

分类号: \_\_\_\_\_

单位代码: 10335

密 级: \_\_\_\_\_

学 号: 20916129

浙江大学

硕士学位论文



褐飞虱酯酶基因在对环境适应中的差异表达研究  
**Differential expressions of esterase genes in environmental  
adaptation of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål**

申请人姓名: 郭 燕  
指导教师: 姚洪渭 副教授  
叶恭银 教授  
专业名称: 农业昆虫与害虫防治  
研究方向: 昆虫生理生化与分子生物学  
所在学院: 农业与生物技术学院

论文提交日期: 二零一二年五月

浙江大学硕士学位论文



褐飞虱酯酶基因在对环境适应中的差异表达研究



论文作者签名:

指导教师签名:

论文评阅人 1:

评阅人 2:

评阅人 3:

答辩委员会主席:

委员 1:

委员 2:

委员 3:

委员 4:

答辩日期: 二零一二年六月二日

## 浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得浙江大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

签字日期： 年 月 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解浙江大学有权保留并向国家有关部门或机构送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

本研究承蒙

国家重点基础研究发展  
“973”计划课题  
(编号：2010CB126206)

资助

## 致 谢

人生匆匆如白驹过隙，现落笔于此意味着这段短暂研究生求学之路的即将画上句号。回首往事，历历在目。两年虽然短暂，却是我人生中宝贵的财富。老师、同学、朋友及家人的无私奉献和帮助对我帮助很大，心中充满了无限感激之情。借此机会，将我最诚挚的谢意写于此，对曾经指导、帮助和陪伴过我的人表示诚挚的感谢和由衷的敬意！

首先，衷心的感谢我的导师姚洪渭副教授和叶恭银教授。本论文从论文的选题设计到工作开展，从组织撰写到修改定稿，各环节都是在导师严格要求和精心指导下完成的，凝聚着导师的心血和汗水。导师渊实求是的学风、博精深的学识、尖锐敏捷的思路、诲人不倦的风范、勤奋忘我的品质、兢兢业业的精神，无时无刻不在激励着我。至此论文完成之际，真诚地感谢恩师授予我丰富的科学知识，锻炼我各方面的能力，感谢恩师对我的教诲和栽培！无论是在学习、科研还是在生活方面，姚老师都给予了我无微不至的关心与帮助。同时也要感谢师母在平时生活及思想上给予我很大帮助！

同时，感谢本课题组胡萃教授和黄佳副教授在实验中对我的指导帮助以及在生活中对我的关心。感谢中国水稻研究所的傅强研究员提供褐飞虱广西昭平种群、本所蒋明星教授提供褐飞虱泰国种群、祝增荣教授提供褐飞虱酯酶相关的EST序列信息和唐启义研究员提供数据统计分析方面的指导。感谢本所程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、莫建初教授、张传溪教授、娄永根教授、施祖华教授和沈志成教授等昆虫所老师们的授业解惑和关心指导！您们的支持与指导为我顺利完成学业奠定了坚实的基础。

感谢课题组博士后方琦、陈洋、慎小晶对我的帮助与指导，以及课题组博士生王磊、常雪、吴顺凡、钱岑、卢增斌等，硕士生王飞、王伟、孙方达、姚尧、朱宇、严智超、蒋鹏凌、程璐、齐易香等为本论文的完成提供了不少帮助和支持。

感谢我朴实勤劳、默默奉献的父母，感谢一直支持我的哥哥妹妹，千言万语都无法表达我对你们的谢意，是你们始终如一的关心、鼓励、支持和理解才使得我能安心于学业，你们对我的期望与肯定是我勇往直前的动力。

郭 燕

2011 年 12 月

## 前言

水稻是我国也是全球最主要的粮食作物之一，世界水稻耕种面积占世界全部可用耕地面积的9%，但养活了全世界一半以上人口。我国是一个水稻种植大国，2010年全国水稻种植面积约占粮食作物面积的30%。但是近几年我国水稻的可持续生产受到严重威胁：一方面，人口的不断增长，人类活动范围的逐渐扩大尤其是最近几年房地产的迅速发展，土地资源严重紧缺，耕地面积不断减少；一方面，气候环境的改变，极端气候的频繁出现，水稻害虫爆发率显著提高。在我国水稻发生危害较重的同翅目害虫主要是稻飞虱，包括褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱。其中以褐飞虱对我国水稻生产造成严重威胁。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 属于同翅目，飞虱科，具有远距离迁飞、突发、暴发、毁灭性等特点，且易形成“虱烧”，严重威胁水稻生产的可持续发展，是亚洲地区水稻主要害虫之一。近年来褐飞虱发生为害面积愈来愈大、暴发频繁高，防控压力剧增。褐飞虱在中国主要发生在淮河流域以南的稻区，据统计每年稻飞虱的发生面积约0.25亿  $\text{hm}^2$ ，而实际的防控面积约0.67亿  $\text{hm}^2$ ，投入的杀虫剂超过10万t，成本50多亿元，但是水稻的损失仍在25亿以上（廖世纯等，2011）。

褐飞虱各个龄期的虫态都能直接吸食水稻汁液，消耗稻株养分造成的水稻叶片发黄，生长矮小，形成“黄塘”，造成谷物产量大幅度降低。有调查表明，水稻在灌浆前受害减产约79.7%，乳熟期受害减产平均约57.5%，乳熟末期受害减产仍达到28.7%（Sogawa *et al.*, 1982; Watanabe *et al.*, 2000）。受害叶片的水分含量，叶绿素、可溶性蛋白含量及蛋白酶活性均有所降低，但是植株内精氨酸、天门冬酰胺、赖氨酸、脯氨酸及色氨酸含量增加30倍（Hayashi *et al.*, 1990）。褐飞虱除了直接危害水稻外，其造成大量的伤口极易传播或诱发水稻病害的发生且褐飞虱还是某些病毒病的传播体。有研究表明，褐飞虱大面积爆发成灾造成严重危害与其对环境具有较强的适应性有关，包括对农业环境因子如温度、水稻品种和化学农用品适应以及褐飞虱体内化学物质改变等。2005年我国长江流域稻区褐飞虱暴发成灾，其主要原因是：一定的迁入虫量，异常高的种群增长倍数。然而引起褐飞虱高种群增长倍数的因子是单季稻种植面积的扩大，异常的气候条件以及杀虫剂等化学用品滥用（程家安等，2006）。由于其他防止方法的滞后性以及我国所面临的人口压力，化学防治将在很长一段时间内是褐飞虱防治的主要途径（王彦华等，2005）。

酯酶是一种水解酶，是生物体内三大代谢解毒酶系之一，在昆虫体内广泛地分布。酯酶的功能主要是解毒，即分解外源有毒有害物质；或通过与有毒物质相结合，使这些有毒物质无法到达作用

标靶（唐振华，1982）。酯酶同工酶是能水解酯键的一组酶，在生物体内广泛存在。研究中常应用酯酶同工酶谱作为昆虫分子分类学依据（李绍文等，1987）。在昆虫中，最重要的酯酶有乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶等，这些酯酶或催化杀虫剂酯键断裂，广泛参与杀虫剂的代谢；或发生突变而对药剂敏感性降低（郭晓霞等，2000）。目前关于酯酶在昆虫的环境适应过程中发生变化的报道有很多。有学者通过 FAO 推荐的点滴法测定小菜蛾对马拉硫磷和西维因的抗性，并对抗药性以及敏感性的小菜蛾幼虫乙酰胆碱酯酶的性质、活性、动力学以及抑制作用进行了研究，发现抗性小菜蛾酯酶活性、 $V_{max}$  和  $K_m$  等明显高于敏感品系（唐振华等，1992）。另有研究表明，抗性和敏感小菜蛾谷胱甘肽 S-转移酶（GST）在各发育阶段变化不大，但是抗性品系 GST 活性明显高于敏感品系，因此认为 GST 活性增高是小菜蛾对有机磷类杀虫剂抗性的重要机制（吴刚等，2000）。李飞等（2003）研究发现，用浸叶法测定的抗性棉蚜其体内乙酰胆碱酯酶及羧酸酯酶活性均高于敏感棉蚜。在一定程度上，杀虫剂的使用对昆虫体内酯酶活性具有诱导作用，但是作用效果不仅与昆虫种类有关，也与诱导物有关。有研究人员用阿特拉津和敌敌畏对棉铃虫 *Heliothis armigera* 和家蝇 *Musca domestica* 进行处理，发现棉铃虫幼虫羧酸酯酶以及 GST 活性有明显的诱导作用，两种酶活性分别最高增加 1.46 倍和 2.80 倍，而两种农药对家蝇酯酶活性的诱导则不明显（高希武等，1993）。

目前酯酶对褐飞虱相关抗药性的研究也很多。羧酸酯酶抑制剂对马拉硫磷的增效作用随着褐飞虱对马拉硫磷抗性水平的提高而增加，且随着褐飞虱对马拉硫磷抗性水平的提高，具有高羧酸酯酶活性的褐飞虱频率也随之增加（邓业成等，1995）。刘泽文等（2002）还发现，褐飞虱对甲胺磷的抗性呈“快-慢-快”的发展趋势，羧酸酯酶在褐飞虱抗药性上升中可能起到十分重要的作用，而乙酰胆碱酯酶不敏感性在抗性发展的后期阶段可能起到很重要作用。在褐飞虱对马拉硫磷的抗性实验中发现，羧酸酯酶活性的上升在抗性发展的早期阶段起重要作用，而乙酰胆碱酯酶不敏感在抗性发展的后期阶段起更重要作用（刘泽文等，2003）。尽管目前关于褐飞虱抗药性酯酶研究相对较多，但是在褐飞虱对环境的应激反应和适应过程中酯酶是否发生作用以及如何变化还未见研究报道。

因此，本研究的主要是通过比较分析浙江富阳、广西昭平和泰国彭世洛(Phitsanulok)地理种群褐飞虱在对温度、水稻品种和氮肥等适应过程中酯酶基因表达水平差异，探讨酯酶基因在褐飞虱环境应激过程中的作用和机制，希望从中筛选、获得可能与农业环境因子相互作用从而影响褐飞虱灾变机率的特征性酯酶基因，为评价稻田生态系统对褐飞虱灾变的调控功能提供基础与分子指标。

## 中文摘要

本文在筛选获得褐飞虱不同酯酶基因 EST 序列基础上,采用实时定量 PCR 方法分析褐飞虱不同种群体内不同酯酶基因对水稻品种、N 肥和温度等因子变化中表达水平的差异变化,以探讨酯酶基因在褐飞虱环境适应中可能的作用和机制。结果如下:

### 1. 褐飞虱酯酶基因相关的 EST 片段序列分析

对褐飞虱 cDNA 序列测定和同源性分析,获得与昆虫酯酶基因高度同源的 EST 序列 24 条,片段长度在 146-1324bp 之间,其中 6 条 EST 序列编码的多肽片段中含有羧酸酯酶的 motif 基序。根据同源性比对结果,这些褐飞虱 EST 序列分属于羧酸酯酶、保幼激素酯酶、Gliotactin 和 Neuroligin 等 4 个亚家族。

### 2. 水稻品种对褐飞虱酯酶基因表达的影响

以褐飞虱肌动蛋白基因 (*actin3*) 为参照基因,采用定量 PCR 方法测定比较中国浙江、广西和泰国彭世洛地区的褐飞虱种群成虫在不同水稻品种(感虫品种 TN1、热带虫源地稻区当家品种 IR64、迁入地稻区当家品种秀水 11) 寄主更换适应过程中,体内不同酯酶基因表达水平的变化。结果表明,褐飞虱不同种群在不同水稻品种上取食不同时间,对飞虱体内不同酯酶基因表达水平存在极显著影响,而且褐飞虱种群、水稻品种和取食时间之间存在极显著的交互作用。

### 3. N 素水平对褐飞虱酯酶基因表达的影响

以褐飞虱肌动蛋白基因 (*actin3*) 为参照基因,采用定量 PCR 方法测定比较中国浙江、广西和泰国彭世洛地区的褐飞虱种群成虫在经不同 N 浓度处理的稻苗(高 N、低 N 处理和对照稻株中含 N 量分别为 2.50%、1.81%和 0.97%) 上取食后不同酯酶基因表达水平的变化。结果表明,褐飞虱不同种群在不同 N 浓度处理的稻苗上取食不同时间,对飞虱体内不同酯酶基因表达水平存在极显著的影响,而且褐飞虱种群、水稻 N 素水平和取食时间之间存在极显著的交互作用。

### 4. 温度对不同地区褐飞虱酯酶基因表达的影响

以褐飞虱肌动蛋白基因 (*actin3*) 为参照基因,采用定量 PCR 方法测定比较中国浙江、广西和

泰国彭世洛地区的褐飞虱种群成虫在不同温度（21℃、25℃和 29℃）条件下不同酯酶基因表达水平的变化。结果表明，褐飞虱不同种群在不同温度条件下取食不同时间，对飞虱体内不同酯酶基因表达水平存在极显著的影响，而且褐飞虱种群、温度和取食时间之间存在极显著的交互作用。

**关键词：**褐飞虱；酯酶；EST 序列；表达谱；水稻品种；台中在来 1 号；IR64；秀水 11；两优 363；氮肥；温度；实时定量 PCR；环境适应性

## Abstract

To explore the possible function and mechanisms of esterase genes in the environmental adaption of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, differential expressions of esterase EST sequences from different populations of *N. lugens* treated by rice varieties, nitrogen concentrations and temperatures, respectively, are analyzed using real-time PCR in this thesis.

### 1. EST sequence analysis of esterase genes in *N. lugens*

24 of EST sequences, highly homologous to insect esterase genes, were found with length between 146bp and 1324bp in *N. lugens* after a homology search for cDNA sequences. There are 6 of EST sequences encoding a polypeptide fragment containing the motif of carboxylesterase. Based on the result of homology analysis, these EST sequences belong to four subfamilies of esterase, i.e. carboxylesterases, juvenile hormone esterases, gliotactins and neuroligin.

### 2. Effect of rice variety on expression of esterase genes in *N. lugens*

Changes in expression level of esterase genes in adults of *N. lugens* populations collected from Zhejiang and Guangxi, China and Phitsanulok, Thailand were analyzed by the real-time PCR method using actin3 as the reference gene, after feeding on different rice varieties including TN1 (a insect-susceptible variety), IR64 (a local variety planting widely in tropical areas), and Xiushui 11 (a local variety planting widely in China). The results show that the expression level of esterase genes is affected highly significantly with *N. lugens* populations, rice varieties and feeding time. A highly significant interaction on esterase gene expression between *N. lugens* population, rice variety and feeding time were found.

### 3. Effect of nitrogen on expression of esterase genes in *N. lugens*

Changes in expression level of esterase genes in adults of *N. lugens* populations collected from Zhejiang and Guangxi, China and Phitsanulok, Thailand were analyzed by the real-time PCR method using actin3 as the reference gene, after feeding on the rice seedling treated with different nitrogen concentrations. The results show that the expression level of esterase genes is affected highly significantly with *N. lugens*

populations, nitrogen content and feeding time. A highly significant interaction on esterase gene expression between *N. lugens* population, nitrogen content and feeding time were found.

#### **4. Effect of temperature on expression of esterase genes in *N. lugens***

Changes in expression level of esterase genes in adults of *N. lugens* populations collected from Zhejiang and Guangxi, China and Phitsanulok, Thailand were analyzed by the real-time PCR method using actin3 as the reference gene, under different temperatures of 21°C, 25°C and 29°C, respectively. The results show that the expression level of esterase genes is affected highly significantly with *N. lugens* populations, temperatures and feeding time. A highly significant interaction on esterase gene expression between *N. lugens* population, temperatures and feeding time were found.

**Key words:** *Nilaparvata lugens*; esterase gene; EST sequence; expression profiling; rice variety; TN1; IR64; Xiushui 11; Liangyou 363; nitrogen fertilizer; temperature; real-time PCR; environmental adaption

# 目录

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| 致谢.....                       | i    |
| 前言.....                       | ii   |
| 中文摘要.....                     | iv   |
| Abstract.....                 | vi   |
| 目录.....                       | viii |
| 第一章文献综述.....                  | 1    |
| 1.1 水稻对褐飞虱的影响.....            | 1    |
| 1.1.1 褐飞虱对水稻的危害.....          | 1    |
| 1.1.2 植物对褐飞虱的防御机制.....        | 3    |
| 1.2 氮肥对昆虫影响的研究进展.....         | 4    |
| 1.2.1 氮对昆虫种群的影响.....          | 4    |
| 1.2.2 氮对稻飞虱的影响.....           | 5    |
| 1.3 温度对褐飞虱影响的研究进展.....        | 6    |
| 1.4 昆虫酯酶的研究进展.....            | 6    |
| 1.4.1 昆虫酯酶的特点和分类.....         | 6    |
| 1.4.2 酯酶同工酶在昆虫中的重要作用.....     | 7    |
| 第二章褐飞虱酯酶基因相关的 EST 片段序列分析..... | 9    |
| 2.1 材料与方法.....                | 9    |
| 2.1.1 褐飞虱 cDNA 文库构建.....      | 9    |
| 2.1.2 褐飞虱 EST 序列测定.....       | 9    |
| 2.1.3 褐飞虱酯酶相关 EST 序列分析.....   | 9    |
| 2.2 结果与分析.....                | 10   |
| 2.3 讨论.....                   | 10   |
| 第三章水稻品种对褐飞虱酯酶基因表达的影响.....     | 12   |
| 3.1 材料与方法.....                | 12   |
| 3.1.1 供试昆虫.....               | 12   |
| 3.1.2 供试水稻.....               | 12   |
| 3.1.3 试验处理.....               | 12   |
| 3.1.4 实时定量 PCR 检测.....        | 13   |
| 3.1.5 定量计算方法与数据统计分析.....      | 13   |
| 3.2 结果与分析.....                | 15   |
| 3.3 讨论.....                   | 16   |
| 第四章 N 素水平对褐飞虱酯酶基因表达的影响.....   | 27   |
| 4.1 材料与方法.....                | 27   |
| 4.1.1 供试材料.....               | 27   |
| 4.1.2 试验处理.....               | 27   |
| 4.1.3 实时定量 PCR 检测.....        | 28   |
| 4.1.4 水稻植株含 N 量测定.....        | 28   |
| 4.1.5 数据统计分析.....             | 28   |

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 4.2 结果与分析 .....               | 28 |
| 4.2.1 供试稻株含 N 量分析 .....       | 28 |
| 4.2.2 褐飞虱酯酶基因表达水平分析 .....     | 28 |
| 4.3 讨论 .....                  | 29 |
| 第五章温度对褐飞虱酯酶基因表达的影响 .....      | 41 |
| 5.1 材料与方法 .....               | 41 |
| 5.1.1 供试材料 .....              | 41 |
| 5.1.2 试验处理 .....              | 41 |
| 5.1.3 实时定量 PCR 检测 .....       | 41 |
| 5.1.4 数据统计分析 .....            | 42 |
| 5.2 结果与分析 .....               | 42 |
| 5.3 讨论 .....                  | 42 |
| 第六章小结 .....                   | 53 |
| 6.1 不同环境因子对褐飞虱酯酶基因表达的影响 ..... | 53 |
| 6.2 本研究的特点与创新点 .....          | 53 |
| 6.3 今后有待研究的问题 .....           | 54 |
| 主要参考文献 .....                  | 55 |

# 第一章文献综述

## 1.1 水稻对褐飞虱的影响

### 1.1.1 褐飞虱对水稻的危害

水稻在我国农业生产中占有举足轻重的地位，是中国第一大粮食作物，也是世界上最重要的粮食作物之一。虽然世界水稻耕种面积仅为可耕用面积的 10%，但它提供能量接近全世界消费能量的 25%，养活了 50%的世界人口。亚洲国家以稻米为主食的人超过 20 亿 (Maclean *et al.*, 2002)，在一些国家水稻提供的食物能量可以达到 60%(Hittalmani *et al.*, 2003)。据调查，2000 年我国水稻种植面积达到 3000 万公顷，约占全国粮食种植总面积的 27%；总产量已达 20000 万吨，约占全世界总产量的 40%，是世界上最大的稻米生产国与消费国之一。

褐飞虱是东南亚水稻生产国主要的害虫之一，在我国由南至北都有不同程度褐飞虱危害，温度较高的南方爆发严重。1960 年代以前，褐飞虱仅在我国南方温度较高的水稻种植区时有发生。90 年代后，褐飞虱为害地域由南向北扩展，为害程度也逐渐加重。在褐飞虱危害较轻的年份面积大约在 6000 万亩左右，在危害较重年份危害面积达到水稻总栽种面积的 50% (杨之帆, 2005)。有调查研究表明，我国 2005 年仅华东 4 个省市的粮食损失就接近 25 亿 kg，可见近几年褐飞虱给我国水稻生产造成了严重损失。

褐飞虱长翅型成虫具有迁飞性，能在一定气候条件下远距离迁徙。褐飞虱最主要的寄主是水稻，也可以寄生在大田中的稗草和一些野生稻，一般情况褐飞虱在其寄主植物上重复完成世代。20 世纪 60 年代中期以后，由于耕种模式的改变复种指数提高以及水稻新品种的大面积推广，矮秆、早熟、宽叶品种兴起等导致褐飞虱爆发率大幅度提高，使其成为水稻最主要的害虫之一。据调查 2005-2007 年褐飞虱年平均发生危害面积达 2670 余万公顷(夏敬源, 2008)。且 2008 年在福建、广西和广东发现了褐飞虱传播齿叶矮缩病以及草状矮化病等，这使得我国每年杀虫剂原药用量平均增加 3 万吨左右，但仍损失稻谷数百万吨；另一方面也加剧了环境污染，增加了农产品质量安全风险(娄永根, 程家安, 2011)。褐飞虱每年给我国水稻造成严重灾害，已成为我国粮食和生态安全最严重的生物灾害之一 (Khush, 1979; Sogawa *et al.*, 2003)。

褐飞虱对水稻的危害通常分为直接危害和间接危害两方面。褐飞虱直接吸食水稻汁液，会消耗稻株养分，造成水稻生长不正常(Sogawa, 1982; Watanabe and Kitagawa, 2000)。并且褐飞虱各个龄期

的虫态都能吸汁危害水稻，危害时期主要从水稻的圆秆拔节期至乳熟期，常以成虫和若虫群集在稻株下部危害为主。水稻在拔节期、孕穗期、抽穗期受害，叶片易发黄、生长矮小，形成“黄塘”；有的甚至不能抽穗或结实率低(国际褐飞虱论文集, 1980)。乳熟期受害严重时常引起稻叶发黄，稻株底部变黑边软，瘫痪倒伏，呈点、片枯黄，秕粒增加，甚至造成稻田成片枯萎。这种现象常被称为“飞虱火烧”，俗称“冒穿”、“透天”、“穿顶”(Park *et al.*, 2007)。有调查显示，灌浆前受害水稻减产约 79.7%，乳熟期受害水稻减产平均约 57.5%，乳熟末期受害水稻减产仍达到 28.7%(国际褐飞虱论文集, 1980)。另一方面，稻株受害会导致植物组织中的化学成分产生改变。研究表明，受害叶片不仅水分的含量降低而且叶绿素、可溶性蛋白含量及蛋白酶活性均降低，而且植株内精氨酸、天门冬酰胺、赖氨酸、脯氨酸及色氨酸量增加约 30 倍 (Hayashi and Chino, 1990)。褐飞虱危害水稻亦产生间接危害。雌虫产卵时用尖锐的产卵器刺破叶鞘与茎秆组织，使植株韧皮部汁液大量流失、输导组织传导功能减退，光合产物向根部的运输受阻，茎秆机械强度减弱，叶片衰老加速。另一方面，褐飞虱为害造成大量的伤口易传播或诱发水稻病害的发生且褐飞虱还能传播某些病毒病，如草丛矮缩病、齿叶矮缩病和水稻病毒病等(Heinrichs, 1979)。有研究表明，褐飞虱为害的伤口亦会导致水稻感染菌核病，其排泄物是霉菌滋生的好环境，进而影响水稻呼吸和光合作用。

20 世纪 60 年代以后，褐飞虱危害的持续上升不仅与其对现代农业生产系统的高度适应性，而且与其生物学特性的强可塑性密切相关。褐飞虱危害能力超强的原因有其自身的一些特点。生长周期很短，成虫寿命长，繁育能力强，产卵期长且量大。个体对密度过高的忍耐力强，发育周期产生短翅型的能力强，长翅飞虱迁移率高，这些都为褐飞虱大规模爆发成灾奠定了生物学基础。褐飞虱具有高度变异的致害能力。褐飞虱暴发成灾以后，研究者相继培育了一系列抗性水稻品种，含有 *Bph1* 抗性基因的抗性品种 IR26、含有 *Bph2* 抗性基因 IR36 水稻品种以及含有 *Bph3* 抗性基因的 IR56 新抗稻飞虱品种，但是褐飞虱在很短的时间内就适应了这些抗性品种 (娄永根和程家安, 2011)。此外，褐飞虱对农药还有高度的适应性。20 世纪 80 年代以来,国家大力推广使用杀虫剂防治褐飞虱，在一定程度上缓解了虫害，但同时杀死了稻田中褐飞虱的天敌。同一种农药的长期大面积的使用容易诱发了害虫对农药的高抗性。2005 年褐飞虱在越南、日本、韩国和中国等暴发成灾(程家安等, 2008)，导致水稻损失惨重。另一方面当前我国的种植模式的改变，矮秆、早熟等抗虫性差水稻品种大面积种植，复种指数提升，营造了宜于褐飞虱种群发展的生态环境，为褐飞虱在短时间内爆发创造了有利条件。

### 1.1.2 植物对褐飞虱的防御机制

19 世纪初, 人们就发现没有一种植物是能同时被所有的昆虫危害的, 表明了任何植物对于昆虫的侵害总有某种防疫机制是昆虫所不能突破的, 特别是协同进化提出后, 植物与昆虫相互关系的研究成为热点。

植物在生长过程中, 必须在各个水平都存在成熟的防卫机制以抵御各种病原菌等异养生物的危害。植物在受虫害或病原菌侵害时, 其代谢水平会发生变化而这主要是由转录水平的变化引起的, 主要包括编码初级和次级代谢基因的变化。这表明植物抵抗病原菌的侵害能在小范围内是高度有效。当前, 主要是通过分析抗性不同的植物受虫害后差异基因的表达情况对植物转录组进行分析进而分析植物的抗性。以植物与病原菌关系为模型, 植物一旦受到病原菌的侵害, 监督系统与入侵的病原菌的各种蛋白质、脂类、肽类及寡糖类相结, ROS(Reactive oxygen species)反应则被激活(Lam *et al.*, 2001)。接着被感染处的细胞迅速死亡并产生抗微生物的物质以阻止病原菌的扩散。但一旦植物大面积的感染, 研究表明这只能有效地抵御静态的吸食植物特定组织的某些害虫(王小兰, 2003)。目前基于植物和昆虫相互作用分子机理的研究, 尤其是对植物抗虫信号的研究, 将植物对昆虫的反应分为直接防御反应, 间接防御反应及植物对害虫的耐受性。

植物除了在进化过程中产生如荆棘、硅石、香毛簇等增加对昆虫的抗性, 还通过产生化学物质用于直接防御包括毒物、驱虫剂、消化抑制剂等。这些植物次生代谢产物通常包括芥子油苷、酚类代谢物、类黄酮和含氮代谢物生物碱等。根据次级代谢物作用方式可将其分为: 蛋白酶抑制剂, 由昆虫取食、虫害诱导产生, 抑制昆虫消化系统蛋白酶作用(Koiwal *et al.*, 1997; Tamayo *et al.*, 2000); 多酚氧化酶(一种抗营养酶类)催化酚类次级代谢物发生氧化反应形成聚合醌或通过蛋白交联降低受伤植物营养物的效价, 迫使昆虫投入大量能源到解毒机制上而影响其生长发育(walling, 2000)。另外, 植物在受到外界害虫的攻击时释放一些化学物质, 吸引害虫的天敌以及寄生虫, 通过它们对害虫的捕食或寄生作用, 从而达到对害虫群体的防控(Karban *et al.*, 1997; Dicke *et al.*, 2000)。有研究表明, 在自然状况下这些有机挥发物具有高度专一的防御作用(Klessner and Baldwin, 2001), 如寄生蜂常在特定的宿主上栖息以及特定的宿主幼虫中产卵(Turlings *et al.*, 1998)。植物释放的化学物同时也有抑制害虫的繁殖能力的作用(De Moraes *et al.*, 2001)。植物的耐受性表现为, 植物在受到害虫侵害后与未受到侵害植物相比较, 基本上组织不受损或植物本身的适应自然能力不受影响(Stowe *et al.*, 2000)。目前对于耐受性发生在转录水平上的变化还比较少, 主要是对植物基本生理作用进行研究, 包括营养的吸收以及合成都发生变化, 同时对植物多态性性状也有影响, 如植物分生组织的反应及植物茎及地下部分的光同化作用(Stowe *et al.*, 2000)。植物在长期的进化过程中形成的这些特性以及防御方法

都能够直接影响昆虫取食、生长、产卵和发育等，以增强其适应环境的能力。

## 1.2 氮肥对昆虫影响的研究进展

### 1.2.1 氮对昆虫种群的影响

氮是地球上所有有机体的基本元素，当然也是昆虫生长发育最主要的营养物质，昆虫获得必要的氮营养主要通过粮食作物。人类活动改变了氮循环，氮沉积的速率加快，氮沉积的总量增加 (Vitousek *et al.*, 1997)。在实际水稻种植过程中，人们为了追求高产追加氮肥的使用量，据调查氮肥实际使用量目前普遍大大超过需要量 (Dobermann and Fairhurst, 2000)。1995 到 1999 年，中国总耕地面积 21% 的水稻消耗了总的 37% 的氮肥量，高达  $180\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。这大大高出了世界平均水平  $103\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$  (Statistical Databases, 2001)。大量使用氮肥致使昆虫的数量和生物量增加，导致昆虫群落简单化，改变了群落优势种 (Haddad *et al.*, 2000; Siemann, 1998; Vitousek *et al.*, 1997)。含氮量高低的农作物对昆虫适应不同生态条件影响较大。研究表明，含氮量高的水稻对水稻害虫的存活、生长和繁殖都有明显的促进作用 (Lu *et al.*, 2004)。在高含氮植株上的褐飞虱若虫存活率、成虫生殖力和卵孵化率均明显高于低氮稻株上的褐飞虱，这表明稻株较高的含氮量有助于提高褐飞虱对高温的耐性 (郑许松, 陈桂华等 2009)。

氮肥是增加农作物产量的最主要肥料，施用氮肥可能会影响植物化学物质的变化，从而影响昆虫体内化学物质改变引起昆虫对不同生态环境适应性改变 (Bentz *et al.*, 1995)。近几年由于氮肥大面积的施用，植物的形态学和生物化学特性都有所改变，植食性昆虫对含氮量高的寄主搜索和取食能力显著提高。2006 年，我国褐飞虱的发生面积约 1667 万  $\text{hm}^2$  (农业部全国农业技术推广服务中心内部资料)。氮肥的过量使用，已经被认为是导致褐飞虱种群密度大幅度提高的主要原因之一 (Li *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2006)。

含氮量高的植物除了对褐飞虱有影响，同样对其他昆虫产生影响。研究表明氮肥的施用量提高能明显提高玉米叶片上亚洲玉米螟的产卵量 (Xu *et al.*, 1994)，从而使玉米螟大面积爆发，适应性增强。Bentz 等 (1996) 发现随着氮肥施用量增加农作物叶片蛋白氮含量增加呈线性关系，幼嫩叶片由于含氮量相对较高使得更多成虫产卵，导致叶片产卵量随叶片含氮量直线增加。De Kraker 等 (2000) 认为氮肥过量使用后，致使稻田害虫与天敌关系发生改变，其原因可能有：(1) 取食高氮水稻的害虫增长速率高于天敌、寄生蜂和捕食性天敌增长的速率；(2) 高氮处理田的稻株密度增加从而增加天敌搜索猎物的难度 (吕仲贤, 2003)；(3) 取食高氮处理的水稻害虫后发育历期缩短从而减少被天敌

捕食的几率。

虽然大多数昆虫受到植物中含氮量的限制表现出与植物含氮量呈正相关，但是也有昆虫不符合氮限制假说(Saggar *et al.*, 1993)。Fischer 和 Fiedler (2000) 研究发现灰蝶在低氮肥植物上产卵量大。棉花对棉蚜的抗性 (Cisneros and Godfrey, 2001) 及马铃薯对鞘翅目和鳞翅目昆虫的抗性 (Barbour *et al.*, 1991) 随植物含氮量降低而下降了。此外，Fox 和 Eisenbach (1992) 也发现小菜蛾雌成虫不区分植物含氮量高低。还有研究表明，氮肥施用量对叶蝉产卵量没有显著影响，但在含氮量低得植物上栖息的成虫量明显增加 (Rossi *et al.*, 1996)。

目前关于寄主植物含氮量与昆虫的研究很多，但是昆虫的表现也可能由其无法测定的因子所控制 (Fischer and Fiedler, 2000)，具体因子尚未明确。农作物体内含氮量的变化常伴随着其它营养物质的变化 (Mattson, 1980)，昆虫种群动态的变化可能是氮与昆虫体内其它化学物质包括酯酶综合作用的结果。

### 1.2.2 氮对稻飞虱的影响

在亚洲稻区稻中飞虱是生态系统中最常见的害虫，其中褐飞虱是最主要的经济害虫之一。水稻是褐飞虱的主要寄主，水稻的含氮量直接影响着褐飞虱种群的变化。由于褐飞虱整个生活周期需要大量的氨基酸，这些都要从水稻汁液中获得。

褐飞虱吸取很多的汁液以满足其正常的生活需要 (Cheng, 1971; Sogawa, 1982)，导致了较低的食物转化效率 (吕仲贤等, 1997)。大量施用氮肥增加了水稻汁液中氨基酸的含量，这大幅度地改善了褐飞虱的营养条件，增加了它们的种群数量 (Balasubramanian *et al.*, 1983)。

水稻含氮量增加，其含水量以及相对含水量明显增高，但是叶鞘伤流液反而减少，这使得高氮肥条件下稻株对褐飞虱为害的敏感性增加，最终降低水稻含氮量对褐飞虱为害的忍耐性。此外，水稻含氮量对褐飞虱产卵、取食也产生影响。褐飞虱自由选择试验表明，饲养在不同含氮量水稻上的雌成虫均喜欢将卵产在高氮的稻株上，并且褐飞虱种群的产卵量与稻株含氮量呈显著的正相关。饲养在含氮量高的水稻植株上褐飞虱若虫存活率高 (Cheng, 1971; Preap *et al.*, 2001a)、生殖力强、种群爆发频率高 (Preap *et al.*, 2001a)。实验研究表明，褐飞虱种群若虫存活率随水稻含氮量增加显著提高，变化范围达 60%-100% (吕仲贤, 2003)，可能是由于高氮水稻上若虫历期缩短、雌成虫生殖力增加、寿命延长和卵孵化率提高。稻株含氮量对褐飞虱子代数数量以及生物种群的影响随着连续饲养时间有一定的累积效应，研究表明在低氮稻株上逐代下降，而高氮稻株上逐代增加。另一方面，高氮肥水稻饲养褐飞虱种群会增强其抗逆性，从而为褐飞虱种群的大量繁殖提供了有利的条件。

20 世纪 60 年代以后，化肥的大量施用导致褐飞虱种群密度大幅度提高，使其从次要害虫转变为最主要的害虫之一。氮肥的大面积连续施用被认为是褐飞虱大发生的主要原因之一。氮肥在增加水稻产量的同时导致水稻对害虫的敏感性降低；害虫与天敌关系的变化，影响生物链自然控制效能，导致褐飞虱等的大暴发；同时影响水稻、褐飞虱和天敌之间关系。

### 1.3 温度对褐飞虱影响的研究进展

褐飞虱属于迁飞性害虫，因此气象因素对其迁飞、繁殖以及取食影响作用大。在所有的气象条件中温度对褐飞虱的影响特别重要，它直接影响褐飞虱的生存，繁殖，取食。温度的高低对褐飞虱各阶段的发育速度、存活率以及繁殖力都有影响，且调控作用是不同的，相关的报道国内外已有不少。实验表明，褐飞虱未发育成熟的若虫在28℃条件下发育最快；在22℃环境条件下，褐飞虱蜕皮与羽化都很正常但是发育缓慢（李汝泽，1997）。高温32℃对未成熟褐飞虱存活率影响很大，平均存活率约为36.69%；28℃条件下褐飞虱的存活率较高可以达到81.93%。而卵的存活率不论是在高温还是在低温条件下都比正常温度下偏低。温度对褐飞虱成虫产卵量的影响表现为每天产卵量与温度呈近似于抛物线趋势，28℃时平均每头雌成虫产卵总量或平均每天产卵量最高；30℃~32℃产卵量显著减少。戴华国等（1997）研究发现，高温处理4龄褐飞虱若虫羽化后的雌成虫产卵量明显减少，存活率及繁殖力显著降低。低温主要是通过延长褐飞虱发育历期来起作用的，随着温度的降低，褐飞虱的繁殖率及存活率明显下降。

褐飞虱适宜的生长发育温度范围比较狭窄。一般情况下9月份双季稻时温度不适宜褐飞虱繁殖，这是褐飞虱年度间褐飞虱发生程度变动的重要原因。总得趋势来说，低温主要是延长褐飞虱发育历期，褐飞虱的繁殖力、存活率随温度的降低呈明显的降低趋势，从而影响种群的增长。而高温主要是影响褐飞虱正常的生长发育，降低褐飞虱的繁殖力、存活率。温度对褐飞虱的影响不仅表现在生理生态上，还表现在对体内化学物质的改变。冯从经等（2001）研究发现，高温条件下，褐飞虱成虫体内保幼激素酯酶活性呈下降趋势，且短翅型雌、雄成虫体内保幼激素酯酶活性均高于长翅型雌、雄成虫。但是，当前对褐飞虱适应不同温度时哪些酯酶起作用以及如何起作用还不清楚。

### 1.4 昆虫酯酶的研究进展

#### 1.4.1 昆虫酯酶的特点和分类

酯酶是一种水解酶，广泛地分布于昆虫体内，主要存在细胞匀浆液的微粒体部分。酯酶的功能

主要是解毒，即分解外源有毒有害物质；或通过与有毒物质相结合，使这些有毒物质无法到达作用靶靶（唐振华，1992）。酯酶是一个超家族，其中主要包括羧酸酯酶、芳族酯酶、胆碱酯酶和保幼激素酯酶。这些酯酶功能各不相同，有些与昆虫的生殖有关；有些与昆虫的生长发育有关，如保幼激素酯酶。

酯酶是能水解内源和外源酯类化合物的所有酶的通称。酯酶的分级命名体系至今尚未建立，目前采用多系统命名的方式。根据国际生物化学和分子生物学协会（IUBMB）的分类体系，酯酶属于水解酶亚类 1；再根据水解的酯键类型可进一步分为亚-亚类，如羧酸酯酶催化水解羧基酯键。有学者曾根据酯酶对 3 类抑制剂（硫氢试剂、有机磷酸酯和毒扁豆碱硫酸盐）的敏感性对真核生物的酯酶进行功能分类：1)乙酰酯酶：不受这 3 类抑制剂影响，优先水解酯酸基脂肪族底物；2)芳族酯酶：只被硫氢试剂抑制，优先水解芳族底物；3)羧酸酯酶：只被有机磷抑制，优先水解脂族酯类；4)胆碱酯酶：被有机磷和毒扁豆碱硫酸盐抑制。后来有学者根据酯酶与有机磷的相互作用把酯酶分为 3 类：A-酯酶包括能水解有机磷酯酶以及活性位点带有酰基化半胱氨酸的酯酶；B-酯酶为能被有机磷逐步抑制和活性位点为丝氨酸残基的酯酶；C-酯酶为既不被有机磷抑制又不能水解有机磷的酯酶。Aldridge 的分类在毒理学上具有一定的使用价值（唐振华等，1992）。根据此分类方法，大多数昆虫酯酶应属于 B-酯酶类群。此外，Sato 等（1998）提出根据酯酶基因核苷酸序列相似性把哺乳动物羧酸酯酶分成 5 类，这为昆虫酯酶的分类命名提供了新思路（Oakeshott *et al.*, 2005）。此外，还有根据酯酶对杀虫剂的作用不同，可以将酯酶分不同的类。如酯酶对有机磷酸酯化合物的作用可分为：把有机磷酸酯化合物作为底物进行降解的 A-型酯酶，这类酯酶能抗有机磷化合物；对有机磷化合物的抑制作用的 B-型酯酶，这类酯酶是敏感的；抗有机磷化合物的但不降解的 C-型酯酶。

目前，酯酶在昆虫体内的作用研究最多的是对杀虫剂的代谢。在酶的作用下，杀虫剂转变为极性分子，再通过昆虫的正常系统排出体内，这为杀虫剂分子毒理学和新农药设计以及研究开发的一个提供参考。

## 1.4.2 酯酶同工酶在昆虫中的重要作用

昆虫对遭遇到的致死性的和半致死性的胁迫进化出了一套有效的防御机制。环境中的有毒成份包括人工杀虫剂和植物所产生的有毒化合物，这些是对植食性昆虫的生长发育和繁殖影响最大的胁迫因子。而昆虫对来自杀虫剂和植物毒素的伤害使用相同的解毒系统来解除。昆虫长期置于某种胁迫之下其后代往往会对该胁迫产生抗性，这就产生了抗药性。有学者从机理方面将昆虫的抗性分为代谢抗性以及靶标不敏感两类。代谢抗性是建立在三种基本的酶系统上：细胞色素 P450 单加氧酶、

GST 以及羧酸酯酶系统。昆虫通过这些酶产生抗药性而且对抗环境中的毒物，而三种酶系统在昆虫适应宿主植物中所起的重要作用是不同的。

在三大解毒酶系中，P450 单加氧酶是参与各类杀虫剂以及其它外源性和内源性化合物代谢的主要解毒酶系，但因其活性需辅助因子而应用颇受限制。GST 催化还原型谷胱甘肽与各种亲电化合物的亲核加成反应。但是，GST 属 II 相（次级代谢）酶，通常不直接作用于杀虫剂，而以 P450 单加氧酶的亲电性代谢产物为作用底物。酯酶属水解酶，不仅能作用于含酯键的化合物，还能水解肽、酰胺和卤化物等非酯键的化合物（Ollis *et al.*, 1992），即具有广泛的底物专一性。目前，市场上许多杀虫剂都是酯类化合物，如有机磷酸酯、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯等。

酯酶同工酶近几年发展迅速，当前研究的比较成熟的是应用聚丙烯凝胶电泳从黑腹果蝇单个组织和特定的虫期中检测到两种可溶性酯酶同工酶，其中大多数酯酶是由不同的基因编码的。目前仅发现有乙酰胆碱酯酶的 4 个同工酶是例外，它们都是一个基因 *Ace* 编码的（Arpagaus *et al.*, 1988）。

羧酸酯酶在有水存在的条件下能催化代谢大多含酯键类物质，分解有机物中的酯酶，而对非水溶性的底物作用不强。人们发现昆虫的抗性与羧酸酯酶活性的密切相关，这是因为目前多数的杀虫剂和植物有毒化合物中都含有酯键。李腾武等（1997）研究发现，桃蚜在取食宿主植物后，昆虫体内羧酸酯酶活性会升高。棉铃虫取食抗性棉花后，抗药性提高，羧酸酯酶活性变化较大（谭维嘉等，1993）。但是，与多数的昆虫中的研究结果不一致的是取食过抗性品种的褐飞虱羧酸酯酶活性反而下降，具体的反应机理目前还不清楚。

## 第二章褐飞虱酯酶基因相关的 EST 片段序列分析

目前对褐飞虱通过分子水平的调控来对抗品种抗性,适应高含氮植物以及高温研究比较透彻。关于褐飞虱抗性基因 cDNA 片段,以及基因全长的报道也比较多,这些基因包括了参与信号传导、胁迫反应、基因表达调控、解毒和代谢等。有学者用不同抗性级别的三种籼稻品种(MH63、B5 和 TNI)饲养褐飞虱,利用 cDNA-AFLP 技术克隆了取食三种水稻植株后,褐飞虱体内差异表达的基因。在银染的 PAGE 胶上共分析了 2,800 个 DNA 条带,以取食 TNI 的褐飞虱若虫为对照,发现处理组(取食 B5 和 MH63)的若虫 76 个 DNA 条带表现为上调,而只有 8 个表现为下调(杨之帆, 2005)。

关于褐飞虱环境适应的基因研究较多,但是到目前为止褐飞虱对环境应激反应的酯酶基因差异表达的研究相对欠缺。本文项目根据已发表的昆虫的解毒和毒物耐受性相关基因的保守序列以及已经报道的褐飞虱基因序列,在褐飞虱 cDNA 文库中筛选出 24 条褐飞虱酯酶基因相关表达序列标签片段(Expressed Sequence Tags, ESTs),经 GenBank 同源序列比对,分析其所属类别,为开展褐飞虱对环境因子应激反应相关的酯酶基因差异表达分析提供序列信息。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 褐飞虱 cDNA 文库构建

自浙江大学华家池校区农场稻田采集褐飞虱,在室内用稻苗(秀水 128)于  $28\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 、光照 12L:12D 条件下继代饲养。取褐飞虱不同发育阶段,包括卵、各龄若虫和雌雄成虫等,分别提取总 RNA。

#### 2.1.2 褐飞虱 EST 序列测定

参照 Xue 等(2010)采用基因池(Gene pool)方法构建褐飞虱 cDNA 文库后,应用 Illumina 测序平台测定获得转录组 EST 序列。

#### 2.1.3 褐飞虱酯酶相关 EST 序列分析

通过已报道的昆虫酯酶基因序列,在测得的褐飞虱转录组 EST 序列中检索酯酶基因相关的所有

EST 片段, 经 GenBank 数据库对比分析这些 EST 序列的类别特征。

## 2.2 结果与分析

通过褐飞虱 cDNA 序列测定和同源性分析, 获得与昆虫酯酶基因高度同源的 EST 序列 24 条, 片段长度在 146-1324bp 之间 (表 2.1), 其中 6 条 EST 片段 (Nlu-EST01~05 和 Nlu-EST17~18) 在推定的多肽序列中含有羧酸酯酶 (Carboxylesterase, CaE, E3.1.1.1) 的 motif 基序 (F-[GR]-G-x(4)-[LIVM]-x-[LIV]-x-G-x-S-[STAG]-G), 3 条 EST 序列 (Nlu-EST19~21) 与 Gliotactin、3 条 EST 序列 (Nlu-EST22~24) 与 Neuroligin 分别具有较高相似性。

根据同源性比对结果, 这些褐飞虱 EST 序列可划归于羧酸酯酶、保幼激素酯酶、Gliotactin 和 Neuroligin 等 4 个亚家族。

## 2.3 讨论

酯酶是能水解内源和外源酯类化合物的所有酶的通称。在昆虫中, 酯酶作为同工酶家族不仅参与多种药物, 环境毒物及致癌物的解毒和代谢, 是三大解毒酶系之一, 同时也参与生长发育的调节及神经递质的传递。在褐飞虱中, 酯酶同工酶存在多态性。酯酶同工酶的谱型主要用于褐飞虱种群遗传结构分析和生物型鉴定 (Sogawa, 1978) 等。

根据序列相似性和功能特异性, 昆虫羧酸酯酶基因可以分为 8 个亚家族:  $\alpha$ -酯酶 ( $\alpha$ -Esterase,  $\alpha$ -EST)、 $\beta$ -酯酶 ( $\beta$ -Esterases,  $\beta$ -EST)、保幼激素酯酶 (Juvenile Hormone Esterase, JHE)、乙酰胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, AChE)、Gliotactin、Glutactin、神经胶质蛋白 (Neuroligin) 和神经趋化蛋白 (Neurotactin) 等 (Oakeshott *et al.*, 2005)。目前, 在 GenBank 中登录的褐飞虱酯酶全长基因有 3 条: 褐飞虱酯酶基因 NI-EST1 (登录号 AF302777)、褐飞虱乙酰胆碱酯酶基因 (登录号 AJ852420) 和褐飞虱保幼激素酯酶基因 (登录号 EU380769)。本文从褐飞虱基因池 cDNA 文库中筛选到 24 条酯酶相关基因 EST 片段, 经同源相关性比对, 没有发现上述已克隆的褐飞虱酯酶基因的片段。在这些 EST 片段中, 有 16 条与羧酸酯酶类 (如  $\alpha$ -酯酶、昆虫酯酶 6 等) 存在有较高相似性, 其中 4 条 EST 序列中包含 motif 基序; 有 2 条与昆虫的 JHE 存在较高相似性, 且均具有 motif 基序; 各有 3 条分别与 Gliotactin、Neuroligin 具有较高同源性。目前, 褐飞虱的基因组序列已经测序完成, 可应用已知的昆虫酯酶基因对褐飞虱基因组序列进行比对, 就能明确褐飞虱体内有的酯酶基因数量。今后, 可根据已筛选获得的褐飞虱酯酶 EST 片段, 克隆全长基因以进一步分析其所属类别和生物学功能。

表 2.1 褐飞虱酯酶基因 EST 序列

| Name                     | Length(bp) | Peptide with high similarity                                    | Score | E-value   | motif            |
|--------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------|-------|-----------|------------------|
| <b>I. 羧酸酯酶类</b>          |            |                                                                 |       |           |                  |
| Nlu-EST01                | 1279       | Q9GQ01   <i>Nilaparvata lugens</i> Carboxylesterase             | 456   | 1.00E-127 | FGDDDCRITVMGQSSG |
| Nlu-EST02                | 1324       | D7ELD3   <i>Tribolium castaneum</i> Esterase 6                  | 351   | 6.00E-96  | FGGNPNSVTISGMSAG |
| Nlu-EST03                | 762        | D7ELD3   <i>T. castaneum</i> Esterase 6                         | 158   | 4.00E-38  | FGGNPIRVTFAGVSAG |
| Nlu-EST04                | 593        | Q171Y4   <i>Aedes aegypti</i> Alpha-esterase                    | 134   | 3.00E-31  | GDPSVTLFGESAG    |
| Nlu-EST05                | 232        | Q8MM61   <i>Plutella xylostella</i> Esterase                    | 131   | 9.00E-31  | FGDANNVTIFGESA   |
| Nlu-EST06                | 465        | Q17MV6   <i>A. aegypti</i> Carboxylesterase                     | 112   | 9.00E-25  |                  |
| Nlu-EST07                | 455        | Q171Y4   <i>A. aegypti</i> Alpha-esterase                       | 103   | 3.00E-22  |                  |
| Nlu-EST08                | 202        | B0WJ14   <i>Culex quinquefasciatus</i> Carboxylesterase 3       | 84.1  | 1.00E-16  |                  |
| Nlu-EST09                | 252        | Q5WM41   <i>T. castaneum</i> esterase                           | 84.5  | 2.00E-16  |                  |
| Nlu-EST10                | 209        | Q8T9V6   <i>A. aegypti</i> carboxylesterase                     | 81    | 1.00E-15  |                  |
| Nlu-EST11                | 186        | D2KWC5   <i>Bombyx mori</i> Carboxyl/cholinesterase 5BS         | 80.2  | 2.00E-15  |                  |
| Nlu-EST12                | 209        | B3GS55   <i>B. mori</i> Carboxylesterase                        | 80.6  | 2.00E-15  |                  |
| Nlu-EST13                | 149        | D7ELD3   <i>T. castaneum</i> Esterase 6                         | 73.1  | 2.00E-13  |                  |
| Nlu-EST14                | 186        | Q670J7   <i>Drosophila erecta</i> Carboxylesterase 6            | 73.3  | 4.00E-13  |                  |
| Nlu-EST15                | 257        | Q9VIC3   <i>D. melanogaster</i> Alpha-Esterase-1                | 58.5  | 1.00E-08  |                  |
| Nlu-EST16                | 165        | Q17DY1   <i>A. aegypti</i> Carboxylesterase                     | 52.1  | 5.00E-07  |                  |
| <b>II. 保幼激素酯酶类</b>       |            |                                                                 |       |           |                  |
| Nlu-EST17                | 617        | Q16XU6   <i>A. aegypti</i> Juvenile hormone esterase            | 194   | 4.00E-49  | FGGDPDSVTLVGYSAG |
| Nlu-EST18                | 203        | A7XV23   <i>Scaptotrigona depilis</i> Juvenile hormone esterase | 108   | 6.00E-24  | FGGDPDKVTLAGLSAG |
| <b>III. Gliotactin 类</b> |            |                                                                 |       |           |                  |
| Nlu-EST19                | 298        | B0W0B8   <i>C. quinquefasciatus</i> Gliotactin                  | 163   | 4.00E-40  |                  |
| Nlu-EST20                | 282        | Q9NK80   <i>D. melanogaster</i> Gliotactin                      | 125   | 8.00E-29  |                  |
| Nlu-EST21                | 146        | Q16WX2   <i>A. aegypti</i> Gliotactin                           | 96.2  | 3.00E-20  |                  |
| <b>IV. Neuroligin 类</b>  |            |                                                                 |       |           |                  |
| Nlu-EST22                | 148        | Q17GB8   <i>A. aegypti</i> Neuroligin                           | 111   | 5.00E-25  |                  |
| Nlu-EST23                | 159        | B9VMQ6   <i>Apis mellifera</i> Neuroligin 4                     | 87.1  | 2.00E-17  |                  |
| Nlu-EST24                | 288        | B9VMQ4   <i>A. mellifera</i> Neuroligin                         | 62.4  | 9.00E-10  |                  |

## 第三章水稻品种对褐飞虱酯酶基因表达的影响

自然界中,植物对抗经常遭遇到的害虫及疾病等成了组成型和诱导型的防御反应机制(Stotz *et al.*, 1999)。在有关植物对病害抗性的分子机理方面的研究已比较透彻,基本已经形成完整的生化系统及反应的信号网络(Ryals *et al.*, 1996)。然而,昆虫与植物互作的分子机制的研究相对欠缺,尤其是昆虫对环境应激反应的生理及分子变化的研究方面还是处于起步阶段。

褐飞虱是我国及亚洲水稻上重要的迁飞性害虫。有关褐飞虱酯酶在寄主适应性(致害性变化)和抗药性形成中的作用已有较多研究,但多涉及酯酶同工酶谱与活性等变化的研究(吕仲贤等, 1997),而有关水稻品种对褐飞虱酯酶基因表达谱水平的影响至今尚乏研究。本章拟在明确褐飞虱不同酯酶基因 EST 序列(见第 2 章)基础上,采用实时定量 PCR 方法,检测不同地区褐飞虱种群不同酯酶基因在经历水稻品种替换后的表达水平变化,为揭示水稻品种与褐飞虱之间互作的分子机理提供理论基础。

### 3.1 材料与方法

#### 3.1.1 供试昆虫

褐飞虱 3 个地区种群分别采自泰国彭世洛、中国广西昭平和浙江富阳,并在室内不接触任何化学用品的情况下用两优 363(籼型杂交稻)稻苗进行继代饲养。饲养条件为:恒温  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $75\%\pm 5\%$ 、光周期(L:D)为 14h:10h。取羽化第 1d 成虫用于试验。

#### 3.1.2 供试水稻

选用褐飞虱不同种群在其地区的当家水稻品种:IR64(热带虫源地稻区)和秀水 11(迁入地稻区),以感虫品种:台中在来 I 号(TN1)为对照品种。以水稻培养液((Yoshida *et al.*, 1976))培养的第 15d 稻苗用于试验。

#### 3.1.3 试验处理

对褐飞虱不同种群各取 60 对羽化第 1d 的雌雄成虫,分别接入置有不同品种稻苗的养虫箱中,在接虫后第 1d (1<sup>st</sup> DAT)、第 3d (3<sup>rd</sup> DAT)和第 5d (5<sup>th</sup> DAT)以及饲养 1 代后成虫羽化

第 1d (1<sup>st</sup> GAT), 分别取大小一致的长翅型雌成虫 3 头用于总 RNA 抽提。

处理期间恒温 25℃±1℃、湿度 75%±5%、光周期 (L:D) 为 14h:10h。每个处理重复取样 3 次。

### 3.1.4 实时定量 PCR 检测

采用 Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 提取褐飞虱总 RNA, 按试剂盒提供的说明书进行操作。对提取的褐飞虱总 RNA 进行 DNase 酶解处理 (美国 Promega 公司), 以去除样品中残留基因组 DNA 的影响。

采用逆转录试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 对经 DNase 酶解的褐飞虱 RNA 进行 cDNA 合成反应。反应体系和操作过程为: 取经 DNase 酶解的 RNA 4μl, 加入 Random primers (0.2μg/μl) 2μl、Oligo(T)<sub>18</sub> primer (0.5μg/μl) 2μl、再加 DEPC 水 16 μl, 将样品轻轻混匀后于 70℃ 下温育 5min; 再加入 5X Reaction buffer 8μl、RNase inhibitor (20U/μl) 3μl、10mM dNTP 混合物 4μl, 轻轻混匀后于 25℃ 下温育 5min; 最后加入 RTase 1μl 混匀, 25℃ 温育 10min 后于 42℃ 温育 60min, 即得 cDNA 模板。

根据本文筛选获得的 24 条褐飞虱酯酶基因 EST 序列 (见第 2 章) 以及 GenBank 数据库中的褐飞虱酯酶基因, 设计、合成特异性引物 (上海 Invitrogen 公司) 用以实时定量 PCR 检测, 以褐飞虱看家基因—肌动蛋白基因 3 (*actin3*) 为对照 (表 3.1)。在进行实时定量 PCR 前, 先以褐飞虱 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 将扩增产物送上海博尚公司测序。测序结果表明设计的特异性引物能正确、有效扩增目的片段。

对褐飞虱 cDNA 模板进行梯度稀释成 20X、200X 和 2000X, 分别在美国 ABI 公司 7500PCR 仪上进行实时定量 PCR, 以确定最适的 cDNA 模板浓度。最终选择 2000X 稀释液为 PCR 模板。具体的反应体系为: 染料预混液 (美国 Bio-RAD 公司) 10μl、特异性正、反向引物各 1μl、2000X cDNA 模板 2μl、灭菌双蒸水 6μl。采用两步法: 95℃ 30s; 95℃ 5s, 60℃ 5s, 共 35 个循环。

### 3.1.5 定量计算方法与数据统计分析

以内参基因为标准, 采用相对定量 ( $\Delta\Delta Ct$ ) 方法估算不同基因的表达水平。实验数据应用 DPS 数据处理系统进行统计分析, 其中采用多元方差分析中线性模型分析不同水稻品种对褐飞虱酯酶基因表达的影响, 采用多元方差分析中 R 型因子的可变类平均聚类方法评价不同酯酶基因以及不同褐飞虱种群在水稻寄主品种更换中的相互关系。

表 3.1 用于实时定量 PCR 检测的特异性引物

| 引物名称      |    | 引物序列                   |
|-----------|----|------------------------|
| Nlu-EST01 | SP | GTTCTGGACGGATCCAAAGA   |
|           | AP | GTA CTGGCGTACCCATTCGT  |
| Nlu-EST02 | SP | TTCATGTTCTTG GGCAGTCA  |
|           | AP | GAGCTGCAACCTGGTCTTTC   |
| Nlu-EST03 | SP | AGTGACTTTTGCTGGCGTCT   |
|           | AP | ACGTCAGATGCGTAGTCACG   |
| Nlu-EST04 | SP | TAATGCAGAGCGGAAGTGTG   |
|           | AP | TGTGCCAGGGTGAGTTGATA   |
| Nlu-EST05 | SP | AAGTGGCGACGATGAACTTT   |
|           | AP | GAACCCATTTCAAAGCCAGA   |
| Nlu-EST06 | SP | TCTGCTGCAACAAATTCGAC   |
|           | AP | CAGTTCACCTTTGGGGTGAG   |
| Nlu-EST07 | SP | ACGTCGAGAACACCATACCC   |
|           | AP | TTTTGAGCAGCCTCTCAGGT   |
| Nlu-EST08 | SP | TAACACCGAGGATGTCACCA   |
|           | AP | GCTTTCCACCTCCCTGTGTA   |
| Nlu-EST09 | SP | TGGCAGCTTAGTTGGGTGTA   |
|           | AP | GCTGATTGCTGAATTCGTGA   |
| Nlu-EST10 | SP | CACTCCCAAGATTCTCTGC    |
|           | AP | ACTGAATGGTGACCACGACA   |
| Nlu-EST11 | SP | TGAAGTAGTACTGCCCCAAGG  |
|           | AP | AGACACCTTTCCACGGTTTG   |
| Nlu-EST12 | SP | AACTCCGCTTCAAGAGTCCA   |
|           | AP | TCCACCTCCATGAATGAACA   |
| Nlu-EST13 | SP | TTTGCTTATCGTGGCAAACA   |
|           | AP | TTTGCCATAGAACGTTTCCAG  |
| Nlu-EST14 | SP | ACTCACCTTTCGGACCTGTG   |
|           | AP | AGATGTGGAGCCAGCTCTGT   |
| Nlu-EST15 | SP | GGAACGCTTATGGTTGGTGA   |
|           | AP | TTTCCA ACTGGAGGTT CAGC |
| Nlu-EST16 | SP | TCTGAATCCAAGTCCAACAGT  |
|           | AP | CAGCAGTACTGGTCTCTTCCTT |
| Nlu-EST17 | SP | TTGGAACGGACCAGACTACC   |
|           | AP | GGCGCTATAGCCAACAAGAG   |
| Nlu-EST18 | SP | AAGTGGTCCCAGGCAACAT    |
|           | AP | TGGGGAGAAGTAGTGGAAGTG  |
| Nlu-EST19 | SP | CTATCGAGCACCGACTGACA   |
|           | AP | GCTCCCGTCAAGAAAAGATG   |
| Nlu-EST20 | SP | GGGCCAATACGA ACTTGCTA  |
|           | AP | GTGGTGACACCGGTCATGTA   |
| Nlu-EST21 | SP | GAATCCAACGCACACTGAGA   |
|           | AP | AATCGTCGAGTTGAATGTCG   |

| 引物名称      |    | 引物序列                    |
|-----------|----|-------------------------|
| Nlu-EST22 | SP | ATAGCTGCCTTGCA GTGGAT   |
|           | AP | ATTGACACATGCTGCTCCTG    |
| Nlu-EST23 | SP | AGGCTCAGGATGACGGATT     |
|           | AP | CGTCTTGTCACGCTGGTAGT    |
| Nlu-EST24 | SP | TGCATCTTG TGGTGT TTTGTG |
|           | AP | CCACGTTGCGTAGTTTGTG     |
| NluCaE    | SP | TCACGCAATGGTGTAGGGTA    |
|           | AP | ATCATCCAAACTTGCGAACC    |
| NluJHE    | SP | GCGATGTCTGGTAAGAAGAGC   |
|           | AP | CGCCCTCAGTAGGATCAGAG    |
| NluAChE   | SP | ACAAGTTTATGGGGCGAGTG    |
|           | AP | TAGGCCAATTCACGTCATCA    |
| NilACT3   | SP | TGGACTTTGAGCAGGAAATGC   |
|           | AP | ACGTCGCACTTCATGATCGAG   |

## 3.2 结果与分析

以褐飞虱肌动蛋白基因 (*actin3*) 为参照基因, 采用定量 PCR 方法测定比较了褐飞虱不同地区种群成虫在经历寄主品种更换后不同酯酶基因表达水平的变化。结果表明 (图 3.1~3.27), 褐飞虱不同种群 ( $F=332.52$ ;  $df1, df2=54, 140$ ;  $p<0.001$ ) 在不同水稻品种 ( $F=179.89$ ;  $df1, df2=81, 210.2$ ;  $p<0.001$ ) 上取食不同时间 ( $F=330.86$ ;  $df1, df2=81, 210.2$ ;  $p<0.001$ ), 对飞虱体内不同酯酶基因表达水平存在极显著的影响, 而且褐飞虱种群、水稻品种和取食时间之间存在极显著的交互作用 (种群 X 品种:  $F=98.56$ ;  $df1, df2=162, 419.5$ ;  $p<0.001$ ; 种群 X 时间:  $F=151.97$ ;  $df1, df2=162, 419.5$ ;  $p<0.001$ ; 品种 X 时间:  $F=70.32$ ;  $df1, df2=243, 620.3$ ;  $p<0.001$ ; 种群 X 品种 X 时间:  $F=53.12$ ;  $df1, df2=486, 1124.1$ ;  $p<0.001$ )。

在转换寄主取食 1-5d 内, 褐飞虱成虫体内不同酯酶基因的表达即发生显著变化; 而饲养一代后, 其成虫体内不同酯酶基因的表达水平在不同品种之间多无显著差异。这表明水稻寄主品种更换对褐飞虱体内不同酯酶基因表达水平的影响是以诱导表达增高或抑制作用为主。

褐飞虱不同酯酶基因根据其在不同种群中对不同水稻品种响应的相似性, 可聚类成为 3 类 (图 3.28)。这表明褐飞虱不同酯酶基因在应对寄主水稻品种更替时, 存在协同效应。褐飞虱不同种群之间, 以中国浙江种群和泰国彭世洛种群在酯酶基因对水稻品种更替响应表达变化上存在较高的相似性 (图 3.29)。

### 3.3 讨论

酯酶在褐飞虱对寄主适应过程中起着重要作用。酯酶在褐飞虱适应水稻品种中的活性表现各不相同，受到不同水稻品种、虫态以及性别等因素影响。有报道在抗性品种上的褐飞虱酯酶活性显著低于感虫品种上的。另有学者发现褐飞虱在不同寄主上取食后酯酶活性无显著差异。吕仲贤等（1997）研究结果则表明褐飞虱在抗性水稻上生活若干世代后，其羧酸酯酶活性显著升高。其后又有报道褐飞虱取食水稻抗性品种后，其体内酯酶基因表达均明显提高。

本章结果显示，水稻品种（IR64、秀水 11、TN1 以及两优 363）对褐飞虱相关酯酶基因表达的影响各有不同，而且不同褐飞虱酯酶基因按其变化趋势可分为 3 类。这表明，不同酯酶基因在褐飞虱适应不同水稻品种过程中可能有着不同的作用，即褐飞虱酯酶对水稻寄主的适应是不同酯酶基因综合作用的结果。有关褐飞虱不同酯酶基因在其寄主适应性中的功能与作用尚待进一步研究。

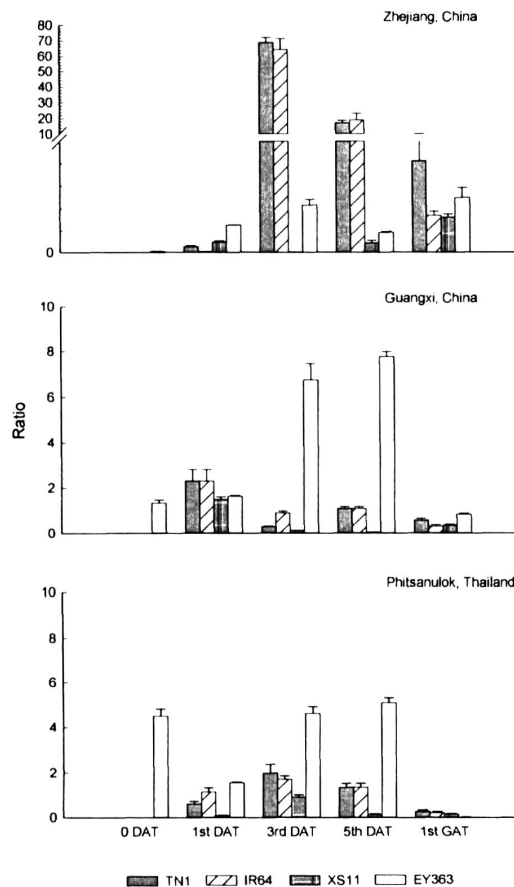


图 3.1 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST01* 的表达水平差异比较

注: DAT (Day after treatment) 为处理后天数; GAT (Generation after treatment) 为处理后代数。下同。

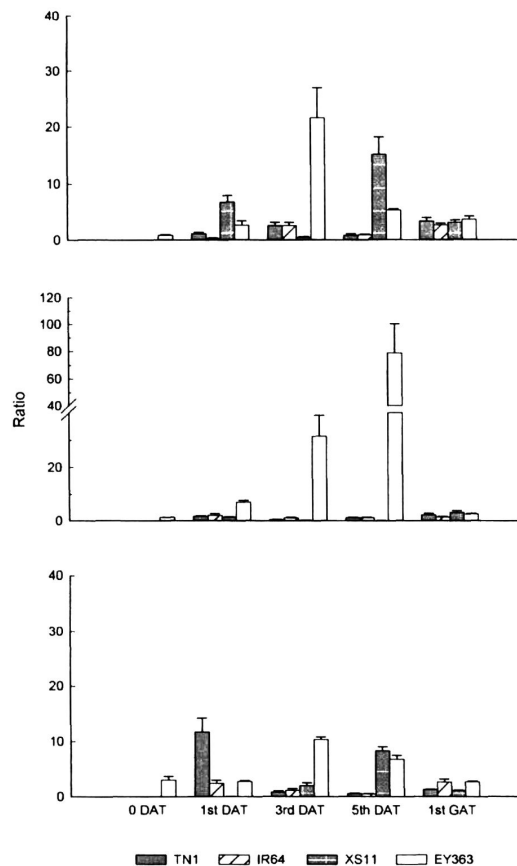


图 3.2 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST02* 的表达水平差异比较

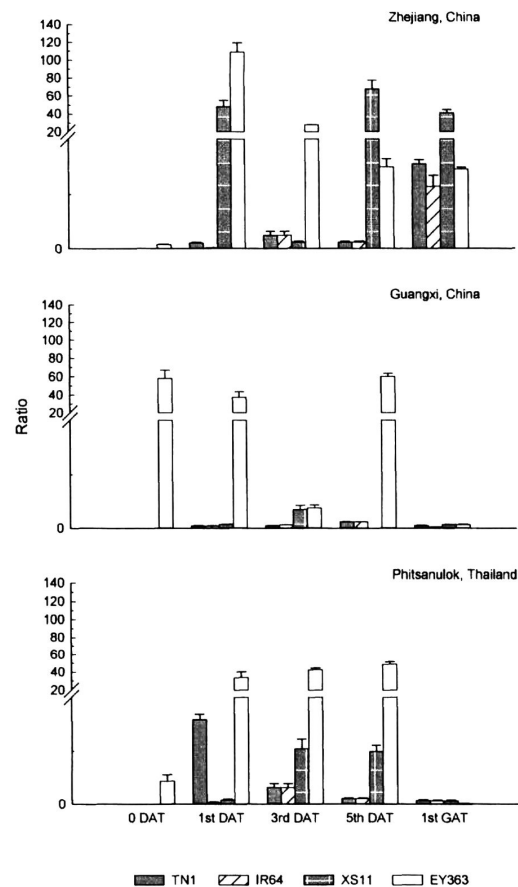


图 3.3 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST03* 的表达水平差异比较

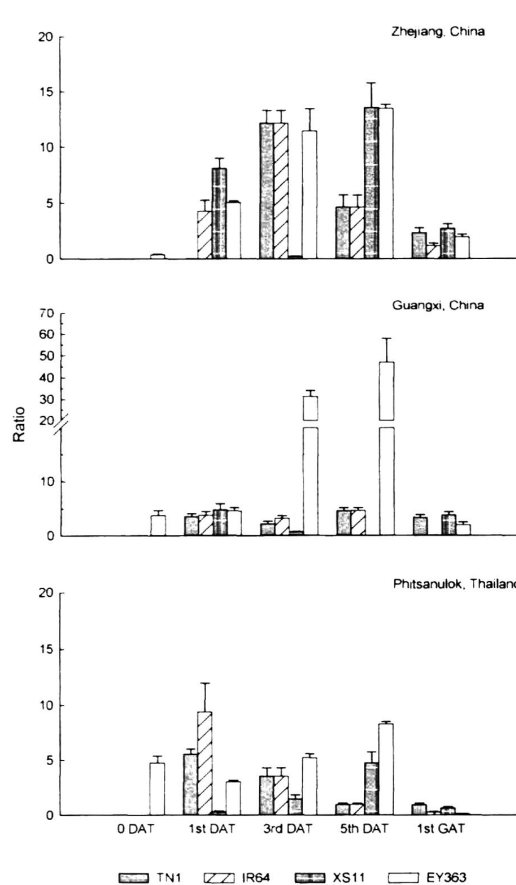


图 3.4 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST04 的表达水平差异比较

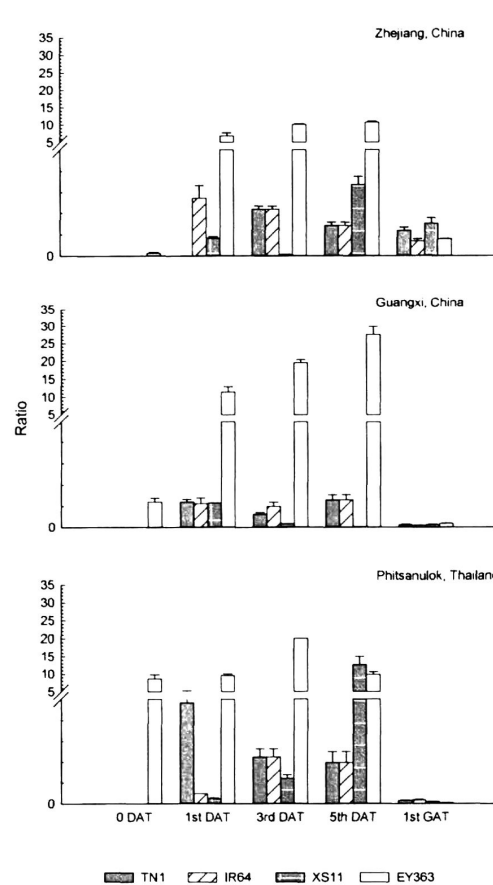


图 3.5 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST05 的表达水平差异比较

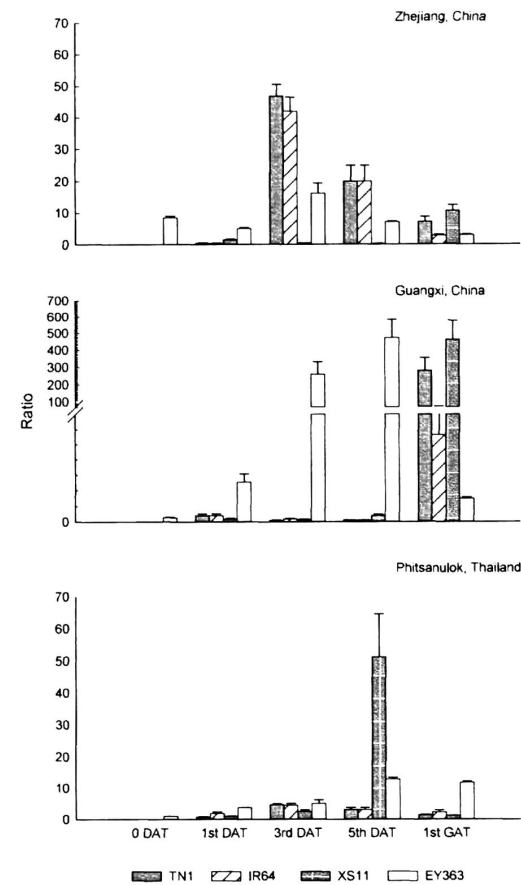


图 3.6 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST06 的表达水平差异比较

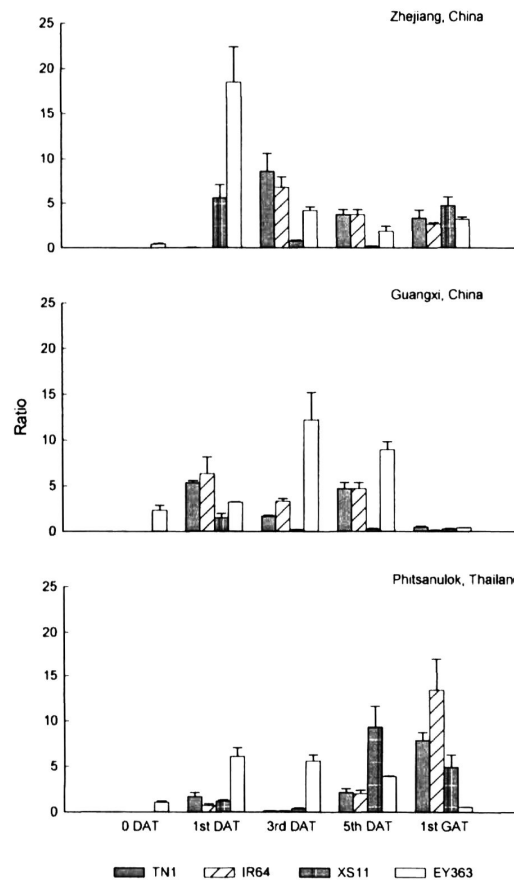


图 3.7 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST07* 的表达水平差异比较

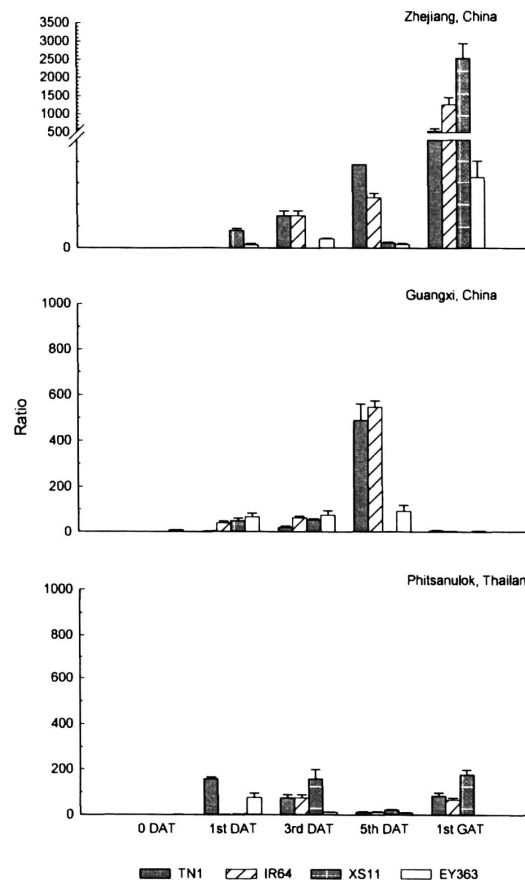


图 3.8 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST08* 的表达水平差异比较

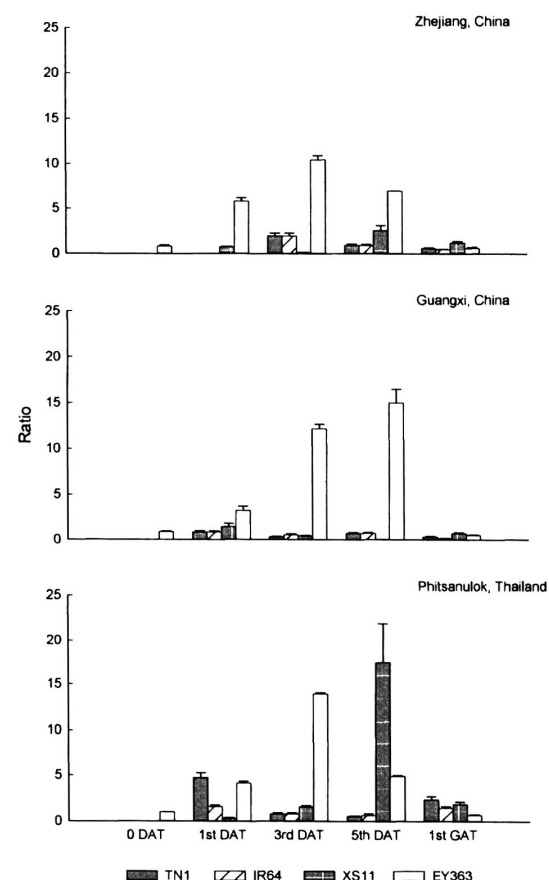


图 3.9 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST09* 的表达水平差异比较

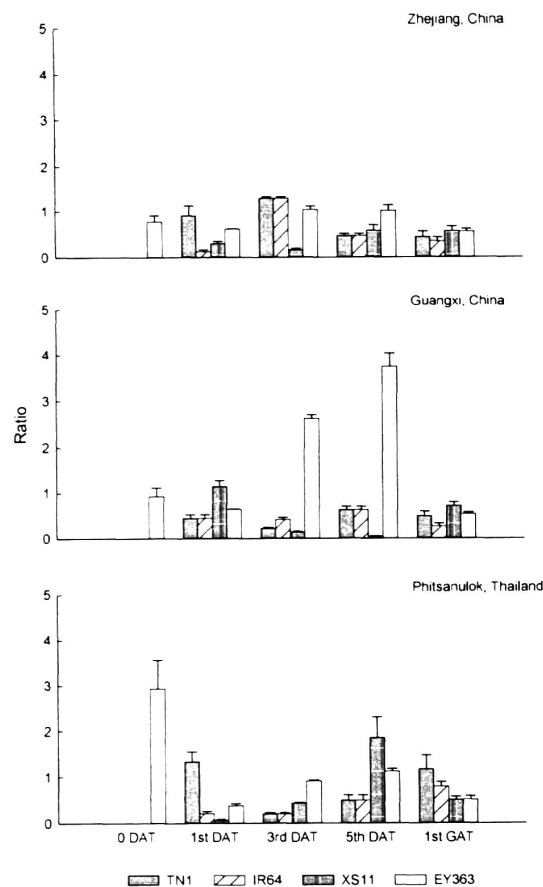


图 3.10 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST10* 的表达水平差异比较

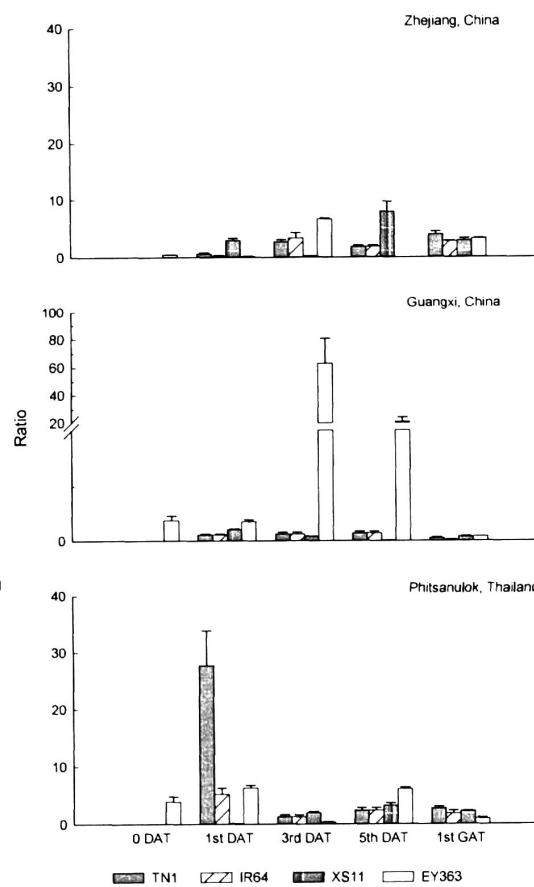


图 3.11 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST11* 的表达水平差异比较

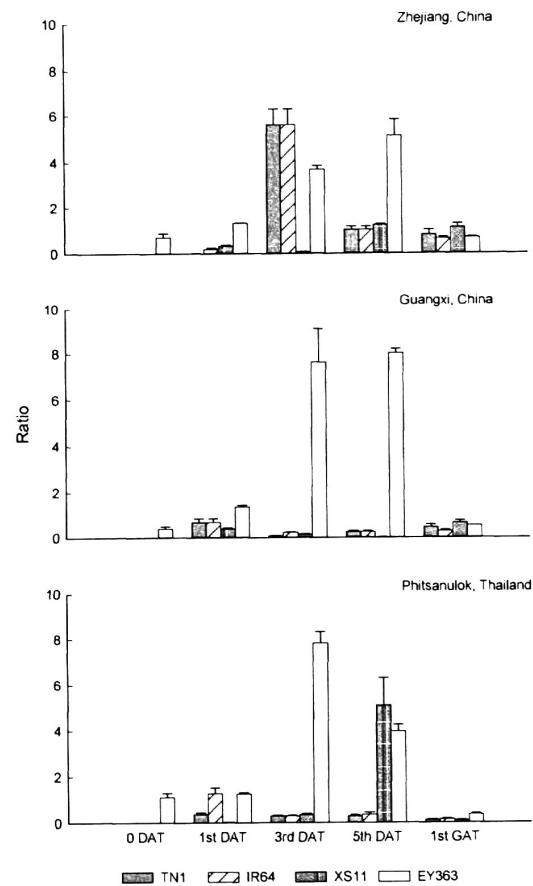


图 3.12 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST12* 的表达水平差异比较

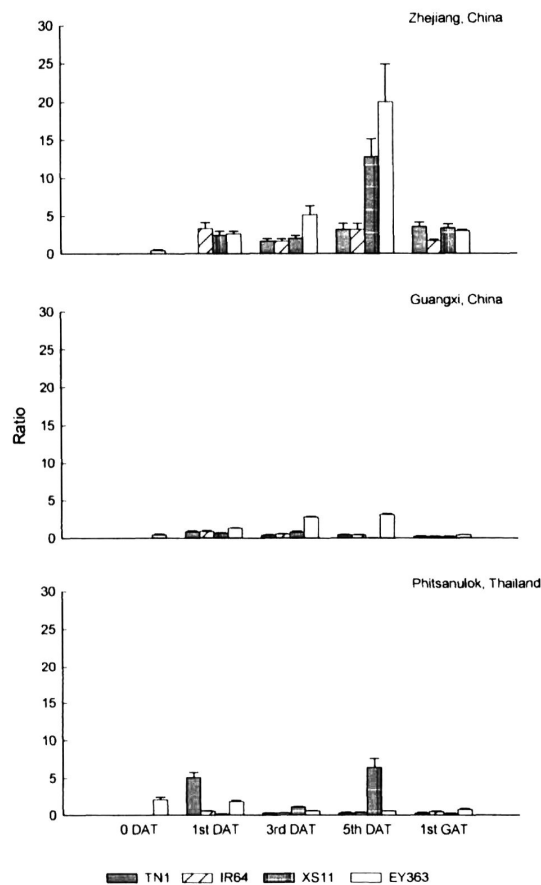


图 3.13 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST13* 的表达水平差异比较

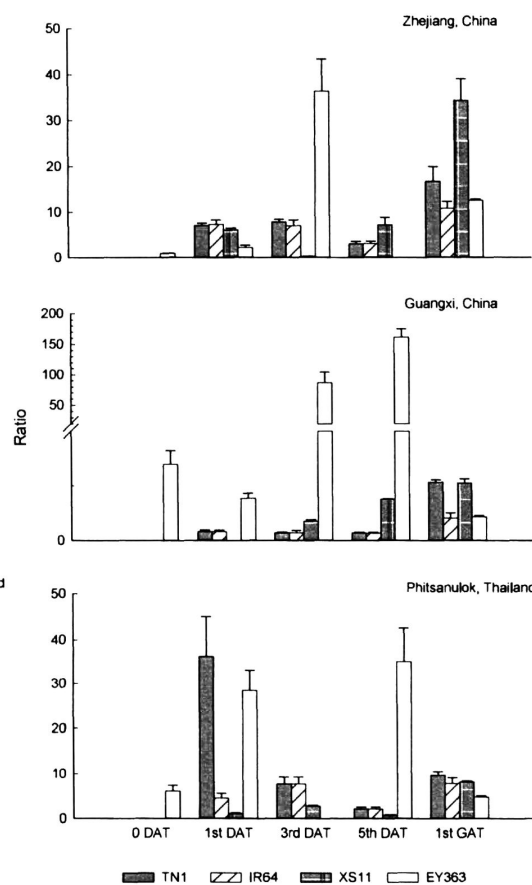


图 3.14 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST14* 的表达水平差异比较

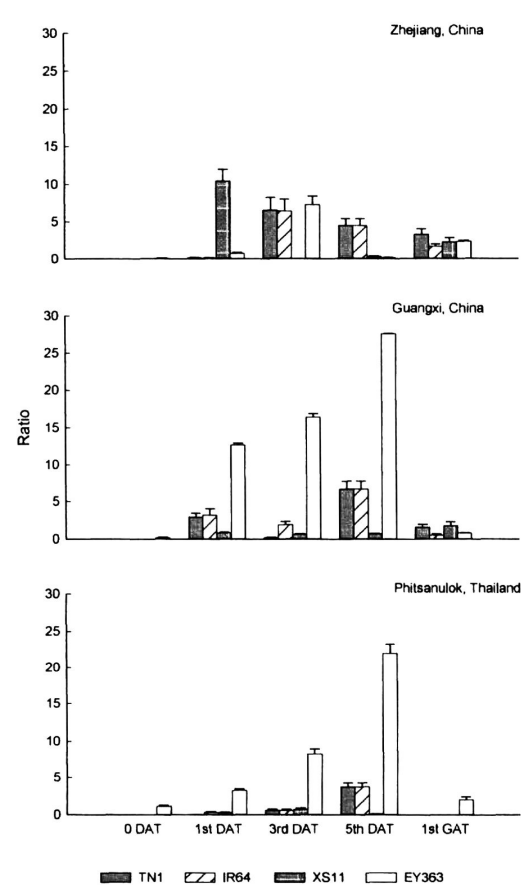


图 3.15 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST15* 的表达水平差异比较

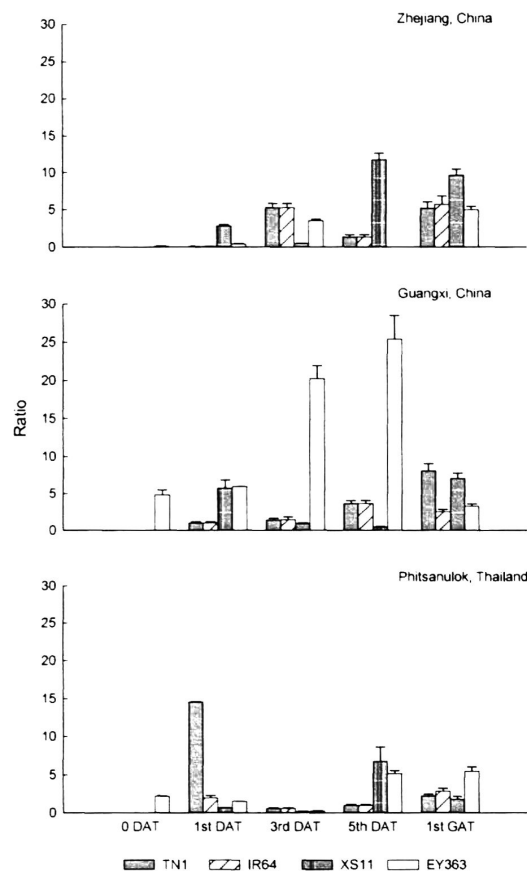


图 3.16 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST16 的表达水平差异比较

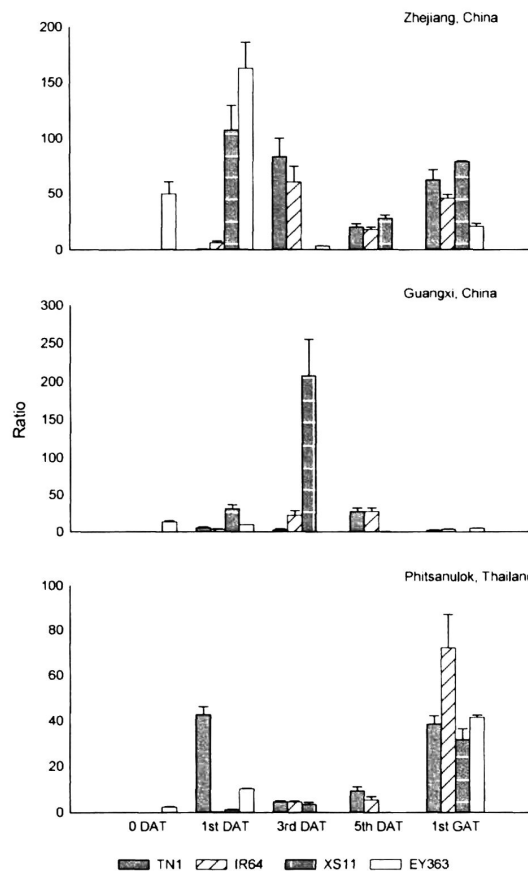


图 3.17 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST17 的表达水平差异比较

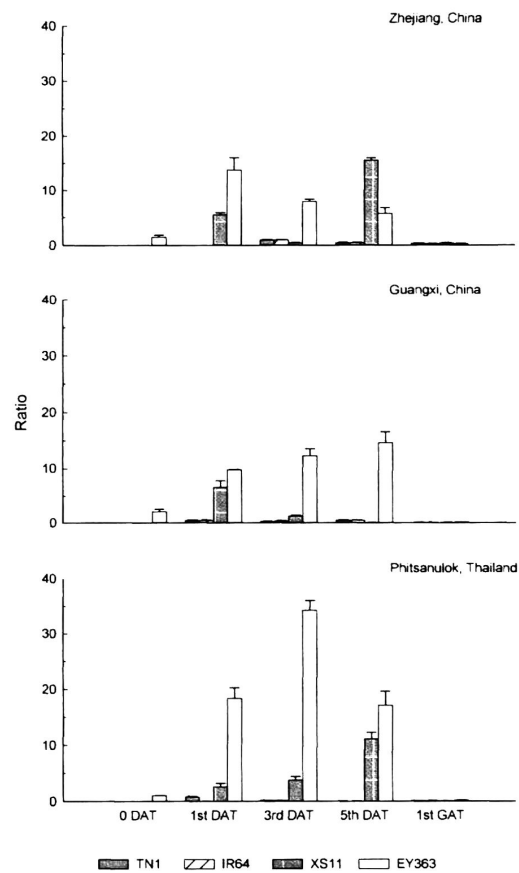


图 3.18 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST18 的表达水平差异比较

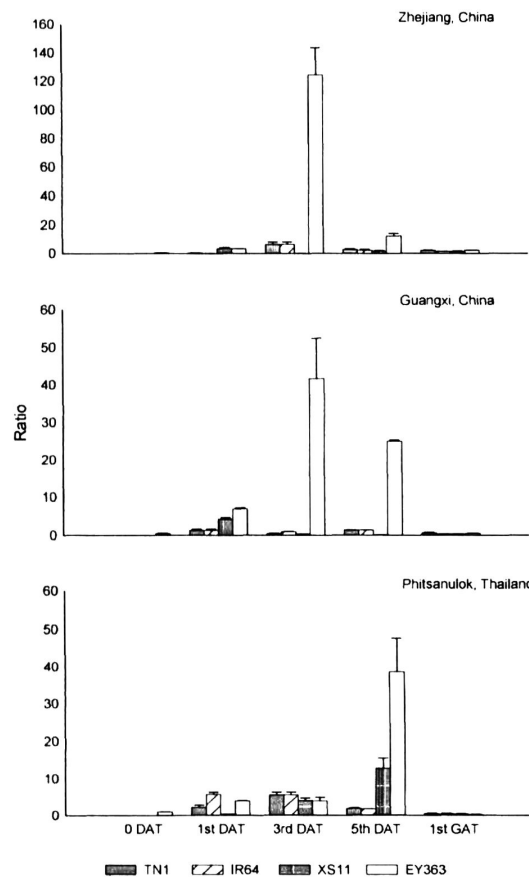


图 3.19 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST19 的表达水平差异比较

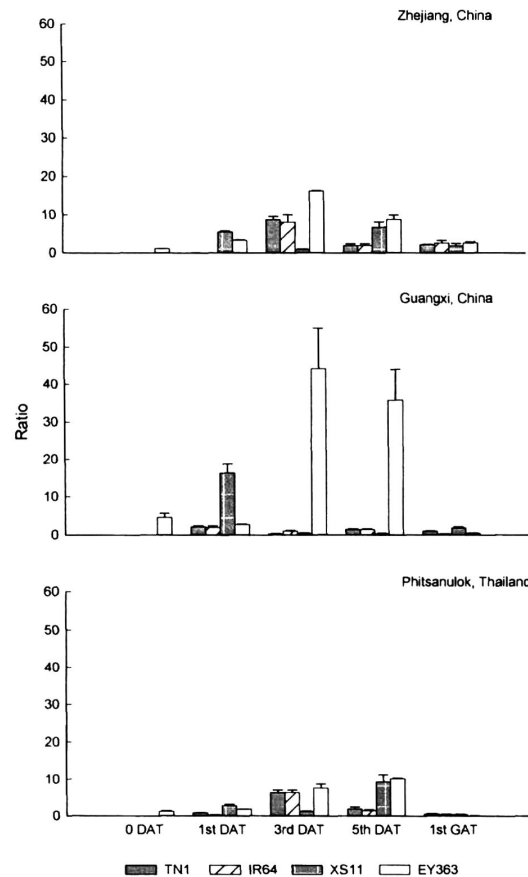


图 3.20 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST20 的表达水平差异比较

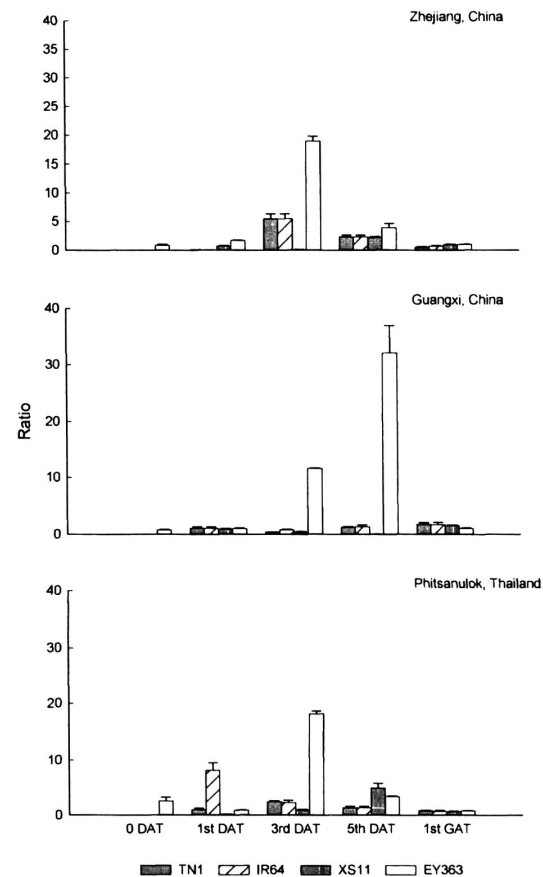


图 3.21 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 Nlu-EST21 的表达水平差异比较

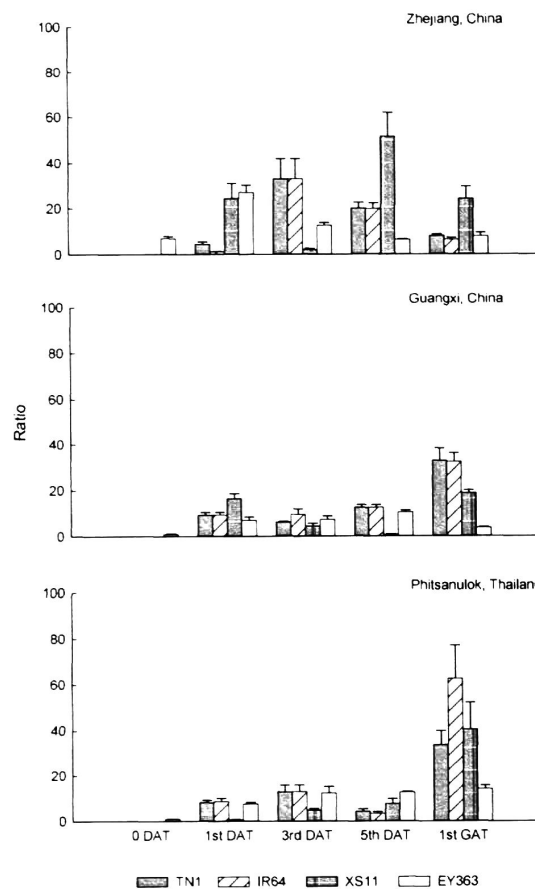


图 3.22 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST22* 的表达水平差异比较

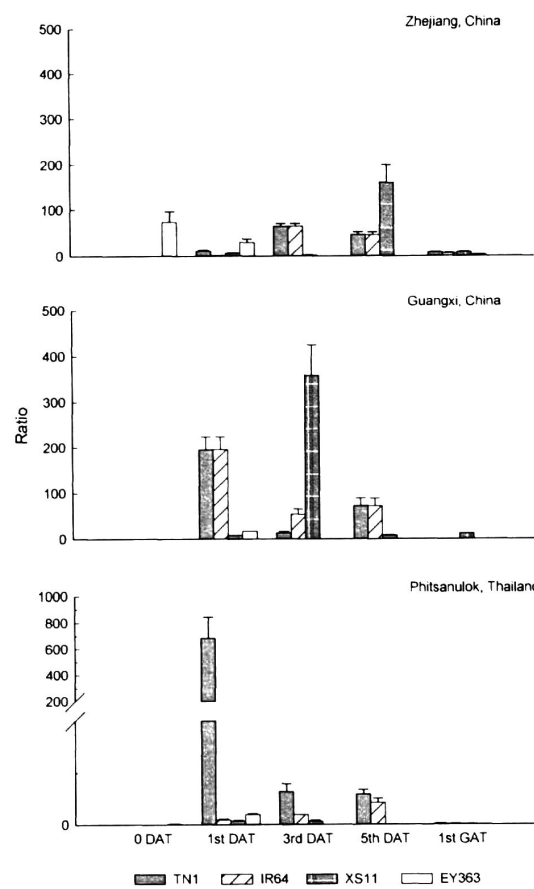


图 3.23 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST23* 的表达水平差异比较

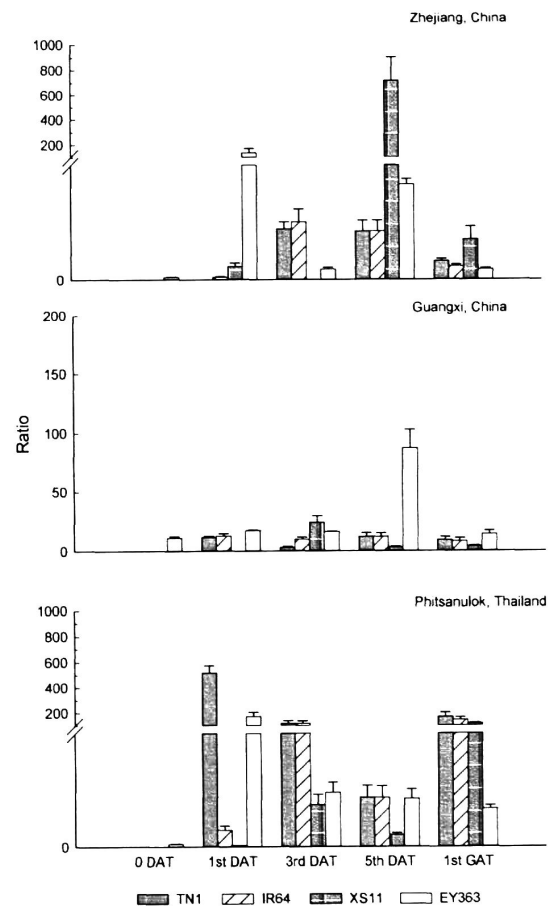


图 3.24 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-EST24* 的表达水平差异比较

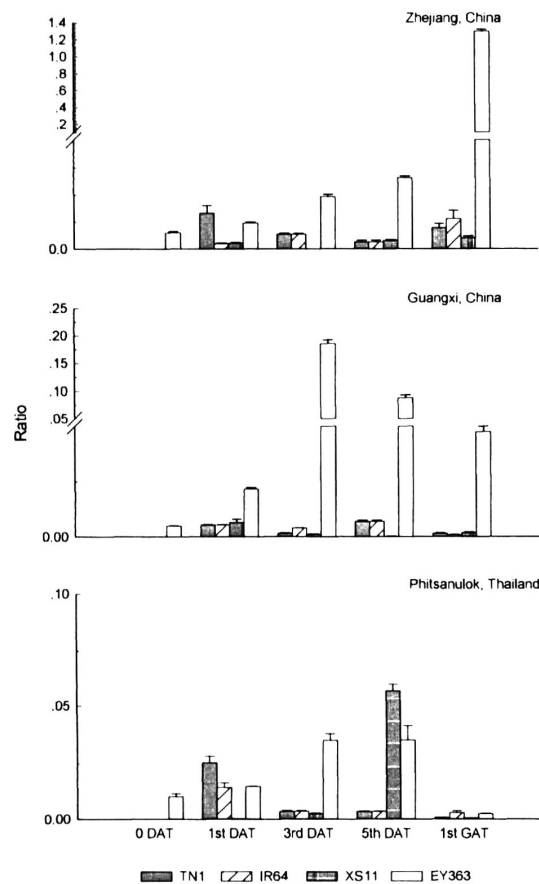


图 3.25 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-CaE* 的表达水平差异比较

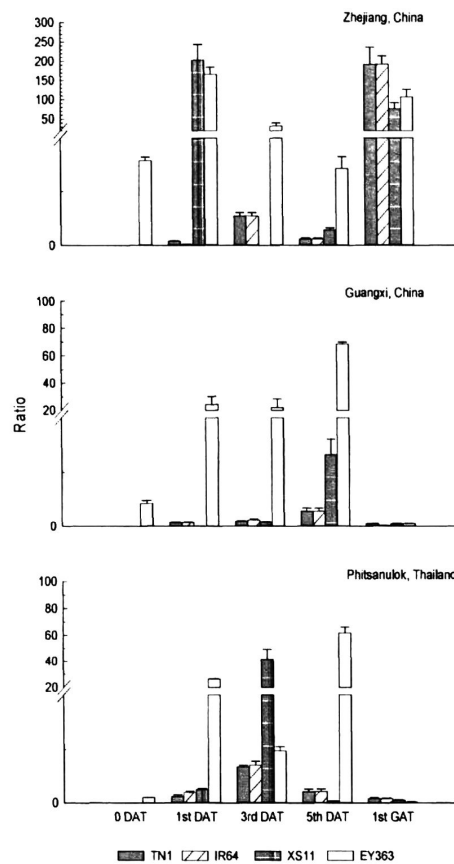


图 3.26 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-JHE* 的表达水平差异比较

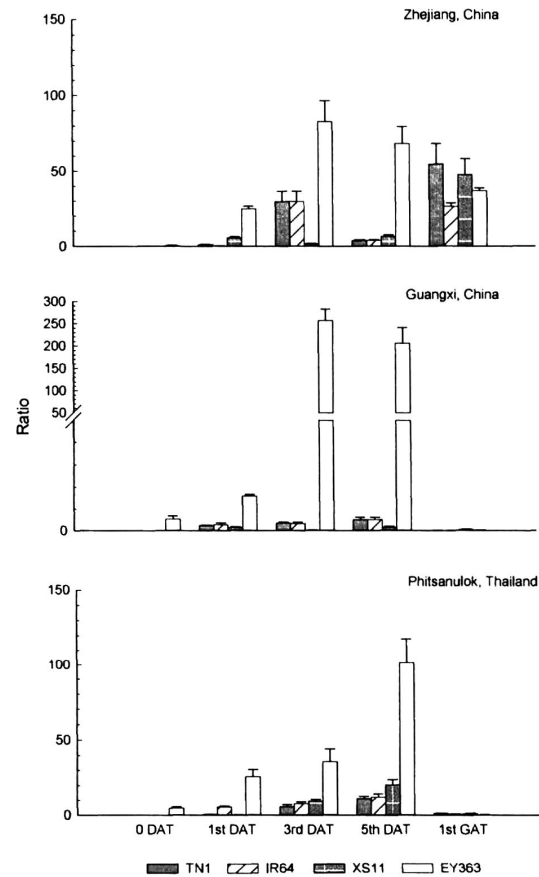


图 3.27 褐飞虱不同种群取食不同水稻品种后酯酶基因 *Nlu-AChE* 的表达水平差异比较

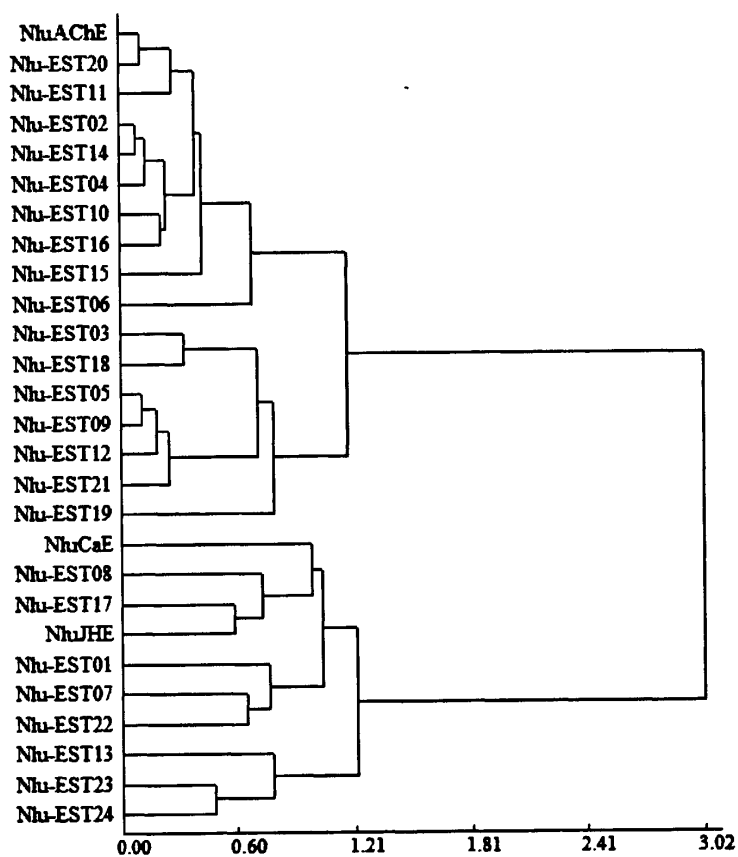


图 3.28 褐飞虱不同酯酶基因在不同种群中对水稻品种更替响应的聚类分析图

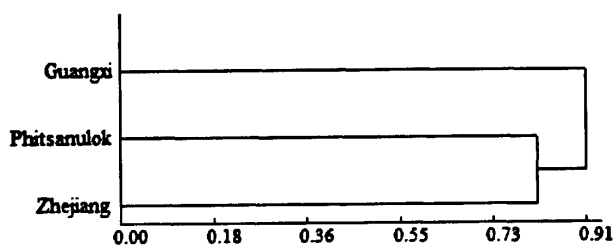


图 3.29 褐飞虱不同种群对水稻品种更替反应的聚类分析图

## 第四章 N 素水平对褐飞虱酯酶基因表达的影响

人类活动改变了全球氮循环，氮沉积的速率加快，同时为了水稻增产长期大量施用氮肥，这导致植食性昆虫种群群落简单化，增加了昆虫的数量和生物量。施用氮肥的植物通常会增加害虫的取食嗜好和取食量，提高害虫的存活率和繁殖力，增大害虫种群（Lu *et al.*, 2004; Mattson, 1980）。对于褐飞虱来说，施氮会增强褐飞虱生态适应性，并通过累积效应使其种群数量在高氮情况下不断增长（吕仲贤, 2003）。

目前，有关 N 肥对于褐飞虱生态的影响研究比较多，但是施 N 水平究竟如何影响褐飞虱以及褐飞虱又是通过何种机制来适应生态环境中 N 水平变化，相关的研究较为缺乏。本章主要探讨褐飞虱在对环境 N 适应中酯酶基因的表现。

### 4.1 材料与方法

#### 4.1.1 供试材料

供试水稻品种为籼型杂交稻：两优 363。

供试褐飞虱种群同 3.1.1，即分别采自泰国彭世洛、中国广西昭平和浙江富阳，并在室内不接触任何化学用品的情况下用两优 363 稻苗进行继代饲养。

#### 4.1.2 试验处理

根据生产上常用的施 N 水平，在水稻培养液中添加尿素，配制低 N 处理和高 N 处理的培养液，一直用来培养两优 363 稻苗后，供褐飞虱取食。以不加尿素的水稻培养液为对照。

对褐飞虱不同种群各取 60 对羽化第 1d 的雌雄成虫，分别接入置有不同尿素浓度水稻培养液培养的稻苗（苗龄 15d）的养虫箱中，在接虫后第 1d（1<sup>st</sup> DAT）、第 3d（3<sup>rd</sup> DAT）和第 5d（5<sup>th</sup> DAT）以及饲养 1 代后成虫羽化第 1d（1<sup>st</sup> GAT），分别取大小一致的长翅型雌成虫 3 头用于总 RNA 抽提。

处理期间恒温 25℃±1℃、湿度 75%±5%、光周期（L:D）为 14h:10h。每个处理重复取样 3 次。

### 4.1.3 实时定量 PCR 检测

在不同 N 浓度处理稻苗上取食的褐飞虱总 RNA 提取、DNase 酶解、逆转录以及实时定量 PCR 检测等方法同 3.1.4。

### 4.1.4 水稻植株含 N 量测定

取经不同 N 浓度处理的供试稻苗，去除稻根，并用剪刀将稻苗整株水剪碎后晾干。准确称取 1g 样品移入干燥的 100ml 定氮瓶中，依次加入 0.2g  $\text{CuSO}_4$ 、3g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  混匀，再加入 20ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ，轻轻混匀，使样品全部碳化。将定氮瓶放入高温锅内 200℃ 温育 1h，待瓶内液体呈蓝绿色且澄清透明后，取出冷却。将定氮瓶放入凯氏定氮仪（丹麦 Foss 公司）中进行稻苗植株中的含 N 量测定。

### 4.1.5 数据统计分析

实验数据应用 DPS 数据处理系统进行统计分析，方法同 3.1.5。不同 N 处理稻株中的含 N 量比较采用单因素方差分析和 LSD 检测。

## 4.2 结果与分析

### 4.2.1 供试稻株含 N 量分析

采用凯氏定氮法测定不同 N 浓度处理的稻苗中含 N 量，结果表明不同 N 浓度处理后，稻苗中含 N 量存在极显著差异 ( $F=3655.135$ ;  $df=2,15$ ;  $p<0.001$ )，其中低 N 和高 N 处理的含 N 量分别是对照的 1.9 倍和 2.6 倍（表 4.1）。

### 4.2.2 褐飞虱酯酶基因表达水平分析

以褐飞虱肌动蛋白基因 (*actin3*) 为参照基因，采用定量 PCR 方法测定比较了褐飞虱不同地区种群成虫在经不同 N 浓度处理的稻苗上取食后不同酯酶基因表达水平的变化。结果表明(图 4.1~4.27)，褐飞虱不同种群 ( $F=520.45$ ;  $df1,df2=54,92$ ;  $p<0.001$ ) 在不同 N 浓度处理 ( $F=438.38$ ;  $df1,df2=54,92$ ;  $p<0.001$ ) 的稻苗上取食不同时间 ( $F=330.11$ ;  $df1,df2=81,138.5$ ;  $p<0.001$ )，对飞虱

体内不同酯酶基因表达水平存在极显著的影响，而且褐飞虱种群、水稻 N 素水平和取食时间之间存在极显著的交互作用（种群 X 氮素： $F=150.57$ ;  $df1,df2=108,185.2$ ;  $p<0.001$ ；种群 X 时间： $F=116.67$ ;  $df1,df2=162,278.4$ ;  $p<0.001$ ；氮素 X 时间： $F=138.71$ ;  $df1,df2=162,278.4$ ;  $p<0.001$ ；种群 X 氮素 X 时间： $F=62.85$ ;  $df1,df2=324,542.8$ ;  $p<0.001$ ）。

在转换寄主取食 1-5d 内，褐飞虱成虫体内不同酯酶基因的表达即发生显著变化；而饲养一代后，其成虫体内不同酯酶基因的表达水平在不同 N 浓度处理之间多无显著差异。这表明水稻含 N 量变化对褐飞虱体内不同酯酶基因表达水平的影响是以诱导表达增高或抑制作用为主。与对照相比，取食低 N 浓度处理稻苗的褐飞虱酯酶基因表达多被不同程度抑制，而取食高 N 浓度处理稻苗的则正相反。这表明 N 素对褐飞虱酯酶基因表达的影响存在一定的剂量关系。

褐飞虱不同酯酶基因根据其在不同种群中对不同 N 浓度处理响应的相似性，可聚类成为 3 类（图 4.28）。这表明褐飞虱不同酯酶基因在应对高 N 浓度时，存在协同表达效应。褐飞虱不同种群之间，以中国浙江种群和泰国彭世洛种群在酯酶基因对高 N 浓度响应表达变化上存在较高的相似性（图 4.29）。

表 4.1 稻苗植株中的含 N 量

| 处理     | 含 N 量 (%) *  | 比率  |
|--------|--------------|-----|
| 高 N 浓度 | 2.50±0.02 aA | 2.6 |
| 低 N 浓度 | 1.81±0.02 bB | 1.9 |
| Ck     | 0.97±0.04 cB | 1.0 |

\*数据为平均值±标准差。同列中相同大、小写字母分别表示平均值之间存在极显著 ( $p<0.01$ ) 和显著 ( $p<0.05$ ) 差异。

### 4.3 讨论

大量施用 N 肥一直被认为是造成褐飞虱爆发的主要原因之一。褐飞虱偏好在高 N 水稻植株上取食、产卵 (Lu *et al.*, 2004)。这可能是由于施用 N 肥可提高水稻汁液中的氨基酸含量，有效改善了褐飞虱的营养条件，导致种群数量增长 (Balasubramanian *et al.*, 1983)。在褐飞虱体内，N 素代谢与利用途径中可能涉及酯酶，但相关研究较为缺乏。

本章检测了褐飞虱体内酯酶基因在经历不同含 N 水平后的表达量变化，发现施 N 能显著

改变不同酯酶基因的表达量。而且，施加低浓度 N 能导致部分酯酶基因表达抑制，而施高浓度 N 则诱导酯酶基因表达水平显著提高。酯酶基因表达水平对不同 N 浓度的响应不同，推测可能存在剂量，即不同 N 水平对褐飞虱体内的生理状态的影响是不同的。有关酯酶基因在褐飞虱对不同 N 水平水稻的适应过程中的作用机制尚待今后进一步的研究。

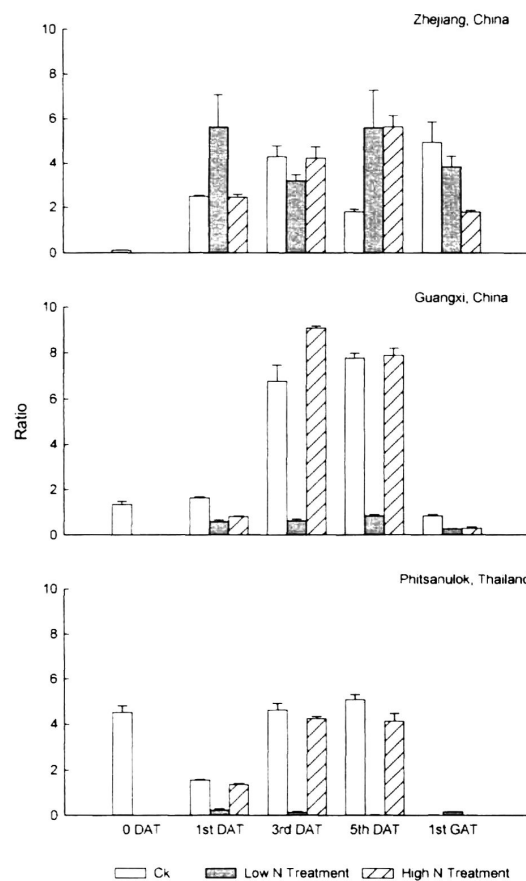


图 4.1 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理水稻后酯酶基因 Nlu-EST01 的表达水平差异比较

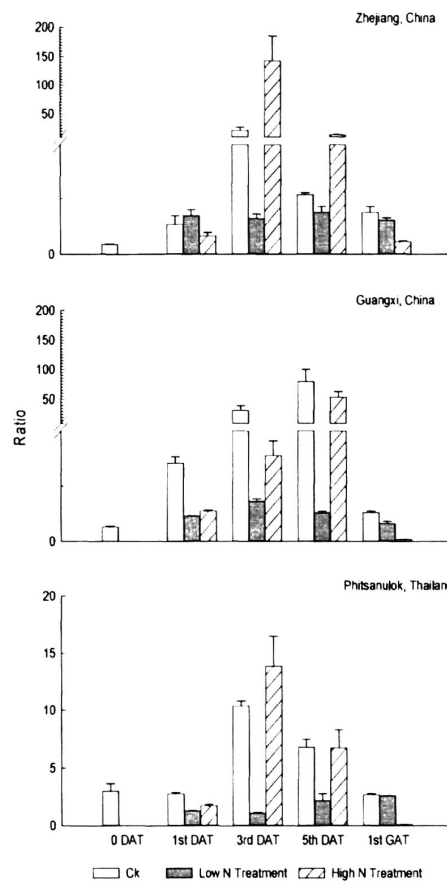


图 4.2 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理水稻后酯酶基因 Nlu-EST02 的表达水平差异比较

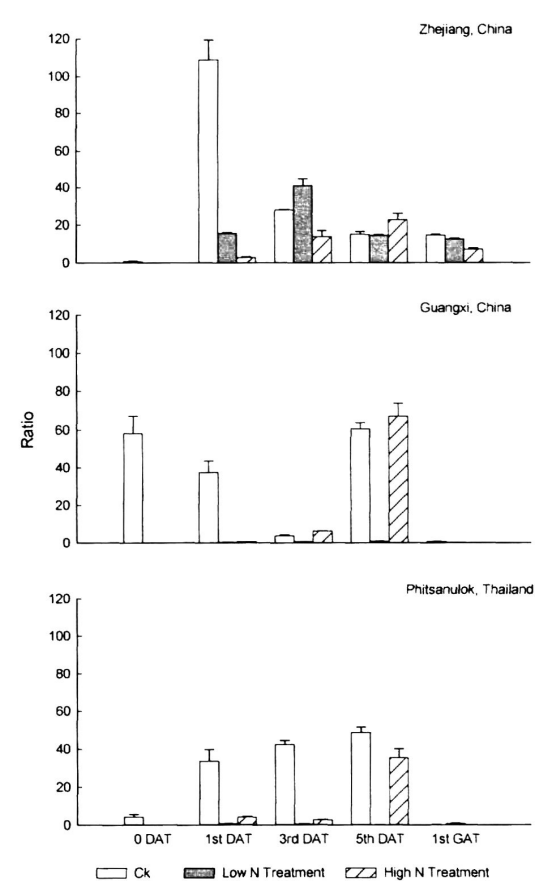


图 4.3 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理水稻后酯酶基因 Nlu-EST03 的表达水平差异比较

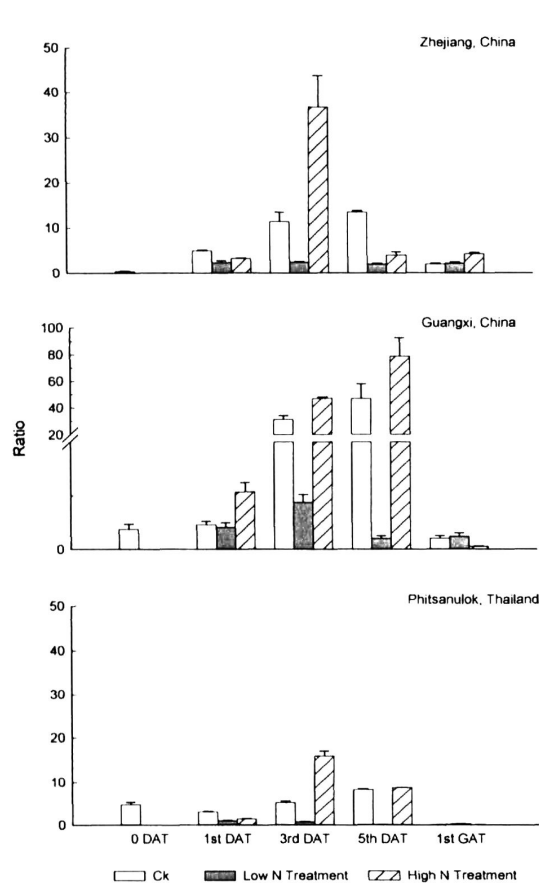


图 4.4 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST04* 的表达水平差异比较

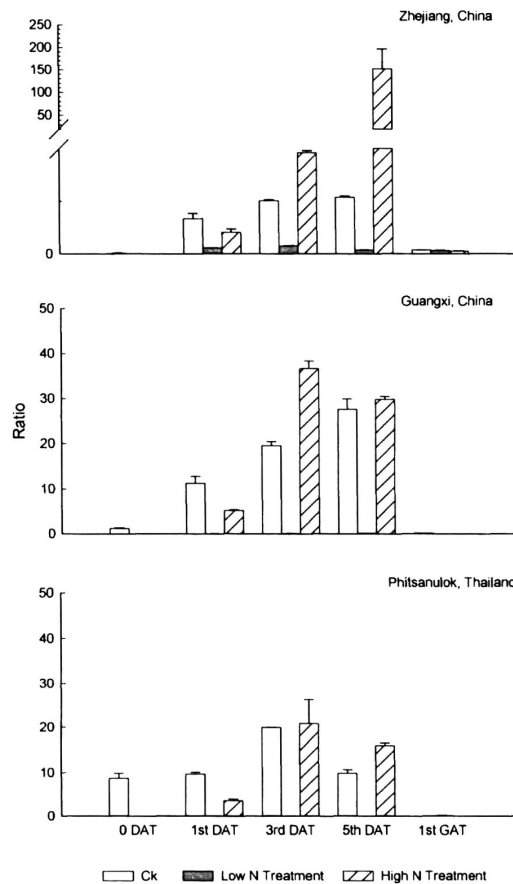


图 4.5 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST05* 的表达水平差异比较

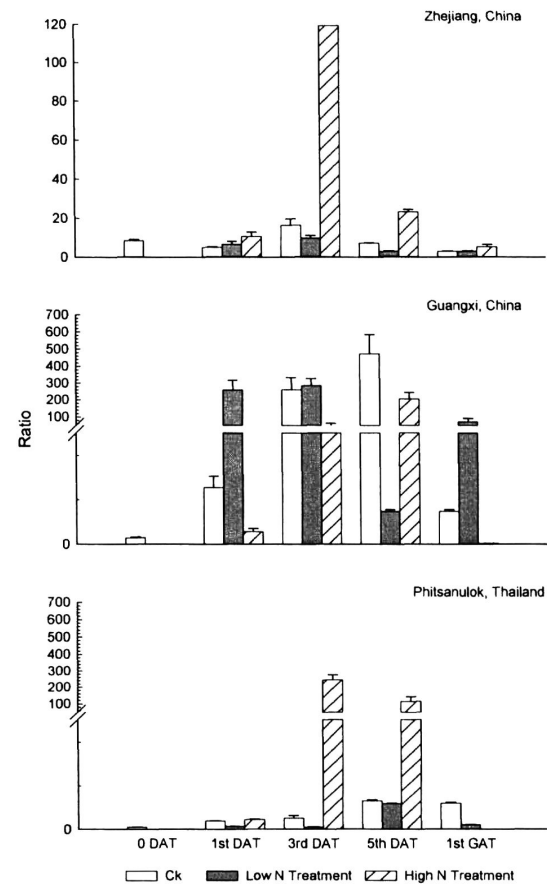


图 4.6 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST06* 的表达水平差异比较

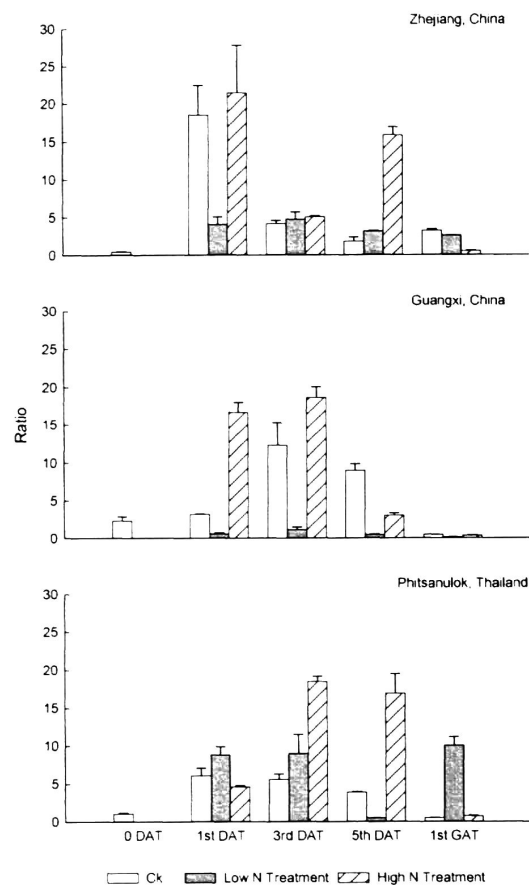


图 4.7 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST07* 的表达水平差异比较

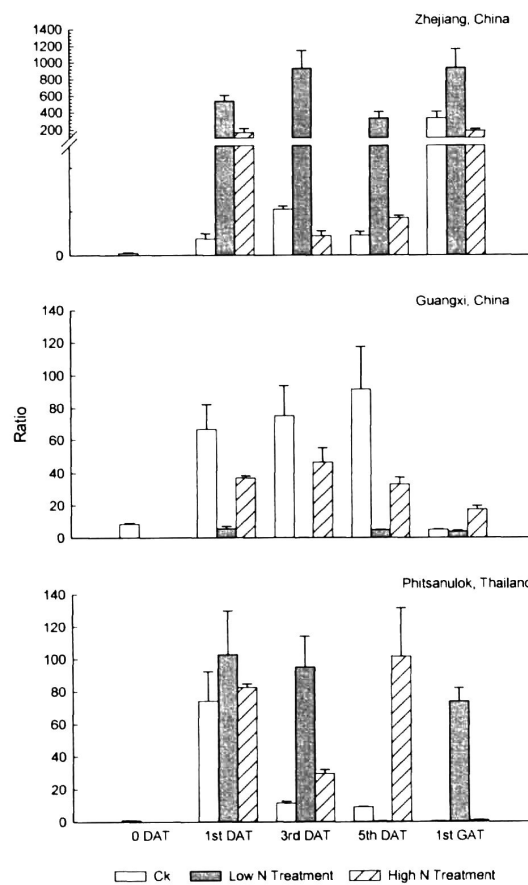


图 4.8 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST08* 的表达水平差异比较

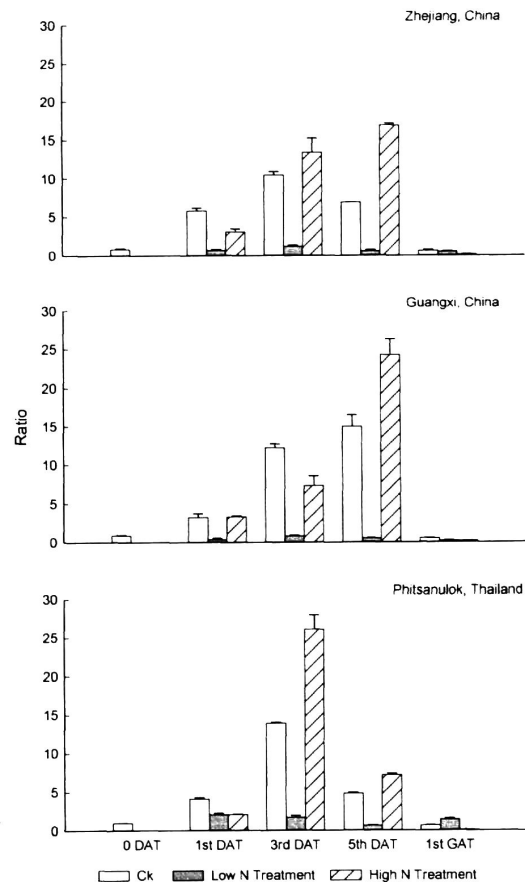


图 4.9 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST09* 的表达水平差异比较

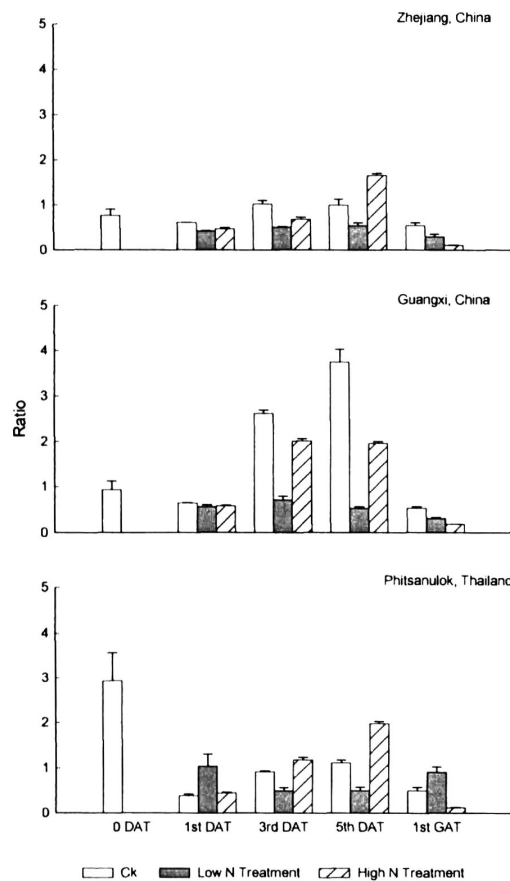


图 4.10 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 Nlu-EST10 的表达水平差异比较

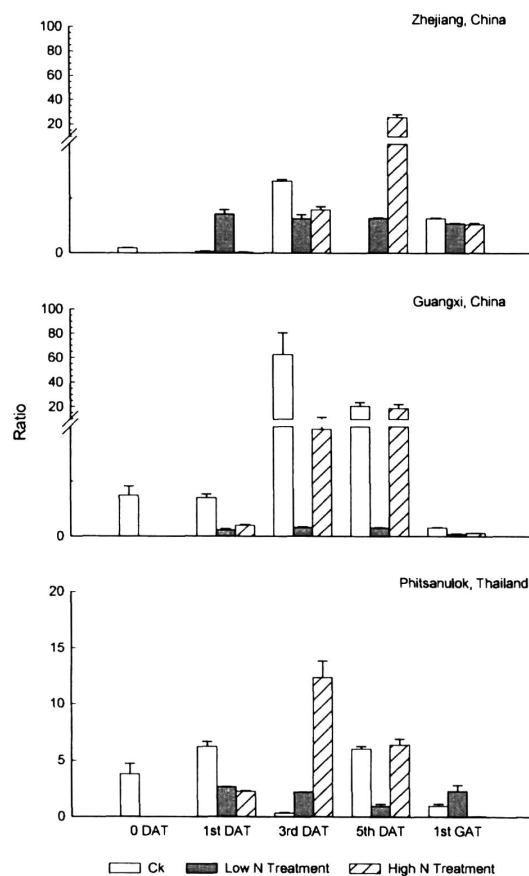


图 4.11 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 Nlu-EST11 的表达水平差异比较

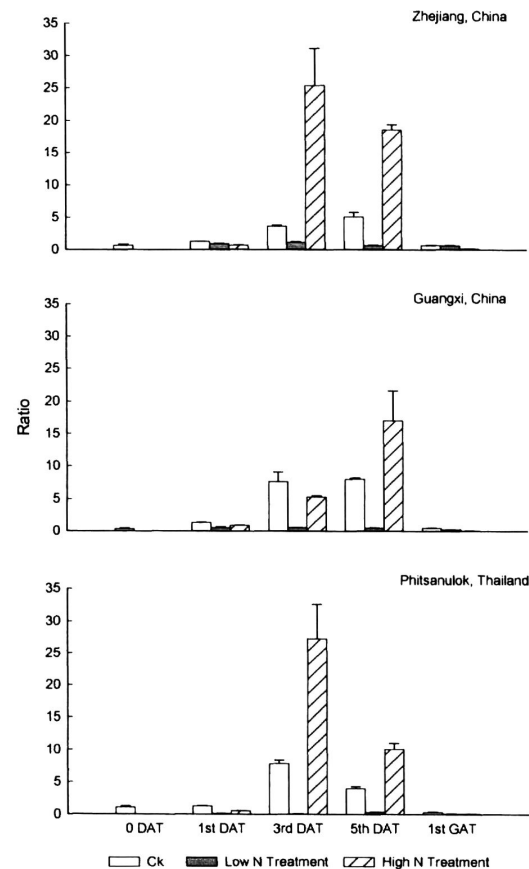


图 4.12 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 Nlu-EST12 的表达水平差异比较

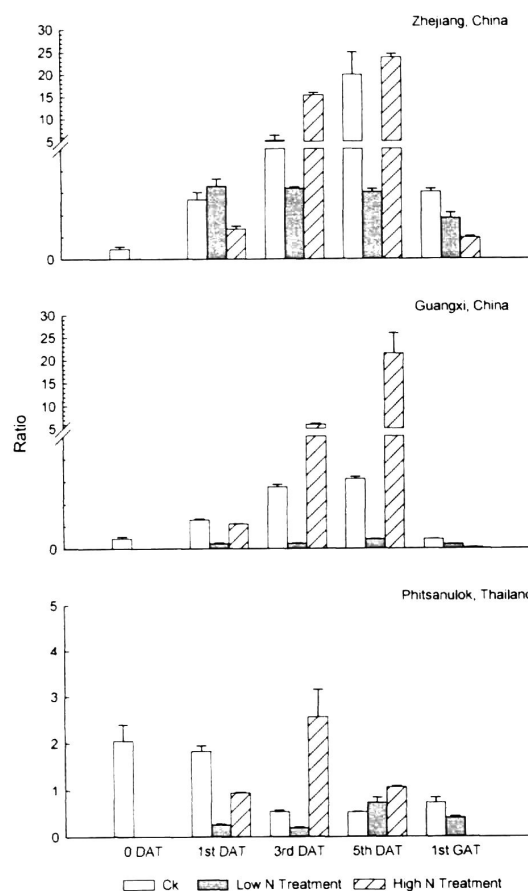


图 4.13 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
 稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST13* 的表达水平差异比较

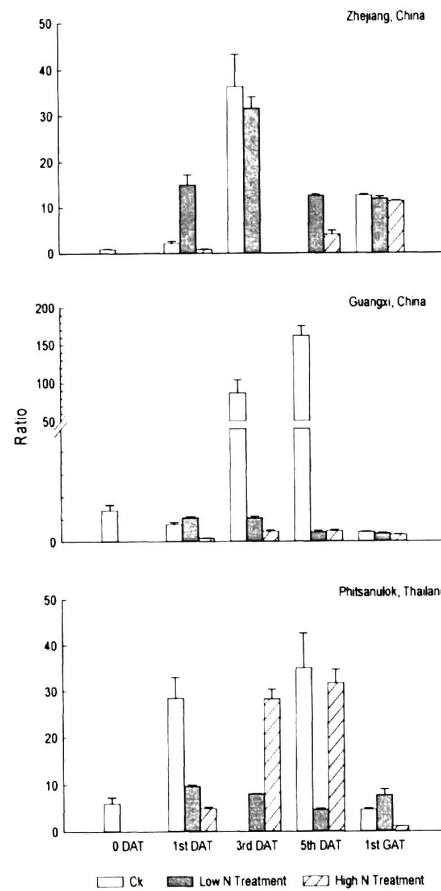


图 4.14 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
 稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST14* 的表达水平差异比较

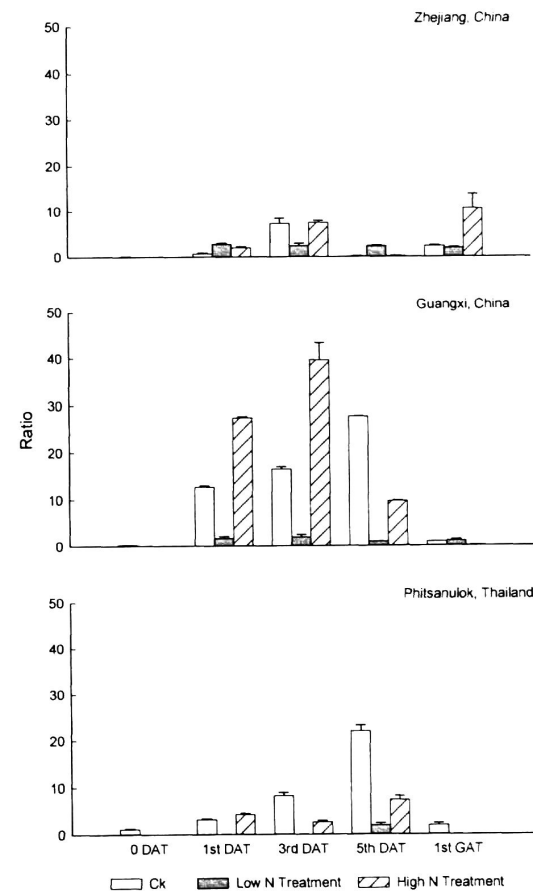


图 4.15 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
 稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST15* 的表达水平差异比较

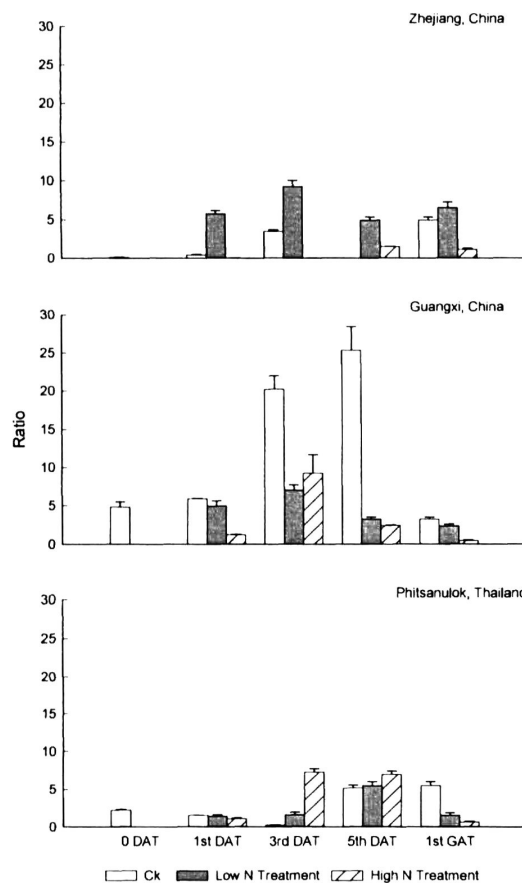


图 4.16 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
稻苗后酯酶基因 Nlu-EST16 的表达水平差异比较

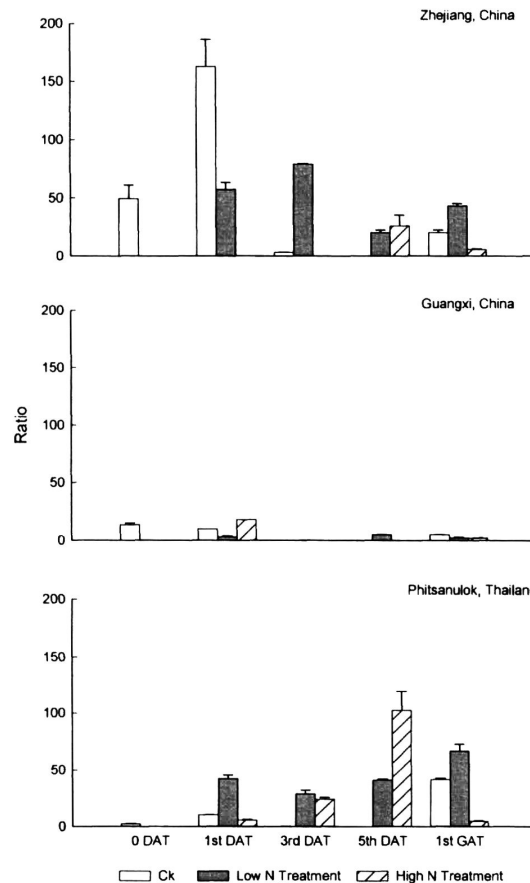


图 4.17 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
稻苗后酯酶基因 Nlu-EST17 的表达水平差异比较

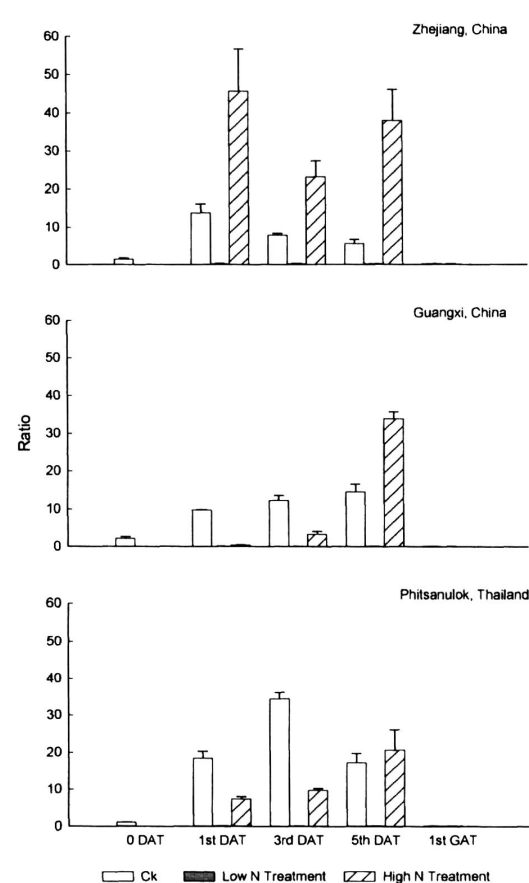


图 4.18 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
稻苗后酯酶基因 Nlu-EST18 的表达水平差异比较

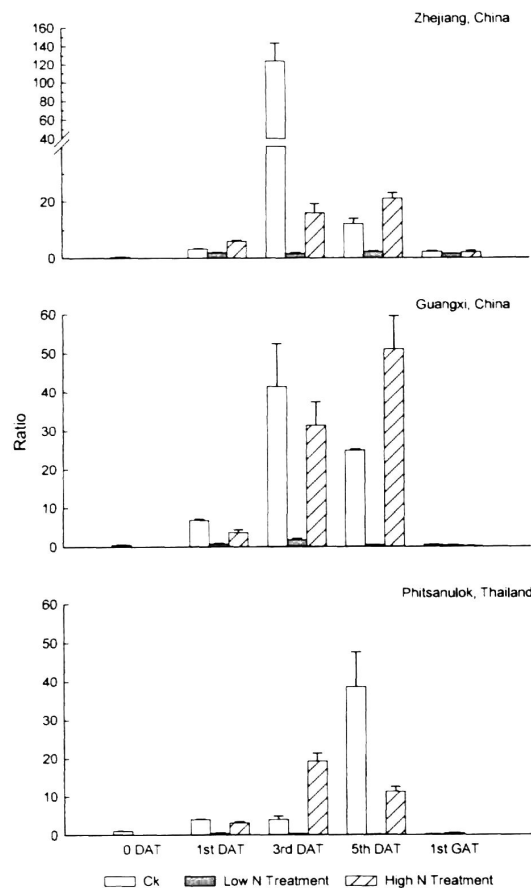


图 4.19 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST19* 的表达水平差异比较

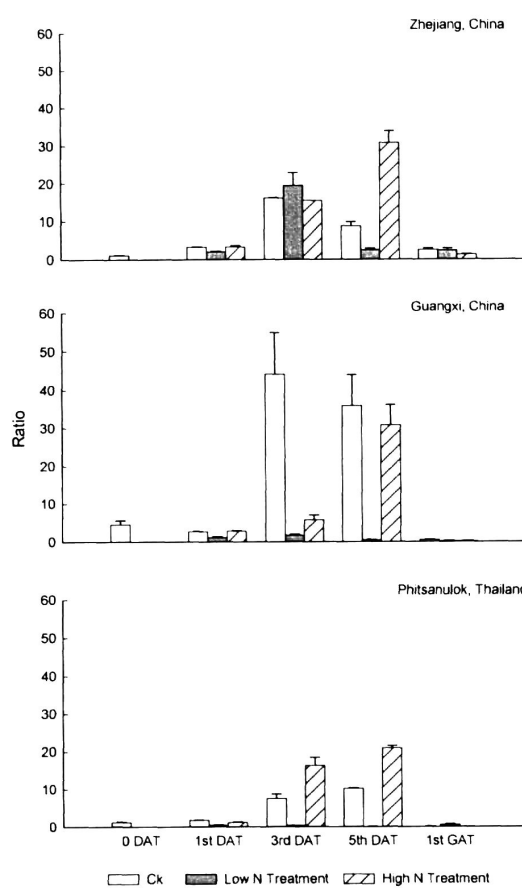


图 4.20 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST20* 的表达水平差异比较

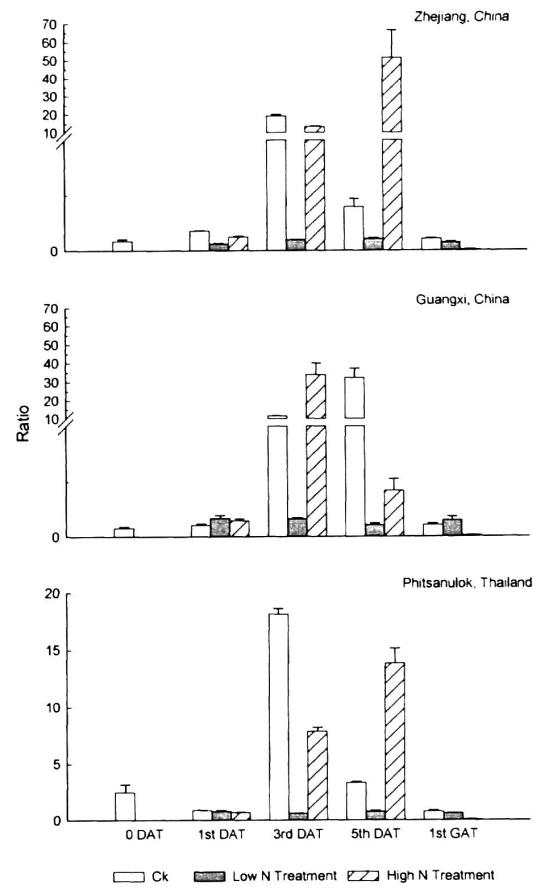


图 4.21 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 *Nlu-EST21* 的表达水平差异比较

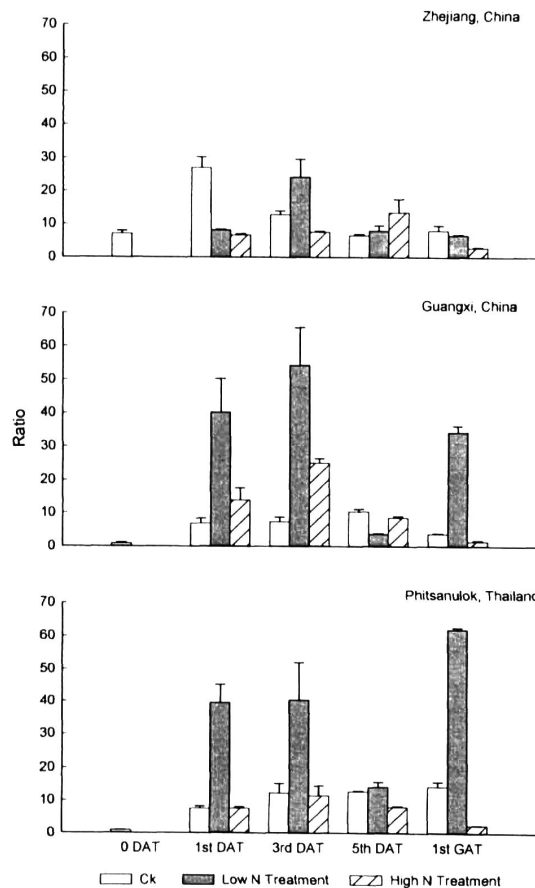


图 4.22 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 Nlu-EST22 的表达水平差异比较

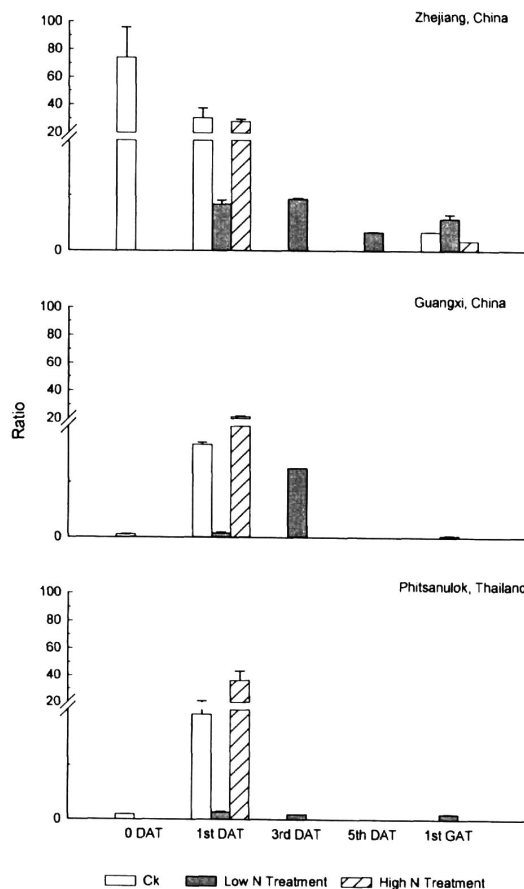


图 4.23 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 Nlu-EST23 的表达水平差异比较

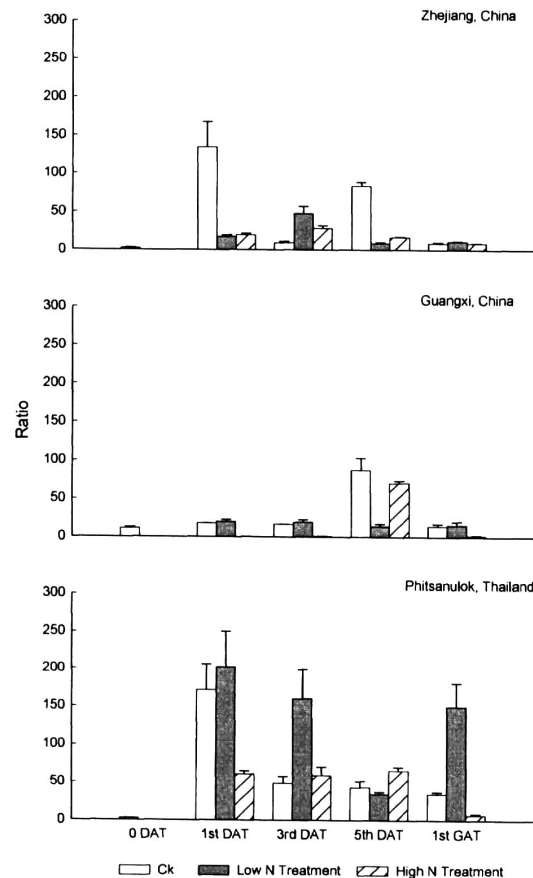


图 4.24 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理稻苗后酯酶基因 Nlu-EST24 的表达水平差异比较

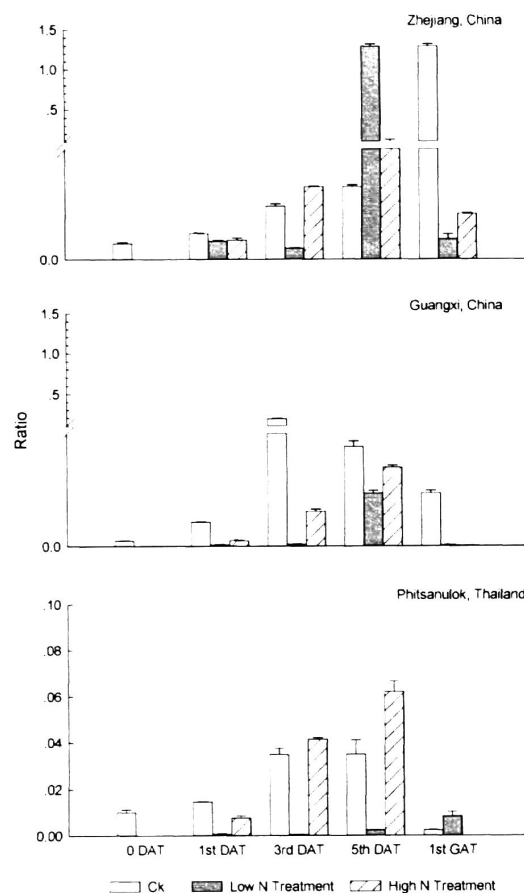


图 4.25 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
稻苗后酯酶基因 Nlu-CaE 的表达水平差异比较

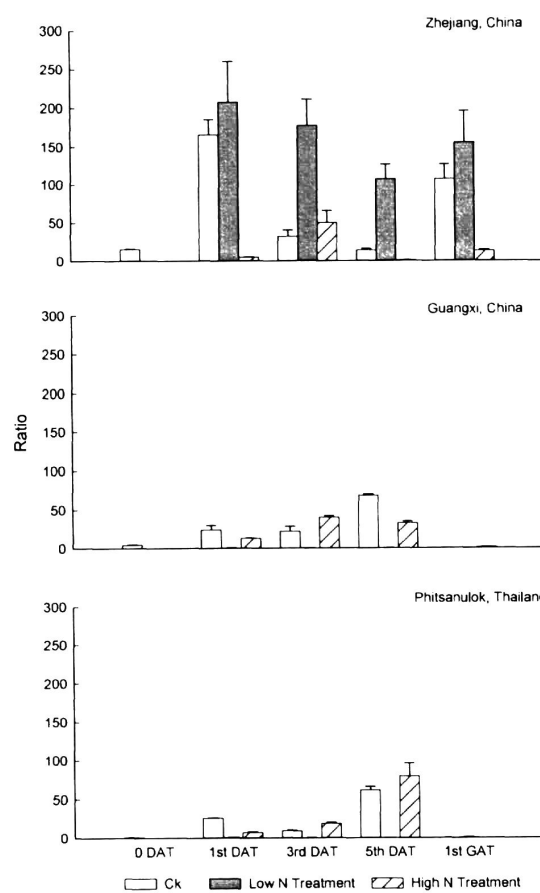


图 4.26 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
稻苗后酯酶基因 Nlu-JHE 的表达水平差异比较

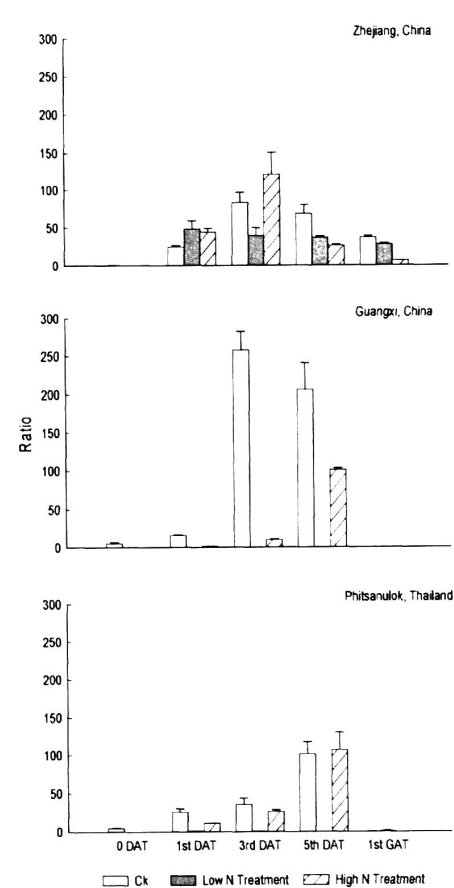


图 4.27 褐飞虱不同种群取食经不同 N 浓度处理  
稻苗后酯酶基因 Nlu-AChE 的表达水平差异比较

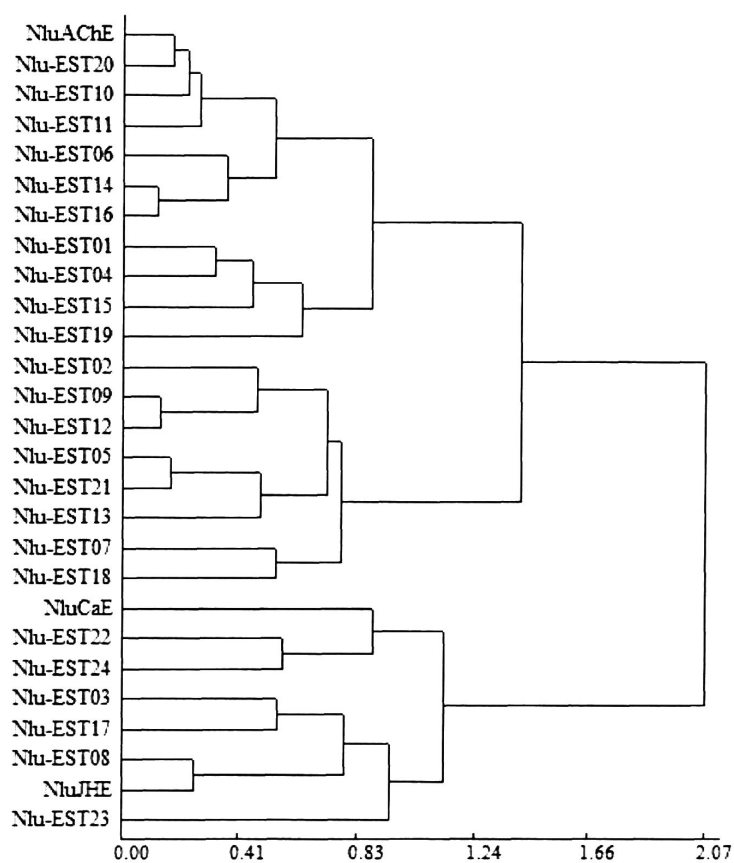


图 4.28 褐飞虱不同酯酶基因在不同种群中对不同 N 浓度响应的聚类分析图

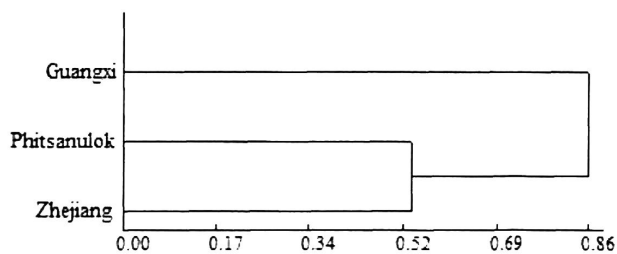


图 4.29 褐飞虱不同种群对不同 N 浓度反应的聚类分析图

## 第五章温度对褐飞虱酯酶基因表达的影响

褐飞虱的存活、生长、发育以及繁殖与温度密切相关。在 22℃-32℃时，褐飞虱的生态适应性呈抛物线变化趋势。随着温度升高，褐飞虱卵期、若虫期和成虫寿命明显缩短，而产卵量则正相反。在 2005-2007 年期间，褐飞虱在我国水稻大面积暴发，造成严重损失。此后，有学者认为气候变暖导致褐飞虱越冬面积扩大，虫源基数增加，秋季温度偏高利于褐飞虱繁殖、存活，是导致当时褐飞虱暴发的主要原因。为了能更好地理解褐飞虱对环境的适应性，并科学指导褐飞虱适期适量防治，本章探讨褐飞虱应对低温和高温条件时酯酶基因表达的变化规律。

### 5.1 材料与方法

#### 5.1.1 供试材料

供试水稻品种为籼型杂交稻：两优 363。

供试褐飞虱种群同 3.1.1，即分别采自泰国彭世洛、中国广西昭平和浙江富阳，并在室内不接触任何化学用品的情况下用两优 363 稻苗进行继代饲养。

#### 5.1.2 试验处理

对褐飞虱不同种群各取 60 对羽化第 1d 的雌雄成虫，分别接入置有两优 363 稻苗（苗龄 15d）的养虫箱中，并置于 21℃、25℃和 29℃人工培养箱中饲养，在接虫后第 1d（1<sup>st</sup> DAT）、第 3d（3<sup>rd</sup> DAT）和第 5d（5<sup>th</sup> DAT）以及饲养 1 代后成虫羽化第 1d（1<sup>st</sup> GAT），分别取大小一致的长翅型雌成虫 3 头用于总 RNA 抽提。处理期间湿度 75%±5%、光周期（L:D）为 14h:10h。每个处理重复取样 3 次。

#### 5.1.3 实时定量 PCR 检测

在不同温度下饲养的褐飞虱总 RNA 提取、DNase 酶解、逆转录以及实时定量 PCR 检测等方法同 3.1.4。

### 5.1.4 数据统计分析

实验数据应用 DPS 数据处理系统进行统计分析，方法同 3.1.5。

## 5.2 结果与分析

以褐飞虱肌动蛋白基因 (*actin3*) 为参照基因, 采用定量 PCR 方法测定比较了褐飞虱不同地区种群成虫在不同温度下取食后不同酯酶基因表达水平的变化。结果表明 (图 5.1~5.27), 褐飞虱不同种群 ( $F=631.08$ ;  $df1, df2=54, 92$ ;  $p<0.001$ ) 在不同温度 ( $F=487.97$ ;  $df1, df2=54, 92$ ;  $p<0.001$ ) 条件下的取食不同时间 ( $F=402.93$ ;  $df1, df2=81, 138.5$ ;  $p<0.001$ ), 对飞虱体内不同酯酶基因表达水平存在极显著的影响, 而且褐飞虱种群、温度和取食时间之间存在极显著的交互作用 (种群 X 温度:  $F=140.80$ ;  $df1, df2=108, 185.2$ ;  $p<0.001$ ; 种群 X 时间:  $F=224.24$ ;  $df1, df2=162, 278.4$ ;  $p<0.001$ ; 温度 X 时间:  $F=170.31$ ;  $df1, df2=162, 278.4$ ;  $p<0.001$ ; 种群 X 温度 X 时间:  $F=94.00$ ;  $df1, df2=324, 542.8$ ;  $p<0.001$ )。

高温和低温处理可导致褐飞虱体内不同酯酶基因的表达水平降低。褐飞虱不同酯酶基因根据其在不同种群中对不同温度响应的相似性, 可聚类成为 3 类 (图 5.28)。这表明褐飞虱不同酯酶基因在应对温度胁迫时, 存在协同表达效应。褐飞虱不同种群之间, 以中国浙江种群和泰国彭世洛种群在酯酶基因对温度响应表达变化上存在较高的相似性 (图 5.29)。

## 5.3 讨论

昆虫体内的生理状态受温度变化的调控, 并直接影响到存活、生长与发育以及繁殖等。这是由于生物体内的物质与能量代谢中涉及的酶活性及反应速度均受到温度的调控作用。温度对褐飞虱在不同发育阶段的生长、存活以及繁殖都有显著影响, 且调控作用各不相同。

通常, 低温导致酶活性降低, 酶反应速度变慢; 而高温易使酶蛋白变性或功能区结构变化而同样导致酶活降低, 反应速度减慢。有学者研究发现, 高温条件下褐飞虱成虫体内保幼激素酯酶活性呈下降趋势。本章研究表明, 低温和高温均能诱导褐飞虱酯酶基因表达量降低。

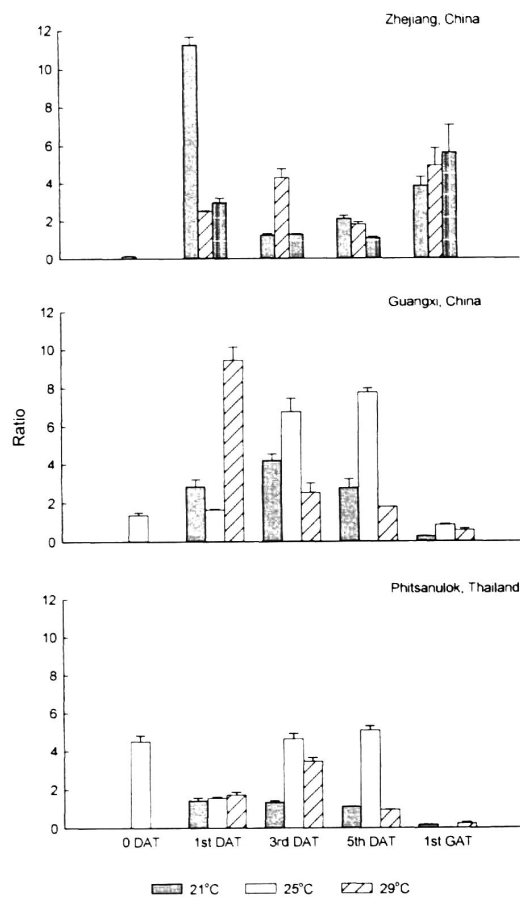


图 5.1 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 *Nlu-EST01* 的表达水平差异比较

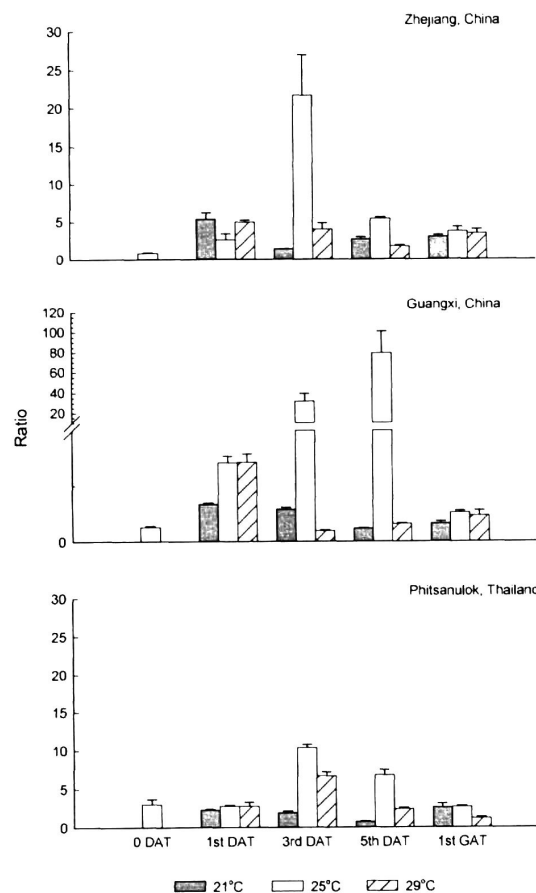


图 5.2 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 *Nlu-EST02* 的表达水平差异比较

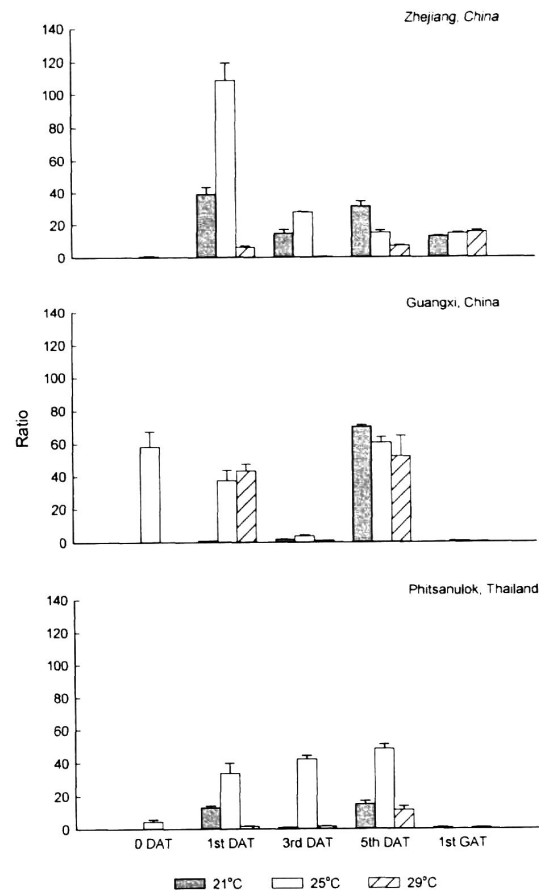


图 5.3 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 *Nlu-EST03* 的表达水平差异比较

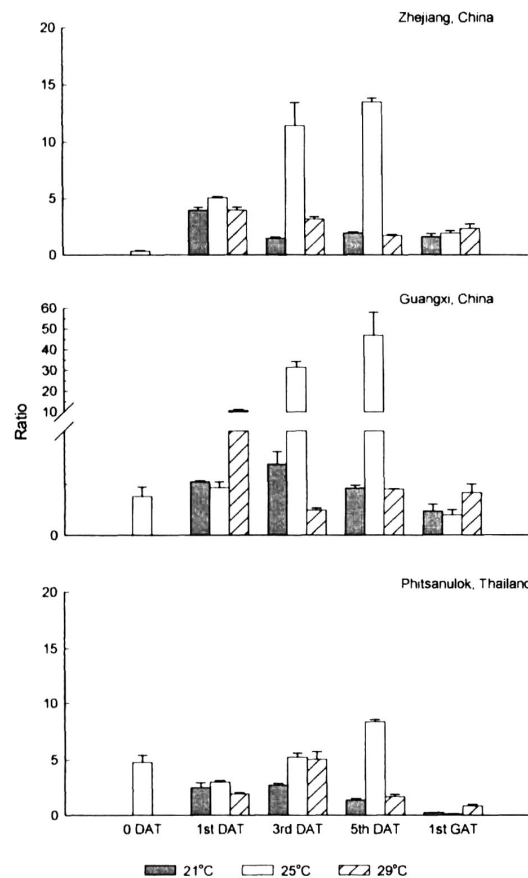


图 5.4 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST04 的表达水平差异比较

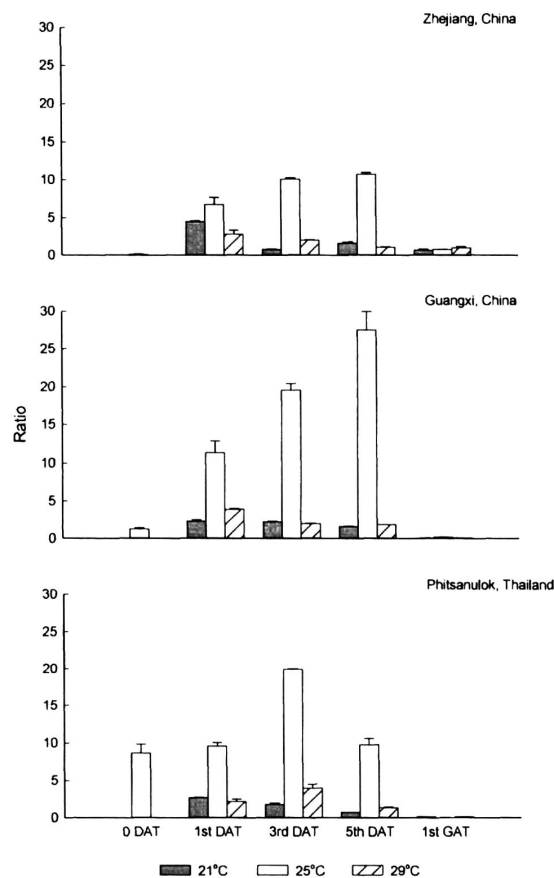


图 5.5 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST05 的表达水平差异比较

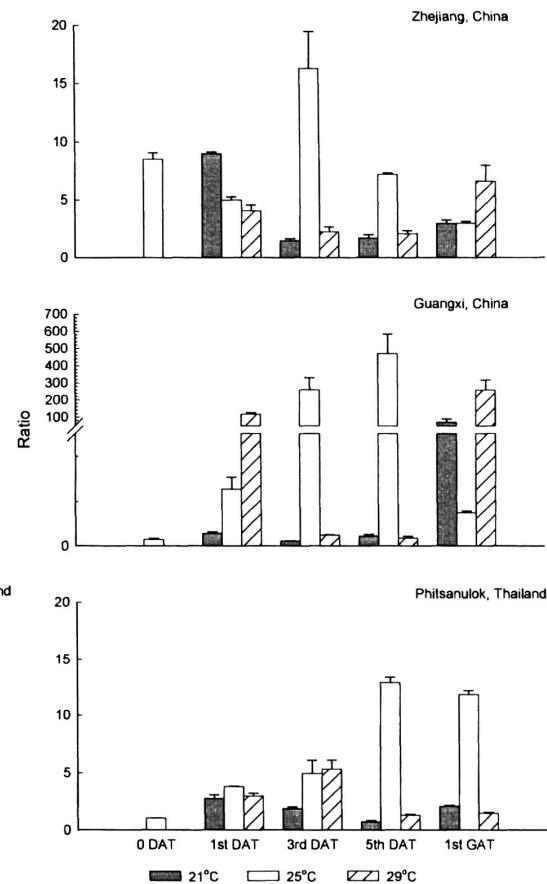


图 5.6 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST06 的表达水平差异比较

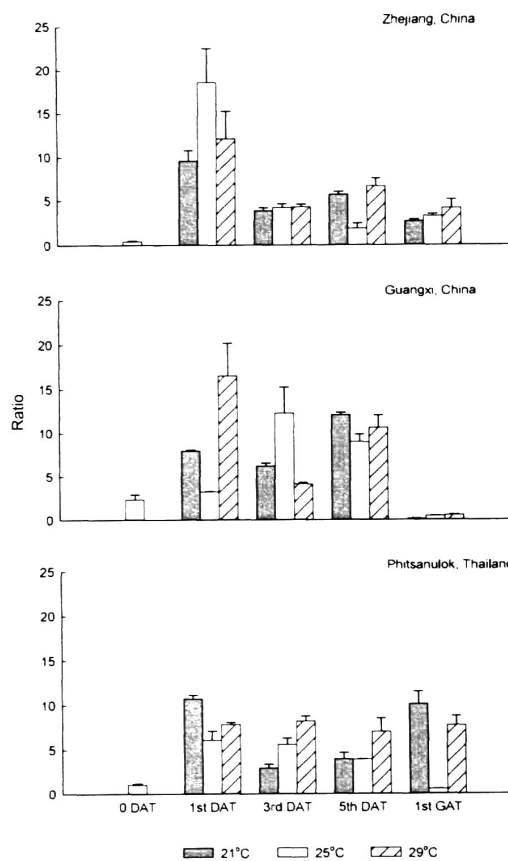


图 5.7 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST07 的表达水平差异比较

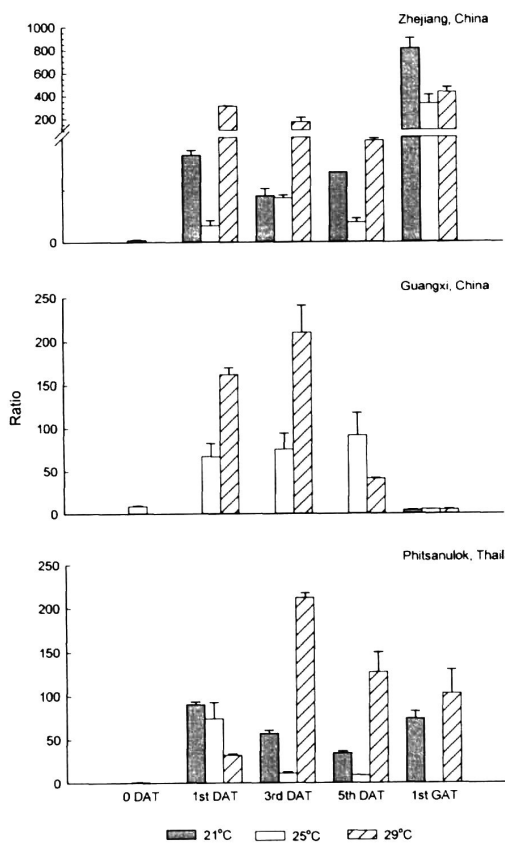


图 5.8 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST08 的表达水平差异比较

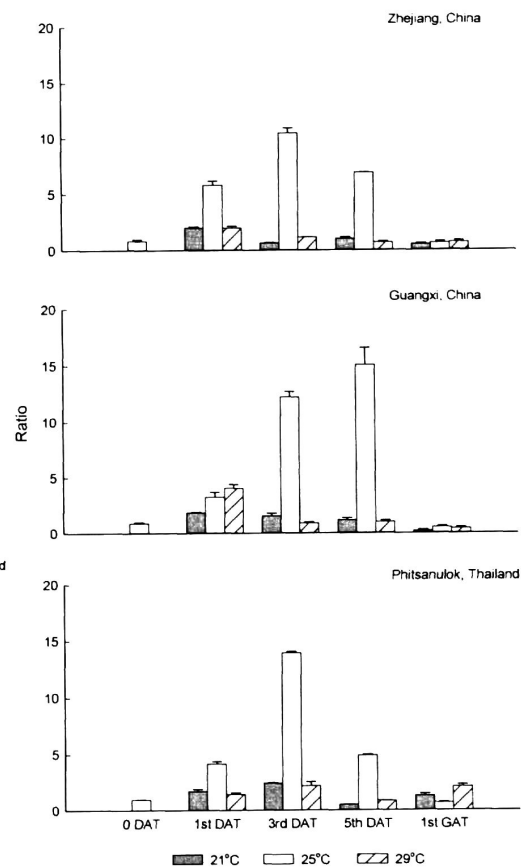


图 5.9 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST09 的表达水平差异比较

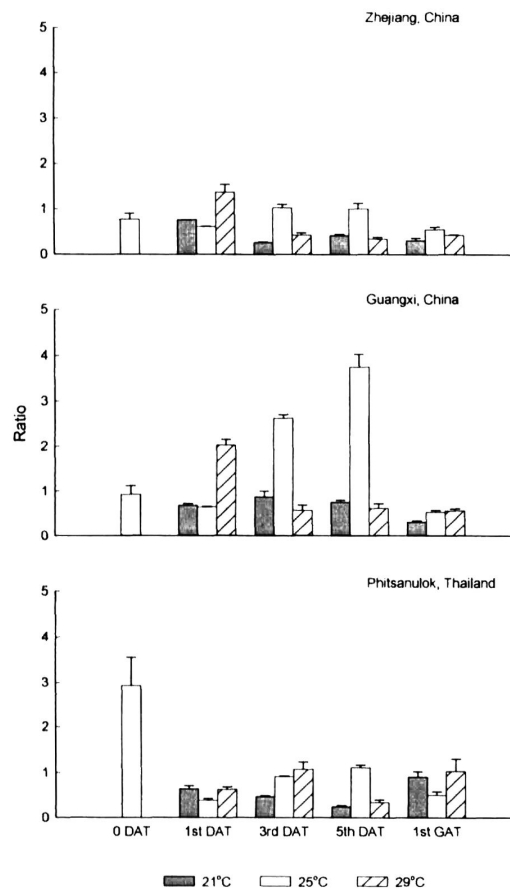


图 5.10 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST10 的表达水平差异比较

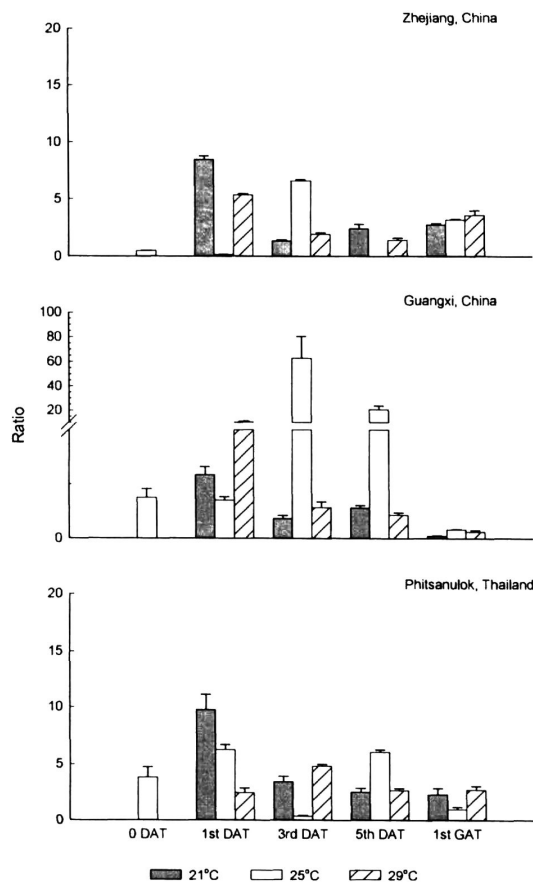


图 5.11 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST11 的表达水平差异比较

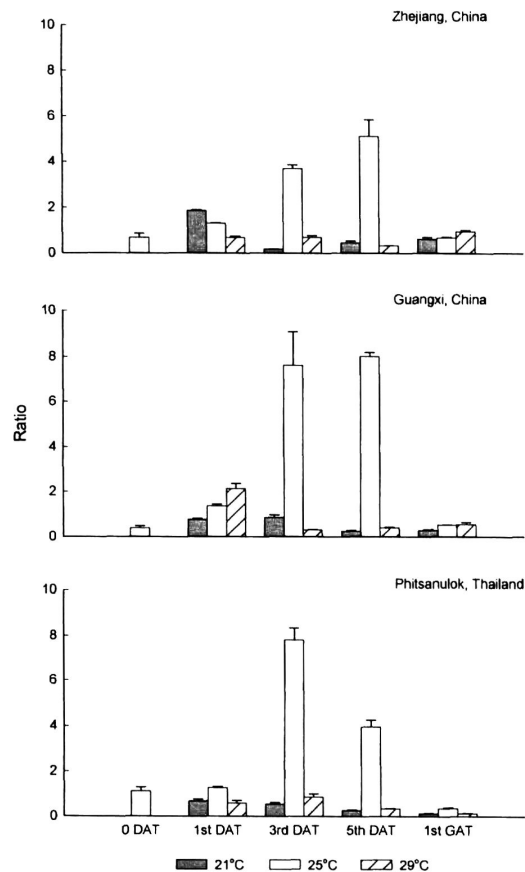


图 5.12 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST12 的表达水平差异比较

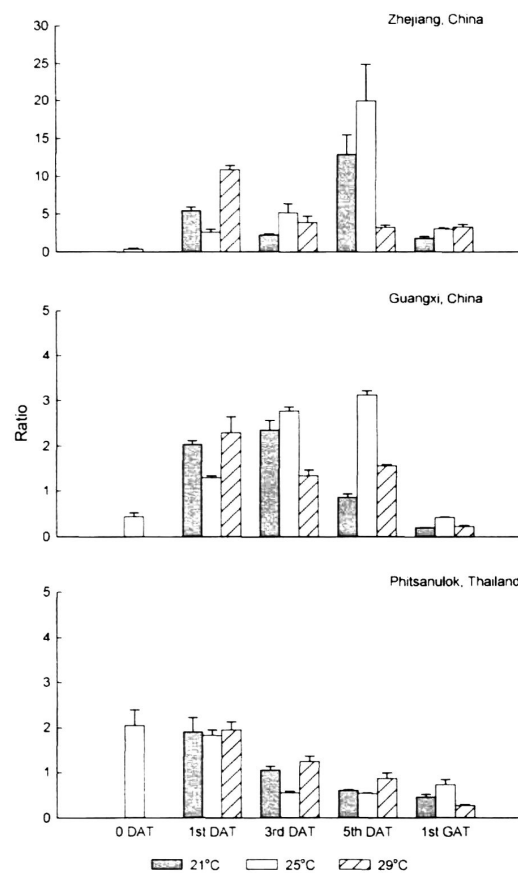


图 5.13 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST13 的表达水平差异比较

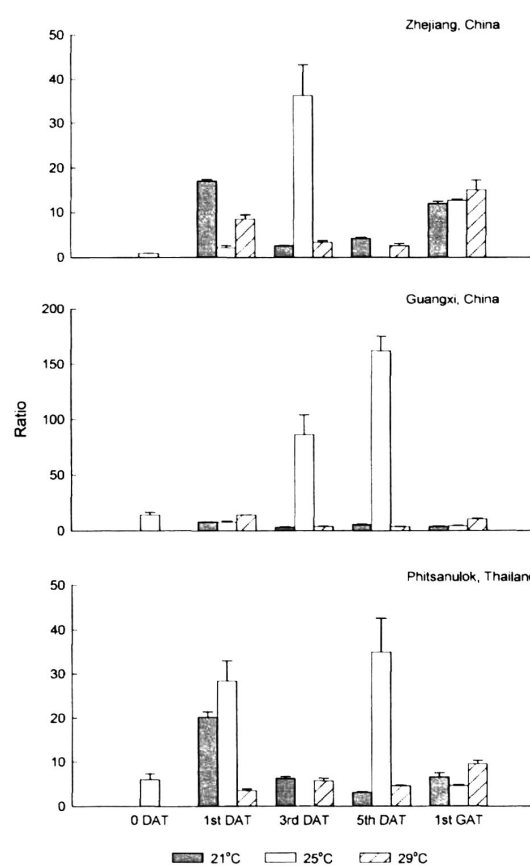


图 5.14 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST14 的表达水平差异比较

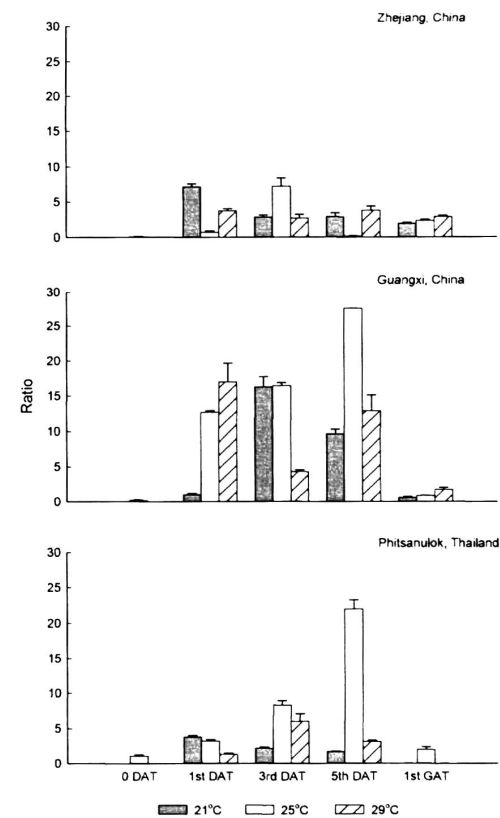


图 5.15 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST15 的表达水平差异比较

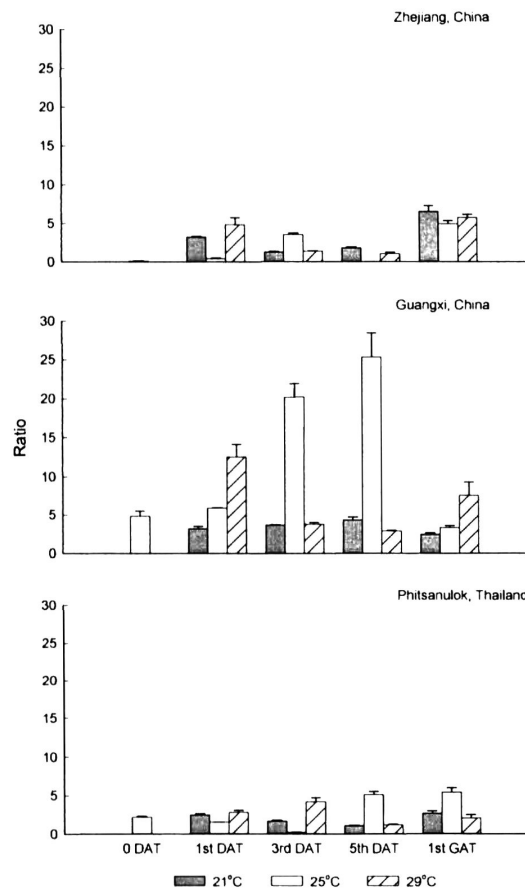


图 5.16 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST16 的表达水平差异比较

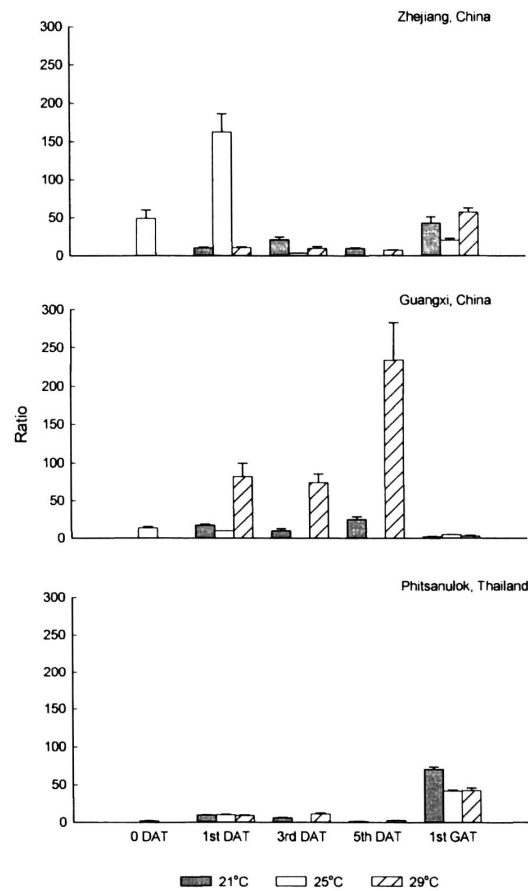


图 5.17 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST17 的表达水平差异比较

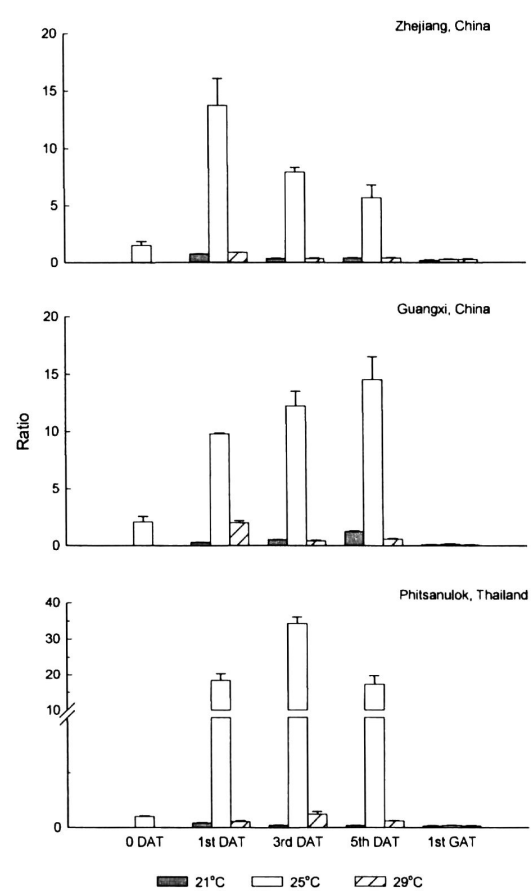


图 5.18 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST18 的表达水平差异比较

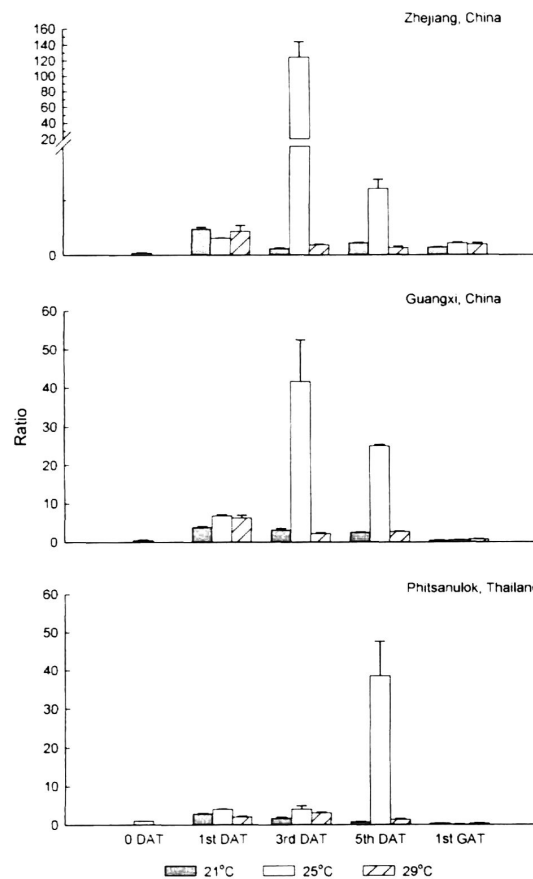


图 5.19 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST19 的表达水平差异比较

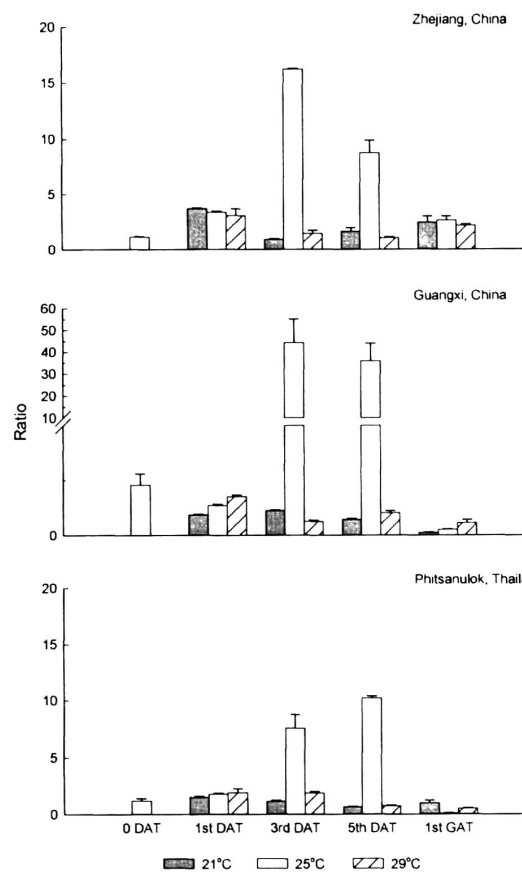


图 5.20 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST20 的表达水平差异比较

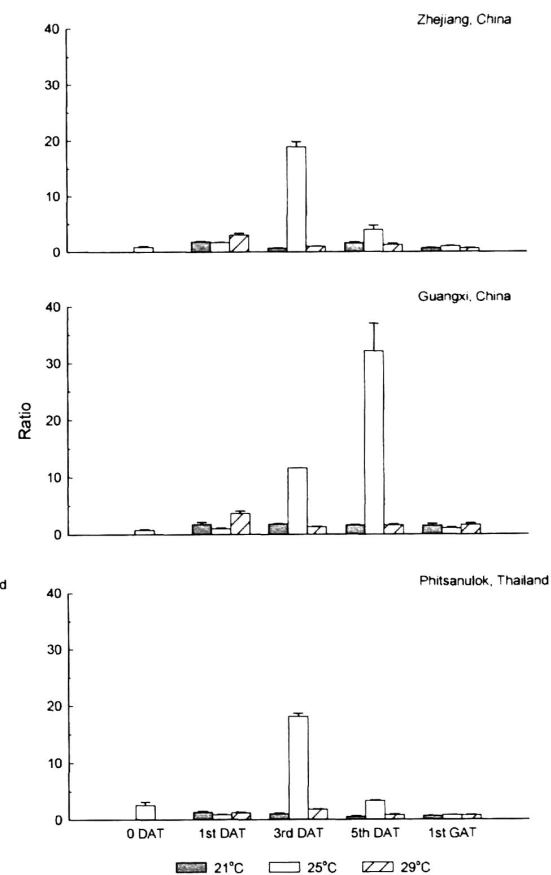


图 5.21 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST21 的表达水平差异比较

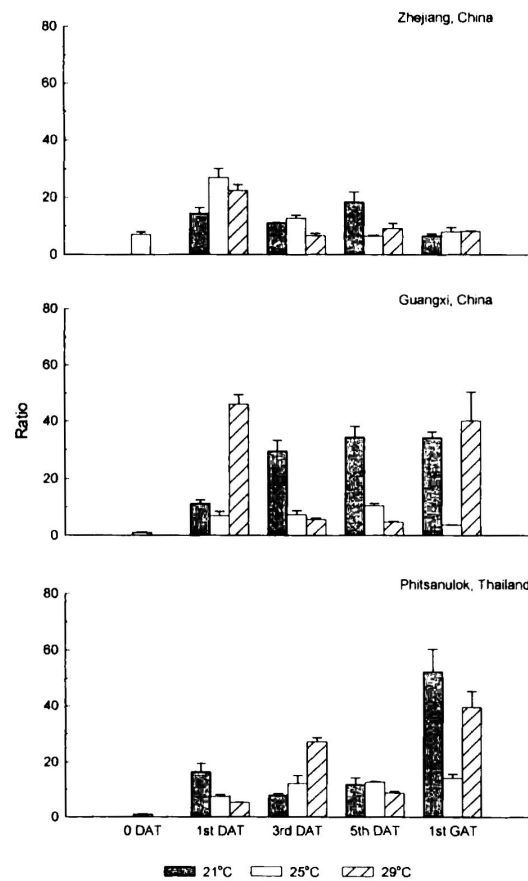


图 5.22 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST22 的表达水平差异比较

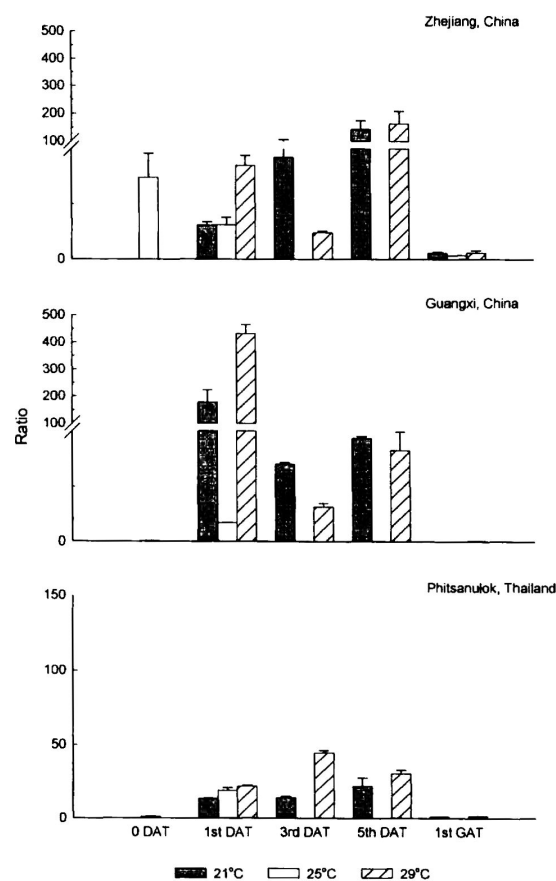


图 5.23 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST23 的表达水平差异比较

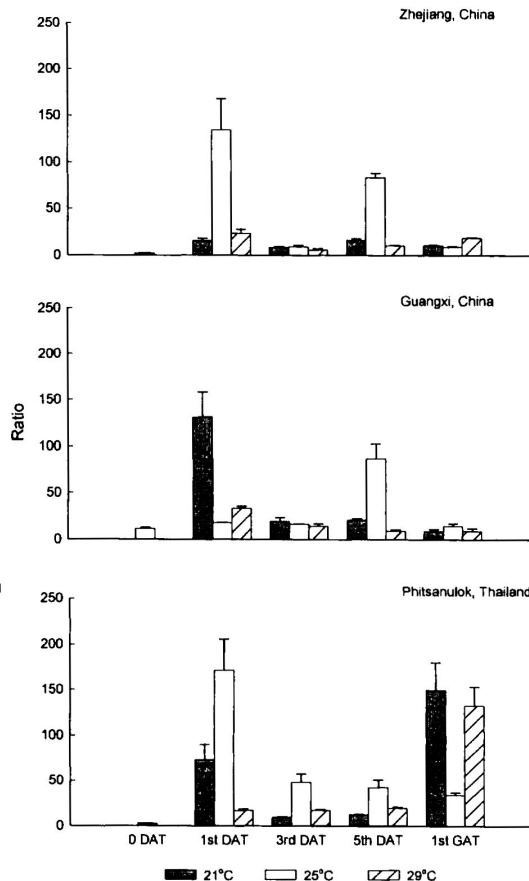


图 5.24 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 Nlu-EST24 的表达水平差异比较

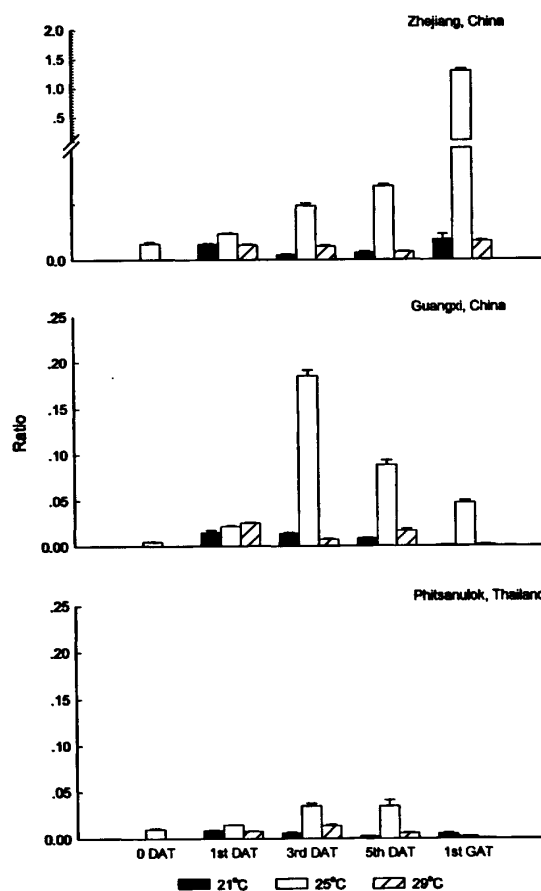


图 5.25 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 *Nlu-CaE* 的表达水平差异比较

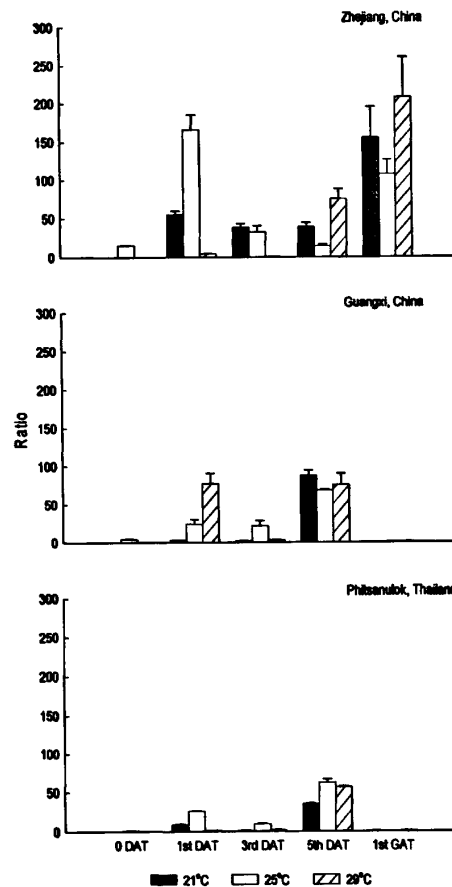


图 5.26 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 *Nlu-JHE* 的表达水平差异比较

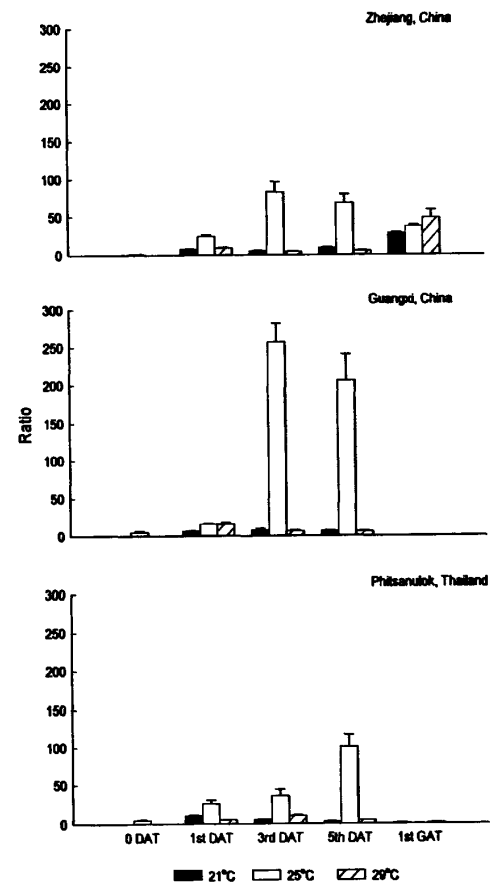


图 5.27 褐飞虱不同种群在不同温度下酯酶基因 *Nlu-AChE* 的表达水平差异比较

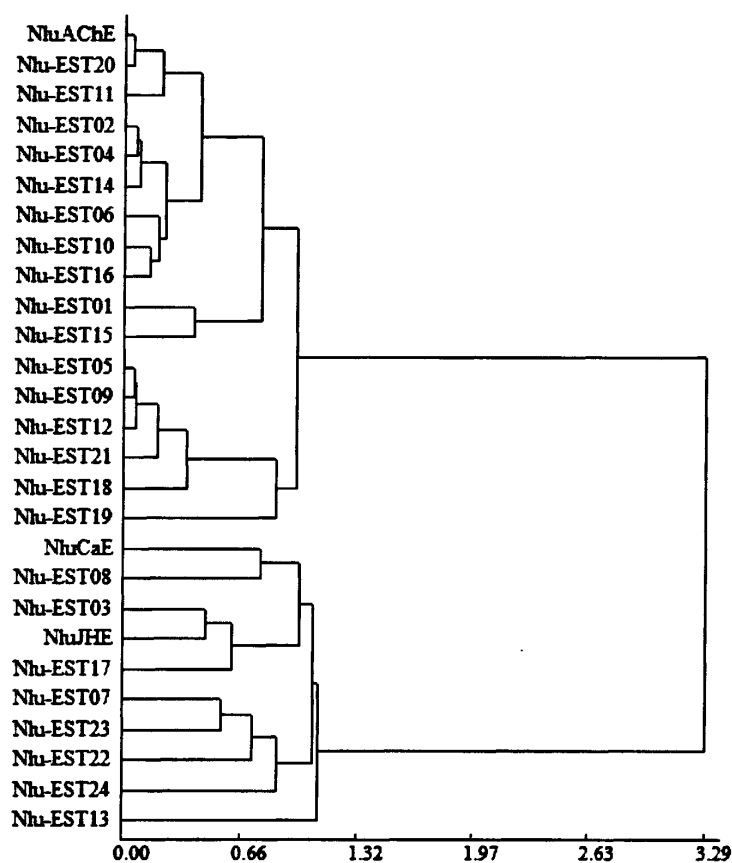


图 5.28 褐飞虱不同酯酶基因在不同种群中对不同温度响应的聚类分析图

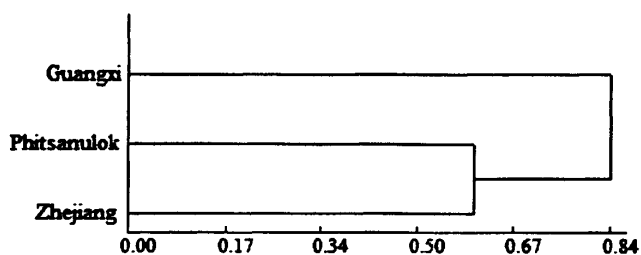


图 5.29 褐飞虱不同种群对不同温度反应的聚类分析图

## 第六章小结

目前,褐飞虱短时间暴发成灾已经引起国内外各界的广泛关注。进入本世纪以来,我国褐飞虱暴发范围发生面积进一步上升。褐飞虱的严重危害使我国杀虫剂原药用量逐渐增多,但稻谷损失数人不断增多,同时也加剧了环境污染以及农产品质量安全风险。因此,褐飞虱是我国粮食安全和生态安全最为严重的生态灾害之一。面对褐飞虱危害如此迅速的增长,现在亟待解决的问题已不再是要不要使用杀虫剂产品,而是就褐飞虱如何在短时间内暴发成灾进行准确科学的评价,如何运用分子生物学进行褐飞虱防治,为人类的生存与发展提供更多、更安全的优质产品。本论文就水稻品种,水稻含氮量以及温度对褐飞虱相关酯酶基因差异表达的影响进行了初步的研究,得到了一定的结果,为褐飞虱灾变的防治提供了一定的参考依据。

### 6.1 不同环境因子对褐飞虱酯酶基因表达的影响

目前,关于不同水稻品种、水稻含 N 量以及温度对褐飞虱生长发育及相关基因的影响已有报道,但还未见相关因子对褐飞虱酯酶基因表达的影响研究。为了更深入地反应酯酶基因对褐飞虱环境适应性的影响,本文就褐飞虱不同地区种群经不同水稻品种、稻株含 N 量以及温度处理后的酯酶基因表达水平进行了测定。

本文结果表明,褐飞虱不同种群在经不同水稻品系、施 N 水平和温度等因子处理对飞虱体内不同酯酶基因表达水平存在极显著的影响,而且褐飞虱种群与这些因子及其处理时间之间存在极显著的交互作用。通过聚类分析,发现褐飞虱酯酶基因不同种类在不同种群中对水稻品种、N 素水平和温度等因子响应上具有相似性,即不同酯酶基因对环境因子的响应存在一致性。褐飞虱不同种群之间,以中国浙江种群和泰国彭世洛种群在酯酶基因对温度响应表达变化上存在较高的相似性。这表明酯酶基因作为功能基因的分子指标可用于褐飞虱种群遗传结构的分析。

### 6.2 本研究的特色与创新点

本论文率先在筛选获得褐飞虱不同酯酶基因 EST 序列基础上,采用实时定量 PCR 方法高通量研究褐飞虱酯酶基因应对环境变化的表达情况,研究结果为深入探讨酯酶基因在褐飞虱环境适应中的作用和机制,并从中筛选出可能与农业环境因子相互作用从而影响褐飞虱灾变机率的特征性酯酶基因,为评价稻田生态系统对褐飞虱灾变的调控功能提供基础与分子指标。

## 6.3 今后有待研究的问题

由于时间等种种原因，本文仅对褐飞虱环境适应相关酯酶基因片段差异的表达影响进行了初步的研究，尚有很多工作需进一步深入研究。主要有：

- 1) 明确褐飞虱基因组上的酯酶基因数量及其结构分布；
- 2) 探明褐飞虱不同酯酶基因在各发育阶段的表达谱；
- 3) 筛选并克隆差异表达的酯酶基因全长序列，明确其生物学功能；
- 4) 应用褐飞虱酯酶基因及其响应环境因子表达水平的多态性研究褐飞虱迁飞种群的遗传结构组成。等

## 主要参考文献

- 程家安, 朱金良, 祝增荣, 章连观. 2008. 稻田飞虱灾变与环境调控. 环境昆虫学报. 30 (2):176-182
- 戴华国, 宋小玲, 吴晓毅, 等. 1997. 高温对稻褐飞虱生殖与发育的影响. 昆虫学报. 40(增): 195-164
- 邓业成, 王萌长, 等. 1995. 褐飞虱对马拉硫磷的抗性与酯酶的关系. 西南农业学报. 10(4): 74-78
- 高希武, 梁同庭, 等. 1993. 阿特拉津和敌敌畏对棉铃虫和家蝇羧酸酯酶以及 GSH-S-转移酶的诱导作用. 昆虫学报. 12(2): 267-275
- 郭晓霞, 郑哲明, 等. 2000. 酯酶同工酶多态性及其在昆虫分类学中的应用价值. 昆虫知识. 37(6): 370-374
- 国际褐飞虱论文集. 1980. 中国农业科学院科技情报研究所
- 冯从经, 戴华国, 武淑文. 2001. 褐飞虱高温条件下应激反应及体内保护酶系活性的研究. 应用生态学报. 13: 409-413
- 廖世纯, 王凤英, 黎柳锋, 等. 2011. 水稻褐飞虱防控策略. 中国农学通报 .21(7):240-244
- 李绍文, 梦玉萍, 等. 1987. 膜翅目昆虫酯酶同工酶的比较研究. 昆虫学报. 30(3): 266-270
- 李飞, 韩召军, 等. 2003. 抗性品系棉蚜乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的变异. 昆虫学报. 46(5): 578-583
- 李汝铎, 丁锦华, 胡国文, 等. 1997. 褐飞虱及其种群管理. 复旦大学出版社
- 李腾武, 宗静, 高希武, 郑炳宗. 1997. 寄主植物对桃蚜羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的诱导作用. 植物保护. 23(2): 14-16
- 刘泽文, 韩召军, 等. 2002. 羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶在褐飞虱对甲胺磷抗性的发展中的作用. 农药学报. 11(4): 51-55
- 刘泽文, 韩召军, 等. 2003. 羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶在褐飞虱对马拉硫磷抗性发展中的作用. 昆虫学报. 4(2): 250-253
- 娄永根, 程家安. 2011. 稻飞虱灾变机理及可持续治理的基础研究. 应用昆虫学报. 48(2): 231-238
- 吕仲贤. 氮肥对褐飞虱的生态适应性及其与水稻和天敌关系的影响. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2003
- 吕仲贤, 俞晓平, 郑许松, 等. 1997. 褐飞虱致害性变异过程及其体内保护酶的变化. 昆虫学报. 40(增): 122-127
- 唐振华, 等. 1982. 农药害虫抗药性[M]. 北京农业出版社
- 唐振华, 周成理, 等. 1992. 抗性小菜蛾的乙酰胆碱酯酶敏感性. 昆虫学报. 29(4): 121-130
- 谭维嘉, 杨雪梅. 1993. 寄主植物对棉铃虫生理代谢的影响. 植物保护学报. 20(2): 147-153
- 王彦华, 沈晋华, 王鸣华, 等. 2005. 褐飞抗药性性机理及其治理性研究进展. 农药科学与管理. 26(4): 24-28
- 王小兰. 2003. 水稻抗褐飞虱基因表达调控的分析和抗虫相关 cDNA 的克隆博士学位论文. 武汉大学
- 吴刚, 尤民生, 等. 2000. 抗性和敏感小菜蛾谷胱甘肽 s-转移酶以及谷胱甘肽的比较. 福建农业大学学报. 11(4): 16-22
- 夏敬源. 2008. 我国重大农业生物灾害暴发现状与防控成效. 中国植保导报. 28 (1): 5-9
- 杨之帆. 2005. 褐飞虱对水稻品种抗性的分子反应和相关 cDNA 的克隆博士学位论文. 武汉大学
- 郑许松, 陈桂华, 等. 2009. 温度和氮肥对褐飞虱存活、生长发育和繁殖的交互作用. 应用生态学

报. 20(5): 1171-1175

- Arpagaus. 1988. Vertebrate insulin induces diapause termination in *Pieris brassicae* pupae. Roux's Archives of Developmental Biology. 8: 527-530
- Barbour JD, Farrar RR, Kennedy GG. 1991. Insecticide resistance in tomato. Entomol. Exp. Appl. 60: 289-300
- Balasubramanian P, Palaniappan SP, Gopalan M. 1983. The effect of carbofuran and nitrogen on leaf folder incidence. IRRN. 8: 13-14
- Bentz J, J Goschnick, *et al.* 1995. Analysis and classification of individual outdoor aerosol particles with SIMS time-of-flight mass spectrometry. Fresenius journal of analytical chemistry. 353(5): 603-608
- Bentz JA, Reeves J, *et al.* 1996. The effect of nitrogen fertilizer applied to *Euphorbia pulcherrima* on the parasitization of *Bemisia argentifolii* by the parasitoid *Encarsia formosa*. Entomol. Exp. Appl. 78(1): 105-110
- Cheng CH. 1971. Effect of nitrogen application on the susceptibility in rice to brown Planthopper attack. J. Taiwan Agriculture Research. 20(3): 21-30
- Cheng JA, Zhu ZR. 2006. Analysis on the key factors causing the outbreak of brown planthopper in Yangtze area, China in 2005. Plant Protection. 32 (4) : 1-4
- Cisneros JJ, Godfrey LD. 2001. Midseason pest status of the cotton aphid in California cotton: nitrogen a key factor? Environ. Entomol. 30: 501-510
- Cohen MB, Alam SN, *et al.*, 1997. Brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, resistance in rice cultivar IR64: mechanism and role in successful *N. lugens* management in Central Luzon, Philippines. Entomol. Exp. Appl. 85(3): 221-229
- De Moraes CM, Meseher MC, Tumlinson JH. 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel non-specific females. Nature. 410: 557-580
- De Kraker J, Rabbinge R, van Huis A, van Lenteren JC, Heong KL. 2000. Impact of nitrogenous-fertilization on the population dynamics and natural control of rice leafhoppers (Lep: Pyralidae). International Journal of Pest Management. 46(3): 225-235
- Dicke M, van Loon JJ A. 2000. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. Entomol. Exp. Appl. 97: 237-249
- Dobermann AT, Fairhurst. 2000. Rice: Nutrient disorders & nutrient management, Int. Rice Res. Inst. 13-39
- Fischer K, Fiedler K. 2000. Response of the copper butterfly *Lycaena tityus* to increased leaf nitrogen in natural food plants: evidence against the nitrogen limitation hypothesis. Oecologia. 124: 235-241
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2001. Statistical Databases [EB/OL]
- Fox LR, Eisenbach J. 1992. Contrary choices: Possible exploitation of enemy-free space by herbivorous insects in cultivated vs. wild crucifers. Oecologia. 89: 574-579
- Haddad NM, Haarstad J, Tilman D. 2000. The effects of long-term nitrogen loading on grassland insect communities. Oecologia. 124: 73-84.
- Hayashi H, Chino M. 1990. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of the rice plant. Plant Cell Physiol 31: 247-251
- Heinrichs EA. 1979. Control of leafhopper and planthopper vectors of rice viruses. In: Moramorosch K, Harris KF (eds) Leaf hopper vectors and plant disease agents. Academic Press. New York. pp. 529-558

- Hittalmani SN, Huang, *et al.* 2003. Identification of QTL for growth-and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. TAG Theoretical and Applied Genetics. 107(4): 679-690
- Karban R, Baldwin IT. 1997. Induce dresponsesto herbivory. University of Chicago. Pp.1-319
- Khush GS. 1979. Genetics of and breeding for the resistance to the brown planthopper. In: Brown Planthopper: threat to rice production in Asia. International Rice Research Institute (IRRI). Los Banos,pp. 321-332
- Klessler A, Baldwin IT. 2001. Defensive function of herbivore-induced Plant volatile emissions in nature. Science. 291: 2141-2144
- Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM. 1997. Regulation of Protease inhibitors and Plant defense. Trends Plant Sci. 2:379-384
- Lam E, Kato N, Lawton M.2001. Rrogrammed cell death, mitochondria and the Plant hypersensitive response. Nature. 411:848-853
- Li R, Ding J, *et al.* 1996. The Brown Planthopper and its Population Management. Shanghai, Fudan University Press. 4(1): 97-108
- Lu ZX, Heong KL, *et al.*2004. Effects of Plant Nitrogen on Ecological Fitness of the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal in Rice. Journal of Asia-Pacific Entomology. 7(1): 97-104
- Mac Lean LM. 2002. Constructing a social safety net in Africa: An institutionalist analysis of colonial rule and state social policies in Ghana and Côte d'Ivoire. Studies in Comparative International Development (SCID).37(3): 64-90
- Mattson WJ. 1980. Herbivory in relation to plant nitrogen content. Ann. Rev. Ecol. Syst. 11: 19-61
- Oakeshott JG *et al.* 2005. Multiple mutations and gene duplications conferring organ ophosphorus insecticide resistance have been selected at the rop-1 locus of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. Journal of Molecular Evolution. 2: 207-220
- Ollis D, Fuzuki ES. 1992. Development of affinity chromatography-aided radioactive assay of monoclonal antibody. Biotechnology Techniques. 1: 39-44
- Park DS, Lee SK, *et al.* 2007. The identification of candidate rice genes that confer resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) through representational difference analysis. TAG Theoretical and Applied Genetics 115(4): 537-547
- Preap V, Zalucki MP, Nesbitt HJ, Jahn GC. 2001a. Effect of fertilizer, pesticide treatment, and Plant variety on the realized fecundity and survival rates of brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*, generating outbreaks in Cambodia. Journal of Asia-Pacific Entomol. 4(1): 75-84
- Rossi AM, Brodbeck BV, Strong DR. 1996. Response of xylem-feeding leafhopper to host plant species and plant quality .Chemical Ecol. 22(4): 653-671
- Ryals JA, Neuenschwander VH, Willzts MG, *et al.*1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell. 8: 1809-1819
- Saggar S, Hedley M, *et al.*1993. Assessment of the relative agronomic effectiveness of phosphate rocks under glasshouse conditions. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 34(2): 141-151
- Satoh N, Yoshida S, Satou Y. 1998. Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology
- Siemann E. 1998. Experimental tests of effects of plant productivity and diversity on grassland arthropod diversity. Ecology. 79(6): 2057-2070
- Sogawa K, Liu GJ, Shen JH. 2003. A review on the hypersusceptibility of Chinese hybrid rice to insect pests. Chin J RiceSci. 17:23-30
- Sogawa K. 1982. The rice brown planthopper: Feeding physiologyand host plant interactions. Annu

- Stowe KA, Marquis RJ, Hochwender CG, *et al.* 2000. The evolution of tolerance to consumer damage. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 565-595
- Tamayo MC, Rufat M, Bravo JM. *et al.* 2000. Accumulation of maize Proteinase inhibitor response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive Proteinases of *Spodoptera littoralis* larvae. *Plant.* 211:62-71
- Turlings TCJ, Benrey B. 1998. Effects of Plant metabolites on the behavior and development of parasitic wasps. *Ecoscience.* 5: 321-333
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schlesinger WH, Tilman DG. 1997. Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Sources and Consequences. *Ecological Applications.* 7(3): 737-750
- Watanabe T, Kitagawa H. 2000. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *J Econ Entomol* 93: 1192-1198
- Walling LL. 2000. The Myriad Plant Responses to Herbivores. *Plant Growth.* 10:195-216
- Xu Z, De Long LE, *et al.* 1994. Vibrating reed study of the flux line dissipation of ceramic and single-crystal (Ba, K) BiO 3. *Journal of superconductivity.* 7(5): 835-839
- Yoshida S, Forno D, Cock J, *et al.* 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute. Manila, Philippines