

# 基于 rDNA ITS1 和 ITS2 序列的褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱的分子鉴定

刘玉娣, 林克剑, 韩兰芝, 侯茂林\*

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 本研究测定了褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的 rDNA ITS1 和 ITS2 的序列, 以探讨这 3 种稻飞虱的分子鉴定方法。3 种飞虱的 ITS1 和 ITS2 侧翼区(18S, 5.8S 和 28S)序列相对稳定, 但 ITS1 和 ITS2 序列在 3 种飞虱中变异较大。ITS1 在所分析的 438 个位点中可变量点达 294 个, ITS2 在分析的 403 个位点中可变量点为 177 个。根据 3 种飞虱 rDNA 的 ITS1 和 ITS2 序列设计了特异性引物, 应用特异性引物对样品进行了 PCR 扩增, 分析发现 3 种飞虱 ITS1 区的特异性引物扩增效果不理想, 而 ITS2 区的特异性引物可以稳定地扩增出明显的目的 DNA 条带。因此, 采用 ITS2 区的特异性引物可以对 3 种飞虱进行快速的分子鉴定。

**关键词:** 褐飞虱; 白背飞虱; 灰飞虱; rDNA; ITS1; ITS2; 特异引物; 分子鉴定

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)11-1266-07

## Molecular identification of *Nilaparvata lugens* (Stål), *Sogatella furcifera* (Horvath) and *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Homoptera: Delphacidae) based on rDNA ITS1 and ITS2 sequences

LIU Yu-Di, LIN Ke-Jian, HAN Lan-Zhi, HOU Mao-Lin\* (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The complete sequences of rDNA ITS1 and ITS2 were determined for the brown planthopper *Nilaparvata lugens*, the white-backed planthopper *Sogatella furcifera* and the small brown planthopper *Laodelphax striatellus* in order to explore the molecular identification method for them. The flanking regions of rDNA-ITS1 and ITS2 of the three planthoppers showed only limited variation, but the sequences of rDNA-ITS1 and ITS2 differed significantly. There are 294 variable sites in the 438 analyzed sites for the ITS1 region, and 177 variable sites in the 403 analyzed sites for the ITS2 region. Species-specific primers of *N. lugens*, *S. furcifera*, and *L. striatellus* were designed based on their rDNA-ITS1 and ITS2 sequences. The results of PCR amplification of rDNA-ITS1 in the three species indicated that the species-specific primers were not applicable. However, the species-specific primers based on the rDNA-ITS2 sequences proved to be useful diagnostic primers for the three planthoppers. It is so concluded that molecular identification of *N. lugens*, *S. furcifera* and *L. striatellus* using the species-specific primers from the rDNA-ITS2 region is feasible.

**Key words:** *Nilaparvata lugens*; *Sogatella furcifera*; *Laodelphax striatellus*; rDNA; ITS1; ITS2; diagnostic primers; molecular identification

稻飞虱又称稻虱, 属同翅目, 飞虱科。我国为害水稻的飞虱主要有 3 种: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål), 白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horvath) 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén)。稻飞虱分布很

广, 全国各稻区都有发生, 3 种飞虱由于食性及对温度的要求和适应性不同, 在地理分布上和各稻区的发生为害情况也不同。褐飞虱食性单一, 只能在水稻和普通野生稻上取食和繁殖; 白背飞虱和灰飞

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项《水稻褐飞虱综合防控技术研究》(200803003); 转基因生物新品种培育重大专项《转基因水稻环境安全评价技术》(2008ZX08011-001)和《抗虫转基因水稻对稻飞虱种群影响的环境安全性评价技术》(2009ZX08011-009B)

作者简介: 刘玉娣, 1977 年生, 博士, 副研究员, 研究方向昆虫分子生态学, E-mail: ydliu@ippcaas.cn

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: mlhou@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2009-05-19; 接受日期 Accepted: 2009-09-24

虱食性广, 可为害水稻、小麦、玉米等禾本科植物(丁锦华, 1995; 程家安, 1996)。褐飞虱和白背飞虱为迁飞性害虫, 在我国长江流域及以南地区发生危害严重; 灰飞虱以本地虫源为害为主, 在华北、华东、华中和西南等地发生为害较重(丁锦华, 1995; 程家安, 1996)。褐飞虱和灰飞虱能传播或诱发水稻病害, 褐飞虱传播水稻草状丛矮病和齿叶矮缩病(黄水金和黄荣华, 2001); 灰飞虱可传播水稻黑条矮缩病和条纹叶枯病, 小麦丛矮病和玉米矮缩病(丁锦华, 1995)。可见, 这 3 种稻飞虱虽然均为害水稻, 但它们在食性、分布、传毒等方面分化很大。

现有的一些基于分子标记的研究主要侧重于用 RAPD 研究种内的种群遗传关系(万由衷等, 2001; 王桂荣等, 2001; 许骏等, 2001; 张晓俊等, 2001), 而研究种间遗传关系应用更多的是核糖体 DNA 序列(rDNA)。rDNA 是目前广泛使用的细胞核 DNA 分子标记, 由于 rDNA 簇(单元)是由一系列编码区和非编码区组成, 所以可以设计保守的通用引物, 从而可以在不同物种中扩增变异性较高的非编码区(张德兴, 2002)。位于 18S、5.8S 和 28S 之间的核糖体内转录间隔区(ITS)的 ITS1 和 ITS2 区域目前被广泛应用于近缘种的系统发生分析中(Miller *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 2003), 如不同地理种群美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 及近缘种的 rDNA-ITS1 序列的分析和比较(王莉萍等, 2007), 9 种绢丝昆虫线粒体 12S rRNA 基因序列特征和系统发育的分析(刘彦群等, 2008)。

水稻上的 3 种飞虱在我国很大范围内混合发生。目前对稻飞虱种间的遗传背景缺乏研究。另外, 由于灰飞虱雌虫与白背飞虱相似, 非专业人员容易混淆两种害虫。同时对于长时间浸泡的标本, 当标本的体色和体征变得不明显时, 需要借助分子的方法进行区分。由于核糖体被转录的内间隔区变异很大, 可以通过设计特异引物扩增目的基因来鉴别形态相似的物种(Amornsak *et al.*, 1998; 耿金虎等, 2004)。本研究测定了 3 种飞虱的 ITS1 和 ITS2 的完整序列, 对两个区段序列的碱基组成特征进行了分析; 根据 rDNA ITS1 和 ITS2 的序列设计了 3 种飞虱的特异性引物, 并对各物种不同地理种群的样品进行了 PCR 扩增分析, 建立了快速鉴定 3 种稻飞虱的分子方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱样本分别采自 8 个不同的地区(表 1)。3 种飞虱各取 2 个个体进行了测序分析, 褐飞虱和白背飞虱采自广西桂林, 而灰飞虱采自山东济宁(表 1)。活成虫采集后立即保存在无水乙醇中, 4℃ 保存。

表 1 褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱的样本来源

Table 1 Sampling data for *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*

物种 Species	个体编号 Individual code	样本采集地 Sampling sites	采集时间 Sampling time
褐飞虱 <i>N. lugens</i>	GXGL01	广西桂林 Guilin, Guangxi	2007.7
	YNKM01	云南昆明 Kunming, Yunnan	2007.7
	HBZ01	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2007.7
	ZJHZ01	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2007.7
	AHHS01	安徽黄山 Huangshan, Anhui	2007.7
	JSNJ01	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	2007.8
	BJ01	北京 Beijing	2007.9
	HNZZ01	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2007.7
白背飞虱 <i>S. furcifera</i>	GXGL01	广西桂林 Guilin, Guangxi	2007.7
	YNKM01	云南昆明 Kunming, Yunnan	2007.7
	HBZ01	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2007.7
	ZJHZ01	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2007.7
	AHHS01	安徽黄山 Huangshan, Anhui	2007.7
	JSNJ01	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	2007.8
	BJ01	北京 Beijing	2007.9
	HNZZ01	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2007.7
灰飞虱 <i>L. striatellus</i>	SDJN01	山东济宁 Jining, Shandong	2007.5
	TJ01	天津 Tianjin	2007.5
	BJ01	北京 Beijing	2007.5
	HNZZ01	河南郑州 Zhengzhou, Henan	2007.5
	JSNJ01	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	2007.5
	ZJHZ01	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2007.5
	HBZ01	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2007.5
	JXNC01	江西南昌 Nanchang, Jiangxi	2007.5

### 1.2 主要的试剂和仪器

Ex Taq DNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 公司, QIAGEN Gel Extraction 试剂盒购自 TIANGEN 公司, pGEM-T easy 试剂盒为 Promega 公司产品, PCR 引物由上海生物工程公司合成, PCR 扩增仪为 MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad)。

### 1.3 总 DNA 的提取

采用 Zhang 和 Hewitt (1998) 方法并作如下改

进:成虫经液氮研磨碎后加入裂解液 55℃ 水浴 1 ~ 2 h, 用等体积的 Tris-饱和酚 (pH 8.0) 混匀, 置冰上 3 min, 在 4℃ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用等体积的 TE-饱和氯仿抽提 1 次。用 1 倍体积的醋酸铵 (10 mol/L) 和 5 倍体积的无水酒精沉淀 DNA, 4℃ 放置 30 min 后 12 000 r/min 离心 15 min 弃上清, 将沉淀用 70% 和 100% 的酒精各洗 1 次, 室温晾干后溶于 80 μL 灭菌去离子水中 -20℃ 保存。

#### 1.4 引物和 PCR 扩增

本研究中所用的引物是参照 Ji 等 (2003) 所设计的 2 对引物, 引物对 CAS18sF1/ CAS5p8sB1d 扩增位于 18S 和 5.8S 之间 rDNA-ITS1 区域, 引物对 CAS5p8sFc/CAS28sB1d 扩增位于 5.8S 和 28S 之间的 ITS2 区域。PCR 反应在 MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) PCR 仪器上进行扩增。20 μL 的反应体系各成分的含量为: 模板 DNA 30 ~ 60 ng, 0.3 mmol/L dNTPs, 2 × buffer (含 Mg<sup>2+</sup>), 上下游引物均为 0.2 μmol/L, 0.25 U *Taq* 酶。反应参数为: 94℃ 预变性 4 min 后进行 40 个循环: 94℃ 变性 20 s, 55 ~ 50℃ touchdown 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 最后 72℃ 延伸 7 min。

#### 1.5 PCR 产物序列测定和同源性比较

PCR 产物用 QIAGEN Gel Extraction 纯化试剂盒

进行纯化。纯化产物经连接反应连接到 pGEM-T easy vector 上, 再将重组体克隆转化到感受态大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 中, 通过蓝、白斑筛选, 将阳性克隆 37℃ 250 r/min 培养 18 ~ 24 h。挑取白色克隆用 M13 引物进行初步检测, 以确认连接情况和片段大小。每个样本最后取 6 个质粒进行序列检测, 序列测定在 ABI PRISM® 3730 遗传自动分析仪上进行。序列经 NCBI 中 BLAST 软件进行同源性比较, 确认正确的序列。

#### 1.6 特异性引物和 PCR 扩增

根据 3 种飞虱 rDNA 的 ITS1 和 ITS2 区的测序和比对结果, 我们为 3 种飞虱在 rDNA-ITS1 和 ITS2 区各设计了一条特异性引物 (表 2), 而引物对中的另外一条引物在 ITS1 区 3 种飞虱均采用 CAS18sF1 引物 (Ji *et al.*, 2003), 在 ITS2 区均采用 CAS5p8sFc 引物 (Ji *et al.*, 2003)。引物由上海生物工程公司合成。PCR 反应在 MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) PCR 仪器上进行扩增。20 μL 的反应体系各成分的含量为: 模板 DNA 30 ~ 60 ng, 0.4 mmol/L dNTPs, 2 × buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) (TaKaRa Biomedical), 上下游引物均为 0.3 μmol/L, 0.3 U *Taq* 酶 (TaKaRa Biomedical)。反应参数为: 94℃ 预变性 4 min 后进行 35 个循环: 94℃ 变性 20 s, 55 ~ 50℃ touchdown 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 最后 72℃ 延伸 7 min。

表 2 特异引物序列和目标扩增产物大小

Table 2 Species-specific primer sequences and the target product size

物种 Species	特异性引物 Species-specific primers	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	产物大小 (bp) Product size	
ITS1	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	ITS1-BPH	TGCCCCGATGTTAGTCAGACCAGACC	361
	白背飞虱 <i>Sogatella furcifera</i>	ITS1-WBPH	ATCAACATGGCATGCAAACCTCATT	350
	灰飞虱 <i>Laodelphax striatellus</i>	ITS1-SBPH	ATGAACCGGAGGCTCAGACCCTGAG	320
ITS2	褐飞虱 <i>N. lugens</i>	ITS2-BPH	TGGTACACACACTGGAGGCAATATT	476
	白背飞虱 <i>S. furcifera</i>	ITS2-WBPH	GATAAATCTTCAACATATACTAGCA	262
	灰飞虱 <i>L. striatellus</i>	ITS2-SBPH	TGCACCACACACTGGAGACAAACAG	395

#### 1.7 DNA 序列数据处理

利用软件 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) 进行序列比对, 然后再进行人工检查核对。利用软件 DNASP version 4.10 (Rozas *et al.*, 2003) 进行碱基组成和变异位点的统计。用 MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007) 对上述序列进行碱基含量和多态位点分析的运算。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种稻飞虱 rDNA ITS1 和 ITS2 序列的碱基组成特征

**2.1.1 ITS1:** 测序结果经比较、剪切后得到 439 ~ 603 bp 的 ITS1 完整序列。3 种飞虱的 ITS1 变异大, 白背飞虱 ITS1 片段最长 (603 bp), 灰飞虱最短

(439 bp)(表 3)。3 种飞虱的 ITS1 区 A + T 含量较高, 在 58.7 ~ 61.9 之间变动(表 3)。3 种飞虱 ITS1 区序列差异显著, 通过比对后, 在所分析的 438 个位点中缺失位点 170 个, 单态位点 144 个, 而可变位点达到 294 个。

**2.1.2 ITS2:** 测序结果经比较、剪切后得到 422 ~ 566 bp 的 ITS2 完整序列。3 种飞虱 ITS2 区变异大,

褐飞虱 ITS2 片段最长(566 bp), 白背飞虱最短(422 bp)(表 3)。褐飞虱和白背飞虱的 ITS2 A + T 含量较高, 分别为 60.2% 和 58.5%; 灰飞虱的 A + T 含量相对较低, 仅为 49.8%(表 3)。3 种飞虱 ITS2 序列差异非常显著, 通过比对后, 在所分析的 403 个位点中, 除去 173 个缺失位点和 226 个单态位点后, 可变位点达到 177 个。

表 3 褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱 rDNA-ITS1 和 ITS2 序列长度和碱基组成  
Table 3 Sequence length and nucleotide composition of rDNA-ITS1 and ITS2 genes of *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*

物种 Species	个体编号 Individual code	ITS1			ITS2		
		长度 Length	A + T (%)	GenBank 序列号 GenBank accession no.	长度 Length	A + T (%)	GenBank 序列号 GenBank accession no.
褐飞虱 <i>N. lugens</i>	GXGL01, GXGL02	535	58.7	EU931463, FJ607950	566	58.5	EU931464, FJ607952
白背飞虱 <i>S. furcifera</i>	GXGL01, GXGL02	603	60.5	EU931465, FJ607949	422	60.2	EU931466, FJ607951
灰飞虱 <i>L. striatellus</i>	SDJN01, SDJN02	439	61.9	EU931461	470	49.8	EU931462

## 2.2 PCR 扩增鉴定 3 种飞虱

根据 ITS1 和 ITS2 区在 3 种飞虱中变异大的特点, 我们应用引物对 CAS18sF1/CAS5p8sB1d (扩增 ITS1 区) 和 CAS5p8sFc/CAS28sB1d (扩增 ITS2 区) 通过 PCR 扩增对 3 种飞虱进行鉴定。PCR 反应体系及反应条件同上面 1.4 中的条件。3 种飞虱各取 6 个个体进行了 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 通过片段长度不能区分 3 种飞虱(图 1)。

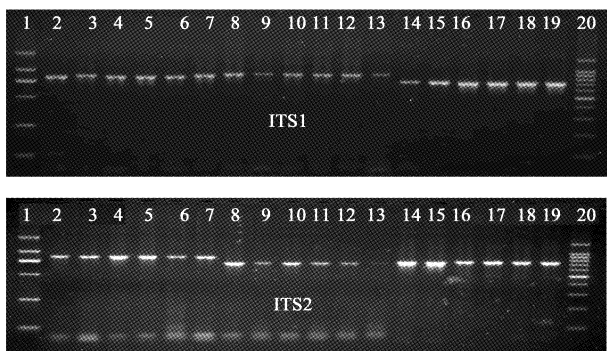


图 1 褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱 rDNA ITS1 和 ITS2 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 PCR amplification of rDNA ITS1 and ITS2 genes in *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*  
1: DL2000 marker; 2-7: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*; 8-13: 白背飞虱 *Sogatella furcifera*; 14-19: 灰飞虱 *Laodelphax striatellus*; 20: 100 bp DNA ladder.

因此我们采用设计特异性诊断引物的方法鉴别 3 种飞虱。3 种飞虱在 rDNA-ITS1 和 ITS2 区的特异性引物 PCR 扩增结果见图 2。在 ITS1 区, 除白背飞虱扩增结果不理想外, 灰飞虱和褐飞虱扩增效果较好, PCR 产物大小分别为 320 bp(灰飞虱)和 361 bp(褐飞虱)。在 ITS2 区, 3 种飞虱的 PCR 扩增结果均较好, 片段大小分别为 262 bp(白背飞虱), 395 bp(灰飞虱)和 476 bp(褐飞虱)。对照样品均无扩增产物。

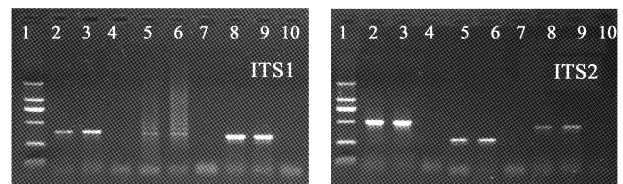


图 2 利用 rDNA ITS1 和 ITS2 区特异性引物对褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 PCR amplification by using rDNA ITS1 and ITS2 species-specific primers of *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*  
1: DL2000 marker; 2-3: 褐飞虱 *N. lugens*; 4: 褐飞虱特异引物扩增的阴性对照 Negative control in PCR amplification with *N. lugens* species-specific primers; 5-6: 白背飞虱 *S. furcifera*; 7: 白背飞虱特异引物扩增的阴性对照 Negative control in PCR amplification with *S. furcifera* species-specific primers; 8-9: 灰飞虱 *L. striatellus*; 10: 灰飞虱特异引物扩增的阴性对照 Negative control in PCR amplification with *L. striatellus* species-specific primers.

特异性引物的扩增稳定性检验:将3种飞虱在ITS1和ITS2区的特异性引物对目标物种8个不同地理种群(每个种群取1个个体,表1)进行扩增检验,以检验特异性引物的扩展稳定性。3种飞虱

ITS1区特异性引物PCR扩增结果显示(图3):除白背飞虱的扩增效果不理想外,ITS1区褐飞虱和灰飞虱扩增效果均较好(图3);ITS2区3种飞虱的特异性引物扩增效果均理想。

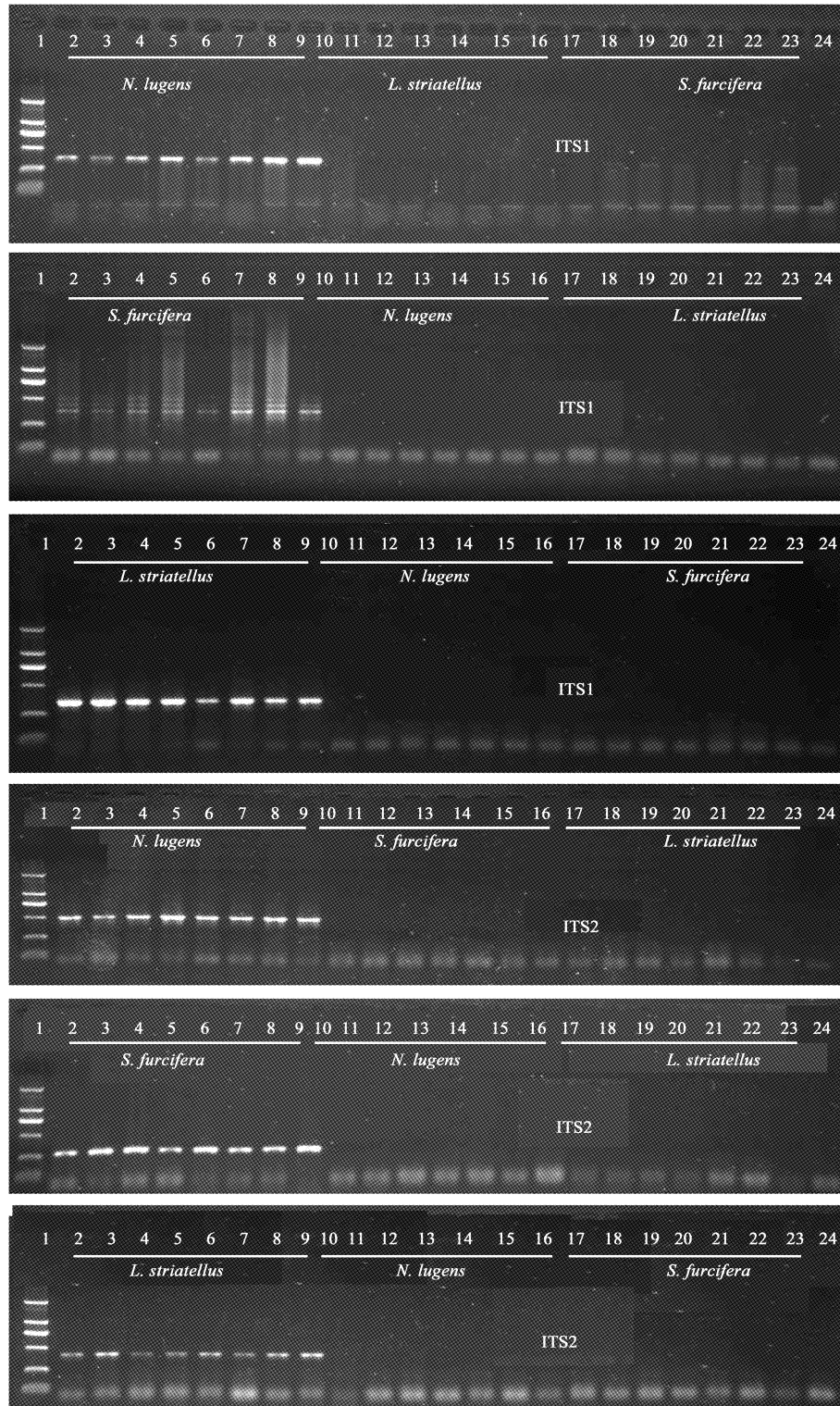


图3 rDNA ITS1和ITS2区特异性引物对褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱基因的PCR扩增产物电泳图

Fig. 3 PCR amplification of rDNA ITS1 and ITS2 in *Nilaparvata lugens*, *Sogatella furcifera* and *Laodelphax striatellus*  
1: DL2000 marker; 2-9: ITS1和ITS2区特异引物扩增目标物种的PCR产物电泳图 PCR amplification with ITS1 and ITS2 species-specific primers in the target species; 10-16, 17-23: 分别为ITS1和ITS2区特异引物扩增两种非目标物种的PCR产物电泳图 PCR amplification with ITS1 and ITS2 species-specific primers in other two non-target species, respectively; 24: 阴性对照 Negative control.

3 种飞虱的特异性引物在种间的交互扩增检验:把一种飞虱的特异性引物在其他两种飞虱中进行扩增以检验是否有 PCR 扩增现象出现。本研究中对非目标物种取 7 个不同地理种群个体(均取表 1 中的前 7 个种群,每个种群取 1 个个体,表 1)进行扩增检验,交互扩增结果显示:为褐飞虱设计的 ITS1 区特异性引物在灰飞虱中出现了 PCR 扩增产物,而其他特异性引物种间的交互扩增均未出现 PCR 产物(图 3)。

因此,本文设计的 3 种飞虱 ITS2 区特异性引物可以对 3 种飞虱进行快速的分子鉴定,引物的序列见表 2。

### 3 讨论

尽管世界上的飞虱约有 1 500 种以上,国内估计有 200 种左右,但褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱是农业生产上主要害虫。目前 GenBank 数据库中有 rDNA 序列可以利用的只有灰飞虱的 ITS1 序列。本研究测定出了 3 种飞虱 rDNA ITS1 和 ITS2 的全序列,并分析了 3 种飞虱 ITS1 和 ITS2 序列的碱基组成。

本研究样品采用了克隆测序法,并且将广西桂林褐飞虱样品进行多个阳性克隆测序。结果发现广西种群同一个体不同拷贝间 ITS1 和 ITS2 序列遗传距离非常小,甚至不同个体之间序列差异也非常小。因此,可忽略同一个体不同拷贝之间的差异,选择其中一条序列进行系统进化分析,这种做法在其他昆虫序列分析中已有相关报道(李正西和沈佐锐,2002;刘彦群等,2008)。对于这 3 种稻飞虱,我们发现 rDNA ITS1 和 ITS2 不适合飞虱种内遗传研究,但对于种间遗传分化的研究则是一个理想的分子标记。

3 种飞虱的 ITS1 和 ITS2 序列虽然显示出一定的 AT 偏好性(ITS1, 58.7% ~ 61.9%; ITS2, 49.8% ~ 60.2%),但是 3 种飞虱的 ITS1 与斑潜蝇种类 rDNA ITS1 的碱基组成(王莉萍等,2007)有很大差异,斑潜蝇 ITS1 的平均碱基含量 A + T 为 85.1%、G + C 为 14.9%。灰飞虱的 ITS1 相对其他两种飞虱有较强的 AT 偏好性,但在 ITS2 区 AT 含量则最低。3 种飞虱尽管同属于飞虱科,但是它们的内转录间隔区却有很大的差异,这说明这个区段可能经过长时间的分化,发生了较大的变异。尽管 3 种飞虱的 ITS1 和 ITS2 侧翼区(18S, 5.8S 和 28S)

序列相对比较稳定,ITS1 侧翼区的保守性大于 ITS2 侧翼区,但是 ITS1 和 ITS2 在 3 种飞虱中变异很大。ITS1 区在分析 438 个点中可变异点达到了 294 个,ITS2 则在分析的 403 个位点中可变异点为 177 个。

3 种飞虱混合发生,特别是灰飞虱雌虫与白背飞虱相似。对于酒精或福尔马林长时间浸泡的标本,体色和体征不明显,即使在显微镜下也难以区分,这时需要用分子的方法进行区分。本研究中试图利用 3 种飞虱 ITS1 和 ITS2 的区段变异大的特点,直接采用通用引物通过 PCR 扩增对形态特征难以鉴别的个体进行分子鉴别,但发现电泳检测 PCR 产物结果不能将 3 种飞虱区分开来。因此,我们通过针对 3 种飞虱的“种保守区域”设计了特异性的诊断引物,通过 PCR 扩增对 3 种飞虱不同地理种群的样本经过一系列的检测,发现 ITS1 区的特异性引物不适合用于 3 种飞虱的分子鉴定,ITS2 区的特异性引物在 3 种飞虱中均能进行较好的 PCR 扩增并且扩增结果稳定。从理论上讲,有必要测定各物种的所有地理种群(品系)ITS2 序列,并进一步定位“种保守区域”。但由于资源、时间和财力的限制,往往难以收集到所有的样本用于测序和分析(耿金虎等,2004)。我们采用 ITS2 区特异性引物对 3 种飞虱各 8 个不同地理种群的鉴定结果与形态学鉴定结果完全吻合。由于物种特异性诊断引物操作简单,成本低,可重复性好,因此检测结果准确且更符合实际研究的需要。本研究中报道的褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱的 ITS2 区的特异性引物为 3 种稻飞虱在特殊情况下的快速鉴别提供了有效的工具。

### 参考文献 (References)

- Amornsak W, Gordh G, Graham G, 1998. Detecting parasitised eggs with polymerase chain reaction and DNA sequence of *Trichogramma australicum* Girault (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Australian Journal of Entomology*, 37: 180-182.
- Cheng JA ed., 1996. Rice Pests. China Agriculture Press, Beijing. 80-102. [程家安 主编, 1996. 水稻害虫. 北京:中国农业出版社. 80-102]
- Ding JH, 1995. Agricultural Entomology. Jiangsu Science and Technology Press, Nanjing. [丁锦华, 1995. 农业昆虫学. 南京:江苏科学技术出版社]
- Geng ZH, Li ZX, Shen ZR, 2004. Application of species-specific primers to molecular identification of three important *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 47(5): 639-644. [耿金虎, 李正西, 沈佐锐, 2004. 诊断引物应用于我国三种重要赤眼蜂分子鉴定的研

- 究. 昆虫学报, 47(5): 639–644]
- Huang SJ, Huang RH, 2001. Some research progress of *Nilaparvata lugens* in China. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 13(4): 43–50. [黄水金, 黄荣华, 2001. 我国褐飞虱的若干研究进展. 江西农业学报, 2001, 13(4): 43–50]
- Ji YJ, Zhang DX, He LJ, 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*, 3: 581–585.
- Li ZX, Shen ZR, 2002. Application of rDNA-ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5): 559–566. [李正西, 沈佐锐, 2002. 赤眼蜂分子鉴定技术研究. 昆虫学报, 45(5): 559–566]
- Liu YQ, Jin XD, Qin L, Lu C, Xiang ZH, 2008. Characterization and phylogenetic analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene sequences from nine species of silk-producing insects. *Acta Entomologica Sinica*, 51(3): 307–314. [刘彦群, 靳向东, 秦利, 鲁成, 向仲怀, 2008. 九种绢丝昆虫线粒体 12S rRNA 基因的序列特征和系统发育分析. 昆虫学报, 51(3): 307–314]
- Miller BR, Crabtree MB, Savage HM, 1996. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*, 5: 93–107.
- Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R, 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2 496–2 497.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1 596–1 599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal\_X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4 876–4 882.
- Wan YZ, Qu ZC, Cao QY, Shen DL, 2001. The RAPD analysis of *Laodelphax striatellus* populations. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 40(5): 535–543. [万由衷, 曲志才, 曹清玉, 沈大棱, 2001. 不同种群灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) 的 RAPD 分析. 复旦学报 (自然科学版), 40(5): 535–543]
- Wang GR, Fan YY, Zhuang JY, Zheng KL, Zhang ZT, 2001. DNA-based genetic variation in rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Acta Entomologica Sinica*, 44(1): 123–126. [王桂荣, 樊叶杨, 庄杰云, 郑康乐, 张志涛, 2001. 稻褐飞虱的 DNA 遗传变异性分析. 昆虫学报, 44(1): 123–126]
- Wang LP, Du YZ, He YT, Lu YJ, Lu ZQ, 2007. Sequence analysis and comparison of rDNA-ITS1 of geographical populations of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) from China and closely related species. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 597–603. [王莉萍, 杜予州, 何娅婷, 陆亚娟, 陆自强, 2007. 不同地理种群美洲斑潜蝇及近缘种的 rDNA-ITS1 序列分析和比较. 昆虫学报, 50(6): 597–603]
- Xu J, Zhao Y, Wu AZ, Pan CG, Qu ZC, Shen DL, Su DM, 2001. RAPD analysis for brown plant hopper groups from different areas. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 19(1): 20–23. [许骏, 赵艳, 吴爱忠, 潘重光, 曲志才, 沈大棱, 苏德明, 2001. 不同地区灰飞虱群体的 RAPD 分析. 上海交通大学学报 (农业科学版), 19(1): 20–23]
- Zhang DX, 2002. Molecular ecology. In: Ge F ed. *Modern Ecology*. Beijing, Science Press. 7–31. [张德兴, 2002, 分子生态学. 见: 戈峰 主编. 现代生态学. 北京: 科学出版社. 7–31]
- Zhang DX, Hewitt GM, 1998. Isolation of DNA from preserved specimens. In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS eds. *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman & Hall, London, UK. 41–45.
- Zhang XJ, Li SS, Huang YQ, Wei H, Zhan ZX, Hu QY, 2001. RAPD-PCR analysis of rice brown planthopper. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 20(2): 93–97. [张晓俊, 李三暑, 黄玉清, 魏辉, 占志雄, 胡奇勇, 2001. 褐飞虱的 RAPD-PCR 分析. 广西农业生物科学, 20(2): 93–97]

(责任编辑:袁德成)