

## 白蜡虫体内杀雄菌属 (*Arsenophonus*) 共生菌的分子检测

刘魏魏, 杨璞, 陈晓鸣\*, 徐冬丽, 李燕飞

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, 昆明 650224

**摘要:** 【目的】研究白蜡虫体内杀雄菌属 (*Arsenophonus*) 共生菌的含量与白蜡虫性比之间的关系。【方法】采用 16S rDNA 文库的方法对白蜡虫雄虫体内的共生菌进行分析, 利用杀雄菌属特异的 2 条 16S rDNA 引物以及 23S rDNA 引物进行 PCR 检测。对昭通、昆明、金口河、杭州、长春、江华 6 个不同地理种群白蜡虫体内的杀雄菌属共生菌进行半定量分析, 并采用荧光定量 PCR 对昭通、昆明、金口河白蜡虫体内的杀雄菌属共生菌进行绝对定量分析。【结果】在白蜡虫体内首次发现杀雄菌属共生菌。在白蜡虫雌雄虫体内均扩增出杀雄菌属的两条不同长度的 16S rDNA 序列, 分别为 445bp 和 1462bp, 并扩增得到长度为 582bp 的 23S rDNA 序列。杭州和江华地理种群白蜡虫的一些个体不含杀雄菌属共生菌。昭通地理群的杀雄菌属共生菌含量显著高于金口河和昆明, 而昆明和金口河白蜡虫的杀雄菌属含量无显著差异。【结论】白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的含量与白蜡虫性比无关。

**关键词:** 白蜡虫, 杀雄菌属共生菌, 16S rDNA, 性比, 绝对定量

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 08-1002-09

共生菌广泛分布于昆虫体内, 可分为初级共生菌和次级共生菌。初级共生菌和宿主基因协同进化, 同时为宿主提供必需的氨基酸。次级共生菌和宿主的协同进化关系较为短暂、松散, 反映出感染昆虫的历史较短<sup>[1]</sup>。研究发现, 某些次级共生菌在宿主昆虫的生长、繁殖过程中起着十分重要的作用, 如营养功能、解毒作用、调控生殖及与寄主适应性等等<sup>[2-3]</sup>。近些年, 一些学者提出了共生菌在寄主抵御天敌等逆境的胁迫时具有重要的作用。一些研究表明, 次级共生菌也可能在寄主昆虫适应植物的能力和竞争力等方面具有重要作用, 进而间接影响寄主昆虫进化和生物型的形成<sup>[4]</sup>。共生菌还可以通

过诱导孤雌生殖、雄性致死以及充当雌性化因子等方式影响宿主昆虫的生殖方式<sup>[5]</sup>。例如, 共生菌沃尔巴克氏 (*Wolbachia*) 可以通过诱导产雌孤雌生殖、宿主胞质不亲和、雄性致死和增强生殖力等作用方式引起其寄主生殖行为的改变<sup>[6-7]</sup>。杀雄菌属共生菌是在丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 中发现的一种可以杀死雄性胚胎的共生菌, 杀雄菌属共生菌在昆虫体内的分布已有广泛报道<sup>[8-10]</sup>, 但其功能的研究仍然很少。

白蜡虫 *Ericerus pela* (Chavannes) 属昆虫纲、半翅目、蜡蚧总科、白蜡蚧属, 是我国特产的一种具有重要经济价值的资源昆虫。白蜡虫雄虫分泌的白蜡为一

**基金项目:** 国家自然科学基金青年基金 (31000983); 林业公益性行业科研专项经费项目 (201204602); 云南省应用基础研究基金 (2010ZC235); 中国林业科学研究院资源昆虫研究所基本科研业务费专项资金 (rircif200904M-3, rircif2011006M)

\* 通信作者。Tel: +86-871-3862047; E-mail: cafxm@tom.com

**作者简介:** 刘魏魏 (1989-), 安徽省界首市人, 硕士研究生, 从事资源昆虫分子生物学研究。E-mail: liuwsk@163.com

**收稿日期:** 2012-02-20; **修回日期:** 2012-04-01

种天然高分子化合物,广泛应用于机械、国防军工、食品、医药等领域,具有很高的经济价值。泌蜡是白蜡虫雄虫特有的生物学习性,且集中在二龄幼虫期,该时期的生理活动受到很多因素的影响,已有研究表明,刺吸危害的昆虫体内普遍存在内共生菌,对宿主的生长和发育起着重要作用。白蜡虫以往研究多关注光照、温度等生态因子对其生物学特性的影响<sup>[11]</sup>,而对于微生物的作用,研究甚少,所以开展白蜡虫共生菌的研究,有着十分重要的理论和实践意义。

本实验采用 16S rDNA 文库的方法,对白蜡虫雄虫体内的共生细菌进行了分析和鉴定,在白蜡虫体内首次发现杀雄菌属共生菌,并利用杀雄菌属 16S rDNA 和 23S rDNA 的特异引物,对 16S rDNA 和 23S rDNA 基因进行检测和序列分析,并采用荧光定量 PCR 对不同地理种群白蜡虫体内杀雄菌属共生菌进行绝对定量分析。结果表明白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的含量与白蜡虫性比无关。本实验为研究共生菌对宿主的作用提供了参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试昆虫:**实验所用的白蜡虫分别采自我国昭通(103.71°E、27.34°N)、昆明(102.73°E、25.04°N)、金口河(103.08°E、29.24°N)、杭州(120.12°E、30.16°N)、长春(125.35°E、43.88°N)、江华(111.34°E、25.11°N),于-20℃保存。

**1.1.2 引物设计:**表 1 内是本研究所用的引物。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

primers	sequence (5'→3')
27F	AGAGTTGATCCTGGCTCAG
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT
ARS16S-F1	AGACGGGTGATGTTGTGAAATG
ARS16S-F2	CCTAACACATGCAAGTCGAGCG
16S-R	TACCTTGTTACGACTT
ARS23S-F	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA
ARS23S-R	GGTCTCCAGTTAGTGTACCCAAC
ARS16S-F3	TTCGGTCGGAAGTCAAAGG
16S-R3	TCTGAGTTCGCTTCCCATC
β-actinF	CCACGAGACGACCTACAAT
β-actinR	CGATCCATACGGAGTACT

**1.1.3 主要试剂和仪器:**基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy® Blood & Tissue Kit DNA 购自 Qiagen 公司

(美国);Taq PCR MasterMix 购自天根公司(北京);KOD FX 购自 TOYOBO 公司(日本);AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司(杭州);pGEM T-Easy Vector System I 试剂盒购自 Promega 公司(上海);*E. coli* Competent Cells JM109 感受态细胞、*Afa* I 酶、*Hind* I 酶和 SYBR Premix Ex Taq™ 购自 TaKaRa 公司(大连);质粒小量抽取试剂盒购自庄盟国际公司(北京)。所用仪器为 CFX96 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad,美国)、凝胶成像系统(Syngene,英国)、BIONANO 超微量紫外可见分光光度计(Thermo Scientific,上海)。

### 1.2 白蜡虫总 DNA 的提取

取白蜡虫,用 75% 的酒精漂洗 3 次,每次 2 min,然后用无菌水清洗 5 次,每次 2 min。使用 DNeasy® Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒提取 DNA,4℃ 保存备用。

### 1.3 16S rDNA 文库的构建

取泌蜡高峰期的昆明地理种群白蜡虫雄虫,按照上述方法提取 DNA。16S rDNA 基因片段的扩增选取 27F 和 1492R<sup>[12]</sup>,所用 Taq 酶为天根的 Taq PCR MasterMix,反应体系如下: MIX 25 μL,上下游引物(20 μmol/L)各 3 μL, DNA 3 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。PCR 反应程序:94℃ 4 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 90 s,31 个循环;72℃ 10 min。

所获得的 16S rDNA 的 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,拍照并切下相应条带,纯化步骤按照 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒操作,最后加入 25 μL 加热的 ddH<sub>2</sub>O 洗脱。按照 pGEM T-Easy Vector System I 试剂盒操作进行连接,再转化 *E. coli* Competent Cells JM109 感受态细胞,涂布在氨苄青霉素抗性的平板上即得到 16s rDNA 文库。

### 1.4 文库测序和分析

经过蓝白斑筛选后,对获得的文库随机挑选 200 个白色单克隆,采用 M13 通用引物进行阳性重组克隆检测,对于阳性重组克隆的 M13 PCR 产物,采用 *Afa* I 酶和 *Hind* I 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所对应的克隆送交南京金思瑞生物科技有限公司测序。

测序结果用 NCBI 的 VecScreen 去除载体序列,采用 BLAST 进行比对,E 值 < 1e<sup>-6</sup> 的序列认为比对相似性较高。

### 1.5 杀雄菌属共生菌的分子检测

对昆明地理种群白蜡虫雌、雄虫各3头,分别单头提取DNA,方法同前。利用杀雄菌属共生菌特异的16S rDNA引物(ARS16S-F1/16S-R和ARS16S-F2/16S-R)和23S rDNA引物(ARS23S-F: /ARS23S-R)(表1)<sup>[13]</sup>,在50 μL体系中进行PCR扩增。反应体系、PCR反应程序、克隆和测序同前。

### 1.6 系统发育分析

将ARS16S-F1/16S-R和ARS16S-F2/16S-R引物组合进行PCR扩增获得的杀雄菌属共生菌序列采用DNAMAN进行序列分析,并在GenBank中应用nucleotide BLAST进行相似性搜索,将引自NCBI的9条序列用ClustalX Version 1.83软件进行多重比对,比对结果输入MEGA 4.1软件,采用Neighbor-Joining方法构建白蜡虫杀雄菌属共生菌16S rDNA以及23S rDNA序列系统发育树,各分支的bootstrap置信度用1000次自导复制来评价<sup>[13]</sup>。

### 1.7 白蜡虫不同地理种群中杀雄菌属共生菌的PCR检测

选取6个白蜡虫地理种群,每个种群的雌成虫各取10头,分别单头提取DNA(方法同前),使用BIONANO超微量紫外可见分光光度计测定DNA浓度,然后稀释到100 ng/μL。根据测序所得的白蜡虫杀雄菌属共生菌16S rDNA序列,在其可变区设计特异的荧光定量PCR引物(ARS16S-F3/16S-R3)。对于6个种群所获得的PCR产物,分别随机挑选2个进行克隆、测序,比对后确定所得片段为白蜡虫杀雄菌属共生菌的16S rDNA序列。以白蜡虫β-actin基因作为内参,对6个白蜡虫地理种群中杀雄菌属共生菌进行半定量PCR分析,所用Taq酶为TOYOBO公司KOD FX酶,配制10 μL反应体系:2 × PCR buffer 5 μL, Taq酶(1U) 0.3 μL, dNTP(2 mmol/L) 2 μL、*Arsenophonus*和β-actin的4条上下游引物(20 μmol/L)各0.15 μL, DNA 2.1 μL。反应程序为:94℃, 4 min; 98 30 s, 55℃ 45 s, 68 30 s, 30个循环。扩增产物经2.0%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下拍照。

### 1.8 白蜡虫不同地理种群中杀雄菌属共生菌含量的荧光定量PCR分析

将ARS16S-F3/16S-R3获得的PCR产物,进行

T-A克隆,利用质粒小量抽取试剂盒抽提质粒,检测质粒浓度,梯度稀释后进行荧光定量PCR检测,并做标准曲线。利用1.7中提取并定量稀释后的白蜡虫DNA(昭通、昆明、金口河三个地理种群)以及ARS16S-F3/16S-R3引物组合,对30个样本的杀雄菌属共生菌进行绝对定量PCR分析(CFX Manager Software Version 2.1)。以SYBR Green I为荧光染料,荧光定量PCR的反应体系为:2 × SYBR Premix Ex Taq™(含荧光染料) 12.5 μL、ARS16S-F3和16S-R3引物(2 μmol/L)各0.5 μL、DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O补至25 μL。反应程序为:95℃, 3 min; 95℃ 10 s, 55℃ 20 s, 读板, 39个循环;生成溶解曲线步骤为:65℃ ~ 95℃, 每次升温0.5℃, 读板。根据荧光值的变化规律,系统将自动生成标准曲线和溶解曲线。

将获得的杀雄菌属共生菌含量(拷贝数)导入DPS数据处理软件,采用LSD法(最小显著差法)在 $P < 0.01$ 的水平进行差异显著性分析。白蜡虫雌雄性比和体内杀雄菌属共生菌含量之间的相关性分析采用R 2.14软件,计算了昭通、昆明、金口河3个白蜡虫地理种群的性比与其体内杀雄菌属共生菌含量之间的Kendall's tau相关系数,并检验其显著性。

## 2 结果和分析

### 2.1 文库测序结果

随机挑选的200个单克隆得到14条带型不同的酶切图谱,所以将克隆子分为14个可操作分类单元(OTU, Operational Taxonomic Unit),其中在文库中仅出现一次的OTU有2个,根据库容(coverage, C)计算公式: $C = 1 - n/N$ (N代表文库中总克隆数, n代表在文库中仅出现一次的OTUs的数量)<sup>[14]</sup>,计算得到本实验构建的16S rDNA文库的库容为99%。

每个OTU随机挑选一个克隆测序,测序结果表明,7个克隆序列与立克次氏体(*Rickettsia*)相似;3个克隆序列(长度分别为1501pb、1501pb、1482bp)均与蚜科 *Stomaphis longirostris* 体内的次生共生菌 *Arsenophonus* 16S rDNA (GenBank 登录号为:FJ655542.1)一致性(Identities)为99%(E值为

0.0); 有4个克隆序列经比对和已知序列一致性太低, 无法确认。序列分析表明, 白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的16S rDNA G+C含量为53.83%; 获得的杀雄菌属16S rDNA序列已递交到NCBI, 登录号是JN990929。

## 2.2 16S rDNA 和 23S rDNA 的 PCR 扩增与序列分析

利用杀雄菌属共生菌特异的16S rDNA引物对昆明地理种群白蜡虫雌、雄虫各3头, 分别进行DNA扩增, 均得到2个不同的片段, 其中用引物ARS16S-F2和16S-R扩增得到预期片段长为1462bp(图1-A), G+C含量为53.83%, 与粉虱科 *Australiococcus greville* 体内的共生菌 *Arsenophonus*

16S rDNA序列相似度达99%以上(E值0.0)。用引物ARS16S-F1和16S-R扩增得到的预期片段长为445bp(图1-B), G+C含量为52.81%。本实验所用的特异引物ARS16SF1是在16S rDNA的预期缺失片段两头设计的, 并且得到了预期的16SF1片段, 这说明在白蜡虫体内杀雄菌属共生菌中, 存在两种不同片段大小的16S rDNA, 且16SF1 rDNA的基因序列是16SF2 rDNA的序列中间缺失957bp。

利用 *Arsenophonus* 特异的23S rDNA引物对白蜡虫总DNA扩增, 获得的片段长为582bp(图1-C), G+C含量为51.55%。获得的白蜡虫体内杀雄菌属共生菌23S rDNA序列已经递交到NCBI, 登录号是JN990930。

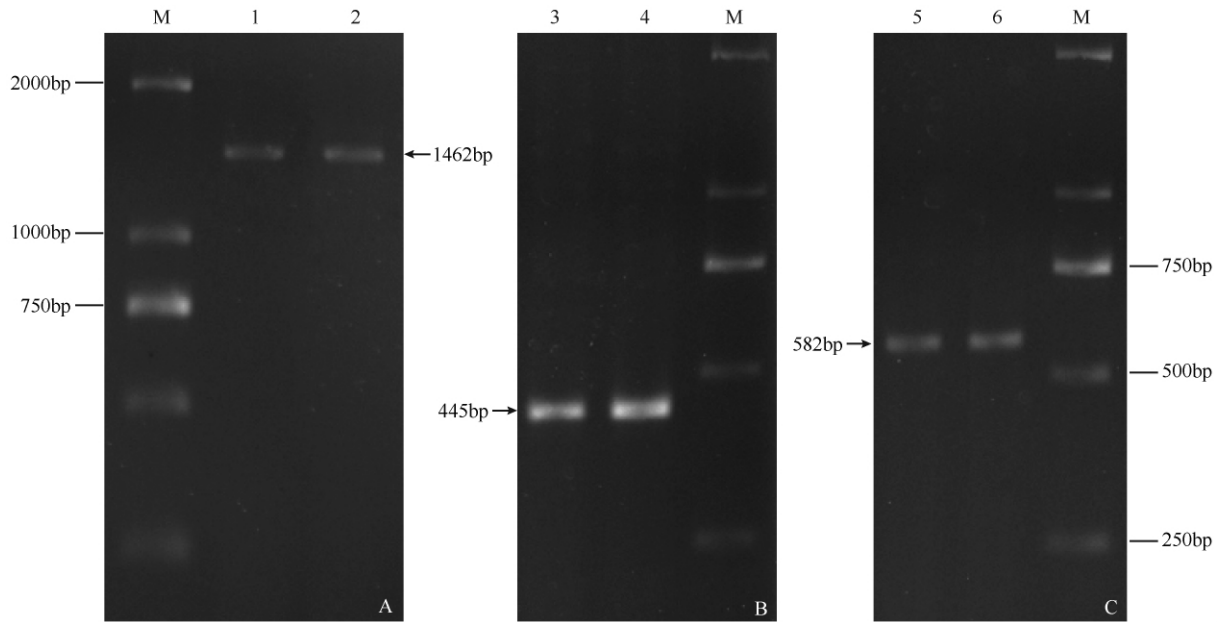


图1 白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的16S rDNA和23S rDNA基因PCR扩增

Fig.1 PCR amplification with 16S rDNA and 23S rDNA specific primer pairs for *Arsenophonus* from *E. pela*. (A) lane 1, PCR amplification with specific primer pair ARS16S-F2/16S-R for *Arsenophonus* from female *E. pela*; lane 2, PCR amplification with specific primer pair ARS16S-F2/16S-R for *Arsenophonus* from male *E. pela*. (B) lane 3, PCR amplification with specific primer pair ARS16S-F1/16S-R for *Arsenophonus* from female *E. pela*; lane 4, PCR amplification with specific primer pair ARS16S-F1/16S-R for *Arsenophonus* from male *E. pela*. (C) lane 5, PCR amplification with specific primer pair ARS23S-F/23S-R for *Arsenophonus* from female *E. pela*; lane 6, PCR amplification with specific primer pair ARS23S-F/23S-R for *Arsenophonus* from male *E. pela*. DNA maker was indicated in lane M.

## 2.3 系统聚类分析

对白蜡虫杀雄菌属共生菌的16S rDNA和23S rDNA基因序列以及已知的其它昆虫的相应序列构建系统进化树, 发现白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的16S rDNA和23S rDNA基因序列均与半翅目昆虫粉虱科的 *Glycaspis brimblecombei*、*Tetraleurodes acaciae*

和木虱科的 *Dialeurodes hongkongensis* 体内杀雄菌属共生菌进化上最为接近, 而与双翅目虱蝇科 *Trichobius parasiticus*、膜翅目金小蜂科 *Nasonia vitripennis* 以及鳞翅目草螟科 *Chilo suppressalis* 体内的杀雄菌属共生菌的遗传距离较远(图2)。

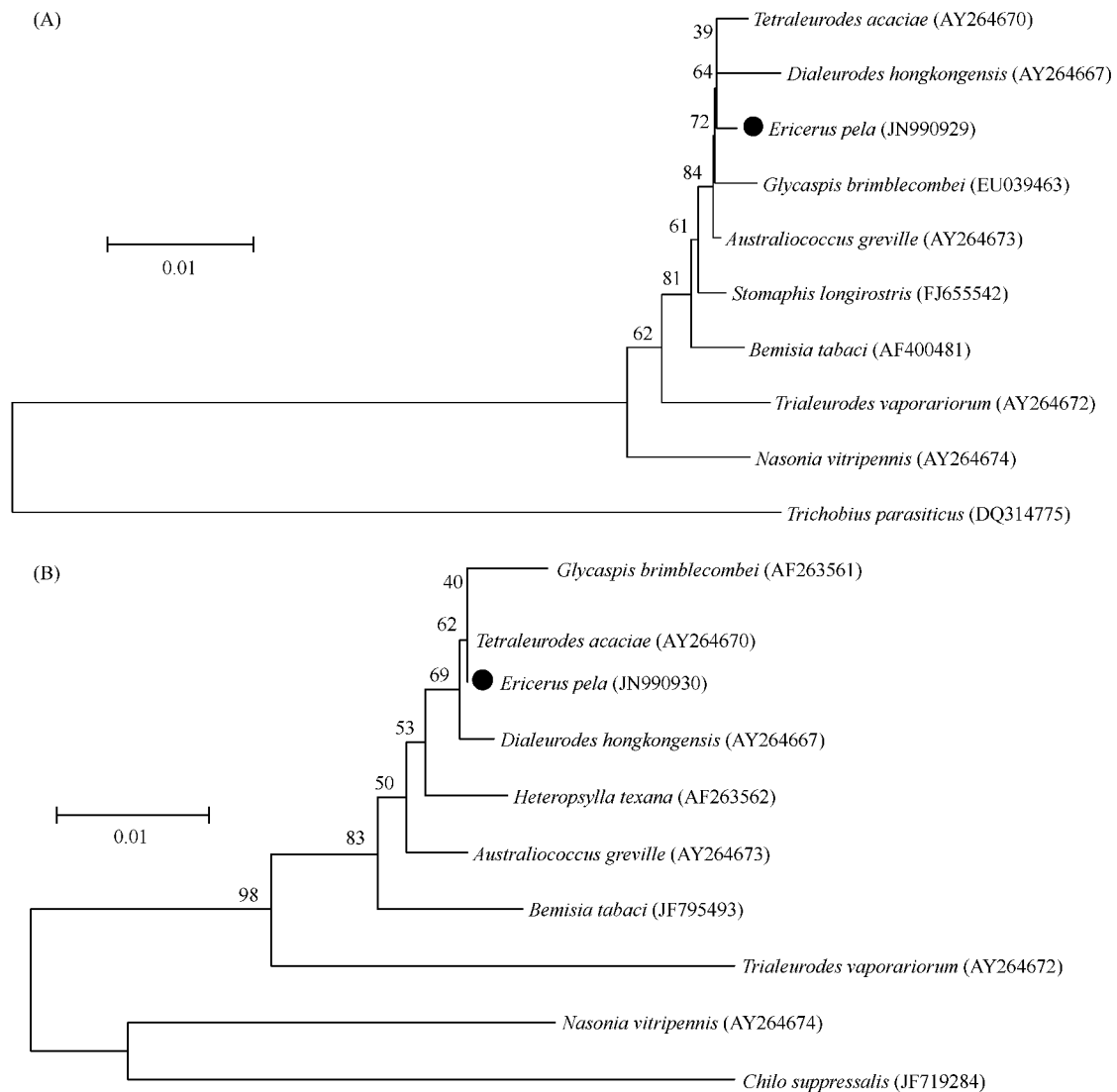


图2 基于16S rDNA序列(A)和23S rDNA序列(B)的白蜡虫体内杀雄菌属的系统进化树

Fig. 2 Phlogenetic tree of endosymbiotic *Arsenophonus* from *E. pela* bases on 16S rDNA (A) and 23S rDNA (B) sequences. The numbers at each note is the percentage supported by bootstrap. Scale length, 1%, is substitutions per residue. GenBank accession numbers of sequences are shown in the figure after the science name of each host.

#### 2.4 杀雄菌属共生菌在6个白蜡虫地理种群中的PCR检测

利用ARS16S-F3/16S-R3为引物,以白蜡虫 $\beta$ -actin基因为内参,在6个白蜡虫地理种群中均检测出杀雄菌属共生菌。其中昭通、昆明、金口河、长春4个白蜡虫地理群的10个样本中均检测出了杀雄菌属共生菌(图3-A, B, C, E),杭州的10个样本中有8个样本检测到含有杀雄菌属共生菌(图3-D),江华的10个样本中有4个样本检测到含有杀雄菌属共生菌(图3-F)。而且,即使在同一白蜡虫

地理群中,杀雄菌属共生菌的含量也有所差别。

#### 2.5 雄菌属共生菌在3个白蜡虫地理种群中的绝对定量分析

利用ARS16S-F3 / 16S-R3为引物,得到白蜡虫杀雄菌属共生菌特异16S rDNA的标准曲线和溶解曲线。曲线的回归系数 $R^2 = 0.993$ ,曲线的扩增效率为 $E = 96.3\%$ 。溶解曲线为单一峰,说明引物具有很好的特异性。以上结果显示此标准曲线能够准确地反映目的产物的扩增。

昭通白蜡虫地理群的10个样本中杀雄菌属共

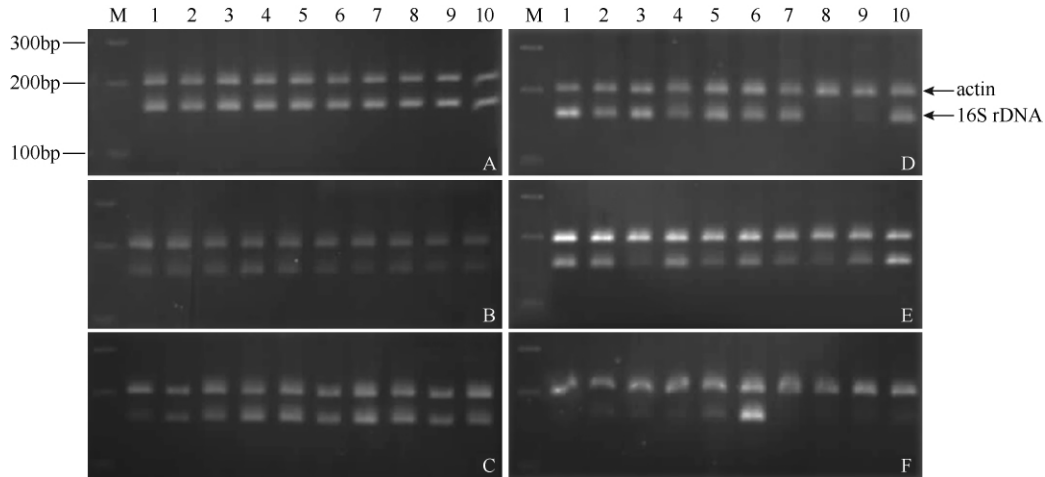


图3 不同白蜡虫地理种群中杀雄菌属共生菌的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification for *Arsenophonus* from different populations of *E. pella*. PCR amplification for *Arsenophonus* from (A) Zhaotong population, (B) Kunming population, (C) Jinkouhe population, (D) Hangzhou population, (E) Changchun population, (F) Jianghua population. The ten lanes from one to ten in each picture are the ten samples from each population.

生菌的原始拷贝数分别为:  $8.05 \times 10^6$ 、 $4.69 \times 10^6$ 、 $2.44 \times 10^6$ 、 $5.21 \times 10^6$ 、 $4.56 \times 10^6$ 、 $9.92 \times 10^6$ 、 $9.78 \times 10^6$ 、 $1.90 \times 10^7$ 、 $4.80 \times 10^6$ 、 $3.38 \times 10^6$  (图 4-A), 平均值为  $7.18 \times 10^6$ , 标准误为  $1.54 \times 10^6$ ; 昆明白蜡虫地理群的 10 个样本中杀雄菌属共生菌的原始拷贝数分别为:  $1.06 \times 10^3$ 、 $2.88 \times 10^3$ 、 $2.85 \times 10^3$ 、 $8.96 \times 10^3$ 、 $6.04 \times 10^3$ 、 $2.05 \times 10^3$ 、 $6.87 \times 10^2$ 、 $3.10 \times 10^3$ 、 $2.04 \times 10^3$ 、 $2.32 \times 10^3$  (图 4-B), 平均值为  $3.20 \times 10^3$ , 标准误为  $7.87 \times 10^2$ ; 金口河白蜡虫地理群的 10 个样本中杀雄菌属共生菌的原始拷贝数分别为:  $1.02 \times 10^3$ 、 $6.85 \times 10^3$ 、 $4.30 \times 10^3$ 、 $2.35 \times 10^5$ 、 $2.71 \times 10^5$ 、 $2.02 \times 10^4$ 、 $1.62 \times 10^5$ 、 $1.01 \times 10^5$ 、 $1.42 \times 10^4$ 、 $6.35 \times 10^3$  (图 4-C), 平均值为  $8.21 \times 10^4$ , 标准误为  $3.30 \times 10^4$ 。昭通地理群的杀雄菌属共生菌含量显著高于金口河和昆明, 而昆明和金口河白蜡虫的菌杀雄菌属含量无显著差异 ( $F = 36.2$ ;  $df = 2, 29$ ;  $P < 0.0001$ ) (图 4-D)。昭通、昆明、金口河 3 个白蜡虫地理群的雌雄平均性比分别为 1:2.0、1:2.1、1:2.0<sup>[15]</sup>, 将此 3 个地理群白蜡虫体内的杀雄菌属共生菌含量与其雌雄性比进行相关性分析, 结果表明白蜡虫的杀雄菌属共生菌含量与性比不相关 ( $\tau = 0.82$ ,  $z = 1.22$ ,  $p = 0.22$ )。

### 3 讨论

杀雄菌属共生菌是属于 *Proteobacteria*  $\gamma$  亚类肠杆菌科的一类细菌, 广泛存在于金小蜂、粉虱、木虱、蚜虫、锥蝽、革蜱、蝠蝇、虱蝇等多种昆虫体内<sup>[16-18]</sup>。本实验采用 16S rDNA 文库的方法, 首次在白蜡虫体内鉴定出杀雄菌属共生菌, 其 16S rDNA 序列 (G+C) 含量为 53.83%, 说明此类细菌为次生共生菌, 与寄主关系松散<sup>[19]</sup>。杀雄菌属共生菌最显著的作用就是通过杀死寄主的雄性胚胎, 从而改变寄主后代的性比。在丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 中, 杀雄菌属杀死大约 80% 的雄性胚胎而使后代雌性比增大<sup>[20]</sup>, 但在美洲钝眼蜱 *Amblyomma americanum*、骚扰锥蝽 *Triatoma infestans* 和卡纳尔鸽虱蝇 *Pseudolynchia canariensis* 中杀雄菌属却不起改变性比的作用, 因为不管宿主是否感染杀雄菌属, 后代性比均为 1:1<sup>[21-23]</sup>。白蜡虫雌雄二型, 只有雄白蜡虫才有产蜡的习性, 白蜡虫雄性比的高低直接影响着白蜡的产量, 因此, 白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的研究对于白蜡生产具有重要意义。本实验选取了雌雄性比有确切统计的昭通、昆明、金口河 3 个白蜡虫地理种群做绝对荧光定量。这 3 个

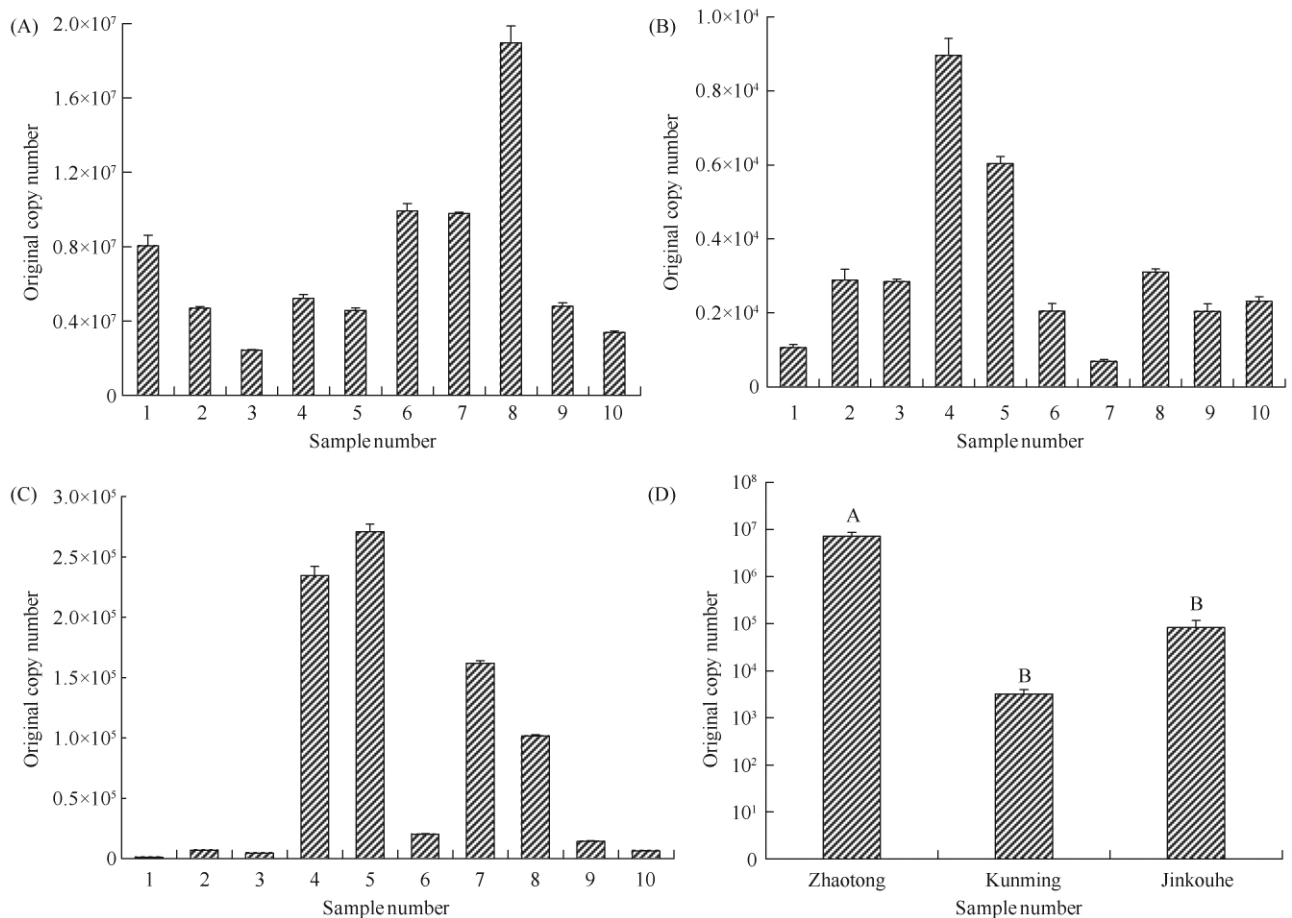


图4 杀雄菌属共生菌在3个白蜡虫地理种群中的荧光定量PCR结果及比较分析

Fig. 4 Quantitative real-time PCR and analysis of *Arsenophonus* in three populations of *E. pela*. Original copy numbers of *Arsenophonus* from *E. pela* of (A) Zhaotong population, (B) Kunming population, (C) Jinkouhe population. (D) Average original copy number of *Arsenophonus* from *E. pela* of different geographic populations, the same letters are not significantly different ( $P > 0.01$ ).

地理种群的白蜡虫平均性比基本相同,但是杀雄菌属共生菌的含量却有显著差异,相关性分析结果表明白蜡虫体内杀雄菌属共生菌的含量与性比不相关。

杀雄菌属共生菌在节肢动物中有着广泛的寄主谱,既可以垂直传播也可以在不同物种间水平传播或多次感染寄主<sup>[24-25]</sup>。本研究发现,白蜡虫雌雄虫均含有杀雄菌属共生菌,且雌雄虫中杀雄菌属的16S rDNA和23S rDNA序列分别完全一致,基于16S rDNA和23S rDNA基因序列的系统发育分析表明,白蜡虫体内的杀雄菌属共生菌与半翅目粉虱科、木虱科昆虫体内的杀雄菌属共生菌最为接近,而与双翅目虱蝇科、膜翅目金小蜂科以及鳞翅目草螟科昆虫体内的杀雄菌属共生菌距离较远,这与分类学

上的几种宿主昆虫的系统进化关系较为接近,结合白蜡虫的生物学特性,可知杀雄菌属在白蜡虫中是以垂直方式传播。

同时,杀雄菌属共生菌还与其它细菌存在多重感染的现象<sup>[26]</sup>。对美洲钝眼蜉的研究表明,7个种群同时检测到了杀雄菌属共生菌和立克次氏体,数据统计表明它们的侵染频率之间存在负相关,但是在烟粉虱中并不存在这种现象。本研究的16S rDNA文库测序结果表明,白蜡虫体内同时含有杀雄菌属共生菌和立克次氏体,且含有立克次氏体16SrDNA片段的克隆数要多于杀雄菌属,推测杀雄菌属共生菌在白蜡虫体内的含量没有立克次氏体丰富,但白蜡虫感染杀雄菌属共生菌是否会阻止或减少立克次氏体的感染需要进一步的验证。

目前虽然已经发现杀雄菌属寄生于多种昆虫体内,但其具体功能却不是很清楚,尤其是对寄主的影响方面,除了杀雄作用外<sup>[20]</sup>,尚无明确的报道,因此杀雄菌属共生菌对寄主的作用仍需更多研究。

## 参考文献

- [1] 阮永明, 李月红. 烟粉虱共生细菌的研究进展. 浙江师范大学学报 (自然科学版) [ *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)* ], 2007, 30 (4): 453-459.
- [2] Murad G, Svetlana K. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Management Science*, 2009, 65: 939-942.
- [3] 徐红星, 郑许松, 刘淑平, 叶恭银, 吕仲贤. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. 昆虫知识 (*Chinese Bulletin of Entomology*), 2009, 46 (3): 350-354.
- [4] Zchori-Fein E, Brown JK. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci*. *Annals of the Entomological Society of America*, 2002, 95 (6): 711-718.
- [5] 董钧锋, 王琛柱, 钦俊德. 昆虫性比因子及其作用机理. 昆虫知识 (*Chinese Bulletin of Entomology*), 2001, 38 (3): 173-177.
- [6] 褚栋, 张友军, 毕玉平, 付海滨. *Wolbachia* 属共生菌及其对节肢动物宿主适合度的影响. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45 (5): 817-820.
- [7] Nirgianake A, Banks GK, Frohlich DR, Veneti Z, Braig HR, Miller TA, Bedford ID, Markham PG, Savakis C, Bourtzis K. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology*, 2003, 47 (2): 93-101.
- [8] Sebastien A, Gruber MAM, Lester PJ. Prevalence and genetic diversity of three bacterial endosymbionts (*Wolbachia*, *Arsenophonus* and *Rhizobiales*) associated with the invasive yellow crazy ant (*Anoplolepis gracilipes*). *Insectes Sociaux*, 2012, 59: 33-40.
- [9] Nováková E, Václav H, Moran NA. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 143-157.
- [10] Thao ML, Baumann P. Evidence for multiple acquisition of by whiefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Current microbiology*, 2004, 48: 140-144.
- [11] 陈晓鸣, 王自力, 陈勇, 叶寿德, 王绍云, 冯颖. 环境因子对白蜡虫泌蜡的影响. 生态学报 (*Acta Ecologica Sinica*), 2007, 27 (1): 103-112.
- [12] 王远亮, 杨瑞红, 毛爱军, 王加启, 董志扬. 采用未培养技术对荷斯坦奶牛瘤胃细菌多样性进行初步分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45 (6): 915-919.
- [13] 王渭霞, 罗举, 赖凤香, 傅强. 水稻褐飞虱内生共生细菌 *Arsenophonus* 的鉴定和系统分析. 昆虫学报 (*Acta Entomologica Sinica*), 2010, 53 (6): 647-654.
- [14] 黄珍, 谭志琼, 阮云泽. 香蕉园土壤 16S rDNA 文库分析. 热带作物学报 (*Chinese Journal of Tropical Crops*), 2010, 31 (6): 989-993.
- [15] 陈晓鸣. 白蜡虫自然种群生态学. 北京: 科学出版社, 2011: 15-16.
- [16] Trowbridge RE, Dittmar K, Whiting MF. Identification and phylogenetic analysis of *Arsenophonus*- and *photorhabdus*-type bacteria from adult Hippoboscidae and strebidae (Hippoboscoidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2006, 91: 64-68.
- [17] Dergousoff SJ, Chilton NB. Detection of a new *Arsenophonus*-type bacterium in Canadian populations of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Experimental and Applied Acarology*, 2010, 52: 85-91.
- [18] Ahmed MZ, Ren SX, Xue X, Li XX, Jin GH, Qiu BL. Prevalence of Endosymbionts in *Bemisia tabaci* Populations and Their In Vivo Sensitivity to Antibiotics. *Current Microbiology*, 2010, 61: 322-328.
- [19] 谭周进, 谢丙炎, 肖启明, 杨宇红, 冯兰香. 烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的变异与系统发生. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44 (4): 436-439.
- [20] Skinner SW. Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting sex ratio in the parasitoid wasp, *Nasonia* (= *Mormoniella*) *vitripennis*. *Genetics*, 1985, 109: 745-754.
- [21] Clay K, Klyachko O, Grindle N, Civitello D, Oleske D, Fuqua C. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Molecular Ecology*, 2008, 17: 4371-4381.
- [22] Hypsa V, Dale C. In vitro culture and phylogenetic analysis of "*Candidatus Arsenophonus triatominarum*," an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997, 47 (4): 1140-1144.
- [23] Dale C, Beeton M, Harbison C, Jones T, Pontes M.



- Isolation, pure culture, and characterization of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*,” an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (4) : 2997-3004.
- [24] Gherna RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L, Brenner DJ. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, 41 (4) : 563-565.
- [25] Taylor GP, Coghlin PC, Floate KD, Perlman SJ. The host range of the male-killing symbiont *Arsenophonus nasoniae* in filth fly parasitoids. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 106: 371-379.
- [26] Wilkes TE, Darby AC, Choi JH, Colbourne JK, Werren JH, Hurst GDD. The draft genome sequence of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of *Nasonia vitripennis*, reveals genes associated with virulence and symbiosis. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19: 59-73.

## Molecular detection of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from *Ericerus pela* Chavannes

Weiwei Liu, Pu Yang, Xiaoming Chen<sup>\*</sup>, Dongli Xu, Yangfei Li

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, China

**Abstract:** [Objective] The purpose of this study is to examine the relation between the sex ratio of *Ericerus pela* and its symbiotic bacterial *Arsenophonus*. [Methods] The symbiotic bacterial diversity in male *Ericerus pela* was determined through sequencing 16S rDNA gene library. PCR amplification for *Arsenophonus* was performed by using two 16S rDNA specific primers and 23S rDNA specific primer. The molecular detection of *Arsenophonus* in six geographic populations of *E. pela*, namely Zhaotong, Kunming, Jinkouhe, Hangzhou, Changchun, and Jianghua, were performed by semi-quantitative PCR. The absolute concentrations of *Arsenophonus* in *E. pela* of Zhaotong, Kunming, Jinkouhe geographic populations were determined using absolute quantitative real-time PCR. [Results] Two different 16S rDNA sequences were obtained; the sizes were 445bp and 1462bp respectively. A 23S rDNA sequence was obtained, the size was 582bp. Some *E. pela* individuals of Hangzhou and Jianghua were not infected with *Arsenophonus*. The contents of *Arsenophonus* in *E. pela* of Zhaotong were significantly higher than that of Kunming and Jinkouhe, while the contents of *Arsenophonus* from the latter two geographic populations were not significantly different. [Conclusion] *Arsenophonus* is not responsible for the sex ratio of *E. pela*.

**Keywords:** *Ericerus pela*, symbiotic bacteria *Arsenophonus*, 16S rDNA, sex ratio, absolute quantification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Researchers of China (31000983)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-871-3862047; E-mail: cafcxm@tom.com

Received: 20 February 2012/ Revised: 1 April 2012