

5种白蚁基因组DNA随机扩增多态性研究

邢连喜¹, 苏晓红¹, 阴灵芳¹, 胡 萃², 程家安², 任东强³

(1. 西北大学 生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 浙江大学 城市昆虫研究中心, 浙江 杭州 310029; 3. 陕西省太白县林业局, 陕西 太白县 721600)

摘要:采用RAPD(Random amplified polymorphic DNA)技术对尖唇异白蚁(*Heterotermes aculabialis*)、黄肢散白蚁(*Reticulitermes flaviceps*)、扩头散白蚁(*R. ampliceps*)、细颚木鼻白蚁(*Stylotermes angustignathus*)和陇南树白蚁(*Glyptotermes longnanensis*)等5种白蚁的基因组DNA多态性进行了初步分析。在所用的20个随机引物中有4个引物能扩增出稳定的带型,5种白蚁6个群体共扩增出43条带,均为多态性片段;同一种类不同群体和同一群体不同品级间存在一定程度的多态性,但种间扩增片段差异显著大于种内差异。以UPGMA方法将扩增片段分布和共享度数据矩阵进行聚类分析,所得结果支持我国异白蚁属与散白蚁属合并的观点。

关键词:白蚁;基因组DNA;系统

中图分类号:Q969.29 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274X(2001)05-0445-03

RAPD技术是20世纪90年代发展起来的一项大分子多态检测技术,可用于扩增从低等到高等各类生物的DNA,并作为遗传标记用于研究种间亲缘关系和起源进化^[1]。由于该技术快速、简便、有效,对材料要求不高,在亲缘关系和系统进化研究方面具有广阔的应用前景。

本文采用RAPD技术对5种白蚁基因组DNA多态性进行了分析,以期探讨RAPD技术在白蚁分类中的应用前景和几种白蚁间的系统关系。

1 材料和方法

1.1 白蚁种类

尖唇异白蚁采自陕西省西安市和陕西省佛坪县,扩头散白蚁和黄肢散白蚁采自陕西省佛坪县,细颚木鼻白蚁和陇南树白蚁采自甘肃省文县。除陇南树白蚁属木白蚁科外,其余4种白蚁均属鼻白蚁科。

1.2 基因组DNA提取、PCR扩增及电泳

取白蚁8~20头于解剖镜下剔除其体表的螨类及腹部,以免螨及后肠原生动植物污染。参照王文等^[2]

的改进方法提取并纯化DNA,置4℃备用。

随机引物为Advanced Biotechnologies公司生产。扩增反应参照王义权等^[3]的方法。扩增产物用1.5%琼脂糖电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下拍照。

1.3 数据处理

依据文献[4]的公式 $F = 2N_{12} / (N_1 + N_2)$ 计算种间的随机扩增多态DNA片段共享度,其中 N_{12} 为两物种的共有片段数, N_1 和 N_2 分别为物种X和物种Y的扩增片段数, F 为片段共享度。将多态片段数据矩阵和片段共享度数据矩阵用非加权对群法(UPGMA)构建分子聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及扩增结果

用20个随机引物(序列号为AB1-01~20)进行扫描扩增发现,AB1-02,03,09,13,16,17,20等7个引物不能对5种白蚁基因组DNA进行扩增,AB1-04,05,06,07,08,11,14,15,19等9个引物仅对扩头散白蚁基因组DNA扩增,产生扩增片段,但重复

收稿日期:1999-01-10

基金项目:陕西省教育厅专项基金资助项目(99JK121)

作者简介:邢连喜(1965-),男,陕西西安人,西北大学讲师,博士,主要从事城市昆虫学研究。

性较差, AB1-06 和 07 两个引物可对陇南树白蚁基因组 DNA 扩增出少量不稳定带。AB1-01, 10, 12, 18 等 4 个引物(序列依次为 5'GTTTCGCTCC 3', 5'CTGCTGGGAC 3', 5'CCTTGACGCA 3', 5'CCACAGCAGT 3')能对 5 种白蚁(6 个群体)基因组 DNA 扩增出特定的带型, 重复性很好。4 个引物对 6 个白蚁群体共扩增出 43 个片段, 其大小在 250~2570 bp 之间。

为了比较同种不同品级间有无差异, 用 AB1-01, 10, 12 和 18 等 4 个引物扩增了同一尖唇异白蚁群体中工蚁、兵蚁、雌长翅蚁和雄长翅蚁的基因组 DNA, 电泳后共得到 22 条带。其种内差异远小于种间差异。

2.2 种间的扩增片段区分

RAPD 扩增产物具有物种特异性。4 种引物扩增的 13 个片段中, 5 个种分别独有片段占 30.3%, 2 个种共有的片段占 27.9%, 3 个种共有的片段占 23.2%, 1 个种共有的片段占 18.0%, 没有 5 个种共有的片段, 而 2 个尖唇异白蚁不同地理群之间的共有片段数占 65%。统计 4 种引物对 5 种白蚁基因组 DNA 扩增产物中的特有片段发现, 每种白蚁有 1~11 个鉴别片段(见表 1)。用这些鉴别片段很容易从电泳图谱上区分不同种类。

表 1 5 种白蚁的鉴别片段

Tab. 1 The most discriminatory fragments of the 5 termite species

蚁种	引物/鉴别片段 bp
黄肢散白蚁	AB1-10/870, AB1-12/960, AB1-12/1620
扩头散白蚁	AB1-01/620
尖唇异白蚁	AB1-10/910, AB1-10/1110, AB1-10/2240
细颧木鼻白蚁	AB1-01/1170, AB1-10/620, AB1-10/1280, AB1-10/1580
陇南树白蚁	AB1-12/2650, AB1-18/880

2.3 种间片段共享度和分子聚类图

物种间的共有片段是进化中比较保守的 DNA 序列扩增的结果, 其种属间共有片段的多少可以用于确定种属间亲缘关系的远近。种间亲缘关系越近, 基因组 DNA 的差异越小, 扩增产物的共有片段也越多。从表 2 片段共享度看, 散白蚁属两种间的共享度为 0.5652, 而异白蚁属种类与散白蚁属种类的共享度平均为 0.5962(0.4865~0.7059), 二者无显著性差异。二者无显著性差异。此两属与木鼻白蚁

属和树白蚁属间的共享度也无多大差异(分别为 0.2250 与 0.3041 和 0.3917 与 0.3936)。

表 2 5 种白蚁(6 个群体)RAPD 片段共享度

Tab. 2 The proportion of RAPD fragments shared among five termite species (6 colonies)

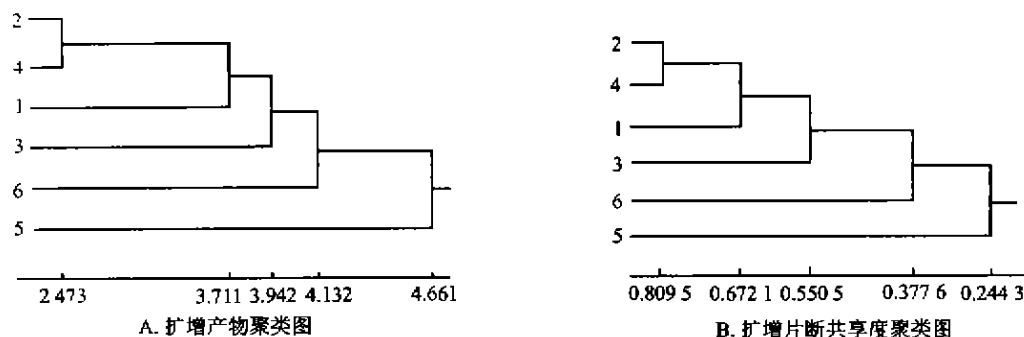
蚁种	A	B	C	D	E
B	0.5652				
C	0.6383	0.4865			
D	0.2500	0.2000	0.3226		
E	0.4500	0.3333	0.3871	0.2500	
F	0.7059	0.5854	0.8095	0.2857	0.4000

注: A 黄肢散白蚁; B 扩头散白蚁; C 尖唇异白蚁(西安); D 细颧木鼻白蚁; E 陇南树白蚁; F 尖唇异白蚁(佛坪)。

将扩增产物和片段共享度矩阵进行 UPGMA 聚类分析, 所得聚类图(见图 1)显示, 两个尖唇异白蚁不同居群先聚在一起, 然后与黄肢散白蚁相聚, 再与扩头散白蚁相聚。本实验所用 4 种引物扩增结果在科一级与现行分类系统略有差异, 即将属于鼻白蚁科的木鼻白蚁从鼻白蚁科中分了出来。这反映出木鼻白蚁与鼻白蚁科其他类群间亲缘关系较远(聚类图显示它比树白蚁与鼻白蚁科间亲缘关系还远)。印度学者 Chatterjee 等^[5]主张将鼻白蚁科的木鼻白蚁亚科提升为科, 得到了一些学者的认可, 本实验用 RAPD 技术分析的结果也支持将木鼻白蚁亚科分出提升为科的观点。

3 讨论

近年来, 将 RAPD 技术用于动植物品系和近缘种鉴定及系统进化研究等方面, 显示出它对未知基因序列的生物种类鉴定和物种亲缘关系探讨具有快速、简便和灵敏等优点^[6]。Black IV et al. 用 RAPD 技术以 4 种随机引物成功地区分了 4 种蚜虫^[4]; 王义权等用 RAPD 技术进行 6 种蛇的分类研究, 结果与染色体、颅骨和半阴茎形态特征分析结果基本一致^[3]。笔者将 RAPD 技术用于白蚁分类研究, 结果表明扩增片段在白蚁种内不同群体和同一群体不同品级间存在一定程度的多态性, 因此有必要对种内不同居群和不同品级间的变异程度进行研究。但是, RAPD 结果显示白蚁种间差异显著大于种内差异, 因此用 RAPD 技术对随机获得的白蚁标本进行种间比较分析是可行的。



1 黄肢散白蚁; 2 尖唇异白蚁(西安); 3 扩头散白蚁; 4 尖唇异白蚁(佛坪); 5 细颧木鼻白蚁; 6 陇南树白蚁。
图中标尺为距离系数。

图 1 5 种白蚁(6 个群体)随机扩增多态 DNA 聚类图

Fig. 1 The dendrograms based on RAPD fragments and proportions of shared fragments of five termite species(6 colonies)

关于异白蚁属在中国存在与否一直争议较多,我国学者历来持有两种观点,一是认为二者本身就是一属,不存在异白蚁属;二是认为异白蚁属存在,其与散白蚁属的区别为兵蚁上唇端透明部分尖锐。笔者通过多年饲养观察得知,尖唇异白蚁与黑胸散白蚁在生物学方面非常相似,其形态特征除兵蚁上唇透明区尖锐外,其余从属一级很难区分。张方耀等通过分飞繁殖蚁翅面刻点的电镜分析也认为我国异白蚁属与散白蚁属间差异不明显^[7]。国外学者一般认为异白蚁属种类的分布限于热带地区,其长翅成

虫为黄褐色,翅边缘具纤毛,分飞时间为黄昏和晚上,而散白蚁属种类的分布可延伸到北半球较冷的地域,其长翅成虫为黑褐色,翅边缘不具纤毛,分飞时间为白天^[8]。散白蚁属和异白蚁属是两个近缘属,从我国现有种类的分布、电镜观察^[7]、线粒体 DNA 限制性片段长度多态分析^[9]、CO I 基因测序分析和后肠原生动动物区系分析^[10]以及翅的形态与分飞行为等方面看,我国异白蚁与散白蚁种类都无明显差异,结合 RAPD 分析结果^[11],我们认为将我国异白蚁属与散白蚁属合并应该更合理一些。

参考文献:

- [1] WILLIAMS J K, KUBELIK A R. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18(22): 6 531-6 535.
- [2] 王文, 兰宏, 宿兵, 等. 云南 4 个少数民族的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 科学通报, 1994, 39: 1 900-1 903.
- [3] 王义权, 周开亚, 秦树臻. 用 RAPD 标记检测 6 种蛇基因组 DNA 多态性[J]. 动物学报, 1996, 42(2): 172-181.
- [4] NEI M, LI W H. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci, USA 1979, 74: 5 269-5 273.
- [5] CHATTERJEE P N & THANKUR M L. Sarvaritermes faveolus gen. et sp. nov. from Kulu valley (Punjab, India) (Isoptera), with a discussion on the systematic position and relationship of the family stylotermitidae [J]. Zool Anz, 1964, 173(2): 149-162.
- [6] BLACK IV W C, DUTEAU N M, PUTERKA G J et al. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction(RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids(Homoptera: Aphididae) [J]. Bull Entomol Res, 1992, 82: 151-159.
- [7] 张方耀, 李参, 高其康. 8 种散白蚁和一种异白蚁翅面微刻点的扫描电镜观察[J]. 动物分类学报, 1994, 19(1): 113-118.
- [8] SCHEFFRAHN, R H. SU, N. A new subterranean termite introduced to Florida: Heterotermes Froggatt (Rhinotermitidae: Heterotermitinae) established in Miami [J]. Florida Entomologist, 1995, 78(4): 623-627.
- [9] 朱本忠, 范寿祥, 束激玖. 中国等翅目昆虫名录 [J]. 白蚁科技, 1994, 11(1): 1-21.
- [10] 邢连喜, 胡萃, 程家安. 四种白蚁线粒体 DNA 限制性片段长度多态分析[J]. 昆虫分类学报, 1999, 21(3): 181-185.
- [11] XING L, MAEKAWA K, MIURA T, et al. A reexamination on the taxonomic position of Chinese *Heterotermes aculeatus* (Isoptera: Rhinotermitidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene [J]. Entomological Science, 2001, 4 (1): 53-58.

(编辑 徐象平)

(下转第 460 页)

参考文献:

- [1] BIGGS N L. The root of combinatorics[J]. *Historia Mathematica*, 1979, 6: 34-35.
- [2] 贝尔热 C. 组合学原理[M]. 陶懋欣译. 上海: 上海科学技术出版社, 1986. 5.
- [3] SMITH D E. *History of Mathematics*, Vol. 1 [M]. New York: Dover Publications, 1953. 597; 594.
- [4] 胡化凯. 五行说的数学论证[J]. *科学技术与辩证法*, 1995, (5): 38-42.
- [5] CHAKRAYARTI G. Growth and development of permutations and combinatorics in India[J]. *Bull Calcutta Math Soc.*, 1932, (24): 79-88.
- [6] 罗见今. Nim: 从古代的游戏到现代的数学[J]. *自然杂志*, 1986, 9(1): 63-67.
- [7] 胡著信. 魔方问题的历史渊源和现代发展[A]. 吴文俊. *中国数学史论文集(二)*[C]. 济南: 山东教育出版社, 1986. 56-63.

(编辑 姚 远)

Eastern origination of combinatorics

LIU Jian-jun

(Department of Mathematics, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: From ancient magic squares, old examples on permutation and combination, chess methods and games the study combines magic squares in the ancient east with that in ancient west and lists the thought and cases about permutation and combination, especially in ancient India, and some chess methods and games in the ancient East. Those methods and games contain some profound mathematical knowledge, pointing out that the combinatorial thought came from the ancient east. *Luoshu*, the oldest 3-magic square in the world, is the predecessor of modern configuration and design.

Key words: magic square; permutation and combination; combinatorics

(上接第 447 页)

Genomic DNA polymorphisms in five species of termites using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) MarkersXING Lian-xi¹, SU Xiao-hong¹, YIN Ling-fang¹,HU Cui², CHENG Jia-an², REN Dong-qiang³

1). College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069; 2. Urban Entomology Research Center, Zhejiang University, Hangzhou 310029; 3. The Administration of Forest, Taibai County, Shaanxi Province 721600)

Abstract: Genetic variation in five species of termites, *Reticulitermes flaviceps*, *R. ampliceps*, *Stylotermes angustignathus* and *Glyptotermes longnanensis* was detected using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Of the 20 arbitrary 10-base primers tested, 4 (20%) were informative and yielded 43 bands that were all polymorphic. Polymorphism was found in different populations of the same species and in different castes of one colony, but the difference of the amplified fragments in interspecies was significantly bigger than that of the intraspecies. The relationship indicated by the cluster analysis (unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA) suggested that *Heterotermes aculabialis* should be transferred to *Reticulitermes* as originally combined.

Key words: termites; genomic DNA; phylogeny