

大蚕蛾科绢丝昆虫线粒体基因组 A + T 丰富区序列及其系统发育研究

沈兴家^{1,2}, 陈丽媛^{1,2}, 唐顺明^{1,2}, 孙孝龙³, 赵巧玲^{1,2}, 朱晨^{1,2}, 郭锡杰^{1,2}

(1. 江苏科技大学, 江苏 镇江 212003)

(2. 中国农业科学院 蚕业研究所 农业部家蚕生物技术重点开放实验室, 江苏 镇江 212018)

(3. 盐城生物工程高等职业技术学校, 江苏 盐城 224731)

摘要: 为了研究大蚕蛾科绢丝昆虫的进化关系, 分别从蓖麻蚕、樗蚕和柳蚕的蛹中提取线粒体 DNA, 用 PCR 方法扩增线粒体 A + T 丰富区及侧翼序列, 克隆到 pMD18 - T 载体, 进行序列测定. 序列分析表明, 克隆片段的基因依次为 12S rRNA 基因 3' 端、A + T 丰富区、tRNA^{Met}、tRNA^{Ile}、tRNA^{Gln} 和 ND2 基因 5' 端, 与家蚕和野桑蚕 mtDNA 排列顺序相同; 在 tRNA^{Gln} 和 ND2 基因之间有一段非编码区. 根据柳蚕 3 个 tRNA 基因的核苷酸序列推定了其二级结构. 基于 5 种大蚕蛾科绢丝昆虫和家蚕 mtDNA A + T 丰富区序列的系统发育树显示, 柳蚕与蓖麻蚕、樗蚕的亲缘关系较近, 与柞蚕的亲缘关系较远, 而与家蚕的亲缘关系更远. 本研究结果有助于阐明大蚕蛾科绢丝昆虫以及家蚕的起源和进化.

关键词: 大蚕蛾科; 非家蚕; 线粒体 DNA; A + T 丰富区; 系统发育树

中图分类号: S881.2; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1673 - 4807(2008)03 - 0066 - 06

Study on nucleotide sequences in A + T-rich regions of mitochondrial DNAs from silkmoths of saturniidae and their molecular phylogeny

SHEN Xingjia^{1,2}, CHEN Liyuan^{1,2}, TANG Shunming^{1,2}, SUN Xiaolong³,
ZHAO Qiaoling^{1,2}, ZHU Chen^{1,2}, GUO Xijie^{1,2}

(1. Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212003, China)

(2. The Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

(3. Yancheng Higher Vocational School of Bioengineering, Yancheng Jiangsu 224731, China)

Abstract: To study the phylogeny of silkmoths of Saturniidae, the mitochondrial DNAs (mtDNAs) were extracted from the pupa of *Philosamia cynthia ricini*, *Philosamia cynthia* and *Actias selene ningdoana* respectively. The A + T-rich regions and flanking sequences were amplified with the polymerase chain reaction (PCR) method, and cloned into the pMD18 - T vector and then sequenced. Results from sequence analysis show that gene orders in all cloned fragments are 3' - end portion of 12S rRNA, A + T - rich region, tRNA^{Met}, tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} and 5' - end portion of ND2, which are the same as those of *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*. Between tRNA^{Gln} and ND2 there is a non - coding region. The secondary structures of three tRNAs of *A. s. ningdoana* are deduced based on the nucleotide sequences. The phylogenetic tree based on the A + T-rich regions from 5 species of Saturniidae and 2 varieties of *B. mori* reveals that *A. s. ningdoana* is closer to *P. c. ricini* and *P. c. cynthia*, a little far from *Antheraea pernyi*, but remote to *B. mori* in blood relationship. These results will benefit to the study of the origins and the molecular evolution of Saturniidae insects as well as *B. mori*.

Key words: saturniidae; non-mulberry silkworms; mitochondrial DNA; A + T-rich region; phylogenetic tree

收稿日期: 2007 - 12 - 03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”资助项目(2005CB121000)

作者简介: 沈兴家(1963 -),男,浙江嵊州人,研究员,博士生导师,研究方向为家蚕生物化学与分子生物学. E-mail: shenxj@srcaas.com

0 引言

我国吐丝昆虫资源丰富,除了家蚕,还有多种野生、半野生和已经驯化家养的其他蚕类,如人工饲养的蓖麻蚕(*Philosamia cynthia ricini*)、放养的柞蚕(*Antheraea pernyi*)、野生的樗蚕(*Philosamia cynthia cynthia*)、柳蚕(*Actias selene ningdoana*)等等。这些蚕类同属鳞翅目大蚕蛾科(*Saturniidae*),联合国粮农组织将这类野蚕命名为“非家蚕”(non-mulberry silkworms)^[1]。我国对家蚕以外的绢丝昆虫的利用已经有悠久的历史。目前,柞蚕和蓖麻蚕作为绢丝昆虫在国内外已经得到了很好地利用,在形态学、遗传学和病虫害防治等方面有大量的研究,对蓖麻蚕等的分子进化也有研究报道^[2-3]。但对樗蚕和柳蚕的研究多侧重于形态学或蛋白质等方面^[4-5],鲜见分子进化研究报道。

A + T 丰富区是动物线粒体基因组序列和长度变异最大的区域^[6-10]。虽然昆虫线粒体 A + T 丰富区的位置以及保守序列与脊椎动物不同,但是它们对昆虫 mtDNA 的复制起着同样重要的作用^[6, 9-10]。对蓖麻蚕、樗蚕和柳蚕线粒体 A + T 丰富区的研究,有助于阐明大蚕蛾科绢丝昆虫以及家蚕的起源和进化。本试验分别以蓖麻蚕、樗蚕和柳蚕的蛹为材料提取线粒体 DNA (mtDNA),克隆了 mtDNA 的 A + T 丰富区及侧翼序列,并结合 GenBank 公布的柞蚕 mtDNA 相应序列,利用 Phylip 进化分析软件等构建了系统发育树,对大蚕蛾科绢丝昆虫几种绢丝昆虫线粒体 A + T 丰富区的多样性和系统发育进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 生物材料与试剂

试验用的蓖麻蚕品种海黄由中国农业科学院蚕业研究所保存,樗蚕采自研究所桑园和林地,柳蚕采自江苏省盐城地区。宿主菌 *E. coli* DH10B 由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T, Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa(大连)公司产品。其它主要试剂为 GibcoBRL 公司产品。核苷酸引物合成、测序均委托上海生物工程技术有限公司完成。

1.2 mtDNA 的抽提和 A + T 丰富区及其侧翼序列的克隆

分别以蓖麻蚕、樗蚕和柳蚕的蛹为材料,参照文献[11]的方法提取 mtDNA,溶于适量 pH 8.0 的 0.1 × TE 中, -20℃ 保存备用。参照 GenBank 已发表的家蚕 mtDNA 控制区侧翼序列(AB070264),设计 1 对 PCR 引物: P1 (5' - AAGGATCCGTATAACCGCAACTGCTGGCA - 3') 和 P2 (5' - GATCTAGATGAGTTT GAAATTAGGGGGAT - 3'),分别以这 3 种绢丝昆虫 mtDNA 为模版,按照文献[10]的方法克隆 A + T 丰富区及侧翼序列。

1.3 序列分析

测序结果用 Blast 在线同源性查询软件在 NCBI 等数据库进行搜索,用 DNASTar 5.0 软件包中的 EditSeq 软件和目测进行序列拼接。

1.4 系统发育分析

根据蓖麻蚕、樗蚕和柳蚕线粒体 A + T 丰富区序列,以及本实验室先前克隆的家蚕(*Bombyx mori*)大造和甘肃种该区序列^[10],结合 GenBank 登录的颇洛柞蚕(*Antheraea proyei*)和中国柞蚕(*Antheraea pernyi*) mtDNA 的相应序列(DQ415454; DQ415455),以黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)为外群(NC - 001709),用 Phylip3.66 DNAML(最大可能性法)软件构建进化树,以二元法计算遗传距离,采用 Bootstrapping 法对进化树(1000 个重复)进行评估。

2 结果与分析

2.1 mtDNA A + T 丰富区及其侧翼片段的克隆

以蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕 mtDNA 为模板的 PCR 扩增结果,得到大小约为 1 kb 的条带(图 1). 将 PCR 产物分离纯化后的克隆到 pMD18-T 载体上,转化感受态 *E. coli* DH10B,获得重组质粒;再用 PCR 确证后测序.

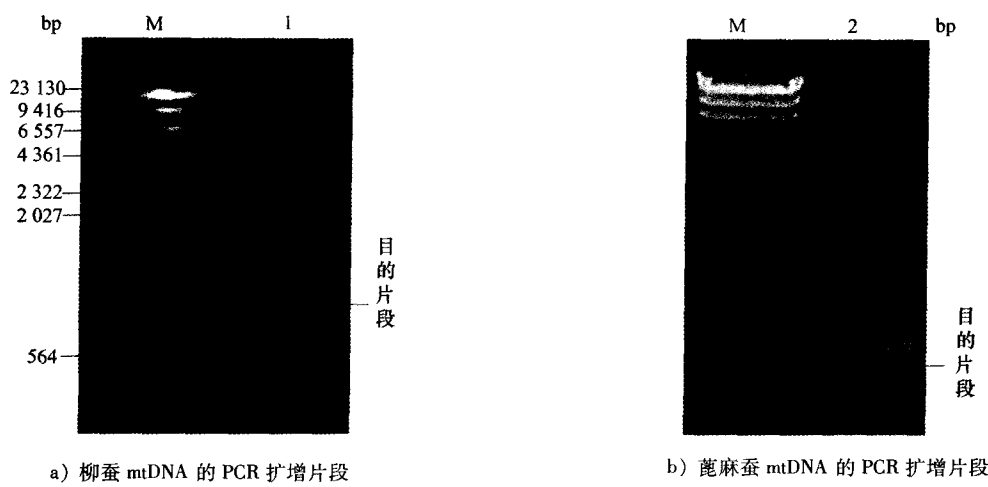


图 1 柳蚕和蓖麻蚕 mtDNA A + T 丰富区及其侧翼片段的 PCR 扩增

Fig. 1 Amplification of A + T-rich regions and their flanks from mtDNAs of *Actias selene ningdoana* and *Philosamia cynthia ricini* by PCR respectively

2.2 克隆片段的序列分析

2.2.1 核苷酸序列及其基因排列

测序结果显示,克隆的蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕 mtDNA 片段长度分别为 951 bp、952 bp 和 930 bp(图 2),其中蓖麻蚕和柞蚕相应序列已在 GenBank 登录(EF437419,EF437418).

经与 GenBank 登录的家蚕和野桑蚕 mtDNA 序列比对分析,3 个克隆片段包含的基因数及顺序都相同,依次为 12S rRNA 基因 3' 端部分、A + T 丰富区、tRNA^{Met}、tRNA^{Ile}、tRNA^{Gln}和 ND2 基因 5' 端部分,tRNA^{Gln}和 ND2 基因之间分别有一段非编码区(表 1).

表 1 蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕线粒体 A + T 丰富区及其侧翼片段的基因排列

Tab. 1 Gene order of A + T-rich regions of mitochondrial DNA from *Philosamia cynthia cynthia*, *Philosamia cynthia ricini* and *Actias selene ningdoana*

物种名	基因/bp					
	12S rRNA 3' - 端	A + T 丰富区	tRNA ^{Met}	tRNA ^{Ile}	tRNA ^{Gln} 互补链	ND2 5' - 端
蓖麻蚕	1 ~ 168	169 ~ 526	527 ~ 597	596 ~ 660	658 ~ 726	808 ~ 910
柞蚕	1 ~ 167	168 ~ 525	526 ~ 595	594 ~ 658	656 ~ 724	808 ~ 909
柳蚕	1 ~ 167	168 ~ 508	509 ~ 575	577 ~ 641	639 ~ 707	787 ~ 888

注:表中数据为克隆片段长度扣除 5'端和 3'端 PCR 引物后的值.

2.2.2 序列同源性分析

将蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕线粒体克隆片段扣除 5' - 端和 3' - 端 PCR 引物后用 DNASTAR 5.0 软件包中的 MegAlign 软件进行同源性比较,结果表明蓖麻蚕与柞蚕该区段同源性达到 97.2%;柳蚕与二者同源性也均达到了 85%,说明 A + T 丰富区及侧翼序列在大蚕蛾科品种之间还是相对保守的. 其中,蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕三者之间 12S rRNA 基因 3'端相似性为 85.6% 以上,但其物种间保守程度不如家蚕品种内高^[10].

1	CAAAATTAGT	TATTAATTTT	AATATTACTA	AATCTTAATT	TCTTAAATTT
2		...G.....	T.C.....	.G.....	G.....
3					
1	TTAATATTAA	TTACTACTTC	TATCCTTTAA	ATATTATCCA	AATAATTAAA
2		 ^T	.. ^{TA}	CC.....TT.	G.....
3	CAT	..A-A.....	CC.....TT.	G.....	G.....
1	ATTTACCACT	AAAATTTTATA	TGTAAAATAA	ACTCATATTA	AATTCCTTTA
2	 ^G	G.....	G.....	GT.C...A..	 ^T -.....
3	A.....	G.....	G.....	GT.C...A..	T-.....
1	AACATAAA-A	AATTTATTTA	TATATGAAAT	TTTACACATA	GATTTTTTTT--
2			.. ^G	.. ^T	CT
3	...C.....G.		TCGCA..T.	..TTG.....	CT
1	--TTTTTTTTT	TTTTTATATT	AAAATATTTA	ATGTATATAT	AATTATTTAA
2	TT.....			..A.....	--
3	TT.....			..A.....	--
1	TAATTTAAAA	TATGTCTATA	AATCAATTAA	TAATTTCTTT	CTTTTTTTCT
2					
3	-----	-----	-----		
1	TCATAATATT	AAATGTAAAT	ATAAAATGGC	TATATAAAAT	TTTATAATTT
2				G...	..G.....
3				G...	..G.....
1	AGCCAAA-TT	ATATTATATT	AAAATAATTA	ATATTAATTT	TTTCAATAAT
2	..AAA...A..	..TAA.A...			G.T..
3	..AAA...A..	..TAA.A...			G.T..
1	TTATTATATT	ATATATATAT	ATATATACAT	TAAATATTTA	ATATAATAAA
2					C.....
3			GT-		C.....
1	ATAAAATTTT	AGAAGTCTTA	TACTAATAAA	TTAGTATAAA	ACCGTATATA
2	T...T...T	TT.GA. ^T	..A... ^C	..CG.GTCC..	A.
3	T...T...T	TT.GA.A..C	..A...A...	..CG.GTCC..	A.
1	ATAATTTTTT	CTATAAATAT	AAAAT-----	----GTAAAA	ATTAAAAATA
2	TT.....C	AC.....G.A	...GAAAAG	GAAA.A....	
3	TT.....C	AC.....G.A	...GAAAAG	GAAA.A....	
1	AGCTAAATTT	AAGCTTTTGG	GTTTCATACCT	CAAATATAAA	GATTCTTCTT
2	-C..		.C.....G	...G.....	.GAA.....
3	-C..		.C.....G	...G.....	.GAA.....
1	TTTTTTAAGG	AATAAAGTGC	CTGATTAAAG	GATTATTCTG	ATAGGATAAA
2	 ^A				
3	AT				
1	TTAAGTAGAA	ATTCTACCTT	TATTATATTT	TATAGAATTA	AACTATACCT
2			 ^C		T..
3	TT	T.....	..C...T..		T..
1	AATAGTATCA	AAAACATATTG	TGCATCTTAC	ACTAAAATAT	AATTCTCTAG
2		C..			T.-..T
3		C..			T.-..T
1	AATAAAGAAC	TTATAATTCT	CCTTATTTAA	ATAATAATAT	--TTTAAATT
2		..A...A..	.. ^C	..C.A.T.T.	AT.....
3	T...T	..A...A..	--.....	..C.A.T.T.	AT.....
1	TACTTTTTTAA	ACAATTCCAA	TAAAATATTT	TTTTCTTTTA	TTCTTTTTTTT
2	C...	.T.....T..		...AT.....	
3	C...	.T.....T..		...AT.....	
1	TAGAACATTA	ATTTCAATTT	CTTCAAATTC	TTGATTGGT	TGTTGAATTG
2	A..	...G.T....	.C.....	G	
3	A..	...G.T....	.C.....	G	
1	GCTTAGAAAT	TAATCTATTA	AGATTTA		
2					
3		.C...T....			

注:1,2,3 分别代表蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕,“-”表示核苷酸缺失,“.”表示核苷酸相同。

图2 蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕线粒体 A + T 丰富区及其侧翼序列

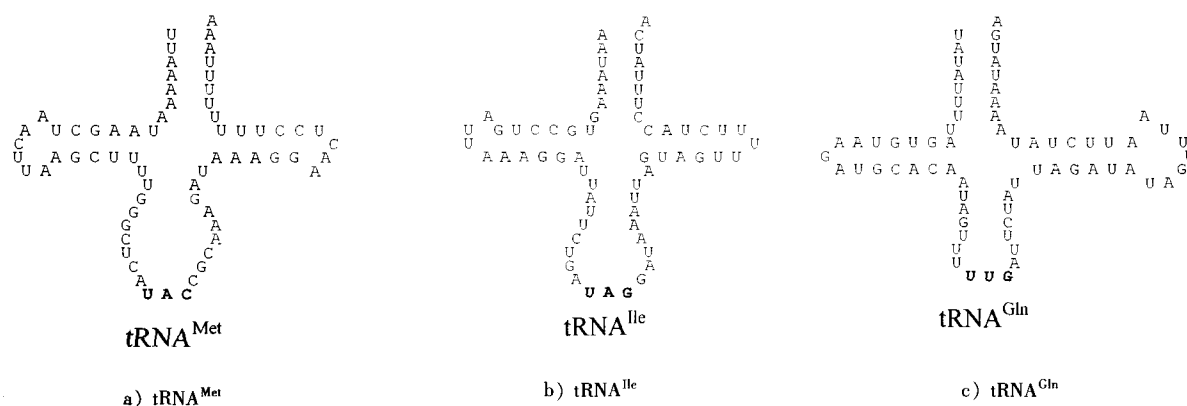
Fig. 2 A + T-rich regions and their flanks of mtDNAs from *Philosamia cynthia ricini*, *Philosamia cynthia cynthia* and *Actias selene ningdoana*

动物 mtDNA 控制区因富含 A 和 T, 被称为 A + T 丰富区, 它是线粒体基因组序列和长度变异最大的区域. 供试大蚕蛾科绢丝昆虫中: 蓖麻蚕 A + T 丰富区共计 358 bp, (A + T) 比例高达 91.3%; 柞蚕 A + T 丰富区共计 358 bp, (A + T) 比例高达 90.8% 以上; 柳蚕 A + T 丰富区共计 341 bp, (A + T) 比例 88.6%. 蓖麻蚕与柞蚕该区段同源性达到 97.8%; 但是柳蚕与二者同源性均不足 80.5%.

线粒体基因组中 *ND2* 基因是最保守的基因^[10,12], 蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕三者该区段相似性为 91% 以上, 说明该区段在大蚕蛾科绢丝昆虫间也是高度保守的.

2.2.3 tRNA 基因及其二级结构

克隆片段中有 3 个 tRNA 基因: tRNA^{Met} (AUG)、tRNA^{Ile} (AUC) 和 tRNA^{Gln} 互补链 (CAA), 基因之间有 2~3 bp 的重叠. 线粒体 tRNA 也能形成典型的三叶草形结构, 根据柳蚕线粒体 tRNA 基因的核苷酸序列, 推测了其编码的 tRNA 二级结构, 如图 3 所示, 碱基对存在错配现象.



注: 粗体字母表示反密码子.

图 3 推定的柳蚕 3 个 tRNA 的二级结构

Fig. 3 Putative secondary structures of three tRNAs from mtDNA of *Actias selene ningdoana*

2.3 系统发育分析

以黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 为外群, 用 Phylip3.66 DNAML (最大可能性法) 软件构建基于 A + T 丰富区序列系统发育树, 以二元法计算遗传距离, 采用 Bootstrapping 法对系统树 (1000 个重复) 进行评估 (见图 4).

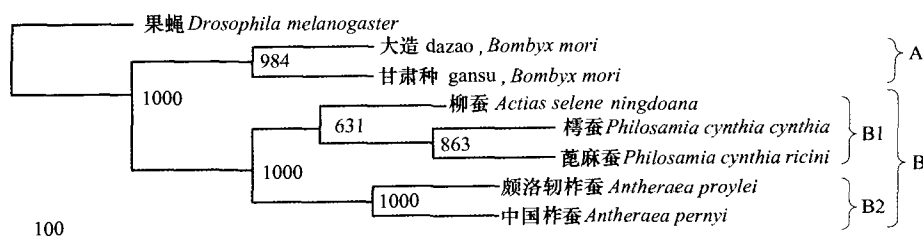


图 4 最大可能性法构建的大蚕蛾科昆虫线粒体 A + T 丰富区的系统发育树

Fig. 4 ML tree based on sequences of A + T-rich regions of mitochondrial DNAs from Saturniidae insects

在系统发育树中, 除去外群, 两个家蚕品种聚为一个群 A, 柳蚕、蓖麻蚕、柞蚕和柞蚕聚为一个群 B. 在 B 群中, 柳蚕、蓖麻蚕和柞蚕聚为一亚群 B1, 柞蚕聚为另一个亚群 B2. 在 B1 亚群中, 蓖麻蚕和柞蚕聚为一群. 说明在所研究的大蚕蛾绢丝昆虫中柳蚕, 蓖麻蚕和柞蚕三者之间的亲缘关系相对较近, 与柞蚕相对较远, 蓖麻蚕和柞蚕的亲缘关系最为接近.

3 结 论

蓖麻蚕、柞蚕和柳蚕线粒体 A + T 丰富区序列是克隆片段中序列和长度变异最大的区域, 三者该区

段(A + T)比例均高达88%以上。正是由于该区段在所克隆的序列中发生碱基转换和颠换的数目较多,同源性最低仅为80.5%,因此选择该区段构建进化树用于分析大蚕蛾科绢丝昆虫间的物种进化关系。

基于大蚕蛾科绢丝昆虫线粒体 A + T 丰富区构建的 ML 系统树表明:在所研究的大蚕蛾科绢丝昆虫中蓖麻蚕与柞蚕在进化关系上最为接近,与形态学分类相符^[1],也与通过卵黄原蛋白一级结构特性分析得出的结论一致^[4];在系统树中,柳蚕与蓖麻蚕、柞蚕归属于同一亚群,说明其亲缘关系相对较近,但细胞核型分析显示柳蚕与蓖麻蚕、柞蚕的染色体数目不同,柳蚕 $n = 31$,蓖麻蚕雄 $2n = 28$ 雌 $2n = 27$,柞蚕 $2n = 26$ 或 $2n = 28$ ^[1, 5, 13, 14],因此,对于它们三者之间的进化关系还需要作进一步研究;柳蚕、蓖麻蚕和柞蚕三者与柞蚕的亲缘关系相对较远,这四者之间的分子进化关系也有待于更多更详细的研究证明。

参考文献 (References)

- [1] 吕鸿声. 中国养蚕学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991.
- [2] 魏兆军,赵巧玲,张志芳,等. 蓖麻蚕线粒体基因组细胞色素氧化酶亚基Ⅲ的序列及其分子进化分析[J]. 昆虫学报,2002,45(2):193-197.
Wei Zhaojun, Zhao Qiaoling, Zhang Zhifang, et al. Characterization of the cytochrome oxidase subunit Ⅲ gene of mitochondrial DNA from the eri silkworm *Samia cynthia ricini* [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(2):193-197. (in Chinese)
- [3] Shen Xingjia, Zhao Qiaoling, Zhang Zhifang, et al. Cytochrome subunit b and NADH oxido-reductase subunit I genes of mitochondrial genome from the eri silkworm, *Samia cynthia ricini* and phylogenetic analysis [J]. *International Journal of Wild Silkworm and Silk*, 2003, 8: 51-56.
- [4] 王磊,刘朝良. 绢丝昆虫卵黄原蛋白一级结构的特性分析[J]. 蚕业科学,2005,31(4):482-485.
Wang Lei, Liu Chaoliang. Characterization of the primary structures of vitellogenins from the silk insects [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2005, 31(4):482-485. (in Chinese)
- [5] 常平安,宋方洲,童建松,等. 蓖麻蚕染色体的核型研究[J]. 蚕业科学,2002,28(3):190-193.
Chang Ping'an, Song Fangzhou, Tong Jiansong, et al. Studies on the Karyotype of the *Philosamia cynthia ricini* [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2002, 28(3):190-193. (in Chinese)
- [6] Saito S, Tamura K, Aotsuka T. Replication origin of mitochondrial DNA in insects [J]. *Genetics*, 2005, 171(4):1695-1705.
- [7] Inohira K, Hara T, Matsuura ET. Nucleotide sequence divergence in the A + T-rich region of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana* [J]. *Mol Biol Evol*, 1997, 14(8):814-822.
- [8] Tsujino F, Kosemura A, Inohira K, et al. Evolution of the A + T-rich region of mitochondrial DNA in the melanogaster species subgroup of *Drosophila* [J]. *J Mol Evol*, 2002, 55(5):573-583.
- [9] Lewis DL, Farr CL, Farouhar AL, et al. Sequence, organization, and evolution of the A + T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA [J]. *Mol Biol Evol*, 1994, 11(3):523-538.
- [10] 陈丽媛,赵巧玲,沈兴家,等. 家蚕地方品种线粒体基因组 A + T 丰富区的序列及分子进化分析[J]. 蚕业科学,2007,33(1):5-13.
Chen Liyuan, Zhao Qiaoling, Shen Xingjia, et al. Nucleotide sequences in the A + T-rich regions of mitochondrial DNA from local races of *Bombyx mori* and their molecular evolution [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2007, 33(1):5-13. (in Chinese)
- [11] Tamura K, Aotsuka T. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure [J]. *Biochemical genetics*, 1988, 26(11/12):815-819.
- [12] Arunkumar KP, Metta M, Nagaraju J. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkworm, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 40(2):419-27.
- [13] 张果. (蓖麻蚕蛾 × 柞蚕蛾) F1 受精卵的细胞学观察 [J]. 蚕业科学, 1986(2):114-116.
- [14] 宋方洲,蒋同庆,向仲怀. 绢丝昆虫柳天蚕细胞遗传学的研究 [J]. 蚕丝通讯, 1990(1):2-7.

(责任编辑:顾琳)