

家蚕与蓖麻蚕杂交后代变异机理探讨 ——基因组 RAPD 检测^①

刘春宇^② 陈元霖^③ 桂慕燕 张春玲

(福建省厦门大学细胞生物学研究室, 厦门 361005)

摘要 采用 24 种随机引物, 对以蓖麻蚕精子进行人工授精得到的家蚕后代中的 3 个稳定变异品系及其亲本的基因组进行了 RAPD 检测, 结果显示, 在变异品系的 RAPD 图谱中, 不仅存在大量与母本相同的“亲本带”, 同时还出现了不同数量与母本不同的“变异带”, 包括“非亲本带”、“缺失带”及个别仅与父本相同的“目的带”, 从分子水平上揭示了变异品系存在着明显的“偏母性”与“变异性”特点。

关键词 家蚕, 蓖麻蚕, 杂交, RAPD

中图分类号 Q321.3

Studies on the Mechanism of Variations of Hybrids of Domesticated Silkworm and Eri Silkworm ——RAPD Analysis of Genome

LIU Chunyu CHEN Yuanlin GUI Muyan ZHANG Chunling

(Institute of Cell Biology, Xiamen University, Fujian Province 361005)

Abstract Twenty-four random primers were used to analyze the genomes of three descendant strains with steady heritable variation produced from domesticated silkworm by artificial insemination with sperms of eri silkworm. The results show that in the RAPD patterns there are many amplified bands called “parental bands” which are similar to those of the female parent. At the same time, there appears varied amount of amplified bands called “variant bands” that are different from those of the female parent. The variant bands include non-parental bands, lost bands and several “expected bands” which only shared with the male parent. This research reveals the significant matroclony and variation in the descendant strains at the molecular level.

Key words Domesticated silkworm, Eri silkworm, Hybridization, RAPD

家蚕 (*Bombyx mori* L.) 与蓖麻蚕 (*Philosamia cynthia ricini* Boisduval) 的杂交属于昆虫的科间杂交。一些作者曾经采用人工授精方法, 进行以家蚕为母本、蓖麻蚕为父本的杂交试验^[1~4], 并在杂交后代获得性状改变的个体^[1~3], 培育出了稳定的新品系^[1, 2]。但是杂交后代的表型分析、染色体观察和受精细胞学的研究结果表明, 蓖麻蚕精子进入家蚕卵后, 并未发生雌雄核的融合。据此推测, 在杂交过程中, 蓖麻蚕精子进入家蚕卵后, 不仅刺激了家蚕卵的发育产生子代, 而且还通过精子将外源遗传物质带入卵内, 从而导致了后代性状的改

① 国家自然科学基金资助课题。

② 刘春宇, 男, 28 岁, 硕士学位, 助理研究员, 专业方向为细胞生物学。

③ 通讯联系人。

变^[1]。Deodikar 等也认为, 从浸泡于蓖麻蚕精液中的家蚕卵孵出的后代中出现性状的变化, 可能是由于在卵内发生了“遗传转化作用”的结果^[2]。自从 Williams 等创立了 RAPD 技术以来, 该技术已被成功地应用于动植物的种属鉴别和外源基因的追踪等研究领域^[5~7]。实践证明 RAPD 技术不仅具有快速、简便和需样少的优点, 更具有在对研究对象基因组序列不了解的情况下开展工作的特点。

本文采用 RAPD 技术, 对家蚕、蓖麻蚕及其人工授精产生的变异后代的基因组进行检测和比较分析, 探讨了远缘精子授精引起的遗传变异的特点。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验材料

蓖麻蚕品种斑马(父本)和家蚕品种湖₂₀₄(母本)以及从斑马精子授精的湖₂₀₄产生的后代变异个体中选育出的新品系 BH₈₆₁、BH₈₆₂、BH₈₆₃。这些新品系均采用近亲繁殖法培育了 30 代以上、性状稳定^[1]。此外, 还用家蚕品种苏学₅作为品种间比较。各种蚕的主要特征见表 1。

表 1 蓖麻蚕和家蚕各品种(系)主要特征

种类	主要性状	种类	主要性状
斑马 ¹⁾	卵白色、不滞育、壮蚕大班	BH ₈₆₁	卵白色、不滞育、壮蚕素斑
湖 ₂₀₄	卵深灰色、滞育、壮蚕素斑	BH ₈₆₂	卵深灰色、滞育、壮蚕眼状斑
苏学 ₅	卵深灰色、滞育、壮蚕普通斑	BH ₈₆₃	卵黄间微红、滞育、壮蚕素斑

1) 蓖麻蚕, 其他均为家蚕。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取、纯化与检测 取早期蚕蛹捣碎匀浆, 离心, $1 \times \text{SSC}$ (0.15 mol/L NaCl ; 0.015 mol/L 柠檬酸三钠; 0.01 mol/L EDTA , pH7.7) 反复漂洗沉淀, 然后以蛋白酶 K 消化, 氯仿:异戊醇 (24:1) 去蛋白, 乙醇沉淀 DNA, 溶于适量的 TE 缓冲液。再依次以 RNA 酶、蛋白酶 K 消化, 酚:氯仿处理, 异丙醇沉淀, 乙醇漂洗, 稍干后溶于纯水, 贮存于 -20°C 。样品经紫外检测 (Shimadzu UV-240) 和琼脂糖凝胶电泳分析, A_{260}/A_{280} 介于 1.8~1.9 之间, 分子量在 50kb 以上, 样品稀释至约 $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 用于 RAPD 分析。

1.2.2 RAPD 分析 引物为美国 Operon 公司生产的试剂盒, 标号为 AI-01 至 20, I-01 和 I-02, 以及 W-06 和 W-20。25 μl 的 PCR 反应液中, 含有 1U Taq 酶 (华美); 约 5p mol 引物; $100 \mu\text{mol/L}$ dNTP; 约 25ng 模板 DNA。以石蜡油覆盖, 在 PCR 仪 (PE480) 中运行调温程序: 94°C 变性 5s, 36°C 复性 30s, 72°C 延伸 1min, 共 40 个循环, 最后在 72°C 延伸 5min。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳, EB 染色, 紫外分析仪上拍照, 即得 RAPD 图谱供分析。

每个样品至少重复检测两次。分别统计各样品 RAPD 图谱上显现的带数 (N), 并计算相互的遗传距离 (D)。遗传距离 (D) 的计算按如下公式进行:

$$D = \frac{1 - 2Nab}{Na + Nb}$$

Nab 为样品 A 与样品 B 图谱中相同的带数, $Na + Nb$ 为样品 A 和样品 B 图谱中各自显现的总带数之和^[9]。

2 结 果

2.1 遗传距离的比较

采用 24 种随机引物对蓖麻蚕品种斑马、家蚕品种湖₂₀₄和苏学₅、以及斑马与湖₂₀₄杂交后代品系 BH₈₆₁、BH₈₆₂、BH₈₆₃共 6 个样品基因组进行了 RAPD 检测, 所有引物均得到清晰的、重复性好的 RAPD 图谱(见图版 I, 1~4)。在所有的图谱中总共显现出 216 条扩增带, 其分子片段大小分布在 300bp~3kb 之间。在扩增图谱中分别统计出各种样品的扩增带数及相互间的共有带数, 从而计算其遗传距离。结果见表 2。

表 2 杂交后代与其亲本间的遗传距离 (D)

种 类	湖 ₂₀₄	BH ₈₆₁	BH ₈₆₂	BH ₈₆₃	苏学 ₅
斑 马	0. 796	0. 841	0. 801	0. 821	0. 855
湖 ₂₀₄	—	0. 262	0. 046	0. 211	0. 364
苏学 ₅	0. 364	0. 455	0. 355	0. 353	—

如表 2 所示, 杂交后代与父本蓖麻蚕之间遗传差异很大 ($D=0.801\sim0.841$), 接近于家蚕湖₂₀₄和苏学₅与蓖麻蚕斑马间的遗传距离 ($D=0.796$ 和 0.855); 苏学₅与湖₂₀₄及 BH 品系的遗传距离在 $0.353\sim0.455$ 之间; 湖₂₀₄与 BH 品系之间的遗传距离不超过 0.262 (BH₈₆₁), 其次为 0.211 (BH₈₆₃), 而与 BH₈₆₂的遗传距离最小 ($D=0.046$), 这与它们的表型差异情况相吻合(见表 1)。

2.2 变异品系的 RAPD 图谱分析

斑马和湖₂₀₄及其杂交后代 RAPD 图谱比较结果提示, 家蚕与蓖麻蚕杂交后代有两个显著特点: 一是偏母性。在样品 DNA 扩增产物中, 3 个变异品系与母本相同的扩增带占它们总带数的 68.9% 以上, 而与父本相同的带还不到 2% (见表 3); 二是变异性。在变异品系中出现了一些在双亲中所没有的新带, 即所谓“非双亲带”(见图版 I, 2), 或者消失了一些母本所固有的扩增带, 即所谓“缺失带”(见图版 I, 3), 尤其是在采用引物 OPAI-02 和 OPAI-07 对 BH₈₆₃ DNA 扩增的产物中, 还出现了父本所独有的带, 即所谓“目的片段”(OPAI-02 930、OPAI-07 1900)(见图版 I, 4)。

表 3 变异品系的 RAPD 图谱中各类扩增带的比例 (%)

品系名称	与双亲相同带	与母本相同带	与父本相同带	与双亲不同带	缺失母本原有带
BH ₈₆₁	15. 2	70. 7	0	14. 1	35. 2
BH ₈₆₂	16. 8	79. 8	0	3. 4	5. 7
BH ₈₆₃	16. 0	68. 9	1. 9	13. 2	13. 2

3 讨 论

家蚕和蓖麻蚕的杂交是一种超远缘杂交, 通常是极难成功的。在我们和其他一些作者的试验中, 通过人工授精方法进行以家蚕为母本与蓖麻蚕杂交, 得到的子代雌雄个体都有正常生殖能力、染色体数目与母本相同 ($2n=56$)。由此有人认为, 家蚕与蓖麻蚕杂交的后代, 是家蚕卵在蓖麻蚕精子刺激下发生的一种孤雌生殖现象^[2, 3], 这种观点似乎也为受精细胞学的观察所证实^[4]。但是, 孤雌生殖何以会出现性状的变化? 我们采用 RAPD 技术检测的结果表明, 远缘杂交引起了母本基因组结构变化。在杂交后代的扩增产物中, 不仅存在着大量与母本相同的扩增带, 还出现一定数量的不同于母本的“变异带”, 包括“非双亲带”、“缺失带”、及个别与父本相同的“目的带”等。这些变异带的出现, 可能是由蓖麻蚕精子携带入家蚕卵内的外源 DNA 的作用, 导

致母本基因组原有结构发生了重排(包括碱基或 DNA 片段插入、缺失或替换等)的结果。由此提示,在人工授精的情况下,蓖麻蚕 DNA 掺入家蚕基因组,可能是杂交后代发生性状改变的原因。由于掺入的外源 DNA 对家蚕基因组作用的随机性,从而导致了后代出现变异现象的复杂性:在杂交后代既可能出现父本的性状(“遗传转化”),也可能出现母本原有的性状(“返祖”),或者出现与双亲完全不同的新性状(“突变”等);这些情况既可能同时出现于后代的不同个体,也可能出现在后代同一个体;甚至不同作者,或同一作者的各次实验都可能出现不同的情况;这也许正是重复实验难以取得一致结果的重要原因之一。

我们在家蚕和蓖麻蚕 DNA 相互直接导入的实验中,多次观察到与其杂交试验相似的结果,并育成了稳定的家蚕和蓖麻蚕杂交后代新品系^[9~12]。对蓖麻蚕 DNA 导入家蚕的试验后代进行 RAPD 检测,也得到了与杂交后代相似的“变异带”^[12]。由此提示,家蚕与蓖麻蚕杂交和外源 DNA 直接导入引起的性状改变,可能存在着相同或相似的机理。

根据 RAPD 图谱计算出的遗传距离表明:杂交后代的变异是很小的,它们与母本遗传距离小于家蚕品种之间如湖₂₀₄与苏学₃的遗传距离。不同变异品系与母本的遗传距离也各不相同,按距离的大小依次为 BH₈₆₁>BH₈₆₃>BH₈₆₂,这与其表型差异情况相吻合。

远缘杂交的研究,对于开发动植物的育种新技术,揭示物种进化的奥秘有着重要意义。但是远缘杂交现象也是很复杂的,为了阐明远缘杂交的本质,仅仅根据其后代是否出现父本性状,或者在其染色体组中父本染色体的有无作出判断是不充分的,还必须在分子水平上进行深入的研究,才有可能揭示远缘杂交后代发生性状改变的机理。

参 考 文 献

- 1 陈元霖,桂慕燕,任承贞等.家蚕与蓖麻蚕的杂交研究.厦门大学学报(自然科学版),1993,32(增刊1):1~8
- 2 Deodkar G B *et al.* New strains of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.) by induced anomalous parthenogenesis. Indian J. Seric, 1997, Vol xv, 43~48
- 3 钱惠田等.蚕的人工授精初报.广西蚕业通讯,1981,4:50~55
- 4 张果.异科精子在蚕卵中的命运.蚕业科学,1987,13(4):221~225
- 5 Williams J G K *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and useful genetic markers. Nucleic Acid Res., 1990, 18(22):6531~6536
- 6 鲍晓明等.用 RAPD 技术鉴定两个小冰麦易位系.遗传学报,1993,20(1):81~87
- 7 惠东威等. RAPD 技术及其应用.生物工程进展,1992,12(6):1~5
- 8 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 74: 5267~5273
- 9 陈元霖等.家蚕去氧核糖核酸诱导蓖麻蚕遗传变异的初步研究.遗传学报,1979,6(1):84
- 10 陈元霖等.蚕类 DNA 诱导遗传变异的研究——家蚕 DNA 对蓖麻蚕的诱变作用.中国科学(B辑),1981,9:1153~1159
- 11 陈元霖等.蓖麻蚕 DNA 对家蚕的诱变作用.厦门大学学报(自然科学版),1993,32(增刊1):20~27
- 12 张春玲等.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.遗传,1998,20(3):待发表
1997-09-05 收稿,1997-12-28 修回.