

蝗虫微孢子虫的基因组学研究进展及应用现状

高兴珂 班丽萍*

(中国农业大学草业科学与技术学院, 北京 100193)

摘要: 蝗虫微孢子虫 *Antonospora locustae* 是蝗虫生物防治过程中的重要病原微生物。本文主要讨论蝗虫微孢子虫基因组的研究进展,明确蝗虫微孢子虫基因组独特的压缩特征,了解蝗虫微孢子虫获取能量的途径。此外,本文对蝗虫微孢子虫在我国蝗虫的防治中的应用现状进行综述,并探讨未来基于基因组测序技术开发的治蝗新方法。

关键词: 蝗虫; 微孢子虫; 基因组; 蝗虫防治

Genomics research progresses in microsporidia *Antonospora locustae* and its application status

Gao Xingke Ban Liping*

(College of Grassland Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Microsporidia *Antonospora locustae* is an important pathogenic microorganism in the process of locust biological control. This article mainly discussed the research progress of the *A. locustae* genome, clarified the unique compression characteristics of the *A. locustae* genome, and understood the way in which the locust microsporidia obtain energy. The application of *A. locustae* in locust's biocontrol was summarized, and the future development of new locust control methods based on genome sequencing technology was discussed.

Key words: locust; *Antonospora locustae*; genome; locust control

微孢子虫(microsporidia)是专性寄生单细胞真核微生物(Corradi et al., 2007; Williams, 2009; Pan et al., 2013),直径2~40 μm,其寄主范围极其广泛,可以寄生大多数无脊椎动物和脊椎动物(Xu et al., 2012; Campbell et al., 2013; Cameron et al., 2016)。目前已知的微孢子虫共计有200多个属1400多种(Wittner & Weiss, 1999; Rao et al., 2004)。微孢子虫首次发现于家蚕 *Bombyx mori* 中,是一种引起家蚕微孢子病的病原物——家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* (Jones et al., 2011)。利用微孢子虫能寄生昆虫这一特性,可以将其用于害虫防治,包括目前广泛用于飞蝗防治的蝗虫微孢子虫 *Antonospora locustae*。据统计,蝗虫微孢子虫可以侵染100多种直翅目昆虫(Lange, 2005)。飞蝗是一种世界性的害虫,每年

会有10%的人口受其为害(Zhang et al., 2019)。2019—2020年沙漠蝗在非洲之角再次大规模发生,并在巴基斯坦和印度成灾,严重威胁着我国边境的生态安全(赵紫华等, 2020)。将蝗虫微孢子虫用于飞蝗防治,对蝗虫防治具有非常关键的作用。微孢子虫不仅可以寄生昆虫,其也会对人类健康造成巨大威胁,目前已明确有10余种微孢子虫与人类疾病相关(Stentiford et al., 2016)。感染人类的微孢子虫很多都可以引起人畜共患病,因此,在2005年被美国疾病控制中心列入生物武器的病原微生物名录(刘吉平等, 2011)。

1 蝗虫微孢子虫基因组学研究进展

随着人们对微孢子虫逐步深入的了解,其相关

基金项目: 国家科技基础资源调查专项(2019FY100400)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: liping_ban@163.com

收稿日期: 2020-11-11

信息也被逐渐揭开,特别是随着分子生物学、生物化学、测序技术以及生物信息学的快速发展,推进了包括微孢子虫在内的很多生物全基因组测序以及功能基因的挖掘和研究。2001年,首个微孢子虫基因组——兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi* 基因组序列被全面公布(Katinka et al., 2001),随后又针对家蚕的病原物家蚕微孢子虫进行了基因组测序(Xu et al., 2012)。

2002年,美国海洋生物实验室对蝗虫微孢子虫进行了基因组的一代测序,获得了约648条重叠(contigs)序列,总大小约为2.1 Mb。但是由于当时技术受限,所获得的基因组数据并不全面,并且也未进一步利用所获得的数据进行下一步研究。Chen et al. (2020) 基于 Illumina HiSeq 和 PacBio RSII SMRT 平台进行二代联合三代全基因组测序技术对蝗虫微孢子虫基因组进行了重新测序,首次绘制了高质量的蝗虫微孢子虫完整基因组精细图谱,该基因 GenBank 登录号为 PRJNA353563。Chen et al. (2020) 结果显示,蝗虫微孢子虫共有17条染色体,基因组大小为3.2 Mb,每条染色体的长度范围在88.763~388.82 kb之间,GC含量为41.97%,有效预测的基因有1 857条,几乎每条染色体基因组内部都有1个25 kb左右的高AT含量的集中区域。

伴随着基因组数据的公开,人们对微孢子虫的信息有了更加深入了解。通过比较几种已公布的微孢子虫基因组信息(表1)发现,微孢子虫基因组有

一个显著特点,即基因组相对较小,例如,第1个获得全基因组序列的兔脑炎微孢子虫的基因组只有2.9 Mb(Katinka et al., 2001),蝗虫微孢子虫的基因组也仅有3.2 Mb(Chen et al., 2020),目前已知最小的微孢子虫基因组——肠脑炎微孢子虫 *E. intestinalis* 的基因组大小仅为2.25 Mb(Corradi et al., 2010),即使与其分类地位相近的真菌相比,它们的基因组仍明显小。造成这种现象可能主要由于以下几个原因:第一,微孢子虫线粒体明显缺失,在微孢子虫中仅发现了线粒体残基,即一种高度还原的细胞器——纺锤剩体(Williams, 2009)。微孢子虫自身也缺失与生活生殖相关联的代谢途径相关的合成酶,其不具备三羧酸循环、氧化磷酸化等典型功能,并且也缺少部分脱氢酶,无法合成腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP),只能从寄主体内偷取能量以供自身使用(Keeling, 2009)。第二,微孢子虫基因组内部进行了非常大的压缩。由于其对宿主高度依赖的生存方式,使得微孢子虫基因组内只有较少的编码基因,基因间隔区也得到大幅度降低(Corradi et al., 2010)。以肠脑炎微孢子虫为例,基因组内基因间隔区极度减少,几乎完全丢失了启动子和调控因子,相邻的两两基因也重叠相连。第三,这些基因在编码序列内部也能改变,相比其他物种而言,其编码基因普遍较短(Williams et al., 2005)。

表1 蝗虫微孢子虫和其他微孢子虫之间的基因组信息比较(Chen et al., 2020)

Table 1 Comparison of genome information between *Antonospora locustae* and other microsporidia (Chen et al., 2020)

基因组特征 Genomic feature	蝗虫微孢子虫 <i>Antonospora locustae</i>	家蚕微孢子虫 <i>Nosema bombycis</i>	蜜蜂微孢子虫 <i>N. ceranae</i>	兔脑炎微孢子虫 <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	肠脑炎微孢子虫 <i>E. intestinalis</i>	比氏肠细胞内微孢子虫 <i>E. bienersi</i>
染色体数目 Chromosome number	17.0	18.0	ND	11.0	11.00	≥6.0
基因组大小 Genome size/Mb	3.2	ND	7.7	2.9	2.25	6.0
组装大小 Assembled/Mb	3.2	15.7	7.9	2.5	2.20	3.9
重叠数量 Number of scaffolds/contigs	17.0	1 605.0	5 465.0	11.0	137.00	1 646.0
基因组覆盖率 Genome coverage/%	100.0	100.0	90.0	86.0	96.00	64.0
G+C含量 G+C content/%	41.6	31.0	27.0	48.0	41.40	26.0
开放阅读框预测 Predicted open reading frame	1 857.0	4 458.0	2 614.0	1 999.0	1 833.00	3 804.0

ND: 无数据。ND: No data.

由于微孢子虫没有完整的线粒体而只有线粒体残基纺锤剩体,而线粒体又是真核生物的主要能量供应场所,因此,有关微孢子虫如何获得能量的问题,一直是学者们关注的热点(Keeling, 2009)。Williams et al. (2008)在蝗虫微孢子虫中发现了二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)/ATP 特异性线粒体转运蛋白基因,发现该转运蛋白具有交换ADP和ATP的功能,因此推测微孢子虫可以利用来源于寄主的ATP。此外,兔脑炎微孢子虫也有类似的现象,通过使用核苷转运蛋白(nucleotide transporters, NTT)蛋白开发其真核宿主及其自身细胞质的ATP池,兔脑炎微孢子虫已进化出满足其细胞和线粒体能量需求的独特解决方案(Tsaousis et al., 2008)。在蝗虫微孢子虫中同样发现了NTT的存在,这表明NTT在微孢子虫窃取寄主能量过程中具有非常重要的作用(Chen et al., 2020)。

2 蝗虫微孢子虫应用现状

在我国历史上,蝗灾、水灾和旱灾并称为三大自然灾害(倪根金, 1998)。从春秋到新中国成立前的2 000余年中,我国共发生蝗灾800余次(郑淑丹, 2015)。据联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)统计,蝗灾在全球常年发生面积可达4 680万 km^2 ,对世界粮食安全造成巨大损失(Zhang et al., 2019)。在众多蝗虫防治方法中,生物防治是相对环保和安全的一种防治方法。生物防治包含多种方法,除了常见的天敌防治以外,利用微生物制剂防治也是被广泛接受和应用的一种方法。在蝗虫防治过程中,常用的病原微生物主要有蝗虫微孢子虫、绿僵菌*Metarhizium anisopliae*、蝗噬虫霉*Entomophaga grylli*、白僵菌*Beauveria bassiana*和米曲霉*Aspergillus oryzae* XJ-1等(张鹏飞等, 2020)。其中,蝗虫微孢子虫既可以水平传播,又可以垂直传播,因其独特传播方式得到广泛应用,感染蝗虫微孢子虫的病虫不仅可以将病原传染到周围其他蝗虫上,而且能引起微孢子虫病在蝗群中流行,同时还能通过蝗卵将微孢子虫传染到下一代,在蝗虫种群中持续流行,最终可将蝗虫持续稳定的控制在安全阈值之内而避免灾害的暴发(Henry, 1985; Johnson, 1997)。另外,经过多年的研究和试验表明,蝗虫微孢子虫对环境安全,对蜜蜂、蝗虫天敌、家蚕、牲畜以及人等非靶标生物也十分安全(Goettel & Jaronski, 1997)。

1986年中国农业大学害虫生防实验室从美国引进了蝗虫微孢子虫,开始将蝗虫微孢子虫在国内田间应用(张龙和严毓骅, 2008)。此后,蝗虫微孢子虫在我国蝗虫防治中得到广泛应用。自1986年至今,蝗虫微孢子虫已在山东、河北、河南、新疆、青海、甘肃、内蒙、广东、海南、天津、湖北、辽宁、四川、山西、陕西、吉林和北京等省(区、市)开展的防治东亚飞蝗*Locusta migratoria*、意大利蝗*Calliptamus italicus*、西伯利亚蝗*Gomphocerus sibiricus*、亚洲小车蝗*Oedaleus decorus asiaticus*、宽须蚁蝗*Myrmeleotettix palpalis*、白边痲蝗*Bryodemum luctuosum*、红翅皱膝蝗*Angaracris rhodopa*、中华稻蝗*Oxya chinensis*、棉蝗*Chondracris rosea*和黄脊竹蝗*Ceracris kiansu*等试验中取得了良好的防治效果,田间试验结果表明应用蝗虫微孢子虫4周后的普遍蝗虫虫口减退率在50%~70%之间,存活个体的感染率为30%~40%(张杰, 2014)。据全国农技推广中心统计,蝗虫微孢子虫、绿僵菌和印楝素3种生物农药作为治蝗微生物农药累计应用面积达567万 hm^2 /次,共挽回经济损失151亿元,减少化学农药使用量1.7万t,将我国蝗虫生物防治比例由5%提升到57%,彻底改变了我国过度依赖化学农药防治蝗虫的历史,同时也保证了生态环境以及蝗虫天敌和其他非靶标生物的安全。近10年以来,东亚飞蝗的数量一直处于相对稳定状态(张龙等, 2020)。

此外,在蝗虫微孢子虫高毒力株系的筛选、蝗虫微孢子剂型的开发等方面也开展了相应的工作。Zhou & Zhang (2009)经过3代筛选,通过比较6种不同株系蝗虫微孢子虫的 LT_{50} 和 LD_{50} 筛选出了高毒力株系AL2008L,该株系见效快,毒力高,此后被广泛应用于蝗虫的田间防治。随着技术发展,我国研制并建立了蝗虫微孢子虫水悬浮剂生产工艺,开发了环保的水悬浮剂,可保证蝗虫微孢子虫制剂在常温下保持高活性1年以上(张龙等, 2020)。

蝗虫微孢子虫不仅在国内得到了广泛的应用,在老挝、越南等国家的蝗灾治理中也发挥了重要作用,同时还应用于中国和哈萨克斯坦联合治蝗工作中。2018年,老挝、越南等国家黄脊竹蝗暴发成灾,经FAO的推荐,将蝗虫微孢子虫应用于老挝和越南的该蝗虫防治中,17 d时的防效高达88.3%。

3 问题与展望

随着各种微孢子虫基因组计划的实施与完成

(<http://microsporidiadb.org/micro/>), 以及测序技术的发展, 必将对微孢子虫的认识和研究起到重要的推动作用(刘吉平等, 2011)。Chen et al. (2020) 获得了蝗虫微孢子虫的精细基因图谱, 并且结合转录组测序等相关技术, 初步明确了东亚飞蝗与蝗虫微孢子虫的互作机制。但是, 如何更好地利用现有基因组数据解答微孢子虫存在的争议问题值得深入思考。例如能否利用现有的微孢子虫基因组数据明确微孢子虫的分类地位, 在蝗虫微孢子虫基因组中几乎每条染色体都有一段 25 kb 左右的低 GC 含量区域的功能是什么、微孢子虫基因水平转移的原理是什么等问题还需要进一步深入探讨。

蝗虫微孢子虫作为一种生物农药, 在蝗虫的可持续治理中起着重要的作用, 为蝗虫的生物防治提供了保障。但是影响生物防治的因素有很多, 比如环境温度、湿度、光照等, 此外生物防治的时期选择也非常重要。伴随着技术发展, 全球定位系统(global positioning system, GPS)、地理信息系统(geographic information system, GIS)和遥感技术(remote sensing, RS)技术已经广泛应用于蝗虫的监测预警中, 大大提高了监测预警效率(张龙等, 2020)。进入 21 世纪以来, 以互联网为主的综合监测预警技术发展迅速, 大大提高了人们对沙漠蝗灾预测的准确性和防控的精准性(于红妍和石旺鹏, 2020)。如何将蝗虫预测预报信息与生物防治更加合理的结合, 在蝗虫大暴前喷洒生物农药, 及时控制蝗虫种群数量还需更加精细的衔接。此外, 伴随着东亚飞蝗和蝗虫微孢子虫基因组数据的揭示, 二者的互作机制得到了初步明确, 如何利用蝗虫微孢子虫与蝗虫互作机制研发新的治蝗方法也是接下来亟需解决的问题。

参 考 文 献 (References)

- Cameron SA, Lim HC, Lozier JD, Duennes MA, Thorp R. 2016. Test of the invasive pathogen hypothesis of bumble bee decline in North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(16): 4386–4391
- Campbell SE, Williams TA, Yousuf A, Soanes DM, Paszkiewicz KH, Williams BA. 2013. The genome of *Spraguea lophii* and the basis of host-microsporidian interactions. *PLoS Genetics*, 9(8): e1003676
- Chen LX, Gao XK, Li RT, Zhang LM, Huang R, Wang LQ, Song Y, Xing ZZ, Liu T, Nie XN, et al. 2020. Complete genome of a unicellular parasite (*Antonospora locustae*) and transcriptional interactions with its host locust. *Microbial Genomics*, DOI: 10.1099/mgen.0.000421
- Corradi N, Akiyoshi DE, Morrison HG, Feng XC, Weiss LM, Tzipori S, Keeling PJ. 2007. Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonospora locustae* and *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS ONE*, 12: e1277
- Corradi N, Pombert JF, Farinelli L, Didier ES, Keeling PJ. 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications*, 1: 77
- Goettel MS, Jaronski ST. 1997. Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129: 83–99
- Henry JE. 1985. Effect of grasshopper species, cage density, light intensity, and method of inoculation on mass production of *Nosema locustae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Economic Entomology*, 78(6): 1245–1250
- Johnson DL. 1997. Nosematidae and other protozoa as agents for control of grasshoppers and locusts: current status and prospects. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171: 375–389
- Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, Richards TA. 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*, 474: 200–203
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, et al. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414: 450–453
- Keeling P. 2009. Five questions about microsporidia. *PLoS Pathogens*, 5(9): e1000489
- Lange CE. 2005. The host and geographical range of the grasshopper pathogen *Paranosema (Nosema) locustae* revisited. *Journal of Orthoptera Research*, 14(2): 137–141
- Liu JP, Li J, Lü SX, Wei JY, Yang JL. 2011. The new progress of microsporidian genomics. *Guangdong Sericulture*, 45(2): 43–47, 49 (in Chinese) [刘吉平, 李进, 吕思行, 魏建影, 杨吉龙. 2011. 微孢子虫基因组学研究新进展. *广东蚕业*, 45(2): 43–47, 49]
- Ni GJ. 1998. Locust plagues and locust control in Chinese history. *History Teaching: College Edition*, (6): 48–51 (in Chinese) [倪根金. 1998. 中国历史上的蝗灾及治蝗. *历史教学: 高校版*, (6): 48–51]
- Pan GQ, Xu JS, Li T, Xia QY, Liu SL, Zhang GJ, Li SG, Li CF, Liu HD, Yang L, et al. 2013. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics*, 14: 186
- Rao SN, Muthulakshmi M, Kanginakudru S, Nagaraju J. 2004. Phylogenetic relationship of three new microsporidia isolates from the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 86(3): 87–95
- Stentiford GD, Becnel JJ, Weiss LM, Keeling PJ, Didier ES, Williams BAP, Bjornson S, Kent ML, Freeman MA, Brown MJF, et al. 2016. Microsporidia-emergent pathogens in the global food chain.

- Trends in Parasitology, 32(4): 336–348
- Tsaousis AD, Kunji ERS, Goldberg AV, Lucocq JM, Hirt RP, Embley TM. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 453: 553–556
- Williams BAP. 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiology*, 11(11): 1551–1560
- Williams BAP, Haferkamp I, Keeling PJ. 2008. An ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein in the microsporidian *Antonospora locustae*. *Journal of molecular biology*, 375(5):1249–1257
- Williams BAP, Slamovits CH, Patron NJ, Fast NM, Keeling PJ. 2005. A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31): 10936–10941
- Wittner M, Weiss LM. 1999. *The microsporidia and microsporidiosis*. Washington: American Society for Microbiology
- Xu XF, Shen ZY, Zhu F, Tao HP, Tang XD, Xu L. 2012. Phylogenetic characterization of a microsporidium (*Endoreticulatus* sp. Zhenjiang) isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Parasitology Research*, 110: 815–819
- Yu HY, Shi WP. 2020. Outbreak, monitoring and control technology of desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Plant Protection*, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020801> (in Chinese) [于红妍, 石旺鹏. 2020. 沙漠蝗灾发生、监测及防控技术进展. 植物保护学报, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020801>]
- Zhang J. 2014. Research and application of new technology extension model for green locust prevention and control in China. Ph. D thesis. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [张杰. 2014. 我国蝗虫绿色防控新技术推广模式研究与应用. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学]
- Zhang L, Ban LP, You YW, Yin XW. 2020. Locust outbreak and management. *Journal of Environmental Entomology*, 42(3): 511–519 (in Chinese) [张龙, 班丽萍, 游银伟, 尹学伟. 2020. 蝗虫的发生与防控. 环境昆虫学报, 42(3): 511–519]
- Zhang L, Lecoq M, Latchinsky A, Hunter D. 2019. Locust and grasshopper management. *Annual Review of Entomology*, 64: 15–34
- Zhang L, Yan YH. 2008. New strategies and technical systems for sustainable management of locust and grasshopper mainly based on biocontrol. *Journal of China Agricultural University*, 13(3): 1–6 (in Chinese) [张龙, 严毓骅. 2008. 以生物防治为主的蝗灾可持续治理新对策及其配套技术体系. 中国农业大学学报, 13(3): 1–6]
- Zhang PF, Yuan SK, Zhang L. 2020. Entomopathogenic microorganisms and their application in locust plague control. *Journal of Environmental Entomology*, 42(3): 529–544 (in Chinese) [张鹏飞, 袁善奎, 张龙. 2020. 昆虫病原微生物及其在蝗灾治理中的应用. 环境昆虫学报, 42(3): 529–544]
- Zhao ZH, Tu XB, Zhang ZH, Li ZH. 2020. The alert of population expansion of the desert locust *Schistocerca gregaria* and its risk to enter China. *Journal of Plant Protection*, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020802> (in Chinese) [赵紫华, 涂雄兵, 张泽华, 李志红. 警惕沙漠蝗种群持续增加和入侵我国边境地区的风险. 植物保护学报, <https://doi.org/10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020802>]
- Zheng SD. 2015. Research on prediction model of temporal and spatial distribution of grassland locust disaster based on MCA and Markov chain in Xinjiang. Master thesis. Urumqi: Xinjiang University (in Chinese) 郑淑丹. 2015. 基于MCA和马尔可夫链新疆的草地蝗虫灾害时空分布预测模型研究. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆大学]
- Zhou X, Zhang L. 2009. Selection of *Antonospora locustae* (Protozoa: Microsporidae) with higher virulence against *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae). *Biocontrol Science & Technology*, 19(4): 421–427

(责任编辑:王璇)