

文章编号:0427-7104(2001)05-0535-04

不同种群灰飞虱(*Laodelphax striatellus*) 的 RAPD 分析

万由衷, 曲志才, 曹清玉, 沈大棣

(复旦大学 生命科学学院 遗传学研究所, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433)

摘要: 用 RAPD 技术对 9 个不同的灰飞虱地理种群的 DNA 多态性进行了研究. 按 Neighbor-joining 聚类法构建了这 9 个种群灰飞虱的分子系统树. 该系统树分为 2 簇, 簇 1 包括我国北京、福建、海南、辽宁、四川、上海、云南地区的灰飞虱种群, 簇 2 包括宁夏地区和日本东京地区的 2 个灰飞虱种群. 研究表明, 不同地区灰飞虱种群的遗传距离与其地理距离不呈相关性.

关键词: 灰飞虱(*Laodelphax striatellus*); RAPD 分析; 多态性

中图分类号: Q 969

文献标识码: A

灰飞虱是吸食水稻等禾本科作物茎叶汁液的迁飞性害虫, 经它传播的水稻条纹叶枯病毒(rice stripe virus, RSV)对世界上很多国家的水稻生产形成了巨大的威胁. 我国自 60 年代在江浙发现水稻条纹叶枯病以来, 已陆续在 16 个省区流行, 造成了重大损失^[1]. 目前对该病的防治尚缺乏有效的方法, 主要通过喷洒杀虫剂防治传毒媒介等间接手段控制病害的流行. 研究发现, 介体灰飞虱的传毒能力受遗传因素控制^[2]. 因此对灰飞虱不同地理种群间的遗传差异进行分析, 有助于揭示病毒与介体之间的相互关系, 为病毒病的有效防治提供理论依据.

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是由 Williams 等首先提出的一种分子生物学技术, 因其能够简便有效地提供丰富的 DNA 多态信息, 而被广泛用于遗传差异、亲缘关系和进化等方面的研究^[3]. Black 利用该技术进行蚜虫的分类鉴定, 藉以揭示形态及生理生化指标无法检测的多态性^[4]. 近年来, 国内学者利用该技术在昆虫遗传和分类方面也作了一些工作, 如杨效文^[5]等对烟蚜种群分化的 RAPD 分析中发现, DNA 分子的多态性能够反映出不同地区烟蚜体色上的差异. 但迄今为止, 尚未见到有关利用 RAPD 技术研究灰飞虱不同地理种群间遗传差异的报道.

1 材料和方法

1.1 虫源

共 9 个灰飞虱种群, 分别采自上海、云南、北京、辽宁、四川、宁夏、福建、海南和日本东京(第 536 页表 1). 传代保存于本实验室.

1.2 模板 DNA 的提取

主要参照 Baruffi 等的方法^[6]提取模板 DNA. 每个种群取 30 只左右的成虫, 加入 200 μ L 研磨缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl pH 9.1, 100 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS 及 100 μ g/mL 蛋白酶 K)充分研磨. 收集匀浆液, 65 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 再加入 55 μ L 8 mol/L 的 KAc, 冰浴 30 min 以充分沉淀, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 上清液中加入 2 倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放

收稿日期: 2001-02-28

基金项目: 生物多样性与生态工程教育部重点实验室基金; 美国 McKnight 基金资助(14001404)

作者简介: 万由衷(1976—), 男, 硕士研究生.

置 2 h 沉淀 DNA, 12 000 r/min 再离心 10 min, 收集沉淀, 70% (体积分数) 乙醇洗涤 3 次, 沉淀悬浮于 200 μ L 双蒸水中.

表 1 灰飞虱来源

Tab. 1 Nine populations of *Loodelphax striatellus* as sources of DNA

| 编号 | 群体 | 采集地点 | 采集日期 | 编号 | 群体 | 采集地点 | 采集日期 |
|----|----|------|---------|----|----|------|---------|
| BJ | 北京 | 六郎山 | 1999-06 | NX | 宁夏 | 青铜峡 | 1999-06 |
| DJ | 日本 | 东京 | 1997-06 | SC | 四川 | 绵阳 | 1999-06 |
| FJ | 福建 | 福州 | 2000-05 | SH | 上海 | 闵行 | 1998-06 |
| HN | 海南 | 三亚 | 1999-09 | YN | 云南 | 楚雄 | 1999-06 |
| LN | 辽宁 | 沈阳 | 1999-05 | | | | |

1.3 PCR 体系及扩增程序

所用 Taq 酶等试剂及随机引物均购自上海生工生物有限公司. 反应体积 20 μ L, 含 2.5 U 的 Taq 酶, 终质量浓度为 0.2 mmol/L 的 dNTP, 0.5 μ mol/L 的引物, 10~50 ng 灰飞虱 DNA. PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C, 2 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 36 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 循环 45 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 反应产物用 15 g/L 的琼脂糖凝胶在 70 V 电压下电泳 4 h, 凝胶成像仪观察并拍照. 每个反应重复 2 次.

1.4 数据分析

根据 Nei 等^[7]的相似率计算公式进行数据分析, 设 PCR 扩增产物电泳后在凝胶的某一多态位置上有 DNA 条带为 1, 无条带为 0, 遗传距离 (GD) = 1 - GS, 相似系数 (GS) = $2N_{xy} / (N_x + N_y) \times 100\%$. 其中 N_{xy} 为样品 x 和样品 y 共有的扩增带数目, N_x 为样品 x 具有的 DNA 扩增带数目, N_y 为样品 y 具有的 DNA 扩增条带数目.

2 结果分析

2.1 随机引物筛选及扩增结果

在所选用的 53 个随机引物中, 筛选出重复性好, 条带清楚且多态性丰富的 20 个引物用于灰飞虱的 RAPD 分析 (表 2). 共扩增出 115 条带, 其中表现多态性的为 108 条, 占全部条带的 93.9%. 部分引物扩增结果如图 1 (第 537 页) 和图 2 (第 538 页) 所示.

表 2 随机引物及其扩增带数

Tab. 2 Nucleotide sequences of random primers and numbers of their amplified bands

| 引物名称 | 序列 (5'→3') | 扩增带数 | 具多态性的带数 | 引物名称 | 序列 (5'→3') | 扩增带数 | 具多态性的带数 |
|------|-------------|------|---------|------|------------|------|---------|
| S61 | TTCGAGCCAG | 5 | 5 | X19 | TGGCAAGGCA | 7 | 7 |
| S63 | GGGGGTCTTT | 5 | 5 | M6 | CTGGGCAACT | 4 | 3 |
| S64 | CCGCATCTAC | 4 | 4 | M9 | GTCTTGCGGA | 8 | 8 |
| S67 | GTCCCCGACGA | 8 | 8 | M14 | AGGGTCGTTC | 4 | 4 |
| S68 | TGGACCGGTG | 6 | 6 | M15 | GACCTACCAC | 5 | 5 |
| S69 | CTCACCGTCC | 5 | 4 | M16 | GTAACCAGCC | 6 | 4 |
| S70 | TGTCTGGGTG | 7 | 7 | M17 | TCAGTCCGGG | 5 | 4 |
| X10 | CCCTAGACTG | 8 | 8 | M18 | CACCATCCGT | 7 | 7 |
| X12 | TCGCCAGCCA | 4 | 4 | T9 | CACCCCTGAG | 5 | 5 |
| X16 | CTCTGTTCGG | 5 | 4 | T14 | AATGCCGCAG | 7 | 6 |



图1 灰飞虱9个地理种群的 RAPD 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 RAPD patterns of 9 populations of *Laodelphax striatellus*

A. 引物 M17 的 RAPD 图谱; B. 引物 M18 的 RAPD 图谱; 泳道 1~9 分别对应的是 BJ, DJ, FJ, HN, LN, NX, SC, SH 和 YN 9 个灰飞虱地理种群

2.2 灰飞虱种群间的遗传距离

根据 Nei 等^[7]的相似系数公式,从 20 个引物的 PCR 扩增条带的带谱,可以计算出灰飞虱各不同地理种群间的遗传距离(表 3)。从表(3)中可以看出,四川和辽宁的灰飞虱种群间的遗传距离最小,为 0.355 6。福建和东京灰飞虱种群间的遗传距离最大,为 0.704 6。平均遗传距离为 0.528 8。

表3 灰飞虱9个不同地理种群间的遗传距离(左下)和地理距离(km,右上)矩阵

Tab. 3 Pairwise genetic distances (lower left triangle of the matrix) and geographic distances (upper right triangle of the matrix) among 9 populations of *Laodelphax striatellus*

| | BJ | DJ | FJ | HN | LN | NX | SC | SH | YN |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| BJ | | 2 300 | 1 800 | 2 600 | 1 000 | 700 | 2 000 | 1 200 | 2 000 |
| DJ | 0.466 7 | | 2 600 | 3 800 | 1 700 | 3 000 | 3 400 | 2 000 | 4 000 |
| FJ | 0.373 7 | 0.704 6 | | 1 250 | 2 400 | 2 000 | 1 600 | 750 | 1 800 |
| HN | 0.604 2 | 0.561 0 | 0.444 4 | | 3 400 | 2 450 | 1 650 | 1 850 | 1 300 |
| LN | 0.621 1 | 0.645 6 | 0.452 4 | 0.420 0 | | 1 650 | 2 300 | 1 700 | 3 000 |
| NX | 0.393 9 | 0.435 9 | 0.506 2 | 0.468 1 | 0.500 0 | | 900 | 1 650 | 1 550 |
| SC | 0.534 0 | 0.682 9 | 0.525 0 | 0.428 6 | 0.355 6 | 0.608 7 | | 1 550 | 650 |
| SH | 0.505 4 | 0.674 4 | 0.500 0 | 0.600 0 | 0.563 2 | 0.488 4 | 0.440 9 | | 2 000 |
| YN | 0.626 4 | 0.657 9 | 0.500 0 | 0.510 6 | 0.674 4 | 0.590 4 | 0.494 3 | 0.479 2 | |

3 讨 论

运用 RAPD 技术检测了 9 个不同地理种群灰飞虱的 DNA 多态性,从 DNA 分子水平对 9 个不同地理种群的亲缘关系进行了研究。结果表明:(1) 采自 9 个不同地点的灰飞虱可以分为 2 簇,簇 1 包括我国北京、福建、海南、辽宁、四川、上海、云南地区的灰飞虱种群,簇 2 包括宁夏地区和日本东京地区的 2 个灰飞虱种群。簇 1 又分为 2 支:一支为南方的灰飞虱种群,包括福建、海南、云南和四川的灰飞虱种群;另一支包括辽宁、北京和上海地区的灰飞虱种群。(2) 日本东京地区的灰飞虱种群与我国各灰飞虱种群的遗传距离普遍较远,平均遗传距离为 0.603 6,明显高于所有灰飞虱种群间的遗传距离的平均值(0.528 8)。东京地区的灰飞虱在形态上和我国的灰飞虱也有较大差别,如东京的灰飞虱的眼睛是红色的,而我国的灰飞虱的眼睛是褐色的。(3) 从聚类分析来看(第 538 页图 2),宁夏种群与东京种群较为接近,推测它们具有相似的遗传特征。共生菌 *Wolbachia* 的检测结果表明它们均表现为 *Wolbachia* 阴性,而我国其他地区的灰飞虱则为 *Wolbachia* 阳性^[8]。这说明 2 个种群在 *Wolbachia* 感染特性上是一致的。(4) 地理距离对不同

种群灰飞虱遗传距离的影响不明显,二者间不存在明显的线性关系(图3)。可能地形、地貌、农作物的种植规模及周围环境对灰飞虱不同地理种群间遗传物质的交流所起的作用更大。例如四川绵阳和宁夏青铜峡间的直线距离约900 km,但两地灰飞虱间的遗传距离确高达0.6087(表3),位于四川以北的山地可能阻止了灰飞虱在两地间的迁飞。另外宁夏的水稻种植区和我国其他水稻种植区相对隔绝,这也可能促成了宁夏地区灰飞虱形成其独特的遗传特征。从我们多年考察结果来看,宁夏灰飞虱的传毒能力特别低,而其他地区的传毒能力都很高。我国南方地区虽然国土辽阔,但水稻种植区都相连成片,各地灰飞虱间相互的迁飞可能更为容易,因此这些地区灰飞虱间遗传物质的交流也会更加频繁。

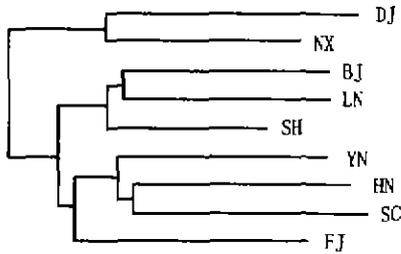


图2 灰飞虱9个不同地理种群的 Neighbor-Joining 分子系统图

Fig. 2 Neighbor-Joining tree for 9 populations *Laodelphax striatellus*

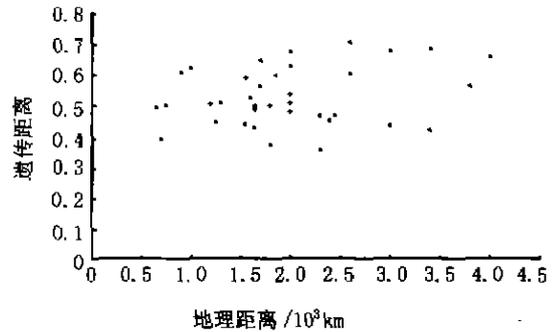


图3 灰飞虱不同地理种群间遗传距离与相对地理距离关系图

Fig. 3 The relationship between of pairwise genetics distances among 9 population of *Laodelphax striatellus*

John Armstrong 博士等提供了 RAPD 分析软件,使得本实验的数据分析工作能够顺利地进行,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 林奇英,谢联辉,周仲驹,等. 水稻条纹叶枯病的研究[J]. 福建农学院学报,1990,19(4):421-425.
- [2] Gingery R E. The Rice Stripe Virus Group[A]. The plant viruses [M]. New York:Plenum Press, 1988. Vol 4:297-329.
- [3] Williams J F K, Kubelic A R, livak K G, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucl Acid Res*, 1990,18:6531-6535.
- [4] Black W C, Duteau N M, Puterka F J, et al. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction(RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids [J]. *Bull Entomol Res*, 1992, 82:151-159.
- [5] 杨效文,张孝毅,陈晓峰,等. 我国烟蚜种群分化的 RAPD 分析[J]. 昆虫学报, 1999, 42(4):372-380.
- [6] Baruffi L, Damiani G, Guglielmino C R, et al. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*; Comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data[J]. *Heredity*, 1995, 74:425-437.
- [7] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease[J]. *PNAS*, 1979, 76:5269-5273.
- [8] 邓可京,杨瑛云,胡成业. 灰飞虱共生菌 *Wolbachia* 引起的细胞质不亲和性[J]. 复旦学报(自然科学版), 1997, 36(5):500-506.

(下转第543页)

- [17] O'Neill S L, Karr T L. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans* [J]. *Nature*, 1990, **348**(8):178-180
- [18] Kostas B, Andromaki N, George M, et al. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species [J]. *Genetics*, 1996, **144**(12):1063-1073
- [19] Boyle L, O'Neill S L, Robertson H M, et al. Interspecific and intraspecific for horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila* [J]. *Science*, 1993, **260**(5115):1796-1799.
- [20] Braig H R, Guzman H, Tesh R B, et al. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart [J]. *Nature*, 1994, **367**(3):453-455.
- [21] Langworthy N G, Renz A, Mackenstedt U, et al. Macrofilaricidal activity of tetracycline against the filarial nematode *Onchocerca ochengi*: Elimination of *Wolbachia* precedes worm death and suggests a dependent relationship [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2000, **267**(1448): 1063-1069.

The Distribution of *Wolbachia* in the Infected *Laodelphax striatellus*

LIAO Shan, KANG Lin, CHEN Xiao-ai, YE Xin, LI Chang-ben

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences,
Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The small brown planthoppers (*L. striatellus*) contain *Wolbachia* that infects insect hosts and causes cytoplasmic incompatibility (CI) between normal and infected hosts, leading to reproductive advantages for those carrying the *Wolbachia*. By PCR and Western blot, *Wolbachia* was found not only in the gonads of infected planthopper, but also in somatic tissues, such as head, thorax and abdomen etc. The wide distribution of *Wolbachia* in the planthopper suggests that it may become an ideal medium to introduce and express foreign genes, and to spread the genes in planthopper populations.

Keywords: small brown planthopper (*L. striatellus*); *Wolbachia*; tissue distribution

~~~~~  
(上接第 538 页)

## The RAPD Analysis of *Laodelphax striatellus* Populations

WAN You-zhong, QU Zhi-cai, CAO Qing-yu, SHEN Da-leng

(Institute of Genetics, School of Life Sciences, Ministry of Education Key Laboratory for  
Biodiversity and Ecological Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to measure DNA polymorphisms among nine populations of *Laodelphax striatellus*. A neighbor-joining tree was generated from RAPD bands. The tree was divided into two clusters. One contained most populations from China, i. e. Beijing, Fujian, Hainan, Liaoning, Sichuan, Shanghai, Yunnan; the other those from Ningxia and Tokyo in Japan. This study revealed that the genetic distance between different populations was unrelated to the geographic distance between them.

**Keywords:** planthopper (*Laodelphax striatellus*); RAPD analysis; polymorphism