

不同 CO₂ 浓度条件下灰飞虱体内 RSV 的定量检测*

王爽 朱橙 封亚青 张燕 梁国华 杨益众**

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要 灰飞虱的群体带毒率及体内条纹病毒(rice stripe virus, RSV)的准确检测是预测水稻条纹叶枯病在 CO₂ 浓度升高背景下能否大发生的重要参考依据之一。本研究应用 qualified RT-PCR(qRT-PCR)测定不同 CO₂ 浓度条件下灰飞虱体内的 RSV 含量。结果表明:在试验的 3 个 CO₂ 浓度梯度(370、470 和 570 μl · L⁻¹)下,470 μl · L⁻¹的 CO₂ 浓度最适合 RSV 在灰飞虱体内的增殖,此方法与现已普遍应用的酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和斑点免疫结合检测法(dot immunobinding assay, DIBA)相比,具有快速、灵敏和特异性强的优点,且不需制备抗血清,适于普及应用。

关键词 灰飞虱; 水稻条纹病毒; qRT-PCR; 二氧化碳

中图分类号 Q968.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2010)9-1782-06

Quantitative detection of rice stripe virus in *Laodelphax striatellu* under different CO₂ concentrations. WANG Shuang, ZHU Cheng, FENG Ya-qing, ZHANG Yan, LIANG Guo-hua, YANG Yi-zhong (School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(9): 1782-1787.

Abstract: Accurate detection of populations virus-carrying rate and individuals rice stripe virus (RSV) content of small brown planthopper (*Laodelphax striatellu*) is one of the important references to predict whether the rice stripe disease could outbreak under elevated CO₂ concentration. In this study, qualified RT-PCR assay (qRT-PCR) was employed to detect the RSV content in *L. striatellu* under different CO₂ concentrations. Among the test three CO₂ concentrations (370, 470, and 570 μl · L⁻¹), 470 μl · L⁻¹ of CO₂ was most favorable to the multiplication of RSV in *L. striatellu*. Compared with the commonly used ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and DIBA (dot immunobinding assay), qRT-PCR was more rapid, sensitive, and specific, and didn't need antiserum preparation, being easily to be popularized.

Key words: *Laodelphax striatellu*; rice stripe virus; qRT-PCR; carbon dioxide.

近年来,由水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)引起的水稻条纹叶枯病给中国的水稻生产带来了灾难性损失(程兆榜等,2002)。其病毒由介体昆虫灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)经卵传递给下一代,并以持久方式进行传播(Ramirez & Haenni, 1994)。对灰飞虱体内 RSV 的定量测定目前普遍采用的是酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和斑点免疫结合测试技术(dot immunobinding assay, DIBA)(周益军等,2004)。这 2 种方法虽有一定的借鉴作用,但只能作为单头灰

飞虱是否带毒的判定,而定量描述只能依据斑点颜色的相对深浅进行判断,误差较大。

qualified RT-PCR(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)是实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, FQ-PCR)与 RT-PCR(reverse transcriptase PCR)相结合的技术。此技术使定量极微量的基因表达成为可能,广泛用于基因表达差异分析(李文海等,2005)。与常规的 RT-PCR 方法比较,具有引物和探针的双重特异性,扩增效率高、反应污染少、初始循环数(Ct)值稳定等优势(Kahn *et al.*, 2000)。本研究拟用此方法对灰飞虱体内 RSV 进行定量检测。

近年来,大气中 CO₂ 的浓度不断升高。据统

* 国家自然科学基金项目(30771416)和江苏省六大人才高峰资助项目(06-G-035)。

** 通讯作者 E-mail: yzyang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2010-03-11 接受日期: 2010-06-14

计,全球 18 世纪 CO₂ 的平均浓度为 280 μl · L⁻¹,19 世纪为 285 μl · L⁻¹,20 世纪末达到 367 μl · L⁻¹,预计到 21 世纪 50 年代将增加到 700 μl · L⁻¹ 左右 (Clark,1982; Crane & Liss,1985; 蔡晓明,2000)。CO₂ 是植物进行光合作用的底物,其浓度的升高对植物的生长发育、形态结构和生理生化机能都有着直接或间接的影响(李果梅等,2008;韩雪,2009),并影响以之为食的植食性昆虫的生长发育(吴坤君,1988; Lindroth *et al.*, 2002; 孟玲和李保平,2005)。

鉴于条纹叶枯病近几年在长江中下游稻区大面积流行,对传播 RSV 的媒介灰飞虱的带毒检测研究已有较多报道(秦文胜等,1994;曲志才等,1999;Cai *et al.*,2003),但 RSV 在灰飞虱体内的传播规律研究还很少(Wu *et al.*,2002)。环境条件变化特别是随着大气 CO₂ 浓度的升高,灰飞虱体内的 RSV 对 CO₂ 浓度升高的响应研究目前国内外还是一个空白。

本研究通过室内模拟,建立了利用 qRT-PCR 解析灰飞虱体内 RSV 含量的方法,初步探讨了大气 CO₂ 浓度升高对灰飞虱体内 RSV 增殖的影响,为进一步预测条纹叶枯病的发生流行提供重要的参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 虫源 虫源来自扬州大学实验农牧场,放入不同 CO₂ 浓度光照培养箱中饲养繁殖 2 代后取 4 ~ 5 龄若虫。提取 RNA 前先用 DIBA(斑点免疫结合测试技术)(周益军等,2004)检测其平均带毒率。

1.1.2 稻苗 水稻品种“武运粳 7 号”,播种在 1000 ml 大烧杯中,自秧苗长至 10 cm 左右时接入带毒灰飞虱,烧杯口以纱网罩住,放入不同 CO₂ 浓度的光照培养箱中培养。

1.1.3 CO₂ 浓度的控制 本试验设备参照陈法军等(2004)所用设备,以 eSENSE-D 型 CO₂ 浓度控制仪(Sense Air AB Company, Sweden)和 XMT605 智能显示仪表(南京法派电器有限公司)控制和监测 CO₂ 浓度,普通试验钢瓶供给 CO₂ 气体,以 PYX-300Q-B 型人工气候箱(哈尔滨东联电子公司)为试验空间,形成一个密闭动态气室。该气室温度为 25 °C,湿度 60% ≤ RH ≤ 80%,光周期 L/D = 14/10(L = 8:00—22:00;D = 22:00—8:00)。

设置 370(大气 CO₂ 浓度,作为对照 CK)、470 和 570 μl · L⁻¹ 的 3 个浓度梯度,每隔 2 h 自动检测

一次 CO₂ 的浓度变化。统计表明,470 和 570 μl · L⁻¹ 的 2 个处理的浓度变异都显著小于 370 μl · L⁻¹ (对照)的浓度变异($P < 0.05$)。

1.1.4 主要试剂 M-MLV 反转录酶(invitrogen); NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒(MACHEREY-NA-GEL, Germany); cDNA Synthesis Kit (Promega, USA); SYBRR Premix Ex Taq TM (Perfect Real-Time)(宝生物工程(大连)有限公司),其他常规试剂均为国产分析纯。

1.1.5 分子生物学软件 Primer Premier 5.0 引物设计软件为加拿大 Premier Biosoft International 公司产品;Lasergene 序列分析软件为美国 DNASTAR 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 Real Time-PCR 引物的设计 根据 GenBank 中的水稻条纹病毒(RSV)多条序列的保守区域,设计了一对 Real Time-PCR 特异性引物,由上海生物工程技术服务有限公司提供。上游引物(5' - 3')序列为:AGAGAGAGTCACGGAAGATACTAAGAAG;下游引物(3' - 5')序列为:CGCTAAAAGGTGTGATAGGAATGAGT。PCR 扩增的基因片段大小为 149 bp。

1.2.2 灰飞虱体内 RNA 的提取 提取方法参照王朝晖等(2002),如下:取每个 CO₂ 浓度处理下饲养 2 代的 4 ~ 5 龄灰飞虱若虫各 30 只(在 CO₂ 为 370、470 和 570 μl · L⁻¹ 浓度下灰飞虱群体的带毒率分别为 29%、30% 和 25%)为一组,一起捣碎后转入 -70 °C 超低温冰箱中保存备用。在每份冻存组织中取 100 mg,转入 1.5 ml 离心管中,加入 1 ml Trizol 匀浆,加 300 μl 氯仿强烈振荡 15 s,冰上放置 2 ~ 3 min,离心后取其上清液,加 500 μl 异丙醇,混匀,冰上放置 10 min,离心沉淀后弃去上清液,加 1 ml 75% 乙醇(由 0.1% DEPC 水配制)洗涤,再加入适量 DEPC 水溶解,-70 °C 保存备用。每个 CO₂ 浓度处理重复 3 次。

反转录体系(获得 cDNA):利用 1.2.2 提取的 RNA 26 μl,5 × buffer 8 μl,dNTP 2.5 μl,随机引物(50 pmol · μl⁻¹)1.5 μl,反转录酶(M-MLV)1.5 μl,RNasin 0.5 μl。37 °C 60 min,75 °C 15 min,灭活反转录酶。PCR 扩增体系:已获得的 cDNA 模板 1 μl,10 × buffer 5 μl,dNTP 1 μl,上下游引物(50 pmol · μl⁻¹)各 1 μl,超纯水 40 μl,Expand High Fidelity DNA 聚合酶(3.5 U · μl⁻¹)1 μl。94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 20 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 20 s,

30个循环,最后72℃延伸10min。

1.2.3 qRT-PCR特异性的鉴定 PCR产物电泳,用Agrose Gel DNA Extraction Kit回收预期大小的目的片段,取3μl回收产物与PCR2.1(r)-T vector连接。连接产物转化至DH5α感受态细胞,在IPTG+X-gal+Amp+LB平板上筛选白斑,常规方法小量提取质粒。质粒初步电泳验证后,进行PCR鉴定。选择阳性克隆,送上海联合基因科技有限公司用M13通用引物测序。

1.2.4 定量标准品的制备 以自然条件下培养的灰飞虱提取的RNA反转录合成的cDNA为标准品,用灭菌的超纯水以5倍稀释度进行倍比稀释,分别稀释至1/5、1/25、1/125、1/625、1/3125和1/15625,置于-20℃保存。

1.2.5 qRT-PCR条件的优化 相对于普通PCR反应,qRT-PCR的要求较高,必须对反应体系进行优化。本研究通过调整引物浓度,以提高扩增效率:将SYBRR Premix Ex TaqTM (2×)上下颠倒混匀,离心机低速瞬时离心。向20μl qRT-PCR反应体系中加入SYBRR Premix Ex TaqTM (2×)10μl,上下游引物浓度分别选择0.08、0.10、0.12、0.24、0.48、1.00 μmol·L⁻¹,ROX Reference Dye (50×) 0.4 μl,最后补加灭菌的超纯水至18 μl终体积,分装至PCR反应孔中,最后加入cDNA模板2 μl,盖上PCR反应板的封盖。

上述操作均在冰上进行,操作过程中尽量避免产生气泡。所用仪器为7500 Real-time 定量PCR仪(美国应用生物系统公司)。

qRT-PCR的反应条件:94℃预变性10s;然后进行36个循环,条件为94℃6s,60℃20s,72℃31s;在每个循环的第二步即60℃20s结束时进行荧光检测。每个样品作3个平行对照,同时以灭菌的超纯水代替cDNA模板作阴性对照。

1.2.6 标准曲线的建立 qRT-PCR标准曲线中各浓度模板为方法1.2.4中配置的标准品,每样品3次重复。qRT-PCR的反应体系如下(共20ul):SYBRR Premix Ex TaqTM (2×)10.0 ul,PCR forward primer (20 μM) 0.4 μl,PCR reverse primer (20 μM) 0.4 μl,ROX Reference Dye (50×) 0.4 μl,cDNA模板2.0 μl,dH₂O 6.8 μl。

1.2.7 qRT-PCR对样品的解析 利用qRT-PCR技术对3个CO₂浓度处理的灰飞虱体内的病毒量做解析。Real-time PCR反应体系见1.2.6,反应的模

板共3组,分别为3个CO₂浓度下灰飞虱体内的病毒反转录得到的cDNA,每个样品做3个平行对照,同时以标准品建立标准曲线。在每个循环的第二步即60℃20s结束时进行荧光检测,反应结束后,直接由仪器自带软件计算出Ct值并给出定量结果。

2 结果与分析

2.1 组织及病毒RNA的提取

用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检显示所提取的RNA样品电泳条带清晰,23S与16S rRNA条带亮度比接近或大于1:1,结果显示所提取的RNA可用。

2.2 qRT-PCR特异性的鉴定

qRT-PCR扩增的产物,经1%琼脂糖凝胶电泳分析,cDNA组均扩增出预期大小的目的条带,而阴性对照(灭菌超纯水)组,未见有任何条带。qRT-PCR扩增产物连接入PCR2.1(r)-T vector,经测序结果表明扩增片段为目的基因。显示设计的引物具有很好的特异性,符合qRT-PCR对引物的要求。

2.3 qRT-PCR体系的优化

结果证明,在实验所设上下游引物的一系列梯度浓度范围内,0.48 μmol·L⁻¹引物浓度使体系的扩增效率最高。

2.4 qRT-PCR标准曲线的建立

从图1可见,RSV目的片段的熔解曲线为单一峰型的曲线,未出现其他非特异性的峰,说明建立的qRT-PCR体系的特异性较高。

不同浓度下灰飞虱体内RSV目的片段的扩增曲线见图2,说明随着标准品被稀释倍数的增加,能够达到荧光阈值所需的初始循环数(Ct)也在增多。

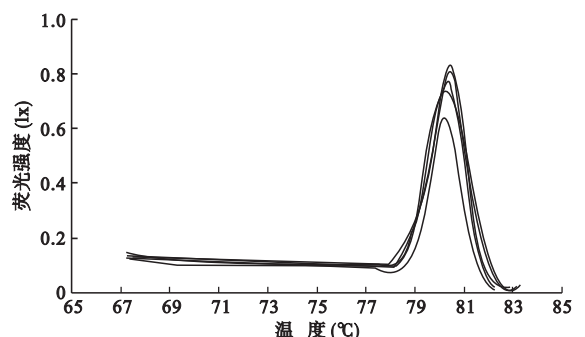


图1 灰飞虱体内RSV目的基因片段的熔解曲线
Fig. 1 Melting curve of target gene fragments of RSV from the small brown planthopper

6条曲线为RSV目的基因的6次重复。

以不同拷贝数的标准品浓度的对数为横坐标,以定量 PCR 反应过程中达到荧光阈值的 Ct 为纵坐标,得到了灰飞虱体内 RSV 含量的标准曲线(图 3)。

评价标准曲线的优劣有 2 个指标:相关系数(r^2)和斜率(s)。相关系数反映标准曲线的线性,应大于 0.98,越接近 1 说明线性关系越好,定量越准确;斜率反映 PCR 扩增效率(E),应在 0.8 ~ 1.2,可根据公式 $E=10^{[-1/s]}-1$ 计算。本研究中标准曲线的 r^2 为 0.9988, s 为 -3.46,计算得 PCR 扩增效率为 0.95。 r^2 和 E 均符合理想标准曲线的要求,可用于 RSV 含量的定量解析。

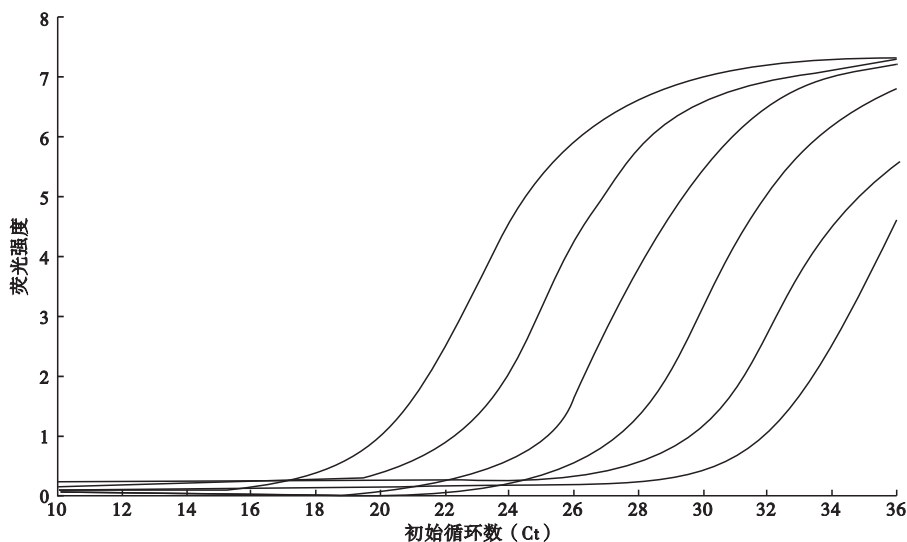


图 2 灰飞虱体内 RSV 目的片段不同浓度下的扩增曲线

Fig. 2 Amplification curve of target gene fragments of RSV from the small brown planthopper

以自然条件下培养的灰飞虱提取的 RNA 反转录合成的 cDNA 为标准品;图中曲线从上往下依次为标准品被稀释至 1/5、1/25、1/125、1/625、1/3125 和 1/15625 时的扩增曲线。

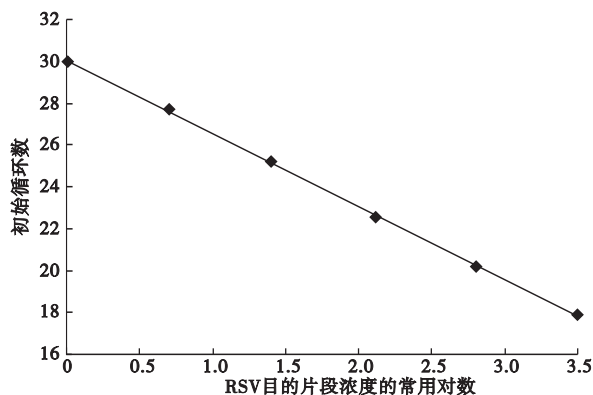


图 3 灰飞虱体内 RSV 含量的标准曲线

Fig. 3 Standard curve of concentrations of RSV from the small brown planthopper

2.5 qRT-PCR 对不同样品中 RSV 的 RNA 水平解析

qRT-PCR 对不同样品中 RSV 的 RNA 定量结果见图 4。370 $\mu\text{l} \cdot \text{L}^{-1}$ CO₂ 浓度下灰飞虱体内 RSV 的定量结果分别为 268.31、259.92 和 278.45,平均 268.89;470 $\mu\text{l} \cdot \text{L}^{-1}$ CO₂ 浓度下灰飞虱体内 RSV 的定量结果分别为 2306.10、2238.10 和 2568.50,平均 2370.90;570 $\mu\text{l} \cdot \text{L}^{-1}$ CO₂ 浓度下灰飞虱体内 RSV 定量结果分别为 588.34、628.20 和 540.58,平均 585.71。3 个 CO₂ 浓度下灰飞虱体内 RSV 含量差异达到极显著水平。

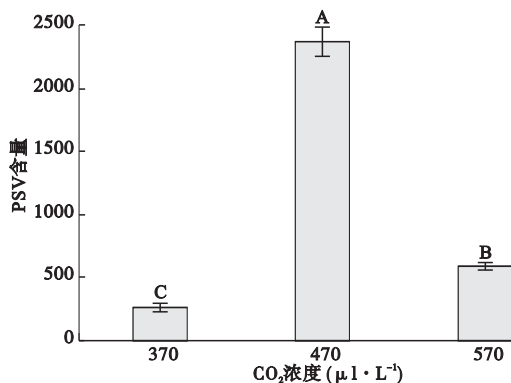


图 4 不同 CO₂ 浓度下灰飞虱体内 RSV 的定量结果

Fig. 4 Quantitative result of RSV in the small brown planthopper in different concentrations of CO₂

不同大写字母表示在 0.01 水平上差异达到极显著。

3 讨论

目前生产上主要是根据灰飞虱的带毒率来预测水稻条纹叶枯病的发生情况,采用的是灰飞虱带毒检测技术即 ELISA 和 DIBA 法(周益军等,2004)。这种预测结果虽有一定的借鉴作用,但无法对灰飞虱体内 RSV 进行定量描述。本研究建立了利用 qRT-PCR 对不同 CO₂ 浓度条件下灰飞虱体内 RSV 增殖规律进行解析的方法。这一技术与 ELISA 和 DIBA 法相比,具有快速、灵敏和特异性强等优点,如 RT-PCR 技术可检测到 30 μg 病叶及 1/10 头带毒虫中的病毒,而 DBIA 检测的灵敏度约为 120 μg 病叶及单头带毒虫;RT-PCR 检测时,病叶及带毒灰飞虱可在电泳凝胶中得到阳性反应带,与预期的相符,对照样品不会出现任何反应带。而 DIBA 的结果易受样品浓度影响,常有假阳性或假阴性现象(Gabrys *et al.*, 1997)。而且 RT-PCR 技术不需制备抗血清,适于普及应用。

qRT-PCR 有 2 种方法(Raja *et al.*, 2000; Lekanne *et al.*, 2002),即一步法 qRT-PCR 和两步法 qRT-PCR。两步法 qRT-PCR 的第一步是通过随机引物或特异性引物对 RNA 进行反转录,第二步是以合成的 cDNA 为模板进行后续的 PCR 反应。一步法 qRT-PCR 是反转录和后续的 PCR 反应在同一反应管中进行,其优点是操作简单、污染机率低,但反应的各步都不是各自的最佳条件,所以效率通常比两步法低,且第一步的反转录不能使用随机引物,而必须选择特异性的引物。因此本研究我们采用了两步法 qRT-PCR。

qRT-PCR 的荧光检测方法分为嵌合荧光法和荧光探针法两大类(Lekanne *et al.*, 2002)。荧光探针法特异性强,且能进行多重 PCR,但成本较高。嵌合荧光简单可行、成本较低。本研究采取了嵌合荧光法,引物设计的优劣是影响其实验结果的最重要因素。本研究设计的特异性引物,其反应产物的熔解曲线都呈单峰,且测序结果也表明扩增的片段为目的序列,证明引物特异性较强。

在制作标准曲线时,标准品的选择和制备非常重要。本研究选择了在自然条件下培养的灰飞虱提纯的 RNA 反转录合成的 cDNA 作为标准品。标准品的稀释是关系到其制作质量的重要因素。如果稀释不均匀,Ct 值对应点就会偏离标准曲线,导致定量结果不准确,所以应尽量保证稀释的准确性。制

备的标准品要避免反复冻融而导致其结构的改变,近期使用的标准品可以在 4 °C 短期贮存,长期使用的应分装后于 -20 °C 保存。斜率和相关系数是判断标准曲线优劣的 2 个指标。斜率反映 PCR 扩增效率(E),理想值应在 0.8 ~ 1.2。如果值 ≤ 0.8 ,必须优化反应体系或重新设计引物;如果值 ≥ 1.2 ,说明体系中有可能存在对反转录或 PCR 反应的抑制物质,需要改良方法。相关系数(r^2)反映标准曲线的线性,理想值应大于 0.98,越接近 1 说明线性越好,定量越准确。通过调节引物工作浓度,优化了 qRT-PCR 的反应体系,保证了 PCR 的扩增效率;同时,标准曲线的相关系数都达到了 0.99 以上。上述结果表明,本研究利用 qRT-PCR 技术可以准确地应用于灰飞虱体内 RSV 的 RNA 含量的解析。

定量 PCR 的结果表明,不同 CO₂ 浓度下灰飞虱体内 RSV 病毒的含量存在差异,其中 470 μl · L⁻¹ 时 RSV 含量最高,其次为 570 μl · L⁻¹,最低为 370 μl · L⁻¹。该结果提示,CO₂ 浓度的变化对 RSV 在灰飞虱体内的增殖有影响。在实验所设计的 3 个浓度内,470 μl · L⁻¹ 最适合 RSV 在灰飞虱体内的增殖。

尽管国内外已开展了大气 CO₂ 浓度变化对昆虫影响的大量研究探索,但许多方面还存在着不可知性。大气 CO₂ 浓度升高对昆虫的影响可分为直接影响和间接影响。直接影响表现为通过高浓度的 CO₂ 对昆虫的呼吸代谢和体内某些生理活动的影响。但在试验设定的范围内(一般为 550 ~ 750 μl · L⁻¹),CO₂ 浓度变化对昆虫的影响甚微(丁一汇和高素华,1995)。因此,CO₂ 浓度变化对昆虫的影响主要是通过影响寄主植物而间接作用于昆虫。

朱橙(2009)研究表明,CO₂ 浓度增加使灰飞虱进入第三代后存活率明显提高,说明 CO₂ 对灰飞虱存在长期、多代的特点。同时,朱橙(2009)对水稻体内糖、蛋白质和游离氨基酸等基本物质进行了测定,结果显示,在不同 CO₂ 浓度处理下各营养物质的含量差异显著。可见,本实验所设定的 CO₂ 浓度很有可能是通过影响寄主植物体内营养物质的含量进而影响灰飞虱体内 RSV 的增殖。

目前在高 CO₂ 浓度下对昆虫影响的机理主要有营养补偿假说(nutrient complementation hypothesis, NH)、毒素假说(toxins hypothesis, TH)和碳营养平衡假说(carbon nutrient balance hypothesis, CNBH)等(吴坤君,1993)。在处理 CO₂-水稻-灰飞虱这一整体环境中,特别是对于不同 CO₂ 浓度对灰飞虱带

毒量的影响,是否与上述假说相符,今后应加强对水稻体内各发育期微量营养物质以及与 RSV 增殖有关的各种指标的检测,以获得进一步的结果。

本研究首次利用 qRT-PCR 技术对 CO₂ 浓度升高与虫传病毒之间的关系进行探讨,为其他虫传病害与 CO₂ 浓度之间关系的研究提供了一定的基础,也为分析近几年长江流域条纹叶枯病大流行的机理提供了参考依据。

参考文献

- 蔡晓明. 2000. 生态系统生态学. 北京: 科学出版社.
- 陈法军, 戈峰. 2004. 一套用于控制 CO₂ 浓度的人工气候箱-CDCC-1 型密闭式动态 CO₂ 气室. 昆虫知识, **41**(3): 279-281.
- 程兆榜, 杨荣明, 周益军, 等. 2002. 江苏稻区水稻条纹叶枯病发生新规律. 江苏农业科学, (1): 39-42.
- 丁一汇, 高素华. 1995. 痕量气体对我国农业和生态系统影响研究. 北京: 中国科学技术出版社.
- 韩雪. 2009. 大气 CO₂ 浓度升高对冬小麦生理生态的影响研究(硕士学位论文). 北京: 中国农科院农业环境与可持续发展研究所.
- 李果梅, 史奕, 陈欣. 2008. 二氧化碳和臭氧浓度升高对春小麦生长及次生代谢的影响. 应用生态学报, **19**(6): 1283-1288.
- 李文海, 邓学梅, 李宁, 等. 2005. 用 SSH 法结合荧光定量 PCR 技术研究猪双肌臀和非双肌臀肌肉组织的差异表达基因. 生物化学与生物物理进展, **32**(4): 353-358.
- 孟玲, 李保平. 2005. 大气二氧化碳浓度升高对植物昆虫相互关系的影响. 生态学杂志, **24**(2): 200-205.
- 秦文胜, 高东明, 陈声祥. 1994. 灰飞虱体内稻条纹叶枯病毒快速检测技术研究. 浙江农业学报, **6**(4): 226-229.
- 曲志才, 沈大棱, 徐亚南, 等. 1999. 水稻条纹叶枯病毒基因产物在水稻和昆虫体内的 Western 印迹分析. 遗传学报, **26**(5): 512-517.
- 王朝辉, 周益军, 范永坚, 等. 2002. 从单头灰飞虱中检测水稻黑条矮缩病毒简单快速的方法. 上海交通大学学报(农业科学版), **20**(4): 340-343.
- 吴坤君. 1988. 空气污染对昆虫的影响. 昆虫知识, **26**(2): 122-127.
- 吴坤君. 1993. 大气中 CO₂ 含量增加对植物昆虫关系的影响. 应用生态学报, **4**(2): 198-202.
- 周益军, 刘海建, 王贵珍, 等. 2004. 灰飞虱携带的水稻条

纹病毒免疫检测. 江苏农业科学, (1): 50-51.

- 朱橙. 2009. 大气二氧化碳浓度升高对灰飞虱获毒、带毒和种群动态的影响研究(硕士学位论文). 扬州: 扬州大学.
- Cai LJ, Ma XZ, Kang L, et al. 2003. Detecting rice stripe virus (RSV) in the small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*) with high specificity by RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **112**: 115-120.
- Clark WC. 1982. Carbon Dioxide Review. New York: Oxford University Press.
- Crane A, Liss P. 1985. Carbon dioxide, climate and sea. *New Scientist*, **108**: 50-53.
- Gabrys B, Tjallingii WF, Beek TA. 1997. Analysis of EPG recorded probing by cabbage aphid on host plant parts with different glucosinolate contents. *Journal of Chemical Ecology*, **23**: 1661-1673.
- Kahn HJ, Yang LY, Blondal J, et al. 2000. RT-PCR amplification of CK19 mRNA in the blood of breast cancer patients: Correlation with established prognostic parameters. *Breast Cancer Research and Treatment*, **60**: 143.
- Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, et al. 2002. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry*, **307**: 63-69.
- Lindroth RL, Wood SA, Kopper BJ. 2002. Responses of quaking aspen genotypes to enriched CO₂: Foliar chemistry and tussock moth performance. *Agricultural and Forest Entomology*, **4**: 315-323.
- Raja S, Luketich JD, Kelly LA, et al. 2000. Increased sensitivity of one-tube, quantitative RT-PCR. *Biotechniques*, **29**: 702-706.
- Ramirez HC, Haenni AL. 1994. Molecular biology of tenuiviruses, a remarkable group of plant viruses. *Journal of General Virology*, **75**: 467-475.
- Wu A, Sun X, Pang Y, et al. 2002. Homozygous transgenic rice lines expressing GNA with enhanced resistance to rice sap-sucking pest *Laodelphax striatellus*. *Plant Breeding*, **121**: 93-95.

作者简介 王爽,女,1979年生,讲师,博士研究生。主要从事害虫综合治理、植物生理生化及农药毒理研究。
E-mail: wshhaitun@126.com
责任编辑 刘丽娟