

# 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

桂慕燕,左正宏,王学民,陈元霖

(厦门大学生命科学学院,福建厦门 361005)

**摘要:**采用 RAPD 技术,对 5 个柞蚕品种的遗传差异进行比较研究。结果表明,所采用的 40 个随机引物中,有 27 个引物扩增谱带清晰且重复性较好,扩增总片段数 253 条,单个引物的扩增片段数在 4~16 之间,片段大小在 0.33~3.0 kb 之间。不同柞蚕品种间的遗传差异较小,遗传距离(D)在 0.066~0.1659 之间,根据 D 值,由 UPGMA 聚类分析软件绘制了它们的分子进化树。

**关键词:**柞蚕;RAPD;品种差异

中图分类号:S885.1

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2001)05-0452-03

## Application of RAPD Technique in Genetic Relationship of Silk Insect

### II. Genetic Variance in *Antheraea pernyi*

GUI Mu-yan, ZUO Zheng-hong, WANG Xue-min, CHEN Yuan-lin

(Dept. of Bio. Xiamen University, Xiamen, Fujian Province, 361005 China)

**Abstract:** Random amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to analyze the genetic diversity among *Antheraea pernyi*. The genetic variance of five *Antheraea pernyi* was studied. The result showed that, 27 of 40 arbitrary primers could amplify clear and repeating bands. A total of 253 fragments were obtained. Each primer gave 4-16 bands and the average was 9.7. The length of the band was 0.33-3.0kb. The D value between different breeds of *Antheraea pernyi* was 0.066-0.1659. The D value was used to construct a dendrogram by UPGMA.

**Key words:** *Antheraea pernyi*; RAPD; genetic variance

柞蚕(*Antheraea pernyi* Guerin)在分类学上分属天蚕蛾科(Saturniidae),是我国已开发的天然丝生产的三大蚕种之一。但有关蚕类的研究,绝大多数是针对家蚕的<sup>[1~3]</sup>,对非桑蚕的文献报道则较少见。因此,对柞蚕进行种群亲缘关系和遗传差异研究对生产和科研都具有重要意义。

本研究利用我们已建立的蚕类基因组 DNA 的 RAPD 检测技术<sup>[4~7]</sup>,对柞蚕不同品种的基因组

DNA 进行多态性分析,以作为种质资源保存、鉴定和利用的分子生物学依据,同时也为今后寻找柞蚕品种分子标记作前期工作。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

5 个品种的柞蚕蚕茧由山东蚕业研究所提供。其性状特征见表 1。

收稿日期:2000-09-22;修回日期:2000-11-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目部分内容(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.

表 1 柞蚕各品种的性状特性  
Table 1 the character and properties of five *Antheraea pernyi*

育种方法	育成时间	茧色	幼虫体色	蛹色	备注
方黄2 杂交育种	1993	深米黄	黄	栗色	丝量大
黄黄 引进选育	1958	深米黄	绿	栗色,少数棕黄色	原产辽宁
胶蓝 大田选育	1949	深米黄	蓝	栗色	稳定二化
蓝白 杂交育种	1989	深米黄	乳白	栗色	
鲁白 杂交育种	1994	灰白	淡黄	浅栗色	

## 1.2 基因组 DNA 的提取

蚕类基因组 DNA 的提取根据本实验室已建立和应用的方法<sup>[4]</sup>,取早期蚕蛹,在预冷的  $1 \times \text{SSC}$  中,捣碎匀浆,3000r/min 离心 15min,弃上清,用  $1 \times \text{SSC}$  反复漂洗沉淀,去除部分蛋白质及脂肪等杂质,直至上清液清澈。称取沉淀部分,按 1ml/g 加提取缓冲液,混匀后加入蛋白酶 K 至  $200 \mu\text{g/ml}$ ,  $50^\circ\text{C}$  消化 24 小时,加 5mol/L 的 KAc 至终浓度为 1.3mol/L,冰浴 20min,加等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 摇匀,8000r/min 离心 20min 去蛋白。取上相,以 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤并稍干后,溶于适量的 TE 缓冲液,再经 RNA 酶、蛋白酶 K 处理,酚:氯仿抽提,异丙醇沉淀,溶于 TE 中,  $-20^\circ\text{C}$  保存。样品经紫外检测和琼脂糖凝胶电泳检测, A260/A280 介于 1.72~1.83 之间,分子量在 50kb 以上。

## 1.3 PCR 反应

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 OPW-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 反应程序:  $94^\circ\text{C}$  变性 5s、 $36^\circ\text{C}$  复性 30s、 $72^\circ\text{C}$  延伸 60s,每个反应为 40 个循环,最后在  $72^\circ\text{C}$  延伸 5min。RAPD 产物经 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色后于多色荧光凝胶成像仪上成像及数据处理。

## 1.4 数据分析

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 DNA 片段的总数。根据遗传距离(D),利用 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean)<sup>[5]</sup> 聚类分析方法构建分子系统树。

## 2 结果与讨论

### 2.1 RAPD 扩增结果

我们采用了 40 个 10bp 的随机引物进行 PCR 扩增,每个引物都进行三次以上的重复实验,根据实验结果,对其中扩增谱带清晰、重复性较好的 27 个引物进行数据统计,其碱基序列及扩增结果见表 2。

表 2 RAPD 引物及其 PCR 扩增情况

引物	序列	RAPD		
		标记总数	RAPD 标 记可变数	多态 百分率(%)
OPI01	ACCTGGACAC	4	3	75
OPI02	GGAGGAGAGG	9	6	66.67
OPI03	CAGAAGCCCA	9	3	33.33
OPI06	AAGGCGGCAG	7	4	57.14
OPI07	CAGCGACAAG	13	7	53.85
OPI09	TGGAGAGCAG	7	3	42.86
OPI10	ACAACGCGAG	13	3	23.08
OPI11	ACATGCCGTG	8	4	50
OPI13	CTGGGGCAGA	16	11	68.75
OPI14	TGACGGCGGT	9	3	33.33
OPI19	AATGCGGGAG	15	10	66.67
OPI20	AAAGTGCGGC	13	4	30.77
OPW01	CTCAGTGTC	8	1	12.5
OPW03	GTCCGGAGTG	7	1	14.29
OPW05	GCGGATAAG	9	6	33.67
OPW06	AGGCCCGATC	6	0	0
OPW08	GACTGCCTCT	12	8	66.67
OPW09	GTGACCGAGT	10	6	60
OPW10	TGCGATCCCT	11	4	36.36
OPW11	CTGATGCGTG	8	4	50
OPW12	TGGGCGAAG	13	4	30.77
OPW13	CACAGCGAGC	9	3	33.33
OPW15	ACACCGGAAC	7	0	0
OPW16	CAGCTACCA	9	2	22.22
OPW17	GTCCTGGGTT	5	1	20
OPW18	TTCAGGGCAT	10	3	30
OPW19	CAAAGCGCTC	6	0	0
合计		253	104	

根据 27 个引物的扩增谱带进行分析,27 个引物扩增谱带总数为 253 条,每个引物的扩增所得的条带数平均为 9.4 条,变动范围在 4~16 之间。这些 DNA 片段的分子量在 330~3 000bp 之间。图 1 为引物 OPW11、OPW10 的电泳图谱。在各种实验条件稳定,采用同一 PCR 扩增仪时可获得重复性较好的结果。

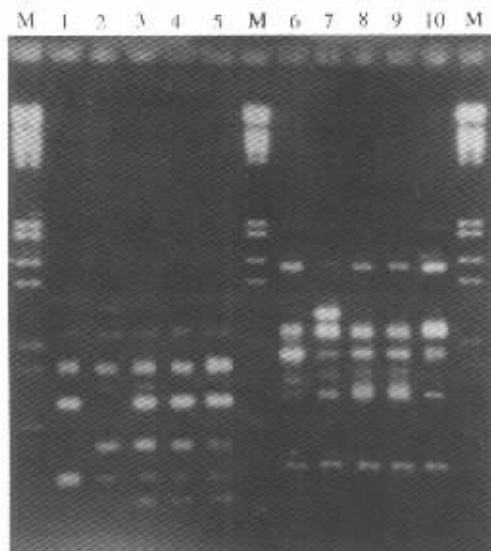


图1 引物 OPW11(1~5)、  
OPW10(6~10)的 RAPD 图谱

Fig.1 The RAPD pattern of Opw11(1~5)、  
OPW10(6~10)

1,4 鲁白(Lubai);2,7 莲白(Lianbai);  
3,8 胶蓝(Jiaolan);4,9 青黄(Qinghuang);  
5,10 方黄2(Fanghuang 2);M:λDNA-EcoRI/HindIII

## 2.2 品种间的遗传多态性和 UPGMA 聚类

五个柞蚕品种间的遗传距离( $D$ )见表3。根据  $D$  值,由 UPGMA 聚类分析软件绘制的分子进化树见图2。

表3 柞蚕品种间的遗传距离( $D$ )

Table 3 The genetic distances among *Antheraea pernyi*

	方黄2	青黄	胶蓝	莲白	鲁白
方黄2	220				
青黄	0.1023	210			
胶蓝	0.1106	0.0860	214		
莲白	0.1919	0.1859	0.1401	200	
鲁白	0.1002	0.1351	0.1489	0.1443	209

对角线上数字为每个品种的 RAPD 扩增总带数

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

结果表明,采用 27 个随机引物对 5 个柞蚕品种进行检测,总共获得 253 个扩增片段,其中共享性片段 149 个,占总数的 59.3%,多态率在 50% 以上的有 8 个引物,多态率为 0 的有 3 个引物,其他引物的多态率在 12%—43% 之间,表明品种间的随机扩增 DNA 多态性较低。5 个品种相互间的  $D$  值在 0.066~0.1659 之间,这与蓖麻蚕品种间的遗传差异相近<sup>[17]</sup>,反映了柞蚕和蓖麻蚕品种间的分化程度低于家蚕地理品种的分化程度<sup>[3]</sup>。

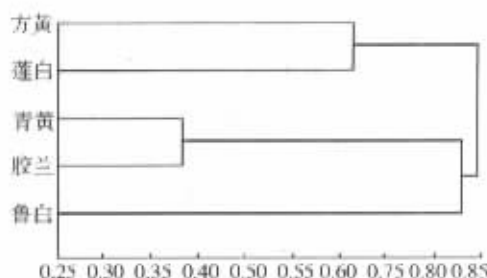


图2 柞蚕品种间 UPGMA 聚类分子树

Fig.2 The dendrogram by UPGMA  
of five *Antheraea pernyi*

## 参考文献(References):

- [1] 翁宏刚,徐孟奎,张耀洲. 家蚕的 RAPD 及其品种(系)间差[J]. 浙江农业大学学报,1996,22(2):152~156.
- [2] 夏庆友等. 家蚕 RAPD 的扩增条件、重复性及遗传模型研究[J]. 蚕业科学,1996,22(1):20~25.
- [3] 夏庆友,周泽扬,鲁成等. 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.
- [4] 刘春宇,陈元霖,桂慕燕,等. 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.
- [5] 桂慕燕,左正宏,陈元霖,等. 五种铜丝昆虫随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析[J]. 遗传,2001,23(1):25~28.
- [6] 张春玲,陈元霖,桂慕燕,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[J]. 遗传,1998,20(3):1~4.
- [7] 刘春宇,张春玲,陈元霖. 家蚕和蓖麻蚕的基因组 RAPD 检测[J]. 蚕业科学,1997,23(4):215~220.
- [8] 左正宏,桂慕燕,陈元霖,等. RAPD 分析在铜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):128~130.