

中华卵索线虫的性别分化分子机理研究进展*

任爽** 王伟娜 赵娜娜 艾欢 王国秀***

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

摘 要 中华卵索线虫 *Ovomermis sinensis* Chen *et al.* 是一种宝贵的昆虫天敌资源, 具有特殊的寄生期营养竞争压力决定其雌雄性别分化机制。本文重点概述了近年中华卵索线虫性别决定与分化、寄生期生理生化以及分子系统学研究等方面的进展, 并对中华卵索线虫今后的研究方向提出了建议。

关键词 中华卵索线虫, 性别分化, 寄生期生理生化, 分子系统学

Research progresses and prospects of nematode, *Ovomermis sinensis*

REN Shuang** WANG Wei-Na ZHAO Na-Na AI Huan WANG Guo-Xiu***

(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract *Ovomermis sinensis* Chen *et al.* is a potentially valuable natural enemy of insect pests. Sexual differentiation in this species is dependent on nutrition during a critical period of development. This paper introduces progress in research in molecular genetics related to the sexual differentiation and sexual development, physiology and biochemistry of this species during this period, and its molecular systematics. In addition, suggestions are made for future research on *O. sinensis*.

Key words *Ovomermis sinensis*, sexual differentiation, physiology and biochemistry in vulnerable period, molecular systematics

中华卵索线虫 *Ovomermis sinensis* Chen *et al.* 是一种昆虫病原线虫, 属无尾感器纲 (Aphasmodia), 嘴刺目 (Enoplida), 索线虫总科 (Mermithidea), 卵索属 (*Ovomermis*)。其生活史包括卵、幼虫和成虫 3 个阶段, 其中 2 期幼虫能主动侵染并进入昆虫体腔血淋巴中营寄生生活。研究表明, 每一宿主体内寄生的线虫越少, 即每条线虫所获得的营养越多, 其越有可能发育为雌虫, 相反则为雄虫 (高原等, 1998; Robin *et al.*, 1998)。该线虫具有广泛的宿主, 可杀灭斜纹夜蛾、甜菜夜蛾、粘虫及棉铃虫等害虫, 其寄生率即等于害虫的死亡率, 对人畜及环境安全无毒, 并可在自然界中再循环, 是一种宝贵的生物防治资源。因此, 中华卵索线虫的研究在蔬菜、粮棉油等农作物多种害虫的综合治理、环境保护以及实现农田生物多样性等方面, 都具有重要的学术和实用价值 (Poinar *et al.*, 1979; 钟玉林和王国秀, 2001)。

自陈果等 1991 年发现并命名中华卵索线虫以来, 国内对该线虫进行了大量的研究, 岳华梅等 (2006) 综述了中华卵索线虫的生物学特性、田间应用和体内外培养等方面的研究工作。本文就近年有关该线虫的性别分化、寄生期生理生化、系统演化等方面的研究进展报道如下。

1 中华卵索线虫性别分化研究

由于索科线虫资源有限, 再加上环境污染、人为破坏严重, 这类重要昆虫天敌资源有濒临消失灭种的危险, 更难以在虫害高峰期有大量天然线虫繁殖量与之相匹配。国内外有关学者试图以体外培养的方式解决这一问题, 但始终未获成功, 其原因在于培养的线虫性别尚未分化成熟 (Fassuliotis and Greighton, 1982; Giblin and Platzer, 1987; Gordon, 1990; 王国秀等, 2001)。

中华卵索线虫具有较为特殊的性别分化机

* 资助项目: 国家自然科学基金 (30870350)。

** E-mail: shuang198711@126.com

*** 通讯作者, E-mail: wangguoxiu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-15, 接受日期: 2010-05-20

制,寄生期的营养竞争压力决定其性别分化(高原等,1998;Robin *et al.*,1998),即营养决定型。近年来,索科线虫作为研究营养决定性别分化的典型代表,已引起有关科学家的极大兴趣。

1.1 中华卵索线虫生殖系发育形态研究

李俊莉等(2006)采用石蜡切片的方法对中华卵索线虫生殖系统重要发育时期形态特征进行了观察,发现其生殖腺的发育开始于寄生后期幼线虫进行最后一次蜕皮并变为成虫这一过程中。即寄生期幼线虫的生殖腺没有发育;脱出1~2 d的寄生后期幼线虫生殖原基也很小,几乎没有发育,滋养体几乎占满虫体整个假体腔;成虫的横切片观察结果显示:蜕皮后1~2 d的雌成虫生殖腺已开始发育,其体积增大;交配后的雌虫生殖腺的体积进一步增大;怀卵雌虫的生殖系统发达几乎充满整个假体腔。成年的雌、雄虫分别具有明显的阴道和交合刺,可交配、产卵进入下一个生命周期(鲍学纯,2006)。

1.2 中华卵索线虫生殖系统重要发育时期主要化学物质含量变化研究

李俊莉等(2006)对生殖系统重要发育时期主要化学物质含量测定的研究表明,随生殖系统发育期的不同,雌虫和雄虫的含水量无显著差异,均略有减少后不断增加,寄生后期幼线虫含水量最低,而交配后成虫含水量最高;雌雄虫蛋白质含量均无显著差异;雌雄虫糖的含量随生殖系统发育期的不同其变化趋势不同,雄虫先减少后增加,而雌虫先增加后减少,寄生后期幼线虫和蜕皮后成虫糖含量差异极显著($P < 0.01$);雌、雄虫的脂肪酸相对含量存在显著差异或极显著差异,且变化情况复杂。

1.3 中华卵索线虫性别分化分子机理研究

贺俊飞等(2009)已成功获得中华卵索线虫性别分化相关基因 *tra-1*、*vbh-1* 的部分或全部序列,并通过 RT-PCR、实时荧光定量 PCR 等技术对其表达进行了分析,得出 *tra-1*、*vbh-1* 基因均与中华卵索线虫性别发育有关的初步结论。

从中华卵索线虫中克隆得到 *tra-1* 基因 cDNA 片段,由该 cDNA 片段推导的氨基酸序列与人 GLI3、果蝇 CiD 结构域以及自由生活线虫(*Caenorhabditis elegans*、*C. briggsae* 和 *Pristionchus pacificus*) *tra-1* 编码的 TRA-1A 蛋白质序列在锌指

区域具有较高的相似性,即它们同属于 GLI 转录因子家族。*tra-1* 基因在中华卵索线虫各期幼虫中转录水平较低,且相互间无显著差异;在雌成虫中转录水平极显著高于其它各虫期($P < 0.01$) (贺俊飞等,2009)。由此推测,*tra-1* 基因的高水平表达促进雌性生殖系统的发育,这与自由生活线虫中的 *tra-1* 基因功能相同(Laura *et al.*,2004;Pires-daSilva and Sommer,2004)。

Wang 等(2009)首次克隆到了与中华卵索线虫生殖相关的 DEAD-box 家族基因 *vbh-1*,其在中华卵索线虫各个发育时期均有表达,从胚胎发育到寄生后期幼虫,相对表达量呈现先下降后上升的趋势。根据 DEAD-box 家族基因与生殖细胞的产生与发育密切相关的特点,以及秀丽线虫(*C. elegans*)中 *vbh-1* 基因性腺特异表达的结果推测:中华卵索线虫 *vbh-1* 基因可能与该线虫生殖细胞的产生以及发育有关。中华卵索线虫 *vbh-1* 基因在其蜕皮变为成虫前后相对表达量较高,而形态学观察的结果是该时期为线虫生殖腺的迅速发育期(李俊莉等,2006),将二者综合分析,佐证了该基因与生殖发育相关的可能。

2 中华卵索线虫系统学研究

2.1 中华卵索线虫线粒体基因组多态性分析

为完善昆虫病原索科线虫线粒体基因组全序列数据库,更系统地研究其基因组特征和系统演化规律,进而为发挥该线虫生防潜力打下基础,何芳等(2009)开展了中华卵索线虫线粒体全基因组的研究。该研究通过线粒体基因组滚环复制及酶切图谱,揭示了中华卵索线虫线粒体基因组具有种内遗传多态性,其大小变化范围在 16.5 ~ 24.5 kb。

通过对 2 条代表性成虫的线粒体基因组(mtDNA)进行测序与拼接,概括出中华卵索线虫 mtDNA 基本特点:(1)线粒体基因排列顺序各不相同:通过定位 2 条中华卵索线虫线粒体基因组图,发现其中一条包括 15 个(12 种)蛋白质编码基因、2 个 rRNA 基因、23 个 tRNA 基因和一段富含 AT 的 D-loop 区;另一条仅包括 13 个(12 种)蛋白质编码基因、2 个 rRNA 基因、20 个 tRNA 基因和一段富含 AT 的 D-loop 区。(2)线虫线粒体部分基因存在重复现象:即位于 ND2 和 ND4 之间的区域,不仅基因序列不同,且存在 ND3 基因重复现

象(分别重复2次和4次),这也是造成中华卵索线虫线粒体基因组酶切图谱不一致的主要原因。(3)线粒体基因组大小存在很大差异。实验测得的2条中华卵索线虫线粒体基因组全长分别为18 864和16 777 bp,其原因主要是基因重复、D-loop区长短的变化和tRNA基因个数差异等。

2.2 基因分子标记对中华卵索线虫等亲缘关系的探索

汪江一等(2007)首次采用18S rDNA、28S rDNA和COI基因3个分子标记对我国包括中华卵索线虫在内的常见6属10种以及Genbank中6属10种索科线虫的系统演化进行了研究,探讨了它们之间的亲缘关系,另外对GenBank中索科线虫4个未定种的属级分类也进行了探讨。分析结果显示,选用18S rDNA、28S rDNA和COI基因3个进化速率不同的分子标记对中华卵索线虫及其他索科线虫亲缘关系进行分析,能够反映出不同线虫间的遗传差距,从而较好地进行了属、种间的分子分类及系统演化等问题的探讨。研究的12属索科线虫分为3大类群,其中中华卵索线虫隶属的卵索属(*Ovomermis*)与六索属(*Hexamermis*)的亲缘最近,并与多索属(*Agamermis*)、八腱索属(*Octomyomermis*)和*Thaumamermis*线虫归为一大类群(何芳和王国秀,2009)。

2.3 SAFLP技术用于索科线虫分子系统学研究

姜爱兰等(2008)将SAFLP技术应用于包括中华卵索线虫在内我国常见昆虫病原线虫亲缘关系研究,建立并优化了索科线虫SAFLP体系,显示了6属11种/亚种索科线虫从属级阶元可以分为两大类群,六索属与中华卵索线虫所在的卵索属先聚在一起然后与多索属聚在一起,最后再与两索属聚在一起构成一大类群;罗索属和八腱索属聚为一支构成一大类群。这与形态分类学的研究结果基本相符。

3 中华卵索线虫的研究展望

在性别分化研究方面,为确定中华卵索线虫雌雄性别决定的起始期,建议以*vasa*基因为分子标记来追踪生殖细胞的起源、迁移和分化(Kazunori *et al.*, 2005),以便能更确定生殖腺的发育状况,解决形态学研究的局限或不足的现状,在推断中华卵索线虫性别开始分化的临界期的基

础上,确定深入研究的关键时期。利用荧光原位杂交(FISH)技术,对与中华卵索线虫性别决定与分化表达相关的基因如*tra-1*、*mab-3*等进行定位,并对其功能进行深入研究,以探讨中华卵索线虫可能的性别决定与性别分化的分子调控机理。

加深对中华卵索线虫的生理生化等方面的基础研究,扩大寄主血淋巴成分以及不同时期雌雄虫体内各物质含量的检测范围,探寻触发中华卵索线虫性别分化的关键因子,为配制最佳营养液、促进其大量体外培养获得成功并走向应用提供理论和实验依据。

在系统演化方面,中华卵索线虫的每个实验单体都代表着一条独特的线粒体序列,这种现象在已研究过的多细胞后生动物中是很罕见的,因此应对同种更多品系线虫的线粒体基因组序列继续探究,或对同一怀卵雌虫繁殖多代的线虫线粒体基因组进行研究,即利用线粒体基因组母系遗传的特点研究不同生境下(包括不同的化学或物理因子诱变)其若干后代线虫线粒体基因组的变异,从而在分子水平上揭示其遗传差异特点及系统演化规律。此外,姜爱兰等(2008)SAFLP研究结果与徐芬等(2005)、汪江一等(2007)研究结果存在一定差异,其原因有待进一步研究。

参考文献(References)

- 鲍学纯, 1996. 昆虫线虫学. 武汉: 武汉大学出版社. 1—204.
- 陈果, 简恒, 任惠芳, 潘沧桑, 1991. 寄生于粘虫的卵索线虫属一新种——中华卵索线虫(线虫纲: 索科). 动物分类学报, 16: 270—274.
- Fassuliotis G, Greighton CS, 1982. In vitro cultivation of the entomogenous nematode *Filipjerimermis leipsandra*. *J. Nematol.*, 14: 126—131.
- 高原, 吴芳, 程丹丹, 1998. 中华卵索线虫生活史的初步研究. 华中师范大学学报(自然科学版), 专辑: 52—55.
- Giblin RM, Platzer EG, 1987. In vivo growth of *Romanomermis culicivorax* biochemical changes during parasitism. *J. Nematol.*, 19: 123—129.
- Gordon R, 1990. Empirical and physiological assessment of in vitro growth in the mermithid nematode *Romanomermis culicivorax*. *Can. J. Zool.*, 68: 511—516.
- 何芳, 姜爱兰, 李神斌, 吴运梅, 王国秀, 2009. 中华卵索线虫(*Ovomermis sinensis*)线粒体基因组多态性分析. 昆虫学报, 52(10): 1083—1089.

- 何芳,王国秀,2009. 索科线虫分子系统学研究进展. 生物学报,26(6):65—67.
- 贺俊飞,王伟娜,周青春,王国秀,2009. 中华卵索线虫 *tra-1* 基因 cDNA 片段的克隆及实时定量表达分析. 植物保护学报,30(4):325—328.
- 姜爱兰,饶祥军,贺俊飞,王国秀,2008. 基于 SAFLP 的我国常见索线虫科昆虫病原线虫亲缘关系分析. 昆虫学报,51(9):924—929.
- Kazunori S, Hideo Y, Yasuhiro S, 2005. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. *Gene Expr. Patterns*, 5:669—678.
- Laura DM, Mara S, Kristin MM, 2004. TRA-1 /GL I controls development of somatic gonadal precursors in *C. elegans*. *Development*, 131:4333—4343.
- 李俊莉,王国秀,汪威,刘绪生,乔志仙,赵珊,2006. 中华卵索线虫生殖系统发育程中形态和主要化学物质含量的变化. 华中师范大学学报,40(2):265—269.
- Pires-daSilva A, Sommer RJ, 2004. Conservation of the global sex determination gene *tra-1* in distantly related nematodes. *Gene. Dev.*, 18(10):1198—1208.
- Poinar Jr GO, 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. Boca Raton FL: CRC press. 1—5.
- Robin JS, Moeen AH, Randy G, 1998. Sex ratio and the infection process in entomopathogenic nematodes: are males the colonizing sex. *J. Inv. Pathol.*, 72: 288—295.
- 汪江一,徐芬,刘绪生,王国秀,2007. 基于部分 18S rDNA, 28S rDNA 和 COI 基因序列的索科线虫亲缘关系. 动物学报,53(5):835—844.
- 王国秀,陈曲侯,陈果,2001. 中华卵索线虫的体外培养. 动物学报,47(2):235—239.
- Wang WN, Cao MX, Zhao NN, Li SB, Zhou QC, Wang GX, 2009. Cloning of DEAD-box gene from Mermithidae. Proceedings of the 6th Asia-Pacific Congress of Entomology (APCE). 138—139.
- 徐芬,王国秀,查玉平,刘朋,曹文博,刘绪生,2005. 5 种索科线虫 RAPD 亲缘关系分析. 动物学研究,26(3):294—299.
- 岳华梅,汪江一,王洪涛,王国秀,2006. 中华卵索线虫的研究与应用. 昆虫知识,43(6):762—766.
- 钟玉林,王国秀,2001. 我国昆虫寄生索科线虫研究近况. 中国生物防治,17(1):35—39.