

向川安瘿蜂和寄生性长尾小蜂共生菌 *Wolbachia* 的检测

杨筱慧¹, 朱道弘^{1*}, 刘志伟², 苏成元¹

(1.中南林业科技大学昆虫行为与进化生态学实验室, 湖南 长沙 410004; 2.东伊利诺大学生命科学学院, 查尔斯顿, 伊利诺伊州, 美国, 61920)

摘 要: *Wolbachia* 是一类胞质遗传共生菌, 能调控被其感染宿主的生殖方式。以向川安瘿蜂虫瘿中获得的向川安瘿蜂和其寄生的长尾小蜂为材料, 使用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异引物, 通过 PCR 扩增向川安瘿蜂和长尾小蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 特异片段, 以邻位相连法构建 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的分子系统树。结果表明: 向川安瘿蜂和长尾小蜂均感染了 *Wolbachia*; 因二者感染 *Wolbachia* 的株系 W_a 和 W_b 的 *wsp* 序列差异大, 不能认定在寄生的长尾小蜂和宿主向川安瘿蜂间存在 *Wolbachia* 的水平传播。

关 键 词: 向川安瘿蜂; 长尾小蜂; *Wolbachia*; *wsp* 基因; 水平传播

中图分类号: Q968

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)03-0274-05

The detection of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* in *Andricus mukaigawae* and *Torymus* sp.

YANG Xiao-hui¹, ZHU Dao-hong^{1*}, LIU Zhi-wei², SU Cheng-yuan¹

(1.Laboratory of Insect Behavior and Evolutionary Ecology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois 61920, USA)

Abstract: *Wolbachia* are maternally inherited endosymbiotic bacteria, and they can manipulate the reproduction of their hosts. In this paper, we amplified the *wsp* gene fragment of *Wolbachia* in *Andricus mukaigawae* and *Torymus* sp. associated with the plant galls of *A. mukaigawae*, by using *Wolbachia* *wsp*-specific primers. Our results revealed that *A. mukaigawae* and *Torymus* sp. were respectively infected with *Wolbachia* strain W_a and W_b . We didn't find the evidence for horizontal transmission between *A. mukaigawae* and *Torymus* sp. because of the difference of *wsp* sequence in *Wolbachia* strain W_a and W_b .

Key words: *Andricus mukaigawae*; *Torymus* sp.; *Wolbachia*; *wsp* gene; horizontal transmission

Wolbachia 是一类能调控被感染宿主生殖方式、与宿主共生的胞质遗传的生殖共生菌, 属变形菌纲的 α 亚纲。*Wolbachia* 的调控方式包括诱导宿主胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility)、诱导孤雌生殖(parthenogenesis-inducing)、诱导雌性化(feminizing)及雄性致死(male-killing)等^[1-3]。

一些学者认为, *Wolbachia* 主要通过雌性宿主生殖细胞的细胞质传递给子代, 传播方式为种内垂直

传播^[1]。但有分子生物学研究表明, *Wolbachia* 和其昆虫宿主二者的分子系统树并不一致, 说明在一些宿主中存在 *Wolbachia* 的水平传播^[4]。当感染和未感染 *Wolbachia* 的赤眼蜂幼虫共享一宿主的卵时, 两类幼虫间发生了 *Wolbachia* 的水平传播^[5]。另外, 利用显微注射还实现了 *Wolbachia* 在寄主间的水平传播^[6]。已发现的 *Wolbachia* 的水平传播途径有宿主-寄生蜂、血液接触、取食、植物介导等 4 种, 其中宿主-

收稿日期: 2013-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30872036)

作者简介: 杨筱慧(1981—), 男, 湖南邵阳人, 博士研究生, 主要从事昆虫行为与进化生态学研究, poplarbright@126.com; *通信作者, daohongzhu@yeah.net

寄生蜂间水平传播报道最多,如发现原丽蝇-金小蜂^[7]和果蝇-寄生蜂^[8-9]等宿主与寄生蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 或 *ftsZ* 基因的 DNA 序列完全一致。

瘦蜂科属瘦蜂总科(Cynipoidea),分两亚科,即 Hodiernocynipinae(均为化石种)和瘦蜂亚科 Cynipinae(现存种和个别化石种)。瘦蜂亚科包含 Aylacini 族、Eschatocerin 族、Diplolepidini 族、Synergini 族、Pediastidili 族及 Cynipini 族等^[10]。瘦蜂具有产雄孤雌生殖(arrhenotoky)、产雌孤雌生殖(thelyotoky)、周期性的孤雌生殖(cyclical parthenogenesis)等多种繁殖方式。研究已证明,Aylacini 族、Diplolepidini 族、Synergini 族和 Cynipini 族分别有 4、9、11、6 种瘦蜂感染 *Wolbachia*^[11-16],而感染 *Wolbachia* 的 Cynipini 族一些种类的产雌孤雌生殖已证实不是由 *Wolbachia* 诱导^[11, 15, 16]。

向川安瘦蜂(*Andricus mukaigawae*)属 Cynipini 族,分布于俄罗斯、中国、韩国、日本和印度,于槲栎(*Quercus aliena*)等壳斗科植物的枝条形成球状虫瘿^[17]。Abe 和 Miura 已证实向川安瘦蜂的日本种群存在 *Wolbachia* 的共生,但其产雌孤雌生殖与 *Wolbachia* 的共生无关^[11]。

笔者于 2011 年 11 月从安徽安庆采集向川安瘦蜂虫瘿,并收集向川安瘦蜂和寄生蜂-长尾小蜂(*Torymus* sp.),使用 *Wolbachia* 的细胞表面蛋白 *wsp* 基因的特异引物,通过 PCR 法扩增向川安瘦蜂和寄生蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 特异片段,并建立 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的分子系统树,以证实 *Wolbachia* 对中国安庆地区向川安瘦蜂和其寄生蜂长尾小蜂的感染,推测向川安瘦蜂和寄生蜂间 *Wolbachia* 的传播方式。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2011 年 11 月自安徽安庆采集向川安瘦蜂虫瘿,寄主植物为白栎(*Quercus fabri* Hance)。室温条件下置于养虫笼内,2011 年 12 月下旬至 2012 年 2 月上旬获得向川安瘦蜂羽化成虫;2012 年 3 月上旬至 2012 年 5 月上旬获得寄生蜂羽化成虫。成虫样本以无水乙醇浸泡,于-40℃冰柜保存,备用。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取及 *Wolbachia* 感染的检测和测序

以酚-氯仿法^[15]提取向川安瘦蜂和长尾小蜂雌

成虫总 DNA,样本各 10 个。

以节肢动物 CO-I 特异引物 LCO1490 和 HCO2198^[18]对样本的模板 DNA 进行 PCR 扩增,检测 DNA 模板质量,CO-I PCR 扩增体系、条件参考 Folmer 等^[18]的方法,获得的 PCR 产物大小约为 660 bp。阳性结果的 DNA 模板用于检测 *Wolbachia*。

Wolbachia 的 *wsp* 基因片段用细胞表面蛋白基因 *wsp* 片段的特异引物 *wsp*81F 和 *wsp*691R^[19]进行 PCR 扩增,以检测向川安瘦蜂和长尾小蜂 *Wolbachia* 的感染。*wsp* PCR 扩增体系和条件参考文献[16]的方法,获得 PCR 产物大小约为 600 bp。阳性对照是已知感染 *Wolbachia* 的栗瘦蜂,阴性对照是未感染的栗瘦蜂和纯净水。

对 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的 PCR 产物直接双向测序由上海英骏生物有限公司完成。

1.2.2 *Wolbachia* 系统发生分析

寄生蜂、宿主向川安瘦蜂和其他昆虫的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列利用软件 Clustal X 2.0^[20]对齐排列。由于该基因序列 74~110、214~249 和 520~584 位区域的同源性在部分研究中存在歧义^[19],故将这 3 个区域删除。*Wolbachia* 的 *wsp* 基因的进化模型利用 Model-Test 3.7^[21]程序筛选,*wsp* 基因的最合适的进化模型为(GTR+G)模型。邻位相连(neighbor-joining method)NJ 系统树使用软件 MEGA^[22]、依据(GTR+G)模型设定参数值、采用 Kimura's 2-parameter 遗传距离构建,自导复制次数为 1 000。

2 结果与分析

2.1 向川安瘦蜂和长尾小蜂的性比及 *Wolbachia* 感染率

共采集到 295 个向川安瘦蜂虫瘿,收集到向川安瘦蜂成虫共 52 只,全部为雌性,通过检测其体内 *Wolbachia*,感染率为 30%。收集到长尾小蜂雌成虫 18 个,雄性成虫 6 个,雌性比例为 75%,检测其体内 *Wolbachia*,感染率为 100%。

2.2 向川安瘦蜂和长尾小蜂与已知瘦蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列一致性

测序结果表明,寄主向川安瘦蜂感染了 W_a 株系,寄生的长尾小蜂感染了 W_b 株系,其 GenBank 登录号分别为 KC130968 和 KC130977(表 1)。使用

NCBI 网站的 Blast 工具，对向川安瘿蜂、长尾小蜂和 GenBank 已登录的瘿蜂及其他代表性昆虫种类的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列进行一致性比较，基因序列的一致性最低为 81%，最高为 99%。

表 1 向川安瘿蜂群落与已知瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的一致性

Table 1 Sequence identity of the <i>wsp</i> gene of <i>Wolbachia</i> from <i>A. mukaigawae</i> and <i>Torymus</i> sp. with other species of Cynipidae					
寄主昆虫	寄主繁殖模式	核苷酸数目/个	序列一致性/%	GenBank 登录号	文献来源
<i>Andricus mukaigawae</i>	CP	588	W _a (-)	KC130968	
<i>Torymus</i> sp.	S	561	W _b (87%)	KC130977	
<i>Andricus mairiei</i>	S	561	94%	JN710456	[16]
<i>Callirhytis glandium</i>	CP	594	99%	AY095156	[13]
<i>Synergus gallaepomiformis</i>	A	588	99%	AY095155	[13]
<i>Andricus solitarius</i> strain 1	CP	564	95%	AY095153	[13]
<i>Biorhiza pallida</i>	CP	564	95%	AF339629	[13]
<i>Neuroterus macropterus</i>	T	564	95%	AY095152	[13]
<i>Synergus crassicornis</i>	A	564	95%	AY095154	[13]
<i>Andricus solitarius</i> strain 2	CP	573	83%	AY095151	[13]
<i>Andricus solitarius</i> strain 3	CP	576	84%	AY095150	[13]
<i>Synergus diaphanus</i>	A	576	84%	AY095148	[13]
<i>Synergus reinhardi</i>	A	576	84%	AY095147	[13]
<i>Synergus umbraculus</i>	A	576	84%	AY095149	[13]
<i>Plagiotrochus quercusilicis</i>	T	546	82%	AY095158	[13]
<i>Dryocosmus kuriphilus</i>	T	573	86%	DQ493720	[15]
<i>Ceroptres cerri</i>	A	540	81%	AY095157	[13]

CP 周期性孤雌生殖；A 产雄孤雌生殖；T 产雌孤雌生殖；S 有性生殖。

2.3 *Wolbachia* 的分子系统树

由 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因建立的系统发生树(图 1)可知，获得的向川安瘿蜂和寄生长尾小蜂的 *Wolbachia* 株系均属 A 群，与膜翅目其他种类^[23]和

其他瘿蜂 *Wolbachia* 的结果一致，其中，W_a 和 *S.gallaepomiformis* (AY095155)的 *wsp* 序列基本一致(相差 1 个碱基)，W_b 未与其他分支聚合，独立为 1 个分支；W_a 和 W_b 为不同株系。

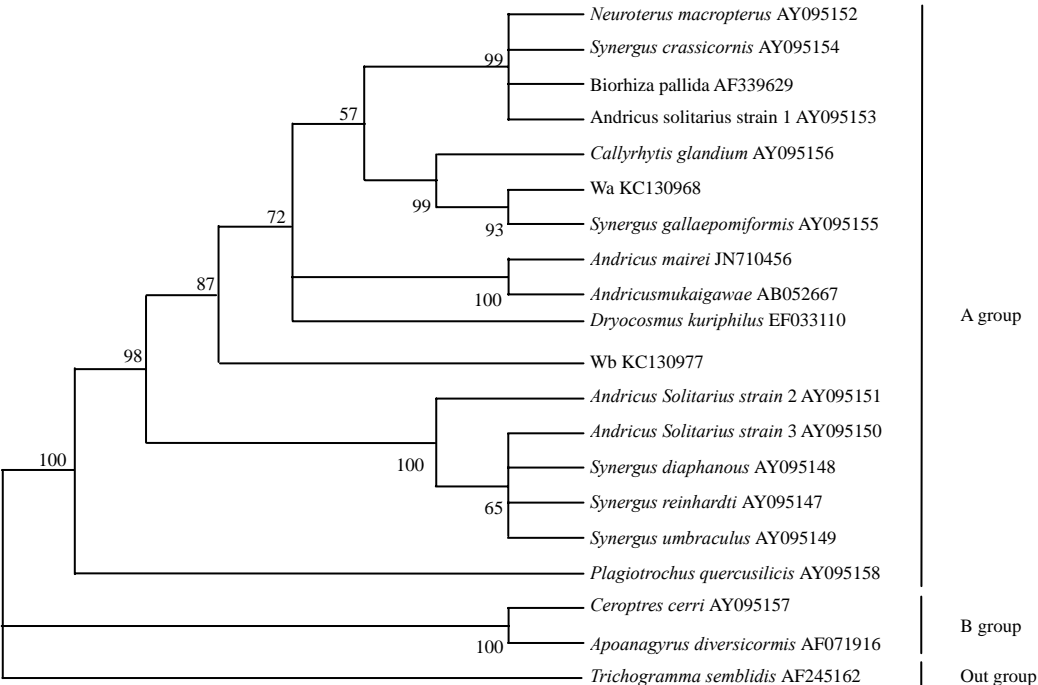


图 1 向川安瘿蜂、长尾小蜂和其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的系统发生关系

Fig. 1 Phylogenetic relationship of *wsp* gene sequences of *Wolbachia* in *A. mukaigawae* and *Torymus* sp. and other gall wasps

3 讨 论

瘿蜂的生殖方式主要为有性和无性世代交替发生,称为周期性孤雌生殖或世代交替(heterogony)^[24]。栎瘿蜂族瘿蜂1年发生1个世代,有性和无性世代交替发生。对于栎瘿蜂族瘿蜂的产雌孤雌生殖,Abe等认为,瘿蜂周期性孤雌生殖中两性生殖世代的丢失是 *Wolbachia* 的控制所致^[25]。Plantard 等对蔷薇瘿蜂(*Diplolepis spinosissimae*)10个地理种群的性比、遗传结构及 *Wolbachia* 感染检测的研究,发现2个地理种群无 *Wolbachia* 的共生,为产雄孤雌生殖;8个地理种群有 *Wolbachia* 的共生,为 *Wolbachia* 诱导产雌孤雌生殖^[12]。然而,Zhu等^[15]发现,产雌孤雌生殖的栗瘿蜂(*Dryocosmus kuriphilus*)(栎瘿蜂族)被 *Wolbachia* 感染,但其孤雌生殖并非 *Wolbachia* 所诱导;同属栎瘿蜂族的向川安瘿蜂^[11]、麦氏安瘿蜂^[16]尽管感染了 *Wolbachia*,但均进行周期性的孤雌生殖;这些研究结果和 Abe 等的推测并不一致。本研究证实采自中国安庆寄生的长尾小蜂和宿主向川安瘿蜂均感染了 *Wolbachia*。鉴于 Abe 等已证明向川安瘿蜂为周期性孤雌生殖的无性世代,其下一世代为有性世代,其 *Wolbachia* 未诱导向川安瘿蜂的产雌孤雌生殖^[11],而笔者采集的样本均为雌性,故也推测 *Wolbachia* 未诱导向川安瘿蜂的产雌孤雌生殖。长尾小蜂感染了 *Wolbachia*,但采集的样本中有雌、雄性个体,应为有性生殖,因此,推测其体内 *Wolbachia* 的共生未能诱导长尾小蜂营产雌孤雌生殖。

向川安瘿蜂和寄生的长尾小蜂分别感染 *Wolbachia* 株系 W_a 和 W_b ,其 *wsp* 序列差异大,为不同株系,因而不能作为 *Wolbachia* 在向川安瘿蜂和寄生的长尾小蜂间水平传播的证据。但是,同一瘿蜂可被不同的寄生蜂寄生,同一种寄生蜂也可寄生于不同瘿蜂,鉴于未收集到其他寄生蜂,故仍不能排除 *Wolbachia* 在瘿蜂-寄生蜂间水平传播的可能性,需采集更多的瘿蜂和寄生蜂种类,以进一步研究 *Wolbachia* 在瘿蜂和寄生蜂间的传播。

参考文献:

[1] Werren J H . Biology of *Wolbachia*[J] . Annual Review

of Entomology , 1997 , 42 : 587–609 .

- [2] Stouthamer R , Breeuwer J A J , Hurst G D D . *Wolbachia* pipientis : Microbial manipulator of arthropod reproduction[J] . Annual Review of Microbiology , 1999 , 53 : 71–102 .
- [3] Werren J H , Baldo L , Clark M E . *Wolbachia* : master manipulators of invertebrate biology[J] . Nature Reviews Microbiology , 2008 , 6(10) : 741–751 .
- [4] Vavre F , Mouton L , Pannebakker B A . Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations[J] . Molecular Biology and Evolution , 1999 , 16(12) : 1711–1723 .
- [5] Huigen M E , Luck R F , Klaassen R H G , et al . Infectious parthenogenesis[J] . Nature , 2000 , 405 : 178–179 .
- [6] Braig H R , Guzman H , Tesh R B , et al . Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila-simulans* with a mosquito counterpart[J] . Nature , 1994 , 367 : 453–455 .
- [7] 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-Biological Sciences , 1995 , 261 : 55–63 .
- [8] Haine E R , Pickup N J , Cook J M . Horizontal transmission of *Wolbachia* in a *Drosophila* community[J] . Ecological Entomology , 2005 , 30(4) : 464–472 .
- [9] Heath B D , Butcher R D J , Whitfield W , G , F , et al . Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism[J] . Current Biology , 1999 , 9(6) : 313–316 .
- [10] Ronquist F . Phylogeny , classification and evolution of the Cynipoidea[J] . Zoologica Scripta , 1999 , 28(1/2) : 139–164 .
- [11] Abe Y , Miura K . Does *Wolbachia* induce unisexuality in oak gall wasps? (Hymenoptera : Cynipidae) [J] . Annals of the Entomological Society of America , 2002 , 95(5) : 583–586 .
- [12] Plantard O , Rasplus J Y , Mondor G , et al . *Wolbachia*-induced thelytoky in the rose gallwasp *Diplolepis spinosissimae*(Giraud)(Hymenoptera : Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host[J] . Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences , 1998 , 265 : 1075–1080 .
- [13] Rokas A , Atkinson R J , Nieves-Aldrey J L et al . The

- incidence and diversity of *Wolbachia* in gallwasps (Hymenoptera : Cynipidae) on oak[J]. *Molecular Ecology*, 2002, 11(9) : 1815–1829 .
- [14] Schilthuizen M , Stouthamer R . Distribution of *Wolbachia* among the guild associated with the parthenogenetic gall wasp *Diplolepis rosae*[J]. *Heredity*, 1998, 81 : 270–274 .
- [15] Zhu D H , He Y Y , Fan Y S , et al . Negative evidence of parthenogenesis induction by *Wolbachia* in a gallwasp species , *Dryocosmus kuriphilus*[J]. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 2007, 124(3) : 279–284 .
- [16] 杨筱慧, 朱道弘, 刘志伟, 等. 湖南三地区麦氏安瘿蜂体内 *Wolbachia* 的感染及其 *wsp* 基因序列分析[J]. *昆虫学报*, 2012, 55(2) : 247–254 .
- [17] Abe Y , Bhuyan M , Mech J , et al . Discovery of an oak gall wasp (Hymenoptera : Cynipidae) inducing galls on deciduous oak trees in India[J]. *Entomological Science*, 2012, 15(3) : 340–342 .
- [18] Folmer O , Black M , Hoeh W , et al . DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome coxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5) : 294–299 .
- [19] Zhou W G , Rousset F , O'Neill S . 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 .
- [20] Thompson J D , Higgins D G , Gibson T J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22) : 4673–4680 .
- [21] Posada D , Crandall K A , Modeltest : Testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9) : 817–818 .
- [22] Tamura K , Dudley J , Masatoshi N , et al . MEGA4 : Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8) : 1596–1599 .
- [23] Werren J H , Windsor D , Guo L R . Distribution of *Wolbachia* among Neotropical Arthropods[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 1995, 262 : 197–204 .
- [24] Stone G N , Schonrogge K , Atkinson R J . et al . The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera : Cynipidae) [J]. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47 : 633–668 .
- [25] Abe Y . Taxonomic status of the *Andricus mukaigawae* complex and its speciation with geographic parthenogenesis (Hymenoptera : Cynipidae)[J]. *Applied Entomology and Zoology*, 1986, 21(3) : 436–447 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗 维