

文章编号:1001-1498(2011)03-0340-05

# 一种新的白蜡虫寄生蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因 分子检测及序列分析\*

杨 璞<sup>1</sup>, 朱家颖<sup>2</sup>, 谢正华<sup>1</sup>, 李 萌<sup>1</sup>, 陈晓鸣<sup>1\*\*</sup>, 陈晓庆<sup>2</sup>

(1. 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;  
2. 西南林业大学保护生物学院, 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:**采用 *Wolbachia* 的通用引物、A 大组和 B 大组的特异性引物对一种新的白蜡虫寄生蜂——长尾啮小蜂 (*Aprostocetus* sp.) 体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行分子检测, 所获得的基因片段分别命名为 *wApr*、*wAprA* 和 *wAprB*, 长度分别为 620、566 和 463 bp; 基因序列分析表明: *wAprA*、*wAprB* 与 *wApr* 在对应位置序列仅有 4 个碱基的差异。系统发育分析表明: 该寄生蜂仅感染了 B 大组 Dig 亚组的 *Wolbachia*。 *wApr* 和 *wAprB* 基因序列已经递交到 NCBI, 登录号分别是 HQ121415 和 HQ121417。

**关键词:**白蜡虫; 长尾啮小蜂; *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 a New Species of *Ericerus pela* Parasitic Wasps

YANG Pu<sup>1</sup>, ZHU Jia-ying<sup>2</sup>, XIE Zheng-hua<sup>1</sup>, LI Meng<sup>1</sup>, CHEN Xiao-ming<sup>1</sup>, CHEN Xiao-qing<sup>2</sup>

(1. Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry; The Key laboratory of Cultivating and Utilization of Resources Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Faculty of Conservation Biology, Southwest Forestry University; Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** PCR amplification was employed to detect the infection of *Wolbachia* on *Aprostocetus* sp., a new species of parasitic wasps on *Ericerus pela*, by using the universal primers and specific primers for *wsp* gene of A and B supergroup. The sequences obtained, were named as *wApr*, *wAprA* and *wAprB*, which sizes were 620, 566 and 463 bp respectively. Sequence analysis found that 4 variable basepairs occurred among the sequences. The phylogenetic analysis of *wsp* gene showed that *Wolbachia* in *Aprostocetus* sp. were classified as Dig group of *B-Wolbachia*. The sequences of *wApr* and *wAprB* were submitted to GenBank and the accession numbers assigned were HQ121415 and HQ121417.

**Key words:** *Ericerus pela*; *Aprostocetus* sp.; *Wolbachia*; *wsp*

*Wolbachia* 属于细菌门变形菌纲的  $\alpha$  亚纲, 立克次氏体目, 立克次氏体科, *Wolbachia* 属, 是广泛存在于节肢动物体内的一类共生微生物, 可引起宿主胞质不亲和、诱导孤雌生殖、雌性化及雄性致死<sup>[1-4]</sup>。

*Wolbachia* 在昆虫种群中的分布十分广泛, 据统计, *Wolbachia* 在昆虫纲的鞘翅目、双翅目、半翅目、同翅目、膜翅目、鳞翅目、直翅目中都有广泛分布<sup>[5-7]</sup>。Tagami 等<sup>[5]</sup>对日本鳞翅目中 9 个科和 49 个种的昆

收稿日期: 2010-11-25

基金项目: 国家自然科学基金委青年基金(31000983); 云南省应用基础研究基金(2010ZC235) 和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) 资助

作者简介: 杨 璞(1919—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事白蜡虫分子生物学研究. E-mail: zjuyangpu@yahoo.cn

\* 浙江大学昆虫科学研究所的吴琼博士帮助鉴定白蜡虫寄生蜂的种类, 在此表示感谢!

\*\* 通讯作者: 研究员, 博士生导师, 主要从事资源昆虫学研究. E-mail: cafexm@tom.com

虫进行了调查,结果表明:77.8%的科和44.9%的种都感染了 *Wolbachia*<sup>[8]</sup>。到目前为止,已有许多报道证实,在多种昆虫的自然种群中存在着 *Wolbachia* 的超感染现象<sup>[9-10]</sup>。目前,检测昆虫体内是否感染 *Wolbachia* 主要依赖于对其 *wsp* 基因进行 PCR 检测与序列分析<sup>[11-15]</sup>,而且在 GenBank 中登录的 *wsp* 基因越来越多,为 *Wolbachia* 的研究提供了大量的资料,随着对 *Wolbachia* 的不断研究,又有新的亚组被发现<sup>[16]</sup>。

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<sup>[17]</sup>,长尾啮小蜂属的 *Aprostocetus* sp. 为首次发现在白蜡虫上寄生,对该寄生蜂的生物学特性研究较少,关于该寄生蜂 *Wolbachia* 的 PCR 检测还未见报道。对该寄生蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行序列分析,对于了解 *Wolbachia* 在白蜡虫寄生蜂内的感染和传播以及进一步研究 *Wolbachia* 白蜡虫寄生蜂生殖方式的影响具有重要意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

所用白蜡虫长尾啮小蜂采自昆明资源昆虫研究所人工大棚内白蜡虫上,于 -20 °C 冻存。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用改良的蛋白酶 K 法<sup>[18]</sup>。取 5 头寄生蜂用蒸馏水漂洗干净,研碎,加入 500  $\mu$ L 裂解液(100 mmol Tris-HCl, 25 mmol EDTA, 500 mmol NaCl, 1% SDS, pH 值 8.0),加蛋白酶 K 至终浓度为 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 50 °C 水浴 4 h,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 2 倍体积无水乙醇, -20 °C 静置 1 h, 14 000 g 离心 10 min,沉淀用 75% 乙醇洗涤 2 次,充分干燥后加入适量 0.5  $\times$  TE 溶解沉淀, 4 °C 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

参照 Zhou 等<sup>[15]</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  $\mu$ L 体系:ddH<sub>2</sub>O 为 31.5  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer 为 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> primer F 为 1.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> primer R 为 1.5  $\mu$ L, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 为 4  $\mu$ L, 5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq polymerase 为 0.5  $\mu$ L, 25 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 为 4  $\mu$ L, DNA 为 2  $\mu$ L。PCR 程序为:94 °C, 4 min; 94 °C, 1 min; 48 °C, 1 min; 72 °C, 1 min; 32 个循环; 72 °C, 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下检测拍照。

### 1.4 克隆和测序

紫外灯下切下相应条带,按照 Axygen 凝胶回收试剂盒操作,最后加入 25  $\mu$ L 加热的 ddH<sub>2</sub>O 洗脱,取 4  $\mu$ L 纯化产物与 1  $\mu$ L T 载体混匀,加入 5  $\mu$ L solution I 混匀(按照 Takara 的 pMD19-T 载体连接试剂盒操作), 4 °C 过夜连接, 42 °C 水浴热激 90 s 转化大肠杆菌 DH5- $\alpha$  感受态细胞,涂平板后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。

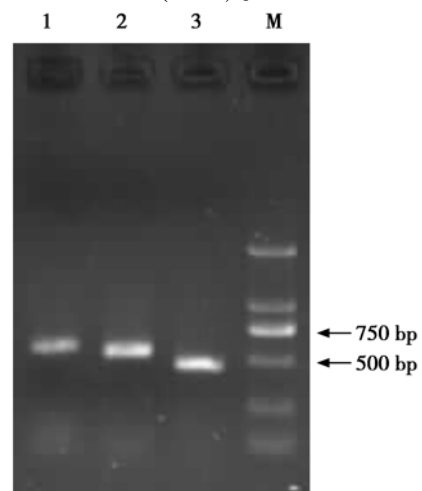
### 1.5 序列分析

将引自 NCBI 的 19 条序列以及 *wApr*、*wAprA*、*wAprB* 基因序列用 clustalx 1.83 比对后,输入 MEGA4.1,采用 Kimura-2 Parameter 模型建 NJ 树,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

以白蜡虫长尾啮小蜂基因组 DNA 为模板,结合通用引物、A 大组特异性引物和 B 大组特异性引物均扩增出了目的片段(图 1)。



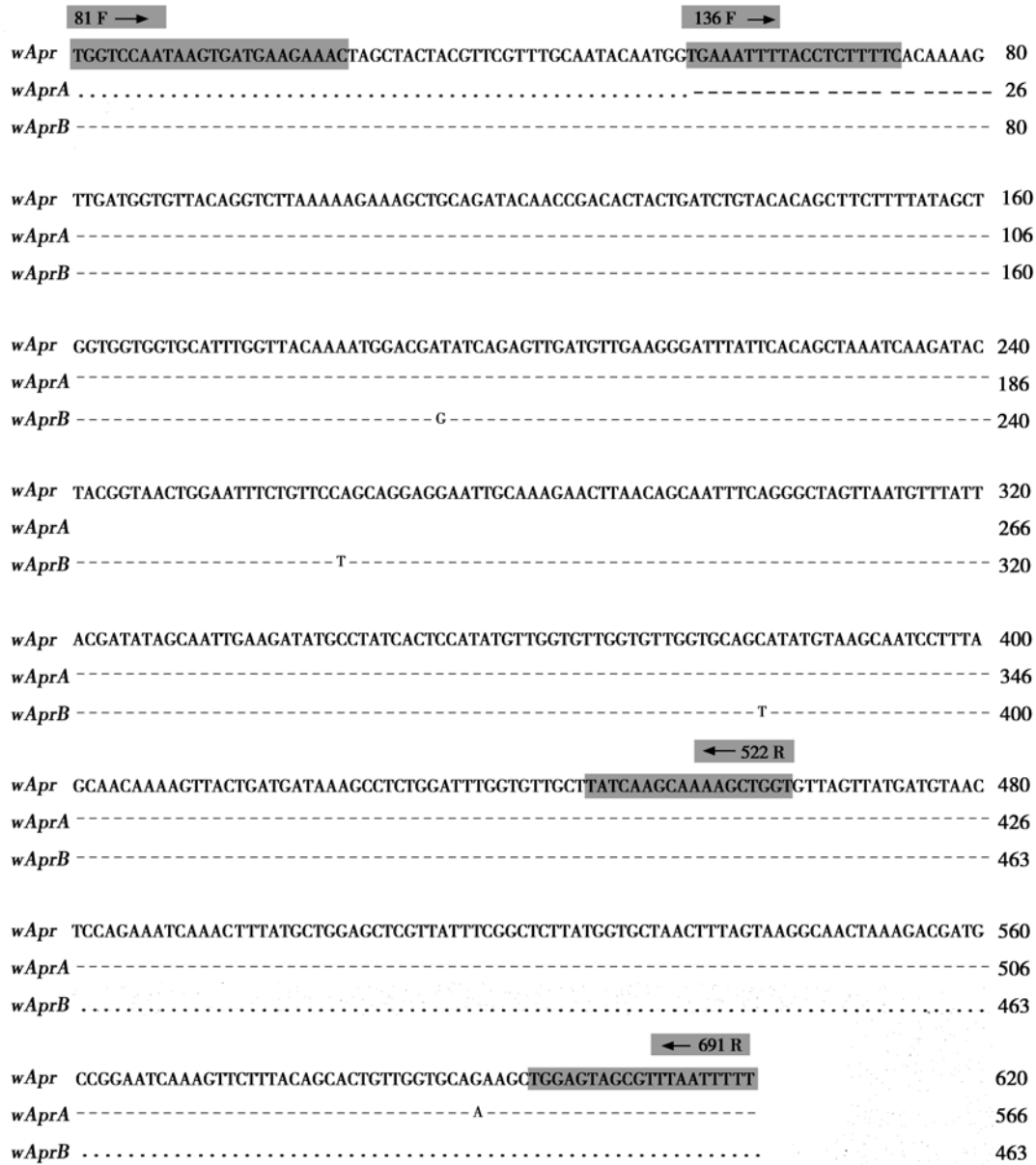
泳道 1~3 为采用通用引物、A 大组和 B 大组特异引物以长尾啮小蜂基因组 DNA 为模板进行的 PCR 扩增, M 为 Marker

图 1 采用通用引物、A 大组和 B 大组特异引物对白蜡虫长尾啮小蜂进行 PCR 扩增获得的电泳图

### 2.2 wsp 基因的序列分析

长尾嗜小蜂基因组 DNA 结合通用引物扩增获得的基因片段命名为 *wApr*, 长度为 620 bp, 采用 A 大组引物扩增获得的基因片段长度为 566 bp, 命名为 *wAprA*, 与 *wApr* 在对应位置仅有 1 个碱基存在差

异(图 2), 采用 B 大组引物获得的基因片段长度为 463 bp, 命名为 *wAprB*, 与 *wApr* 在对应位置仅有 3 个碱基存在差异, 3 条序列间总共只有 4 个碱基存在差异(图 2)。



“-”为相同碱基,“.”为缺失碱基,阴影部分所示为引物序列和引物名称。

图 2 白蜡虫长尾嗜小蜂体内 *Wolbachia* 共生菌 *wsp* 基因序列比较

在 NCBI 进行 BLAT 发现, *wApr*、*wAprA* 和 *wAprB* 与 B 大组 Dig 亚组序列(登录号为 EF564624 和 DQ487096)的一致性很高,因此采用 A 大组引物获得的片段并非来自 A 大组 *Wolbachia*。系统发育分

析表明:该寄生蜂感染的 *Wolbachia* 均属于 B 大组的 Dig 亚组(图 3)。所获得的序列已经递交到 NCBI, 登录号为 HQ121415 和 HQ121417。

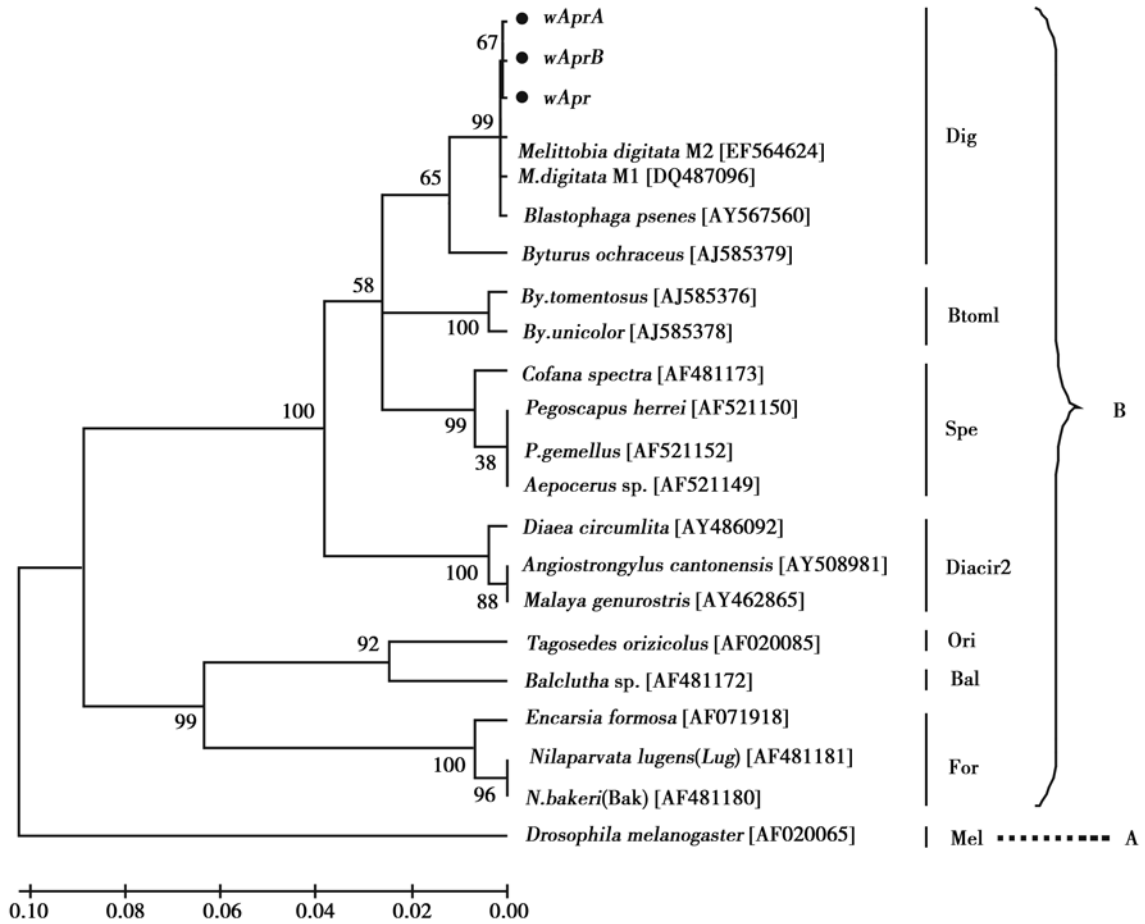


图 3 基于 *wsp* 基因序列的白蜡虫长尾啮小蜂体内 *Wolbachia* 的系统进化树

### 3 讨论

自然界的昆虫中感染 *Wolbachia* 的情况非常普遍,存在复合感染<sup>[19]</sup>和三重感染<sup>[20]</sup>,但检测结果和所用的引物有一定关系,若采用通用引物检测,只能说明该昆虫被某一个大组的 *Wolbachia* 感染,其主要原因就是昆虫体内的 A 大组 *Wolbachia* 和 B 大组 *Wolbachia* 丰度不同。因此,在判断昆虫是否被不同大组 *Wolbachia* 复合感染时,应选择多对引物进行检测。本研究采用了 A 大组和 B 大组的特异引物进行检测,虽然获得了相应的片段,但是序列分析表明,长尾啮小蜂 *wApr* 序列中含有 A 大组扩增的上下游引物 136F/691R,该小蜂体内如果 A 大组 *Wolbachia* 含量较低可能也难以检测。对于采用 A 大组引物获得的长尾啮小蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段,挑选了多个单克隆进行测序,结果均相同,同时对于通用引物、A 大组和 B 大组引物获得的该寄生蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行系统聚类分析发现,它们均属于 B 大组的 Dig 亚组,与采用其它聚类方法得到

的结果相同。因此,采用 A 大组引物获得的基因片段并非来自 A 大组 *Wolbachia*,该寄生蜂只被 B 大组 *Wolbachia* 感染。

*Wolbachia* 水平传播在寄生蜂中已有文献报道<sup>[21]</sup>。本研究发现长尾啮小蜂感染的 *Wolbachia* 与白蜡虫阔柄跳小蜂 *Metaphycus ericeri* Xu et Jiang 感染的 *Wolbachia* 属于不同亚组,其 *wsp* 基因序列差异较大,不存在 *Wolbachia* 在这 2 种寄生蜂之间水平传播。

*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>[12,22]</sup>;因此, *Wolbachia* 对于长尾啮小蜂的生殖调控机制如何,有待进一步探讨。

#### 参考文献:

[1] Vavre F, Fleury F, Varaldi J, et al. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid in-

- sects: epidemiologic and evolutionary consequences[J]. *Evolution*, 2000, 54(1): 191–200
- [2] 施婉君, 程家安, 祝增荣, 等. 昆虫共生细菌 *Wolbachia* 的研究进展[J]. *生态学报*, 2002, 22(3): 409–419
- [3] Huigens M E, De Almeida R P, Boons P A H, *et al.* Natural inter-specific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps[J]. *Proceedings of the Royal Society of London: Series B*, 2004, 271(1538): 509–515
- [4] 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
- [5] 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, Biological Sciences*, 2001, 268(1472): 1123–1126
- [6] 国伟, 沈佐锐. 棉蚜体内感染沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的分子检测[J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(2): 1–3
- [7] 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
- [8] Tagami Y, Miura K. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera[J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13(4): 359–364
- [9] Covacin C, Barker S C. Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta: Phthiraptera) [J]. *Parasitology Research*, 2007, 100(3): 479–485
- [10] Kondo N, Ijichi N, Shimada M, *et al.* Prevailing triple infection with *Wolbachia* in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) [J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2): 167–180
- [11] Zhou 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(1395): 509–515
- [12] 郭晓鹏, 李正西. 我国烟粉虱自然种群中存在广泛的 *Wolbachia* 感染现象[J]. *微生物学报*, 2008, 48(1): 63–67
- [13] 林煌真, 李正西. 福建省烟粉虱自然种群 *Wolbachia* 感染特点[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(1): 14–19
- [14] 宋月, 王哲, 刘宏岳, 等. 北京地区亚洲玉米螟种群中 *Wolbachia* 超感染[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(6): 665–670
- [15] 江幸福, 王蕾, 张蕾, 等. 蔬菜蚜虫感染沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的分子检测[J]. *植物保护*, 2009, 35(4): 63–65
- [16] Copeland C S, Matthews R W, González J M, *et al.* *Wolbachia* in two populations of *Melittobia digitata* Dahms (Hymenoptera: Eulophidae) [J]. *Neotropical Entomology*, 2008, 37(6): 633–640
- [17] 焦懿, 赵苹. 白蜡虫啮小蜂对白蜡虫花翅跳小蜂种群控制作用的研究[J]. *动物学研究*, 2000, 21(4): 291–296
- [18] 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
- [19] Cook J M, Butcher R D J. The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids[J]. *Researches on Population Ecology*, 1999, 41(1): 15–28
- [20] 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
- [21] Werren J H, Windsor D, Guo L R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods[J]. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 1995, 262(1364): 197–204
- [22] 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(1): 13–19