

转染从灰飞虱提取的 *Wolbachia* 对豆叶螨繁殖适合度和寿命的影响

赵冬晓^{1,2}, 张艳凯¹, 陈 汉¹, 洪晓月^{1,*}

(1. 南京农业大学昆虫学系, 南京 210095; 2. 南通市通州区农业委员会, 江苏南通 226300)

摘要:【目的】*Wolbachia* 是广泛存在于节肢动物体内的一类母系遗传的共生菌, 能够通过多种机制调节节肢动物的生殖。近年来, 为了更进一步地探究 *Wolbachia* 与寄主之间的互作机制, 许多研究者展开了 *Wolbachia* 的人工转染研究。【方法】我们在实验室条件下将灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) 感染的 *Wolbachia* 提取纯化后, 利用显微注射的方法导入豆叶螨 *Tetranychus phaseus* Ehara 体内。研究了注入从灰飞虱提取的 *Wolbachia* 和豆叶螨自然感染 *Wolbachia* 对豆叶螨繁殖适合度和寿命的影响, 并测定了两种 *Wolbachia* 的密度随豆叶螨日龄增长的变化情况。【结果】结果显示, 外源 *Wolbachia* 在豆叶螨体内的拷贝数极低, 仅为自然感染豆叶螨体内 *Wolbachia* 拷贝数的 0.5% 左右。与自然感染的 *Wolbachia* 不同, 外源 *Wolbachia* 在豆叶螨种群中不能引起胞质不亲和, 但能够显著降低雌螨的产卵量。【结论】本研究表明, 来自灰飞虱的 *Wolbachia* 具有抑制豆叶螨种群扩张的潜在能力, 对豆叶螨生物防治具有一定的应用价值。

关键词: 灰飞虱; 豆叶螨; 共生菌; *Wolbachia*; 显微注射; 人工转染; 繁殖适合度; 寿命

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2014)01-0025-11

Effects of transinfection of *Wolbachia* from *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) on reproductive fitness and adult longevity of *Tetranychus phaseus* (Acari: Tetranychidae)

ZHAO Dong-Xiao^{1,2}, ZHANG Yan-Kai¹, CHEN Han¹, HONG Xiao-Yue^{1,*} (1. Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Agriculture Committee of Tongzhou District of Nantong, Nantong, Jiangsu 226300, China)

Abstract:【Aim】*Wolbachia* are a group of maternally inherited intracellular bacteria that infect a wide range of arthropods and cause an array of effects on host reproduction. Recently, researchers have carried out transfer experiments that generated novel infection types to elucidate the interaction between *Wolbachia* and the hosts.【Methods】Under laboratory conditions, *Wolbachia* infected by the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallén), were extracted and purified, and then were transferred into the new host *Tetranychus phaseus* Ehara using microinjection. The effects of *Wolbachia* extracted from *L. striatellus* and the native *Wolbachia* on reproductive fitness and adult longevity of *T. phaseus* were studied, and the densities of *Wolbachia* during host aging were measured.【Results】Our results showed that the novel *Wolbachia* was present at a rather low density in *T. phaseus*, being only 0.5% of the densities of the native *Wolbachia*. Unlike native *Wolbachia*, novel *Wolbachia* could not induce cytoplasmic incompatibility in the *T. phaseus* population, but they could decrease the fecundity of *T. phaseus* significantly.【Conclusion】This study indicates that *Wolbachia* from *L. striatellus* have potential ability to inhibit population expansion of *T. phaseus* and will be valuable for biocontrol of *T. phaseus*.

Key words: *Laodelphax striatellus*; *Tetranychus phaseus*; symbiont; *Wolbachia*; microinjection; artificial transinfection; reproduction fitness; longevity

Wolbachia 是目前研究最为普遍的一类母系遗传的共生细菌, 广泛共生于多种无脊椎生物体内,

包括昆虫 (Hilgenboecker *et al.*, 2008)、螨类 (Breeuwer and Jacobs, 1996; Gotoh *et al.*, 2003)、

基金项目: 国家公益性行业(农业)科技项目(200903051, 200803003)

作者简介: 赵冬晓, 女, 1985年生, 山东莱芜人, 博士研究生, 研究方向为昆虫分子生态与进化, E-mail: 2010202031@njau.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 025-84395339; E-mail: xyhong@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-09-24; 接受日期 Accepted: 2013-12-23

蜘蛛 (Rowley *et al.*, 2004; Goodacre *et al.*, 2006)、甲壳纲动物 (Bouchon *et al.*, 1998) 以及线虫 (Bandi *et al.*, 1998)。Wolbachia 能够导致寄主产生多种生殖异常现象。例如, 寄生蜂感染后会出现孤雌生殖, 陆生等足类动物感染后会出现雌性化, 而在一些瓢虫、蝴蝶中, Wolbachia 能够引起雄性死亡的现象。另外, 在果蝇等节肢动物中, Wolbachia 引起胞质不亲和 (cytoplasmic incompatibility, CI) 现象 (Stouthamer *et al.*, 1999; Hurst and Jiggins, 2000)。

系统发育分析结果表明, 在自然界中不同生物体内感染的 Wolbachia 可以分为多种不同株系, 有一些生物体内同时感染多种不同株系的 Wolbachia。这说明, 在自然条件下, Wolbachia 存在着水平传播的现象 (O'Neill *et al.*, 1992; Werren, 1997; Vavre *et al.*, 1999; Schulenburg *et al.*, 2000)。近年来, 随着研究技术的不断提高, 许多研究者能够通过人工注射胚胎或者成体的方法将外源 Wolbachia 导入非自然寄主体内, 从而实现了实验室条件下 Wolbachia 的水平传播 (Boyle *et al.*, 1993; Grenier *et al.*, 1998; Rigaud *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Ruang-Areerate and Kittayapong, 2006)。通过人工转染, 研究者获得了多种自然界没有的感染类型, 并通过深入的研究进一步揭示了 Wolbachia 与寄主的互作关系 (McGraw *et al.*, 2001, 2002)。尤其是通过对一些具有医学意义和经济意义的昆虫进行 Wolbachia 人工转染, 人们发现 Wolbachia 对其非自然寄主带来的生殖或者适合度方面的影响具有非常重要的生防价值。研究者尝试将黑腹果蝇体内的 Wolbachia 人工导入了埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的胚胎中, 并研究了这种外源 Wolbachia 对新寄主的影响。结果表明, 感染了外源 Wolbachia 的埃及伊蚊寿命比不感染者的寿命缩短了将近 50% (McMeniman *et al.*, 2009), 这使得埃及伊蚊的寿命短于病原物在其体内的潜伏期 (extrinsic incubation period, EIP)。也就是说, 感染了外源 Wolbachia 的蚊子丧失了传播病原物的能力, 这对防治人类登革热病具有重大意义。除此之外, 研究者也发现外源 Wolbachia 能够使埃及伊蚊对切昆贡亚热 (chikungunya) 病毒、疟原虫 *Plasmodium*、黄热病病毒 (yellow fever viruses), 以及一些致病性的线虫等具有显著的抗性, 从而阻止了这些病毒、线虫向人类的传播, 有效地保护人类免受其侵害 (Kambris *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009)。

据报道, 灰飞虱体内的 Wolbachia 能够引起完

全 CI 作用, 即当感染的雄虫与不感染的雌虫交配后, 后代完全不孵化 (Noda *et al.*, 2001)。尽管有报道表明 CI 强度与雄虫的日龄具有相关性, 低日龄的雄虫引起强 CI, 而高日龄的雄虫引起 CI 的能力非常弱 (Hoffmann *et al.*, 1986)。然而, 在灰飞虱中, 无论雄虫日龄高低, 均能引起完全 CI。相关研究表明, CI 是 Wolbachia 在寄主种群中扩散的主要动力。那么, 借助灰飞虱 Wolbachia 所引起的完全 CI, 可以将一些有利基因带入目的种群, 从而实现种群改造 (Sinkins and Godfray, 2004)。另外, 我们推测将完全 CI 的 Wolbachia 转染到害虫体内后具有生防价值。转染后的雄虫与自然界中不感染的雌虫交配后不能产生后代, 从而有效地控制害虫种群的扩增。

据调查, 近年来, 豆叶螨 *Tetranychus phaseolus* 的危害呈上升趋势, 主要危害豆类作物、黄瓜、茄子、番茄等, 并造成了较大的经济损失。在本研究中, 我们利用显微注射技术, 将灰飞虱体内感染的 *wStri* 株系的 Wolbachia 导入豆叶螨成体内, 来回答以下两个问题: (1) 来自灰飞虱的 Wolbachia 能否在亲缘关系较远的寄主豆叶螨体内成功侵染; (2) 外源 Wolbachia 与豆叶螨将产生怎样的相互作用? 这也是首次尝试在不同纲的寄主之间进行 Wolbachia 的人工水平传播。

1 材料与方法

1.1 供试材料

人工转染的供体是灰飞虱江苏南京种群, 受体为豆叶螨江苏镇江种群。豆叶螨种群用隔离法在菜豆 *Phaseolus vulgaris* L. 叶片上隔离饲养。灰飞虱种群用籼稻感虫品系汕优 63 (南京农业大学神州中冶) 稻苗在大烧杯中隔离饲养。豆叶螨和灰飞虱的饲养条件均为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 60%, 光周期 16L:8D。

1.2 豆叶螨与灰飞虱总 DNA 的提取

提取豆叶螨总 DNA 时, 将每头成螨作为一个独立样本, 放入装 25 μL STE 缓冲液 (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 的 1.5 mL 离心管中, 用研磨棒研磨均匀。加入 2.5 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL), 4 000 r/min 离心 1 min, 37°C 孵育 1 h, 然后 95°C 变性 5 min, 4 000 r/min 离心 1 min, 随后置于 -20°C 保存或取 2 μL 直接做模板进行 PCR 扩增。提取灰飞虱总 DNA

时, 将每头成虫放入 40 μ L STE 缓冲液中研磨, 其余步骤与豆叶螨 DNA 提取方法一致。

1.3 PCR 扩增

Wolbachia 的检测使用一对特异性引物 (wsp-81F 和 wsp-691R) 扩增 *wsp* 基因, 扩增出一段长度为 599 bp 的片段 (表 1)。PCR 反应体系总体积为 25 μ L 的扩增反应体系由以下成分组成: 2 μ L DNA 模板, 14.3 μ L 灭菌水, 2.5 μ L 10 \times buffer, 2.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 2.5 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L, 大连 TaKaRa 公司), 上游和下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 μ L 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 最后一次循环后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物的电泳检测: 取 PCR 反应产物 10 μ L, 在 1.5% (g/mL) 的琼脂糖凝胶上 110 V 电压电泳检测, 在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 下观察并记录结果。阳性对照为已检测过的确定 *Wolbachia wsp* 基因片段的 PCR 回收产物; 阴性对照为超纯水。

表 1 本研究中用到的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	参考文献 Reference
wsp-81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	Zhou <i>et al.</i> , 1998
wsp-81R	AAAAATTAACCGCTACTCCA	
wTpQ-F	CTCGTACT TCGGTTCTTATGGC	Zhao <i>et al.</i> , 2013
wTpQ-R	TTAAACGCTACTCCAGCTTCTGC	
wLsQ-F	GTTGATGTTGAAGGGCTTACTCAC	本研究设计
wLsQ-R	GGCATATCTTCAATCGCTATATCGT	Designed in this study

1.4 PCR 扩增产物的测序

低熔点琼脂糖电泳切胶回收 PCR 产物, 利用 V-gene Biotechnology Limited 公司的纯化试剂盒。将纯化产物连接至 pGEM-T 载体 (Promega 公司), 再进一步转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中进行培养。经过蓝白斑和氨苄筛选, 重组质粒经扩大培养及 PCR 检测后, 将阳性克隆用于测序。所有测序工作均由上海美吉公司完成。

1.5 叶螨和灰飞虱体内的 *Wolbachia* 分型及系统发育分析

Baldo 等 (2006) 提出用多位点序列分型 MLST 的方法来对不同 *Wolbachia* 进行株系的鉴定和分型,

有效地避免了由于 *wsp* 基因重组而带来的分型混乱现象。本研究中用到了 *Wolbachia* 的 5 个持家基因: *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* 和 *fbpA*。PCR 反应体系总体积 20 μ L, 由以下成分组成: 2 μ L DNA 模板, 9 μ L 灭菌水, 2.5 μ L 10 \times buffer, 2.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 1 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 1 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L, 大连 TaKaRa 公司), 上游和下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 45 s (*hcpA*: 53 $^{\circ}$ C; *gatB* 和 *ftsZ*: 54 $^{\circ}$ C; *coxA*: 55 $^{\circ}$ C; *fbpA*: 59 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 36 个循环; 延伸: 72 $^{\circ}$ C 10 min。最后保持在 4 $^{\circ}$ C。

利用贝叶斯 (Bayesian) 方法 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) 对 *Wolbachia* 的系统发育关系进行分析, 分析基于 5 个持家基因的接合序列进行。除本研究中豆叶螨和灰飞虱感染的 *Wolbachia* 序列以外, 我们在专用数据库中下载了其余 16 个物种感染的 *Wolbachia* 序列 (<http://www.pubmlst.org/wolbachia/>)。首先通过 Modeltest 中的 AIC 值选取进化模型, 选用 GTR + I + G 模型。在 MrBayes 3.1.2 中共运行 3 000 000 代, 取样频率为 100。最后得到不同株系 *Wolbachia* 的系统发育关系。

1.6 *Wolbachia* 的提取纯化

1) 供体收集: 用吸虫管吸取新鲜灰飞虱 5 龄若虫 40 ~ 50 头放入离心管中。

2) 供体洗涤: 将装有若虫的离心管在桌面上垂直敲打, 使虫体聚于管底。快速向管内加入 500 μ L PBS 缓冲液 (PBS: 将 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 以及 1.44 g Na₂HPO₄ 溶解于 1 L 灭菌水中, pH 7.2)。用枪头轻轻反复吸打, 然后吸出 PBS 溶液, 保留虫体在离心管中。将此步骤重复 3 次以洗去虫体表面的杂质。

3) 供体研磨: 向离心管中加入 250 μ L 碾磨缓冲液 [250 mmol/L 蔗糖, 90 mmol/L KCl, 30 mmol/L NaCl, 15 mmol/L MgSO₄, 5.5 mmol/L CaCl₂, 0.1% (w/v) Lubrol; ICN Inc., Costa Mesa, Calif.], 用已灭菌的玻璃研磨棒将若虫充分研磨。然后, 继续加入 750 μ L 的研磨缓冲液将研磨液稀释。为了选出一种最有效的研磨缓冲液, 在此步骤中, 我们分别采用了 4 种不同的液体用来研磨溶解虫体。

4) 将上一步骤中得到的研磨液通过孔径为 1 μ m 的过滤器, 一方面滤去大的碎片, 另一方面保证 *Wolbachia* 菌胞的顺利通过。

5) 将上一步骤中得到的滤液离心, 速度为 300

$\times g$, 离心时间为 5 min。目的是进一步的除去灰飞虱细胞碎片, 而保留 *Wolbachia* 菌胞。将得到的上层溶液吸入新的离心管中。

6) 将上一步骤中得到的含有 *Wolbachia* 菌胞的悬浊液进一步离心, 速度为 $12\ 000 \times g$, 离心时间为 15 min。弃滤液, 剩余的沉淀为纯化出的 *Wolbachia* 菌胞。

7) 用 35 μL 的研磨缓冲液将沉淀重悬浮, 简单离心 ($300 \times g$, 3 min) 后, 取上清液作为外源 *Wolbachia* 注射液。

1.7 感染纯系的筛选

豆叶螨感染纯系的筛选采用孤雌回交的方法 (Hong *et al.*, 2002)。在菜豆叶上接入静 III 时期的雌若螨 1 头, 让其孤雌生殖, 等到所产卵发育为雄成螨时, 与其母本回交。回交 2 d 后, 将母本移到新鲜叶片上使其产卵 3~5 d, 之后检测该母本的感染情况。将感染的母本所产生的后代重复以上步骤 4~5 代, 然后 PCR 检测后代雌成螨 30~40 头, 直至达到感染率 100%, 否则继续回交。与此同时, 将不感染共生菌的母本后代单独培养, 并连续检测 3 代确保 100% 不感染共生菌, 从而建立起不感染品系。然而, 由于外源 *Wolbachia* 在叶螨种群中的垂直传播效率较低, 所以没有筛到 100% 感染外源 *Wolbachia* 的种群。经连续 5 代以上的 PCR 检测, 我们发现灰飞虱南京种群的 *Wolbachia* 感染率和垂直传播效率均为 100%, 这说明该种群为自然的 *Wolbachia* 感染纯系, 无需人工筛选。

1.8 显微注射外源 *Wolbachia*

我们选择的注射对象为不感染品系的静 III 态雌螨, 这是在成虫羽化前最后一个阶段。这个阶段的雌螨体型与成螨相近, 并且保持静止不动, 有利于我们完成注射实验。将待注射的静 III 态若螨分别置于豇豆叶片上, 并将叶片平铺在注射平台上开始注射, 注射位置为雌螨背面的后端。外源 *Wolbachia* 注射量取决于注射压力、注射时间和补偿压力, 注射中, 注射压力 $P_i = 800\ \text{hpa}$; 注射时间 $t = 0.2\ \text{s}$; 补偿压力 $P_c = 80\ \text{hpa}$, 以此来控制注射量的一致性。

显微注射仪: Eppendorf Inject Man NI 12; 拉针仪: Sutter P97; 气泵: FemtoJet 5247。

拉针参数: Heat 627, Pull 0, Vel 30, Time 250。

1.9 外源 *Wolbachia* 在叶螨种群中的感染率的世代演变

将注射外源 *Wolbachia* 后成活的雌螨单独隔离

饲养, 每头雌螨都配以 2~3 头不感染的雄螨, 使其交配产生后代。产卵 5 d 后, 提取母本 DNA, 并进行 PCR 检测 *Wolbachia* 的感染情况。根据检测结果, 保留感染母本的后代, 将不感染母本的后代排除出本实验。对于保留的不同母本后代继续分开隔离饲养, 同样的方法来逐代检测不同世代叶螨种群中外源 *Wolbachia* 的感染率。

1.10 遗传杂交实验

取新鲜菜豆叶片, 从完全感染或不感染的品系中选取静 III 时期的雌若螨分别隔离培养, 这些雌螨蜕皮羽化为成螨后进行产雄孤雌生殖。做杂交实验时, 再另取新鲜叶片, 每个叶片划分成几个面积约为 $4\ \text{cm}^2$ 的圆形小区, 从之前产雄孤雌生殖后代中挑取 2 头 1 日龄的雄螨放入小区, 目的是避免雄螨老化或者同一头多次交配后共生菌的影响减弱的现象; 从完全感染或者不感染的品系中分别挑取单个 (成熟前的最后一个静止期) 雌虫放到叶片的小区中, 每个小区只放一对。雌螨蜕皮成为成熟个体的 2 d 以后将雄螨移走。从开始产卵的第 1 天算起, 产卵 5 d 后移走雌螨。每天检查并记录卵数, 卵孵化数, 幼螨成活数, 以及雌螨和雄螨的数目。如果亲代雄成螨在雌螨产卵前死亡, 要及时补充雄成螨; 如果亲代雌成螨产卵未 5 d 就死亡, 此数据作废。最后, 根据每天记录的数据计算出孵化率、存活率和性比等。

为检测不同株系 *Wolbachia* 对叶螨生殖的影响, 进行了 8 个组合的杂交实验, 分别是: $\text{♀ U} \times \text{♂ U}$; $\text{♀ U} \times \text{♂ W}$; $\text{♀ W} \times \text{♂ U}$; $\text{♀ W} \times \text{♂ W}$; $\text{♀ U} \times \text{♂ U}'$; $\text{♀ U} \times \text{♂ W}'$; $\text{♀ W}' \times \text{♂ U}$; $\text{♀ W}' \times \text{♂ W}'$ 。其中 W 代表自然感染的 *Wolbachia*, W' 代表外源导入的 *Wolbachia*。由于没有筛到 100% 感染外源 *Wolbachia* 的叶螨品系, 在这部分实验中, 我们选用的是转染后第 4 代的叶螨。按照杂交实验方法, 对第 4 代叶螨与不感染品系展开若干组合。产卵 5 d 后, 对母本和父本进行 PCR 检测, 以判断其感染情况, 从而将得到的杂交数据分为 4 组: $\text{♀ U} \times \text{♂ U}$; $\text{♀ U} \times \text{♂ W}'$; $\text{♀ W}' \times \text{♂ U}$; $\text{♀ W}' \times \text{♂ W}'$ 。

1.11 寿命评估

我们挑取 100 头左右静 III 时期的雌若螨, 12 h 后挑走已孵化的雌螨, 再过 8 h 后将在这 8 h 内新孵化的雌螨挑入新鲜叶片。每片新鲜的叶片上挑入 8 头雌螨以及雄螨 (评估不交配雌螨的寿命时不挑入雄螨), 每个感染品系需要 3 个叶片, 即每个感染品系总共 24 头雌螨。由于不能够筛选得到转染

纯系, 所以, 在评估转染雌螨寿命时, 我们及时对死亡个体进行 PCR 检测, 仅记录感染个体的数据, 避免了不感染个体寿命的影响。为保证充足的营养条件, 每 3 d 将螨转移到新鲜的叶片上。由于雄螨很容易逃逸或者淹水死亡, 难以检测其寿命, 因此, 我们只观察了感染共生菌对雌螨寿命的影响。

1.12 实时定量 PCR 检测 *Wolbachia* 的菌量

使用 TaKaRa 公司设计的 SYBR 荧光定量试剂盒, 分别对不同羽化天数的自然感染和转染叶螨体内的 *Wolbachia* 进行定量, 仪器是 ABI 公司推出的 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System。自然感染 *Wolbachia* 和转染 *Wolbachia* 的定量引物分别为 wTpQ-F/R 和 wLsQ-F/R (表 1)。定量 PCR 反应体系总体积为 20 μ L, 成分为: 1 μ L 的 DNA 模板, 10 μ L 的 SYBR 试剂, 0.4 μ L 的 Rox Dye, 7.8 μ L 的 ddH₂O, 上下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环。要获得 *wsp* 基因的准确拷贝数, 我们要先制定标准曲线。分别将两对定量引物扩增出的 *wsp* 基因片段利用前面提到的 PCR 产物纯化、连接、转化的方法得到 *wsp* 基因克隆载体 DNA, 即质

粒 DNA。使用赛默飞世尔科技有限公司 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 生产的 Nanodrop 1000 微量紫外分光光度计对提取的质粒 DNA 的浓度进行测量, 通过下面的公式换算得到质粒 DNA 的拷贝数浓度, 然后以 10 倍的梯度稀释质粒。标准曲线的制作使用稀释倍数为 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 的质粒标准样。

质粒拷贝浓度 (拷贝/mL)

$$= \frac{\text{质粒 DNA 质量}}{\text{质粒 DNA 摩尔质量}} \times 6.02 \times 10^{23}$$

$$= \frac{\text{质粒浓度 (ng/mL)} \times \text{质粒体积}}{(\text{载体长度} + \text{插入片段长度}) \times 660} \times 6.02 \times 10^{23}$$

式中, 660 为每个碱基对的平均分子量。

1.13 数据统计与分析

用 SPSS 软件对产卵量、孵化率、存活率以及性比进行 ANOVA 分析, 均值的多重比较用 Turkey 氏检验。在进行 ANOVA 分析前, 对产卵量进行自然对数 (ln) 转换, 而孵化率、存活率和性比先用反正弦平方根进行数据预处理, 从而保证数据为正态分布以及等方差。生存曲线比较则通过 SPSS 软件的 Kaplan-Meier 方法以及 log-rank test 进行统计分析。

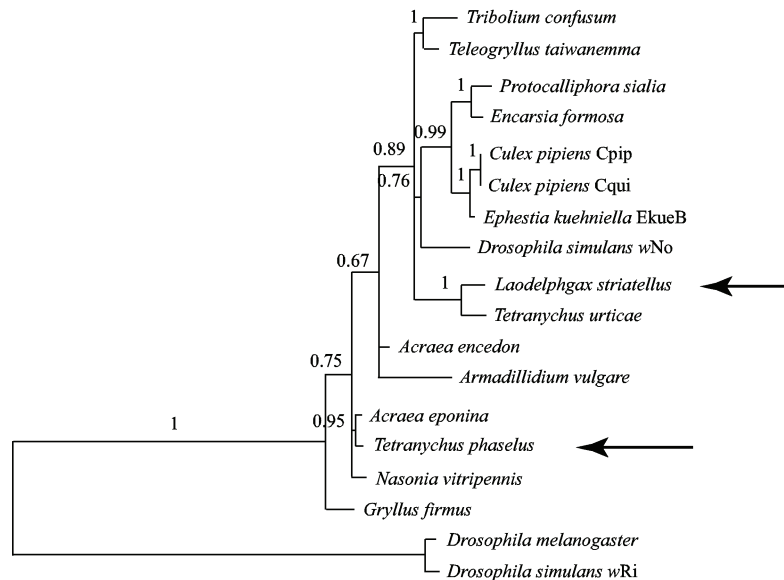


图 1 基于 *Wolbachia* 株系的宿主系统发育关系

Fig. 1 Phylogeny of the hosts based on *Wolbachia* strains

Tribolium confusum: 杂拟谷盗; *Teleogryllus taiwanemma*: 蟋蟀; *Protocalliphora sialia*: 一种原丽蝇; *Encarsia formosa*: 丽蚜小蜂; *Culex pipiens*: 尖音库蚊; *Ephestia kuehniella*: 地中海粉螟; *Drosophila simulans*: 拟果蝇; *Laodelphgax striatellus*: 灰飞虱; *Tetranychus urticae*: 二斑叶螨; *Acraea ecedon*: 一种珍蝶; *Armadillidium vulgare*: 平甲虫; *Acraea eponina*: 一种珍蝶; *Tetranychus phaselus*: 豆叶螨; *Nasonia vitripennis*: 蝇蛹金小蜂; *Gryllus firmus*: 沙蟋; *Drosophila melanogaster*: 黑腹果蝇。箭头所指的为本研究中的两个 *Wolbachia* 宿主。图中 Cpip, Cqui, EkueB, wNo 和 wRi 代表相应宿主感染的 *Wolbachia* 株系名称。The two *Wolbachia* hosts in this study are labeled with arrows. Cpip, Cqui, EkueB, wNo and wRi are the name of *Wolbachia* strains in the corresponding hosts.

2 结果与分析

2.1 灰飞虱与叶螨体内两种株系 *Wolbachia* 的 MLST 分型

从叶螨感染种群和灰飞虱种群中各选代表样本,进行 *Wolbachia* 5 个持家基因的 PCR 扩增。对扩增条带进行回收、连接、转化、测序,最终得到 5 个基因的核苷酸序列。利用 MrBayes 3.1.2 对得到的两种寄主体内的不同株系的 *Wolbachia* 进行 MLST 分型(图 1)。从系统发育关系图可以看出,豆叶螨感染的 *Wolbachia* 与灰飞虱感染的 *Wolbachia* 亲缘关系较远。

2.2 外源 *Wolbachia* 在豆叶螨种群中感染率的世代演变

从图 2 可以看出,后代中外源 *Wolbachia* 的感染率出现了先上升后下降的趋势。从母本到第 4 代,感染率逐代上升。在这个阶段中,5 组重复实验的平均感染率从 28.87% 上升到了 82.77%。这说明,此时外源 *Wolbachia* 具有一定的入侵动力。而从第 4 代到第 10 代的过程中,感染率出现了逐渐下降的趋势。尽管在第 8 代时有小幅回升,但过了第 8 代又继续下降,到第 10 代时,5 组重复实验的平均感染率为 27.06%。

2.3 两种株系的 *Wolbachia* 对豆叶螨后代卵孵化率的影响

从自然感染品系与不感染品系杂交实验的结果看出,自然感染的 *Wolbachia* 能够引起较强烈的 CI 作用。主要表现在不感染雌螨与感染雄螨交配后,后代卵孵化率较低,仅为 52.03%,显著低于其余 3 个亲和组合(Tukey HSD 检验, $P < 0.001$)(图 3: A)。从转染品系与不感染品系杂交实验的结果看出,外源 *Wolbachia* 在叶螨种群中并不能引起 CI 作用。不感染雌螨与雄螨交配后,后代卵孵化率为 96.77%。与其余 3 组亲和组合的后代卵孵化率无显著差异(Tukey HSD 检验, $P = 0.289$)(图 3: B)。

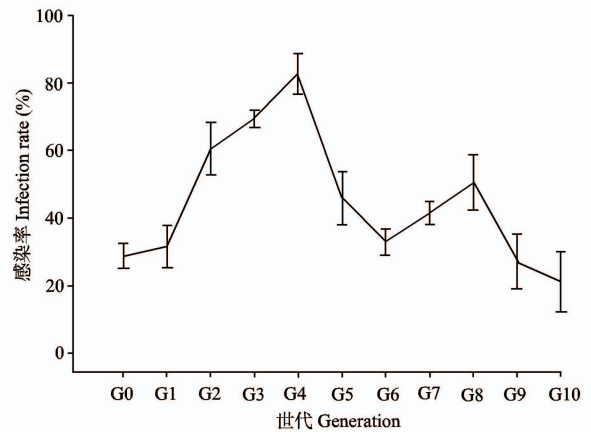


图 2 转染豆叶螨种群不同世代中的平均感染率

Fig. 2 Average infection efficiency in different generations of transinfected population of *Tetranychus phaseolus*

图中各点代表平均值 ± 标准误。Each point in the figure represents the mean ± SE.

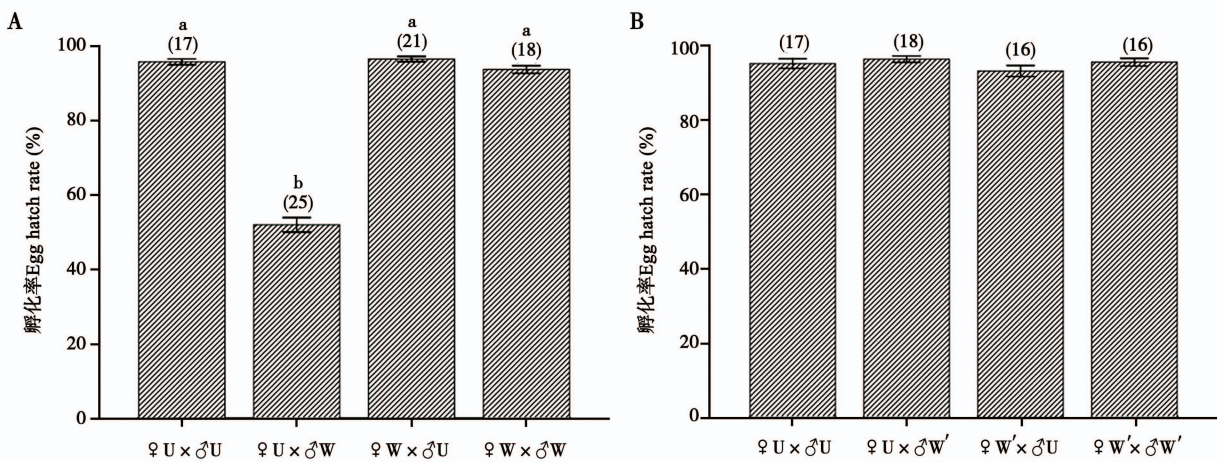


图 3 豆叶螨不感染品系分别与感染品系、转染品系杂交结果

Fig. 3 Results of crossing experiments of uninfected strain with infected or transinfected strains of *Tetranychus phaseolus*

A: 自然感染品系与不感染品系的杂交 Crosses between infected and uninfected lines; B: 转染品系与不感染品系的杂交 Crosses between transinfected and uninfected lines. U: 不感染品系 Uninfected line; W: 感染品系 *Wolbachia* infected line; W': 转染品系 *Wolbachia* transinfected line. 柱上括号中数字代表该杂交组合的重复数,柱上不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$, Tukey-HSD test). Number of replicates for each of the cross types are shown in parentheses. Different letters above bars represent significant differences among statistic groups ($P < 0.05$, Tukey-HSD test).

2.4 两种株系的 *Wolbachia* 对豆叶螨产卵量的影响

分别评估了自然感染 *Wolbachia* 与外源 *Wolbachia* 对豆叶螨产卵量的影响。为了排除由于雄螨感染类型不同而产生的影响, 我们比较了感染雌螨、不感染雌螨分别与不感染雄螨交配后的产卵

量。从图 4(A)可以看出, 自然感染的 *Wolbachia* 能够显著提高豆叶螨的产卵量, 从 24.24 ± 1.14 提高到了 31.19 ± 0.53 ($P < 0.001$, T 检验)。与此相反, 从图 4(B)看出外源导入的 *Wolbachia* 却大大降低了豆叶螨的产卵量, 从 24.24 ± 1.14 降到了 16.29 ± 1.15 ($P < 0.001$, T 检验)。

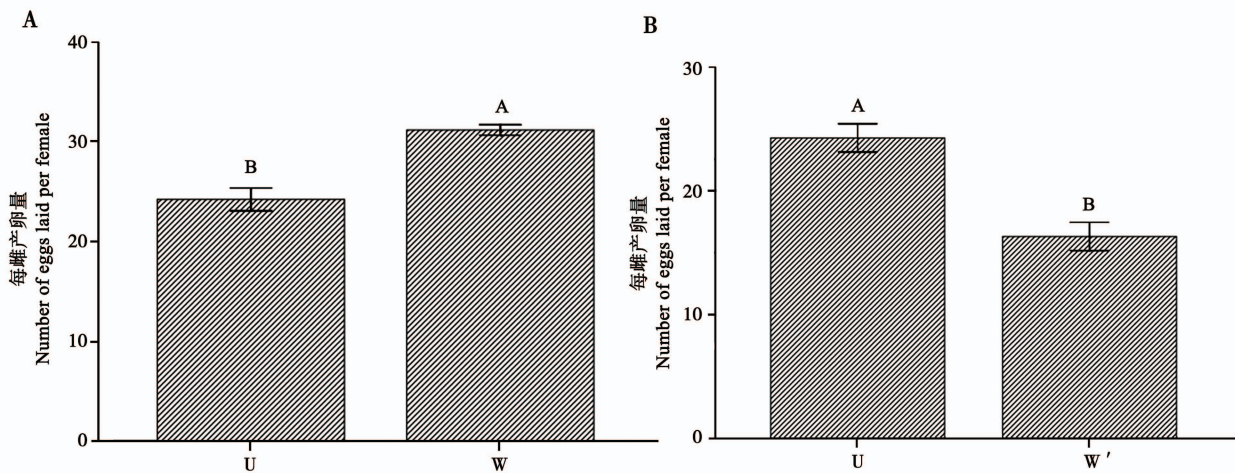


图 4 不同感染类型豆叶螨雌螨 5 d 内的平均产卵量

Fig. 4 Average number of eggs laid by *Tetranychus phaseolus* adult females in different infection status in 5 d

A: 不感染雌螨与感染雌螨的生殖力比较 Comparison of fecundity of uninfected and infected females; B: 不感染雌螨与转染雌螨的生殖力比较 Comparison of fecundity of uninfected and transinfected females. 柱上不同字母示差异显著 ($P < 0.001$, T 检验). Different letters above bars indicate significant difference at $P < 0.001$ (T -test). U: 不感染品系 Uninfected line; W: 感染品系 *Wolbachia* infected line; W': 转染品系 *Wolbachia* transinfected line.

2.5 两种株系的 *Wolbachia* 对豆叶螨寿命的影响

分别评估了自然感染 *Wolbachia* 与外源 *Wolbachia* 对豆叶螨雌螨寿命的影响。从图 5(A)可以看出, 自然感染雌螨与不感染雌螨的寿命没有显著的差别。自然感染雌螨平均寿命为 14.93 ± 1.89 d, 而不感染雌螨的品均寿命为 13.97 ± 1.71 d。统计结果显示, 二者并无显著差异 ($\chi^2 = 0.012$, $df = 1$, $P = 0.914$)。图 5(B)比较转染雌螨与不感染雌螨的寿命。结果显示, 转染雌螨的品均寿命为 11.00 ± 1.53 d。通过统计分析, 我们发现转染雌螨寿命与不感染雌螨的寿命没有显著差异 ($\chi^2 = 0.617$, $df = 1$, $P = 0.432$)。

2.6 不同日龄的豆叶螨体内 *Wolbachia* 的量

分别对自然感染的豆叶螨和人工转染的豆叶螨体内的 *Wolbachia* 进行了定量。从图 6(A)可以看出, 在自然感染的豆叶螨雌螨体内 *Wolbachia* 的拷贝数出现了随寄主日龄的增长而逐步增加的趋势。

从 1 日龄到 5 日龄期间拷贝数增长速度比较平稳, 从 3.87×10^7 增长到 5.21×10^7 。而 5 日龄到 9 日龄期间 *Wolbachia* 拷贝数增长速度较快, 增长到 8.62×10^7 。在自然感染的雄螨体 *Wolbachia* 的拷贝数低于雌螨。拷贝数随着寄主日龄呈现先上升后下降的趋势。其中 7 日龄叶螨的 *Wolbachia* 拷贝数最高, 为 6.48×10^7 。从图 6(B)可以看出, 外源 *Wolbachia* 在豆叶螨体内的拷贝数极低, 仅为自然感染豆叶螨体内 *Wolbachia* 拷贝数的 0.5% 左右。其中, 在雌螨体内, 外源 *Wolbachia* 的拷贝数出现了先上升后下降的趋势。第 5 日龄时 *Wolbachia* 拷贝数达到最高 5.16×10^5 , 而之后便开始急剧下降。到 9 日龄时, 拷贝数仅为 1.14×10^5 。在雄螨体内, 外源 *Wolbachia* 的拷贝数也同样出现了先上升后下降的趋势。但是, 最高点出现在了 3 日龄, 为 3.36×10^5 。从 3 日龄到 9 日龄期间, *Wolbachia* 的拷贝数随日龄平稳下降。

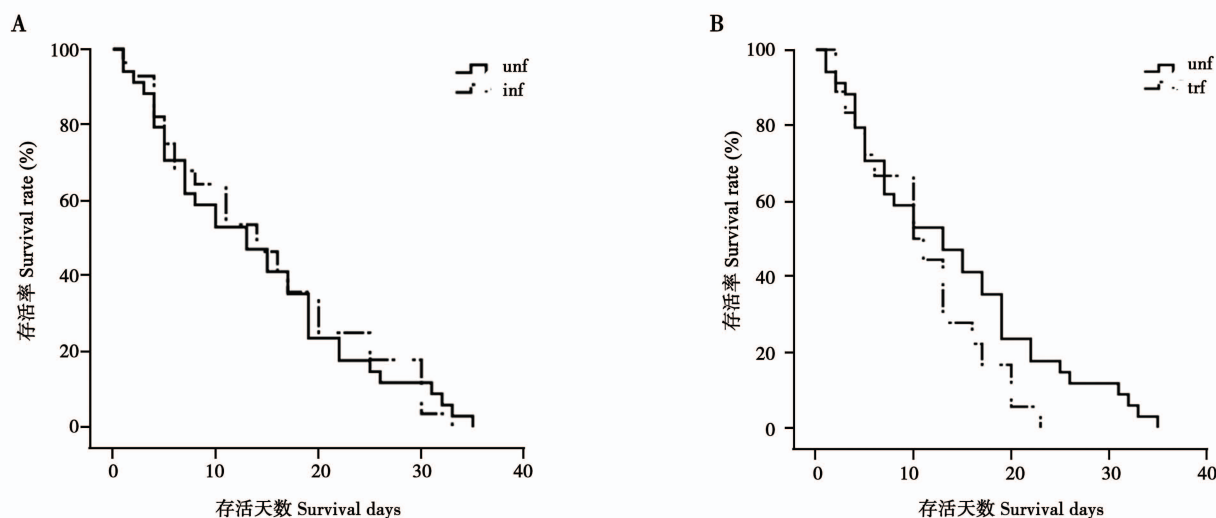


图5 感染、转染与不感染豆叶螨雌螨寿命的比较

Fig. 5 Comparison of longevity of infected, transinfected and uninfected *Tetranychus phaseelus* adult females

A: 不感染雌螨与感染雌螨的寿命比较 Comparison of the longevity of uninfected and infected females; B: 不感染雌螨与转染雌螨的寿命比较 Comparison of the longevity of uninfected and transinfected females. unf: 不感染雌螨 Uninfected females; inf: 感染雌螨 Infected females; trf: 转染雌螨 Transinfected females.

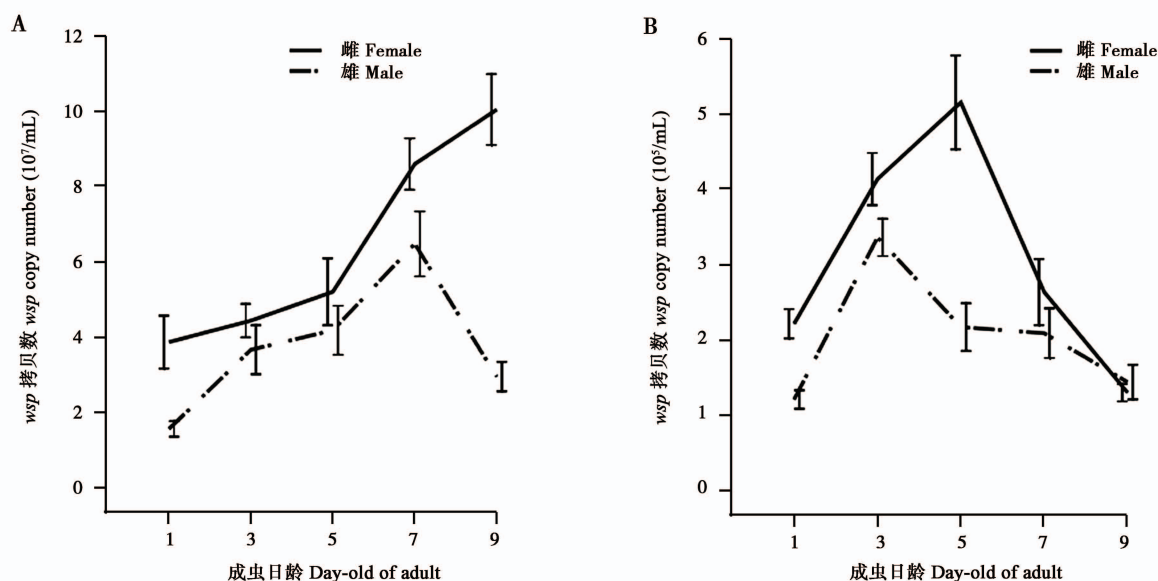


图6 不同日龄豆叶螨体内 Wolbachia 的拷贝数

Fig. 6 Copy numbers of *Wolbachia* in different day-old adults of *Tetranychus phaseelus*

A: 自然感染的豆叶螨 Infected *T. phaseelus*; B: 转染的豆叶螨 Transinfected *T. phaseelus*. 图中数据代表平均值 \pm 标准误; 每日龄检测 8 头个体。Data in the figure are represented as mean \pm SE, and 8 samples of each age are tested.

3 讨论

3.1 外源 Wolbachia 的注射

Wolbachia 的人工水平转移技术已经被广泛应用于多种昆虫中, 包括双翅目、鳞翅目、膜翅目等 (Boyle *et al.*, 1993; Giordano *et al.*, 1995; McGraw

et al., 2002; Riegler *et al.*, 2004)。 *Wolbachia* 不能在细胞外进行单独培养, 为我们注射剂的制备带来了很多的困难。综合前人的研究, 目前主要有 3 种制备方法: 第 1 种是直接从供体的卵中抽取卵质 (Braig *et al.*, 1994); 第 2 种是将 *Wolbachia* 培养在细胞系中, 在纯化 *Wolbachia* 时通过破碎细胞、去除细胞碎片来得到高纯度的 *Wolbachia* (Kawai *et*

al., 2009); 第 3 种是直接收集供体的成虫或若虫, 通过过滤、离心等步骤去除寄主细胞成分, 从而获取高纯度的 *Wolbachia* (Ruang-Areerate and Kittayapong, 2006)。在注射过程中, 大部分选择注射受体的胚胎, 主要目的是使得 *Wolbachia* 能够随着寄主细胞的不断分裂分化而逐渐增殖扩散。同时, *Wolbachia* 也能够更好地适应新寄主的细胞环境 (Fujii *et al.*, 2001; McGraw *et al.*, 2002; Xi and Dobson, 2005)。然而, 有一些受体的卵不易收集, 或是卵壳厚而且硬, 无法高效率地完成注射工作时, 研究者往往选择注射若虫或者成虫 (Ruang-Areerate and Kittayapong, 2006; Kawai *et al.*, 2009)。

在本研究中, 我们选择的供体是灰飞虱, 其体内能够引起完全 CI 的 *Wolbachia* 具有非常重要的生防价值。从理论上讲, 我们可以通过释放感染该株系 *Wolbachia* 的雄虫来实现对目标害虫种群的抑制。在纯化 *Wolbachia* 的探索中, 最初我们尝试使用直接抽取其卵质的方法, 然而, 在实际操作过程中效果不理想。一方面, 灰飞虱的卵产在水稻苗的内部, 收集起来费时费力; 另一方面, 灰飞虱的卵壳较硬, 抽取时针头容易折断。最终我们探索出了一套直接从灰飞虱若虫中提取 *Wolbachia* 的方法: 利用过滤、离心来去除灰飞虱细胞碎片, 纯化得到纯度相对较高且具有感染活性的 *Wolbachia*。受体豆叶螨, 是目前在蔬菜、棉花等作物上发生严重的主要害螨之一。据调查, 其危害呈现逐年上升的趋势。我们试图利用灰飞虱感染的 *Wolbachia* 来实现对豆叶螨的生物防治。在注射过程中, 经过不断的尝试和长期的探索, 我们最终选择了雌螨的静 III 态作为注射对象。一方面, 该时期的叶螨体型相对较大, 容易操作。另一方面, 这是雌螨羽化前的最后一个状态, 注射后可以在 24 h 以内获得成活率, 从而尽快开展后续实验。

3.2 胞质不亲和 (CI) 的表达情况

尽管该株系 *Wolbachia* 在灰飞虱中能够引起完全的 CI, 然而, 当其被转移到豆叶螨体内时却失去了引起 CI 的能力。据报道, 共生菌对寄主生殖调控能力的大小跟其感染密度呈正相关 (Poinsot *et al.*, 1998; Noda *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2010)。为了揭示这种现象产生的原因, 我们对转染后的豆叶螨进行了 *Wolbachia* 的定量检测。结果显示, 外源 *Wolbachia* 在豆叶螨体内的拷贝数极低, 仅仅为自然感染的 *Wolbachia* 的 1% 左右。由此, 我们判断, 拷贝数低是导致其失去引起 CI 能力

的一个原因之一。前人研究表明, *Wolbachia* 对精巢以及精子的感染是其引起 CI 作用的重要前提 (Clark *et al.*, 2003)。仅存在于寄主体细胞中的 *Wolbachia* 是不能引起 CI 的。有研究证明, *Wolbachia* 所引起的 CI 强度与精子的感染率有着正相关的关系 (Veneti *et al.*, 2003)。综合以上的研究我们推测, 导致外源 *Wolbachia* 不能引起 CI 的另外一个重要原因有可能是该 *Wolbachia* 仅存在于豆叶螨的体细胞中, 而没有侵染雄螨的精巢, 从而使得其产生的精子中不携带 *Wolbachia*。但这一推论需要通过定位外源 *Wolbachia* 在豆叶螨雄螨体内的分布来确认。

3.3 外源 *Wolbachia* 抑制雌螨产卵量

在研究中我们发现, 外源 *Wolbachia* 能够显著的降低雌螨的产卵量。这与自然感染的 *Wolbachia* 产生的效果截然相反。从这个角度来说, 外源 *Wolbachia* 对豆叶螨是具有一定毒性的。这种现象在之前也有所报道, 当把黑腹果蝇中的 *wMelPop* 株系的 *Wolbachia* 注射到拟果蝇体内后, 它对新寄主拟果蝇带来了一定的毒性, 主要表现为缩短新寄主寿命 (McGraw *et al.*, 2002)。从另一个角度来看, 外源 *Wolbachia* 在叶螨中的拷贝数尽管很低, 却对叶螨的产卵量产生了强烈的抑制作用。Zhao 等 (2013) 在多感染的豆叶螨中, 低拷贝的 *wOri* 株系的 *Wolbachia* 却显著延长了寄主寿命。由此, 我们推测, 尽管共生菌对寄主生殖调控能力的大小跟其感染密度呈正相关, 但是 *Wolbachia* 对宿主适合度的影响与其感染密度没有关系。即使在密度很低的情况下, *Wolbachia* 也可以对宿主的适合度产生显著的促进或者抑制作用。

3.4 外源 *Wolbachia* 在叶螨种群中的垂直传播

从外源 *Wolbachia* 感染率随豆叶螨世代的演变情况来看, *Wolbachia* 在新寄主种群中的垂直传播效率较低。而且从第 4 代开始, 垂直传播效率出现了逐代下降的趋势。我们推测, 外源 *Wolbachia* 在短时间内没有完全适应豆叶螨的细胞环境。结合定量结果我们也可以看出, 在雌螨体内外源 *Wolbachia* 的拷贝数出现了先上升后急剧下降的现象。这说明外源 *Wolbachia* 在新寄主细胞内的菌胞活性保持时间较短, 由于不适应寄主细胞而很快失去活性。这种外源 *Wolbachia* 在寄主中不能稳定存在而逐代消失的现象在之前也有过报道。当把果蝇中的 *Wolbachia* 注射到蚊子体内后, 蚊子中外源 *Wolbachia* 的感染率也出现了逐代下降的现象

(Ruang-Areerate and Kittayapong, 2006)。我们推测有两方面原因,一方面,两种寄主的亲缘关系较远。据 Clancy 和 Hoffmann (1997) 报道, *Wolbachia* 在不同寄主间人工转染的成功性往往取决于寄主间的亲缘关系。亲缘关系越近的两寄主间越容易实现 *Wolbachia* 的人工转染。灰飞虱和豆叶螨的亲缘关系远,分别属于昆虫纲和蛛形纲,这是导致外源 *Wolbachia* 在新寄主中感染不稳定的一个原因。另一方面,外源 *Wolbachia* 与受体自然感染的 *Wolbachia* 的亲缘关系较远,出现了受体不适应新株系的 *Wolbachia* 的情况。从图 1 的 *Wolbachia* 进化关系中我们发现,灰飞虱感染的 *Wolbachia* 与豆叶螨近缘种二斑叶螨中感染的 *Wolbachia* 亲缘关系较近。这说明豆叶螨具有感染灰飞虱 *Wolbachia* 的潜在能力。然而,在本研究中出现了灰飞虱 *Wolbachia* 不能适应豆叶螨的现象,原因可能是将含有 *Wolbachia* 的纯化物直接注射进豆叶螨成体后中出现的一些复杂的不定因素。为了解决外源 *Wolbachia* 与新寄主相互不适应的问题,在今后的研究中,我们可以将供体中的 *Wolbachia* 先培养在受体细胞系中,待其适应受体细胞环境后,再将其纯化出来注射到受体卵或成体中。目前,利用 *Wolbachia* 来防止蚊子向人类传播病毒的研究已经取得了很大的进展,并从实验室研究逐步转向室外试验。这为我们充分利用有价值的 *Wolbachia* 株系来防治叶螨等害虫提供了理论和实践依据。相信,只要能突破目前技术上的一些难题,利用 *Wolbachia* 来实现对害虫的生物防治将指日可待。

参考文献 (References)

- Baldo L, Hotopp J, Jolley K, Bordenstein SR, Biber S, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH, 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 7098–7110.
- Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML, 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 2407–2413.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P, 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 1081–1090.
- Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM, Karr TL, 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, 260: 1796–1799.
- Braig HR, Guzman H, Tesh RB, O'Neill SL, 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367(6462): 453–455.
- Breeuwer JAJ, Jacobs G, 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol.*, 20: 421–434.
- Clancy DJ, Hoffmann AA, 1997. Behavior of *Wolbachia* endosymbionts from *Drosophila simulans* in *Drosophila serrata*, a novel host. *Am. Nat.*, 149: 975–988.
- Clark ME, Veneti Z, Bourtzis K, Karr TL, 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility during sperm development: the cyst as the basic cellular unit of CI expression. *Mech. Develop.*, 120: 185–198.
- Fujii Y, Kageyama D, Hoshizaki S, Ishikawa H, Sasaki T, 2001. Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proc. Biol. Sci.*, 268: 855–859.
- Giordano R, O'Neill SL, Robertson HM, 1995. *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics*, 140: 1307–1317.
- Goodacre SL, Martin OY, Thomas CFG, Hewitt GM, 2006. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. *Mol. Ecol.*, 15(2): 517–527.
- Gotoh T, Noda H, Hong XY, 2003. *Wolbachia* distribution and cytoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan. *Heredity*, 91: 208–216.
- Grenier S, Bernard P, Heddi A, Lassablière F, Jager C, Louis C, Khatchadourian C, 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proc. Biol. Sci.*, 265: 1441–1445.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH, 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.*, 281: 215–220.
- Hoffmann AA, Turelli M, Simmons GM, 1986. Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*, 40: 692–701.
- Hong XY, Gotoh T, Nagata T, 2002. Vertical transmission of *Wolbachia* in *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus mori* Yokoyama (Acari: Tetranychidae). *Heredity*, 88: 190–196.
- Hurst GD, Jiggins FM, 2000. Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerg. Infect. Dis.*, 6: 329–336.
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP, 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, 326: 134–136.
- Kang L, Ma X, Cai L, Liao S, Sun L, Zhu H, Chen X, Shen D, Zhao S, Li C, 2003. Superinfection of *Laodelphax striatellus* with *Wolbachia* from *Drosophila simulans*. *Heredity*, 90: 71–76.
- Kawai S, Matsumoto Y, Gotoh T, Noda H, 2009. Transinfection of *Wolbachia* in planthoppers: nymphal injection of cultured *Wolbachia* and infection dynamics. *Environ. Entomol.*, 38(6): 1626–1633.
- McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O'Neill SL, 2001. *Wolbachia*-mediated sperm modification is dependent on the host genotype in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268(1485): 2565–2570.

- McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O' Neill SL, 2002. *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(5): 2918 - 2923.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O' Neill SL, 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323: 141 - 144.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O' Neill SL, 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, *Chikungunya*, and *Plasmodium*. *Cell*, 139: 1268 - 1278.
- Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, Deng K, 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(6 - 7): 727 - 737.
- O' Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2699 - 2702.
- Poinsot D, Bourtzis K, Markakis G, Savakis C, Mercot H, 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics*, 150: 227 - 237.
- Riegler M, Charlat S, Stauffer C, Merçot H, 2004. *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1): 273 - 279.
- Rigaud T, Pennings PS, Juchault P, 2001. *Wolbachia* bacteria effects after experimental interspecific transfers in terrestrial isopods. *J. Invertebr. Pathol.*, 77: 251 - 257.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572 - 1574.
- Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA, 2004. *Wolbachia pipientis* in Australia spiders. *Curr. Microbiol.*, 49: 208 - 214.
- Ruang-Areerate T, Kittayapong P, 2006. *Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: a potential gene driver of dengue vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 12534 - 12539.
- Sakamoto H, Ishikawa Y, Sasaki T, Kikuyama S, Tatsuki S, Hoshizaki S, 2005. Transinfection reveals the crucial importance of *Wolbachia* genotypes in determining the type of reproductive alteration in the host. *Genet. Res.*, 85: 205 - 210.
- Schulenburg JHG, Hurst GDD, Huigens TME, van Meer MM, Jiggins FM, Majerus ME, 2000. Molecular evolution and phylogenetic utility of *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* gene sequences with special reference to the origin of male-killing. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 584 - 600.
- Sinkins SP, Godfray HCJ, 2004. Use of *Wolbachia* to drive nuclear transgenes through insect populations. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 271: 1421 - 1426.
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53: 71 - 102.
- Vavre F, Girin C, Bouletreau M, 1999. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Mol. Biol.*, 8: 67 - 72.
- Veneti Z, Clark ME, Zabalou S, Karr TL, Savakis C, Bourtzis K, 2003. Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila-Wolbachia* associations. *Genetics*, 164: 545 - 552.
- Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587 - 609.
- Xi Z, Dobson SL, 2005. Characterization of *Wolbachia* transfection efficiency by using microinjection of embryonic cytoplasm and embryo homogenate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 3199 - 3204.
- Xie RR, Zhou LL, Zhao ZJ, Hong XY, 2010. Male age influences the strength of *Cardinium*-induced cytoplasmic incompatibility expression in the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus*. *Appl. Entomol. Zool.*, 45(3): 417 - 423.
- Zhao DX, Chen DS, Cheng G, Gotoh T, Hong XY, 2013. Multiple infections with *Cardinium* and two strains of *Wolbachia* in the spider mite *Tetranychus phaseus* Ehara: revealing new forces driving the spread of *Wolbachia*. *PLoS ONE*, 8(1): e54964.
- Zhou W, Rousset F, O' Neil SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 509 - 515.

(责任编辑: 袁德成)