

抗药性二斑叶螨的分子标记初探

周星石

(哈尔滨市香坊区幸福镇人民政府, 哈尔滨 150036)

1 材料与方法

1.1 供试叶螨品系

供试二斑叶螨抗性品系: 由敏感品系经过多代抗性选育获得。

1.2 化学药品与试剂

CTAB(溴化十六烷三甲基铵); 琼脂糖, 溴乙锭; DL2000Marker; TaqDNA 聚合酶、 $10\times$ 反应缓冲液、 $MgCl_2$ 、DNTP。

1.3 仪器与设备

PTC-200 PCR 扩增仪; FinePixS602ZOOM 数码相机; 微量移液枪; Air Tech 无菌操作台; JA2003 型电子天平; TCL-16G 型台式离心机; HH-4 型数显恒温水浴锅; 85-1 型恒温磁力搅拌器等。

1.4 基因组 DNA 的提取

将适量二斑叶螨挑到滤纸上, 放入漏斗中。用灭菌水清洗一次后, 将虫体装入 1.5 mL 离心管中。向管中加入 50 μ L 提取缓冲液, 置于 $-20^\circ C$ 冰箱中, 5 min 后取出, 用研磨棒捣碎, 匀浆; 研磨棒用 150 μ L 提取缓冲液冲洗; 离心管置于 $65^\circ C$ 水浴保温 1 h; 再加入 500 μ L 氯仿异戊醇(24 : 1)反复混匀, $13\ 000\ r\cdot\min^{-1}$ 离心 15 min; 取上清液, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 轻轻混匀, 出现少数絮状沉淀, 放置于 $-20^\circ C$ 1 h 以上; 沉淀用新昆虫针挑出, 移入新管后于室温下晒干; 在离心管中加入 50 μ L 无菌双蒸水, 沉淀充分溶解后, 保存于 $-20^\circ C$ 备用。

1.5 DNA 浓度测定(琼脂糖凝胶电泳法)

$5\times$ TBE 电泳缓冲液: 称取 27 g Tris、13.75 g 硼酸, 溶于适量蒸馏水中, 加入 10 mL EDTA ($pH8.0$), 蒸馏水定容至 500 mL, 高压蒸汽灭菌, 制成 $5\times$ TBE 母液, 储藏于 $4^\circ C$ 备用。用时稀释为 $1\times$ TBE。

0.1% 溴酚蓝点样缓冲液: 称取溴酚蓝 100 mg, 加 ddH₂O 10 mL, 室温下过夜, 待溶解后再称取蔗糖

50 g, 加 ddH₂O 溶解后移入溴酚蓝溶液中, 混匀后加 ddH₂O 定容到 100 mL, 加 10N NaOH 1~2 滴, 调制蓝色。于 $4^\circ C$ 冰箱内保存备用。

$1\ mg\cdot mL^{-1}$ 溴化乙锭溶液(EB): 称取 1 mg 溴化乙锭溶于 1 mL ddH₂O 中。

配制 1.2% 琼脂糖凝胶: 称取 1.2 g 琼脂糖, 放入三角瓶中, 加入 $1\times$ TBE 缓冲液 100 mL, 微波炉溶解; 待溶化好的琼脂糖冷却至 $60^\circ C$ 左右时, 加入 EB 溶液使其中浓度为 $0.5\ \mu g\cdot mL^{-1}$, 混匀; 将电泳槽胶水平放置; 选择适宜的点样梳, 倒入厚度为 3~5 mm 左右的琼脂糖凝胶溶液, 放置 25 min 至胶完全硬化; 小心拔出点样梳, 将胶槽放入电泳槽, 点样孔一端靠近电泳槽的负极; 加入 $1\times$ TBE 缓冲液, 液面高于胶面 1~2 mm, 待用。

取 10 μ L 0.1% 溴酚蓝点样缓冲液加入 PCR 管中, 离心混匀; 取 10 μ L 混匀后的样品加于 1.2% 琼脂糖凝胶孔中电泳。80 V 稳压电泳 1 h 左右, 254 nm 紫外灯下观察。

1.6 随机引物序列

所选用的随机引物序列见表 1。

表 1 随机引物序列

引物号	引物序列	引物号	引物序列
S ₁	GTTTCGCTCC	S ₁₁	GTAGACCCGT
S ₂	TGATCCCTGG	S ₁₂	CCTTGACGCA
S ₃	CATCCCCCTG	S ₁₃	TTCCCCGCT
S ₄	GGACTGGAGT	S ₁₄	TCCGCTCTGG
S ₅	TGCGCCCTTC	S ₁₅	GGAGGGTGT
S ₆	TGCTCTGCC	S ₁₆	TTTGCCCGGA
S ₇	GGTGACGCAG	S ₁₇	AGGGAACGAG
S ₈	GTCCACACGG	S ₁₈	CCACAGCAGT
S ₉	TGGGGGACTC	S ₁₉	ACCCCCGAAG
S ₁₀	CTGCTGGGAC	S ₂₀	GGACCCTTAC

1.7 RAPD 扩增体系和扩增程度

1.7.1 反应体系 总体积 25 μ L, 含有:

$10\times$ buffer	2.5 μ L
4 种 dNTP (各 $2.5\ mmol\cdot L^{-1}$)	2.5 μ L
引物	2.5 μ L

收稿日期: 2008-10-10

作者简介: 周星石(1980-), 男, 哈尔滨市人, 学士, 从事农业技术推广工作。Tel: 13836012426; E-mail: zhouxingshi@163.com。

ddH ₂ O 水	14.5 μL
Taq 酶	1 U
模板 DNA	2 μL

1.7.2 扩增程序 取 10 μL 扩增产物, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 mg · mL⁻¹ EB)电泳, 5V/cm, 约 3~4 h, 同时 100 bp DNA 作 Marker, 电泳完毕于紫外灯下观察结果。

94 °C	2 min	1 个循环	
94 °C	2 min		
35 °C	1 min	1 个循环	
72 °C	2 min		
94 °C	1 min		
35 °C	1 min	40 个循环	4 °C 保存

2 结论与讨论

害虫抗药性的产生是在杀虫剂施用量不断加大的外界环境条件下, 由于突变和选择的作用, 与抗药性有关的遗传变异在种群中产生和扩散的结果。由于害虫遗传学理论尚不完善和缺乏抗性突变体的诊断技术等原因, 以往对抗性机理的研究多局限于生理学方面, 而极少深入到分子水平。RAPD 技术一出现, 随即迅速地被用于害虫抗性机理的研究, 在检测与害虫抗药性有关的变异及分析昆虫种群遗传结构等方面, RAPD 技术也发挥了重要作用。梁革梅等^[1]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 Bt 产生抗性后在基因水平上发生了变异, 说明 RAPD 技术不仅可以用来鉴定棉铃虫对 Bt 是否产生抗性, 而且可以区分不同的 Bt 抗性种群。程罗根等^[2]用 RAPD

方法研究了小菜蛾对杀虫双和杀螟丹的抗药性遗传标记, 为进一步研究抗性基因的分子结构和功能奠定了基础。陈克平等^[3]用 200 个 RAPD 随机引物进行扩增, 获得了 OPB-08850 和 OPB-10917 两个与家蚕耐氟性有关的分子标记。Riaz Shah, Karen Armstrong 等^[4]用此技术研究了二斑叶螨对有机磷农药抗性产生的机制。他们选用了 20 种随机引物在 R 和 S 两亲本之间进行扩增。结果表明引物 B8 扩增出来的条带, 可以用来区分二斑叶螨的敏感种群和抗性种群。

本研究选取了 20 种随机引物, 对二斑叶螨抗性品系和敏感品系进行 PCR 扩增, 结果只有引物 S18 在抗性品系中扩增出一条大小约为 225 bp 的条带, 其他引物都没有扩增出条带, 关于抗性品系的分子标记有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. Primary RAPD-PCR analysis on the resistance populations of cotton boll worm to *Bacillus thuringiensis*[J]. 植物保护, 2000, 26(3): 4-6.
- [2] 程罗根, 李凤良, 韩招文. Random amplified polymorphic DNA of resistance to dimethy-Po and cartap in diamond-back moth [J]. 昆虫学报, 2001, 44(1): 15-20.
- [3] 陈克平, 鲁成, 向仲怀. Cloning and sequencing the RAPD markers of enduring fluoride in silk worm (*Bombyx mori*)[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 136-138.
- [4] Riaz Shah, Karen Armstrong, Sue P. Worner and R. Bruce Chapman. Investigation of a PCR-base Method for Insecticide Resistance Monitoring[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2002, 5(10): 1070-1073.

2009 年《杂交水稻》征订启事

《杂交水稻》是由国家杂交水稻工程技术研究中心和湖南杂交水稻研究中心主办的、对国内外公开发行的专业技术刊物, 获第二届国家期刊奖提名奖, 为全国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、《中国期刊网》和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊、万方数据资源系统数字化期刊群全文收录期刊、湖南省一级期刊、湖南省优秀科技期刊、湖南省十佳科技期刊、全国优秀科技期刊、中国期刊方阵双效期刊。主要宣传报道我国及国外杂交水稻研究、应用中的最新成果、进展、动态、技术经验和信息等。辟有专题与综述、选育选配、栽培技术、繁殖制种、新组合、基础理论、国外动态和简讯等栏目。双月刊, 大 16 开本, 96 页, 逢单月出版, 每册定价 8.0 元, 年价 48 元。订阅办法: (1)可到当地邮局订阅, 邮发代号: 42-297。(2)直接向本刊杂志社订阅, 挂号费每个订户全年 18 元整。请将款邮至长沙市马坡岭远大二路 736 号《杂交水稻》杂志社或信汇长沙市农行马坡岭支行, 账户: 湖南省农业科学院, 账号: 035801040000341(务请注明为杂交水稻 09 年杂志款), 邮编: 410125, 电话: 0731-2872955, 2872954; E-mail: jhybrice@public.cs.hn.cn; http://zjsd.chinajournal.net.cn。欢迎订阅, 并欢迎投稿、刊登广告。