

美国白蛾基因水平研究进展

吴晶¹, 钱路², 许忠祥¹, 叶兼菱², 韩鸣花¹, 宋杰^{1*}

(1. 南京出入境检验检疫局, 江苏南京 211100; 2. 江苏出入境检验检疫局, 江苏南京 210001)

摘要 针对美国白蛾有关基因水平的研究现状进行综述。目前美国白蛾有关基因方面的研究主要有3个方面: 一是线粒体DNA相关的研究, 主要是美国白蛾线粒体基因组序列测定和分析, 涉及DNA条形码鉴别技术; 二是探讨美国白蛾遗传多样性与种群分化, 主要通过DNA遗传学基础研究认识外来入侵种的适应性机制; 三是针对美国白蛾核型多角体病毒HcNPV开展的美国白蛾生物防治方面的研究。

关键词 美国白蛾; 基因; 研究进展

中图分类号 S433.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)36-13890-03

Research Advance of *Hyphantria cunea*(Drury) Genes

WU Jing et al (Nanjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing, Jiangsu 211100)

Abstract The advances in the research over *Hyphantria cunea*(Drury) genes were reviewed. The current study may be divided into three aspects. The first is the research on mitochondrial DNA, testing mitochondrial genome sequence and involving DNA barcode identification. The second is the research over *Hyphantria cunea*(Drury) genetic diversity and population differentiation, basing on genetic study of DNA to study adaptive mechanism of alien invasive species. The last is the research on study of biological control using nuclear polyhedrosis virus HcNPV.

Key words *Hyphantria cunea*(Drury); Genes; Research advance

美国白蛾 *Hyphantria cunea*(Drury) 属鳞翅目灯蛾科, 原产北美, 广泛分布于美国北部、加拿大南部和墨西哥。后随交通工具传入欧洲、日本、朝鲜。1979年在我国辽宁丹东首次发现, 在我国目前已扩散到辽宁、河北、天津、山东、陕西等省市^[1]。美国白蛾食性杂、食量大、繁殖力强、寄主范围极广, 在我国的寄主植物已达49科108属175种^[2]。美国白蛾是一种入侵性极强的有害生物, 具有适生性强, 分布广泛, 寄主植物繁多, 扩散速度快等特点, 给各发生区造成了严重的经济损失。由于其毁灭性强已被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》。美国白蛾在原产地北美是一种并不引人注目的次要害虫, 国外的研究报道较少^[3]。目前的研究报道主要来自欧洲、日本、韩国、中国等这些后被入侵的国家和地区, 大部分文献都集中于美国白蛾的生物生态学特性、预测预报、性信息素和防治方面^[4-8]。随着分子生物学的发展, 美国白蛾的基因方向的研究也取得了很大进展。研究主要集中在在线粒体DNA相关研究、美国白蛾遗传与种群分化、美国白蛾生物防治为目的基因研究。笔者通过对这些相关研究进行分析, 就美国白蛾基因方面的研究现状作一综述。

1 美国白蛾线粒体DNA相关的研究

线粒体是一种几乎存在于所有真核生物的细胞器, 与能量代谢、凋亡、衰老以及疾病相关, 是氧化磷酸化的场所。线粒体DNA(mtDNA)组大多数呈环状, 少部分呈线状。它有母性遗传、缺乏重组以及进化速度较快等特点, 是研究昆虫系统学常用的分子标记^[9]。mtDNA序列的12S RNA、16S RNA、COI、COII基因是昆虫中使用最为广泛的线粒体基因片

段。12S RNA、16S RNA 比较适合属间不同种团的研究^[10-11]。COI、COII基因在物种属间保守, 种间变异较大适合作为物种间鉴定的分子标记^[12-15]。美国白蛾相关的线粒体DNA研究内容主要是美国白蛾线粒体基因组序列测定和分析, 涉及分子角度的适应性研究和DNA条形码鉴别技术。

Ozaki等^[16]通过研究日本和原产地佛罗里达州2个美国白蛾种群的COI序列, 得出美国白蛾在日本变异是由于物种适应不同地区环境气候的进化反应, 是一种入侵种自然选择的结果。Gomi等^[17]研究发现美国白蛾在传入日本的前30年生活史为3个世代, 但之后日本西南部美国白蛾生活史产生了变化。通过研究对比14个日本种群、1个韩国种群以及3个北美种群的COI、COII和cytb基因序列, 发现日本种群与朝鲜种群相同, 与北美种群不同, 这是导致日本种群生活史发生改变的原因, 据研究推测这是外来物种对新的气候环境适应的结果。Hebert等^[18]基于200个鳞翅目昆虫的COI基因序列探讨了COI基因在构建DNA条形码(DNA barcodes)用于鉴别鳞翅目昆虫的可行性。廖芳等^[19]通过设计引物分段扩增, 序列测定和拼接, 首次获得了美国白蛾线粒体全基因组序列。全基因组包含13个蛋白码基因(PCGs)、22个tRNA基因、2个rRNA亚单位和一个非编码区域。

2 以美国白蛾遗传多样性与种群分化为目的的基因研究

昆虫种群的遗传分化受环境因素的影响而且与种群的自身适应性相关^[20]。研究外来入侵物种适应性遗传学进化, 对于探究外来入侵物种的适应性机制有非常重要的意义。物种在不同地理区域中因环境和气候的不同产生的种群遗传分化可能是其适应不同环境的重要方式^[21]。美国白蛾自1979年首次入侵我国辽宁省丹东地区, 在我国定殖已30余年。为了了解该入侵害虫的遗传多样性和遗传变异规律, 多位学者运用分子生物学新技术展开了相关研究。

基金项目 江苏出入境检验检疫局项目: 美国白蛾与近似种分子检测研究(2013KJ53)。

作者简介 吴晶(1981-), 女, 云南昆明人, 农艺师, 硕士, 从事昆虫分类、植物检验检疫工作。*通讯作者, 工程师, 硕士, 从事植物检验检疫工作。

收稿日期 2013-11-22

高宝嘉等^[22]选取沧州、石家庄、秦皇岛、丹东、烟台 5 个美国白蛾地理种群 DNA 样品,采用微卫星分子标记技术,筛选 10 对引物进行 PCR 扩增,并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。结果表明 5 个种群中美国白蛾沧州种群的遗传多样性最高,石家庄种群遗传多样性最低。美国白蛾具有很丰富的遗传多样性,种群间的分化度较低,种群内变异比例高,种群间的变异比例小,这些和美国白蛾种群在一定区域内活动广、寄主杂、雨水量等因素有一定的相关性;入侵物种的经纬度、平原比率、年降水量、入侵来源、入侵时间是导致种群变异的主要因素,美国白蛾的种群变异和它自身的生活习性有关^[23]。

闾国仕等^[24]采集沈阳、庄河、鞍山、丹东、葫芦岛、东营、天津、北京和美国德克萨斯州 9 个地方的美国白蛾,应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术,选用 25 个 RAPD 引物共扩增 191 个位点对美国白蛾不同种群进行遗传多样性和 UPMGA 聚类分析。经研究 9 个美国白蛾种群分为 3 类:辽宁-山东类群、北京-天津类群和美国类群。9 个种群间的遗传距离随地理距离逐渐增加,表明地理距离与遗传距离存在相关性。同时地理隔离加上严格的检疫隔离使得美国白蛾不同地理种群间基因交流减少,造成了不同地理种群间的遗传分化。

刘颀等^[25]以我国暴发严重的 8 个地区的美国白蛾群体为材料,采用 AFLP 分子标记技术进行分析。5 对 AFLP 引物共扩增出 564 个位点, Nei's 遗传多样性指数 (h) 为 0.291 0, 具较高的遗传多样性;遗传分化指数显示,美国白蛾群体间分化程度大都属于较大或很大的范畴。而从遗传学角度分析,丰富的遗传多样性及快速分化的能力可能是美国白蛾具有强大入侵能力和生态适应能力的根源。聚类分析显示沈阳、济南、烟台和寿光群体亲缘关系较近,天津、济宁群体聚为一类,而廊坊、北京群体分别独立分支;一般外来物种入侵较早的种群具有较高的遗传多样性而新近入侵的遗传多样性相对较低^[26-27]。然而,入侵时间较短的济南、济宁种群的遗传多样性较高,可能是国内不同来源种群的重复传入的结果,这种多次入侵将原种群间的多样性转化为新入侵种群内的多样性。

研究美国白蛾群体的遗传多样性水平,群体间和群体内的遗传变异程度与遗传分化,进而对遗传结构与其适应机制和扩散传播规律之间的关系进行梳理,可为进一步优化现有美国白蛾的预警监测和防控体系提供科学依据。

3 美国白蛾生物防治为目的基因研究

以美国白蛾生物防治为目的基因研究主要是针对美国白蛾核型多角体病毒 HcNPV 的分子研究开展的。早在 1991 年 Hyung Hoan Lee 等^[28]选取 BamHI 和 SmaI 限制性外切酶对美国白蛾核型多角体病毒基因组作进行酶切分析,完成 HcNPV 基因组物理图。同年运用质粒载体克隆出部分基因组 EcoRI 酶切片段,并且克隆定位多角体蛋白基因 Polyhedrin。1999 年贡成良等^[29]研究完成美国白蛾核型多角体病毒 CP 基因的核苷酸序列以及蛋白质的一级结构特征;测

定了美国白蛾核型多角体病毒几丁质酶基因核苷酸序列;2000 年对美国白蛾核型多角体病毒半胱氨酸蛋白酶、几丁质酶基因进行失活分析,得出 CP、ChiA 两基因失活后可延长细胞持续表达外源基因的时间的结论。2001 年曹广力^[30]研究分析美国白蛾核型多角体病毒超氧化物歧化酶基因的序列,研究表明:HcNPV SOD 蛋白中含有对结构和活性必需的氨基酸残基且在 HcNPV SOD 中均为保守。第 2 年对美国白蛾核型多角体病毒 p35 基因进行克隆和序列分析,推测出 HcNPVp35 蛋白与 BomoNPVT3p35 蛋白功能相同并且都具有抑制细胞凋亡的能力。2006 年 Ikda 等^[31]完成美国白蛾全基因组序列的测定,HcNPV 基因组序列全长 132 959 bp,G + C 含量为 45.1%,有 148 个开放阅读框,编码 50 多种多肽。因拥有 group I NPVs 中特有的基因以及近缘关系,推断 HcNPV 属于 group INPVs,与 CfMNPV 和 OpMNPV 相似。完成美国白蛾核型多角体病毒全基因组序列,大大推进了美国白蛾核型多角体病毒的分子生物学研究。

4 展望

对美国白蛾的研究主要集中在欧洲、日本、韩国和中国,这些国家是美国白蛾的重灾区。随着分子生物学的发展,越来越多的研究对象转向了与美国白蛾相关的基因研究。2013 年小菜蛾基因组宣告破译,这是世界上首次成功完成鳞翅目昆虫原始类型基因组^[32],同时也是第一个世界性鳞翅目害虫的基因组,为鳞翅目昆虫的进化和比较基因组学研究提供宝贵的数据资源。新一代测序技术的问世,大大加快了各物种基因组学研究的进程,将这些技术运用到美国白蛾某些基因的研究中,也将更为快速、直接地发现这些基因在美国白蛾生长发育、适生性、基因鉴定等方面起到的作用。

参考文献

- [1] 张向欣,王正军.外来入侵种美国白蛾的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(1):215-219.
- [2] 胡水冰,曾岩,赵铁建,等.美国白蛾与其相似种奇特望灯蛾在形态学和生物学上的区别[J].动物分类学报,2009,34(1):148-154.
- [3] ALLEGRO G. The fall webworm after 20 years[J]. Sherwood Forested Alberi Oggi, 1997, 3(5): 31-36.
- [4] 杨忠岐.利用天敌昆虫控制我国重大林木害虫研究进展[J].中国生物防治,2004,20(4):221-227.
- [5] 张庆贺,初冬,朱丽虹,等.美国白蛾性信息素应用技术的研究[J].植物检疫,1998(2):65-69.
- [6] 张向欣,王正军.外来入侵种美国白蛾的研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(1):215-219.
- [7] 杨秀卿,魏建荣,杨忠岐.大连地区美国白蛾寄生性天敌昆虫[J].中国生物防治,2001,17(1):40-42.
- [8] 季荣,谢宝瑜,李欣海,等.外来入侵种:美国白蛾的研究进展[J].昆虫知识,2003,40(1):13-18.
- [9] 李青青,段焰青,李地艳.鳞翅目昆虫线粒体 DNA 的研究进展[J].云南农业大学学报,2009,24(5):746-756.
- [10] KATO T, CHICHVARKIN A, YAGI T, et al. Phyloeny and evolution of butterflyXies of the genus Parnassius; inferences from mitochondrial 16S and NDI sequences[J]. Zoological Science, 2005, 22:343-351.
- [11] 时号,张婧,蒋国芳.线粒体基因和核基因在蝶类分子系统学中的研究进展[J].广西科学,2006,13(2):156-160.
- [12] HAJIBABI M, JANZEN D H, BUMS J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2006, 103(4):968-971.
- [13] CAMERON S L, WHITING M F. The complete mitochondrial genome of the tobacco homworm, *Manduca sexta*, (Insecta; Lepidoptera; Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths[J]. Gene, 2008, 408(1/2):112-123.

- [14] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3: 294-299.
- [15] SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, et al. Evolution, weightiflg, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymers chain reaction primers[J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 1994, 87: 651-701.
- [16] OZAKI K, OHBAYASHI T. DNA comparison of Japanese populations of *Hyphantria cunea* with diver gent lifecycles[J]. *Entomological Science*, 2001, 4(1): 47-52.
- [17] GOMI L, MURAJI M, TAKEDA M. Mitochondrial DNA analysis of the introduced fall web worm showing its shift in life cycle in Japan[J]. *Entomol Sci*, 2004, 7: 183-188.
- [18] HEBERT P D, CYWIMKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 2003, 270: 313-321.
- [19] 廖芳. 重要植物疫害的检测鉴定及分子系统学研究[D]. 天津: 南开大学, 2010.
- [20] 薛进, 苏建伟, 黎家文. 中国水稻二化螟 5 个地理种群遗传差异的 RAPD 分析[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2007, 33(2): 160-163.
- [21] 邹喻苹, 葛颂. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 9-41.
- [22] 高宝嘉, 杜娟, 高素红, 等. 美国白蛾种群的遗传多样性与遗传分化[J]. *林业科学*, 2010, 46(8): 120-124.
- [23] 李进, 陈可咏, 李渤生, 等. 不同海拔高度川真高山栎群体遗传多样性的变化[J]. *植物学报*, 1998, 40(8): 761-767.
- [24] 阙国仕, 李雪, 王海鸿, 等. 美国白蛾种群遗传分化的 RAPD 分析[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(10): 2032-2036.
- [25] 刘颖, 李婧, 陈敏, 等. 中国美国白蛾种群遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *北京林业大学学报*, 2012, 24(7): 107-113.
- [26] CHAPMAN R E, BOURKE A F G. The influence of sociality on the conservation biology of social insects[J]. *Ecology Letters*, 2001, 4: 650-662.
- [27] AMSELLEM L, NOYER J L, BOURGEOIS T L, et al. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus salceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 443-455.
- [28] LEE H Y H. Cloning of the *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus Partial EcoRI Genome DNA Fragments in Plasmid Vectors pUC8 and pBR322[J]. *Kor Soc of Virology*, 1991, 21(1): 35-40.
- [29] 贡成良, 小林淳, 宫岛成寿. 美国白蛾核型多角体病毒几丁质酶基因核苷酸序列研究[J]. *病毒学报*, 1999, 15(3): 260-269.
- [30] 曹广力, 薛仁宇, 朱越雄, 等. 美国白蛾核型多角体病毒超氧化物歧化酶基因的序列分析和表达[J]. *微生物学报*, 2001, 41(2): 173-180.
- [31] IKEDA M. Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 2549-2562.
- [32] 谢开飞, 林祥聪, 曹佳奕. 我科学家破译小菜蛾基因组[N]. *科技日报*, 2013-01-14(001).

(上接第 13886 页)

pH 7.0 根际土壤中, 接种 3 d 后 L_1-9 菌落数从 3.23×10^7 CFU/g 上升至 3.16×10^8 CFU/g, 第 6 天下降到 10^7 CFU/g, 并继续下降。pH 8.0 土壤中, L_1-9 菌落数在接种后第 3 天时, 由最初的 1.28×10^7 CFU/g 下降到 5.30×10^6 CFU/g, 之后略有上升, 15d 达到最大值 5.54×10^7 CFU/g, 之后在 10^7 CFU/g 范围内波动下降, 24 d 时下降到最低。

2.2 不同 pH 下 L_1-9 菌株在黄瓜根际土壤中定殖结果显著性检验 对不同土壤 pH、同一时间黄瓜根际土壤中 L_1-9 菌株的含菌量进行 F 检验, 分析土壤 pH 对 L_1-9 菌株在黄瓜根际土壤中菌落数差异的显著性。以时间为横坐标, 菌落数为纵坐标作图, 结果见图 1 和图 2。

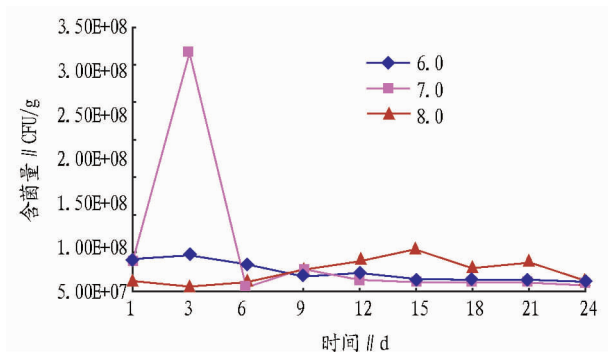


图 1 土壤 pH 对 L_1-9 菌株在黄瓜根际土壤中菌落数的影响

图 1 和图 2 表明, 同一时间不同 pH 的根际土壤中 L_1-9 菌落数有显著差异。接种后的第 6 天和第 12 天, 不同土壤 pH 之间 L_1-9 菌落数都有极显著差异; 接种后的第 3 天, pH 7.0 的根际土中 L_1-9 菌落数最高, 达 3.16×10^8 CFU/g, 与

pH 6.0 和 pH 8.0 处理菌落数之间有极显著差异, 这时 pH 6.0 和 pH 8.0 处理菌落数之间也有显著差异。其他时间的试验结果表明, 不同 pH 之间差异都达显著水平, 可见土壤 pH 对 L_1-9 菌株在黄瓜根际土壤中的定殖有明显影响。

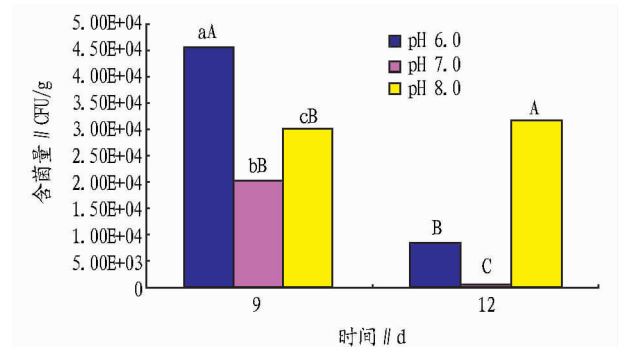


图 2 土壤 pH 对 L_1-9 菌株在黄瓜根际土壤中菌落数的影响

3 结论

该试验结果表明, 土壤酸碱度对 L_1-9 菌株在黄瓜根际土壤中的定殖有显著影响。在该试验条件下, 当 pH 为 7.0 时, 海洋生抗菌 L_1-9 菌落数最大, 定殖效果最好。

参考文献

- [1] 王涛, 王占利, 李木娜, 等. 棉花萎黄病拮抗细菌 DS45-2 菌株在土壤和棉花根内的定殖[J]. *棉花学报*, 2010, 22(2): 169-174.
- [2] 周洪友, 刘正坪, 胡俊, 等. 2,4-二乙酰基藤黄酚产生菌在番茄根部的定殖及对番茄青枯病的防治[J]. *华北农学报*, 2004, 19(4): 105-108.
- [3] 年洪娟, 陈丽梅. 土壤有益细菌在植物根际竞争定殖的影响因素[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(6): 1235-1239.
- [4] 张拥华, 高会兰, 马桂珍, 李世东. 粉红粘帚霉 67-1 菌株寄生核盘菌研究[J]. *植物病理学报*, 2004, 34(3): 211-214.
- [5] 杜森, 高祥照. 土壤分析技术规范[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.