

广东省蚊虫感染沃尔巴克氏体初步调查研究

林立丰, 吴德, 张欢, 寇婧, 周惠琼, 段金花, 吴军, 刘文华
广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430

摘要: **目的** 了解广东省蚊虫种群中沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)的分布及其基因型别。**方法** 利用*Wolbachia*的*wsp*基因序列建立PCR检测方法,对蚊科中库蚊属、伊蚊属、阿蚊属和按蚊属部分蚊虫种类进行检测,同时利用Mega 5.2软件对所获基因序列进行系统分析。**结果** 分别从致倦库蚊、骚扰阿蚊、白纹伊蚊及未分型蚊种中检测到12条目的基因序列,其中11条成功进行测序,这些序列分别属于A和B 2个超级基因组,分布在5个不同的基因族中。**结论** 广东省白纹伊蚊、骚扰阿蚊和致倦库蚊中均存在A大组(含2个小组)和B大组(含3个小组)基因型的*Wolbachia*感染,埃及伊蚊和中华按蚊未检测出*Wolbachia*。

关键词: 白纹伊蚊; 中华按蚊; 致倦库蚊; 骚扰阿蚊; *Wolbachia*; *wsp* 基因; 种系发生

中图分类号: R384.1; R376 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)02-0113-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.02.006

Preliminary studies on infection of *Wolbachia* in mosquito populations in Guangdong province, China

LIN Li-feng, WU De, ZHANG Huan, KOU Jing, ZHOU Hui-qiong, DUAN Jin-hua, WU Jun, LIU Wen-hua
Guangdong Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 511430, Guangdong Province, China

Abstract: Objective To understand *Wolbachia* distribution and genotype among mosquito populations in Guangdong. **Methods** PCRs were performed on mosquitoes from *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* and *Armigeres* based on *Wolbachia wsp* gene, PCR products were sequenced and performed phylogenetic analysis using molecular biology software (Mega 5.2). **Results** Twelve samples were positive on *Cx. pipiens quinquefasciatus*, *Ar. subalbatus*, *Ae. albopictus* and unidentified *Culex*, 11 of them were successfully sequenced, phylogenetic analysis revealed they were divided into 5 clades belonged to *Wolbachia* supergroup A and supergroup B. **Conclusion** Both supergroup A and supergroup B were detected among *Cx. pipiens quinquefasciatus*, *Ar. subalbatus*, *Ae. albopictus*, but not in *Ae. aegypti* and *Anopheles sinensis* samples.

Key words: *Aedes albopictus*; *Anopheles sinensis*; *Culex pipiens quinquefasciatus*; *Armigeres subalbatus*; *Wolbachia*; *wsp* gene; Phylogenetic analysis

沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)属于 α 变性菌,是可以通过雌性昆虫进行传播的一种革兰阴性菌,也是最为常见的一种专性细胞共生菌。由于*Wolbachia*可以通过诱导宿主间杂交的胞质不相融合(CI)^[1],诱导单性生殖(PI)^[2]、雌性化^[3]和杀雄性^[4]等机制改变和影响其宿主的繁殖,因而被人们利用来进行生物控制的工具。为了更好地利用*Wolbachia*的这些特点,我们需要弄清楚不同*Wolbachia*的进化史。目前,有研究已经利用*Wolbachia*的核酸序列,如16S rRNA、*ftsZ*和*wsp*基因等,进行系统发生的研究^[5-8]。葛春喜等^[9]利用*Wolbachia*的16S rRNA序列对白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)和致倦库蚊(*Culex pipiens quinquefasciatus*)进行了其种系发生关系及传播方式的研究;同年,宋社吾等^[10]利用*wsp*基因序列对来自我国多个地区的蚊虫标本进行

*Wolbachia*的感染研究。广东省位于亚热带地区,登革热等蚊媒传染病的防控面临很多难题。如何利用*Wolbachia*的胞质不相融性及对登革热病毒的抑制作用^[11]预防控制蚊虫的繁殖和疾病的传播是我们关注的重点。本研究对采集到的骚扰阿蚊(*Armigeres subalbatus*)、中华按蚊(*Anopheles sinensis*)、致倦库蚊、白纹伊蚊和埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)感染*Wolbachia*情况进行调查,对*wsp*基因进行扩增测序,并对其进行系统进化分析研究,为进一步深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 蚊种及来源 埃及伊蚊采自湛江市,在本研究室饲养繁殖的成蚊及幼蚊;白纹伊蚊成蚊采自东莞、河源和云浮市;致倦库蚊、骚扰阿蚊和中华按蚊成蚊采自河源市的龙川县、肇庆市的怀集县、云浮市的罗定、阳江和东莞市。上述采集的所有成蚊均为雌性蚊虫,采用诱蚊灯法和诱蚊诱卵法获得。

作者简介:林立丰,男,医学博士,主任医师,中心副主任,从事病媒生物学及控制研究。Email: lifenglin@vip.tom.com

1.2 蚊虫标本的处理 将上述采集到的各种蚊虫标本,按 4~50 只/管分装至 2 ml 螺旋口管中,放入 ϕ 10 mm 的瓷珠 3~4 颗,每管加入 600 μ l 的生理盐水,放入研磨粉碎机 preCellys 24 (Bertin Technologies, 法国) 中按 5000 次/min 振荡 45 s 粉碎处理。处理的标本 5000 \times g 离心 5 min, 吸取上清-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 *Wolbachia* DNA 的提取 *Wolbachia* DNA 的提取按照 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, 德国) 说明书进行提取。简单叙述如下:向 1.5 ml EP 管中加入 20 μ l 蛋白酶 K, 同时加入上述制备的上清液 200 μ l 和 200 μ l 的裂解液, 56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 每管再加入 200 μ l 无水乙醇沉淀核酸, 将上述所有液体加入到 DNeasy Mini 硅胶柱中离心, 2 次清洗硅胶柱后 13 200 \times g 离心脱水, 最后加入 100 μ l DEPC 水洗脱 DNA。

1.4 *wsp* 基因序列的扩增 使用依据 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列设计的 1 对特异性引物, 上游引物为 81F: 5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC, 下游引物为 691R: 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA, 该引物为 *Wolbachia* 的通用引物, 其 PCR 产物 590~632 bp。PCR 试剂选用 Platium PCRmix (Lifetech, 美国), 扩增体积为 25 μ l, 包括: 12.5 μ l Platium PCRmix 反应液, 上下游引物 (10 pmol/ μ l) 各 1 μ l, DNA 模板 5 μ l, 用 DEPC 水补齐到 25 μ l 体积。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。取以上 PCR 产物 10 μ l, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

1.5 PCR 产物的克隆和鉴定 将 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收, 回收产物与 pUC19 载体在 37 $^{\circ}$ C 条件下连接 30 min。取连接产物 10 μ l 转化大肠埃希菌 JM109 感受态细胞, 然后将转化的菌液加入 IPTG 和 X-gal 后均匀地涂布于含氨苄青霉素的平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 经蓝/白斑初步筛选阳性克隆。以碱裂解法少量提取重组质粒, 以重组质粒为模板, 分别作 PCR 鉴定。

1.6 *wsp* 基因序列的测定与分析 鉴定的 PCR 产物送 Lifetech 广州分公司进行测序。登录互联网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将所测序列与 GenBank 中相关序列进行同源性分析, 同时从 GenBank 中下载相关序列, 利用 Mega 5.2 软件中的 Test Neighbor-joining tree 进行系统进化分析和进化树的制作。

2 结果

2.1 蚊虫种类及数量 本研究共采集各类蚊虫标本 93 份, 约 3786 只, 采集种类、数量和采集地点见表 1。

2.2 *wsp* 基因序列的 PCR 扩增 利用合成的引物分别从采集的蚊虫标本中扩增出 *Wolbachia wsp* 基因序列,

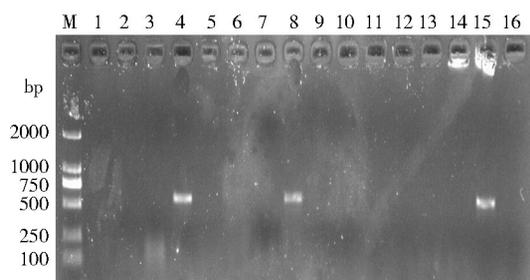
琼脂糖电泳表明目的核酸片段长约 599~626 bp, 在理论设计大小范围内 (图 1)。93 份标本中, 共扩增出 12 份目的条带, 其中来自东莞市的 2 份白纹伊蚊均为阳性; 阳江市未分型库蚊阳性 2 份 (2/189), 骚扰阿蚊阳性 1 份 (1/5); 河源市致倦库蚊阳性 2 份 (2/15), 骚扰阿蚊阳性 1 份 (1/15); 云浮市致倦库蚊阳性 2 份 (2/6), 骚扰阿蚊阳性 2 份 (2/8); 中华按蚊和埃及伊蚊均未检出阳性条带。致倦库蚊检出率为 14.8% (4/27), 骚扰阿蚊为 33.3% (4/12), 白纹伊蚊为 40.0% (2/5), 未鉴定库蚊为 9.5% (2/21), 中华按蚊 (0/8) 和埃及伊蚊 (0/20) 未检出。

表 1 采集的蚊虫标本信息

Table 1 Informations of collected mosquito samples

蚊种	东莞市	阳江市	河源市	云浮市	本实验室
致倦库蚊	6(291)	0	15(575)	6(201)	0
白纹伊蚊	3(50)	0	1(4)	1(4)	0
骚扰阿蚊	0	3(135)	1(15)	8(249)	0
中华按蚊	0	1(14)	5(190)	2(57)	0
未鉴定库蚊	0	19(990)	2(11)	0	0
埃及伊蚊	0	0	0	0	20(1000)
合计	9(341)	23(1139)	24(795)	17(511)	20(1000)

注: 括号外数据为蚊虫标本份数; 括号内数据为采集数量 (只)。



注: M. 2000 bp 分子质量标准; 泳道 1~16. 扩增 *wsp* 基因的 PCR 产物。

图 1 PCR 扩增的 *wsp* 基因 1% 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 1% agarose gel electrophoresis of the amplified *wsp* genes

2.3 *wsp* 基因序列测定与分析 扩增的 12 条 *wsp* 基因有 11 条成功测序, 有 1 条测序后为双峰。重组质粒测序结果表明, 插入序列均为 599~626 bp (表 2)。经与 GenBank 中相关序列的同源性分析, 证明获得的序列为 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列。11 个序列之间的同源性在 80.1%~100% 之间, 最低同源性发生在 DG13013 和 GD13002 之间, 最高同源性发生在 GD130098 和 GD13101 之间, 以及 GDYJ1315、GD13016 和 DG13003 之间。

进化分析结果显示, 11 个序列被划分在 2 个超级组别 (图 2) 的 5 个进化分支中, 其中来自白纹伊蚊的 2 个序列分别位于 A 大组的 I 簇和 B 大组的 II 簇中; 来自骚扰阿蚊的 4 个序列分别位于 A 大组的 I、II 两个

表 2 扩增的 *Wolbachia wsp* 基因信息

Table 2 Informations of the amplified *Wolbachia wsp* genes

标本编号	采集地点	采集时间	宿主名称	序列长度 (bp)	GenBank 登录号
DG13003	东莞	2013-08-28	白纹伊蚊	608	KJ140135
GD13016	河源	2013-06-18	骚扰阿蚊	608	KJ140134
DYJ1315	阳江	2013-08-26	骚扰阿蚊	608	KJ140131
GD13002	河源	2013-06-18	致倦库蚊	626	KJ140133
GD13099	云浮	2013-06-27	骚扰阿蚊	626	KJ140127
DYJ1326	阳江	2013-08-26	库蚊(未鉴定)	599	KJ140128
GD13101	云浮	2013-06-27	致倦库蚊	602	KJ140129
GD13098	云浮	2013-06-27	致倦库蚊	602	KJ140126
GD13013	河源	2013-06-18	致倦库蚊	602	KJ140125
DG13009	东莞	2013-08-28	白纹伊蚊	602	KJ140132
GD13116	云浮	2013-06-27	骚扰阿蚊	602	KJ140130

簇中和 B 大组的 III 簇中;来自致倦库蚊的 4 个序列分别位于 A 大组的 II 簇中及 B 大组的 II 和 III 两个簇中;来自未鉴定库蚊的 1 个序列位于 B 大组中的 I 簇中;其中来源于骚扰阿蚊 (GD13116)、白纹伊蚊 (DG13009) 和致倦库蚊 (DG13013) 的 *Wolbachia wsp* 基因序列同源性高达 97.84%~99.34%, 位于同一个进化分支中 (B 大组 III 小簇);来自骚扰阿蚊 (GD13099) 和致倦库蚊 (GD13002) 的 *wsp* 基因序列同源性为 98.09%, 位于同一个进化分支中 (A 大组 II 小簇);来源于骚扰阿蚊 (GDYJ1315、GD13016) 和白纹伊蚊 (DG13003) 的 *wsp* 基因序列同源性高达 100%, 位于同一个进化分支中 (A 大组 I 小簇)。

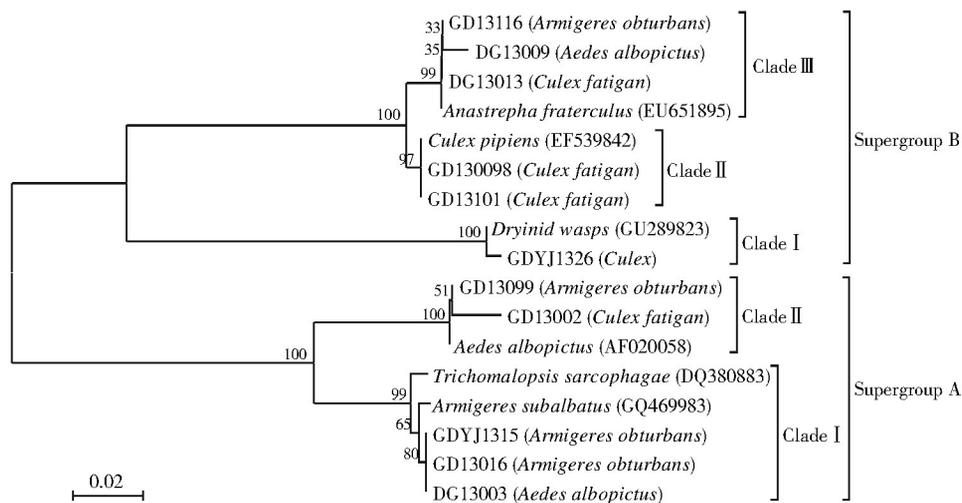


图 2 *Wolbachia wsp* 基因系统进化分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of *Wolbachia wsp* genes

3 讨论

Wolbachia 是一群细胞内寄生的细菌,不同的生殖表型与细胞质不相容、单性生殖和雄性雌性化等有关。Zhou 等^[7]利用 *Wolbachia* 外壳蛋白基因 (*wsp*) 进行了系统进化研究,研究表面 *Wolbachia pipientis* 簇最初可以划分成 12 个小组,其中 8 个组成 A 大组,4 个组成 B 大组。随着 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的增加,这种分类还会不断地进行调整。本研究共获得 11 条 *wsp* 基因序列,这些序列共划分成 5 个小组,其中 2 个小组来自 A 大组,3 个小组来自 B 大组,这些序列的变异均未超出目前公布的序列范围。

由于 *Wolbachia* 可以影响宿主不同的生殖表型,早在 1967 年, Laven^[12] 利用 *Wolbachia* 可以诱导胞质不相融现象来控制库蚊的繁殖,达到控制库蚊种群的目的。此外,有研究表明在其唾液腺中感染 *Wolbachia* 的白纹伊蚊可以减少登革热病毒的传播^[12],在广东省开展蚊虫 *Wolbachia* 分布调查以及其对登革热病毒抑制

作用,对广东省登革热流行规律研究与防控具有重要意义。

本研究中,在致倦库蚊、白纹伊蚊和骚扰阿蚊中均检出 *Wolbachia*,其中白纹伊蚊检出率最高。为了提高检出率,我们未对单个蚊虫进行检测,而是将每种蚊虫的多只混合在一起进行检测,因此无法判断每种蚊虫的真实感染率,但本研究结果初步反映出广东省蚊虫感染的基本情况,为开展下一步的研究提供科学依据。

参考文献

- [1] Blagrove MS, Arias-Goeta C, Failloux AB. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(1): 255-260.
- [2] Watanabe M, Kageyama D, Miura K. Transfer of a parthenogenesis-inducing *Wolbachia* endosymbiont derived from *Trichogramma dendrolimi* into *Trichogramma evanescens* [J]. J Invertebr Pathol, 2013, 112(1): 83-87.

(下转第 118 页)

蚊正常品系作为敏感株,与采集于现场的淡色库蚊及致倦库蚊对常用拟除虫菊酯类杀虫剂进行了比较测定。调查发现,北京、河北、海南等地淡色库蚊及致倦库蚊对常用杀虫剂溴氰菊酯和氯菊酯均已达到抗性水平。7 株淡色库蚊对 10 000 mg/L 氯菊酯 24 h 死亡率均 < 50%, 河北地区淡色库蚊的抗药性普遍比北京地区高。北京市朝阳区和昌平区的抗药性比石景山区略低;河北省保定市的淡色库蚊抗药性比本省其他地区高,24 h 死亡率仅为 16.89%。各地理株蚊虫对溴氰菊酯的抗性也很高,但不同地区高低不一。海口市坡巷致倦库蚊的抗药性最高,24 h 死亡率仅为 1.11%,溴氰菊酯几乎对该蚊不起作用。此外,北京市石景山区和河北省廊坊市的淡色库蚊抗药性也很高,24 h 死亡率在 20% 左右;其他地区蚊虫对溴氰菊酯的抗药性比这 3 株略低,24 h 死亡率在 45%~66% 之间。蚊虫抗药性的产生是其长期接触杀虫剂的必然结果,抗性的发展程度与杀虫剂的使用频率密切相关^[5]。实验结果表明溴氰菊酯和氯菊酯在北京、河北和海南各地区蚊虫的防治中已不宜继续使用。今后应采取更加科学合理的抗药性管理措施,定期进行蚊虫抗药性监测,及时了解蚊虫抗药性状况,正确选择不同作用机制的杀虫剂轮换交替使用,以提高药效,避免长期使用同一种或同一类杀虫剂而引起抗性增加^[6]。使用杀虫剂与增效剂复配,也可使蚊虫抗药性延缓产生。将杀虫剂与不同的增效剂混用,可起到增效、减轻污染、降低成本、克服抗

药性种群、延缓抗药性的产生等作用^[7]。此外,还需要加强对抗性机制的研究,促进新型杀虫剂的开发,以延缓和克服抗药性的进一步发展。蚊虫防治最终应以综合治理为主,加强环境整治,消除蚊虫赖以孳生的场所,减少蚊虫防治过程中对化学药剂的依赖^[8]。

参考文献

- [1] 陆宝麟,赵彤言. 中国尖音库蚊复合组生物分类学的研究:雄蚊阳茎 DV/D 值的数值分析[J]. 昆虫学报, 1994, 37(4): 446-449.
- [2] 张金光,霍新北. 淡色库蚊的抗性机制研究进展及控制策略[J]. 预防医学论坛, 2011, 17(4): 355-358.
- [3] 刘维德. 蚊类抗药性及其测定[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 53-63.
- [4] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 26347-2010 蚊虫抗药性检测方法 生物测定法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [5] 蔡松武,林立丰,段金花,等. 广东省白纹伊蚊抗药性现状与抗性治理对策[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2006, 17(4): 274-276.
- [6] 鲍庆汉,姜朝明,吴黎明. 千岛湖镇城区淡色库蚊抗药性研究[J]. 浙江预防医学, 2013, 25(7): 17-19.
- [7] 黄晓丹,赵久旭,寇景轩,等. 山东省东平湖地区淡色库蚊对常用杀虫剂的抗药性调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2013, 24(5): 406-408.
- [8] 宋丽华,周祎,齐上,等. 按蚊对 5 种常用杀虫剂的抗药性现场调查研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2012, 18(6): 518-520.

收稿日期:2013-11-22

(上接第 115 页)

- [3] Reumer BM, van Alphen JJ, Kraaijeveld K. Population genetics of *Wolbachia*-infected, parthenogenetic and uninfected, sexual populations of *Tetrastichus coeruleus* (Hymenoptera: Eulophidae) [J]. Mol Ecol, 2013, 22(17): 4433-4444.
- [4] Longdon B, Fabian DK, Hurst GD, et al. Male-killing *Wolbachia* do not protect *Drosophila bifasciata* against viral infection [J]. BMC Microbiol, 2012, 12 Suppl 1: S8.
- [5] Comandatore F, Sasser D, Montagna M, et al. Phylogenomics and analysis of shared genes suggest a single transition to mutualism in *Wolbachia* of nematodes [J]. Genome Biol Evol, 2013, 5(9): 1668-1674.
- [6] Li Z, Garner AL, Gloeckner C, et al. Targeting the *Wolbachia* cell division protein FtsZ as a new approach for antifilarial therapy [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(11): e1411.
- [7] Zhou W, Rousset F, O'Neil S. Phylogeny and PCR-based

classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences [J]. Proc Biol Sci, 1998, 265(1395): 509-515.

- [8] van Meer MM, Witteveldt J, Stouthamer R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene [J]. Insect Mol Biol, 1999, 8(3): 399-408.
- [9] 葛春喜,黄炯烈,陈观今,等. 白纹伊蚊和致倦库蚊 *Wolbachia* 16S rRNA 序列测定与分析 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(2): 81-83.
- [10] 宋社吾,赵彤言,董言德,等. 我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与分析 [J]. 昆虫学报, 2002, 45(5): 571-577.
- [11] Mousson L, Zouache K, Arias-Goeta C, et al. The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(12): e1989.
- [12] Laven H. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility [J]. Nature, 1967, 216(5113): 383-384.

收稿日期:2014-01-20