

文章编号: 1001-1498(2006)04-0423-08

# 紫胶虫主要生产种的 RAPD 分子标记分析

陈 航<sup>1,2</sup>, 陈晓鸣<sup>1,2\*</sup>, 冯 颖<sup>1,2</sup>, 叶寿德<sup>1,2</sup>

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:**用 RAPD 技术研究了紫胶虫 7 种主要生产种 12 个群体之间的亲缘关系, 研究中每个群体使用了 24 个标本, 共有 288 个个体用于研究。在试用的 45 种随机引物中, 筛选出 9 种引物用于随机引物扩增, 共得到 121 个清晰稳定的位点, 其中 118 个为多态性位点, 多态百分率为 97.52%, 每条引物检测到的位点数为 11~16 个, 长度为 150~3 000 bp。根据扩增结果, 用 UPGMA 法对 Nei's 遗传距离进行聚类分析, 构建分子系统树。7 种紫胶虫聚类结果显示: 紫胶虫各群体间的遗传距离为 0.044 3~0.791 7, 其中, 种间的遗传平均距离为 0.443 0, 种内的遗传平均距离为 0.170 7。根据聚类分析, 讨论了紫胶虫主要生产种的亲缘关系。

**关键词:** 紫胶虫; RAPD 分子标记; UPGMA 聚类分析; 遗传距离; 亲缘关系

中图分类号: S899.2

文献标识码: A

## Analysis of Relationships among the Main Commercial Species of Lac Insects Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

CHEN Hang<sup>1,2</sup>, CHEN Xiaoming<sup>1,2</sup>, FENG Ying<sup>1,2</sup>, YE Shou-de<sup>1,2</sup>

(1. Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. The Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** The technique of random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to study the relationships of 12 populations from 7 species in the genus *Kerria*. A total of 288 samples were used in this study and 24 samples for each population. In 45 primers under predetermined optimal reaction conditions, 9 primers were informative and yielded a total of 121 clear and reproducible loci. The percentage of polymorphic loci (PPB) was 97.52%. The amplified DNA loci of individual primer were 11~16, and their molecular size was 150~3 000 bp. The dendrogram were constructed based on Nei's genetic distance by UPGMA method. The cluster results showed the genetic distance between inter-population were 0.044 3~0.791 7, in which the average genetic distance among species was 0.443 0 while under species was 0.170 7. By analysis of molecular dendrogram, the genetic relationships among production species were discussed.

**Key words:** Lac insect; RAPD; UPGMA cluster; genetic distance; genetic relationship

紫胶虫是一类具有重要经济价值的资源昆虫, 属同翅目 (Homoptera) 胶蚧科 (Tachardiidae) 胶蚧属 (*Kerria*), 全世界记载并定名的有 19 种<sup>[1]</sup>。在长期与寄主植物的协同进化过程中, 紫胶虫经过长期积

累, 形成了丰富的种类和遗传变异, 在紫胶虫种内形成明显分化特征而遗传下来, 形成了多个变异的品系、种源和遗传多态现象 (多色型现象)。这也使得以形态学为依据的传统分类方法遇到了困难, 需要

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 国家自然科学基金“紫胶虫种质资源库建立及紫胶虫遗传规律研究”(30371165)、科技部基础专项“资源昆虫种质资源收集、整理、保存”(2000DEB100035)和国家攻关“特种林产资源高效生产与精深加工技术研究”(2004BA502B04)项目研究内容

作者简介: 陈 航 (1977—), 男, 四川万源人, 博士生。

\* 通讯作者

用分子生物学方法对紫胶虫的分类地位进行补充和证实,对其亲缘关系进行深入研究分析。

对于蚘胶属各种间分类研究,前人作了大量的工作,Varshney<sup>[2]</sup>对紫胶科分类进行了系统的研究。欧炳荣等<sup>[3,4]</sup>分别对紫胶蚘(*Kerria lacca* Kerr.)与国内生产种进行光学显微和电镜扫描的观察对比,发现国内生产种与紫胶蚘在膊器、膊筛、肛上板等形态特征上存在显著区别,并将国内紫胶虫鉴定为一个新种,定名为云南紫胶虫(*Kerria yunnanensis* Ou et Hong)。陈晓鸣等<sup>[5,6]</sup>对紫胶蚘、云南紫胶虫、榕树紫胶虫(*Kerria fici* Green)和信德紫胶虫(*Kerria sindica* Mahdihassan)进行了初步杂交试验,研究发现紫胶蚘、榕树紫胶虫和信德紫胶虫同属热带虫种,亲缘关系较近;而我国生产用紫胶虫(以前一直认为是 *K lacca*)与紫胶蚘(*K lacca*)杂交后并不能产生子代,证明了我国生产所用紫胶虫应为云南紫胶虫。周朝鸿等<sup>[7]</sup>对紫胶蚘、云南紫胶虫、榕树紫胶虫、信德紫胶虫和田紫胶虫(*Kerria nuralis* Wang) 5种紫胶虫雌虫的染色体做了初步研究,通过比较核型特征,推断出紫胶蚘、榕树紫胶虫和信德紫胶虫 3种紫胶虫亲缘关系较近,而云南紫胶虫和田紫胶虫与上述 3种亲缘关系较远;进一步从细胞遗传学角度验证了我国主要生产种不是紫胶蚘,而应为云南紫胶虫。陈晓鸣<sup>[1]</sup>运用同功酶电泳技术对紫胶蚘,云南紫胶虫,榕树紫胶虫和信德紫胶虫的酯酶和过氧化物酶进行分析,发现 4种紫胶虫在酯酶和过氧

化物酶同功酶谱上均存在差异,而且两种酶谱具有种的特征,因此同功酶可作为种间鉴别的一个指标,首次从分子水平上研究了紫胶虫的种间遗传差异。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术是 Williams和 Welsh等人于 1990年首次提出的一项 DNA 多态性检测技术。由于 RAPD 技术能够简单、快速地检测生物间的遗传差异,其所需的 DNA 材料极少,对于研究微小昆虫十分有利<sup>[8-10]</sup>。自 1992年以来,RAPD 技术被应用于微小昆虫的种类鉴定、生物型识别和遗传变异研究<sup>[11-13]</sup>,但在紫胶虫的研究方面,目前尚未有相关的报道。本文运用 RAPD 技术对 7种生产用紫胶虫 12个群体的基因组 DNA 多态性进行了分析,对它们的亲缘关系和系统进化进行探讨,以期对紫胶虫的种质资源研究提供相关的遗传背景资料和理论依据,并为使用分子标记辅助育种打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试的紫胶虫标本均采自实验站和野外田间,采集后浸泡在无水乙醇中,放置在 -20℃ 冰箱中长期保存,并依据其形态特征用传统分类学方法进行鉴定。标本的种类、数量、寄主及采集时间与地点见表 1。

表 1 7种紫胶虫(12个群体)供试样本基本情况

名称	寄主树	样本数	采集地点	采集时间 (年/月)	代码
云南紫胶虫	秧青 <i>Dalbergia assamica</i> Benth	24	中国林科院资源昆虫所景东实验站	2004-07	Cy
云南紫胶虫	牛肋巴 <i>Dalbergia obtusifolia</i> Prain	24	中国林科院资源昆虫所景东实验站	2004-07	Cm
紫胶蚘(兰吉尼)	滇刺枣 <i>Zizyphus mauritiana</i> Lam.	24	中国林科院资源昆虫所元江实验站	2005-06	RAN
紫胶蚘(库斯米)	久树 <i>Schleichera oleosa</i> Lour	24	中国林科院资源昆虫所元江实验站	2005-06	Lf
中华紫胶虫 <i>K chinensis</i> Mahdihassan	荔枝 <i>Litchi chinensis</i> Sonn	24	泰国青莱	2004-11	Tl
中华紫胶虫	雨树 <i>Samanea saman</i> (Jacq.) Merr	24	泰国青莱	2004-11	Ty
尼泊尔紫胶虫 <i>K nepalensis</i> Varshney	大叶千斤拔 <i>Floringia macrophylla</i> Wil	24	缅甸(低海拔地区)	2003-12	Ml
普萨紫胶虫 <i>K pusana</i> Misra	苏门答腊金合欢 <i>Acacia montana</i> Benth	24	缅甸(东枝、腊叙等高海拔地区)	2005-06	Mh
田紫胶虫(黄色型)	铁藤 <i>Pueraria tonkinensis</i> Gagn	24	云南西双版纳自治州普文	2003-08	Ry
田紫胶虫(红色型)	铁藤	24	云南西双版纳自治州普文	2003-08	Rr
信德紫胶虫	聚果榕 <i>Ficus racemosa</i> Linn	24	中国林科院资源昆虫所元江实验站	2005-06	Sj
信德紫胶虫	万年青 <i>Ficus glabella</i> Bl	24	中国林科院资源昆虫所元江实验站	2005-06	Swf

## 1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 在冻存的酒精标本中,随机选择形体完整的虫体,待其表面酒精挥发后,对整虫体进行总 DNA 提取,具体步骤参见田英芳等<sup>[14,15]</sup>的提取方法并作适当的改进,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度与浓度,提出的总 DNA 用去离子水溶解,保存在 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 引物筛选 随机引物由上海 Sangon 公司设计合成,共 45 条,每条引物长 10 bp,经预备实验选出能产生丰富多态位点,谱带清晰且重复性强的 9 条引物,分别对 7 种紫胶虫 12 个群体各 24 个体 DNA 进行扩增。

1.2.3 RAPD-PCR 扩增 采用 20 μL 反应体系:其中模板 DNA 50 ng,引物(上海 Sangon 合成)66 ng, MgCl<sub>2</sub>浓度 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>(Taq 酶配套), 10 × Buffer (Taq 酶配套)2 μL, dNTP 浓度 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, Taq 酶浓度为 2 U。用去离子水代替模板 DNA 设置对照。

扩增程序为:95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min,共 40 个循环。最后,72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增仪使用美国 MJ 公司 PTC-200 型,标准分子量使用 100 bp DNA Ladder,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电泳缓冲液为 1 × TBE,溴化乙锭(0.5 μg·mL<sup>-1</sup>)染色 30 min,置于 UVP-8000 凝胶成像系统下检测 RAPD 谱带。

1.2.4 数据处理与分析 根据凝胶成像系统记录的照片统计清晰稳定的扩增片段,借助 Marker 计算不同片段的分子量大小,并同时用数字“0”和“1”分别表示扩增片段在某一特定位置的无或有,从而将 RAPD 谱带转换为矩阵数据,使用 POPGENE32 软件计算遗传一致度(I)和遗传距离(D)。运用 MEGA3 软件对遗传距离进行不加权算术平均组对法(UPGMA)聚类分析,构建分子系统树。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

用筛选出的 9 条随机引物对来自胶蚧属主要生产种 12 个群体 288 个个体的紫胶虫基因组 DNA 进行扩增,每条引物检测到的位点数为 11~16,共检测到 121 个清晰稳定的位点,其中有 118 个多态性位点,多态百分率为 97.52%,平均每条引物扩增的位点数为 13.4 个,长度为 150~3 000 bp。随机引物的碱基序列及扩增条带数见表 2。

表 2 随机引物的碱基序列及扩增条带

引物	引物序列 (5'-3')	扩增位 点数	引物	引物序列 (5'-3')	扩增位 点数
S6	TGCTCTGCCC	11	S7	GGTGACGCAG	14
S8	GTCACACGG	11	S43	GTCGCCGTCA	16
S71	AAAGCTGCGG	14	S88	TCACGTCCAC	12
S103	AGACGTCCAC	15	S319	TGGCAAGGCA	15
S62	GTGAGCCGTC	13	Total		121

从表 2 可知,扩增位点数最多的为 S43,为 16 个;扩增位点数最少的为 S6 和 S8,均为 11 个。同一群体 24 个个体在同一引物下扩增的条带基本一致(图 1),而不同种在同一引物扩增下显示出多态性差异(图 1、2),用不同引物扩增同一群体,产物也有显著差异(图 2、4)。部分 RAPD 扩增结果见图 1~4。

### 2.2 遗传距离、遗传一致度和聚类分析

采用 Nei's 无偏遗传距离的算法,对 7 个种和 12 个不同群体间的遗传距离和遗传一致性进行测度计算,得到各分类群的距离系数和一致性系数矩阵(表 3~4),根据遗传距离用 UPGMA 聚类法构建分子系统树(图 5)。

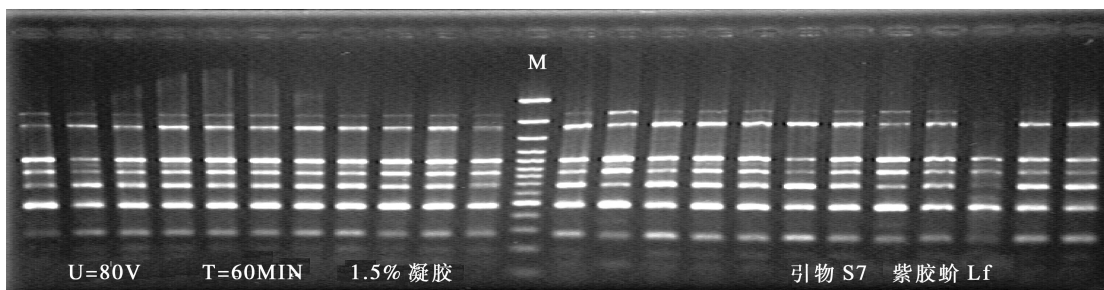


图 1 引物 S7 对紫胶蚧库斯米品系 24 个个体的 RAPD 扩增结果(M 表示分子量标准 Marker 的位置,下同)

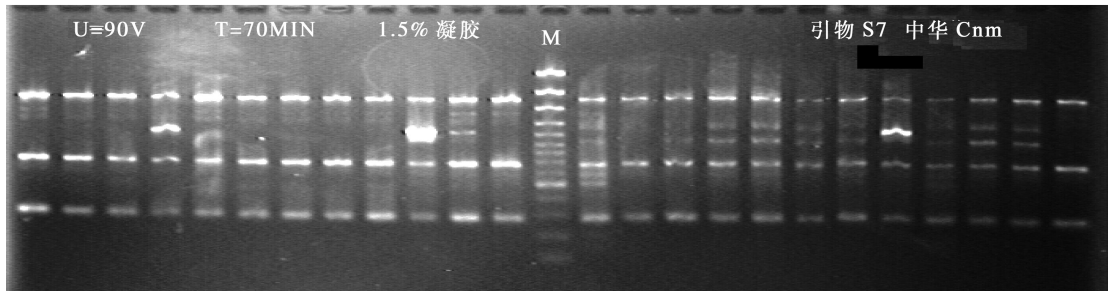


图 2 引物 S7对云南紫胶虫 24个体的 RAPD扩增结果

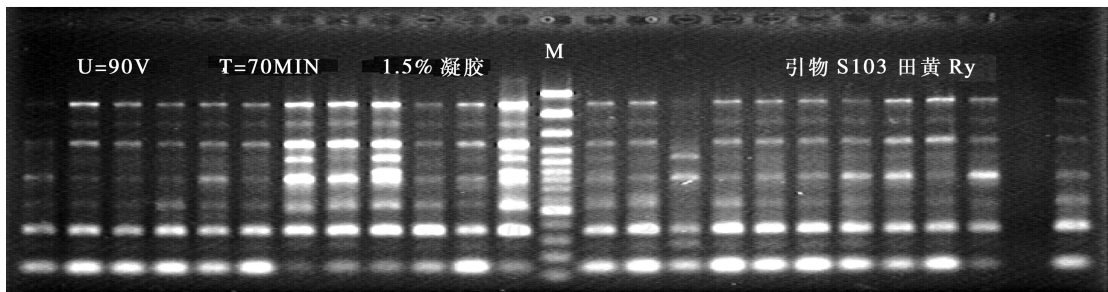


图 3 引物 S103对田紫胶虫 (黄色型) 24个体的 RAPD扩增结果

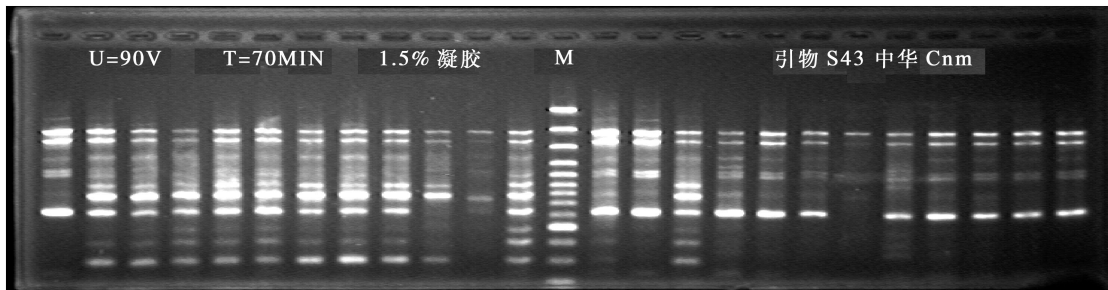


图 4 引物 S43对云南紫胶虫 24个体的 RAPD扩增结果

表 3 紫胶虫 12个不同群体的遗传距离 (D) (下三角)和遗传一致性 (I) (上三角)

名称	云南紫胶虫 (牛肋巴)	云南紫胶虫 (秧青)	紫胶蚧 库斯米 品系	紫胶蚧 兰吉尼 品系	普萨紫胶虫	尼泊尔紫胶虫	田紫胶虫 (红色型)	田紫胶虫 (黄色型)	信德紫胶虫 (金合欢)	信德紫胶虫 (万年青)	中华紫胶虫 (雨树)	中华紫胶虫 (荔枝)
云南紫胶虫 (牛肋巴)		0.915 1	0.492 4	0.533 2	0.774 4	0.777 5	0.796 5	0.817 6	0.624 4	0.651 1	0.560 9	0.604 1
云南紫胶虫 (秧青)	0.088 8		0.508 0	0.532 0	0.739 7	0.712 9	0.761 4	0.754 2	0.613 7	0.657 2	0.580 5	0.621 7
紫胶蚧库斯米品系	0.708 4	0.677 3		0.783 7	0.531 1	0.597 9	0.550 8	0.566 3	0.710 0	0.733 3	0.527 7	0.466 1
紫胶蚧兰吉尼品系	0.628 9	0.631 1	0.243 8		0.572 1	0.625 2	0.571 3	0.585 7	0.665 4	0.662 1	0.587 8	0.577 1
普萨紫胶虫	0.255 7	0.301 6	0.632 8	0.558 4		0.776 8	0.831 1	0.817 9	0.602 3	0.583 7	0.518 7	0.607 3
尼泊尔紫胶虫	0.251 7	0.338 5	0.514 3	0.469 7	0.252 6		0.773 5	0.802 7	0.657 1	0.609 9	0.630 2	0.644 0
田紫胶虫 (红色型)	0.227 5	0.272 6	0.596 4	0.559 9	0.185 0	0.256 8		0.956 7	0.624 5	0.633 4	0.600 1	0.610 8
田紫胶虫 (黄色型)	0.201 4	0.282 1	0.568 6	0.534 9	0.201 0	0.219 8	0.044 3		0.654 7	0.657 9	0.597 6	0.604 5
信德紫胶虫 (金合欢)	0.471 0	0.488 3	0.342 5	0.407 4	0.507 1	0.419 9	0.470 8	0.423 6		0.873 5	0.529 3	0.520 3
信德紫胶虫 (万年青)	0.429 1	0.419 7	0.310 2	0.412 4	0.538 3	0.494 4	0.456 7	0.418 7	0.135 2		0.475 7	0.453 1
中华紫胶虫 (雨树)	0.578 3	0.543 9	0.639 3	0.531 4	0.656 4	0.461 8	0.510 6	0.514 8	0.636 3	0.742 9		0.710 7
中华紫胶虫 (荔枝)	0.504 1	0.475 3	0.763 4	0.549 7	0.498 7	0.440 0	0.492 9	0.503 3	0.653 4	0.791 7	0.341 5	

表 4 7种紫胶虫的遗传距离(D)(下三角)和遗传一致性(I)(上三角)

名 称	云南紫胶虫	紫胶蚧	普萨紫胶虫	尼泊尔紫胶虫	田紫胶虫	信德紫胶虫	中华紫胶虫
云南紫胶虫		0.532 8	0.773 9	0.777 0	0.796 0	0.624 0	0.560 5
紫胶蚧	0.629 7		0.571 8	0.624 9	0.571 0	0.665 1	0.587 5
普萨紫胶虫	0.256 3	0.558 9		0.776 6	0.830 8	0.602 1	0.518 6
尼泊尔紫胶虫	0.252 3	0.470 2	0.252 9		0.773 2	0.657 0	0.630 0
田紫胶虫	0.228 2	0.560 4	0.185 4	0.257 2		0.624 3	0.599 9
信德紫胶虫	0.471 6	0.407 9	0.503 7	0.420 1	0.471 1		0.529 2
中华紫胶虫	0.578 9	0.531 9	0.656 7	0.462 1	0.511 0	0.636 5	

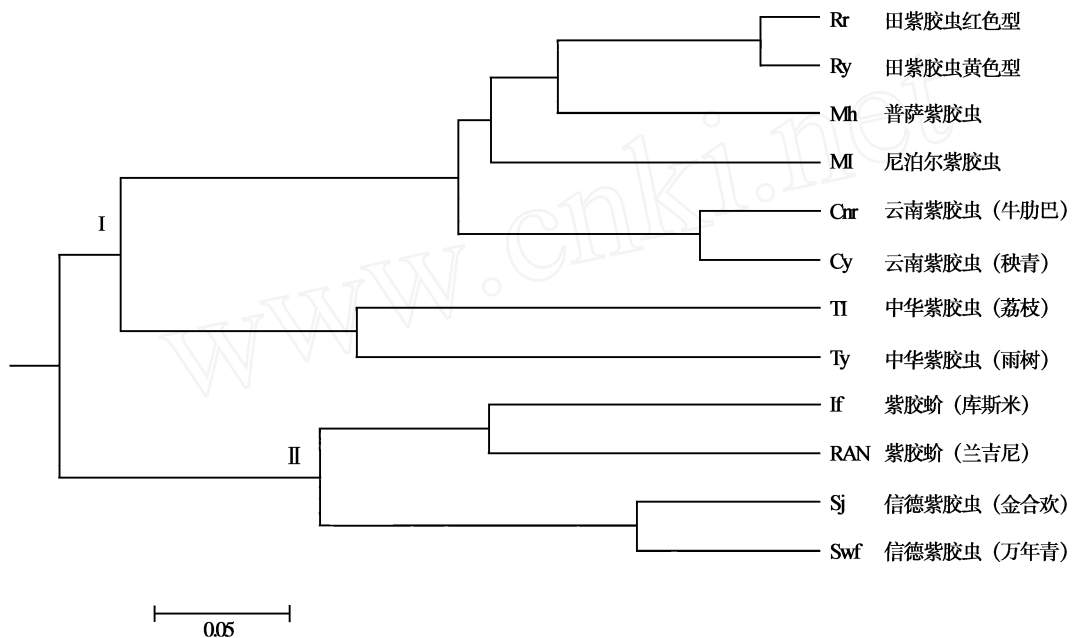


图 5 紫胶虫 12 个群体的 UPGMA 聚类树状图

遗传距离是衡量群体间或物种间遗传差异或遗传分化的重要参数,是以两个群体或两个物种间同一座位上相同等位基因频率差异的函数来测量。在本研究所得距离系数矩阵中(表 3、4),紫胶虫各群体间的遗传距离为 0.044 3~0.791 7,其中,种间的遗传平均距离为 0.443 0,种内的遗传平均距离为 0.170 7,各种间的遗传差异明显大于种内各群体间的差异。

从种内的遗传距离来看(表 3),亲缘关系最近的两个群体是田紫胶虫红、黄两种色型,其距离系数仅为 0.044 3,遗传相似程度最高,这可能与两种色型生活在同一寄主树、生态环境近似有关;而在田紫胶虫黄色型分离试验中发现:黄色雌成虫所产生的子代幼虫均保持了纯黄色,这表明黄色性状是遗传的,体色的差异可能是遗传物质在起作用<sup>[16]</sup>。关于多色型的起源,目前存在两种不同的观点:一种认为

生物的体色差异是由环境造成,是适应环境的一种表象;另一种观点则认为不同的体色完全是由生物的遗传突变决定的,与所在的环境无关。尽管从 RAPD 扩增图谱上也很难分出红、黄两型的区别,该实验也不支持环境造成体色差异这样的结论,因为这可能与选择的随机引物有关,当引物序列与突变基因不能相互匹配与识别时,那么 RAPD 也就无法检测出相对应的遗传差异。还需要进一步选用其它引物作 RAPD 扩增或测序后进行核苷酸序列比对,才能明确形成不同体色的真实原因。

紫胶蚧两个品系生活周期各不相同,形成两种寄主专业化型。库斯米品系只能生长在久树上,而兰吉尼品系生长在一种榕树(*Ficus* sp.)和宝树(*Butea monosperma* Lain.)上,不生长在久树上<sup>[11]</sup>,它们之间的遗传距离为 0.243 8;来自不同寄主树的两类云南紫胶虫和信德紫胶虫,由于它们尚未形成寄主专化

型,所以同种内两个群体间遗传相似性更高,其遗传距离分别为 0.088 8 和 0.135 2,比紫胶蚧两个品系间的距离更近;两类中华紫胶虫不但在寄主树上存在差异,而且分别采自泰国不同的地区,因而遗传相似程度最低,其距离系数为 0.341 5,亲缘关系最远。从育种的角度分析,双亲的遗传距离越远,遗传差异越丰富,子代出现优良性状的机率就越高,而且同种内不存在生殖隔离,因此在良种选育过程中,选择这两类中华紫胶虫作为亲本是值得考虑的方案。

从种间的遗传距离来看(表 4),普萨紫胶虫与田紫胶虫距离为 0.185 4,二者遗传距离最小,其遗传一致度最大,亲缘关系密切,在外部形态上两者也较相似:除在体形大小较为接近以外,还具有膊臂紧贴体壁,抬起不明显,前气门紧靠膊臂,前气门角质化痕迹退化等共同特征。由于两者的遗传距离与种内的平均距离值(0.170 7)接近,且原产地缅甸北部与中国云南普文毗邻,有类似的气候环境,所以有可能是同一种下的不同亚种,但目前普萨紫胶虫中没发现有红、黄两型分化,还要做更深入的研究才能得出定论。中华紫胶虫与普萨紫胶虫的距离为 0.656 7,在种间遗传距离最大,其遗传一致度最小。两者在体形上也相差很大,前者是后者的 5~7 倍;中华紫胶虫的角质化痕迹长约 0.54~2.21 mm,在所收集到的虫种中为最长;而普萨紫胶虫角质化痕迹几乎完全退化;另外,中华紫胶虫膊臂明显抬起,凹陷的面积狭小,这都与普萨紫胶虫形成了鲜明的对比。

根据杂交试验<sup>[5,6]</sup>的结果,信德紫胶虫与紫胶蚧(距离系数 0.407 9)杂交后能正常孕卵并产生子代;而云南紫胶虫与紫胶蚧(距离系数 0.629 7),云南紫胶虫与信德紫胶虫(距离系数 0.471 6)杂交后,均不能孕卵和产生子代,说明杂交的成功与亲本间的亲和性有着密切的关系,这种亲和性若以遗传距离为参考标准,那么选择遗传距离低于平均值 0.443 的双亲组合,则更有可能获得成功。

从系统树的拓扑结构(图 5)可以看出,同种内的不同群体(包括田紫胶虫红黄两型,紫胶蚧两个品系,云南紫胶虫、中华紫胶虫和信德紫胶虫的两种不同寄主型)聚在一起,形成 5 个姐妹群,分别与 5 个不同独立的虫种对应契合(图 5);这 5 个种再与普萨、尼泊尔两种紫胶虫进行聚类,结果 7 种虫种最终归属为 2 两大分支(图 5):在第 1 分支中,田紫胶虫与尼泊尔紫胶虫、普萨紫胶虫亲缘关系紧密,先

聚在一起,再与云南紫胶虫合为一族,最后与中华紫胶虫聚类,形成一大支系,其中田紫胶虫与中华紫胶虫的亲缘关系较远,分别位于分支内的两端。在第 2 分支中,信德紫胶虫与紫胶蚧构成一个自然进化枝,与其它 5 种紫胶虫亲缘关系较远,从群体中分支出来,形成单独的支系。

### 3 讨论

#### 3.1 7 种紫胶虫间的亲缘关系

从聚类结果(图 5)来看,在分支 1 中,田紫胶虫与普萨紫胶虫的亲缘关系最近,尼泊尔紫胶虫的肛突发育良好,分为两节,与前两种相区别,在系统树上也位于较远的分支;云南紫胶虫的肛上板筒状,宽大长,这与前面 3 种明显不同,亲缘关系较远;中华紫胶虫是分支 1 中虫体最长的一个种,而且前气门远离膊臂,在前气门下方的角质化痕迹明显长于其它 4 种,与它们的亲缘关系最远,位于系统树分支的基部。

在分支 2 中,信德紫胶虫与紫胶蚧亲缘关系较近,聚为单独的一支,与分支 1 中 5 个虫种间的遗传关系较为疏远。这可能与这两种虫种的独特的生态环境有关,它们的原产地气候均属热带半干旱气候类型,年均气温在 22℃ 以上,降水量为 400~1 200 mm。中华紫胶虫和田紫胶虫虽然也同属热带虫种,但主要分布在热带湿润地区,年降水量在 1 300 mm 以上;云南紫胶虫生活在亚热带地区,年均气温为 14~20℃。在长期的进化过程中,不同的紫胶虫种类对生态环境产生了不同的适应机制,并逐渐形成遗传上的一些差异,积累下来形成了目前的系统发育关系。

紫胶虫主要分布于亚洲的热带、亚热带地区和澳大利亚地区,大致分布在 77°E~120°E, 8°~26°N 范围内<sup>[11]</sup>,从昆虫地理区系划分,则从属古北区、东洋区和澳洲区<sup>[17]</sup>。虽然本研究所选用的标本均来自东洋区,但从板块构造上,信德紫胶虫与紫胶蚧原产地为孟加拉国、印度,属于印度板块;其它 5 种紫胶虫来自中国云南省、泰国和缅甸北部,属欧亚大陆板块。根据地质研究,在三叠纪末期(约 1.9 亿年前),印度板块与古南大陆分开,开始长距离北移,与古北大陆的欧亚板块碰撞并插入,造成青藏高原隆起与古地中海西退<sup>[18]</sup>。据已有的化石记录,最古老的昆虫化石发现于古生代泥盆纪层积岩中,距今约 3.5~4 亿年以前;而蚧虫化石最早可见于古生代石

炭纪晚期,约 2 亿年前<sup>[19]</sup>。也就是说,在印度板块与欧亚大陆合并之前,蚘虫类已在两块大陆上长期隔离生存了,虽然它们起源于联合大陆的共同祖先,但各自独立的环境,使得在长期的进化过程中保持了各异的遗传特征,形成了不同的支系,这也许就是信德紫胶虫与紫胶蚘与其它 5 种紫胶虫遗传距离较大、亲缘关系较远的原因所在。

聚类结果除与陈晓鸣等<sup>[5,6]</sup>进行的初步杂交试验结论相一致以外,同时也与周朝鸿<sup>[7]</sup>等所做染色体初步研究结论相符合,通过比较各种的核型特征,发现云南紫胶虫和田紫胶虫明显不同于信德紫胶虫与紫胶蚘,它们的第 1、2 号染色体的臂比值明显高于另外两种,染色体类型为近端部着丝点染色体,另外两种为中部或近中部着丝点染色体,推断出信德紫胶虫与紫胶蚘亲缘关系较近,而云南紫胶虫和田紫胶虫与上述两种亲缘关系较远。RAPD 分析与这些结论的吻合,说明实验中建立 RAPD 体系较为稳定可靠,RAPD 技术在胶蚘属亲缘关系的研究中具有良好的适用性。当然,RAPD 技术并不能解决所有系统发育上的问题,RAPD 分析结果有时与传统形态分类存在一些分歧,如普萨紫胶虫、云南紫胶虫和信德紫胶虫的肛突宽大长,在形态分类上被明确的归为一类,而 RAPD 聚类的结果则将三者分在不同的两大支系中(图 5)。因此,在紫胶虫系统发育的研究中,只有将分子、形态以及细胞学等方面的数据结合起来分析,才能得出较为客观的结论。

### 3.2 RAPD 技术的稳定性探讨

RAPD 技术由于引物碱基数很少(10 bp),所以灵敏度很高,很容易受到反应条件的影响而使产物发生改变,导致扩增结果的不稳定性,它的重复性一直是许多学者关注的重点。RAPD 扩增片段的多少及重复性除了与基因组特性有关之外,也受到扩增体系(如模板 DNA 的纯度、 $Mg^{2+}$  浓度、dNTP 浓度、Taq 酶的用量)及外部因素(反应程序,凝胶电泳的类别和胶的质量等)的影响<sup>[20,21]</sup>。

在参考前人工作的基础上,重点关注反应体系中  $Mg^{2+}$  与 dNTP 不同浓度搭配,主要方法是在保持其它因素不变的情况下,只对其中一项进行梯度实验,从而得出一个优化的反应体系。在 20  $\mu$ L 的反应体系中,分别采用如下的梯度实验:模板(25、50 ng)、Taq 酶(1、1.5、2 U)、dNTP(0.25、0.50、0.96、1.42、2.00、2.50  $mmol \cdot L^{-1}$ ),  $Mg^{2+}$ (1.20、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50、2.75  $mmol \cdot L^{-1}$ ),通过多次

预实验,最终筛选出最佳的反应体系。

另外,模板 DNA 的纯度对 RAPD 扩增条带的重复性有很大影响。在研究中采用酚、氯仿多次抽提,较为彻底的清除蛋白质的干扰,加入少量异戊醇以消除混匀时所产生的泡沫,使用氯仿去除色素、RNA 酶,从而使提出的 DNA 的相对纯度较高,杂质较少,扩增出的条带数较稳定。从实验中作者发现,尽管 RAPD 反应存在较多的影响因素和潜在的不稳定性,但可以通过一些有效的措施来实现 RAPD 结果重复性和可靠性。

与其它分子标记技术相比,RAPD 标记具有下列优点:RAPD 技术可以在对受试物种缺乏任何分子生物学研究的背景下,直接对基因组进行多态性分析;RAPD 标记位点多,利用一系列引物可以使检测区域覆盖整个基因组;RAPD 所需模板量极小,可从毛发、脱落组织或排泄物中提取微量 DNA 直接进行扩增,这对于研究珍稀物种的基因组分析十分有效<sup>[22,23]</sup>;同时 RAPD 技术还具有操作步骤少,周期短,费用低等优点。紫胶虫体型微小,从单头虫提取出的 DNA 量极少,同时缺乏相关的分子生物学研究,因此对于研究紫胶虫的系统发育与遗传背景来说,RAPD 是一种有效的分子标记方法。

### 参考文献:

- [1] 陈晓鸣. 紫胶虫生物多样性研究 [M]. 昆明:云南科技出版社,2005
- [2] Varshney R K. Taxonomic studies on lac insects of India (Homoptera: Tachardiidae) [J]. Orient Insects (supplement), 1976 (5): 1~97
- [3] 欧炳荣,洪广基. 紫胶虫外部形态扫描电镜观察 [J]. 林业科学研究, 1990, 3(2): 133~136
- [4] 欧炳荣,洪广基. 云南紫胶虫外部形态扫描电镜观察 [J]. 林业科学研究, 1991, 4(3): 269~272
- [5] 陈晓鸣,王绍云,毛玉芬,等. 四种紫胶虫雄性外生殖器观察及初步杂交试验 [J]. 林业科学研究, 1992, 5(2): 236~238
- [6] 陈晓鸣,王绍云,毛玉芬,等. 紫胶虫杂交试验 [J]. 林业科学研究, 1995, 8(专刊): 13~18
- [7] 周朝鸿,王自力,王绍云,等. 紫胶虫核型的初步研究 [A]. 资源昆虫研究进展 [C]. 云南:云南科技出版社, 1999: 36~42
- [8] 李学斌. RAPD 技术在动物遗传变异中的应用 [J]. 云南畜牧兽医, 1997(2): 34~37
- [9] 龚鹏,杨效文,谭声江,等. 分子遗传标记技术及其在昆虫科学中的应用 [J]. 昆虫知识, 2001, 38(2): 86~91
- [10] 蒋国芳,陆敢,黄琨,等. 用 RAPD 标记研究蚘属 5 个种间的亲缘关系 [J]. 昆虫学报, 2002, 45(4): 499~502
- [11] 郑哲民,黄刚. 蠹蚘总科部份属种 RAPD 带型变异的比较研究 [J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2000, 28(3): 96~99

- [12] Black IV W C, DuTeau N M, Puterka G J, *et al* Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids[J]. Bulletin Entomological Research, 1992, 82: 151 ~ 159
- [13] 朱道弘, 安藤喜一, 城田安幸. 利用 RAPD 对稻蝗属昆虫亲缘关系的研究[J]. 昆虫学报, 2001, 44 (3): 316 ~ 320
- [14] 田英芳, 黄刚, 郑哲民, 等. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1999, 27 (4): 82 ~ 84
- [15] 杨子祥, 冯颖, 陈晓鸣. 一种有效的蚜虫基因组 DNA 提取方法[J]. 林业科学研究, 2005, 18 (5): 641 ~ 643
- [16] 洪广基. 田紫胶虫 (*Kerria nivalis* Wang) 黄色型分离培育初探[J]. 资源昆虫, 1986 (1): 44 ~ 46
- [17] 章士美. 昆虫的分布区系[J]. 江西农业大学学报, 1984, 18 (01): 11 ~ 17
- [18] 许再富. 古今演变中的云南植物若干特点探讨[J]. 广西植物, 2003, 23 (4): 299 ~ 302
- [19] 王子清. 中国动物志, 昆虫纲, 第二十二卷, 同翅目, 蚱总科[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [20] 田英芳, 郑哲民. 七种蟋蟀基因组 DNA 的 RAPD 多态性研究[J]. 昆虫分类学报, 2001, 23 (4): 248 ~ 252
- [21] Zhang Sufang, Yang Xiaowen, Ma Jisheng. A study on genetic distance among different taxa of aphids (Homoptera: Aphidoidea) [J]. Entomologia Sinica, 2000, 7 (3): 235 ~ 242
- [22] 陈永久, 张亚平. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究[J]. 动物学研究, 1997, 18 (2): 211 ~ 227
- [23] 成新跃, 周红章, 张广学. 分子生物学技术在昆虫系统学研究的应用[J]. 动物分类学报, 2000, 25 (2): 121 ~ 133

www.cnki.net