

RAPD 技术在昆虫分类学研究中的应用*

孟子焯^{1,2}, 陈晓琴¹, 江世宏¹, 李广京¹

(1. 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院, 广东 深圳 518055; 2. 华中农业大学 昆虫资源研究所, 武汉 430070)

摘要:传统昆虫分类学主要从昆虫形态特征着手,是进行昆虫分类的主要方法,但形态分类的方法在较低的分类阶元中有着较大的局限性。近年来分子生物学技术同传统分类学方法相结合,在昆虫分类学研究中得到广泛的应用。本文概述了随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术的技术基础,分析了 RAPD 简便快捷、费用低、灵敏度高、对模板纯度要求不高、能充分反映模板的多态性等技术优势;同时指出了该技术稳定性和可重复性差、不能对纯合体杂合体加以区分、存在共迁移问题等不足之处;阐述了近年来国内外 RAPD 技术在同翅目、蜚蠊目、双翅目、鳞翅目、直翅目、鞘翅目等昆虫的分类鉴定及昆虫系统发育分析中的应用。本文认为, RAPD 技术扩展了分子生物学技术在昆虫分类学的应用范围,该技术的成功应用,极大地提高了昆虫分类学研究的水平,并且随着技术手段的不断进步有着更为广阔的应用前景。

关键词: RAPD; 昆虫分类鉴定; 昆虫系统发育; 应用

中图分类号: Q969

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2009)02-0033-06

昆虫分类学(Insect taxonomy)是研究昆虫的命名(Nomenclature)、鉴定(Identification)、描述(Description)及其系统发育(Phylogeny)和进化(Evolution)的科学^[1]。它不仅是昆虫学的一个重要分支,而且是昆虫学其他所有分支学科的基础。如果不先对昆虫进行科学的分类,就无法以科学的方式研究昆虫,从而影响到昆虫学其他分支学科研究结果的客观性、可比性和重复性。因此,对昆虫分类学的研究具有重要的现实意义。

传统昆虫分类学主要从昆虫形态特征如外部形态和外生殖器来进行分类鉴别,这是进行昆虫分类的主要方法。但形态分类的方法在较低的分类阶元中有着较大的局限性,如一些近缘种或姊妹种中,比较难确定它们的分类学界线。近年来,分子生物学技术得到了快速发展,并同传统分类学方法相结合,使昆虫分类学研究具有更广阔的前景。RAPD 技术就是目前在昆虫分类学研究中应用比较广泛的分子生物学技术之一。

1 RAPD 技术

随机扩增多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术是 1990 年美国杜邦公司的 Williams^[2]和加利福尼亚生物研究所的 Welsh^[3]

领导的 2 个小组几乎在同时发展起来的。它的主要技术基础是 DNA 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR),以一种或多种人工合成的随机引物来对模板 DNA 进行 PCR 扩增,再进行电泳分离和对 DNA 片段染色,由于不同物种的基因组中与引物相匹配的碱基序列的位置和数量都可能不同,所以扩增产物的大小也有不同,扩增片段 DNA 的多态性也就反映了模板 DNA 的多态性,从而可以通过多态性的比较,应用于昆虫物种的鉴定和系统发育关系的研究中。

1.1 RAPD 技术的优势

RAPD 操作简便快捷,技术容易掌握,自动化程度高。RAPD 技术中使用的主要仪器为现在实验室里常见的 PCR 仪,使得模板 DNA 扩增过程实现自动化,大大降低了研究费用。其次, RAPD 能够对整个模板 DNA 进行标记,有很大的随机性,可充分展现出模板 DNA 的多态性^[4]。因此,它能够在没有任何分子遗传背景的情况下,分析模板 DNA 的多态性。

同时, RAPD 的引物丰富,其采用的引物是随机引物,常由 10 个寡核苷酸组成,引物可人工合成,很多公司都能生产。目前 RAPD 引物已经有千余种,可以针对不同模板 DNA 来选取不同的引物。另外,

* 收稿日期 2008-07-18 修回日期 2008-09-24

资助项目 国家自然科学基金(No. 30570204, No. 30170122)

作者简介 孟子焯,男,硕士研究生,研究方向为昆虫学,通讯作者 江世宏, E-mail: sjjiang@oa.szpt.net。

RAPD 技术中模版 DNA 用量少。PCR 扩增时仅需模版 DNA 20 ~ 100 μg 灵敏度高,扩增时,引物一个碱基的变化都可能引起扩增谱带的巨大变化。

该技术对模版 DNA 的纯度要求不高也是其优点之一。Barro 等^[5]的研究表明酒精保存的标本和干制标本都可用于 RAPD 分析。模版中混有少量的 RNA 或蛋白质对扩增结果几乎没有影响。这就可以省略提取模版 DNA 过程中的一些纯化过程,减少了模版 DNA 的损失^[6],适用于小型昆虫模版 DNA 的提取。

1.2 RAPD 技术的不足之处

RAPD 技术受环境影响的因素较多,因而试验稳定性和可重复性较差。RAPD 分析中重复性不太高的原因是在 PCR 反应中会产生一些扩增产物的改变。并且,不同的研究者采用的程序不同,或者即使设置相同的反应程序,但所使用的仪器类型试剂和耗材在不同厂家间也有差异,从而扩增产物也会受到影响。此外还有模版 DNA 的完整性、PCR 的变性温度、Taq 酶的选择、 Mg^{2+} 的浓度、外源 DNA 的污染等因素都可以对 RAPD 结果产生影响。值得注意的是,在扩增反应过程中,引物的熔点值较低也是 RAPD 实验结果的可重复性差的一个重要原因:其反应易受环境条件的影响,导致引物降解,扩增失败^[7]。

从适用范围来看,由于 RAPD 标记为显性标记,虽符合孟德尔遗传定律,但不能区分纯合体和杂合体基因型,故而在遗传分析和构建遗传图谱等方面受到了一定限制。

此外从电泳效果来看,该技术存在共迁移问题。在不同个体的 PCR 产物出现分子量大小相同的条带,并不能保证这些个体拥有同源的片段,这些条带也有可能包含了不同的扩增产物。因为所用的凝胶电泳类型(一般是琼脂糖凝胶电泳)只能分开不同分子量的片段,而不能分开分子量相同但碱基序列不同的片段^[8]。

正是由于 RAPD 技术有着上述的局限性,因而在进行同一项研究工作时需要注意所选用的试剂、配制的反应体系、所用的引物、反应程序、染色条件等因素必须严格一致并要选用优良的电泳设备。

2 RAPD 技术在昆虫分类学研究中应用

昆虫常规的分类方法是根据昆虫的分类特征、生物学特性和地理分布等来进行的^[9]。随着分子生物学技术以及相关的计算机分析软件的推出,越来越

越多的分类学家开始注意到了物种间的遗传物质的差异,并以此为手段探讨它们之间的亲缘关系和对近缘种进行分类鉴定。RAPD 技术能快速、简捷、有效地进行基因组 DNA 多态性检测,通过选择合适的引物来反映出物种基因内部的差异,在昆虫分类学研究中得到了广泛应用。

2.1 昆虫分类鉴定

害虫的防治和益虫的利用常常需要对物种进行准确鉴定。昆虫的鉴定多是依据传统分类的结果以形态特征为依据开展的^[8]。但对于属、种等低级分类单元,特别是一些近缘种之间,仅凭借外部形态有时很难区别。RAPD 技术借助其在物种鉴定中的较强优势,在同翅目、蜚蠊目、双翅目、直翅目、鞘翅目等不同昆虫类群中得到了广泛应用。

Black^[10]首先将 RAPD 技术用于同翅目 4 种蚜虫的鉴别比较。他采用了 4 种 10 个碱基的随机引物对 4 种蚜虫进行了 RAPD 反应,检测它们扩增产物的多态性。结果表明,根据电泳图谱能明确地区别 4 个种。Black^[10]还用 RAPD 技术检测和鉴定了蚜虫体内的 2 种寄生蜂。茶叶蝉(Tea leafhopper)是中国茶区的重要害虫,其若虫和成虫主要取食茶树嫩梢芽叶汁液,严重影响茶叶的产量和品质。长期以来,生产和实践中对危害种是小绿叶蝉(*Empoasca flavescens*)还是假眼小绿叶蝉(*Empoasca vitis*)这一问题一直存在争议。付建玉和韩宝瑜^[11]用 RAPD 标记技术,对中国茶叶蝉的优势种归属进行算术平均的不加权对群法(UPGMA)聚类分析,结果表明其个体遗传距离在 0.17 ~ 0.46 之间,说明茶叶蝉的遗传基础较一致。再结合前人对茶叶蝉的形态学研究,他们认为茶叶蝉的优势种为假眼小绿叶蝉。螺旋粉虱复合种(*Aleurodicus disperses-Lecanoideus floccissimus*)是加纳利岛重要的农业害虫,这 2 个种很难通过形态学特征进行辨别。Callejas 等^[12]利用 6 个随机引物对 *A. disperses-L. floccissimus* 进行 RAPD 分析,结果得到了 39 个 *L. floccissimus* 和 51 个 *A. dispersus* 的标记,这些图谱在同一种的所有个体中均出现,而在另一种内则不会出现,证实了 RAPD 标记是区分这 2 个种的有效途径。

在对蜚蠊目的分类学研究方面,姚涌等^[13]选取 3 条随机引物对 3 种蜚蠊:黑胸大蠊(*Periplaneta fuliginosa*)、美洲大蠊(*Periplaneta americana*)和德国小蠊(*Blattella germanica*)进行 RAPD-PCR 扩增,电泳图谱表明扩增的条带既有其同源性也显示了各自的特异性。结果证实 RAPD 技术可以精确地区别 3 种

蜚蠊。

Kambhampati^[14]等对双翅目伊蚊属(*Aedes*)的 5 种伊蚊进行 RAPD 分析, 根据各种内个体共有的 RAPD 指纹图谱的特征谱带建立了分类标准, 可对伊蚊进行种间区分。小麦黑森瘿蚊(*Mayetiola destructor*)和大麦茎干瘿蚊(*M. hordei*)是 2 个植食性姊妹种, 导致突尼斯每年都损失大量的谷物。通常认为小麦黑森瘿蚊是为害种, 但是不同谷类(小麦或大麦)与这 2 个种之间寄主关系并不很严格。要提出有效的害虫治理方案, 则需要对瘿蚊基因型进行准确分析。Bouktila 等^[15]利用 RAPD 技术, 结合交配分析和线粒体 DNA 分型技术, 对位于突尼斯北部的一个为害小麦的麦瘿蚊种群的遗传变异程度和分类关联性进行了评估。基于细胞色素 b 基因限制性酶切分析, 全部样品的线粒体分型均为 *M. destructor*。Nwilene 等^[16]对非洲稻瘿蚊(*Orseolia oryzivora*)和其它 2 个非洲种群 *O. bonzii*、*O. nwanze* 进行了形态多样性研究, 发现这 3 个种群在成虫和幼虫阶段, 形态差异很小, 差异主要表现在蛹的特征上。由于这 3 个种群的形态差异小, 故采用 RAPD 技术和 SCAR(Sequence characterized amplified regions, 序列特征扩增区)法测定它们的染色体 DNA 酶解图谱, 对非洲稻瘿蚊的 3 个种群进行了区分, 进而为培育对非洲稻瘿蚊具有持久抗性的水稻品种奠定了基础。

张亮和张智英^[17]对果实蝇属(*Bactrocera*)的南瓜实蝇(*B. tau*)、黑漆实蝇(*B. scutellaris*)、具条实蝇(*B. scutellata*)、瓜实蝇(*B. cucurbitae*)、桔小实蝇(*B. dorsalis*)和番石榴实蝇(*B. correcta*)等 6 种实蝇进行 RAPD 分析, 构建指纹图谱, 筛选出 5 条引物可用于这 6 种实蝇的分类鉴定。

关于 RAPD 技术在直翅目的分类学研究上的应用, 田英芳和郑哲民^[18]的研究值得关注: 他们对 5 种蟋蟀: 长颚斗蟋(*Velarifictorus aspersus*)、小斗蟋(*V. parvus*)、石首棺头蟋(*Loxoblemmus equestris*)、多伊棺头蟋(*L. doenitzi*)、黄脸油葫芦(*Teleogryllus emma*)的基因组 DNA 进行扩增, 结果筛选出一条引物可以用于 5 种蟋蟀的分类鉴定。

安榆林等^[19]以幼虫和成虫标本, 应用 RAPD 技术, 对鞘翅目墨天牛属(*Monochamus*)的 3 个近缘种: 松墨天牛(*M. alternatus*)、云杉大墨天牛(*M. urussovi*)、云杉小墨天牛(*M. sutor*)进行了区分, 为天牛近缘种的鉴定提供了一种新方法。Kethidi 等^[20]通过分析 RAPD 片段中的 SCAR 鉴定出仅在

光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)中存在的 2 740 bp 的 DNA 片段, 并设计出由 22 个碱基组成的嵌套式寡聚核苷酸引物, 利用引物 SCAR2 和 SCAR3, 分别扩增出 1 237 和 2 720 bp 的片段。这可以将当地种和其它与之紧密相关的非当地种区分开来, 表明 SCAR 标记可用于光肩星天牛的鉴定。

2.2 昆虫系统发育

系统发育(Phylogeny)是指生物形成或进化的历史。系统发育研究的是进化关系, 系统发育分析就是要推断或者评估这些进化关系。通过系统发育分析所推断出来的进化关系一般用分枝图(进化树)来描述, 这个进化树就描述了同一谱系的进化关系, 包括了分子进化(基因树)、物种进化以及分子进化和物种进化的综合。在现代系统发育学研究中, 研究的重点已经不再是生物的形态学特征或者其他特性, 而是生物大分子尤其是 DNA 序列。因为以外部形态为依据的方法会有很大的局限性, RAPD 技术可以弥补传统方法的不足。物种基因组的差异性可以通过 RAPD 技术表现出来, 对昆虫物种进行分子多态性分析, 可以建立完善的分类体系, 推测出正确的系统演化树。

在双翅目昆虫的系统发育研究中, 马雅军等^[21]利用 RAPD-PCR 技术研究了中国 9 省的中华按蚊(*Anopheles sinensis*)自然群体的遗传多态现象, 结果表明中华按蚊群体具有广泛的遗传多态现象, 其平均遗传距离为 0.41 ± 0.033 , 属于种内变异范围。聚类分析显示, 群体间遗传距离与地理位置无对应关系。王银东和熊邦喜^[22]对萨摩亚摇蚊(*Chironomus samoensis*)、红裸须摇蚊(*Prosilocerus akamusi*)、刺铗长足摇蚊(*Tanypus punctipennis*) 3 种摇蚊幼虫的基因组 DNA 进行 RAPD 扩增。聚类分析结果表明刺铗长足摇蚊与红裸须摇蚊的亲缘关系较近。斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)是中东、印度大陆、远东及伊朗南部的一种重要疟疾媒介昆虫。该昆虫尽管分布较广, 但仍被认为是单型而非多型性的。Djaidid 等^[23]分析了伊朗斯氏按蚊不同种群的 rDNA-ITS2 和 RAPD 位点。rDNA-ITS2 区域在所有的按蚊种群序列中都包含了一段微卫星片段。rDNA-ITS2 序列的系统发育树表明, 尽管不同种群距离相隔较远, 它们之间也只有一个细微的差异。RAPD-PCR 能区别斯氏按蚊的农村和城市种群, 但 2 类种群的形态区别仍不明确。结果显示伊朗的斯氏按蚊很可能是不同地域有不同生物或生态形式的单型种。贺春贵等^[24]采用 RAPD 方法测定分析了中国麦红吸

浆虫(*Sitodiplosis mosellana*)10个地理种群的遗传结构。结果表明不同种群间的遗传相似程度与其地理间距呈反比,种群内的遗传相似程度比种群间的高。赵中明等^[25]用RAPD技术分析了金色果蝇复合种(*Drosophila auraria species complex*)的5个姊妹种*Drosophila auraria*、*D. biauraria*、*D. triauraria*、*D. quadraria*和*D. subauraria*共12个地理种群的遗传变异,得到了129个多态性标记,并以遗传距离为尺度用UPGMA法构建了该复合种的聚类关系图。该图显示,用RAPD标记得到的种间平均遗传距离为0.214,表明这5个姊妹种间亲缘关系非常近。

高江勇等^[26]利用RAPD方法对中国16个地区、美国3个地区及韩国2个地区鞘翅目昆虫光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)及其近缘种共23个地理种群进行了研究,筛选17个引物,产生219个多态性位点,对光肩星天牛种群间的亲缘关系进行了聚类分析,结果表明美国种群同中国种群的亲缘关系较远。

对于RAPD技术在直翅目昆虫系统发育研究方面的应用,张建珍等^[27]的研究值得重视。他们用10条随机引物对5个不同种群的中华稻蝗(*Oxya chinensis*)和日本稻蝗(*Oxya japonica*)进行RAPD分析。根据RAPD图谱,以日本稻蝗作为外群,用Between-groups linkage法进行聚类分析,探讨中华稻蝗不同种群的亲缘关系,结果表明供试的5个稻蝗种群其系统发育树分为2大支,它们存在一定程度的差异,其亲缘关系的远近与地理距离之间存在一定的正相关关系。此外,朱道弘等^[28]也利用20种随机引物对日本稻田常见的4种稻蝗的基因组DNA进行研究,用得到的RAPD图谱建立了UPGMA系统树,说明了日本常见4种稻蝗的亲缘关系。田英芳和郑哲民^[29]还应用10种引物,对西北地区常见的3属7种蟋蟀进行了RAPD多态性检测,筛选出2种引物S142和S8,得到了多态性片段58条,对7种蟋蟀之间的亲缘关系进行分析,所得到的结果有异于传统分类结果。

至于鳞翅目昆虫系统发育研究方面,桂慕燕等^[30]对中国5个柞蚕(*Antheraea pernyi*)品种运用RAPD技术进行研究,从40个随机引物中筛选出27个,用UPGMA聚类分析,绘制了它们的分子进化树,分析了柞蚕品种间的遗传差异。程道军等^[31]对6种绢丝昆虫:家蚕(*Bombyx mori*)、中国野桑蚕(*B. mandarina*)、日本野桑蚕(Japanese *B. mandarina*)、蓖麻蚕(*Philosamia cynthia ricini*)、柞蚕(*Antheraea*

pernyi)、天蚕(*Antheraea yamamai*)进行研究,选取10个引物对23个昆虫个体进行扩增,共得到245个RAPD标记。分析结果揭示了6种绢丝昆虫之间的遗传距离。孙珊等^[32]采用RAPD方法研究了我国5个地区亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)种群分化,选用40个随机引物,其中39个引物均可在5个种群的14个个体中扩增出数目不等的条带,共计754个RAPD标记,利用UPGMA方法构建系统聚类图。结果表明,中国亚洲玉米螟的遗传分化与地理隔离有很大关系,因为地理位置上的差异而阻隔了各种群间的基因交流,从而导致了遗传分化。

Serce等^[33]对同翅目粉蚧科(Pseudococcidae)6种粉蚧:*Planococcus citri*、*P. ficus*、*P. vovae*、*Pseudococcus longispinus*、*Pseudococcus viburni*和*Phenacoccus aceris*进行RAPD-PCR扩增,50个引物扩增出256个片段,聚类分析明确的将这6种昆虫分为2个组群。扬子祥^[34]等采用RAPD技术对五倍子蚜虫的6种倍蚜:角倍蚜(*Schlechtendalia chinensis*)、倍蛋蚜(*S. peitan*)、肚倍蚜(*Kaburagia rhusicola*)、肚倍蚜枣铁亚种(*K. rhusicola. ensigallis*)、倍花蚜(*Nurudea shiraii*)、红倍花蚜(*N. rosea*)以及角倍蚜(*S. chinensis*)的4个地理种群的DNA多态性进行分析,倍蚜在种内和种间均显示了丰富的多态性,在种间水平上,3个属首先分成了3支,每一支又按不同种分成了2支。其遗传距离的分析结果同张素方等的研究结果基本一致。

Kavar等^[35]采用RAPD技术,并通过对16S rDNA、28S rDNA、细胞色素b和细胞色素c氧化酶亚组基因片段的测序,研究了半翅目南方稻绿蝽(*Nezara viridula*)的11个地理隔绝种群(斯洛文尼亚、法国、希腊、意大利、马德拉群岛、日本、瓜德罗普岛、加拉帕戈斯、加利福尼亚、巴西、博茨瓦纳)的遗传多样性,测序结果表明11个截然不同的单模标本聚类于A、B、C等3系。RAPD数据具有更大的多样性,但是与mtDNA的测序结果一致,显示了相同的聚类结果。

3 展望

RAPD技术具有简便快捷的特点,而且其灵敏程度很高,能够对整个基因组作地毯式的多态分析。同时,RAPD技术还可以和其它DNA分子技术结合,这样就在很大程度上扩展了分子生物学技术在昆虫分类学研究中的应用范围并使之得到了极大的发展。RAPD技术的成功应用,极大地提高了昆虫

分类学研究的水平,在揭示昆虫的系统发育关系、保护昆虫的生物多样性、合理利用昆虫资源、害虫的综合治理等方面都起到了重要作用。综上所述,RAPD技术在昆虫分类学研究中的应用前景巨大,并将随着技术手段的不断完善变得更加广阔。

参考文献:

- [1] 袁锋. 昆虫分类学[M]. 北京:中国农业出版社,1996:12-17.
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [3] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7213-7218.
- [4] Hoy M A. Molecular Genetics [M]. California: Academy press, 1994 388-390.
- [5] Barro P J D, Driver F. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. *Aus J of Ento*, 1997, 36: 149-152.
- [6] 汪小全, 邹俞苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题 [J]. *植物学报*, 1996, 38(12): 954-962.
- [7] 朱元娣, 李光晨, 张文, 等. 苹果 RAPD 标记的引物筛选与 RAPD 校正 [J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(3): 7-10.
- [8] 黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展 [J]. *生物技术通报*, 1999, 4: 19-22.
- [9] 孙强, 马坤明, 孙立恒. RAPD 标记技术及在昆虫分类学中的应用与展望 [J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2002, 14(4): 14-18.
- [10] Black IV W C. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) of defect DNA polymorphisms in aphids [J]. *Bull Entomol Res*, 1992, 82: 151-159.
- [11] 付建玉, 韩宝瑜. 茶小绿叶蝉优势种的归属的分子依据 [J]. *科技通报*, 2005, 21(5): 549-556.
- [12] Callejas C, Velasco A, Gobbi A, et al. Fast discrimination (RAPD-PCR) of the species forming the pest complex *Aleyrodicus dispersus*-*Lecanoideus floccissimus* (Hom: Aleyrodidae) [J]. *J Appl Ent*, 2005, 129(7): 382-385.
- [13] 姚涌, 汪学龙, 夏立照. 安徽省三种长剑蜚蠊基因组多态性 DNA 的研究 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19(1): 55-57.
- [14] Kambhampati S, Black IV W C, Rai K S. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical analysis and applications [J]. *J Med Entomol*, 1992, 29(6): 939-945.
- [15] Bouktila D, Mezghani M, Marrakchi M, et al. Genetic variation and relatedness in Tunisian wheat midges of the genus *Mayetiola* (Diptera: Cecidomyiidae), inferred from biological and molecular data [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49(5): 822-828.
- [16] Nwilene F E, Harris K M, Okhidievbie O, et al. Morphological diversity and genomic DNA fingerprinting of the African rice gall midge *Orseolia oryzivora* (Diptera: Cecidomyiidae) and of two other species of African *Orseolia* [J]. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2006, 26(4): 256-265.
- [17] 张亮, 张智英. 云南六种实蝇的 RAPD 快速鉴定 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18(5): 1165-1168.
- [18] 田英芳, 郑哲民. 5 种蟋蟀的 RAPD 研究初报(直翅目:蟋蟀总科) [J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 30(2): 91-93.
- [19] 安榆林, 刁彩华, 朱宏斌, 等. 墨天牛属三个近缘种的 RAPD 分析 [J]. *南京林业大学学报*, 1998, 22(4): 35-38.
- [20] Kethidi D R, Roden D B, Ladd T R, et al. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2003, 52(4): 193-204.
- [21] 马雅军, 翟逢伊, 徐建农, 等. 我国中华按蚊分子遗传多态性研究 [J]. *昆虫学报*, 2001, 44(1): 33-39.
- [22] 王银东, 熊邦喜. 三种摇蚊幼虫 RAPD 扩增条件的优化及在昆虫系统发育分析中的应用 [J]. *昆虫知识*, 2006, 43(3): 355-360.
- [23] Djadid N D, Gholizadeh S, Aghajari M, et al. Genetic analysis of rDNA-ITS2 and RAPD loci in field populations of the malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae): Implications for the control program in Iran [J]. *Acta Tropica*, 2006, 97(1): 65-74.
- [24] 贺春贵, 袁峰, 张雅林. 中国麦红吸浆虫(双翅目: 瘿蚊科)不同地理种群的遗传结构 [J]. *昆虫学报*, 2003, 46(6): 783-787.
- [25] 赵中明, 陆剑, 戴灼华. 用 RAPD 标记探讨了金色果蝇符合种内的遗传分化 [J]. *动物学报*, 2001, 47(6): 625-631.
- [26] 高江勇, 杨晓军, 林晓佳, 等. 利用 RAPD 研究星天牛地理种群间亲缘关系 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2007, 31(1): 128-130.
- [27] 张建珍, 任俐, 郭爱平, 等. 山西省及邻近地区中华稻蝗 5 个种群 RAPD 分析及其亲缘关系 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(2): 159-165.

- [28] 朱道弘,安腾喜一,城田安幸. 利用 RAPD 对稻蝗属昆虫亲缘关系的研究[J]. 昆虫学报, 2001, 44(3): 316-320.
- [29] 田英芳,郑哲民. 七种蟋蟀基因组 DNA 的 RAPD 多态性研究(直翅 蟋蟀总科)[J]. 昆虫分类学报, 2001, 23(4): 248-252.
- [30] 桂慕燕,左正宏,王学民,等. RAPD 分析在绢丝昆虫亲缘关系研究中的应用 II. 柞蚕品种间的遗传差异[J]. 遗传, 2001, 23(5): 452-454.
- [31] 程道军,鲁成,周泽扬,等. 几种绢丝昆虫遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 蚕业科学, 2002, 28(4): 277-282.
- [32] 孙珊,徐茂磊,王戎疆,等. RAPD 方法用于亚洲玉米螟地理种群分化的研究[J]. 昆虫学报, 2000, 43(1): 103-106.
- [33] Serce C U ,Kaydan M B ,Kilincer A N ,et al. Investigation of mealybug (Hemiptera :Coccoidea : Pseudococcidae) species from Turkey by RAPD[J]. Phytoparasitica, 2007 , 35(3) 232-238.
- [34] 扬子祥,陈晓鸣,冯颖,等. 五倍子蚜虫 DNA 多态性的 RAPD 分析[C]//第五届生物多样性保护与利用高新技术国际研讨会论文集. 北京:北京科学技术出版社, 2005.
- [35] Kavar T ,Pavlovic P ,Susnik S ,et al. Genetic differentiation of geographically separated populations of the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera : Pentatomidae)[J]. Bulletin of Entomological Research , 2006, 96(2): 117-128.

Application of RAPD Technique in Insect Taxonomy

MENG Zi-ye^{1,2}, CHEN Xiao-qin¹, JIANG Shi-hong¹, LI Guang-jing¹

(1. School of Applied Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Polytechnique College, Shenzhen Guangdong 518055 ;

2. Institute of Insect Resources, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract : Traditional insect taxonomy was the main way of insect classification, which classified the insects by morphology. However, morphological classification has significant limitations at lower taxonomic levels because it is difficult to confirm its taxonomy boundaries. The definition of the taxonomic boundaries at lower level relies on environmental and subjective factors. In recent years, the development in the technology of molecular biology and traditional taxonomy has provided broad prospect for insect taxonomy. This paper summarizes the basic technology of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) technology, analyzes the advantages of RAPD, simple and rapid, low cost, high sensitivity, not high demand for purity of template and fully reflect polymorphism of the template. Meanwhile, the shortages of this technology, such as poor stability and reproducibility, can not distinguish homozygote from heterozygote and has the problem of co-migrating and so on. Also in this paper, the applications of RAPD in classification and identification and phylogeny analysis of homoptera, blattariae, diptera, lepidoptera, orthoptera, coleoptera in recent years are expatiated. In addition, RAPD extends the application range of molecular biological techniques in the study of insect taxonomy. Moreover, RAPD are successfully applied to the study of insect taxonomy. All this significantly improves the study level of insect taxonomy, and will have more expansive application foreground with the increasing development of related technology means.

Key words : RAPD ; insect taxonomy ; insect phylogeny ; application

(责任编辑 方 兴)