

6种寄主桃蛀果蛾遗传变异的RAPD分析

韩青梅¹, 花蕾²

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院; 2 干旱半干旱地区农业研究中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 用25种随机引物对苹果、梨、杏、酸枣、枣、山楂6种寄主桃蛀果蛾基因组DNA进行了随机扩增多态DNA(RAPD)分析,结果表明,25种随机引物中有22种出现不同程度的DNA多态性标记,多态百分比为71.9%。根据Nei氏片段共享度公式计算了6种寄主桃蛀果蛾两两配对间的遗传距离,6种寄主桃蛀果蛾的平均遗传距离为0.5426,其中梨桃蛀果蛾与酸枣桃蛀果蛾遗传距离最远为0.704,枣与酸枣遗传距离最近为0.4627,用UPGMA法构建了6种寄主桃蛀果蛾的分子聚类图。

[关键词] 桃蛀果蛾; RAPD-PCR; 遗传变异; 寄主

[中图分类号] Q969.42+9.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-091-04

桃蛀果蛾又名桃小食心虫,简称“桃小”,隶属于鳞翅目果蛀蛾科,是我国北方地区多种果树上的重要害虫,其寄主多,分布广,危害严重,对寄主果实的质量和产量均造成严重的损失。桃蛀果蛾在不同寄主上的发生代数,越冬幼虫出土和成虫出现时期,幼虫脱果滞育时期等均有明显差异^[1~4],这可能会导致不同寄主上的桃蛀果蛾种群间基因交流降低,并出现遗传分化^[5]。分子标记能够为种群内与种群间的变异提供更多的信息。RAPD作为一种分子标记,用单个随机引物对基因组DNA进行扩增,可揭示种群的多态性^[6]。该技术灵敏度高,操作简单,试验材料要求较少且要求不高(新鲜、干制标本均可),不需要放射性标记,特别是对种群的遗传背景了解不多或根本不了解时更适用。本研究的目的是用RAPD标记来探讨不同寄主桃蛀果蛾的遗传分化及亲缘关系,以期对不同寄主桃蛀果蛾的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫来源

所用的桃蛀果蛾均是在不同寄主果树上用桃蛀果蛾性诱芯诱到的成虫,带回室内后凉干于-22℃保存(诱蛾时不同寄主果树至少相距500m以上)。

桃蛀果蛾的诱集分别在陕西的乾县、澄城进行。

1.2 基因组DNA的提取

用上海生物工程技术公司提供的基因组DNA

小量抽提试剂盒,提取时,将不同寄主桃蛀果蛾成虫分别随机选取4个置于1.5mL离心管中液氮研成粉末,用100μL TE缓冲液悬浮后加入200μL细胞裂解液,混匀后加入1.5μL蛋白酶K,置于55℃水浴30min后加300μL氯仿,用台式离心机(10000r/min)离心2min,取上清液300μL置于无菌1.5mL离心管中,分别加300μL悬浮液混匀,室温放置2min后,高速(10000r/min)离心2min,吸掉溶液后立即加100μL 1.2mol/L NaCl,轻轻振荡至样品完全溶解,再加1.5μL RNase A酶混匀,置55℃水浴5~10min,加入300μL冷乙醇,-20℃放置30min后取出10000r/min高速离心5min,倒掉乙醇,用等体积700mL/L的乙醇洗1~2次倒置于干净的滤纸上,室温干燥10min,用50μL TE溶解后置-22℃保存备用。

1.3 反应引物

所用引物从上海生物工程技术公司引物中选取10碱基随机引物25个,引物及其序列见表1。

1.4 DNA扩增

扩增反应液含引物15ng,模板DNA20ng,100mmol/L Tris-HCl(pH 8.3),50mmol/L KCl,2mmol/L MgCl₂,1g/L BSA(牛血清蛋白),200μmol/L dNTP,3μmol/min Taq DNA聚合酶,反应总体积25μL,反应混和物用25μL石蜡油覆盖。扩增在DNA Thermal cycler 96DTC-3C基因扩增仪上进行,条件为94℃变性3min,然后进行45

[收稿日期] 2000-07-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目

[作者简介] 韩青梅(1968—),女,陕西横山人,讲师,在读博士生,主要从事植物保护研究。

个循环,即 94 ℃变性 1 min,36 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,最后在 72 ℃延伸 10 min。扩增重复 3 次。

表 1 25 个随机引物及其序列

Table 1 List of 25 random primers and its nucleotide sequence

引物号 Primer	序列 Sequence	引物号 Primer	序列 Sequence
S ₁	GTTTCGCTCC	S ₈	GTCCACACGG
S ₂₅	AGGGGTCTTG	S ₂₇	GAAACGGGTG
S ₃₆	AGCCAGCGAA	S ₄₅	TGAGCGGACA
S ₅₁	AGCGCCATTG	S ₇₅	GACGGATCAG
S ₇₈	TGAGTGGGTG	S ₈₆	GTGCCTGGGTG
S ₈₄	GCATGAGACC	S ₉₈	GGCTCATGTG
S ₁₂₁	ACGGATCCTG	S ₁₂₃	CCTGATCACC
S ₃₆₉	CCCTACCGAC	S ₃₇₅	CTCCTGCCAA
S ₄₄₄	AAGTCCGCTC	S ₄₄₇	CAGCACTGAC
S ₁₃₉	CCTCTAGACC	S ₁₆₉	TGGAGAGCAG
S ₄₅₂	CAGTGCTGTG	S ₄₅₅	TGGCGTCCTT
S ₄₅₆	TCGGCGGTTC	S ₇₉	GTTGCCAGCC
S ₉₉	GTCAGGGCAA		

1.5 结果计算

将扩增产物在质量分数 1.2% 琼脂糖凝胶(含 70 μL/mL 溴化乙锭)上电泳,电压 3.5~4 V/cm,时间 2~3 h,电极缓冲液为 Tris-硼酸(0.5× TBE)系统,电泳结束后在紫外灯下拍照。统计清晰可变且重复的扩增片段,根据扩增片段出现与否构建“0”,

“1”信息矩阵。根据 Nei 氏片段共享度公式^[7]计算不同基因型间片段共享度(F),遗传距离(D)。

$$F = 2N_{xy}/(N_x + N_y), \quad D = 1 - F,$$

式中, F 为片段共享度或基因型相似系数, N_{xy} 为两样品共有片段数, N_x 和 N_y 分别为 X 样品和 Y 样品扩增的总带数。

2 结果与分析

2.1 不同引物对 6 个寄主桃蛀果蛾的扩增结果

用 25 种随机引物对 6 种寄主桃蛀果蛾群体混和 DNA 样品进行 RAPD 扩增。从扩增结果看,在所使用的 25 种引物中,只有 3 种引物(S_{359} 、 S_{447} 、 S_{456})在 6 种寄主桃蛀果蛾的 DNA 混和样品中都未出现标记,其余 22 种都产生了不同程度的 DNA 多态标记,各引物产生的标记数不同,最多 16 条,最少 1 条,其中有 10 种引物在 6 种寄主上都出现多态性条带,共记录到 171 个 RAPD 标记,123 个为多态性条带,多态百分比为 71.9%,标记的分子含 180~2 000 bp,最大的片段为 2 000 bp,最小的片段为 185 bp。图 1 分别为引物 S_8 与 S_{123} 的扩增图谱。

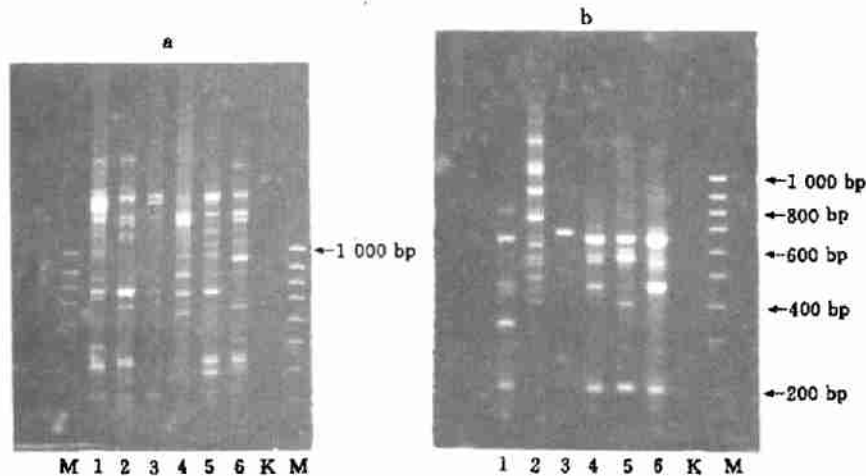


图 1 两种引物的 RAPD 扩增图谱

1. 苹果桃蛀果蛾;2. 梨桃蛀果蛾;3. 杏桃蛀果蛾;4. 酸枣桃蛀果蛾;5. 枣桃蛀果蛾;6. 山楂桃蛀果蛾;
K. 对照;M. Mark (Gene Ruler™) a. 引物 S_8 ; b. 引物 S_{123}

Fig. 1 Agarose gel patterns generated by RAPD amplifications with primers

1—6. *Carpocapsa sasakii* Matsumura of apple, pear, apricot, wild-jujube, jujube, hawthorn; K. Negative control; M. 1 kb molecular weight ladder
a. Primer S_8 ; b. Primer S_{123}

2.2 不同寄主桃蛀果蛾的遗传相似度与遗传距离

6 种寄主桃蛀果蛾群体之间的遗传相似度与遗传距离见表 2。

Ayala^[8]报道了果蝇(*Drosophila willstoni*)和无

脊椎动物群体间不同阶段进化分歧时的遗传差异,即遗传距离 $D(X \pm SD)$ 在不同阶段的值,地方种群 0.031 ± 0.007 ,亚种 0.230 ± 0.016 ,端始种 0.226 ± 0.033 ,同胞种 0.581 ± 0.039 ,形态上不同的种

1.056±0.08。

表2 6种寄主桃蛀果蛾基因型相似系数(对角线下)与遗传距离(对角线上)

Table 2 Matrix of genetic identity (below diagonal lines) and genetic distance (above diagonal lines) of *Carpocapsa sasakii* Matsumura populations among 6 hosts

寄主	苹果 Apple	梨 Pear	杏 Apricot	酸枣 Wild-jujube	枣 Jujube	山楂 Hawthorn
苹果 Apple		0.627	0.511	0.533	0.469 7	0.503 9
梨 Pear	0.373		0.689 9	0.704	0.589 5	0.529 8
杏 Apricot	0.498	0.310 1		0.479	0.514 2	0.612 4
酸枣 Wild-jujube	0.467	0.296	0.521 0		0.426 7	0.455 5
枣 Jujube	0.530 3	0.410 5	0.485 6	0.573 3		0.494
山楂 Hawthorn	0.496 1	0.470 2	0.387 6	0.544 5	0.506 0	

从表2可以看出,6种寄主桃蛀果蛾间遗传距离最大的是梨桃蛀果蛾与酸枣桃蛀果蛾,其次为梨桃蛀果蛾与杏桃蛀果蛾,遗传距离分别为0.704与0.689 9;枣桃蛀果蛾与酸枣桃蛀果蛾遗传距离最近,为0.426 7;6种寄主桃蛀果蛾的平均遗传距离

为0.542 6。参照上述标准,则表明不同寄主桃蛀果蛾之间的分化均在亚种水平上。

2.3 不同寄主桃蛀果蛾间的聚类分析

根据遗传距离,用UPGMA法构建了6种寄主桃蛀果蛾的分子聚类图,如图2。

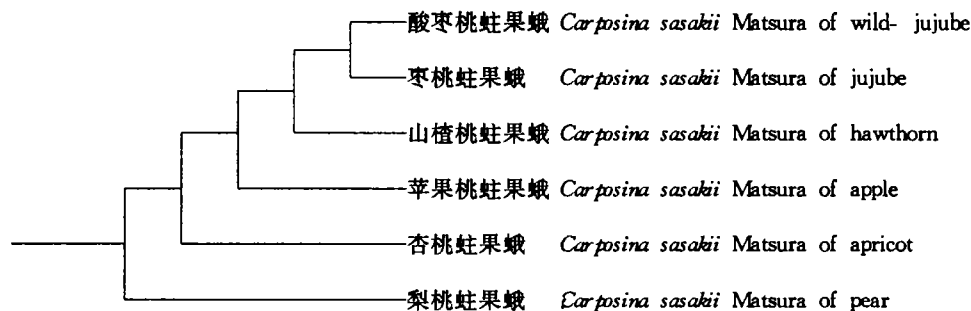


图2 6种寄主桃蛀果蛾遗传距离的UPGMA聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram for *Carpocapsa sasakii* Matsumura of genetic distance matrix among 6 hosts

从图2可以看出,梨桃蛀果蛾最先分离出来,其次为杏桃蛀果蛾、苹果桃蛀果蛾、山楂桃蛀果蛾,酸枣桃蛀果蛾与枣桃蛀果蛾遗传距离最近。

3 讨论

本研究结果表明,RAPD方法可以揭示不同寄主桃蛀果蛾的遗传差异。关于RAPD揭示不同物种遗传变异的研究,在昆虫学研究中有很多报道。但是单个RAPD标记得到的信息是很低的,模糊多态性是从简单的所选引物位点上扩增出不同核苷酸的细微差别得到的^[6]。RAPD反应的结果通过基因组序列与引物位点的竞争来部分决定^[8],扩增可以在很多位点移动,但扩增后在所有可能的产物中只有部分作为可见带而被揭示^[10]。在PCR中与引物对应的DNA被扩增是以其他DNA为代价的,一些DNA在特殊条件下可优先扩增^[11],这可能是研究中相同分子质量的带(迁移率相同)在有些寄主中产

生明亮的带,而在另一些寄主中产生模糊的带的原因。在结果统计分析中有些带由于很微弱而未考虑,所以计算得到的多态百分率可能比实际偏高。另外,在本研究中仅考虑了带的有无和带的位置,而没有考虑带的强度(包括亮度和宽度)。尽管许多带为共有带,但其亮度差异很大,这可能使一些信息未被考虑而造成分析的偏差。

总的来说,RAPD-PCR技术用于评价不同寄主桃蛀果蛾遗传变异的程度是可行的。不同寄主桃蛀果蛾由于寄主的强大选择压力,已经发生了较大的遗传分化,特别是梨桃蛀果蛾与杏桃蛀果蛾、酸枣桃蛀果蛾很可能已形成了不同的种(遗传距离很大)。由于对桃蛀果蛾遗传背景了解甚少及扩增时引物数偏少,可能带来些误差,所以关于不同寄主桃蛀果蛾的遗传分化究竟到什么水平(种,亚种还是寄主生物型)还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 蔡平,丁文正. 桃小食心虫危害石榴研究简报[J]. 中国果树,1990,(2),35—37.
- [2] 和喜田,王家民,张福珍. 山楂桃小食心虫生物学特性研究[J]. 中国果树,1993,(1),13—14.
- [3] 花蕾,花保祯,黄维利. 杏桃小食心虫的研究[J]. 植物保护学报,1998,25(2),141—144.
- [4] 花蕾,沈宝成. 酸枣桃小食心虫的初步研究[J]. 植物保护,1992,18(2),15—17.
- [5] 花蕾. 桃蛀果蛾在不同寄主上有关生物学特性差异的研究[J]. 西北农业大学学报,1993,(2),99—103.
- [6] John G K,Willimas A R,Kubelik K J,et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res,1990,18(22),6531—6535.
- [7] Nei M,Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1979,(76),5269—5273.
- [8] Ayala F J. Genetic differentiation during the speciation process[J]. Evol Biol,1975,(8),1—78.
- [9] Willimas J G K,Hanafey M K,Rafalski J A,et al. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers[J]. Methods Enzymol,1993,(218),704—740.
- [10] Hallden C,Hansen M,Nilsson N O,et al. Competition as a source of errors in RAPD analysis Theor[J]. Appl Genet,1996,(93),1185—1192.
- [11] Gibbs R A,Nguyen P,Caskey C T. Detectoion of single DNA base-differences by compective nologonucleotide printing[J]. Nucleic Acids Research,1989,(17),2437—2448.

RAPD-PCR analysis of genetic variation of *Carposina sasakii* Matsumura (Lepidoptera Carposinidae) in different host plants

HAN Qing-mei¹, HUA Lei²

(1 Collage of Animal Sciences and Veterinary Medicine, 2 Center of Studying Aried and Semiared Zone Agriculture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In this research, RAPD-PCR was adopted to analyse the genomic DNA of *Carposina sasakii* Matsumura of 6 host plants (apple, pear, apricot, jujube, wild-jujube, hawthorn) with 25 random primers. As a result, 22 of the 25 random primers showed variable polymorphic marks with the polymorphic frequency of 71.9%. Based on these results, we calculated the genetic distance of 6 populations. The average genetic distance of 6 populations was 0.542 6, of which the most distant is between wild-jujube and pear, and the nearest is between jujube and wild-jujube. At the same time, the molecular dendrogram of the 6 populations was constructed with UPGMA method.

Key words: *Carposina sasakii* Matsumura; RAPD-PCR; genetic variation; host