

毛桉 ISSR-PCR 反应体系的建立

李娜, 张存旭, 刘伟, 宋利伟, 王豪, 杨玲

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以毛桉叶片为试材,通过单因素 2 次循环试验对毛桉 ISSR 反应体系进行优化,建立了毛桉 ISSR-PCR 的最佳反应体系和扩增程序。结果表明:PCR 反应体系总体积为 25 μL ,其中 10 \times Buffer 2.5 μL ,模板 DNA 用量 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶用量 1.5 U, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L,引物浓度 0.6 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 浓度 0.15 mmol/L;扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 48.8~59.1 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 38 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。在此基础上,从 100 条 ISSR 通用引物中筛选出 17 条多态性好、稳定性高的引物,并优化了它们的退火温度。这一优化体系的建立,为开展毛桉种质资源鉴定、遗传多样性及分子育种方面的研究提供了技术依据和参考。

关键词:毛桉;ISSR;单因素 2 次循环试验;体系优化;引物筛选

中图分类号:S 792.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0104-06

毛桉(*Cornus wateri*)属山茱萸科桉木属落叶乔木或灌木,又名车梁木、油树,既是我国重要的优良用材树种,也是产区很有开发潜力的油料树种,其果实含油量高达 34%,其油既可食用,又可作为生物柴油理想的原料,可见毛桉是极具发展前景的食用和工业用油料树种,具有较高的经济及科研价值^[1]。现国内外对毛桉的研究相对较少,其多种价值尚未开发利用,到目前为止,关于毛桉的研究主要集中在生物学特性^[2]、种子繁殖及栽培技术^[3]等宏观方面,利用 ISSR 标记技术对毛桉的相关研究国内外尚鲜见报道。

ISSR(Inter Simple Sequence Repeat)又称简单序列重复区间扩增,是由 Zietkiewicz 等^[4]改造创建的一种新型分子标记技术。该标记技术与其它分子标记技术相比,具有试验过程更为简单、快速,多态性和重复性高,所需 DNA 量少,无需知道基因组序列且成本较低等优点,现多用于林木遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱构建、基因定位^[5-7]等的研究。由于 ISSR 标记与 RAPD 标记一样,是一种基于聚合酶链式反应的分子标记,其扩增反应易受到各组分浓度及 PCR 扩增程序的影响且具有物种特异性,因此有必要对毛桉 ISSR-PCR 反应体系及扩增程序中的主要影响因子进行系统优化,以确保试验分析的准确性。目前,对 ISSR-PCR 反应体系

进行优化多采用单因素单循环设计或正交实验设计^[8],采用单因素 2 次或 2 次以上循环设计进行 ISSR 反应条件优化鲜见报道。该研究采用单因素 2 次循环试验,优化出毛桉 ISSR 的最佳反应体系和扩增程序,在此基础上,筛选出适合毛桉 ISSR 分析的有效引物并优化其退火温度,以期为进一步利用 ISSR 标记技术进行毛桉种质资源遗传多样性、分子鉴定、分子标记辅助育种和基因定位等研究提供技术依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试毛桉采自西北农林科技大学林学院苗圃试验地,于 2012 年 4 月末从毛桉健康植株上采摘幼叶,将其分别放入装有硅胶的密封袋中,做好标记,带回贮于超低温冰箱中备用。

试剂与仪器:试验所用引物购自上海生物工程公司, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)、dNTPs(2.5 mmol/L)、DL 2 000 Marker 均购自 TaKaRa 公司;所用仪器有 Bio-RAD My cyclerTM thermal cycler PCR 扩增仪(美国),Bio-RAD Powerpac Basic-041BR 电泳仪(美国)和 DYY-12 型电泳槽(北京六一仪器厂),Eppendorf Biophotometer 核酸蛋白测定仪(德国),Bio-RAD Universal Hood II 凝胶成像系统(美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照李昌珠等^[9]的方法,用核酸蛋白测定仪测定 DNA 的浓度和纯度,用超纯水将 DNA 统一稀释至 20 ng/ μL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 ISSR 扩增反应条件优化 在 ISSR 经典扩增方案的基础上,将李昌珠等^[9]的扩增程序和反应体系构成

第一作者简介:李娜(1988-),女,硕士研究生,现主要从事林木遗传育种科学研究工作。E-mail:657874432@qq.com

责任作者:张存旭(1961-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事林木遗传育种科学研究工作。E-mail:cxzhang@nwsuaf.edu.cn

基金项目:国家林业公益性行业专项资助项目(200804010);陕西省教育厅科研计划资助项目(06JK153)。

收稿日期:2013-06-19

设定为该试验的原初反应程序和原初反应体系,经过初步的引物筛选,选用引物 UBC855 作为此反应体系优化试验的固定引物,根据 ISSR 体系优化的相关文献及预备试验的结果,反应体系中各因素处理水平见表 1。PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上以 100 V 电压进行电泳分离,EB 染色显带,凝胶成像系统下观察,拍照。

表 1 ISSR-PCR 反应体系的处理因素与水平

Table 1 The design factor and level of ISSR-PCR reaction system

因素 Factor	水平 Level
模板 DNA 用量/ng	10,20,30,40,50,60,70
dNTPs 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.10,0.15,0.20,0.25,0.30,0.35,0.40
Mg^{2+} 浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.0,1.5,2.0,2.5,3.0
Taq DNA 聚合酶用量/U	0.50,1.00,1.50,1.75,2.00
引物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.2,0.4,0.6,0.8,1.0
退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	48.0,48.8,50.3,52.4,55.3,57.6,59.1,60.0
循环次数/次	30,32,35,38,40,43,45
退火时间/s	30,45,60

2 结果与分析

2.1 模板 DNA 用量优化

由图 1 可知,当模板 DNA 用量为 10、20 ng 时扩增出的条带较少,当其用量为 30~70 ng 时,能扩增出数量大致相同的条带,说明毛榛 ISSR 反应对模板 DNA 用量不敏感,模板用量许可范围较大,但当模板用量为 40 ng 时条带最清晰。

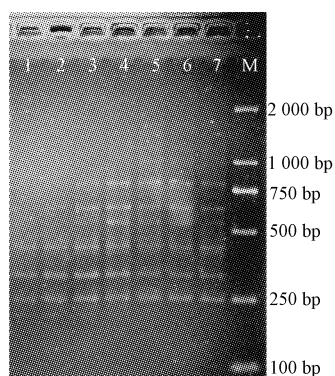


图 1 模板 DNA 用量对 ISSR 扩增的影响

注:M;DL 2 000 Marker;1~7 分别表示 10、20、30、40、50、60、70 ng (25 μL) 的 DNA 用量。

Fig. 1 Effect of template DNA quantity on ISSR product

Note:M;DL 2 000 Marker;1~7 indicating template DNA 10,20,30,40,50,60,70 ng (25 μL) respectively.

2.2 Taq DNA 聚合酶用量优化

由图 2 可见,Taq DNA 聚合酶用量过低时,无条带产生,随着用量的增加,条带增加、变亮,当酶用量为 1.00 U 和 1.50 U 时,扩增谱带清晰、稳定且扩增效果无明显差别,为节约成本,在确保试验结果稳定的前提下,选用较低的用量 1.00 U。

2.3 Mg^{2+} 浓度优化

由图 3 可见,当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 mmol/L 时,未扩增出条带;随着 Mg^{2+} 浓度的增加,有扩增产物出现,但相应的条带少且弱;当 Mg^{2+} 浓度为 2.5 mmol/L 时,条

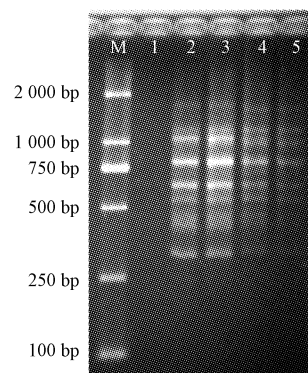


图 2 Taq DNA 聚合酶浓度对 ISSR 扩增的影响

注:M;DL 2 000 Marker;1~5 分别表示 0.50、1.00、1.50、1.75、2.00 U(25 μL)的 Taq DNA 聚合酶用量。

Fig. 2 Effect of Taq DNA polymerase quantity on ISSR product

Note:M;DL 2 000 Marker;1~5 indicating Taq DNA polymerase 0.50,1.00,1.50,1.75,2.00 U (25 μL) respectively.

带数量较多,清晰稳定,效果最好;而当 Mg^{2+} 浓度继续增加至 3.0 mmol/L 时,非特异性条带增加,条带变弱,不清晰。因此,确定 2.5 mmol/L 为 Mg^{2+} 的最适浓度。

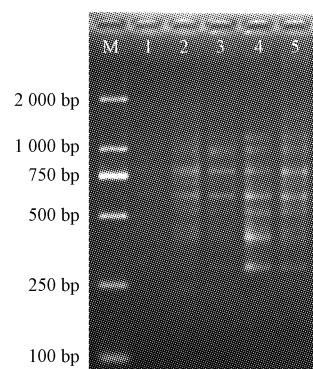


图 3 Mg^{2+} 浓度对 ISSR 扩增的影响

注:M;DL 2 000 Marker;1~5 分别表示 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度。

Fig. 3 Effect of Mg^{2+} concentration on ISSR product

Note:M;DL 2 000 Marker;1~5 indicating Mg^{2+} concentrations 1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mmol/L respectively.

2.4 引物浓度优化

由图 4 可见,当引物浓度在 0.2~0.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增不完全,电泳条带较少且不清晰;当引物浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,非特异性条带增加,扩增条带减弱变暗,模糊不清;以扩增条带的多少、强弱以及带型的清晰度、稳定性为标准,故确定 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 为最适引物浓度。

2.5 dNTPs 浓度优化

由图 5 可见,当 dNTP 浓度过低,在 0.1~0.2 mmol/L 之间时,扩增条带数量少且趋于弱化;当 dNTP 浓度过高,在 0.3~0.4 mmol/L 时,扩增出的条带数并未增加,反而明显减少,有缺失现象,不易辨认;而当 dNTP 浓度 0.25 mmol/L 时,扩增效率最高,条带最亮。

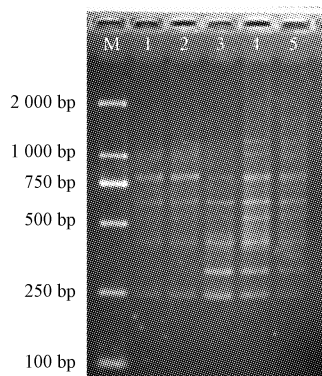


图4 引物浓度对 ISSR 扩增的影响

注:M; DL 2 000 Marker; 1~5 分别表示 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的引物浓度。

Fig. 4 Effect of primer concentration on ISSR product

Note:M; DL 2 000 Marker; 1~5 indicating primer concentrations 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ respectively.

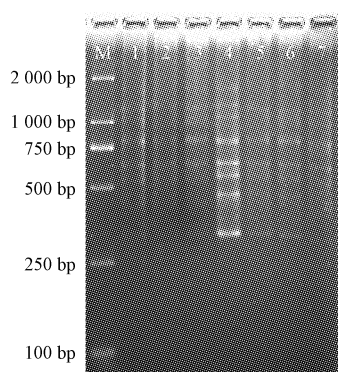


图5 dNTPs 浓度对 ISSR 扩增的影响

注:M; DL 2 000 Marker; 1~7 分别表示 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40 mmol/L 的 dNTPs 浓度。

Fig. 5 Effect of dNTPs concentration on ISSR product

Note:M; DL 2 000 Marker; 1~7 indicating dNTPs concentrations 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40 mmol/L respectively.

2.6 退火时间优化

由图6可见,退火时间为30、45 s时扩增条带黯淡,而退火时间为60 s时条带较亮,扩增效果最好。故最佳退火时间为60 s。

2.7 循环次数优化

PCR 循环次数决定着扩增程度,次数太少,PCR 产物量极低;次数过多,超过最适值后,会增加非特异性扩增产物的数量和复杂性。该试验设置了7个不同循环次数,从图7可以看出,在38次循环条件下,扩增的条带清晰可辨,强弱合适,多态性最好。

2.8 退火温度优化

在确定反应体系的基础上,该试验采用梯度 PCR 模式,确定 UBC-855 的最佳退火温度,根据引物给定的 T_m 值设定温度范围 48~60 $^{\circ}\text{C}$,PCR 仪自动产生 8 个温度梯度:48.0、48.8、50.3、52.4、55.3、57.6、59.1、60.0 $^{\circ}\text{C}$ 。图8结果显示,退火温度对毛桃 ISSR 扩增效果有显著

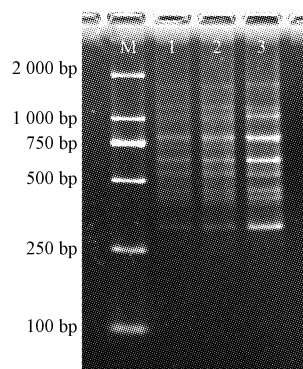


图6 退火时间对 ISSR 扩增的影响

注:M; DL 2 000 Marker; 1~3 分别表示退火时间为 30、45、60 s。

Fig. 6 Effect of annealing time on ISSR product

Note:M; DL 2 000 Marker; 1~3 indicating annealing time 30, 45, 60 s respectively.

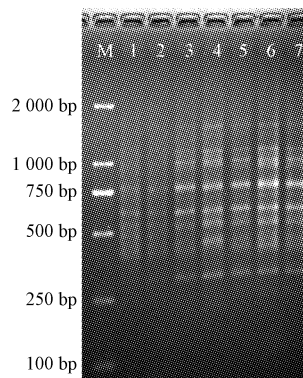


图7 循环次数对 ISSR 扩增的影响

注:M; DL 2 000 Marker; 1~7 分别表示循环次数为 30、32、35、38、40、43、45 次。

Fig. 7 Effect of cycle number on ISSR product

Note:M; DL 2 000 Marker; 1~7 indicating cycle numbers 30, 32, 35, 38, 40, 43, 45 respectively.

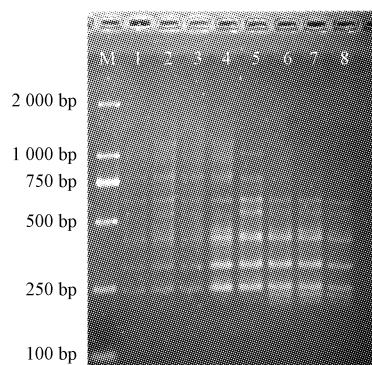


图8 退火温度对 ISSR 扩增的影响

注:M; DL 2 000 Marker; 1~8 分别表示退火温度为 48.0、48.8、50.3、52.4、55.3、57.6、59.1、60.0 $^{\circ}\text{C}$ 。

Fig. 8 Effect of annealing temperature on ISSR product

Note:M; DL 2 000 Marker; 1~8 indicating annealing temperature 48.0, 48.8, 50.3, 52.4, 55.3, 57.6, 59.1, 60.0 $^{\circ}\text{C}$ respectively.

影响,当退火温度低于 52.4℃时,扩增出的条带模糊,主带不够清晰;随着温度的升高,扩增特异性增强,但当提高退火温度至 57.6℃以上,扩增条带数明显减少,而当退火温度为 55.3℃时,谱带最清晰,效果最好。

2.9 交互作用对 ISSR 扩增结果的影响

该研究通过单因素 2 次循环试验来检验相关反应

因素间的交互作用是否对 ISSR 扩增结果产生影响,图 1~8 为第 1 次循环,图 9 为第 2 次循环。由图 1~9 前后 2 次循环可以看出,各反应因素间交互作用明显。因此,为排除交互作用对试验的影响,该试验的最终结果应与第 2 次循环所得出的结论一致。

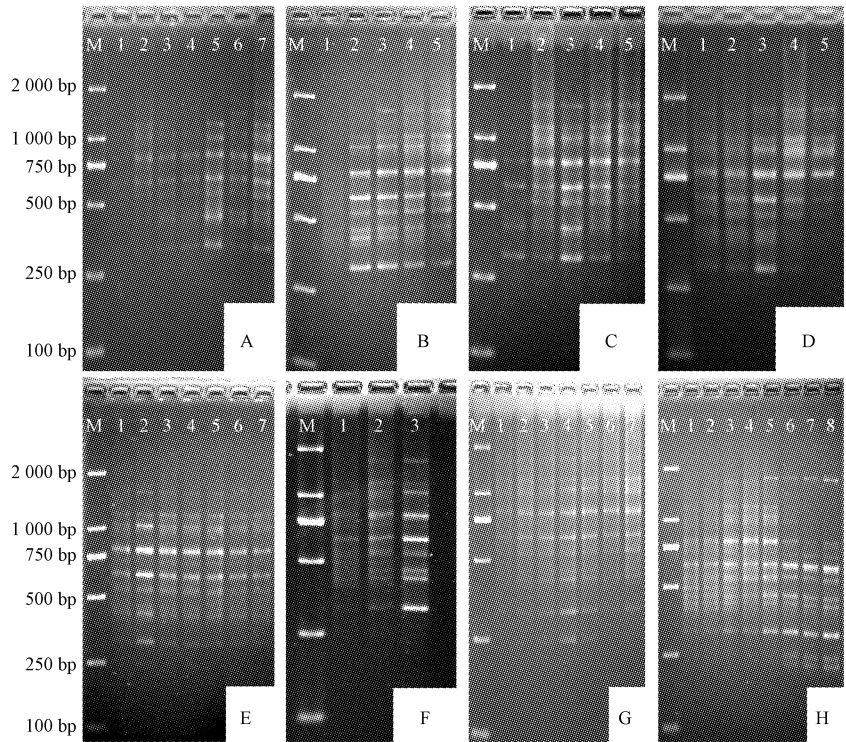


图 9 ISSR 反应条件第 2 次循环优化

注:A:模板 DNA 用量;B: *Taq* DNA 聚合酶用量;C: Mg^{2+} 浓度;D:引物浓度;E:dNTPs 浓度;F:退火时间;G:循环次数;H:退火温度。

Fig. 9 The second optimization of factors on ISSR

Note: A: Template DNA quantity; B: *Taq* DNA polymerase quantity; C: Mg^{2+} concentration; D: Primer concentration; E: dNTPs concentration; F: Annealing time; G: Cycle number; H: Annealing temperature.

2.10 反应体系和扩增程序的建立

该试验采用单因素 2 次循环试验设计,表明毛桃 ISSR 最佳反应体系是:PCR 反应体系总体积为 25 μ L,其中 10 \times Buffer 2.5 μ L,模板 DNA 用量 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶用量 1.5 U, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L,引物浓度 0.6 μ mol/L, dNTPs 浓度 0.15 mmol/L;毛桃 ISSR 最佳扩增程序:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s, 48.8~59.1℃(退火温度随引物不同而设定)退火 60 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 38 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

2.11 ISSR 引物的筛选

利用已确定的反应体系和扩增程序,用 3 个不同的毛桃 DNA 模板经初筛、复筛从 100 条 ISSR 引物中筛选出 17 条扩增带型清晰、多态性高、特异性强的引物,同时采用梯度 PCR 模式,对这些引物的退火温度进行优化,优化方法同 2.8,引物筛选与其退火温度的优化结合进行,结果发现不同引物具有不同的最佳退火温度,最终筛选出的引物及其各自最适退火温度见表 2。

表 2 筛选出的有效引物及其最佳退火温度

Table 2 Screening of ISSR primers and their optimum annealing temperatures

引物 Primers	序列 Sequence(5'~3')	退火温度 Annealing temperature/℃
UBC-807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	52.4
UBC-812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	50.3
UBC-813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	57.6
UBC-825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	57.6
UBC-826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	55.3
UBC-834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	55.3
UBC-835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	52.4
UBC-836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	57.6
UBC-840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	52.4
UBC-842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	57.6
UBC-844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	55.3
UBC-848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	48.8
UBC-855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	55.3
UBC-868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	50.3
UBC-880	GGA GAG GAG AGG AGA	50.3
UBC-895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	55.3
UBC-899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TC	59.1

3 结论与讨论

任耀忠等^[8]已成功利用单因素 2 次循环试验设计对栓皮栎 RAPD 反应条件进行优化,结果表明单因素 2 次循环试验设计也同样适用于毛桉 ISSR 反应体系的优化,最终优化的毛桉 ISSR 反应体系是:25 μL 反应体系中含有 $10 \times \text{Buffer}$ 2.5 μL ,模板 DNA 用量 50 ng, *Taq* DNA 聚合酶用量 1.5 U, Mg^{2+} 浓度 2.0 mmol/L,引物浓度 0.6 $\mu\text{mmol/L}$, dNTPs 浓度 0.15 mmol/L;最佳扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 50 s,48.8~59.1℃(退火温度随引物不同而设定)退火 60 s,72℃延伸 1.5 min,38 个循环;最后 72℃延伸 10 min。利用优化的反应体系和扩增程序,从 100 条 ISSR 通用引物中筛选出 17 条多态性好、稳定性高的有效引物,并优化了它们的退火温度,这为进一步利用 ISSR 分子标记技术开展对毛桉的相关研究奠定了基础。

ISSR 反应体系中,关键是调节 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度。 Mg^{2+} 是 *Taq* DNA 酶的激活剂,它通过影响 *Taq* DNA 酶的活性从而显著地影响 PCR 扩增; Mg^{2+} 浓度过低,*Taq* DNA 酶活力显著降低,甚至不能扩增出条带; Mg^{2+} 浓度过高则会使引物的错配频率增加,导致非特异性扩增,使其背景模糊、条带弥散^[10]。引物浓度的变化实质上是改变了引物和模板配对的几率,进而影响扩增结果;浓度过低,导致引物和模板的结合率降低,不能进行有效扩增,扩增不出条带或条带较弱;浓度过高,会引起碱基错配和非特异性扩增,引物二聚体形成的几率也会增大,导致条带出现弥散^[11]。dNTPs 作为 PCR 反应的原料,参与新链 DNA 的合成,其用量取决于扩增片段的长度;此外,dNTPs 浓度的大小直接关系到扩增产物量的多少,适宜的 dNTP 浓度对获得理想的扩增结果尤为重要,浓度过低会影响合成效率,则产率降低,甚至使产物单链化,扩增条带少、弱,不易辨认;而高浓度的 dNTPs 易产生错误掺入,导致某些片段可能扩增不出产物,条带变少且模糊不清^[12]。另外,该研究结果表明,毛桉的 ISSR 反应体系对模板 DNA 用量的变化不敏感,这与郭凌飞等^[13]报道的研究结果一致。ISSR 扩增程序中,退火温度对反应的影响较大,退火温度随引物和试验材料的不同而不同,因而确定合适的退火温度至关重要。温度过低时,产物特异性差;温度过高时,扩增条带明显减少甚至无条带^[12]。适宜的退火温度能够提高 PCR 反应的特异性,因此,退火温度

的梯度试验是非常有必要的。

目前,ISSR 反应体系的建立大多采用单因素单循环试验方法,这样会忽视各因素之间的交互效应,由该研究的第 2 次循环试验可知,各因素间的交互作用明显,为兼顾到各因素间的交互作用,采用单因素 2 次循环试验设计是进行 ISSR 反应条件优化较为科学合理的方法。此外,也可采用正交设计、均匀设计等方法,其可行性已有报道。该试验首次运用单因素 2 次循环试验设计进行 ISSR 反应体系的优化,其可行性已得到验证,这为今后其它物种 ISSR 体系优化的相关研究提供新方法、新思路。试验过程中,引物的筛选及对各环节的效果检测都表明最终优化的体系适合毛桉的 ISSR 分析。

参考文献

- [1] 赵宝鑫,康晋,康永祥,等.毛桉优树选择的研究[J].西北林学院学报,2012,27(3):76-79.
- [2] 康永祥,陈绵,康晋,等.毛桉的生物学特性研究[J].西北林学院学报,2012,27(3):57-62.
- [3] 康永祥,赵宝鑫,贡玉洁,等.毛桉天然群体种实表型多样性研究[J].西北农林科技大学学报,2011,39(9):106-108.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994(20):176-183.
- [5] He X H, Pan H, Deng L B, et al. Genetic Diversity of natural *Myrica rubra* Sieb. et Zucc populations in Guangxi revealed by ISSR markers[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(5):626-632.
- [6] Martins-Lopes P, Lima-Brito J, Gomes S, et al. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification[J]. Crop Evolution, 2007, 54:117-128.
- [7] Venkateswarlu M, Raje Urs S, Surendra Nath B, et al. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy[J]. Tree Genetics and Genomes, 2006(3):15-24.
- [8] 任耀忠,张文辉,刘莉丽,等.栓皮栎 RAPD 反应条件优化研究[J].西北林学院学报,2009,24(2):55-59.
- [9] 李昌珠,李培旺,张良波,等.光皮树无性系 ISSR-PCR 反应体系的建立[J].经济林研究,2009,27(2):6-9.
- [10] 顾婧婧,金则新,李钧敏,等.乌药 ISSR 扩增条件的优化[J].西北林学院学报,2008,23(6):94-97.
- [11] 李房英,黄彦晶,吴少华,等.三角梅 ISSR 反应体系的建立和优化[J].生物技术通报,2010(7):143-145.
- [12] 张永夏,刘晓,黎科,等.珍稀植物杨叶肖槿 ISSR 体系建立及检测[J].西北植物学报,2012,32(4):829-834.
- [13] 郭凌飞,邹明宏,曾辉,等.澳洲坚果 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].林业科学,2008,44(5):160-164.

Establishment of ISSR-PCR Reaction System of *Cornus walteri*

LI Na, ZHANG Cun-xu, LIU Wei, SONG Li-wei, WANG Hao, YANG Ling

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

江汉平原蔬菜地频振灯下昆虫群落多样性研究

周 雷¹, 王 玲², 雷小涛¹, 陈光然¹, 王香萍¹

(1. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025; 2. 湖北省荆州市植保站, 湖北 荆州 434020)

摘 要:在江汉平原荆州郊区露地蔬菜田, 应用佳多牌频振式杀虫灯对蔬菜昆虫进行了 2 a 诱杀试验, 以明确蔬菜田诱杀的昆虫群落的结构及多样性情况。结果表明: 频振灯诱杀的类群较多, 在不同年份之间波动差异不大, 在同一年份不同月份之间波动变化较大。丰富度在高峰时约为 50 余种, 但是其中鞘翅目和鳞翅目在其中所占比例较大, 多样性在 2.0~4.0 之间波动, 优势集中性指数在 0.05~0.50 之间波动, 均匀性指数在 0.3~0.8 之间波动。根据诱捕结果判断害虫发生高峰时间, 可以为害虫的监测与防治提供帮助。

关键词:频振式杀虫灯; 蔬菜; 昆虫; 诱杀; 多样性

中图分类号:S 436.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)22-0119-03

频振式杀虫灯是利用频振波诱集各种趋光、趋波性强的害虫, 以电网触杀的一种灭虫器械。据报道, 使用频振灯对蔬菜害虫进行监测、预测预报以及对某些主要害虫进行防治, 其使用效果较单一波段的灯好^[1-6]。

荆州地处江汉平原腹地, 夏秋季节温度高, 害虫猖獗, 蔬菜生产用药频繁, 害虫极易产生抗药性, 致使施药次数不断增加, 对蔬菜的安全使用威胁很大。因此, 在蔬菜生产中更应该遵循绿色生产的概念, 为安全使用蔬菜提供保证。该试验于 2009~2010 年在江汉平原蔬菜地使用频振式杀虫灯对诱杀的昆虫类群进行研究, 以期

了解其在江汉平原蔬菜地诱杀的主要类群, 进一步为蔬菜地害虫的绿色防治提供帮助和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

频振式杀虫灯(佳多牌 PS-15II 型频振式杀虫灯, 河南省汤阴县佳多科工贸有限公司生产)。试管、镊子、昆虫体视镜、解剖针、试验记录专用笔和纸。试验田为蔬菜田, 主要为番茄、黄瓜、豆角及十字花科蔬菜。

1.2 试验方法

试验在湖北省荆州市荆州区郊区荆西村蔬菜基地进行。2009 年从 6 月挂灯开始至 11 月每 3 d 取 1 次虫, 2010 年从 5 月开始挂灯至 10 月每 2 d 取 1 次虫, 每天晚上 19:00 开灯, 次日 6:00 关灯, 小雨天气可正常开灯, 遇大风雷雨天气不开灯。将诱杀的昆虫带回实验室进行鉴定分类, 并记录好昆虫的种类、数量。至诱虫量较少后结束试验。

频振灯安装时确定好架灯位置后栽 2 根木桩或三

第一作者简介:周雷(1989-), 男, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态。

责任作者:王香萍(1975-), 女, 湖北钟祥人, 博士, 教授, 现主要从事植物保护教学与科研工作。E-mail: wang.xiang.ping@126.com.

基金项目:湖北省教育厅资助项目(D20101305)。

收稿日期:2013-06-17

Abstract: Using leaves of *Cornus walteri* as material, ISSR reaction conditions of *Cornus walteri* were optimized systematically via single factor with two circular tests, and the optimal ISSR reaction system and thermal cycling conditions of *Cornus walteri* were established. The results showed that the optimal ISSR reaction system included a total volume 25 μ L containing 2.5 μ L 10 \times Buffer, 50 ng template DNA, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.6 μ mol/L primer, 0.15 mmol/L dNTPs. Thermal cycling conditions were as follows: denaturation 5 min at 94 $^{\circ}$ C; 38 cycles of 50 s at 94 $^{\circ}$ C, 60 s at 48.8~59.1 $^{\circ}$ C, 1.5 min at 72 $^{\circ}$ C; and a final extension of 10 min at 72 $^{\circ}$ C at the end of the amplification. Based on the optimized reaction system, 17 primers with superior stability and polymorphism were screened out from 100 ISSR primer candidates. Subsequently, annealing temperatures of selected primers were subjected to further optimization. As a consequence, the optimized system in this study may provide technological base and reference for identification of germplasm resources, genetic diversity and molecular breeding of *Cornus walteri*.

Key words: *Cornus walteri*; ISSR; single factor with two circular tests; system optimization; primer screening