

优良红锥种质资源遗传多样性的 ISSR 分析与聚类

王鸣刚¹, 赵宏¹, 陈晓前¹, 王蕾², 陈亮²

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 利用 ISSR 分子标记对来自 10 个不同生态地区的红锥优良种质进行基因组遗传多样性分析. 从 20 条引物中筛选出 11 条具有扩增多态性的引物用于 ISSR-PCR 扩增, 共扩增出 435 条带, 其中多态性条带 325 条, 占总扩增条带的 74.7%, 平均每个引物扩增 3.95 条. ISSR 标记分析揭示出红锥 10 个优良种质的遗传相似系数介于 0.473 7~0.808 1 之间, 平均值为 0.728 7. 用 STATIS 统计软件的欧氏可变量平均法构建类型之间的分子系统树, 聚类分析结果将 10 个优良红锥种质分为 4 个类群.

关键词: 红锥; 遗传多样性; ISSR; 聚类分析

中图分类号: Q 753

文献标识码: A

文章编号: 1003-4315(2009)02-0110-06

Genetic diversity of *Castanopsis hystrix* germplasm resources by ISSR and cluster analysis

WANG Ming-gang¹, ZHAO Hong¹, CHEN Xiao-qian¹, WANG Lei², CHEN Liang²

(1. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China;

2. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Genetic diversity of fine germplasm resources of *Castanopsis hystrix* from ten different ecological regions was analyzed by using the inter-simple sequence repeat (ISSR), and 11 effective primers were selected from 20 primers. The result showed as follows: 435 bands were amplified, among which 325 bands were polymorphic, and percentage of polymorphic bands were 74.7%, an average of approximately 3.95 bands per primer. Genetic similarity indexes of ten germplasms of *C. hystrix* ranged from 0.473 7 to 0.8081, and the average value was 0.728 7. Static software was used to calculate the Nei's genetic distance and a dendrogram was constructed based on UPGMA cluster analysis. These ten germplasms were divided into 4 major groups, and their genetic relative and the genetic distance were discussed.

Key words: *Castanopsis hystrix*; genetic diversity; ISSR; cluster analysis

红锥(*Castanopsis hystrix* A D C)为壳斗科栲属常绿乔木,是华南地区重要的乡土阔叶优良珍贵用材和多功能树种,在广西、广东、海南、云南等地均有分布,中心分布区在广西南部.红锥具有生长快、适应广、效益高等特性,其主干通直、材质坚硬,可供建筑、造船、高档家具、木制地板、军工用品、体育器

材等用途.红锥萌芽力强,萌条生长迅速,一次造林可采伐 10 次以上,经营上百年,枝叶浓密,较耐荫蔽,混生性能好,可纯林种植,亦可混交造林,是与松、杉等针叶树种混交造林的最理想的伴生树种之一.以往对红锥植物的研究主要集中在形态分类学、植物学特征,地理分布等方面^[1-2].

作者简介:王鸣刚(1962),男,教授,博士,研究方向为植物分子生物学. E-mail: mgwang@163.com

基金项目:广西林业科学研究院国家林业局中南速生材繁育重点实验室开放基金课题;兰州理工大学博士基金(SB08200602);甘肃省教育厅研究生导师基金(0703-11)

收稿日期:2008-03-20;修回日期:2008-06-12

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

ISSR(inter-simple sequence repeat) 是利用包含重复序列并在 3' 或 5' 锚定的单寡聚核苷酸引物, 对基因组进行 PCR 扩增的标记系统. 它具有多态性高、无组织器官特异性等优点. 在缺乏分子遗传学研究背景的濒危植物遗传多样性水平评价中显示出较大的优势. Gilbert 等^[3] 和 Yang 等^[4] 研究表明, ISSR 对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD, 稳定性优于 RAPD. Jonsson 等^[5] 研究认为在进行克隆植物遗传多样性的研究时可优先考虑使用 ISSR. Gao 等^[6] 研究认为 RAPD 和 ISSR 检测疣粒野生稻遗传变异的能力高于等位酶分析, 根据多态条带比率和 Shannon 多样性指数分析, ISSR 能比 RAPD 检测到更多的遗传多态性.

对红锥优良品系的遗传多样性进行准确的评价可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性的指导, 这是红锥育种目标能否成功实现的关键. 本研究即利用 ISSR 分子标记技术对 10 个优良红锥树种进行遗传多样性分析, 旨在为红锥资源的合理保护、开发利用以及优良红锥品系的选育工作和系统发育的解释提供理论依据, 也为红锥 DNA 指纹图谱的构建奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

选用广西林科院试验基地 10 个优良红锥品系 (*Castanopsis hystrix*) 的新鲜叶片为试验对象, 采样后将样品立即放入超低温冰箱备用. 材料来源见表 1.

表 1 原产于不同生态地区的 10 个红锥优良种质材料

Tab. 1 Germplasm materials of *Castanopsis hystrix* from 10 different ecological regions

| 编号 | 原产地 |
|----|-------|
| 1 | 广东高洲县 |
| 2 | 广西蒲北县 |
| 3 | 广东信宜县 |
| 4 | 广西苍梧县 |
| 5 | 广西容县 |
| 6 | 广西东兰县 |
| 7 | 广西凭祥县 |
| 8 | 广西博白县 |
| 9 | 广东陆河县 |
| 10 | 广西宁明县 |

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 每个红锥树种随机选取 15 个个体的混合叶片, 采用改进的 CTAB^[7] 法提取总 DNA. 各取 60 ng 用于 PCR 扩增.

1.2.2 ISSR-PCR 扩增反应条件 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 52~55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 40 个循环, 72 °C 延伸 7 min. PCR 产物在 2.0% 琼脂糖上电泳, 凝胶成像系统拍照.

1.2.3 引物的筛选 根据 PCR 扩增结果, 从 20 个引物(表 2) 中选出 11 个扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物用于 ISSR-PCR 反应. 变性温度根据引物的 T_m 值变化 1~3 °C. ISSR 引物由上海生工公司合成.

表 2 ISSR 引物序号与序列

Tab. 2 List of ISSR primers and their sequences

| 引物序号 | 引物序列(5'-3') |
|------|--------------------|
| 1 | GAGAGAGAGAGAGAGAA |
| 2 | GAGAGAGAGAGAGAGAC |
| 3 | AGAGAGAGAGAGAGAGT |
| 4 | AGAGAGAGAGAGAGAGST |
| 5 | AGAGAGAGAGAGAGAGSA |
| 6 | CTCTCTCTCTCTCTCTA |
| 7 | CTCTCTCTCTCTCTCTG |
| 8 | CTCTCTCTCTCTCTCTT |
| 9 | CTCTCTCTCTCTCTCTWG |
| 10 | CTCTCTCTCTCTCTCTWC |
| 11 | TCTCTCTCTCTCTCTCA |
| 12 | TCTCTCTCTCTCTCTCG |
| 13 | TGTGTGTGTGTGTGTGA |
| 14 | ACACACACACACACACG |
| 15 | GAGAGAGAGAGAGAGAT |
| 16 | ACACACACACACACACCG |
| 17 | TCTCTCTCTCTCTCTCAT |
| 18 | CACCACACACACACA |
| 19 | TCTCTCTCTCTCTCTCC |
| 20 | ACACACACACACACAG |

1.2.4 数据处理与统计分析 电泳图谱的每个条带均为 1 个分子标记(Marker), 代表 1 个引物的结合位点. 根据各分子标记的有无及其迁移率, 统计所有的二元数据; 有带(显性)记作 1, 无带(隐性)记为 0, 强带和弱带的赋值均为 1. 对于多态位点, 仅将重复试验中能稳定出现的差异条带用于数据分析. 利

用 STATIS 统计软件的欧氏可变类平均法构建类型之间的分子系统树, 并计算两个类型之间的遗传距离.

2 结果与分析

2.1 优良红锥的 ISSR 扩增结果

从 20 条引物中筛选出 11 条具有扩增多态性的引物用于 ISSR-PCR 扩增. 11 条 ISSR 引物共扩增出 407 条重复性高、清晰的多态性条带(图 1, 2, 3), 分子量在 120~ 2 000 bp 之间, 多态性条带比率为 74.7%, 平均每个引物扩增 37.0 条. 11 条引物的具体扩增情况见表 3.

表 3 11 条 ISSR 有效引物扩增情况

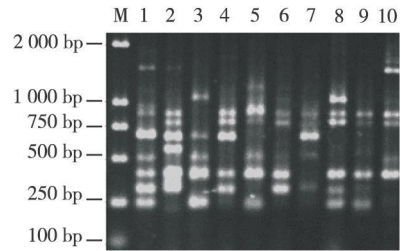
Tab.3 Amplification of 11 effective ISSR primers

| 引物序号 | 扩增带数 | 多态性条带数 | 多态性条带率/ % |
|------|------|--------|-----------|
| 9 | 56 | 56 | 100.0 |
| 17 | 63 | 53 | 84.1 |
| 19 | 49 | 39 | 80.0 |
| 7 | 48 | 38 | 79.2 |
| 2 | 41 | 31 | 75.6 |
| 18 | 36 | 26 | 72.2 |
| 14 | 66 | 46 | 70.0 |
| 12 | 31 | 21 | 67.7 |
| 4 | 56 | 36 | 64.3 |
| 5 | 54 | 34 | 63.0 |
| 15 | 47 | 27 | 57.4 |

2.2 聚类分析结果

根据 DNA 扩增结果计算遗传距离, Nei's 遗传距离(GD)的范围在 0.191 9~ 0.526 3(表 4). 其中, 容县(5)和凭祥(7)的遗传距离最近(GD = 0.191 9), 广东 1 号(1)和浦北(2)的遗传距离最远(GD= 0.526 3). 基于 Nei's 遗传距离, 根据 LPCMA 法构建了 10 个优良红锥种质的聚类图(图 5). 10 个优良红锥种质可分为 4 个类群, 其中容县和凭祥遗

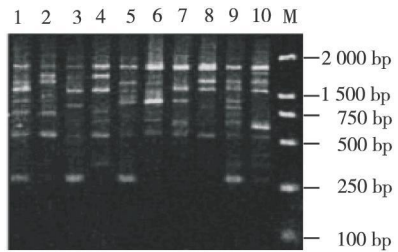
传关系最近, 与东兰、广东 1 号、广东 3 号、宁明聚为第 1 类群, 苍梧和博白为第 2 类群, 广东 2 号为第 3 类群, 浦北与其他 9 个品种遗传关系最远, 聚为第 4 类群.



注: M. DNA 标准(DL 2000).

图 1 ISSR 引物 9 的 PCR 扩增结果

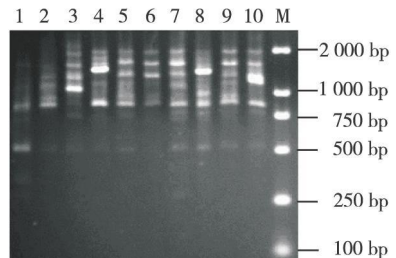
Fig.1 PCR result of primer 9



注: M. DNA 标准(DL 2000).

图 2 ISSR 引物 14 的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR result of primer 14



注: M. DNA 标准(DL 2000).

图 3 ISSR 引物 17 的 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR result of primer 17

表 4 Nei 氏遗传相似性系数(上方)和遗传距离(下方)

Tab.4 Nei's genetic similarity indexes (above) and genetic distance (below)

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1 | | 0.473 7 | 0.493 2 | 0.746 7 | 0.729 7 | 0.708 9 | 0.733 3 | 0.674 2 | 0.729 4 | 0.690 5 |
| 2 | 0.526 3 | | 0.693 3 | 0.638 9 | 0.611 9 | 0.620 5 | 0.664 0 | 0.681 8 | 0.658 3 | 0.698 8 |
| 3 | 0.506 8 | 0.306 7 | | 0.684 9 | 0.658 8 | 0.632 9 | 0.644 4 | 0.629 2 | 0.611 8 | 0.642 9 |
| 4 | 0.253 3 | 0.361 1 | 0.315 1 | | 0.707 3 | 0.684 2 | 0.689 7 | 0.674 4 | 0.682 9 | 0.666 7 |
| 5 | 0.270 6 | 0.388 1 | 0.341 2 | 0.292 7 | | 0.772 9 | 0.808 1 | 0.646 8 | 0.766 0 | 0.688 2 |
| 6 | 0.291 1 | 0.379 5 | 0.367 1 | 0.315 8 | 0.227 3 | | 0.752 7 | 0.739 2 | 0.727 3 | 0.735 0 |
| 7 | 0.266 7 | 0.336 0 | 0.355 6 | 0.310 3 | 0.191 9 | 0.247 3 | | 0.718 4 | 0.787 9 | 0.734 7 |
| 8 | 0.325 8 | 0.318 2 | 0.370 8 | 0.325 6 | 0.353 2 | 0.260 8 | 0.281 6 | | 0.755 1 | 0.721 6 |
| 9 | 0.270 6 | 0.341 7 | 0.388 2 | 0.317 1 | 0.234 0 | 0.272 7 | 0.212 1 | 0.244 9 | | 0.782 6 |
| 10 | 0.309 5 | 0.301 2 | 0.357 1 | 0.333 3 | 0.311 8 | 0.264 4 | 0.265 3 | 0.278 4 | 0.217 4 | |

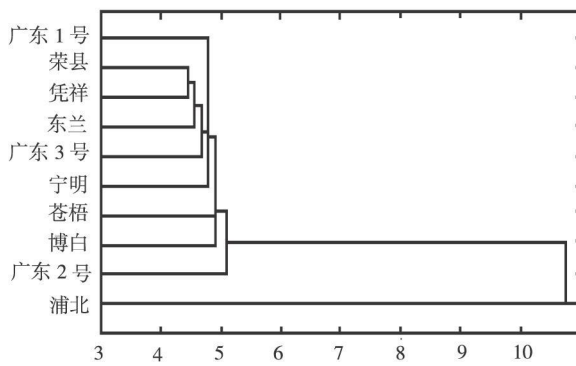


图 4 10 种优良红锥种质的 ISSR 聚类分析树状图

Fig. 4 The cluster dendrogram for ten germplasms of *C. hystrix* based on ISSR markers

3 讨论

3.1 ISSR 用于红锥遗传多样性分析的可行性

ISSR 技术的原理和操作与 SSR、RAPD 相似, 只是引物设计要求不同, 其长度一般在 15~24 bp. 反应的退火温度为 52~55 °C, 比 RAPD (36~40 °C) 高, 因此对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD. ISSR 引物中包含有一定长度的重复序列, 与它结合的目标序列在 DNA 复制的过程中存在滑动和不均等交换现象, 使得它们在不同品种或个体间的重复次数存在较大差异, 更易于导致引物结合位点和两结合位点间的片段长度产生差异^[8-9], 其产物多态性远远比 RFLP, SSR, RAPD 丰富, 可以提供更多的关于基因组的信息, 而且比 RAPD 技术更加稳定可靠, 实验重复性好. 在 ISSR 反应体系中加入 2% 甲酰胺能够降低由于引物滑动而引起的背景模糊, 加入 2%~4% DMSO 能提高反应的特异性^[10]. 因此 ISSR 结合了 SSR 和 RAPD 的优点, 既具有 RAPD 的操作简单、检测结果方便的特点, 又具有 SSR 的稳定性优势, 并且 ISSR 花费小, 容易操作. 所以 ISSR 标记是一种快速、可靠、可以提供有关基因组丰富信息的 DNA 指纹技术, 有着很好的发展前景^[11].

3.2 10 个红锥种质形成较大遗传差异

通过 ISSR 分子标记对 10 个优良红锥种质基因组的分析发现, 它们的遗传相似系数变化范围在 0.473 7~0.808 1 之间, 小于种内群居间的遗传一致度 (0.90). 多态位点百分率是衡量物种遗传变异水平高低的一个重要指标, 是度量遗传多样性的重要参数. Harmrick 和 Godt^[12] 用等位酶对 449 个种

进行植物遗传变异研究, 揭示出种的多态位点平均水平为 50.5%, 种群多态位点平均水平为 34.2%. 本研究表明 ISSR 分析的多态位点百分率为 74.7%, 高于种和种群的平均水平, 说明 10 个优良红锥种质长期在不同的地理环境下进化, 已经形成了较大的遗传差异.

综合 ISSR 分子标记、同工酶分析和 *rbcl* 序列比对推断出: 所研究的 10 个优良红锥种质可以分为 4 个类群, 其中容县和凭祥遗传关系最近, 与东兰、广东 1 号、广东 3 号、宁明聚为第 1 类群, 并且与同属的 *C. lucida* 相差较远; 苍梧和博白为第 2 类群, 广东 2 号为第 3 类群, 这 2 个类群与同属的 *C. lucida* 最接近; 浦北与其他 9 个红锥种质遗传关系最远, 聚为第 4 类群, 并且与同属的 *C. lucida* 相差最远.

3.3 影响林木群体遗传变异和分化的因子

影响林木群体遗传变异和分化的原因很多. 葛颂^[13] 指出, 林木所处的生境条件, 群体的起源和家系结构以及林木群体的交配系统均是影响林木群体遗传变异和分化的因子. 王洪新等^[14] 则特别强调, 影响自然群体遗传结构唯一肯定起作用的因子是繁育系统. Hamrick 和 Godt 等^[15] 人指出, 在多年生木本植物中, 分布范围是预测等位酶变异的最佳指标. 广泛分布的种具有更高比例的多态位点和更大比例的基因多样性, 群体间分化程度低, 而分布有限、隔离的小群体, 基因流动有限, 因此群体内遗传变异减少, 群体间分化程度高. 在草本植物遗传多样性研究中, 盛丽等^[16] 对来自甘肃不同产区的 20 个当归样品的基因组 DNA 进行了 RAPD 及其聚类分析, 结果表明: 20 个当归样品可以聚为 5 类, 其结果与当归的地理分布比较吻合, 即甘肃省当归栽培群之间亲缘关系的远近与栽培地的地理分布距离有一定的相关性. 地理分布距离较近的样品遗传距离较近, 但在同一分布区域内, 生态条件对当归遗传差异亦有影响. 这种丰富的变异起源于遗传上的修饰, 这种修饰与植物的生活史有关, 过去的大陆迁移, 山脉形成及气候变化将群体隔离并且对现存谱系也有重要影响. 因此, 要了解林木遗传多样性, 不能单纯着眼于某个因子, 而是要对诸多因子进行综合评价、全面分析, 这样才不会导致太大的偏差.

3.4 影响广西红锥遗传多样性的原因

基因型是遗传和生态两个因素长时期复杂的相互作用的产物,土壤和地理环境对种内变异起重要作用^[17].广西壮族自治区地处 E 104°29' ~ 112°04', N 20°54' ~ 26°20', 地理差别极大,南濒北部湾,北为南岭山地,西延云贵高原,全区的地形总趋势是西北向东南倾斜,有台地、盆地、丘陵、溶岩等,地形交错分布,形成了复杂多样的地貌类型.主要气候受太阳强烈辐射和冬夏季风环流的影响,气候特点为广西北半部属中亚热带气候,南半部属南亚热带气候,广西年降雨量差异显著,在 1 000~ 2 800 mm 之间.广西差异显著的地理形势造成红锥形成稳定的遗传多样性.浦北地区位于广西东南,具有亚热带向热带过渡性质的海洋季风气候特点.浦北和博白地理位置非常接近,可能导致二者的遗传距离较为接近.容县和凭祥地理位置相差很远,但是两地的土质相似,气候相似,年均温度一致,同为 22.1 °C,可能是造成二者的遗传距离极为接近的主要原因.关于导致这 10 个优良红锥种质产生较大遗传多样性的其它因子还需要进一步研究.

3.5 红锥遗传多样性的保护

如何保存或者维持林木遗传多样性,不同学者持有不同观点. Kim^[18] 应用捕获曲线 (capturing curves) 的方法,提出了对赤松 (*Pinus densiflora*)、黑松 (*P. thunbergii*) 和红松 (*P. koraiensis*) 取原境保存和异境保存所抽取的群体数、群体面积及每个群体的个体数. Yang 等^[19] 将等位基因按其频率和在群体中的分布状况分成 4 类,分别对每类等位基因提出不同的抽样策略. Hudson^[20] 指出,若为了从群体中获取最大数量的、潜在的、有用的遗传变异,靠表型选择的方法抽样不可取,应采取随机抽样,并讨论了在一定时间内允许杂合度或等位基因一定程度地丢失时应保留群体的有效数目.

近 20 多年来,红锥的优良特性逐步为科研和生产部门所重视.开展优树选择和良种选育,提高遗传增益,加快红锥生产的良种化进程,提高红锥林的单位面积产量,已成为华南地区发展珍贵用材树种的当务之急.但是生物群体遗传多样性的存在代表了种群的适应策略,表现在具有多样性的种群可以应付某些类型的异质环境,并且具有对多变的环境产

生潜在的适应性.鉴于目前仍存在遗传多样性的损失,且自然群体和育种群体中遗传多样性的下降将限制其对不断变化的自然、经济和社会环境的适应,林木遗传一致性还会增加对害虫和其它环境胁迫的脆弱性^[21-22].因此,对红锥遗传多样性的保护势在必行.

参考文献

- [1] 朱积余,蒋 焱,丘小军.广西红锥地理种源试验初报 [J]. 广西林业科学,1997,26(2):66-68
- [2] 朱积余,蒋 焱,潘 文.广西红锥优树选择标准研究 [J]. 广西林业科学,2002,31(3):109-113
- [3] Gilbert J E, Lewis S R V, Wilkinson M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 1125-1131
- [4] Yang W P, Oliveira A C, Godwin I, et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums [J]. Crop Sci, 1996, 36: 1669-1676
- [5] Jonsson B O, Jonsdottir IS, Cronbergn. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic [J]. Carex Bigelowii (Cyperaceae) J Ecol, 1996, 84: 449-459
- [6] Gao L Z, Ge S, Hong D Y. A study on population genetic structure of *Oryza meyeriana* (Zoll et Mor ex Steud) Bail from Yunnan and its in situ conservation significance [J]. Sci China: Ser C, 1999, 42: 102-108
- [7] 金东雁,黎孟枫,候云德,等译.分子克隆实验指南(第 2 版) [M]. 北京:科学出版社,1992
- [8] 钱 韦,葛 颂,洪德元.采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻遗传多样性 [J]. 植物学报, 2000, 42 (7): 741-750
- [9] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 2000, (100): 1311-1320
- [10] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 1311-1320
- [11] 胡绍庆.桂花品种的 ISSR-PCR 分析 [J]. 南京林业大

- 学学报(自然科学版), 2004, 28(suppl): 71-75
- [12] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species [J]. *New Forest*, 1992, 6: 95-124
- [13] 葛 颂. 同工酶与林木群体遗传变异研究[J]. *南京林业大学学报*, 1988, 12 (1): 68-77
- [14] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统、遗传结构和遗传多样性维护[J]. *生物多样性*, 1996, 4(2): 92-96
- [15] Hamrick J L, Godt M J W. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species[J]. *New Forest*, 1992, 6: 95-124
- [16] 盛 丽, 王 蒂, 司怀军. 甘肃省当归种质资源的 RAPD 分析[J]. *甘肃农业大学学报*, 2007, 42(4): 60-64
- [17] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*[J]. *Theor Appl Genet*, 2000, (100): 1311-1320
- [18] Zin-Suh Kim, Cheong-Ho Yi, Seok-woolee. Genetic variation and sampling strategy for conservation in *Pinus* species[M]// Conservation and manipulation of genetic resources in forestry. Seoul: Kwang Moon Kag, 1994: 294-319
- [19] Rong-Cai Yang, F C Yeh. Genetic consequences of in situ and exsitu conservation of forest trees[J]. *For Chr*, 1992, 68 (6): 720-729
- [20] Hudson R R. Levels of DNA polymorphism and divergence yield important insight into evolutionary processes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(16): 7425-7426
- [21] Ledig F T. Conservation strategies for forest gene resources[J]. *For Ecol Manage*, 1982(14): 77-90
- [22] 王明麻. 森林与生物多样性[J]. *南京林业大学学报*, 1993, 17 (4): 73-77

(责任编辑 朱燕琴)

(上接第 96 页)

- [2] 陈阿兰. 灰翅麦茎蜂越冬幼虫抗寒性研究[J]. *青海师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 3: 77-79
- [3] 王海庆, 郅和臣, 葛菊梅, 等. 小麦抗麦茎蜂机制初步探讨[J]. *西北农业学报*, 1997, 6(3): 5-11
- [4] Holmes N D. The effect of the wheat stem sawfly *Cephus cinctus* (Hymenoptera: Cephidae) on the yield and quality of wheat[J]. *Can Entomol*, 1977, 109: 1591-1598
- [5] 黄相国. 青海麦茎蜂的初步观察及防治对策[J]. *植物保护*, 1990, 1(15): 41
- [6] Weiss M J, Morrill W L. Wheat stem sawfly (Hymenoptera: Cephidae) revisited[J]. *American Entomologist*, 1992, 38: 241-245
- [7] 黄相国, 王海庆, 葛菊梅, 等. 灰翅麦茎蜂的生物学及其防治对策[J]. *昆虫知识*, 2003, 40(6): 515-518
- [8] 南京农学院编. 昆虫生态及预测预报[M]. 北京: 农业出版社, 1985: 320-323
- [9] 张孝羲, 程遐年, 耿治国. 害虫测报原理和方法[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 228-229
- [10] 强中发, 侯生英, 张 贵, 等. 灰翅麦茎蜂防治适期研究[J]. *青海农林科技*, 1998, 3: 49
- [11] 钱秀娟, 梁俊燕, 刘长仲. 皋兰县麦长管蚜的田间消长规律及预测模型[J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(2): 183-185
- [12] 柳小妮, 蒋文兰. 甘肃省草地蝗虫测报系统研究现状[J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(5): 562-566
- [13] 王 伟, 刘长仲, 姜生林, 等. 敦煌市棉田烟粉虱发生规律的研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2007, 42(5): 104-107

(责任编辑 许 涛)