

绢丝昆虫线粒体 DNA 多态性研究

陈元霖 桂慕燕 凌建华 王斌

(厦门大学细胞生物学研究室, 厦门 361005)

摘要 采用差速离心法和碱变性法制备家蚕、野桑蚕、蓖麻蚕、柞蚕和天蚕蛹线粒体 DNA (mtDNA), 并进行了限制性酶切片段多态性 (RFLP) 检测。结果表明, 绢丝昆虫在种间 mtDNA 酶切类型差异明显, 而在种内不同品种之间则没有差异或差异甚少。在 *Hae* II 酶解作用下, 家蚕的 15 个一化和二化性品种的酶切类型相同, 5 个多化性品种的酶切类型也相同, 但它们彼此间则有差异, 前者与野桑蚕属同一个类型。由此提示, 在家蚕品种演化过程中, 一化和二化品种可能与野桑蚕有更密切的亲缘关系。

关键词 绢丝昆虫, mtDNA, 酶切片段长度多态性

Studies on mtDNAs Polymorphism in Spun Silk Insect

Chen Yuanlin Gui Muyan Ling Jianhua Wan Bin

(Laboratory of Cell Biology, Xiamen University, Xiamen361005)

绢丝昆虫是一类具有重要经济意义的鳞翅目昆虫。关于绢丝昆虫 mtDNA 酶切图谱的研究, 我们已作了一些报道^[1~3]。本文在原工作基础上, 增加了家蚕二化和多化性品种的数量, 也对家蚕一化性品种和野桑蚕蛹的 mtDNA 进行了限制性酶切图谱分析, 并对不同亲缘关系的绢丝昆虫 mtDNA 的 RFLP 进行了比较。

1 材料和 方法

1.1 实验材料

1.1.1 蚕蛹 采用蚕蛾总科 (Bombycoidea) 中家蚕蛾科 (Bombycidae) 的家蚕 (*Bombyx mori*) 和野桑蚕 (*B. mandarina*); 天蚕蛾科 (Saturniidae) 的蓖麻蚕 (*Philosmia cynthia ricini*)、柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 和天蚕 (*A. yamamai*) 羽化前的蚕蛹。

1.1.2 限制酶 *Bam* HI、*Bgl* II、*Eco* RI、*Eco* RV、*Hae* III、*Pst* I、*Sac* I、*Xba* I、*Hin* fI、*Msp* I、*Rsa* I 均为华美生物公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 mtDNA 制备 用差速离心法制备线粒体, 加 SDS 破膜, 用苯酚/氯仿抽提去蛋白, 乙醇沉淀得 mtDNA 粗品, 用纯 RNase 处理、重复苯酚氯仿抽提, 上清液用 NaAc 和异丙醇沉淀, 即得纯净 mtDNA^[2]。

1.2.2 酶解条件 单酶完全消化的反应总体积 20 μ l, 含 mtDNA 0.3~0.5 μ g, 酶 1~5 单位, 37 $^{\circ}$ C 处理 2~3h。

1.2.3 电泳 配制 1.0% 琼脂糖凝胶, 电泳缓冲液为 89mmol/L 硼酸, 2.5mmol/L Na₂ EDTA, 89mmol/L Tris (pH8.0), 电压 2V/cm, 室温下电泳 14h。

2 结果 与 讨论

2.1 桑蚕 mtDNA 多态性测定

2.1.1 家蚕 用于测定的家蚕品种共 20 个, 其中一化性品种 5 个 (47 新、四川弯黄、日 13 桥、罗尼 3、法 403); 二化性品种 10 个 (春蕾、苏春、明珠、镇丰、91 日、华八 (h)、群芳、瀛翰、34 研、湖 204); 多化性品

种5个(演金黄、655、加木王、305、秋303)。这些品种分别来自中国农业科学院蚕业研究所、广东省农科院蚕业研究所和沈阳农业大学。采用12种限制酶对20个家蚕品种的mtDNA分别进行酶解,仅在Hae III酶解的情况下,一化和二化性品种的mtDNA酶切类型表现出了与多化性品种的差异,其他11种酶的酶切类型在20个品种上表现出完全一致,表明家蚕mtDNA的RFLP贫乏(见表1)。

表1 家蚕、野桑蚕和非桑蚕 mtDNA 单酶酶解片段(A~E)分子量(kb)

科	种	酶名	切点数	A	B	C	D	E	合计	
家蚕科	家蚕	<i>EcoRI</i>	5	5.7	5.2	2.0	1.9	0.3	15.1	
		<i>HindIII</i>	4	5.2	4.4	3.6	1.9		15.1	
		<i>Hae III</i>	2*	10.5*	4.7*				15.2	
			3**	6.2**	4.7**	4.3**			15.2	
		<i>Sac I</i>	2	12.3	2.8				15.1	
		<i>Xba I</i>	3	5.6	5.4	4.0			15.0	
		<i>BamHI</i>	2	9.6	5.3				14.9	
		<i>Pst I</i>	2	7.8	7.4				15.2	
		<i>Bgl II</i>	2	11.8	3.3				15.1	
		<i>EcoRV</i>	1	15.3					15.3	
		<i>Hinf I</i>	0						15.3	
		<i>Msp I</i>	2	9.9	5.3				15.2	
	<i>Rsa I</i>	5	8.0	3.5	2.1	0.9	0.8	15.3		
	野桑蚕	<i>EcoRI</i>	5	5.7	5.2	2.0	1.9	0.3	15.1	
		<i>HindIII</i>	2	8.0	7.1				15.1	
		<i>Hae III</i>	2	10.5	4.7				15.2	
		<i>Sac I</i>	2	12.3	2.8				15.1	
		<i>Xba I</i>	1	15.0					15.0	
	天蚕蛾科	蓖麻蚕	<i>EcoRI</i>	2	7.5	7.5				15.0
			<i>HindIII</i>	5	6.3	3.9	2.0	1.7	1.3	15.2
<i>Hae III</i>			4	5.8	5.5	1.9	1.7		14.8	
<i>Sac I</i>			5	5.2	5.2	2.0	1.9	1.6	14.9	
<i>Xba I</i>			5	5.0	4.2	3.0	1.6	1.3	15.1	
<i>BamHI</i>			0						15.0	
<i>Pst I</i>			1	15.1					15.1	
<i>Bgl II</i>			1	15.0					15.0	
<i>EcoRV</i>		1	15.0					15.0		
柞蚕		<i>EcoRI</i>	3	6.5	5.6	2.0			13.7	
		<i>HindIII</i>	5	6.0	3.3	1.9	1.5	1.0	13.7	
		<i>Hae III</i>	4	6.3	3.0	2.7	1.9		13.9	
		<i>Sac I</i>	3	5.6	4.5	3.6			13.7	
		<i>Xba I</i>	0						13.8	
		<i>BamHI</i>	0						13.8	
	<i>Pst I</i>	2	8.0	5.7				13.7		
天蚕	<i>Bgl II</i>	2	7.6	6.1				13.7		
	<i>EcoRV</i>	1	13.8					13.8		
	<i>EcoRI</i>	3	7.3	6.3	0.8			14.4		
	<i>HindIII</i>	3	6.4	6.2	1.9			14.5		
	<i>Hae III</i>	2	9.2	4.9				14.2		
	<i>Sac I</i>	4	5.4	4.0	2.7	2.2		14.3		
	<i>Xba I</i>	4	7.8	2.7	2.1	1.9		14.5		
<i>BamHI</i>	0						14.4			
<i>Pst I</i>	2	11.0	3.2				14.2			
<i>Bgl II</i>	3	6.2	5.6	2.6			14.4			
<i>EcoRV</i>	1	14.3					14.3			

*一化和二化性品种; **多化性品种。

2.1.2 野桑蚕 采自浙江省杭州市, 为多化性四眠蚕, 由浙江省蚕业研究所陈和瑞先生提供。用 5 种限制酶酶解, 所得结果列于表 1。从表 1 的比较表明: (1) 家蚕和野桑蚕 mtDNA 的分子大小平均为 15.2 和 15.1 kb; (2) 用 *EcoRI* 和 *SacI* 酶解家蚕和野桑蚕 mtDNA, 得到的酶切类型相同; (3) 在 *Hae* II 酶解的情况下, 野桑蚕 mtDNA 的酶切类型与家蚕一化和二化性品种相同, 而异于多化性品种。

2.2 非桑蚕 mtDNA 多态性测定

2.2.1 蓖麻蚕 采用斑马、素白、桂虎斑和 ATY-2 等 4 个品种, ATY-2 是由家蚕 DNA 直接导入蓖麻蚕后选育出来的稳定变异品系^[4], 材料均由广东省农业科学院蚕业研究所提供。结果(表 1)表明, 在 9 种限制酶单酶解作用下, 不同品种(品系)蓖麻蚕的酶切类型相一致, mtDNA 分子量在 14.8~15.2 之间, 平均为 15.01 kb。

2.2.2 柞蚕 系由沈阳农业大学和山东蚕业研究所提供的二化性品种, 所得结果见表 1。在 9 种限制酶单酶解作用下, 柞蚕 mtDNA 的分子大小在 13.7~13.9 kb 之间, 平均为 13.76 kb。

2.2.3 天蚕 材料由沈阳农业大学和山东省蚕业研究所提供。如表 1 所示, 在 9 种限制酶单酶解作用下, 天蚕 mtDNA 分子大小在 14.2~14.5 kb 之间, 平均为 14.36 kb。

桑蚕和非桑蚕经单酶切的切点数和 mtDNA 分子的大小的比较如表 2。

表 2 绢丝昆虫 mtDNA 单酶切点数和分子量比较

酶 名	家蚕蛾科				天蚕蛾科		
	家 蚕			桑蚕	蓖麻蚕	柞 蚕	天 蚕
	一化	二化	多化				
<i>Bam</i> HI	2	2	2		0	0	0
<i>Bgl</i> II	2	2	2		1	2	3
<i>Pst</i> I	2	2	2		1	2	2
<i>EcoRV</i>	1	1	1		1	1	1
<i>Hind</i> III	4	4	4	2	5	5	3
<i>EcoRI</i>	5	5	5	5	2	3	3
<i>Sac</i> I	2	2	2	2	5	3	4
<i>Xba</i> I	3	3	3	1	5	0	4
<i>Hae</i> III	2	2	3	2	5	4	2
平均分子量 (kb)	15.2	15.2	15.2	15.1	15.01	13.76	14.36

本文通过对蚕蛾总科中的家蚕、野桑蚕、蓖麻蚕、柞蚕和天蚕蛾 mtDNA 进行 RFLP 测定, 结果表明: (1) 种间限制性酶切图谱的差异是明显的, 而且这种差异的显著程度随其亲缘关系的疏远而增加。因此, mtDNA 的 RFLD 可作为绢丝昆虫种间鉴别的分子标记; (2) 在家蚕和蓖麻蚕种内不同品种间 mtDNA 的 RFLP 表现出一致性; (3) 在 *Hae* II 酶解作用下, 家蚕一化和二化性品种的限制性酶切图谱不同于多化性品种而与野桑蚕相同, 由此提示在家蚕品种演化过程中, 家蚕的一化和二化性品种与野桑蚕可能有更为密切的亲缘关系。

参 考 文 献

- 1 凌建华, 陈元霖. 蓖麻蚕蛾 mtDNA 的限制性内切酶图谱. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(5): 641~646
- 2 凌建华, 王 斌, 陈元霖. 家蚕蛾线粒体 DNA 限制酶图谱初步研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32(增刊 1): 33~39.
- 3 王斌, 陈元霖. 天蚕、柞蚕线粒体 DNA (mtDNA) 的限制性酶切电泳图谱. 蚕业科学, 1995, 21(2): 111~113
- 4 陈元霖等. 蚕类 DNA 诱导遗传性变异的研究: 家蚕 DNA 对蓖麻蚕的诱变作用. 中国科学(B 辑), 1984, 9: 1153~1159
1997-05-15 收稿, 1997-08-15 修回.