

文章编号: 1001-1498(2010)06-0823-05

# 白蜡虫阔柄跳小蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因分子检测及序列分析\*

杨 璞, 陈晓鸣\*\* , 李 萌, 文 灿

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 采用 *Wolbachia* 的通用引物对白蜡虫优势寄生蜂之一, 白蜡虫阔柄跳小蜂 (*Metaphycus ericeri* Xu et Jiang) 体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行 PCR 扩增, 以此为模板结合 *Wolbachia* 的 A 大组和 B 大组的特异性引物进行巢式 PCR 扩增, 结果表明: 白蜡虫阔柄跳小蜂被 A 大组和 B 大组 *Wolbachia* 复合感染, 将两种寄生蜂感染的 A 大组和 B 大组 *Wolbachia* 基因片段以及采用通用引物获得的基因片段分别命名为 *wMeeriA*、*wMeeriB* 和 *wMeeri*, 对应的片段长度分别为 554、439、599 bp。系统发育分析表明: 白蜡虫阔柄跳小蜂感染的 *Wolbachia* 分属于 A 大组以及 B 大组的 Con 亚组。所获得的序列已经递交到 NCBI, 登录号分别为: HQ161162、HQ161163 和 HQ161164。

**关键词:** 白蜡虫阔柄跳小蜂; *Wolbachia*; *wsp*

中图分类号: S899.1

文献标识码: A

## Molecular Detection and Sequence Analysis of *wsp* Gene from *Wolbachia* in *Metaphycus ericeri* Xu et Jiang in *Ericerus pela*

YANG Pu, CHEN Xiao-ming, LI Meng, WEN Can

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** Universal primers were used to amplify *wsp* gene from *Metaphycus ericeri* DNA by PCR, and the product was used as templates for the following nested PCR amplification using the specific primers for A and B groups of *Wolbachia*. The results showed that, *M. ericeri* was infected by both A and B group of *Wolbachia*. The sequences were named as *wMeeriA*, *wMeeriB* and *wMeeri*, and the length were 554, 439 and 599 bp, respectively. *Wolbachia* in *M. ericeri* were classified as A-*Wolbachia* and Con group of B-*Wolbachia* by phylogenetic analysis of *wsp* genes. Sequences obtained from this study have been submitted to GenBank and the accession numbers assigned were HQ161162, HQ161163 and HQ161164.

**Key words:** *Metaphycus ericeri*; *Wolbachia*; *wsp*

*Wolbachia* 是一类寄生在节肢动物体内, 可以引起节肢动物生殖行为改变的细胞质遗传的共生菌<sup>[1-2]</sup>, 最早是 1924 年 Hertig 和 Wolbach 在尖音库蚊 (*Culex pipiens*) 的卵巢中发现并命名<sup>[3]</sup>。*Wolbachia* 在昆虫纲的鞘翅目、双翅目、半翅目、鳞翅目、直翅目、蜻蜓目、等翅目、弹尾目<sup>[4]</sup>和膜翅目<sup>[5]</sup>中都有

广泛分布<sup>[6]</sup>。*Wolbachia* 可以在同种宿主的不同个体间进行传播, 也可以在系统关系较远的昆虫种间进行水平传播。在以 PCR 为基础的分子检测技术出现之前, 曾用 DAPI 染色法和电镜分析的方法对 *Wolbachia* 进行判断<sup>[7-8]</sup>。20 世纪 90 年代以来用 PCR 的方法对 16SrDNA、23S rDNA、*ftsZ* 和 *wsp* 等基

收稿日期: 2010-07-12

基金项目: 中国林科院资源昆虫研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(7-015-3)、云南省应用基础研究基金(2010ZC235)和国家自然科学基金青年科学基金(31000983/C040506)资助。

作者简介: 杨 璞(1979—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事白蜡虫分子生物学研究. E-mail: zjuyangpu@yahoo.cn.

\* 致谢: 本单位的赵敏博士和吴海霞博士在数据分析过程给予帮助, 在此表示感谢!

\*\* 通讯作者.

因进行分子检测。据报道, *wsp* (*Wolbachia surface protein*, *Wolbachia* 表面蛋白编码基因) 是进化最快的基因, 因而被广泛用于 *Wolbachia* 的 PCR 检测<sup>[9-12]</sup>。Zhou 等<sup>[10]</sup> 根据 *wsp* 基因, 将主要感染昆虫、螨以及甲壳类动物的 A 大组和 B 大组 *Wolbachia* 又细分为 12 个亚组。随着对 *Wolbachia* 的深入研究, 不断有新的亚组被发现。

白蜡虫 (*Ericerus pela*) 是我国一种重要的资源昆虫, 该虫被多种寄生蜂寄生, 其中白蜡虫阔柄跳小蜂 (*Metaphycus ericeri*) 为白蜡虫优势寄生蜂之一, 对白蜡虫生产造成严重危害<sup>[13]</sup>。关于该寄生蜂的生物学特性研究较多, 但关于该寄生蜂体内共生菌 *Wolbachia* 的研究还未见报道, 为此, 作者对白蜡虫阔柄跳小蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行 PCR 检测, 并对基因序列进行系统进化分析, 了解 *Wolbachia* 在白蜡虫阔柄跳小蜂体内的感染情况, 为进一步讨论 *Wolbachia* 对其生殖方式的影响以及白蜡虫寄生蜂防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

所用白蜡虫阔柄跳小蜂采自昆明资源昆虫研究所人工大棚内的白蜡虫上, 于 -20℃ 冻存。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用改良的蛋白酶 K 法<sup>[14]</sup>。取 5 头白蜡虫阔柄跳小蜂放在 1.5 mL 的离心管中, 加入 200 μL 裂解液 (100 mmol Tris-HCl, 25 mmol EDTA, 500 mmol NaCl, 1% SDS, pH 值 8.0) 研磨, 300 μL 裂解液冲洗研磨棒, 加蛋白酶 K 至终浓度为 100 μg · mL<sup>-1</sup>, 50℃ 水浴 4 h, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 14 000 g 离心 5 min, 用氯仿: 异戊醇 (24: 1) 重复抽提 1 次, 取上清加入 1 mL 预冷的无水乙醇, 14 000 g 离心 10 min, 沉淀用 75% 乙醇洗涤, 充分干燥后 0.5 × TE 溶解沉淀, 4℃ 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

参照 Zhou 等<sup>[10]</sup> 设计的 *wsp* 基因的引物: 81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3)、136F (5'-TGAAATTTTACCTCTTTTC-3、522R (5'-AC-CAGCTTTTGCTTGATA-3)、691R (5'-AAAAATTA-AACGCTACTCCA-3), 其中, 81F/691R 为 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的通用引物, 136F/691R 为 A 大组特异性引物, 81F/522R 为 B 大组特异性引物, 3 对引物所用扩增体系和 PCR 反应程序相同。扩增体系为

50 μL 体系: ddH<sub>2</sub>O 34.5 μL, 10 × PCR buffer 5 μL, 10 μmol · L<sup>-1</sup> primer F 1.25 μL, 10 μmol · L<sup>-1</sup> primer R 1.25 μL, 10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP 1.25 μL, 5 μ · μL Taq polymerase 0.5 μL, 25 μmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 3.75 μL, DNA 模板 2.5 μL。PCR 程序为: 94℃, 4 min; 94℃, 1 min, 48℃, 1 min, 72℃, 1 min, 35 个循环; 72℃, 10 min。以基因组 DNA 为模板结合通用引物获得的 PCR 产物作为巢式 PCR 扩增的模板, 反应体系和 PCR 程序同前。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外灯下检测拍照。

### 1.4 克隆及序列测定

紫外灯下切下相应条带, 按照 Axygen 凝胶回收试剂盒操作, 将纯化的产物与 pMD19-T 载体 4℃ 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5- 感受态细胞 (按照 Takara 的载体试剂盒操作), 通过蓝白斑筛选以及菌液 PCR 检测阳性重组克隆。菌液送交南京金斯瑞公司测序。

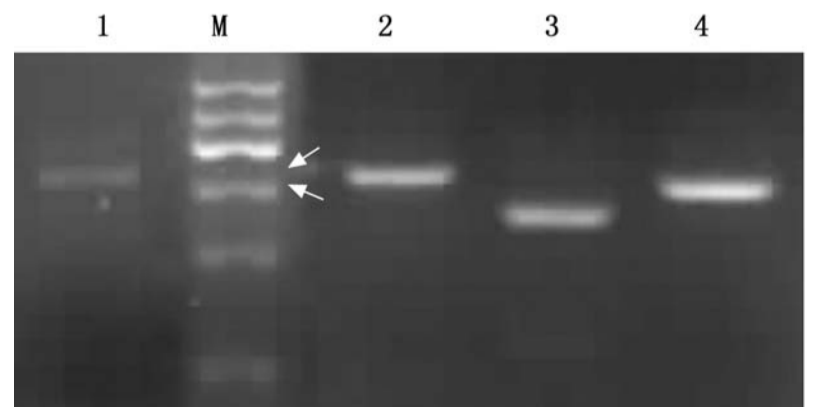
### 1.5 序列分析

将引自 NCBI 的 26 条序列以及 *wMeeriA* 和 *wMeeriB* 序列用 clustalX1.83 比对后, 输入 MEGA4.1, 采用 Kimura-2 Parameter 模型建 NJ 树 (图 2), 各分支的 bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制来评价。

## 2 结果与分析

### 2.1 *wsp* 基因的 PCR 检测

以基因组 DNA 为模板, 结合 *wsp* 基因的通用引物进行 PCR 扩增, 获得的条带较弱, 以该 PCR 产物为模板, 采用通用引物、A 大组和 B 大组特异性引物均扩增出了目的片段 (图 1)。



泳道 1 为采用通用引物以基因组 DNA 为模板进行的 PCR 扩增, 泳道 2~4 是以 PCR 产物为模板, 结合通用引物、B 大组和 A 大组特异引物进行巢式 PCR 扩增获得的 *wMeeriA*, *wMeeriB* 和 *wMeeriA* 基因片段。M 为 Marker, 箭头所指条带分别为 750、1 000 bp。

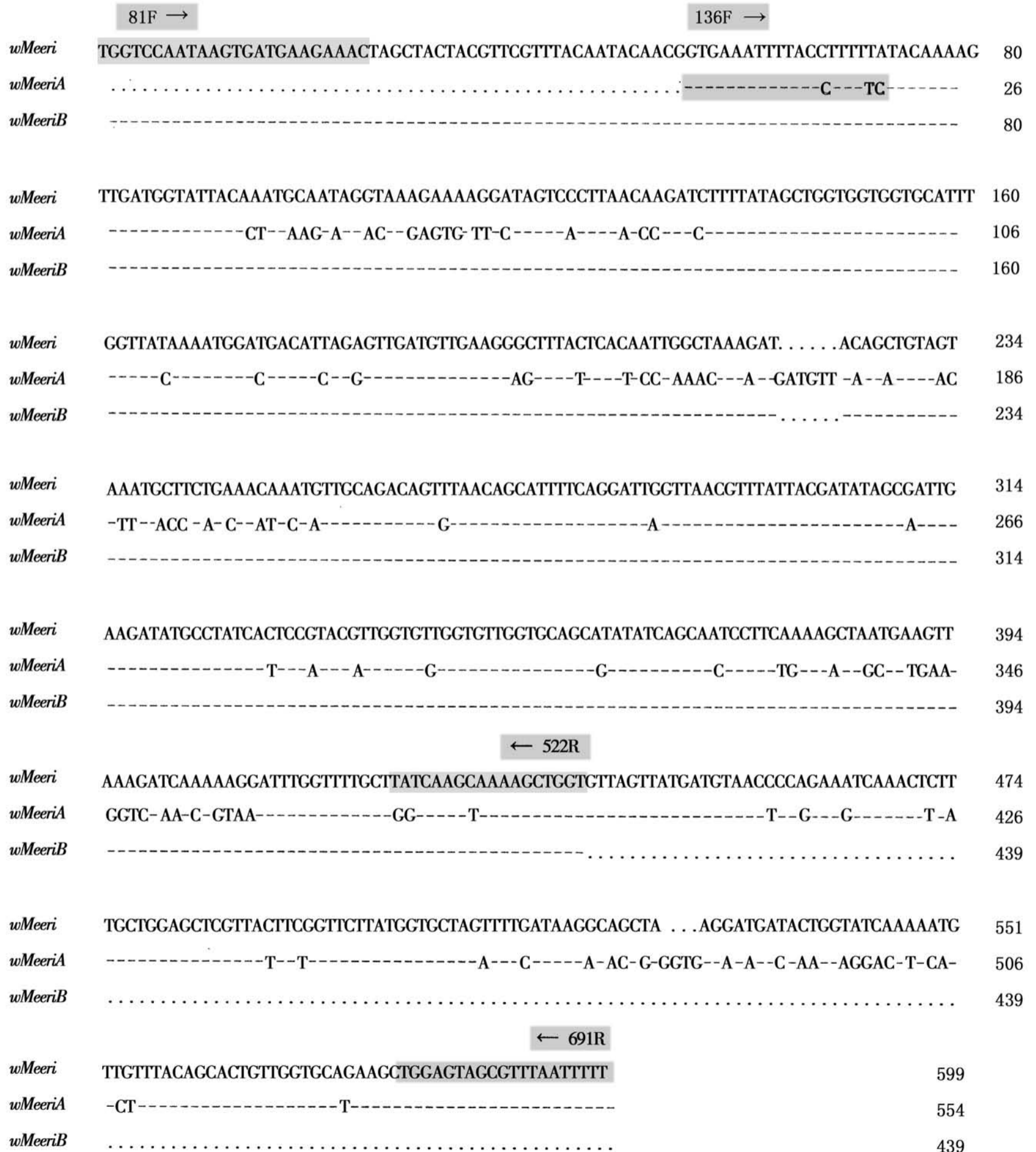
图 1 采用通用引物、A 大组和 B 大组特异引物进行 PCR 扩增获得的白蜡虫阔柄跳小蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的电泳图

白蜡虫阔柄跳小蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段长度为 599 bp, 命名为 *wMeeri*, 采用 A 大组特异性引物获得的片段为 554 bp, 命名为 *wMeeriA*, 采用 B 大组特异性引物获得的片段为 439 bp, 命名为 *wMeeriB*, 所获得的片段已经在 genbank 登录, 登录号分别为 HQ161162、HQ161163 和 HQ161164。

### 2.2 *wsp* 基因的序列分析

*wMeeri* 和 *wMeeriB* 2 条基因片段在对应位置碱

基序列完全相同, *wMeeri* 和 *wMeeriA* 2 条序列在对应位置碱基序列差异很大 (图 2), 一致性仅为 77.44%。将采用 A 大组和 B 大组特异引物获得的 *wMeeriA* 和 *wMeeriB* 序列与 GenBank 中昆虫共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列进行系统发育分析, 结果表明: *wMeeriA* 属于 A 大组, *wMeeriB* 属于 B 大组的 Con 亚组 (图 3)。表明白蜡虫阔柄跳小蜂被 A 大组和 B 大组 *Wolbachia* 复合感染。



“-”为相同碱基, “.”为缺失碱基, 阴影部分为引物名称

图 2 白蜡虫阔柄跳小蜂体内 *Wolbachia* 共生菌 *wsp* 基因序列比较

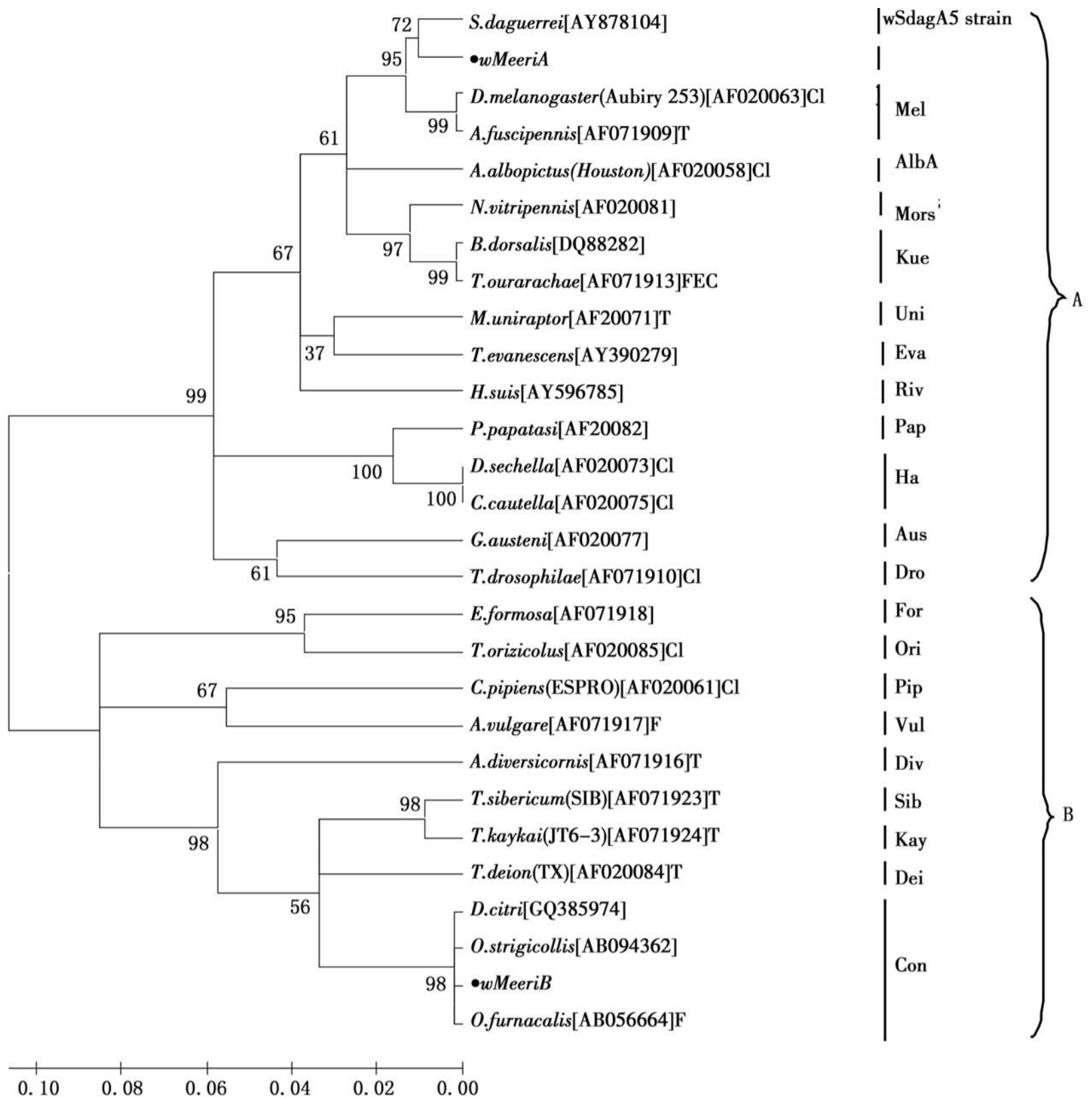


图 3 基于 *wsp* 基因序列的白蜡虫阔柄跳小蜂体内 *Wolbachia* 的系统进化树

### 3 讨论

聚类结果表明: *wMeeriA* 和 *wMeeriB* 分属于 A 大组和 B 大组 *Wolbachia*, *wMeeriB* 与 B 大组的 Con 亚组聚类在一起, 属于 Con 亚组。 *wMeeriA* 与 *wSdagA5* 品系聚类在一起, 但支持率较低 (72%), 采用多种聚类方法得到的结果相似, 无法确定 *wMeeriA* 与 *wSdagA5* 品系是否为同一亚组。虽然 *wMeeriA* *wSdagA5* 品系与 Mel 亚组聚为一个类群, 但不能确定它们是否属于 Mel 亚组。因此, *wMeeriA* 属于哪一亚组有待进一步研究。

自然界中约 16% 的昆虫感染 *Wolbachia*<sup>[15]</sup>, 本研究表明: 白蜡虫阔柄跳小蜂体内感染了 2 种 *Wol-*

*bachia*, 虽然单个寄主昆虫复合感染的来源并不清楚, 但已知 *Wolbachia* 在不同寄主之间可以水平传播<sup>[5, 16]</sup>, 白蜡虫寄生蜂之间是否存在 *Wolbachia* 的水平传播需要对白蜡虫其它寄生蜂进行 *wsp* 基因的分子检测。

*Wolbachia* 对寄主的生殖调控具有很重要的作用, 但有研究认为 *Wolbachia* 对不同种类的寄主所起的生殖调控作用可能不同, 而且 *Wolbachia* 密度不同时其作用可能也会有所不同<sup>[17-18]</sup>。采用通用引物分析只能说明寄主被一种 *Wolbachia* 感染, 而用 A 大组和 B 大组引物则可检测到寄主被 2 种 *Wolbachia* 复合感染, 这说明 2 种 *Wolbachia* 在寄主体内的丰度并不相同, 白蜡虫阔柄跳小蜂如何获得 2 种品系的

*Wolbachia*? 它们对寄主调控机制如何? 有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] Neill S L, Giordano R, Colbert A M E, *et al.* 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insect[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 1992, 89: 2699 - 2702
- [2] Juchault P, Frelon M, Bouchon D, *et al.* New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications[J]. *C R Acad Sci Paris life sciences*, 1994, 317: 225 - 230
- [3] Hertig M T. *Wolbachia pipientis* and associated inclusions of the mosquito *Culex pipiens*[J]. *Parasitology*, 1936, 28: 453 - 486
- [4] Jiggins F M, Bentley J K, Majerus M E N, *et al.* How many species are infected with *Wolbachia*? Cryptic sex ratio distorters revealed to be common by intensive sampling[J]. *Proceedings of the royal society of London, series B*, 2001, 268: 1123 - 1126
- [5] 王 欢, 李 凯, 刘 怀, 等. 两种金小蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因分子检测及序列分析[J]. *植物保护学报*, 2006, 33(9): 235 - 240
- [6] 国 伟, 沈佐锐. 棉蚜体内雄染沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的分子检测[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(2): 1 - 3
- [7] Louis C, Nigro L. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* Rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility[J]. *Invertebrate pathology*, 1989, 54: 39 - 44
- [8] Louis C, Pinturesu B, Chapelle L. Research on the origin of unisexuality: themotherapy cures both rickettsia and thelytokous parthenogenesis in a *Trichogramma* species[J]. *C R Acad Sci III Sci Vie*, 1993, 316: 27 - 33
- [9] Braig H R, Zhou W, Dobson S L, *et al.* Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*[J]. *Journal of bacteriology*, 1998, 180(9): 2373 - 2378
- [10] hou W G, Rousset F, O'Neill S L. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences[J]. *Proceedings of the royal society of London, series B*, 1998, 265: 509 - 515
- [11] Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species[J]. *Insect molecular biology*, 2000, 9(4): 393 - 405
- [12] Fukatsu T, Kondo N, Ljichi N, *et al.* Discovery of symbiont-host horizontal genome transfer: a beetle carrying two bacterial and one chromosomal *Wolbachia* endosymbionts[M]. In: *Insect symbiosis*, Bourtzis K, Miller TA. New York: CRC press, 2003: 305 - 324
- [13] 焦 懿, 赵 苹. 白蜡虫阔柄跳小蜂生物学特性的研究[J]. *昆虫学报*, 1999, 42(2): 166 - 171
- [14] 田英芳, 黄 刚, 郑哲民, 等. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法[J]. *陕西师范大学学报: 自然科学版*, 1999, 27(4): 82 - 84
- [15] 宋 月, 沈佐锐, 王 哲, 等. *Wolbachia* 在玉米螟赤眼蜂内的三重感染[J]. *昆虫学报*, 2009, 52(4): 445 - 452
- [16] Duron O, Wilkes T E, Hurst G D D. Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale[J]. *Ecology letters*, 2010, 13(9): 1139 - 1148
- [17] 宋 月, 王 哲, 刘宏岳, 等. 北京地区亚洲玉米螟种群中超感染[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(6): 665 - 670
- [18] Kageyama D, Narita S, Imamura T, *et al.* Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pests and their parasitoids[J]. *Journal of stored products research*, 2010(46): 13 - 19