

基于 *wsp* 基因的叶螨体内 *Wolbachia* 株系的多样性与重组分析 *

丁秀蕾 张艳凯 荣 霞 张开军 赵冬晓 洪晓月 **

(南京农业大学昆虫学系 南京 210095)

摘要 胞内共生菌 *Wolbachia* 能对多种叶螨产生生殖调控作用。为更好地筛选有潜在应用价值的 *Wolbachia* 株系, 本研究应用 PCR 技术对自然种群的截形叶螨 *Tetranychus truncatus*、二斑叶螨 *T. urticae*、神泽叶螨 *T. kanzawai* 和山楂叶螨 *Amphitetranychus viennensis* 体内的 *Wolbachia* 感染情况进行检测, 并对 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行序列分析和基因重组检测。结果表明, 叶螨中的 *Wolbachia* 株系具有较高的遗传多样性, 其中截形叶螨感染两种分化较大的株系。不同叶螨感染特有的 *Wolbachia* 株系说明 *Wolbachia* 与其宿主存在一定的协同进化关系。二斑叶螨和截形叶螨感染同一株系的 *Wolbachia*, 可能由于水平传播造成。同时, 不同株系 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因间普遍存在着基因重组现象。

关键词 叶螨, *Wolbachia* 株系, 多样性, 基因重组

Diversity and recombination of *Wolbachia* strains in spider mites based on analysis of the *wsp* gene

DING Xiu-Lei ZHANG Yan-Kai RONG Xia ZHANG Kai-Jun

ZHAO Dong-Xiao HONG Xiao-Yue **

(Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract *Wolbachia* are intracellular bacteria with the ability to manipulate the reproduction of several spider mite species. We used PCR to examine the infection status of four spider mite species (*Tetranychus truncatus*, *T. urticae*, *T. kanzawai* and *Amphitetranychus viennensis*) from different wild populations in China. The sequences and recombination of the *wsp* gene were then analyzed in order to obtain potentially useful *Wolbachia* strains. The results indicate that there is a high level of *Wolbachia* diversity in spider mites; for example, two divergent strains were observed in *T. truncatus*. Distinctive strains of *Wolbachia* were each only found in a single species of spider mite, suggesting the potential co-divergence of *Wolbachia* strains with their hosts. One instance of *T. truncatus* and *T. urticae* being infected with an identical *Wolbachia* strain might have been caused by horizontal transmission. Evidence of recombination of the *wsp* gene was also discovered.

Key words spider mite, *Wolbachia* strains, diversity, intragenic recombination

Wolbachia 是一种广泛存在于节肢动物体内的胞内共生菌, 其能影响宿主的生殖和发育, 并引起 4 种常见生殖调控类型: 孤雌生殖 (parthenogenesis) (Stouthamer *et al.*, 1993)、雌性化 (feminization) (Rigaud *et al.*, 1991)、杀雄 (male-killing) (Hurst *et al.*, 1999) 和胞质不亲和现象

(cytoplasmic incompatibility, CI) (Barr, 1980)。这些调控作用对宿主物种分化、性别决定机制、共生关系和害虫生物防治等的研究具有重要意义 (Breeuwer and Werren, 1990; Rigaud and Juchault, 1993; Hurst and Schilthuizen, 1998)。因此, *Wolbachia* 一直受到系统进化生物学和害虫生防等

* 资助项目: 公益性行业(农业)科研专项“作物叶螨综合防控技术研究与示范推广(201103020)”和国家自然科学基金项目(31172131)。

**通讯作者, E-mail: xyhong@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-12-06, 接受日期: 2012-12-29

领域学者的广泛关注。目前 *Wolbachia* 还不能在宿主体外培养,对其生物学及系统发育的研究主要借助分子生物学、显微注射和体外细胞系等技术。

Wolbachia 具有较高的遗传多样性。基于分子系统发育分析的方法, *Wolbachia* 可细分为 11 个超群(A~K)(Werren *et al.*, 1995; Bandi *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 2002; Bordenstein and Rosengaus, 2005; Casiraghi *et al.*, 2005; Ros *et al.*, 2009)。*Wolbachia* 株系的变异和重组可以合理地解释这一现象。从进化角度来看,依据选择压力的不同,基因变异一直伴随着细菌的增殖和传播过程,在这一过程中基因的重组同时发生。经研究发现,同一 *Wolbachia* 株系可以在较短的时间内发生变异进而导致分化(Atyame *et al.*, 2011)。*Wolbachia* 的基因重组现象同样存在分子依据。基因间的重组可以从基因树间的不一致上找到依据(Jiggins *et al.*, 2001; Werren and Bartos, 2001; Baldo *et al.*, 2006)。同时在 A、B 和 C、D 几个超群内也发现有 *wsp*、*ftsZ*、*gltA* 和 *fbpA* 这 4 个基因的基因内重组现象(Jiggins, 2002; Reuter and Keller, 2003; Keller *et al.*, 2004; Malloch and Fenton, 2005; Baldo *et al.*, 2005, 2006; Verne *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012)。*Wolbachia* 具有较复杂的侵染类型,如亲缘关系较远的 *Wolbachia* 株系可以同时侵染近缘种的宿主,亲缘关系近的株系又可以侵染亲缘关系较远的宿主。在 *Wolbachia* 基因组中,编码表面蛋白基因 *wsp* 是目前报道的进化最快的基因,它在研究 *Wolbachia* 多样性和重组方面具有一定的优势,因而被广泛用于 *Wolbachia* 组及组以下类群的检测和株系鉴定中(Braig *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Fukatsu *et al.*, 2003)。

关于叶螨中 *Wolbachia* 的研究,目前已经在二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch, 朱砂叶螨 *T. cinnabarinus* (Boisduval), 土耳其斯坦叶螨 *T. turkestanl* (Ugarov *et al.* Nikolski), 神泽叶螨 *T. kanzawai* Kishida, 截形叶螨 *T. truncatus* Ehara 和皮氏叶螨 *T. piercei* McGregor 等体内检测到 *Wolbachia* 感染(Hong *et al.*, 2002; 苗慧等, 2006; Gotoh *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012)。进一步的研究发现 *Wolbachia* 对多种叶螨具有生殖调控作用,但在不同株系之

间生殖调控作用存在差异,因此有必要系统地对叶螨体内 *Wolbachia* 株系的多样性展开研究。

基于此,本研究应用 PCR 技术对截形叶螨、二斑叶螨、神泽叶螨和山楂叶螨 *Amphitetranychus viennensis* (Zacher) 体内的 *Wolbachia* 进行了检测。由于 *wsp* 基因广泛地用于 *Wolbachia* 株系多样性和重组的研究,我们对叶螨体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行了序列分析和基因重组检测,旨在阐明叶螨体内 *Wolbachia* 株系的多样性和重组现象。研究结果将有助于揭示 *Wolbachia* 在叶螨中的传播扩散规律、*Wolbachia* 与其宿主之间的进化关系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

研究所用的 4 种叶螨均为自然种群,包括截形叶螨 116 头,二斑叶螨 24 头,神泽叶螨 18 头,山楂叶螨 33 头。采集到的叶螨保存于 100% 的酒精中。叶螨的鉴定主要依据雄虫阳具形状并参照前人建立的分子鉴定方法(Osakabe *et al.*, 2008)。

1.2 叶螨总 DNA 的提取

将浸泡在 100% 酒精中的叶螨个体用灭菌水漂洗干净,室温放置直至酒精完全挥发。向事先已编号的 1.5 mL 离心管内加入 25 μL STE buffer (100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。在显微镜下挑取单头螨,放入离心管内,立即用塑料研磨棒研磨,研磨后将离心管置于冰上并向离心管内加 2 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL)。简单离心后,37°C 下孵育 30 min。95°C 初始变性 5 min。简单离心后,-20°C 保存。

1.3 *wsp* 基因扩增与测序

wsp 基因的 PCR 扩增使用 1 对特异性引物(Baldo *et al.*, 2006)。上游引物为: 5'-GTCCAATARSTGATGARGAAC-3', 下游引物为: 5'-CYGCACCAAYAGYRCTRTAAA-3'。扩增反应体系为 25 μL, 包括: 2 μL DNA 模板, 14.8 μL ddH₂O, 2.5 μL 10 × buffer, 2.5 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 上游和下游引物 (25 μmol/L) 各 0.5 μL, 最后加入 0.2 μL Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL)。PCR 程序为: 95°C 预变性 3 min, 35 个循环 (95°C 30 s; 55°C 30 s; 72°C 1 min), 最后再 72°C 延伸 10 min。取 8 μL PCR 扩增产物, 点样于含溴化乙锭 (EB) 的 1.0% (g/mL) 的

琼脂糖凝胶上,进行电泳检测(电压 120 V,电泳缓冲液为 1×TAE),在 Bio-Rad Gel Doc EQ 凝胶成像系统下观测靶标 DNA 条带并拍照记录结果。

切胶回收目标 PCR 产物,用 Axygen 产物纯化试剂盒进行产物纯化。将纯化产物与 Trans-T3 载体(Transgen Beijing)连接,再转化到感受态大肠杆菌中,将菌液涂布于含 50 mg/μL 氨苄的 LB 培养基平板上 37℃ 倒置恒温培养 14 h,观察蓝白菌落。挑取白色菌落置于已加入 1 mL 液体 LB 培养基(含 0.1% 氨苄抗生素)的离心管中,37℃,250 r/min 振荡培养过夜,然后将经过培养后的菌液直接进行 PCR 检测。经 PCR 检测后将阳性克隆用于测序。

1.4 序列分析

将获得的 *wsp* 基因序列先利用“BLAST”工具(NCBI 站点)进行序列检索分析并提交到 GeneBank 数据库中。然后用 Clustal X 软件(Thompson et al., 1997)进行序列比对(Alignment),序列编辑在 BioEdit 软件中进行。

1.5 系统发育分析

比对结果输入 MEGA 4.0 软件(Tamura et al., 2007),基于 Kimura-2 Parameter 模型计算各序列间的遗传距离。邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树,各个分支的 Bootstrap 置信度用 1 000 次自展来评价。利用 van Meer(1999)构建的系统发育分析方法确定 *Wolbachia* 株系,同时也用系统发育网来分析由于重组造成的 *Wolbachia* 基因中潜在的不一致性(Fitch, 1997)。应用 SPLITSTREE 软件,用邻接网法(neighbor-net method)基于未校正的 P 遗传距离法构建系统发育网(Bryant and Moulton, 2004; Huson and Bryant, 2006)。邻接网是以遗传距离为基础的方法,它可以对由于数据中的不一致信号重建出的所有可能的系统发育树进行一个普遍的构建。

1.6 重组检测

应用 RDP2 软件的 MaxChi 方法在单基因比对的基础上进行重组分析。参数的设置如下:用每个窗口中变异位点的不同分数值对三联体进行扫描分析,应用 Bonferroni 校正的方法,得到一个 1 000 次置换的结果,P 值设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 叶螨种和 *wsp* 序列间的关系

根据测序结果,所检测自然种群的 4 种叶螨体内都扩增出了 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段。在截形叶螨体内扩增出 12 种序列型;二斑叶螨中扩增出 2 种序列型;而神泽叶螨和山楂叶螨中都只得到 1 种序列型(表 1)。可以看出,这些 *wsp* 序列与物种之间几乎都是呈现出强烈的宿主专属性。值得注意的是在截形叶螨和二斑叶螨中都扩增出 *wsp6*,推测这可能是 *Wolbachia* 在物种间水平传播造成的。

表 1 4 种叶螨感染 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列

Table 1 *wsp* gene sequences of *Wolbachia* obtained from four species of spider mites

宿主 Host species	<i>wsp</i> 基因序列型 <i>wsp</i> gene sequence type	GeneBank 登录号 GenBank accession number
截形叶螨 <i>T. truncatus</i>	<i>wsp1</i>	JX094379
	<i>wsp2</i>	JX094380
	<i>wsp3</i>	JX094381
	<i>wsp4</i>	JX094382
	<i>wsp5</i>	JX094383
	<i>wsp6</i>	JX094384
	<i>wsp7</i>	JX094385
	<i>wsp8</i>	JX094386
	<i>wsp9</i>	JX094387
	<i>wsp11</i>	JX094389
	<i>wsp12</i>	JX094390
	<i>wsp15</i>	JX094393
二斑叶螨 <i>T. urticae</i>	<i>wsp6</i>	JX094384
神泽叶螨 <i>T. kanzawai</i>	<i>wsp10</i>	JX094388
	<i>wsp13</i>	JX094391
山楂叶螨 <i>A. viennensis</i>	<i>wsp14</i>	JX094392

2.2 序列分析及系统发育树的建立

用 MEGA 4.0 软件对不同 *wsp* 基因序列间的遗传距离进行分析,得到这 15 种基因序列间的成对遗传距离(表 2)。结果表明在截形叶螨中,除了 *wsp15* 以外,其它 *wsp* 基因序列间的遗传距离相

对较近。另外,二斑叶螨中的 *wsp* 基因序列之间的遗传距离也较近。而 *wsp7*、*wsp10* 和 *wsp13* 之间的遗传距离最远,达到 0.1806。

根据 B 大组 *Wolbachia* 株系最初的系统发育关系划分,从得到的系统发育树(图 1)可以看出

这 4 种叶螨体内感染的 *Wolbachia* 可以分为两个组,即 Ori 组和 Con 组。其中,截形叶螨中的序列型 *wsp15* 属于 Con 组,其余序列型属于 Ori 组。二斑叶螨中的 *Wolbachia* 序列型都属于 Ori 组,神泽叶螨和山楂叶螨中的两种序列型同属于 Con 组。

表 2 *wsp* 基因序列成对遗传距离

Table 2 Pairwise distance between *wsp* gene sequences

	<i>wsp1</i>	<i>wsp2</i>	<i>wsp3</i>	<i>wsp4</i>	<i>wsp5</i>	<i>wsp6</i>	<i>wsp7</i>	<i>wsp8</i>	<i>wsp9</i>	<i>wsp10</i>	<i>wsp11</i>	<i>wsp12</i>	<i>wsp13</i>	<i>wsp14</i>	<i>wsp15</i>
<i>wsp1</i>															
<i>wsp2</i>	0.0019														
<i>wsp3</i>	0.0019	0.0038													
<i>wsp4</i>	0.0038	0.0057	0.0057												
<i>wsp5</i>	0.0019	0.0038	0.0038	0.0019											
<i>wsp6</i>	0.0038	0.0057	0.0057	0.0038	0.0019										
<i>wsp7</i>	0.0057	0.0076	0.0076	0.0057	0.0038	0.0019									
<i>wsp8</i>	0.0115	0.0134	0.0134	0.0115	0.0096	0.0076	0.0096								
<i>wsp9</i>	0.0134	0.0154	0.0154	0.0134	0.0115	0.0096	0.0115	0.0019							
<i>wsp10</i>	0.0096	0.0115	0.0115	0.0096	0.0076	0.0057	0.0076	0.0057	0.0076						
<i>wsp11</i>	0.0291	0.0311	0.0311	0.0331	0.0311	0.0291	0.0311	0.0371	0.0351	0.0351					
<i>wsp12</i>	0.0410	0.0430	0.0430	0.045	0.043	0.0451	0.0471	0.0532	0.0553	0.0512	0.0719				
<i>wsp13</i>	0.1781	0.1755	0.1755	0.1779	0.1755	0.1781	0.1806	0.1804	0.1779	0.1806	0.1456	0.1325			
<i>wsp14</i>	0.1781	0.1755	0.1755	0.1779	0.1755	0.1730	0.1755	0.1753	0.1728	0.1755	0.1408	0.1325	0.0038		
<i>wsp15</i>	0.1755	0.1730	0.1730	0.1753	0.1730	0.1704	0.1679	0.1728	0.1703	0.1730	0.1384	0.1257	0.0211	0.0172	

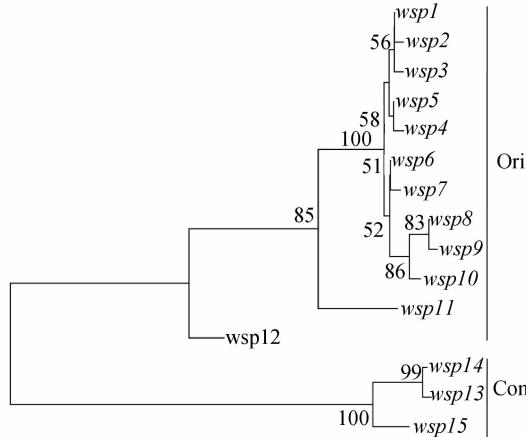


图 1 4 种叶螨体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的 NJ-系统发育树

Fig. 1 The NJ-phylogenetic tree based on the *wsp* gene sequences of *Wolbachia* in four species of spider mites

2.3 *wsp* 基因重组现象分析

基因内和基因间的重组可以改变基因的某些分子信息,从而容易对不同株系间系统发育关系造成干扰和误导。基于此,在本研究中对这 4 种

叶螨中的 *wsp* 基因是否存在潜在的重组现象进行了检测。用邻接网法对这些基因序列进行分析,得到一个网络分析图(图 2)。图 2 中的每一个边代表这些序列联系数据组的一个分离,长度代表

分离的程度。图 2 中的箱状结构表示由于重组造成的基因不相容分离。由图 2 中可知, *wsp1-wsp12* 基因序列型间, *wsp13-wsp15* 基因序列型间的发生重组的几率较小, 而这两个组合间的基因互相发生重组的几率则较大。再对这些基因进行配对检

测实验, 分析结果发现 *wsp* 基因存在普遍的重组现象(图 3)。*wsp11* 基因序列型是 *wsp15* 和 *wsp10* 重组的结果, 而 *wsp12* 由 *wsp11* 和 *wsp15* 重组产生。

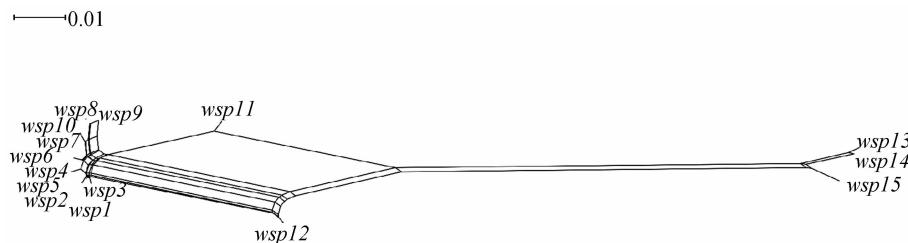


图 2 4 种叶螨体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列邻接网法分析得到的网络分析图

Fig. 2 Network analysis based on *wsp* sequences of *Wolbachia* in four species of spider mites using the uncorrected-P method

<i>wsp11</i>	1 2 2 3 4 4 5 5 6 6 6 7 7 7 7 8 8 9 9 0 0 0 1 2 2 5 6 7 9 9 0 0 0 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3 3
<i>wsp12</i>	0 5 8 5 7 9 5 6 5 9 1 4 5 7 5 8 1 2 5 7 8 6 1 4 4 0 5 1 2 0 4 2 5 1 2 4 7 8 2 4
<i>wsp15</i>	T T T T A A A G A G C T A A T G C C A A G C C C C A T G A A G G A G A C C G G T A A
	C C C G T T A G A A A G C A A A G G C A G C C A T G A A G G A G A C C G G T A A
	C C C G T T A G A A A G C A A A G G C A G A T T C A G G C C C A G G A A A A T C
<i>wsp15</i>	3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5
<i>wsp11</i>	6 6 6 7 7 7 7 7 8 8 8 2 3 4 4 5 5 6 6 6 8 9 0 1 1 1 2 2
<i>wsp10</i>	3 7 9 1 3 4 6 7 0 1 2 1 3 5 8 0 7 5 6 9 6 2 5 2 3 4 7 4 5
<i>wsp15</i>	A A T A A G T C A A A C T A C T A A C C G A G A C T T A A
<i>wsp11</i>	T T G G T A A A T C T T C G T A A A C C G A G A C T T A A
<i>wsp10</i>	T T G G T A A A T C T T T G T A T G T T A G A G G C A G T

图 3 *wsp* 基因序列间的重组现象

Fig. 3 Recombination events between different *wsp* sequences

3 讨论

本研究运用 PCR 技术及通用引物对自然种群的 4 种叶螨体内 *Wolbachia* 感染情况进行检测, 结果发现同一种叶螨中可以同时感染多种 *Wolbachia* 株系, 尤其以截形叶螨最为显著。运用通用引物对某一基因进行 PCR 扩增及测序分析是评估 *Wolbachia* 多样性的一个普遍手段 (Kikuchi and Fukatsu, 2003; van Borm et al., 2003)。同一个种的不同个体中有多种 *Wolbachia* 株系存在的现象在很多属的昆虫中都有发现 (Ijichi et al., 2002; Jamnongluk et al., 2002; Riegler and Stauffer, 2002; Reuter and Keller, 2003; Malloch and Fenton, 2005; Raychoudhury et al., 2008)。由于 *wsp* 基因自身具有快速进化的特点, 而叶螨的发育周期相对较短,

这为 *Wolbachia* 在增殖和传播过程中发生快速变异提供了可能性。因此, 变异推动了 *Wolbachia* 株系多样性的产生。另外, 同一种叶螨, 如截形叶螨中存在分化较大的两种 *Wolbachia* 株系可能由于存在多次独立的侵染事件, 且独立侵染的株系能在宿主中稳定的保存下来。多次独立侵染同样也可以解释叶螨中 *Wolbachia* 株系多样性的形成。

通过母系垂直传播, *Wolbachia* 自身在宿主种群中进行传播扩散。越来越多的研究表明, *Wolbachia* 也能在不同种宿主或同种宿主的不同个体之间进行水平传播 (Werren et al., 1995; Ahrens and Shoemaker, 2005; Baldo et al., 2008; Raychoudhury et al., 2008), 并且 Werren (1997) 认为 *Wolbachia* 能够在节肢动物中进行广泛的传播很大程度上依赖于水平传播。我们发现截形叶螨

和二斑叶螨体内的 *Wolbachia* 存在一致的 *wsp* 序列型,因此我们推断, *Wolbachia* 水平传播同样发生在两种叶螨之间。*Wolbachia* 能在不同宿主间水平传播,为 *Wolbachia* 的基因重组提供了可能性(Ishmael et al., 2009)。

除此之外, *wsp* 基因容易发生重组(Baldo et al., 2005)。基因重组可以合理地解释 *Wolbachia* 株系多样性产生的分子机制。我们的实验结果给出了 *Wolbachia* 基因内重组的分子依据,发现亲缘关系较近的同一个组中的 *Wolbachia* 株系间不易发生基因重组,而亲缘关系较远的两个组间的 *Wolbachia* 株系发生基因重组的概率则相对较大。前人研究发现,在 *Wolbachia* 与宿主的寄生关系中,同一宿主中感染两种或两种以上的 *Wolbachia* 株系以及这些株系间发生的由基因重组带来的基因改变的现象是普遍存在的(Werren et al., 1995; Baldo et al., 2006)。基因树的不一致证实了 *Wolbachia* 的基因间的重组(Jiggins et al., 2001; Werren and Bartos, 2001; Baldo et al., 2006)。而基因内的重组也在 A、B 两个大组内及之间的 *wsp*, *ftsZ*, *gltA* 和 *fbpA* 这 4 个基因中有所发现(Jiggins, 2002; Reuter and Keller, 2003; Keller et al., 2004; Baldo and Werren, 2005; Malloch and Fenton, 2005; Baldo et al., 2006; Zhang et al., 2012)。另外,基因重组可能会促进有利进化的发生,例如在异常胞质不亲和亲本中 *Wolbachia* 的传递(Francis et al., 2001)。

本次研究发现 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列型与叶螨之间存在对应关系,说明 *Wolbachia* 与其宿主在长期进化过程中形成了协同进化关系。协同进化现象在自然界中普遍存在。昆虫是整个地球生态系统中多样性最成功的例子,这很大程度上得益于其体内的微生物(Grimaldi and Engel, 2005)。共生生物的系统发育往往可以反映宿主的系统发育关系,这表明共生生物和其宿主之间存在着协同进化关系(Chen et al., 1999; Clark et al., 2000)。这种协同进化现象在立克次氏体属、衣原体属和支原体属等致病细菌中也有报道(Moran, 2002; Wernegreen, 2004; Blanc et al., 2007)。因此我们认为,正是由于这种协同进化作用,使得同一种叶螨体内的多种不同 *Wolbachia* 株系能够稳定地遗传下去,进而形成并维持 *Wolbachia* 的多样性。

我们通过 *wsp* 基因测序的方法对叶螨体内

Wolbachia 的多样性进行研究,发现 *Wolbachia* 在叶螨中遗传多样性较高,某些株系与宿主之间具有一定的协同进化关系,*Wolbachia* 基因重组存在分子依据。为了进一步明确不同 *Wolbachia* 株系对叶螨生殖调控作用的差异,我们将建立能够稳定遗传的叶螨单雌系,进而开展生物学研究。此外, *Wolbachia* 在宿主生殖调控及基因表达等方面的作用机制尚不是很清楚,也需要进一步的研究。

参考文献(References)

- Ahrens ME, Shoemaker D, 2005. Evolutionary history of *Wolbachia* infections in the fire ant *Solenopsis invicta*. *BMC Evol. Biol.*, 5:35.
- Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O, 2011. Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10):2761–2772.
- Baldo L, Ayoub NA, Hayashi CY, Russell JA, Stahlhut JK, Werren JH, 2008. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Mol. Ecol.*, 17(2):557–569.
- Baldo L, Bordenstein S, Wernegreen JJ, Werren JH, 2006. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):437–449.
- Baldo L, Lo N, Werren JH, 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *J. Bacteriol.*, 187(15):5406–5418.
- Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML, 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265:2407–2413.
- Barr AR, 1980. Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. *Nature*, 283(1413):71–72.
- Blanc G, Ogata H, Robert C, Audic S, Suhre K, Vestris G, Claverie JM, Raoult D, 2007. Reductive genome evolution from the mother of *Rickettsia*. *PLoS Genet.*, 3(5742):e14.
- Bordenstein S, Rosengaus RB, 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in isoptera. *Curr. Microbiol.*, 51(6):393–398.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O' Neill SL, 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipiensis*. *J. Bacteriol.*, 180(9):2373–2378.
- Breeuwer JAJ, Werren JH, 1990. Microorganisms associated

- with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346(6284):558–560.
- Bryant D, Moulton V, 2004. Neighbor-net; an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.*, 21(2):255–265.
- Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Werneburg JJ, Werren JH, Bandi C, 2005. Phylogeny of *Wolbachia* pipiensis based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151 (Pt 12):4015–4022.
- Chen X, Li S, Aksoy S, 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidiae*. *J. Mol. Evol.*, 48(1):49–58.
- Clark MA, Moran NA, Baumann P, Werneburg JJ, 2000. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution*, 54(2):517–525.
- Fitch WM, 1997. Networks and viral evolution. *J. Mol. Evol.*, 44(Suppl 1):S65–S75.
- Francis MJ, von der Schulenburg JHG, Gregory DDH, Michael ENM, 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268(1474):1423–1427.
- Fukatsu T, Kondo N, Ljichi N, Nikoh N, 2003. Discovery of symbiont-host horizontal genome transfer: a beetle carrying two bacterial and one chromosomal *Wolbachia* endosymbionts//Bourtzis K, Miller TA (eds.). *Insect Symbiosis*. CRC Press, New York. 305–324.
- Gotoh T, Sugasawa J, Noda H, Kitashima Y, 2007. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in Japanese populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 42(1):1–16.
- Grimaldi DA, Engel MS, 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press. 1–772.
- Hong XY, Gotoh T, Nagata T, 2002. Vertical transmission of *Wolbachia* in *Tetranychus kanzawai* Kishida and *Panonychus mori* Yokoyama (Acari: Tetranychidae). *Heredity*, 88(3):190–196.
- Hurst GDD, Jiggins MF, Schulenburg G, Bertrand D, West SA, Goriacheva II, Zakharov IA, Werren GH, Stouthamer R, Majerus MEN, 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266(1420):735–740.
- Hurst GDD, Schilthuizen M, 1998. Selfish genetic elements and speciation. *Heredity*, 80(1):2–8.
- Huson DH, Bryant D, 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254–267.
- Ijichi N, Kondo N, Matsumoto R, Shimada M, Ishikawa H, Fukatsu T, 2002. Internal spatiotemporal population dynamics of infection with three *Wolbachia* strains in the azuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(8):4074–4080.
- Ishmael N, Dunning Hotopp JC, Ioannidis P, Biber S, Sakamoto J, Siozios S, Nene V, Werren J, Bourtzis K, Bordenstein SR, Tettelin H, 2009. Extensive genomic diversity of closely related *Wolbachia* strains. *Microbiology*, 155(Pt 7):2211–2222.
- Jamnongluk W, Kittayapong P, Baimai V, O'Neill SL, 2002. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. *Curr. Microbiol.*, 45(4):255–260.
- Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9(4):393–405.
- Jiggins FM, 2002. The rate of recombination in *Wolbachia* bacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 19(9):1640–1643.
- Jiggins FM, von der Schulenburg JHG, Hurst GDD, Majerus MEN, 2001. Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268(1474):1423–1427.
- 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(8):2405–2420.
- Kikuchi Y, Fukatsu T, 2003. Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in heteropteran bugs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(10):6082–6090.
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C, 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol. Biol. Evol.*, 19(3):341–346.
- Lu MH, Zhang KJ, Hong XY, 2012. Tripartite associations among bacteriophage WO, *Wolbachia*, and host affected by temperature and age in *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.*, 58(3):207–220.
- Malloch G, Fenton B, 2005. Super-infections of *Wolbachia* in

- byturd beetles and evidence for genetic transfer between A and B super-groups of *Wolbachia*. *Mol. Ecol.*, 14(2):627–637.
- Moran NA, 2002. Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell*, 108(5):583–586.
- Osakabe MH, Kotsubo Y, Tajima R, Hinomoto N, 2008. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.*, 101(4):1167–1175.
- Raychoudhury R, Baldo L, Oliveira DCSG, Werren JH, 2008. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution*, 63(1):165–183.
- Reuter M, Keller L, 2003. High levels of multiple *Wolbachia* infection and recombination in the ant *Formica exsecta*. *Mol. Biol. Evol.*, 20(5):748–753.
- Riegler M, Stauffer C, 2002. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.*, 11(11):2425–2434.
- Rigaud T, Juchault P, 1993. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics*, 133(2):247–252.
- Rigaud T, Juchault P, Mocquard J, 1991. Experimental study of temperature effects on the sex ratio of broods in terrestrial Crustacea *Armadillidium vulgare* Latr.: Possible implications in natural populations. *J. Evol. Biol.*, 4(4):603–617.
- Ros VID, Fleming VM, Feil EJ, Breeuwer JA, 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(4):1036–1043.
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Luck RF, Werren JH, 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361(6407):66–68.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8):1596–1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24):4876–4882.
- van Borm S, Wenseleers T, Billen J, Boomsma JJ, 2003. Cloning and sequencing of *wsp* encoding gene fragments reveals a diversity of co-infecting *Wolbachia* strains in *Acromyrmex* leafcutter ants. *Mol. Phylog. Evol.*, 26(1):102–109.
- van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R, 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol. Biol.*, 8(3):399–408.
- Verne S, Johnson M, Bouchon D, Grandjean F, 2007. Evidence for recombination between feminizing *Wolbachia* in the isopod genus *Armadillidium*. *Gene*, 397(1/2):58–66.
- Wernegreen JJ, 2004. Endosymbiosis: lessons in conflict resolution. *PLoS Biol.*, 2(3):e68.
- Werren JH, Bartos JD, 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Curr. Biol.*, 11(6):431–435.
- Werren JH, O'Neill SL, 1997. The evolution of heritable symbionts//O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH (eds.). *Influential Passengers*. Oxford University Press, Oxford, England. 1–41.
- Werren JH, Windsor D, Guo LR, 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 262(1364):197–204.
- Yu MZ, Zhang KJ, Xue XF, Hong XY, 2011. Effects of *Wolbachia* on mtDNA variation and evolution in natural populations of *Tetranychus urticae* Koch. *Insect Mol. Biol.*, 20(3):311–321.
- Zhang KJ, Han X, Hong XY, 2012. Various infection status and molecular evidence for horizontal transmission and recombination of *Wolbachia* and *Cardinium* among rice planthoppers and related species. *Insect Sci.*, doi 10.1111/j.1744–7917.2012.01537.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. Biol. Sci.*, 265(1395):509–515.
- Zhu LY, Zhang KJ, Zhang YK, Ge C, Gotoh T, Hong XY, 2012. *Wolbachia* strengthens *Cardinium*-induced cytoplasmic incompatibility in the spider mite *Tetranychus piercei* McGregor. *Curr. Microbiol.*, 65(5):516–523.
- 苗慧, 洪晓月, 谢霖, 薛晓峰, 张春玲, 2006. 二斑叶螨体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与分析. *昆虫学报*, 49(1):146–153.