

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1728.033

网络出版时间:2012-02-23 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1728.033.html>

美洲棘蓟马体内共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因 分子检测及系统发育分析

董 菁, 李晓维, 张晓晨, 冯纪年

(西北农林科技大学 植物保护资源与害虫防治教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对美洲棘蓟马体内共生菌 *Wolbachia* 进行分子生物学鉴定, 确定该蓟马体内 *Wolbachia* 的进化位置, 为进一步探讨 *Wolbachia* 对其生殖作用的调控机制提供理论依据。**【方法】**以 *wsp* 基因为目的基因, 对美洲棘蓟马体内的共生菌 *Wolbachia* 进行特异性扩增和测序, 使用 Clustal X 1.83 软件对所得 DNA 序列进行比对; 在 MEGA 4.0 软件中采用邻接法对 *Wolbachia* 的系统发育关系进行分析。**【结果】**利用 *wsp* 基因的特异性引物从美洲棘蓟马体内扩增出了 632 bp 的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段(GenBank 登录号为 JN315668), 580 bp 的 *Wolbachia* A 群的 *wsp* 基因片段和 405 bp 的 Mel 亚群的 *wsp* 基因片段。系统发育分析结果表明, 美洲棘蓟马体内的 *Wolbachia* 与黑腹果蝇亲缘关系较近。**【结论】**美洲棘蓟马体内感染的 *Wolbachia* 属于 A 群 Mel 亚群。

【关键词】 美洲棘蓟马; *Wolbachia*; *wsp*; 序列分析; 系统发育

【中图分类号】 S436.634.2⁺2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)03-0131-04

Sequencing and phylogenetic analysis of the *wsp* gene of *Wolbachia* in *Echinothrips americanus* Morgan

DONG Jing, LI Xiao-wei, ZHANG Xiao-chen, FENG Ji-nian

(Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study is to identify the presence of *Wolbachia* in *Echinothrips americanus* Morgan, 1913 (Thysanoptera: Thripidae) based on the amplification and sequencing of the *wsp* gene and definite the phylogenetic relationship of *Wolbachia* in this host. The result of this study will provide theoretic basis for the function of *Wolbachia* on manipulation of the reproductive biology in *E. americanus*. **【Method】** In this study, the phylogenetic relationships of *Wolbachia* were analyzed by using *wsp* sequences. All *wsp* sequences were aligned using the ClustalX 1.83 program. Phylogenetic tree was constructed with neighbor joining implementation. **【Result】** Using the specific primers, 632 bp region of *Wolbachia wsp* gene(GenBank accession number is JN315668), 580 bp region of *Wolbachia* group A *wsp* gene and 405 bp region of *Wolbachia* Mel subgroup *wsp* gene were sequenced from this host population. **【Conclusion】** The *E. americanus* was infected with endosymbiont *Wolbachia*. The topology of the phylogenetic tree showed that the *Wolbachia* in *E. americanus* belonged to group A.

Key words: *Echinothrips americanus*; *Wolbachia*; *wsp*; sequence analysis; molecular phylogeny

Wolbachia 是一种以昆虫、螨类等节肢动物及 线虫为宿主的细胞质共生细菌, 属于变形杆菌(Pro-

* [收稿日期] 2011-09-27

[基金项目] 高等学校博士点专项科研基金项目(20090204110003); 科技部基础性工作专项(2006FY120100)

[作者简介] 董 菁(1985—), 女, 陕西西安人, 在读硕士, 主要从事蓟马生物学研究。

[通信作者] 冯纪年(1957—), 男, 陕西白水人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫分类及分子生物学研究。

teobacteria) α 亚门的立克次氏体,为革兰氏阴性细菌,具杆状和球状 2 种形态。Hertig 和 Wolbach 在尖音库蚊 *Culex pipiens* 的生殖组织中首先发现它,并命名为 *Wolbachia pipiensis*^[1]。目前以应用 PCR 为基础的分子检测技术研究表明,*Wolbachia* 广泛存在于包括鞘翅目、双翅目、半翅目、同翅目、膜翅目、鳞翅目、直翅目和啮目在内的 16%~20% 的昆虫中,且有可能是分布最广、丰度最大的共生细菌类群^[2-4]。该共生细菌参与多种调控其宿主生殖活动的机制,包括诱导宿主的胞质不亲和(Cytoplasmic incompatibility, CI)、孤雌生殖(Parthenogenesis)、雌性化(Feminization)及提高宿主生殖力等^[5]。这种对宿主生殖方式的调控有助于提高在宿主种群内 *Wolbachia* 的密度和数量。

对 *Wolbachia* 系统发育的研究主要是基于 16S rDNA、23S rDNA、*ftsZ*、SR2 及 5S rDNA 等基因^[6-12]。由于不同的 *Wolbachia* 品系对宿主的生殖调控作用存在差异^[13],而 16S rDNA、*ftsZ* 等基因进化速率缓慢,无法利用这些序列对 *Wolbachia* 品系进行准确精细的划分,所以研究中选用进化速度较快的 *wsp* 基因进行小尺度系统分化关系的分析。*wsp* 是一种编码 *Wolbachia* 表面蛋白(surface protein)的基因。Braig 等^[14]首次从感染 *Wolbachia* 的果蝇卵中成功地纯化了 *Wolbachia* 表面蛋白,并进行了 *wsp* 基因的克隆和测序。在 *wsp* 序列分析的基础上,A 群和 B 群可细分为 19 个亚群(subgroups),其中 A 群包括 10 个亚群,B 群包括 9 个亚群。Zhou 等^[15]和 van Meer 等^[16]根据这些亚群进行了 *wsp* 基因诊断的 PCR 特异引物设计,建立了 *Wolbachia* 的基因诊断技术。

美洲棘蓟马(*Echinothrips americanus* Morgan, 1913)属缨翅目(Thysanoptera)、锯尾亚目(Terebrantia)、蓟马科(Thripidae)、针蓟马亚科(Panchaetothripinae),起源于北美洲^[17],目前已扩散至欧洲、日本和泰国等地^[18-20]。该蓟马寄主范围广,主要以成、若虫在叶片的正反面取食,造成白色斑点,并在叶片上留下黑色颗粒状排泄物,影响植物正常光合作用,可对温室作物特别是蔬菜造成危害。在我国美洲棘蓟马属新入侵外来物种,目前仅在北京和陕西省有分布报道^[21-22]。

本研究应用 PCR 技术,对美洲棘蓟马体内共生菌 *Wolbachia* 的感染情况进行了检测,并通过系统发育分析明确了该蓟马体内 *Wolbachia* 所属的亲缘关系,为进一步探讨 *Wolbachia* 对美洲棘蓟马生殖

作用的调控机制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 试虫及来源

美洲棘蓟马(*E. americanus*)采自西北农林科技大学昆虫博物馆温室内的卵叶马兜铃(*Aristolochia ovatifolia*)上。在人工气候箱(型号 ZPQ-2808,温度:白天(27±0.5)℃,夜晚(25±0.5)℃,光周期 14L/10D,相对湿度 54%)内以盆栽玉米饲养,建立种群。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照盐析法^[23]。将单头美洲棘蓟马成虫移入 1.5 mL 离心管中,加入 50 μ L DNA 提取液(50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5, 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 0.5% SDS)和 1 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),用微型研磨棒研磨至粉碎,再加入 50 μ L DNA 提取液冲洗研磨棒;将离心管置于 37℃ 水浴 18~24 h 后加入 28 μ L 5 mol/L NaCl,上下振荡 15 s, 25℃、13 000 r/min 离心 7 min;转移上清于新离心管中,加入 128 μ L 预冷的无水乙醇,上下振荡 15 s;冰浴 1 h 后, 4℃、13 000 r/min 离心 7 min;弃上清,沉淀用预冷的体积分数 70%乙醇漂洗(4℃、13 000 r/min 离心 7 min),室温下干燥 30~40 min,加入 30 μ L 灭菌双蒸水溶解, -20℃ 保存备用。

1.3 *wsp* 基因的 PCR 扩增及电泳检测

wsp 基因的特异性引物:*wsp* 81F 和 *wsp* 691R; A 群引物:*wsp* 136F 和 *wsp* 691R; B 群引物:*wsp* 81F 和 *wsp* 522R; Mel 亚群引物:*wsp* 308F 和 *wsp* 691R^[15]。

PCR 反应体系(25 μ L)为: ddH₂O 14.8 μ L, 10×PCR Buffer(Mg²⁺ Free) 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μ L, 上游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1.5 μ L 和 2.5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增反应结束后,取 PCR 产物 3 μ L 用于 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 序列测定

将检测有 *wsp* 基因片段的 PCR 产物 50 μ L, 委托桑尼生物工程(上海)有限公司纯化和测序。

1.5 序列分析

DNA 序列检索和同源性比较采用 BLAST 工

具(NCBI),多序列比对采用 Clustal X 1.83 软件,系统发育树的构建采用 MEGA 4.0 软件中的邻接法(Neighbor-Joining,NJ),系统树中分支的置信水平均用自引导检验(Bootstrap test)估计,重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 美洲棘蓟马体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的扩增

利用 *wsp* 基因的特异性引物(*wsp* 81F,*wsp* 691R)成功地从美洲棘蓟马体内扩增出了 632 bp 的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段(图 1),该基因片段已经测序并提交 GenBank(登录号为 JN315668)。应用 A 群引物(*wsp* 136F,*wsp* 691R)扩增出了 580 bp 的特异性条带,应用 B 群引物(*wsp* 81F,*wsp* 522R)未扩增出特异性条带(图 1)。扩增片段的大小与理论值相符,表明美洲棘蓟马体内仅被 A 群的 *Wolbachia* 感染。

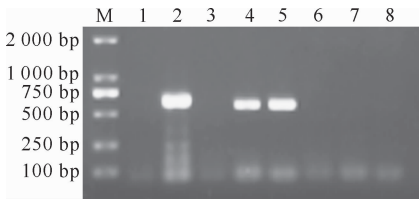


图 1 美洲棘蓟马体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异性扩增结果
M. DNA 标准 DL2000;1~2. *wsp* 基因特异性引物;
3~5. A 群引物;6~8. B 群引物(1,3,6. 阴性对照)

Fig.1 PCR amplification of the *wsp* gene fragment of *Wolbachia* in *E. americanus*
M. DNA Maker DL2000;1-2. Amplification of *wsp* gene;
3-5. Amplification of A group;6-8. Amplification of B group (1,3,6. Negative control)

2.2 系统聚类分析

利用 MEGA 4.0 软件,将美洲棘蓟马体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列以及 GenBank 中已有的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列进行聚类分析得到 NJ 系统树,结果见图 2。

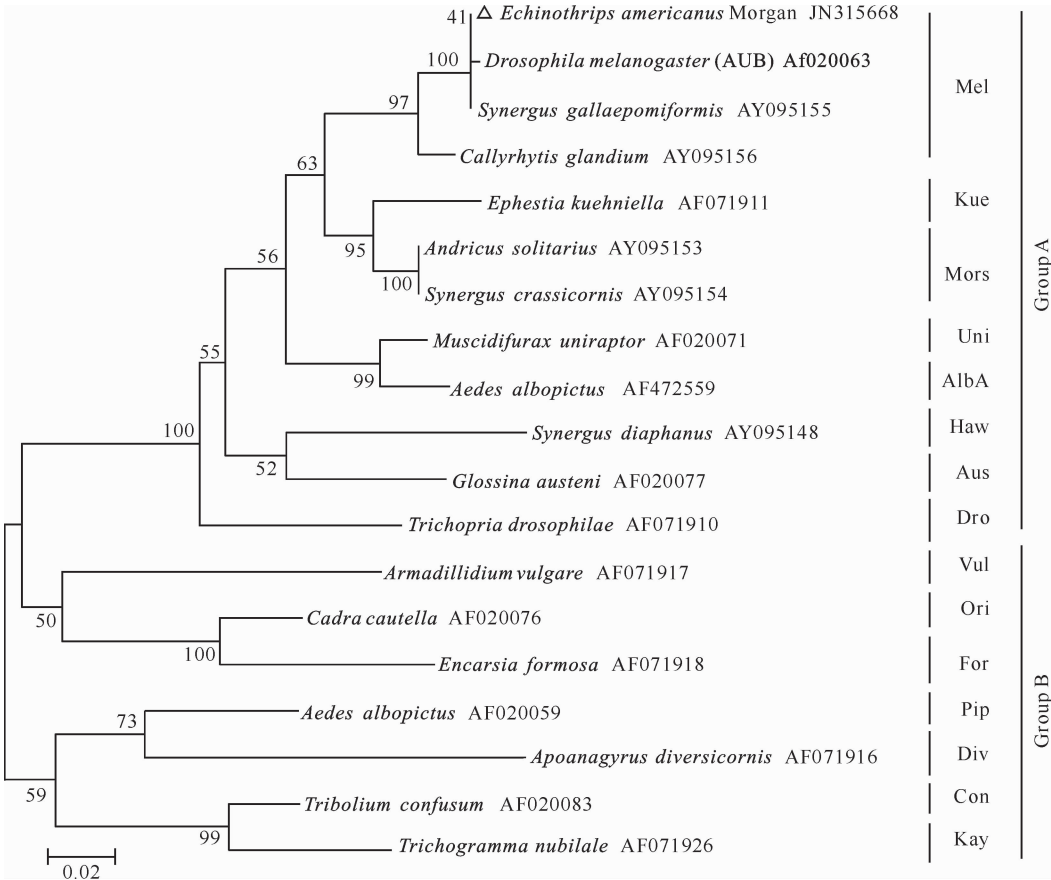


图 2 基于 *wsp* 基因序列的 *Wolbachia* 的系统发育树
△.美洲棘蓟马
Fig.2 Phylogenetic tree of *Wolbachia* based on the *wsp* sequence
△. *E. americanus*

从图 2 可以看出,依据 *wsp* 基因将 *Wolbachia* 分成 A、B 2 组。美洲棘蓟马体内的 *Wolbachia* 属于 A 组,并且与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (AUB)体内的 *Wolbachia* 亲缘关系较近,同属于 Mel 亚群;应用 Mel 亚群引物(*wsp* 308F, *wsp* 691R)扩增出了 405 bp 的特异性条带,扩增结果也证实了这一观点(图 3)。

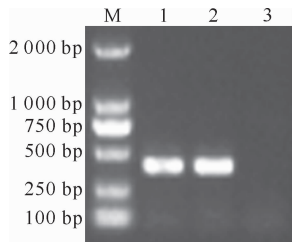


图 3 Mel 亚群 *wsp* 基因特异性扩增结果
M. DNA 标准 DL2000;1~2. Mel 亚群引物;3. 阴性对照
Fig. 3 PCR amplification of the *wsp* genefragment of *Wolbachia* in Mel subgroup
M. DNA Maker DL2000;1-2. Amplification of Mel subgroup;3. Negative control

3 讨 论

Wolbachia 是节肢动物体内最为丰富的共生微生物之一。本研究发现,美洲棘蓟马被 *Wolbachia* 感染,且其体内的 *Wolbachia* 属于 A 群中的 Mel 亚群,并经特异性引物扩增结果证实。

美洲棘蓟马为我国新入侵物种,可对温室蔬菜造成严重危害。该蓟马营两性生殖和孤雌产雄生殖 2 种生殖方式,但是其遗传机制尚不清楚。Kumm 等^[24]检测出美洲棘蓟马体内存在共生菌 *Wolbachia*,但具有同样生殖方式的西花蓟马体内并未检测出共生菌的感染。本研究通过对美洲棘蓟马体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行系统发育分析,结果表明,美洲棘蓟马体内的 *Wolbachia* 与黑腹果蝇感染的 *Wolbachia* 亲缘关系较近,已经证实黑腹果蝇体内的共生菌 *Wolbachia* 属于具有诱导 CI 现象能力的 A 群中的 Mel 亚群。但美洲棘蓟马体内的 *Wolbachia* 在对宿主的生殖调控作用上是否具有同样的诱导胞质不亲和(CI)功能,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Hertig M, Wolbach S B. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects [J]. Journal of Medical Research, 1924, 44: 329-374.
[2] 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.
[3] Werren J H, Guo L R, Windsor D W. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods [J]. Proceedings of the Royal Society of London: Series B, 1995, 262: 197-204.
[4] Werren J H, Windsor D M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium [J]. Proceedings of the Royal Society of London: Series B, 2000, 267: 1277-1285.
[5] Werren J H, Baldo L, Clark E. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology [J]. Nature Rev Microbiol, 2008, 6: 741-751.
[6] O'Neill S L, Giordano R, Colbert A M E, et al. 16S RNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(7): 2699-2702.
[7] Stouthamer R, Breeuwer J A J, Luck R F, et al. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis [J]. Nature, 1993, 361: 66-68.
[8] Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, et al. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various sexual alterations of sexuality in arthropods [J]. Proceedings of the Royal Society of London: Series B, 1992, 250: 91-98.
[9] Holden P R, Brookfield J F, Jones P. Cloning and characterization of a *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster* [J]. Mol Gen Genet, 1993, 240(2): 213-220.
[10] Werren J H, Zhang W, Guo L R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods [J]. Proceedings of the Royal Society of London: Series B, 1995, 261: 55-63.
[11] Fialho R F, Stevens L. Molecular evidence for single *Wolbachia* infections among geographic strains of the flour beetle *Tribolium confusum* [J]. Proceedings of the Royal Society of London: Series B, 1997, 264: 1065-1068.
[12] van Meer M M M, van Kan F J M P, Stouthamer R. Spacer 2 region and 5S rDNA variation of *Wolbachia* strains involved in cytoplasmic incompatibility or sex-ratio distortion in arthropods [J]. Lett Appl Microbiol, 1998, 28(1): 17-22.
[13] Machtelinckx T, Van L T, Vanholme B, et al. *Wolbachia* induces strong cytoplasmic incompatibility in the predatory bug *Macrolophus pygmaeus* [J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(3): 373-381.
[14] Braig H R, Guzman H, Tesh R B, et al. Replacement of nature *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart [J]. Nature, 1994, 367: 453-455.
[15] Zhou W, Rousset R, 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: 1-7.