

玉米螟赤眼蜂种群特异分子标记构建及其应用^{*}

董 贝^{1**} 王素琴² 李正西^{1***}

(1. 中国农业大学昆虫学系 北京 100193; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所 北京 100097)

摘 要 赤眼蜂是我国乃至世界范围内应用最广的卵寄生蜂, 其中玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostrinae* Pang et Chen 是我国玉米种植区重要的天敌昆虫, 但其不同的地理种群在生物防治效果上存在较大差异。为了有效利用玉米螟赤眼蜂的优势种群, 有必要对其进行准确的鉴别。然而, 采用传统形态学方法对同一种赤眼蜂的不同种群进行鉴别是非常困难的。本研究首先采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 标记对采自我国北京农科院、山东日照和山西太原的 3 个玉米螟赤眼蜂种群, 进行了遗传差异分析, 然后筛选了种群特异性位点, 并通过克隆测序和引物设计构建了种群特异性分子标记, 即序列特征性扩增区域 (SCAR) 标记。最后, 利用 SCAR 标记对混合蜂群竞争试验结果进行了分子检测。该研究方法有助于玉米螟赤眼蜂优势种群的筛选, 对于赤眼蜂的有效利用具有重要的意义。

关键词 玉米螟赤眼蜂, 随机扩增多态性 DNA, RAPD, 序列特征性扩增区域标记, SCAR, 混合蜂群竞争试验

Development and applications of population-specific markers of *Trichogramma ostrinae* in China

DONG Bei^{1**} WANG Su-Qin² LI Zheng-Xi^{1***}

(1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) are the most-widely used egg parasitoids in China and the world. *T. ostrinae* Pang et Chen is an important biocontrol agent in corn crops in our country, but different *T. ostrinae* populations display different biocontrol efficacy. In order to make full use of the most beneficial populations, it is essential to be able to precisely discriminate between populations. However, it can be extremely difficult to distinguish different populations of the same *Trichogramma* species by using morphological methods. In this study, random amplified polymorphic DNA markers were used to analyze genetic variations between *T. ostrinae* populations collected from Beijing, Shandong and Shanxi, and population-specific loci were then located. From sequencing of population-specific loci, population-specific markers were successfully developed which were subsequently employed to determine the most effective biocontrol populations in mixed population testing. This method is helpful in screening for the most beneficial *Trichogramma* populations, and therefore plays a significant role in the application of *Trichogramma* spp. to biocontrol.

Key words *Trichogramma ostrinae*, random amplified polymorphic DNA, RAPD, sequence characterized amplified region, SCAR, mixed wasp competition testing

赤眼蜂属 (*Trichogramma*) 属于膜翅目赤眼蜂科, 是我国乃至全世界应用最广的一类卵寄生蜂 (林乃铨, 1994)。已有的研究表明, 同一种赤眼蜂

不同种群的生物学特性, 如寄生率、羽化率、雌雄性比和成蜂寿命等, 往往存在差异, 而这些差异对害虫防治效果具有明显的影响 (Hassan, 1989; 王

* 资助项目: 北京市自然科学基金项目 (6072009)、"十一五" 国家科技支撑计划课题 (2006BAD08A06-02)。

** E-mail: 1985dongbei@163.com

*** 通讯作者, E-mail: zxli@cau.edu.cn

收稿日期: 2011-02-18, 接受日期: 2011-06-18

振营等,1995;Guo *et al.*, 1999)。在室内繁蜂过程中,不同蜂种的混杂往往难以避免;在田间,为了评价赤眼蜂释放后的生防效力,确定蜂群结构,抽样和鉴定也是必需的。因此,建立赤眼蜂不同种群或品系的快速鉴定方法是非常必要的(李正西和沈佐锐,2001;王福莲等,2004)。

赤眼蜂个体微小(一般小于 1 mm),且近缘种间形态难辨(Li *et al.*, 2004)。由于赤眼蜂形态易受环境和寄主的影响而改变,因此不同地理宗或生物型,甚至同一生物型的不同个体,也会因寄生条件不同而在生理和形态上显示差异(徐志宏和何俊华,1994)。传统上,赤眼蜂分类鉴定一般以雄性外生殖器作为依据,但赤眼蜂属的许多种类在自然条件下仅能见到雌蜂,因此赤眼蜂的鉴定往往耗时又费力,而且不准确(庞雄飞,1999)。正是由于上述原因,多种分子标记技术已被用来进行赤眼蜂近缘种的分子鉴定。例如,随机扩增多态性 DNA(RAPD)标记技术被用来构建了赤眼蜂的快速鉴定方法及甘蓝夜蛾赤眼蜂 *T. brassicae* 的遗传图谱(Landry *et al.*, 1993;Laurent *et al.*, 1998)。该研究表明,基于种群内遗传多态性,RAPD 标记对于近缘种乃至种下型具有较强的分辨力。在赤眼蜂不同地理种群遗传差异分析上,简单重复序列(inter-simple sequence repeat, ISSR)标记也有较高的分辨力(de León and Jones, 2005;裴毅夫等,2009)。此外,赤眼蜂近缘种间核糖体 DNA(rDNA)内部可转录第二间隔区(ITS2)序列被用来设计不同赤眼蜂种的特异引物是有效的(Amornsak *et al.*, 1998;Stouthamer *et al.*, 1999;Li and Shen, 2002;Li, 2007)。然而,尽管 ITS2 序列对于赤眼蜂蜂种的分子鉴定非常有价值,却难以用来区分同种赤眼蜂的不同种群。

RAPD 分子标记是利用单一随机引物(一般为 10 个核苷酸长度),对任意基因组 DNA 进行 PCR 扩增,从而检测基因组 DNA 多态性的方法,具有简便、快速、灵敏、多态性检出率高、所需 DNA 量少、无需预先知道基因组 DNA 遗传背景等优点,现已广泛地应用于生物个体和品种鉴定、遗传多样性检测、基因定位、遗传图谱构建、标记辅助选择和种间遗传分析等。RAPD 扩增不需要了解目标基因的 DNA 序列信息,但 RAPD 标记也存在一些局限性。首先,几乎所有 RAPD 标记都是显性的,无法区分某一 DNA 片段是来自杂合位点

还是来自纯合位点;其次,RAPD 是一种依赖酶的 PCR 反应,因而其结果严重依赖模板 DNA 的质量和浓度、不同 PCR 成分的浓度以及 PCR 循环条件,所以 RAPD 技术常常受实验条件和操作的影响,难以保持其结果的可重复性;另外,随机引物与模板的错配也常常导致对结果难以解释。然而,如果基于 RAPD 标记开发出位点特异性的标记,则可避免 RAPD 重复性差的缺点,获得稳定的和操作性强的特异分子标记。该技术涉及通过电泳将多态性的 RAPD 标记在胶上分离、筛选特异性的 PCR 产物、克隆测序,然后根据所测定的 DNA 序列设计更长的专门特异引物,即序列特征性扩增区域标记(sequence characterized amplified region marker, SCAR)(张浩等,2011)。

本研究首先通过正交试验,对影响 RAPD 反应的各因素进行了优化,获得了最佳的 RAPD 反应组合要素。然后,采用该 PCR 扩增体系,对采自我国北京、山东和山西的 3 个玉米螟赤眼蜂种群进行了遗传差异检测和分析,并进一步筛选了种群特异性位点。在此基础上,通过克隆测序和引物设计,构建了赤眼蜂种群稳定的 SCAR 特异分子标记。最后,采用所构建的分子标记对混合蜂群竞争试验的结果进行了分子检测和分析。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 玉米螟赤眼蜂 本研究所采用的玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostrinae* Pang *et al.* 由北京市农林科学院生物防治科研中试基地提供。2007 年夏,该基地从北京、山西和山东等 28 个县市,采集到 39 个被寄生的寄主卵(块)。然后,采用单雌系繁殖的方式,收集到新鲜成蜂,用于形态和分子鉴定,结果发现这些寄生蜂绝大多数为玉米螟赤眼蜂(35/39)。通过生物学试验,包括比较不同种群的寄生率、羽化率、雌雄比和寿命等指标,确定其中的 7 个玉米螟赤眼蜂种群为优势种群。本研究从该 7 个优势玉米螟赤眼蜂种群中选取了北京市农科院种群(BN)、山东日照种群(SR)以及山西太原种群(ST)进行 RAPD 标记分析和 SCAR 标记筛选。所有通过单雌系繁殖收集的新鲜成蜂样品,置无水乙醇浸泡于 1.5 mL 离心管中,于 -20℃ 保存,直至 DNA 抽提。

1.1.2 化学试剂 本试验所用全套 PCR 试剂、克

隆载体以及感受态细胞,均购自北京全式金生物技术有限公司;测序及引物合成均委托北京诺赛基因组研究中心有限公司完成;所有试剂均为分子生物学级别。

1.1.3 RAPD 引物 本研究所采用的 RAPD 引物为通用的 Operon 随机引物,包括 OPF01-20、OPG01-20、OPH01-20、OPL01-20、OPM01-20、OPN01-20、OPO01-20 和 OPP01-20,共计 160 条随机引物。

1.2 总 DNA 提取

将单头玉米螟赤眼蜂样品置 0.2 mL 离心管,加入 5 μL 抽提缓冲液 ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH8.4, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 0.45% Tween-20, 0.45% NP-40 及 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Proteinase K),用微型研杵将样品磨碎后,再加入 15 μL 抽提缓冲液。将上述裂解物置于 65°C 水浴 30 min,然后在

98°C 处理 10 min,经简单离心后,便得到了用于 PCR 扩增的 DNA 模板。

1.3 RAPD 反应体系优化

1.3.1 基础参数的设定 根据商品化试剂的建议用量,确定 20 μL 反应体系的基础参数如下,即 $10\times\text{PCR Buffer}$ 2 μL ,模板 DNA 用量 0.8 μL ,dNTPs 浓度 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,*Taq* DNA 聚合酶单位 1 U,引物浓度 8 pmol, Mg^{2+} 浓度 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3.2 正交优化试验 首先按照基础参数,在其他因子保持不变的情况下,获得单因子的最佳浓度。在单因子试验的基础上,对影响 RAPD 的上述 5 个因素,按正交组合设计 4 水平 5 因素 $L_{16}(4^5)$ 正交试验表(表 1)。通过试验,确定 RAPD 反应的最佳体系,并进行稳定性检验。根据正交试验的结果,设定 6 个退火温度梯度,即 30、32、34、36、38 和 40°C ,从而获得最佳的退火温度。

表 1 RAPD 反应体系 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计表
Table 1 Orthogonal designs $L_{16}(4^5)$ for RAPD reactions

处理编号 Code	模板 DNA Template DNA (μL)	dNTPs ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	<i>Taq</i> 酶 DNA polymerase (U)	引物 Primer ($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Mg^{2+} ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	0.8	0.15	1.00	10	2.5
2	0.8	0.20	1.25	12	3.0
3	0.8	0.25	1.50	14	3.5
4	0.8	0.30	1.75	16	4.0
5	1.0	0.15	1.25	14	4.0
6	1.0	0.20	1.00	16	3.5
7	1.0	0.25	1.75	10	3.0
8	1.0	0.30	1.50	12	2.5
9	1.2	0.15	1.50	16	3.0
10	1.2	0.20	1.75	14	2.5
11	1.2	0.25	1.00	12	4.0
12	1.2	0.30	1.25	10	3.5
13	1.4	0.15	1.75	12	3.5
14	1.4	0.20	1.50	10	4.0
15	1.4	0.25	1.25	16	2.5
16	1.4	0.30	1.00	14	3.0

1.4 种群特异性位点筛选及克隆测序

在 RAPD 反应体系优化的基础上,采用最佳 PCR 条件和上述随机引物(共 160 条)对 3 个不同玉米螟赤眼蜂种群的不同个体进行 RAPD 扩增,筛选出扩增效果较好的 RAPD 引物。然后,采用这些引物对不同赤眼蜂种群进行 RAPD 扩增,筛

选出不同种群的差异性扩增条带(位点)。通过进一步扩大检测范围,获得不同种群稳定的特异性位点。

在获得 3 个赤眼蜂种群特异性位点之后,进一步将这些位点通过电泳分离、切胶回收,然后将回收产物与克隆载体(pEASY-T3)连接、转化和蓝

白斑筛选,挑选出阳性克隆并进行测序。

1.5 位点特异性引物设计及 SCAR 标记构建

根据对不同赤眼蜂种群特异位点的测序结果,经过分析 DNA 序列,设计位点特异性引物。采用这些位点特异性引物进行 PCR 扩增,比较分析这些位点的特异性和稳定性。RAPD 筛选的特异位点,在通过测序、设计引物和扩增后,有些位点被证明不具有特异性,即在 3 个种群中都能扩增出相同的 DNA 条带,因此这些位点被弃用,而只保留那些能稳定扩增出差异性条带的引物。采用最后保留下来的引物扩增出来的 DNA 条带就是序列特征性扩增区域标记(SCAR)。SCAR 标记可特异地从特定赤眼蜂种群的个体中扩增出特异的 PCR 产物,重复性好。

1.6 不同种群混蜂试验及分子检测

将单头玉米螟赤眼蜂雌蜂引入装有寄主卵卡的指形管中,然后用黑布封口,在 25℃ 环境下进行单雌系繁殖,培养至 F_1 代,并从中选出性状较好的雌蜂进行 F_2 代培养。进行混蜂试验时,取上述 3 个玉米螟赤眼蜂种群的 F_1 代雌蜂各一头,接入卵卡,令其在竞争条件下产卵,重复 4 次。同理,取 F_2 代进行混合繁殖。然后,采用本研究所构建的 SCAR 标记技术对竞争产卵后的成蜂进行分子检测,以判断不同种群的寄生率(同一条件下的竞争力指标)。分子检测的 PCR 热循环程序设定为:95℃ 预变性 3 min,接着进行 35 个循环(94℃ 变性 30 s、62℃ → 52℃ 退火温度递降 30 s、72℃ 延伸 45 s),最后 72℃ 处理 10 min。PCR 扩增结果采用 1.4% 的琼脂糖进行电泳分离和成像。分子检测数据采用 ANOVA 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 RAPD 反应的最优要素组合

单因子分析结果表明,模板 DNA 用量在 0.8、1.0、1.2 和 1.4 μL 时较为合适;dNTPs 浓度在 0.15、0.20、0.25 和 0.30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时较为合适;Taq 酶单位在 1.00、1.25、1.50 和 1.75 U 时较为合适;引物浓度在 10、12、14 和 16 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 较为合适; Mg^{2+} 浓度在 3.5 和 4.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时较为合适。

正交试验结果表明,所有要素组合都能扩增出条带,其中第 11 组、12 组、13 组和 14 组(表 1)扩增出的条带数多且清晰,扩增图谱基本一致,但

比较该 4 个组合,其中第 13 号组合的扩增效果最好,即模板 DNA 为 1.4 μL 、dNTPs 为 0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、Taq 酶为 1.75 U、引物浓度为 12 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及 Mg^{2+} 为 3.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 1)。该反应体系的稳定性和重复性经更多的检测得到了验证(数据和图谱未显)。退火温度优化结果表明,退火温度为 34℃ 时的扩增效果最佳。

2.2 种群特异性位点

在大量 RAPD 扩增结果中,发现了一些种群差别位点,但经过重复检测,发现这些位点中,有些是不稳定的,即在单个个体中出现的某些差别位点,当扩大检测范围时未能稳定地出现在特定种群的检测个体中。采用优化的 RAPD 反应体系,使用随机引物 OPO02 和 OPM03,通过反复筛选,本研究在山东日照种群(SR)以及山西太原种群(ST)中扩增出特异性的位点(图 1:A,B)。该 2 个位点清晰度好,稳定性高,可用于切胶、克隆和测序以及后续的位点特异性引物设计。本研究中,虽然在北京市农科院种群(BN)中也能发现差异性条带,但稳定性并不理想,因此没有被采用。

2.3 位点特异性引物及 SCAR 标记

在定位种群特异性位点(即随机引物 OPO02 扩增的 SR 种群特异性位点与 OPM03 扩增的 ST 种群特异性位点)的基础上,进一步将这些位点进行了克隆和测序。然后,以所测得的 DNA 序列为模板,设计了相应的位点特异性引物,即玉米螟赤眼蜂山东日照种群(SR)的特异引物 O02SRf/O02SRr(预期扩增产物为 564 bp,图 2:A)以及玉米螟赤眼蜂山西太原种群(ST)的特异引物 M03STf/M03STr(预期扩增产物为 530 bp,图 2:B)。

采用上述位点特异性引物,进一步从目标种群扩增出序列特征性扩增区域标记(SCAR),即 SR 种群的特异引物 O02SRf/O02SRr 可从 SR 种群的所有检测个体中特异性地扩增出预期大小的产物(图 3:A),而 ST 种群的特异引物 M03STf/M03STr 可从 ST 种群的个体中特异性地扩增出预期大小的产物(图 3:B)。

2.4 混蜂试验分子检测结果

在玉米螟赤眼蜂单雌系繁殖的基础上,我们设计了大量混蜂试验,但本研究检测的只是其中 3 个玉米螟赤眼蜂种群的室内混蜂试验结果,即北

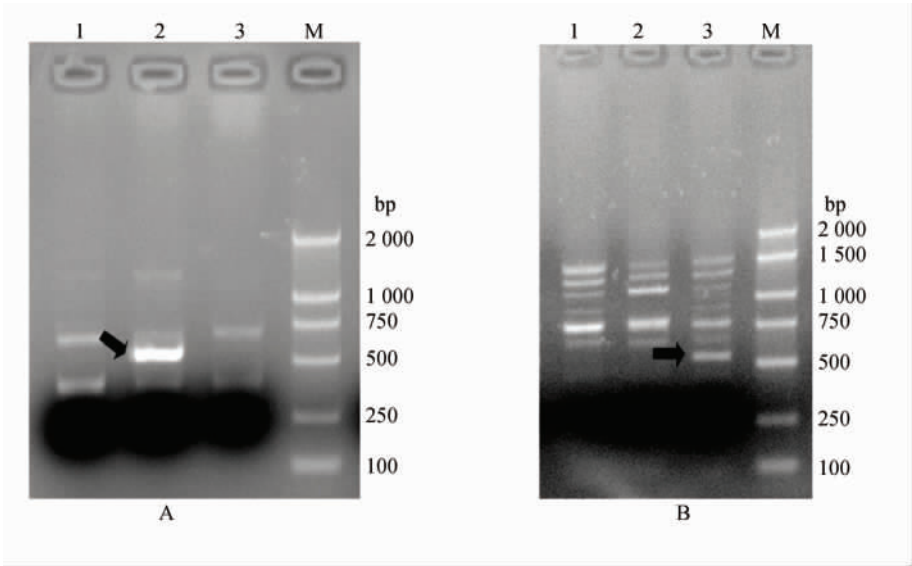


图 1 随机引物 OPO02 和 OPM03 对 3 个玉米螟赤眼蜂种群扩增的 2 个特异性位点
Fig. 1 Two specific loci of 3 different *Trichogramma ostrinae* populations,
amplified by the RAPD primers OPO02 and OPM03

A:泳道 1~3 为随机引物 OPO02 对 BN、SR、ST 3 个玉米螟赤眼蜂种群的扩增结果,箭头所指为 SR 种群特异性产物(约 560 bp)。lane 1~3, PCR profiles of OPO02; arrow: specific product (~560 bp) for the population SR; B:泳道 4~6 为随机引物 OPM03 对 BN、SR、ST 3 个玉米螟赤眼蜂种群的扩增结果,箭头所指为 ST 种群特异性产物(约 540 bp)。lane 4~6, PCR profiles of OPM03; arrow: specific product (~540 bp) for the population ST.

京市农科院种群 BN、山东日照种群 SR 和山西太原种群 ST(图 4: A, B)。之所以检测该混蜂试验结果,是因为目前已开发了 2 个种群的 SCAR 标记,即 SR 和 ST 种群的位点特异性引物,而根据 SR 种群的特异引物 O02SRf/O02SRr 与 ST 种群的特异引物 M03STf/M03STr 的检测结果,很容易地推测出 BN 种群的个体数。

本研究的分子检测结果表明, F_1 代混蜂试验中,北京市农科院种群 BN 比山西太原玉米螟赤眼蜂种群 ST 稍占优,但 F_2 代混蜂试验中,山西太原玉米螟赤眼蜂种群 ST 占优。从 2 代混蜂试验结果的平均值看,山西太原玉米螟赤眼蜂种群 ST 比另外 2 个种群(山东日照种群 SR 和北京市农科院种群 BN)更有优势,但优势程度并不显著(ANOVA, $F = 1.167, df = 2, P = 0.331$, 95% 置信区间)(表 2)。

表 2 玉米螟赤眼蜂 3 个种群混蜂试验分子检测结果

Table 2 Molecular diagnoses of the mixed wasp competition testing for three different <i>Trichogramma ostrinae</i> populations					
代次 Generation	重复次数 Repeat	检测个体数 Number	北京农科院种群 BN Population BN	山东日照种群 SR Population SR	山西太原种群 ST Population ST
F ₁	1	5	2	0	3
	2	5	4	1	0
	3	5	1	1	3
	4	5	2	1	2
	平均数 ± 标准误 (mean ± SE)		2.25 ± 0.63	0.75 ± 0.25	2.0 ± 0.71
F ₂	1	5	0	1	4
	2	5	0	4	1
	3	5	0	2	3
	4	5	3	0	2
	平均数 ± 标准误 (mean ± SE)		0.75 ± 0.75	1.75 ± 0.85	2.25 ± 0.65
总平均数 ± 标准误 (total mean ± SE)			1.5 ± 0.53	1.25 ± 0.45	2.25 ± 0.45

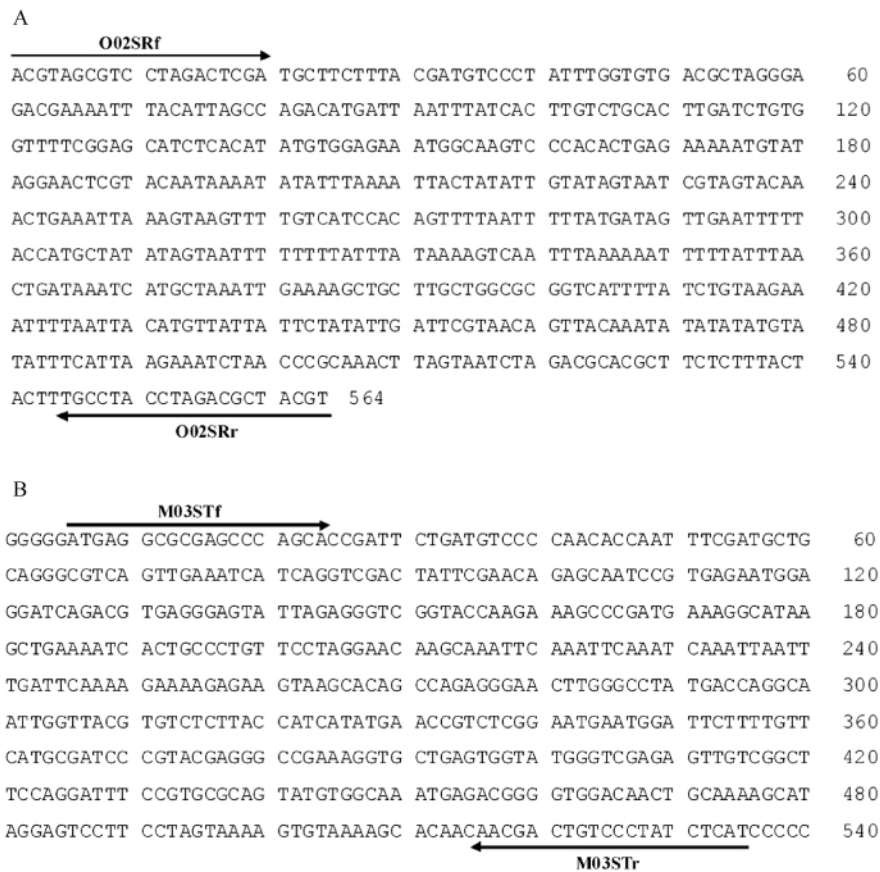


图 2 玉米螟赤眼蜂山东日照种群(SR)以及山西太原种群(ST)位点特异性引物的位置(正反引物分别采用正向和反向箭头表示)

Fig. 2 Locations of the locus-specific primers of the populations SR and ST

(the forward and reverse primers are represented by forward and reverse arrows, respectively)

A: SR 种群(引物 OPO02, 片段大小为 564 bp), 引物 O02SRf/O02SRr 的预期扩增产物为 564 bp。population SR (OPO02, amplicon size: 564 bp): expected size of O02SRf/O02SRr: 564 bp; B: ST 种群(OPM03, 片段大小为 540 bp), 引物 M03STf/ M03STr 的预期扩增产物为 530 bp。population ST (OPM03, amplicon size: 540 bp): expected size of M03STf/M03STr: 530 bp.

3 讨论

通过采用 RAPD 技术对玉米螟赤眼蜂不同种群进行遗传差异检测, 并筛选出差别位点, 从而获得了不同赤眼蜂种群的特异性位点。在此基础上, 经过克隆和测序以及位点特异性引物的设计, 最终开发出 2 个玉米螟赤眼蜂种群的序列特征性扩增区域标记, 即山东日照种群 SR 和山西太原种群 ST 的 SCAR 标记。这些研究结果证明, 将通过 RAPD 技术筛选得到的差别位点转化为 SCAR 标记是可行的。

本研究进一步采用所开发的 SCAR 标记对 3 个玉米螟赤眼蜂种群的室内混蜂试验结果进行了

分子检测。分子检测结果表明, 3 个赤眼蜂种群在完全相同的竞争条件下, 其寄生能力(赤眼蜂竞争力的主要指标)存在差异。总体上, 山西太原种群比山东日照种群和北京市农科院种群更具有优势, 但优势程度并不显著。这些研究证明, 采用 SCAR 标记辅助赤眼蜂优势种群的快速筛选是可行的。虽然在扩增中可能出现非特异性条带, 但这并不影响对于 PCR 检测结果的判断, 因为对于阳性结果的判断可依据 2 个具体的条件, 即(1)阳性条带大小必须符合预期, 即 O02SRf/O02SRr 的预期扩增产物为 564 bp, 而 M03STf/M03STr 的预期扩增产物为 530 bp; (2) 阳性条带应该是单一且明亮的。对于不符合上述条件的扩增结果均将被

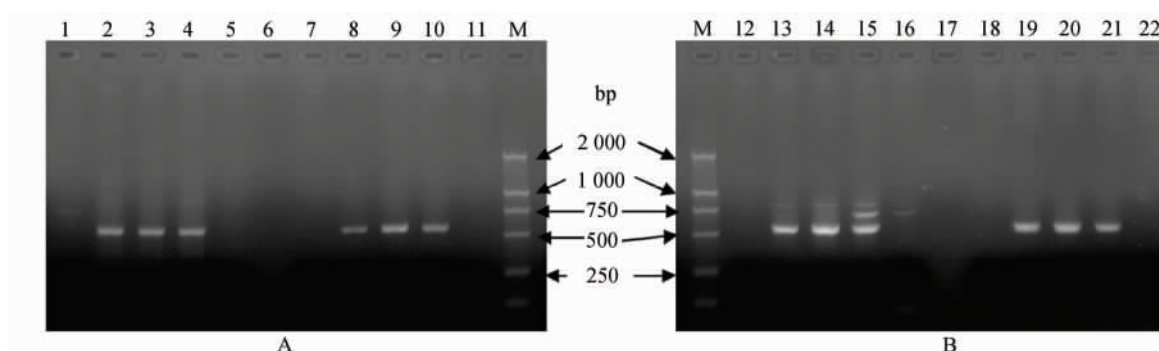


图3 玉米螟赤眼蜂山东日照种群(SR)以及山西太原种群(ST)的 SCAR 标记

Fig.3 SCAR markers for the populations SR and ST

A:SR 种群 SCAR 标记(O02SRf/O02SRr)的预期产物大小为 564 bp;泳道 1、5 和 6 的模板 DNA 来自 BN 种群的个体;泳道 7 和 11 的模板 DNA 来自 ST 种群的个体;泳道 2~4 以及 8~10 的模板 DNA 来自 SR 种群的个体. the expected size of the SCAR of the population SR (O02SRf/O02SRr) is 564 bp, template DNAs for lane 1, 5 and 6 from the population BN; template DNAs for lane 7 and 11 from the population ST; template DNAs for lane 2~4 and 8~10 from the population SR; B: ST 种群 SCAR 标记(M03STf/M03STr)的预期产物大小为 530 bp;泳道 12、16 和 17 的模板 DNA 来自 BN 种群的个体;泳道 18 和 22 的模板 DNA 来自 SR 种群的个体;泳道 13~15 以及 19~21 的模板 DNA 来自 ST 种群的个体. the expected size of the SCAR of the population ST (M03STf/M03STr) is 530 bp, template DNAs for lane 12, 16 and 17 from the population BN; template DNAs for lane 18 and 22 from the population SR; template DNAs for lane 13~15 and 19~21 from the population ST.

视为阴性。

传统上,赤眼蜂优势种群的筛选一般针对单个种群分别进行测定,因为若将不同赤眼蜂种混合进行测定,采取形态学方法将很难轻易区分不同的赤眼蜂种,也就难以正确地判断优势种群;如果将同一赤眼蜂种的不同种群进行混合,则基本无法通过传统手段进行鉴别。然而,将不同赤眼蜂分别进行测定与将它们混合后进行测定,对于筛选优势种群的意义是非常不一样的,因为在自然条件下,不同的赤眼蜂种往往同时存在,而在施行人工放蜂的情况下,在同一区域将存在同一蜂种的不同地理种群或品系。显然,为了真正了解和评价这些不同赤眼蜂的生防效能,其基本前提是对它们进行正确地区分。本研究进行的混蜂试验,其目的正是模拟自然条件下不同赤眼蜂的竞争环境,并采用分子检测手段,筛选具有比较竞争优势的赤眼蜂种群。因此,本研究所构建的种群特异性分子标记(SCAR)可比较客观、准确和快速地对混蜂条件下的优势赤眼蜂种群进行甄别,因而是对赤眼蜂传统应用方法的有力补充。

理论上讲,采用 2 个玉米螟赤眼蜂种群的 SCAR 标记就足以鉴别 3 个种群的混蜂试验结果,因为第 3 个种群的数量可根据另外 2 个种群的数量

进行推测。然而,必须指出,PCR 检测的假阴性风险问题往往难以避免。在本研究中,采用山东日照种群 SR 和山西太原种群 ST 的 SCAR 标记分子检测结果推测出来的北京市农林科学院种群 BN 的数值中可能包含 SR 和 ST 种群分子检测过程中出现的假阴性结果,也就是说,BN 种群的数量存在高估的风险。为了解决该问题,在以后的研究中有必要开发更多的 SCAR 标记,以改进对分子检测结果解释的准确性。

参考文献(References)

- Amornsak W, Gordh G, Graham G, 1998. Detecting parasitized eggs with polymerase chain reaction and DNA sequence of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera:Trichogrammatidae). *Aust. J. Entomol.*, 37 (2):174—179.
- de León JH, Jones WA, 2005. Genetic differentiation among geographic populations of *Gonatocerus ashmeadi*, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca coagulata*. *J. Insect Sci.*, 5 (2):1—9.
- Guo MF, Zhu DF, Li LY, 1999. Selection of *Trichogramma* species for controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Ent. Sin.*, 6(2):187—192.

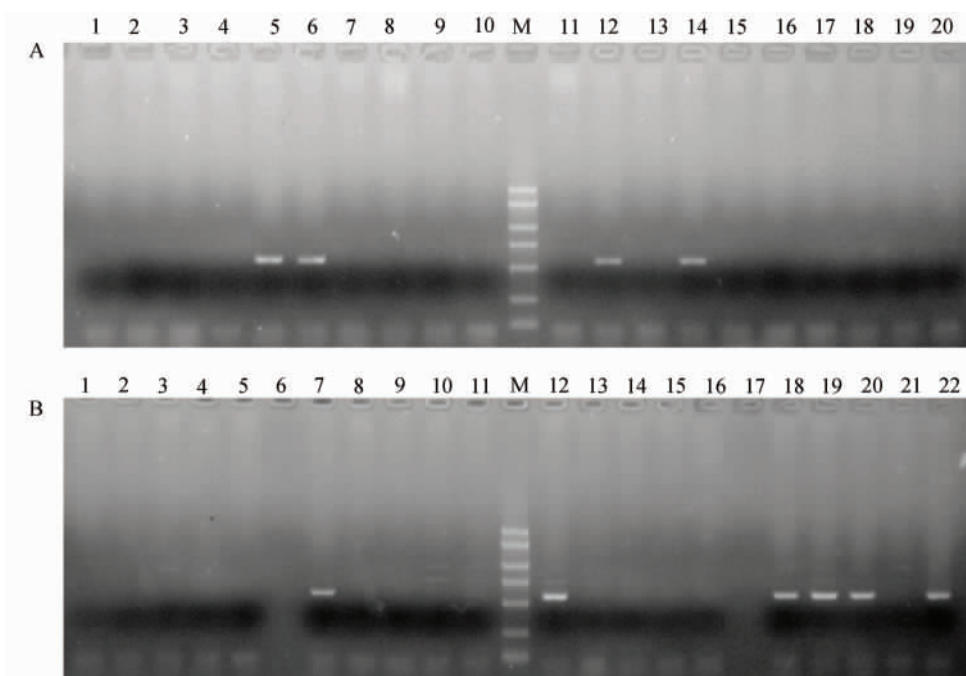


图 4 采用位点特异性引物及 SCAR 标记对 3 种玉米螟赤眼蜂种群(北京市农科院种群 BN、山东日照种群 SR 和山西太原种群 ST)的混蜂试验结果进行分子检测的结果

Fig. 4 Molecular diagnoses of the mixed wasp competition testing using locus-specific primers and SCAR markers for the three *Trichogramma ostrinae* populations BN, SR and ST

A: 采用 SR 种群 SCAR 标记引物 (O02SRf/O02SRr) 对 20 个混蜂种群个体 (F_1 代) 的检测结果。results of 20 *T. ostrinae* individuals (F_1) from SR population-specific primers O02SRf/O02SRr; B: 采用 ST 种群 SCAR 标记引物 (M03STf/M03STr) 对 20 个混蜂种群个体 (F_2 代) 的检测结果。results of 20 *T. ostrinae* individuals (F_2) from ST population-specific primers M03STf/M03STr.

Hassan SA, 1989. Selection of suitable *Trichogramma* to control the moth *Cydia pomonella* and the summer fruit tortrix moth *Adoxophyes orana*, *Pandemis heparana*. *Entomophaga*, 34 (1): 19—27.

Landry BS, Dextraze L, Boivin G, 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control program of phytophagous insects. *Genome*, 36 (3): 580—587.

Laurent V, Wajnberg E, Mangin B, Schiex T, Gaspin C, Vanlerberghe-Masutti F, 1998. A composite genetic map of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae* based on RAPD markers. *Genetics*, 150 (1): 275—282.

Li ZX, 2007. Molecular differentiation of the four most commonly occurring *Trichogramma* species in China. *Eur. J. Entomol.*, 104 (3): 363—367.

Li ZX, Li Z, Shen ZR, 2004. Using internally transcribed spacer 2 sequences to re-examine the taxonomic status of

several cryptic *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Eur. J. Entomol.*, 101 (3): 347—358.

Li ZX, Shen ZR, 2002. The utility of specific markers based on ITS2 sequences for molecular identification and detection of *Trichogramma* spp. *Agri. Sci. Chin.*, 1 (9): 998—1005.

Stouthamer R, Hu J, Van Kan F, Platner GR, Pinto JD, 1999. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *Biocontrol*, 43 (4): 421—440.

李正西, 沈佐锐, 2001. 分子标记用于赤眼蜂分子监测的研究. *农业生物技术学报*, 9 (1): 65—68.

林乃铨, 1994. 中国赤眼蜂分类(膜翅目: 小蜂总科). 福州: 福建科学技术出版社. 1—364.

庞雄飞, 1999. 赤眼蜂属一些种名的商榷. 长春: 中国昆虫学会全国赤眼蜂学术讨论会论文摘要集.

裴毅夫, 李正西, 王素琴, 康总江, 2009. 不同赤眼蜂品

- 系 ISSR-PCR 条件优化及分子鉴定. 昆虫知识, 46 (3) : 388—393.
- 王福莲, 张帆, 万方浩, 2004. 赤眼蜂蜂种及品系选择刍议. 中国生物防治, 20 (4) : 269—272.
- 王振营, 周大荣, Hassan SA, 1995. 几种赤眼蜂品系对欧洲玉米螟卵寄生选择性比较. 植物保护, 21 (6) : 39—42.
- 徐志宏, 何俊华, 1994. 松毛虫赤眼蜂种群间的形态学比较研究. 生物防治通报, 10 (2) : 49—51.
- 张浩, 陈乃中, 李正西, 2011. 我国 6 个舞毒蛾地理种群 RAPD 遗传分析及 SCAR 标记构建. 昆虫学报, 54 (6) : 714—721.