

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.06.7

水稻二化螟和三化螟基因组 ddRADseq 文库的构建

杨 琼^{1*}, 孙 娜^{1,2*}, 郑 敏¹, 罗除成¹, 罗光华^{1**}, 方继朝^{1**}

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 本文介绍了构建水稻二化螟和三化螟“双酶切限制性酶切位点关联 DNA 测序”(Double digest restriction-site associated DNA sequencing, ddRADseq) 文库的方法。利用安捷伦 2100 生物分析仪对 4 种单酶切及 2 种双酶切的酶切产物片段大小及分布范围进行分析, 筛选出 *Mlu*C I 和 *Nla* III 两种限制性内切酶组合对螟虫基因组 DNA 进行酶切。酶切后的 DNA 片段两端连接上特定的 P1、P2 接头后, 用 Pippin Prep 回收大小为 285–435 bp 的 DNA 片段。通过 PCR 扩增进行文库的富集并引入 index 序列。构建好的 ddRADseq 文库用琼脂糖凝胶电泳和生物分析仪进行质量检测。本方法所构建的文库 DNA 片段长度、分布和摩尔浓度能够达到 Illumina 平台测序的技术要求。本研究证实了利用 *Mlu*C I 和 *Nla* III 组合酶切构建水稻螟虫基因组 ddRADseq 文库的可行性, 为在水稻螟虫中利用 ddRADseq 技术开展生物地理学、种群遗传学和系统发育重建等方面的研究奠定基础。

关键词: 基因组 DNA 文库; ddRADseq; 生物分析仪; 水稻螟虫

中图分类号: Q963; S433

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 06-1114-07

Construction of genomic ddRADseq libraries of *Chilo suppressalis* and *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae)

YANG Qiong^{1*}, SUN Na^{1,2*}, ZHENG Min¹, LUO Chu-Cheng¹, LUO Guang-Hua^{1**}, FANG Ji-Chao^{1**}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 2100140, China;

2. College of Plant Protection, Nanjing Agriculture University, Nanjing 2100950, China)

Abstract: We introduce a method of using two frequent cutter enzymes to construct restriction-site associated DNA sequencing (ddRADseq) libraries for *Chilo suppressalis* and *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). The fragment size distribution generated by a given pair of restriction endonucleases was estimated using Agilent 2100 Bioanalyzer. Based on Bioanalyzer analysis, we chose two frequent cutter enzymes (*Mlu*C I and *Nla* III) for genomic DNA digestion. Each individual of stem borers was labelled with a unique combination of P1 and P2 barcodes. Size selection of adapter-ligated DNA fragments between 285–435 bp was performed using a Pippin Prep. Finally, size selected DNA was used as a template in PCR amplification. PCR primers will add a unique index sequence to all DNA fragments in the PCR reaction. Evaluation of the final libraries was performed using both routine agarose gel electrophoresis and Bioanalyzer. Both assessments showed that the molarity and fragment size distribution were appropriate for Illumina sequencing. This method confirms the feasibility of using a combination of restriction enzymes (*Mlu*C I and *Nla* III) to construct the genomic ddRADseq libraries for the stem borers, which lays an important foundation for investigation into biogeography, population genetics and phylogenetics on rice stem borers.

Key Words: gDNA library; ddRADseq; bioanalyzer; rice stem borer

基金项目: 国家水稻产业技术体系项目 (CARS-01-25); 江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX (16) 1001); 江苏省农业科学院院基金项目 (6111606)

* 共同第一作者简介: 杨琼, 博士, 副研究员, 研究方向为水稻虫害综合治理; 孙娜, 硕士研究生, 研究方向为水稻虫害防控。

** 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: luogh_cn@163.com, fangjc@jaas.ac.cn

收稿日期 Received: 2016-10-24; 接受日期 Accepted: 2016-11-08

二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker) 和三化螟 *Scirpophaga incertulas* (Walker) 是我国水稻上的重要钻蛀性害虫, 危害范围广, 可造成重大的经济损失 (盛承发等, 2003)。目前, 对二化螟和三化螟的防治主要依赖化学农药, 但化学农药的长期及大量使用使它们产生了明显的抗药性, 并且造成农药残留和环境污染 (吴孔明等, 2009)。因此, 迫切需要开发出更高效环保的治螟技术与方法。

害虫一般都具有很强的环境适应性。种群具有高适应性是基于其内在丰富的遗传多样性。研究害虫种群的遗传多样性, 一方面是探索害虫种群遗传分化的机制, 另一方面则是寻找治理害虫新策略的突破口 (韩海斌等, 2013; 周宇等, 2013)。种群遗传多样性研究是基于各种分子标记开展的, 如微卫星、线粒体 DNA 基因 (CO I, CO II)、转座子等 (Meng *et al.*, 2008)。随着科技的进步与技术的发展, 基于二代测序技术的简化基因组测序技术为种群遗传学研究提供了更丰富而准确的分析数据 (翟正晓, 2014; 魏书军等, 2016)。在各种简化基因组测序技术中, 发展最快且应用最广泛的是限制性酶切位点关联 DNA 测序技术 (Restriction-site associated DNA sequencing, RADseq)。该技术体系具有通量较高、成本偏低、试验周期较短并且无需参考基因组等优点 (Peterson *et al.*, 2012)。经过不断发展, RADseq 技术已经有了多种版本, 如 mbRAD、ddRAD、2bRAD、ezRAD、nextRAD 等, 能满足多种不同的试验设计与要求 (Andrews *et al.*, 2016)。其中, 双酶切限制性酶切位点关联 DNA 测序 (Double digest restriction-site associated DNA sequencing, ddRADseq) 技术具有成本低、SNPs 位点数量多且准确等优势, 故很多研究利用该技术方案开展相关的研究 (Willing *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2012)。

ddRADseq 的技术特点是利用 2 种限制性内切酶组合对基因组 DNA 进行双酶切构建基因组 DNA 测序文库。该技术能够大幅度降低基因组复杂度, 快速获得每个样本的基因型, 在整个基因组范围内鉴定出高密度的 SNP 位点, 可以用于构建未知基因组序列生物的高密度遗传连锁图谱, QTL 定位、寻找 DNA 多态性和群体进化研究 (王冠杰等, 2012; 王莹, 2014)。该技术策略可以高效、准确、低成本的确定生物的基因型, 是一种非常

实用的研究方法, 在复杂基因组研究领域具有广泛地应用前景 (王洋坤等, 2014)。

二化螟和三化螟, 特别是二化螟分布范围极其广泛, 表明他们具有很高的环境适应性和丰富的遗传多样性 (Meng *et al.*, 2008)。目前, 已经有研究者利用微卫星分子标记、线粒体 DNA 基因 (CO I 和 CO II) 等方法对二化螟的种群遗传多样性进行了研究 (Meng *et al.*, 2008)。但上述这些方法获得的数据量及分辨率远不及基于二代测序的简化基因组测序技术 (Rašić *et al.*, 2014)。为此, 本研究以二化螟和三化螟为实验材料, 利用试剂盒单头提取试虫基因组 DNA, 选用限制性核酸内切酶 *MluC* I 和 *Nla* III 对个体基因组 DNA 进行双酶切, 构建二化螟和三化螟的 ddRAD 文库, 为后续这两种螟虫的种群遗传学等研究提供重要的基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

从安徽和县水稻田采集的二化螟和从江西瑞昌水稻田采集三化螟, 经饥饿处理后单头虫体浸泡在 95% 乙醇中, 置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 双酶切方法构建水稻螟虫基因组 ddRADseq 文库

构建 ddRADseq 文库的主要步骤: ①基因组 DNA 的提取; ②限制性内切酶的筛选; ③基因组 DNA 双酶切反应; ④酶切后的 DNA 片段两端连接含 barcode 的 P1 和 P2 接头; ⑤Pippin Prep 全自动核酸片段回收仪回收目的 DNA 片段; ⑥PCR 扩增对文库进行富集。

1.2.1 基因组 DNA 的提取

利用 Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒 (Qiagen 公司, 德国) 单头提取试虫的 gDNA, 提取方法参照试剂盒说明书。取单头虫体置于吸水纸上, 使其表面彻底晾干, 经液氮速冻后迅速研磨虫体, 然后按照试剂盒的使用说明进行操作。gDNA 经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳和 Qubit® 3.0 型荧光计 (Invitrogen 公司, 美国) 测定浓度和纯度后保存于 -20℃ 冰箱。

1.2.2 限制性内切酶的筛选

选择合适的限制性内切酶是构建文库的关键步骤。不仅要保证产生的 RAD 标记能够在基因组上均匀分布, 同时所获得的 RAD 标记数量能够覆

盖一定比例的基因组，这样才可以用于后续的 SNP 检测和个体及种群的遗传分化分析。RAD 位点即一段相邻于某一个或者一组限制性内切酶酶切位点的 DNA 片段 (Peterson *et al.*, 2012)。本研究用安捷伦 Bioanalyzer 2100 芯片分析系统 (Agilent 公司, 美国) 分析不同限制性内切酶组合产生的 DNA 片段的数量、摩尔浓度以及在整个基因组的分布。本研究选用了 *MluC* I (4 bp site, 0% G/C)、*Nla* III (4 bp site, 50% G/C)、*EcoR* I (6 bp site, 33% G/C)、*Sph* I (6 bp site, 66%

G/C) (NEB 公司, 美国) 4 种内切酶, 他们都能在 NEB Buffer 中保持完全的活性, 并且可以组合进行双酶切。使用 50 μL 的酶切体系, 反应体系配制如下: 10 $\times$ CutSmart Buffer 5 μL , 限制性内切酶 1 μL (单酶切) / 2 μL (双酶切), gDNA 120 ng, 最后 ddH₂O 补齐至 50 μL (表 1)。按照表 1 配制酶切反应体系, 充分混匀后, 短暂离心, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。酶切反应结束后, 用 1.5 $\times$ AMPure XP beads 浓缩、纯化, 最终用 40 μL ddH₂O 溶解 DNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

表 1 限制性内切酶酶切反应体系

Table 1 Reaction system of restriction enzyme

酶切类型 Types	Buffer 种类 Types of buffer	内切酶 Enzyme	反应体系 (50 μL) Reaction system
单酶切	CutSmart buffer	<i>MluC</i> I	DNA + H ₂ O: 35 μL
	CutSmart buffer	<i>Nla</i> III	Buffer: 5 μL
	<i>EcoR</i> I buffer	<i>EcoR</i> I	酶: 1 μL
	2. 1	<i>Sph</i> I	H ₂ O: 9 μL
双酶切	2. 1	<i>EcoR</i> I & <i>Sph</i> I	DNA + H ₂ O: 35 μL
	CutSmart buffer	<i>MluC</i> I & <i>Nla</i> III	Buffer: 5 μL
			酶: 2 μL
			H ₂ O: 8 μL

用 Qubit 测定酶切纯化产物的 DNA 浓度后用安捷伦 2100 生物分析仪进行检测。芯片的使用参照 High Sensitivity DNA Chips 试剂盒说明进行。酶切产物用生物分析仪检测后, 经计算分析, 最终确定选择 *MluC* I 和 *Nla* III 进行基因组 DNA 的酶切。

1. 2. 3 基因组 DNA 的双酶切反应

直接选用 *Nla* III 和 *MluC* I 双酶切组合进行后续试验。提取好的 gDNA, 用 Qubit 测定各样本 gDNA 的浓度, 随后计算每个样本酶切反应所需的 gDNA 量。利用限制性内切酶 *Nla* III 和 *MluC* I 对每个样本 gDNA 进行双酶切, 反应体系及酶切方法同上。酶切后的 DNA 利用 1.5 $\times$ AMPure XP Beads 进行纯化并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1. 2. 4 酶切产物的接头连接

酶切纯化后的 DNA 经 Qubit 测定浓度后, 用 T4 DNA 连接酶 (NEB) 连接 P1、P2 接头。连接反应体系如下: DNA (35 ng) + ddH₂O 35 μL , T4 DNA Ligase Buffer 4.5 μL , T4 DNA Ligase

0.55 μL , P1 接头 2 μL , P2 接头 2 μL , 最后用 ddH₂O 补齐至 45 μL 。将以上反应体系置于 16 $^{\circ}\text{C}$ PCR 仪中过夜孵育。过夜孵育结束后, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 再以每 90 s 退火 2 $^{\circ}\text{C}$ 的速度循环 22 次, 最后的连接产物用 1.5 $\times$ AMPure XP Beads 纯化, 再用 Qubit 检测连接反应后 DNA 的浓度。纯化后的连接产物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。连接反应后, 每个样本都连接上可以用于区分个体的独一无二的 Barcode 组合, 将一定数量个体的酶切 DNA 合并至一个文库。

1. 2. 5 目标 DNA 片段的收集

利用 Pippin Prep 全自动核酸电泳和片段回收系统 (sage science 公司, 美国) 收集目标片段。回收系统的使用参照说明书进行。本文库需要收集大小在 285 - 435 bp (含 85 bp 接头) 的 DNA 片段, 收集后的 DNA 产物再用 Qubit 测定浓度。

1. 2. 6 PCR 富集和 index 序列引入

经过片段大小选择、回收后的 DNA 作为模板, 利用含 Illumina 测序平台对应的引物 (10uM)

Primer F (5′ AATGATACGGCGACCACCGAGATCTA CACTCTTTCCCTACACGACG 3′) 和 Primer R (5′ CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACATCGGTGG ACGTGTGC3′) 进行 PCR 扩增, 将两端连有 P1 和 P2 接头的目的片段进行富集, 同时引入 index 序列 (下划线部分所示)。如研究需要构建多个文库, 可以设计多条含有不同 6 bp 长度的 index 序列的反向引物进行 PCR 扩增, 测序完成后根据每个文库特定的 index 序列来区分不同的文库。Index 和 Barcode 的使用增加了每个测序孔中样本的数量, 降低了试验成本。10 μL PCR 扩增体系为: PCR phusion 2X master mix 5 μL, PCR Illumina primer F (10 uM) 2 μL, PCR Illumina primer R (10 uM) 2 μL, DNA 1 μL。反应条件为: 98℃ 预变性 30 s; 98℃ 10 s, 65℃ 30 s, 98℃ 45 s, 12 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。最终用于 Illumina 平台测序的 gDNA 文库使用 Qubit 和生物分析仪进行检测分析。

2 结果与分析

2.1 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测

利用限制性内切酶 *MluC* I 和 *Nla* III 对二化螟和三化螟个体的基因组 DNA 进行双酶切后, 用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 酶切后的基因组 DNA 呈现为一条弥散的条带, 大部分片段集中于 200 – 400 bp 之间 (图 1)。

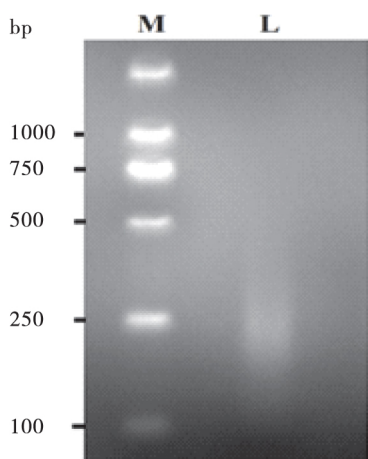


图 1 二化螟基因组 DNA 双酶切后电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of gDNA double digestion products of *Chilo suppressalis*
M, DNA Ladder; L, gDNA 酶切产物。M, DNA Ladder; L, gDNA digestion products of *C. suppressalis*.

2.2 限制性内切酶选择的 Bioanalyzer 分析

分别使用 *MluC* I、*Nla* III、*EcoR* I、*Sph* I 单酶切及 *MluC* I-*Nla* III、*EcoR* I-*Sph* I 的双酶切酶切组合对二化螟和三化螟的 gDNA 进行酶切, 酶切产物安捷伦 2100 生物分析仪进行检测, 结果分析如图 2。 *MluC* I (50 – 3000 bp)、*Nla* III (500 – 3000 bp)、*EcoR* I (1000 – 7000 bp)、*Sph* I (2000 – 7000 bp) 4 种酶的单酶切和 *EcoR* I-*Sph* I (2000 – 8000 bp) 双酶切组合产生的 DNA 片段大小及分布均不符合 Illumina 测序平台 (PE125) 和后续实验目的要求。 *MluC* I 和 *Nla* III 均为 4 碱基内切酶, 切割底物的频率更快, *MluC* I-*Nla* III 组合酶切产生的 DNA 片段大小主要分布在 100 – 300 bp, 完全满足后续实验对 RAD tag 的要求。将 *MluC* I 和 *Nla* III 单酶切、双酶切的 Bioanalyzer 数据结合二化螟和三化螟基因组大小进行计算, 得到 *MluC* I 和 *Nla* III 双酶切产生的 DNA 片段在各种大小范围内的数量 (表 2)。因 Illumina 测序平台 (PE125) 的读长是 125 bp, 所以选择的 DNA 片段大小原则上应 ≥ 250 bp, 但计算后发现, 如全部舍弃 250 bp 以下的片段, 将会导致丢失大部分 RAD 位点。因此决定选择 200 – 350 bp 的范围, 在这个范围内, 二化螟共有 397060 个 DNA 片段, 三化螟有 344973 个 DNA 片段 (表 2)。

表 2 *MluC* I 和 *Nla* III 双酶切产物的 Bioanalyzer 分析
Table 2 Bioanalyzer analysis of both *MluC* I and *Nla* III digestion products

片段范围 (bp) Size region	二化螟 DNA 片段数 <i>C. suppressalis</i>	三化螟 DNA 片段数 <i>S. incertulas</i>
	fragment No.	fragment No.
50 – 100	668652	504066
100 – 150	603697	527641
150 – 200	368637	326780
200 – 250	203037	183091
250 – 300	123934	103540
300 – 350	70089	58342
350 – 400	50578	33681

2.3 DNA 文库的琼脂糖凝胶电泳和 Bioanalyzer 检测分析

利用 Qubit 检测构建的 ddRAD 文库的浓度, 然后用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳和生物分析仪进行检测分析 (图 3)。从图 3 中可以看出, 2.5% 琼脂

糖凝胶电泳图谱和生物分析仪电泳图谱较为一致，DNA 片段均集中在 330 – 480 bp，表明成功构建了

二化螟和三化螟的目标基因组 DNA 文库，可以在 Illumina 测序仪上进行测序。

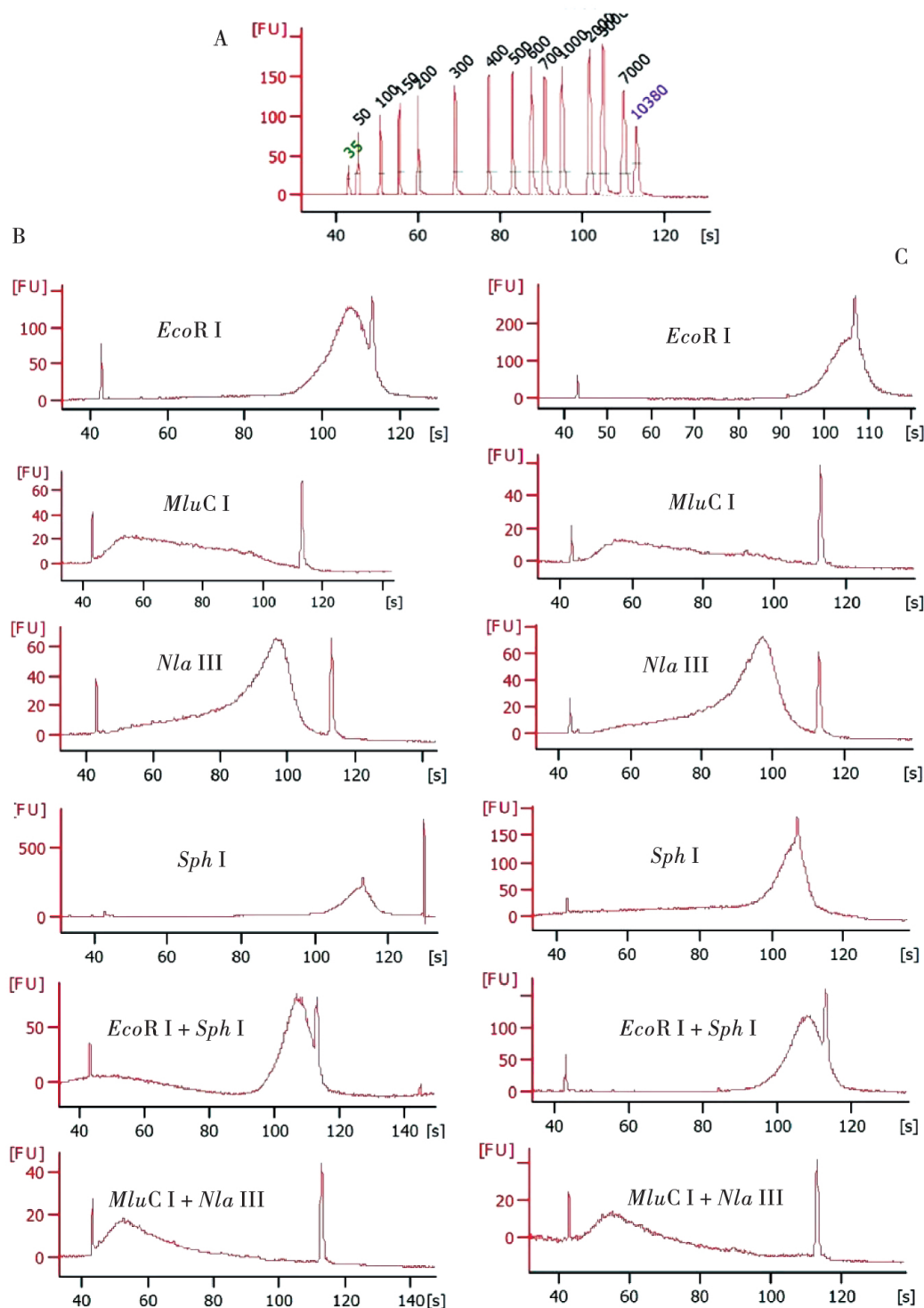


图2 各种酶切产物的 Bioanalyzer 分析

Fig. 2 Bioanalyzer analysis of various combinations of restriction enzymes

A, DNA Ladder; B, 二化螟 gDNA 酶切; C, 三化螟 gDNA 酶切。A, DNA Ladder; B, digestion of *C. suppressalis* gDNA; C, digestion of *S. incertulas* gDNA.

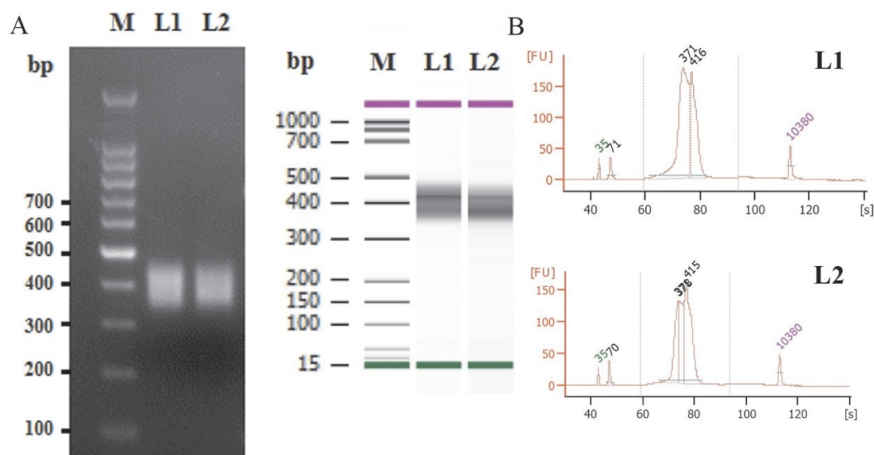


图3 基因组 DNA 文库的琼脂糖凝胶电泳和 Bioanalyzer 分析

Fig. 3 Analysis of agarose gel electrophoresis and Bioanalyzer for gDNA library

A, 基因组 ddRADseq 文库琼脂糖凝胶电泳分析; B, 基因组 DNA 文库 Bioanalyzer 分析。M 为 DNA Ladder, L1 为二化螟基因组 ddRADseq 文库, L2 为三化螟基因组 ddRADseq 文库。A, Electrophoresis analysis of ddRADseq library; B, Bioanalyzer analysis of ddRADseq library. M, DNA Ladder; L1, ddRADseq library of *C. suppressalis*; L2, ddRADseq library of *S. incertulas*.

3 结论与讨论

二化螟和三化螟作为水稻上的重要害虫, 一直受到关注, 其遗传多样性研究也是害虫综合治理的重要研究内容之一。本研究利用筛选出 2 种高频率限制性内切酶并对二化螟和三化螟基因组 DNA 进行酶切, 成功构建 ddRADseq 文库, 为深入开展其种群遗传学研究奠定了重要基础。

随着二代测序技术的发展, 各类简化基因组测序技术迅速发展起来, 这为种群遗传学带来了极大的便利。RADseq 技术是基于全基因组酶切位点的简化基因组测序技术, 最早应用于三刺鱼的生态特性遗传学研究 (Davey *et al.*, 2010)。早期的 RAD 文库制备过程通常包含酶切、连接 P1 接头、物理打断、末端修复、连接 P2 接头、片段选择等几个步骤, 物理打断和琼脂糖凝胶电泳进行片段选择的过程可能会造成 DNA 的损伤及损失。而 ddRADseq 技术 (Peterson *et al.*, 2012) 中 2 种限制性内切酶的目的性更强, 免去了随机打断的过程, 结合 Pippin Prep 全自动核酸电泳和片段回收系统精确的片段选择技术, 从而对 DNA 文库的筛选更严格。两种限制性内切酶的组合使用和严格的片段选择不仅降低了基因组的复杂度, 而且简化了文库的制备过程 (Bus *et al.*, 2012; Pukk *et al.*, 2015)。

生物分析仪是基于生物芯片技术的核酸分析系统, 在基因差异表达研究中具有重要的应用价值。与传统的琼脂糖凝胶电泳相比, 生物分析仪可以更简便、精确、直观地对 DNA 片段的大小、分布范围以及摩尔浓度进行定量分析, 可以清晰地显示短至 50 bp 的 DNA 条带和低至 0.02 ng 的 DNA 片段, 灵敏度更高。检测仅需 1 μ L 的实验样本, 克服了传统的琼脂糖凝胶电泳的局限性。在 DNA、RNA、蛋白质和细胞样品的分析中都发挥了重要的作用 (刘翠华等, 2002)。该核酸分析系统在制备本研究所涉及的基因组 ddRADseq 文库过程中起到重要的作用。

目前, 尚无关于构建二化螟和三化螟基因组文库的报道。本研究证实了用双酶切方法构建水稻螟虫基因组 ddRADseq 文库的可行性。由于 RADseq 数据的分析不需要参考基因组序列就可以产生大量的 SNP 标记, 结合传统的形态学、生理学、生态学等方法, 该技术可以广泛地应用于模式生物和非模式生物的种群遗传学、系统发生生物地理学、系统发育、物种界定、遗传图谱构建等诸多领域的研究, 也将在昆虫学研究中发挥重要的作用 (Houston *et al.*, 2012; 魏书军等, 2016)。相比 RADseq 技术, ddRADseq 技术大大简化了实验流程, 但同时也存在着多次选酶、使用仪器复杂等缺点, Pukk 等 (2015) 人开发出一种被子植物通用的双酶切简化基因组 (Modified

ddRAD, MiddRAD) 二代测序文库构建方法, 免去了多次选酶、定量、纯化产物等步骤, 优化了复杂的建库仪器, 降低了实验成本。随着技术的不断优化, ddRADseq 技术将成为昆虫遗传学研究的重要手段, 也将在其它研究领域中发挥更大的应用价值。

参考文献 (References)

- Andrews KR, Good JM, Miller MR, *et al.* Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17 (2) .
- Bus A, Hecht J, Huettel B, *et al.* High-throughput polymorphism detection and genotyping in *Brassica napus* using next-generation RAD sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13 (13): 281.
- Davey JW, Davey JL, Blaxter ML, *et al.* RADSeq: Next-generation population genetics [J]. *Briefings in Functional Genomics*, 2010, 9 (5-6): 416-23.
- Han HB, Zhou XR, Pang BP, *et al.* Microsatellite marker analysis of the genetic diversity of *Oedaleus asiaticus* (Orthoptera: Acrididae) populations in Inner Mongolia, Northern China [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56 (1): 79-87. [韩海斌, 周晓榕, 庞保平, 等. 内蒙古亚洲小车蝗种群遗传多样性的微卫星分析 [J]. 昆虫学报, 2013, 56 (1): 79-87]
- Houston RD, Davey JW, Bishop SC, *et al.* Characterisation of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed *Atlantic salmon* [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13 (1): 1-15.
- Liu CH, Ma WL, Shi R, *et al.* Application of agilent 2100 bioanalyzer in the study of differential gene expression [J]. *Academic Journal of the First Medical College of PLA*, 2002, 22 (12): 1066-1069. [刘翠华, 马文丽, 石嵘, 等. Agilent 2100 Bioanalyzer 在基因差异表达研究中的应用 [J]. 第一军医大学学报, 2002, 22 (12): 1066-1069]
- Meng XF, Shi M, Chen XX. Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): Strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17 (12): 2880-2897.
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, *et al.* Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (5), e37135.
- Pukk L, Ahmad F, Hasan S, *et al.* Less is more: Extreme genome complexity reduction with ddRAD using Ion Torrent semiconductor technology [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15 (5): 1145-52.
- Rašić G, Endersby NM, Williams C, *et al.* Using *Wolbachia*-based release for suppression of *Aedes* mosquitoes: Insights from genetic data and population simulations [J]. *Ecological Applications*, 2014, 24 (5): 1226-1234.
- Sheng CF, Wang HT, Sheng SY, *et al.* Pest status and loss assessment of crop damage caused by the rice borers, *Chilo suppressalis* and *Tryporyza incertulas* in China [J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 4: 289-294. [盛承发, 王红托, 盛世余, 等. 我国稻螟灾害的现状与损失估计 [J]. 昆虫知识, 2003, 4: 289-294]
- Wang GJ, Zhou B, Li YH. The RAD-tagged Sequencing and its application in molecular breeding [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 28 (9): 797-803. [王冠杰, 周波, 李玉花. RAD 标记测序及其在分子育种中的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28 (9): 797-803]
- Wang YK, Hu Y, Zhang TZ. Current status and perspective of RAD-seq in genomic research [J]. *Heredity*, 2014, 36 (1): 41-49. [王洋坤, 胡艳, 张天真. RAD-seq 技术在基因组研究中的现状及展望 [J]. 遗传, 2014, 36 (1): 41-49]
- Wei SJ, Li BY, Cao LJ, *et al.* RAD-seq and its application in entomological research [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2016, 59 (7): 767-774. [魏书军, 李冰艳, 曹利军, 等. RAD-seq 技术及其在昆虫学研究中的应用 [J]. 昆虫学报, 2016, 59 (7): 767-774]
- Willing EM, Hoffmann M, Klein JD, *et al.* Paired-end RAD-seq for de novo assembly and marker design without available reference [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27 (16): 2187-93.
- Wu KM, Lu YH, Wang ZY. Advance in integrated pest management of crops in China [J]. *Entomological Knowledge*, 2009, 46 (6): 831-836. [吴孔明, 陆宴辉, 王振营. 我国农业害虫综合防治研究现状与展望 [J]. 昆虫知识, 2009, 46 (6): 831-836]
- Zhai ZX. SNP Mapping and Population Genetic Analyses for 13 Chinese Indigenous Chicken Breeds Using RAD Sequencing [D]. Shanghai Jiao Tong University, 2014. [翟正晓. 基于 RAD 简化基因组测序技术的 13 种中国地方优良鸡品种 SNPs 多态性图谱构建及群体遗传学分析 [D]. 上海交通大学, 2014]
- Zhou Y, Yang Q, Han GJ, *et al.* Isolation of genomic microsatellite molecular marker by suppression-PCR in *Scirpophaga incertulas* (Walker) [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29 (5): 999-1004. [周宇, 杨琼, 韩光杰, 等. 抑制 PCR 富集法分离三化螟基因组微卫星分子标记 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29 (5): 999-1004]
- Wang Y. Construction of High-Density Linkage Maps of *Populus deltoids* × *P. simonii* Using Restriction-Site Associated DNA Sequencing [D]. Nanjing Forestry University, 2014. [王莹. 利用 RAD-seq 测序构建美洲黑杨 × 小叶杨高密度遗传连锁图谱 [D]. 南京林业大学, 2014]