

烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的特性研究*

谭周进¹ 谢丙炎^{2*} 周清明¹ 杨宇红² 肖启明¹

(湖南农业大学 长沙 410128) (中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要 对烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的酶切结果及部分生物体 16S rDNA 的 (G+C)% 分析结果表明, 烟粉虱初生内共生菌的 16S rDNA 能够被 *EcoR* I 酶切成两个片段, 而不能分别被 *Bam*H I 与 *Sac* I 酶切, 烟粉虱次生内共生菌的 16S rDNA 没有 *Bam*H I 内切酶位点, 而能够分别被 *EcoR* I 或 *Sac* I 酶切成大小不同的两个片段。(G+C)mol% 与菌的分类地位有关, 同时还与菌的可培养能力有关。*Proteobacteria* γ 亚纲的烟粉虱初生内共生菌与 α 亚纲的 *Rickettsia*、线粒体的 16S rDNA 相似, 富含 (A+T)mol%, 具低的 (G+C)mol%。而 γ 亚纲的次生内共生菌及大肠杆菌与 β 亚纲的 mealybugs 初生内共生菌的 16S rDNA 相似, 富含 (G+C)mol%。说明初生内共生菌可能与烟粉虱同时发生, 并且形成一种非常紧密的共生关系, 次生内共生菌与烟粉虱关系松散一些, 其特性近似于自由生活的细菌, 更有可能获得纯培养体。16S rDNA 的系统进化树表明, 烟粉虱次生内共生菌属于 *Proteobacteria* γ -3 亚纲, 而初生内共生菌属于 *Proteobacteria* γ 亚纲的另一分支。

关键词 烟粉虱, 16S rDNA, 内共生菌, 系统发育

中图分类号: Q93-936 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)03-0487-05

Studies on Characteristics of 16S rDNA Sequences from Endosymbionts in *Bemisia tabaci* *

TAN Zhou-Jin¹ XIE Bing-Yan^{2*} ZHOU Qing-Ming¹ YANG Yu-Hong² XIAO Qi-Ming¹

(Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract The studies on enzymes digested sites and (G+C)mol% of 16S rDNA gene from endosymbionts in *B. tabaci* were conducted. The results showed that 16S rDNA from primary endosymbiont in *B. tabaci* could be digested into two segments by *EcoR* I, but not by *Bam*H I or *Sac* I. 16S rDNA from secondary endosymbiont in *B. tabaci* could be digested into two segments by *EcoR* I or *Sac* I respectively, but not by *Bam*H I. The (G+C)mol% of 16S rDNA varied according to creature species and culturable characters. For example, 16S rDNA of primary endosymbiont (*Proteobacteria* γ subdivision) in *B. tabaci* were as rich in (A+T)mol% and poor in (G+C)mol% as 16S rDNA of *Rickettsia* and mitochondria (*Proteobacteria* α subdivision), which are cell wares or unculturable microbes. The 16S rDNA from secondary endosymbiont (*Proteobacteria* γ subdivision) in *B. tabaci* and primary endosymbiont (*Proteobacteria* β subdivision) in mealybugs, both were unculturable, were as rich in (G+C)mol% as those of *E. coli* (*Proteobacteria* γ subdivision), a kind of culturable bacterium. As a result, primary endosymbiont was a concurrence and concerted evolution with *B. tabaci*. Secondary endosymbiont was similar to free-living bacteria and might be easier to be cultured. Molecular phylogenetic trees based on 16S rDNA of different creatures showed that secondary endosymbiont in *B. tabaci* was *Proteobacteria* γ -3 subdivision. Primary endosymbiont in *B. tabaci* was another *Proteobacteria* γ subdivision.

Key words *Bemisia tabaci*, 16S rDNA, Endosymbionts, Phylogeny

烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 是一种重要农业害虫^[1], 其内共生菌分为初生内共生菌 (Primary symbiont) 和次生内共生菌 (Secondary symbiont)^[2]。rDNA 是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标, 素有

“细菌化石”之称^[3]。通过一种进化分枝学 (cladistics) 技术, 原核细胞的 16S rDNA 序列和真核生物的 18S rDNA 碱基序列已广泛用于测定不同生物之间的进化关系^[4]。Woese 及其同事们最先利用

* 国家重点基础研究发展规划项目 (No. 2002CB111400)

** 通讯作者 E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

收稿日期 2006-08-14, 修回日期 2006-09-19

16S rDNA 进行了生物进化关系的研究^[3,5]。*Proteobacteria* 包括了许多与动植物关系密切的种类,如 α 亚类的 *Rhizobacteria*、*Agrobacteria*、植物线粒体的起源体^[6]、 γ 亚类的海洋无脊椎动物硫化内共生菌^[7]。内共生菌与立克次氏体和衣原体等专性细胞内病原体或支原体亲缘关系较近^[3],并且不能人工培养,形态特征和 DNA 的 $(G + C)$ mol% 是对其鉴定主要依靠^[8]。核糖体 DNA (rDNA) 基因序列为原核及真核生物的系统发生提供了有价值的遗传信息^[3,9]。酶切位点分析,对构建遗传图谱^[10]、研究基因突变^[11]等都有很好的价值,也是一种很好的手段。

为了探索烟粉虱内共生菌的进化地位,研究内共生菌 16S rDNA 的 $(G + C)$ mol%、限制性酶切特性及系统进化树具有重要的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

供试烟粉虱为 B 型成虫,采自保存在中国农业科学院蔬菜花卉研究所温室中的实验种群。寄主植物包括:黄瓜 (*Cucumis sativus*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、一品红 (*Euphorbia pulcherrima*)、牵牛花 (*Ipomoea purpurea*)、辣椒 (*Capsicum annum*)、甘蓝 (*Brassica Oleracea*) 等植物。成虫采回后立即放于 -20°C 冰箱中冻死,保存备用。

PCR 扩增试剂 (dNTPs, Taq 酶) DNA 快速回收试剂盒主要购自清华大学天为时代科技有限公司、Gibco 等公司。

1.2 烟粉虱内共生菌模板 DNA 的提取

DNA 的提取采用改进的 SDS 裂解法^[12]。

1.3 PCR 扩增引物的设计与合成

烟粉虱内共生菌 16S rDNA 参照文献^[13]设计的引物,其序列为:G :28F-5' :TGCAAGTCGAGCGGC ATCAT-3' ; 1098R-5' : AAAGTTCCCGCCTTATGCGT-3' 用于扩增初生内共生菌约 1000bp 的产物;H :92F-5' : TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG-3' ; 1343R-5' : CCCGGAACGTATTC ACCGTAG-3' 用于扩增次生内共生菌 1250bp 的产物。引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 PCR 扩增及产物序列的测定

烟粉虱内共生菌 16S rDNA PCR 在 $25\mu\text{L}$ 体系中

进行,反应体系及 PCR 反应参数参照文献^[14]。将 16S rDNA PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 快速回收试剂盒回收目的片段,回收产物 PCR 重扩后直接送 PCR 产物到上海博亚生物技术有限责任公司进行测序(测序仪为 ABI PRISM 377-96)。测序结果送 GenBank 进行登记。

1.5 16S rDNA 的酶切

按照内切酶反应体系说明进行配制,在 37°C 反应 9h,然后用 1.2% 琼脂糖电泳检测。*Bam*H I 的 $10 \times$ NEB 缓冲液用 $10 \times$ NEBuffer *Bam*H I, *Sac*I $10 \times$ NEB 缓冲液用 $10 \times$ NEBuffer 1, *Eco*R I $10 \times$ NEB 缓冲液用 $10 \times$ NEBuffer *Eco*RI。

1.6 16S rDNA 序列分析

从 GenBank 中下载相关序列一起进行分析。分子系统树建立所用序列的基本情况如表 1。将表 1 中的序列用 Clustal W 排列 DNA 同源序列 (alignment),用 MEGA2.1 (2001) (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 2.1) 软件计算遗传距离,并用 ME (Minimum evolution) 法、NJ (Neighbor-joining) 法聚类分析构建分子系统树。Bootstrap (自举法) 为 1025 次检测 (replication)。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱内共生菌 16S rDNAs 的 $(G + C)$ mol% 含量分析

由表 1 可知, *Proteobacteria* γ -亚类的烟粉虱初生内共生菌 16S rDNA $(G + C)$ mol% 为 47% ~ 48%, 蚜虫的初生内共生菌 16S rDNA $(G + C)$ mol% 为 48% 左右, *S. phillyreae* 初生内共生菌 16S rDNA $(G + C)$ mol% 为 47.76%, γ -亚类的 *T. abutilonea* 初生内共生菌与 *T. vaporariorum* 初生内共生菌 16S rDNA $(G + C)$ mol% 分别为 48.43%、49.07%, *S. phillyreae* 初生内共生菌 16S rDNA $(G + C)$ mol% 为 47.76%。 α -亚类的不能培养的真细菌或其演化体也具有低 $(G + C)$ mol% 的特点,如 *R. peacockii* 的 16S rDNA $(G + C)$ mol% 为 48.98%, *W. pipientis* 的 16S rDNA $(G + C)$ mol% 为 47.61%, *Ateles geoffroyi* 线粒体 16S rRNA 基因的 $(G + C)$ mol% 为 39.43%, *Coluber zebrinus* 线粒体 16S rRNA 基因的 $(G + C)$ mol% 为 39.40%。 β -亚类的不能培养的 *Candidatus Tremblaya princeps* (primary endosymbionts in mealybugs) 却具有高 $(G + C)$ mol% 的特点,为 55% 左右,而 *Proteobacteria* γ -亚类

肠杆菌科的部分细菌 16S rDNA 富含(G+C)% ,如能够培养的 *E. coli* (G+C)mol% 为 54.8% 左右,不能够培养的烟粉虱次生内共生菌 16S rDNA 富含(G+C)mol% ,为 54.3% 左右。另外,能够培养的真细菌(*Eubacteria*)*L. delbrueckii* 的 16S rDNA(AB007908) (G+C)mol% 为 53.63% ,古细菌(*Archaea*)产甲烷细菌(*M. mazei*)16S rDNA(A Y196685)(G+C)mol% 为 56.81%。

表 1 来自不同生物体中 16S rDNA 基因的(G+C)mol%

生物或有机体	生物或有机体特征	Accession number	(G+C) mol%	Subdivision
<i>B. tabaci</i> -P4	unculturable	AY429619	47.58%	γ
<i>B. tabaci</i> -P2	unculturable	AY429620	47.69%	γ
<i>B. tabaci</i> -P3	unculturable	AY371188	48.00%	γ
<i>B. tabaci</i> -P1	unculturable	AY429623	47.57%	γ
<i>B. tabaci</i> -S1	unculturable	AY429618	53.96%	γ
<i>B. tabaci</i> -S3	unculturable	AY429614	54.53%	γ
<i>B. tabaci</i> -S2	unculturable	AY429617	54.47%	γ
<i>B. aphidicola</i>	unculturable	Z19056	48.74%	γ
<i>Trialeurodes abutilonea</i> -P	unculturable	AF400482	48.43%	γ
<i>T. vaporariorum</i> -P	unculturable	Z11928	49.07%	γ
<i>Rickettsia peacockii</i>	unculturable	AY360094	48.98%	α
<i>Wolbachia pipientis</i>	unculturable	AY549180	47.61%	α
<i>Siphoninus phillyreae</i> -P	unculturable	Z11927	47.76%	γ
<i>C. T. princeps</i>	unculturable	AF481909	56.93%	β
<i>Pinus thunbergii</i> -C	cell ware	D17510	56.27%	-
<i>Ateles geoffroyi</i> -M	cell ware	AB116026	39.43%	-
<i>Escherichia coli</i>	culturable	AJ605115	54.80%	γ
<i>Agrobacterium vitis</i>	culturable	X67225	54.85%	α
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	culturable	AB007908	53.63%	-
<i>Methanosarcina mazei</i>	culturable	AY196685	56.81%	-

注 :C chloroplast ,M mitochondrial ,P Primary endosymbiont ,S Secondary endosymbiont

2.2 初生内共生菌 16S rDNA 的酶切结果

16S rDNA 的酶切位点很多,本研究进行了 *Bam*H I、*Sac* I、*Eco*R I 三种限制性内切酶位点的分析。将北京地区 7 种植物寄主来源烟粉虱初生内共生菌经 G 引物 PCR 扩增得到的 16S rDNA 重扩纯化后,经 *Bam*H I、*Sac* I、*Eco*R I 三种内切酶作用后的结果如图 1。由图 1 可知,烟粉虱初生内共生菌 G 引物 PCR 扩增得到的 16S rDNA 没有 *Bam*H I 与

Sac I 内切酶位点,而存在 *Eco*R I 酶切位点,经 *Eco*R I 酶切后,得到长度约 500bp 和 600bp 的 2 个片段,这与 GenBank 中已报道序列的酶切位点分析结果是一致的。

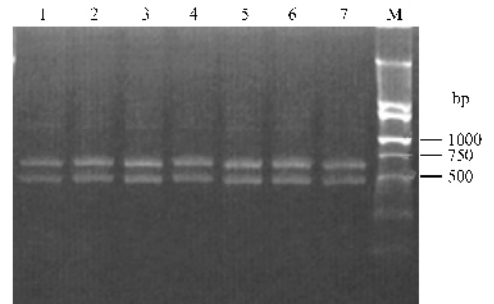


图 1 G 引物 PCR 扩增产物的 *Eco*R I 酶切电泳图

1 黄瓜 2 番茄,3 烟草,4 一品红,5 牵牛花,6 辣椒,7 甘蓝,M marker

2.3 次生内共生菌 16S rDNA 的酶切结果

将 7 个寄主来源的烟粉虱次生内共生菌经 H 引物 PCR 扩增到的 16S rDNA 重扩后,分别经 *Bam*H I、*Sac* I、*Eco*R I 三种内切酶作用后的结果如图 2、图 3。烟粉虱次生内共生菌 H 引物 PCR 扩增得到的 16S rDNA 没有 *Bam*H I 内切酶位点,而存在 *Eco*R I 与 *Sac* I 酶切位点,分别经 *Eco*R I 或 *Sac* I 酶切后,得到长度约 500bp 和 750bp 的 2 个片段。

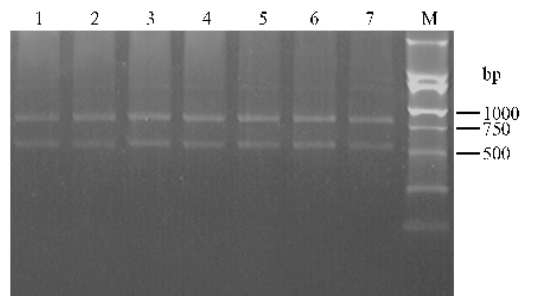


图 2 H 引物 PCR 扩增产物的 *Sac* I 酶切电泳图

1 黄瓜 2 番茄,3 烟草,4 一品红,5 牵牛花,6 辣椒,7 甘蓝,M marker

2.4 16S rDNA 的分子系统树

16S rDNA 的 NJ 分子系统树如图 4。结果表明,烟粉虱的次生内共生菌属于肠杆菌科,与 *E. coli*、*B. aphidicola* (蚜虫的初生内共生菌)的亲缘最近,而 *Proteobacteria* α 亚类的 *W. pipientis* 与 *R. peacockii* 接近,并且更接近于肠杆菌科,这对于解释 *Wolbachia* 在多种生物体之间可以相互感染,甚至于可以感染 33% 的烟粉虱等,都将提供很好的依据。叶绿体及线粒体与 *Proteobacteria* α 亚类的菌接近,与其起源

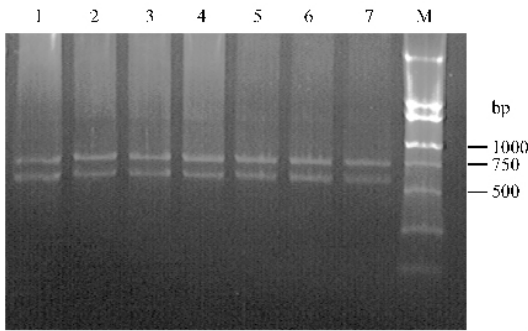


图3 H引物PCR扩增产物的EcoRI酶切电泳图
1 黄瓜 2 番茄 3 烟草 4 一品红 5 牵牛花 6 辣椒 7 甘蓝 M marker

的推测相一致。而 *Proteobacteria*β 亚类的 *C. T. princeps* 列为单独一支。

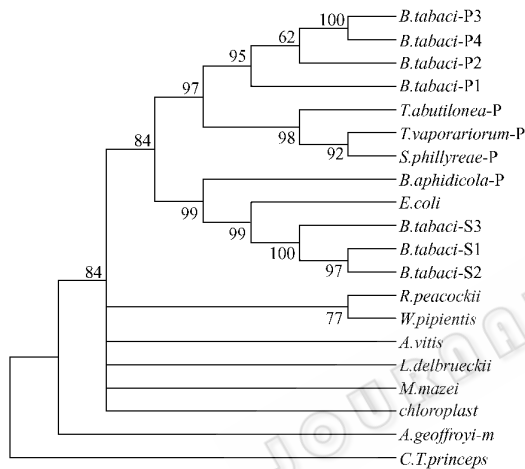


图4 烟粉虱内共生菌及不同有机体的16S rDNA分子系统树

遗传距离用 Tamura-Nei 公式计算,树用邻近连接法(NJ)构建,枝长代表了分歧程度,各枝上的数字是1025次bootstrap重抽样分析的支持百分比

m 线粒体 P 初生内共生菌 S 次生内共生菌

3 讨论

低的(G + C)mol% 是一个反应寄生物与寄主在远古时代就结合的特征,而高的(G + C)mol% 则可以反应其接近自由生活细菌的方面^[15]。16S rDNA (G + C)mol% 分析结果表明, *Proteobacteria* 的 α 亚类与 γ 亚类难培养初生内共生菌具有低(G + C)mol% 特点,为47%左右,线粒体可能起源于 *Proteobacteria* 的 α-亚类菌^[6],其16S rDNA(G + C)mol% 为40%左右。 *Proteobacteria*β 亚类的难培养菌16S rDNA 富含

(G + C)mol% ,为55%左右。 *Proteobacteria*γ 亚类肠杆菌科的难培养次生内共生菌与可培养菌 *E. coli* 的16S rDNA 富含(G + C)mol% ,为54%左右,与可培养细菌的16S rDNA 基因具相似的特征。说明烟粉虱初生内共生菌可能与烟粉虱同时发生,并且形成一种非常紧密的共生关系,次生内共生菌与烟粉虱关系松散一些,其特性近似于自由生活的细菌,更有可能获得纯培养体。Ochman 等根据16S rDNA 的分析认为,蚜虫的初生内共生菌大约在4.2亿年以前就与 *E. coli* 发生了分化,而次生内共生菌则在大约2.5亿年以前与 *E. coli* 发生了分化^[16]。如果这种推测正确的话,那么说明两类内共生菌与宿主之间存在一种高度适应与相互依赖的关系,16S rDNA 的(G + C)mol% 反应了内共生菌发生的早晚。

有人认为,哺乳动物的一些专性寄生病原体(如立克次氏体)来源于植物相关的细菌,然后通过植物-昆虫的桥梁作用演化而来^[17]。根据基因组的特性分析可以推测,自由生活的微生物在远古时代与昆虫结合,相互依赖,然后共同进化,形成非常严密的共生体(初生内共生菌)。昆虫生活过程中,有可能将自身的共生体传给植物寄主,然后发生演化。也可能在生活过程中摄取环境中的微生物,然后演化成一种共生体(次生共生菌),这一类共生菌的水平传播,有可能在不同生物之间进行感染,然后演化成与另一寄主关系不同的生物体-病原体。烟粉虱的内共生菌与肠道细菌亲缘关系很近,可以推测内共生菌可能最初寄生在体内,继而与宿主协同进化,形成共生关系。初生内共生菌16S rDNA 富含(A + T)% (G + C)mol% 为47%左右,更能够说明其与宿主起源的一致性,而次生内共生菌16S rDNA 富含(G + C)mol% ,为53.4%,与能够人工培养的细菌的16S rDNA 接近。根据内共生菌与昆虫的关系,可以将昆虫的初生内共生菌视为一种“细胞器”。进行相关有机体总DNA(G + C)mol% 的研究,对于探索生命起源、内共生菌分类地位的确定等,都将起到重要的作用。

参考文献

[1] Zeidan M, Czosnek H. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1994, 7 (6): 792 ~ 798.
[2] 谭周进, 肖启明, 谢丙炎, 等. 微生物学通报, 2005, 32(4): 40-44
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [3] Woese C R. Microbiol Rev ,1987 **51**(2): 221 ~ 271.
- [4] Madigan M , Martink J , Parker J. Brock Biology of Microorganisms 9th ed. 2000 , Prentice Hall.
- [5] Olsen G J , Lane D J , Giovannoni S J , *et al.* Annu Rev Microbiol , 1986 **40** 337 ~ 365.
- [6] Yang D , Oyaizu Y , Oyaizu H , *et al.* Proc Natl Acad Sci USA , 1985 , **82**(13) : 4443 ~ 4447.
- [7] Distel D L , Lane D L , Olsen G J , *et al.* J Bacteriol , 1988 , **170** : 2506 ~ 2510.
- [8] Houk E J , McLean D L , Criddle R S. J Invertebr Pathology , 1980 **35** : 105 ~ 106.
- [9] Bruns T D , White T J , Taylor J W. An Rev EcoI Syst , 1991 , **22** : 525 ~ 564.
- [10] 郑文竹 , 洪夏. 厦门大学学报(自然科学版) , 2002 , **41**(1) : 112 ~ 116.
- [11] 熊莉娟 , 罗端德 , 曾令兰 , 等. 中国病毒学 , 2002 , **17**(3) : 195 ~ 197.
- [12] 萨姆布鲁克 J , 弗里奇 E F , 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京 科学出版社 2002 . pp. 25 ~ 26.
- [13] Zchori-fein E , Brown J K. Entomological Society of America 2002 , **95** (6) : 711 ~ 718.
- [14] 谭周进 , 谢丙炎 , 肖启明 , 等. 微生物学报 , 2004 , **44**(4) : 436 ~ 439.
- [15] Moran N A , Telang A. Bioscience , 1998 **48** : 295 ~ 304.
- [16] Ochman H , Wilson A. J Mol Evol , 1987 **26** : 74 ~ 86.
- [17] Weisburg W G , Woese C R , Dobson M E , *et al.* Science , 1985 **230** : 556 ~ 558.