

利用 RAPD 标记分析柞蚕品种资源的亲缘关系

刘彦群^{1,2}, 鲁成¹, 秦利³, 向仲怀¹

(¹西南大学蚕学与生物技术学院 / 农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716; ²南开大学生命科学学院, 天津 300071; ³沈阳农业大学生物科技学院, 沈阳 110161)

摘要:【目的】从分子水平揭示柞蚕品种资源之间的遗传关系, 为柞蚕的育种及种质资源的利用提供依据。【方法】利用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术, 对来自中国 6 个主要柞蚕产区的 66 个品种 (系) 和 2 个朝鲜的品种的基因组 DNA 多态性进行分析。根据扩增结果计算单匹配相似系数, 用 Neighbor-Joining 法构建聚类图。【结果】筛选出的 33 个随机引物对 68 个柞蚕品种 (系) 共扩增出 296 条 DNA 带, 其中多态性带 269 条 (90.88%)。品种间的成对遗传距离在 0.120~0.324 之间, 主要集中在 0.200~0.300 之间, 有 99.05% 的品种对的遗传距离小于 0.300。聚类分析表明, 供试的 68 个柞蚕品种 (系) 聚为 6 个类群, 并表现出按目前所在地域 (产地) 聚类的特性。【结论】柞蚕品种资源之间的遗传差异较小, 并且遗传聚类与其目前的地理分布有密切相关性。

关键词: 柞蚕; 品种; RAPD; 遗传关系

Genetic Relationships of *Antheraea pernyi* Cultivars Based on RAPD Markers

LIU Yan-qun^{1,2}, LU Cheng¹, QIN Li³, XIANG Zhong-huai¹

(¹The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716;

²College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071; ³Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: 【Objective】 This work analyzed the genetic relationships of oak silkworm cultivars, *Antheraea pernyi*, in the molecular level, and further obtained the helpful information for breeding and germplasm evaluation. 【Method】 The genomic DNA polymorphism of 68 *A. pernyi* cultivars were analyzed with RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) techniques. The simple matching coefficients were calculated, and the Neighbor-Joining method was used to construct the dendrogram. 【Result】 A total of 296 DNA fragments were amplified with 33 primers selected from 68 cultivars of *A. pernyi*, 269 of which (90.88%) were polymorphic. The value of pairwise genetic distance ranged from 0.120 to 0.324, and most of them were in the range of 0.200 to 0.300. There were 99.05% of the cultivar pairs with pairwise genetic distance less than 0.300. The *A. pernyi* cultivars used were divided into six genetic groups, and the cluster results appeared to associate with the present raising area. 【Conclusion】 In general, there was great genetic similarity among *A. pernyi* cultivar resources, and the cultivar groupings were closely related to their geographic distribution.

Key words: Oak silkworm (*Antheraea pernyi*); Cultivar; RAPD; Genetic relationship

0 引言

【本研究的重要意义】柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 属于大蚕蛾科 (saturniidae) 的一种著名的绢丝昆虫, 是我国重要的一种生物资源。据历史文献记载, 放养

柞蚕起源于中国的山东省鲁中南地区^[1~3]。中国对野生柞蚕茧的利用有着悠久的历史, 并在明末清初开始进行人工放养、选种。传播到各地后经过较长期的人工选择培育、杂交以及自然选择等作用, 逐渐形成了具有不同生理、遗传特性和区域适应性的柞蚕品种资源。

收稿日期: 2005-07-07; 接受日期: 2006-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30170719) 和教育部重点项目 (02427)

作者简介: 刘彦群 (1973-), 男, 山西绛县人, 讲师, 博士, 研究方向为绢丝昆虫的遗传资源与分子生物学。E-mail: liuyqlyp@yahoo.com.cn。通讯作者鲁成 (1957-), 男, 重庆人, 教授, 博士, 研究方向为家蚕遗传育种。Tel: 023-68250346; E-mail: lucheng@swau.edu.cn

据统计, 目前中国共保存有 100 多个柞蚕品种^[2], 分布在辽宁、山东、河南和贵州等 10 多个省区。研究这些品种资源之间的遗传差异、系统分类等, 不但是柞蚕品种资源鉴定、保护和利用的依据, 也是品种培育、推广和杂交亲本选配的理论基础, 其意义重大。【前人研究进展】在柞蚕品种资源的利用上, 目前流行的分类体系是根据幼虫 5 龄期的体色进行划分的, 包括 4 个系统: 青黄蚕系统、黄蚕系统、蓝蚕系统、白蚕系统^[2,3]。RAPD (random amplified polymorphic DNA)^[4]是昆虫(包括家蚕等绢丝昆虫)中检测种一级水平基因组多态性行之有效的分子标记技术^[5-9], 当处理遗传差异较小的材料(如种内的品种间)时, RAPD 能提供更为详细的信息, 目前已广泛应用于绢丝昆虫的系统进化^[10-12]、遗传多样性检测^[13-16]、品种间的亲缘关系分析^[17]等研究。关于柞蚕 RAPD 标记的研究, 桂慕燕等^[17]分析了 5 个柞蚕品种的遗传差异, 宋宪军等^[18]对 8 个生产用品种的遗传差异进行了研究。【本研究的切入点】在笔者的前期研究中, 对 4 个柞蚕品种 DNA 多态性进行了检测, 发现柞蚕品种存在有丰富的 DNA 多态性, 品种内个体间的遗传距离明显小于不同品种个体间的遗传距离^[19]; 对全部 4 种体色的 13 个品种的遗传关系进行了分析, 初步发现品种的遗传聚类与体色之间的相关性并不大^[20]。【拟解决的关键问题】本研究利用前期研究^[19,20]建立的柞蚕 RAPD 标记分析技术, 对来自 6 个主要柞蚕产区的 68 个柞蚕品种(系)的遗传背景进行了分析, 以期从分子水平揭示它们之间的遗传关系, 为柞蚕的育种及种质资源的利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试柞蚕品种(系)的来源及特性见表 1。所收集的 68 个柞蚕品种(系)包括中国 6 个主要柞蚕产区的 66 个品种(系)和 2 个朝鲜的品种。作为外群对照的天蚕(*Antheraea yamamai*)由河南云阳蚕业试验场提供, 编号为 69; 家蚕(*Bombyx mori*)品种为 C₁₀₈, 由西南大学家蚕基因库提供, 编号为 70。

1.2 基因组 DNA 的提取

模板 DNA 制备参照夏庆友等^[10]的方法, 具体见刘彦群等^[19]。每个品种随机取 4 个个体(蛹、或幼虫、或卵)提取基因组 DNA, 等量混合组成品种基因池用于 PCR 扩增。

1.3 PCR 体系及扩增程序

25 μl 的 PCR 反应体系中, 含 1 U Taq 酶(Promega 公司)、10 \times Buffer 2.5 μl 、25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂ 2.0 μl 、dNTP (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μl 、Primer (Operon 公司、0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μl 、基因组 DNA 1 μl (约 30 ng)。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90s, 35 个循环后接 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

为提高 RAPD 的特异性、稳定性, 在前期的试验基础上将退火温度升为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 扩增在 GeneAmp 9600 扩增仪上进行。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳分离, EB 染色后在 Bio-Rad 凝胶成像系统上成像。

1.4 数据分析

对每一引物而言, 在特定位置出现扩增带记为“1”, 未出现扩增带记为“0”, 以此计算单匹配相似系数。公式为 $SM = (a+d) / (a+b+c+d)$, 其中 a 为两品种(系)均为 1 的条数, d 为两品种(系)均为 0 的条数, b、c 为两品种错配的条数。遗传距离 $D = 1 - SM$ 。分析软件采用 TreeconW^[21], Neighbor-Joining 法构建系统聚类图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

用差异较大的 3 个品种(101、青黄 1 号、方山黄)对 Operon 公司的 C、H、I、R、W、Y 组的 120 个引物进行了初步筛选, 选用 DNA 条带清晰、多态性较高的引物进一步对 68 个不同产地、化性、体色系统的柞蚕品种(系)及 2 个外群对照的基因池 DNA 进行 PCR 扩增。33 个 10 bp 引物共得到 364 条清晰的 DNA 带型, 其中 360 条呈多态性, 占总带数的 98.90% (表 2)。每个引物扩增 DNA 带在 5~17 条之间, 平均 11 条。

68 个柞蚕品种(系)共扩增出 296 条 DNA 带, 只有 27 条共有带, 多态性带占 90.88%。平均每个引物扩增 9 条带, 最少的为 4 条, 最多的为 16 条。

33 个引物在家蚕中共扩增出 142 条 DNA 带, 在天蚕中扩增出 121 条带。柞蚕中扩增带数最少的为“33”, 有 104 条; 最多的是“青绿”, 为 171 条带, 平均每个品种(系)扩增出 144.5 条带, 大多数品种(系)在 130~160 条之间。

在供试的 68 个柞蚕品种(系)中, 只有 9 个品种(系)产生了品种特有带, 分别是方山黄 2 号-902、青 6 号、扎兰 1 号、多丝 4 号、青黄 1 号、101、125、胶蓝、扎兰 2 号, 仅占供试品种(系)的 12.68%。

2.2 品种(系)间的遗传距离分析

表 1 供试柞蚕品种的来源及特性

Table 1 Origin and feature of the *A. pernyi* cultivars used in this study

编号 No.	品种/品系 Cultivar/strain	系统 Line	化性 Voltinism	产地 Source	编号 No.	品种/品系 Cultivar/strain	系统 Line	化性 Voltinism	产地 Source
1	101	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	35	扎兰 1 号 Zhalan No.1	青黄蚕 Qinghuang	2	内蒙古 NM
2	102	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	36	青绿 Qinglu	青黄蚕 Qinghuang	2	内蒙古 NM
3	103	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	37	黑蛾 Hei'e	青黄蚕 Qinghuang	2	内蒙古 NM
4	104	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	38	扎兰 3 号 Zhalan No.3	青黄蚕 Qinghuang	2	内蒙古 NM
5	125	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	39	扎兰 2 号 Zhalan No.2	青黄蚕 Qinghuang	2	内蒙古 NM
6	128	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	40	豫早 1 号 Yuzao No.1	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
7	130	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	41	豫 101 Yu 101	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
8	133	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ	42	豫早 2 号 Yuzao No.2	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
9	黄安东 Huang'andong	青黄蚕 Qinghuang	2	山东方山 Fangshan,SD	43	河 41 He 41	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
10	方山黄 Fangshanhuang	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	44	33	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
11	方山黄 2 号-901 Fanghuang No.2-901	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	45	豫早 3 号 Yuzao No.3	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
12	方山黄 2 号-902 Fanghuang No.2-902	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	46	小黄皮 Xiaohuangpi	青黄蚕 Qinghuang	2	吉林永吉 Yongji,JL
13	789-5	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	47	吉黄 1 化 Jihuang 1 hua	黄蚕 Huang	1	吉林永吉 Yongji,JL
14	789-10	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	48	定州 1 号 Dingzhou No.1	青黄蚕 Qinghuang	2	朝鲜 Korea
15	烟 6-3 Yan 6-3	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	49	64	青黄蚕 Qinghuang	2	朝鲜 Korea
16	烟 6-4 Yan 6-4	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	50	小杏黄 Xiaoxinghuang	黄蚕 Huang	2	吉林永吉 Yongji,JL
17	方山黄 1 号-A Fanghuang No.1-A	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	51	清河 1 号 Qinghe No.1	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
18	方山黄 1 号-B Fanghuang No.1-B	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	52	豫 6 号 Yu No.6	黄蚕 Huang	1	河南云阳 Yunyang,HN
19	鲁红 Luhong	黄蚕 Huang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	53	6406	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ
20	杏黄 Xinghuang	黄蚕 Huang	2	山东方山 Fangshan,SD	54	三里丝 Sanlisi	黄蚕 Huang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
21	胶蓝 Jiaolan	蓝蚕 Lan	2	山东方山 Fangshan,SD	55	辽青 Liaoqing	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
22	青 6 号 Qing No.6	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	56	白茧 825 Baijian825	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
23	青皮 Qingpi	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	57	701	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
24	松黄 Songhuang	黄蚕 Huang	1	辽宁凤城 Fengcheng,LN	58	辽柞 1 号 Liaozuo No.1	黄蚕 Huang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
25	白茧 1 号 Baijian No.1	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	59	柞早 1 号 Zuozao No.1	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
26	882	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	60	371	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
27	水青 Shuiqing	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	61	抗病 2 号 Kangbing No.2	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
28	小白蚕 Xiaobaican	白蚕 Bai	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	62	79-4	黄蚕 Huang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ
29	鲁黄 Luhuang	黄蚕 Huang	1	辽宁凤城 Fengcheng,LN	63	78-3	青黄蚕 Qinghuang	1	贵州遵义 Zunyi, GZ
30	海青 Haiqing	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	64	多丝 3 号 Duosi No.3	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
31	四青 Siqing	青黄蚕 Qinghuang	1	辽宁凤城 Fengcheng,LN	65	多丝 4 号 Duosi No.4	黄蚕 Huang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN
32	宽青 Kuanqing	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	66	多丝 2 号 Duosi No.2	青黄蚕 Qinghuang	2	吉林永吉 Yongji,JL
33	青黄 1 号 Qinghuang No.1	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	67	沈农青蚕 Shennong qing	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁沈阳 Shenyang,LN
34	多丝 786 Duosi 786	青黄蚕 Qinghuang	2	辽宁凤城 Fengcheng,LN	68	沈黄 1 号 Shenhuang No.1	黄蚕 Huang	2	辽宁沈阳 Shenyang,LN

GZ, Guizhou; SD, Shandong; LN, Liaoning; NM, Neimenggu; HN, Henan; JL, Jilin

表 2 33 个 RAPD 引物的扩增结果

Table 2 Amplification results of 33 RAPD primers selected

引物 Primer	扩增带数 Amplified bands	多态性带 Polymorphic bands	引物 Primer	扩增带数 Amplified bands	多态性带 Polymorphic bands	引物 Primer	扩增带数 Amplified bands	多态性带 Polymorphic bands
C11	7	6	I11	8	7	W07	11	11
C15	6	6	I12	11	11	W08	14	14
H03	13	13	I17	9	9	W09	14	13
H04	11	10	I18	7	7	W11	15	15
H05	15	15	I20	11	11	W13	13	13
H07	17	16	R02	10	10	W15	12	11
H08	12	12	R07	7	7	W16	17	17
H09	9	9	R12	13	13	W18	10	10
H12	9	9	R16	13	12	W19	13	13
H15	14	14	W03	10	10	Y01	9	9
I07	9	9	W05	10	10	Y09	5	5
						Total	364	360

柞蚕品种（系）间的成对遗传距离的变化范围为 0.120~0.324。最小的是方山黄 2 号-901 与方山黄，遗传距离为 0.120；最大的是多丝 3 号与 101，遗传距离也仅为 0.324。遗传关系最近的两个品种间，有高达 88% 的相似性；而遗传差异最大的两个品种间，仍有 67.6% 的相似性。

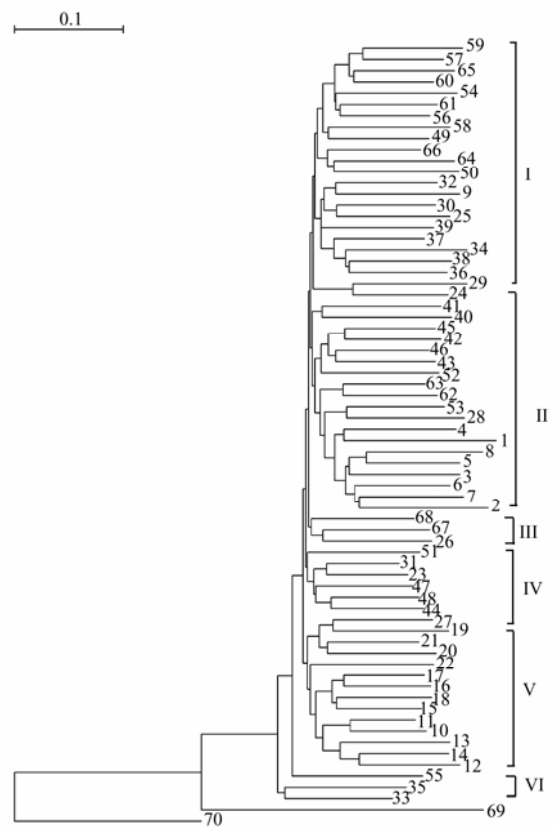
对品种间成对遗传距离的分布进行了统计，结果表明柞蚕品种间的成对遗传距离主要集中在 0.200~0.300 之间，该范围内的品种对占总品种对数的 80.97%，遗传距离小于 0.200 的品种对占 18.09%，而遗传距离大于 0.300 的品种对仅占 0.95%。

2.3 聚类分析

根据品种（系）间的成对遗传距离矩阵（数据略），用 Neighbor-Joining 法构建的 68 个柞蚕品种（系）和 2 个外群对照的聚类结果见图。根据聚类结果可将 68 个柞蚕品种（系）划分为 6 个类群：

第 I 类分为 3 个亚类：第 I-1 亚类包括 12 个品种，其中辽宁 2 化性品种 9 个、吉林 2 化性品种 2 个、朝鲜 2 化性品种 1 个；第 I-2 类包括 9 个品种，为来源于辽宁、内蒙古、山东的 2 化性品种；第 I-3 类的 2 个品种，均为 2 化性地区辽宁选育的 1 化性黄蚕品种。

第 II 类分为 3 个亚类：第 II-1 类的 2 个品种均为河南的 1 化性品种；第 II-2 类包括 5 个品种，其中 4 个河南 1 化性品种、1 个吉林 2 化性品种；第 II-3 类包括 12 个品种，其中 11 个贵州 1 化性品种，1 个辽宁 2 化性品种。该类共包括 19 个品种，除 2 个 2 化性品种外，均为 1 化性品种。



编号同表 1：69 代表天蚕；70 代表家蚕
See table 1 for explanation of code; 69. *Antheraea yamamai*; 70. *Bombyx mori*

图 以 NJ 法构建的 68 个柞蚕品种（系）的聚类图
Fig. Dendrogram constructed for 68 cultivars (strains) of *A. pernyi* based on NJ methods

第 III 类包括 3 个品种,均为辽宁地区近几年选育的 2 化性品种。

第 IV 类共 6 个品种,其中包括 1 个河南的 1 化性品种、2 个 2 化性地区(辽宁和吉林)选育的 1 化性品种、3 个分别来源于辽宁、吉林和朝鲜的 2 化性品种。

第 V 类共 14 个品种(系),均为 2 化性品种(系),其中 11 品种来源于个山东、3 个品种来源于辽宁。来源于辽宁的“水青”、“青 6 号”和“鲁红”均是由原始的农家种系统选择育成的。

第 VI 类仅有 3 个品种。其中的辽青和青黄 1 号来源于辽宁,而“扎兰 1 号”是从“青黄 1 号”选育出的。由于仅剩 3 个品种,本文将其归为 1 个类群。

3 讨论

3.1 柞蚕品种间的遗传差异

本研究用 33 个 10 bp 随机引物对 68 个柞蚕品种(系)进行了 RAPD 扩增,共得到 296 条 DNA 带,其中多态性带比率达到 90.88%,利用单匹配相似系数计算的品种(系)间的遗传距离在 0.120~0.324 之间。鲁成等^[12]进行野桑蚕和家蚕的分子系统学研究时分析了 5 个柞蚕品种的遗传差异,得到的品种间遗传距离为 0.142~0.180,其结果在本试验结果范围之内。而桂慕燕等^[17]的研究结果(0.066~0.1659)则较小,这可能是由于试验材料、计算方法不同而造成的。

本试验得到的品种间的最小遗传距离为 0.120,结果说明在柞蚕品种资源中存在着比较丰富的遗传变异。但是,品种间的最大遗传距离仅为 0.324,也表明柞蚕品种资源之间的亲缘关系非常接近。对品种间成对遗传距离的分析表明,有高达 99.05%的品种对的遗传距离在 0.120~0.300 之间,这一结果进一步从总体上表明了柞蚕品种资源之间的相似性程度较高,品种间的遗传差异较小。

3.2 柞蚕品种资源的地域性聚类

本研究对 68 个柞蚕品种(系)的聚类结果中,除极个别品种外,来源于河南、贵州、山东的品种均各自聚为一类,而地理位置相近的辽宁、吉林、内蒙古、朝鲜的品种也聚为相对集中的一类。这一结果表明柞蚕品种的聚类是按地域分布进行的,即柞蚕品种的遗传聚类与其目前的地理分布有密切相关性。

柞蚕是由野生柞蚕驯化而来的^[1-3],与柞蚕同为绢丝昆虫的家蚕(*B. mori*)是由野桑蚕(*B. mandarina*)驯化而成的^[10,12,13],这二者之间具有一定的可比性。

本研究通过 RAPD 分析得到的柞蚕品种的地域性聚类结果与家蚕品种的地理系统聚类结果^[10,12,13]比较相似。但必须指出的是,这种相似仅仅是表面上,二者之间有着巨大的差别,即柞蚕的绝大多数品种是按目前所在的地域聚类的,与品种的原始产地关系不明显;而家蚕却主要是按品种的原始产地聚类的,与品种的现保存地域无关。如“102”、“103”、“104”原是 1952~1953 年河南的品种引种到贵州经系统选育而来,经过近 50 年的自然和人工选择,即与贵州当地的品种首先聚在了一起。内蒙古的“青绿”是 1960 年以山东的“青绿”为材系统选育成的,“黑蛾”是 1979 年由辽宁的“青黄”选育而成,“扎兰 2 号”是 1961 年由“青黄 1 号×胶蓝”的后代选育的,“扎兰 3 号”是 1963 年从辽宁的“克青”系统选育而来,这 4 个品种在较低的聚类水平就首先聚在一起(图),也已经表现出一定程度的所在地域的特征。

对于柞蚕品种的按目前所在地域聚类的形成原因,笔者认为柞蚕是在野外放养的昆虫,其生长发育过程中受自然环境条件的影响甚大,并且自然环境条件对柞蚕的影响可能远大于其所受的人工选择的影响,在各地较强的自然选择压力下,品种在适应的过程中逐渐形成了某些地域性的特性,在聚类中即反映出地域性的特点。

3.3 柞蚕品种资源的系统分类

构建柞蚕品种的系统分类层次,对柞蚕品种资源的利用和指导育种实践具有重要的意义。柞蚕现行的品种分类系统是根据幼虫 5 龄期的体色进行划分的^[2,3],而本研究结果进一步证实了柞蚕品种的聚类与体色并没有一定的相关性^[20]。这一结果表明现行的体色分类系统属于人为的、直观的品种分类方法,与根据遗传基础上的品种分类存在着较大的偏差,有必要构建新的柞蚕品种的分类系统。

根据品种的化性也可将柞蚕品种资源划分为 1 化性和 2 化性两种类型^[3]。本研究中,如不考虑 4 个 2 化性地区选育的 1 化性品种,其余 64 个品种的聚类结果也表现出一定程度的化性集中性(除 2 化性的“小黄皮”、“小白蚕”聚在 1 化性品种中和 1 化性的“33”没有聚在 1 化性品种中外)。特殊的是,2 化性地区选育的 1 化性品种在聚类时并没有与 1 化性品种聚在一起,而是与 2 化性品种聚在一起,这一结果更反映了柞蚕品种聚类中的地域性特性。因此,依据化性进行柞蚕品种的分类是比较粗糙的,其不能将化性相同的品种的差异反映出来。

本研究利用 RAPD 标记对柞蚕品种资源的聚类分析中, 贵州和河南的品种首先聚在一起, 并组成一类; 内蒙古、吉林、朝鲜的品种在聚类时均与地理位置临近的辽宁的品种聚在一起, 组成相对集中的一类; 山东的品种聚为的一类, 这表明了柞蚕品种的聚类与所生存的生态环境是密切相关的。因此, 在构建柞蚕品种的系统分类层次时, 首先应该考虑品种的地域分布, 依据本次 RAPD 标记的研究结果, 可以初步将现有柞蚕品种资源大致划分为 3 个大的类群, 即山东类群、辽宁类群(包括辽宁、吉林、内蒙古和朝鲜的品种)和河南类群(包括河南和贵州的品种)。详细的柞蚕品种的系统分类层次的构建, 有必要结合形态分类和其它分子分类方法进行深入的研究, 为柞蚕品种资源的利用和品种改良提供科学依据。

4 结论

本文通过对超过现有品种半数的 68 个柞蚕品种(系)基因组 DNA 的多态性分析, 结果发现: (1) 柞蚕品种资源中存在着非常丰富的遗传多态性, 在得到的 296 条 DNA 带中多态性带达到 90.88%; (2) 从总体上讲, 柞蚕品种资源之间的遗传差异较小, 有 99.05% 的品种对的遗传距离小于 0.300; (3) 进一步证实了柞蚕品种的遗传聚类与体色并没有一定的相关性; (4) 68 个柞蚕品种(系)的遗传聚类与其目前所在地域有密切相关性。

致谢: 沈阳农业大学柞蚕研究室的王学英教授和张涛高级实验师、辽宁蚕业研究所的姜德富所长和杨宝山、河南蚕业实验场的褚金祥所长和朱绪伟、贵州蚕业研究所姜虹所长和罗朝宾、吉林蚕业研究所的靳向东、内蒙古蚕业研究所的洪恩众等单位和个人, 在本研究收集材料时均给予了很大的帮助。试验中还得到刘玲玲同学、柴春利同学的帮助。在此表示感谢!

References

- [1] 古开弼. 我国柞蚕业发展史考略. 农业考古, 1995, (3):206-214.
Gu K B. A review of phylogeny on tassah sericulture. *Agricultural Archaeology*, 1995, (3): 206-214.(in Chinese)
- [2] 辽宁省蚕业科学研究所 主编. 中国柞蚕品种志. 沈阳:辽宁科学技术出版社, 1995.
Sericultural Research Institute of Liaoning edit. *Annals of Chinese Tussahs*. Shenyang: Liaoning Technology Press, 1994. (in Chinese)
- [3] 秦利 主编. 中国柞蚕学. 北京:中国科学文化出版社, 2003.
Qin L. edit. *The Science of Antheraea pernyi*. Beijing: China Science and Culture Press, 2003. (in Chinese)
- [4] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531-6535.
- [5] Loxdale H D, Lushai G. Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 1998, 88:577-600.
- [6] Nagaraju J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*. *Current Science*, 2000, 78: 746-747.
- [7] Nagaraju J, Goldsmith M R. Silkworm genomics - progress and prospects. *Current Science*, 2002, 83:415-425.
- [8] 胡艳红, 迟德富. RAPD 技术在昆虫学研究中的进展. 应用生态学报, 2004, 15:1481-1486.
Hu Y H, Chi D F. Research advance in application of RAPD techniques in entomology. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15: 1481-1486. (in Chinese)
- [9] Kim K S, Sappington T W. Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13: 293-303.
- [10] 夏庆友, 周泽扬, 鲁成, 向仲怀. 家蚕不同地理品种分子系统学研究. 昆虫学报, 1998, 41(1): 32-40.
Xia Q Y, Zhou Z Y, Lu C, Xiang Z H. Molecular phylogenetic study on the racial differentiation of *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 1998, 41(1): 32-40. (in Chinese)
- [11] 余红仕, 鲁成, 周泽扬, 向仲怀. 中国野桑蚕 DNA 多态性研究初报. 蚕业科学, 2000, 26(2): 94-98.
Yu H S, Lu C, Zhou Z Y, Xiang Z H. A Preliminary study on DNA polymorphism of *Bombyx mandarina* M. in China. *Acta Sericologia Sinica*, 2000, 26(2):94-98. (in Chinese)
- [12] 鲁成, 余红仕, 向仲怀. 中国野桑蚕和家蚕的分子系统学研究. 中国农业科学, 2002, 35: 94-101.
Lu C, Yu H S, Xiang Z H. Molecular phylogenetic study on *Bombyx mori* and *B. mandarina*. *Scientia Agricultural Sinica*, 2002, 35: 94-101.(in Chinese)
- [13] 鲁成, 余红仕, 向仲怀. 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, 2002, 45(2):198-203.
Lu C, Yu H S, Xiang Z H. The genetic diversity and phylogenetic relationship of *Bombyx mandarina* and *B. mori* from China based on RAPD analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(2):198-203. (in Chinese)
- [14] 程道军, 鲁成, 周泽扬, 向仲怀. 几种绢丝昆虫遗传多样性的 RAPD 研究. 蚕业科学, 2002, 28: 277-282.
Chen D J, Lu C, Zhou Z Y, Xiang Z H. RAPD analysis on the

- phylogenetic relationship of several species of silk-spinning insects. *Acta Sericologia Sinica*, 2002, 28: 277-282.(in Chinese)
- [15] 刘玲玲, 潘敏慧, 代方银, 余红仕, 鲁成. 家蚕与中国野桑蚕的 RAPD 标记遗传多样性比较分析. 蚕业科学, 2004, 30: 237-241.
- Liu L L, Pan M H, Dai F Y, Yu H S, Lu C. Comparative analysis of genetic polymorphism of silkworm (*Bombyx mori*) and wild mulberry silkworm (*Bombyx mandarina*). *Acta Sericologia Sinica*, 2004, 30: 237-241.(in Chinese)
- [16] Pradeep A R, Chatterjee S N, Nair C V. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori*, revealed by RAPD and ISSR marker systems. *Journal of Applied Genetics*, 2005, 46: 291-298.
- [17] 桂慕燕, 左正宏, 王学民, 陈元霖. RAPD 分析在绢丝昆虫亲缘关系研究中的应用 II: 柞蚕品种间的遗传差异. 遗传, 2001, 23: 452-454.
- Gui M Y, Zuo Z H, Wang X M, Chen Y L. Application of RAPD technique in genetic relationship of silk insect II: genetic variance in *Antheraea pernyi*. *Hereditas*, 2001, 23: 452-454. (in Chinese)
- [18] 宋宪军, 聂磊, 张涛, 秦启联, 秦利. 柞蚕部分品种及杂交种的 RAPD 分析. 蚕业科学, 2004, 30: 428-431.
- Song X J, Nie L, Zhang T, Qin Q L, Qin L. RAPD analysis on a portion of *Antheraea pernyi*. *Acta Sericologia Sinica*, 2004, 30: 428-431. (in Chinese)
- [19] 刘彦群, 鲁成, 向仲怀. 中国柞蚕 DNA 多态性的 RAPD 分析. 蚕业科学, 2002, 28: 283-288.
- Liu Y Q, Lu C, Xiang Z H. RAPD Analysis of DNA Polymorphism of *Antheraea pernyi*. *Acta Sericologia Sinica*, 2002, 28: 283-288. (in Chinese)
- [20] 刘彦群, 鲁成, 向仲怀. 4 种体色柞蚕品种遗传关系的 RAPD 分析. 蚕业科学, 2006, 32(1):20-24.
- Liu Y Q, Lu C, Xiang Z H. Genetic relationships of *Antheraea pernyi* cultivars from four skin color based on RAPD markers. *Acta Sericologia Sinica*, 2006, 32(1):20-24. (in Chinese)
- [21] Van de Peer Y, De Wachter R. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. *Computer Application Bioscience*, 1994, 10:569-570.

(责任编辑 王红艳)