



Magyarországi kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) populációk genetikai (DNS) vizsgálata

ÁCS ZOLTÁN¹ – KESZTHELYI SÁNDOR²

¹ Vas Megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat, Rovar Parazitológiai Laboratórium
Kőszeg

² Kaposvári Egyetem Növénytan és Növénytermesztés-tani Tanszék
Kaposvár

ÖSSZEFOGLALÁS

A kukoricamoly magyarországi populációinak molekuláris genetikai vizsgálata érdekében az ország három különböző régiójának 14 pontjáról gyűjtöttünk L₅-ös stádiumú lárvákat. A vizsgálatba Egyiptomból származó lárvákat is bevontunk.

A kukoricamoly lárvák SSCP-vel végzett molekuláris vizsgálatából kiderült, hogy a Magyarországon található populációk ugyanolyan haplotípust képviselnek. Sőt, az egyiptomi minta sem mutatott genetikai különbséget. Egyetlen esetben (székkutasi minta) találtunk eltérést, de ez sem a kétnemzedékes ökotípus genetikai különbségét bizonyítja, mivel a többi délkelet-magyarországi minta nem mutatta ezt a genetikai eltérést.

Vizsgálataink alapján kijelenthető, hogy az évi egy- és kétrajzású, illetve az évente több nemzedékben megjelenő populációk egységes genetikai állománnyal rendelkeznek.

Kulcsszavak: kukoricamoly, molekuláris vizsgálat.

BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kukoricamoly elterjedési területének függvényében eltérő nemzedékszámban fejlődik. Magyarországon egy teljes első (univoltin) és egy részleges második (bivoltin) nemzedék kifejlődését figyelték meg (Nagy *et al.* 1997), míg Észak-Amerika déli államaiban (Showers *et al.* 1975), illetve Észak-Afrikában (El-Adl 1983) a több nemzedékes (multivoltin) ökotípus előfordulása a jellemző.

A fent említett ökotípusok esetleges genetikai különbözőségeire különböző diapauza és feromon vizsgálatok hívták fel a figyelmet.

Különböző tulajdonságú kukoricamoly törzsek létezését már régebben gyanították (*O'Kane és Lowry* 1927), de elsőként *Arbuthnot* (1944) mutatta ki az Észak-Amerika Corn Beltjéből a többnemzedékes homozigóta és az egynemzedékes heterozigóta törzseket. Az Észak-Amerika különböző területeiről származó populációk a diapauzában, fejlődési sebességben (*Beck és Apple* 1961, *Ellsworth et al.* 1983), sőt fotoperiodus érzékenységben is különböznek (*Chiang et al.* 1968). A kukoricamoly populációk genetikai vizsgálatainak eredményei a szakirodalmi adatok alapján ellentmondásos. *Pornkulwat et al.* (1998) DNS vizsgálatokkal Észak-Amerikában az egy- és kétnemzedékes (uni-, bivoltin) ökotípusokkal szemben a több nemzedékes (multivoltin) ökotípus genetikai különbözőségét állapították meg. *Marcon et al.* (1997) európai és észak-amerikai populációk genetikai vizsgálatából arra a következtetésre jutottak, hogy a különböző nemzedékszámú populációk genetikai eltérése nem kimutatható, mivel az ökotípusok közti szaporodás következtében a folyamatos géncsere elmosza az esetlegesen kialakuló genetikai határokat. *Arbuthnot* (1949) és *McLeod* (1976) szerint az eltérő nemzedékszám oka a hőmérséklet különbözősége mellett a diapauzára való hajlam genetikai rögzítettségében keresendő.

Az eltérő törzsek létezését megerősítik az újonnan folytatott szexferomon vizsgálatok (*Glover et al.* 1992). Ezek a vizsgálatok megerősítették a szexferomon izomerek eltérő arányú keverékéhez vonzódó kukoricamoly törzsek létezését (*Klun et al.* 1975). Magyarországon is kimutatható volt biotípusbeli eltérés. Itt a martonvásári populáció kender kerülése volt a legfeltűnőbb (*Nagy* 1959). Az első rajzás idején hatékony 11 tetradecinil-acetát keveréknek a második rajzás idején gyenge, vagy semmilyen hatása nem volt.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kukoricamoly lárvagyűjtés helyszínei és időpontja

A vizsgálatot 2002. április 25–30. között végeztük az ország 14 különböző pontján (*1. ábra*). A felvételezés helyszíneit úgy próbáltuk megválasztani, hogy egy régióból több minta származzon. Minden területről kukoricaszárak felhasításával 3–4 db lárvát gyűjtöttünk, amelyeket abszolút alkoholban –20 Celsius-fokon tároltunk a molekuláris munkákig. A szövet mintavétel megkönnyítése érdekében a gyűjtést úgy időzítettük, hogy a területeken kifejlett (L_5) lárvákat találjunk.

Külcsoportként egyiptomi kukoricamoly lárvákat is bevontunk a vizsgálatba, amelyeket Prof. Dr. Hessein A. Boraie, a Tampai Egyetem munkatársától kaptuk.

A molekuláris biológiai vizsgálat metodikája

A mitokondriális DNS jóval gyorsabban változik időben, mint a sejtmagi genom, ami populációsintű elkülönítésekre is enged következtetni. A mitokondriális DNS citokróm b génjének analízisét gyakran alkalmazzák rovar populációk elkülönítésére, evolúciós kapcsolatok vizsgálatára (*Rokas et al.* 2003). Ezért választottuk mi is a citokróm b gén molekuláris vizsgálatát.

A különböző gyűjtőhelyről származó példányok citokróm b génjének összehasonlítását SSCP-vel végeztük, ami elég érzékeny eljárás már egy-két bázis eltérés kimutatására is (Hodgkinson *et al.* 2002).

DNS izoláció

A kukoricamoly lárvák tor izomzatából steril szikével kivágott 1–2 mm-es darabok, egyenként tiszta eppendorf csőbe kerültek, amelyet 1xTAE-ben történő 1,5 órás áztatás követett szobahőmérsékleten. Ezután 200 µl 5% Chelex 100 DNS kivonás következett, amihez 3,5 µl Proteináz K-t (50 µg/µl) adtunk mintánként, majd steril műanyag homogenizálóval (Sigma) eldörzsöltük a mintákat. A szövetek minél teljesebb feltárása érdekében egy kevés steril szénporral végeztük az eldörzsölést.

Az extrakciós keverékben 12 órán át inkubáltuk a mintákat 56 Celsius-fokon, gyakori vortexes keverés mellett. Ezután a felülúszót levettük, melyet 95 fokon 10 percig tartottuk, hogy a proteináz enzimek inaktiválódjanak. A kész DNS mintákat –20 Celsius-fokon tároltuk felhasználásig.

PCR reakció

A citokróm b gén PCR-es felszaporításához az alábbi primer párt használtuk (Jermin és Crozier 1994):

CB1: 5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3'

CB2: 5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AT-3'

A PCR reakciókat 25 µl végtérfogatra készítettük, mely a következőket tartalmazta: 200 µM dNTP, 0,15 µM CB1 és CB2 primerek, 1xPCR puffer, 2 mM MgCl és 1,2 U Taq DNS polimeráz (Zenon), 1 µl template DNS. MJ Research PTC 100 PCR gépet használtunk.

Az alkalmazott hőmérsékleti lépések:

1. 10 perc előinkubálás 94 °C-on,
2. 36 ciklus 30 sec. 94 °C-on, 1 perc 46 °C-on, 2 perc 72 °C-on,
3. végső elongáció 10 perc 72 °C-on.

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) analízis

A kb. 430 bp hosszú PCR termékek összehasonlítását SSCP-vel végeztük. Az elektroforézist 12% végkoncentrációjú akrilamid gélen végeztük TBE pufferben.

Az akrilamid gél az alábbiak szerint készítettük el: 2955 µl 0,5xTBE, 1200 µl szűrt akrilamid (30%), 5 µl TEMED, 40 µl 10% ammónium perszulfát.

A gél lemezeket 95%-os etanollal tisztítottuk.

A kész gél előzőleg üresen futtattuk 1 órán át 0,5x TBE-ben (Tris, bórsav, EDTA). Az 5–5 µl PCR termékeket az alábbi keverékkel 100 °C-on tartottuk 10 percig: 10 µl (95% formamid, 20 mM EDTA, 0,05% brómfenol kék, 0,05% xylen cyanol).

A hődenaturált DNS szálakat tartalmazó csöveket ezután hirtelen jégre tettük, hogy a hőmérséklet-csökkenéssel ne alakuljanak vissza eredeti kettősszálú formává. Az egyes-

szálú denaturált konformáció fennmaradását a formamid segíti. Az így egyesszálú formává alakított PCR termékeket vittük fel az előbb említett vertikális akrilamid géltre. A gélt 15 °C-on futtattuk 45 V-on 24 órán át. Ezután, etídium bromidos oldatban áztattuk az akrilamid gélt, hogy UV fényben láthatóvá és fotózhatóvá váljanak a DNS sávok.

EREDMÉNYEK

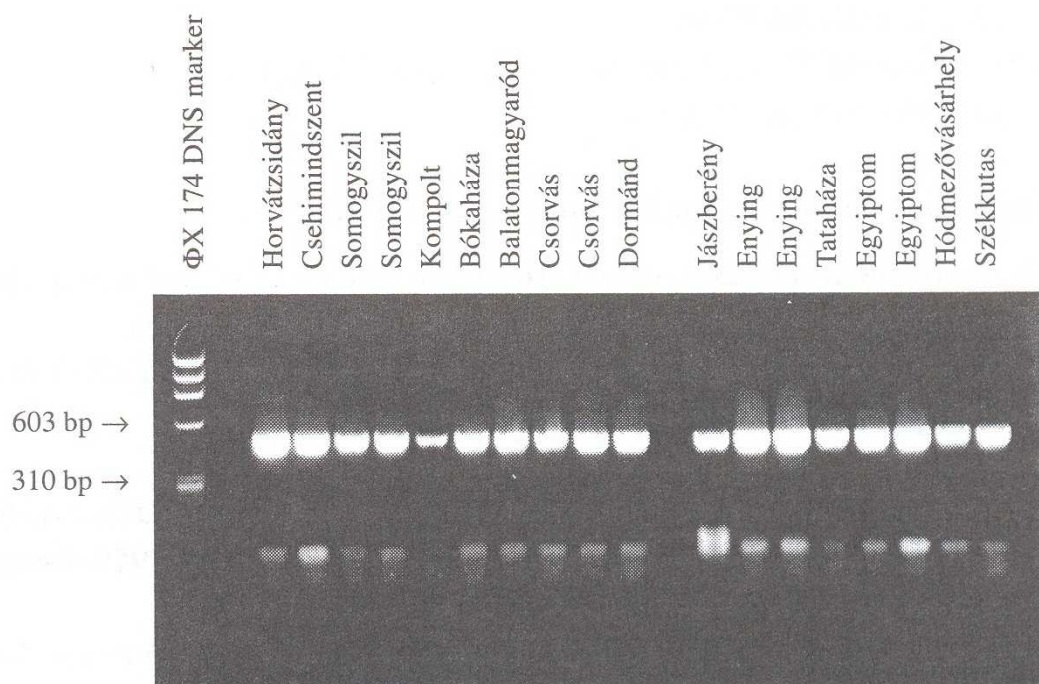
Az univerzális citokróm b primerekkel (CB1/CB2) elegendő mennyiségű PCR terméket kaptunk a kukoricamoly hernyók DNS mintáiból (1. ábra).

Az 5–5 µl PCR termék SSCP analízis gélfotóját mutatja a 2. és 3. ábra.

A gélfotók DNS sávjainak vizsgálataiból elmondható, hogy a 14 magyarországi gyűjtőhelyről származó kukoricamoly hernyók mitokondriális citokróm b génjeinek SSCP-vel végzett elemzése gyakorlatilag egy haplotípust mutatott. Még a jóval távolibb, egyiptomi kukoricamoly is hasonló DNS sávokat adott. Ez feltételezi, hogy a kukoricamolynak térségünkben egy kiterjedt egységes populációja élhet. Ezek az eredmények összhangban vannak egy korábbi vizsgálattal, ami Európában és Észak-Amerikában élő *Ostrinia nubilalis* példányokat hasonlított össze DNS markerek alapján (Marcon et al. 1997).

1. ábra 18 kukoricamoly DNS minta citokróm b PCR terméke (CB1 és CB2 primerekkel). 1,5%-os agaróz gélen 5–5 µl PCR terméket futtatva. A PCR fragment ~430 bp hosszú.

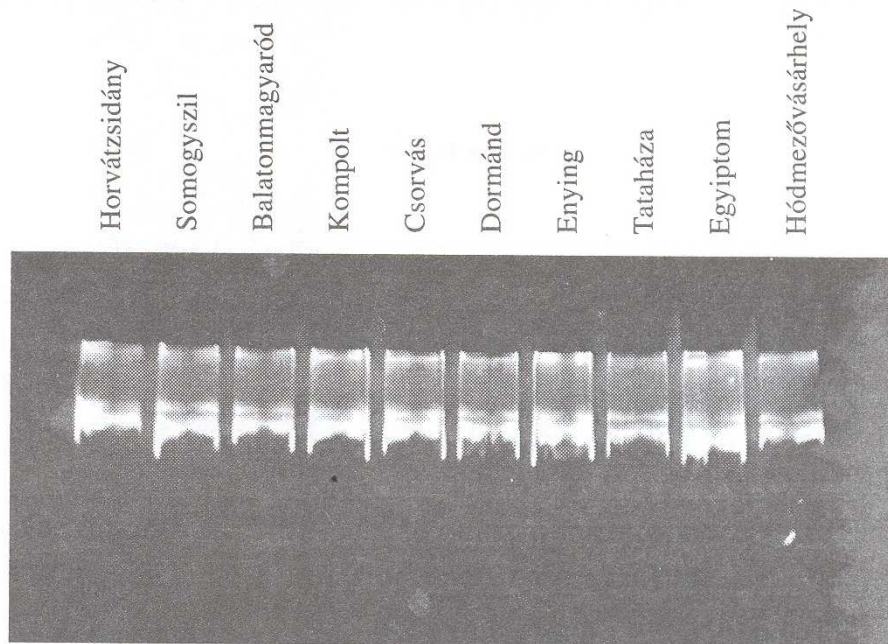
Figure 1. Cytochrome b PCR products (with CB1 and CB2 primers) of 18 DNA samples of European corn borer. PCR products (5 µl each) loaded on 1,5% agarose gel. The PCR fragment is ~430 bp long.



2. ábra Mitokondriális citokróm b PCR fragmentek SSCP analízise. 9 magyarországi és egy egyiptomi gyűjtőhelyről származnak az *Ostrinia nubilalis* DNS minták.

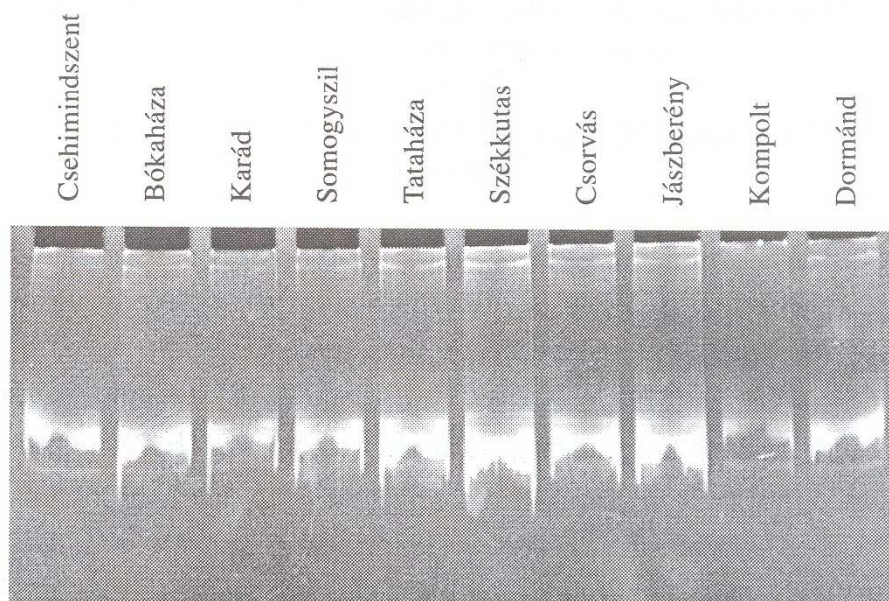
A DNS sávok közel azonos haplotípust mutatnak.

Figure 2. SSCP analysis of mitochondrial cytochrome b PCR fragments. The *Ostrinia nubilalis* DNA samples came from 9 collecting places in Hungary and place in Egypt. The DNA bands show nearly the same haplotype.



3. ábra Mitokondriális citokróm b PCR fragmentek SSCP analízise. 10 magyarországi gyűjtőhelyről származnak az *Ostrinia nubilalis* DNS minták. A Székkutasról származó minta kivételével azonos haplotípust mutatnak a DNS sávok.

Figure 3. SSCP analysis of mitochondrial cytochrome b PCR fragments. The *Ostrinia nubilalis* DNA samples originate from 10 collecting places in Hungary. With the exception of the sample from Székkutas the DNA bands exhibit the same haplotype.



A székkutasi minta az egyetlen, mely „kivált” a többi közül. Ha genetikailag kissé különbözik is ez az egyed, semmiképpen sem a kiindulási „két rajzáscsúccsal érvényesülő ökotípus” létét bizonyítja. Ugyanis ez esetben a hódmezővásárhelyi, tataházi és csorvási példányoknak is a székkutasihoz hasonló DNS sávokat kellett volna adniuk. Azt, hogy mi lehet az oka a székkutasi minta citokróm b különbözőségének, nem tudjuk, de az eredeti kérdésfeltevésünkre adott választ lényegében nem befolyásolja. Azaz a hazai évi egy és két rajzáscsúccsal érvényesülő kukoricamoly populációk egységes állományt alkotnak.

KÖVETKEZTETÉS

A Magyarország különböző területeiről származó kifejlett (L_5) kukoricamoly lárvák molekuláris genetikai vizsgálatából kiderült, hogy a hazánk területén élő kukoricamoly populációk egységes genetikai állománnyal rendelkeznek. Így igazolódtak *Pornkulvat et al.* (1998) észak-amerikai és *Marcon et al.* (1997) európai kukoricamoly populációkkal végzett kísérletei, miszerint az egy- és kétnemzedékes (uni-, bivoltin) ökotípusok génállománya nem különbözik.

Vizsgálataink szerint, Magyarországon az egyes kukoricamoly populációk közbeiktatott diapauza nélküli fejlődése és szexferomon-polimorfizmusa tehát nem genomikusan meghatározott.

Genetic (DNS) examination of Hungarian European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hübner) populations

ZOLTÁN ÁCS¹ – SÁNDOR KESZTHELYI²

¹ Plant Protection and Soil Conservation Service of county Vas
Insect Parasitological Laboratory
Kőszeg

² University of Kaposvár, Faculty of Animal Science
Kaposvár

L_5 stadium larvae were collected in interests of molecular genetic examination of European corn borer Hungarian populations from 14 points of three different regions of country. Egyptian larvae have been attached to this examination too.

It turned out from SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) molecular genetic examination of corn borer larvae, that Hungarian corn borer populations has got similar haplotype. What is more, neither Egyptian larvae showed genetical difference. A single difference was found (Székkutas sample), but genetical difference of bivoltin ecotype is not proved, because more south-western Hungarian samples not showed this genetical difference.

It can be declared on the basis of our examinations, uni-, bi-, multivoltine ecotypes has got unified genetical information.

Keywords: European corn borer, molecular genetic examination.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondunk Prof. Dr. Hessein Boraie-nek, a Tantai Egyetem munkatársának az egyiptomi kukoricamoly lárvák biztosításáért, illetve Krizbai Lászlónak a molekuláris labormunkák során végzett segítségéért.

IRODALOM

- Arbuthnot, K. D. (1944): Strains of European corn borer in the United States. USDA Tech. 1–20.
- Arbuthnot, K. D. (1949): Temperature and precipitation in relation to number of generations of European corn borer in the United States. USDA Tech. Bull. **987.**, 1–22.
- Beck, S. D. – Apple, J. W. (1961): Effects of temperature and photoperiod on voltinism of geographical populations of European corn borer, *Pyrausta nubilalis*. J. Econ. Entomol. **54.**, 550–558.
- Chiang, H. C. – Keaster, A. J. – Reed, G. L. (1968): Difference in ecological responses of three biotypes of *Ostrinia nubilalis* from the north central United States. Ann. Entomol. Soc. Am. **61.**, 140–146.
- El-Adl, M. (1983): Detection of the pheromonal phenotype in the Egyptain of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.). Proc. 1st Hon. Con. Agric. Bot. Sci. 326–330.
- Ellsworth, P. C. – Umeozor, O. C. – Kennedy, G. G. – Bradley, J. R. – Van Duyn, J. W. (1983): Population consequences of diapause in a model system, the European corn borer *Ostrinia nubilalis*. Entomol. Exp. Appl., **53.**, 45–55.
- Glover, T. J. – Robbins, P. S. – Eckenrode, C. J. – Roelofs, W. L. (1992): Genetic control of voltinism characteristics in European corn borer races assessed with a marker gene. Arch. Insect Biochem. Physiol. **20.**, 107–117.
- Hodgkinson, V. H. – Birungi, J. – Haghpanah, M. – Joshi, S. – Munstermann, L. E (2002): Rapid identification of mitochondrial cytochrom b haplotypes by single-strand conformation polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) populations. J. Medic. Entomol. **39.**, 689–694.
- Jermiin, L. S. – Crozier, R. H. (1994): The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger* – sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. J. Mol Evol. **38.**, 282–294.
- Klun, J. A. – Chapman, O. L. – Mattes, K. L. – Beroza, M. (1975): European corn borer and redbanded leafroller: disruption of reproduction behavior. Environ. Entomol. **4.**, 871–876.
- Marcon, P. – Taylor, D – Mason, C. – Hellmich, R. – Siegfried, B. (1997): Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera: Crambidae). Insect Mol. Biol., **8.**, 2. 213–221.
- McLeod, D. G. R. (1976): Geographical variation of diapause termination on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in Southwestern Ontario. Can. Entomol. **108.**, 1403–1408.
- Nagy B. (1959): A kukoricamoly okozta elváltozások és károsítási formák kenderen. Kísérl., Közl. 52/A., 49–68.
- Nagy, B. – Szentkirályi, F. – Vörös, G. (1997): Changes in the pests status within maize insect assemblages in the Carpathian basin. Proceed. XIX. IWGO, Guimaraes (Portugal), August 30–September 5, 1997, 223–235.

- O'Kane, W. C. – Lowry, P. R.* (1927): The European corn borer, life history in New Hampshire 1923–1926. New Hampshire Agric. Expt. Sta., Tech. Bull. **33.**, 1–39.
- Pornkulwat, S. – Skoda, S. R. – Thomas, G. D. – Foster, J. E.* (1998): Random amplified polymorphic DNA used to identify genetic variation in ecotypes of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Genetics*. **91.**, 719–725.
- Rokas, A. – Melika, G. – Abe, Y. – Nieves-Aldrey, J. L. – Cook, J. M. – Stone, G. N.* (2003) Lifecycle closure, lineage sorting and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Molecular phylogenetics and Evolution*. In press.
- Showers, W. B. – Chiang, H. C. – Keaster, A. J. – Hill, R. E. – Reed, G. L. – Sparks, A. N. – Musick, G. J.* (1975): Ecotypes of the European corn borer in North America. *Environ. Entomol.* **4.**, 753–760.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

ÁCS Zoltán

Vas Megyei Növény- és Talajvédelmi Szolgálat, Rovar Parazitológiai Laboratórium
H-9730 Kőszeg, Kelcz-Adelffy u. 6.
E-mail: acszoltan@freemail.hu

KESZTHELYI Sándor

Kaposvári Egyetem, Növénytan és Növénytermesztés-tani Tanszék
H-7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.
E-mail: sandorke@axelero.hu