

基于细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因的 小蜡螟系统进化分析*

张永红** 朱 峰 唐芬芬 邵榆岚 杨 爽 白兴荣***

(云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 蒙自 661101)

摘 要 【目的】小蜡螟 *Achroia grisella* Fabricius 作为蜂业生产中的主要虫害, 为确认它在鳞翅目昆虫中的遗传地位, 本研究克隆了小蜡螟细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 CO I, 并对其序列进行相关生物信息学分析。【方法】根据 NCBI 已登录鳞翅目昆虫线粒体基因组 mtDNA 中 CO I 基因保守序列设计简并引物, 以小蜡螟基因组为模板进行 PCR, 克隆并测序得到小蜡螟 mtDNA CO I 基因序列 (GenBank 登录号: MF509586)。【结果】对 CO I 基因编码区进行序列分析发现, 其翻译的起始码子为 TTG, 以碱基 T 作为不完全终止; 通过 CO I 基因同源性和遗传距离分析发现, 小蜡螟与大蜡螟 *Galleria mellonella* 同源性最高且遗传距离最近, 分别为 88.3%、0.117。系统进化分析发现, 小蜡螟与其它鳞翅目昆虫聚为一支, 其中蛾科昆虫大蜡螟、小蜡螟、米蛾 *Corcyra cephalonica* 和梢斑螟 *Corcyra cephalonica* 聚在一个小的分支。【结论】小蜡螟与大蜡螟的进化地位最为相近, 也说明了利用 CO I 基因可以区分同属不同种的蜡螟, 研究结果为了了解小蜡螟的遗传背景提供理论基础。

关键词 小蜡螟; CO I 基因; 同源性; 进化分析

Phylogenetic analysis of *Achroia grisella* Fabricius based on the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene

ZHANG Yong-Hong** ZHU Feng TANG Fen-Fen
SHAO Yu-Lan YANG Shuang BAI Xing-Rong***

(Institute of Sericulture and Apiculture, Yunnan Academy of Agricultural Science, Mengzi 661101, China)

Abstract [Objectives] *Achroia grisella* Fabricius (small wax moth) is the main pests in the apiculture industry, in order to confirm its position of the genetic in Lepidoptera insects, cytochrome C oxidase subunit I gene (CO I) of small wax moth was cloned, and analyzed by bioinformatics analysis. [Methods] According to the conserved sequence of mitochondrial genome mtDNA CO I gene was logged in lepidoptera insects in NCBI, the degenerate primers were designed for the study, the genome of small wax moth as a template for PCR, mtDNA CO I sequence (GenBank accession NO. MF509586) of small wax moth was cloned and sequenced. [Results] The sequence analysis of the CO I gene coding region found that the initial code of its translation was TTG, and the base T was not terminated completely. The homology and genetic distance analysis of CO I genes showed that *Galleria mellonella* (greater wax moth) and small wax moth were the most homologous and the genetic distance was 88.3% and 0.117 respectively. Phylogenetic analysis found that the small wax moth and other lepidoptera insects formed a separate clade, this clade gathered in a small branch that include greater wax moth, small wax moth, the rice moth (*Corcyra cephalonica*) and *Corcyra cephalonica*. [Conclusion] *A. grisella* was most closely related to *G. mellonella*, CO I gene was used for distinguishing the different kinds of wax moths from same genus, the research of results provided a theoretical basis for understanding the genetic background of small wax moth.

*资助项目 Supported projects: 现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-22); 国家自然科学基金应急管理项目 (31640080); 云南省农业科学院应用基础研究专项 (YJM201710)

**第一作者 First author, E-mail: zhang200503@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: bxrong3@163.com

收稿日期 Received: 2017-08-25; 接受日期 Accepted: 2018-05-23

Key words *Achroia Grisella* Fabricius; CO I gene; homocology; evolution analysis

小蜡螟 *Achroia grisella* Fabricius 属鳞翅目 Lepidoptera 螟蛾科 Pyralidae 蜡螟亚科 Galleriinae 蜡螟属 *Galleria* Fabricius 昆虫, 其幼虫又称巢虫, 它在我国南方养蜂地区普遍发生, 对蜜蜂造成危害 (文彬, 2008)。目前对小蜡螟的防治方法主要有物理、化学和生物防治 (冯峰, 1998)。小蜡螟生活于蜂箱底部, 以箱底掉落的蜡屑为食, 对蜂群不造成直接危害 (徐祖荫, 1981), 由此小蜡螟关注较少, 加之大小蜡螟在鉴别方便存在一定的混淆, 因此寻找保守基因在小蜡螟物种鉴定和遗传背景方面具有重要的生物学意义。

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 由于具有遵循严格的母系遗传、几乎无重组、结构简单以及在不同的区域进化速度存在差异等优点, 逐渐成为种群遗传学和分子系统发育研究的重要标记。物种鉴定和区分关键在于获得具有种间代表性基因片段的 DNA 条形码, 在分子鉴定工作中使用的常见 DNA 条形码有线粒体 18S rRNA、16S rRNA、12S rRNA、CO (Cytochrome oxidase) 基因等, 其序列长度合适且可以运用通用引物进行扩增, 线粒体基因组中细胞色素氧化酶 I (CO I) 基因是线粒体氧化呼吸链的重要成员 (Hoeh *et al.*, 1996), 其序列已经广泛用于膜翅目昆虫蜜蜂 (Collet *et al.*, 2006)、鳞翅目 (Coates *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2010)、双翅目果蝇 (Clary *et al.*, 1983) 等昆虫近缘种间的鉴定和系统进化研究。

虽然 GenBank 中报道了大蜡螟 *Galleria mellonella* 线粒体基因组全序列 (GenBank 登录号: KT750964), 但小蜡螟线粒体基因组中相关基因还未见报道; 线粒体基因组成具有多态性和异质性, 因此有必要对小蜡螟线粒体基因进行研究。本研究克隆获得小蜡螟 CO I 基因全长序列与其它鳞翅目昆虫进行比较分析; 并进一步探讨了蜡螟的遗传分化程度以及系统进化关系, 为探讨蜂群主要敌害遗传多样性和系统进化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

小蜡螟成虫, 采自云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所西方蜜蜂饲养基地。

PCR 反应体系 (10×PCR buffer、dNTPs 和 Ex-Taq 聚合酶), pMD19-T 载体试剂盒购自大连 TaKaRa 公司, PCR 产物回收试剂盒购自上海生工生物工程公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 已登陆鳞翅目昆虫大蜡螟 *Galleria mellonella* Linne (GenBank 登录号: KT750964)、小菜蛾 *Plutella xylostella* (GenBank 登录号: NC_025322)、家蚕 *Bombyx mori* (GenBank 登录号: AY048187) 基因组设计扩增小蜡螟 CO I 基因的简并引物 (表 1)。

表 1 CO I 基因扩增简并引物序列
Table 1 Degenerate primers sequence used for PCR amplification of CO I gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	扩增子 (bp) Amplicon size
CO I1-F	CTCGTTAATAAATTTACAATTTA YCGC	795
CO I1-R	GGTAAATTARAATATAAACTTC	
CO I2-F	CCWGGATCTYTAATTGGAGA	1 466
CO I2-R	GATAATCCTTTATAAATGGGGT	

1.3 小蜡螟基因组提取

取小蜡螟成虫数只, 用液氮充分研磨, 粉末转移至含 2 mL 基因组抽提液 (10 mmol/L Tris-Cl, pH8.0; 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0; 0.5% SDS) 的离心管中并加入蛋白酶 K 55 水浴消化数小时; 利用 Tris 平衡酚、酚: 氯仿 (1:1), 酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 氯仿各抽提 1 次; 无水乙醇沉淀基因组, 70%乙醇洗涤 DNA, 最后用适量 TE 溶液溶解沉淀, 溶液保存于

- 20 冰箱中备用。

1.4 小蜡螟 CO I 基因克隆

小蜡螟 CO I 基因采用分段式克隆。以小蜡螟基因组作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: 10×PCR Buffer (Mg^{2+}) 5 μ L, dNTPs 4 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 基因组模板 1 μ L, Ex-Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L; 条件如下: 94 预变性 4 min, 94 变性 30 s, 55 30 s, 72 2 min, 35 个循环, 终止延伸 72 10 min。PCR 产物经回收试剂盒纯化, 连接到 pUCm-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α , M13F/M13R 扩增来验证阳性克隆, 将阳性菌液送生工生物工程 (上海) 有限公司测序。

1.5 CO I 基因生物信息学分析

测序结果用 BioXM 2.6 软解进行拼接和分析; 应用 NCBI ORFfinder 在线工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析 CO I 基因的翻译区序列; 应用 DNAMAN 6.0 生物软件进行基因同源性和遗传距离分析; 利用 MEGA4.0 和 GeneDoc 软件对不同昆虫 CO I 基因进行多序列比对; 下载 NCBI 数据库中已登录昆虫 CO I 基因核苷酸序列, 利用 MEGA5.0 (Tamura *et al.*, 2011) 构建系统发生树分析亲缘关系, 其中 Bootstrap 1 000 次重复检验进化树的可靠性。

2 结果与分析

2.1 小蜡螟 CO I 基因的克隆

以小蜡螟基因组为模板, 采用 CO I 基因简并引物进行 PCR 扩增, 分别获得大小约 794 bp 与 1 466 bp 大小的条带 (图 1)。将扩增的两条基因片段进行 T-A 克隆并测序, 根据测序结果得知, 两条基因片段大小为 794 bp、1 466 bp, 序列拼接后提交至 GenBank 数据库并得到 GenBank 登录号 (MF509586)。

2.2 小蜡螟 CO I 基因生物信息学分析

2.2.1 CO I 基因序列分析 通过 ORFfinder 工具预测的 CO I 基因全长为 1 535 bp, 其中 A、T、

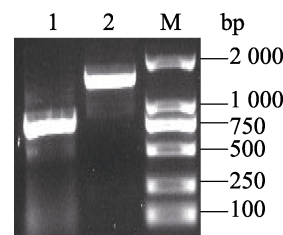


图 1 小蜡螟 CO I 基因 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoretogram of CO I gene PCR product of *Achroia grisella*

M: DL2000 Marker; 1: CO I1-F/R 引物扩增条带;
2: CO I2-F/R 引物扩增条带。

M: DL2000 Marker; 1: PCR amplification of CO I1-F/R primers; 2: PCR amplification of CO I2-F/R primers.

G、C 的含量分别为 30.88%、39.54%、13.49%、16.09%, G+C 含量为 29.58%, A+T 含量显著高于 G+C 含量, 为 70.42%; 符合动物线粒体基因序列的特征。

利用 MEGA4.0 与 GeneDoc 对螟蛾科昆虫 (小蜡螟、大蜡螟、米蛾和梢斑螟) CO I 基因编码区进行多序列比对 (图 2 所示), 大蜡螟 CO I 基因的翻译起始位点为 ATT, 而 ATT 编码甲硫氨酸 Met 是第 5 套遗传密码子 (Code, translatable=5) 与标准遗传密码子 (Standard code) 的主要区别, ATT/ATA 编码异亮氨酸 (Isoleucine, Ile), 为蛋白质翻译起始, 在东、西方蜜蜂 mtDNA CO I 中均有发现。小蜡螟同米蛾、梢斑螟 CO I 基因编码区 5'端高度同源, NCBI ORFfinder 工具预测翻译起始为 TTG, TTG 在标准密码子中编码亮氨酸 (Leucine, Leu), 在离颚细蜂 *Vanhornia eucnemidarum* 中 CO I 基因同样以 TTG 为翻译的起始密码子, 而米蛾 CO I 基因确以 CGA 为起始密码子。多序列比对发现小蜡螟、大蜡螟与米蛾 CO I 基因以 T 作为翻译终止, 这种 3'端不完整的终止密码子现象出现于很多昆虫 mtDNA 中, 而梢斑螟是以 TAA 为终止, 推测 CO I 基因 3'端密码子不完整性可能与细胞质遗传的特殊转录方式有关。

2.2.2 CO I 基因同源性和进化分析 为了解从云南省养蜂场收集到的小蜡螟同其它物种间遗传进化关系, 基于 CO I 基因编码区构建的系统发生树 (图 3) 所示, 进化树以 4 个不同目 (鳞翅目、双翅目、鞘翅目和膜翅目) 的昆虫进行分

中大蜡螟与小蜡螟的亲缘关系最近,遗传距离为 0.117 (如表 2 所示),也充分说明了利用 *CO* I 基因可以区分不同种或者不同地理区域的蜡螟。

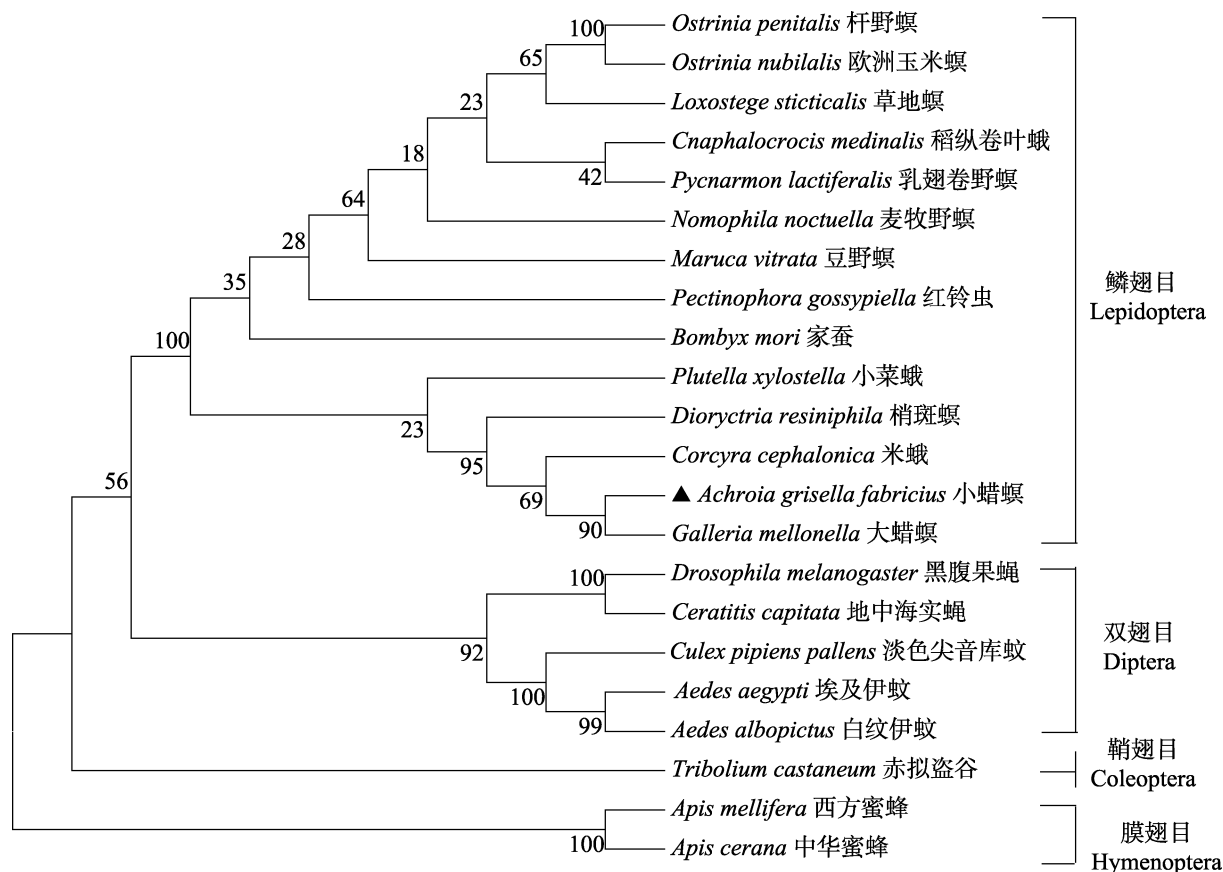


图 3 小蜡螟和其他昆虫基于 CO I 基因的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of CO I gene from *Achroia grisella fabricius* and other insects

Ostrinia penitalis: 杆野螟 (KM395814); *Ostrinia nubilalis*: 欧洲玉米螟 (AF442957); *Loxostege sticticalis*: 草地螟 (KR080490); *Cnaphalocrocis medinalis*: 稻纵卷叶蛾 (JN246082); *Pycnarmon lactiferalis*: 乳翅卷野螟 (KX426346); *Nomophila noctuella*: 麦牧野螟 (KM244688); *Maruca vitrata*: 豆野螟 (KP327715); *Pectinophora gossypiella*: 红铃虫 (KM225795); *Bombyx mori*: 家蚕 (AY048187); *Plutella xylostella*: 小菜蛾 (NC_025322); *Dioryctria resiniphila*: 梢斑螟 (AJ871091); *Corcyra cephalonica*: 米蛾 (HQ897685); *Achroia grisella fabricius*: 小蜡螟 (MF5095586); *Galleria mellonella*: 大蜡螟 (KT750964); *Drosophila melanogaster*: 黑腹果蝇 (U37541); *Ceratitis capitata*: 地中海实蝇 (NC_000857); *Culex pipiens pallens*: 淡色尖音库蚊 (KT851543); *Aedes aegypti*: 埃及伊蚊 (EU352212); *Aedes albopictus*: 白纹伊蚊 (AY072044); *Tribolium castaneum*: 赤拟盗谷 (KM009121); *Apis mellifera*: 西方蜜蜂 (KT164631); *Apis cerana*: 中华蜜蜂 (GQ162109)。

表 2 螟蛾科昆虫 CO I 基因同源性和遗传距离

Table 2 Homology and genetic distance of CO I gene from pyralidae insects

	<i>Achroia grisella</i>	<i>Galleria mellonella</i>	<i>Corcyra cephalonica</i>	<i>Dioryctria resiniphila</i>
<i>Achroia grisella</i>	—	0.117	0.128	0.126
<i>Galleria mellonella</i>	88.3	—	0.111	0.112
<i>Corcyra cephalonica</i>	87.2	88.9	—	0.107
<i>Dioryctria resiniphila</i>	87.4	88.8	89.3	—

3 结论与讨论

在蜂群中,小蜡螟取食蜂箱底部碎屑,对蜂

群危害不及大蜡螟,由此小蜡螟的关注较少,但是由于蜜蜂的饲养过程中,难免存在大量闲置的蜂巢存在,加之羽化的蜡蛾具有一定飞翔能力,

蛾子在搁置的蜂巢中产卵,当种群繁殖至一定数量同样给蜂群造成严重危害,因此有必要对小蜡螟进行研究。在云南省西方蜜蜂饲养基地闲置蜂箱中滋生了大量的大蜡螟和小蜡螟,基于 CO I 基因编码区构建进化树,进化树中大蜡螟与小蜡螟的亲缘关系最近,遗传距离为 0.117,也充分说明了 mtDNA 中 CO I 基因可用于区分不同蜡螟种群的遗传关系。

动物线粒体基因组基因序列典型特征为 A、T 含量较高(Boore, 1983),本文成功克隆得到的小蜡螟 CO I 基因中 A、T、G、C 的含量分别为 30.88%、39.54%、13.49%、16.09%, A+T 含量显著高于 G+C 含量。小蜡螟 CO I 基因编码区经 NCBI ORFfinder 工具预测翻译起始为 TTG, TTG 在标准密码子中编码亮氨酸(Leucine, Leu),基因编码以“ATN”的经典模式为起始密码子,家蚕线粒体全基因组中共有 13 个蛋白质编码基因,这些编码基因所使用的起始密码子在基因组中出现的次数 ATA(4 个)、ATT(3 个)、ATG(5 个),未发现 ATC(鲁成等, 2002),这些起始密码子在大蜡螟和其它昆虫 mtDNA 也出现。同作为螟蛾亚科昆虫大蜡螟 CO I 基因以 ATT 作为翻译起始,在东、西方蜜蜂 mtDNA CO I 中均有发现(Crozier *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2011)。多序列比对结果(图 2)发现,小蜡螟同米蛾、梢斑螟 CO I 基因编码区 5' 端高度同源,其中米蛾 CO I 基因以 CGA 为起始密码子(Wu *et al.*, 2012),小蜡螟 CO I 基因经 NCBI ORFfinder 工具预测翻译起始为 TTG,在离颚细蜂 *Vanhornia eucnemidarum* 中 CO I 基因同样以 TTG 为翻译的起始密码子(Castro *et al.*, 2006)。多序列比对发现小蜡螟、大蜡螟与米蛾 CO I 基因以 T 作为翻译终止,这种基因的 3' 端终止密码子不完整可能是 3' 端与 tRNA 紧密相连或重叠造成的(Wolstenholme, 1992); Ojala 等(1981)认为这种不完全的终止结构是由转录过程中 mRNA 的 3' 端 PolyA 所补全。小蜡螟 CO I 的起始还不能确定并且 3' 端翻译终止不完整性的机制还有待进一步确认。

线粒体包含的遗传信息作为母性遗传,它也

具有区别于细胞核基因的各方面优势, mtRNA 中的基因无论片段大小、进化程度均符合近缘及种内群体间的遗传关系分析。昆虫线粒体基因组 mtDNA 包括 13 个蛋白质编码基因,常用于昆虫种间系统发育分析的基因有细胞色素 c 氧化酶亚基基因 CO(CO I 与 CO II)、核糖体基因(12S rRNA 与 16S rRNA)、NADH 降解酶基因(ND5) (王德明和林杨, 2010),小蜡螟为养蜂产业中的主要虫害,为确认它在鳞翅目昆虫中的遗传地位,本研究克隆了小蜡螟细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 CO I,并对其序列进行相关生物信息学分析,为了解小蜡螟的遗传背景提供了一定的理论基础。虽然 mtDNA CO I 回答了小蜡螟在昆虫中的进化关系,下一步有三个方面的问题有待验证:首先, mtDNA 基因组中 CO、核糖体、降解酶基因同样高度保守,本研究未进行这些基因的克隆与分析,这些基因用于进化得出的结论可能不同或者产生矛盾;其次,进化分析是以 CO I 基因的整个编码区作为对象,由于不同昆虫的翻译起始和终止不同,是否考虑基因 5' 和 3' 端的非编码区在内,这样得出的进化树分支上的节点数或可行度可能会更高;最后,本研究中样本的选取。在实验样品采集过程中将雌雄成虫个体混搭进行基因组抽提,值得深究的问题是:线粒体基因组作为细胞质遗传, mtDNA 各编码基因在雌雄个体、组织间是否会存在一定的差异。

参考文献 (References)

- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Castro LR, Ruberu K, Dowton M, 2006. Mitochondrial genomes of *Vanhornia eucnemidarum* (Apocrita: *Vanhorniidae*) and *Primeuchroeus* spp. (Aculeata: *Chrysididae*): Evidence of rearranged mitochondrial genomes within the Apocrita (Insecta: *Hymenoptera*). *Genome*, 49(7): 752–766.
- Clary DO, Wahleithner JA, Wolstenholme DR, 1983. Transfer RNA genes in *Drosophila* mitochondrial DNA: related 5' flanking sequences and comparisons to mammalian mitochondrial tRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 11(8): 2411–2425.
- Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, 2004. Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia*

- nubilalis* (European corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplotypes. *Journal of Insect Science*, 4(1): 35–43.
- Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AEE, Lama MAD, 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA CO I-CO II patterns. *Heredity*, 97(5): 329–335.
- Crozier RH, Crozier YC, 1993. The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics*, 133(1): 97–117.
- Feng F, 1998. Biology and control of *Galleria*. *Journal of Bee*, 1998(8): 20–20. [冯峰, 1998. 蜡螟的生物学及防治. 蜜蜂杂志, 1998(8): 20–20.]
- Hoeh WR, Stewart DT, Sutherland BW, Zouros E, 1996. Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology & Evolution*, 13(2): 418–421.
- Lu C, Liu YQ, Liao SY, Li B, Xiang ZH, Han H, Wang XG, 2002. Complete sequence determination and analysis of *Bombyx mori* mitochondrial genome. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 10(2): 163–170. [鲁成, 刘运强, 廖顺尧, 李斌, 向仲怀, 韩华, 王学刚, 2002. 家蚕线粒体基因组全序列测定与分析. 农业生物技术学报, 10(2): 163–170.]
- Ojala D, Montoya J, Attardi G, 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290(5806): 470–474.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Tan HW, Liu GH, Dong X, Lin RQ, Song HQ, Huang SY, Yuan ZG, Zhao GH, Zhu XQ, 2011. The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE*, 6(8): e23008.
- Wang DM, Lin Y, 2010. Application of mitochondrial DNA gene order in molecular systematics of insects. *Guangdong Agricultural Sciences*, 37(6): 188–190. [王德明, 林杨, 2010. 线粒体 DNA 基因序列在昆虫分子系统学研究中的应用. 广东农业科学, 37(6): 188–190.]
- Wen B, 2008. *Achroia Grisella* Fabricius and *Galleria mellonella* Linne. *Apiculture of China*, 59 (7): 29–29. [文彬, 2008. 大蜡螟与小蜡螟. 中国蜂业, 59(7): 29–29.]
- Wolstenholme DR, 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, 141(6): 173–216.
- Wu YP, Li J, Zhao JL, Su TJ, Luo AR, Fan RJ, Chen MC, Wu CS, Zhu CD, 2012. The complete mitochondrial genome of the rice moth, *Corcyra cephalonica*. *Journal of Insect Science*, 12(72): 1–14.
- Xu ZY, 1981. Determination of *Achroia Grisella* Fabricius and *Galleria mellonella* Linne. *Apiculture of China*, 1981(6): 7–8. [徐祖荫, 1981. 大小蜡螟的鉴别. 中国蜂业, 1981(6): 7–8.]
- Yin J, Hong GY, Wang AM, Cao YZ, Wei ZJ, 2010. Mitochondrial genome of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and comparison with other Lepidopterans. *Mitochondrial DNA*, 21(5): 160–169.