

# 灰飞虱体内沃尔巴克氏体生物学特性及其利用展望

仲崇翔, 陈建, 乔静, 杨益众\*

(扬州大学农学院植物保护系, 扬州 225009)

**摘要** 灰飞虱既是传播水稻条纹叶枯病毒的媒介昆虫,也是我国水稻上的主要害虫。*Wolbachia* 是存在于飞虱等多种昆虫体内的一类共生菌,它们能通过多种机制调节寄主的生殖,包括诱导细胞质不亲和、孤雌生殖和遗传上的雄性雌性化等。目前对这类微生物的研究已取得了重要进展。本文综述了 *Wolbachia* 在灰飞虱体内的分布、传播方式及其对灰飞虱种群的影响,并初步探讨了利用其生物防治的可能性。

**关键词** 灰飞虱; *Wolbachia*; 生物学; 生物防治

中图分类号 S 435.131.49

## Biological characteristics of *Wolbachia* in small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* and the prospects for application

Zhong Chongxiang, Chen Jian, Qiao Jing, Yang Yizhong

(Department of Plant Protection, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** Small brown planthopper is the major vector of rice stripe disease. *Wolbachia* are the endosymbiont of many insect pests, which have evolved various mechanisms for manipulating reproduction of their hosts to enhance their transmission, including induction of reproductive incompatibility, parthenogenesis and genetic male feminization. Great advances have been made in these microbes. This paper reviews the distribution, transmission model and infection of *Wolbachia* in *Laodelphax striatellus*. Their potential for biological control is also discussed.

**Key words** *Laodelphax striatellus*; *Wolbachia*; biology; biological control

沃尔巴克氏体(*Wolbachia*)是存在于节肢动物体内的一种立克次氏体细菌,其分类地位属原核生物界、细菌门、变形菌纲的 $\alpha$ 亚纲、立克次氏体目、立

克次氏体科、*Wolbachia*族、*Wolbachia*属,在宿主中通过细胞质遗传传给下一代<sup>[1]</sup>。据统计,目前有15%~20%的昆虫感染了这类细菌,遍及昆虫纲的

收稿日期: 2005-08-26

基金项目: 江苏省三项工程资助[SX(2005)032]

\* 通讯作者

10 多个目。除此外, *Wolbachia* 还普遍寄生于甲壳动物、蛛形纲类、螨类、丝状线虫体内, 是分布最广、丰度最大的共生细菌类群。这类微生物可以改变宿主的生殖行为, 导致细胞质不亲和 (cytoplasmic incompatibility, CI)、诱导雌性化 (feminization) 和孤雌生殖 (parthenogenesis inducing, PI)、杀雄 (male killing) 现象等, 这些现象并能通过 *Wolbachia* 垂直传递。农作物上许多重要的、甚至传播家畜和人类疾病的害虫都能感染 *Wolbachia*<sup>[2]</sup>。所以, 有学者提出利用 *Wolbachia* 侵染害虫, 导致寄主生殖力变化来控制甚至消灭对农业生产及人类健康有重要影响的害虫<sup>[3]</sup>。

水稻条纹叶枯病是由灰飞虱 (*Laodelphax striatellus*) 传播的一种水稻病毒病害, 近些年在长江中下游稻区肆虐。进入 21 世纪后, 该病的发生范围和损害度逐年扩大, 已成为江淮稻区水稻生产上最主要的病害之一。调查显示: 2000 年和 2001 年江苏省条纹叶枯病的发病面积分别为 67 万  $\text{hm}^2$  和 100 万  $\text{hm}^2$ , 到了 2004 年, 该省 220 万  $\text{hm}^2$  的水稻有近 90% 的面积发病, 涉及全省 2/3 县(市)。其中偏重发病(病株率为 10%~30%)和重发成灾(病株率 > 30%)的面积分别占 17.1%、3.6%, 另有近 0.5% 的水稻面积只好毁苗改种其他作物。据一些专家的保守估计, 2004 年仅灰飞虱引起的条纹叶枯病一项, 就给江苏地区的经济造成了近百亿元的损失<sup>[4]</sup>。

对灰飞虱的防治, 目前主要有农业防治、生物防治、化学防治等。这些方法虽然都有一定的效果, 但远远没有达到人们的期望值, 同时在防治灰飞虱和条纹叶枯病过程中也暴露出乱用滥用化学农药和环境污染等问题。而 *Wolbachia* 是灰飞虱体内普遍存在的一类共生菌, 所以有些专家设想: 利用基因工程方法即媒介昆虫—共生菌技术转化这些共生菌, 让共生菌携带、表达和释放对病原微生物有专性的毒蛋白(对昆虫和共生菌没有副作用), 这样病原微生物在昆虫体内被杀死, 疾病的传播也就被终止了<sup>[5]</sup>。因此, 探讨 *Wolbachia* 在灰飞虱体内的分布及作用机制对防治灰飞虱和控制水稻条纹叶枯病都具有极其重要的意义。

## 1 *Wolbachia* 在灰飞虱体内的分布与检测

探讨灰飞虱与 *Wolbachia* 之间的关系是对灰飞虱传播水稻条纹叶枯病进行媒介昆虫—共生菌防治技术研究的基础<sup>[6]</sup>。因此, 了解 *Wolbachia* 在灰飞

虱体内的分布及如何检测对防治水稻条纹叶枯病有实际指导意义。

### 1.1 *Wolbachia* 在灰飞虱体内的分布

由于 *Wolbachia* 经卵传递, 而且它与生殖类型有关, 所以人们最初把对 *Wolbachia* 的研究都集中在宿主生殖组织中, 忽视了 *Wolbachia* 在非生殖组织中的分布状况。自从 1997 年 Min 等发现一些果蝇被 *Wolbachia* 感染后会导致宿主生命周期下降<sup>[7]</sup>, 越来越多的注意力开始集中到 *Wolbachia* 在非生殖组织即宿主体细胞中的分布。研究表明, *Wolbachia* 在节肢动物体内的广泛分布均是在非生殖组织中<sup>[6]</sup>。

影响 *Wolbachia* 在宿主体内分布的因素是多方面的。胚胎发育过程是最主要的影响因素之一, 但其影响程度在不同物种之间不尽相同。对灰飞虱的研究表明, 灰飞虱的早期发育已决定了 *Wolbachia* 在其体内的分布部位, 在灰飞虱的头、胸、腹、唾液腺、消化道及生殖组织中都存在着 *Wolbachia*, 而在脂肪体、肠细胞、一些腺体及输精管中没有观察到<sup>[8]</sup>。

### 1.2 *Wolbachia* 的检测技术

大多数立克次氏体无法在寄主体外进行培养, 所以对 *Wolbachia* 的检测很难用传统的微生物学方法<sup>[9]</sup>。目前的检测方法主要是以 PCR 技术为基础的分子检测。在此之前人们还运用过 DAPI 染色法(用非特异性的 DNA-binding 荧光染料 DAPI 染色, 然后在荧光显微镜下观察)和电镜分析技术对 *Wolbachia* 进行定性检测。电镜分析技术中透射电镜观察的结果与超薄切片的质量密切相关。由于许多昆虫组织制样的不易操作性, 使得切片质量不够理想<sup>[10]</sup>。分子生物学方法的快速发展, 尤其是 PCR 技术的发展和分子系统学方法的应用使得这些细胞内微生物的鉴别有了重大突破。

*Wolbachia* 的分子检测一般选取 *wsp* 基因(外膜蛋白基因)、*ftsZ* 基因(细胞分裂基因)、16SrDNA 和 23SrDNA 等设计特异性引物进行 PCR 扩增<sup>[11]</sup>, 其中以 *wsp* 基因最为常用。研究表明, *wsp* 基因比 *ftsZ* 基因的进化速度快, 因而利用 *wsp* 基因能揭示 *Wolbachia* 更为详细的系统发育关系<sup>[12]</sup>。但 PCR 作为一种检测手段也有一定的局限性, 采用 PCR 和 Western 杂交等方法联合检测, 可以提高检测结果的准确性。

## 2 *Wolbachia* 在灰飞虱种群内的传递

通过对宿主生殖系统的解剖, 发现 *Wolbachia*

能够有效地侵入宿主群体,而不需要通过感染或其他方式的传播途径。在 *Wolbachia* 扩散的同时,它能够带动与之相关联的其他细胞质因子,如线粒体等在宿主群体中传播<sup>[13]</sup>。这一遗传模式导致了感染 *Wolbachia* 的雌性个体的增加<sup>[14]</sup>。但随着研究的深入,人们发现 *Wolbachia* 在同种宿主的不同个体间也有水平传递。

## 2.1 影响 *Wolbachia* 在灰飞虱群体内扩散的因素

影响 *Wolbachia* 在昆虫群体内扩散的因素有 3 个:一是 *Wolbachia* 的传递率,即宿主将 *Wolbachia* 传递给后代的比率;二是细胞质不亲和(CI)的表达强度,即 *Wolbachia* 引起的宿主细胞质亲和的水平;三是 *Wolbachia* 对宿主生殖力的影响。极端高温、抗生素、昆虫的迁飞和非适龄交配等也会影响 *Wolbachia* 在昆虫群体内的扩散<sup>[15]</sup>。

研究表明,室内饲养感染的灰飞虱种群比室外的更易将 *Wolbachia* 传递给后代<sup>[13]</sup>。这说明自然界可能存在一些抑制 *Wolbachia* 的因素,如高温和抗生素,它们可消除 *Wolbachia* 或降低其密度,而 *Wolbachia* 需达到一定密度后才能稳定遗传给后代<sup>[16]</sup>。

## 2.2 *Wolbachia* 的水平传递

长期以来,人们都认为 *Wolbachia* 是垂直传递的,但最近发现 *Wolbachia* 存在着水平传递的可能性<sup>[17]</sup>。虽然目前对水平传递的机制还不太清楚,并且还没有直接证据证明天然水平传递是否存在,但在实验室内人们已通过跟踪损伤和暴露的血淋巴或通过 *Wolbachia* 的显微注射发现了水平传递<sup>[17]</sup>。Werren 等于 1995 年首次报道了 *Wolbachia* 在不同昆虫种间的水平传递;Heath 等人在实验室条件下,利用不同种间的寄主昆虫传播 *Wolbachia* 获得了成功<sup>[18]</sup>。甘波谊等以 PCR 方法检测了来自不同地域稻田的 3 种稻飞虱,发现灰飞虱、褐飞虱(*Nilaparvata lugens*)、白背飞虱(*Sogatella furcifera*) 均被 *Wolbachia* 所感染,进一步的分析证实了这些飞虱为同种或极为相近的 *Wolbachia* 感染。同时发现能寄生于上述 3 种飞虱的稻虱红螯蜂(*Haplogonolopus japonicus*) 也受同种 *Wolbachia* 感染<sup>[19]</sup>。这些都暗示了 *Wolbachia* 的水平传播。

## 3 *Wolbachia* 对灰飞虱生殖的影响

*Wolbachia* 对灰飞虱生殖的影响主要包括细胞质不亲和,诱导孤雌生殖,雌性化以及杀雄性等多个

方面,其中研究最多、最深入的当属细胞质不亲和。

### 3.1 细胞质不亲和(CI)的作用原理

CI 是存在于多种昆虫种群体内的一种胚胎发育异常现象。研究表明,当感染了 *Wolbachia* 雄性个体与非感染的雌性个体交配时,通常不产生或者产生极少量的子代。而如果雌性个体感染了 *Wolbachia*,与任何雄性个体交配均能产生正常数量的子代。这样,感染了 *Wolbachia* 的宿主与非感染的同种昆虫相比较在生殖量上就明显不同<sup>[20]</sup>。进一步的研究认为,这一现象的产生是由于 *Wolbachia* 结合了宿主的某种生殖细胞特异染色体蛋白并在随后的精子发生过程中将这种蛋白质携至精细胞外,从而影响了受精后的第 1 次有丝分裂过程<sup>[21]</sup>。

### 3.2 CI 在灰飞虱体内的表达强度

对灰飞虱的研究表明,*Wolbachia* 引起的 CI 现象广泛存在于灰飞虱体内<sup>[22]</sup>。当灰飞虱在室内适龄交配的情况下,其 CI 表达强度接近 100%。自然界中由于存在着随机交配,使得 CI 的表达强度有所降低,例如已经感染 *Wolbachia* 的雄虫与没有感染 *Wolbachia* 的雌虫交配是亲和的,但可降低 CI 的表达强度<sup>[23]</sup>。Hiroakiet 等对灰飞虱和白背飞虱的研究表明,宿主的 CI 表达水平与雄性个体体内 *Wolbachia* 的含量呈正相关<sup>[24]</sup>。

### 3.3 *Wolbachia* 对灰飞虱生殖力的影响

对灰飞虱生殖力的研究发现,*Wolbachia* 的存在能提高宿主的生殖力<sup>[14]</sup>。*Wolbachia* + 灰飞虱能产生更多的子代,且和正常灰飞虱相比差异显著。虽然此特性对控制灰飞虱的种群暴发也许不利,但从另一方面看,*Wolbachia* + 灰飞虱所表现出的明显生殖优势倒为媒介昆虫—共生菌技术的研究提供了新的思路:即将 *Wolbachia* 导入一些中性昆虫或天敌昆虫体内,如果也能表现出生殖优势,则为媒介昆虫—共生菌技术的应用提供了材料;如果利用工程技术让灰飞虱体内的 *Wolbachia* 携带能控制条纹叶枯病毒的毒蛋白,媒介昆虫—共生菌技术也同样发挥了应有的作用。

## 4 利用 *Wolbachia* 控制灰飞虱

### 4.1 CI 在灰飞虱生物防治上的可能性

研究指出,*Wolbachia* 既能相对稳定地遗传,又能通过外界因素去除,这些都有利于对它的利用。对于如何利用 CI,人们曾设想进行抗体基因的转化,再放回到昆虫体内,利用 CI 的特性使工程昆虫

的种群在自然界中扩大,抗体基因得以表达,介体昆虫的传毒能力就被逐渐削弱,最终达到阻断这类害虫传播病毒的目的。例如,有人就曾设想利用果蝇特异的 *Wolbachia* 超感染灰飞虱,并使之稳定地遗传,在超感染的 *Wolbachia* 中转入抗病的目的基因,通过超感染传播进行种群取代,将抗病基因在灰飞虱群体中不断地扩散,从而为水稻虫媒病毒病害的防治提供新的解决途径<sup>[5]</sup>。不过,利用 *Wolbachia* 引起的 CI 防治灰飞虱,必须解决引起 CI 的生化机制、*Wolbachia* 的分布范围及体外培养等问题,这样才能将抗病的外源基因直接转入 *Wolbachia* 中,然后将 *Wolbachia* 导入事先用抗生素处理过的灰飞虱体内,*Wolbachia* 就可通过 CI 带动抗病基因在群体中扩散并逐渐占优势。

#### 4.2 PI 在灰飞虱生物防治上的潜能

*Wolbachia* 所诱导的孤雌生殖也有可能应用于生物防治。Stouthamer 提出了这种潜在利用的价值<sup>[25]</sup>。因为孤雌生殖将有更高的种群增殖率和更多的产卵量。如果将 *Wolbachia* 移植到对生产上有重要意义的昆虫天敌体内,使其大量繁殖,就能达到控制害虫的目的。当然,灰飞虱传毒是一个复杂的过程,而且不同地区的灰飞虱与病毒的亲和力、病毒在介体内的循环期均不同,灰飞虱种群还存在生物型和生态型分化等现象,因此,如何利用工程灰飞虱防治水稻条纹叶枯病,还需要不断探索和实践。另外,在释放转基因昆虫前,还需要进行介体昆虫的群体遗传学试验和安全性测定,以便释放的转基因昆虫对环境是安全的。

#### 参考文献

- WERREN H, GUO L, WINDSOR D W. Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods [J]. Proc R Soc London Ser B, 1995, 262: 147 - 204.
- MCGRAW E A, ONELL S L. Evolution of *Wolbachia pipientis* transmission insect [J]. Trends in Microbiology, 1999, 7 (7): 297 - 302.
- SINKINS S P, CURTIS C F, ONELL S L. *Wolbachia pipientis*: bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus* [J]. Experimental Parasitology, 1995, 81(3): 284 - 291.
- 杨荣明,刁春友,朱叶芹. 江苏省水稻条纹叶枯病上升原因及防治对策[J]. 植保技术与推广, 2002, 22(3): 9 - 12.
- 温建国,胡铁清. *Wolbachia* 在灰飞虱群体中的传播[J]. 上海交通大学学报, 2003, 21: 35 - 37.
- 廖珊,康琳,陈小爱,等. *Wolbachia* 在灰飞虱体内的分布[J]. 复旦学报, 2001, 40(5): 540 - 542.
- MIN K T, BENZER S. Spongecake and eggroll. Two hereditary diseases in *Drosophila* resemble patterns of human brain degeneration [J]. Curr Biol, 1997, 7(11): 885 - 888.
- CLARK M E, VENETI Z, BOURTZIS K, et al. The distribution and proliferation of intracellular bacteria during spermatogenesis in *Drosophila* [J]. Mechanism of Development, 2002, 111: 3 - 15.
- HOERAUF A, VOLKMANN L, NISSEN-PAEHLE K, et al. Targeting of *Wolbachia* endobacteria in *Litomoides sigmodontis*, comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides, and ciprofloxacin [J]. Trop Med Inn Health, 2000, 5(4): 275 - 279.
- 宋社吾,赵彤言,董言德,等. *Wolbachia* 在我国蚊虫体内感染组织定位的透射电镜观察和 PCR 检测[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2002, 9(1): 26 - 32.
- 国伟,沈佐锐. 棉蚜体内感染 *Wolbachia* 的分子检测[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(2): 1 - 3.
- BRAIG H R, ZHOU W, DOBSON S, et al. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(9): 2373 - 2378.
- TURELLI M, HOFFMANN A A, MCKECHNIE S W. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations [J]. Genetics, 1992, 132: 713 - 723.
- 崔建平,仲泉,李文卓,等. 灰飞虱 *Drosophila*. 群体生物学的遗传特性研究[J]. 复旦学报, 1998, 37(4): 542 - 546.
- SYLVALN C, HERVE M. Did *Wolbachia* cross the border [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2001, 16(10): 540.
- HOFFMANN A, TURELLI M, HARSHMAN L G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* [J]. Genetics, 1997, 126: 933 - 948.
- CLANCY D J, HOFFMANN A A. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity [J]. Trends in Ecology and Evolution, 1996, 11(4): 145 - 146.
- HEATH B D, BUTCHER R D, WHITFIELD W G, et al. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by naturally occurring mechanism [J]. Curr Biol, 1999, 9: 313 - 316.
- 甘波谊,周伟国,冯丽冰,等. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染[J]. 昆虫学报, 2002, 45(1): 14 - 17.
- WERREN J H. Biology of *Wolbachia* [J]. Ann Rev Entomol, 1997, 42: 587.
- CALLAINI G. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from incompatible cross of *Drosophila simulans* [J]. Cell Sci, 1997, 110: 271.
- 周伟国,甘波谊,赵新燕,等. *Wolbachia* 中一个新的可转移遗传因子的分离和鉴定[J]. 自然科学进展, 2001, 11(1): 105 - 109.
- 施婉君,程家安,祝增荣,等. 昆虫共生菌 *Wolbachia* 的研究进展[J]. 生态学报, 2002, 22(3): 409 - 420.

[24] HIROAKI N, KOIZUMI Y, ZHANG Q, et al. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera* [J]. Insect Bio-

chemistry and Molecular Biology, 2001, 31:727 - 737.

[25] STOUTHAMER R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control [J]. Entomophaga, 1993, 38: 3 - 6.