

SCAR 分子标记方法检测家蚕品种和纯度的研究

唐斌^{1,2}, 徐世清¹, 戴璇颖¹, 陈息林¹, 司马杨虎¹, 王玉军¹, 吴阳春¹

(¹苏州大学生命科学学院, 苏州 215123, ²浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘要:【目的】家蚕 (*Bombyx mori* L.) 品种和纯度的鉴别, 普遍依靠幼虫斑纹或茧形等形态鉴别方法, 该方法易受环境影响, 结果时效性和准确性差。【方法】筛选 RAPD 随机引物, 稳定扩增出亲本品种的 DNA 特异性片段, 转换成 SCAR 标记。【结果】利用微量 DNA 抽提法, 从家蚕主要品种苏 5、苏 6 及其 F1 孵化前日卵快速提取单粒卵基因组 DNA, 筛选出 RAPD 随机引物 S42, 稳定扩增出苏 5 和苏 6 两个亲本品种的 DNA 特异性片段 R5 和 R6, 克隆和测序确认其大小分别为 255bp 和 343bp。Blastn 分析显示, R5 的 nt7~192 与家蚕的一个非长末端逆转录转座子 (AB002270.1) 的 nt183~368 片段碱基序列有高达 91% 的相似性, 无缺口序列。R6 的 nt5~340 与家蚕的一个 WGS (BAAB01113163.1) 的 nt675~337 有 91% 的一致性, 其中存在 13 个碱基的缺口序列。将 2 个亲本的 RAPD 标记转换成 SCAR 标记, 分别利用合成的 S42-255-2 (P5-2) 和 S42-343-2 (P6-2) SCAR 标记引物, 能够准确、快速地鉴别所标记的苏 5 和苏 6 及其 F1 蚕品种。【结论】SCAR 分子标记方法能够检测家蚕品种和纯度。

关键词: 家蚕; 分子标记; SCAR; 品种; 纯度

Study on the Method of SCAR to Identify the Variety and Purity of Silkworm, *Bombyx mori* L.

TANG Bin^{1,2}, XU Shi-qing¹, DAI Xuan-ying¹, CHEN Xi-lin¹, SIMA Yang-hu¹, WANG Yu-jun¹, WU Yang-chun¹

(¹School of Life Science, Suzhou University, Suzhou 215123; ²School of Life Science, Zhejiang Institute of Technology, Hangzhou 310018)

Abstract: 【Objective】The rule method to identify silkworm (*Bombyx mori*) variety and purity with morphological characters of larval pattern or cocoon shape is easily affected by environment. Thus, the prescription and accuracy are low. 【Method】Select the random primers by random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplify the specific bands of RAPD from two parental varieties, then transform the RAPD marks to sequence characterized amplified regions (SCAR) marks. 【Result】The genome DNA was extracted from single blue-stage-egg of mainly *Bombyx* varieties of SU5, SU6 and their F1 with rapid method. Each of the specific bands R5 and R6 of RAPD were amplified stably from SU5 and SU6 varieties, with selected random primer of S42. The sequences of bands R5 and R6 were 255 bp and 343 bp respectively after being cloned and sequenced. Then analyze the sequences by courtesy of database on-line. The results showed the nt 7-192 of R5 and the nt 183-368 of the non-LTR retrotransposon of *Bombyx mori* L1Bm DNA (AB002270.1) have 91% consistency, with no gap sequence (Gaps). Accordingly, the nt 5-340 of R6 and nt 675-337 of one of whole genome shotgun sequences (BAAB01113163.1| *Bombyx mori* DNA, contig491593) have 91% consistency, which include 13 gaps. Further, transform the RAPD marks of two parental varieties to SCAR marks. Thus, SU5, SU6 and their F1 were identified accurately and quickly, with the synthetic specific primers of S42-255-2 (P5-2) and S42-343-2 (P6-2). 【Conclusion】Molecular mark of SCAR can be used for identifying the variety and purity of silkworm, *Bombyx mori* L.

Key words: Silkworm (*Bombyx mori* L.); Molecular mark; SCAR (sequence characterized amplified regions); Variety; Purity

0 引言

【研究意义】家蚕 (*Bombyx mori* L.) 品种的真实

性和纯度鉴定是国家标准规定的蚕种质量主要检验项目。目前, 国家标准规定的鉴定方法是按照幼虫斑纹或蚕茧的形状等进行鉴定。由于家蚕纯种幼虫生命力

收稿日期: 2005-10-29; 接受日期: 2006-12-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30371086), 国家商务部茧丝绸风险基金重点项目 (2002-36), 江苏省科技攻关项目 (BE2005358)

作者简介: 唐斌 (1978-), 男, 江苏泰州人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为分子遗传和生物制药。通讯作者徐世清 (1963-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士生导师, 研究方向为发育遗传学。Tel: 0512-65880185; Fax: 0512-65110185; E-mail: szsqxu@suda.edu.cn

比一代杂交种差、死亡率高,而且绝大多数的生产用蚕品种,中系亲本为白蚕、日系亲本为花蚕,其一代杂交种也为花蚕,难以区分幼虫斑纹,杂交率检验结果存的准确性倍受质疑。养蚕生产季节性很强,目前的检验方法的校验结果往往在蚕种已经出售、并投入生产的后期才有检验结果,失去了种子质量检验需要的时效性。所以,生产方法存在准确性和时效性差的严重问题。【前人研究进展】家蚕品种的分子性状不受环境因素的影响,利用蚕品种遗传的 DNA 分子信息,可以在室内快速进行品种及纯度的鉴定^[1]。自 1990 年 Williams^[2]等人提出 DNA 的随机扩增片段多态性 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 技术,已有利用 RAPD 技术进行家蚕品种纯度(杂交率)检测的报道^[3-5]。RAPD 技术鉴定家蚕品种及纯度简单易行,但 RAPD 标记存在重复性较差的缺点,如能克服其稳定性不高的特点,将是有着很好前景的标记技术,而 SCAR 技术则为此提供了良好的契机。DNA 的特定序列扩增 (Sequence Characterized Amplified Regions, SCAR) 标记是 Paran 在 1993 年提出的一种分子标记方法^[6]。Mebtto 等^[7]在菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 中发展了与 J 基因连锁的 SCAR 标记, Garcia 等^[8]用 SCAR 技术在花生 (*Arachis hypogaea* L.) 中鉴定了连锁到抗线虫基因的 RAPD 与 RFLP 标记, Ohmori 等^[9]在番茄 (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) 中找到了与 Tm-1 连锁的 SCAR 标记。【本研究的切入点】由于动植物品种(种质资源)的 SCAR 标记很可能是该品种(种质资源)的特有性状基因片段, SCAR 标记过去主要用于分子标记辅助育种,即利用混合分组分析方法 (Bulk segregant analysis, BSA) 鉴定连锁到某一基因的 RAPD 标记,将其转换成 SCAR 标记。在育种时,利用其简单、易于操作的优点对大量的样本进行有效地筛选,避免工作的盲目性。王斌等^[10]成功地将一个玉米自交系的特异 RAPD 标记 (0.9 kb) 转换成了稳定的 SCAR 标记,并应用于检验种质资源和种子纯度。赵姝华等^[11]进一步将 SCAR 标记应用于玉米杂种纯度的检验。干滢等^[12]也成功地将一个油菜 (*Brassica napus*, L.) 杂交 F₁ 父母本的 RAPD 标记转换成了稳定的 SCAR 标记,应用于杂种纯度的检验。【拟解决的关键问题】以江苏省主要蚕品种苏 5、苏 6 为材料,建立其 RAPD 标记,进一步探讨利用 SCAR 标记技术快速、准确地检测家蚕品种纯度的方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

家蚕苏 5 与苏 6 品种及其一代杂交种蚕卵由江苏蚕种管理所为本试验特制,充分保证品种的纯正。并在产下后 20 h 用盐酸浸渍 (S.G. 1.075, 46℃, 5 min) 活化处理,然后自然光线孵化保护(催青) (25℃, R.H.75%~85%),发育至孵化前日 (Blue-stage-egg) 藏于-70℃备用。

灭菌超纯水、2.5 mmol·L⁻¹ dNTP、25 mmol·L⁻¹ MgCl₂、10×Buffer (100 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 8.0, 500 mmol·L⁻¹ KCl)、Taq DNA Polymerase、随机引物[S42 (5'-GGACCCAACC-3')、S43(5'-GTCGCCGTCA-3')、S56 (5'-AGGGCGTAAG-3')、S57 (5'-TTTCCCACGG-3')、S58 (5'-GAGAGCCAAC-3')、S76 (5'-CACACTCCAG-3')、S60 (5'-ACCCGGTCAC-3') 和 S79 (5'-GTTGCCAGCC-3')], 为 Sangon 产品。CaCl₂、pMD 18-T Vector、大肠杆菌、T4 DNA 连接酶等,为 TaKaRa 公司产品。

TC-100 型 PCR 仪 (美国 MJ Research, INC), DY-A 电泳仪 (上海西巴斯生物技术开发有限公司), D37520 离心机 (德国 Biofuge 公司), ZF-AZ 型紫外透射分析仪 (上海康乐光电仪器有限公司), U-3000 型紫外分光光度仪 (日本日立公司), D290- Kodak 数码照相机 (日本 Kodak 公司), MP200A 型电子天平 (上海精科太平公司)。

1.2 RAPD 多态性检测

参照唐斌等方法^[13]从家蚕单粒卵提取模板 DNA。使用相同的 DNA 模板和 PCR 反应体系,筛选出多态性较好的随机引物和 PCR 反应体系。反应总体积为 25 μl。其中 16.7 μl 灭菌双蒸水、1.8 μl 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂、2.5 μl 10×Buffer (100 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH 8.0, 500 mol·L⁻¹ KCl)、0.3 μl Taq DNA Polymerase (Sangon)、2 μl 12.5 mmol·L⁻¹ dNTP、2 μl 随机引物、20 ng 模板。94℃预变性 3 min, 94℃ 45 s, 38℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s, 35 个循环后接 72℃ 10 min。产物在 1.2%琼脂糖凝胶中电泳 1 h,经溴化乙锭 (EB) 染色后在紫外灯下观察拍照。

1.3 特异性片段的回收、连接、转化和测序

将 PCR 扩增后电泳鉴定的 RAPD 特征 DNA 片段转移至低熔点胶,割下移入 Eppendorf 管,加 1/2 体积超纯水,65℃水浴 2~4 min 融化胶。37℃水浴,加入等体积同温度平衡酚,混匀后 4℃ 保持 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清加入酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提变性蛋白。加等体积正丁醇后再次抽提后

的上清液加 2 倍体积冰乙醇和 1/10 体积的 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc 溶液, -20°C 过夜, 回收沉淀。 4°C , $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃液相晾干, 70% 冷酒精洗涤, 适量超纯水溶液稀释, -20°C 保存。

采用 TaKaRa 公司的 pMD 18-T Vector, *EcoR* V 酶切连接, 按试剂盒说明书克隆回收 RAPD 特异性片段。连接反应总体积 $10 \mu\text{l}$: $1 \mu\text{l}$ $10\times$ Buffer, $0.5 \mu\text{l}$ 质粒 DNA, $4 \mu\text{l}$ 纯化 DNA 溶液, $1 \mu\text{l}$ T4 DNA 连接酶, $3.5 \mu\text{l}$ 超纯水, 18°C 连接过夜。

受体菌选用 TG1 菌株, IPTG 和 X-Gal 诱导并蓝白斑筛选, 挑取白斑用 LB 液体培养基 37°C 培养过夜。小量法抽提质粒 DNA, 根据 pMD 18-T Vector 载体的多克隆位点酶切图谱, 选择 *EcoR* I、*Hind* III 酶切验证。酶切反应体系总体积为 $10 \mu\text{l}$ (H_2O $7 \mu\text{l}$ 、 $10\times$ Buffer $1 \mu\text{l}$ 、DNA $1 \mu\text{l}$ 、*EcoR* I $0.5 \mu\text{l}$ 、*Hind* III $0.5 \mu\text{l}$), 37°C 保温 3 h。

委托上海博亚生物工程有限公司测序。采用 ABI 测序系统 Version (1.02) 完成, 测序正反向引物分别为 M13 Forward/Reverse Sequencing Primer (引物序列: GGACCCAACC)。

1.4 SCAR 方法检测

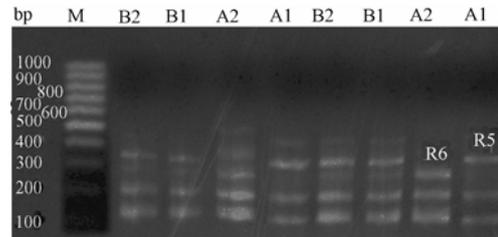
SCAR 引物设计依据原 RAPD 引物序列及测得序列设计, 优化工作由 Primer Designer 完成。依据引物设计原则, 在特异片段的两端除随机引物的 10 个碱基外再延长 12~17 bp。利用设计引物对该蚕品种的 DNA 模板进行 SCAR 扩增, 扩增条件为: 预变性 94°C 3 min, 94°C 45 s; 退火 45 s, 72°C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 然后 72°C 10 min, 反应结束后, 4°C 保存。

2 结果与分析

2.1 家蚕苏 5、苏 6 品种 RAPD 特征 DNA 片段

从多个随机引物中筛选出多态性较好的随机引物 S42。为防止操作误差, 使用两组样本获得的 DNA 模

板, 同时进行 PCR 扩增。图 1 是随机引物 S42 对 2 组 DNA 模板的 PCR 扩增结果, 苏 5、苏 6 家蚕品种各有一条特异性的条带 R5 (约 260 bp) 和 R6 (约 340 bp), 可以彼此区分, 而其 F_1 都出现了这两条条带。经过 3 次以上的重复, 结果稳定。回收 R5、R6 片段, 克隆入 pMD 18-T Vector, 通过蓝白斑初步筛选出目的克隆, 酶切鉴定其片段大小与 R5、R6 一致。



M: 标准分子量标记; A1、A2、B1、B2: 家蚕品种苏 5、苏 6、苏 5 \times 苏 6、苏 6 \times 苏 5

M. DNA marker; A1,A2, B1 and B2. *Bombyx* variety SU5, SU6 and their F_1 SU5 \times SU6,SU6 \times SU5

图 1 引物 S42 获得的家蚕苏 5、苏 6 品种及其 F_1 的 RAPD 特征性片段

Fig. 1 The RAPD specific fragment from *Bombyx* variety SU5, SU6 and their F_1 by primer S42

2.2 家蚕苏 5、苏 6 品种 RAPD 特征片段的碱基序列

将家蚕苏 5、苏 6 品种的特异性 RAPD 标记 R5 和 R6 进行测序, 结果分别如图 2 和图 3。由于各品种两条引物序列全部在片段的 5'端出现, 表明所测序列为电泳获得的各品种的 RAPD 特征性片段。苏 5 品种的 RAPD 特征 DNA 片段 R5 长 255bp, 苏 6 品种的 R6 片段长 343 bp。

在家蚕基因组数据库中用 blastn 程序检索, 发现苏 5 品种的 RAPD 特异性 DNA 片段 R5 的 nt7~192

```

GGACCCAACC GGAGTGTGTC TAACACTGGC CCTACCAAGC GCAGTGCTTC 50
GCAAAATCTA TCACCGGATC GGAAGCGCGA CCCACTGAGA AGATCCGGCG 100
AGAAACTCAG TGGTCTGTGT CTATGGGTTA ATTTACTTGT CAAGCCCTTC 150
GTCACAAGCG ACGGGTTCGG CGAGGACGGT GACCGGTGCT TGAGGTATCC 200
GTGAACTTGG AAGTATACGT CCTTATAACA GGTGATCGAG AAAGG GGTTC 250
GGTCC 255

```

□内为引物序列, ■内为底物与引物互补的序列。图 3 注相同 □. Primer sequence; ■Complementary primer sequence; The note is same in Fig. 3

图 2 家蚕苏 5 品种 RAPD 特征片段 (R5) 的碱基序列

Fig. 2 The sequence of RAPD specific fragment (R5) from silkworm variety SU5

```

GGACCCAACC CGGTTGTAAG CACCCGAAAT TTGATTTGAC ACCGATCCTT 50
TTGGGCAGCC CATATGAAA CAGACTATGA AGTTTAAGTG TAAGTCAGGC 100
GTTCGAGTGT GGTGCTTAA GAATCCGGTA GGCCAGACCC AATGGTGCAG 150
GAACTATTCT GACTGCTGTA CCAAGGTAC AGGTTTCGAT CCCACACTG 200
CCAAAGATCA TGTGATGAAG AAGTCTGTTT GTCCTTCCT TGTCCGGATG 250
TTTAAGATT ATACATGTAT CACCTGAACG TATTTAAGAC GTAAATATA 300
CCGTCTCTAG TACCCATATT ATAGGAATC CCCGGTGGG TCC 343

```

图3 家蚕苏6品种 RAPD 特征片段 (R6) 的碱基序列
 Fig. 3 The sequence of RAPD specific fragment (R6) from silkworm variety SU6

与家蚕的一种非长末端逆转录转座子 (AB002270.1, *Bombyx mori* L1Bm DNA, non-LTR retrotransposon) 的 nt 183~368 片段碱基序列有高达 91% 的同源性, 无缺口序列 (Gap sequence) (图 4)。相同方法寻找与 R6 同源的家蚕 DNA 序列, 发现 R6 的 nt5~340 与

一个家蚕 WGS(BAAB01113163.1, *Bombyx mori* DNA, whole genome shotgun sequence) 的 nt675~337 有 91% 的一致性, 其中存在 13 个缺口序列, 位点在 R6 的 nt 35~39、259、260 和 292, WGS 的 nt 607~605、602、600 和 597 (图 5)。通过 Vector NT1 软件程序检测, R6

R5	7	AACCGGAG	G	TTGCTAACAC	TG	CCCTA	C	AAGCGCAGTG	CTTCGCA	AA	TCTA	CACCGG	66						
Non-LTR retrotransposon	183	AACCGGAG	G	TTGCTAACAC	TG	CCCTA	C	AAGCGCAGTG	CTTCGCA	AA	TCTA	CACCGG	242						
R5	67	G	TCGGAA	C	GCGACCCACT	GAGAAGAT	C	GGCGAGAAAC	TCAGTGG	CT	GTGTCTATGG	126							
Non-LTR retrotransposon	243	G	TCGGAA	C	GCGACCCACT	GAGAAGAT	C	GGCGAGAAAC	TCAGTGG	CT	GTGTCTATGG	302							
R5	127	GTTAATTT	A	C	T	GTC	A	AGCC	CTTCGTC	A	CA	AGCGACGGGT	TCG	C	G	GAGGA	CGGTGACCGG	186	
Non-LTR retrotransposon	303	GTTAATTT	G	C	T	GTC	G	AGCC	CTTCGTC	G	CA	AGCGACGGGT	TCG	A	C	G	GAGGA	CGGTGACCGG	362
R5	187	TGCTTG											192						
Non-LTR retrotransposon	363	TGCTTG											368						

和 分别代表不同碱基和缺口位点。 Difference base; Gap sequence; The note is same in Fig. 5

图4 苏5蚕品种的 RAPD 标记 (R5) 与家蚕非长末端逆转录转座子 (AB002270.1) 的同源性比较

Fig. 4 Homology of the RAPD mark R5 sequence from Su variety and a non-LTR retrotransposon of *Bombyx mori* (AB002270.1)

R6	5	CCAACCCGGT	TGTAAGCACC	CGAAATTTG	A	TTTGA	CACCGATCCT	TTTGGGCAGC	59										
WGS (BAAB01113163.1)	675	CCAACCCGGT	TGTAAGCACC	CGAAATTTG	T	GCAT	TTTGA	CACCGATCCT	TTTGGGCAGC	616									
R6	60	CCATATGAAA	ACA	GACTA	TG	A	AGTT	AAGT	GTAAGT	C	AGG	CGTT	C	G	A	GTG	TGTTGCTTA	119	
WGS (BAAB01113163.1)	615	CCATATGAAA	ACA	TTG	A	T	GTT	AAGT	GTAAGT	T	AGG	CGTT	G	G	G	GTG	TGTTGCTTA	561	
R6	120	AGAATCC	G	GT	AGGCCAGAC	C	A	ATGGTGCA	GGAA	C	TATTC	TGACTGCTGT	ACCAAGGGTA	179					
WGS (BAAB01113163.1)	560	AGAATCC	A	GT	AGGCCAGAC	T	C	ATGGTGCA	GGAA	T	TATTC	TGACTGCTGT	ACCAAGGGTA	501					
R6	180	CAGGTTTCGA	TCCCA	A	ACT	GCCAAAGATC	ATGTGATGAA	G	AAGTCTGTT	TGCTCCTCC	239								
WGS (BAAB01113163.1)	500	CAGGTTTCGA	TCCCA	T	ACT	GCCAAAGATC	ATGTGATGAA	C	AAGTCTGTT	TGCTCCTCC	441								
R6	240	TTGTCCGGAT	GTTTA	A	AGA	TTTATACA	T	G	TATC	A	CCTGA	ACGTATTTAA	G	A	C	GTA	A	AT	296
WGS (BAAB01113163.1)	440	TTGTCCGGAT	GTTTA	A	AG	TTTATACA	C	G	TATC	C	CCTGA	ACGTATTTAA	G	A	C	GTA	C	AT	381
R6	297	ATAACC	T	TCT	CTAGTACCCA	TATTATAGGG	AATCCCCGGT	TGGG	340										
WGS (BAAB01113163.1)	380	ATAACC	T	TCT	CTAGTACCCA	TATTATAGGG	AATCCCCGGT	TGGG	337										

图5 苏6蚕品种的 RAPD 标记 (R6) 与家蚕 WGS (BAAB01113163.1) 序列的同源性比较

Fig. 5 Homology of the RAPD mark R6 from SU6 variety and a whole genome shotgun sequence of *Bombyx mori*(BAAB01113163.1)

很可能不是一个功能基因, 但可确认是家蚕 DNA 片段。

2.3 苏 5、苏 6 蚕品种 SCAR 标记检测结果

按照 SCAR 引物设计的原则, 从 S42 随机引物的

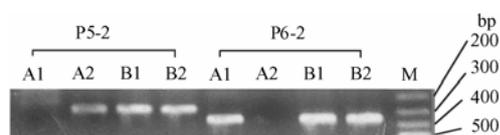
10 个碱基开始, 依照碱基互补的规律和已测序的各品种序列沿 3'端延伸 11~15 个碱基, 作为各品种的 SCAR 标记引物 (表)。

表 SCAR 标记引物序列

Table Primer sequence of SCAR mark

SCAR 标记 SCAR mark	SCAR 标记引物 Primers of SCAR mark	SCAR 标记引物序列 Sequence of SCAR primers
R5	S42-255-1 (P5-1)	FP: 5'AACCGGAGTGTGCTAACACTGGC3'
	S42-255-2 (P5-2)	RP: 5'GGACCCAACCGGAGTGTGCTAACAA3'
	S42-343-1 (P6-1)	FP: 5'CCAACCCCTTTCTCGATCACCTGT3'
	S42-343-2 (P6-2)	RP: 5'GGACCCAACCCCTTTCTCGATCACCC3'
R6	S42-343-1 (P6-1)	FP: 5'TTTGATTTGACACCGATCCTTTTG3'
	S42-343-2 (P6-2)	RP: 5'GGACCCAACCCGGTTGTAAGCACCC3'
	S42-343-2 (P6-2)	FP: 5'CCAACCGGGGATTCCCTATAATAT3'
	S42-343-2 (P6-2)	RP: 5'GGACCCAACCGGGGATTCCCTATAA3'

理论上 F_1 应该具备双亲的主要基因, 或者说 F_1 应该具备双亲的特征标记 DNA。本试验使用引物 S42-255-1 (P5-1) 和 S42-343-1 (P6-1) 扩增苏 5、苏 6 品种及其一代杂交种的基因组 DNA 模板时, 没有获得品种特异性的检测结果。进一步使用引物 S42-255-2 (P5-2) 和 S42-343-2 (P6-2) 扩增苏 5、苏 6 品种及其一代杂交种的基因组 DNA 模板, 并比较了 48℃、53℃、62℃和 72℃几种不同的退火温度, 结果采用 72℃较高的退火温度, 获得了特异性较高的检测结果。苏 6 品种及其一代杂交种用 SCAR 标记特异引物 P6-2 扩增出了 340 bp 左右的一条片段, 苏 5 品种没有扩增出任何片段; 苏 5 品种及其一代杂交种用 SCAR 标记特异引物 P5-2 扩增出了 250 bp 左右的一条片段, 苏 6 品种没有扩增出任何片段; 所以, 利用 P5-2 和 P6-2 可以有效地辨别苏 5 和苏 6 品种及其 F_1 (图 6)。



P5-2、P6-2: 苏 5、苏 6 品种 SCAR 引物; M: DNA 分子量标记; A1、A2、B1、B2: 家蚕品种苏 5、苏 6、苏 5×苏 6、苏 6×苏 5
P5-2, P6-2. SCAR specific primers for *Bombyx* variety SU5 and SU6; M. DNA marker; A1, A2, B1 and B2. *Bombyx* variety SU5, SU6 and their F_1 SU5×SU6, SU6×SU5

图 6 SCAR 特异引物 P5-2 和 P6-2 的 PCR 扩增效果

Fig. 6 Results of PCR analysis with SCAR specific primers of P5-2 and P6-2

3 讨论

家蚕品种的纯度指蚕种与标签 (标记) 品种在特征、特性方面一致的程度, 即该品种的卵数占所测样本总数的百分率。对于一代杂交种, 为指定杂交方式一代杂交种的卵数占所测样本总卵数的百分率, 即指定杂交方式的杂交率。目前, 国内外蚕业生产主要依靠形态检验判别品种和纯度, 结果存在准确性和时效性差的问题; RAPD 技术鉴定家蚕品种及纯度虽然简单易行^[5], 但存在重复性较差的缺点, SCAR 标记能够克服 RAPD 标记的这一缺点。目前, 国内外还没有利用 SCAR 标记进行家蚕品种和纯度检验的报告。本实验将筛选出的 RAPD 标记转化为 SCAR 分子标记, 成功利用于鉴定家蚕苏 5、苏 6 品种与纯度, 对其它实用蚕品种的 SCAR 分子标记建立、和最终应用 SCAR 分子标记鉴定家蚕品种和纯度提供了参考; 该方法可以用于防止家蚕品种混杂或假冒品种进入销售流通领域, 也为家蚕新品种审定和保护育成品种的知识产权提供了一种方法。今后, 首先需要建立更多家蚕品种的 SCAR 标记, 同时需要建立双 SCAR 引物的检测方法, 并寻求通过一次反应而不经电泳来区分亲本品种和 F_1 杂交种, 进一步减少反应时间和检测成本。

4 结论

利用微量 DNA 抽提法, 从主要家蚕品种苏 5、苏 6 及其 F_1 孵化前日卵快速提取单粒卵基因组 DNA, 筛选出 RAPD 随机引物 S42, 稳定扩增出苏 5 和苏 6 两

个亲本品种的 DNA 特异性片段 R5 和 R6, 克隆和测序确认, 大小分别为 255 bp 和 343 bp。R5 的 nt 7~192 与家蚕的一个非长末端逆转录转座子 (AB002270.1) 的 nt 183~368 片段碱基序列有高达 91% 的相似性, 无缺口序列。R6 的 nt 5~340 与家蚕的一个 WGS (BAAB01113163.1) 的 nt 675~337 有 91% 的一致性, 其中存在 13 个碱基的缺口序列。将 2 个亲本的 RAPD 标记 R5 和 R6 转换成 SCAR 标记, SCAR 标记引物 S42-255-2 (P5-2) 和 S42-343-2 (P6-2), 能够准确、快速地鉴别所标记的苏 5 和苏 6 及其 F₁ 蚕品种。SCAR 分子标记方法能够检测家蚕品种和纯度。

References

- [1] 徐世清, 唐 斌, 司马扬虎, 戴璇颖, 裔洪根. 家蚕品种真实性和纯度鉴定方法研究. *江苏蚕业*, 2002, 24(4): 1-7.
- Xu S Q, Tang B, Sima Y H, Dai X Y, Yi H G. Research on methods of silkworm eggs identification of variety and purity. *Jiangsu Canye*, 2002, 24(4): 1-7. (in Chinese)
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Licak K J, Livak J A, Rafalshi, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18:6531-6535.
- [3] 廖富蕓, 林健荣, 莫红丽, 余爱群, 文哲光. RAPD 分子标记技术应用家蚕品种纯度检验的研究. *湖北农业科学*, 2002, (3): 56-58.
- Liao F P, Lin J R, Mo H L, Yu A Q, Wen Z G. Study on the purity detection of mulberry silkworm (*Bombyx mori*) varieties by applying the RAPD molecular technique. *Hubei Agricultural Sciences*, 2002, (3):56-58.(in Chinese)
- [4] 钟伯雄, 张金卫, 丁 农, 陶金亚, 陆云翀. RAPD 技术在家蚕杂交率检验中的应用. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2003, 29: 321- 324.
- Zhong B X, Zhang J W, Ding N, Tao J Y, Lu Y C. Purity determination on silkworm hybrid rate using RAPD technique. *Journal of Zhejiang University(Agric. & Life Sci.)*, 2003, 29: 321-324. (in Chinese)
- [5] 徐世清, 陈息林, 戴璇颖, 司马扬虎, 王玉军, 吴阳春, 朱端红, 唐 斌. DNA 分子标记检测家蚕黄海、苏春品种和纯度的研究. *江苏蚕业*, 2005, 27(3): 4-9.
- Xu S Q, Chen X L, Dai X, Sima Y H, Wang Y J, Wu Y C, Zhu D H, Tang B. Study on the identification method of *Bombyx* variety and purity of Huanghai and Suchun with DNA molecular marker. *Jiangsu Canye*, 2005, 27(3): 4-9. (in Chinese)
- [6] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85:985-993.
- [7] Meletto M, Afannador L, Kelly J D. Development of a SCAR marker linked to the J gene in common bean. *Genome*, 1996, 39: 1216-1219.
- [8] Garcia G M, Stalker H T, Shroeder E, Kochert G. Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis aypogaea*. *Genome*, 1996, 39: 836-845.
- [9] Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 151-156.
- [10] 王 斌, 张超良, 翁曼丽, 高红玉, 金德敏, 孙致良, 孙世孟. 玉米自交系 8112 特异 SCAR 标记的获得. *高技术通讯*, 1999, (3): 45-47.
- Wang B, Zhang C L, Weng M L, Gao H Y, Jin D M, Sun Z L, Sun S M. Conversion of RAPD marker to SCAR marker of maize inbred line. *Chinese High Technology Letters*, 1999, (3):45-47. (in Chinese)
- [11] 赵姝华, 李 莹, 王 鹤, 李冬梅, 张俊涛. 利用分子标记技术检测玉米杂种纯度研究. *生物技术*, 2003, 13(5): 19-21.
- Zhao S H, Li Y Y, Wang H, Li D M, Zhang J T. Study of maize hybrids seed purity test using molecular markers. *Biotechnology*, 2003, 13(5):19-21. (in Chinese)
- [12] 干 滢, 曾凡亚, 赵 云, 王茂林. 杂交油菜“蜀杂 6 号”特异序列扩增标记(SCAR) 建立及其在杂种鉴定中的应用. *作物学报*, 2001, 27: 722-728.
- Gan Y, Zeng F Y, Zhao Y, Wang M L. Development of SCAR markers to authenticate the hybrid seed lots of Shuza No. 6 (*Brassica napus* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27: 722-728. (in Chinese)
- [13] 唐 斌, 戴璇颖, 徐世清, 徐运东. 家蚕单粒卵 DNA 的快速制备方法研究. *江苏蚕业*, 2003, 25(1): 11-13.
- Tan B, Dai X Y, Xu S Q, Xu Y D. Study on the preparation method of DNA from single silkworm egg. *Jiangsu Canye*, 2003, 25(1): 11-13.(in Chinese)

(责任编辑 王红艳)