



绿眼赛茧蜂线粒体基因组全序列测定和分析

王丹阳¹, 王予彤^{1,2}, 于良斌¹, 韩海斌¹, 徐林波^{1,*}, 崔艳伟¹,
康爱国³, 庞红岩³

(1. 中国农业科学院草原研究所, 呼和浩特 010020; 2. 内蒙古农业大学, 呼和浩特 010020;
3. 河北省张家口市康保县植保站, 河北张家口 076650)

摘要:【目的】测定绿眼赛茧蜂 *Zele chlorophthalmus* 线粒体基因组全序列, 分析其基因组结构及茧蜂科(Braconidae)部分类群的系统发育关系。【方法】利用 Illumina MiSeq 二代测序技术对绿眼赛茧蜂的线粒体基因组进行测序, 对基因组序列进行拼装、注释, 分析其结构特点和碱基组成; 基于 22 种茧蜂科昆虫的 COX1 蛋白编码基因序列, 应用最大似然法(ML)和邻接法(NJ)构建系统发育树, 分析绿眼赛茧蜂与茧蜂科其他昆虫的系统发育关系。【结果】绿眼赛茧蜂线粒体基因组全长 16 661 bp(GenBank 登录号: MG822749), 包含 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因, 共 37 个基因, 以及 1 个控制区。线粒体基因组有明显的核苷酸组成的偏倚, AT 偏正, GC 偏负, 其 A + T 含量为 82.83%。基因排列顺序与推测的昆虫祖先的序列不完全一致, tRNA 基因 7 处发生重排。13 个蛋白质编码基因均以 ATN 为起始密码子, 以 TAA 为终止密码子。在 22 个 tRNA 基因二级结构中, 除 tRNA^{His(H)} 缺失 TΨC 环和 tRNA^{Cys(C)} 仅剩二氢尿嘧啶(DHU)臂和反密码子臂外, 其余 tRNA 基因均能形成典型的三叶草结构。基于 COX1 蛋白编码基因的系统发育分析结果显示, 与绿眼赛茧蜂亲缘关系最近的是同属于赛茧蜂属的雪跗赛茧蜂 *Z. niveitarsis*。【结论】本研究首次获得绿眼赛茧蜂线粒体基因组全序列。结果表明绿眼赛茧蜂隶属于优茧蜂亚科(Euphorinae)赛茧蜂属, 并支持赛茧蜂属的单系性。

关键词: 茧蜂科; 优茧蜂亚科; 绿眼赛茧蜂; 线粒体基因组; 系统发育

中图分类号: Q969.54 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)08-1028-11

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Zele chlorophthalmus* (Hymenoptera: Braconidae)

WANG Dan-Yang¹, WANG Yu-Tong^{1,2}, YU Liang-Bin¹, HAN Hai-Bin¹, XU Lin-Bo^{1,*}, CUI Yan-Wei¹, KANG Ai-Guo³, PANG Hong-Yan³ (1. Institute of Grassland Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010020, China; 2. Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010020, China; 3. Plant Protection Station, Kangbao County, Zhangjiakou, Hebei 076650, China)

Abstract:【Aim】This study aims to sequence and analyze the complete mitochondrial genome of *Zele chlorophthalmus*, and to explore the molecular phylogenetic relationship of some groups within Braconidae.【Methods】Using Illumina MiSeq sequencing technique, the mitochondrial genome of *Z. chlorophthalmus* was sequenced, the genome sequences were assembled, annotated and characterized, and then the general features and base composition of the mitochondrial genome were analyzed. To analyze the phylogenetic relationships of *Z. chlorophthalmus* and other species of Braconidae, the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201848); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2015MS0388)

作者简介: 王丹阳, 女, 1993 年 12 月生, 内蒙古巴彦淖尔人, 硕士研究生, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: dan_yang_wang@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xulinbo@caas.cn

收稿日期 Received: 2019-11-30; 接受日期 Accepted: 2020-05-18

phylogenetic trees of 22 Braconidae species based on mitochondrial *COX1* gene sequences were constructed by using maximum likelihood (ML) and neighbor-joining (NJ) methods. 【Results】 The mitochondrial genome of *Z. chlorophthalmus* (GenBank accession no. : MG822749) is 16 661 bp in length, and contains 37 genes including 13 protein-coding genes (PCGs), 22 tRNA genes and 2 ribosomal RNA genes, and one control region (CR). The mitochondrial genome has a clear bias in nucleotide composition with a positive AT-skew and a negative GC-skew, with the A + T content of 82.83%. The mitochondrial gene arrangement of *Z. chlorophthalmus* is not completely consistent with that of the putative ancestral sequence of insects, and there are seven gene rearrangements in its tRNA genes. All the 13 PCCs start with an ATN initiation codon and terminate with a TAA stop codon. All the predicted tRNA genes show the classic clover-leaf secondary structure, except that tRNA^{His(H)} has no TΨC loop and tRNA^{Cys(C)} only has dihydrouridine arm and anticodon arm. The results of phylogenetic analysis based on the *COX1* coding sequence showed that *Z. chlorophthalmus* had the closest relationship with *Z. niveitarsis*, which also belongs to the genus *Zelee*. 【Conclusion】 We firstly sequenced and analyzed the complete mitochondrial genome of *Z. chlorophthalmus*. The results show that *Z. chlorophthalmus* belongs to Euphorinae and support the monophyly of *Zelee*.

Key words: Braconidae; Euphorinae; *Zelee chlorophthalmus*; mitochondrial genome; phylogeny

线粒体 (mitochondrion) 是真核生物细胞中一种重要的胞质细胞器, 在细胞代谢、凋亡、疾病和衰老中起着重要作用 (Boore, 1999; Alcolado, 2005; Cameron, 2014)。线粒体基因具有结构简单、组成稳定、排列保守、母系统遗传、进化速率快等特点, 被广泛应用于系统发育分析、种群遗传分化等研究中 (Boore, 1999; Ballard and Rand, 2005; Wei *et al.*, 2010a; 李倩, 2014)。对于大多数昆虫而言, 线粒体基因组通常是一个大小为 15 ~ 20 kb 的双链闭合环状分子, 编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白编码基因 (PCGs) 2 个核糖体 RNA (rRNA) 基因和 22 个转运 RNA (tRNA) 基因, 以及 1 个长的非编码区 (又称为控制区或 AT 富含区) (Wolstenholme and Clary, 1985; Boore, 1999; Sharkey and Chapman, 2017)。

膜翅目 (Hymenoptera) 是六足总纲中较为高等的类群, 除了具有上述普遍特征外, 其线粒体基因组还有重排率较高, 基因重排程度在类群间有差异, 广腰亚目 (Symphyta) 排列较细腰亚目 (Apocrita) 保守等特点 (魏书军, 2009; Wei *et al.*, 2014)。茧蜂科 (Braconidae) 是膜翅目最大的科, 已记录了 1 040 多个属, 19 000 余种 (Wharton and van Achterberg, 2000; Wei *et al.*, 2010b; Li *et al.*, 2016), 其中有许多种类是农林害虫的重要寄生性天敌。茧蜂科是研究寄生虫模式演变的理想群体, 而该家族报道完整的线粒体基因组较少 (李倩, 2014; 宋胜楠, 2015)。而且, 茧蜂科昆虫几乎全部营寄生生活 (Dangerfield and Austin, 1998), 且寄主范围极其广泛, 是重要的

天敌资源昆虫, 对其深入、全面的研究才能更好地发挥其利用价值。

绿眼赛茧蜂 *Zelee chlorophthalmus* 属膜翅目 (Hymenoptera) 茧蜂科 (Braconidae) 优茧蜂亚科 (Euphorinae), 主要分布于我国河北、内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江、浙江、安徽、甘肃、宁夏、新疆等地 (何俊华等, 2004)。绿眼赛茧蜂为内寄生, 是草地螟 *Loxostege sticticalis*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等农业重大害虫的主要天敌 (李倩等, 2017)。目前国内仅有少量关于其形态学、生物学特性等方面的研究, 尚无对绿眼赛茧蜂线粒体基因组全序列的研究报道 (杜芹, 2015; 李倩等, 2017)。虽然茧蜂科线粒体基因组的信息已有报道, 但是并不全面, 而且茧蜂科昆虫几乎全部营寄生生活 (Dangerfield and Austin, 1998), 且寄主范围极其广泛, 是重要的天敌资源昆虫, 对其深入、全面的研究才能更好地发挥其利用价值。本研究对绿眼赛茧蜂线粒体全基因组进行了测定, 结合 GenBank 中已收录的 21 种茧蜂科昆虫的线粒体基因组 *COX1* 序列进行比较分析, 探讨茧蜂科各亚科、各属及种间的系统发育关系, 旨在为绿眼赛茧蜂的种群遗传学、分子生态学以及茧蜂科的分子系统发育研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

绿眼赛茧蜂成虫于 2018 年 5 月采自中国农业

科学院草原研究所沙尔沁农牧交错区试验基地,室内以草地螟为寄主,在温度 21 ~ 23℃、相对湿度 50% ~ 70%、光周期 16L:8D 条件下,以 15% 蜂蜜水继代饲养繁育。

1.2 绿眼赛茧蜂总 DNA 的提取

取单头成虫用于总 DNA 提取,采用 DNeasy DNA Extraction Kit 试剂盒 (QIAGEN),参照说明书进行总 DNA 的抽提,提取后采用 Thermo Scientific NanoDrop 2000 检测纯度及浓度,采用琼脂糖电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测其完整性。

1.3 序列测定

采用全基因组鸟枪法 (whole genome shotgun, WGS) 策略构建文库,利用第二代测序技术 (next generation sequencing, NGS),基于 Illumina MiSeq 测序系统,对构建的文库进行双末端 (paired-end, PE) 测序。

1.4 基因组序列拼装与注释

采用 A5-miseq v20150522 (Coil *et al.*, 2015) 和 SPAdesv3.9.0 (Bankevich *et al.*, 2012) 对高质量的二代测序数据进行从头拼装,构建 contig 和 scaffold 序列。根据拼接序列的测序深度提取序列,将高测序深度的序列同 NCBI 上的 nt 库进行 blastn (BLAST v2.2.31+) 比对,挑出各拼接结果的线粒体序列。拼接结果整合:将以上不同软件得到的线粒体拼接结果利用 mummer v3.1 软件进行共线性分析,确定 contig 间的位置关系,进行 contigs 间 gap 的填补。使用 pilon v1.18 (Walker *et al.*, 2014) 软件对结果进行校正以得到最终的线粒体序列。使用 MEGA7.0 对线粒体基因组各部分的碱基组成和相对同义密码子使用频率 (relative synonymous codon usage, RSCU) 进行统计。

将拼接得到的完整的线粒体基因组序列上传至 MITOS 网页服务器 (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>) 进行功能注释 (Bernt *et al.*, 2013)。其中 Genetic Code 选择设置为 05-invertebrate,其余设置按照 MITOS 设置的默认参数,分别计算线粒体全基因组、蛋白编码基因、基因排列顺序、rRNA 基因的碱基组成等。采用 OGDRAW (ogdraw.mpimp-golm.mpg.de) 在线可视化软件绘制线粒体全基因组圈图 (Lohse *et al.*, 2013)。

1.5 系统发育分析

以蜜蜂科的两个种小蜜蜂 *Apis florea* 和大蜜蜂 *Apis dorsata* 为外群,选用已报道的 21 种茧蜂科昆虫和绿眼赛茧蜂的线粒体基因组 COX I 基因的核苷

酸序列,通过 MEGAX 的 Align by Clustal-X 程序进行序列比对 (Kumar *et al.*, 2016),利用 MEGA-X 软件采用最大似然法 (ML) 和邻接法 (NJ) 构建茧蜂科的系统发育树。系统树分支的置信水平用 bootstrap test (Felsenstein, 1985) 估计,重复抽样 1 000 次。

2 结果

2.1 绿眼赛茧蜂线粒体基因组的基因组成

绿眼赛茧蜂线粒体基因组全长 16 661 bp (GenBank 登录号: MG822749),基因组的基因排布与已报道茧蜂科其他种类的 (Wei *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016) 相似度高,呈双链闭合环状结构 (图 1)。基因组成包含 13 个蛋白质编码基因 (PCGs)、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因 (*rrnS* 和 *rrnL*) 和 1 个 AT 控制区 (CR)。13 个蛋白质编码基因中有 4 个 (*NAD1*, *NAD4l*, *NAD4*, *NAD5*) 在 N 链上,其余 9 个 (*Cob*, *NAD6*, *NAD3*, *COX3*, *ATP6*, *ATP8*, *COX2*, *COX1*, *NAD2*) 在 J 链上;22 个 tRNA 基因中有 10 个位于 N 链,12 个位于 J 链上;2 个 rRNA 基因均位于 N 链上,其中 *rrnS* 基因长 748 bp,位于 tRNA^{Ile(1)} 和 tRNA^{Val(V)} 之间;*rrnL* 基因长 1 264 bp,位于 tRNA^{Val(V)} 和 tRNA^{Leu-1(L1)} 之间 (图 1);控制区长度 418 bp,位于 tRNA^{Gln(Q)} 和 tRNA^{Met(M)} 之间。

绿眼赛茧蜂线粒体基因组上的基因排列顺序与昆虫线粒体原始排列 (魏书军, 2009; 魏书军和陈学新, 2011) 存在一定差异。13 个蛋白质编码基因和 2 个 rRNA 基因的排列顺序和方向均相同,7 个 tRNA 基因发生重排。tRNA^{Cys(C)} 从 tRNA^{Trp(W)} 和 tRNA^{Tyr(Y)} 之间移到了 *COX3* 和 tRNA^{Gly(G)} 之间,tRNA^{Asn(N)} 从 tRNA^{Ser-1(S1)} 和 tRNA^{Arg(R)} 之间移到了 tRNA^{Phe(F)} 和 *NAD5* 之间,tRNA^{Lys(K)} 和 tRNA^{Asp(D)} 以及 tRNA^{Ser-1(S1)} 和 tRNA^{Ser-2(S2)} 发生了基因位置互换,tRNA^{Ile(1)} 发生了倒置,tRNA^{Met(M)} 和 tRNA^{Gln(Q)} 发生了异位倒置。

绿眼赛茧蜂线粒体基因组有 16 处基因重叠,共 107 bp,最长重叠位于 *COX1* 和 tRNA^{Tyr(Y)} 之间,重叠序列长 24 bp。基因间隔区域有 18 处,共 1 886 bp,最长间隔 854 bp,位于 tRNA^{Ser-2(S2)} 和 *Cob* 之间;其次为 *NAD1* 和 tRNA^{Ser-2(S2)} 之间,间隔 236 bp。既无重叠又无间隔有 4 处 (表 1)。

2.2 绿眼赛茧蜂线粒体基因组核苷酸组成

绿眼赛茧蜂线粒体基因组中,A, T, G 和 C 含量分别为 43.00%, 39.84%, 10.09% 和 7.08%, A

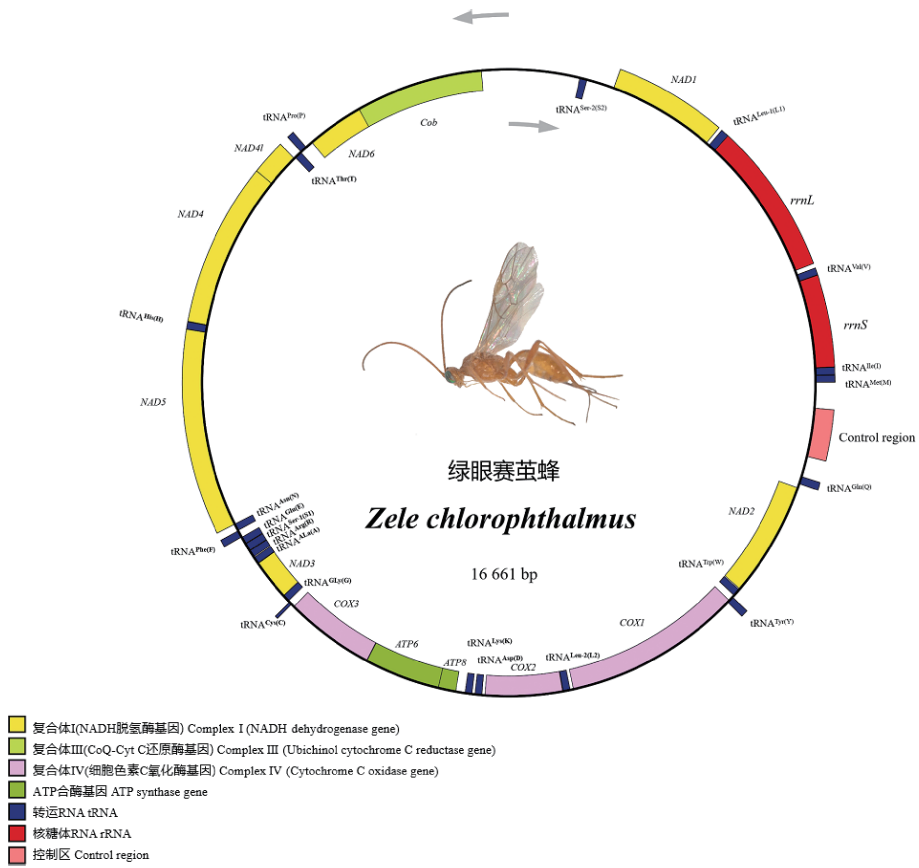


图 1 绿眼赛茧蜂线粒体基因组结构

Fig. 1 Mitochondrial genome structure of *Zele chlorophthalmus*

表 1 绿眼赛茧蜂线粒体基因组特征分析

Table 1 Gene organization of the mitochondrial genome of *Zele chlorophthalmus*

基因 Genes	编码链 Coding strand	位置 (bp) Position	基因长度 (bp) Gene length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反密码子 Anticodon	基因间隔 (bp) Intergenic length
tRNA ^{Met} (M)	N	1 – 64	64			CAT	-1
tRNA ^{Ile} (I)	N	64 – 127	64			GAT	-2
<i>rrnS</i>	N	126 – 873	748				-2
tRNA ^{Val} (V)	N	872 – 933	62			TAC	33
<i>rrnL</i>	N	967 – 2230	1 264				-21
tRNA ^{Leu-1} (L1)	N	2 210 – 2 280	71			TAG	25
<i>NAD1</i>	N	2 306 – 3 241	936	ATG	TAA		236
tRNA ^{Ser-2} (S2)	J	3 478 – 3 545	68			TGA	854
<i>Cob</i>	J	4 400 – 5 536	1 137	ATG	TAA		-23
<i>NAD6</i>	J	5 514 – 6 014	501	ATT	TAA		60
tRNA ^{Pro} (P)	N	6 075 – 6 138	64			TGG	0
tRNA ^{Thr} (T)	J	6 139 – 6 206	68			TGT	8
<i>NAD4l</i>	N	6 215 – 6 508	294	ATT	TAA		-7
<i>NAD4</i>	N	6 502 – 7 842	1 341	ATG	TAA		-1
tRNA ^{His} (H)	N	7 842 – 7 904	63			GTC	-3
<i>NAD5</i>	N	7 902 – 9 572	1 671	ATT	TAA		-5
tRNA ^{Asn} (N)	J	9 568 – 9 632	65			GTT	-1
tRNA ^{Phe} (F)	N	9 632 – 9 696	65			GAA	-2
tRNA ^{Glu} (E)	J	9 695 – 9 760	66			TTC	0

续表 1 Table 1 continued

基因 Genes	编码链 Coding strand	位置 (bp) Position	基因长度 (bp) Gene length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反密码子 Anticodon	基因间隔 (bp) Intergenic length
tRNA ^{Ser-1(S1)}	J	9 761 – 9 828	68			TCT	0
tRNA ^{Arg(R)}	J	9 829 – 9 893	65			TCG	3
tRNA ^{Ala(A)}	J	9 897 – 9 959	63			TGC	-1
<i>NAD3</i>	J	9 959 – 10 312	354	ATA	TAA		-3
tRNA ^{Gly(G)}	J	10 310 – 10 374	65			TCC	63
tRNA ^{Cys(C)}	N	10 384 – 10 413	30			GCA	24
<i>COX3</i>	J	10 438 – 11 220	783	ATG	TAA		-1
<i>ATP6</i>	J	11 220 – 11 888	669	ATG	TAA		-10
<i>ATP8</i>	J	11 879 – 12 037	159	ATT	TAA		78
tRNA ^{Lys(K)}	J	12 116 – 12 180	65			TTT	21
tRNA ^{Asp(D)}	J	12 202 – 12 266	65			GTC	22
<i>COX2</i>	J	12 289 – 12 966	678	ATG	TAA		0
tRNA ^{Leu-2(12)}	J	12 967 – 13 032	66			TAA	25
<i>COX1</i>	J	13 058 – 14 636	1 569	ATT	TAA		-24
tRNA ^{Tyr(Y)}	N	14 603 – 14 667	65			GTA	15
tRNA ^{Trp(W)}	J	14 683 – 14 751	69			TCA	4
<i>NAD2</i>	J	14 756 – 15 757	1 002	ATT	TAA		32
tRNA ^{Gln(Q)}	N	15 790 – 15 858	69			TTG	171
控制区 Control region	J	16 030 – 16 448	418				212

J: 主编码链 Major strand; N: 次编码链 Minor strand.

含量最高而 C 含量最低(表 2)。全基因组的 A + T 总量高达 82.83% ,G + C 含量为 17.17% ,呈现明显的 A + T 偏好性,符合昆虫线粒体基因组中 A + T 含量偏向性的特征(夏靖等, 2011; 王菊平等, 2015; 钟健等, 2017)。绿眼赛茧蜂基因组全序列的 AT 偏斜(AT-skew)为 0.038, GC 偏斜(GC-skew)为 0.

176,表明 A 多于 T,G 多于 C。从不同的基因来看,蛋白质编码基因的 AT 偏斜均为负值,J 链上 9 个蛋白质编码基因的 GC 偏斜为负值。N 链上 4 个蛋白质编码基因和 rRNA 基因的 GC 偏斜均为正值,与大多数昆虫的线粒体基因组 AT/GC 偏斜(彭艳等, 2017)一致。

表 2 绿眼赛茧蜂线粒体基因组的核苷酸组成

Table 2 Nucleotide composition of the mitochondrial genome of *Zelee chlorophthalmus*

基因 Genes	A%	C%	G%	T%	(A + T)%	(G + C)%	AT-skew	GC-skew
全基因组 Whole genome	43.00	7.08	10.09	39.84	82.83	17.17	0.038	0.176
<i>rrnS</i>	44.25	5.48	9.49	40.78	85.03	14.97	0.041	0.268
<i>rrnL</i>	46.20	5.46	9.26	39.08	85.28	14.72	0.083	0.258
<i>NAD1</i>	33.33	9.29	10.68	46.69	80.02	19.98	-0.167	0.070
<i>Cob</i>	33.16	13.72	9.23	43.89	77.04	22.96	-0.139	-0.195
<i>NAD6</i>	37.92	10.58	5.19	46.31	84.23	15.77	-0.100	-0.342
<i>NAD4l</i>	36.05	7.14	7.48	49.32	85.37	14.63	-0.155	0.023
<i>NAD4</i>	34.75	6.94	11.56	46.76	81.51	18.49	-0.147	0.250
<i>NAD5</i>	37.82	7.30	9.93	44.94	82.76	17.24	-0.086	0.153
<i>NAD3</i>	37.57	9.04	5.93	47.46	85.03	14.97	-0.116	-0.208
<i>COX3</i>	33.46	14.81	9.20	42.53	75.99	24.01	-0.119	-0.234
<i>ATP6</i>	34.68	10.31	6.28	48.73	83.41	16.59	-0.168	-0.243
<i>ATP8</i>	33.96	12.58	3.14	50.31	84.28	15.72	-0.194	-0.600
<i>COX2</i>	36.43	11.36	9.59	42.63	79.06	20.94	-0.078	-0.085
<i>COX1</i>	32.25	13.07	13.07	40.98	73.23	26.77	-0.119	-0.024
<i>NAD2</i>	37.72	7.98	5.99	48.30	86.03	13.97	-0.123	-0.143

2.3 绿眼赛茧蜂线粒体基因组蛋白质编码基因 (PCGs)

绿眼赛茧蜂线粒体蛋白质编码基因长度与其他膜翅目昆虫线粒体蛋白编码基因相似, 13 个蛋白质编码基因均以 ATN 为起始密码子, 以 TAA 为终止密码子, 其中 *NAD3* 以 ATA 为起始密码子, *NAD6*, *NAD4l*, *NAD5*, *ATP8*, *COX1* 和 *NAD2* 以 ATT 为起始密码子, 其余 6 种均以 ATG 作为起始密码子。绿眼赛茧蜂线粒体蛋白质编码基因的相对同义密码子使用频率 (RSCU) 见表 3。绿眼赛茧蜂线粒体蛋白

质编码基因对 A 和 T 有明显的偏向性, 使用最多的 5 个密码子是 AAA (Lys) 525 次、UAA (终止密码子) 465 次、UUA (Leu) 459 次、AAU (Asn) 420 次和 UUU (Phe) 394 次。只有 Met 和 Trp 仅有一种密码子, 分别为 AUG 和 UGG。除了 Met 和 Trp 外, 绿眼赛茧蜂蛋白质编码基因使用频率最高密码子第 3 位偏好使用 A 和 U, 与一些膜翅目昆虫 (Fan *et al.*, 2017; 彭艳等, 2017) 相似, 蛋白质编码基因的氨基酸百分比最高者为 Ile (15.3%), 其次为 Leu (13.2%), Lys (11.2%) 和 Phe (8.6%)。

表 3 绿眼赛茧蜂线粒体基因组相对同义密码子使用频率 (RSCU)

Table 3 Relative synonymous codon usage (RSCU) in the mitochondrial genome of *Zele chlorophthalmus*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	使用次数 Usage frequency	RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	使用次数 Usage frequency	RSCU
Met (M)	AUG	89	1.00	Phe (F)	UUU	394	1.65
Ile (I)	AUU	367	1.29		UUC	83	0.35
	AUC	104	0.37	Glu (E)	GAA	86	1.56
	AUA	380	0.34		GAG	24	0.44
Val (V)	GUU	69	1.52	Arg (R)	CGU	7	0.32
	GUC	22	0.49		CGC	1	0.05
	GUA	69	1.52		CGA	10	0.45
	GUG	21	0.46	CGG	6	0.27	
Leu (L)	UUA	459	3.75	Ala (A)	AGA	68	3.07
	UUG	98	0.80		AGG	41	1.85
	CUU	51	0.42		GCU	14	1.27
	CUC	38	0.31	GCC	7	0.64	
	CUA	67	0.55	GCA	19	1.73	
	CUG	21	0.17	GCG	4	0.36	
	Ser (S)	UCU	42	1.29	Gly (G)	GGU	43
UCC		20	0.61	GGC		6	0.17
UCA		45	1.38	GGA		55	1.53
UCG		12	0.37	GGG	40	1.11	
AGU		65	1.99	Cys (C)	UGU	61	1.77
AGC		12	0.37		UGC	8	0.23
Pro (P)	CCU	17	1.51	Lys (K)	AAA	525	1.69
	CCC	11	0.98		AAG	95	0.31
	CCA	15	1.33	Asp (D)	GAU	68	1.64
	CCG	2	0.18		GAC	15	0.36
Thr (T)	ACU	38	1.83	Tyr (Y)	UAU	341	1.74
	ACC	15	0.72		UAC	51	0.26
	ACA	24	1.16	Trp (W)	UGG	26	1.00
	ACG	6	0.29		Gln (Q)	CAA	104
His (H)	CAU	50	1.64	CAG		32	0.47
	CAC	11	0.36	*	UAA *	465	2.26
Asn (N)	AAU	420	1.82		UAG *	91	0.44
	AAC	41	0.18		UGA *	62	0.30

* 终止密码子 Stop codon.

2.4 绿眼赛茧蜂线粒体基因组 tRNA 基因和 rRNA 基因

绿眼赛茧蜂线粒体基因组的 22 个 tRNA 基因

与其他膜翅目昆虫线粒体基因组对应的 tRNA 反密码子相同, 除 tRNA^{Leu} 和 tRNA^{Ser} 有两个 tRNA 结构外, 其他都只有一个与之对应。除 tRNA^{His(H)} 缺失

TΨC 环和 tRNA^{Cys(C)} 仅剩 DHU 臂和反密码子臂外, 其他 tRNA 基因都能形成典型的三叶草式二级结构 (图 2)。在三叶草结构中还发现有 6 处错配:

tRNA^{Ala(A)} 有 1 处, 错配于氨基酸臂上; tRNA^{Phe(F)}, tRNA^{Gly(G)} 和 tRNA^{Val(V)} 各有 1 处, 位于 DHU 臂上; tRNA^{Gln(Q)} 有 2 处, 分别位于 DHU 臂和反密码子臂

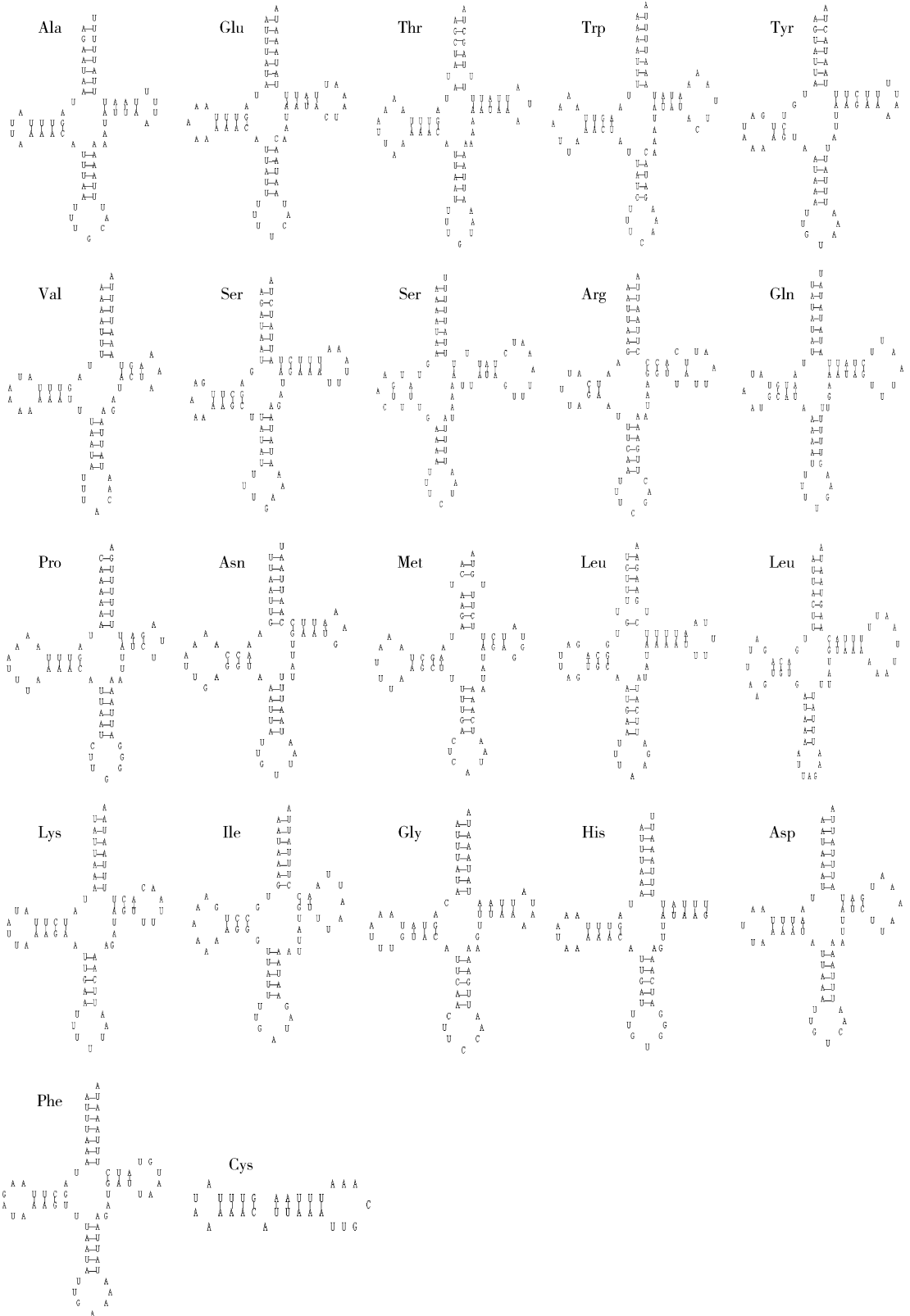


图 2 绿眼赛茧蜂线粒体基因组 tRNA 基因二级结构

Fig. 2 Secondary structure of tRNA gene in the *Zele chlorophthalmus* mitochondrial genome

上,发生错配的碱基均为 G-U。

绿眼赛蜜蜂线粒体基因组的 2 个 rRNA 基因与大部分昆虫线粒体 rRNA 基因相比类似,具有明显的 AT 碱基偏向性,*rrnS* 与 *rrnL* 的长度分别为 748 bp 和 1 264 bp (表 1),A + T 的含量分别为 85.03% 和 85.28% (表 2)。

2.5 系统发育分析

以蜜蜂科为外群,基于已报道的 21 个蜜蜂科种和绿眼赛蜜蜂的线粒体基因组 COX1 蛋白编码基因序列,采用最大似然法 (ML) 和邻接法 (NJ) 利用 MEGA-X 软件构建蜜蜂科的系统发育树 (图 3 和 4)。最大似然法分析结果 (图 3) 表明,蜜蜂科各个种群分类关系为蚜蜜蜂亚科 Aphidiinae + (长体蜜蜂亚科 Macrocentrinae + 毛蜜蜂亚科 Doryctinae + 探蜜蜂亚科 Ichneutinae + (窄径蜜蜂亚科 Agathidinae +

折脉蜜蜂亚科 Cardiochilinae)) + 优蜜蜂亚科 Euphorinae; 邻接法分析结果表明,优蜜蜂亚科 Euphorinae + (蚜蜜蜂亚科 Aphidiinae + ((窄径蜜蜂亚科 Agathidinae + 折脉蜜蜂亚科 Cardiochilinae) + (探蜜蜂亚科 Ichneutinae) + (长体蜜蜂亚科 Macrocentrinae + 毛蜜蜂亚科 Doryctinae)))。综合比较,两种方法构建的系统发育树大致相同。在系统发育树中,蜜蜂科主要分为 3 支,蚜蜜蜂亚科为一支,优蜜蜂亚科为一支,剩余的一支包括长体蜜蜂亚科、毛蜜蜂亚科、探蜜蜂亚科、折脉蜜蜂亚科和窄径蜜蜂亚科。窄径蜜蜂亚科 (Agathidinae) 和折脉蜜蜂亚科 (Cardiochilinae) 在两种方法中都为姐妹群。绿眼赛蜜蜂聚于优蜜蜂亚科赛蜜蜂属,与传统形态分类学结果一致,其与雪跗赛蜜蜂 *Zelee niveitarsis* 亲缘关系较近。

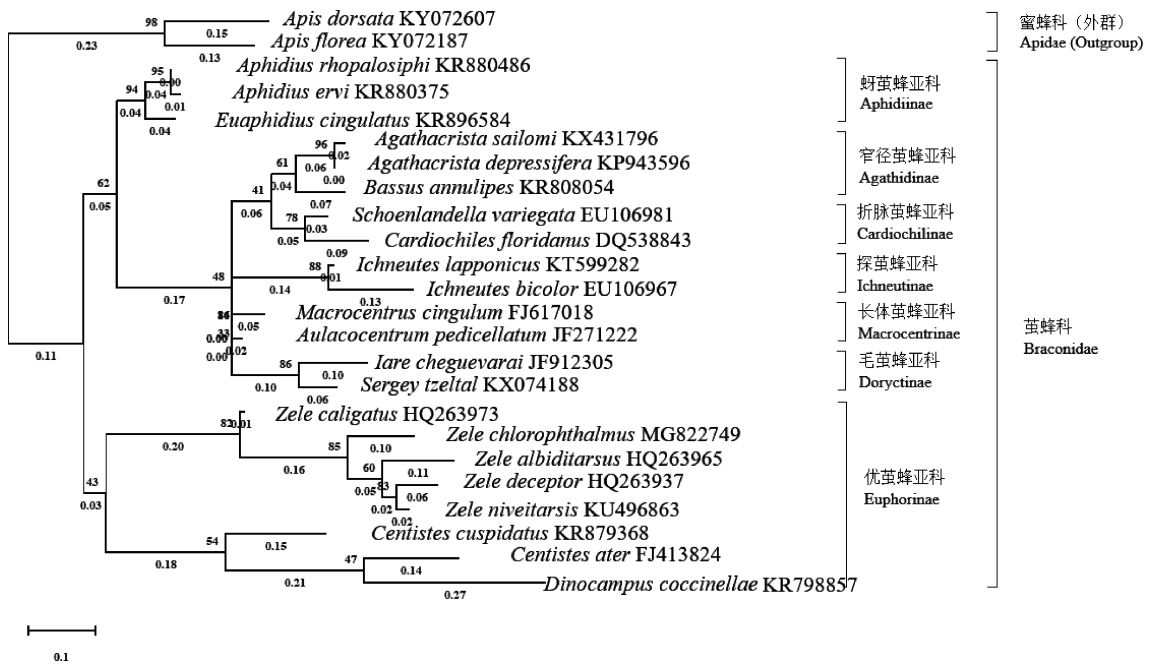


图 3 最大似然法构建的基于线粒体 COX1 序列的蜜蜂科 22 个种的系统发育树 (1 000 次重复)

Fig. 3 Phylogenetic trees of 22 Braconidae species constructed by maximum likelihood method based on COX1 sequences (1 000 replicates)

3 讨论

亚库巴果蝇 *Drosophila yakuba* 线粒体基因组的排列方式被认为是昆虫线粒体基因组最原始的排列方式 (魏书军和陈学新, 2011), 绿眼赛蜜蜂线粒体基因组与其相比, 存在基因重排现象。本研究通过与蜜蜂科其他种的线粒体基因组比较分析, 发现绿

眼赛蜜蜂线粒体基因组重排多出现于 tRNA 基因中, 除 tRNA^{Leu-2(12)} 处于 COX1 和 COX2 之间较稳定, 没有出现重排外, 其余 tRNA 基因都曾出现重排现象。膜翅目分为广腰亚目 (Symphyta) 和细腰亚目 (Apocrita) 两个类群, 广腰亚目的基因排列相比细腰亚目保守, 重排较少 (宋胜楠, 2015), 但细腰亚目存在大量重排, 包括移位、原位倒置、异位倒置 (Wei *et al.*, 2010b), 而绿眼赛蜜蜂属于细腰亚目。膜翅目

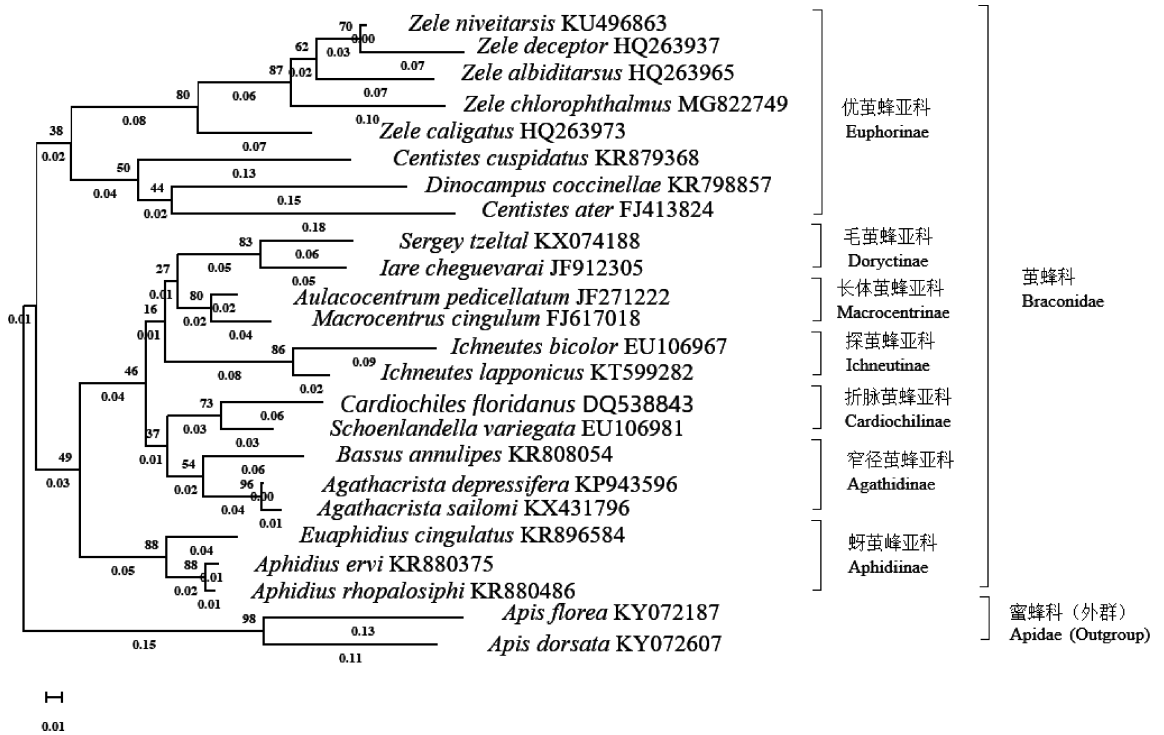


图4 邻接法构建的基于线粒体 *COX1* 序列的茧蜂科 22 个种的系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 4 Phylogenetic trees of 22 Braconaceae species constructed by neighbor-joining method based on *COX1* sequences (1 000 replicates)

线粒体具有较高的重排速率,主要集中在发生于 AT 富含区 *NAD2*, *NAD2-COX1*, *COX2-ATP8* 和 *NAD3-NAD5* 区(魏书军, 2009)。

膜翅目茧蜂科昆虫线粒体基因组中有大量的基因间隔区和基因重叠区的现象并不少见。离颚细蜂科的 *Vanhornia eucnemidaru* 存在 36 处基因间隔, 5 处基因重叠, 基因间隔总长达 1 777 bp, 基因重叠共 31 bp (Castro *et al.*, 2006); 盖拉头甲肿腿蜂 *Cephalonomia gallicola* 基因间隔总长度比绿眼赛茧蜂基因间隔长, 共有 22 处, 长 2 543 bp, 基因重叠 4 处, 共 36 bp (魏书军, 2009); 半闭弯尾姬蜂 *Diadegma semiclausum* 也有 13 处基因间隔, 共 1 846 bp, 14 处基因重叠, 共 61 bp (魏书军, 2009)。比较发现, 基因重排发生的区域基因间隔较大, 而基因重叠区基因重排发生较少。茧蜂科昆虫常有一些较短的基因间隔区, 但也存在例外, 绿眼赛茧蜂有两处较长的基因间隔, *NAD1* 与 *tRNA^{Ser-2(S2)}* 之间有 236 bp 的基因间隔, *tRNA^{Ser-2(S2)}* 与 *Cob* 之间有 854 bp 的基因间隔, 推断是由于 *tRNA^{Ser-2(S2)}* 和 *tRNA^{Ser-1(S1)}* 发生了位置互换产生的。发生重排的基因左右都有较大的基因间隔区, 因此推断基因间隔可能是昆虫线粒体基因组产生重排的原因, 具体原因还需要更进一

步的研究。

通过不同方法构建系统发育树, 综合分析发现优茧蜂亚科和蚜茧蜂亚科的单系性得到很高的支持。窄径茧蜂亚科和折脉茧蜂亚科互为姐妹群。宽鞘茧蜂属 *Centistes*、瓢虫茧蜂属 *Dinocampus* 和赛茧蜂属 *Zeles* 同属于优茧蜂亚科 (Euphorinae), 这与传统分类方法的结果 (陈学新等, 2000) 一致, 但宽鞘茧蜂的两个种并没有聚到一起, 还需要进一步研究。两种方法都将窄径茧蜂亚科、折脉茧蜂亚科、探茧蜂亚科、长体茧蜂亚科和毛茧蜂亚科聚于一支, 说明这 5 种亚科之间的亲缘关系较近, 而与优茧蜂亚科和蚜茧蜂亚科关系较远。

本研究对绿眼赛茧蜂线粒体基因组全序列的测定丰富了茧蜂科线粒体基因组的序列信息, 为分子进化信息系统增添了有益的数据信息, 并且为线粒体基因的结构和组成提供了基础数据, 为后续茧蜂科系统发生关系奠定基础。

参考文献 (References)

- Alcalado J, 2005. Power, sex, suicide; mitochondria and the meaning of life. *BMJ*, 331(7520): 851.
- Ballard JWO, Rand DM, 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol.*

- Syst.*, 36: 621–642.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA, 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.*, 19(5): 455–477.
- Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsch G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF, 2013. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 69(2): 313–319.
- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27(8): 1767–1780.
- Cameron SL, 2014. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annu. Rev. Entomol.*, 59: 95–117.
- 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.
- Chen XX, He JH, van Achterberg C, Ma Y, 2000. An outline of the taxonomic studies of the subfamily Euphorinae (excluding the genus *Meteorus* Halida) (Hymenoptera: Braconidae) from China, with a checklist of the Chinese species. *Entomotaxonomia*, 22(1): 65–70. [陈学新, 何俊华, van Achterberg C, 马云, 2000. 中国优茧蜂亚科研究概况及已知种名录(膜翅目: 茧蜂科). 昆虫分类学报, 22(1): 65–70]
- Coil D, Jospin G, Darling AE, 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4): 587–589.
- Dangerfield PC, Austin AD, 1998. Biology of *Mesostoa kerri* (Insecta: Hymenoptera: Braconidae: Mesostoinae), an endemic Australian wasp that causes stem galls on *Banksia marginata*. *Aust. J. Bot.*, 46(4): 559–569.
- Du Q, 2015. Investigation of Insect Pests of Lucern and Their Natural Enemies in Kangbao County of Hebei Province. MSc Thesis, Huazhong Agricultural University, Wuhan. [杜芹, 2015. 河北康保县苜蓿害虫及其天敌的研究. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文]
- Fan XL, Gong YJ, Chen PY, Tan QQ, Tan JL, Wei SJ, 2017. Next-generation sequencing of the mitochondrial genome of *Dolichovespula panda* (Hymenoptera: Vespidae) with a phylogenetic analysis of Vespidae. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 20(3): 971–976.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
- He JH, Chen XX, Ma Y, 2004. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 37. Hymenoptera (2). Science Press, Beijing. 384–385. [何俊华, 陈学新, 马云, 2004. 中国动物志, 昆虫纲, 第 37 卷. 膜翅目: 茧蜂科(2). 北京: 科学出版社. 384–385]
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33(7): 1870–1874.
- Li Q, 2014. Comparative Mitogenomes and Phylogenetic Analysis of Braconidae (Hymenoptera) Based on Mitochondrial Genomes. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [李倩, 2014. 基于线粒体基因组的膜翅目茧蜂科(Hymenoptera: Braconidae)比较基因组学与系统发育研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]
- Li Q, Cheng YX, Luo LZ, Du Q, Jiang XF, Zhang L, 2017. Biology and bio-control potential of *Zele chlorophthalmus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Chin. J. Biol. Control*, 33(6): 803–810. [李倩, 程云霞, 罗礼智, 杜芹, 江幸福, 张蕾, 2017. 绿眼赛茧蜂生物学特性及其对草地螟的控害作用. 中国生物防治学报, 33(6): 803–810]
- Li Q, Wei SJ, Tang P, Wu Q, Shi M, Sharkey MJ, Chen XX, 2016. Multiple lines of evidence from mitochondrial genomes resolve phylogenetic relationships of parasitic wasps in Braconidae. *Genome Biol. Evol.*, 8(9): 2651–2662.
- Lohse M, Drechsel O, Kahlau S, Bock R, 2013. OrganellarGenomeDRAW – a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Res.*, 41 (Web Server issue): W575–W581.
- Peng Y, Chen B, Li TJ, 2017. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Parapolybia crocea* (Hymenoptera: Vespidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(4): 464–474. [彭艳, 陈斌, 李廷景, 2017. 黄侧异腹胡蜂线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 60(4): 464–474]
- Sharkey MJ, Chapman E, 2017. Ten new genera of Agathidini (Hymenoptera, Braconidae, Agathidinae) from Southeast Asia. *ZooKeys*, (660): 107–150.
- Song SN, 2015. Comparative Mitogenomics and Phylogeny of the Microsatrinae (Hymenoptera: Braconidae). PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [宋胜楠, 2015. 小腹茧蜂亚科(膜翅目: 茧蜂科)比较线粒体基因组学与系统发育研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM, 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE*, 9(11): e112963.
- Wang JP, Xuan SB, Zhang YP, Yang J, Cao TW, Ma EB, 2015. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Chitoria ulupi* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 319–328. [王菊平, 宣善滨, 张育平, 杨静, 曹天文, 马恩波, 2015. 武铠蛱蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 58(3): 319–328]
- Wei SJ, 2009. Characterization and Evolution of Hymenopteran Mitochondrial Genomes and Their Phylogenetic Utility. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [魏书军, 2009. 膜翅目线粒体基因组的特征与进化及其在系统发育研究中的应用. 杭州: 浙江大学博士学位论文]
- Wei SJ, Chen XX, 2011. Progress in research on the comparative mitogenomics of insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(6): 1573–

1585. [魏书军, 陈学新, 2011. 昆虫比较线粒体基因组学研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1573–1585]
- Wei SJ, Niu FF, Tan JL, 2014. The mitochondrial genome of the *Vespa bicolor* Fabricius (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae). *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.*, 27(2): 875–876.
- Wei SJ, Shi M, Chen XX, Shaekey MJ, van Achterberg C, Ye GY, He JH, 2010a. New views on strand asymmetry in insect mitochondrial genomes. *PLoS ONE*, 5(9): e12708.
- Wei SJ, Shi M, Sharkey MJ, van Achterberg C, Chen XX, 2010b. Comparative mitogenomics of Braconidae (Insecta: Hymenoptera) and the phylogenetic utility of mitochondrial genomes with special reference to holometabolous insects. *BMC Genomics*, 11: 371.
- Wharton RA, van Achterberg C, 2000. Family group names in Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *J. Hym. Res.*, 9(2): 254–270.
- Wolstenholme DR, Clary DO, 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondria DNA. *Genetics*, 109(4): 725–744.
- Xia J, Hu J, Zhu GP, Zhu CD, Hao JS, 2011. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Calinaga davidis* Oberthür (Lepidoptera). *Acta Entomol. Sin.*, 54(5): 555–565. [夏靖, 胡静, 朱国萍, 朱朝东, 郝家胜, 2011. 大卫绢蛱蝶线粒体基因组全序列测定和分析. 昆虫学报, 54(5): 555–565]
- Zhong J, Liu ZH, Yang WK, Zhu F, Dong ZP, 2017. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae). *Acta Entomol. Sin.*, 60(8): 936–949. [钟健, 刘增虎, 杨伟克, 朱峰, 董占鹏, 2017. 琥珀蚕线粒体全基因组测序及序列分析. 昆虫学报, 60(8): 936–949]

(责任编辑: 马丽萍)