

RAPD 技术在昆虫遗传多样性研究中的作用

李金, 张跃西, 李淑萍 (1. 西南大学生命科学学院, 重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆400715; 2. 金华大学旅游学院, 浙江金华321000; 3. 商丘师范学院生命科学系, 河南商丘476000)

摘要 随机扩增的多态性DNA技术(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)是一项基于PCR技术上的DNA分子水平上的大分子检测技术。近几年来, RAPD技术在昆虫遗传多样性研究中的应用取得很大进展。就其在昆虫分类、昆虫分子生态学研究、害虫抗药性研究、作物抗虫方面、基因组图谱构建等的应用进行了综合论述, 并指出RAPD技术的优点、缺点及对策。

关键词 RAPD; 昆虫; 遗传多样性

中图分类号 Q963 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)06-01609-02

Application of RAPD Technique in the Study on Genetic Diversity of Insect

LI Jin et al (School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) technique is a new technology of DNA molecular marking which is based on PCR technique. In recent years, great progress has been made in the application of RAPD technique in insect genetic diversity. In this paper the classification, molecular ecology, resistance to agro-chemical of insect, and the resistance of crop to pest, the construction of genomic mapping of insect were reviewed. The advantage and shortcoming in RAPD were discussed.

Key words RAPD; Insect; Genetic diversity

随机扩增多态DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, 简称RAPD)技术是Williams和Welsh研究小组于1990年同时提出的一项DNA多态检测新技术, 是一项建立在PCR基础上的DNA指纹技术。该技术使用一系列的随机引物可检测到覆盖整个基因组范围的遗传改变, 而无需先了解被测基因组相关分子生物学信息。作为一项新兴技术, RAPD也被引入到昆虫学的研究领域中, 应用于昆虫遗传多样性的研究。遗传多样性的检测可在不同水平上进行, 最初人们对遗传多样性的检测是从形态学开始的, 进入20世纪80年代, 分子生物学与分子克隆技术的发展带来了一系列检测遗传多样性更为直接的方法。目前, DNA水平的分析方法已成为最有效的遗传分析方法, 原则上可以做到对任何片段进行分析。RAPD具有快速、灵敏、程序简便等优点, 是众多分子生物学分析方法无法比拟的, 倍受人们的青睐。笔者对RAPD技术在昆虫分类、昆虫分子生态学研究、害虫抗药性研究、作物抗虫、基因组图谱构建等的应用进行了综述, 并指出RAPD技术的优点、缺点及对策。

1 RAPD 技术理论基础

RAPD标记技术是1990年由美国杜邦公司的J Williams和加利福尼亚生物研究所J Welsh领导的2个小组几乎同时发展起来的。它是建立在DNA聚合酶链式反应(polymerase chain reaction PCR)技术基础上, 以一种或多种随机引物来对模板DNA进行随机扩增, 研究模板DNA多态性的遗传标记技术^[1-2]。它的理论基础为: 相同的模板DNA用一种引物来扩增, 所得到的DNA片段应是序列一致、分子量大小相同, 即在RAPD指纹图谱上的谱带表现为一致, 其中的特异性谱带, 则可作为该模板DNA的分子标记; 对不同模板DNA用同一引物来进行扩增, 得到的RAPD指纹图谱上的谱带可能是相同的(模板基因组间具有同源性), 也可能是不同的。进一步, 如果用多种经过筛选的随机引物来对一个模板DNA进行随机扩增, 这些引物的识别位点就可能遍布整个模板

DNA, 使模板DNA的多态性得以充分地展现。

2 优缺点及对策

2.1 优点

2.1.1 操作简便, 自动化程度高, 成本低。RAPD标记技术容易掌握, 可在短时间内完成大量模板DNA的分子标记, PCR仪的产生使模板DNA扩增过程实现了自动化。因此, 可大规模生产, 形成商品化, 大大降低了研究费用。

2.1.2 可对整个模板DNA进行标记, 具有更大的随机性, 可充分展现出模板DNA的多态性。模板DNA的编码区与非编码区都可以进行标记, 能在没有任何分子遗传背景情况下, 分析模板DNA的多态性^[3], 这样也增加了可构建遗传图谱的物种数量。

2.1.3 模板DNA用量少, 灵敏度高。PCR扩增时, 一次仅需模板DNA 20~100 μg, 适合于小型昆虫的研究。在扩增时, 引物的一个碱基变化就会引起扩增谱带的巨大变化。

2.1.4 RAPD标记技术的引物为随机引物, 常由10个寡核苷酸组成, G、C的含量一般为60%~70%, 可人工合成, 现在引物的种类已有千余种。在应用中要针对不同模板DNA来选取不同的引物。标记位点较为丰富, 基本能反映整个基因组的变化。

2.1.5 对模板DNA的纯度要求不高。模板中混有少量的蛋白质或RNA对扩增结果几乎没有影响, 使模板DNA制备过程中的一些纯化步骤可以省略, 减少了模板DNA的损失量。并且保存在酒精、福尔马林^[4-5]浸液和FAA^[6]保存液中的标本, 所提取出的基因组DNA都可进行RAPD标记。

2.2 缺点

2.2.1 环境影响因素较多。模板DNA的完整性、PCR的变性温度、Taq酶的选择、模板DNA的浓度、Mg²⁺浓度和外源DNA污染等因素都可对RAPD指纹图谱产生影响, 造成实验的稳定性和重复性较差^[7]。

2.2.2 RAPD标记是显性标记, 符合孟德尔遗传定律^[1], 但不能区分纯和(AA)与杂和(Aa)基因型及不能提供完整的遗传信息, 这是RAPD技术的主要缺陷。

2.2.3 存在共迁移问题, 凝胶电泳只能分开不同长度的

DNA 片段,不能分开那些长度相同的碱基序列组成不同的 DNA 片段。

2.3 对策

2.3.1 控制模板 DNA 和镁离子的浓度,对单链引物进行严格筛选,优化 PCR 条件,操作规范化,减小反应体系组成上的差异。尽可能使 RAPD 反应标准化,提高扩增片段分辨率。

2.3.2 将 RAPD 作为一种初步筛选的方法,一旦发现所需的 DNA 扩增产物,再用等位特异性 PCR(AS-PCR)或测序扩增区段标记(SCAR)^[8],取代 RAPD 标记,以使标记位点更加精确,重复性更高。同时,还可以将 RAPD 转化为 RFLP、SSR 等其他分子标记,使之变为共显性标记^[9]。

3 应用

3.1 在昆虫分类中的应用 传统的昆虫分类方法都是以外部形态为依据,在大的分类单位内能清楚地确定一个物种的分类地位,但对于某些物种,在确定了它的属、族或种等分类地位时,仅凭借外部形态往往是难以确定的。由于物种的进化本质上是基因组的进化,因而分子分类学可以在 DNA 水平更精确地甚至定量地分析物种的进化速度、遗传距离以及由此推断系统关系。因此,选择合适的引物通过 RAPD 技术就可以较容易地把基因内部的差异显示出来,从而为准确确定物种的分类地位提供依据。Back 等^[10]用 4 条引物对 4 种蚜虫进行了 RAPD 分析,结果表明,根据电泳图谱能明确地区分 4 个蚜虫品种。田英芳等^[11]成功地利用 RAPD 技术区分了 7 种蟋蟀。张迎春等^[12]利用 RAPD 分析瓢虫的亲缘关系发现,不同个体间多态性 DNA 的特有带较少,变异程度较大。韩雅莉(2001)运用随机扩增多态 DNA 技术对斑翅蝗科中 3 属 6 种蝗虫基因组 DNA 进行了多态性比较,并根据各种间片段共享度构建了 UPG 聚类关系图,结果表明,大垫尖翅蝗和甘蒙尖翅蝗的片段共享度为 0.375,红翅皱膝蝗和鼓翅皱膝蝗的片段共享度为 0.268,亚洲小车蝗和黄胫小车蝗的片段共享度也为 0.268。

3.2 在昆虫分子生态学研究中的应用 昆虫分子生态学是从基因水平来研究生物之间以及生物与环境之间的关系。目前,RAPD 技术在该领域主要用于种群的遗传变异程度和种群间遗传分化程度、天敌昆虫的标识和鉴定、害虫生物型鉴别、个体遗传标记以鉴定亲缘关系及昆虫生殖策略的研究。孙珊等^[13]采用 RAPD 方法研究了我国 5 个地区亚洲玉米螟种群分化,随机引物选用美国 OPERON 公司生产的 OPW 和 OPF 2 个 KIT 共 40 种,其中 39 个引物均可在 5 个种群的 14 个个体中扩增出数目不等的条带,共计 754 个 RAPD 标记,利用 UPGMA 方法构建系统聚类图。结果表明,中国亚洲玉米螟的遗传分化是和地理隔离有很大关系的,因为地理位置上的差异而阻隔了各种群间的基因交流,从而导致了遗传分化。Skinner 等^[14]利用 RAPD 技术,研究了紫花苜蓿上一种叶蝉种群内的遗传多样性,结果表明,所有 48 个个体都具有特殊的 RAPD 片段,个体间存在随机交配。Roehrdanz 等(1993)用 RAPD 技术标识了不同地理起源的北美瓢虫-蚜虫的天敌,为正确引进天敌、控制蚜虫的危害起了决定性的作用,同时指出 RAPD 技术可用于区分关系近缘的天敌昆虫,在利用天敌控制害虫方面有着巨大的经济意义。Lu^[15]将 DNA 重复

序列标记技术应用于秋黏虫(*Spodoptera frugiperda*)的研究,该物种 2 个种群的分布区有部分重叠,其中一个种群嗜食玉米,另一个种群则以水稻和饲料用草为食,结果表明,DNA 重复序列标记技术能将 2 个在形态上无法区分的种群完全地划分开。Luchi 等^[16]用 RAPD 揭示出,模式昆虫水稻蚜的变异同寄主植物相关,既包括在特殊植物上的特殊基因型,又包括在培育的谷类和当地草上的一般基因型;蚜虫同其各自的寄主植物在相同的地理区域并在同一时间出现,这是一个少有的例子,这项研究强调了对遗传多样性和农业环境中寄主类型理解的重要性。

3.3 在害虫抗药性中的应用 RAPD 和 RAPD 标记是 2 个不同的概念,由于 RAPD 扩增获得的 DNA 片段经过鉴定后证明可以用作分子标记的,则称为 RAPD 标记。害虫抗药性的产生是在杀虫剂使用量不断加大的条件下,由于突变和选择作用与抗药性有关的遗传变异在种群中产生和扩散的结果,RAPD 技术一出现,便迅速被应用于害虫抗性机理的研究。利用 RAPD 技术检测抗性遗传变异,即使在人们对有关抗性基因缺乏深入了解的情况下,也可依赖与抗性基因连锁的 DNA 多态性标记对种群的抗性遗传变异进行鉴定。程罗根^[17]用 100 条随机引物对抗杀虫双和抗杀螟丹小菜蛾近等位基因系进行了 RAPD 分析,找出了 10 条与杀虫双抗性相连锁的特异带和 8 条与杀螟丹相连锁的特异带,这些特异带的确立为进一步研究抗性基因的结构和表达提供了基础。梁革梅等^[18]利用 RAPD 技术成功地扩增得到 105 条多态性条带,并通过聚类分析发现,棉铃虫对 B 产生抗性后在基因水平上发出了变异,说明 RAPD 技术不仅可以用来鉴定棉铃虫对 B 是否产生抗性,而且可以区分不同的 Bt 抗性种群。芮昌辉等(1996)利用 RAPD 技术分析棉铃虫对三氟氯氰菊酯抗性的遗传方式,通过筛选出的 3 个随机引物在 R 和 S 两亲本之间共扩增出 47 条 DNA 带,其中差异带达 27 条;初步筛选出与抗三氟氯氰菊酯有关的 RAPD 分子标记 3 个,即 OKG_r1300、OPG_r1450、OPG_r535,它们能同时出现于 R 亲本和正反交 F₁ 代中,而在 S 亲本中不出现,与抗药性遗传方式的测定结果一致,证明了这种方法的可靠性。

3.4 在作物抗虫方面的应用 Roche 等通过抗苹果红二圆尾蚜(*Dysaphis devecta*)苹果的分子标记研究,找出了与抗性基因(sd1)连锁的 3 个 RFLP 标记和 4 个 RAPD 标记,并且对它们进行了定位,这些标记的获得和定位在抗性育种中具有良好的应用前景。Mjburg 等(1998)开展了小麦对俄罗斯麦蚜抗性基因 Dn2 连锁分子标记研究,共检测了 2 700 个位点,其中有 4 个 RAPD 片段被鉴定出可推定作为与 Dn2 基因连锁的标记。F₂ 抗性基因分离表明,这 4 个片段与 Dn2 基因紧密连锁,并用这 4 个片段作探针进行 Southern 分析,证明了它们的同源性。Dweikat 等^[19]利用 RAPD 技术,使用 2 000 个引物对小麦(*Triticum aestivum*)的相近基因系进行了筛选,发现在生物型 B 中同 H6 基因相连的 DNA 标记对黑森蝇(Hessian fly)具有抗性,其中有 6 个引物显示的多态性片段同 H6 的抗性相关。基于重组率构建的高分辨率的遗传图谱还显示出,2 个标记是同 H6 紧密连锁的,没有重组发生;有 3 个标记被成

(上接第1610页)

功地插入序列标签位点(STS),其与RAPD引物可检验抗性基因的存在,说明标记鉴定和高分辨率的遗传图谱可以定位抗性基因。Blanchetot(1993)利用RAPD和RFLP技术研究了非洲稚虫和中间寄主非洲舌蝇之间的遗传依赖关系,以及非洲舌蝇自交系和基因连锁图谱,为非洲舌蝇生物防治靶标的设计提供了依据。

3.5 基因组图谱构建 遗传图谱的构建是当前分子遗传研究的热点,无论在理论上还是在实践上对基因组的分析都有重要作用。大量的RAPD位点既可以使根据形态性状构建的遗传图谱变得饱和,加大定位基因的密度,也可单独构建连锁图。何宁桂等(2001)结合SADF与RAPD标记构建了家蚕连锁图,用40个选择性扩增多态性引物和137个随机性扩增多态性引物对家蚕*Bombyx mori* F₂群体进行分子标记的筛选。Hurt等(1995)利用RAPD标记构建了蜜蜂的基因图谱,该图谱包括26个连锁群,全长161 720 kb(估计蜜蜂基因组全长为24 150 kb),平均每个10 bp引物筛选出的多态性位点达2.8个,并在此基础上,把决定性别的X位点、控制黑色体色的基因和苹果酸脱氢酶基因分别定位于不同的连锁群上。

4 前景展望

RAPD技术在短短的几十年中获得如此迅猛的发展,充分显示出其优越性。目前,科学家已将它应用于生物的研究,从化石、木乃伊以及埋藏在琥珀内的古生物样品中提取痕量的DNA通过PCR扩增和测序,与现在的生物进行比较,由此确定一些原始类群在进化上的位置。随着生物技术的发展,RAPD技术在昆虫学研究中扮演着越来越重要的角色,从而揭开了昆虫遗传图谱的构建、系统发育关系、昆虫分子适应机制探索、防虫技术提高、昆虫资源利用和昆虫多样性保护等研究领域的新篇章,相信随着这项技术的进一步发展,在昆虫学研究中将得到更广泛的应用。

参考文献

- [1] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531 - 6535.
- [2] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucl*[J]. *Acids Res*, 1990, 18(24): 7213 - 7218.
- [3] HOY M A. *Molecular Genetics*[M]. California: Academy Press, 1994: 388 - 390.
- [4] BARRO P J D. Diverf aus[J]. *J of Eto*, 1997, 36: 149 - 152.
- [5] 安榆林, 刁彩华, 朱宏斌, 等. 墨天牛属三个近缘种的RAPD分析[J]. *南京林业大学学报*, 1998, 22(4): 35 - 38.
- [6] 印红, 刘晓丽, 王彦芳, 等. 一种改进的昆虫基因组DNA的提取方法[J]. *河北大学学报: 自然科学版*, 2002, 22(1): 80 - 82.
- [7] 邹喻苹. RAPD分子标记简介[J]. *生物多样性*, 1995, 3(2): 104 - 108.
- [8] PARAN L, MCHLMORE R W. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 985 - 993.
- [9] 张晗, 沙伟. RAPD技术在遗传多样性研究中的应用[J]. *贵州科学*, 2003, 21(3): 81 - 85.
- [10] BLACKI V W C. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) of defect DNA polymorphisms in aphids[J]. *Bull Entomol Res*, 1992, 82: 151 - 159.
- [11] 田英芳, 郑哲民. 七种蟋蟀基因组DNA的RAPD多态性研究(直翅目: 蟋蟀总科)[J]. *昆虫分类学报*, 2001, 23(4): 248 - 252.
- [12] 张迎春, 郑哲民. 6种瓢虫的RAPD分析及在分类上应用的研究[J]. *西北大学学报: 自然科学版*, 2002, 32(4): 409 - 412.
- [13] 孙珊, 徐茂磊, 王戎疆, 等. RAPD方法用于亚洲玉米螟地理种群分化的研究[J]. *昆虫学报*, 2000, 43(1): 103 - 106.
- [14] SKINNER D Z, CAMACHO R F. Genetic diversity within a potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) population infesting alfalfa[J]. *J Kansas Ent Soc*, 1995, 68(1): 35 - 42.
- [15] 陈青. RAPD技术在昆虫学中的应用[J]. *世界农业*, 2004, 297(1): 49 - 51.
- [16] LUCHAI G, MARKOVITCHO, LOXDALE H D. Host-based genotype variation in insect revisited[J]. *Bull Ent Res*, 2002, 92(2): 159 - 164.
- [17] CHENGL G, LI FL, HANZ J, et al. Random amplified polymorphic DNA of resistance to dinitrophenol and cartapin dantrolone back moth, *Hutella xybostella*[J]. *Acta Ent Sn*, 2001, 44(1): 15 - 20.
- [18] HANG G M, TAN W J, GUO Y Y. Binary RAPD PCR analysis on the resistant populations of cotton boll worm to *Bacillus thuringiensis*[J]. *Hart Prot*, 2000, 26(3): 4 - 6.
- [19] DWIKATI, ZHANG W, OHM H. Development of STS markers linked to Hessian fly resistance gene Hb1 in wheat[J]. *Theory Appl Genet*, 2002, 105(5): 766 - 770.
- [20] 危文亮, 赵应忠. 分子标记在作物育种中的应用[J]. *生物技术通报*, 2000(2): 12 - 17.