

五种绢丝昆虫随机扩增多态性 DNA 分析

桂慕燕 左正宏 陈元霖

(厦门大学细胞生物研究室 福建厦门 361005)

摘要 本文对家蚕、野桑蚕、蓖麻蚕、柞蚕和天蚕等 5 种绢丝昆虫进行了随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析。40 个引物中有 27 个引物能扩增出 536 个清晰且重复性强的条带,其中可变条带数为 520 个,单个引物扩增的条带数在 11~28 之间,平均为 19.9,各片段分子量大小在 0.29~2.67kb 之间。每个样本都能找出其独特的分子标记。家蚕与野桑蚕的遗传距离(D)最小,为 0.3760,家蚕与蓖麻蚕的遗传距离(D)最大,为 0.7488。根据遗传距离,用 UPGMA 聚类分析方法构建了它们的分子树。

关键词 蚕丝昆虫;RAPD;多态性

中图分类号 S881 S885

文献标识码:A

文章编号 0253-977X(2001)01-0025-04

The Study on Molecular Phylogenetic and Molecular Marker of Species in Silk Insects

GUI Mu-yan, ZUO Zheng-hong, CHEN Yuan-lin

(The Biology Department of Xiamen University, Xiamen, Fujian Province 361005, China)

Abstract Five species of silk insects including *Bombyx mori*, *B. manolarina*, *Philosamia cynthia*, *Atheraea pernyi* and *A. yamamai* were analyzed by RAPD method using 40 arbitrary primers. In these primers, 27 of them could amplify clear and repeating bands. 536 fragments were obtained and the variable bands were 520. Each primer gave 11~28 bands and the average was 19.9. The length of the fragments is 0.29~2.67 kb. Some distinctive bands were found in every species. The genetic distance(D) between *Bombyx mori* and *B. manolarina* is 0.3760, which is the lowest. The highest D value is 0.7488, which between *Bombyx mori* and *Philosamia cynthia*. The D value was then used to construct a dendrogram by unweighted pair-group method with arithmetical average (UPGMA).

Key words silk insect; RAPD; polymorphism

绢丝昆虫一般指那些能在体内合成、分泌并吐出蛋白质纤维的昆虫,主要有鳞翅目(Lepidoptera)家蚕蛾科(Bombycidae)和天蚕蛾科(也叫大蚕蛾科 Saturniidae)的一些昆虫,有着极为重要的经济价值。开展这类昆虫贵遗传特性的研究,对于丰富生物进化和物种演化理论,革新蚕的育种技术,提高蚕丝昆虫的物种鉴别及其亲缘关系的分析,促进蚕丝业的发展都有重要意义。目前,对蚕丝昆虫遗传特性的研究一般是以其个体的表型特征(如个体形态和蛋白

质多型性的差异)为依据,这些特征虽然是以其基因型的差异为基础,但它往往受到外界环境和体内生理因素的影响而有不同的表现^[1~3]。蚕丝昆虫的核型和线粒体 DNA 多态性研究表明,它们不能提供足够丰富的多态性^[4~8]。RAPD 方法应用于物种系统学研究,能够从 DNA 水平上反映基因组的特征,而且技术简单,可以快速、高效地获取许多个体或基因型的许多位点的 DNA 序列多态性资料。已有的研究表明,RAPD 方法可作为蚕遗传与

收稿日期 2000-05-23;修回日期 2000-09-08

基金项目 国家自然科学基金资助项目(批准号 39870410)

作者简介 桂慕燕(1948-),女,江苏人,实验师,专业方向 动物遗传学。Tel 0592-2187494. E-mail guimuyan@263.net

进化研究,以及在育种中寻找遗传标记的一种有效工具^[9~13]。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验所用材料为家蚕蛾科的家蚕(*Bombyx mori* , 代表品种为七芙 × 湘九),野桑蚕(*B. mandarina*); 天蚕蛾科的蓖麻蚕(*Philosamia cynthia* ,代表品种为镇蓖 6)柞蚕(*Antheraea pernyi* ,代表品种为方黄 2), 天蚕(*A. yamamai*)。蓖麻蚕由中国农业科学院蚕业研究所,柞蚕和天蚕由山东省蚕业研究所,家蚕由福建省蚕桑研究所,野桑蚕由浙江省蚕桑研究所提供(表 1)。

1.2 基因组 DNA 的提取

根据我们以前所采用的方法^[9],取早期蚕蛹在预冷的 $1 \times \text{SSC}$ (0.15mol/L NaCl , 0.015mol/L 柠檬酸三钠, 0.01mol/L EDTA , $\text{pH}7.7$)中捣碎匀浆,离心, $1 \times \text{SSC}$ 反复漂洗沉淀物,用蛋白酶 K 消化,氯仿 - 异戊醇(24:1)去蛋白,乙醇沉淀 DNA。将 DNA 溶于适量的 TE 缓冲液,再依次用 RNA 酶、蛋白酶 K 消化,酚 - 氯仿处理,异丙醇沉淀,70% 乙醇漂洗,稍干后将 DNA 溶于纯水,贮存于 -20°C 。样品经紫外检测(BECKMAN DU600)和琼脂糖凝胶电泳检测, A_{260}/A_{280} 介于 $1.7 \sim 1.8$ 之间,分子量在 50kb 以上,用于 RAPD 分析的样品稀释至约 $25 \text{ng}/\mu\text{l}$ 。

表 1 实验采用的绢丝昆虫分类表

Table 1 The species of silk insects in this experiment

昆虫纲鳞翅目(Class : Insecta , Order : Lepidoptera)

蚕蛾总科(*Bombycoidea*)

家蚕蛾科(<i>Bombycidae</i>)		天蚕蛾科(<i>Saturniidae</i>)		
家 蚕 (<i>Bombyx mori</i>)	野桑蚕 (<i>Bombyx mandarina</i>)	蓖麻蚕 (<i>Philosamia cynthia ricini</i>)	柞 蚕 (<i>Antheraea pernyi</i>)	天 蚕 (<i>Antheraea amamai</i>)

1.3 RAPD 分析

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 OP2 - 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、 $100 \mu\text{mol/L dNTP}$ 、约 25ng 的基因组 DNA。反应混合物用石蜡油覆盖。PCR 反应中的运

行调温程序 94°C 变性 5s 、 36°C 退火 30s 、 72°C 延伸 60s 每个反应为 40 个循环,最后在 72°C 延伸 5min 。RAPD 产物经 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色后于紫外分析仪上拍照,在多色荧光凝胶成像仪上(BIO - RAD)进行图谱分析。

1.4 数据处理

根据 RAPD 扩增结果,将重复性强、条带清晰的片段记为“ 1 ”,没有或很弱的条带即为“ 0 ”,构建“ 0 ” “ 1 ”信息矩阵。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 扩增产物的 DNA 片段总数。根据遗传距离(D),利用 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)^[14] 聚类分析方法构建分子树。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 扩增结果

首先采用 40 种随机引物进行扩增,从中筛选出重复性好谱带清晰并呈多态性的引物 27 个,根据这 27 个引物扩增的谱带进行分析。27 个引物对 5 个样本 DNA 扩增的片段(位点)总数为 536 个,平均每个引物为 19.9 个,最多的 28 个,最少的 11 个(表 2)。各片段分子量大小在 0.29kb 至 2.67kb 之间。

根据以上分析结果看出,27 个引物对 5 个样本进行 PCR 扩增,共获得 536 个片段,可变数为 520 个(占 97%),完全相同的片段只有 16 个。每个物种均表现出其独特的 RAPD 标记(见表 2)。表 2 中还列出家蚕蛾科和天蚕蛾科独特的分子标记。

图 1、2 表示 OPI₀₉ 和 OPI₁₀、OPW₀₉ 和 OPW₁₀ 的 PCR 扩增产物的电泳结果。

2.2 遗传距离的比较

从 27 个引物对 5 种样本进行 RAPD 检测的结果进行各样本相互遗传距离的计算,所得结果列于表 3。结果提示,家蚕与野桑蚕的遗传距离(D)最小($D = 0.3760$),天蚕与柞蚕为次($D = 0.4707$)。根据构建的“ 0 ” “ 1 ”信息矩阵,我们采用 UPGMA 聚类分析方法构建了它们的分子树(图 3)。

表 2 5 种绢丝昆虫随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析

Table 2 The studies of random amplified polymorphic DNA(RAPD) in silk insects

引物 primers	序列 sequences	T	V	P	独特的分子标记						
					B	S	Bmo	Bma	Per	Aqe	Aya
OPI01	ACCTGGACAC	15	15	100	2	1	0	2	2	0	2
OPI02	GGAGGAGAGG	20	20	100	1	0	0	1	3	1	3
OPI03	CAGAAGCCCA	24	24	100	3	0	3	0	3	1	4
OPI06	AAGGGCCAG	27	27	100	1	1	0	1	4	2	1
OPI07	CAGCGACAAG	28	26	92.9	1	1	2	1	5	1	1
OPI09	TGGAGAGCAG	17	16	94.1	0	0	0	0	2	0	3
OPI10	ACAACGGCAG	23	22	95.7	2	0	0	0	1	2	2
OPI11	ACATGCCGTC	19	19	100	0	0	4	1	4	2	2
OPI13	CTGGGGCAGA	15	4	93.3	1	0	0	0	1	1	2
OPI14	TGACGGCGGT	26	25	96.1	1	0	0	1	2	0	0
OPI19	AATGCGGGAG	25	25	100	0	2	2	2	0	2	2
OPI20	AAAGTCCGGC	27	25	92.6	1	1	1	1	3	1	1
OPW01	CTCAGTGTC	17	16	94.1	1	1	2	0	0	1	0
OPW03	GTCGGAGTC	23	23	100	1	0	1	1	2	1	3
OPW05	GGCGGATAAG	19	19	100	2	1	2	0	2	1	3
OPW06	AGGCCCGATC	23	22	95.7	1	1	0	1	4	0	1
OPW08	GACTGCCCTCT	11	10	90.9	1	0	0	0	2	1	1
OPW09	GTGACCGAGT	19	19	100	0	0	1	0	2	1	0
OPW10	TCGCATCCCT	23	23	100	0	1	0	1	1	4	1
OPW11	CTGATCCGTC	18	18	100	0	0	0	1	2	1	0
OPW12	TGGGCAGAAG	23	21	91.3	1	0	0	0	4	0	2
OPW13	CACAGCGAGC	17	16	94.1	0	0	1	0	1	0	0
OPW15	ACACCGGAAC	19	18	94.7	1	0	0	0	0	1	1
OPW16	CAGCCTACCA	12	11	91.7	0	0	1	0	1	0	3
OPW17	GTCTGGGTT	14	14	100	2	0	0	0	2	0	3
OPW18	TTCAGGGCAT	15	15	100	2	0	1	0	2	1	1
OPW19	CAAAGCGCTC	17	17	100	0	0	1	1	3	1	0
合计		536	520	97.1	25	10	22	14	58	26	42

T:RAPD 标记总数 total numbers of RAPDs; V:RAPD 标记可变数 varied numbers of RAPDs; P:多态百分率 percentage of polymorphism(%) ;

B:家蚕蛾科 *Bombyxidae*; S:天蚕蛾科 *Saturniidae*; Bma:野桑蚕 *Bombyx mandarina*; Bmo:家蚕 *Bombyx mori*; Per:蓖麻蚕 *Philosamia Cynthia ricini*; Ape:柞蚕 *Antheraea pernyi*; Aya:天蚕 *Antheraea yamamai*。

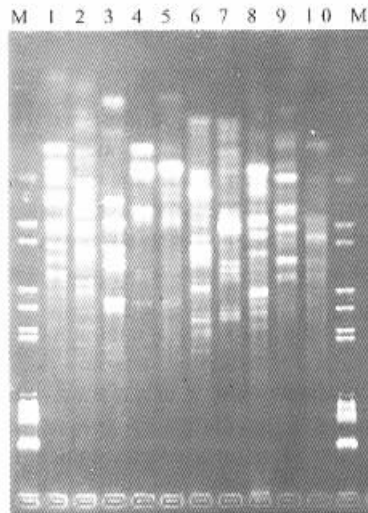
图 1 引物 OPI₀₉(1~5)、OPI₁₀(6~10)的 RAPD 扩增图谱

Fig.1 The RAPD pattern of OPI-09,10

1、6. 柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 2、7. 天蚕 (*Antheraea yamamai*) 3、8. 蓖麻蚕 (*Philosamia Cynthia ricini*);
4、9. 家蚕 (*Bombyx mori*) 5、10. 野桑蚕 (*Bombyx mandarina*) M λDNA-EcoRI/HindIII。

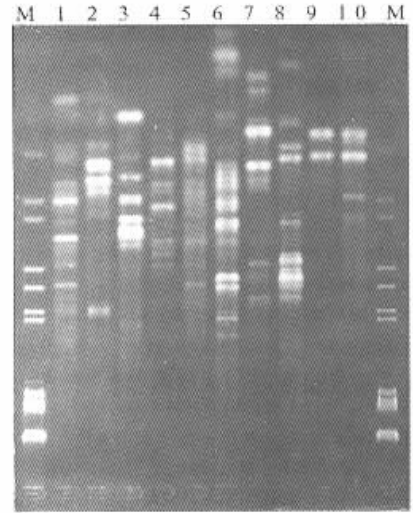
图 2 引物 OPW₀₉(1~5)、OPW₁₀(6~10)的 RAPD 扩增图谱

Fig.2 The RAPD pattern of OPW-09,10

表 3 五种蚕丝昆虫间的遗传距离(D)

Table 3 The genetic distances among five insects

	Bma	Bmo	Pcr	Ape	Aya
Bma	1.76				
Bmo	0.3760	183			
Pcr	0.6904	0.7488	231		
Ape	0.6313	0.6232	0.6320	231	
Aya	0.6897	0.6804	0.7007	0.4707	230

对角线上数字为每个样本所检测到的 RAPD 标记数

The numbers on the diagonal line is the sums of the marks of RAPDs

Bma 野桑蚕 *Bombyx mandarina*; Bmo 家蚕 *Bombyx mori*;

Pcr 蓖麻蚕 *Philosamia Cynthia ricini*; Ape 柞蚕 *Antheraea pernyi*;

Aya 天蚕 *Antheraea yamama*.

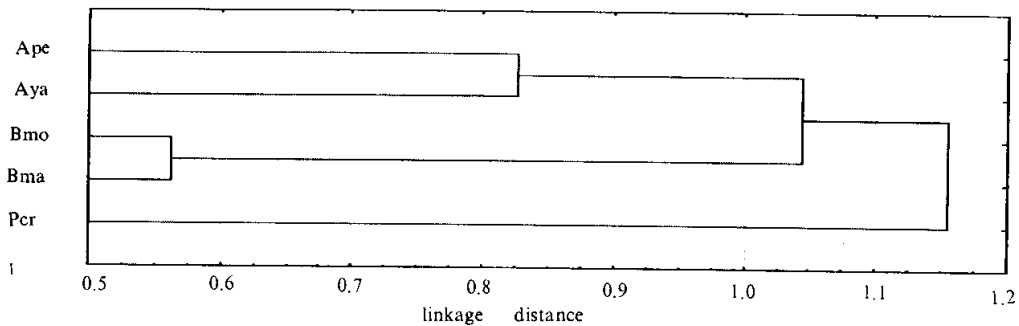


图 3 五种蚕丝昆虫 UPGMA 聚类分子树

Fig. 3 The dendrogram by UPGMA of five silk insects

参考文献(References):

- [1] 王斌,黄乃辉,魏洋,陈元霖.家蚕、蓖麻蚕、柞蚕和樟蚕酯酶同工酶遗传分析[J].厦门大学学报(自然科学版),1993,32(增刊1):46~53.
- [2] 王斌,黄乃辉,魏洋,陈元霖.家蚕、蓖麻蚕、柞蚕和樟蚕酸性磷酸酶同工酶遗传分析[J].厦门大学学报(自然科学版),1993,33(增刊1):40~45.
- [3] 王斌,陈元霖.家蚕酯酶同工酶及其应用研究中存在的问题[J].国外农学—蚕业,1994,4:8~11.
- [4] 陈元霖,李晓彤,曾寰,王泉升.家蚕、蓖麻蚕、柞蚕和樟蚕核型分析[J].厦门大学学报(自然科学版),1994,33(1):89~95.
- [5] 凌建华,陈元霖.蓖麻蚕蛹 mtDNA 的限制性内切图谱[J].厦门大学学报(自然科学版),1993,33(5):641~646.
- [6] 凌建华,王斌,陈元霖.家蚕蛹线粒体 DNA 限制酶图谱初步研究[J].厦门大学学报(自然科学版),33(增刊1):33~39.
- [7] 王斌,陈元霖.天蚕、柞蚕线粒体 DNA 限制酶切电泳图谱[J].蚕业科学,1995,21(2):111~113.
- [8] 陈元霖,桂慕燕,凌建华,王斌.绢丝昆虫线粒体 DNA 多态性研究[J].遗传,1997,9(增刊):43~45.
- [9] 刘春宇,陈元霖,桂慕燕,张春玲.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.
- [10] 张春玲,陈元霖,桂慕燕,刘春宇.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.
- [11] 翁宏飏,徐孟奎,张跃洲.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.
- [12] 夏庆友,周泽汤等.家蚕 *Y. N1* 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.
- [13] 夏庆友,周泽汤,鲁成,向仲怀.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.
- [14] 左正宏,桂慕燕,陈元霖,王学民. 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[J].遗传,2001,23(2):待发表.