

RAPD 分析在绢丝昆虫亲缘关系研究中的应用

I. 蓖麻蚕品种间的遗传差异

左正宏¹, 桂慕燕², 王学民², 陈元霖²

(1. 湖南省岳阳卫生学校, 岳阳 414000; 2. 福建省厦门大学生物学系, 厦门 361005)

摘要:用 RAPD 技术对蓖麻蚕基因组 DNA 进行多态性研究, 分析了 5 个蓖麻蚕品种间的遗传差异。结果表明, 所采用的 40 个随机引物中, 有 27 个引物扩增谱带清晰且重复性较好, 扩增总片段数达 243 个, 单个引物的扩增片段数在 4~17 之间, 平均为 9 条, 片段大小在 0.33~3.0kb 之间。不同蓖麻蚕品种间的遗传距离(D)在 0.0683~0.1603 之间, 根据 D 值, 由 UPGMA 聚类分析软件绘制了它们的聚类分子树。

关键词:蓖麻蚕; RAPD; 品种差异

中图分类号: Q963

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)02-0128-03

Application of RAPD Technique in Genetic Relationship Study of Silk Insect

I. Genetic Variance in Eri Silkworm

ZUO Zheng-hong¹, GUI Mu-yan², WANG Xue-min², CHEN Yuan-lin²

(1. Yueyang Health School of Hunan, Yueyang 414000; 2. Dept. of Bio. Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to analyze the genetic diversity among eri silkworm. The genetic variance of five eri silkworm was studied. The result showed that: 27 of 40 arbitrary primers could amplify clearly with repeatable bands. 243 fragments were obtained. Each primer gave 4~17 bands and the average was 9. The length of the band was 0.33~3.0kb. The genetic distance (D) value between different breeds of Eri Silkworm was 0.0683~0.1603. The D value was used to construct a dendrogram by UPGMA.

Key words: eri silkworm; RAPD; genetic variance

蓖麻蚕 (*Philosamia cynthia ricini* Boisduval) 原产于印度东北部, 20 世纪 50 年代初引入我国试养和研究, 自引种试验以来, 科学工作者根据幼虫血液、皮色和斑点作为繁殖原种蓖麻蚕的标志, 凭这些肉眼能辨认的性状进行分离、纯化, 培育出了许多蓖麻蚕品种^[1]。蓖麻蚕与家蚕及柞蚕为我国生产天然丝的三大蚕种。作为已开发利用的非桑蚕资源, 蓖麻蚕还具有有一些家蚕所不及的优良经济性状: 食性广、生长快、个体大、抗逆性强等。关于蚕类的 RAPD 研究, 目前国内外多限于家蚕^[2~5], 对非桑蚕

的文献报道则较少见。本研究利用我们已建立的蚕类基因组 DNA 的 RAPD 检测技术^[6,8], 对蓖麻蚕不同品种的基因组 DNA 进行多态性分析, 以作为种质资源保存、鉴定和利用的分子生物学依据。同时也为今后寻找品种特征分子标记作前期工作。

1 材料和方法

1.1 材料

5 个品种的蓖麻蚕由中国农业科学院蚕业研究所吴冬秀研究员提供。其性状特征见表 1。

收稿日期: 2000-04-04; 修回日期: 2000-09-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号 39870410)

作者简介: 左正宏(1973-), 男, 汉族, 安徽贵池人, 硕士学位, 讲师, 专业方向: 动物遗传学

通讯作者: 陈元霖(1934-), 男, 福建莆田人, 副教授, 专业方向: 动物遗传学。Tel: 0592-2187494, E-mail: guimuyan@263.net

表 1 蓖麻蚕各品种的性状特性

Table 1 The varietal character of Eri silkworms

品种	品种类型	血色	茧色	幼虫斑纹
镇蓖 3	杂交越冬种	黄血	蓝皮	无斑
镇蓖 4	低温驯化种	黄血	白皮	无斑
镇蓖 6	低温驯化种	黄血	白皮	无斑
镇蓖 9	异地杂交种	黄血	白皮	有斑
镇蓖 10	引进越冬种	白血	白皮	无斑

1.2 基因组 DNA 的提取

蚕类基因组 DNA 的提取根据本实验室已建立和应用的方法^[6],取早期蚕蛹,在预冷的 $1 \times \text{SSC}$ 中,捣碎匀浆,3000r/min 离心 15min,弃上清,用 $1 \times \text{SSC}$ 反复漂洗沉淀,去除部分蛋白质及脂肪等杂质,直至上清液清澈。称取沉淀部分,按 1ml/g 加提取缓冲液,混匀后加入蛋白酶 K 至 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 。50℃ 消化 24h 后,加 5M 的 KAc 至终浓度为 1.3M,冰浴 20min,加等体积的氯仿:异戊醇(24:1)摇匀,8000r/min 离心 20min 去蛋白。取上相,以 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA,再用 70% 乙醇洗涤并稍干后,溶于适量的 TE 缓冲液,再经 RAN 酶、蛋白酶 K 处理,酚、氯仿抽提,异丙醇沉淀,溶于 TE 中, -20℃ 保存。样品经紫外检测和琼脂糖凝胶电泳检测, A_{260}/A_{280} 介于 1.69 ~ 1.81 之间,分子量在 50kb 以上。

1.3 PCR 反应

引物为美国 Operon 公司出品的试剂盒,标号为 OPI-01 至 OPI-20 和 OPW-01 至 OPW-20 共 40 个。在 $25\mu\text{l}$ 的 PCR 反应液中,含有 1U Taq 酶 (Promega)、约 5pmol 引物、 $100\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTP、约 25ng 的基因组 DNA。反应混合物用石蜡油覆盖。PCR 反应程序:94℃ 变性 5s,36℃ 复性 30s,72℃ 延伸 60s,共 40 个循环,最后在 72℃ 延伸 5min。RAPD 产物经 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色后于多色荧光凝胶成像仪上成像及数据处理。

1.4 数据分析

任何两个样本之间的遗传距离 (D) 的计算可以通过以下公式: $D = 1 - F$ 。 F 为两个样本 RAPD 标记的共享度,计算公式为 $F = 2N_{xy}/(N_x + N_y)$,在此, N_{xy} 是样本 x 和样本 y PCR 扩增分子量相同的 DNA 片段总数, N_x 和 N_y 分别是样本 x 和样本 y PCR 扩增 DNA 片段的总数。根据遗传距离 (D),利用 UPGMA (unweighted pair group method with

arithmetic mean)^[7] 聚类分析方法构建分子系统树。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 扩增结果

我们采用了 40 个 10bp 的随机引物进行 PCR 扩增,对其中扩增谱带清晰、重复性较好的 27 个引物进行数据统计,其碱基序列及扩增结果见表 2。

表 2 RAPD 引物及其 PCR 扩增情况

Table 2 The primes of RAPD and the amplification of PCR

引物	序列	RAPD 标记总数	RAPD 标记可变数	多态百分率 (%)
OPI01	ACCTGGACAC	9	3	33.33
OPI02	GGAGGAGAGG	10	3	30.00
OPI03	CAGAAGCCCA	7	0	0
OPI06	AAGCGGCAG	9	3	33.33
OPI07	CAGCGACAAG	13	4	30.77
OPI09	TGGAGAGCAG	5	0	0
OPI10	ACAACGCGAG	9	4	44.44
OPI11	ACATGCCGTG	10	2	20.00
OPI13	CTGGGGCAGA	8	1	12.5
OPI14	TGACGGCGGT	11	4	36.37
OPI19	AATCGGGGAG	9	4	44.44
OPI20	AAAGTGGGCG	17	9	52.94
OPW01	CTCAGTGTC	8	6	75.00
OPW03	GTCCGGAGTG	5	4	80.00
OPW05	GGCGGATAAG	7	4	57.14
OPW06	AGGCCCGATC	11	4	36.37
OPW08	GACTGCCTCT	9	5	55.56
OPW09	GTGACCGAGT	8	4	50.00
OPW10	TCCATCCCT	12	5	41.67
OPW11	CTGATGCCGTG	10	5	50.00
OPW12	TGGGCAGAAG	14	5	35.71
OPW13	CACAGCGAGC	7	3	42.86
OPW15	ACACCGGAAC	7	1	14.29
OPW16	CAGCCTACCA	4	0	0
OPW17	GTCCTGGGTT	6	2	33.33
OPW18	TTCAGGGCAT	9	2	22.22
OPW19	CAAAGCGCTC	9	2	22.22
合计		243	89	

根据 27 个引物的扩增谱带进行分析,27 个引物扩增谱带总数为 243 条,每个引物的扩增所得的条带数平均为 9 条,变动范围在 4 ~ 17 之间。这些 DNA 片段的分子量在 330bp ~ 3000bp 之间。和我们以前的结果相比较^[6,8,9],其 RAPD 图谱的重复性较好,带型基本相符。图 1 为引物 OPW-01、OPW-08 的电泳图谱。由此表明,在各种实验条件稳定,采用同一 PCR 扩增仪时,可获得重复性较好的结果。

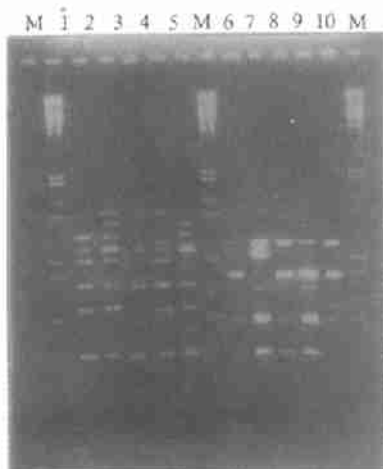


图1 引物 OPW-08(1~5)、
OPW-01(6~10)的 RAPD 图谱
1,6:镇蓖 10;2,7:镇蓖 9;3,8 镇蓖 6;
4,9:镇蓖 4;5,10:镇蓖 3;
M: λ DNA - EcoRI/HindIII。
Fig.1 The RAPD pattern of
Opw-08(1~5)、Opw-01(6~10)

2.2 品种间的遗传多态性和 UPGMA 聚类

五个品种间的遗传距离(D)见表3。根据 D 值,由UPGMA聚类分析软件绘制的分子进化树见图2。

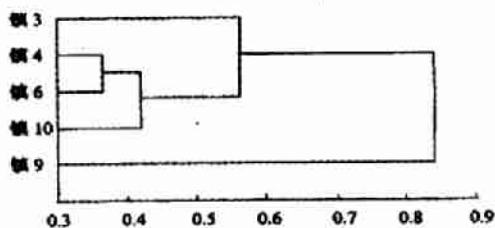


图2 蓖麻蚕品种间聚类分子树
Fig.2 The dendrogram by
UPGMA of Eri Silkworm

表3 蓖麻蚕品种间的遗传距离(D)

Table 3 The genetic distance between
different breeds of Eri Silkworm

	镇蓖 3	镇蓖 4	镇蓖 6	镇蓖 9	镇蓖 10
镇蓖 3	214				
镇蓖 4	0.1046	197			
镇蓖 6	0.0726	0.0683	213		
镇蓖 9	0.1463	0.1603	0.1491	196	
镇蓖 10	0.0773	0.0730	0.0702	0.1364	200

对角线上数字为每个品种的 RAPD 扩增总带数。

蓖麻蚕五个品种间存在大量的共有片段,它们之间 D 值均很小,在0.0683~0.1603之间。考虑到蓖麻蚕原产于印度,1951年和引入我国,它的地域隔离和分化只有四十几年,本文所用的品种又同来源于镇江,其遗传分化甚小应是合理的。这五个品种又以镇蓖9与其它品种的遗传分化稍大(见图2),这也和它们的表型性状相吻合。

参考文献(References):

- [1] 张果. 蓖麻蚕种选育[M]. 北京: 科学出版社, 1959, 3.
- [2] 翁宏庵, 徐孟奎, 张耀洲. 家蚕的 RAPD 及其品种(系)间差异[J]. 浙江农业大学学报, 1996, 22(2): 152~156.
- [3] 夏庆友, 等. 家蚕 RAPD 的扩增条件、重复性及遗传模型研究[J]. 蚕业科学, 1996, 22(1): 20~25.
- [4] 夏庆友, 周泽汤, 等. 家蚕 Y、NI 基因和 Z 染色体的 RAPD 分子标记研究[J]. 西南农业大学学报, 1996, 18(2): 114~118.
- [5] 夏庆友, 周泽汤, 鲁成, 等. 家蚕不同地理品种(系)分子系统学研究[J]. 昆虫学报, 1998, 41(1): 32~40.
- [6] 刘春宇, 陈元霖, 桂慕燕, 等. 家蚕与蓖麻蚕杂交后代变异机制探讨——基因组 RAPD 检测[J]. 遗传, 1998, 20(2): 5~8.
- [7] Sneath P H A, et al. Numerical Taxonomy[M]. San Francisco, 1973.
- [8] 张春玲, 陈元霖, 桂慕燕, 等. 蓖麻蚕 DNA 导入引起家蚕遗传变异的研究——基因组 DNA 的 RAPD 检测[J]. 遗传, 1998, 20(3): 1~4.
- [9] 桂慕燕, 左正宏, 陈元霖. 五种绢丝昆虫随机扩增多态性 DNA 分析[J]. 遗传, 2001, 23(1): 25~28.

中国生物工程学会第三次代表大会暨学术讨论会即将召开

[本刊讯] 中国生物工程学会第三次代表大会暨学术讨论会定于2001年6~7月在北京召开,大会主题是21世纪初的中国生物技术。会议将邀请知名专家就生物技术重大和热点问题作大会报告,并组织若干专题研讨会,具体安排见正式通知。欢迎参加征文和报名参加会议。征文摘要限1200字,请以纯文本形式寄送,不得作为附件。

联系地址:北京中关村科学院南路8号 中国生物工程学会办公室(100080)

电话:010-62562548(传真),010-62534585

电子信箱:biotech@mail.las.ac.cn