

我国几种重要松毛虫基因组大小测定

张苏芳¹, 张真^{1*}, 王鸿斌¹, 孔祥波¹, 罗基同², 杨忠武³

(1. 国家林业局森林保护学重点实验室, 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;
2. 广西壮族自治区森林病虫害防治站, 广西 南宁 530022; 3. 广西壮族自治区桂林市森林病虫害防治检疫站, 广西 桂林 541001)

摘要:本研究采用流式细胞术,以公鸡(*Gallus domesticus*)血红细胞 DNA 含量为标准,测定了我国南方几种重要松毛虫的基因组大小(或称 C-值)。结果显示,马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)的基因组大小为 563.36 ± 7.26 Mb,其雌、雄 2C DNA 含量分别为 1.1756 ± 0.0164 和 1.1286 ± 0.0134 pg;思茅松毛虫(*Dendrolimus kikuchii*)的基因组大小为 719.30 ± 9.70 Mb,其雌、雄 2C DNA 含量分别为 1.4492 ± 0.0212 和 1.4428 ± 0.0184 pg;云南松毛虫(*Dendrolimus houi*)的基因组大小为 586.82 ± 8.94 Mb,其雌、雄 2C DNA 含量分别为 1.244 ± 0.0182 和 1.156 ± 0.0184 pg。统计分析结果发现,思茅松毛虫基因组显著大于云南松毛虫和马尾松毛虫基因组,后两者的基因组也存在显著差异,但绝对值相差较小。3 种松毛虫雌雄虫的基因组大小之间也存在显著的差异,雌虫基因组大于雄虫。几种松毛虫基因组大小的测定,为进一步比较其分子差异、构建基因组文库和基因组学研究奠定了基础。

关键词:流式细胞仪,基因组大小,松毛虫,鸡血细胞

中图分类号:S763

文献标识码:A

Genome Size Determination of Several *Dendrolimus* Species in China

ZHANG Su-fang¹, ZHANG Zhen¹, WANG Hong-bin¹, KONG Xiang-bo¹, LUO Ji-tong², YANG Zhong-wu³

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Forest pest and disease control station of the Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530022, Guangxi, China; 3. Forest pest and disease control station of Guilin city, the Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541001)

Abstract: The genome size of three important *Dendrolimus* species in South China were measured by flow cytometry, with chicken erythrocyte DNA content as control. The results showed that the genome size of *D. punctatus* was 563.36 ± 7.26 Mb, and the 2C DNA content of female and male were 1.1756 ± 0.0164 and 1.1286 ± 0.0134 pg, respectively. The genome size of *D. kikuchii* was 719.30 ± 9.70 Mb, and the 2C DNA content of female and male were 1.4492 ± 0.0212 and 1.4428 ± 0.0184 pg, respectively. The genome size of *D. houi* was 586.82 ± 8.94 Mb, and the 2C DNA content of female and male were 1.244 ± 0.0182 and 1.156 ± 0.0184 pg, respectively. Statistical analysis indicated that the genome size of *D. kikuchii* was much greater than that of *D. houi* and *D. punctatus*, and the genome size of *D. houi* was a little larger than that of the *D. punctatus*. For all the three species, the genome size of the female was larger than that of the male. Genome size determinations of these *Dendrolimus* species can be used as the basis of further comparison among the molecular differentiation of these closely related and sym-

收稿日期:2013-12-06

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31200492);中国林科院森林生态环境与保护研究所基本科研业务费专项资金项目(CAF-RIFEEP201102-5)

作者简介:张苏芳(1983—),女,助理研究员,主要从事森林昆虫与环境因子的互作研究;电话:010-62889874;E-mail:wavingsnow@ustc.edu

* 通讯作者:主要从事森林昆虫研究;电话:010-62889567;E-mail:zhangzhen@caf.ac.cn

patric species, and also provide important information for genomic library construction and sequencing in the future.

Key words: flow cytometry, genome size, *Dendrolimus*, chicken erythrocyte

松毛虫属于鳞翅目(Lepidoptera)枯叶蛾科(Lasiocampidae),是我国最重要的针叶类食叶害虫之一。松毛虫作为“无烟的火灾”给我国林业建设造成了严重的危害。其中我国南方大面积人工松林经常遭受到马尾松毛虫(*Dendrolimus punctata punctata* Walker)、云南松毛虫(*Dendrolimus houi* Lajonquiere)、和思茅松毛虫(*D. kikuchii kikuchii* Matsumura)的危害。因此,松毛虫防治一直是我国林业昆虫学家的重要研究方向之一^[1-3]。松毛虫防治工作凝聚了我国几代林业科技工作者的心血,并取得了显著的成效,其生物学特性、防治和管理等方面都有较为深入的研究^[1,2,4-9]。然而,目前从分子生物学角度对松毛虫成灾机理方面的探索还较少,限制了我们深入理解其成灾的内部分子机理。因此,目前亟待从其本身的遗传和基因组角度深入探究松毛虫的成灾机制,才能形成更加有效的可持续控制体系。

昆虫是地球上类群最为复杂的一类生物,其基因组的深入研究不仅为昆虫科学的研究发展提供了新机遇,也为发展害虫防治新方法提供了依据。基因组大小,又称C-值,是指一个物种单倍体核的DNA含量。基因组大小的表示方式有两种:其单位可是质量(pg),也可以是碱基对的数目(Mb),根据碱基对平均分子量进行计算,可知两者之间的换算关系为978 Mb DNA质量为1 pg^[10]。越来越多的研究发现基因组大小和生物的很多生理参数存在关系,如细胞的大小^[11]、寿命^[12]、濒危程度^[13]、代谢率^[14]等,故对其研究具有重要意义^[15]。目前人们已经利用各种方法对几百种昆虫的基因组大小进行估计(Animal Genome Size Database),但这对于庞大的昆虫种类数量来说,依旧是冰山一角。有趣的是,在已测定基因组大小的昆虫中,其C-值有超过185倍的差异。甚至在亲缘关系极其相近的物种间,其基因组大小也有成倍的差异。例如,Boulesteix发现*Drosophila oreana*的基因组是黑腹果蝇基因组大小的1.6倍,这种果蝇的核型与其他果蝇有所不同^[16]。因此,昆虫基因组大小的改变,最终导致了基因组大小和昆虫间关系的多样性及复杂性。同时,基因组大小的变化也为昆虫适应极端环境和优化自身种群提供了一个良好的遗传工具^[17]。为进一步比较其分子差异、构建基因组文

库和基因组学研究奠定了重要基础。

基因组大小测定方法主要有流式细胞测定法、Feulgen光密度测定法、荧光定量分析法等,其中流式细胞测定法由于具有快速、采集量大、并且结果比较准确等优点,已经成为最常用的基因组大小检测手段^[18]。流式细胞技术是一种利用激光束散射与折射原理来对液体中的细胞或其他微小颗粒状物体进行快速分析与分选的技术^[18]。测定基因组大小之前,通常需要选定标准品作为参照物,其选取原则为参照物的基因组大小和测定物种的类似,同时两者的测定峰又不重叠^[19]。昆虫基因组大小测定中,常用的标准品有:黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、家鸡(*Gallus domesticus*)、赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)。由于黑腹果蝇只有4条染色体,基因组大小仅约180 Mb^[20]。根据其他鳞翅目物种推测,松毛虫基因组大小应该在500 Mb以上,和鸡血细胞的基因组大小倍数上更为接近(约1 139 MB)^[20]。另外,鸡红细胞在体内为一终末细胞,其DNA含量是均一致的,它还具有制备简单,来源丰富,价格低廉的优势。因此,本研究中,用鸡血细胞作为标准品,测定并比较了我国南方三种重要松毛虫的基因组大小,为进一步比较其分子差异、构建基因组文库和基因组学研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验昆虫

思茅松毛虫和云南松毛虫的蛹采集自云南省普洱市,马尾松毛虫的蛹采集自广西省桂林市全州县(2012)。采集到的蛹带回实验室后在光照培养箱中继续培养,温度为 $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $50 \pm 10\%$,光周期为16L:8D。等松毛虫羽化后,分雌、雄保存,并在3天之内用于流式细胞仪测定制样。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞悬液制备 取活性较好的松毛虫成虫胸部肌肉黄豆粒大小,置于滴有2 ml细胞裂解液的培养皿中,用消毒后的锋利刀片将其切碎,用600目尼龙网过滤获得细胞悬液,倒入荧光透明的指形试管中。低温离心机 4°C ,800 rpm离心5分钟,细胞沉于试管底部。轻轻倒掉上清液,放于冰上备用^[21]。

商品化的鸡血对照细胞制备悬浮液,置于冰上

备用。

1.2.2 DNA 荧光染色 向制备的细胞悬液中滴入碘化丙啶(propidium iodide, PI)至终浓度为 50 ug · ml⁻¹,置于 4°C,染色 30min。

1.2.3 流式细胞仪检测 流式细胞仪系统采样 FACS Aria(BD 公司,美国)检测 PI 的荧光强度。先以商品化鸡血细胞做对照校正二倍体细胞峰值于 50 道左右,而后对待测样品进行逐一检测。每组样品至少收集 10 000 个细胞。为了校正鸡血细胞的标准值,在样品检测的前、中、后期各进行一次鸡血细胞二倍体峰值校正。最后使用 BDFACSDiva 软件分析数据。

1.3 基因组大小计算原理与数据分析

PI 是一种插入性的荧光染料,能够均匀地嵌入双链核酸的碱基对上。PI 在激发光的激发下,发出可被流式细胞仪检测到的荧光。由于 PI 在着色过程中的嵌入量与 DNA 的量成正比,因而用荧光强度可以表示 DNA 的相对含量。通过对待测样品和标准样品的 PI 发射荧光强度的测定,可知待测样品的 DNA 含量和标准样品的 DNA 含量之间的比例关系。由于标准细胞 DNA 的含量是已知的,因此可以计算出待测样品的 DNA 含量。松毛虫的基因组大小依照以下公式计算: $X = A_X/A_C \times C$ pg = $A_X/A_C \times C \times 978$ Mb。其中, X 表示待测松毛虫的 DNA 含量;A_X 表示待测松毛虫样品的荧光强度;A_C 表示鸡血对照细胞样品的荧光强度;C 为标准鸡血细胞 DNA 含量(2.33 pg/2C)。

2 结果

2.1 标准鸡血细胞悬液检测与校正

PI 荧光染色剂能够嵌入细胞核双链核酸碱基对中,从而实现 DNA 的特异染色。该实验采

用较为常见的商品化鸡血细胞作为对照,调整其 G₁ 期细胞峰值位于 50 道附近(图 1)。图 1 可以看出,细胞峰值锐利,实验设置合理,各个倍型的分布也表明对照细胞的状态和前期制样结果良好。为了进一步校准对照细胞峰值,我们在进行后续实验的前、中、后期各进行一次对照细胞校正,确保对照细胞 G₁ 期峰值位于横坐标 50 道附近(三次 2C 峰值分别为 49.83,48.53,49.01),防止实验过程中电压漂移造成的误差,最终确定对照 2C 峰值为 49.12。

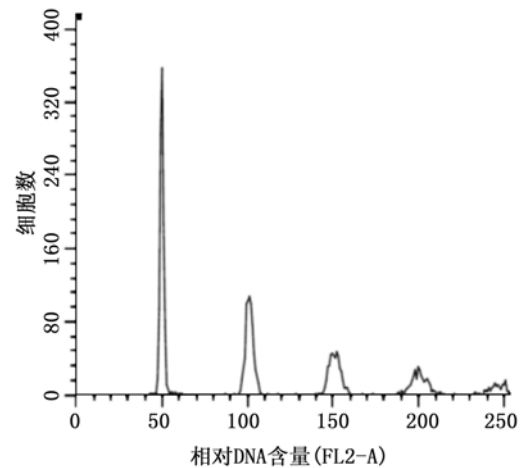


图 1 鸡血红细胞 DNA 流式细胞仪校准图

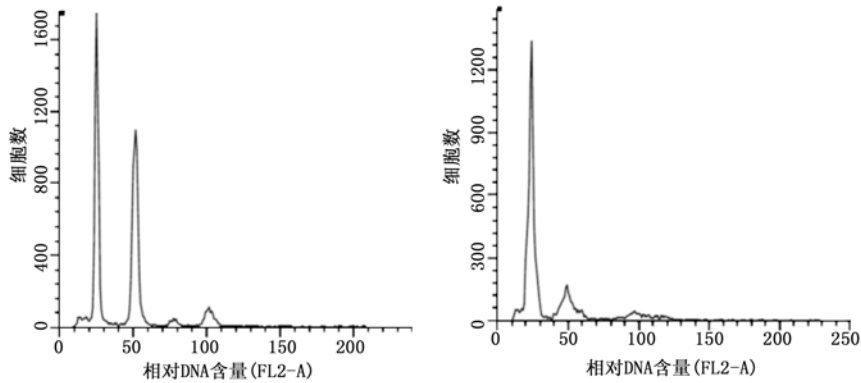
2.2 马尾松毛虫 C-值测定

马尾松毛虫雌、雄样品各 6 份(表 1),利用上述方法制样后,进行流式细胞检测。结果表明,雌、雄之间的基因组含量差别不大,其平均 G₁ 期峰值分别为 24.78 ± 0.34 和 23.79 ± 0.28(图 2)。利用鸡血细胞(2C = 2.33 pg)计算马尾松毛虫雌、雄 C-值分别为 0.587 8 ± 0.008 2 和 0.564 3 ± 0.006 7,平均基因组大小为 563.36 ± 7.26 Mb(按照 1 pg DNA = 978 Mb 计算^[10])。

表 1 我国几种重要林业事业害虫松毛虫的 C-值测定结果

种名	性别	样品数	C-值/pg Mean ± SD	基因组大小/Mb Mean ± SD
马尾松毛虫	雌	6	0.587 8 ± 0.008 2 d	563.36 ± 7.26 c
	雄	6	0.564 3 ± 0.006 7 e	
思茅松毛虫	雌	5	0.749 6 ± 0.010 6 a	719.30 ± 9.70 a
	雄	6	0.721 4 ± 0.009 2 b	
云南松毛虫	雌	6	0.622 0 ± 0.009 1 c	586.82 ± 8.94 b
	雄	5	0.578 0 ± 0.009 2 de	

注:同一列相同字母表示无差异



左侧为马尾松毛虫雌虫;右侧为马尾松毛虫雄虫

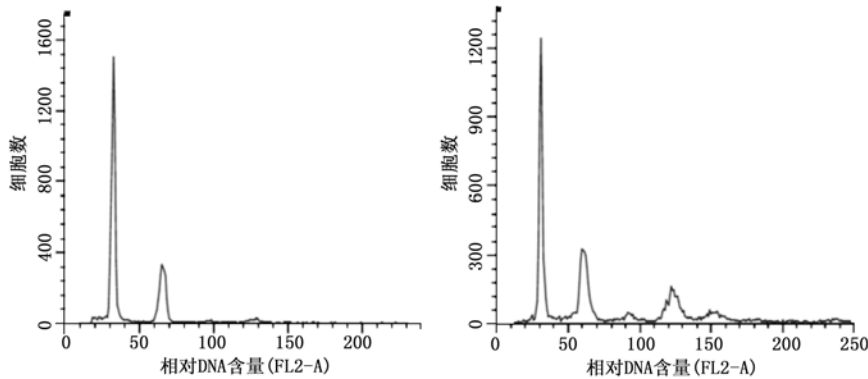
图2 马尾松毛虫 C-值测定

2.3 思茅松毛虫 C-值测定

思茅松毛虫雌虫样品 5 份、雄虫样品 6 份(表 1),利用上述方法制样后,进行流式细胞检测。结果表明,思茅松毛虫雌、雄之间的基因组含量差别不大,其平均 G_1 期峰值分别为 31.61 ± 0.45 和 30.42 ± 0.39 (图 3)。利用鸡血细胞($2C = 2.33 \text{ pg}$)计算思茅松毛虫雌、雄 C-值分别为 0.7496 ± 0.0106 和 0.7214 ± 0.0092 ,平均基因组大小为 $719.30 \pm 9.70 \text{ Mb}$ (按照 $1 \text{ Pg DNA} = 978 \text{ Mb}$ 计算^[10])。

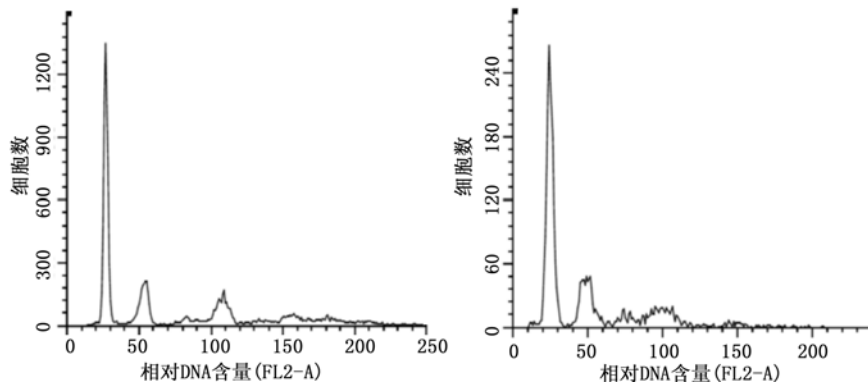
2.4 云南松毛虫 C-值测定

云南松毛虫雌虫样品 6 份、雄虫样品 5 份(表 1),利用上述方法制样后,进行流式细胞检测。结果表明,云南松毛虫雌、雄之间的基因组含量差别不大,其平均 G_1 期峰值分别为 26.23 ± 0.38 和 24.37 ± 0.39 (图 4)。利用鸡血细胞($2C = 2.33 \text{ pg}$)计算思茅松毛虫雌、雄 C-值分别为 0.6220 ± 0.0091 和 0.5780 ± 0.0092 ,平均基因组大小为 $586.82 \pm 8.94 \text{ Mb}$ (按照 $1 \text{ Pg DNA} = 978 \text{ Mb}$ 计算^[10])。



左侧为思茅松毛虫雌虫;右侧为思茅松毛虫雄虫

图3 思茅松毛虫 C-值测定



左侧为云南松毛虫雌虫;右侧为云南松毛虫雄虫

图4 云南松毛虫 C-值测定

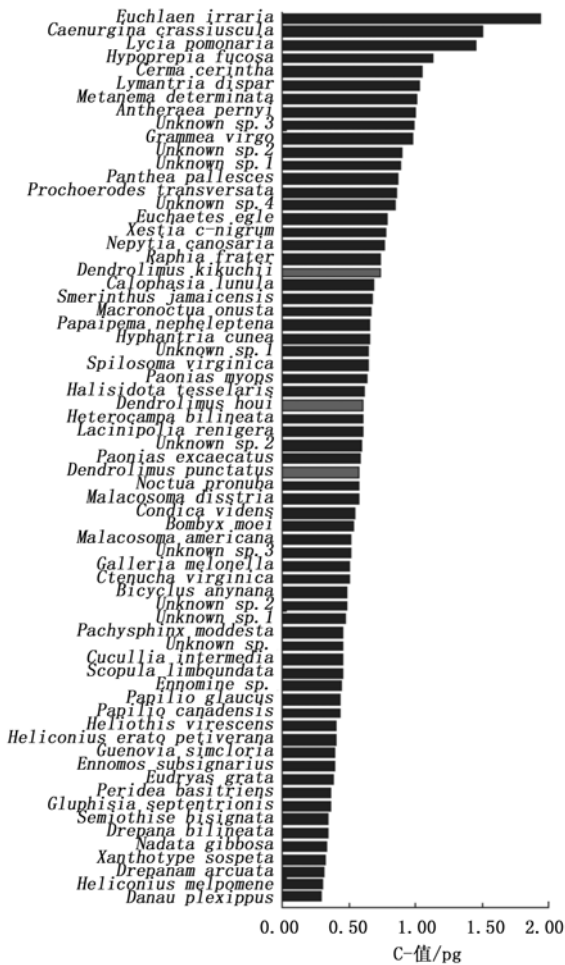


图 5 几种松毛虫基因组大小与已知的其他鳞翅目基因组大小比较

2.5 几种松毛虫 C-值与其他鳞翅目昆虫 C-值的比较

截止到现在,人们已经通过各种方法对 836 种昆虫基因组大小进行了估计^[20] (Animal Genome Size Database <http://www.genomesize.com/>)。其中双翅目(244 种)、鞘翅目(185 种)、直翅目(67 种)、鳞翅目(65 种)、膜翅目(58 种)、半翅目(54 种)是研究最多的几类昆虫。通过比较鳞翅目昆虫 C-值的相对大小,发现我们测定的几种松毛虫位于鳞翅目基因组大小变化范围的中部(图 5),和鳞翅目最重要的模式昆虫家蚕相差不大。家蚕全基因组测序结果已经获得^[22],其测序策略为我们未来深入研究松毛虫的基因组提供了重要的参考。

3 结论与讨论

本研究采用流式细胞仪技术测定了我国南方 3 种重要松毛虫的基因组大小,并比较了它们的 C-值。结果发现,思茅松毛虫基因组显著大于云南松

毛虫和马尾松毛虫基因组,后两者的基因组也存在显著差异,但绝对值相差较小。3 种松毛虫雌雄虫的基因组大小之间也存在显著的差异,雌虫基因组大于雄虫。

流式细胞技术由于其快速、采集量大、并且结果比较准确等优点,成为最常用的基因组大小检测手段。但是,利用流式细胞仪测定基因组试验过程中,由于测定方法、细胞类型及校准标准细胞不同等等,相同物种可能得出不同的结果,给极其相近物种间的比较造成干扰^[20]。为了减少这些误差对结果的影响,我们对所有测试个体都采样同一细胞类型(胸部肌肉细胞)、用同一批鸡血红细胞做标准品,每个样品测定细胞 10 000 个以上,最大限度的保证了各个样品之间的均衡性。

3 种松毛虫中,思茅松毛虫的基因组明显比另外两种松毛虫要大,其隐含的意义值得进一步探讨。昆虫不同物种基因组大小的差异并非都是由于基因数目的不同造成的,同时 C-值悖理现象(C-值和生物结构或组成的复杂性不一致的现象称为 C-值悖理^[23])也表明昆虫基因组大小的变化受到复杂因素的影响^[17]。一方面,我们可以从几种松毛虫的进化关系上对其基因组差异进行探讨。我国几种常见松毛虫的亲缘关系一直受到林业科学家的关注^[7],人们也利用多种不同的方法,如杂交^[24, 25]、分子生物学^[17, 26, 27]、以及形态学^[28]等技术对其中间关系进行过探讨。对于该文涉及到的三种松毛虫,一般认为思茅松毛虫和云南松毛虫亲缘关系较近,是较为独立的进化分支,而马尾松毛虫则和其它松毛虫在进化上更加相近^[8, 26-27]。我们最近利用嗅觉基因对我国几种重要松毛虫的进化关系进行过探讨^[9],结果发现云南松毛虫最类似于祖先物种。祖先物种首先分化出思茅松毛虫,而后进化出马尾松毛虫及其他几种北方松毛虫。综合已有的研究结论以及本研究中的结果,我们推测思茅松毛虫作为云南松毛虫和马尾松毛虫之间的一种过渡种群,可能在进化过程中经历过较为剧烈的环境变化,从而导致了其基因组大小的增加,但这仍有待进一步深入分析其基因组序列信息才能最终进行解释。

另一方面,关于基因组大小差异的产生原因有几种假说。第一种为环境复杂度假说,该假说认为环境中的特定选择力会影响近缘种基因组 DNA 的含量^[29]。例如纬度、海拔高度、温度、气候或者地区差异会造成近缘植物的基因组大小差异^[30-33]。对

于动物而言,其所处的环境因子的稳定性与基因组大小之间则有较大的相关性。例如,陆生软体动物的基因组要明显大于水生软体动物,因为海洋环境比较均一稳定^[34];淡水鱼种则往往比海水鱼种有更大的基因组,其原因主要在于江河环境高度分化,比海洋环境变化更加剧烈^[35]。对于我们的研究涉及的3种松毛虫来说,它们均在我国华南地区有较大面积的分布,并存在混合发生的情况,但是马尾松毛虫成灾,多在海拔500米以下的低山丘陵地区;而云南松毛虫则猖獗发生于500~1000米的山区;这两类分布区虽然不同,但是具有相对稳定性;思茅松毛虫则在我国长江以南地区广泛分布,其中浙江地区在高海拔地区分布,其海拔起伏较大,气候环境更加复杂^[3],这可能与其基因组较大之间存在一定的联系。但是该推测有待于更多物种和样本进一步验证。

另外一种假说为备择假说,基因组大小与细胞的各项特征甚至和生物体表形均存在一定联系^[36]。例如蚜虫个体大小与其基因组大小有相关性^[37]。然而该理论有很多反例,例如蚂蚁^[38]和瓢甲科(Coccinellidae)^[39]的基因组大小和个体大小没有相关性。该理论也无法解释思茅松毛虫基因组较大的状况,因为云南松毛虫和思茅松毛虫的体型都要比马尾松毛虫大很多(马尾松毛虫雌蛾展翅60~70 mm,雄蛾展翅49~53 mm;云南松毛虫雌蛾翅展110~120 mm,雄蛾翅展70~87 mm;思茅松毛虫雌蛾翅展68~121 mm,雄蛾翅展53~78 mm)。

因此,环境复杂度假说更能够解释松毛虫近缘种基因组大小的差异。可能由于思茅松毛虫的分布地区大部分属于喀斯特地貌,环境条件复杂多变,较大的基因组为其适应极端环境和优化自身种群提供了一个良好的遗传工具^[17]。然而,这还需要更多的物种和样本来进行验证。另外,本研究的结果则为进一步比较我国几种重要、易成灾松毛虫的分子差异、构建基因组文库和基因组学研究奠定了重要基础。

参考文献:

- [1] 陈昌洁. 松毛虫综合管理[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990.
- [2] 萧刚柔. 中国森林昆虫[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [3] 侯陶谦. 中国松毛虫[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [4] 李天生. 松毛虫监测与防治方法研究进展[J]. 昆虫知识, 2000, 37(2): 122-128.
- [5] Kong X-B, Liu K-W, Wang H-B, et al. Identification and Behavioral Evaluation of Sex Pheromone Components of the Chinese Pine Caterpillar Moth, *Dendrolimus tabulaeformis* [J]. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33381.
- [6] 孔祥波, 赵成华, 高伟. 4种松毛虫性信息素成分及其在近缘种生殖隔离中的作用[J]. 科学通报, 2001, 46(17): 1435-1439.
- [7] 张真, 李典谟, 查光济. 马尾松毛虫种群动态的时间序列分析及复杂性动态研究[J]. 生态学报, 2002, 7: 1061-1067.
- [8] 张爱兵, 孔祥波, 李典谟, 等. 中国松毛虫属八个种和亚种亲缘关系的DNA指纹证据[J]. 昆虫学报, 2004, 47(2): 236-242.
- [9] Zhang S F, Zhang Z, Kong X B, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of three odorant binding protein gene transcripts in *Dendrolimus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) [J]. Insect Science: n/a-n/a. DOI: 10.1111/1744-7917.12074
- [10] Doležel J, Bartos J, Voglmayr H, et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. Cytometry A, 2003, 51(2): 127-128.
- [11] Gregory T R. The Bigger the C-Value, the Larger the Cell: Genome Size and Red Blood Cell Size in Vertebrates [J]. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2001, 27(5): 830-843.
- [12] Griffith O L, Moodie G E E, Civetta A. Genome size and longevity in fish [J]. Experimental Gerontology, 2003, 38(3): 333-337.
- [13] Vinogradov A E. Genome size and extinction risk in vertebrates [J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2004, 271(1549): 1701-1705.
- [14] Vinogradov A E. Selfish DNA is maladaptive: evidence from the plant Red List [J]. Trends in Genetics, 2003, 19(11): 609-614.
- [15] 薛建, 程家安, 张传溪. 昆虫基因组及其大小 [J]. 昆虫学报, 2009, 52(8): 901-906.
- [16] Boulesteix M, Weiss M, Biémont C. Differences in Genome Size Between Closely Related Species: The *Drosophila melanogaster* Species Subgroup [J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(1): 162-167.
- [17] Petrov D A. Evolution of genome size: new approaches to an old problem [J]. Trends in Genetics, 2001, 17(1): 23-28.
- [18] Birstein V J, Poletaev A I, Goncharov B F. DNA content in eurasian sturgeon species determined by flow cytometry [J]. Cytometry, 1993, 14(4): 377-383.
- [19] Johnston J S, Bennett M D, Rayburn A L, et al. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei [J]. American Journal of Botany, 1999, 86(5): 609-613.
- [20] Gregory T R. Animal Genome Size Database. [M]. 2005.
- [21] 左连富, 王凤荣. 流式细胞术样品制备技术 [M]. 北京: 华夏出版社, 1991.
- [22] group Ba, Xia Q, Zhou Z, et al. A Draft Sequence for the Genome of the Domesticated Silkworm (*Bombyx mori*) [J]. Science, 2004, 306(5703): 1937-1940.
- [23] Thomas C A. The Genetic Organization of Chromosomes [J]. Annual Review of Genetics, 1971, 5(1): 237-256.
- [24] 蔡邦华, 侯陶谦, 宋士美. 松毛虫的种间杂交及杂种生物学的初步观察 [J]. 昆虫学报, 1965, 14(4): 347-359.

- [25] 赵清山, 袁 星. 松毛虫的杂交遗传试验[J]. 昆虫学报, 1992, (1): 28 - 32.
- [26] 南宫自艳, 高宝嘉, 徐志娥, 等. 松毛虫属5种松毛虫不同地理种群 RAPD 遗传多样性分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1): 178 - 179.
- [27] 南宫自艳, 高宝嘉, 刘军侠. 四种松毛虫不地理种群遗传多样性的等位酶分析[J]. 昆虫学报, 2008, 51(4): 417 - 423.
- [28] Tan Q, Yan X F, Wen J B, *et al.* Phylogenetic relationship of seven *Dendrolimus* (Lepidoptera: Lasiocampidae) species based on the ultrastructure of male moths' antennae and antennal sensilla[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2012, 75 (12): 1700 - 1710.
- [30] Gregory T R. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. [J]. *Genome*, 2000, 43: 895 - 901.
- [30] Grime J, Mowforth M. Variation in genome size-an ecological interpretation[J]. *Nature*, 1982, 299: 151 - 153.
- [31] Reeves G, Francis D, Davies M, *et al.* Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata* [J]. *Annals of Botany*, 1998, 82: 99 - 105.
- [32] Charles A, David D. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis [J]. *Ecology Letters*, 2002, 5: 66 - 76.
- [33] Hall S, Dvorak W, Johnston JS, *et al.* Flow cytometric analysis of DNA content for tropical and temperate new world pines[J]. *Annals of Botany*, 2000, 86: 1081 - 1086.
- [34] Vinogradov A. Larger Genomes for molluscan land pioneers [J]. *Genome*, 2000, 43: 211 - 212.
- [35] Ebeling A, Atkin N, Setzer P. Genome sizes of teleostean fishes: increase in some deep-sea species [J]. *American Naturalist*, 1971, 105: 549 - 561.
- [36] Vieira C, Nardon C, Arpin C, *et al.* Evolution of genome size in *Drosophila* in the invader's genome being invaded by transposable element? [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19 (7): 1154 - 1161.
- [37] Finston T, Hebert P, Footitt R. Genome size variation in aphids [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25 (2): 189 - 196.
- [38] Tsutsui N, Suarez A, Spagna J, *et al.* The evolution of genome size in ants [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 64.
- [39] Gregory T R. Is small indel bias a determinant of genome size? [J]. *Trends in Genetics*, 2003, 19(9): 485 - 488.