

# 东方粘虫 (*Pseudaletia separata* (Walker)) 微卫星富集文库的构建与分析

张国彦<sup>1,2</sup>, 翟保平<sup>1,\*</sup>

(1. 南京农业大学昆虫学系, 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095; 2. 河南省植物保护植物检疫站, 郑州 450002)

**摘要:** 根据生物素与链亲和素的强亲和性原理, 用包被链亲和素的磁珠亲和捕捉与生物素标记的微卫星寡核苷酸探针 (CA)<sub>15</sub>、(GA)<sub>15</sub>、(GTT)<sub>12</sub>、(GAT)<sub>12</sub>、(TAGA)<sub>8</sub> 和 (GTGA)<sub>8</sub> 退火结合的含接头和微卫星序列的单链粘虫基因组 DNA 限制性酶切片段, 获得单链目的片段。经 PCR 扩增形成双链后连接到 pGEM-T 载体上, 再转化到 DH5 $\alpha$  热感受态细胞中, 首次成功构建粘虫基因组微卫星富集文库。随机抽样 (16 次抽样, 每库共 12 ~ 114 个克隆) 测序发现, 6 个文库总的微卫星阳性克隆率 30.07%, CA/GAT/GTT 等 3 个文库的阳性克隆率达到 40% 以上。单次抽样最高阳性克隆率达到 56%。粘虫微卫星富集文库的建立和高多态性微卫星单拷贝位点的筛选将为粘虫的生态遗传学研究、连锁图谱构建、分子进化和系统发育研究等提供大量遗传标记, 对昆虫迁飞的分子生态研究也有重大意义。

**关键词:** 东方粘虫; 微卫星; 富集文库; 序列分析

文章编号: 1000-0933(2008)08-3860-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

## Construction and identification of enriched microsatellite library from *Pseudaletia separata* genome

ZHANG Guo-Yan<sup>1,2</sup>, ZHAI Bao-Ping<sup>1,\*</sup>

1 Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insect Pests, the Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Plant Protection and Quarantine Station of He'nan, Zhengzhou 450002, China

*Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8): 3860 ~ 3857.

**Abstract:** We constructed the first microsatellite-enriched library of the oriental armyworm (*Pseudaletia separata*) according to the strong affinity between biotin and streptavidin. Briefly, the approach involved adaptation of 300 — 700bp enzyme-digested fragments to adaptors, affinity capture of microsatellite repeat using biotinylated oligo-nucleotide probes ((CA)<sub>15</sub>, (GA)<sub>15</sub>, (GTT)<sub>12</sub>, (GAT)<sub>12</sub>, (TAGA)<sub>8</sub>, (GTGA)<sub>8</sub>) attached to streptavidin-coated magnetic beads, PCR amplification of captured moleculars using 21-mer primers complementary to the adapters, ligation of PCR products into pGEM-T, transformation of recombinant plasmids from each of the six preparations into DH5 $\alpha$  competent cells. The sequencing results of 16 random samplings showed that 30.07% of the clones contained microsatellite sequences, more than

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30571202)

**收稿日期:** 2008-03-05; **修订日期:** 2008-04-28

**作者简介:** 张国彦 (1969 ~), 男, 河南中牟人, 博士生, 高级农艺师, 主要从事昆虫分子生态、病虫害预测预报研究. E-mail: 2005202022@njau.edu.cn \* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bpzhai@2008.sina.com

**致谢:** 感谢南京农业大学植物保护学院李飞教授和陈功友教授给予的指导, 感谢全国农技中心姜玉英研究员和有关植保站的专家帮助采集昆虫标本, 感谢南京农业大学博士研究生吴敏、李玉蓉、王小云在实验过程中给予的帮助。

**Foundation item:** The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30571202)

**Received date:** 2008-03-05; **Accepted date:** 2008-04-28

**Biography:** ZHANG Guo-Yan, Ph. D. candidate, senior agronomist, mainly engaged in insect molecular ecology and the forecast of crop insect pests and diseases. E-mail: 2005202022@njau.edu.cn

40% for CA, GTT and CAT libraries, a maximum of 56% among 16 samplings. High polymorphic single-copy microsatellite loci will be detected from six libraries. A large number of such loci are crucial to investigate ecological genetics, linkage mapping, molecular evolution and phylogeny *et al.* of oriental armyworm and will contribute to molecular ecology of insect migration.

**Key Words:** *Pseudaletia separata* (Walker); oriental armyworm; microsatellite; SSR; STR; enriched library; sequence analysis

东方粘虫 *Pseudaletia separata*(Walker) 是一种典型的迁飞昆虫,也是我国和其它亚洲国家粮食作物的主要害虫之一<sup>[1~3]</sup>。尤其在我国,东方粘虫和东亚飞蝗曾经是为害最严重的害虫,给农业生产和粮食安全造成极大威胁。2000 年以来,三代粘虫在华北和黄淮地区秋作物上危害加重,局部地区某些年份暴发成灾<sup>[4,5]</sup>。为科学治理东方粘虫,建国后我国科学家曾对它的生物学和生态学进行了大量研究,但是,种群遗传学和分子生态学方面的研究比较薄弱。种群遗传学和分子生态学研究能够从分子水平探究昆虫的扩散、迁飞和交配行为,检测种群遗传结构的时空动态,从而可能鉴别种群的地理来源和区域间迁移水平,为制定大区域治理策略提供科学依据。微卫星又被称作短串连重复 (Short Tandem Repeats, STRs) 或简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSRs),每单元长度 1~10bp(一般 1~6bp,多数 2~4bp)之间,重复次数约为 10~60 次,在真核生物基因组中广泛存在,具有高度多态性<sup>[6~16]</sup>,是种群遗传学和分子生态学研究的最合适工具之一。它对于探究种群遗传结构、检验亲权和相关性、评估遗传多样性以及研究最近的种群历史等,都有明显的优势,可用于从生态角度探究种群进化和趋异,以及理解相关生境之间不同组分的功能和营养联系等<sup>[17,18]</sup>。虽然微卫星标记应用的初始成本高于 AFLP,但是对于需要多个基因型进行统计分析的种群和生态研究来说也是值得的。因为微卫星标记能够通过非放射性标记和自动测序分析进行高通量基因分型。目前,对于鳞翅目昆虫,只有全基因组测序的家蚕(*Bombyx mori*)的微卫星分布和变异情况研究较为深入<sup>[19,20]</sup>,而东方粘虫微卫星的研究未见报道。本研究成功构建了粘虫微卫星富集文库,为粘虫独特的微卫星标记的筛选打下了基础,对进一步研究种群生态遗传机制、构建遗传连锁图谱和物理图谱、探讨昆虫分子进化等具有重大意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

粘虫成虫标本采自北京市密云县,用无水乙醇 -20℃ 保存。

### 1.2 接头、引物和探针

#### 1.2.1 接头和引物

连接酶切片断的接头是含有 *Hind* III 酶切位点的双链接头,一链的 5' 端磷酸化。

5'CTCTTGCTTAAGCTTGGACTA

3'ACACGAGAACGAATTCGAACCTGAT-P

而检测用的单链引物就是接头的其中一个单链 5' CTCTTGCTTAAGCTTGGACTA 3'。均由 TaKaRa 合成。

#### 1.2.2 生物素标记的探针

用于磁珠亲和捕捉的探针是生物素 5' 标记的 (CA)<sub>15</sub>、(GA)<sub>15</sub>、(GTT)<sub>12</sub>、(GAT)<sub>12</sub>、(TAGA)<sub>8</sub> 和 (GTGA)<sub>8</sub>。由 Invitrogen 合成。

### 1.3 载体和菌株

DNA 片断连接载体是 Promega pGEM-T,转化用 Tiangen 公司的 *E. coli* DH5α 热感受态细胞。

### 1.4 主要试剂

Qiagen Gel Extraction Kit 用于酶切片断回收。AxyPrep PCR Clean-up Kit 用于连接接头后的产物和磁珠

捕捉洗脱后 PCR 产物的浓缩清洁。磁珠 Novagen MagPrep Streptavidin Beads 和磁力架 Magnetight Separation Stand 用来亲和捕捉。限制性内切酶购自 SibEnzyme 公司, *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。

## 1.5 微卫星富集文库的构建

### 1.5.1 基因组 DNA 提取和酶切

参照 Sambrook 等<sup>[21]</sup>和 Moller 等<sup>[22]</sup>的方法,并加以改进,用 10~20mg 粘虫成虫腹部中段组织,经液氮研磨,再用 CTAB 和酚-氯仿相结合的方法提取基因组 DNA。然后用 Eppendorf Biophotometer 生物分光光度计检测 DNA 纯度和浓度,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

参考 Ibrahim KM 等<sup>[23]</sup>, Leonardia AAP 等<sup>[24]</sup>等的酶切方案,进行 3 种酶切方案酶切效果的比较,这 3 种酶切方案分别是 *Rsa* I, *Hae* III/*Rsa* I 和 *Hae* III/*Alu* I/*Rsa* I。酶切反应体系 50 $\mu$ l,其中包含基因组 DNA 样品 ( $OD_{260} > 2\mu\text{g/ml}$ ,  $OD_{260/280} \in [1.8, 2.0]$ ,  $OD_{260/230} > 2.0$ ) 20 $\mu$ l,每种限制性内切酶 10~20U。37 $^{\circ}\text{C}$  酶切 2h。

酶切产物经过 1.2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离,切取 300~700bp 胶块,用 Qiagen II 试剂盒回收纯化。

### 1.5.2 酶切片断加接头

100 $\mu$ l 连接反应体系中,含 80 $\mu$ l 酶切胶回收产物(约含 5 $\mu$ gDNA 片断)、5 $\mu$ l 双链接头(462.5pmol)和 1 $\mu$ l T4 DNA 连接酶(360U)。16 $^{\circ}\text{C}$  过夜反应。反应液经 AxyPrep PCR Clean-up Kit 纯化浓缩为 30 $\mu$ l。

### 1.5.3 磁珠亲和捕捉及扩增

在 1.5ml 聚丙烯离心管中准确吸入 100 $\mu$ l Novagen MagPrep Streptavidin Beads(10mg/ml),然后放置到磁力架上,用移液器小心转走上清液。用 2 倍体积的 10 $\times$ SSC 洗涤两次,再用 100 $\mu$ l 10 $\times$ SSC 重悬磁珠,加入探针(100 $\mu\text{mol/L}$ )4 $\mu$ l,室温放置 2h,使磁珠和探针发生亲和反应,然后再用 10 $\times$ SSC 洗涤两次,最后用 90 $\mu$ l 10 $\times$ SSC 重悬。取经过纯化浓缩的连接反应产物 60 $\mu$ l 在 98 $^{\circ}\text{C}$  变性 10min,取出立即置于冰上,然后与上述 90 $\mu$ l 已结合探针的磁珠混合,65 $^{\circ}\text{C}$  杂交过夜。然后经历一个高严谨性(high stringency)洗涤过程,把非特异性结合的片断除去。主要包括用含 0.1% SDS 的 2 $\times$ SSC 洗液室温洗 3 次,1 $\times$ SSC 室温洗 3 次,1 $\times$ SSC 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴中洗 5 次,每次用 200 $\mu$ l 洗液洗涤 5min,最后用预冰浴的 STE(20mmol/L Tris-Cl pH 7.5,150 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA pH 8.0)洗涤 2min。最后用 70 $^{\circ}\text{C}$  预热的无菌去离子水洗脱,每次 25 $\mu$ l 洗 2min,洗脱 1~2 次。在磁力架上小心吸取上清液,其中的 DNA 单链片断即富含微卫星。

随后对磁珠捕获的单链 DNA 片断进行 PCR 扩增,反应体系 25 $\mu$ l,包括单链目的片断 2 $\mu$ l、单链引物(20 $\mu\text{mol/L}$ )1 $\mu$ l、 $\text{MgCl}_2$ (25mmol/L)2 $\mu$ l、*Taq* DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ l)0.2 $\mu$ l、dNTP(每种 2.5mmol/L)2 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer 和无菌去离子水。反应条件是:94 $^{\circ}\text{C}$  45s,54.5 $^{\circ}\text{C}$  45s,72 $^{\circ}\text{C}$  1min,30 个循环。扩增产物经 AxyPrep PCR Clean-up Kit 纯化浓缩。

### 1.5.4 微卫星富集 DNA 片断的克隆

将纯化的 PCR 产物,以 insert:vector = 6:1 的比例连接到载体 pGEM-T,再转化 DH5 $\alpha$  高效感受态细胞。经过蓝白筛选,所有阳性克隆即组成粘虫微卫星富集文库。文库点在 384 孔板(含冷冻缓冲液)上,-70 $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.6 文库抽样鉴定

随机抽取阳性克隆,用 T7 和 SP6 通用引物进行菌落 PCR,检测插入片断大小。选择插入片断 300~700bp(菌落 PCR 产物电泳检测带 500~1000bp)的克隆,在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 12h 以上,提取质粒,用 BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)测序试剂盒在 ABI 377 autosequencer 上进行测序。用 RepeatMasker 软件分析测序数据中的微卫星位点。

## 2 结果

### 2.1 基因组 DNA 提取

用 CTAB 和酚-氯仿相结合的方法提取的自然种群的总 DNA 合格率( $OD_{260/280} = 1.8 \sim 2.0$ ,  $OD_{260/230} > 2.0$ )达到 70%~95%,而用酚-氯仿方法合格率仅达到 30%。提取 DNA 量达到 3.89~8.75mg/g,其电泳照片见

图 1。

## 2.2 基因组 DNA 酶切

经过酶切比较,发现 *Hae* III/*Rsa* I 双酶切片断集中 1000bp 以下,符合构建基因组文库的要求。而 *Rsa* I 酶切片断比较分散,*Hae* III/*Alu* I/*Rsa* I 酶切片断多在 500bp 以下。3 种酶切方案酶切效果如图 2 所示。

## 2.3 酶切片断回收与连接头

通过切胶回收,将酶切片断中的 300 ~ 700bp 纯化,并连接上一个双链接头。连接效果经过 PCR 检测。这两个关键步骤的电泳检测结果如图 3,反映出胶回收效率和连接结果都比较好。

## 2.4 磁珠捕捉和 PCR 扩增

经过磁珠链亲和素和探针生物素的亲和反应、带接头 DNA 片断的变性、探针和 DNA 片断杂交、高严紧洗

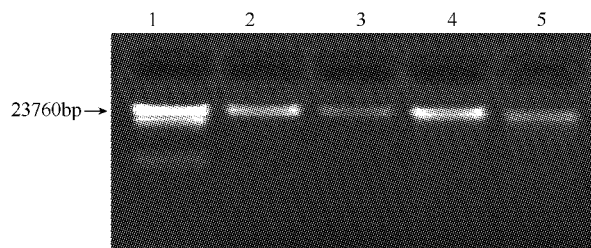


图 1 粘虫基因组 DNA 提取结果

Fig. 1 Examples of oriental armyworm genomic DNA prepared by the protocol described here

1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 2, 3, 4, 5: 粘虫基因组 DNA 电泳结果; 电泳条件: 1% 琼脂糖凝胶, 1  $\times$  TAE, 4.5V/cm 电压, 电泳 40min  
1: Molecular weight standard  $\lambda$ DNA/*Hind* III; Lane 2, 3, 4, 5: Electrophoresis (4.5V/cm, 40min, 1% agarose) of genomic DNA of *Pseudaletia separata*(Walker)

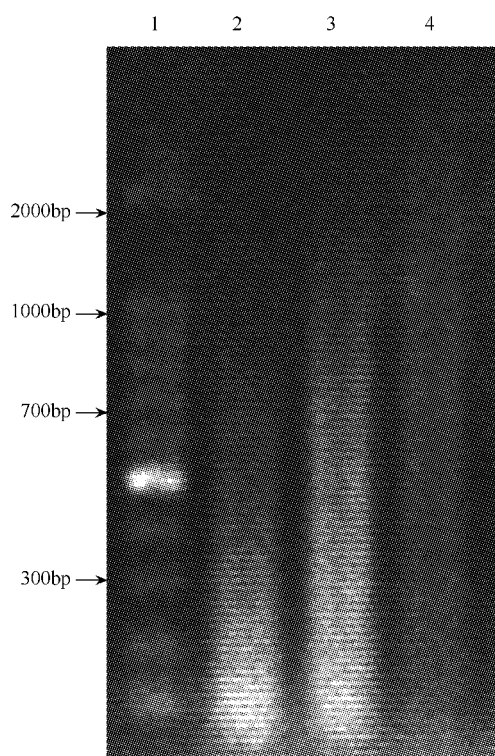


图 2 基因组 DNA 酶切结果

Fig. 2 The results of enzyme-digested oriental armyworm genomic DNA

1: 分子量标准 1kb ladder marker; 2: *Hae* III/*Alu* I/*Rsa* I 三酶切电泳结果; 3: *Hae* III/*Rsa* I 双酶切电泳结果; 4: *Rsa* I 单酶切电泳结果。电泳条件: 1.2% 琼脂糖凝胶, 1  $\times$  TAE, 4V/cm 电压, 电泳 1h  
1: Molecular weight standard 1kb ladder marker. Lane 2, 3, 4: Electrophoresis (4V/cm, 1h, 1.2% agarose) of RNase-treated genomic DNA digested by *Hae* III/*Alu* I/*Rsa* I (2), *Hae* III/*Rsa* I (3) and *Rsa* I (4)

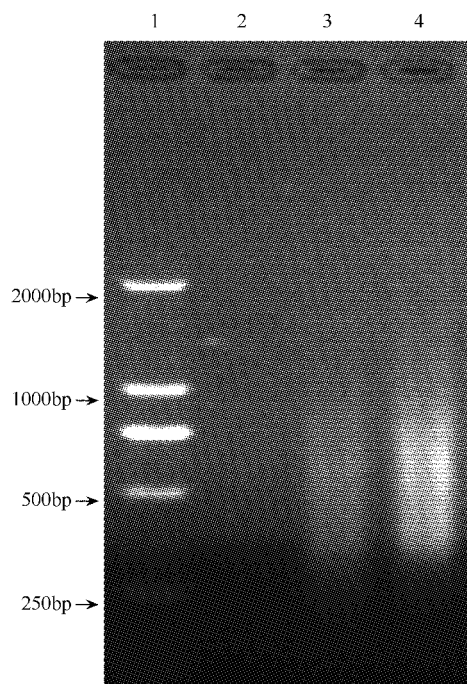


图 3 酶切片断回收和连接头电泳检测结果

Fig. 3 Electrophoresis of agarose gel recovery products of enzyme-digested genomic DNA fragments and PCR products after they are ligated with adaptors

1: 分子量标准 D2000; 2: 连接产物 PCR 反应阴性对照; 3: 酶切片断回收产物; 4: 连接产物 PCR 扩增产物。电泳条件: 1% 琼脂糖凝胶, 1  $\times$  TAE, 3.5V/cm 电压, 电泳 2.5h  
1: Molecular weight standard D2000. Lane 3: agarose gel recovery products by Qiagen II Gel Extraction Kit. Lane 2, 4: PCR-amplified genomic DNA fragments with adaptors (4) and negative control (2). Running conditions: 1% agarose, 3.5V/cm at RT for 2.5h, 1  $\times$  TAE

涤和热洗脱等过程,获得单链目的片段,再以接头为引物进行 PCR 扩增,即得双链微卫星富集目的片段(图 4)。从图 4 可以看出,富集片段集中在 250 ~ 750bp 之间,与最初酶切回收的 DNA 片段大小相符,而且富集产物的量也足够大。

## 2.5 微卫星富集片段的克隆

把磁珠捕捉产物的 PCR 产物连接(插入片段和载体的摩尔数之比是 6:1)到 T-载体,并转化大肠杆菌,最后建立了包括 8531 个克隆的粘虫微卫星富集文库。

## 2.6 微卫星富集文库的抽样检测和微卫星鉴别

从文库中随机抽取克隆,通过菌落 PCR 检测(图 5),选择实际插入片段 300 ~ 700bp 的克隆进行测序。测序数据用 RepeatMasker 分析,过滤微卫星位点。

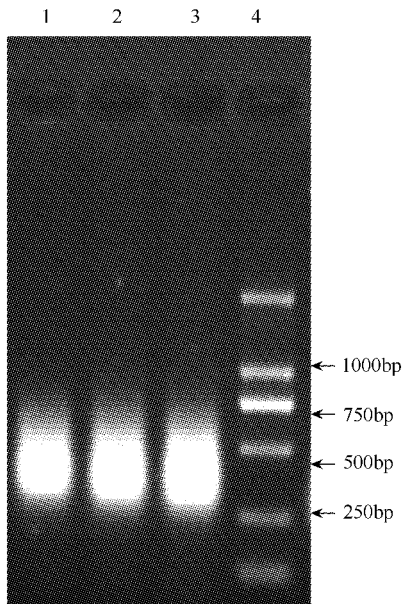


图 4 亲和捕捉及 PCR 扩增的微卫星富集 DNA 片段

Fig. 4 Microsatellite-enriched DNA fragments from affinity capture and PCR amplification

1,2,3:亲和捕捉产物 PCR 扩增结果;4:分子量标准 D2000。电泳条件:1.2% 琼脂糖凝胶,1 × TAE,3V/cm 电压,电泳 1.5h 1,2,3: Electrophoresis (3V/cm, 1.5h, 1.2% agarose) of PCR products of DNA fragments captured by streptavidin-coated magnetic beads; Lane 4: Molecular weight standard D2000

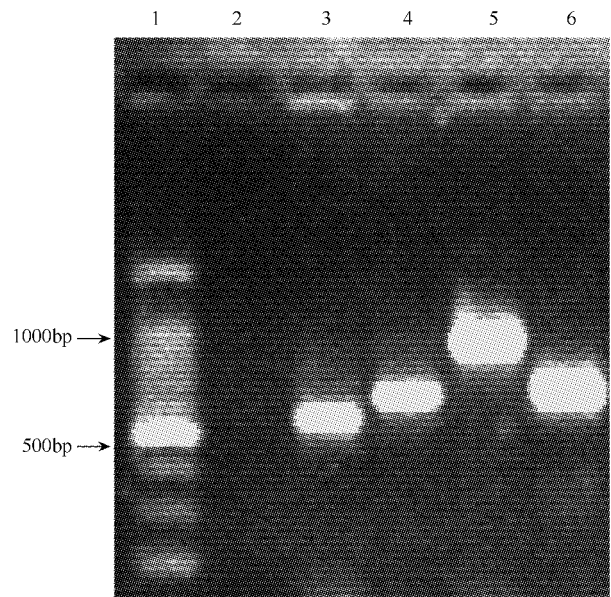


图 5 微卫星富集文库随机抽样菌落 PCR 结果

Fig. 5 Examples of PCR products of clones randomly sampled from microsatellite-enriched library

1:D2000;2:PCR 阴性对照;3,4,5,6:菌落 PCR 产物电泳结果;电泳条件:1.2% 琼脂糖凝胶,1 × TAE,3V/cm 电压,电泳 1.5h 1: Molecular weight standard D2000; Lane 2: Negative control PCR without template DNA; Lane 3, 4, 5, 6: Electrophoresis (3V/cm, 1.5h, 1.2% agarose) of colony PCR products

随机抽样测序鉴定的微卫星统计结果见表 1。微卫星阳性克隆的标准是:2 ~ 3 核苷酸微卫星重复次数 ≥ 10,4 ~ 5 核苷酸微卫星重复次数 ≥ 5,单核苷酸重复不予统计。

由表 1 可知,共随机抽样测序 16 次 276 个克隆,占 8531 个克隆的微卫星富集文库的 2.24%。共筛选出微卫星 83 个,微卫星比例(微卫星/克隆)30.07%,最高单次抽样测序的微卫星比例达到 56%。由不同探针与磁珠杂交产生的 6 个子库随机抽样测序计算的微卫星阳性克隆率差异较大,CA 库、GAT 库和 GTT 库微卫星阴性克隆率较高,达到 40% 以上。同一子库不同转化批次筛选的阳性克隆中微卫星阳性克隆率也存在较大差异。其中,(CA)<sub>15</sub>库随机抽样测序 5 次,阳性克隆率 20% ~ 56%;(GA)<sub>15</sub>库随机抽样测序 5 次,阳性克隆率 2.5% ~ 50%;(GTT)<sub>12</sub>库随机抽样测序 1 次,阳性克隆率 41.67%;(GAT)<sub>12</sub>库随机抽样测序 1 次,阳性克隆率 40%;(GTGA)<sub>8</sub>库随机抽样测序 2 次,阳性克隆率 0 ~ 21.43%;(TAGA)<sub>8</sub>库随机抽样测序 2 次,阳性克隆率

0~6.67%。

表 1 粘虫微卫星富集文库随机抽样测序统计结果

| Table 1 Statistical results of microsatellites from sequenced clones in oriental armyworm microsatellite-enriched library |                                    |                                               |                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 探针<br>Probe                                                                                                               | 测序克隆<br>Number of clones sequenced | 微卫星数量<br>Number of microsatellites identified | 微卫星阳性克隆比例<br>Microsatellites/clones (%) |
| CA                                                                                                                        | 114                                | 46                                            | 40.35                                   |
| GA                                                                                                                        | 96                                 | 22                                            | 22.92                                   |
| GAT                                                                                                                       | 15                                 | 6                                             | 40                                      |
| GTT                                                                                                                       | 12                                 | 5                                             | 41.67                                   |
| TAGA                                                                                                                      | 20                                 | 1                                             | 5                                       |
| GTGA                                                                                                                      | 19                                 | 3                                             | 15.79                                   |
| 合计 Total                                                                                                                  | 276                                | 83                                            | 30.07                                   |

2.7 粘虫基因组微卫星的基本特征

目前发现的粘虫微卫星以 CA/TG 和 GA/TC 两类最多(表 1),分别占到已发现微卫星总数的 56.63%和 19.28%,而三核苷酸及其以上重复基序的微卫星较少。部分粘虫微卫星的核心序列和侧翼序列如表 2 所示。

在利用 RepeatMasker 分析测序数据的过程中,考虑到人类基因组微卫星数据库最为丰富,所以总是把它作为参照微卫星序列库进行比对。在比较的结果中,发现粘虫微卫星核心序列普遍存在变异现象。在统计的 76 个微卫星中,没有发生突变的 31 个,仅占 40.79%。发生转换、颠换和缺失/插入的微卫星比例分别是 48.68%、35.53%和 30.26%。同时发生两项以上突变的微卫星比例是 27.63% (transitions + transversions)、26.32% (transitions + gaps)、21.05% (transversions + gaps) 和 19.74% (transitions + transversions + gaps)。在发生变异的微卫星核心序列中,转换的碱基数 1~21 个,颠换的碱基数 1~38 个,缺失/插入发生的碱基比例是 1%~12%,缺失/插入的平均大小是 1~1.31 个碱基。

3 结论与讨论

传统的从基因组文库直接杂交筛选微卫星的方法<sup>[25]</sup>效率很低,节肢动物一般平均阳性克隆率 2%<sup>[26]</sup>。对于微卫星相对缺乏而且难以分离的鳞翅目昆虫<sup>[27]</sup>来说,分子生态研究中筛选微卫星位点必须利用富集效率较高的方法。磁珠富集法<sup>[28~33]</sup>是近年广泛采用的分离微卫星位点的方法,在多种不同物种应用中,筛选 2~4 核苷酸基序的微卫星,其富集效率达到 20%~90%<sup>[2]</sup>。研究利用此方法建立的 6 个粘虫微卫星富集文库也有相对较高的富集效率。不同探针捕捉获得的文库之间抽样测序阳性克隆率差别大,除了文库质量、文库大小、抽样误差等因素影响外,也可能反映了粘虫基因组上不同微卫星分布的差异,有待通过大量微卫星位点的进一步鉴定来证明。同一文库不同

表 2 粘虫部分微卫星核心序列及其侧翼序列

Table 2 The core sequences and flanking sequences of part microsatellites in oriental armyworm genome

| 克隆编号<br>Clone | 5'侧翼序列<br>5' flanking sequence | 核心序列<br>Core sequence                  | 3'侧翼序列<br>3' flanking sequence |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------|
| CA107         | GTGTTGTTT                      | (TG) <sub>30</sub>                     | CTTCGCTCGT                     |
| CA107         | GCCTATTGGG                     | (CTCG) <sub>12</sub>                   | AGCGGTATCA                     |
| CA111         | TGAAAGTGCT                     | (TG) <sub>17</sub>                     | AGCTGTGTTA                     |
| GAT10         | GAGCATGAAG                     | (CA) <sub>38</sub>                     | TTTGACTTIT                     |
| GAT2          | TTCGAAGATA                     | (TTG) <sub>43</sub>                    | TGTTGGGTTT                     |
| GAT5          | GAGCATGAAG                     | (CA) <sub>38</sub>                     | TTTGACTTIT                     |
| GAT7          | ATGTTAATTA                     | (CAT) <sub>9</sub>                     | CTAGTGAATT                     |
| CA11          | GGTATCGGGT                     | (TG) <sub>19</sub>                     | TGAATCACTA                     |
| CA18          | GTGCATGCTT                     | (TG) <sub>14</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| CA5           | ACCATTGTTT                     | (CA) <sub>42</sub>                     | GAAGAGTTCA                     |
| CA6           | AGTGGAATAA                     | (TG) <sub>55</sub>                     | ATTCTAAATT                     |
| CA4           | GCCTTTTGAA                     | (TG) <sub>17</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| CA8           | ATTTGATTTA                     | (TG) <sub>12</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| GA10          | TCTTCCTGTC                     | (TC) <sub>45</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| GA12          | CCTCGTTCGG                     | (TC) <sub>14</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| GA3           | CACTCCATTC                     | (CT) <sub>11</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| CA28          | ACAGTGTGGC                     | (GT) <sub>13</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| GA26          | TAAATGATGA                     | (AGATG) <sub>70</sub>                  | GATGAGGGAT                     |
| M19           | TATATAGATA                     | (TG) <sub>34</sub>                     | TTTCTATGTG                     |
| GA41          | AGCTTAAGCA                     | (AG) <sub>18</sub>                     | TAAGTCAGAA                     |
| CA48          | ATTTATCTTG                     | (CA) <sub>79</sub>                     | TCAACCTCAC                     |
| CA53          | TAAAGGTGAA                     | (TG) <sub>30</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| CA60          | CTAATCTTAC                     | (TG) <sub>13</sub>                     | AATCACTAGT                     |
| CA69          | GGCGGAGCGG                     | (CA) <sub>20</sub>                     | GCGCTACGCT                     |
| CA71          | GATAGTAAAA                     | (TG) <sub>32</sub>                     | CTTGTTTTAT                     |
| CA75          | AGTGAGTGAC                     | (TAGTG) <sub>5</sub> (GT) <sub>2</sub> | GTCACCTAAA                     |
| GA74          | ATTTTAAGAC                     | (TTA) <sub>20</sub>                    | TCGCTGTATG                     |

批次抽样测序阳性克隆率差别大,与不同批次连接转化效率变化大、以及涂板、挑取白斑、从文库中抽样等过程中的操作误差等有关。

抽样测序发现的粘虫微卫星不完美型(一种重复序列被 1~3 个非重复碱基隔开)占 59.21%,短的(长度小于 50bp)占 61.84%,与 InSatDb 数据库<sup>[34]</sup>中 5 种全基因组测序的昆虫微卫星不完美型占多数(69.51%~85.96%)、短型占多数<sup>[35]</sup>的结论相似。家蚕基因组微卫星以单核苷酸、三核苷酸和四核苷酸居多,三类总计占到微卫星总数的 77.58%,而本研究中截至目前的测序取样偏重于双核苷酸探针捕捉类型的文库,所得数据还不能反映粘虫基因组微卫星类型和分布的概貌,有待进一步大规模测序。

完成大规模测序后,本研究建立的文库将可用来鉴别足够多的粘虫微卫星位点,为构建粘虫遗传图谱、物理图谱以及全基因组图谱提供定位标记;对微卫星分布、核心序列和侧翼序列的变异等进行深入研究,也可以为比较基因组学和生物进化的研究提供证据;利用微卫星位点的多态性可研究不同自然种群的微卫星多态性特征,期望能够为目前东方粘虫治理中比较困惑的虫源问题提供解决方案。

## References:

- [1] Chen R L, Sun Y J, Wang S Y, *et al.* Migration of the oriental armyworm *Mythimna separata* in East Asia in relation to weather and climate. I. Northeastern China. In: Drake V A and Gatehouse A G eds. Insect migration: tracking resources through space and time. New York: Cambridge University Press, 1995. 93—104.
- [2] Lee J H, Uhm K B. Migration of the oriental armyworm *Mythimna separata* in East Asia in relation to weather and climate. II. Korea. In: Drake V A and Gatehouse A G ed. Insect migration: tracking resources through space and time. New York: Cambridge University Press. 1995. 105—116.
- [3] Hirai K. Migration of the oriental armyworm *Mythimna separata* in East Asia in relation to weather and climate. III. Japan. In: Drake V A and Gatehouse A G eds. Insect migration: tracking resources through space and time. New York: Cambridge University Press, 1995. 117—130.
- [4] Xu X W. Outbreak of the third generation oriental armyworm *Mythimna separata* in Qinyang. Plant Protection Technology and Extension, 2002, 22(12):42.
- [5] Li X H. A study on the factors of the third generation oriental Armyworm *Mythimna separata* occurrence in Xiyang. Plant Protection Technology and Extension, 2003, 23(3): 19—20.
- [6] Huber K, Loan L L, Hoang T H, *et al.* Genetic differentiation of the dengue vector *Aedes aegypti* using microsatellite markers. Molecular Ecology, 2002, 11(9): 1629—1635.
- [7] Simard F, Lehmann T, Lemasson J J, *et al.* Persistence of *Anopheles arabiensis* during the severe dry season conditions in Senegal: an indirect approach using microsatellite loci. Insect Molecular Biology, 2000, 9(5): 467—479.
- [8] Wilson A C C, Sunnucks P, Hales D F. Microevolution, low clonal diversity and genetic affinities of parthenogenetic Sitobion aphids in New Zealand. Molecular Ecology, 1999, 8(10):1655—1666.
- [9] Simon J C, Baumann S, Sunnucks P, *et al.* Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid Sitobion avenae studied using phenotypic and microsatellite markers. Molecular Ecology, 1999, 8(4):531—545.
- [10] Fuller S J, Chavigny P, Lapchin L. Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France. Molecular Ecology, 1999, 8(11): 1867—1877.
- [11] Kamau L, Lehmann T, Hawley W A, *et al.* Microgeographic genetic differentiation of *Anopheles gambiae* mosquitoes from Asembo Bay, western Kenya: a comparison with Kilifi in coastal Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1998, 58(1):64—69.
- [12] Jame P, Lagoda J L. Microsatellite, from molecules to population and back. Trends in Ecology & Evolution, 1996, 11(10):424—429.
- [13] England P R, Briscoe D A, Frankham R. Microsatellites polymorphisms in a wild population of *Drosophila melanogaster*. Genetical Research, 1996, 67(3):285—290.
- [14] Weber J L and May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3):388—396.
- [15] Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiacmuscle actin gene. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3):397—401.
- [16] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research. 1989, 17(16):6463—6471.

- [17] Speight M R, Watt A, Hunter M. Ecology of insects: concepts and applications (2nd ed). London: Blackwell Science, 2005.
- [18] Behura S K. Molecular marker system in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, 2006, 15(11):3087—3113.
- [19] Miao X X, Xu S J, Li M H, *et al.* Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2005, 102(45):16303—16308.
- [20] Reddy K D, Abraham E G, Nagaraju J. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: abundance, polymorphism, and strain characterization. *Genome*, 1999, 42(6):1057—1065.
- [21] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual*(3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
- [22] Moeller E M, Bahnweg G, Sandermann H, *et al.* A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(22):6115—6116.
- [23] Ibrahim K M, Yassin Y, Elguzouli A. Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci in the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4: 653—655.
- [24] Leonardia A A P, Kumar P P, Tan Benito C. Development of microsatellite markers for the tropical moss, *Acanthorrhynchium papillatum*. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 396—398.
- [25] Rassmann K, Schlotterer C, Tautz D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*. 1991, 12(2-3):113—118.
- [26] Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2002, 11(1):1—16.
- [27] Zhang D X. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, 19(10):507—509.
- [28] Kandpal R P, Kandpal G, Weissman S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1994, 91(1):88—92.
- [29] Kijas J M, Fowler J C, Garbett C A, *et al.* Enrichment of Microsatellites from the Citrus Genome Using Biotinylated Oligonucleotide Sequences Bound to Streptavidin-Coated Magnetic Particles. *BioTechniques*, 1994, 16(4):656—662.
- [30] Karagyozov L, Kalcheva I D, Chapman V M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16):3911—3912.
- [31] Brown J, Hardwick L J, Wright A F. A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes. *Molecular and Cellular Probes*, 1995, 9(1):53—58.
- [32] Fischer D and Bachmann K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques*, 1998, 24(5):796—802.
- [33] Edwards K J, Barker J H A, Daly A, *et al.* Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques*, 1996, 20(5):758—760.
- [34] Archak S, Meduri E, Kumar P S, *et al.* InSatDb: a microsatellite database of fully sequenced insect genomes. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1):D36—D39.
- [35] <http://210.212.212.8/PHP/INSATDB/analysis.php>

#### 参考文献:

- [4] 徐小娃. 沁阳市2002年三代黏虫暴发. *植保技术与推广*, 2002, 22(12):42.
- [5] 李新华. 昔阳县三代黏虫发生影响因子分析. *植保技术与推广*, 2003, 23(3):19~20.