

文章编号:1001-1498(2012)06-0780-04

## 白蜡虫肠道微生物分析及立克次氏体分子检测

徐冬丽, 刘魏魏, 胡艳红, 杨 璞, 陈晓鸣\*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

关键词: 白蜡虫; 16S rDNA; 肠道微生物; 立克次氏体

中图分类号: S899.1

文献标识码: A

### Analysis of the Gut Microbes of the Chinese White Wax Scale *Ericerus pela* and Molecular Detection of *Rickettsia*

XU Dong-li, LIU Wei-wei, HU Yan-hong, YANG Pu, CHEN Xiao-ming

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Key laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** To understand the diversity of the gut microbes of Chinese white wax scale *Ericerus pela*, 16S rDNA clone library was constructed to analyze the gut microbes of the female *E. pela* adults. The results showed that, the gut of *E. pela* contained abundant of *Rickettsia*. Gut microbes *Arsenophonus* and *Variovorax* were also been identified. And *Rickettsia* was the main bacteria in gut of *E. pela*. The phylogenetic analysis of the 16S rDNA showed that, the *Rickettsia* from *E. pela* has close relationship with that of pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. PCR amplification was performed using the specific primers for *Rickettsia* to detect infection in 30 male and 30 female individuals. The result showed that, the infected male and female were 24 and 12 respectively.

**Key words:** *Ericerus pela*; 16S rDNA; Gut microbes; *Rickettsia*

肠道微生物对于昆虫的生长和发育起着重要作用, 不仅参与维生素合成、脂肪和碳水化合物的吸收与利用、孤雌生殖、信息素的合成, 同时在抵御外来菌的侵入与定植以及在加强免疫系统的功能中也起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。对于刺吸式昆虫来说, 由于植物枝干韧皮部汁液营养成分不均衡, 碳水化合物含量丰富而必需氨基酸组分欠缺或含量较低<sup>[3]</sup>, 这些昆虫体内的共生细菌能提供寄主昆虫所缺乏的必需氨基酸<sup>[4-5]</sup>。因此, 研究昆虫肠道微生物群落对于了解刺吸式昆虫的生殖和发育以及环境适应性具有重要意义。

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavannes) 是我国一种具

有重要经济价值的资源昆虫, 从 85°08'~121°23'E, 18°~42°N, 海拔 5~3 000 m 左右的广大地区均有分布, 环境适应能力很强。该虫以雌成虫越冬, 且雌虫生活周期长, 肠道微生物对其生命活动具有重要影响<sup>[6]</sup>。由于白蜡虫以往的研究多集中在生活史等方面, 对其肠道微生物的研究较少, 因此, 本实验采用 16S rDNA 文库的方法对雌成虫肠道微生物进行了分析和鉴定, 并对含量最高的立克次氏体进行分子检测, 为揭示白蜡虫肠道微生物的作用、进一步探讨其主要微生物对白蜡虫生命活动的影响奠定基础。

收稿日期: 2012-07-15

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目(201204602); “十二五”国家科技计划课题(2011BAD33B02); 中国林科院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(ririca201004M); 国家自然科学基金项目(30771736) 资助

作者简介: 徐冬丽(1986—), 硕士研究生, 从事资源昆虫分子生物学研究, E-mail: dollyxu2010@163.com.

\* 通讯作者: E-mail: cxfcxm@tom.com.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

所用白蜡虫雌虫和雄虫均采自资源昆虫研究所人工大棚内女贞树上。

### 1.2 肠道微生物基因组 DNA 提取

在解剖镜下用显微镊取出白蜡虫雌成虫的消化道,在磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)中洗涤3次,每次2 min。按照 DNeasy Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒(Qiagen, 美国)操作提取肠道微生物基因组 DNA。

### 1.3 16S rDNA 文库构建

16S rDNA 基因片段的扩增选取广泛应用的一对引物 27F(5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R(5' - TACGGYTACCTTGTACGACTT - 3'),反应体系如下:Taq PCR MasterMix(天根,北京) 25  $\mu$ L,上下游引物(20  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 3  $\mu$ L,DNA 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C, 4 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 31 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

### 1.4 文库测序和序列分析

对获得的文库随机挑选 200 个单克隆,采用 M13 通用引物进行阳性重组克隆检测,并对阳性克隆的 PCR 产物采用 AfaI 酶和 HindII 酶进行双酶切,酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,挑选带型不同的产物对应的克隆送交南京金思瑞公司测序。

测序结果用 VecScreen 在线软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)去除载体序列,获得的基因序列在 NCBI(The National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)采用 BLASTN 进行比对分析,E 值 < e - 6 的序列认为比对相似性较高。

### 1.5 系统发育分析

将引自 NCBI 的 9 条 Rickettsia 的 16S rDNA 基因序列和白蜡虫肠道共生菌 Rickettsia 的 16S rDNA 基因序列用 ClustalX 1.83 软件进行多重比对,比对结果导入 MEGA5.0 建树软件,并用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树,各分支的 bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制来评价。

### 1.6 立克次氏体的分子检测

在人工气候室内随机采集白蜡虫雌虫和雄虫各 30 头,用酒精漂洗干净,分别单头提取基因组 DNA,方法同 1.2。

采用立克次氏体特异引物 Rb - F(5' - GCT-CAGAACGAACGCTATC - 3') 和 Rb - R(5' - GAAG-GAAAGCATCTCTGC - 3') 进行分子检测<sup>[7]</sup>,反应体系同前,PCR 反应程序为:94  $^{\circ}$ C, 4 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 50  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 60 s; 31 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 文库测序分析

双酶切后共挑选出 21 个带型不同的克隆(部分结果见图 1),测序结果表明:其中 13 个为立克次氏体属(Rickettsia),6 个为杀雄菌属(Arsenophonus),1 个为贪食菌属(Variovorax);此外,还有 1 个克隆的插入序列和松树属(Pinus)叶绿体基因组片段序列相似。

比对结果显示:这 13 条立克次氏体共生菌序列与半翅目中豌豆蚜(Acyrtosiphon pisum(Harris))体内的立克次氏体最为接近,相似性高达 99%。对白蜡虫立克次氏体 16S rDNA 基因序列分析发现:GC 含量 50.79%,所获得的白蜡虫立克次氏体和贪食菌属的 16S rDNA 基因序列已递交至 NCBI,登录号分别是 JQ063118 和 JX461233。

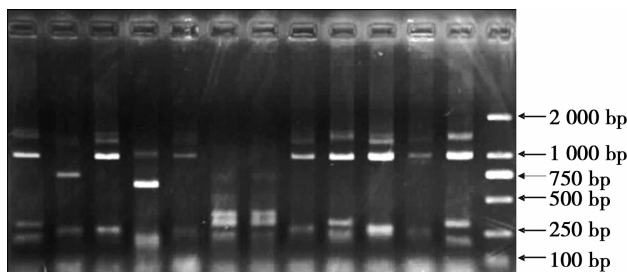


图 1 对文库中 200 个单克隆进行 AfaI 酶和 HindII 酶切后的部分电泳图谱(M 为 maker)

### 2.2 系统发育分析

系统发育分析表明:白蜡虫肠道共生菌(Rickettsia)与半翅目中豌豆蚜体内的立克次氏体最为接近,聚为一支,同时与半翅目中的烟粉虱(Bemisia tabaci)和长蝽(Nysius sp.)以及蒙栎象(Curculio sikkimensis)比较接近,而与鞘翅目中的龟纹瓢虫(Propylea japonica)啮齿目中的嗜卷书虱(Liposcelis bostrychophila)以及蛛形纲中的长角血蜱(Haemaphysalis longicornis)和安氏革蜱(Dermacentor dandersonii)体内的立克次氏体较远,距双翅目中的大蚊(Limonia chorea)体内共生菌立克次氏体最远(图 2)。

### 2.3 立克次氏体的分子检测

30头白蜡虫雌成虫中有12头检测到了体内含有立克次氏体(图3),30头雄成虫中有24头含有立

克次氏体(图4),数量远高于感染立克次氏体的雌虫。

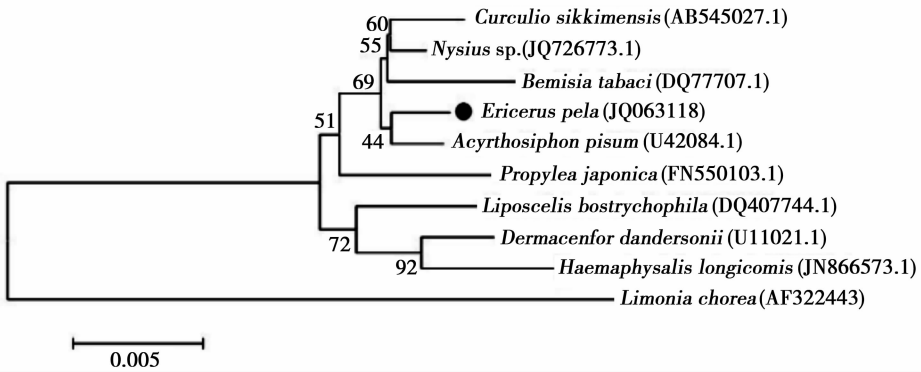


图2 基于立克次氏体属 16S rDNA 基因序列构建的系统树(·为白蜡虫体内的立克次氏体)



图3 30头白蜡虫雌成虫立克次氏体含量检测结果(M为maker,条带大小从上到下依次是: 2 000、1 000、750、500、250、100 bp;CK为阴性对照)

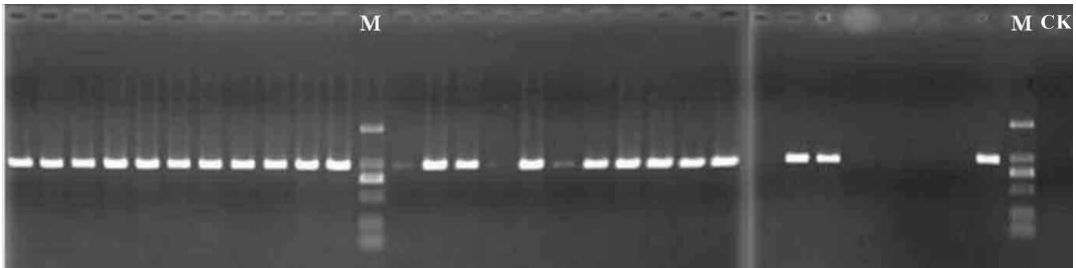


图4 30头泌蜡期的白蜡虫雄虫体内立克次氏体含量检测结果(M为maker,条带大小从上到下依次是: 2 000、1 000、750、500、250、100 bp;CK为阴性对照)

### 3 结论与讨论

本实验构建的 16S rDNA 文库共挑选 21 个带型不同的克隆,测序发现主要是立克次氏体属以及杀雄菌属和贪食菌属共生菌。另外,还有 1 个片段和松树属叶绿体基因组片段序列相似,可能是由于白蜡虫肠道中含有所取食的寄主植物汁液。研究表明,昆虫肠道微生物的多样性与昆虫在某一阶段的取食习惯相关,特别是刺吸式口器的昆虫由于取食相对单一,相对来说肠道微生物的多样性较小<sup>[8-10]</sup>。另外,常驻菌群和宿主之间的关系也会影

响到昆虫肠道微生物的多样性<sup>[11]</sup>。本研究获得的微生物种类较少,可能是白蜡虫雌成虫定杆后仅仅以取食寄主植物汁液为食有关,可能也与本实验的测序量有限有关。

本研究检测到的贪食菌属是一种普遍存在的好氧型革兰氏阴性细菌,具有硝基酪氨酸同化和酰基高丝氨酸内酯矿化等作用<sup>[12-13]</sup>,该菌的存在可能为白蜡虫的生长和繁衍提供部分必须的营养成分。杀雄菌属共生菌可以与多种昆虫共生,并选择性的杀死雄性个体<sup>[14-18]</sup>,但作者在另一研究中表明,杀雄菌属共生菌的含量与白蜡虫后代的性比并不

相关<sup>[19]</sup>。

立克次氏体属存在于多种昆虫体内,并对寄主的生殖方式有可能产生影响<sup>[20]</sup>。本研究对于立克次氏体的分子检测表明,30头雌成虫中12头被感染,30头雄虫中24头被感染,雄虫感染立克次氏体的数量远高于雌虫,立克次氏体属对于白蜡虫的感染率并不是100%。另外,本实验并未对白蜡虫其它虫态进行检测,也没有进行 *Rickettsia* 的定量分析,该共生菌在白蜡虫不同虫态中也可能存在变化。立克次氏体属对于白蜡虫的作用需要更多的研究。

对于白蜡虫立克次氏体 16S rDNA 的基因序列分析表明,GC 含量是 50.79%,根据初生内共生菌 16S rDNA 一般 GC 含量较低为 47% 左右,而次生内共生菌则富含 GC,为 53.4%<sup>[21]</sup>,结合立克次氏体的分子检测结果认为,立克次氏体是白蜡虫雌成虫和雄虫肠道的主要共生菌,但不是初生内共生菌。

系统发育分析表明,白蜡虫肠道共生菌立克次氏体与半翅目中豌豆蚜体内的立克次氏体聚为一支,与半翅目中的粉虱科、蚜科以及鞘翅目中的象甲科和瓢虫科比较接近,而与蛛形纲中的寄螨目和昆虫纲中的啮虫目双翅目体内的立克次氏体较远,这与分类学上白蜡虫与豌豆蚜的亲缘关系较近相一致。结合白蜡虫的生活习性,作者认为立克次氏体在白蜡虫中是垂直传播的。

## 参考文献:

- [1] Broderick N A, Raffa K F, Goodman R M, *et al.* Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004,70(1): 293–300
- [2] 相辉,黄勇平. 肠道微生物与昆虫的共生关系[J]. *昆虫学报*, 2008,45(5): 687–693
- [3] Sandstrom J, Moran N. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 1999,91(1): 203–210
- [4] Douglas A. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006,57(4): 747–754
- [5] Moran N A, Plague G R, Sandstrom J P, *et al.* A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003,100(2): 14543–14548
- [6] 陈晓鸣. 白蜡虫自然种群生态学[M]. 北京:科学出版社, 2011:1–25
- [7] Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, *et al.* Identification and Localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006,72(5): 3646–3652
- [8] Xiang H, Xie L, Zhang J, *et al.* Intracolonic differences in gut bacterial community between worker and soldier castes of *Coptotermes formosanus*[J]. *Insect Science*, 2011,19(1): 86–95
- [9] Mrázek J, Strosová L, Fliegerová K, *et al.* Diversity of insect intestinal microflora[J]. *Folia Microbiologica*, 2008,53(3): 229–233
- [10] 刘莉,王中康,俞和韦,等. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析[J]. *微生物学报*, 2008,48(5): 616–622
- [11] Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2008,54(9): 1377–1383
- [12] Nishino S F, Spain J C. Biodegradation of 3-nitrotyrosine by *Burkholderia* sp. strain JS165 and *Variovorax paradoxus* JS171[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006,72(2): 1040–1044
- [13] Leadbetter J R, Greenberg E P. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000,182(24): 6921–6926
- [14] Mouton L, Thierry M, Henri H, *et al.* Evidence of diversity and recombination in *Arsenophonus* symbionts of the *Bemisia tabaci* species complex[J]. *Microbiology*, 2012,12(Suppl 1): 10
- [15] Gherna R L, Werren J H, Weisburg W, *et al.* NOTES: *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*[J]. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 1991,41(4): 563–565
- [16] Skinner S W. Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting sex ratio in the parasitoid wasp, *Nasonia* (= *Mormoniella*) *vitripennis*[J]. *Genetics*, 1985,109(4): 745–759
- [17] Hypsa V, Dale C. In vitro culture and phylogenetic analysis of “Candidatus *Arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1997,47(4): 1140–1144
- [18] Dale C, Beeton M, Harbison C, *et al.* Isolation, pure culture, and characterization of “Candidatus *Arsenophonus arthropodicus*,” an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscoid louse fly *Pseudolynchia canariensis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006,72(4):2997–3004
- [19] 刘魏魏,杨璞,阮永明,等. 白蜡虫体内杀雄菌属 (*Arsenophonus*) 共生菌的分子检测[J]. *微生物学报*, 2012,52(8): 1002–1010
- [20] Perotti M A, Clarke H K, Turner B D, *et al.* *Rickettsia* as obligate and mycetomic bacteria[J]. *The FASEB Journal*, 2006,20(13): 2372–2374
- [21] 谭周进,谢丙炎,周清明,等. 烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的特性研究[J]. *微生物通报*, 2007,34(3): 487–491