

6种瓢虫的 RAPD 分析及在分类上应用的研究

张迎春, 郑哲民

(陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要:利用随机引物分别对6种瓢虫的DNA进行了聚合酶链式反应(RAPD-PCR)的实验。结果显示,用相同引物扩增不同种瓢虫的基因组DNA,扩增产物多态性DNA片段的数目是不同的;两种不同引物的扩增产物中,各自呈现出种、属的特异性片段,其可用于种、属的鉴别;聚类图显示了种、属之间亲缘关系的远近程度,并与形态学分类结果相一致。实验分析还发现:七星瓢虫不同个体间多态性DNA特有带较多,遗传较稳定;龟纹瓢虫与之相比,不同个体间多态性DNA的特有带较少,变异程度较大。

关键词:鞘翅目;瓢虫;随机扩增多态性DNA;脱氧核糖核酸;分子系统学

中图分类号:Q969 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274X(2002)04-0409-04

瓢虫(lady beetles)是生物防治蚜虫、介壳虫等农、林害虫的天敌昆虫。对瓢虫的分类研究是进行生物防治的重要基础。近年来,分子生物学技术的迅速发展,为系统学鉴别和研究瓢虫提供了新的研究手段,使人们对昆虫这类生物体的认识从形态构造深入到核酸分子的水平^[1,2]。随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA,简称RAPD)就是一种逐渐应用于系统学研究的新技术。将RAPD技术用于昆虫的鉴别与比较,其采用了4种引物对4种蚜虫进行了RAPD反应,通过检测扩增产物的多态性可明确地区别4个种^[3]。近10年来,国内外利用RAPD技术研究昆虫遗传变异、分类进化的报道颇多,已涉及到同翅目、双翅目、直翅目、鳞翅目、鞘翅目等许多目、科,但对瓢虫科昆虫方面的研究尚不多见^[4]。为弥补这方面的不足,本文利用RAPD技术对6种瓢虫进行了分析研究,以探讨瓢虫科昆虫在DNA分子水平上的差异及在分类上的应用。

1 实验材料

实验用瓢虫个体均采用成虫,种类如下:

七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* Linnaeus,

拟九斑瓢虫 *Coccinella divaricata* Oliver, 横斑瓢虫 *Coccinella transversoguttata* Faldermann, 龟纹瓢虫 *propylaea japonica* (Thunberg), 多异瓢虫 *Hippodamia* (*Adonia*) *variegata* (Goeze), 中国双七瓢虫 *Coccinula sinensis* (Weise)

上述6种瓢虫于1997年采自陕西省,其中七星瓢虫、龟纹瓢虫采自西安郊区,中国双七瓢虫采自位于秦岭北坡的长安县山区,拟九斑瓢虫、横斑瓢虫和多异瓢虫采自位于秦岭南坡的宁陕县。

2 实验方法

2.1 基因组DNA提取

将每一虫体分别在1.5 mL Eppendorf管中用塑料研杆粉碎。然后用文献[5]的方法进行DNA提取。在提取DNA的过程中,为保证DNA的纯度,用氯仿:异戊醇(24:1)反复抽提3次,再经异丙醇沉淀,离心(11 000 r/min)15 min,70%乙醇洗涤、干燥。

2.2 RAPD反应体系及反应条件

每个反应体系的总体积为25 μ L,内含10 \times buffer [500 mmol KCl, 100 mmol Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mmol EDTA, 1 mmol DDT, 0.1 Triton-

收稿日期:2000-11-24

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(97SM10)

作者简介:张迎春(1956-),女,陕西西安人,陕西师范大学副教授,从事动物系统学研究。

X-100] 2.5 μ L, dNTP 0.15 mmol, $MgCl_2$ 1.5 mmol, 引物 20 ng, DNA 样品 25 ng, TaqDNA 聚合酶 2 μ L(上海 Sangon 公司出品), 无菌水 17.2 μ L, 并加石蜡油 30 μ L 覆盖, 以防止反应过程水分蒸发。反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}C$ 1 min 45 s, 变性 94 $^{\circ}C$ 30 s, 退火 37 $^{\circ}C$ 2 min, 延伸 72 $^{\circ}C$ 2 min。45 个循环之后, 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。反应在 PCR 微电脑基因扩增仪(美国 Thermolyne Amlitronll 型)上进行。

2.3 扩增产物

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V, 2 h, 紫外检测仪下观察并拍照。

2.4 数据统计及处理

采用性状数据分析法, 对照标准 marker, 将 6 种、36 只虫体的 RAPD 扩增结果进行统计。即将每一引物扩增所产生的 DNA 条带作为性状看待, 当在某一样品中有该带出现时编码为 1, 否则为 0, 构成二态性状数据表。输入计算机, 采用 SPSS 数据统计的系统聚类法进行聚类分析。

3 结果与分析

实验共使用了 75 个随机引物进行 RAPD 扩增, 其中出现 RAPD 多态性扩增带的引物为 60 个, 占实验所用引物的 80%。为避免一些弱带和相连带对研究分析中正确判读的干扰, 选择了出带清晰、重复性较好的两个引物对上述 6 个种类瓢虫的 DNA 进行了 RAPD 扩增。这两个引物的碱基序列为: S67 5'-GTCCCGACGA-3'; S92 5'-CAGCTCACGA-3'。两引物对 6 种瓢虫的扩增结果分别见图 1 和图 2



图 1 引物 S67 对 6 种瓢虫的扩增图

Fig.1 Amplified fragments of individuals from 6 species of lady beetles using Primer S67

1,2 拟九斑瓢虫 3,4 横斑瓢虫 5,6 七星瓢虫 7,8 中国双七瓢虫 9,10 多异瓢虫 11,12 龟纹瓢虫 13 Marker

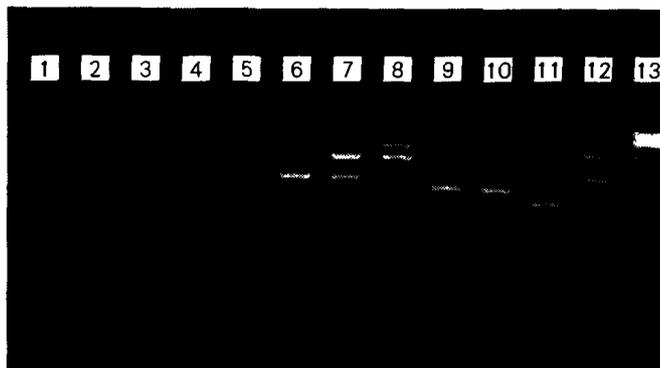


图 2 引物 S92 对 6 种瓢虫的扩增图

Fig.2 Amplified fragments of individuals from 6 species of lady beetles using primer S92

1,2 多异瓢虫 3,4 中国双七瓢虫 5,6 龟纹瓢虫 7,8 拟九斑瓢虫 9,10 横斑瓢虫 11,12 七星瓢虫 13 Marker

将上述瓢虫种类所有个体的 RAPD 扩增结果依据标准 Marker 进行统计, 编制成 0,1 资料输入计算机, 先得出每种所有个体相似性系数的平均值, 据此再用系统聚类法得出 6 个种的聚类图(图 3)。

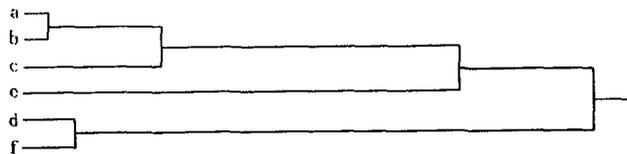


图 3 瓢虫 6 个种的聚类分析树状图

Fig.3 The dendrogram of clustering analysis in 6 species of lady beetles

a 拟九斑瓢虫 b 七星瓢虫 c 横斑瓢虫
d 多异瓢虫 e 龟纹瓢虫 f 中国双七瓢虫

上述实验结果的分析如下:

1) 6 个不同种类瓢虫的 RAPD 扩增结果均具有种、属的特异性片段(条带)。如: 引物 S67 的扩增结果显示拟九斑瓢虫所有个体均具有 1 904 bP 的 DNA 条带, 七星瓢虫所有个体均呈现的 DNA 条带为 1 904, 1 215, 947, 308 bP; 横斑瓢虫所有个体均呈现的 DNA 条带为 1 904, 1 322 bP; 龟纹瓢虫、多异瓢虫、中国双七瓢虫 3 个不同种所呈现的特异性条带分别为 870, 835, 657 bP。其中, 拟九斑瓢虫、七星瓢虫和横斑瓢虫形态相近, 同为一个属, 它们所有的个体均具有 1904 bP 的 DNA 条带。因此, 可将这一特异性条带视为 3 种瓢虫在引物 S67 扩增结果中所显示的属的特有带, 其余的特异性条带可视为种的特有带。引物 S92 的扩增结果显示, 拟九斑瓢虫、七星瓢虫、横斑瓢虫所有个体均具有 908 bP 的特异

性条带,所以可将其视为 3 种瓢虫在引物 S92 扩增结果中所显示的属的特有带、不同种的特有带分别为:七星瓢虫为 1 321,692,502 bP;拟九斑瓢虫 557 bP;横斑瓢虫 546 bP;龟纹瓢虫 657 bP;多异瓢虫 947 bP;中国双七瓢虫 1 210 bP。

在不同引物中,拟九斑瓢虫、七星瓢虫、横斑瓢虫都具属的特有带,说明它们在基因组 DNA 的组成上有着共同序列的部分,而龟纹瓢虫、中国双七瓢虫和多异瓢虫在扩增产物中没有相同大小的特异性条带,从 DNA 分子水平说明它们与瓢虫属之间存在着一一定的差异,这与形态分类结果也是相一致的。曾用 RAPD 技术,通过检测扩增产物的多态性,利用特有带的不同将实验室内混杂的不同地理来源的瓢虫种群予以明确区分^[4]。与之相比较,无论是区别不同地理种群,还是区别不同种属,利用 RAPD 扩增产物的多态性,通过特有带来区别虫体的差异所在,对阐明昆虫的分类、进化具有应用价值。所以,应将特有带视为一种带信息的生物分子序列,为系统学提供一种进行研究、比较的数据。

2) 聚类图的聚群结构显示了瓢虫种间亲缘关系的远近程度。本研究依据标准 Marker,在分析每一引物对所有实验个体扩增结果的基础上,将大量的 DNA 条带显示状况数值化,编制出二态性状数据表输入计算机,得出每一虫体的相似系数,以种内个体间相似系数的平均值为基础,得出种间聚类图。其中,拟九斑瓢虫与七星瓢虫最先相聚,显示了两个种极为相近的亲缘关系。这与两个种的瓢虫在形态上也具有体色和体形大小相似、斑点数目相近的特点相一致,而横斑瓢虫与拟九斑瓢虫和七星瓢虫相聚距离稍远,形态上也具有斑点、形状明显区别的特点。3 个种在图中相聚,显示了同为一属的亲缘关系。龟纹瓢虫、多异瓢虫和中国双七瓢虫分别为瓢虫科不同的属,它们依次与瓢虫属最终相聚,直观地显示了这几种瓢虫在科内有着共同的起源,相聚距离的差异说明了种属之间亲缘关系的远近程度。可见 RAPD 技术与数值分析相结合,可从 DNA 分子水平为 6 种瓢虫的分类地位提供新的证据。

参考文献:

- [1] 黄原. 分子系统学——原理、方法及应用[M]. 北京:中国农业出版社,1998. 42-193.
- [2] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIVAK K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6 513-6 535.
- [3] BLACKIV 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[J]. *Bull Entomol Res*, 1992, 82: 151-159.

3) 同一随机引物对不同瓢虫 DNA 扩增,其产物 DNA 片段有大小不同。RAPD 扩增结果与标准 Marker 相对比,个体之间、种类之间 DNA 条带的数目、大小均存在一定的差异,分子量在 1 995~293 bP 之间。这种差异可从核酸水平上证明不同个体、不同种间的差异,并且对进一步分析物种的多样性有着重要的意义。

在上述研究中,若统计样本数量少,无论是 DNA 条带的数目还是大小、个体差异与种类差异之间则较难区别。所以,实验样本数目一般应在 5 个以上,统计数据的可靠性才较有保证。

4) RAPD 扩增产物的比较,显示出瓢虫 DNA 分子变异的状况。将不同瓢虫 RAPD 扩增产物所具种的特有带的数目进行比较,可发现七星瓢虫种的特有带最多,两个引物的扩增结果中共有 8 条特有带;拟九斑瓢虫和横斑瓢虫次之,分别具有 3 条、4 条特有带;龟纹瓢虫、多异瓢虫及中国双七瓢虫种的特有带相对较少。从系统进化角度可以说明,七星瓢虫这个种的个体之间 DNA 特有带较多,其变异程度较小。从形态学上也可找到与此相应的证据,如七星瓢虫尽管在我国各地分布极广,但形态、大小、体色、鞘翅斑点基本稳定。与之相比,龟纹瓢虫种内个体间的特有带较少,说明其个体间的变异程度相对较大。形态学研究已经显示,龟纹瓢虫鞘翅色斑具有一定的变异。所以,从上述的对比情况可以看出,有可能在 RAPD 扩增产物中,种的特有带的多少与个体间遗传的稳定程度呈正比关系,而与个体间的差异呈反比关系。即种内特有带愈多,其个体间变异程度愈小,说明这个种的遗传就愈稳定。

瓢虫体态特征分化的根源和本质是 DNA 分子。上述的分析研究表明,瓢虫形态特征的分化与 DNA 碱基序列的分化基本一致。本研究通过 RAPD 扩增的多态性将形态学特征分类的科学性从 DNA 分子水平上得到了证实。显然,这项技术既可为昆虫形态分类提供有力的佐证,也可从理论和方法上丰富现代昆虫综合分类的内容。

- [4] ROEHRDANZ R L, FLANDERS R V. Detection of polymorphism in predatory coccinellids using polymersae Chain reaction and arbitrary primers (RAPD-PCR)[J]. *Entomophaga*, 1993, 38(4): 480-491.
- [5] BOYCE T M, ZWICK M E, AQUADO C F. Mitochondrial DNA the Pine weevil; size structure and heteroplasmy[J]. *Genetics*, 1989, 123: 825-836.

(编辑 徐象平)

RAPD analysis and its application to taxonomy of six species of lady beetles

ZHANG Ying-chun, ZHENG Zhe-min

(The School of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Six species of lady beetles were analyzed by Random amplified polymorphic DNA (RAPD). The result showed that the amplified products from the same primer in different species were different. The characteristic bands of each species and genus were found in amplified products from two primers, which are useful for identification of species and genus. The cluster analysis displayed that the relationship of species and genus coincided with morphological taxonomy. It was also found that there were more common bands in amplified products of different individuals in *Coccinella septempunctata*. So its heredity should be more stable. Compared with *Coccinella septempunctata*, there were less common bands in *Propylaea japonica*. So its variation should be more.

Key words: Coccinellidae; lady beetles; Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD); desoxyribose nucleic acid (DNA); molecular systematics

~~~~~  
(上接第 408 页)

- [5] SUTHERLAND I W, WIKINSON J F. Chemical extraction methods of microbial cell[J]. *Methods Microbiology*, 1971, 5B: 345-383.
- [6] FREDERICK C. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* [J]. *Cellular and molecular biology*, 1987, 1: 1-2.
- [7] WARD A L, DAWES E A. A disk assay for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate[J]. *Anal Biochem*, 1973, 52: 607-613.

(编辑 徐象平)

## A study of a new method of recovery of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate

PENG Ju-fang, DONG Zhao-ling

(College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** The recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Azotobacter chroococcum* strain G-3 is studied. The two methods of EDTA cooperated SDS and SDS alone in recovery process were compared. It was discovered that the former was more efficient. The effect of some factors on extraction was discussed, and optimization was carried out. When 30 g/L cells having the PHB content of 66% was treated with 10 g/L EDTA and 7 g/L SDS at 50°C, pH=9 for 15 min, PHB was recovered with purity of 98.75%.

**Key words:** Recovery; sodium dodecanesulphonate; ethylene diamine tetraacetic acid; *Azotobacter chroococcum* strain G-3; PHB