基于 18S rRNA 和线粒体 16S rRNA 基因序列的柳蚕进化分析*

朱保建 刘朝良** 曹 甲 李旭全 魏国清

(安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

Phylogenetic analysis of *Actias selene* based on 18S ribosomal RNA and mitochondrial 16S rRNA genes.

ZHU Bao-Jian, LIU Chao-Liang**, CAO Jia, LI Xu-Quan, WEI Guo-Qing (*College of Life Sciences*, *Anhui Agriculture University*, Hefei 230036, China)

Abstract To investigate the phylogenetic relationship between *Actias selene* Hübner and other Lepidopteran insects, a 391 bp fragment of 18S ribosomal RNA and a 428 bp fragment of mitochondrial 16S rRNA were used to construct phylogenetic trees with neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) and arithmetic averages (UPGMA) methods. The results showed the nucleotide composition of mitochondrial 16S rRNA gene of *A. selene* had AT bias, similar in other Saturnidae insects. The genetic distances between *A. selene* and other species ranged from 0.016 to 0.140 based on mitochondrial 16S rRNA gene sequences, in which the minimum distance was that to *Antheraea roylii* and the maximum was that to *Bombyx mandarina*. As far as 18S rRNA gene sequences were concerned, the minimum distance (0.010) and the maximum distance (0.017) were showed between *A. selene* with *A. pernyi*, and *Samia ricini*, respectively.

Key words *Actias selene*, 18S ribosomal RNA, mitochondrial 16S rRNA, phylogenetic relationship

摘 要 为探讨柳蚕 *Actias selene* Hübner 与鳞翅目昆虫的系统发育关系,本研究利用 PCR 扩增获得了柳蚕核糖体 18S rRNA 和线粒体 16S rRNA 基因的部分序列,长度分别为 391 bp 和 428 bp。并采用邻近距离法(NJ)、最大简约法(MP)、类平均聚类法(UPGMA)构建系统进化树。结果表明,柳蚕线粒体 16S rRNA 基因序列与大蚕蛾科昆虫的 16S rRNA 基因序列均表现出偏好于碱基 AT 的倾向。柳蚕与所研究的其它蚕类的遗传距离介于 0.016 至 0.140 之间,其中与温带柞蚕 *Antheraea roylii* 的遗传距离最小,与野桑蚕 *Bombyx mandarina* 的遗传距离最大。而基于鳞翅目昆虫 18S rRNA 基因部分序列的进化分析显示,柳蚕与柞蚕 *Antheraea pernyi* 之间的遗传距离最小(0.010),与蓖麻蚕 *Samia ricini* 的遗传距离最大(0.017)。

关键词 柳蚕,核糖体 18S RNA,线粒体 16S rRNA,进化分析

柳蚕 *Actias selene* Hübner 是大蚕蛾科的一种珍稀绢丝昆虫,在中国、日本、印度和东南亚各国均有分布。柳蚕主食柳树、枫杨等植物叶片,幼虫形态酷似天蚕和柞蚕,每年发生 2 ~ 3 个世代[1,2];其蛹个体大且富含蛋白质,茧丝纤细耐腐,在食品、服装和医药等领域具有良好的开发前景。但由于柳蚕基本都生活于野外且目前人工饲养柳蚕的技术尚不成熟,加之柳蚕资源相对较少,人们对其遗传背景[3~8]和生理生化特性[9~13]等方面的认识相对匮乏。开展分类学和进化关系研究对于柳蚕资源的保护及开发利用具有重要的理论意义。

线粒体基因组因具有母性遗传,结构简单,进化速率较快等特点,普遍用于解决物种起源与进化关系,其中 16S rRNA、细胞色素氧化酶

* 资助项目:校引进与稳定人才科研启动基金(yj2008-28),安徽省国际合作项目(08080703017),现代农业产业技术体系建设专项资金,安徽省人才专项基金(2008Z022)。

**通讯作者,E-mail:cyschx@163.com

收稿日期:2009-08-07,修回日期:2009-09-30

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

C 亚基(*COI*)基因是常采用的分子标记[14~17]。核糖体在蛋白质合成中具有重要功能,其亚基 18S rRNA 基因的序列具高度保守性,变化水平很小,适合于研究高级阶元的分子进化问题[18~20]。据报道,线粒体 16S rRNA、细胞色素氧化酶 C 亚基 I(*COI*)、12S rRNA、18S rRNA 及编码蛋白质的核基因序列已被用于研究昆虫的分子进化关系[21~28],部分蚕类的分类地位得到了确定,但某些属内部的进化关系尚不明了[3,29~32]。本实验通过分子克隆方法获得了柳蚕核糖体 18S rRNA 和线粒体 16S rRNA 基因部分序列,通过构建系统进化树探讨了其进化关系,以期为阐明柳蚕的遗传背景提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫柳蚕系安徽省合肥地区野外柳树上捕捉的 3~4 龄幼虫,于室内饲养至结茧。

1.2 方法

1.2.1 柳蚕基因组 DNA 的提取 取 1 g 新鲜蚕蛹脂肪体组织,充分研磨后加入 10 mL 裂解液(0.01 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, 0.25 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 mg/mL 蛋白酶 K),置于 50℃水浴锅中处理过夜。然后分别采用平衡酚和氯仿进行抽提获得基因组 DNA[8]并利用分光光度计和琼脂糖电泳检测其浓度和纯度。

1.2.2 引物设计 通过 NCBI 数据库检索昆虫线粒体 16S rRNA 和核糖体 18S rRNA 基因序列,选择保守性区域设计引物,扩增柳蚕线粒体 16S rRNA 基因的引物为 16S F1(5′-GTGCAAAGGTAGCATAATCA-3′)和 16S R1(5′-TGTCCTGATCCAACATCGAG-3′)[14],而扩增 18S RNA 基因片段的引物为 18S F1(5′-CGGCGACGCATCTTTCAAATG-3′)和 18S R1(5′-CTCACCGACGATATGCTCCG-3′)[19],上述引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增及序列测定 采用 20 μL 反应体系进行 PCR 扩增,体系组分包括:14.1 μL 灭菌双蒸水,0.6 μL dNTP(10 mM),2 μL 10× PCR buffer,0.3 μL Taq polymerase,10 μM 引物各 1 μL,模板 1 μL。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min,随后 94℃变性 30 s,56℃退火 40 s,72℃延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物回收后与 PMD-18T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α。最后筛选出的阳性克隆送上海 Invitrogen 公司测序。

1.2.4 数据分析 采用 NCBI 数据库中的 BLAST、ClustalW 工具对测定的 16S rRNA 和 18S rRNA 基因序列进行同源性比对分析。利用 MEGA 3.1 软件分析序列碱基组成和 Kimura-2-Parameter 参数模型计算序列间的变异度,并采用邻近距离法(Neighbor Joining, NJ)、最大简约法(Maximum Parsimony, MP)、类平均聚类法(UPGMA)构建系统进化树[33]。系统树中分支的置信水平用自引导检验估计,重复 500 次。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增 16S rRNA 与 18S rRNA 基因片段

以提取的柳蚕基因组 DNA 为模板,利用引物 16S F1,R1 和 18S F1,R1 分别进行 PCR 扩增,获得单一的特异性条带(图 1),大小与预测基本一致。测序结果表明,扩增的柳蚕 16S rRNA 基因部分序列(GenBank FJ905474)长度为 391 bp,与温带柞蚕 *Antheraea roylii* 的 16S

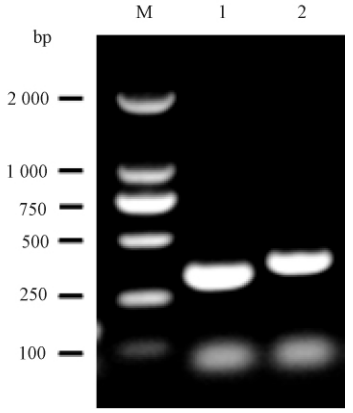

图 1 PCR 产物电泳分析

泳道 1 和 2 分别为线粒体 16S rRNA 与 18S rRNA 基因的 PCR 扩增结果;M 为 DNA 标准分子量

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

rRNA 基因序列同源性很高,达 98%;而 18S rRNA 基因部分序列(GenBank GQ451332)长度为 428 bp,与柞蚕 *Antheraea pernyi* 的 18S rRNA 基因序列具有 99% 的相似度,证明了所得序列的正确性。

2.2　柳蚕 16S rRNA 基因序列的碱基组成分析

通过对包括柳蚕在内的 15 种蚕的线粒体 16S rRNA 基因序列的碱基组成分析(表 1),结果显示柳蚕 16S rRNA 基因序列中 T 含量为 39.9%,C 含量为 13.6%,A 含量为 38.6%,G 含量为 7.9%,A + T 含量为 78.5%,这与其它大蚕蛾科蚕类高度相似。

表 1　不同蚕类 16S rRNA 基因序列的碱基组成

物种	T	C	A	G	A + T	GenBank accession no.
1 柳蚕 *Actias selene*	39.9	13.6	38.6	7.9	78.5	FJ905474
2 家蚕 *Bombyx mori*	38.8	13.1	41.4	6.7	80.2	AB070264
3 野桑蚕 *Bombyx mandarina*	38.7	13.4	41.0	7.0	79.7	AB070263
4 印度柞蚕 *Antheraea mylitta*	42.2	14.0	36.1	7.6	78.3	AY598830
5 惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia*	38.1	15.3	39.4	7.2	77.5	AY604239
6 琥珀蚕 *Antheraea assama*	39.5	14.8	38.3	7.4	77.8	AY601276
7 颇洛轫柞蚕 *Antheraea proylei*	39.8	14.5	38.3	7.4	78.1	AY601277
8 大乌桕蚕 *Attacus atlas*	40.8	13.6	38.7	6.9	79.5	AY601279
9 温带柞蚕 *Antheraea roylii*	40.4	14.0	38.3	7.4	78.7	AY960275
10 柞蚕 *Antheraea pernyi*	40.8	13.7	38.5	7.1	79.3	AY242996
11 蓖麻蚕 *Samia ricini*	38.7	14.4	39.7	7.2	78.4	AY601280
12 日本柞蚕 *Antheraea yamamai*	41.3	13.3	37.9	7.2	79.2	EU726630
13 明目大蚕蛾 *Antheraea frithi*	41.2	14.8	36.6	7.4	77.8	AY601275
14 多音柞蚕 *Antheraea polyphemus*	40.3	13.5	38.8	7.4	79.1	AY601278
15 合目大蚕蛾 *Saturnia boisduvalii*	43.3	12.6	37.4	6.7	80.7	EF622227

表 2　柳蚕与其它蚕类的遗传距离

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 *A. selene*															
2 *B. mori*	0.134														
3 *B. mandarina*	0.140	0.016													
4 *A. mylitta*	0.085	0.137	0.147												
5 *H. cecropia*	0.112	0.121	0.134	0.109											
6 *A. assama*	0.100	0.128	0.137	0.082	0.079										
7 *A proylei*	0.027	0.147	0.160	0.091	0.118	0.106									
8 *A. atlas*	0.100	0.112	0.128	0.085	0.070	0.067	0.106								
9 *A. roylii*	0.016	0.131	0.140	0.067	0.097	0.082	0.022	0.082							
10 *A. pernyi*	0.019	0.128	0.134	0.082	0.115	0.103	0.036	0.097	0.019						
11 *S. ricini*	0.103	0.124	0.137	0.106	0.047	0.088	0.109	0.061	0.088	0.106					
12 *A. yamamai*	0.059	0.109	0.112	0.064	0.109	0.073	0.076	0.088	0.053	0.050	0.100				
13 *A. frithi*	0.076	0.144	0.147	0.053	0.103	0.085	0.082	0.079	0.064	0.079	0.100	0.059			
14 *A. polyphemus*	0.091	0.119	0.125	0.079	0.076	0.061	0.097	0.073	0.076	0.094	0.085	0.070	0.076		
15 *S. boisduvalii*	0.115	0.137	0.141	0.115	0.125	0.091	0.134	0.085	0.109	0.100	0.109	0.079	0.112	0.085	

2.3　柳蚕与其它昆虫的 16S rRNA 基因序列比较

利用 MEGA 软件对柳蚕等 15 种蚕的 16S rRNA 基因序列进行比对并采用 M2P 模型计算它们之间的遗传距离(表 2)。从表 2 中可以看出,柳蚕与其它蚕类的遗传距离介于 0.016 至 0.140 之间,与大蚕蛾科温带柞蚕的遗传距离最小,与蚕蛾科野桑蚕 *Bombyx mandarina* 的遗传距离最大。基于表 2 中的各蚕类间的遗传距离,采用 NJ 法(图 2A)、MP 法(图 2B)和 UPGMA 法(图 2C)构建系统进化树。大蚕蛾科和蚕蛾科(家蚕 *Bombyx mori* 和野桑蚕)昆虫

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

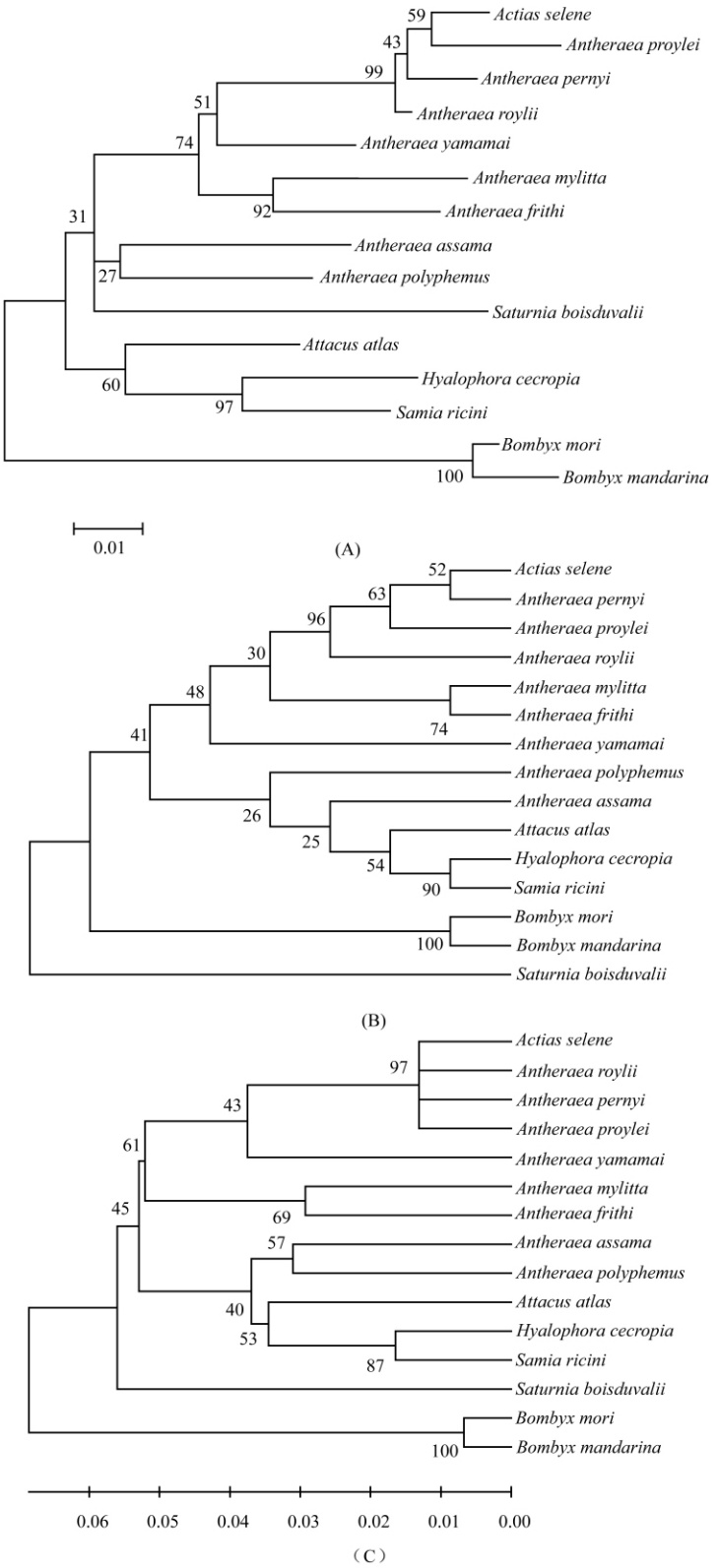

图 2 基于线粒体 16S rRNA 基因序列的进化分析
图中数字表示 500 个重复得到的自引导值；
A，B，C 分别为 NJ 法，MP 法和 UPGMA 法构建的进化树

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在分子进化树中明显分为 2 个大分支,大蚕蛾科的柳蚕属和柞蚕属进化关系较近,与眉纹大蚕蛾科的蓖麻蚕属关系最远。本研究中,柳蚕与其它蚕类的进化关系在 3 种进化树中表现出相似的特征,柳蚕属与柞蚕属进化关系最近。

2.4　基于 18S rRNA 基因序列的柳蚕进化分析

由表 3 可知,柳蚕与柞蚕之间的遗传距离最小(0.010),与蓖麻蚕 *Attacus ricini* 的遗传距离最大(0.017),说明柳蚕与柞蚕的亲缘关系较近,这与 2.3 中柳蚕线粒体 16S rRNA 基因序列的研究结果相似。

依据所选择的鳞翅目昆虫 18S rRNA 基因序列,采用 NJ 法(图 3A),MP 法(图 3B)和 UPGMA 法(图 3C)构建系统进化树。进化分析表明,大蚕蛾科与蚕蛾科、螟蛾科、羽蛾科和尺蠖蛾科的亲缘关系较远,而夜蛾科与斑蛾科的进化关系近。NJ 法和 UPGMA 法均支持柳蚕与柞蚕进化关系较近,而 MP 法支持柳蚕与蓖麻蚕的进化关系较近。

表 3　柳蚕与其它鳞翅目昆虫的遗传距离

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	GenBank accession no.
1 *A. selene*																GQ451332
2 *B. mori*	0.012															DQ347470
3 *A. pernyi*	0.010	0.007														DQ347469
4 *Attacus ricini*	0.017	0.019	0.012													AF535029
5 *Galleria mellonella*	0.012	0.000	0.007	0.019												AF286298
6 *Platyptilia* sp. L11	0.012	0.000	0.007	0.019	0.000											AF423784
7 *Ectropis oblique*	0.014	0.002	0.010	0.022	0.002	0.002										EU482035
8 *Heliothis assulta*	0.014	0.002	0.005	0.017	0.002	0.002	0.005									EU057177
9 *Pryeria sinica*	0.014	0.002	0.005	0.017	0.002	0.002	0.005	0.000								AJ830768
10 *Zygaena trifolii*	0.012	0.000	0.007	0.019	0.000	0.000	0.002	0.002	0.002							AJ830884
11 *Chilo suppressalis*	0.014	0.002	0.010	0.022	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.002						GQ265912
12 *Pidorus glaucopis*	0.014	0.002	0.010	0.022	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.002	0.005					AJ830757
13 *Aglaope labasi*	0.014	0.002	0.010	0.022	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.002	0.005	0.000				AJ830755
14 *Aglaope infausta*	0.014	0.002	0.010	0.022	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.002	0.005	0.000	0.000			AJ830754
15 *Lymantria dispar*	0.014	0.002	0.010	0.022	0.002	0.002	0.005	0.005	0.005	0.002	0.005	0.005	0.005	0.005		DQ186972

3　讨论

核糖体 RNA 基因由于不编码蛋白质产物,不受密码子编码的选择压力,一般用于生物的远缘关系分析[14,25]。本研究选择了线粒体 16S rRNA 基因序列中的一段保守性区域作为进化分析依据,该区域 A + T 含量丰富,已被成功用于分析鳞翅目蚕蛾科和大蚕蛾科昆虫之间的进化关系[14]。克隆获得的柳蚕线粒体 16S rRNA 基因序列与大蚕蛾科的其它昆虫 16S rRNA 基因序列一样,具有偏向使用碱基 AT 的特点。尽管蚕蛾科和大蚕蛾科的蚕类均具有使用 AT 碱基的偏好性[3,14],但蚕蛾科使用碱基 A 的频率略高于大蚕蛾科,这与刘彦群等[24]基于绢丝昆虫 12S rRNA 基因序列的研究结果具有很大相似性。根据线粒体 16S rRNA 基因序列构建的 NJ,MP 和 UPGMA 进化树初步表明柳蚕属与柞蚕属关系较近,这一结果与前人基于卵黄原蛋白基因[10],核基因(*EF*-1α, DDC)[7,27],线粒体 *COI* 与 16S rRNA[3,14]基因及芳基贮存蛋白(*Arylphorin*)基因[5]的研究结果一致。尽管颇洛韧柞蚕 *Antheraea proylei* 是柞蚕和温带柞蚕的杂交品种[34],但三者的相互进化关系在研究中未能确定。另外,柞蚕属的琥珀蚕与大乌桕蚕 *Attacus atlas*、惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 和蓖麻蚕相聚较近,与前人的提出的琥珀蚕是柞蚕属的较原始类型的观点有所不同[14,32]。

核基因中含有丰富的生物学信息,进化速率慢,能比较真实地反映出物种的进化历

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

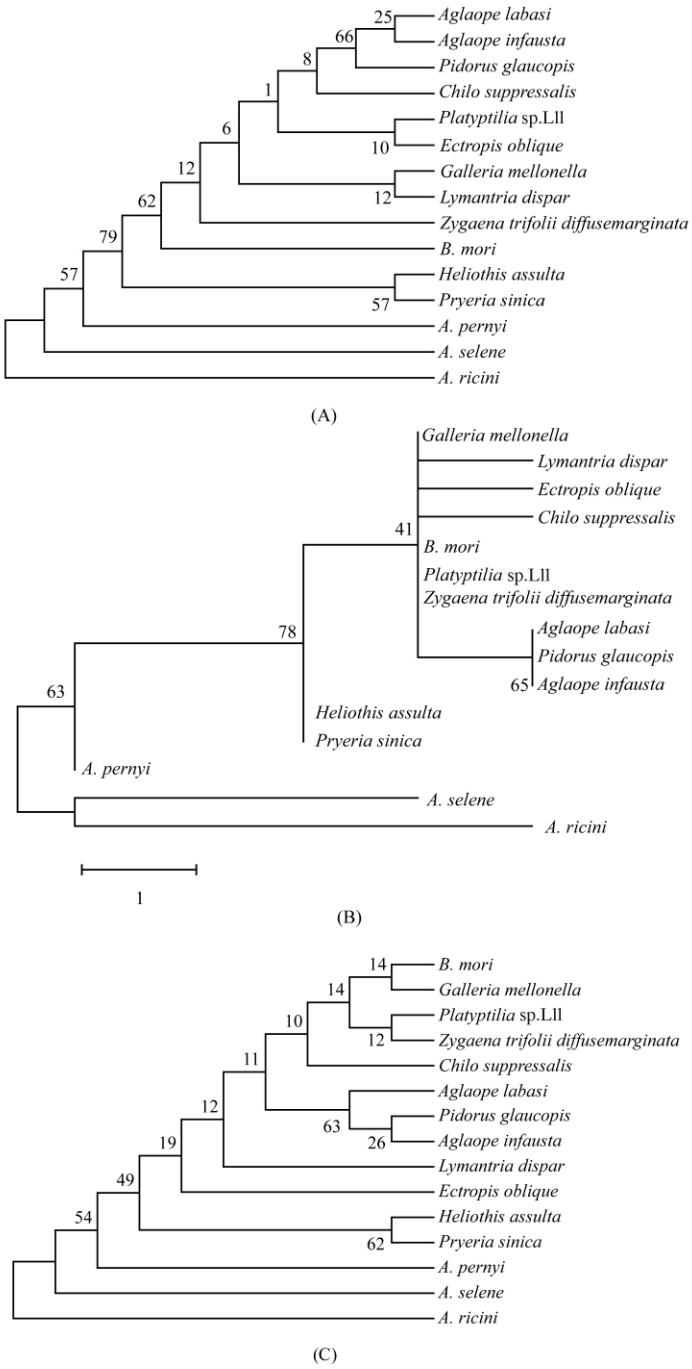

图 3 基于 18S rRNA 基因序列的系统进化分析

A，B，C 分别为 NJ 法，MP 法和 UPGMA 法构建的进化树

史[18]。在以前的研究中发现[25]，不同昆虫的 18S rRNA 基因序列长度差异较大，且不同区域的保守性存在差异[25]，具有 4 个比较保守的区域，我们选择了插入和缺失序列都较少的第 2 段保守性序列（对应家蚕 18S rRNA 基因序列的 303 ~ 728 bp）用于分析其遗传背景。目前已公布或报道的蚕类 18S rRNA 基因的序列多为不完全序列，因此我们选择了鳞翅目中不同

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

科的几种昆虫为代表来分析柳蚕的进化关系。NJ 法和 UPGMA 法构建的进化树支持柳蚕与柞蚕的亲缘关系较为相近,与上述基于柳蚕 16S rRNA 基因序列的研究结果相似,而 MP 法则支持柳蚕与蓖麻蚕关系较近,其结果与沈兴家等[4]基于线粒体基因组的研究一致。尽管 18S rRNA 基因可用在科级甚至属的水平上处理系统关系[35],但从实验结果来看,该 18S rRNA 基因序列未能解决鳞翅目各科之间的进化问题,这可能与选取的 18S rRNA 基因序列中的变异位点较少以及用于比较的物种数量有关[25,36]。

由于线粒体基因与核基因在昆虫分类方面各具优势,线粒体基因为母性遗传,分子量小,进化速率快,可有效分析近缘物种及种内群体间的进化关系[37];而核基因进化速率慢,碱基位点的变异具有同质性,适合于解决高级分类阶元的分子进化问题[18,38]。采用的分析方法和选取的对象不同,会产生不同的结果,因此使用单一某种方法往往并不能很好地处理系统进化关系,因此常结合多个基因及形态学和生态学等特征进行遗传分析[39]。本研究中只收集了部分昆虫的 16S rRNA 基因和 18S rRNA 基因序列用于比较分析,相信随着科学研究的不断深入,将会有更多昆虫的线粒体基因和核基因得以解析,并通过多种分类方法的结合最终阐明柳蚕的遗传背景,使柳蚕资源得以有效地开发利用。

参 考 文 献

1 孙孝龙. 柳蚕的生物学习性与饲育方法. 昆虫知识,2007,**44**(5):751 ~ 753.

2 汪泰初,冯纪元,鲍先巡,等. 绢丝昆虫柳蚕的生物学特性的研究. 安徽农学通报,2005,**11**(1):68.

3 濮佳明,武 松,霍锡敏,等. 珍稀绢丝昆虫柳蚕的 DNA 条形编码与系统进化初步分析. 蚕业科学,2009,**35**(1):154 ~ 159.

4 沈兴家,陈丽媛,唐顺明,等. 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. 江苏科技大学学报,2008,**22**(3):66 ~ 71.

5 Shimada T., Kurimoto Y., Kobayashi M. Phylogenetie relationship of silkmoths inferred from sequence data of the arylphorin gene. *Mol. Phylogenet Evol.*, 1995, **4**(3):223 ~ 234.

6 Ylla J., Peigler R. S., Kawahara A. Y. Cladistic analysis of moon moths using morphology, molecules, and behaviour: *Actias* Leach, 1815; *Argema* Wallengren, 1858; *Graellsia* Grote, 1896 (Lepidoptera: Saturniidae). *Shilap Revta lepid*, 2005, **33**(131): 299 ~ 317.

7 Regier J. C., Mitter C., Peigler R. S., *et al.* Monophyly, composition, and relationships within Saturniinae (Lepidoptera: Saturniidae): evidence from two nuclear genes. *Insect Syst. Evol.*, 2002, **33**: 9 ~ 21.

8 宋方洲,蒋同庆,向仲怀. 绢丝昆虫柳天蚕细胞遗传学的研究. 蚕丝通讯,1990,**1**:2 ~ 7.

9 钱岑,刘朝良,尹志亮. 柳蚕卵黄原蛋白(Vg)cDNA 3′端的克隆及序列分析. 蚕业科学,2008,**34**(1):61 ~ 64.

10 尹志亮,刘朝良,邵引刚,等. 柳蚕卵黄原蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. 激光生物学报,2007,**16**(5):552 ~ 558.

11 刘朝良,朱保建,王磊. 柞蚕和柳蚕雌蛾粘液腺及内容物的研究对比分析. 蚕业科学,2005,**14**(6):420 ~ 423.

12 董胜张,刘朝良,汪泰初,等. 绢丝昆虫柳蚕的生物学特性和卵黄原蛋白鉴定. 蚕业科学,2003,**29**(4):439 ~ 442.

13 Lindroth R. L. Chemical ecology of the luna moth: effects of host plant on detoxification enzyme activity. *J. Chem. Ecol.*, 1989, **15**: 2 019 ~ 2 029.

14 Mahendran B., Ghosh S. K., Kundu S. C. Molecular phylogeny of silk-producing insects based on 16S ribosomal RNA and cytochrome oxidase subunit I genes. *J. Genet.*, 2006, **85**:31 ~ 38.

15 肖金花,肖晖,黄大卫. 生物分类学的新动向-DNA 条形编码. 动物学报,2004,**50**(5):852 ~ 855.

16 Hebert P. D., Cywinska A., Ball S. L., *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B.*, 2003, **270**:313 ~ 322.

17 Hwang J. S., Lee J. S., Goo T. W., *et al.* Molecular genetic relationships between Bombycidae and Saturniidae based on the mitochondria DNA encoding of large and small rRNA. *Genet. Anal. Biomol. Eng.*, 1999, **15**: 223 ~ 228.

18 刘殿锋,蒋国芳. 核基因序列在昆虫分子系统学上的应用. 动物分类学报,2005,**30**(3):484 ~ 492.

19 Kjer K. M. Aligned 18S and insect phylogeny. *Syst. Biol.*, 2004, **53**(3): 506 ~ 514.

20 Carmean D., Kimsey L. S., Berbeet M. L. 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1992, **1**(4):270 ~ 278.

21 Han H. Y., McPheron B. A. Molecular phylogenetic study of the tribe Trypetini (Diptera: Tephritidae), using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, **28**: 501 ~ 513.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

22 Arunkumar K. P., Metta M., Nagaraju J. Molecular phylogeny of silkmoths reveals the origin of domesticated silkmoth, *Bombyx mori* from Chinese *Bombyx mandarina* and paternal inheritance of *Antheraea proylei* mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2006, **40**: 419 ~ 427.

23 卜云,郑哲民. COⅡ基因在昆虫分子系统学研究中的作用和地位. 昆虫知识, 2005, **42**(1):18 ~ 22.

24 刘彦群, 靳向东, 秦利, 等. 九种绢丝昆虫线粒体 12S rRNA 基因的序列特征和系统发育分析. 昆虫学报, 2008, **51**(3): 307 ~ 314.

25 魏国清,代君君,刘朝良,等. 家蚕核糖体 18S RNA 基因的序列分析及分子系统学研究. 经济动物学报, 2006, **10**(3): 151 ~ 156.

26 戴仁怀,李子忠,邢济春. 叶蝉科昆虫分子系统发育的研究进展. 昆虫知识, 2008, **45**(6): 869 ~ 875.

27 Regier J. C., Grant M. C., Mitter C., *et al.* Phylogenetic relationships of wild silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae) inferred from four protein-coding nuclear genes. *Syst. Entomol.*, 2008, **33**: 219 ~ 228.

28 Oberprieler R. G. Classification of the African Saturniidae (Lepidoptera)-the quest for natural groups and relationships. *Metutnolphosis: J. Lepid Soc. Afr. Occ. Suppl.*, 1997, **3**: 142 ~ 155.

29 Shouche Y. S., Patole M. S. Sequence analysis of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene fragment from seven mosquito species. *J. Biosci.*, 2000, **25**(4):361 ~ 366.

30 Chatterjee S. N., Tanushree T. Molecular profiling of silkworm biodiversity in India: An overview. *Genetika*, 2004, **10**:1 ~ 9.

31 Mahendran B., Ghosh S. K., Kundu S. C. Molecular phylogeny of silk producing insects based on internal transcribed spacer DNA. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **39**(5): 522 ~ 529.

32 Sinha A. K., Sinha R. K., Goel A. K., *et al.* A review on the breeding and genetic aspect of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. *Proc. Con. Cytol. Genet.*, 1994, **4**: 7 ~ 16.

33 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150 ~ 163.

34 Nagaraju J., Jolly M. S. Interspecific hybrids of *Antheraea roylei* and *A. pernyi*—a cytogenetic reassessment. *Theor. Appl. Genet.* 1985, **72**: 269 ~ 273.

35 Martin J. A., Pashcy D. P. Molecular systematic analvsis of butterfly family and some subfamily relationships (Lepidopterat Papilionidae). *Ann. Ent. Soc. Am.*, 1992, **85**:127 ~ 135.

36 Carmean D., Kimsey L. S., Berbeet M. L. 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1992, **1**(4):270 ~ 278.

37 王备新,杨莲芳. 线粒体 DNA 序列特点与昆虫系统学研究. 昆虫知识, 2002, **39**(2): 88 ~ 92.

38 张大治,郑哲民. 分子遗传标记技术在蜻蜓目昆虫研究中的应用. 昆虫知识, 2005, **42**(2): 123 ~ 127.

39 Racheli L., Racheli T. Phylogenetic hypothesis and classification: theoretical and methodological issues with reference to some studies on Saturniidae (Lepidoptera: Saturniidae). *Shilap Revta. lepid*, 2006, **34**(133): 5 ~ 12.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net