

马春燕,张明慧,黄芳. 半翅目部分昆虫酯酶同工酶的酶谱模式图[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):35-37.

半翅目部分昆虫酯酶同工酶的酶谱模式图

马春燕,张明慧,黄芳

(宁夏大学生命科学学院,宁夏银川 750021)

摘要:应用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳技术,对宁夏地区半翅目(Hemiptera)蝽科(Pentatominae)4种蝽不同个体的酯酶同工酶(EST)作了比较研究。结果表明,4个种的EST同工酶谱带清晰,稳定性好,且显示出各自的特征谱带。4种蝽模式图的比较表明,种内不同个体酶谱差异较小,不同种之间模式图差异比较明显,并且每种都有自己的特征谱型,可作为半翅目昆虫系统分类学研究的重要分类特征。

关键词:半翅目;蝽科;酯酶同工酶;聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号:Q966 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)05-0035-03

传统的形态分类一直是生物学家鉴别物种的方法,该方法主要以动物形态特征为依据进行分类^[1]。20世纪以后,随着试验生物学的深入和发展,分类学从理论上到方法上都发生了深刻的变化,生物学不再停留在只通过外部形态、内部结构或习性特点进行物种的划分,而需要深入地了解并探讨它们之间的亲缘关系和进化地位,分类学开始进入了一个新的阶段^[2]。

20世纪70年代以来,同工酶技术也被广泛应用到物种鉴别方面。通过对物种同工酶的研究,可以因生化特征的差异而推测其血缘关系^[1]。同工酶是一组催化功能相同、分子组成和分子结构不同的酶。它由染色体上不同基因座的基因或同一基因座的等位基因编码,广泛用于昆虫种属鉴定和遗传变异研究^[3]。酯酶同工酶(estenaseisozymes, EST)是一组能水解酯键的酶,在生物体内广泛存在^[4],许多试验证明,它在种系的鉴定中具有很重要的参考价值^[5]。

有关半翅目昆虫的研究目前多集中在系统发育及亲缘关系等方面。目前,有关同工酶电泳技术的研究特别是酯酶同工酶的研究已有很多报道,但有关半翅目蝽科这方面的报道较少,仅见马春燕等对半翅目蝽科部分种类酯酶同工酶进行的比较研究。因此,将同工酶技术作为一种辅助手段在半翅目昆虫系统分类研究中加入应用还需做大量的探索。本试验对宁夏常见的4种半翅目蝽科昆虫酯酶同工酶进行比较分析,分析同种不同个体昆虫酯酶同工酶酶谱的共同点和差异,通过多次的重复试验,找出共有的酶带,对每一条酶带在凝胶板上的位置进行测量,绘制各个种类酯酶同工酶模式图,填补了半翅目昆虫模式图研究的空白,从而为这一类群的系统分类研究提供重要的、更可靠和更客观的依据。

1 材料与与方法

1.1 材料来源

收稿日期:2012-11-09

基金项目:国家大学生创新试验项目(编号:101074914)。

作者简介:马春燕(1975—),女,宁夏银川人,硕士,副教授,主要从事生化与分子生物学的教学与科研工作。E-mail: machnyan0411@163.com。

该研究所用材料来源见表1。将采集到的标本饥饿24 h以上,于-80℃冰箱内保存备用。

表1 标本种类、采集时间和地点

种名	采集时间	采集地点
A. 斑须蝽 <i>Dolycoris baccarum</i> (Linnaeus)	2010年7月	宁夏大学校园
B. 茶翅蝽 <i>Halyomorpha picus</i> (Linnaeus)	2010年7月	宁南地区
C. 麻皮蝽 <i>Erthesina fullo</i> (Thunberg)	2010年7月	宁南地区
D. 菜蝽 <i>Eurydema dominulus</i> (Scopoli)	2010年7月	宁南地区

1.2 试验方法

取出备用材料置于冰浴的小研钵中,加少量石英砂和提取液(20%蔗糖0.5 mL),快速研磨,将研磨好的液体转入离心管中,用蒸馏水冲洗研钵,将冲洗液一并倒入离心管中,8 000 r/min 离心15~20 min,取上清液备用。采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶不连续电泳,分离胶浓度为7.5%,pH值8.9,浓缩胶浓度为3.5%,pH值6.7,点电极缓冲液为pH值8.3的Tris-甘氨酸溶液,电泳时浓缩胶电压为110 V,分离胶电压为280 V,电泳全过程约需4 h。

2 结果与分析

2.1 斑须蝽同种不同个体间EST同工酶的比较及其模式图

图1为斑须蝽的8个个体的酯酶同工酶酶谱,其中前2道是同一相同个体的酶谱,后2道也为同一个体的酶谱。从酶谱显示看出,斑须蝽不论雌雄都有一条迁移距离最远的酶带,但染色深浅程度不同个体存在一定差别,相对迁移率 R_f 分别为0.550、0.550、0.552、0.546、0.542、0.550、0.546、0.546、0.552,说明此酶带在同种内不同个体中不论泳动速度还是酶活性均有一定差异,但差异不十分明显,可认为此带是这一种的特征带。从酶谱上还看出,雌性比雄性在阳极端多1条带,显然性别差异明显存在,而且大于个体差异。在靠近阴极端出现了3条带,其中2条染色浅,属于三级带,第3条染色颇深,带宽,属于一级带,其相对迁移率为0.23,在此一级带之后出现了2条不易区分的带,属于三级带。这些带除了性别区分带之外,其他均为所找出的每个个体共有的酶带,经过测量,将共有酶带绘制出来,即为斑须蝽酶谱模式图(图2)。

2.2 茶翅蝽同种不同个体间 EST 同工酶的比较及模式图

图3为茶翅蝽酯酶同工酶酶谱,1~3条蝽体色为浅色,4~8条蝽体色为深色,茶翅蝽酶带数目为8条,从酶谱显示可知,2种体色的茶翅蝽表现出微小差异:浅色的茶翅蝽个体较深色茶翅蝽个体酶带染色较浅,酶活性弱;但同时,作为同一种,2种体色的茶翅蝽的酶谱呈现出极大的相似性:8条酶带的 R_f 值均相同,分别是0.05、0.09、0.11、0.14、0.17、0.27、

0.45、0.52,但 R_f 值为0.45的酶带染色深,酶活性强,极易辨认,且在其他个体中稳定存在,认为是该种的特征带。靠近阳极端的3条带和靠近阴极端的3条带在图谱中显示非常清晰,且每个个体均具有,测量每条带泳动后的位置,并且根据其染色程度和清晰度,绘制出茶翅蝽酯酶同工酶的模式图(图4)。

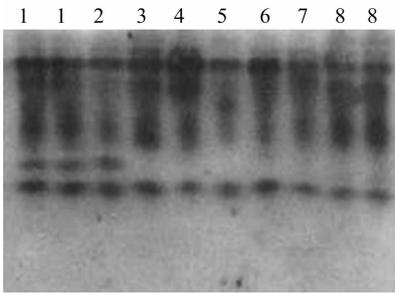


图1 斑须蝽酯酶同工酶电泳图谱

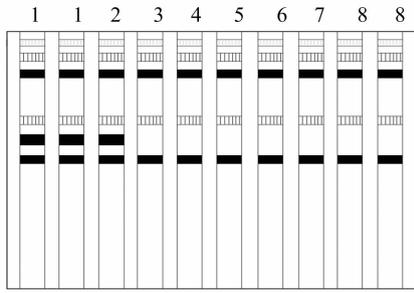


图2 斑须蝽酯酶同工酶酶谱模式图

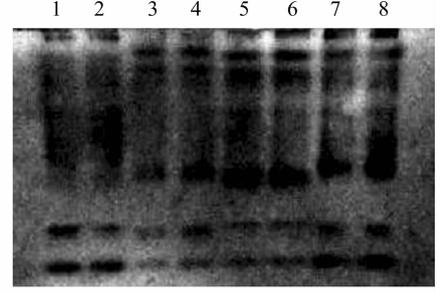


图3 茶翅蝽酯酶同工酶电泳图谱

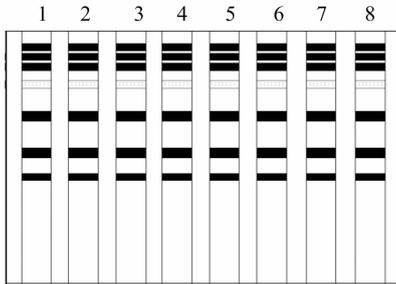


图4 茶翅蝽酯酶同工酶酶谱模式图

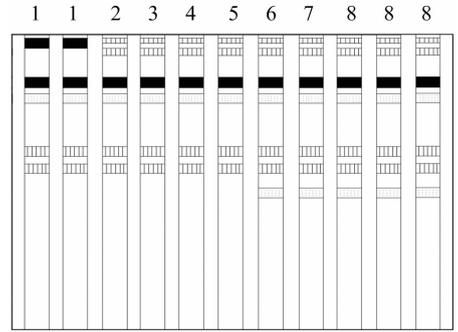


图6 麻皮蝽酯酶同工酶酶谱模式图

2.3 麻皮蝽同种不同个体间 EST 同工酶的比较及模式图

图5为麻皮蝽酯酶同工酶酶谱,其中1~5道为雌性个体,其酶带数目为5~7条,6~8道为雄性个体,其酶带数目为6~8条。从酶谱显示可知,阴极端有2条酶带,带色浅,属二级带,另外还有1条带,不易辨认,属三级带。紧随其后也显示出2条带,其中1条染色深,带宽,并在每个个体中都较稳定,可认为是这一种的特征酶带,其 R_f 值为0.31。在阳极端有3条带,并且雄性个体明显比雌性个体多出1条带,其 R_f 值为0.57,可认为是1条性别区分带。此种不同个体的酶带有6条非常相似,其 R_f 值均相同,只存在较小的差异。由图谱显示的酶带条数以及酶活性的强弱,经过测量酶带的位置,绘制出麻皮蝽酯酶同工酶酶谱模式图(图6)。

2.4 菜蝽同种不同个体间 EST 同工酶的比较及模式图

图7为菜蝽8个个体的酯酶同工酶酶谱,由酶谱显示可见,菜蝽有7条酶带,其中阳极端有2条染色深,清晰可见,并且每个个体的 R_f 值均相同,分别为0.44、0.50,可认为是此种的特征谱,这2条之前有2条酶带分散比较严重,其中1、2、7、8这4道染色深,3、4、5、6这4道染色浅,可认为是不同个体之间的差异,阴极端有3条带,色浅带窄,为二级带。找出每个个体共有的酶带,依据酶带数目,酶带宽窄,染色深浅及 R_f 值,绘制出图8,即菜蝽酯酶同工酶模式图。

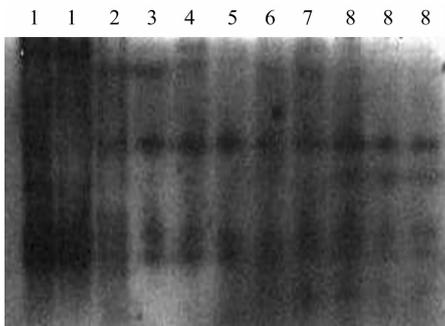


图5 麻皮蝽酯酶同工酶电泳图谱

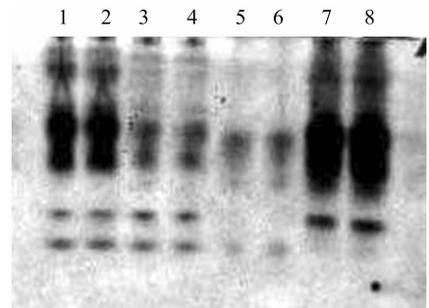


图7 菜蝽酯酶同工酶电泳图谱

2.5 4种蝽 EST 同工酶相似系数及模式图的比较

表2、表3为半翅目蝽科4个种之间 EST 同工酶相似系数比较,比较得出,斑须蝽、麻皮蝽、茶翅蝽和菜蝽相似系数较

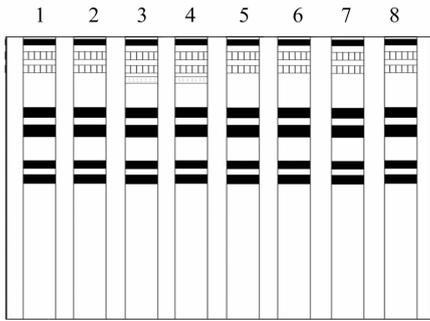


图8 菜蝽酯酶同工酶酶谱模式图

高,均在 1/7 之上,说明斑须蝽、麻皮蝽、茶翅蝽和菜蝽亲缘关系较近;本试验是从分子生物学角度对 4 种昆虫进行比较,EST 同工酶酶带迁移率(R_f)的聚类结果与形态分类结果相一致。利用一般的形态分类无法很正确地区别种的所属,但是同种不同个体之间存在的差异极其微小,经过大量的重复试验,可以找出同种不同个体之间共有的酶带,绘制出模式图,根据所作出的模式图便可确认种的不同。

表 2 半翅目蝽科 4 个种 EST 同工酶 R_f 值

种名	酶带数	迁移率(R_f)
A	6	0.11, 0.17, 0.23, 0.41, 0.45, 0.55
B	8	0.05, 0.09, 0.11, 0.14, 0.17, 0.27, 0.45, 0.52
C	7	0.21, 0.23, 0.27, 0.31, 0.45, 0.52, 0.57
D	7	0.02, 0.05, 0.11, 0.27, 0.31, 0.44, 0.50

注:A 至 D 所代表的种名同表 1。

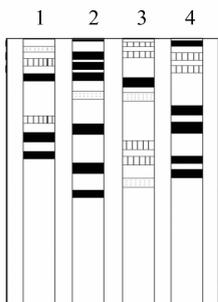
表 3 半翅目蝽科 4 个种之间 EST 同工酶相似系数比较

Sm	A	B	C	D
A	1			
B	3/8	1		
C	2/7	3/8	1	
D	1/7	3/8	2/7	1

注:A 至 D 所代表的种名同表 1。

3 结论与讨论

这 4 种蝽在外观形态上来讲具有一定的相似性,不易区别,但是每个种都有自己的特征谱型,模式图差异很大,图 9 为半翅目蝽科 4 个种酯酶同工酶模式图。由模式图显示可知,不同的种酶带数目不尽相同,并且酶带泳动度以及酶活性的强度都有较大的区别,每个种的特征带也不一样,其中斑须



1—斑须蝽; 2—茶翅蝽; 3—麻皮蝽; 4—菜蝽
图9 半翅目蝽科4个种之间酯酶同工酶模式图

蝽(1道)酶带集中,特征带在靠近阳极端, R_f 值在 0.542 ~ 0.552 之间,茶翅蝽(2道)酶带染色都比较清晰,其中 R_f 值为 0.45 的酶带相比其他带带宽色深,可认为是特征带,麻皮蝽(3道)特征带在靠近阴极端,其 R_f 值为 0.31,菜蝽(4道)特征带也靠近阴极端,但其 R_f 值在 0.44 ~ 0.50 之间,所以作出一个种的电泳图谱,对应模式图,便可鉴定种的所属。综上所述,利用酯酶同工酶绘制出模式图在蝽科以下单元的分类上具有一定的可行性和参考价值。

经多次重复试验表明:同一科不同种个体具有一定的相似性,但差别大于同种不同个体,而同种不同体色个体 EST 同工酶存在差异非常微小,这种差异表现在酶含量、酶活性及性别上,每个种都有各自的特征酶谱,在不同的个体中重复性和稳定性较好,利用这种特征性酶谱作出同一种的酶谱模式图,便能很好地区分同一科内不同种的个体。也就说明以酯酶同工酶作为蝽科亚科间及属间的生化分类指标有一定的可靠性,弥补了形态分类的不足和局限性。

EST 同工酶是一组能水解酯键的酶,也是多态性很高的一组酶,在生物体内广泛存在,因此利用 EST 同工酶进行昆虫分类鉴定、研究系统发育等日渐增多。蒋成山对蚊虫 EST 同工酶进行了研究,证明 EST 同工酶谱能把几种蚊虫区分开来^[6]。梁广勤等人利用染色体重组分析了 EST 同工酶电泳技术,鉴定了寡鬃实蝇属的 5 种实蝇^[7]。邓晓峰等利用酶电泳探讨了斑潜蝇分类鉴定技术^[8]。谢爱林对贵州 7 种负蝗的 EST 同工酶比较研究认为,同种不同性别、不同个体和不同地理之间 EST 同工酶酶谱都有所不同^[9]。研究表明不同种之间 EST 同工酶酶谱都有所不同,而本试验对半翅目部分昆虫的 EST 同工酶进行了比较研究,并绘制了各种类的模式图谱,绘制各个种类酯酶同工酶模式图,填补了半翅目昆虫模式图研究的空白,从而为这一类群的系统分类研究提供重要的、更可靠和更客观的依据和佐证。

参考文献:

[1] 马春燕,郑哲民. 两种蝽科昆虫酯酶同工酶的比较研究[J]. 宁夏工程技术,2005,4(1):68-69.
 [2] 李绍文,孟玉苹,张宗炳,等. 蜜蜂酯酶同工酶的比较研究[J]. 昆虫学报,1985,23(4):369-394.
 [3] 童富淡,汪俏梅,刘艳荷. 西方蜜蜂四个亚种酯酶同工酶型和苹果亚酸脱氢酶 2 同工酶基因型的遗传差异[J]. 动物学报,2002,48(6):823-828.
 [4] 郭晓霞,郑哲民,于广志,等. 酯酶同工酶多态性及其在昆虫分类学中的价值[J]. 昆虫知识,2000,37(6):371-374.
 [5] 李绍文,孟玉苹,张宗炳,等. 膜翅目酯酶同工酶的比较研究[J]. 昆虫学报,1987,30(3):266-270.
 [6] 蒋成山,潘家复,蒋文彬,等. 中华按蚊和雷氏按蚊嗜人亚种八种同工酶的遗传分析及其亲缘关系的研究[J]. 遗传学报,1983,10(5):390-397.
 [7] 梁广勤,杨国海,梁帆,等. 利用染色体和同工酶技术鉴定寡鬃实蝇幼虫[J]. 植物检疫,1994,8(1):4-9.
 [8] 邓晓峰,王俊,屈娟,等. 台湾省斑王潜蝇种类及其防治进展[J]. 植物检疫,1997,11(5):284-289.
 [9] 谢爱林. 贵州七种负蝗染色体及酯酶同工酶的比较研究[J]. 贵州师范大学学报,2002,51(2):257-261.