研究论文

Wolbachia 在熊蜂中的双重感染*

李振宇[1,2**] 冯 夏[2] 宋 月[2] 沈佐锐[1***] 耿金虎[3]

(1. 中国农业大学昆虫系 北京 100193;2. 广东省农业科学院植物保护研究所 广州 510640;
3. 北京市农林科学院 北京 100081)

摘 要 *Wolbachia* 是一类广泛存在于节肢动物体内细胞质遗传的细菌,它可以通过诱导产雌孤雌生殖、引起细胞质不亲和、遗传雄性的雌性化、雄性致死和增强生殖力等作用方式引起其寄主生殖行为的改变。本文以 16S rDNA 为标记检测了 3 种熊蜂不同组织(头,胸,足,卵巢或雄外生殖器)的 *Wolbachia* 感染。其中明亮熊蜂 *Bombus lucorum* 和小峰熊蜂 *Bombus hypocrite* 是自然种,短舌熊蜂 *Bombus terrestris* 及其后代是实验室种。所检测的所有个体的不同组织中,除头部外,其余均发现不同组 *Wolbachia* 双重感染,感染率为 100%。本研究首次报道熊蜂感染 *Wolbachia*,同时也证明熊蜂的所有个体中存在不同组的 *Wolbachia* 双重感染现象。初步讨论了感染 *Wolbachia* 对熊蜂生殖行为和孤雌生殖的影响,推断 *Wolbachia* 可能是熊蜂种群生殖冲突和偏雌性性比的潜在原因。

关键词 *Wolbachia*,熊蜂属,熊蜂,双重感染,16S rDNA

Double infection with *Wolbachia* strains in three species of bumblebees (Hymenoptera: Apidae)

LI Zhen-Yu[1,2**] FENG Xia[2] SONG Yue[2] SHEN Zuo-Rui[1***] GENG Jin-Hu[3]

(1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
2. Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural and Sciences, Guangzhou 510640, China;
3. Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract *Wolbachia* is a group of maternally inherited intracellular bacteria that may manipulate the reproduction of their arthropod hosts through distinct mechanisms, such as cytoplasmic incompatibility (CI), thelytoky (T), feminization (F) or male killing (MK). Using 16S rDNA as a molecular marker, different body parts (heads, thorax, legs and genitalia) of three bumblebee species, including two native species (*Bombus hypocrite* and *Bombus lucorum*) and one lab-reared species (*Bombus terrestris*) were screened for *Wolbachia*. Infection with two *Wolbachia* strains (strain A and strain B) was found in all body parts except the head in all three species. This is the first evidence of infection with both *Wolbachia* strains A and B in social Hymenopteran insects and of *Wolbachia* infection in bumblebees. The effects of *Wolbachia* on the reproduction and sex ratio of bumblebees is briefly discussed, including the possibility that *Wolbachia* could be involved in bumblebees. It's possible that *Wolbachia* could be a potential factor inducing reproductive conflict and a feminized sex-ratio in bumblebee colonies.

Key words *Wolbachia*, *Bombus*, bumblebees, double infection, 16S rDNA

Wolbachia 属于变型菌纲的一种立克次氏体,是广泛存在于节肢动物体内的细胞质遗传共生菌,陆地昆虫种类中至少 20% 已确定感染 *Wolbachia* (Werren and Jaenike, 1995a, 1995b; Tagami and Miura, 2004; Haine and Cook, 2005; Kyei-Poku *et al.*, 2005; Mateos *et al.*, 2006;

* 资助项目:国家自然科学基金(30471166; 30600453)。

**E-mail: zhenyu-li@163.com

***通讯作者: E-mail: ipmist@cau.edu.cn

收稿日期:2010-09-15,接受日期:2011-01-09

Kageyama *et al.*, 2010)，其中社会性昆虫蜜蜂(Hoy *et al.*, 2003)，黄蜂(Stahlhut *et al.*, 2006)和蚂蚁(Wenseleers *et al.*, 1998; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Shoemaker *et al.*, 2000; Van Borm *et al.*, 2001; Bouwma *et al.*, 2006)等已报道感染 *Wolbachia*。*Wolbachia* 对寄主生殖行为调控在独居性昆虫中较为常见如诱导寄生蜂、蓟马等产雌孤雌生殖(Stouthamer, 1997; Arakaki *et al.*, 2001)；螨类的细胞质不亲和(Breeuwer, 1997; Hoffmann and Turelli, 1997)；蛾类遗传雄性的雌性化(Bouchon *et al.*, 1998; Kageyama *et al.*, 1998)；甲虫、蝶类和果蝇等雄性致死(Hurst *et al.*, 1999; Fialho and Stevens, 2000; Hurst *et al.*, 2000)和增强生殖力等，但关于 *Wolbachia* 影响社会性昆虫的生殖活动的报道较少，除 Van Borm 等(2001)报道几种切叶蚁中 *Wolbachia* 感染率的理论模型，间接证明 *Wolbachia* 可诱导社会性昆虫雄性致死外，尚无关于 *Wolbachia* 对社会性昆虫生殖模式作用的报道。

熊蜂属膜翅目蜜蜂科，是社会性昆虫。熊蜂是研究社会性昆虫性别决定机制的模式种类(Baer, 2003)，其性别决定模式是典型的社会性昆虫的性别决定模式，即受精卵发育成雌蜂，未受精的卵发育成雄性蜂(产雄孤雌生殖)。因此明确熊蜂是否感染 *Wolbachia* 及了解 *Wolbachia* 在熊蜂性别决定体系中的作用对推进社会学昆虫与 *Wolbachia* 关系的研究有非常重要的意义。本研究通过 PCR 扩增比较保守和稳定的 16S rDNA 基因，检测了 2 种自然种群和 1 种实验室种群 *Wolbachia* 感染情况，建立了 3 种熊蜂基于 16S rDNA 的 *Wolbachia* 系统发育树，旨在检测熊蜂中是否感染 *Wolbachia*，并讨论其在种内和种间的传播途径，推测 *Wolbachia* 感染与熊蜂的性别比率的关系。

1 材料与方法

1.1 熊蜂

供试熊蜂分别为短舌熊蜂 *Bombus terrestris* L.，明亮熊蜂 *Bombus lucorum* L. 和小峰熊蜂 *Bombus hypocrite* Pérez。短舌熊蜂是实验室种群，检测包括不同性别及不同等级的个体。小峰熊蜂标本是 2007 年 4 月采于北京东北部的雾灵山(40°36′N, 117°22′E)。明亮熊蜂标本是 2007 年 5 月采于新疆巩留(43°03N, 82°51′E)地区。所有标本用无水乙醇浸泡，保存在 −20℃ 冰箱中。在提取 DNA 前将标本解剖为头、胸、足、卵巢或雄外生殖器等组织。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 Gong 和 Shen (2002)的方法提取各部分组织的基因组 DNA。用确定感染 *Wolbachia* 的米蛾卵 *Corcyra cephalonica* 作为阳性对照，去离子水作为阴性对照。利用 28S rDNA 通用引物 28SF (5′TAC CGT GAG GGA AAG TTG AAA 3′)和 28SR (5′AGA CTC CTT GGT CCG TGT TT 3′)检测所提取 DNA 的质量。16S *Wolbachia* 特异性引物为 *Wolbachia*-SpecF (CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG) 和 *Wolbachia*-SpecR (AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC) (Werren and Windsor, 2000)。

28S 检测浓度最高的样本用 16S *Wlobachia* 特异性引物重新检测。PCR 反应体系为 25 μL，其中 2.5 μLDNA, 2.5 μL$MgCl_2$ (25 mmol/L), 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 2 μL 混合引物(25 μmol/L), and 0.3 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL, TianGen)。PCR 反应程序是初始化 DNA 94℃，2 min；然后进行 40 个循环扩增(94℃，30 s；起始的 10 个循环中退火温度从 61℃ 降到 51℃；随后 30 个循环退火温度保持在 51℃，45 s；72℃，90 s)，72℃ 延长 10 min。

目标 PCR 产物利用回收试剂盒(Sangon Biotechnology, Shanghai, China)进行回收。回收后 DNA 用 pMD19-T vector [TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.] 连接。连接产物转移到 *E. coli* DH5α (TianGen Biotechnology, Beijing, China)载体，进行克隆。选择阳性克隆进行测序(Sangon Biotechnology, Shanghai, China)。

1.3 数据处理

所有序列数据采用 DNAMAN V6.0 处理(Lynnon Corporation)。

2 结果与分析

2.1 熊蜂体内感染 *Wolbachia* 的 16S rDNA 基因电泳检测及序列分析结果

利用 *Wolbachia* 的 16S rDNA 特异性引物从 3 种熊蜂的各组织 DNA 中(头部除外)都能扩增出 438 bp目的片段(图 1)。证实了实验室和野外种群的熊蜂体内都感染了 *Wolbachia*，头部没有分布，

胸部、足及卵巢或雄外生殖器等组织内都有分布。将测得的序列在美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站上进行 BLAST,发现本实验测得的序列与 GenBank 中注册的 *Wolbachia* 的 16S rDNA 基因序列的同源性达 100% 或 99%,因此可以确认本实验得到的序列为 *Wolbachia* 的 16S rDNA 基因序列。所得序列在 GenBank 注册(注册号 EU292715 ~ EU292728)。

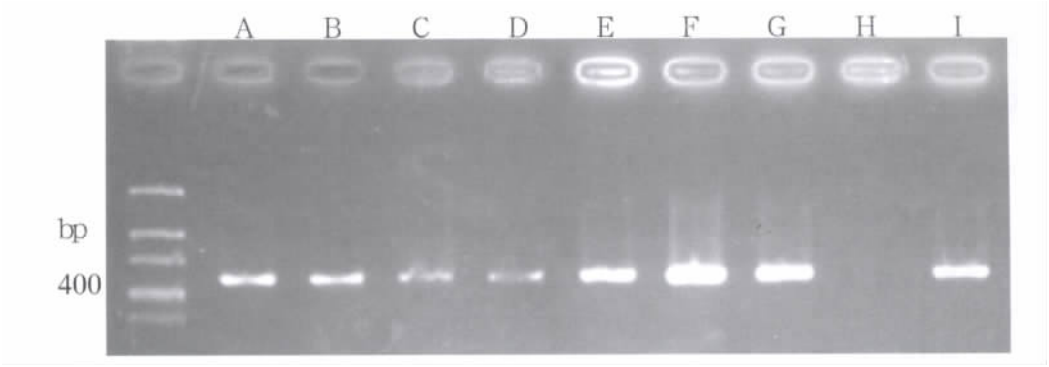

图 1　*Wolbachia* 16S rDNA 引物 PCR 检测

Fig. 1　Detection for the presence of *Wolbachia* by PCR using primers against 16S rDNA

A – 短舌熊蜂新蜂王 New queen of *B. terrestris*; B – 短舌熊蜂新工蜂 New worker of *B. terrestris*; C – 短舌熊蜂新雄蜂 New male of *B. terrestris*; D – 短舌熊蜂工蜂后代 Offspring of *B. terrestris*; E – 短舌熊蜂老蜂王 Founder queen of *B. terrestris*; F – 明亮熊蜂 *B. lucorum*; G – 小峰熊蜂 *B. hypocrita*; H – 阴性对照 Negative control; I – 阳性对照 Positive control.

2.2　熊蜂种群中 *Wolbachia* 的 16S rDNA 序列聚类树的建立

将本实验所得到的序列与引自 GenBnak 的 7 条序列一起输入 MEGA410,采用距离法,在 Kimura22 Parameter 模型下,建立 NJ 树(图 2),各分支的 bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制来评价。从系统树的拓扑结构可以看出,依据 16S rDNA 基因将 *Wolbachia* 分成了 A,B 两组。根据序列比对,2 种序列的差异为 2.28%(表 4)。据 Stouthamer 等 1993 年报道,16S 序列差异大于 2% 即可认为是不同组,因此可以确认本研究所得 2 种序列分属 A、B 两个不同组。对比同组内所有序列,结果表明序列相似度大于 99%(表 4)。检测的所有熊蜂个体中,均得到这 2 种序列。根据序列比对的结果,A 组序列中有 5 个核苷酸位置变异(表 2),B 组中有 3 个核苷酸位置变异(表 3)。结果表明,3 种熊蜂的所有个体中均出现双重感染现象(表 1)。

3　讨论

3.1　*Wolbachia* 在熊蜂中的分布和传播

独居性昆虫中,同一亚组 *Wolbachia* 的多重感染和 2 个不同组(Breeuwer *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993)的 *Wolbachia* 的多重感染已有广泛报道(Rousset and Solignac, 1995; Werren *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 2002; Keller *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2009)。本文首次明确社会性昆虫熊蜂种群及其后代中 100% 双重感染 *Wolbachia*,且组内 16S rDNA 基因的相似率都超过了 99%,对深入探讨社会性昆虫中 *Wolbachia* 分布及传播有重要意义。*Wolbachia* 是细胞质母性遗传共生菌,在寄主中主要是垂直传播的,但也有报道证明当感染 *Wolbachia* 的寄生蜂与未感染 *Wolbachia* 的寄生蜂共同寄生同一寄主卵时,会发生 *Wolbachia* 的横向传播(Werren *et al.*, 1995)。本实验中短舌熊蜂种群中不同等级(工蜂,蜂王)均感染 *Wolbachia*,即子代和母代同时感染 *Wolbachia*,说明在熊蜂中存在垂直传播。在水平传播方面,短舌熊蜂从荷兰引种,并全部实验室内饲养,明亮熊蜂和小峰熊蜂属本地种群,采集地相隔甚远,说明 3 种熊蜂种间横向传播 *Wolbachia* 的可能性很小;同时,由于熊蜂属社会性昆虫,蜂巢内存在多个个体,个体间是否能够进行横向传播 *Wolbachia* 还需要进一步

表 1 熊蜂不同组织 *Wolbachia* 感染率

Table 1 *Wolbachia* infection rate among different tissues of bumblebees

种类 Species	感染数/调查数 感染率 Infection/ Total rate of infection			
	头 Heads	胸 Thoraxes	腿 Legs	生殖组织 Germinal tissue
明亮熊蜂蜂王 Queens of *B. lucorum*	0/9; 0	9/9; 100%	9/9; 100%	9/9; 100%
小熊熊蜂蜂王 Queens of *B. hypocrita*	0/4; 0	4/4; 100%	4/4; 100%	4/4; 100%
短舌熊蜂老蜂王 Founder queens of *B. terrestris*	0/11; 0	11/11; 100%	11/11; 100%	11/11; 100%
短舌熊蜂新蜂王 New queens of *B. terrestris*	0/3; 0	3/3; 100%	3/3; 100%	3/3; 100%
短舌熊蜂新工蜂 New workers of *B. terrestris*	0/15; 0	15/15; 100%	15/15; 100%	15/15; 100%
短舌熊蜂新雄蜂 New males of *B. terrestris*	0/5; 0	5/5; 100%	5/5; 100%	5/5; 100%
短舌熊蜂工蜂后代 Offspring of worker *B. terrestris*	0/3; 0	3/3; 100%	3/3; 100%	3/3; 100%

表 2 A 组 *Wolbachia* 序列差异

Table 2 Difference of *Wolbachi* sequence from A strain

碱基位置 Position	明亮熊蜂 *B. lucorum*	小峰熊蜂 *B. hypocrita*	短舌熊蜂 *B. terrestris*				
			老王 Founder queens	新王 New queens	新雄蜂 New males	新工蜂 New workers	工蜂后代 Offspring of workers
40	T	T	C	T	T	T	T
250	G	A	A	A	A	A	A
314	T	C	C	C	C	C	C
329	A	A	A	G	A	A	A
348	T	A	T	A	A	A	T

表 3 B 组 *Wolbachia* 序列差异

Table 3 Difference of *Wolbachi* sequence from B strain

碱基位置 Position	明亮熊蜂 *B. lucorum*	小峰熊蜂 *B. hypocrita*	短舌熊蜂 *B. terrestris*				
			老王 Founder queens	新王 New queens	新雄蜂 New males	新工蜂 New workers	工蜂后代 Offspring of workers
318	A	G	G	G	G	A	A
364	T	C	T	T	T	T	T
417	G	G	–	–	–	G	G

表 4　不同个体序列相似度

Table 4　Similarity of sequence from different individual

	A stain		B strain		A + B	
	Bombus sp.	*Bombus* sp. and *Muscidifurax uiraptor**	*Bombus* sp.	*Bombus* sp. and *Trichogramma* sp.*	*Bombus* sp.	*Bombus* sp., *Trichogramma* sp. and *M. uiraptor*
序列相似度 Similarity	99.77%	99.46%	99.77%	99.35%	97.72%	97.95%

*　见 Stouthamer 等 1993(See reference Stouthamer *et al.*, 1993).

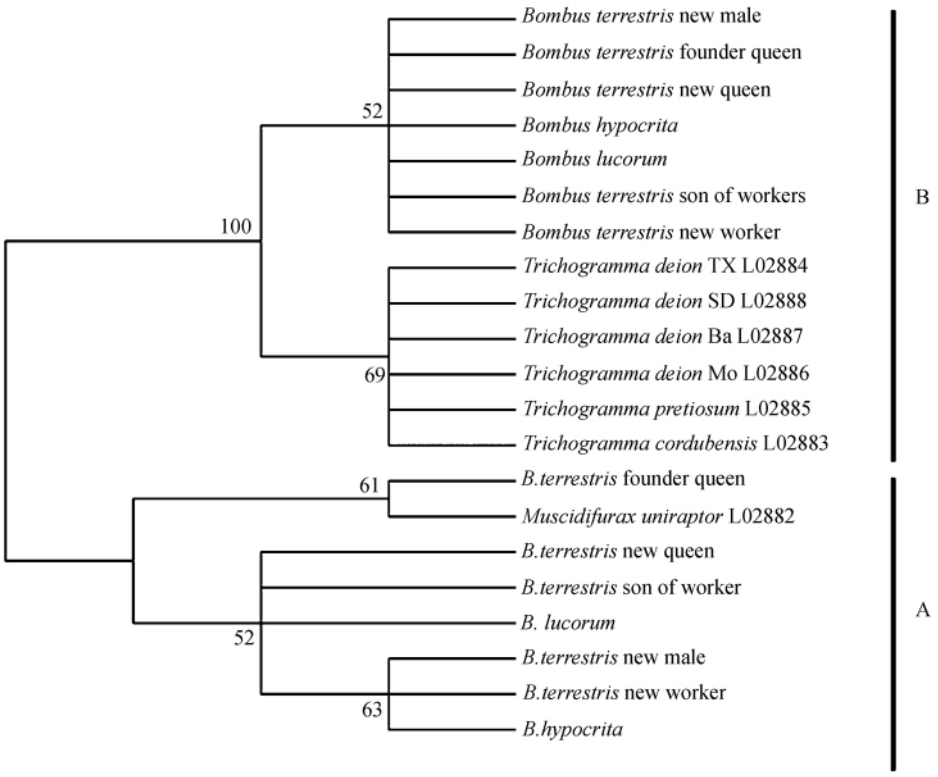

图 2　不同寄主感染 *Wolbachia* 的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of *Wolbachia* based on 16S rDNA construct with different hosts

引用序列为 The sequences are described by their host species: *Thichogramma deion* TX L02884, *T. deion* SD L02888, *T. deion* Ba L02887, *T. deion* Mo L02886, *T. pretiosum* L02885, *T. cordubensis* L02883, *Muscidifurax uniraptor* L02882 (Stouthamer *et al.*, 1993).

研究。

3.2　感染 *Wolbachia* 对熊蜂生殖行为的影响

Wolbachia 对独居性昆虫生殖行为的影响已有广泛报道(Werren and Jaenike, 1995; Breeuwer, 1997; Hoffmann and Turelli, 1997; Stouthamer, 1997; Bouchon *et al.*, 1998; Kageyama *et al.*, 1998; Hurst *et al.*, 1999; Fialho and Stevens, 2000; Hurst *et al.*, 2000; Arakaki *et al.*, 2001), 但对社会性昆虫生殖行为的影响尚未证实。Stahlhut 等(2006)在马蜂中发现感染了 *Wolbachia* 的单倍体与二倍体,但排除了存在雄性致死及雌性化现象。Van Borm 等(2001)则通过检验切叶蚁种群中不同性别和等级的 *Wolbachia* 感染模型,间接证明 *Wolbachia* 能引起社会性昆虫寄主雄性致死现象。本研究中熊蜂种群双重感染 *Wolbachia* 序列和几种产雌孤雌生殖种类 *Muscidifurax*

*uiraptor*与 *Trichogramma* sp. 的序列相似性达到99%以上,说明 *Wolbachia* 对熊蜂生殖模式可能存在影响,但是否诱导熊蜂产雌孤雌生殖或者其他方式仍需要进一步研究。

综上所述,熊蜂感染 *Wolbachia* 对于研究 *Wolbachia* 在社会性昆虫中的分布、传播途径及对生殖行为影响具有重要意义,未来深入研究 *Wolbachia* 对熊蜂生殖行为的影响对于揭开熊蜂,乃至社会性昆虫生殖模式具有重要推动作用。

致谢:感谢中国科学院动物研究所姚健在标本鉴定中提供的帮助。

参考文献(References)

Arakaki N, Miyoshi T, Noda H, 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predator thrips *Franklinothips vespiformis* (Thysanoptera, Insecta). *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268(1471): 1011—1016.

Baer B, 2003. Bumblebees as model organisms to study male sexual selection in social insects. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 54: 521—533.

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(1401): 1081—1090.

Bouwma AM, Ahrens ME, DeHeer CJ, Shoemaker D, 2006. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in introduced populations of the fire ants *Solenopsis invicta*. *Insect Mol. Biol.*, 15(1): 89—93.

Breeuwer JAJ, 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mites *Tetranychus urticae* and *T. turkestani*. *Heredity*, 79: 41—47.

Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Burns DA, Pelletier DA, Weisburg WG, Werren JH, 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol. Biol.*, 1: 25—36.

Fialho RE, Stevens L, 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267: 1469—1474.

Gong P, Shen ZR, 2002. Molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in *Trichogramma dendrolimi*. *Progress in Natural Science*, 12 (5): 388—391.

Haine ER, Cook JM, 2005. Convergent incidences of *Wolbachia* infection in fig wasp communities from two continents. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 272: 421—429.

Hoffmann AA, Turelli M, 1997. Cytoplasmic incompatibility in insects // O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH, (eds.). Influential Passengers. Oxford University Press, Oxford. 42—80.

Hoy MA, Jeyaprakash A, Alvareza JM, Allsopp MH, 2003. *Wolbachia* is present in *Apis mellifera capensis*, *A. m. scutellata*, and their hybrid in Southern Africa. *Apidologie*, 34 (1): 53—60.

Hurst GDD, Jiggins FM, Schulenburg JH, Bertrand D, West S A, Goriacheva II, Zakharov IA, Werren JH, Stouthamer R, Majerus MEN, 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266: 735—740.

Hurst GDD, Johnson AP, Schulenburg JH, Fuyama Y, 2000. Male-killing *Wolbachia* in Drosophila: a temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, 156: 699—709.

Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9: 393—405.

Kageyama D, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 1998. Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81: 311—316.

Kageyama D, Narita S, Imamura T, Miyanoshita A, 2010. Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pests and their parasitoids. *J. Stor. Prod. Res.*, (46): 13—19.

Keller GP, Windsor DM, Saucedo JM, Werren JH, 2004. Reproductive effects and geographical distributions of two *Wolbachia* strains infecting the Neotropical beetle: *Chelymorpha alternans* Boh. (Chrysomelidae, Cassidinae). *Mol. Ecol.*, 13: 2405—2420.

Kondo N, Nobuyuki I, Masakazu S, Takema F, 2002. Prevailing triple infection with *Wolbachia* in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) *Mol. Ecol.*, 11: 167—180.

Kyei-Poku GK, Colwell DD, Coghlin P, Benkel B, Floate KD, 2005. On the ubiquity and phylogeny of *Wolbachia* in lice. *Mol. Ecol.*, 14: 285—294.

Mateos M, Castrezana SJ, Nankivell BJ, Estes AM, Markow TA, Moran NA, 2006. Heritable endosymbionts of Drosophila. *Genetics*, 174: 363—376.

Narita S, Nomura M, Kageyama D, 2007. Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly Eurema hecabe: transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain