

# 小菜蛾对阿维菌素抗性基因的 AFLP 连锁图谱的构建

罗倩<sup>1,2</sup>, 冯夏<sup>1</sup>, 吕利华<sup>1,\*</sup>, 万树青<sup>2</sup>, 陈焕瑜<sup>1</sup>

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广州 510640; 2. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

**摘要:** 世界性害虫小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 田间种群已对阿维菌素药剂产生了高抗药性。本研究以小菜蛾对阿维菌素的抗性品系、敏感品系和回交群体组建作图家系, 再利用 AFLP 技术构建小菜蛾对阿维菌素抗性基因的连锁图谱。用 10 组 AFLP 引物组合对未经药剂处理的小菜蛾成虫 DNA 选择性扩增, 共获得 1 044 条可区分的 DNA 条带, 271 条带具有多态性,  $\chi^2$  检验表明只有 123 个位点符合 1:1 ( $P=0.05$ ) 其中的 112 个构成 28 个连锁群, 其总长度为 1 222.7 cM; 用 10 组 AFLP 引物对经药剂处理后存活的小菜蛾成虫 DNA 扩增, 所得的 DNA 条带中有 54 个条带符合分离比 1:1, 经 Mapmaker 3.0 对多态性位点分析, 只有 E1M4-15、E1M1-4 和 E1M4-2 标记位点位于同一连锁群, 3 个 AFLP 标记与抗性基因的遗传距离分别为 0 cM、8.3 cM 和 13.1 cM。比较分析得出, 抗性基因所在的连锁群是第 5 连锁群。结果显示 AFLP 连锁图谱对小菜蛾对阿维菌素的抗性监测具有很好的应用潜力。

**关键词:** 小菜蛾; 阿维菌素; 抗性基因; AFLP 标记

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)05-0474-07

## Linkage mapping of resistance to abamectin in the diamondback moth using AFLP marker

LUO Qian<sup>1,2</sup>, FENG Xia<sup>1</sup>, LU Li-Hua<sup>1,\*</sup>, WAN Shu-Qing<sup>2</sup>, CHEN Huan-Yu<sup>1</sup> (1. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. College of Natural Resources and Environments, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), is an important insect pest in cruciferous vegetables and has developed high resistance to avermectin all over the world. In this study, AFLP was used to construct a linkage map of resistance to avermectin in diamondback moth. The mapping families consisted of the susceptible strain, the abamectin-resistant strain and their backcross progeny. A total of 1 044 DNA bands and 271 polymorphic loci were amplified using 10 combinations of AFLP primers. Chi-square ( $\chi^2$ ) analysis indicated that only 123 bands fit the segregation ratio of 1:1 ( $P=0.05$ ) in these polymorphic loci. Twenty-eight linkage groups were constructed with 112 bands, covering about 1 222.7 cM of the genomics of the diamondback moth. Three markers of E1M4-15, E1M1-4, and E1M4-2, linked with abamectin-resistant gene were situated on the same linkage group and their distance apart from resistant gene was 0 cM, 8.3 cM, and 13.1 cM, respectively. Comparison with the constructed linkage map showed that the gene was located on the fifth linkage group. These AFLP markers associated with resistance to abamectin show a strong potential of application in monitoring diamondback moth resistance to abamectin.

**Key words:** *Plutella xylostella*; abamectin; resistance gene; AFLP marker

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 是一种危害十字花科蔬菜的世界性害虫, 近年来在我国南方为害非

常严重, 对田间常用杀虫剂产生了较强抗药性(唐振华 2000), 而且其田间种群对阿维菌素类生物杀虫

基金项目: 广东省自然科学基金项目(032021)

作者简介: 罗倩, 女, 1979 年生, 四川人, 博士研究生, 研究方向为害虫抗药性, E-mail: luoqianqian2@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lhlu@gdppri.com

收稿日期 Received: 2006-10-10; 接受日期 Accepted: 2006-12-20

剂也产生了较高抗药性(Iqbal and Wright, 1997; 冯夏等 2001)。20 世纪 90 年代昆虫学家开始利用分子生物学技术研究小菜蛾的抗药性机制。Heckel 等(1995)对小菜蛾抗苏云金杆菌品系的抗药性进行了 RAPD 分析,标记到 118 条与抗性有关的特异性扩增带;利用 RAPD 方法对抗杀虫双、抗杀螟丹近等基因系的小菜蛾基因组 DNA 扩增,获得与抗性有关的特异性扩增带(程罗根等,2001);利用代表性差异分析技术初步分析了小菜蛾敏感品系及其抗杀虫双和抗溴氰菊酯近等基因系之间的遗传差异,分别获得与抗药性有关的差异片段(李忠英等,2002)。Heckel 等(1999)利用扩增片段长度多态性(AFLP)技术和鳞翅目昆虫的双相连锁特性开展小菜蛾的苏云金杆菌抗性基因连锁研究,将获得 207 个 AFLP 标记分为 31 个连锁群,标记出其苏云金杆菌抗性基因(*BiR-1*)位置。但目前国内外尚未见有关小菜蛾的阿维菌素抗性基因连锁分析的研究报道。

本研究以小菜蛾对阿维菌素的抗药性为研究对象,利用鳞翅目昆虫的双相连锁遗传特性和 AFLP 技术,建立小菜蛾抗性遗传家系并寻找与抗性连锁的 AFLP 标记,分析小菜蛾的阿维菌素抗性基因的连锁,明确其分子遗传机理,为抗性治理方案的制定提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试虫和试剂

**1.1.1 试虫:**采用蛭石萝卜苗法(陈之浩等,1990)室内饲养小菜蛾供试品系。其中小菜蛾敏感品系(abamectin-susceptible strain, ABM-S)由广东省农科院植物保护研究所农药研究室提供;阿维菌素抗性品系(abamectin-resistant strain, ABM-R)由广东省农科院植物保护研究所农药研究室长期选育并室内保持,本实验时又继代选育了 13 代,获得抗性指数 902 倍的高抗品系。

**1.1.2 抗性作图家系的构建:**小菜蛾的阿维菌素抗药性属常染色体、不完全隐性遗传(李腾武等,1999),因此  $F_1$  雄虫( $\sigma$ ) $\times$ 抗性雌虫( $\rho$ )回交后代的抗感表现型的分离比例为 1:1, $F_1$  代所有异质性标记位点在回交后代的分离比例也为 1:1。经筛选的敏感品系纯合子(abamectin-pure susceptible strain, ABM-PS)与 ABM-R 单对杂交得到  $F_1$  代。经 1.0 mg/L 区分剂量处理,获得 10 个平均死亡率达 91.85%

$\pm 0.85\%$  的  $F_1$  组合;然后将  $F_1$  雄虫( $\sigma$ )与 ABM-R 雌虫( $\rho$ )群体回交得到回交后代。用 1.0 mg/L 区分剂量处理回交子代,10 个株系的回交子代平均死亡率为  $47.6\% \pm 3.01\%$  ( $n = 60 \sim 70$ )。统计分析表明,回交子代的存活虫数(抗性个体数)与死亡虫数(杂合子和敏感个体数之和)相比值符合 1:1 ( $\chi^2 < \chi_{0.05}^2$ )。饲养生物测定存活幼虫至成虫,将羽化 3 天的成虫置于  $-70^\circ\text{C}$  冻存。另外,将未经药剂处理幼虫饲养至成虫并置于  $-70^\circ\text{C}$  冻存。冻存成虫用于 DNA 模板的提取。

**1.1.3 生化试剂:** *Mse* I 和 *Eco*R I 内切酶以及  $\text{AgNO}_3$ (上海 Sagon 公司);双丙烯酰胺,丙烯酰胺和 TEMED(BBI);dNTPs 和尿素(赛百盛公司);Taq 酶(TaKaTa 公司);GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus(MBI);过硫酸胺及溴酚蓝。接头和引物均由上海 Sagon 公司合成。其余试剂均为国产分析纯试剂。

供试原药为 99.8% 的阿维菌素原药,由浙江海正化工股份有限公司提供,用于室内小菜蛾的阿维菌素高抗品系的选育和生物测定。

### 1.2 生物测定

采用 Ismail 和 Wright(1991)叶片药膜法进行生物测定,具体方法是:将菜芯叶片浸于 1.0 mg/L 阿维菌素溶液中处理 10 s,取出放入培养皿中。每皿接入 10~20 头 3 龄幼虫(2~3 mg/头),以加 0.01% 乳化剂的蒸馏水作对照处理。每处理重复 3 次。处理后的幼虫置于  $(23 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、光周期 14L:10D 和相对湿度 75%~85% 的培养箱中培养观察。在处理 24 h、48 h 和 72 h 时,检查并记录幼虫死亡数。

在小菜蛾敏感品系和抗性品系的半致死浓度测定试验中,经 1.0 mg/L 阿维菌素药液处理的 ABM-PS 和 ABM-R 的试虫中,98% 的 ABM-PS 试虫死亡( $n = 80$ ),仅有 5% 的 ABM-R 试虫死亡( $n = 100$ ),因此确定 1.0 mg/L 为 ABM-PS 和 ABM-R 的区分剂量。

### 1.3 AFLP 分析方法

**1.3.1 DNA 模板的制备:**采用改进的 Sambrook 等(1989)方法制备小菜蛾作图家系中父代、母代、 $F_1$  代和回交后代的供试成虫的 DNA 模板。抗性亲本模板是从 ABM-R 中随机选取的 15 头成虫的 DNA 等量混合而成,敏感亲本模板是从 ABM-PS 中随机选取 15 头成虫的 DNA 等量混合而成。从回交群体中随机选取 24 个未经阿维菌素处理的回交个体,将其 DNA 用于连锁图谱分析;从被阿维菌素处理后存活的回交群体中选取 26 头成虫,将其 DNA 用于抗性

基因分析。

**1.3.2 AFLP 方法:** 采用改进的 Vos 等(1997) AFLP 方法。选择性扩增中用 *EcoR* I 和 *Mse* I 2 种限制性内切酶, 参照 Heckel 等(1999) 方法, 用 *EcoR* I 引物 [E-AA(E1) 和 E-AT(E2)] 与 *Mse* I 引物 [M-CAC(M1), M-CAT(M2), M-CTA(M3), M-CTC(M4) 和 M-CTG(M5)] 组配的 10 个组合作为选择性扩增的引物组合。

**1.3.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测:** 采用改进的朱玉芳等(2001) 电泳方法, 将选择性扩增产物加入, 保持 80 W 恒定功率 3 h; 采用许绍斌等(2002) 方法对扩增产物银染。

#### 1.4 AFLP 标记数据的统计

AFLP 带型的分析和统计, 具体操作过程为: 将用 *EcoR* I 引物与 *Mse* I 引物组合扩增的小菜蛾的敏感品系、抗性品系、 $F_1$  和回交后代成虫按 DNA 带型的“有”或“无”记录, 有带的赋值为 1, 无带的赋值为 0, 缺失或模糊带型记为“-”。用 Mapmaker 3.0/EXP 分析回交群体的 AFLP 标记, 再用 MapDraw 软件制作连锁图谱(刘仁虎和孟金陵, 2003)。AFLP 扩增产生的 DNA 带的名称由引物 *EcoR* I 与 *Mse* I 的代号名称及扩增片段顺序编号构成, 如 E1M1-4 为 E-AA(E1) 与 M-CAC(M1) 引物组合扩增出来的第 4 条带。

本研究建立的连锁图谱的作图群体为小菜蛾回交子代群体。其中, 在未经药剂处理的回交个体中, 与抗性有关的 AFLP 标记的分离比的理论值为 1:1, 对实测的回交群体的 AFLP 分离比进行  $\chi^2$  检验, 然后符合分离比 1:1 的位点被用于连锁图的构建和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 小菜蛾对阿维菌素抗性的连锁图谱构建与分析

用 10 组 AFLP 引物组合对未经药剂处理的 24 头小菜蛾成虫 DNA 扩增, 电泳检测的选择性扩增产物结果见图 1。经过 AFLP 带型的分析和统计(表 1), 共获得 1 044 条可区分的 DNA 条带, 每个引物组合扩增的 DNA 带数为 70~142 条, 平均每组引物产生 104 条带; 在所有 DNA 条带中, 有 271 条带具有多态性, 每个引物组合扩增的多态性 DNA 带数为 20

~40 条, 平均每组引物产生 27.1 条, 占总扩增带数的 25.96%。经  $\chi^2$  检验, 271 个多态性位点中只有 123 个位点符合 1:1 ( $P=0.05$ ), 占多态性 DNA 带数的 45.39%, 占总 DNA 带数的 11.78%; 其余位点为无效位点。结果说明, 不同 AFLP 引物组合产生的扩增条带数、多态性条带数和有效位点数存在差异, AFLP 引物有一定的特异性。

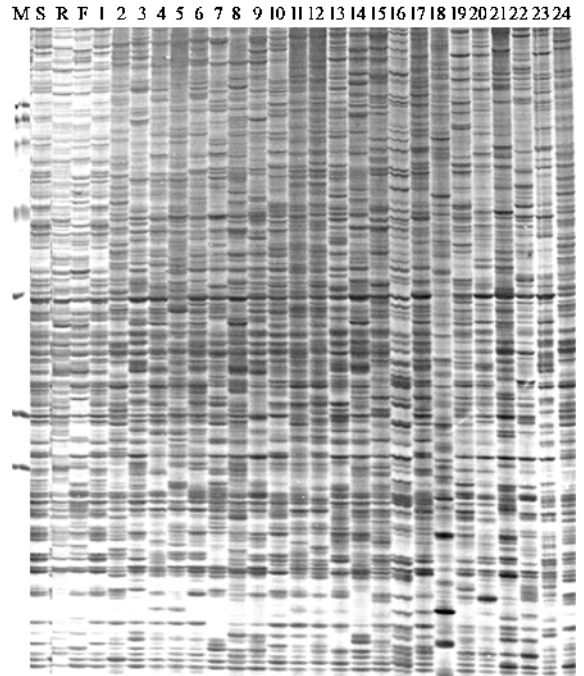


图 1 引物 E2M3 的选择性扩增产物检测

Fig. 1 Selective amplification using primer combination E2M3

M: DNA 标准 DNA marker; S: 敏感品系 Abamectin-susceptible strain; R: 阿维菌素抗性品系 Aabamectin-resistant strain; F: 敏感品系与阿维菌素抗性品系杂交所得第 1 代 Filial generation; 1~24: 未经药剂处理的 24 个回交后代个体 Individuals of the untreated backcross progeny.

用 Mapmaker 3.0 对 123 个有效位点连锁分析(表 2) 结果表明在所有获得有效位点中的 112 个可构成 28 个连锁群(图 2) 还有 11 个位点没有连锁关系, 不能被组进连锁图谱。这些构建连锁群的位点占有有效位点的 91.0%, 占总多态性位点的 41.32%。由 28 个连锁群构成的小菜蛾对阿维菌素抗性连锁图谱覆盖基因组的总长度为 1 222.7 cM, 每个连锁群的标记数 2~11 个, 每个连锁群长度范围为 3.2~202.6 cM, 平均长度为 43.67 cM, AFLP 标记的遗传距离范围为 1.05~25.20 cM。

表 1 AFLP 不同引物组合产生的多态性分布

Table 1 Distribution of polymorphism generated by different AFLP primer combinations

引物组合 Primer combination	扩增带(条) Amplified bands ( bands )	多态性(条) Polymorphism ( bands )	符合 1:1 的位点 Loci fitting for Mendelian law		占总带数的比例(%) Ratio of amplified bands
			带数(条) Number of bands	占多态性的比例(%) Ratio of polymorphism	
			E1M1	77	
E1M2	90	20	7	35.00	7.78
E1M3	112	35	17	48.57	15.18
E1M4	120	20	9	45.00	7.50
E1M5	105	25	9	36.00	8.57
E2M1	118	30	19	63.33	16.10
E2M2	142	26	14	53.85	9.86
E2M3	87	25	11	44.00	12.64
E2M4	123	23	9	39.13	7.32
E2M5	70	40	15	37.50	21.43
合计 Total	1 044	271	123	45.39	11.78

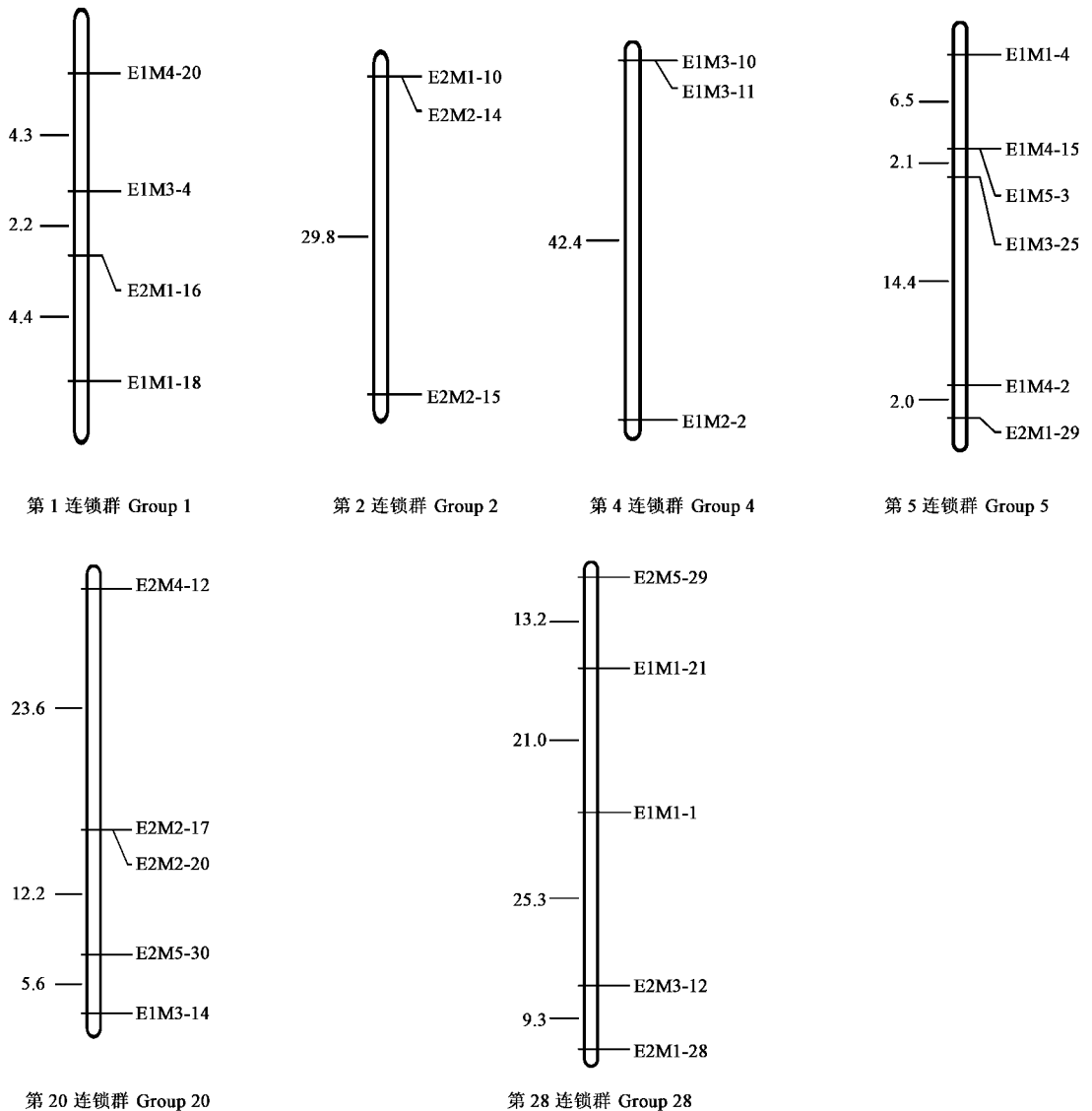


图 2 部分连锁图谱

Fig. 2 Linkage group

表 2 连锁群特征表

Table 2 Traits of linkage groups

连锁群编号 Linkage group no.	标记数目 Number of markers	连锁群长度 Linkage group length (cM)	标记的平均遗传图距 Average marker interval (cM)	连锁群编号 Linkage group no.	标记数目 Number of markers	连锁群长度 Linkage group length (cM)	标记的平均遗传图距 Average marker interval (cM)
1	4	10.9	2.73	15	11	202.6	18.42
2	3	29.8	9.93	16	6	56.0	9.33
3	4	4.2	1.05	17	3	56.3	18.77
4	3	42.4	14.13	18	3	31.0	10.33
5	6	13.0	2.17	19	4	9.8	2.45
6	4	50.2	12.55	20	5	41.4	8.28
7	2	29.7	14.85	21	2	3.2	1.60
8	4	85.7	21.43	22	4	17.9	4.48
9	3	49.5	16.50	23	2	23.6	11.80
10	2	3.2	1.60	24	4	34.9	8.73
11	5	26.6	5.32	25	3	20.2	6.73
12	2	28.2	14.10	26	3	11.4	3.80
13	3	35.8	11.93	27	3	75.6	25.20
14	9	160.8	17.87	28	5	68.8	13.76

2.2 小菜蛾的阿维菌素抗性基因连锁群的确定

用 10 组 AFLP 引物对药剂处理存活的 26 头小菜蛾成虫 DNA 进行扩增 (图 3), 所得的 DNA 条带中有

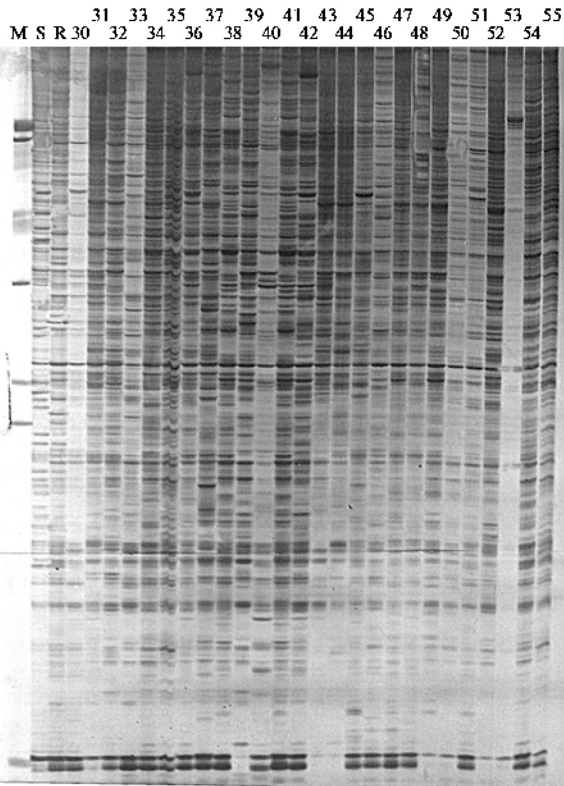


图 3 引物 E1M4 的选择性扩增产物检测

Fig. 3 Selective amplification using primer combination E1M4

M: DNA 标准 DNA marker; S: 敏感品系 Abamectin-susceptible strain; R: 阿维菌素抗性品系 Abamectin-resistant strain; 30~55: 处理存活的 26 个回交后代个体 Survivors of the backcross progeny treated with abamectin.

54 个条带符合分离比 1:1, 再经 Mapmaker 3.0 对多态性位点分析, 只有 3 个标记位点进入同一连锁群 (图 4) 其余的未有进入。这个连锁群含有与抗性连锁的标记 E1M4-15、E1M1-4 和 E1M4-2, 该连锁群被称为抗性基因连锁群。这些 AFLP 标记与抗性基因间的遗传距离分别为 0 cM、8.3 cM 和 13.1 cM。因此推断标记 E1M4-15 是与抗性基因紧密连锁的 AFLP 标记。比较分析抗性连锁群和连锁图谱, 在连锁图谱中 E1M4-15、E1M1-4 和 E1M4-2 三个 AFLP 标记均位于同一连锁群, 即第 5 连锁群中, 因此推断小菜蛾的阿维菌素抗性基因位于第 5 连锁群。

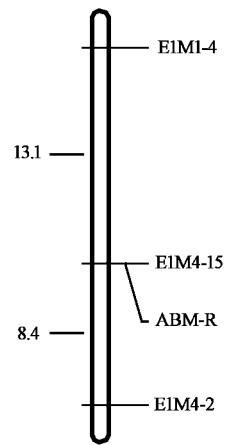


图 4 与小菜蛾阿维菌素抗性连锁的 AFLP 标记图谱

Fig. 4 Linkage map of AFLP markers associated with abamectin resistance of the diamondback moth

3 讨论

目前阿维菌素类药剂已被大量地用于小菜蛾防

治,国内部分地区小菜蛾田间种群已经对其产生了较高的抗药性(冯夏等,2001)。本研究在选育出小菜蛾的阿维菌素高抗品系基础上,利用双相遗传特性建立小菜蛾的阿维菌素抗性连锁图谱的作图家系,再利用 AFLP-银染技术对该家系进行抗性连锁作图,用获得的 112 个 AFLP 多态性有效位点构建了 28 个连锁群,即小菜蛾连锁图谱。Heckel 等(1999)曾对小菜蛾抗苏云金杆菌基因家系进行 AFLP 扩增分析,用获得的 207 个 AFLP 标记组建成 31 个连锁群,而且 1 个连锁群对应 1 条染色体,分析其实验结果说明小菜蛾有 31 条染色体。Cha 和 Har(1999)曾用小菜蛾脂肪体细胞建立了细胞系 Px-FK,核型分析显示该虫的染色体数有变化,而且其变化范围较大,为 24~180 条。本研究中获得 28 个连锁群,与其他研究者的结论相近,但本研究尚不能建立 AFLP 标记连锁群与染色体的对应关系。Traut 和 Clarke(1997)报道鳞翅目昆虫的染色体数差异较大,甚至同一个种内其变化也很大,这与进化过程中染色体的融合和断裂有关。另外,本研究供 AFLP 扩增的作图家系虫数较少,这将导致有效的 AFLP 标记少,连锁图谱距离精度偏低。

本研究结果表明,与抗性基因连锁的 3 个 AFLP 标记(E1M4-15、E1M1-4 和 E1M4-2)均位于第 5 连锁群,而且确定了它们与抗性基因的遗传距离,其中 E1M4-15 是与抗性基因连锁最紧密的 AFLP 标记。Heckel 等(1999)在标记小菜蛾抗苏云金杆菌基因时,将该抗性基因定位在第 7 连锁群,即第 7 染色体上,而且标记定位出与 *Cry1Ac* 对应的抗性基因(*BtR-1*)。本实验结果将为小菜蛾对阿维菌素的抗性基因的精确定位提供理论基础。但是由于利用回交群体获得的连锁图谱完整性差,而且 RAPD、AFLP 等分子标记技术无法区分基因型 AA 和 Aa,因此要想获取与连锁群直接相关的标记,还需对与抗性有关的标记进行克隆和测序,并制成探针进行原位杂交研究。

**致谢** 感谢广东农科院植物保护研究所何自福博士和水稻所罗文永博士在实验操作和数据分析方面提供的帮助。

## 参 考 文 献 (References)

Cha SJ, Han SS, 1999. Establishment of a novel cell line from *Plutella xylostella* fat bodies. *Korean Journal of Entomology*, 29(2): 121 - 126.

- Cheng LG, Li FL, Han ZJ, Li ZY, Chen ZH, 2001. Random amplified polymorphic DNA of resistance to dimehypo and cartap in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomol. Sin.*, 44(1): 15 - 20. [程罗根,李凤良,韩招久,李忠英,陈之浩,2001.小菜蛾对杀虫双和杀螟丹抗药性遗传的 DNA 随机扩增多态性研究.昆虫学报,44(1):15-20]
- Chen ZH, Liu CX, Li FL, Han ZJ, 1990. Initial report on the method for succession reproduction and raising cabbage moth in large scale. *Guizhou Agricultural Science*, (4): 52 - 53. [陈之浩,刘传秀,李凤良,韩招久,1990.小菜蛾继代繁殖大量饲养方法研究初报.贵州农业科学,(4):52-53]
- Feng X, Chen HY, Lu LH, Mo Y, Lu YC, Xie QH, Zhang XX, 2001. A study on the resistance of diamondback moth to abamectin in Guangdong Province. *Journal of South China Agricultural University*, 22(2): 35 - 38. [冯夏,陈焕瑜,吕利华,莫严,卢悦昌,谢齐贺,张小雄,2001.广东小菜蛾对阿维菌素的抗性研究.华南农业大学学报,22(2):35-38]
- Heckel DG, Gahan LJ, Tabashnik BE, 1995. Random amplified polymorphic DNA differences between strains of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) susceptible or resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 88(4): 531 - 537.
- Heckel DG, Gahan LJ, Liu YB, 1999. Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 8 373 - 8 377.
- Ismail F, Wright DJ, 1991. Cross-resistance between acylurea insect growth regulators in a strain of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) from Malaysia. *Pestic. Sci.*, 33(4): 356 - 370.
- Iqbal M, Wright DJ, 1997. Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bulletin of Entomological Research*, 87: 481 - 483.
- Li TW, Gao XW, Zheng BZ, 1999. Genetic analysis and cross-resistance of *Plutella xylostella* to avermectin. *Plant Protection*, 25(6): 12 - 14. [李腾武,高希武,郑炳宗,1999.小菜蛾对阿维菌素的抗性遗传分析及交互抗性研究.植物保护,25(6):12-14]
- Li ZY, Chen ZH, Cheng LG, Li FL, Han ZJ, 2002. Genetic analysis of dimehypo resistance and deltamethrin resistance in diamondback moth (*Plutella xylostella*) by representational difference analysis. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 15(4): 59 - 61. [李忠英,陈之浩,程罗根,李凤良,韩招久,2002.小菜蛾对杀虫双和溴氰菊酯抗性遗传的 RAPD 分析.西南农业学报,15(4):59-61]
- Liu RH, Meng JL, 2003. MapDraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas*, 25(3): 317 - 321. [刘仁虎,孟金陵,2003. MapDraw 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏.遗传,25(3):317-321]
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Clone: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory. 463 - 466.
- Tang ZH, 2000. The situation and expectation of insect resistance in our country. *Entomological Knowledge*, 37(2): 97 - 103. [唐振华,2000.我国昆虫抗药性研究的现状及展望.昆虫知识,37(2):97-103]

- Traut W, Clarke CA, 1997. Karyotype evolution by chromosome fusion in the moth genus *Orgyia*. *Hereditas (Lund)*, 126(1): 77 – 84.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4 407 – 4 414.
- Xu SB, Tao YF, Yang ZQ, 2002. A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation. *Hereditas*, 24(3): 335 – 336. [ 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 2002. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法. *遗传*, 24(3): 335 – 336 ]
- Zhu YF, Tan YD, Wan CL, Lu C, He YY, Zhou ZY, Xiang ZH, 2001. Construction of AFLP linkage map of the silk worm (*Bombyx mori*). *Acta Entomol. Sin.*, 44(4): 483 – 492. [ 朱玉芳, 谭远德, 万春玲, 鲁成, 贺一原, 周泽扬, 向仲怀, 2001. 家蚕 AFLP 连锁框架图谱的构建. *昆虫学报*, 44(4): 483 – 492 ]

(责任编辑: 黄玲巧)