

周氏啮小蜂非典型气味受体基因的cDNA序列及进化分析*

赵燕妮** 刘 强 李 敏***

(天津市动植物抗性重点实验室, 天津师范大学, 生命科学学院, 天津 300387)

摘 要 【目的】对重大林业害虫美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) 的重要寄生性天敌周氏啮小蜂 *Chouioia cunea* Yang (膜翅目: 姬小蜂科) 一个 *Or83b* 直同源基因的 cDNA 全长序列 CcOr1 进行多角度的进化分析, 为研究周氏啮小蜂嗅觉分子机制奠定基础。【方法】通过转录组测序的方法鉴定 CcOr1 基因全长, 并对该基因进行序列及进化分析。【结果】该基因长度为 1 428 bp, 编码 475 个氨基酸; 蛋白二级结构预测具脊椎动物 G 蛋白典型的七跨膜结构域。【结论】该基因较为保守, 主要接受负选择压力。作为寄主广泛的寄生蜂, 周氏啮小蜂与寄主单一的种类相比, 其同义突变率较低, 密码子偏好性较高。

关键词 周氏啮小蜂, *Or83b* 基因, 嗅觉分子机制, 进化分析

Identification and evolution of the *Or83b* olfactory gene of *Chouioia cunea* Yang

ZHAO Yan-Ni** LIU Qiang LI Min***

(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University. 300387, Tianjin)

Abstract 【Objectives】To investigate the olfactory molecular mechanism of *Chouioia cunea* Yang (Hymenoptera:Eulophidae). *C. cunea* is a significant parasitic natural enemy of the fall webworm *Hyphantria cunea* (Drury). We here provide the first description of the full-length cDNA of the *Or83b* orthologous gene of *C. cunea*, named CcOr1. 【Methods】We identified the full-length of CcOr1 and analyzed its gene sequence and likely evolution. 【Results】Sequencing showed that CcOr1 is 1 428 bp in length, encoding 475 amino acid residues. The secondary structure of CcOr1 is similar to the G protein-coupled receptors of vertebrates with seven transmembrane regions. 【Conclusion】The CcOr1 gene is highly conserved relative to other insects and appears to be primarily negatively selected. As a parasitic wasp with a wide range of hosts, *C. cunea* has lower synonymous substitutions and higher codon usage bias compared with host-specific wasps.

Key words *Chouioia cunea*, *Or83b* gene, olfaction molecular mechanism, evolution analysis

昆虫的嗅觉系统对昆虫选择寄主、觅食、求偶、进行种间交流等行为发挥着重要的作用 (Kaissling *et al.*, 1987)。昆虫的嗅觉识别过程需要多种蛋白参与, 其中气味受体 (Odorant receptors, ORs) 是介导特异性气味分子与嗅觉神经元专一性结合的一类重要蛋白 (Vosshall *et al.*, 1999)。目前的研究将其分为两类, 一类

是传统气味受体 (Conventional odorant receptors, CORs), 每种昆虫有多个, 分别感受不同的气味分子, 其编码基因在不同昆虫之间相似度较低; 另一类是非典型气味受体 (Atypical odorant receptors, AORs), 每种昆虫仅有一个, 该基因在不同昆虫间较为保守 (Larsson *et al.*, 2004)。这种气味受体基因首先在果蝇基因组内发现并

* 资助项目: 国家自然科学基金 (31201730); 天津市高等学校科技发展计划项目 (20110602); 天津师范大学博士基金 (52XB1003) 及天津市动植物抗性重点实验室开放基金

**E-mail: cqslzyy@163.com

***通讯作者, E-mail: skylm@mail.tjnu.edu.cn

收稿日期: 2014-03-21, 接受日期: 2014-05-29

命名为 *Or83b* (Pennisi, 1999)。其编码的气味受体参与气味的识别过程, 但并不感受具体的气味分子 (Elmore and Smith, 2001)。由于昆虫的大部分嗅觉感受神经元需同时表达结合气味配体的 CORs 和不直接识别气味分子的 AORs 才能履行正常的功能 (Larsson *et al.*, 2004; Pitts *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005)。在嗅觉神经元中删除 *OR83b* 后, 果蝇的幼虫和成虫阶段对气味都不敏感了 (Wicher *et al.*, 2008), 由此可见 CORs 对昆虫执行嗅觉功能是非常重要的。对其进行深入研究, 除具有阐明昆虫嗅觉识别的理论意义外, 还有助于揭示昆虫与环境信息交流的机制, 能为探索新的害虫防治途径提供重要的科学理论指导。

目前, 对于此类研究主要集中于鳞翅目、双翅目等一些重大害虫中 (Fox *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2002; Krieger *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2004; 秦浩等, 2014), 而对于天敌昆虫寄生蜂而言, 仅见个别报道 (张帅等, 2009; Robertson *et al.*, 2010)。由于长期进化的结果, 在复杂的生境中, 寄生蜂必须具备良好的搜寻寄主的能力 (Tibor *et al.*, 2012)。来自寄主及寄主生境中的各种气味挥发物在寄生蜂寻找寄主的过程中起重要作用 (Costa and Reeve, 2011)。非典型气味受体在昆虫对寄主的识别过程中扮演着重要的角色 (Dobritsa *et al.*, 2003)。对寄生蜂非典型气味受体进行研究, 不仅有助于阐释寄生蜂对寄主昆虫的搜寻机制, 而且对于探索提高寄生蜂的控害能力具有重要的意义。

周氏啮小蜂 *Chouioia cunea* Yang 是我国重要入侵物种美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Drury) 的重要寄生性天敌, 体长 1.1~1.5 mm, 群集内寄生于美国白蛾蛹中 (杨忠岐, 1989), 是抑制美国白蛾的主要天敌因子, 对控制美国白蛾的危害起到重要作用 (Yang *et al.*, 2008)。除寄生于美国白蛾外, 还可寄生于鳞翅目的枯叶蛾科、毒蛾科、舟蛾科、尺蛾科、菜蛾科和双翅目的蝇科、寄蝇科及鞘翅目的叶甲科和瓢甲科等 20 多种昆虫 (苏智等, 2004)。

本文鉴定了一个周氏啮小蜂非典型性气味受体基因 cDNA 的全序列, 并对其从基因进化的角度进行分析, 为进一步研究周氏啮小蜂嗅觉分子机制奠定基础, 也为寄生性昆虫嗅觉分子机制的研究积累数据。

1 材料与方法

周氏啮小蜂购于北京格瑞碧源科技有限公司 (<http://www.geruibiyouan.com/>), 并于室内传代培养。培养条件: 于人工气候箱 (PQX-350H) 中, 温度 25℃, 相对湿度 60%~80%, 无光黑暗。取羽化后 24 h 内的雌性周氏啮小蜂, 于解剖镜下切取触角, 立即浸于 RNAlater (Ambion 公司, AM7020) 中; 每 200 头雌性周氏啮小蜂的触角贮存于一个 1.5 mL 离心管中, 共搜集 8 管样品, 并于 -20℃ 下低温保存, 样品制备完成后送华大基因科技服务有限公司 (<http://www.genomics.cn/index>) 进行转录组测序。

1.1 基因序列分析

应用高通量测序平台 Illumina HiSeq™ 2000 对周氏啮小蜂触角样本进行转录组测序, 采用 Trinity 软件对每个读取序列片段进行聚类后拼接成 unigene, 再结合生物信息学软件进行靶标序列 cDNA 全长的判定。应用 BioEdit 7.2.1 分析氨基酸残基数量和相对分子质量, 使用 EXPASY 平台中的 Signal P 3.0 Serve 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件预测蛋白质氨基酸序列的信号肽位置。使用 TMHMM v2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜结构域。

从 NCBI 上下载同源基因序列, 使用 Clustalx 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) 软件进行序列比对, 将比对后的 20 条 *Or83b* 氨基酸序列提交到 EMBOSS Pairwise Alignment Algorithm (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>), 进行比对, 然后计算出氨基酸一致性和相似性。

1.2 系统发育的构建

将测序所得序列与源自 GenBank 的 19 条序列 (*Microplitis mediator* *Or1* [EF141511]; *Nasonia vitripennis* *Or1* [NM001170994]; *Apis mellifera* *Or2* [NM001134943]; *Drosophila melanogaster* *Or83b* [NM079511]; *Ceratitis capitata* *R2* [AY843206]; *Anopheles gambiae* *Or7* [AY363725]; *Culex pipiens quinquefasciatus* *Or7* [DQ231246]; *Aedes aegypti* *Or7* [AY582943]; *Bombyx mori* *Or2* [AJ555487]; *Antheraea pernyi* *Or2* [AJ555486]; *Helicoverpa zea* *R2* [AY843204]; *Mamestra brassicae* *R2*

[AY485222]; *Spodoptera exigua* R2 [AY862142]; *Spodoptera litura* R2 [DQ845292]; *Tribolium castaneum* R2 [XM968103]; *Ceratosolen solmsi marchali* Or2 [EU281848]; *Apocrypta bakeri* Or2 [EU281849]; *Philotrypesis pilosa* Or2 [EU281850]; *Philotrypesis* sp. Or2 [EU281851]), 用 CLUSTAL W1.8 (Thompson *et al.*, 1994) 进行比对。基于比对后的氨基酸及核苷酸序列, 使用 PAUP 4.0 (Swofford, 2003) 最大简约法 (Maximum parsimony) 分别构建了氨基酸和核苷酸进化树。采用启发式的搜索, 随机加入分类单元, 1 000 次重复, 每次保留 10 棵树, 其它为默认参数。

1.3 选择压力分析

利用 Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC) 软件包 (<http://www.datamonkey.org/>) (Suzuki and Gojobori, 1999) 分析该基因所受的选择压力。在线提交 20 条 *Or83b* 直同源序列, 利用最大似然法 (Maximum likelihood) 构建祖先序列, 计算非同义替换与同义替换的比值 Ka/Ks (即 dN/dS)。利用双尾法检验得出 P 值 (P -values < 0.05 为显著, 小于 0.01 为极显著)。

1.4 替代速率

通过核苷酸的同义突变频率 (Ks) 和非同义突变频率 (Ka) (Nei and Gojobori, 1986) 来进行评价。通过 MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007) 中的 modified Nei-Gojobori 方法 (Zhang *et al.*, 1998) 假设 transition/transversion bias=1.021 进行计算。分析基于膜翅目和双翅目昆虫的序列比对, 除周氏啮小蜂的序列以外还包括膜翅目中的蝇蛹金小蜂 *Nasonia vitripennis*、中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator*、聚果榕小蜂 *Ceratosolen solmsi martchal*、短尾佩妃延腹榕小蜂

Philotrypesis pilosa、长尾佩妃延腹榕小蜂 *Philotrypesis* sp.、对叶榕缩腹榕小蜂 *Apocrypta bakeri* 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera*; 双翅目中的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、埃及斑蚊 *Aedes aegypti* 和致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus*。所有比对 gap 成对删除。

1.5 密码子使用偏好性

通过内嵌于 DnaSP version 4.0 (Rozas *et al.*, 2003) 的 Effective Number of Codons (ENC) (Wright, 1990), Codon Bias Index (CBI) (Morton, 1993) Scaled Chi-square (Scaled χ^2) (Shields *et al.*, 1988) 3 种方法来评价该基因的密码子偏好性。

2 结果与分析

2.1 基因序列分析

经转录组测序及序列拼接后, 成功鉴定到含完整开放阅读框的 *Or83b* 基因的 cDNA (GenBank 登录号: KJ847283) 命名为 *CcOr1* 其长度为 1 428 bp, 编码 475 个氨基酸, 相对分子量为 867 387。在线预测表明该蛋白无信号肽, 其跨膜结构域如图 1 所示, 具有典型 G 蛋白偶联受体的七跨膜结构, 该受体的第 3 个胞内区较长, 并连接了第 4 和第 5 跨膜区。

周氏啮小蜂 *C.cunea* 与膜翅目的 7 种昆虫之间的相似性的范围是 66.5%~76.4%, 一致性范围是 66.5%~77.4%; 其与双翅目的 5 种昆虫之间的相似性的范围是 58.4%~62.6%, 一致性范围是 58.4%~64.6%, C 端的 161 个氨基酸更为保守, 其相似性与一致性将近 90%。

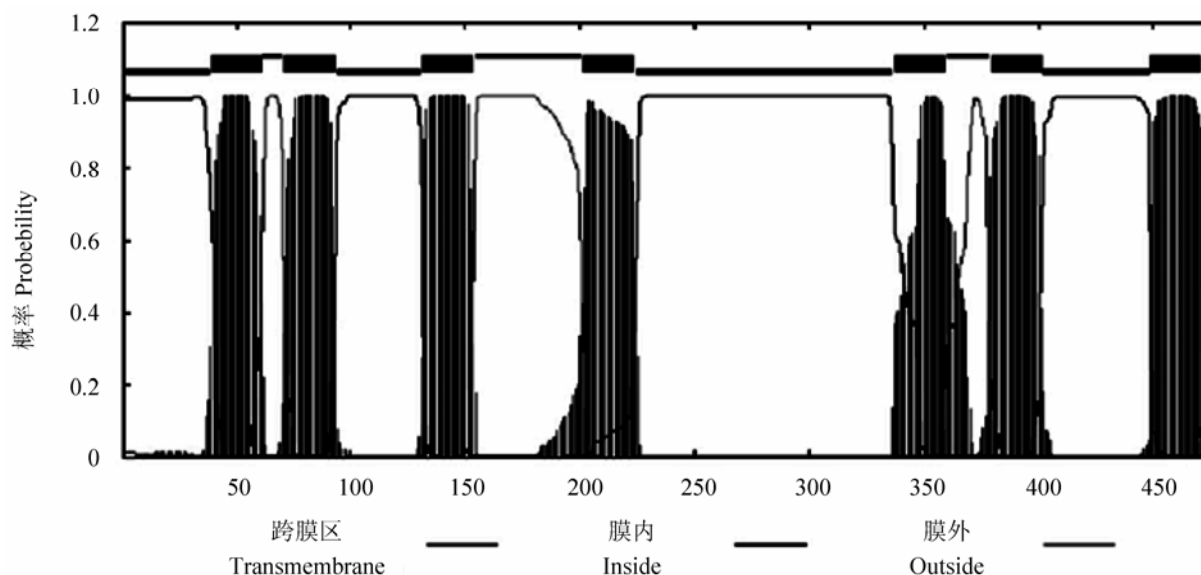


图1 TMHMM 跨膜区预测结果

Fig. 1 TMHMM was used to predict the transmembrane helices of integral membrane proteins

Transmembrane 代表跨膜区; Inside 代表胞内环; Outside 代表胞外环。

Transmembrane, Transmembrane domains; Inside, Intracellular domains; Outside, Extracellular domains.

2.2 进化树的构建

基于 20 种昆虫核苷酸比对矩阵共有 1 482 个碱基, 其中 852 个为简约信息位点; 氨基酸矩阵共有 496 个位点, 其中 233 个是简约信息位点。进化树如图 2 所示, 核苷酸与氨基酸构建的系统发育树拓扑结构相同。周氏啮小蜂与膜翅目的昆虫聚成一支, 其中核苷酸和氨基酸的节点支持率均为 82。

2.3 选择压力分析

20 条 *Or83b* 直同源基因平均 Ka/Ks (即 dN/dS) 值为 0.113761, 主要接受负选择。在 0.1 和 0.2 的显著性水平上均未检测到正选择位点, 显著水平为 0.3 时, 检测到一个正选择位点, 为第 159 位氨基酸, $dN-dS=1.04941$, $P\text{-value}=0.251075$ 。这个位置周氏啮小蜂 *C. cunea* 的氨基酸是组氨酸 (His), 在比对的 20 种昆虫中共发

现了两种不同氨基酸, 组氨酸 (His) 和谷氨酰胺 (Gln)。在 0.1 的显著性水平上我们检测到了 375 个氨基酸位点受到负选择压力。显著性阈值为 0.001 时仍有 78 个负选择位点。

2.4 替代速率

13 条序列的比对共 1 482 个核苷酸位点供分析。969 个核苷酸位点存在变异, 其中 851 个为简约信息位点 (Parsimony information sites), 110 个为单突变位点 (Singleton sites)。

Or83b 直同源基因的同义分歧及非同义分歧结果见表 1, 粗体字代表膜翅目中专一性寄生蜂聚果榕小蜂 *C. solmsi*, 寄主广泛的周氏啮小蜂小蜂, 蝇蛹金小蜂 *N. vitripennis* 和对叶榕缩腹榕小蜂 *A. bakeri* 与双翅目昆虫之间的同义及非同义差异。从表 1 中看出, 专一性寄生蜂聚果榕小蜂 *C. solmsi* 与双翅目昆虫之间的同义分歧 (Ks) 差异范围是 1.492 到 2.285, 而 3 种寄主广泛的寄生蜂与双翅目昆虫之间的同

* 资助项目: 国家自然科学基金 (31201730); 天津市高等学校科技发展计划项目 (20110602); 天津师范大学博士基金 (52XB1003) 及天津市动植物抗性重点实验室开放基金

**E-mail: cqslzyy@163.com

***通讯作者, E-mail: skylm@mail.tjnu.edu.cn

收稿日期: 2014-03-21, 接受日期: 2014-05-29

义分异 (Ks) 差异相对较小, 从 0.734 到 1.691, 寄主广泛的寄生蜂中, 最高的同义分异 (Ks) 差异存在于对叶榕缩腹榕小蜂与双翅目之间, 范围为 1.137 到 1.691。专一性寄生蜂聚果榕小蜂与双翅目昆虫之间的非同义分异 (Ka) 差异范围是 0.813 到 0.943, 3 种寄主广泛的寄生蜂与双翅目昆虫之间的非同义分异 (Ka) 差异范围是 0.819 到 0.976, 两者的差异范围较为相近。

2.5 密码子使用偏好性分析

密码子偏好性分析结果见表 2。寄主专一性

小蜂聚果榕小蜂显示出了较低的密码子偏好性, 而 3 种寄主广泛的小蜂的密码子偏好性相对较高; 密码子第 3 位的 G+C 含量在聚果榕小蜂中是最低的, 而第 2 位的 G+C 含量不论是寄主专一性小蜂、寄主广泛的小蜂, 膜翅目或是双翅目都是相似的, 都在 37% 左右, 因此造成了寄主专一性小蜂编码区的 G+C 含量较低。

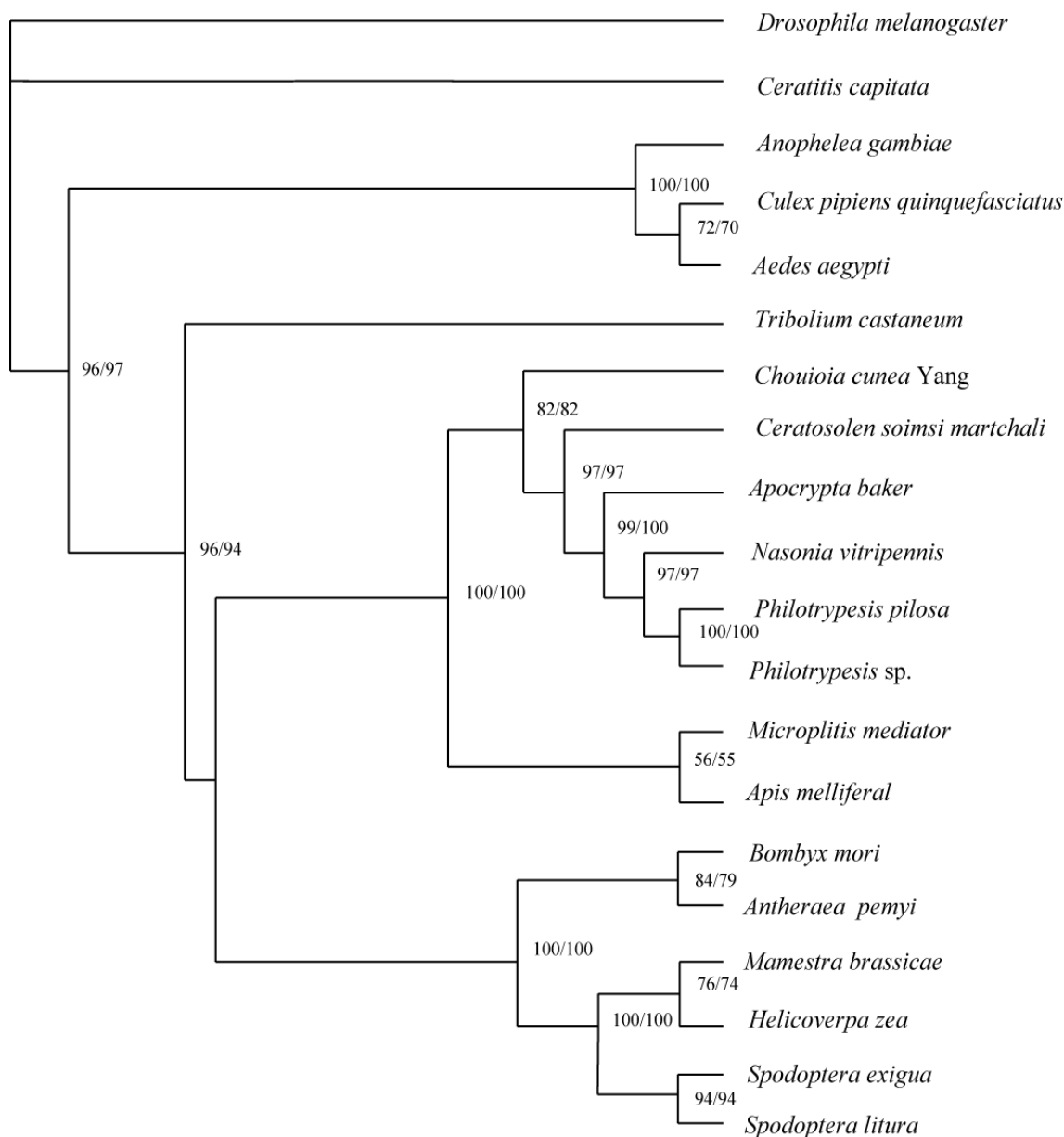


图 2 根据核苷酸序列和氨基酸序列构建的 MP 树

Fig. 2 The maximum parsimony tree of nucleotide and amino acid sequences

“/” 左侧数值为基于核苷酸建树节点支持率, 右侧的数值为基于氨基酸建树的节点支持率。
The nucleotide tree bootstrap support is on the left of “/” and the amino acid tree is on the right of “/”.

表 1 *Or83b* 直同源基因的同义分异和非同义分异
Table 1 Synonymous and nonsynonymous divergence of *Or83b* genes

	P.pi	P.sp.	N.vit	A.bak	C.sm	C.cun	M.med	A.mel	C.cap	D.mel	A.gam	C.pq	A.aeg
P.pi		0.012	0.017	0.019	0.062	0.119	0.173	0.689	0.920	0.926	0.870	0.837	0.870
P.sp.	0.065		0.017	0.019	0.062	0.117	0.170	0.704	0.902	0.911	0.849	0.815	0.856
N.vit	0.438	0.409		0.014	0.054	0.114	0.165	0.708	0.910	0.917	0.873	0.832	0.868
A.bak	0.650	0.609	0.659		0.054	0.113	0.160	0.690	0.912	0.913	0.869	0.819	0.859
C.sm	1.407	1.508	1.492	1.365		0.133	0.172	0.693	0.913	0.943	0.867	0.813	0.859
C.cun	1.288	1.281	1.407	1.410	2.099		0.190	0.767	0.928	0.976	0.845	0.839	0.870
M.med	n/c	n/c	n/c	n/c	3.227	2.698		0.684	0.912	0.914	0.870	0.843	0.856
A.mel	1.617	1.527	1.992	2.088	2.755	1.925	n/c		0.898	0.868	0.876	0.865	0.858
C.cap	1.471	1.660	1.535	1.654	1.833	1.879	2.068	1.770		0.080	0.167	0.190	0.180
D.mel	1.076	1.025	0.897	1.335	2.129	1.590	n/c	1.307	1.816		0.168	0.197	0.172
A.gam	1.133	1.117	0.969	1.499	2.285	1.446	n/c	1.396	1.740	0.886		0.075	0.078
C.pq	0.889	0.825	0.734	1.137	1.837	1.160	n/c	1.489	2.175	0.732	0.605		0.057
A.aeg	1.199	1.162	1.180	1.691	1.492	1.594	2.558	1.646	2.070	1.157	0.903	0.782	

同义分异 (Ks) 位于对角线左下侧, 非同义分异 (Ka) 位于对角线右上侧, n/c 表示无法计算。其中物种名均为缩略形式, 其全称如下: P.pi, *Philotrypesis pilosa*; P.sp., *Philotrypesis* sp.; N.vit, *Nasonia vitripennis*; A.bak, *Apocrypta bakeri*; C.sm, *Ceratosolen solmsi martchali*; C.cun, *Chouioia cunea* Yang; M.med, *Microplitis mediator*; A.mel, *Apis mellifera*; C.cap, *Ceratitis capitata*; D.mel, *Drosophila melanogaster*; A.gam, *Anopheles gambiae*; C.pq, *Culex pipiens quinquefasciatus*; A.aeg, *Aedes aegypti*.

Estimations of synonymous substitutions (Ks) are shown below the diagonal. The estimated nonsynonymous divergence (Ka) are shown above the diagonal. n.a = not applicable. Species names are as follows: P.pi, *Philotrypesis pilosa*; P.sp., *Philotrypesis* sp.; N.vit, *Nasonia vitripennis*; A.bak, *Apocrypta bakeri*; C.sm, *Ceratosolen solmsi martchali*; C.cun, *Chouioia cunea* Yang; M.med, *Microplitis mediator*; A.mel, *Apis mellifera*; C.cap, *Ceratitis capitata*; D.mel, *Drosophila melanogaster*; A.gam, *Anopheles gambiae*; C.pq, *Culex pipiens quinquefasciatus*; A.aeg, *Aedes aegypti*.

表 2 *Or83b* 同源基因的密码子偏好性
Table 2 Estimates of codon bias in *Or83b* genes

物种 Taxa	ENC	CBI	Scaled χ^2	G+C2	G+C3s	G+Cc
周氏啮小蜂						
C.cun	54.653	0.210	0.164	0.365	0.537	0.471
膜翅目其他昆虫 Other hymenopteran species						
N.vit	42.821	0.563	0.576	0.361	0.814	0.561
A.bak	55.534	0.309	0.224	0.363	0.594	0.492
C.sm	60.722	0.204	0.113	0.365	0.490	0.454
A.mel	58.101	0.238	0.156	0.395	0.562	0.483
M.med	57.398	0.232	0.150	0.357	0.357	0.410
P.pil	47.416	0.449	0.435	0.359	0.745	0.541

P.sp	45.549	0.480	0.466	0.359	0.765	0.546
续表 2 (Table 2 continued)						
物种 Taxa	ENC	CBI	Scaled χ^2	G+C2	G+C3s	G+Cc
双翅目昆虫 Dipteran species						
C.cap	49.519	0.351	0.357	0.370	0.559	0.460
A.gam	41.259	0.525	0.591	0.377	0.777	0.558
C.pq	34.252	0.674	0.984	0.375	0.881	0.593
A.aeg	50.663	0.338	0.361	0.361	0.662	0.512
D.mel	38.340	0.601	0.729	0.372	0.824	0.564

ENC (Effective number of codons), 有效密码子数; CBI (Codon bias index) 密码子偏好性指数; Scaled χ^2 (Scaled Chi square); G+C2, 密码子第 2 位的 G+C 含量; G+C3s, 密码子第 3 位的 G+C 含量。其物种缩写见表 1。
ENC, Effective number of codons; CBI, Codon bias index; Scaled χ^2 , Scaled Chi square; G+C2, G+C content at the second codon positions; G+C3s, G+C content at the third codon . Species names are same with Table 1.

3 讨论

本研究首次鉴定了周氏啮小蜂的一个非常规嗅觉受体 *Or83b* 基因, 与其他昆虫的同源性较高, 与膜翅目昆虫氨基酸序列的一致性为 66.5%~76.4%, C 端更保守。由此看出该嗅觉受体是一类非常保守的基因, 这类受体起着结合常规的嗅觉受体的作用, 并不直接参与气味识别 (Larsson *et al.*, 2004; Pitts *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005), 而绝大部分的常规嗅觉受体的表达都要依赖于非常规的嗅觉受体和常规的嗅觉受体的异源二聚体的形成 (Larsson *et al.*, 2004)。由于功能上的重要性, 决定了此类基因都非常的保守。

该受体具有 G 蛋白偶联受体所具有的典型的 7 个跨膜区 (Vosshall *et al.*, 1999 , 2000; Robertson *et al.*, 2003), 其中第 3 个胞内环非常长。有相关的研究表明哺乳动物 G 蛋白偶联受体的第 2 个胞外环也较长, 其功能是与配基结合 (Chao *et al.*, 1999; Capendeguy *et al.*, 2006)。由于哺乳动物的 G 蛋白偶联受体的 N 端在胞外, 而昆虫的嗅觉受体的 N 端位于胞内 (Benton *et al.*, 2006)。因此我们推断, 本嗅觉受体的第 3 个长胞内环可能与嗅觉受体的结合有关。

基于 20 个直同源 *OR83b* 基因应用 *Ka/Ks* 比率进行选择压力分析表明, 该基因总体上处于负选择压力下。在负选择的作用下, 基因的进化速

率是非常缓慢的, 这也是该基因如此保守的原因。当显著水平为 0.3 时, 在第 159 位检测到了一个正选择位点, 周氏啮小蜂 *Or83b* 基因在此位点上的氨基酸是组氨酸 (His), 在所有的 20 种昆虫的 *Or83b* 基因中总共检测到两种氨基酸, 组氨酸 (His) 和谷氨酰胺 (Gln)。该位置的氨基酸在不同的昆虫物种的差异我们推测是因为该位点进化速率比较快所造成的, 但这个位点起到什么样的生物学功能, 还需进一步的研究才能得出结论。Suzuki 和 Gojobori (1999) 的研究表明, 人白细胞抗原 (HLA) 的两个受正选择氨基酸位点可能与抗原识别有关。也有其他一些研究表明正选择位点可能为结合位点并且结合特性正是由这几个关键位点的氨基酸决定的。如果该位点为结合位点, 氨基酸的分化可能反映了不同类群间的结合特性。

相对于寄主单一的聚果榕小蜂, 在周氏啮小蜂等其他寄主广泛的小蜂中, 检测到了相对较低的同义突变率 (*Ks*)。而基于密码子偏好性分析得出, 寄主单一的传粉小蜂显示出了较低的密码子偏好性, 而周氏啮小蜂与其他寄主广泛的小蜂的密码子偏好性较高。本研究结果支持密码子偏好性程度与同义突变率 (*Ks*) 呈负相关 (Sharp and Li, 1987, 1989)。在聚果榕小蜂中相对较高的同义突变率, 说明作用于该物种基因的选择压力较松弛。尽管其寄主专一性要明显的强于其他小蜂, 但自然选择似乎并没有过多的作用于该基因

以严格的维持其保守性。不同的昆虫之间几乎不变的非同义分异 (Ka) 值说明该基因所承受的负选择压力是比较强的, 这一结论又进一步证实了其保守性的原因。

参考文献 (References)

- Benton R, 2006. On the origin of smell: odorant receptors in insects. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 63 (14) : 1579–1585.
- Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. A typical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, DOI : 10.1371 / journal . pbio . 0040020.
- Bukovinszky T, Poelman EH, Kamp A, Hemerik L, Prekatsakis G, Dicke M, 2012. Plants under multiple herbivory: consequences for parasitoid search behaviour and foraging efficiency. *Anim. Behav.*, 83: 501–509.
- Capendeguy O, Chodanowski P, Michelin O, Horisberger JD, 2006. Access of extracellular cations to their binding sites in Na,K-ATPase: role of the second extracellular loop of the alpha Subunit. *J. Gen. Physiol.*, 127 (3) : 341–352.
- Chao TH, Ember JA, Wang M, Bayon Y, Hugli TE, Ye RD, 1999. Role of the second extracellular loop of human C3a receptor and agonist binding and receptor function. *J. Biol. Chem.*, (14): 9721–9728.
- Costa A, Reeve JD, 2011. Olfactory experience modifies semiochemical responses in a bark beetle predator. *J. Chem. Ecol.*, 37(11): 1166–1176.
- Dobritsa AA, van der Goes van Naters W, Warr CG, Steinbrecht RA, Carlson JR, 2003. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 37 (5) : 827–841.
- Elmore T, Smith DP, 2001. Putative *Drosophila* odor receptor OR43b localizes to dendrites of olfactory neurons. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 31 (8) : 791–798.
- Fox AN, Pitts RJ, Zwiebel LJ, 2002. A cluster of candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Chem. Senses*, 27 (5) : 453–459.
- Jones WD, Nguyen TT, Kloss B, Lee KJ, Vosshall LB, 2005. Functional conservation of an insect odorant receptor gene across 250 million years of evolution. *Curr. Biol.*, 15 (4) : R119–R121.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19 (18): 2496–2497.
- Kaissling KE, Strausfeld CZ, Rumbo ER, 1987. Adaptation processes in insect olfactory receptors: Mechanisms and behavioral significance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 510(1): 104–112.
- Krieger J, Raming K, Dewer YM, Bette S, Conzelmann S, Breer H, 2002. A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth *Heliothis virescens*. *Eur. J. Neuro. Sci.*, 16 (4): 619–628.
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703–714.
- Melo AC, Rützler M, Pitts RJ, Zwiebel LJ, 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem. Senses*, 29(5): 403–410.
- Morton BR, 1993. Chloroplast DNA codon use: evidence for selection at the psb A locus based on tRNA availability. *J. Mol. Evol.*, 37 (3): 273–280.
- Nei M, Gojobori T, 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, 3 (5): 418–426.
- Pennisi E, 1999. Fruit fly odor receptors found. *Science*, 283 (5406): 1239.
- Pitts RJ, Fox AN, Zwiebel LJ, 2004. A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *PNAS*, 101 (14): 5058–5063.
- Robertson HM, Gadau J, Wanner KW, 2010. The insect chemoreceptor superfamily of the parasitoid jewel wasp *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol. Biol.*, 19(1): 121–136.
- Robertson HM, Warr CG, Carlson JR, 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 100 (2): 14537–14542.
- Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *PNAS*, 101 (47): 16653–16658.
- Sharp PM, Li WH, 1987. The rate of synonymous substitution in enterobacterial genes is inversely related to codon usage bias. *Mol. Biol. Evol.*, 4 (3): 222–230.
- Sharp PM, Li WH, 1989. On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 28 (5): 398–402.
- Shields DC, Sharp PM, Higgins DG, Wright F, 1988. “Silent” sites in *Drosophila* genes are not neutral: evidence of selection among synonymous codons. *Mol. Biol. Evol.*, 5 (6): 704–716.
- Suzuki Y, Gojobori T, 1999. A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.*, 16 (10):

- 1315–1328.
- Swofford DL, 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sunderland: Massachusetts, Sinauer Associates.
- Takeshi S, Takao N, Hidefumi M, Hajime M, 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *PNAS*, 101 (47): 16653–16658.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24 (8): 1596–1599.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, 22 (22): 4673–4680.
- Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R, 1999. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 96 (5): 725–736.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R, 2000. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*, 102 (2): 147–159.
- Wicher D, Schafer R, Bauernfeind R, Stensmyr MC, Heller R, Heinemann SH, Hansson BS, 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclic-nucleotide-activated cation channels. *Nature*, 452 (7190): 1007–1011.
- Wright F, 1990. The ‘effective number of codons’ used in a gene. *Gene*, 87 (1): 23–29.
- Yang ZQ, Wang XY, Wei JR, Qu HR, Qiao XR, 2008. Survey of the native insect natural enemies of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) in China. *Bull. Entomol. Res.*, 98 (3): 293–302.
- Zhang JZ, Rosenberg HF, Nei M, 1998. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *PNAS*, 95 (7): 3708–3713.
- 秦浩, 于艳雪, 马菲, 张俊华, 叶保华, 陈乃中, 2014. 欧洲型舞毒蛾气味受体基因OrCo的克隆及序列分析. *应用昆虫学报*, 51(1): 146–155. [QIN H, YU YX, MA F, ZHANG JH, YE BH, CHEN NZ, 2014. Molecular cloning and sequence analysis of the odorant receptor gene OrCo in *Lymantria dispar* (European gypsy moth). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 146–155.]
- 苏智, 杨忠岐, 魏建荣, 王小艺, 2004. 白蛾周氏啮小蜂转主寄主的研究. *林业科学*, 40 (4): 106–116. [SU Z, YANG ZQ, WEI JR, WANG XY, 2004. Studies on alternate host of the parasitoid *Chouioia cunea* (Hymenoptera: Eulophidae). *Scientia silvae sinicae*, 40(4) : 106–116.]
- 杨忠岐, 乔秀荣, 韩义生, 2003. 寄生于美国白蛾的啮小蜂—新种(膜翅目, 姬小蜂科). *动物分类学报*, 28(4): 733–736. [YANG ZQ, QIAO XR, HAN YS, 2003. A new species of the genus *Tetrastichus* (Hymenoptera, Eulophidae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 28(4) : 733–736.]
- 张帅, 张永军, 苏宏华, 2009. 中宏侧沟茧蜂非典型气味受体的克隆及组织特异性表达. *中国农业科学*, 42(5): 1639–1645. [ZHANG S, ZHANG YJ, SU HH, 2009. Gene cloning and tissue-specific expression of an olfactory receptor in *Microplitis Mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 42(5) : 1639–1645.]