

# 基于线粒体 CO I 和 NADH-6 基因分子检测的 中日家蚕和野桑蚕亲缘关系的研究

李 兵<sup>1</sup>, 浜野国胜<sup>2</sup>, 蜷木理<sup>2</sup>, 原和二郎<sup>3</sup>, 沈卫德<sup>1\*</sup>

(1. 苏州大学生命科学学院, 江苏苏州 215123; 2. 日本东京农工大学, 东京 183-0059, 日本;  
3. 日本农业生物资源研究所, 筑波 300-4352, 日本)

**摘要:** 为了进一步明确家蚕和野桑蚕的亲缘关系, 收集了中国和日本的一些家蚕和野桑蚕品种资源, 提取了家蚕和野桑蚕的总 mRNA, 通过 RT-PCR 克隆了家蚕和野桑蚕线粒体 DNA (mtDNA) 的细胞色素氧化酶亚基 1 基因 (cytochrome oxidase subunit 1 gene, CO I) 和 NADH-6 基因, 并制备探针进行了 DIG-RFLP 检测。结果表明, 中国和日本的家蚕与中国野桑蚕的 CO I 和 NADH-6 基因的 DIG-RFLP 的分子多态性相同, 但与日本野桑蚕存在差异。此结果从线粒体水平证实了中国和日本的家蚕都起源于中国野桑蚕, 而不是起源于日本的野桑蚕。

**关键词:** 家蚕; 野桑蚕; mtDNA; 细胞色素氧化酶基因 1; NADH-6 基因; RFLP

中图分类号: Q963 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)03-0470-04

## The genetic relationship between domestic silkworm (*Bombyx mori* L.) and wild silkworm (*B. mandarina* Moore) of China and Japan based on DIG-RFLP molecular detection on CO I and NADH-6 of mtDNA

LI Bing<sup>1</sup>, HAMANO Kuni-Katu<sup>2</sup>, NINAGI Osameru<sup>2</sup>, HARA Wa-Zu-Rou<sup>3</sup>, SHEN Wei-De<sup>1\*</sup> (1. School of Life Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-0059, Japan; 3. National Institute of Agrobiological Sciences, Tukuba 300-4352, Japan)

**Abstract:** To obtain more information about the genetic relationship between domestic and wild silkworms, we collected domestic silkworms (*Bombyx mori* L.) and wild silkworms (*B. mandarina* Moore) from China and Japan, respectively. Total mRNAs of domestic and wild silkworms were extracted, and CO I and NADH-6 genes from mtDNA were cloned by RT-PCR and analysed by DIG-RFLP method. The results showed that the Chinese domestic silkworm had the same molecular diversity as that of the Japanese domestic silkworm and Chinese wild silkworm, but had different diversity from that of the Japanese wild silkworm. The results suggested that both Chinese and Japanese domestic silkworms originated from Chinese wild silkworm but not from Japanese wild silkworm.

**Key words:** *Bombyx mori*; *Bombyx mandarina*; mtDNA; CO I; NADH-6 gene; RFLP

家蚕 *Bombyx mori* L. 和野桑蚕 *B. mandarina* Moore 的血缘亲近, 家蚕起源于中国野桑蚕, 中国是养蚕业的发祥地, 这从近代科学研究如考古学 (段佑云, 1983)、同工酶 (段佑云, 1983)、染色体 (吉武成美, 1988) 等方面的研究上得到了许多证明。家蚕和中国野桑蚕具有 28 对染色体, 而日本野桑蚕的染色体只有 27 对。但川口等认为日本野桑蚕的 27 对染

色体在进化过程中断裂形成 28 对, 进而进化为现代的家蚕 (吉武成美, 1988)。吉武成美等 (1988) 通过对同工酶的研究, 提出日本的野桑蚕起源于中国野桑蚕的观点。另外, 河原畑等 (1998) 通过 PCR 的方法, 对日本福冈、对马及韩国产的野桑蚕与中国产的野桑蚕进行了比较研究, 结果表明, 在福冈、对马及韩国产的野桑蚕 DNA 内均存在一个长为 66 bp 的碱

基金项目: 国家“973”计划资助项目 (2005CB121005); 国家自然科学基金项目 (30471309)

作者简介: 李兵, 男, 1973 年生, 江苏灌云人, 硕士, 主要从事分子生物学研究, Tel.: 0512-65880262; E-mail: sllibing@hotmail.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0512-65880182; E-mail: shenwd@suda.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-12-08; 接受日期 Accepted: 2006-02-03

基序列 ( ATTTATTCTTTATTTGTACACACTGTTAAT ATAATACAGTAATTTTCGATAAGAAATAAAAAAAGTT ), 而中国的野桑蚕体内不存在这一碱基序列, 这一研究结果和染色体数分类的结果一致。

鲁成等( 2002a, 2002b ) 以基因组 DNA 为模板, 利用 RAPD 方法, 对中国野桑蚕的遗传多样性进行了研究, 结果表明中国野桑蚕的遗传多样性十分丰富; 对中国和日本野桑蚕的进化类聚分析的结论表明日本野桑蚕是在家蚕驯化以前就从中国野桑蚕中分化出来的。线粒体遗传是研究生物的起源和进化的重要途径。通过对中国和日本家蚕和野桑蚕的线粒体基因进行 DIG-RFLP 的分子检测, 研究它们的亲缘关系, 尚无相关报道。对中国和日本家蚕和野桑蚕的线粒体 DNA 进行多态性研究, 对澄清它们之间的起源关系, 具有重要的意义。野桑蚕雌性个体在自然条件下即使和家蚕的雄性个体进行交配, 由于线粒体为母性遗传, 野桑蚕的体内也不可能混入家蚕的线粒体。同样, 在家蚕的雌性个体内也不可能混入雄性野桑蚕的线粒体。所以说家蚕和野桑蚕的个体内的线粒体都是由各自的祖先遗传下来的, 不存在混合的可能性。所以, 本文为了研究中国和日本家蚕和野桑蚕的亲缘关系, 利用线粒体 cDNA 制备探针, 对样本进行了 DIG-RFLP 分子检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试虫

中国野桑蚕为江苏省南通市桑园内采集的野桑蚕, 在室内饲养的保存系统。日本野桑蚕采集于东京农工大学桑园、神奈川县津久井桑园; N52 为 1983 年春开始用筑波野桑蚕作母本、日本家蚕作父本进行杂交, 通过兄妹交配保留下来的系统。日本家蚕品种为 RF02, 由东京农工大学应用生物科学系提供; 中国家蚕品种为菁松, 由苏州大学蚕桑研究所提供。采用蜷木理和田敏( 1982 )、蜷木理和谷口儀雄( 1983 ) 报道的野桑蚕饲养方法( 对桑叶保鲜方法进行改进 ) 在室内饲养家蚕和野桑蚕。

### 1.2 实验试剂

限制性内切酶由 New England Biolabs inc. 生产, DIG 试剂盒由德国罗氏公司生产, 其他常规试剂购置日本和光纯药工业有限公司。

### 1.3 RFLP 检测方法

抽提五龄家蚕的总 mRNA, 逆转录生成 cDNA, 按照 NCBI 上登录的家蚕线粒体基因组序列

( GenBank 序列号: AB070264 ), 设计引物对 CO I 基因、NADH 脱氢酶亚基 6 基因进行 RT-PCR 扩增。对 RT-PCR 扩增产物进行克隆、测序, 制备相应的探针 ep13、ep17( 表 1 )。

表 1 探针及其对应基因

Table 1 Probe and its corresponding gene

探针编号 No. of probe	对应基因 Sequence homology	探针大小 Size of probe ( bp )
ep13	CO I	1 651
ep17	NADH-6 基因	886

采用原和二郎( 1996a ) 方法( DNA 沉淀方法加以改进 ), 从家蚕和野桑蚕的 5 龄幼虫后部丝腺抽提基因组 DNA( 含 mtDNA ), 各样本 DNA 分别取 5  $\mu$ g 进行 Sac I 限制性酶切 23 h。按照原和二郎( 1996a, 1996b, 2001a, 2001b ) 报道的方法, 利用探针 ep13 对中日家蚕和中日野桑蚕的样本进行 DIG-RFLP 多态性检测。为了探明日本不同地域来源的野桑蚕的进化关系是否一致, 利用探针 ep13、ep17 对来源于日本不同地区的野桑蚕基因组样本进行 DIG-RFLP 检测。

## 2 结果与分析

利用 ep13 探针对中系家蚕菁松、日系家蚕 RF02 以及中国野桑蚕( 江苏省南通市 ) 的 Southern 杂交结果的多态性结果显示, 三者的多态性表现一致, 即均在 12.81 kb 和 2.85 kb 出现了条带, 而与日本野桑蚕( 东京农工大学 ) 不同, 日本野桑蚕样本在 12.81 kb 没有出现条带, 而在 6.50 kb 处出现了条带( 图 1 )。结果表明, 本实验来源的中国和日本家蚕品种与由江苏省南通市采集的中国野桑蚕的进化关系相一致, 而与采集于东京农工大学的日本野桑蚕存在差异。

利用探针 ep17 进行 Southern 杂交的结果表明, 本实验来源的中国野桑蚕和日本家蚕的线粒体 DNA 的多态性相同, 在 12.81 kb 处出现了条带; 地域上来源不同的日本野桑蚕的 2 个样本( 东京农工大学野桑蚕、津久井野桑蚕 ) 与以日本筑波野桑蚕作为线粒体母本的 N52 的条带都相同, 仅在 6.50 kb 出现条带( 图 2 )。由此表明, 本实验来源的日本野桑蚕与中国野桑蚕以及家蚕的线粒体多态性存在明显的不同。

利用探针 ep13 进行 Southern 杂交的结果表明,

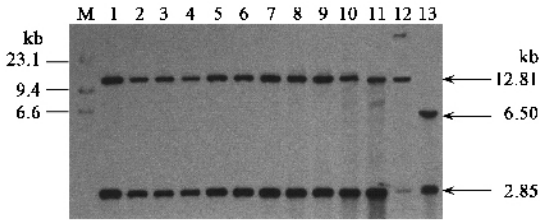


图 1 利用探针 ep13 进行 Southern 杂交的结果

Fig. 1 The result of Southern blot with probe ep13

M: DNA 分子量标记 DNA molecular marker; 1-4: 中国家蚕 Domestic silkworm of China; 5-8: 日本家蚕 RF02 Domestic silkworm RF02 of Japan; 9-12: 中国野桑蚕 Wild silkworm of China; 13: 日本东京农工大学野桑蚕 Wild silkworm of Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

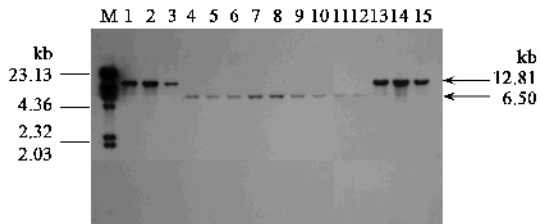


图 2 利用探针 ep17 进行 Southern 杂交的结果

Fig. 2 The result of Southern blot with probe ep17

M: DNA 分子量标记 DNA molecular marker; 1-3: 中国野桑蚕 Wild silkworm of China; 4-6: 日本东京农工大学野桑蚕 Wild silkworm of Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan; 7-9: 日本津久井野桑蚕 Wild silkworm of Tukai, Japan; 10-12: N52; 13-15: 日本家蚕 RF02 Domestic silkworm RF02 of Japan.

中国野桑蚕和日本家蚕的线粒体 DNA 的多态性相同,在 12.81 kb、2.85 kb 处出现了条带;日本野桑蚕的二个样本(东京农工大学野桑蚕、津久井野桑蚕)与以日本筑波野桑蚕作为线粒体母本的 N52 条带都相同,在 6.50 kb 和 2.58 kb 处出现条带(图 3)。由此表明,本实验来源的日本野桑蚕与中国野桑蚕以及家蚕的 RFLP 检测结果存在差异。

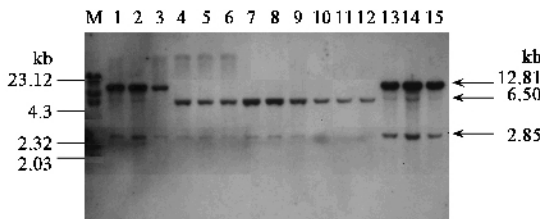


图 3 利用探针 ep13 进行 Southern 杂交的结果

Fig. 3 The result of Southern blot with probe ep13

M: DNA 分子量标记 DNA molecular marker; 1-3: 中国野桑蚕 Wild silkworm of China; 4-6: 日本东京农工大学野桑蚕 Wild silkworm of Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan; 7-9: 日本津久井野桑蚕 Wild silkworm of Tukai, Japan; 10-12: N52; 13-15: 日本家蚕 RF02 Domestic silkworm RF02 of Japan.

### 3 讨论

#### 3.1 家蚕的起源

岛田透(1995)以大蚕蛾科、蚕蛾科为材料,发现家蚕和中国野桑蚕的遗传关系最近。鲁成等(2002c)采用 RAPD 方法,分析了中国家蚕和野桑蚕的分子多态性,揭示了家蚕起源与中国野桑蚕。中国的野桑蚕经过长期的驯养形成了目前的家蚕(蒋猷龙,1982),但日本的野桑蚕有没有经过驯养形成相应的日本家蚕品种,至今无相关报道。本实验以线粒体 DNA 进化保守的 CO I、NADH-6 基因制备探针,采用 DIG-RFLP 方法,从线粒体水平揭示了中国家蚕品种(菁松)和日本的家蚕品种(RF02)都起源于中国的野桑蚕。

#### 3.2 日本野桑蚕的起源

吉武成美(1988)通过对同功酶的研究,提出了日本野桑蚕起源于中国家蚕的观点。本实验对 3 个来源于不同地区的日本野桑蚕同时进行了线粒体多态检测,结果是一致的,都支持吉武成美的结论。表明了日本各地区的野桑蚕起源一致,但与中国和日本家蚕及中国野桑蚕的起源不同。

#### 3.3 线粒体遗传

经典遗传学认为线粒体是母性遗传(刘祖洞,1991),但近年来有些学者对不同物种进行常规杂交实验时发现。在亲缘关系较远的物种之间杂交出现线粒体雄性遗传的现象(赵兴波等,2000)。本实验中采用的实验材料 N52 是日本野桑蚕为母本和日本家蚕为父本的杂种,经过 22 代的兄妹交配继代,目前检测出来的线粒体多态性和日本野桑蚕相同,没有发现来源于雄性的线粒体的信号。根据本实验的结果,日本野桑蚕和日本家蚕的起源关系相对较远,且不存在雄性线粒体的遗传现象。中国野桑蚕和日本家蚕以及日本野桑蚕和中国家蚕的杂交后代是否存在线粒体雄性遗传的现象,还有待于进一步深入研究。

#### 参考文献 (References)

- Duan YY, 1983. Sericulture originated from the middle reaches of Yellow River where the ancestors of Chinese people inhabited. *Acta Sericologica Sinica*, 9(3): 50-56. [段佑云, 1983. 家蚕起源于黄河中游中华民族发祥地. *蚕业科学*, 9(3): 50-56]
- Hara WJR, 1996a. The genome analysis and gene expression of silkworm. *Research Information of National Institute of Sericultural and Entomological Science*, 21: 35-39. [原和二郎, 1996a. カイコの

- ゲノム解析と遺伝子発現. 蚕糸・昆虫資料, 21: 35-39]
- Hara WJR, 1996b. The discussion of using RFLP method to linkage index and identify variety in silkworm. *Bull. Natl. Inst. Seric. Entomol. Sci.*, 16: 21-30. [原和二郎, 1996b. カイコにおける制限酵素断片長多型を用いた連関検索と品種間同定法の検討. 蚕糸・昆虫農業技術研究所研究報告, 16: 21-30]
- Hara WJR, Koseikawa EH, Mase HK, 2001a. The discussion of using linkage to develop DNA marker and analysis method. *Research Information of National Institute of Sericultural and Entomological Science*, 30: 7-14. [原和二郎, 小瀬川英一, 間瀬啓介, 2001a. 連関検索に用いるDNAマーカーの開発と解析法の検討. 蚕糸・昆虫資料, 30: 7-14]
- Hara WJR, Koseikawa EH, Mase HK, 2001b. Linkage index by RFLP of the EST cDNA clone in silkworm. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 70(3): 135-143. [原和二郎, 小瀬川英一, 間瀬啓介, 2001b. カイコにおけるEST化したcDNAクローンのRFLPによる連関検索. 日本蚕糸学雑誌, 70(3): 135-143]
- Jiang YL, 1982. The Origin and Differentiation of Domesticated Silkworm. Nanjing: Jiangsu Science and Technology Press. 3-21. [蒋猷龙, 1982. 家蚕的起源和分化. 南京: 江苏科技出版社. 3-21]
- Kawaharata I, 1998. *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* (The Study of the Origin of Sericultural Industry Viewing from *Bombyx mandarina*). A Written Report of The Basic Research (2) Supported by the Ministry of Education Research Fund Grants-in-aid. Kyushu. 3-4. [河原畑勇, 1998. クワコとカイコ(クワコからみたカイコと養蚕業の起源に関する一考察). 文部省科学研究費補助金基盤研究(A)(2)研究成果報告書. 九州. 3-4]
- Liu ZD, 1991. Genetics. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press. 228-229. [刘祖洞, 1991. 遗传学. 第2版. 北京: 高等教育出版社. 228-229]
- Lu C, Chen DJ, Xiang ZH, Banno Y, Fujii H, 2002a. RAPD analysis of *Bombyx mandarina* M. and Japanese (Fukuoka) *Bombyx mandarina* M. *Acta Sericoligica Sinica*, 28(1): 17-21. [鲁成, 程道军, 向仲怀, 伴野丰, 藤井博, 2002a. 中国野桑蚕和日本野桑蚕的 RAPD 研究. 蚕业科学, 28(1): 17-21]
- Lu C, Yu HS, Xiang ZH, 2002b. Molecular systematic studies on Chinese mandarina silkworm and domestic silkworm. *Scientia Agricultura Sinica*, 35(1): 94-101. [鲁成, 余红仕, 向仲怀, 2002b. 中国野桑蚕和家蚕的分子系统学研究. 中国农业科学, 35(1): 94-101]
- Lu C, Yu HS, Xiang ZH, 2002c. The genetic diversity and phylogenetic relationship of *Bombyx mandarina* and *B. mori* from China based on RAPD analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 198-203. [鲁成, 余红仕, 向仲怀, 2002c. 基于 RAPD 分析的中国野桑蚕和家蚕遗传多样性和系统发育关系研究. 昆虫学报, 45(2): 198-203]
- Ninaki O, Takeda T, 1982. Rearing *Bombyx mandarina* by artificial diet in whole larval stages. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51: 237-238. [蜷木理, 竹田敏, 1982. クワコの全齢人工飼料育. 日本蚕糸学雑誌, 51: 237-238]
- Ninaki O, Taniguti Y, 1983. The research of rearing *Bombyx mandarina* indoors. *Sericultural Research*, 126: 18-24. [蜷木理, 谷口儀雄, 1983. 室内におけるクワコの飼育. 蚕糸研究, 126: 18-24]
- Shimata T, 1995. Gene variation and biological evolution. *Sericultural Science and Technology*, 34(4): 40-41. [島田透, 1995. 基因变异和生物进化. 蚕丝科技, 34(4): 40-41]
- Yositake N, 1988. The Introduction of Origin and Differentiation of Silkworm. Tokyo: Sericultural Laboratory of Department of Agriculture. Tokyo University. 45-52. [吉武成美, 1988. 家蚕の起源と分化に関する研究序説. 東京: 東京大学農学部養蚕学研究室. 45-52]
- Zhao XB, Chu MX, Li N, Wu CX, 2000. Patrilineal heredity of mitochondria DNA of heep. *Science in China (Series C)*, 30(6): 642-646. [赵兴波, 储明星, 李宁, 吴常信, 2000. 绵羊线粒体 DNA 的父系遗传. 中国科学(C辑), 30(6): 642-646]

(责任编辑: 袁德成)