

转基因在苹果蠹蛾不育昆虫释放技术中的应用*

朱虹昱^{1,2} 徐婧¹ 张润志^{1,3**}

(1. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学重点实验室 北京 100101;

2. 中国科学院研究生院 北京 100049; 3. 农业虫害鼠害综合治理技术国家重点实验室 北京 100101)

摘要 使用不育昆虫释放技术是一项新兴的苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 防治方法, 使用转基因得到不育雄蛾具有比传统辐射方法更多的优点。转基因技术通过使用基于 *piggyBac* 等转座子的质粒载体, 并插入显性条件致死基因以培育遗传性别品系, 同时插入荧光蛋白等标记基因来显示转基因的效果; 在人工控制的发育条件, 建立成熟的稳定苹果蠹蛾品系, 用以最终的田间释放以达到防治的目的。

关键词 苹果蠹蛾, 不育昆虫释放技术, 转基因技术, 遗传性别品系

Transgenic approaches applied to the sterile insect technique of codling moth control

ZHU Hong-Yu^{1,2} XU Jing¹ ZHANG Run-Zhi^{1,3**}

(1. CAS Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Beijing 100101, China)

Abstract The sterile insect technique (SIT) is a relatively new approach to controlling the codling moth. Compared with the traditional irradiation method, the application of transgenic techniques is much better at producing sterile males. In addition to manual control of developmental conditions this involves using plasmid vectors based on the *piggyBac* transposon, inserting a dominant conditional lethal gene to culture genetic sexing strains and inserting marker genes such as fluorescent proteins to elucidate the efficacy of gene transfer.

Key words *Cydia pomonella*, sterile insect technique, gene transfer, strain

1 不育昆虫释放技术及获得不育昆虫的常规方法

使用不育昆虫释放技术 (sterile insect technique, SIT) 防治害虫的概念产生于 20 世纪 30 至 40 年代 (Klassen and Curtis, 2005)。该技术的核心是通过释放不育昆虫同野生型的昆虫种群进行交配, 造成后代无法产生, 从而达到对于该地区种群的控制效果 (Knippling, 1955)。该方法由于能够结合其他的常规害虫防治方法进行操作, 因此在广域害虫综合治理的项目中有着非常重要的作用。而且, 使用该方法进行的广域害虫综合治理项目, 大都习惯于选择双翅目、鳞翅目等有重大危

害的害虫进行 (Lance and McInnis, 2005)。其最典型的防治范例包括针对新大陆螺旋蝇、实蝇类、采采蝇、舞毒蛾以及苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.) 等昆虫进行的广域害虫综合治理项目 (Bloem *et al.*, 2005; Enkerlin, 2005; Feldmann *et al.*, 2005; Vargas-Terán *et al.*, 2005)。

不育昆虫释放技术应用在苹果蠹蛾的防治工作中已有十余年的历史。自 1992 年开始在加拿大不列颠哥伦比亚省的 Okanagan Valley 进行的苹果蠹蛾控制项目, 是该技术最为著名的应用例证 (Dyck *et al.*, 1993; Vreyson *et al.*, 2010)。该项目经过多年不育苹果蠹蛾的田间释放, 大量减少了当地杀虫剂的使用, 并且对于该地区苹果蠹蛾

* 资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903042)、973 计划课题 (2009CB119204)。

** 通讯作者, E-mail: zhangrz@ioz.ac.cn

收稿日期: 2011-12-14, 接受日期: 2011-12-25

种群起到了较为成功的控制作用(Bloem *et al.*, 2005)。

一直以来,进行辐射诱导产生显性致死突变都是得到不育昆虫的常规方法(Robinson, 2005)。由于鳞翅目昆虫的染色体组成结构和双翅目等其他昆虫并不一样(Wolf, 1994; Traut and Maréc, 1996),能够达到不育的所需辐射量比其他种类比如双翅目的昆虫更高(LaChance, 1985),因此诱发突变的辐射处理通常会降低成虫的寿命、交配竞争能力和飞翔能力等(路大光和王华嵩,2002),而且辐射诱变也会损害到精子的传导过程(Carpenter *et al.*, 2005)。对于苹果蠹蛾而言,高剂量辐射能够造成其个体伤害以及野外适应性的降低(Bloem *et al.*, 1999)。而且,辐射诱导突变所需设备及保存辐射源所需设施的建设成本较高,这也是目前仅加拿大有其他国家无类似项目的原因之一。另外,该方法也同时也存在较大的失败风险(Tothová and Maréc, 2001; Robinson, 2002)。

2 转基因技术及其在不育昆虫释放技术中的应用

转基因技术是除辐射之外能够得到不育昆虫的另外一种途径,它主要通过对目标害虫进行遗传转化而得到想要的控制效果(O' Brochta and Handler, 2008)。在昆虫中使用的转基因技术的主要原理是,通过分子生物学方法将致死突变基因转入目标害虫,使其后代成为遗传不育(inherited sterility, IS, F1代不育),从而控制目标害虫种群(Lance and McInnis, 2005)。转基因方法之前在许多昆虫种类中都得以应用(Handler and Harrell II, 2001),如地中海果蝇 *Ceratitis capitata* (Handler *et al.*, 1998)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Handler and Harrell II, 1999)、家蚕蛾 *Bombyx mori* (Tamura *et al.*, 2000)和加勒比果蝇 *Anastrepha suspensa* (Handler and Harrell II, 2001)等。

包括苹果蠹蛾在内的所有鳞翅目昆虫的染色体均属于非单着丝点染色体,并且可以认为是全运动型(Murakami and Imai, 1974),这要求达到不育所需辐射的剂量非常高。但同时,其在细胞分裂的过程中发生染色体异位重组的机会也较高(染色体畸变)。如果将特定的致死突变通过转基

因的方法导入,能够很容易的得到可控制的遗传不育品系。在成熟的转基因品系内,通过插入并表达显性抑制的致死基因系统,能够大幅度提高不育昆虫释放的安全性;同时,可以加入荧光蛋白等基因标记,使得检测转基因的效率更加简易和便捷。通过转基因方法得到的苹果蠹蛾成虫,没有经过辐射处理,野外适应性较强,交配竞争能力也未受到影响,是一种更为安全更为经济有效的处理手段。

目前,在苹果蠹蛾的不育昆虫释放研究中,使用转基因方法的研究核心集中在如何获得高效转化的遗传性别品系,如何将显性条件致死基因转入并高效表达以及转化效果的检测等方面。

3 使用转基因方法获得不育苹果蠹蛾

3.1 转基因方法得到遗传不育的主要步骤

获得遗传不育的苹果蠹蛾时,自身来源于昆虫的转座子(如 *piggyBac* 和 *Minos* 等)成为了进行转基因操作的质粒载体的绝佳组成。但在实际操作中单一的转座子无法成功获得转基因,必须依靠其他特定的基因启动子(如 *hsp90* 等)及其他的辅助子的协助以促进转座酶的表达。为了表达的结果能够更容易的被观察和获知,在转座载体中插入标记基因(如 EGFP 荧光蛋白标记基因等)以得到容易辨认的结果。最为关键的是,在转座质粒载体中需要插入特定的条件致死基因系统(如自我调控的 *tetO-tTA* 系统),并转至苹果蠹蛾的性染色体中(W染色体)并使之连锁表达,这样在重组的时候即可以通过人工条件的控制达到性别筛选,也就是所谓的遗传性别品系的培育。最后,通过之前插入的标记基因表达结果的检测,评估和测定最终载体的转座效率以及转基因的效率。

转基因方法可以使得遗传性别品系和条件致死基因系统2种技术在苹果蠹蛾不育昆虫释放技术中同时得到应用(Ferguson *et al.*, 2011),这充分利用了遗传学的优势和先进的分子生物学的方法,通过结合使用得到较好的效果。

3.2 常用转座子载体与DNA重组

目前经常使用的昆虫转基因载体主要包括以 *piggyBac*、*Minos* 等转座子为基础的质粒载体。*piggyBac*(PB)转座子其最早是在建立粉纹夜蛾

Trichoplusia ni 受杆状病毒 (Baculovirus) 侵染的细胞系 (TN - 368) 时发现的 (Fraser *et al.*, 1983; Cary *et al.*, 1989), 并被广泛应用于昆虫的转基因研究中 (Handler and Harrell II, 1999; O' Brochta and Handler, 2008)。piggyBac 转座子能够在生物染色体中准确的切出和转座, 适用范围较广, 可在鳞翅目等昆虫中作为基因转化载体而发挥作用。由于 piggyBac 属于第 II 类转座子, 自身带有转座酶基因, 整个转座过程不需要转录和反转录过程, 因此它在基因间的移动更加自由, 用途也更加广泛。piggyBac 转座子由于本身就是来源于鳞翅目昆虫, 而这类昆虫共同的特点是生活周期短、饲养较容易、转基因品系的培育和稳定保持都较为简便, 转基因效果的检验评估也较为容易。因此, 使用 piggyBac 转座子作为苹果蠹蛾转基因的载体是非常适合的。近年来, 该转座子在哺乳动物中也得到了较为广泛的应用和研究 (谢飞等, 2011)。在 piggyBac 转座子中可以包含有 EGFP 等标记基因, 以便于转基因个体的识别 (Thibault *et al.*, 1999)。使用 piggyBac 转座子进行过成功转基因研究的目标昆虫包括地中海果蝇、黑腹果蝇、家蚕以及加勒比果蝇等。

Minos 转座子最初是从海德氏果蝇 *Drosophila hydei* (Sturtevant) 中意外得到的, 它属于 *Tc1/mariner* 转座元件超家族 (Franz and Savakis, 1991; Pavlopoulos *et al.*, 2007)。Minos 转座子也是一类目前作为鳞翅目昆虫转基因载体的转座子, 但是应用有一定的局限性。Minos 转座子之前曾应用在黑腹果蝇和地中海果蝇 (Loukeris *et al.*, 1995a, 1995b) 等昆虫的研究中。其他经常用作昆虫转基因载体的转座子还有: P 因子、mariner 转座子、hobo 转座子、hermes 转座子等等。

3.3 遗传性别品系的建立与筛选

遗传性别品系 (genetic sexing strains, GSS) 是遗传学上的一个概念, 主要指的是通过和性染色体连锁的基因表达的不同条件要求, 或者其表达产物 (表达性状) 的不同特点, 通过控制影响该品系的特定条件, 达到筛选和鉴别雌雄的目的。在苹果蠹蛾的不育昆虫释放中, 通过建立特定的遗传性别品系, 能够做到单独释放不育雄蛾。使用遗传性别品系单独释放不育雄蛾的优点包括: 1) 降低交配率; 2) 降低饲养成本; 3) 控制由于释放雌

蛾产卵造成可能的果实危害; 4) 仅储存雄蛾能显著减少额外成本 (Maréc *et al.*, 2005)。遗传性别品系在鳞翅目昆虫中已经得以成功应用, 其最主要的基础在于, 将特定的显性条件致死突变基因插入至雌蛾的 W 染色体中并使之连锁, 从而达到有效区分雌雄、并且从内部控制了转基因雌蛾的意外释放造成的安全问题的目的。

在昆虫中, 通常的方法是使用特定的细胞操作技术 (如胚胎显微注射) 将已经制备好的外源 DNA (质粒载体) 导入目标昆虫的个体内 (如新产的苹果蠹蛾卵), 以此来建立所需的遗传性别品系。由载体中包含的一些标记基因的表达, 来观察是否发生转化及其效率如何; 同样, 使用人工条件的控制, 观察已经整合在载体中的条件致死基因的表达情况 (结果为不需要的个体死亡)。根据上述目标基因的表达来筛选想要的成功进行转基因的个体。之后通过遗传学方法的培养, 并挑选一些特定代的个体进行分子生物学的表达情况检查, 观察转基因的具体效率。待整个品系稳定表达且大量繁殖时, 才算该目标遗传性别品系建立成功。

在建立遗传性别品系的过程中, 需要提高转基因的效率。一般来说使用的方法包括以下几点: 1) 使用更有效的强启动子和转化辅助子; 2) 使用更高效的转化质粒载体; 3) 提高细胞培养的效率以提高转化率。

3.4 显性条件致死基因的使用及其自我调控

显性条件致死突变基因 (dominant conditional lethal mutation gene, DCLM Gene) 是同性染色体相连锁的, 其主要特征是在一定限制条件下, 如低温、食物限制等, 致死基因表达从而导致个体死亡 (Ferguson *et al.*, 2011)。

适用于苹果蠹蛾的显性条件致死基因系统——四环素条件致死基因系统, 来源于对于地中海果蝇的遗传性别品系的建立过程 (Thomas *et al.*, 2000)。四环素是一种天然的抗生素, 其主要通过结合核糖体并破坏密码子 - 反密码子的相互作用来抑制细菌生长。大肠杆菌体内的多亚基反向转运蛋白 (TetA 蛋白) 是四环素防御的主要因素。而它的抑制蛋白 TetR 的控制基因 *tetR* 可以通过反向调控作用, 调节自身和 *tetA* 基因的转录, 也就是控制了大肠杆菌对于四环素的抗性

(Grossen and Bujard, 1992)。在这个系统中,将 TetR 蛋白换成组成更为自由的反式激活因子 tTA (四环素控制的反式激活因子, tetracycline-controlled transactivator),就构成了 Tet 反式激活因子调控系统,该系统能够有效地根据插入靶基因的情况,使用不同的人工条件控制其表达,这为我们使用某些特定的靶基因并控制其表达提供了便利的手段。该系统的一个优点在于,将整个包括反式激活因子基因和靶基因的目标系统克隆在单一质粒载体中即可进行稳定转化(Schultze *et al.*, 1996)。在这之后的研究中,人们又使得反式激活因子 tTA 受到 *tetO* 基因元件的调控,即 tTA-*tetO* 系统(Shockett *et al.*, 1995; Shockett and Schatz, 1996),即整个系统能够实现自我调控。此时在系统的靶基因区域插入需要的致死基因(如 *hid* 基因,控制头部发育),就可以通过控制四环素的存在而间接控制致死情况(黄培堂,2005)。

该系统最初在转基因植物如烟草中得以成功应用。在昆虫中,对于地中海果蝇进行应用得到了广泛的关注(Alphey, 2002; Robinson, 2002),Gong 等(2005)论述了该系统在地中海果蝇中的应用,他和作者提出了 2 种可能的系统,一种为单组分的,另外一种为多组分的。在这 2 个系统中,都通过转基因手段得到了特别的 tTA 蛋白,携带有该蛋白的雄性果蝇与雌性果蝇交配产生的后代是不育的。相关结果曾被 *Science* 和 *Nature Biotechnology* 等期刊报道。

在苹果蠹蛾中,使用该转基因系统的最初尝试是由捷克的 Maréc 和美国的 Lisa 等人共同进行的。2005 年之前,在鳞翅目昆虫的类群之中从未有过使用显性条件致死突变基因系统得到成功的转基因成虫的报道(Maréc *et al.*, 2005)。2007 年,他们又发表了关于使用基于显性致死基因系统的方法进行苹果蠹蛾不育昆虫释放技术方面的相关研究进展(Maréc *et al.*, 2007)。

3.5 转基因效果的评估检验及其技术手段

遗传学方法的使用:在人工转入目标基因和标记基因之后,同野生型杂交并检测筛选转化阳性个体、同野生型回交并筛选表达的 G_2 代实验室种群,之后进行自交扩大种群数量,做过分子生物学检测之后筛选标记阳性个体进行杂交以得到最终释放心稳定品系。

生物学方法的使用:在有无四环素等抑制条件存在的情况下观察苹果蠹蛾包括孵化率、产卵量、化蛹率和羽化率在内的相关指标,了解生存能力的变化,以评估转化效果。细胞生物学方法的使用:使用显微注射技术依次将携带有目标 DNA 的质粒载体注入苹果蠹蛾初产胚胎中,在其胚胎发育的过程中,使用荧光检测该转化基因在每个胚胎中表达的情况,以此确定转化率的大小。使用细胞培养技术培育和筛选用以最终导入苹果蠹蛾胚胎中的成功转化载体细胞。使用免疫荧光杂交(如荧光原位杂交 fluorescence *in situ* hybridization, FISH)来确定目标基因是否和 W 染色体连锁及其转化情况。分子生物学方法的使用:使用 Southern Blot 核酸印迹杂交技术和 Inverse PCR 技术检测包括标记基因在内的外源 DNA 在染色体上的插入和位点。如 PCR 阳性条带出现规律性的 TTAA 序列,则表明 *piggyBac* 转座酶的介导;而 Southern Blot 核酸印迹杂交主要检测的是具体目标基因插入的位点数,说明了转基因效率的高低。

4 转基因的安全性问题

转基因的安全性一直是其应用的焦点所在。在田间释放转基因不育昆虫的潜在危险在美国农业部(Bergsten *et al.*, 2008)和欧洲食品安全机构(Benedict *et al.*, 2010)内部都一直在被讨论。其存在一些潜在的风险,这包括适应性和行为的改变、转基因的稳定性、由于基因背景作用或者基因功能突变消失导致的致死基因的效果降低等等。在今后的研究中,通过插入第 2 个致死突变等其他方法,转基因的安全性应可以得到较大的增长。

5 展望

转基因方法同使用放射线进行辐射处理一样作为得到苹果蠹蛾不育成虫的一种手段,相比后者来说,具有更加安全、更加高效、更加经济的诸多优点。使用转基因的方法得到的苹果蠹蛾不育成虫,生存力更高,交配能力不受损害,是绝佳的进行释放控制的材料。在转基因的整个技术流程中,结合了诸多先进的研究方法和技术,并体现了分子生物学、细胞生物学、遗传学在昆虫学领域的研究及应用趋势,这种学科结合的应用对于在类似苹果蠹蛾等传统重要农林害虫的防治工作中

会不断发挥重要的作用。

使用不育昆虫释放技术对于苹果蠹蛾的综合防治研究在国际上还处在理论的深入研究和野外效果检验阶段,而使用转基因以获得苹果蠹蛾不育成虫的理论和实践研究则更为短暂。在我国,对于该技术的研究仍尚未起步。究其原因,该技术所需要的整套设备和技术流程是一个庞大的完整体系,虽然该方法的理论基础简单易懂,但是在具体的实现过程中需要解决相当多的实际问题,如大规模饲养厂房建造的成本、释放研究基地的选择、具体技术细节的确定等等,都是需要研究领导和课题负责人认真考虑并规划的。转基因是该技术中新兴的手段,这不但要求相关的研究人员熟练掌握全套的包括分子生物学、细胞生物学、遗传学等操作技术,并且也要求相关负责的研究机构具有全面的控制能力来具体安排各项研究工作,这必须同政府与相关行政机构出面才能共同达到。因此,在我国要进行该项研究,必须有较大的科研课题经费的支撑,以及相关行政机构强有力的管理。这项技术如果成功引入,必将会对我国全局的苹果蠹蛾广域综合治理工作产生非常重大的有益影响。

参考文献 (References)

- Alphey LS, 2002. Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10):1243—1247.
- Benedict M, Eckerstorfer M, Franz G, Gaugitsch H, Greiter A, Heissenberger A, Knols B, Kumschick S, Nentwig W, Rabitsch W, 2010. Defining Environmental Risk Assessment Criteria for Genetically Modified Insects to be placed on the EU Market. Environment Agency, Austria. 10th September 2010. 64—67. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/71e.pdf>
- Bergsten DA, Burnett W, Coakley BL, Horner TA, Nelson EE, Rose RI, Solomon RR, Warren JE, Simmons GS, 2008. Use of Genetically Engineered Fruit Fly and Pink Bollworm in APHIS Plant Pest Control Programs: Final Environmental Impact Statement. USDA-APHIS.
- Bloem KA, Bloem S, Carpenter J, 2005. Impact of moth suppression/eradication programmes using the sterile insect technique or inherited sterility//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 677—700.
- Bloem S, Bloem KA, Carpenter JE, Calkins CO, 1999. Inherited sterility in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of substerilizing doses of radiation on field competitiveness. *Environ. Entomol.*, 28(4):669—674.
- Carpenter J, Bloem S, Marec F, 2005. Inherited sterility in insects//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 115—146.
- Cary LC, Goebel M, Corsaro BG, Wang HG, Rosen E, Fraser MJ, 1989. Transposon mutagenesis of baculoviruses: Analysis of *trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 172(1):156—169.
- Dyck VA, Graham SH, Bloem KA, 1993. Implementation of the sterile insect release programme to eradicate the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae), in British Columbia, Canada//Proceedings: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. IAEA/FAO International Symposium. Vienna, Austria. 285—298.
- Enkerlin W, 2005. Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 651—676.
- Feldmann U, Dyck V, Mattioli R, Jannin J, 2005. Potential impact of tsetse fly control involving the sterile insect technique//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 701—723.
- Ferguson H, Neven L, Thibault S, Mohammed A, Fraser M, 2011. Genetic transformation of the codling moth, *Cydia pomonella* L., with *piggyBac* EGFP. *Transgenic Res.*, 20(1):201—214.
- Franz G, Savakis C, 1991. *Minos*, a new transposable element from *Drosophila hydei* is a member of the *tc1*-like family of transposons. *Nucleic Acids Res.*, 19(23):6646.
- Fraser MJ, Smith GE, Summers MD, 1983. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: Relationship between host DNA insertions and fp mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Virol.*, 47(2):287—300.
- Gong P, Epton MJ, Fu G, Scaife S, Hiscox A, Condon KC, Condon GC, Morrison NI, Kelly DW, Dafa'alla T, Coleman PG, Alphey LS, 2005. A dominant lethal genetic system for autocidal control of the mediterranean fruitfly. *Nat. Biotech.*, 23(4):453—456.
- Gossen M, Bujard H, 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *PNAS*, 89(12):5547—5551.

- Handler AM, 2001. A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(2):111—128.
- Handler AM, Harrell II RA, 1999. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol. Biol.*, 8(4):449—457.
- Handler AM, Harrell II RA, 2001. Transformation of the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*, with a *piggyBac* vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(2):199—205.
- Handler AM, McCombs SD, Fraser MJ, Saul SH, 1998. The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germline transformation in the mediterranean fruit fly. *PNAS*, 95(13):7520—7525.
- Klassen W, Curtis C, 2005. History of the sterile insect technique//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 3—36.
- Knipling EF, 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.*, 48(4):459—462.
- LaChance LE, 1985. Genetic methods for the control of lepidopteran species: status and potential//USDA ARS (ed.). ARS, Washington D. C. 28.
- Lance D, McInnis D, 2005. Biological basis of the sterile insect technique//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 69—94.
- Loukeris TG, Arcà B, Livadaras I, Dialektaki G, Savakis C, 1995. Introduction of the transposable element *Minos* into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 92(21):9485—9489.
- Loukeris TG, Livadaras I, Arcà B, Zabalou S, Savakis C, 1995. Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science*, 270(5244):2002—2005.
- Maréc F, Neven LG, Robinson AS, Vreysen M, Goldsmith MR, Nagaraju J, Franz G, 2005. Development of genetic sexing strains in Lepidoptera: from traditional to transgenic approaches. *J. Econ. Entomol.*, 98(2):248—259.
- Maréc F, Neven LG, Fukova I, 2007. Developing transgenic sexing strains for the release of non-transgenic sterile male codling moths (*Cydia pomonella*)// Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J (eds.). *Area-wide Control of Insect Pests*. Springer Netherlands. 103—111.
- Murakami A, Imai HT, 1974. Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma*, 47(2):167—178.
- O' Brochta DA, Handler AM, 2008. Perspectives on the state of insect transgenics//Aksoy S (ed.). *Transgenesis and the Management of Vector-borne Disease*. Springer New York. 1—18.
- Pavlopoulos A, Oehler S, Kapetanaki M, Savakis C, 2007. The DNA transposon *Minos* as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Gen. Biol.*, 8(Suppl.1):S2.
- Robinson AS, 2005. Genetic basis of the sterile insect technique//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 95—114.
- Robinson AS, 2002. Mutations and their use in insect control. *Mutat. Res./Rev. Mutat.*, 511(2):113—132.
- Schultze N, Burki Y, Lang Y, Certa U, Bluethmann H, 1996. Efficient control of gene expression by single step integration of the tetracycline system in transgenic mice. *Nat. Biotech.*, 14(4):499—503.
- Shockett P, Difilippantonio M, Hellman N, Schatz DG, 1995. A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *PNAS*, 92(14):6522—6526.
- Shockett PE, Schatz DG, 1996. Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *PNAS*, 93(11):5173—5176.
- Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Eappen A, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Mauchamp B, Chavancy G, Shirik P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. Using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotech.*, 18(1):81—84.
- Thibault ST, Luu HT, Vann N, Miller TA, 1999. Precise excision and transposition of *piggyBac* in pink bollworm embryos. *Insect Mol. Biol.*, 8(1):119—123.
- Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS, 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*, 287(5462):2474—2476.
- Tothová A, Marec F, 2001. Chromosomal principle of radiation-induced fl sterility in *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera:Pyralidae). *Genome*, 44(2):172—184.
- Traut W, Marec F, 1996. Sex chromatin in Lepidoptera. *Quart. Rev. Biol.*, 71(2):239—256.
- Vargas-Terán M, Hofmann H, Tweddle N, 2005. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique//Dyck V, Hendrichs J, Robinson AS (eds.). *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. 629—650.
- Vreysen MJB, Carpenter JE, Marec F, 2010. Improvement of

the sterile insect technique for codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) to facilitate expansion of field application. *J. Appl. Entomol.*, 134(3):165—181.

Wolf KW, 1994. The unique structure of Lepidopteran spindles//Kwang WJ, Jonathan J (eds.). *International Review of Cytology*. Academic Press. 1—48.

黄培堂(译),2005. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 化学工业出版社. 1—693.

路大光,王华嵩,2002. 鳞翅目害虫辐射遗传不育研究的回顾和展望. *核农学报*,16(1):58—63.

谢飞,蒋世忠,马晴雯,2011. *PiggyBac* 转座系统在哺乳动物及其细胞中的研究进展. *生命科学*, 23(3):255—260.



苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.)

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*(L.) 是世界重要的苹果害虫,原产于欧洲中南部,现在已经入侵世界 5 大洲 71 个国家。该入侵昆虫 1953 年首次报道在中国新疆发现,目前已入侵新疆、甘肃、宁夏、内蒙古、黑龙江和吉林 6 省区,直接威胁我国最大的黄土高原苹果产区和渤海湾苹果产区,对全国苹果产业的安全生产构成严重威胁。封面照片为苹果蠹蛾成虫在空中飞翔的状态,前翅臀角的深色椭圆形斑是其最明显的识别特征。

(中国科学院动物研究所 张润志)