

## 利用 SSR 标记进行家蚕部分品种资源的指纹图谱分析

侯成香<sup>1</sup>, 李木旺<sup>1</sup>, 张月华<sup>1</sup>, 钱荷英<sup>1</sup>, 孙平江<sup>1</sup>, 徐安英<sup>1</sup>, 苗雪霞<sup>2</sup>, 郭秋红<sup>2</sup>, 相辉<sup>2</sup>, 黄勇平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018; <sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

**摘要:** 【目的】通过构建家蚕品种资源的指纹图谱, 研究品种间的亲缘关系。【方法】用 35 个 SSR 标记研究 96 个家蚕品种资源的指纹图谱。【结果】这些 SSR 标记在家蚕品种间表现出丰富的多态性, 等位基因数量在 3~28 个, 平均为 12.77 个, 多态性指数 (PIC) 在 0.299~0.919, 平均 0.71。根据各品种的指纹图谱, 用 Nei (1978) 的方法计算了各品种间的遗传距离, 最大为 0.1983, 最小为 0.0641, 并用 UPGMA 方法进行了聚类, 得到的分子系统图与传统意义上的形态分类方法接近但存在一些微小的差异。根据遗传分析结果, 探讨了家蚕的起源与进化关系。【结论】SSR 标记是适于进行品种资源的指纹图谱分析和分子标记辅助育种的一种标记, 可在家蚕核心种质资源库的构建中发挥主要作用。

**关键词:** 家蚕; 品种资源; SSR 标记; 指纹图谱

## Analysis of SSR Fingerprints in Part of the Silkworm Germplasm Resources

HOU Cheng-xiang<sup>1</sup>, LI Mu-wang<sup>1</sup>, ZHANG Yue-hua<sup>1</sup>, QIAN He-ying<sup>1</sup>, SUN Ping-jiang<sup>1</sup>, XU An-ying<sup>1</sup>,  
MIAO Xue-xia<sup>2</sup>, GUO Qiu-hong<sup>2</sup>, XIANG Hui<sup>2</sup>, HUANG Yong-ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018; <sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

**Abstract:** 【Objective】The genetic relationships among silkworm strains were analyzed by constructing their fingerprints. 【Method】35 SSR markers were used to construct 96 fingerprints of silkworm races. All of the SSR markers were polymorphic and unambiguously separated silkworm strains from each other. 【Result】A total of 467 alleles were detected with a mean value of 12.77 alleles/locus (range 3 - 28). The mean polymorphism index content (PIC) was 0.71 (range 0.299 - 0.919). UPGMA cluster analysis of Nei's genetic distance grouped silkworm strains based on their origin. 【Conclusion】The results indicated that SSR markers are an efficient tool for fingerprinting cultivars and conducting genetic-diversity studies in the silkworm.

**Key words:** Silkworm (*Bombyx mori* L.); Germplasm; SSR marker; Fingerprint

### 0 引言

【本研究的重要意义】家蚕是重要的经济昆虫。长期以来, 丝绸一直受到国际市场的欢迎, 蚕丝业在中国、印度及其它的发展中国家扮演着重要的角色。家蚕品种资源是家蚕育种的基础<sup>[1]</sup>, 中国、日本、印度等国家共保存了数千份蚕种质资源 (其中部分品种为重复保存)。中国是蚕丝业的发源地, 有着丰富的蚕

种质资源, 中国农业科学院蚕业研究所保存了 660 个来自不同区域的不同化性、眠性的蚕品种, 其中包括了来自中亚、欧洲、日本等国家和地区的蚕种质资源, 并调查了家蚕品种资源的常规性状和特殊性状<sup>[2,3]</sup>。部分品种资源在形态学上差异较大, 但很多品种仅从形态学上是很难区分的。【前人研究进展】随着分子生物学的发展, 很多类型的分子标记得到了运用, 这些分子标记已经在很多物种 (包括蚕) 中被用来研究分子

收稿日期: 2005-08-16; 接受日期: 2006-04-29

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (2005CB121000); 国家科技基础条件平台工作重点项目 (2004DKA30460-4); 江苏省自然科学基金前期预研重大项目 (BK2004206); 中国科学院知识创新项目 ((KSCX2-SW-318)

作者简介: 侯成香 (1972-), 女, 安徽当涂人, 助理研究员, 研究方向为家蚕种质资源及分子育种。Tel:0511-5616575; Fax:0511-5622507; E-mail: cxhou587@163.com; cangene@pub.zj.jsinfo.net

连锁图构建、遗传多样性分析、品种鉴定、分子标记辅助育种等。简单重复序列 (simple-sequence repeats, SSR), 也称微卫星, 在真核生物中是随机广泛分布的, 并且作为分子标记应用越来越多。微卫星由于其高度的多态性, 作为一个标记系统在基因组分析中有很高的潜在应用价值<sup>[4]</sup>, 并被广泛用于遗传多样性分析<sup>[5-8]</sup>和分子遗传图谱构建<sup>[9-11]</sup>。近年来, 微卫星标记在家蚕中也得到了分离和应用。Reddy<sup>[12]</sup>分离出 28 个微卫星位点, 用其中的 15 个微卫星标记对 13 个家蚕的品系进一步分析微卫星标记的多态性水平。沈利等<sup>[13]</sup>利用插入片段在 7 kb 以上的基因组文库, 采用杂交筛选的方法获得了 8 个微卫星标记并对 6 个家蚕品种进行了多态性研究。Li 等<sup>[14]</sup>用 26 个 SSR 标记分析了 31 个代表性家蚕品种的遗传多样性。Miao 等<sup>[15]</sup>构建了家蚕 SSR 遗传连锁图。【本研究的切入点】家蚕种质资源指纹图谱的构建不仅能够从分子水平鉴别各家蚕品种, 而且可以根据品种的指纹图谱, 分析品种间的遗传距离及亲缘关系。【拟解决的关键问题】本研究利用 SSR 标记构建家蚕引进品种资源及部分中国地方品种的指纹图谱, 并根据各品种的指纹图谱, 研究家蚕品种间的亲缘关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 蚕品种

47 个欧洲系统一化性品种, 13 个日本系统一化性品种和 1 个日本系统二化性品种以及 35 个中国系统二化性品种, 其主要性状见表 1, 这些品种均保存在中国农业科学院蚕业研究所。

### 1.2 DNA 抽提

将后部丝腺 (20 个个体混合) 放入预冷的研钵中加液氮快速研磨成为粉末状; 加抽提缓冲液 (10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.0; 0.1 mol·L<sup>-1</sup> EDTA pH 8.0; 0.5% SDS), 混匀后转入离心管中, 加蛋白酶 K 至终浓度 100 μg·ml<sup>-1</sup>, 56℃水浴保温 3~5 h; 用平衡酚、酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1)、氯仿各抽提 1 次, 上清用 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA, 沉淀用 70% 乙醇洗涤两次, 加 TE 溶解; 加 RNA 酶至终浓度 50 μg·ml<sup>-1</sup>, 37℃保温 2 h 以消化 RNA, 再用酚、酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1)、氯仿各抽提 1 次后, 用 2 倍体积冰无水乙醇沉淀 DNA, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 加 TE 溶解, -20℃保存备用。

### 1.3 微卫星标记及 PCR 扩增

家蚕微卫星标记的获得方法同文献<sup>[15]</sup>, 35 个

SSR 标记的特征见表 2。PCR 仪为 Techne flexigene Cycler。PCR 扩增采用 touchdown 程序进行, 程序如下: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 40 s, 63℃退火 40 s, 72℃延伸 1 min, 之后的 15 轮每轮的退火温度降低 0.44℃至 56℃止; 最后的 24 轮的扩增条件是: 94℃变性 40 s, 56℃退火 40 s, 72℃延伸 1 min, PCR 反应体系 15 μl, 含 1× PCR buffer (10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, pH 8.3), 200 μmol·L<sup>-1</sup> dNTPs, 5'端引物和 3'端引物各 10 pmol·L<sup>-1</sup> 引物, 0.5U Taq 酶 (鼎国生物) 和 20 ng 模板 DNA。

### 1.3 PIC 值计算

根据各 SSR 标记在 96 个家蚕品种中的扩增结果, 计算各 SSR 标记的多态性指数 (polymorphic index content, PIC)<sup>[16]</sup>, 计算公式如下:

$$PIC=1-\sum p_i^2$$

其中,  $p_i$  为  $i$  等位基因在 96 个品种中出现的频率。

### 1.4 电泳

PCR 产物用 377 自动测序仪进行检测。变性胶浓度为 5%, 长度 36 cm。PCR 产物稀释到 0.4 ng DNA·μl<sup>-1</sup> 后, 再取 1 μl 加 3 μl 加样缓冲液 (含 5 mg·ml<sup>-1</sup> 蓝色葡聚糖和 5% 去离子甲酰胺), 经 95℃变性 3 min 放置冰上备用。加样时, 先加荧光标记内标 0.2 μl (ABI 公司, rox400, 含 80、100、150、180、200、250、300、320、350、400 bp 荧光标记 DNA 片段), 再加已经变性的样品 0.5 μl 缓冲液为 1×TBE, 电压 3000 V, 50 mA, 150 W 和胶温度 51℃条件下电泳 2 h。

### 1.5 数据分析

以 rox400 内标为参照, 用 GeneScan Analysis Software v. 3.1 分析出每一片段大小。同一标记在不同品种中扩增出来的带, 有带存在的记为 1, 没有同样大小的带则记为 0, 用 Nei 的方法<sup>[17]</sup>计算出各品种间的遗传距离, 然后用 UPGMA 方法进行聚类分析。这些工作是采用 popgene 程序 version 1.31 (Francis C. et al., 1999) 完成的。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记在家蚕品种中的等位基因数及在家蚕品种间的多态性指数 (PIC)

35 个 SSR 标记在 96 个品种中共扩增出 467 个不同的 DNA 片段 (数据未列出), 平均 1 个 SSR 标记的等位片段数为 12.77 个 (最少的 3 个, 最多 28 个)。35 个微卫星位点的平均 PIC 值为 0.71 (最低为 0.299, 最高为 0.919) (表 2)。

表 1 96 个品种的特性

Table 1 Characteristics of silkworm strains used in the present study

编号 No.	品种名 Strain name	系统 System	化性 Voltinism	眠性 Moltinism	编号 No.	品种名 Strain name	系统 System	化性 Voltinism	眠性 Moltinism
pop1	日 8Ri8	日本种	一化	四眠	pop49	白罗	欧洲种	一化	四眠
	Ri8Ri8	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Bailuo	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop2	日 9Ri9	日本种	一化	四眠	pop50	罗本地红	欧洲种	一化	四眠
	Ri9Ri9	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Luobendihong	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop3	日 10Ri10	日本种	一化	四眠	pop51	罗束腰黄	欧洲种	一化	四眠
	Ri10Ri10	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Luoshuyaohuang	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop4	日 11 锡	日本种	一化	四眠	pop52	西班牙	欧洲种	一化	四眠
	Ri11Xi	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Espana	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop5	日 12 锡	日本种	一化	四眠	pop53	银桃	欧洲种	一化	四眠
	Ri12Xi	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Yintao	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop6	日 13 锡	日本种	一化	四眠	pop54	土耳其黄茧	欧洲种	一化	四眠
	Ri13xi	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Turkey yellow cocoon	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop7	日 13 吴	日本种	一化	四眠	pop55	维玛拉	欧洲种	一化	四眠
	Ri13Wu	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Weimala	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop8	日 13 桥	日本种	一化	四眠	pop56	罗萨	欧洲种	一化	四眠
	Ri13Qiao	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Luosa	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop9	J11 吴	日本种	一化	四眠	pop57	玛依拉黄茧	欧洲种	一化	四眠
	J11Wu	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Mayila	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop10	JA (-) 吴	日本种	一化	四眠	pop58	玉无飞白	欧洲种	一化	四眠
	JA(-)Wu	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Yuwufeibai	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop11	黑子	日本种	一化	四眠	pop59	阿斯可利黄茧	欧洲种	一化	四眠
	Heizi	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Asikeli	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop12	姬蚕	日本种	一化	四眠	pop60	摩洛哥	欧洲种	一化	四眠
	Jican	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Morocco	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>
pop13	天龙青白	日本种	一化	四眠	pop61	829	中国种	二化	四眠
	Tianlongqingbai	Japanese	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>			Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop14	玉种	欧洲种	一化	四眠	pop62	华合	中国种	二化	四眠
	Yuzhong	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Huahe	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop15	欧洲	欧洲种	一化	四眠	pop63	EH1 新	中国种	二化	四眠
	European	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		EH1xin	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop16	欧 16 吴	欧洲种	一化	四眠	pop64	T5	热带种	二化	四眠
	Ou16Wu	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>			Tropical	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop17	欧 17 吴	欧洲种	一化	四眠	pop65	T9	热带种	二化	四眠
	Ou17Wu	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>			Tropical	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop18	欧 18	欧洲种	一化	四眠	pop66	T19	热带种	二化	四眠
	Ou18	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>			Tropical	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop19	欧 19 吴	欧洲种	一化	四眠	pop67	T20	热带种	二化	四眠
	Ou19Wu	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>			Tropical	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop20	AN525	欧洲种	一化	四眠	pop68	浙农 1 号	中国种	二化	四眠
		European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Zhennong1	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop21	意 16	欧洲种	一化	四眠	pop69	春蕾	中国种	二化	四眠
	Yi16	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Chunlei	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop22	钓丝 1 号	欧洲种	一化	四眠	pop70	中 51 号	中国种	二化	四眠
	Diaosi1	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Zhong51	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop23	钓丝 2 号	欧洲种	一化	四眠	pop71	中 54 号	中国种	二化	四眠
	Diaosi2	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Zhong54	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop24	法 50B	欧洲种	一化	四眠	pop72	中 64 号	中国种	二化	四眠
	Fa50B	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Zhong64	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
pop25	法 403	欧洲种	一化	四眠	pop73	中 66 号	中国种	二化	四眠
	Fa403	European	V <sub>1</sub>	M <sub>4</sub>		Zhong66	Chinese	V <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>

续表 1 Continued

编号 No.	品种名 Strain name	系统 System	化性 Voltinism	眠性 Moltinism	编号 No.	品种名 Strain name	系统 System	化性 Voltinism	眠性 Moltinism
pop26	N31 世红吴 N31Shihongwu	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop74	德清 1 号 Deqing1	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop27	信农欧白吴 Xinnongoubaiwu	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop75	德清 2 号 Deqing2	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop28	爱字 1 号 Aizi1	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop76	余杭 7 号 Yuhang7	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop29	爱字 2 号 Aizi2	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop77	新沂 20 号 Xinyi20	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop30	乌斯 1 号 Wusi1	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop78	大草 Dacao	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop31	苏联 1 号 Sulian1	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop79	中农 29 Zhongnong29	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop32	III11 Salisi1	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop80	平 Ping	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop33	III15 Salisi15	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop81	泰 Tai	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop34	III22 Salisi22	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop82	202	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop35	III24 Salisi24	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop83	CB (二) CB2	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop36	东德 201 East German201	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop84	特大形白 Tedaxingbai	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop37	东德 907 East German907	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop85	吴原 11 Wuyuan11	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop38	罗尼 3 号 Luoni3	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop86	CBI	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop39	罗尼 6 号 Luoni6	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop87	苏治 Suzhi	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop40	罗尼 7 号 Luoni7	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop88	247	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop41	罗尼 9 号 Luoni9	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop89	楚雄 Cuxiong	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop42	317	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop90	苏 17 (黄) Su17huang	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop43	410	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop91	8212	日本种 Japanese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>
pop44	Ayag	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop92	神农 1 号 Shennong1	中国种 Chinese	一化 V <sub>1</sub>	三眠 M <sub>3</sub>
pop45	保黄 Baohuang	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop93	神农 2 号 Shennong2	中国种 Chinese	一化 V <sub>1</sub>	三眠 M <sub>3</sub>
pop46	匈牙利 Xiongyali	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop94	神农 3 号 Shennong3	中国种 Chinese	一化 V <sub>1</sub>	三眠 M <sub>3</sub>
pop47	伟罗 A WeiluoA	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop95	神农 5 号 Shennong5	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	三眠 M <sub>3</sub>
pop48	苏罗 42 Suluo42	欧洲种 European	一化 V <sub>1</sub>	四眠 M <sub>4</sub>	pop96	蚕毛 1 号 Canmao1	中国种 Chinese	二化 V <sub>2</sub>	四眠 M <sub>4</sub>

表 2 35 个微卫星标记特征 (引物, 等位片段数、扩增片段范围及 PIC 值)

Table 2 Microsatellite loci, repeat motif, forward and reverse flanking primer sequences, number of alleles, allelic size range, and PIC values in *Bombyx mori*.

引物编号 Locus symbol	重复序列类型 Repeat	引物序列 Primer sequence(3'-5')	等位片段数 Number of alleles	等位片段大小 Allelic size range	多态性指数 PIC value
FL0306	CT	gggtgttagatgctggcgacactcagcattgggtgtca	8	133~203	0.804
FL0315	CA	tcgccgagttggctgctgtgtaaacatgtatcccgagttg	9	150~174	0.792
FL0333	CT	gaagacagagcgaaagtgaggacaagaggtttgatcgaaggtg	15	173~217	0.659
FL0336	CA	cgtattttagttagtactcggatgacatgggctacagtgaccacataag	25	158~236	0.916
FL0536	CA	tgccccacctcaaacccgctagccactgaaggttactt	10	278~328	0.592
FL0542	CT	tgaatcagttgagcggaacctgtaactcgaattcatgattgtaa	19	238~384	0.899
FL0551	CT	aataattctctgtataagtctctgtgagacttttagcgataagactgcct	9	330~350	0.690
FL0554	CA	cagtgatctatgattccattgtttcggagtcggatcacacacgc	4	338~350	0.499
FL0555	CA	tccagctccctcctcttgaagctacagaaacgggg	5	323~331	0.596
FL0571	CT	ggctcggtagagtgctggactttccaaatgattctgtcca	15	300~366	0.753
FL0601	CA	cgccgctgtgacgaagctcatattcaaacgacattca	12	222~300	0.705
FL0607	CT	gccttagcttagcaattagaacacataagacttcaatcaaacgctt	12	238~272	0.608
FL0610	CT	atagcggaggaactgggatggacttccacaataatgaagacaa	10	165~259	0.695
FL0612	CA	cagatttcgccaggactacactttgagaagtgcagagtgccatatt	11	230~264	0.801
FL0617	CT	aagttcttgagtgccgaccgacaagaccgacactccaa	14	231~313	0.827
FL0657	CT	gagattagtcagaatagtgcaagataatcaaacgggtgtctggaag	16	300~400	0.848
FL0915	CT	tgctgaagacaaaaagggaatcattgtggatgtctacggctc	20	128~300	0.846
FL0927	CT	ggcattatgtctcaaatcacctgctgtaagtggattggggca	25	220~306	0.896
FL0932	CT	cagtcctgtcagttgccattgtaacgcttaaatgagacgtgcg	8	262~314	0.572
FL0933	CT	cgcttattggtaattgcctaagtacaccgcaacatacctctat	26	249~319	0.913
FL0934	CT	gagcggatgattagcgtggatcattcagttcacgacgagcc	11	250~334	0.762
FL0939	CT	ggtgtattcgtacaagtagggctctctttgtctcctacttatccact	10	250~310	0.688
FL1001	CT	ggggtcggcaccgtaaatcgaccgaagatgacatgagatg	3	114~118	0.301
FL1002	CT	ccattaggtgcggtcgggtcgcggaagagacattg	13	106~144	0.684
FL1010	CA	cagtgccaggatgtgcccagttcgggtgctcaacagacata	28	160~232	0.919
FL1034	CT	gtttgatcatttcgtttcatcgacgagccttagcaaacaccag	9	270~300	0.717
FL1051	CT	gccaccactgtttcctactgtaaatcaaacgggtgtctggaag	16	240~344	0.879
FL1110	CA	catattcaaaccttaagcagcggccaagacgctccactaccattc	5	198~208	0.299
FL1113	CA	gccaccagtgacttctcaaacctcgggcatgtgacaagatc	13	214~274	0.675
FL1125	CA	ccgacatcgtggtgctggaacactgaggacatgactttctggt	16	180~246	0.860
FL1128	CA	tcagagattcgccaaaactacagagaggagtgagaagtgttcat	20	212~274	0.895
FL1141	CA	cggttagtaggttaggtgtccatcacatctgcagcgaacgctc	8	180~352	0.587
FL1157	CA	gctggaagaaagtcgtgggtccttagaccaagaagacgacaata	6	301~349	0.589
F115L9	CT	actaagagggcagatagggttaatgacgtttccaaatgattctgtcca	9	320~350	0.464
FL1160	CA	ggagtcccgcacccgataaatcatgtcagacctaaagcactcaaa	7	300~334	0.624

## 2.2 遗传距离分析

根据 SSR 标记扩增结果, 计算各品种间的遗传距离, 日本一化性品种间平均遗传距离为 0.1181, 欧洲一化性品种间遗传距离为 0.1237, 中国二化性品种间平均遗传距离为 0.1325。日系一化性和欧洲一化性品种间的平均遗传距离为 0.1324, 日系一化性和中系二化性品种间的遗传距离为 0.1365, 中系二化性品种和欧系一化性品种间的平均遗传距离为 0.1399。由此可见, 系统内部品种间的遗传距离较系统间的遗传距离为小。

## 2.3 聚类分析

根据各品种间的遗传距离, 用 UPGMA 方法绘制了分子系统图, 如图 1 所示, 基于分子系统图可粗分

为 9 个群。第 1 群由 2 个中国二化性品种及 1 个日本系统一化性品种组成, 第 2 群由 11 个欧洲系统一化性品种、4 个日本一化性品种和 3 个中国系统二化性品种组成; 第 3 群含 2 个热带系统二化性品种、8 个中国系统二化性品种; 第 4 群全部为日本系统一化性品种 (7 个); 第 5 群由 28 个欧洲系统一化性品种构成; 第 6 群 2 个日本系统一化性品种; 第 7 群体由 7 个中系二化性品种, 1 个中系一化性品种, 1 个热带二化性品种组成; 第 8 群体由 7 个中系二化性品种, 第 9 群由 4 个中系二化性品种、1 个中系一化性品种和 7 个欧洲一化性品种组成, 该群首先由 4 个中系二化性品种聚类后, 再与欧洲系统品种聚类。

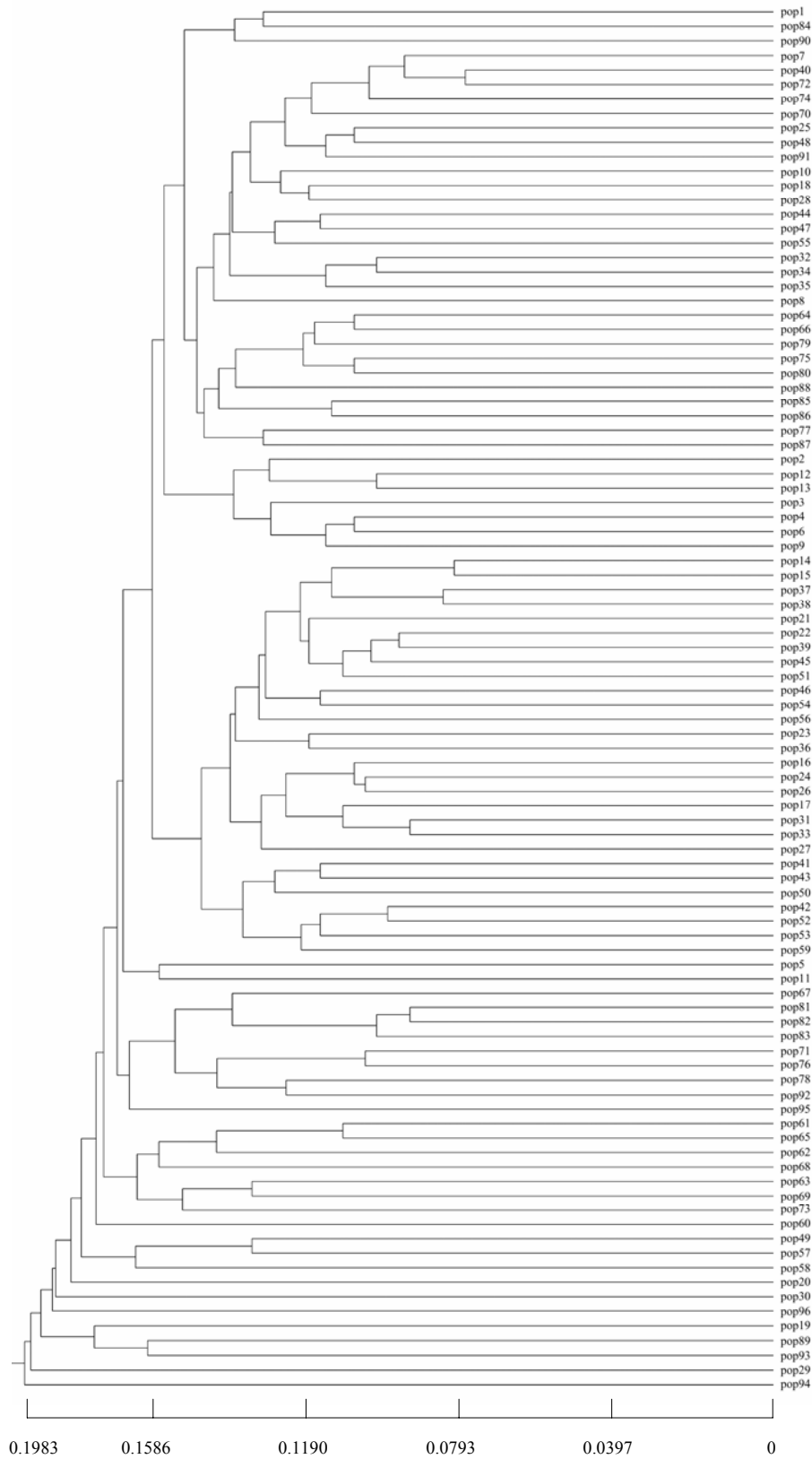


图1 UPGMA法分子聚类图.

Fig. 1 Dendrogram illustrating the phylogenetic relationship based on UPGMA cluster analysis methods

### 3 讨论

采用 SSR 标记的研究结果显示,家蚕各类地理品种基本聚合在一起,但还是略有差异,这与夏庆友等<sup>[18]</sup>、鲁成等<sup>[19]</sup>用 RAPD 方法对家蚕及野桑蚕品种的聚类结果基本一致。李爱玲等<sup>[20]</sup>用家蚕、野桑蚕线粒体 *Cyt b* 基因片段序列进行了分子进化研究,证实家蚕起源于野桑蚕,但在同源性分析中,中国二化性品种复芳与其它 6 个家蚕品种之间距离同源性最低,而其余 6 个家蚕品种(包括 2 个中国种、1 个日本种、1 个欧洲种、1 个韩国种)同源性完全相同,其结果也与本试验结果类似。说明家蚕品种间由于人为的生殖隔离或地理隔离从一个原始群体进行分化时,人工选择对其结构基因变异产生了极大的影响,由于有时人们对两个群体的某些性状会向同一个方向进行选择,这就使得由生态特征得出的遗传距离不能完全准确地反映出两个群体的分化时间,而由分子水平得出的亲缘关系比形态性状得出的亲缘关系应更为准确。在本试验中,尽管总体上系统间品种间的遗传距离较系统内品种间的遗传距离大,但部分系统间的品种间遗传距离较小,在聚类时也相对聚在一起,有可能是由于世界上不同地区在从中国引入蚕丝生产技术时,家蚕品种来源于中国不同的地理位置,或者同一地区在从中国引种时先后引入了两个或两个以上区域的蚕品种。另外,在家蚕品种保育过程中,虽然尽可能做到保存群体的性状,但由于人力、物力的限制,每品种每次饲养量只有 500~1 000 头,而用于继代的蛾区数只有 28 个左右,因此,遗传漂变也会对基因频率产生较大影响,因而由基因频率所得的遗传距离仍有可能产生偏差。

家蚕由野桑蚕驯化而来,已为多数学者公认,但对家蚕各系统分化的求索却有不同观点。吉武<sup>[21]</sup>依据同工酶多态性,提出中国一化性品种为家蚕的起源中心。蒋猷龙等<sup>[22]</sup>根据考古学发现认为多化性分化最早,并且有多个起源中心。鲁成等<sup>[19]</sup>采用 RAPD 方法研究了野桑蚕和家蚕的分子系统学,认为起源之初的野桑蚕群体可能是一化占有优势,同时包含二化、多化的野桑蚕群体。并且认为,后期人工选择形成的不同系统、化性、眠性的家蚕品种可能不是由一种生态型的野桑蚕驯化为多种生态类型的家蚕品种。笔者的研究结果显示中国系统品种间的遗传距离相对较高,似乎支持鲁成的混合起源说。

微卫星 DNA 存在于所有已检测过的真核生物的

基因组中,并在整个基因组中都有分布,其均一性比其它标记高,并且是唯一的一个分布在着丝粒(centromeres)区域附近的多态性标记。其主要位置在基因组的非编码区,长期的自然选择、人工选择都是根据适应性、外形的选择,即主要是对结构基因的选择,因此它的变异几乎不受选择的影响,从而在进化过程中变异就可在群体内大量累积,两个群体间的变异大小主要由分化时间的长短决定,因此微卫星 DNA 的变异并不能完全等同于功能基因的变异,由微卫星得出的遗传距离也许更能反映分化时间的长短。

### 4 结论

4.1 SSR 标记在家蚕品种资源中有丰富的多态性,由于 SSR 标记的可重复性、使用的便利性(PCR 标记)和检测的方便性(用聚丙烯凝胶电泳即可检测),适合于用来构建家蚕品种资源的指纹图谱并进行遗传关系分析,进而构建家蚕核心种质库。

4.2 本研究中 96 个家蚕品种能被所用的 SSR 标记完全区分,说明 SSR 标记适合于进行品种鉴定,特别是在涉及知识产权争议品种的鉴定中将提供 DNA 水平的证据。

4.3 根据本研究结果得到的家蚕各类地理品种基本聚合在一起,但略有差异。这个结果与鲁成提出的混合起源说基本符合,但尚需要更多的证据进行证实。

### References

- [1] 中国农业科学院蚕业研究所主编. 中国养蚕学. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.  
The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. *The Sericultural Science in China*. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1990. (in Chinese)
- [2] 林昌麒, 陈克平, 吴冬秀, 姚勤. 家蚕品种资源特殊性状调查. 中国农业科学, 2003, 36: 709-713.  
Lin C Q, Chen K P, Wu D X, Yao Q. Investigations on specific characteristics of germplasms in *Bombyx Mori* L. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 709-713. (in Chinese)
- [3] Li M W, Chen K P, Hou C X, Yao Q, Lin C Q. Studies on some special characters in the silkworm (*Bombyx mori* L.) germplasm in china. *Sericologia*, 2001, 41: 527-535.
- [4] Bowcock A M, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd J R, Cavalli-Sforza L L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 1994, 368: 455-457.
- [5] Bertin P, Grégoire D, Massart S, Froidmont D. Genetic diversity among European cultivated spelt revealed by microsatellites.

- Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 148-156.
- [6] 李宏伟, 高丽锋, 刘曙东, 李永强, 贾继增. 用 EST-SSRs 研究小麦遗传多样性. *中国农业科学*, 2005, 38: 7-12.
- Li H W, Gao L F, Liu S D, Li Y Q, Jia J Z. Study on the genetic diversity of wheat by EST-SSRs. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 7-12. (in Chinese)
- [7] 李永祥, 李斯深, 李立会, 杨欣明, 李秀全. 披碱草属 12 个物种遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析. *中国农业科学*, 2005, 38: 1522-1527.
- Li Y X, Li S S, Li L H, Yang X M, Li X Q. Comparison of genetic diversity of twelve elymus species using ISSR and SSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 1522-1527. (in Chinese)
- [8] 王素会, 杜雄明. 陆地棉不同纤维发育突变体及其 SSR 指纹分析. *中国农业科学*, 2005, 38: 2139-2146.
- Wang S H, Du X M. SSR fingerprinting analysis on distinct mutants of fiber development in *Gossypium hisutum*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 2139-2146. (in Chinese)
- [9] 陈庆山, 张忠臣, 刘春燕, 王伟权, 李文滨. 应用 Charleston×东农 594 重组自交系群体构建 SSR 大豆遗传图谱. *中国农业科学*, 2005, 38: 1312-1316.
- Chen Q S, Zhang Z C, Liu C Y, Wang W Q, Li W B. Construction and analysis of soybean genetic map using recombinant inbred line of Charleston×Dongnong 594. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 1312-1316. (in Chinese)
- [10] Jones E S, Hughes L J, Drayton M C, Abberton M T, Michaelson-Yeates T P T, Bowen C, Forster J W. An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of whiteclover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science*, 2003, 165: 531-539. (in Chinese)
- [11] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 2002, 9: 199-207.
- [12] Reddy K D, Abraham E G, Nagaraju J. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome*, 1999, 42: 1057-1065.
- [13] 沈利, 李木旺, 李明辉, 苗雪霞, 鲁成, 黄勇平. 家蚕微卫星标记的筛选及其在遗传多样性分析中的应用. *蚕业科学*, 2004, 30: 230-235.
- Shen L, Li M W, Li M H, Miao X X, Lu C, Huang Y P. Development and genetic diversity analysis of microsatellites markers in silkworm, *Bombyx mori* L. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, 30: 230-236. (in Chinese)
- [14] Li M W, Shen L, Xu A Y, Miao X X, Hou C X, Sun P J, Zhang Y H, Huang Y P. Genetic diversity among the silkworm (*Bombyx mori* L., Lep., Bombycidae) germplasm revealed by microsatellites. *Genome*, 2005, 48: 802-810.
- [15] Miao X X, Xub S J, Li M H, Li M W, Huang J H, Dai F Y, Marino S W, Mills D R, Zeng P, Mita K, Jia S H, Zhang Y, Liu W B, Xiang H, Guo Q H, Xu A Y, Kong X Y, Lin H X, Shi Y Z, Lu G, Zhang X, Huang W, Yasukochi Y, Sugasaki T, Shimada T, Nagaraju J, Xiang Z H, Wang S Y, Goldsmith M R, Lu C, Zhao G P, Huang Y P. Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 16303-16308.
- [16] Anderson J A, Churchill G A, Autrique J E, Tanksley S D, Sorrells M E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 1993, 36: 181-186.
- [17] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [18] 夏庆友, 周泽扬, 鲁成, 向仲怀. 家蚕不同地理品种分子形态学研究. *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 radical differentiation of *Bombyx mori* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Acta Entomologica Sinica*, 1998, 41(1): 32-40. (in Chinese)
- [19] 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 systematic studies on Chinese Mandarin silkworm (*Bombyx mandarina* M.) and domestic silkworm (*Bombyx mori* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35: 94-101. (in Chinese)
- [20] 李爱玲, 徐安英, 沈兴家, 唐顺明, 张志芳, 潘沈元. 家蚕、野桑蚕线粒体 Cyt b 基因片段序列分析及分子进化研究. *蚕业科学*, 2004, 30(1): 80-84.
- Li A L, Xu A Y, Shen X J, Tang S M, Zhang Z F, Pan S Y. Analysis of segment sequences and molecular evolution between *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* using mitochondrial cyt b gene. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, 30(1): 80-84. (in Chinese)
- [21] 吉武成美, 蒋猷龙. 家蚕的起源与分化. *蚕业科学*, 1987, 13(3): 182.
- Narumi Y, Jiang Y L. Origin and differentiation of *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 1987, 13(3): 182. (in Chinese)
- [22] 蒋猷龙. 家蚕的起源和分化. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982.
- Jiang Y L. *Origin and Differentiation of Silkworm*. Nanjing: Jiangsu Scientific and Technical Publishers, 1982. (in Chinese)





