

灰飞虱体内沃尔巴克氏体的检测

邸垫平,苗洪芹,路银贵,田兰芝

(河北省农林科学院 植物保护研究所,河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心,河北 保定 071000)

摘要:采用沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)表面蛋白基因(*wsp* 基因)的通用引物 81F 和 691R 对河北曲阳和容城灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)体内的 *Wolbachia* 进行 PCR 检测,结果表明,从灰飞虱 DNA 样品中可扩增出 600 bp 大小的 *wsp* 目的基因片段,证实河北曲阳和容城田间的灰飞虱种群有 *Wolbachia* 感染;对 *wsp* 目的基因片段的序列测定和同源性分析表明,河北的 2 个灰飞虱种群感染的 *Wolbachia* 与来自白背飞虱的 wFur 品系、灰飞虱的 wStri 品系亲缘关系较近,同属于 *Wolbachia* B 大组 Con 组。

关键词:灰飞虱;沃尔巴克氏体;检测

中图分类号:S435 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)01-0178-03

Molecular Detection of *Wolbachia* in Small Brown Planthopper(*Laodelphax striatellus*)

DI Dian-ping, MIAO Hong-qin, LU Yin-gui, TIAN Lan-zhi

(Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry, IPM
Centre of Hebei Province, Baoding 071000, China)

Abstract: *Wolbachia* bacteria is an obligate intracellular bacterium found in a wide range of invertebrate hosts and cause alterations in host reproductive phenotypes, including cytoplasmic incompatibility, feminization, parthenogenesis, male killing, fitness alterations, and other phenomena. Small brown planthoppers (*Laodelphax striatellus*) was the most important vector of some plant virus transmission and the populations were trended to increase in recent years which caused serious damage to rice and maize plant. Thus the infection of *Wolbachia* in small brown planthoppers from different regions was detected by polymerase chain reaction (PCR) using the universal primer 81F and 691Rs of the surface protein gene of *Wolbachia* (*wsp* gene, encoding the outer membrane protein of the symbiotic bacteria) in this paper. The results demonstrated that planthoppers from Quyang county and Rongcheng county were infected with *Wolbachia* and the infection rate was 85.6% and 88.4% respectively. The PCR products were sequenced and analyzed. It was showed that a region of 601-603 bp of *Wolbachia wsp* gene were amplified from the total DNA of small brown planthopper and there was 100% nucleotide identity with other strains derived from *Sogatella fureifera* and *Laodelphax striatellus*. It indicated that the *wolbachia* infected in small brown planthopper from Hebei province had close relatives with the strain wFur (derived from *Sogatella fureifera*) and wStri (derived from *Laodelphax striatellus*). They all belong to the Con group of B supergroup. Therefore, it was possible that *wolbachia* infected *Laodelphax striatellus* derived from the same group.

Key words: *Laodelphax striatellus*; *Wolbachia*; Detection

沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)是自然界中分布非常广泛的胞内共生菌之一,近10余年的研究表明,这类共生菌广泛存在于各类昆虫体内,甚至估计16%的昆虫均含有该菌^[1]。对来自33个不同寄主的38个不同*Wolbachia*株系的*ftsZ*基因(细胞周期基因)研究表明,*Wolbachia*株系间存在着很大的差异,

*Wolbachia*株系分为A组群和B组群^[2]。Zhou等^[3]在*wsp*(编码*Wolbachia*表面蛋白)基因序列分析的基础上,将沃尔巴克氏体细分为12个亚群(sub-group),并设计了12个亚群*wsp*基因诊断的PCR扩增特异引物。昆虫体内是否含有*Wolbachia*,早期多通过DAPI染色法(用非特异性的DNA-binding 荧光

收稿日期:2008-11-20

基金项目:河北省财政专项(2007055001)

作者简介:邸垫平(1970-),男,河北行唐人,副研究员,博士,主要从事植物病毒研究。

染料 DAPI 染色,然后在荧光显微镜下观察)^[4]和电镜观察^[5]来判断,但 20 世纪 90 年代以来则主要依赖于对其 16S rDNA、23S rDNA、ftsZ 和 wsp 等基因进行 PCR 检测与序列分析,其中 wsp 基因是目前报道的 *Wolbachia* 基因中进化最快的基因而被广泛用于 *Wolbachia* 的 PCR 检测与分子鉴别^[1,3,6,7]。沃尔巴克氏体通过卵的细胞质传播并参与多种调控其寄主生殖活动的机制,包括诱导孤雌生殖 (Parthenogenesis inducing, PI)^[8]、雌性化 Feminization)^[9]和生殖不亲和^[10],因而它很有希望被用于许多虫媒传播的重大人类疾病的基因工程防治和生物防治。

灰飞虱 (*Laodelphax striatellus* Falln) 广泛分布于东亚、东南亚、欧洲和北非等地,我国以长江中下游和华北地区发生较多。灰飞虱能取食或为害水稻、小麦、大麦、玉米、高粱、甘蔗、稗草、李氏禾等多种禾本科植物,并且能传播多种病毒病,造成病害的普遍流行。因此,进行灰飞虱种群暴发成灾规律及其有效防治技术的研究,显得尤其重要和紧迫。本研究采用 PCR 方法研究了灰飞虱体内 *Wolbachia* 的感染,以期开辟控制灰飞虱暴发和阻断病毒病传播新途径提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

从河北省曲阳和容城小麦田采集灰飞虱成虫,保存在小麦苗上。

1.2 总 DNA 的提取

每只灰飞虱为 1 个样本,放入离心管中冷冻,而后置于载玻片上,呈直线逐步滴 1 滴 Ringer's solution (昆虫生理盐水),去头,放入装有预冷 100 μ L STE 的管中,匀浆,10% SDS 5 μ L 及蛋白酶 K 2.5 μ L,55 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,加酚 50 μ L 及 50 μ L 氯仿 异戊醇 (24:1),剧烈震荡,12 000 r/min 离心 5 min。取上清,加入 2 倍体积无水乙醇及 0.1 体积 3 mol/L NaAc, -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜,离心,12 000 r/min。弃上清,加 75%乙醇 200 μ L 洗涤 2 遍。55 $^{\circ}$ C 烘干,加入 30 μ L 无菌水溶解, -20 $^{\circ}$ C 冻存,待检。

1.3 PCR 扩增及电泳检测

扩增 wsp 基因片段使用的引物^[3]:

wsp 81F (5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3')

wsp 691R (5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3')。

在 20 μ L 反应体积中进行 PCR 反应,反应体系为 13.5 μ L ddH₂O, 2 μ L 10 \times Buffer, 2 μ L 25 mmol/L

MgCl₂, 0.5 μ L dNTPs (每种 10 mmol/L), 0.5 μ L 20 μ mol/L 的正向和反向引物及一个单位的 Taq 高温多聚酶。Taq plus 及 dNTP 购自上海生工生物工程公司。

PCR 反应条件是:首先在 94 $^{\circ}$ C 下变性 3 min,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 完成一个循环,共进行 35 次循环。72 $^{\circ}$ C 末轮聚合 10 min。

反应结束后取 PCR 特异性扩增产物 5 μ L,在 0.8% 的琼脂糖胶上进行电泳 (电压 40 V, 50 min, 电泳缓冲液为 0.5 \times TBE),用 BioRad 凝胶成像系统检测并拍照。

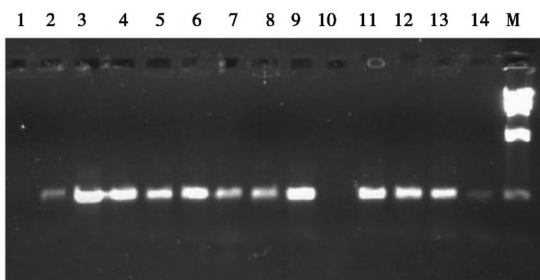
1.4 序列分析

选择有扩增产物的样品进行大量 PCR 扩增,采用 PCR 产物回收试剂盒 (上海生工生物工程公司产品)回收 PCR 扩增产物交上海生工生物工程公司进行测序,利用 BLAST 工具 (NCBI 网站)进行 DNA 序列检索和同源性比较。

2 结果与分析

2.1 wsp 基因的 PCR 检测

采用 wsp 基因通用引物 81F 和 691R 对灰飞虱 DNA 样品进行 PCR 扩增,电泳检测结果表明,从灰飞虱 DNA 样品中可扩增出 600 bp 大小的 wsp 目的基因片段,证实河北曲阳和容城田间采集的灰飞虱种群有 *Wolbachia* 的感染 (图 1)。河北曲阳和容城灰飞虱种群的沃尔巴克氏体感染率分别为 85.6% 和 88.4%,而且雌雄个体感染率无差别。



1. 空白对照 (水); 2~14. 灰飞虱样品; M. DNA/ Hind Marker。
1. Control (water); 2~14. small brown hopper; M. DNA/ Hind Marker.

图 1 灰飞虱体内沃尔巴克氏体 wsp 基因片段的扩增

Fig. 1 Detection of wsp gene of *Wolbachia* infected in small brown planthopper

2.2 wsp 基因片段的序列测定及分析

将扩增的 wsp 基因片段进行基因序列测定,结果表明,从所检测的样品中扩增出的 *Wolbachia* 的 wsp 基因片段长度为 601~603 bp。用 NCBI 网站提供的 BLAST 分析工具进行基因序列同源性分析,表明灰飞虱体内感染的 *Wolbachia* wsp 基因与 *Wolbachia pipientis* 的 wFur、wStri 2 个品系的 wsp 基因的同源

性为 100 % , 与 *Wolbachia* sp. 的 wJapo、wFur、wStri 3 个品系的 *wsp* 基因的同源性也达到 100 % (表 1)。

表 1 灰飞虱感染 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的同源性

Tab. 1 The homology of *wsp* gene of *Wolbachia* infected small brown planthopper

<i>Wolbachia</i> 品系 Strain	同源性/ % Homology	注册号 Accession number	宿主 Host	来源 Literature
<i>Wolbachia pipientis</i> isolate wFur	100	AF481185.1	白背飞虱	Kittayapong et al. 2003
<i>Wolbachia pipientis</i> isolate wStri	100	AF481175.1	灰飞虱	Kittayapong et al. 2003
<i>Wolbachia</i> sp. wStri	100	AF020080.1	灰飞虱	Zhou et al. 1998
<i>Wolbachia</i> sp. wJapo	100	AB039283.1	<i>Elenchus japonicus</i>	Noda. et al. 2001
<i>Wolbachia</i> sp. wFur	100	AB039043.1	白背飞虱	Noda et al. 2001
<i>Wolbachia</i> sp. wStri	100	AB039042.1	灰飞虱	Noda et al. 2001

3 讨论

Wolbachia 是自然界分布较广的共生菌,在双翅目、膜翅目和鳞翅目等许多昆虫体内均有感染。甘波谊等^[11]以 PCR 方法检测了来自不同地域稻田的 3 种稻飞虱,发现灰飞虱、褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*)、白背飞虱 (*Sogatella furcra*) 均被 *Wolbachia* 所感染,对 *wsp* 的 RFLP 分析证实了这些飞虱为单一沃尔巴克氏体感染。但不同地区灰飞虱体内沃尔巴克氏体的感染率不同,在我国形成了周边地区感染率高(如辽宁、北京、上海和云南),而内陆地区感染率低(如四川),或是未被感染(如宁夏)的格局^[11]。在日本采集的 9 个灰飞虱种群被 *Wolbachia* 感染的比率随纬度降低而增加^[12]。这些差异可能与不同地区的地形、气候、寄主条件及 *Wolbachia* 的传播效率等因素有关,其原因有待研究证实。本研究结果表明,河北曲阳和容城灰飞虱种群沃尔巴克氏体感染率较高,与前人的报道一致。通过对基因序列的同源性分析表明,河北的 2 个灰飞虱种群感染的 *Wolbachia* 与来自白背飞虱的 wFur 品系、灰飞虱的 wStri 品系亲缘关系较近,同属于 *Wolbachia* B 大组 Con 组。这些表明灰飞虱可能会被同一组的 *Wolbachia* 感染。

灰飞虱是多种病毒的传播介体,灰飞虱的暴发流行常造成玉米粗缩病、水稻条纹叶枯病等病毒病的严重流行。沃尔巴克氏体是灰飞虱的胞内共生菌,能够通过多种机制调控其寄主的生殖活动^[13],但是,近年灰飞虱种群暴发成灾与 *Wolbachia* 感染的关系有待进一步研究证实。同时,沃尔巴克氏体影响灰飞虱传毒能力的作用及利用媒介昆虫—共生菌技术阻断病毒的传播将是今后研究的重点,对于开辟病毒病防治新途径具有重要的意义。

参考文献:

[1] 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.

[2] Werren J H. Biology of *Wolbachia* [J]. Ann Rev Entomol, 1997, 42 :587 - 609.

[3] 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, Biological Sciences, 1998, 265 : 509 - 515.

[4] O'Neill S L, Karr T L. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans* [J]. Nature, 1990, 348 :178 - 180.

[5] Louis C, Nigro L. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross incompatibility [J]. J of Invertebrate Path, 1989, 54 :39 - 44.

[6] Braig H R, Zhou W, Dobson S, et al. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis* [J]. J of Bacteriology, 1998, 180(9) :2373 - 2378.

[7] 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 [C]//Bourtzis K, Miller T A. Insect Symbiosis. New York: CRC Press, 2003, 305 - 324.

[8] Stouthamer R, Luck R F, Hamilton W D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 :2424 - 2427.

[9] Marie J P M, Li R G, John H W. Single and double infection with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility [J]. Genetics Society of America, 1996: 961 - 967.

[10] Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, et al. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods [J]. Proc R Soc London (B), 1992, 250 :91 - 98.

[11] 甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 等. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染 [J]. 昆虫学报, 2002, 45 (1) : 14 - 17.

[12] Hoshizaki S, Shimada T. PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently [J]. Insect Molecular Biology, 1995, 4 (4) : 237 - 243.

[13] Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, et al. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera* Insect Biochem [J]. Mol Biol, 2001, 31 (6 - 7) :727 - 737.