

沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染

甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 沈大棱, 李昌本

(复旦大学生命科学院遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要: 用 PCR 方法检测了采集于不同地域稻田的 3 种稻飞虱共生菌沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的感染, 发现灰飞虱 *Laodelphax striatellus*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、白背飞虱 *Sogatella furcifera* 为沃尔巴克氏体所感染。克隆了编码沃尔巴克氏体外膜蛋白质的 *wsp* 基因并进行了序列测定。对 *wsp* 的 RFLP 分析证实了这些飞虱为单一沃尔巴克氏体感染。研究了灰飞虱中沃尔巴克氏体所诱导的胞质不相容性及其在不同地域灰飞虱中的分布。还发现能寄生于上述 3 种飞虱的稻虱红螯蜂也受同种沃尔巴克氏体感染。沃尔巴克氏体可能通过这种寄生蜂在不同昆虫间横向传播。

关键词: 沃尔巴克氏体; 灰飞虱; 褐飞虱; 白背飞虱; *wsp* 基因; 感染

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2002) 01-0014-04

Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China

GAN Bo-Yi, ZHOU Wei-Guo, FENG Li-Bing, SHEN Da-Leng, LI Chang-Ben (State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The infection of the bacterial symbionts *Wolbachia* in 3 planthoppers was detected by PCR method. *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* were found to be infected with *Wolbachia*. The gene *wsp*, encoding the outer membrane protein of the symbiotic bacteria, was cloned and sequenced. The RFLP analysis confirmed that those planthoppers were infected with the single *Wolbachia* strain. The cytoplasmic incompatibility (CI) induced by *Wolbachia* in *Laodelphax striatellus* and the distribution of *Wolbachia* in this insect from different regions were studied. A parasitic wasp, *Haplogonatopus apicalis*, which can parasitize the planthoppers, was found to be infected with the same *Wolbachia*. *Wolbachia* might transfer between different insect horizontally via this wasp.

Key words: *Wolbachia*; *Laodelphax striatellus*; *Nilaparvata lugens*; *Sogatella furcifera*; *wsp* gene; transfection

沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 为一类呈母系遗传的细胞内生细菌, 感染多种节肢动物宿主, 自然界中约 16% 的昆虫物种受其感染 (Werren, 1997)。这类细菌能够引发宿主多种生殖异常行为, 如甲壳类动物中雄性基因型个体的雌性化 (feminization), 胡蜂类昆虫孤雌生殖 (parthenogenesis), 而最常见的一种则是胞质不相容性 (cytoplasmic incompatibility, CI) (Werren, 1997)。CI 通常出现在两种交配情况下, 即感染了沃尔巴克氏体的雄性个体与非感染的雌性个体交配 (单向 CI), 或与感染了不同品系的沃尔巴克氏体的雌性个体交配 (双向 CI) (O'Neill *et al.*, 1990)。这两类交配产生的后代在胚胎发育的早期即全部或大部分死亡, 而其它组合方式的交配则产生正常数目的子代。有迹象表明, 沃尔巴克氏体能够通过某种未知机制修饰昆虫的精细

胞, 而只有同种沃尔巴克氏体感染的卵细胞才能补偿这种修饰作用 (Bourtzis *et al.*, 1998)。

通过对宿主生殖系统的作用, 沃尔巴克氏体能够有效地侵入宿主群体, 而不需要通过感染或其它的水平转移途径。在沃尔巴克氏体扩散的同时, 它能够带动与之相联系的其它细胞质因子, 如线粒体等, 在宿主群体中传播 (Turelli *et al.*, 1992)。双向 CI 实际上形成了一种生殖后隔离的机制, 有可能在节肢动物种间分化过程中起重要作用。

稻飞虱 (同翅目: 飞虱科) 是重要的农业害虫, 常取食危害水稻, 并传播多种水稻病害, 如灰飞虱是水稻条纹叶枯病毒 (RstV) 的媒介体 (李汝铎等, 1996)。稻飞虱的防治一般依赖于化学杀虫剂, 但并不能完全控制为害。随着环保及抗药性品系的出现等问题的不断加剧, 人们开始寻求其它的

基金项目: 美国 McKnight 基金和中国博士后基金资助项目

第一作者简介: 甘波谊, 男, 1975 年 4 月生, 籍贯湖南, 土家族, 硕士, 从事遗传学研究, E-mail: bg54@cornell.edu

收稿日期 Received: 2000-06-02; 接受日期 Accepted: 2001-02-10

防治策略。途径之一即是对昆虫的共生菌沃尔巴克氏体进行生物工程改造(如在共生菌体内转入和表达抗病毒基因), 并利用其诱导的生殖异常行为使这种转基因昆虫在自然界传播并最终取代自然昆虫群体(Beard *et al.*, 1993)。本文作者报道了3种稻飞虱被沃尔巴克氏体感染的情况, 明确了灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 中沃尔巴克氏体诱导 CI 的特性, 在此基础上探讨了沃尔巴克氏体水平传播的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 分别采集于北京(通县)、辽宁(铁岭)、宁夏(青铜峡)、四川(西昌)、上海(宝山)、云南(楚雄); 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和白背飞虱 *Sogatella furcifera* 采集于云南; 飞虱寄生蜂为稻虱红螯蜂 *Haplogonatopus apicalis*, 采集于云南。果蝇 *Drosophila simulans* 品系(DSR)(O'Neill *et al.*, 1990) 由耶鲁大学的 Scott O'Neill 博士提供, 该品系果蝇为沃尔巴克氏体感染, 在实验中用作阳性对照。DSRT 是 DSR 果蝇品系经四环素处理所得品系, 不为沃尔巴克氏体感染, 在实验中作为阴性对照。

1.2 PCR 扩增

模板制备参见 Zhou 等(1998)的方法, 扩增 *wsp* 基因片段使用的引物是 *wsp* 81F (5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC3') 和 *wsp* 691R (5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3')。在 20 μ L 反应体积中进行 PCR 反应, 反应体系为 13.5 μ L ddH₂O, 2 μ L 10 \times Buffer (Promega), 2 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ L dNTPs (每种 10 mmol/L), 0.5 μ L 20 μ mol/L 的正向和反向引物及一个单位的 Taq 高温多聚酶(Promega)。PCR 反应条件是: 首先在 94 $^{\circ}$ C 下变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 下 1 min, 55 $^{\circ}$ C 下 1 min, 72 $^{\circ}$ C 下 1 min 完成一个循环, 共进行 35 次循环。

1.3 基因克隆和测序

PCR 反应结束后, 在 72 $^{\circ}$ C 温育 PCR 产物 90 min。直接吸取 1 μ L PCR 反应产物与 pGEM-T 载体(Promega) 进行连接反应, 转化子经酶切鉴定正确后测序, 每个品系随机测定 3 个独立克隆的序列, 以它们的一致顺序为准。

1.4 超感染的鉴定

某些宿主被不止一种沃尔巴克氏体所感染, 这

种现象称为超感染(Sinkins *et al.*, 1995)。为了确定稻飞虱及其寄生蜂是否被多种沃尔巴克氏体感染, 用针对 *wCon* (见结果 2.1) 品系 *wsp* 基因特有的酶切位点 *Bgl* II (Promega) 进行 RFLP 分析, 即取 10 μ L PCR 产物作酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀后溶于 17 μ L H₂O 中进行酶切反应, 反应液体系是: PCR 产物加 H₂O 17 μ L, 10 \times 缓冲液 2 μ L, *Bgl* II 1 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h 后, 上样于 *w* = 3% 的琼脂糖凝胶(NuSieve, FMC BioProducts 公司), 电泳后溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并拍照。

1.5 交配

将预定用于交配的灰飞虱 5 龄若虫, 每试管中放 1 头, 待羽化后取雌雄各 1 头移入同一试管饲养, 5 天后取出成虫进行 PCR 检测, 14 天后统计若虫的数目。

2 结果和讨论

2.1 3 种稻田飞虱及其寄生蜂受沃尔巴克氏体感染

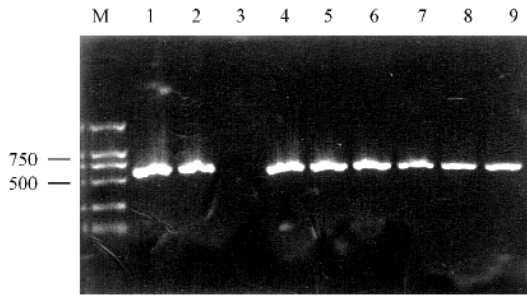
以 *wsp* 81F 和 *wsp* 691R 为引物的 PCR 反应从宁夏以外的 5 个灰飞虱地理种群样品和褐飞虱、白背飞虱及寄生蜂样品中均扩增出长约 600 bp 的片段(图 1)。测序结果表明来自这几种昆虫的 *wsp* 基因片段的序列完全一样, 而且和 *wCon* 品系沃尔巴克氏体(GenBank 索引号 AF020080) 的 *wsp* 基因的序列完全相同(Hoffmann *et al.*, 1990)。

wCon 品系的 *wsp* 基因片段能特异地被 *Bgl* II 酶切, 产生大小分别为 104 bp 和 507 bp 的 2 个片段。如果检测的昆虫不止被 1 种沃尔巴克氏体感染, PCR 产物经酶切后则可观察到 3 个片段, 其大小分别为 600 bp 左右(不能被酶解的其它品系的 *wsp* 基因片段)、131 bp 和 468 bp (被酶解的 *wCon* 品系的 *wsp* 基因片段)。如图 2 所示, 从这些昆虫中扩增的 *wsp* 基因片段均能被 *Bgl* II 完全酶切, 表明在这些昆虫中只存在 1 种沃尔巴克氏体。阳性对照 DSR 中的沃尔巴克氏体属于另一品系, 其 *wsp* 基因片段不为 *Bgl* II 酶解。

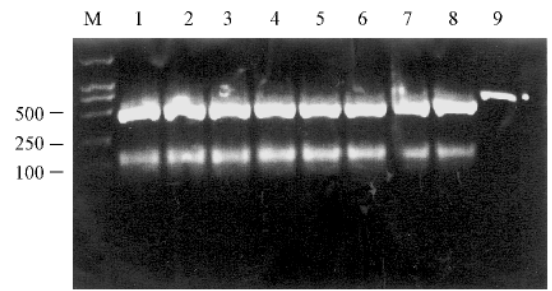
2.2 不同地区灰飞虱的沃尔巴克氏体感染率

对中国的辽宁、北京、宁夏、四川、上海、云南种群的沃尔巴克氏体感染率进行了 PCR 检测, 引物为 *wsp* 81F 和 *wsp* 691R, 结果如表 1 所示。

中国的辽宁、北京、上海和云南的灰飞虱的沃尔巴克氏体感染率均接近 100%, 四川为 58.6%, 而宁夏为 0。在我国形成了周边地区沃尔巴克氏体

图 1 *wsp* 基因片段的扩增Fig. 1 Amplification of the *wsp* gene fragment

M. 分子量参照 molecular weight marker; 1. 灰飞虱 (北京) *L. striatellus* (Beijing); 2. 灰飞虱 (辽宁) *L. striatellus* (Liaoning); 3. 灰飞虱 (宁夏) *L. striatellus* (Ningxia); 4. 灰飞虱 (四川) *L. striatellus* (Sichuan); 5. 灰飞虱 (上海) *L. striatellus* (Shanghai); 6. 灰飞虱 (云南) *L. striatellus* (Yunnan); 7. 褐飞虱 *N. lugens*; 8. 白背飞虱 *S. furcifera*; 9. 稻虱红螯蜂 *H. apicalis*

图 2 *wsp* 基因片段的 RFLP 分析Fig. 2 RFLP analysis of the *wsp* gene fragment

M. 分子量参照 molecular weight marker; 1. 灰飞虱 (北京) *L. striatellus* (Beijing); 2. 灰飞虱 (辽宁) *L. striatellus* (Liaoning); 3. 灰飞虱 (四川) *L. striatellus* (Sichuan); 4. 灰飞虱 (上海) *L. striatellus* (Shanghai); 5. 灰飞虱 (云南) *L. striatellus* (Yunnan); 6. 褐飞虱 *N. lugens*; 7. 白背飞虱 *S. furcifera*; 8. 稻虱红螯蜂 *H. apicalis*; 9. DSR

表 1 各地区灰飞虱的沃尔巴克氏体感染率

Table 1 *Wolbachia* infection rates in *L. striatellus* from different regions

地区 Region	总数 Total number		Wol ⁺		感染率 (%) Rate of infection		总百分率 (%) Total percentage
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
云南 Yunnan	25	25	23	19	92.0	76.0	84.0
上海 Shanghai	25	25	23	20	92.0	80.0	86.0
北京 Beijing	25	25	24	25	96.0	100	98.0
宁夏 Ningxia	20	19	0	0	0	0	0
辽宁 Liaoning	22	21	21	20	95.5	95.2	95.3
四川 Sichuan	11	18	7	10	63.6	55.6	58.6

Wol⁺ 为沃尔巴克氏体阳性 Wol⁺ represents *Wolbachia* positive

的感染率高 (如辽宁、北京、上海和云南), 而内陆地区感染率低 (如四川), 或是未被感染 (如宁夏) 的格局。

2.3 不同地区灰飞虱交配后代的细胞质不亲和性

取上海、云南、北京、辽宁、四川灰飞虱进行交配。配对 5 天后取出成虫进行 PCR 检测, 并记录 F₁ 代的个体数 (表 2)。

感染沃尔巴克氏体的雌虫与任何雄虫交配均有后代出现; 而未感染沃尔巴克氏体的雌虫只能在与未感染的雄虫交配时, 才有 F₁ 代出现。从表 2 中可以看出, 各地区间的灰飞虱交配结果, 均符合 CI 的表现规律, 但是在某些组合 (如云南 × 辽宁) 中, 虽有若虫出现, 但其数量很少。我们曾经推测这可能是由于感染了不同的 *Wolbachia* 造成的, 或者是某种灰飞虱中含有不只一种 *Wolbachia*。但是 RFLP 分析否定了这两种假设。也许其原因在于宿

主方面, 两地灰飞虱由于地理上的隔绝, 已经形成了一定程度的生殖隔离。

2.4 沃尔巴克氏体水平传播的可能机制

如果沃尔巴克氏体的传播严格局限于垂直方式, 则会与宿主共进化的, 其系统发生应与宿主的系统发生表现出对应关系。亲缘关系近的宿主应该被相似的沃尔巴克氏体所感染。但是实际观察的结果却远非如此。O'Neill 等 (1994) 观察到沃尔巴克氏体的分子系统发生与宿主的系统发生不一致。最近, Heath 等 (1999) 在实验室条件下, 成功地实现了利用寄生性昆虫在不同昆虫宿主间传播沃尔巴克氏体。在本研究中, 灰飞虱、白背飞虱、褐飞虱属于不同属的昆虫, 而它们感染的沃尔巴克氏体具有完全一样的 *wsp* 基因序列, *wsp* 基因是目前已知的沃尔巴克氏体内多态性最高的基因, 因此完全有理由认为这几种昆虫感染了同种或极为接近的沃尔

表2 不同地区灰飞虱的交配实验结果
Table 2 Cross experiments of *L. striatellus* from different regions

♀ Wol	♂ Wol	F ₁ 代若虫数 Number of F ₁ larvae
云南 Yunnan +	上海 Shanghai +	63
	北京 Beijing +	59
	四川 Sichuan +	71
	辽宁 Liaoning +	8
	宁夏 Ningxia -	37
上海 Shanghai +	云南 Yunnan +	17
	北京 Beijing +	78
	辽宁 Liaoning +	47
	宁夏 Ningxia -	29
辽宁 Liaoning +	上海 Shanghai +	59
	云南 Yunnan +	29
	上海 Shanghai -	39
	四川 Sichuan -	51
北京 Beijing +	上海 Shanghai +	15
	辽宁 Liaoning +	21
四川 Sichuan +	辽宁 Liaoning +	61
四川 Sichuan -	云南 Yunnan +	0
	辽宁 Liaoning +	0
宁夏 Ningxia -	宁夏 Ningxia -	4
	上海 Shanghai +	0
	云南 Yunnan +	0
	北京 Beijing +	0
	辽宁 Liaoning +	0
	四川 Sichuan -	23

Wol 为沃尔巴克氏体共生菌; + 为阳性; - 为阴性

Wol represents *Wolbachia*; + represents positive; - represents negative

巴克氏体。这种现象只有可能通过横向传播实现。我们在能同时感染这三种昆虫的寄生蜂稻虱红螯蜂中发现了同种沃尔巴克氏体的感染, 这暗示了一种可能的沃尔巴克氏体横向传播途径, 即通过寄生蜂传播。事实上, Schilthuisen 等 (1997) 的研究已经发现感染寄生蜂的沃尔巴克氏体经常与其宿主的沃

尔巴克氏体极为相似。也许, 这是沃尔巴克氏体横向传播的一种常见机制。

致谢 感谢云南楚雄植物保护站为本项研究提供的各种便利。

参 考 文 献 (References)

- Beard C B, O'Neill S L, Tesh R B *et al.*, 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *J. Parasitology Today*, 9: 179 ~ 183.
- Bourtzis K, Dobson S L, Braig H R *et al.*, 1998. Rescuing *Wolbachia* have been overlooked [letter]. *Nature*, 391: 852 ~ 853.
- Heath B D, Butcher R D, Whitfield W G *et al.*, 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr. Biol.*, 9: 313 ~ 316.
- Hoffmann A A, Turelli M, Harshman L G, 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *J. Genetics*, 126: 933 ~ 948.
- Li R D, Ding J H, Hu G W *et al.*, 1996. Planthopper and the Management of Planthopper Population. Shanghai: Fudan University Press. 1 ~ 33. [李汝铎, 丁锦华, 胡国文等, 1996. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社. 1 ~ 33]
- O'Neill S L, Giordano R, Colbert A M *et al.*, 1994. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2 699 ~ 2 702.
- O'Neill S L, Karr T L, 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific population of *Drosophila simulans*. *Nature*, 348: 178 ~ 180.
- Schilthuisen M, Stouthamer R, 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 264: 361 ~ 366.
- Siakins S P, Braig H R, O'Neill S L, 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 261: 325 ~ 330.
- Turelli M, Hoffmann A A, McKechnie S W, 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *J. Genetics*, 132: 713 ~ 723.
- Werren J H, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 587 ~ 609.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S L, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 265: 509 ~ 515.