苹果蠹蛾颗粒体病毒 CpGV-CJ01 的分离和鉴定*

申建茹[1] 刘万学[1] 万方浩[1**] 张芬琴[2]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100094;
2. 河西学院生命科学与工程系 甘肃 734000)

摘 要 苹果蠹蛾颗粒体病毒(*Cydia pomonella granulovirus*, CpGV)是控制苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.)种群的重要生防因子。商业化产品病毒株单一,抗性的快速产生会降低 CpGV 的防效,高毒力或与之具有遗传差异的新病毒株可用于延缓病毒抗性的产生或发展,对苹果蠹蛾的控制策略具有重要作用。本研究从中国酒泉地区苹果园中的苹果蠹蛾野生种群及其实验室种群发病虫体中分离获得一株致病病毒,通过幼虫发病特征、病毒包涵体的形态学及分子生物学方法共同证实该病毒株为 CpGV,且与 CpGV-M 相似,将其命名为 CpGV-CJ01。其幼虫的发病体征具有 CpGV 感染的典型症状,包涵体的电镜形态学观察结果符合 CpGV 结构特征,利用分子生物学方法克隆得到 *Granulin* 基因和凋亡抑制蛋白基因(inhibitor of apoptosis protein, *iap*)均与 CpGV-M 具有 99% 以上的相似性,但是对于毒力的准确定量需要做进一步研究。我国新病毒株的发现为我国开展苹果蠹蛾颗粒体病毒的生物学防治创造了先决条件,并可作为延缓世界范围内 CpGV 抗性的候选菌株。

关键词 苹果蠹蛾,颗粒体病毒,分离菌株,发病特征,电镜,基因克隆

Characterisation of the *Cydia pomonella* granulovirus CpGV-CJ01 from northwest China

SHEN Jian-Ru[1] LIU Wan-Xue[1] WAN Fang-Hao[1**] ZHANG Fen-Qin[2]

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. Life Sicence and Engineering Department, Hexi College, Gansu 734000, China)

Abstract The *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) is an effective and selective biological control agent for *C. pomonella*. Currently most CpGV products are based only on the CpGV-M isolate. Novel isolates could make a great contribution to *C. pomonella* control, for example, isolated strains with high toxicity that are genetically different to CpGV-M could be used to prevent, or delay, the development of resistance to CpGV. This study isolated a novel CpGV isolate from a wild *C. pomonella* population in Gansu province and investigated the characteristics of its descendent lab population, including characteristics of infected larvae, observation of CpGV occlusion bodies and molecular biological techniques. The results indicate that this isolate, named CpGV-CJ01, belongs to the CpGV family and is similar to CpGV-M. The symptoms of larvae infected by CpGV-CJ01 are similar to the typical symptoms reported for CpGV and the morphological characteristics of the occlusion bodies were confirmed by electron microscopy. The CpGV-CJ01 *Granulin* gene and the inhibitor of apoptosis protein (*iap*) gene were cloned; both shared over 99% similarity with CpGV-M. Further study of the virulence of the new strain is required. The isolation of novel CpGV strains was a prerequisite for further biological control based on CpGV in China. The CpGV-CJ01 strain could provide the key to managing resistance to CpGV.

Key words *Cydia pomonella*, CpGV, isolation, symptom of infected larva, electron micrographs, gene clone

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.)是世界范围内仁果类水果的重要检疫害虫,主要以幼虫蛀食危害,造成巨大的经济损失。苹果蠹蛾颗粒体病毒(*Cydia pomonella granulovirus*, CpGV)属杆状病毒

* 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: wanfh@caas.net.cn

收稿日期:2011-12-14,接受日期:2011-12-25

科,是控制苹果蠹蛾种群增长的有效生物因子,早期的田间药效试验证实 CpGV 对苹果蠹蛾的控制效果可与化学杀虫剂相媲美(Huber and Dickler, 1977; Niemczyk *et al.*, 1988)。CpGV 具有高效的杀虫特异性,对非靶标生物安全(Falcon *et al.*, 1968; Lacey *et al.*, 2005),对于果园生态系统中天敌的保护意义很大(Glen *et al.*, 1984; Riddick and Mills, 1995; Lacey *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2007),是可持续 IPM 的重要生防因子,并可用来治理苹果蠹蛾对化学农药的抗性(Kienzle *et al.*, 2003)。

CpGV 最初分离自墨西哥果园中受侵染的苹果蠹蛾幼虫(Tanada, 1964),即 CpGV-M。1974 年苏联从田间幼虫体内分离得到 CpGV-R (Harvey and Volkman, 1983),第 3 株 CpGV-E 是从英国实验室种群的发病幼虫体内分离得到的(Crook *et al.*, 1985)。因为在田间果树上发现苹果蠹蛾发病幼虫的概率较低,所以病毒株的分离相对困难。但是自 1964 年后该病毒的其他一些株系仍在多个国家获得,如从伊朗(Rezapanah *et al.*, 2002)、加拿大(Eastwell *et al.*, 1999)、新西兰、意大利、瑞士等(Asquith *et al.*, 1980; Crook *et al.*, 1985),所以该病毒可能不是地方性的毒株,而是在苹果蠹蛾存在的地方广泛存在(Cross *et al.*, 1999; Rezapanah *et al.*, 2002; Kundu *et al.*, 2003)。

2000 年以前所有的商业化产品全部是基于 CpGV-M,在欧洲范围内每年大约有 1 亿 hm^2 的果园应用 CpGV 防治苹果蠹蛾,但单一产品的高频次大量应用导致了抗性的发展(Lacey *et al.*, 2008)。2003 年,首先在德国发起检测田间种群对病毒的抗性研究,发现德国和法国多年定期施用病毒的特定苹果蠹蛾种群均已产生抗性(Fritsch *et al.*, 2005; Asser-Kaiser *et al.*, 2007),某些种群的抗性比例甚至超过 1 000 倍(Asser- Kaiser *et al.*, 2007)。鉴于欧洲果园苹果蠹蛾种群对商业产品 CpGV-M 的抗性,缓解 CpGV 抗性的发展是有机果园防治苹果蠹蛾面临的主要问题(Warner, 2007; Berling *et al.*, 2009)。高毒力或与 CpGV-M 具有遗传差异的新病毒株,可以作为目前 CpGV 商品的有效替代菌株,并能够辅助对抗抗性的产生或发展,在将来苹果蠹蛾的控制策略中具有重要作用。

本研究从采自中国酒泉地区苹果园和梨园中的苹果蠹蛾野生种群转向实验室驯化饲养过程中,发现苹果蠹蛾颗粒体病毒爆发侵染的相关现象,根据幼虫的发病体征、病原粗提物的电镜形态学观察、以及分子生物学鉴定 3 个方面的信息,证实从发病虫体内分离得到的病原为 CpGV 的分离株。我国病毒株的发现为我国开展苹果蠹蛾颗粒体病毒的生物学防治创造了先决条件,并可作为延缓世界范围内该病毒抗性的候选菌株。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

2009 年 9 月—2010 年 10 月采自甘肃酒泉地区(东经 98°29′53″,北纬 39°42′56″)苹果园内的野生种群,室内继代饲养在胚芽苹果粉人工饲料上的 1 ~ 5 代实验种群的 4 ~ 5 龄幼虫用作病毒的分离与鉴定研究,饲养条件为(26 ± 0.5)℃,相对湿度为 50% ~ 60%,光周期为 L∶D = 16∶8。

1.2　主要试剂

克隆载体 pMD18-T 和大肠杆菌 DH5α 购自 Transgene 公司,DNA 胶回收试剂盒、DNA marker、Taq 酶、dNTP 均购自 Takara 公司;引物合成与测序由 Invitrogen (北京)公司完成。

1.3　感染病毒的虫体特征及病毒的繁殖

1.3.1　感染病毒的虫体特征鉴定　参考(Sheppard and Stairs, 1977; Jans and Benz, 1985)的方法鉴定幼虫是否被 CpGV 感染。4 ~ 5 龄幼虫接种 CpGV 后,第 3 ~ 4 d 可观察到明显的病症,虫体开始膨胀,身体变得平滑,活动迟缓。幼虫在第 7 d 左右停止取食,开始出现死亡现象。发病末端阶段,身体变成乳白,体内液化。

1.3.2　病毒的繁殖　参考 Brassel(1978)的病毒增殖方法,略作调整。将病毒粗提纯样品稀释 10 倍后,以 1 mL 病毒液体/100 g 人工饲料的比例混合均匀,分装至 24 孔板中,接入正常生长的 4 ~ 5 龄幼虫,饲养条件同正常饲养。4 d 后观察发病症状,7 ~ 10 d 内收集虫体,提纯病毒。

1.4　病毒包涵体的纯化

病毒包涵体的纯化参考 Rezapanah 等 (2008)的方法进行,受侵染的幼虫在 50 mmol/L Tris - HCl 缓冲液中研磨成均质,过 4 层纱布,去除虫体组织。在 50% (w/w)蔗糖中 40 000 g 离心 60

min。用 Tris-HCl 缓冲液洗 2 次,病毒悬液在 20% ~80%(v/v)甘油梯度中进行沉淀,13 000 g 离心 40 min。重新获得包涵体带,洗 2 次,在超纯水中重新悬浮,电镜检测悬浮液中的病毒包涵体包含着病毒的接种体。

1.5 电镜观察

1.5.1 样品制样 支持膜铜网由中国农科院原子能所电镜室馈赠。将提纯样品稀释后直接滴到封口膜上,将有支持膜的铜网先置于样品滴上,5 min 后用镊子夹起,用干净的滤纸从铜网边缘吸去液体,自然干燥。

1.5.2 染色 采用常规醋酸双氧铀染色法,在蜡盘中滴加 2% 的醋酸双氧铀,然后将上述干燥好的接触样品的一面接触染色液,铜网在染液上漂浮染色 2 ~3 min。再用滤纸吸去染液,自然干燥。

1.5.3 电镜观察 样品制备完毕后送中国农科院原子能所作透视电镜观察,摄成照片,观察病毒粒子的有无及形态特征。

1.6 苹果蠹蛾颗粒体蛋白基因和凋亡抑制蛋白基因(inhibitor of apoptosis protein, *iap*)的克隆

参考(Eastwell *et al.*, 1999)的鉴定方法,利用 GranL 和 GranR 扩增 CpGV 颗粒体蛋白 *Granulin* 基因,IAPL 和 IAPR 扩增 *iap* 基因,引物的序列见表 1。反应条件均为:94℃预变性 2 min;然后进行如下循环,94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 32 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,连接到 pMD18-T 载体中,转化至 DH5α 感受态细胞,挑取阳性克隆测序,并进行 Blast 序列分析。

表 1 颗粒体蛋白基因和 *iap* 基因扩增引物序列

Table 1 Primer sequences used for *Granulin* gene and *iap* gene cloning

基因 Gene	引物名称 Primer names	序列(5′-3′) Sequence	扩增产物 Size(bp)
Granulin	GranL	CAATGAAGCTGGTGTGCAAC	205
	GranR	CGTCGTGAGCAACATAATCG	
iap	IAPL	ATCACCATGTCTGACTTGCG	795
	IAPR	GCGACACATCGGACACTTAT	

1.7 IAP 蛋白的系统发育分析

根据已公布的 IAP 氨基酸序列,应用 ClustalW2-Multiple Sequence Alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)进行在线多重序列比对。采用分子进化遗传分析软件 MEGA4 进行 Kimura 双参数遗传距离分析(Tamura *et al.*, 2007),构建 NJ 进化树,分析 IAP 蛋白的系统进化关系及其苹果蠹蛾颗粒体病毒与其他物种病毒的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 发病虫体的体征

自然发病的苹果蠹蛾幼虫初期表现为虫体肿胀,体表平滑,虫体的粉红色加重,体节之间的连接处更加明显,幼虫活动力减弱。虫体死亡现象多于脱离饲料后发生,体内液化,轻微触碰则可破碎,并流出黑色液体,有难闻气味,发病特征见图 1。根据发病症状初步认定该病原为苹果蠹蛾颗粒体病毒。接种病原提取物的 4 ~5 龄幼虫的症状与自然发病虫体一致,接种 3 d 后即可观察到初期症状,5 ~9 d 后出现死亡现象。证实自然发病虫体内的病原在扩增繁殖后仍具备致病力,并且症状具有可重复性。

2.2 电镜观察结果

病毒包涵体的纯化悬浮液稀释后,制备电镜铜网支持膜样品,染色后应用透射电镜能够观察到病毒包涵体,具体形态见图 2。包涵体呈椭圆柱状,直径和高度为(180 ~210) nm × (280 ~300) nm,符合颗粒体病毒的形态特征。

2.3 苹果蠹蛾颗粒体蛋白基因和 *iap* 基因的克隆

以包涵体提取物为模板,应用颗粒体蛋白基因的引物 GranL 和 GranR,扩增得到了一个 207 bp 的片段;引物对 IAPL 和 IAPR 扩增得到的 795 bp 的片段,结果见图 3。克隆到 T-Vector 并测序。经 NCBI Blast 软件分析表明克隆的 *Granulin* 基因片

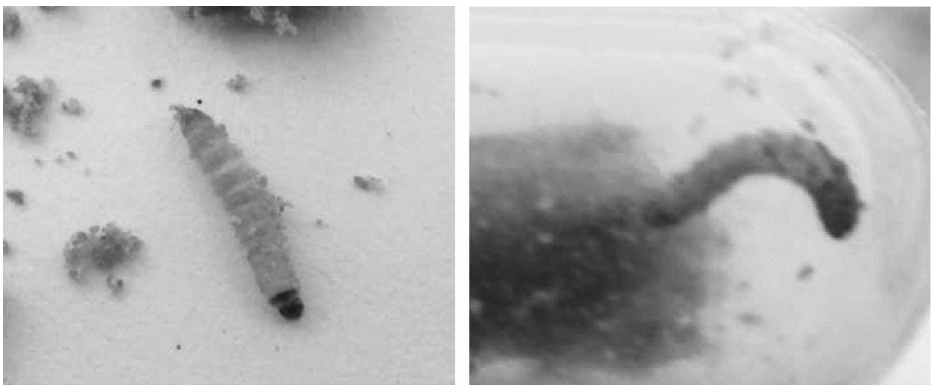

图 1　感染 CpGV 的苹果蠹蛾幼虫

Fig. 1　*Cydia pomonella* larvae patently infected with granulovirus

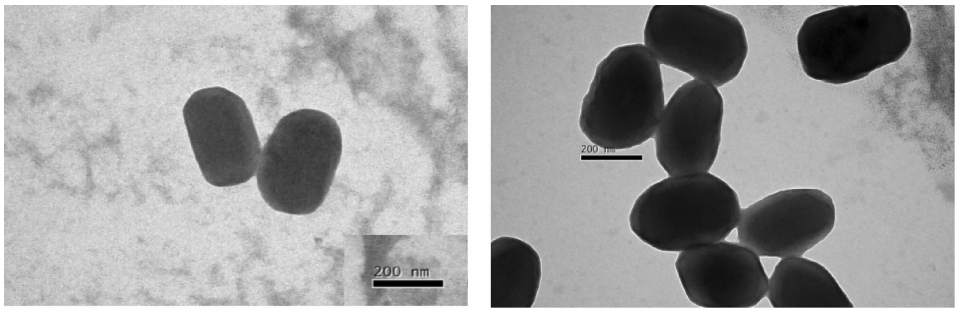

图 2　病毒包涵体的电镜形态学观察

Fig. 2　Electron micrographs of the occlusion bodies of the CpGV

段与 GenBank 上已注册的 CpGV E02 (EU428824.1) 和 G02 (EU370249.1) 的 *Granulin* 基因的相似性可高达 100%,证实该片段属于颗粒体蛋白基因。*iap* 基因与 GenBank 上已注册的 CpGV-M 基因组全序列(U53466.2)的 *iap*3 基因的相似性最高,为 99.75。证实该片段属于 CpGV *iap* 基因。*Granulin* 基因和 *iap* 基因的正确克隆,共同证明该病毒为 CpGV,将命名为 CpGV-CJ01。

2.4　*Granulin* 基因和 *iap* 基因序列分析

克隆得到的 *Granulin* 基因片段编码 69 个氨基酸,预测分子量为 8.4 ku,核苷酸序列及编码氨基酸序列见图 4,GenBank 的登录号为 JQ003556,命名为 CpGV-CJ01 *Granulin*。推导蛋白的氨基酸序列与苹果蠹蛾 *Cydia pomonella granulovirus granulin* (ACA81539.1)、(AAW49157.1)、(ACA81537.1)、(ACA81544.1)、(ACB87526.1)和苹卷蛾 *Adoxophyes orana granulovirus granuli* (AAW49147.1)都高达 100%,说明颗粒体蛋白质超家族(super family)的保守性。

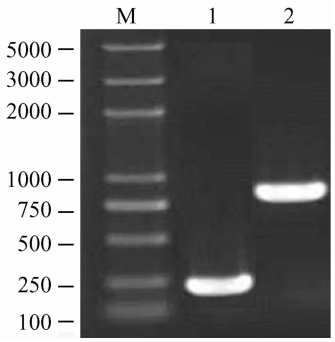

图 3　苹果蠹蛾 *Granulin* 基因和 *iap* 基因的扩增产物

Fig. 3　PCR amplification of *Granulin gene and iap gene*

M: DNA 分子量标准 DNA Marker Trans plus 2K; 1: *Granulin* 基因扩增产物 *Granulin* gene PCR product; 2: *iap* 基因扩增产物 *Granulin* gene PCR product.

iap 基因编码 263 个氨基酸,预测分子量为 29.9 ku,核苷酸序列及编码氨基酸序列见图 5,GenBank 的登录号为 JQ003555,命名为 CpGV-CJ01 *iap*。*iap* 基因推导蛋白的氨基酸序列与苹果蠹蛾颗粒体病毒 CpGV-M 基因组中的 ORF17

表 2 用于系统发育分析的 IAP 序列信息

Table 2 Informations of IAP sequences used in phylogenetic analysis

病毒缩写 Virus	全称 Full name	物种 Host species	病毒 Virus Type
CpGV	*Cydia pomonella* GV	苹果蠹蛾	颗粒体病毒 granulosis virus
CpGV	*Cydia pomonella* GV	苹果蠹蛾	颗粒体病毒 granulosis virus
SlBIR	*Spodoptera littoralis* BIR	海灰翅夜蛾	杆状病毒 *iap* 重叠域 baculoviral *iap* repeater domain
TnBIR	*Trichoplusia ni* BIR	粉纹夜蛾	杆状病毒 *iap* 重叠域 baculoviral *iap* repeater domain
SfBIR	*Spodoptera frugiperda* BIR	草地贪夜蛾	杆状病毒 *iap* 重叠域 baculoviral *iap* repeater domain
HaBIR	*Helicoverpa armigera* BIR	棉铃虫	杆状病毒 *iap* 重叠域 baculoviral *iap* repeater domain
SeBIR	*Spodoptera exigua* BIR	甜菜夜蛾	杆状病毒 *iap* 重叠域 baculoviral *iap* repeater domain
BmBIR	*Bombyx mori* BIR	家蚕	杆状病毒 *iap* 重叠域 baculoviral *iap* repeater domain
AgNPV	*Anticarsia gemmatalis* NPV	大豆夜蛾	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses
HcNPV	*Hyphantria cunea* NPV	美国白蛾	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses
CfMNPV	*Choristoneura fumiferana* MNPV	云杉芽卷蛾	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses
BsNPV	*Buzura suppressaria* NPV	油桐尺蠖	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses
OpMNPV	*Orgyia pseudotsugata* MNPV	黄杉毒蛾	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses
AmEPV	*Amsacta moorei* EPV	桑灯蛾	痘病毒 poxviuses
CoGV	*Choristoneura occidentalis* GV	云杉卷叶蛾	颗粒体病毒 granulosis virus
ClGV	*Cryptophlebia leucotreta* GV	苹果异形小卷蛾	颗粒体病毒 granulosis virus
AsNPV	*Agrotis segetum* NPV	黄地老虎	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses
SlNPV	*Spodoptera litura* NPV	斜纹夜蛾	核型多角体病毒 nuclear polyhedrosis viruses

注:BIR:杆状病毒 *iap* 重叠域 Baculoviral *iap* repeater domain.

IAP-3 (NP 148801.1) 氨基酸的序列相似性为 99.62%。与 *Spodoptera littoralis* (CAM96614.1) 杆状病毒 IAP 重叠域的相似性为 62.41%,与 *Trichoplusia ni* (AAF19819.1) 和 *Spodoptera frugiperda* (AAF35285.1) 的相似性分别为 61.96% 和 63.04%。蛋白结构域分析 (http://www.ebi.ac.uk/interProScan/) 发现 N-端第 8 至第 76 氨基酸和第 109 至第 177 氨基酸分别存在 BIR 超家族保守结构域,BIR 是 IAP 蛋白的功能区之一。

```
1    CAATGAAGCTGGTGTGCAACTGGAGCGGCAAAGAATTCCTTCGTGAAACCTGGACCCGCTTCATTTCCGAAGAG
1      M  K  L  V  C  N  W  S  G  K  E  F  L  R  E  T  W  T  R  F  I  S  E  E
76   TTCCCCATCACCACCGACCAAGAGATCATGGACCTGTGGTTCGAGCTTCAACTGCGACCGATGCACCCCAACCGT
25    F  P  I  T  T  D  Q  E  I  M  D  L  W  F  E  L  Q  L  R  P  M  H  P  N  R
151  TGCTACAAGTTCACCATGCAGTACGCTCTCGGCGCCCACCCCGATTATGTTGCTCACGACG
50    C  Y  K  F  T  M  Q  Y  A  L  G  A  H  P  D  Y  V  A  H
```

图 4 CpGV-CJ01 *Granulin* 基因片段的氨基酸编码序列

Fig. 4 Nucleotide and predicted amino acid sequences for fragment of CpGV-CJ01 *Granulin* gene

2.5 IAP 系统发育分析

本研究中的 CpGV-CJ01 IAP 与 CpGV-M 基因组的 IAP-3 (NP 148801.1) 聚成一支,夜蛾科昆虫的杆状病毒 IAP 的重叠区 BIR 聚成一支,这两支汇聚,亲缘关系很近。CpGV 与卷蛾科的另外 2 个病毒 CoGV 和 ClGV 的亲缘关系相对较远。

核型多角体病毒能够很好的聚合,但其中卷蛾科的 CoGV 和 ClGV,以及痘病毒 AmEPV 与核型多角体病毒的关系相对较近。颗粒体病毒和核型多角体病毒属是杆状病毒的 2 个主要属,这 2 个属各自聚合的现象与杆状病毒的分类学现象相一致。

```
1     ATCACCATGTCTGACTTGCGATTGGAAGAAGTGCGTTTGAACACCTTTGAGAAGTGGCCTGTGTCGTTTTTGTCG
1           M  S  D  L  R  L  E  E  V  R  L  N  T  F  E  K  W  P  V  S  F  L  S
76    CCGGAAACCATGGCTAAAAATGGGTTTTACTACTTGGGTAGGAGCGACGAGGTGCGTTGTGCGTTTTGTAAAGTG
24     P  E  T  M  A  K  N  G  F  Y  Y  L  G  R  S  D  E  V  R  C  A  F  C  K  V
151   GAGATAATGCGTTGGAAGGAGGGCGAAGATCCCGCTGCCGACCATAAGAAGTGGGCTCCCCAATGTCCGTTTGTG
49     E  I  M  R  W  K  E  G  E  D  P  A  A  D  H  K  K  W  A  P  Q  C  P  F  V
226   AAGGGTATCGACGTGTGCGGTTCGATTGTTACAACCAATAATATCCAAAATACTACAACCCACGACACTATTATC
74     K  G  I  D  V  C  G  S  I  V  T  T  N  N  I  Q  N  T  T  T  H  D  T  I  I
301   GGTCCCGCTCACCCCAAATACGCCCATGAAGCTGCTCGAGTCAAGAGTTTTCACAACTGGCCCCGTTGTATGAAG
99     G  P  A  H  P  K  Y  A  H  E  A  A  R  V  K  S  F  H  N  W  P  R  C  M  K
376   CAGAGACCCGAGCAGATGGCGGATGCCGGTTTCTTCTACACTGGCTACGGTGACAATACAAAGTGCTTCTATTGT
124    Q  R  P  E  Q  M  A  D  A  G  F  F  Y  T  G  Y  G  D  N  T  K  C  F  Y  C
451   GACGGCGGATTGAAAGATTGGGAGCCGGAAGATGTACCTTGGGAACAGCATGCAAGATGGTTCGACCGTTGCGCC
149    D  G  G  L  K  D  W  E  P  E  D  V  P  W  E  Q  H  A  R  W  F  D  R  C  A
526   TACGTTCAGCTAGTCAAGGGTAGAGACTACGTACAGAAAGTCATCACGGAAGCCTGCGTGTTACCCGGTGAGAAC
174    Y  V  Q  L  V  K  G  R  D  Y  V  Q  K  V  I  T  E  A  C  V  L  P  G  E  N
601   ACTACCGTGTCAACAGCCGCGCCAGTGTCCGAGCCTATACCTGAGACAAAAATTGAAAAAGAGCCCCAAGTGGAA
199    T  T  V  S  T  A  A  P  V  S  E  P  I  P  E  T  K  I  E  K  E  P  Q  V  E
676   GATTCGAAACTGTGCAAGATATGCTACGTAGAAGAGTGCATCGTGTGCTTCGTACCGTGCGGTCACGTGGTGGCG
224    D  S  K  L  C  K  I  C  Y  V  E  E  C  I  V  C  F  V  P  C  G  H  V  V  A
751   TGTGCCAAGTGTGCGTTGAGCGTAGATAAGTGTCCGATGTGTCGCAAGGG
249    C  A  K  C  A  L  S  V  D  K  C  P  M  C  R  K
```

图 5　CpGV-CJ01 *iap* 基因的氨基酸编码序列

Fig. 5　Nucleotide and predicted amino acid sequences for CpGV-CJ01 *iap* gene

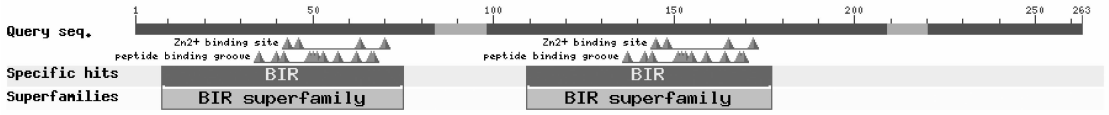

图 6　CpGV-CJ01 IAP 保守结构域预测

Fig. 6　Prediction of the conserved domain of CpGV-CJ01 IAP deduced amino acids

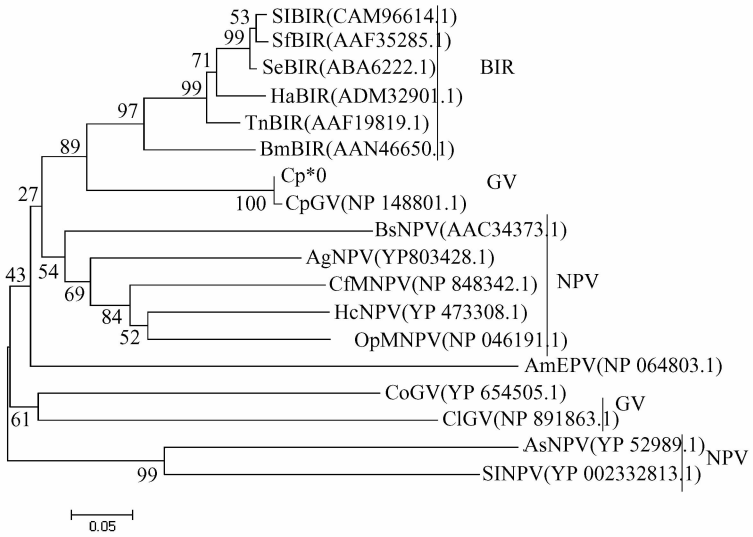

图 7　杆状病毒 IAP 蛋白氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 7　Phylogenetic tree of amino acid sequences of Baculoviral IAP constructed by the neighbor-joining method

∗代表本研究的病毒分离株。∗ represents the isolate in this study.

3 讨论

颗粒体病毒的颗粒体蛋白基因编码区高度保守(Crook and Winstanley, 1992),克隆的基因片段可以作为判定昆虫病原的标准。本研究克隆得到的 *Granulin* 基因的 blast 结果更是突显了苹果蠹蛾颗粒体病毒 CpGV 的 *Granulin* 基因的高度保守性。IAPs 最先从 CpGV 和 OpNPV 编码的蛋白质中发现,现已从病毒、昆虫到人类的多种生物中发现 IAPs(Steller, 1995),因此 *iap* 是一类进化上非常保守的基因家族。杆状病毒 *iap* 基因会显著的影响病毒的寄主范围和致病性(Crook *et al.*, 1993; Clem *et al.*, 1994),所以 *iap* 基因可能更能体现颗粒体病毒的特征。IAP 蛋白通常具有 2 种保守的氨基酸序列结构,C - 端的锌指结构(RING)和 N - 端的 BIR 结构。BIR 是 IAP 蛋白的功能区之一,CpGV 的 IAP1(Crook *et al.*, 1993)蛋白具有明显的抗细胞凋亡功能。由于杆状病毒具有很强的宿主专一性,研究病毒与其宿主的进化保守性基因就显得尤为重要。本研究中对杆状病毒 IAP 蛋白的系统发育分析,揭示了 CpGV 的 IAP 与夜蛾科昆虫杆状病毒的 IAP 重叠域亲缘关进较近,推测 CpGV 可能与夜蛾科杆状病毒的致病性相似,但寄主范围差异较大,因为目前 CpGV 寄主范围的研究,仅发现 CpGV 对卷蛾科的豌豆飞蛾 *Cydia nigricana*(Payne, 1981)、松梢卷叶蛾 pine shoot moth (Skrzecz, 2000) 和苹果异形小卷蛾 *Cryptophlebia leucotreta* 以及蛀果蛾科的梨小食心虫 *Grapholita molesta*(Falcon *et al.*, 1968)有致病性,寄主特异性较强。

本研究通过观察幼虫的发病特征,结合电镜和分子生物学技术分离获得自然发生在我国酒泉地区的一株 CpGV,该病毒株与 CpGV - M 相似性较高。加拿大、新西兰、意大利、瑞士分离得到的多株 CpGV 的 DNA 限制性酶切图谱与 CpGV - M 相似,伊朗多株病毒基因组的差异虽然也较小,但不同菌株的 LC_{50} 差异很大,表现出生物学差异(Crook *et al.*, 1985)。本研究虽然证实繁殖得到的病原物对苹果蠹蛾幼虫具有致病力,但是对于毒力的确定还未进行具体的量化。下一步工作应结合实时荧光定量技术对 CpGV 包涵体含量进行定量,准确评估 CpGV - CJ01 病毒株的毒力,为我国开发利用 CpGV 对苹果蠹蛾种群实施有效的控制奠定基础。

新病毒株的获得对于丰富 CpGV 的异质性和多样性、拓宽 CpGV 产品的遗传学基础具有很重要的意义。最关键的是,新病毒株的分离可能有助于延缓抗性的发展和扩散,比如,病毒株 CpGV - I12 对苹果蠹蛾抗性种群比 CpGV - M 具有较高的效用(Eberle *et al.*, 2008; Berling *et al.*, 2009),商业化 CpGV 产品可以应用不同的分离株制备(Asser - Kaiser *et al.*, 2007),以此避免单一病毒株的长期使用所造成的巨大选择压。因此 CpGV 新病毒株的发现在将来苹果蠹蛾的控制策略中具有重要作用。

参考文献(References)

Asquith D, Croft BA, Hoyt SC, Glass EH, Rice RE, 1980. The systems approach and general accomplishments toward better insect control in pome and stone fruits// Huffaker CB (ed.). New Technology of Pest Control. New York: Wiley. 249—317.

Asser-Kaiser S, Fritsch E, Undorf-Spahn K, Kienzle J, Eberle KE, Gund NA, Reineke A, Zebitz CP, Heckel DG, Huber J, Jehle JA, 2007. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science*, 317(5846): 1916—1918.

Berling M, Blachere-Lopez C, Soubabere O, Lery X, Bonhomme A, Sauphanor B, Lopez-Ferber M, 2009. *Cydia pomonella granulovirus* genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(4): 925—930.

Brassel J, 1978. Entwicklung von methoden fur die produktion eines granulosis-virus-praparates zur mikrobiologischen bekampfung des apfelwicklers, *Laspeyresia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae) und Schatzung der produktionskosten'. *Mitt. Schweiz. Ent. Ges.*, 51: 155—211.

Clem RJ, Robson M, Miller LK, 1994. Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and the adjacent gene. *J. Virol.*, 68(10): 6759—6762.

Crook NE, Clem RJ, Miller LK 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.*, 67(4): 2168—2174.

Crook NE, Spencer RA, Payne CC, Leisy DJ, 1985. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants, *J. Gen. Virol.*, 66(11): 2423—2430.

Crook NE, Winstanley D, 1992. Replication, molecular

biology, and genetic engineering of granulosis viruses. *Phytoparasitica*, 20(Suppl.):33S—36S.

Cross JV, Solomon MG, Chandler D, Jarrett P, Richardson PN, Winstanley D, Bathon H, Huber J, Keller B, Langenbruch GA, Zimmermann G, 1999. Biocontrol of pests of apples and pears in Northern and Central Europe: 1. Microbial agents and nematodes. *Biocontrol. Sci. Technol.*, 9(2):125—149.

Eastwell KC, Cossentine JE, Bernardy MG, 1999. Characterisation of *Cydia pomonella granulovirus* from codling moths in a laboratory colony and in orchards of British Columbia. *Ann. Appl. Biol.*, 134(3):285—291.

Eberle KE, Asser-Kaiser S, Sayed SM, Nguyen HT, Jehle JA, 2008. Overcoming the resistance of codling moth against conventional *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12. *J. Invertebr. Pathol.*, 98(3):293—298.

Falcon LA, Kane WR, Bethell RS, 1968. Preliminary evaluation of a granulosis virus for control of the codling moth. *J. Econ. Entomol.*, 61(5):1208—1213.

Fritsch E, Undorf-Spahn K, Kienzle J, Zebitz CPW, Huber J, 2005. Apfelwickler Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler Populationen, *Nachrbl. Dtsch. Pflanzenschutzd.*, 57(2):29—34.

Glen DM, Wiltshire CW, Milsom NF, Brain P, 1984. Codling moth granulosis virus: effects of its use on some other orchard arthropods. *Ann. Appl. Biol.*, 104(1):99—106.

Harvey JP, Volkman LE, 1983. Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis Virus. *Virology*, 124(1):21—34.

Huber J, Dickler E, 1977. Codling moth granulosis Virus: its efficiency in the field in comparison with organophosphorus insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 70(5):557—561.

Jans P, Benz G, 1985. Weight increase of granulosis virus infected allatectomized larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae). *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.*, 58:341—344.

Kienzle J, Gernoth H, Zebitz CPW, Huber J, 2003. Codling moth granulovirus-an efficient tool for codling moth control. *Bull. OILB/SROP*, 26:249—253.

Kundu JK, Stara J, Kocourek F, Pultar O, 2003. Polymerase chain reaction assay for *Cydia pomonella granulovirus* detection in *Cydia pomonella* Population. *Acta Virol.*, 47(3):153—157.

Lacey LA, Arthurs SP, Headrick H, 2005. Comparative activity of the codling moth granulovirus against *Grapholita molesta* and *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Entomol. Soc. B. C.*, 102:79—80.

Lacey LA, Arthurs SP, Knight A, Huber J, 2007. Microbial control of Lepidopteran pests of apple orchards // Lacey LA, Kaya HK (eds). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests (2nd ed.). Dordrecht: Springer. 527—546.

Lacey LA, Thomson D, Vincent C, Arthurs SP, 2008. Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Sci. Techn.*, 18(7):639—663.

Niemczyk E, Olszak R, Miszczak M, 1988. Effectiveness of granulosis virus for codling moth (*Laspeyresia pomonella* L.) control in Poland. *Fruit Sci. Rep.*, 15(4):185—191.

Payne CC, 1981. The susceptibility of the pea moth, *Cydia nigricana*, to infection by the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38(1):71—77.

Rezapanah M, Kharrazi-Pakdel A, Kamali K, Huber J, 2002. Survey on natural occurrence of *Cydia pomonella granulovirus* in apple orchards of Iran. *Appl. Entomol. Phytopathol.*, 69:49—55.

Rezapanah M, Shojai-Estabragh S, Huber J, Jehle JA, 2008. Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella* granulovirus from Iran. *J. Pest Sci.*, 81(4):187—191.

Riddick EW, Mills NJ, 1995. Seasonal activity of Carabids (Coleoptera: Carabidae) affected by microbial and oil insecticides in an apple orchard in California. *Environ. Entomol.*, 24(2):361—366.

Sheppard RF, Stairs GR, 1977. Dosage-mortality and time-mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 29(2):216—221.

Simon S, Defrance H, Sauphanor B, 2007. Effect of codling moth management on orchard arthropods. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 122(3):340—348.

Skrzecz I, 2000. Preliminary results of experiments for the use of Baculoviruses in Polish forestry. *Bulletin-OILB/SROP*, 23:243—247.

Steller H, 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267(5203):1445—1449.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8):1596—1599.

Tanada Y, 1964. A granulosis virus of the codling moth, *Carpocapsae pomonella* (Linnaeus) (Olethreutidae, Lepidoptera). *J. Insect Pathol.*, 6:378—380.

Warner G, 2007. Wake-up call for virus users. *Good Fruit Grower*, 58(17):14—15.