

稻褐飞虱的 DNA 遗传变异性分析

王桂荣, 樊叶杨, 庄杰云, 郑康乐, 张志涛

(中国水稻研究所, 杭州 310006)

关键词: 稻褐飞虱; RAPD; 相似性系数; 遗传变异

中图分类号: Q963 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2001) 01-0123-04

稻褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 生物型差异的研究, 过去主要局限于形态学、生物学和细胞学比较及同工酶的多态性分析, 对种群遗传变异规律的研究仅仅是进行经典的遗传分析。本文应用 RAPD 技术对褐飞虱种群的遗传变异进行了初步研究, 以探讨褐飞虱是否存在明显的生物型分化。

1 材料与方法

1.1 虫源

试虫采自中国水稻研究所养虫室。分别用品种 TN1 (无抗虫基因)、Mudgo (携带抗虫基因 *Bph1*) 和 ASD7 (携带抗虫基因 *bph2*) 强迫饲养 30 代以上。以寄主名称的第一个字母区分三个不同来源的种群, 即 T 种群、M 种群和 A 种群。采集三个种群初羽化 12 h 雌成虫进行蜜露测定, 试验在 28℃ ~ 30℃ 下进行, 根据测定结果, 按照下列标准, 各选取 14 头短翅雌虫作为代表样品。其中以 5 mg 蜜露排泄量作为褐飞虱是否致害的标准, 是根据具体试验所得的经验数据。

表 1 划分褐飞虱种群的标准

Table 1 The standard for discriminating brown planthopper populations

褐飞虱种群 Brown planthopper population	饲养品种 Rice varieties for rearing	鉴别品种 Rice varieties for test		
		TN1	Mudgo	ASD7
T	TN1	+	-	-
M	Mudgo	+	+	-
A	ASD7	+	-	+

+ 表示蜜露排泄量大于 5 mg Honeydew excretion exceeds 5 mg;

- 表示蜜露排泄量小于 5mg Honeydew excretion is below 5mg

1.2 DNA 的提取

取饥饿 4 h 的短翅褐飞虱雌成虫一头, 用 100% 的乙醇洗涤后置于 1.5 mL 的离心管中, 研碎后加入 100 μ L (200 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 25 mmol/L EDTA, 0.5% SDS) 缓冲液, 再加入 50 μ L 3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2), 置于 -20℃ 冰箱中约 10 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中, 加入等体积异丙醇, 室温放置 20 min, 然后 13 000 r/min 离心 25 min, 倒去上清液, 用 70% 乙醇洗一次, 片状沉淀物真空

基金项目: 国家攀登计划 (85-31-03) 研究内容

收稿日期: 1998-11-19; 接受日期: 1999-05-26

抽干。最后加入 50 μ L TE 缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA pH 8.0) 悬浮, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 备用。

1.3 RAPD-PCR 反应条件

参照陆军等^[4]的方法。引物采用 British Columbia 大学生产的 10 mer 随机引物, 共 30 个。

1.4 统计分析

用 NTSYS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

每种群随机选取 2 份样品, 应用 30 个引物进行 RAPD 分析, 挑选出扩增稳定、多态性带多的引物 6 个, 分析 13 个 T 种群个体、13 个 M 种群个体和 14 个 A 种群个体 (注: 有两份 DNA 样品被污染, 弃去不用)。共得到 68 条多态性条带, 其长度分布于 0.1 kb~3 kb。图 1 显示了引物 P-498 在 15 个个体中的检测结果。

图 1 引物 P-498 在 15 个褐飞虱个体中的扩增结果

Fig. 1 RAPD patterns of 15 rice brown planthoppers with primer P-498

M. 1 kb fragment; C. 空白对照 control; 1~5. T 种群 T population;
6~10. M 种群 M population; 11~15. A 种群 A population

以 68 条多态性带为基础, 计算了各对材料之间的相似性系数, 然后采用类平均距离法进行聚类分析, 建立树状图 (图 2)。从图 2 中可以看出所有材料均可分开, 特别是在感虫品种和抗虫品种上分别强迫饲养多代后, 褐飞虱种群的遗传构成发生了不同的变化, 表明 RAPD 标记能有效地检测褐飞虱的遗传变异。但是从图中还可以看出, 研究材料之间的变异范围很广, 不论是来源于哪个品种, 同一来源的不同个体之间相似性变异较大, 而且研究材料之间的遗传差异呈连续分布, 无法将其明确分组。这表明褐飞虱的遗传背景是相当复杂的。

进一步的分析发现, 不同多态性带在 T 种群中出现的频率与其在 M 种群和 A 种群中的出现频率差异较大。其中有 8 条带仅在来源于抗虫品种的褐飞虱材料中出现, 且在 M 种群和 A 种群中出现的频率无显著差异, 有 2 条带仅在 T 种群个体中出现。该结果表明, 在部分 RAPD 标记位点上, 特定的基因型可能具有种群特异性。

3 讨论

褐飞虱不同生物型对水稻品种的致害性存在明显差异^[2], 方继朝等^[3]报道褐飞虱生物型 I 和生物型 II 之

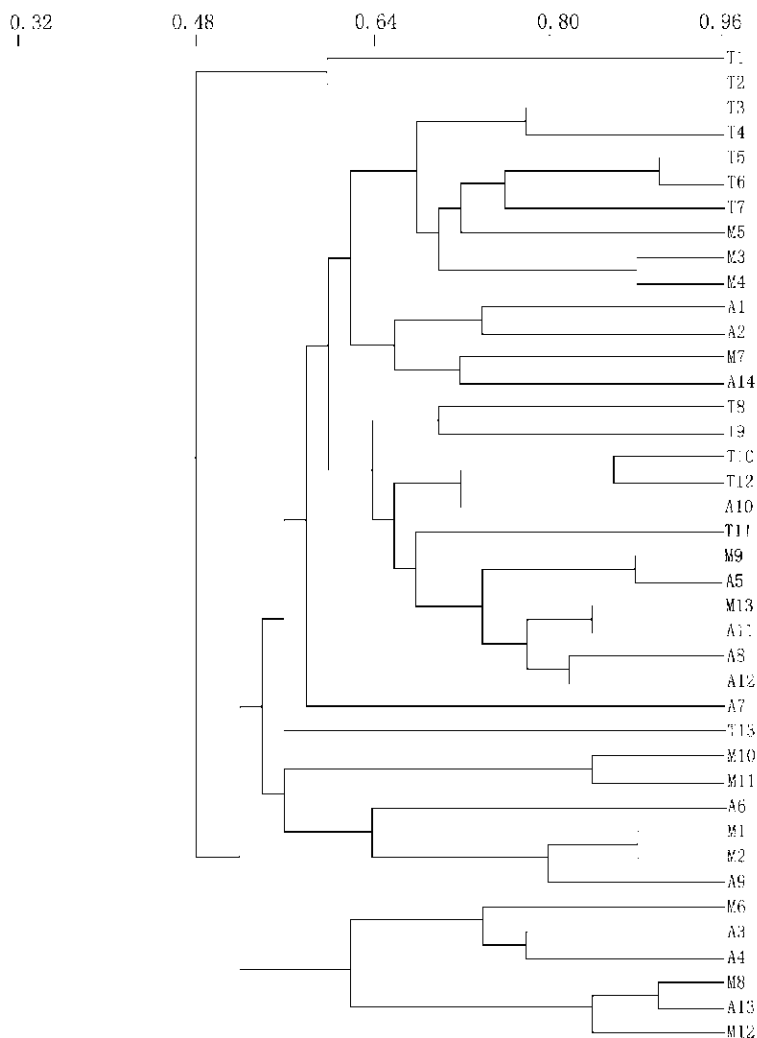


图 2 40 个褐飞虱个体的 UPGMA 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 40 brown planthoppers by UPGMA cluster analysis

T、M 和 A 代表 TN1、Mudgo 和 ASD7 种群

T, M and A represent TN1, Mudgo and ASD7 population respectively

间稳定存在蛋白质水平上的差异。本研究结果表明，在感虫品种与在抗虫品种上连续饲养多代的褐飞虱种群间遗传物质存在明显差异。不过，本研究所揭示的 DNA 变异性，与褐飞虱致害性的转化和不同生物型间的差异是否存在对应的内在联系，有待于进一步的研究。

Shufran 等^[4]用 RAPD 技术研究了国际水稻所饲养的三个褐飞虱种群，聚类结果表明，三个种群间没有明显的差异，与本文研究结果不完全一致。这可能是由于以下原因造成的：首先，即使是某一品种连续饲养很多代，也很难得到纯的褐飞虱种群。Shufran 等是从实验种群中随机选取代表样品种，本文则根据蜜露测定的结果，对各种群进行了进一步的筛选，排除了某一种群中混有其它个体的干扰；其次，可能是因为我们室内饲养得到的褐飞虱种群与国际水稻研究所的三个种群遗传上不一致造成的，具体原因有待进一步研究。

应用经典的遗传方法难以对褐飞虱遗传变异进行系统的研究，但是可以借助于分子生物学技术对其进行

探讨。本研究表明 RAPD 标记能有效地检测褐飞虱的遗传变异,有可能区分在抗、感品种上强迫饲养多代的褐飞虱种群。可以预见,通过应用更多的引物,有可能筛选出一批 RAPD 标记,它们能够特异性地鉴别不同的种群,从而能有效地应用于褐飞虱遗传变异与分化规律的研究中。

致谢 傅强、陈伟、赖凤香、姜人春参加部分养虫工作,谨致谢忱。

参 考 文 献 (References)

- [1] 陆 军, 钱惠荣, 庄杰云等. 利用 RAPD 技术检测水稻的基因组变化, 科学通报, 1993, 38 (23): 2 181~2 182
- [2] 江志强, 吴荣宗, 张良佑. 褐飞虱生物型的形成. 华南农业大学学报, 1993, 14 (1): 76~83
- [3] 方继朝, 杜正文, 夏礼如等. 褐飞虱生物型特异性蛋白质研究. 昆虫学报, 1996, 39 (3): 330~331
- [4] Shufran K A, Whalon M E. Genetic analysis of brown planthopper biotypes using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Insect Sci. Appl.*, 1995, 16 (1): 27~33

DNA-based genetic variation in rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*

WANG Gui-rong, FAN Ye-yang, ZHUANG Jie-yun, ZHENG Kang-le, ZHANG Zhi-tao
(China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

中国生物学期刊总被引频次排序表*

(据《1999 年中国科技期刊引证报告》)

名次	期刊名称	被引频次	名次	期刊名称	被引频次
1	植物学报	1639	24	植物学通报	242
2	植物生理学通讯	1132	25	动物学杂志	238
3	植物生理学报	741	26	武汉植物学研究	230
4	生物化学与生物物理进展	646	27	菌物系统	214
5	遗传学报	644	28	西北植物学报	210
6	植物生态学报	615	29	兽类学报	208
7	生物化学与生物物理学报	461	30	心理学报	179
8	昆虫学报	447	31	细胞生物学杂志	172
9	动物学报	413	32	生物多样性	161
10	植物分类学报	409	33	植物研究	137
11	微生物学报	401	34	广西植物	135
12	云南植物研究	400	35	动物分类学报	130
13	中国生物化学与分子生物学报	385	36	生命的化学	109
14	水生生物学报	378	37	野生动物	94
15	生理学报	355	38	昆虫分类学报	80
16	生物工程学报	345	39	工业微生物	79
17	遗传	323	40	激光生物学报	72
18	微生物学通报	300	41	四川动物	47
19	动物学研究	299	42	氨基酸和生物资源	46
20	昆虫知识	295	43	中国实验动物学杂志	31
21	人类学学报	280	44	中国实验动物学学报	14
22	生物物理学报	268	45	生命科学研究	10
23	实验生物学报	250			

- * 1. 本排序表选自《1999 年中国科技期刊引证报告》；期刊按被引频次降序排列。
 2. 1999 年中国科技论文统计来源期刊包括 1300 余种中国出版的中英文科技期刊。
 3. 《昆虫学报》在 1372 种期刊中总被引频次排序第 99 位，影响因子排序第 276 位。

转载《中国科技期刊引证报告》

中国科学技术信息研究所

2000 年 11 月

敬告作者

为适应我国信息化建设需要，扩大学术交流渠道，本刊已加入“中国学术期刊（网络版与光盘版）”和“万方数据网络系统（ChinaInfo）”。本刊所付作者稿酬包含刊物内容上网服务报酬。如作者不同意论文上网，请来函声明，本刊将做适当处理。

《昆虫学报》编辑部

《昆虫学报》稿约

一、本刊登载昆虫学各分支学科具有创造性、未曾发表过的论文和简报，并酌登学术讨论及文献综述和英文分类学论文。质量较高的论文优先发表。分类部分优先刊登订正性和有关新技术、新方法及新理论的论文。

二、遵照《中华人民共和国著作权法》，凡拟刊登之文稿，作者须明示该文版权（含各种介质的版权）是否同意转让给编辑部。

三、来稿要求论点明确，数据可靠，文字简明通畅，论文不超过 6 000 字，简报 2 000 字左右，综述不超过 8 000 字。论文题目要明确、简短易懂，文前有不超过 300 字的中文摘要（简报可省略），文后有外文摘要；并根据内容，在中文摘要和外文摘要后分别列出中文和外文关键词（key words）3~5 个。

四、来稿务必做到清稿定稿，一经排版，不得再作任何文字上修改。正确使用简化汉字和标点符号。使用《中华人民共和国法定计量单位》。外国人名一律用原名，不译成中文。希腊字母应注明希文，外文字母、符号分清大、小写，正、斜体；上、下角的字母、数码和符号，其位置高低区别明显；容易混淆的外文字母、符号请在文内第一次出现时用铅笔标示。外文摘要的作者和地名，用汉语拼音。

五、来稿中所用的昆虫名称和名词以沿用最广最久而无特殊错误的为原则，待全国自然科学名词审定委员会作出统一规定后，按照规定采用。

六、文中插图用绘图纸墨黑绘制或高质量的激光样图，线条均匀，图中注字用铅笔在图上缮写清楚。附清晰的复印件一份。照片层次清晰，反差适中，以比例标尺示图像的大小；大小适当，以利制版。图在正文中出现处应画一方框，框下注明图的序号、图题和图注，图注文字应精练。表题、图题和表图中各项需具英译文。

七、参考文献选列必需的，只能引用公开发表的文章，勿用内部资料。

本刊参考文献采用顺序编码制，按照文献在正文中出现的先后顺序连续编码，并在出现处右上角注上方括号“[]”，即××^[1]...××^[2]...^[4~8]，文后参考文献书写格式举例如下：

[期刊]

- [1] 钦俊德，李丽英，魏定义等. 关于棉铃虫食性和营养的某些特点. 昆虫学报, 1962, 11 (4): 327~340
 [2] Lanier G N, Qi Y T, West J R *et al.* Identification of the sex pheromone of three *Matsucoccus* pine bark scales. J. Chem. Ecol., 1989, 15 (5): 1 645~1 659

[图书]

- [1] 竺可桢. 物候学. 北京: 科学出版社, 1973. 1~3
 [2] 薛社普, 周增桦, 刘毅等. C-醋酸棉酚在大鼠体内的药物动物学研究. 见: 薛社普等主编. 男用节育药棉酚的实验研究. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 67
 [3] 沈浚成编. 校对手册, 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1984. 105~118
 [4] Abell B C, Tagg R C, Push M. Enzyme catalyzed cellular transaminations. In: Round A F ed. Advances in Enzymology, Vol. 2, 3rd ed. New York: Academic Press, 1954. 125~147

八、文稿不得一稿两投。来稿文责自负，经审查后由编辑部将审阅意见转给作者自行修改。作者须在收到修改意见通知后 3 个月内将原稿、修改稿、定稿软盘（Word 或北大方正）寄回编辑部。修改期超过 3 个月者以新稿处理，重新登记收稿日期；修改内容变更较多的作同样处理。编辑部有权对来稿作必要的文字删改。稿件一般参照收稿日期先后刊登，文献综述及有紧迫性的稿件可提前发表。凡不适合在本刊发表的稿件，当妥为寄还作者。

九、来稿请寄一式两份，并附本工作单位的推荐信（在推荐信中需注明“此文稿经审查，无一稿两投和泄密情况”），否则不予受理。自收到稿件起，6 个月内决定是否可用，特殊情况者例外。

十、来稿登载后，酌致稿酬，并赠送单行本 20 份。

十一、来稿请挂号寄：100080 北京中关村路 19 号中国科学院动物研究所《昆虫学报》编辑部。联系电话：(010) 62581475。E-mail: Huanglq@panda.ioz.ac.cn。