

共生菌 *Wolbachia* 在中国二斑叶螨 种群中的扩散规律*

谢蓉蓉^{1,2} 陈小琳¹ 孙荆涛¹ 洪晓月^{1**}

(1. 南京农业大学昆虫学系 南京 210095; 2. 江苏大学环境学院生物质能源研究所 镇江 212013)

摘要 共生菌 *Wolbachia* 在中国二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 中分布广泛, 所有的地理种群中均感染 *Wolbachia*。以二斑叶螨湖南长沙 (HN), 辽宁兴城 (LN) 和江苏徐州 (JS) 3 个地理种群为实验材料, 经筛选获得 100% 感染和不感染 *Wolbachia* 的品系后, 人工设置 *Wolbachia* 感染率为 50% 的品系, 通过 PCR 技术检测二斑叶螨连续世代 *Wolbachia* 感染率动态变化, 研究 *Wolbachia* 在二斑叶螨种群中的扩散规律。结果表明: 3 个地理种群的垂直传播效率都为 100%; HN 种群 *Wolbachia* 感染率上升速度最快, F_7 代达到 100% 感染; LN 种群 F_{12} 达到 100% 感染; 而 JS 地理种群中 *Wolbachia* 感染率速度上升最慢, 在 F_{20} 代达到 100% 感染, 其后感染率均能稳定在 100%。LN 种群 *Wolbachia* 通过诱导胞质不亲和的策略, JS 种群的 *Wolbachia* 通过提高寄主适合度的策略, 而 HN 种群 *Wolbachia* 则通过诱导胞质不亲和与提高寄主适合度两者相结合的策略, 最终达到在二斑叶螨中维持感染状态并扩散传播的目的。本研究结果为今后利用 *Wolbachia* 的扩散规律控制有害生物及疾病传播提供了基础。

关键词 *Wolbachia*, 二斑叶螨, 感染率动态

A comparative study of the dynamics of *Wolbachia* infection in different populations of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae)

XIE Rong-Rong^{1,2} CHEN Xiao-Lin¹ SUN Jing-Tao¹ HONG Xiao-Yue^{1**}

(1. Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Biofuels, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract Maternally inherited *Wolbachia* bacteria are widely distributed in Chinese populations of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). All populations were found to be infected with *Wolbachia*. Using the Hunan (HN), Liaoning (LN) and Jiangsu (JS) populations of *T. urticae* as experimental subjects, 100% *Wolbachia*-infected and 100% uninfected spider mite lines were obtained by screening. This study investigated the dynamics of *Wolbachia* spread in the two-spotted spider mite. Infection frequencies of *Wolbachia* among the progenies of the artificial populations, initiated with 50% infected and 50% uninfected female adults, were monitored by PCR. The results show 100% maternal transmission in all three populations. The rate of spread was fastest in the HN population in which the infection rate reached 100% by the F_7 generation. The infection rate in the LN population reached 100% by the F_{12} generation but took until the F_{20} generation to do so in the JS population. *Wolbachia* appeared to use different strategies to invade and spread in the different populations. In the LN population, *Wolbachia* invaded and spread by inducing cytoplasmic incompatibility (CI). In the JS population, *Wolbachia* invaded and spread by enhancing mite survival and host fitness. In the HN population, inducing CI was the dominant strategy. The enhanced fecundity associated with *Wolbachia* helped to promote the spread of infection. These results could provide a foundation for using *Wolbachia*-based strategies to control insect pests and disease vectors.

Key words *Wolbachia*, *Tetranychus urticae*, dynamics of *Wolbachia* infection

* 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: 2012-12-28

Wolbachia (沃尔巴克氏体) 是一类呈母性遗传的细胞内寄生细菌, 属于 α -变形菌纲 (α -Proteobacteria)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、无形体科 (Anaplasmataceae)、*Wolbachia* 属。*Wolbachia* 在自然界的分布非常广泛, 能够感染线虫以及昆虫、甲壳动物、螨等多种节肢动物宿主。研究发现 76% 的节肢动物物种, 66% 的昆虫物种都感染 *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008)。*Wolbachia* 成为目前所知的分布最广的胞内细菌之一。共生菌 *Wolbachia* 能在如此多的物种中存在, 主要归功于其对寄主生殖的调控作用从而促进了其在寄主种群中的扩散。共生菌 *Wolbachia* 对寄主生殖的调控作用包括以下 4 种: ①胞质不亲和现象 (cytoplasmic incompatibility, CI), 即在同一物种里, 感染 *Wolbachia* 的雄虫与未感染 *Wolbachia* 的雌虫交配或感染不同株系 *Wolbachia* 的雌雄个体交配, 往往产生不亲和现象 (Alam *et al.*, 2011); ②产雌孤雌生殖 (parthenogenesis), 感染 *Wolbachia* 的雌虫的未受精卵发育为雌虫 (Reumer *et al.*, 2012); ③雌性化 (feminization), *Wolbachia* 改变宿主正常的性别决定机制, 影响性腺发育, 让本该发育为雄虫的个体发育成雌虫 (Negri *et al.*, 2009); ④杀雄 (male-killing), 由于 *Wolbachia* 的作用, 雄虫在胚胎发育过程中染色体异常而死亡 (Riparbelli *et al.*, 2012)。尽管共生菌 *Wolbachia* 对寄主生殖的调控作用是不定的, 但这些作用均使感染的雌虫比不感染的雌虫在生殖上更具有优势。而且除了对寄主生殖的调控作用, *Wolbachia* 还能影响寄主的适生性, 从而阻碍或者促进感染的扩散 (Dobson *et al.*, 2002)。

在本实验室早先的实验中发现, 共生菌 *Wolbachia* 在中国二斑叶螨中分布广泛, 所有的地理种群中均感染 *Wolbachia*, 自然种群的感染率从 2.5% ~ 85% 不等 (Xie *et al.*, 2006)。可能造成 *Wolbachia* 感染多态现象的因素有很多, 例如寄主适合度, 母系遗传是否完全, CI 的不同表达水平等 (Reynolds and Hoffmann, 2002)。作者已对中国二斑叶螨湖南长沙、辽宁兴城、江苏徐州地理种群所感染 *Wolbachia* 对寄主生殖以及产卵量、孵化率、存活率、性比、寿命、发育历期等适合度指标的影响进行了详细的研究 (Xie *et al.*, 2011)。但这些因子与 *Wolbachia* 的种群扩散有什么关联还是未知的。关于共生菌 *Wolbachia* 扩散规律, 只在果蝇

中有过较充分研究 (Turelli and Hoffmann, 1995; Hoffmann *et al.*, 1998)。Hoffmann 等 (1990) 提出数学模型, 预测果蝇 *Drosophila simulans* 中 *Wolbachia* 感染率动态, 模型中主要考虑了 3 个可以测量的参数: 感染雌虫产生不感染后代的百分比 (μ); 不亲和杂交的相对孵化率 (H); 感染雌虫的相对生殖力 (F)。该模型还曾被用于预测蚊子中 *Wolbachia* 的感染率动态 (Dobson *et al.*, 2002; Rasgon and Scott, 2003)。目前还没有二斑叶螨中 *Wolbachia* 感染动态的相关报道。

本研究选择中国从北到南 3 个二斑叶螨地理种群作为实验材料: 辽宁兴城 (LN), 江苏徐州 (JS) 和湖南长沙 (HN)。筛选 100% 感染和完全不感染 *Wolbachia* 的品系, 研究各地理种群 *Wolbachia* 的垂直传播效率。为了了解这 3 个地理种群中共生菌 *Wolbachia* 感染率的动态变化, 我们使初始品系中感染和不感染 *Wolbachia* 的雌螨各占 50%, 并检测其后数个连续世代 *Wolbachia* 的感染率。同时, 结合作者已发表的中国二斑叶螨 *Wolbachia* 对寄主生殖以及适合度影响的数据 (Xie *et al.*, 2011), 引用 Hoffmann 等 (1990) 构建的模型以预测 *Wolbachia* 的感染率动态, 并将实验室条件下检测的感染动态与理论值进行比较, 从中探寻 *Wolbachia* 在二斑叶螨种群中的扩散规律以及主要的影响因子。本文主要回答以下几个问题: 为什么共生菌 *Wolbachia* 在中国二斑叶螨中能分布广泛? 二斑叶螨中共生菌 *Wolbachia* 的感染率会有怎样的动态变化? 二斑叶螨中共生菌 *Wolbachia* 的感染率动态受哪些因素的影响?

1 材料与方法

1.1 供试虫源

二斑叶螨辽宁兴城地理种群 (LN) (40.36°N, 120.42°E) 采集于 2002 年 8 月, 江苏徐州地理种群 (JS) (34.41°N, 116.35°E) 采集于 2003 年 7 月, 寄主植物都为苹果 (*Malus pumila* Mill)。湖南长沙地理种群 (HN) (28.11°N, 112.58°E) 采集于 2003 年 8 月, 寄主植物为大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.)。采样时, 叶片上的二斑叶螨存在多种虫态, 包括卵、若螨和成螨。经鉴定确认种类后, 在实验室种群用隔水法在豇豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 叶片上进行隔离饲养, 饲养条件为 (25 ± 1) °C, 相对湿度 60%。

1.2 叶螨总 DNA 的提取和 PCR 扩增

DNA 提取方法详见苗慧等(2006)。

本文使用一对特异性引物(Zhou *et al.*, 1998)从 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因中扩增出一段长度为 596 bp 左右的片段。上游引物为: 5'-TGG TCC AAT AAG TGATGA AGA AAC-3'; 下游引物为: 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3'。

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, 16.3 μ L ddH₂O, 2.5 μ L 10 $\times$ buffer, 1.5 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 1.5 μ L dNTPs (2.5 mmol/L), 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ m, 大连 TaKaRa 公司), 上游和下游引物各 0.5 μ L (20 pmol)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 35 个循环; 最后一次循环后再延伸 5 min。

扩增产物的检测: 取 PCR 反应产物 6~7 μ L, 在 1.0% (g/mL) 的琼脂糖凝胶上 100 V 电压电泳检测, 最后在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 下观察并记录结果。

1.3 筛选 100% 感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的品系

经 PCR 检测, 二斑叶螨辽宁兴城、江苏徐州、湖南长沙 3 个地理种群均感染 *Wolbachia*, 但不是每个个体都感染, 要经过筛选才能获得 100% 感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的品系。

1.3.1 筛选 100% 感染 *Wolbachia* 的品系

100% 感染 *Wolbachia* 的品系筛选使用孤雌回交的方法(Hong *et al.*, 2002)。在豇豆叶上接入静Ⅲ时期的雌若螨一头(未经交配), 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 后, 检测母体内是否含有 *Wolbachia*。将含有 *Wolbachia* 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 头, 全部感染 *Wolbachia*, 则获得完全感染 *Wolbachia* 的品系, 否则继续回交。达到 100% 则可用于杂交实验。

1.3.2 筛选 100% 不感染 *Wolbachia* 的品系 将豇豆叶置于海绵上, 在 0.1% (w/v) 的四环素浸泡 24 h 后, 用于饲养刚孵化出的幼螨。每天加水, 4 d 换一次叶子, 每处理一代 PCR 检测 40 头雌成螨, 完全不感染则获得 100% 不感染 *Wolbachia* 的品

系。在用于杂交实验前, 获得的不感染品系在无四环素的条件下饲养 4 代, 以避免四环素可能带来的不利影响。同时使用前 PCR 检测雌螨 40 头, 确认各品系 100% 不感染 *Wolbachia*。

1.4 *Wolbachia* 的垂直传播效率

各地理种群均以感染 *Wolbachia* ♀ $\times$ 感染 *Wolbachia* ♂, 不感染 *Wolbachia* ♀ $\times$ 感染 *Wolbachia* ♂, 感染 *Wolbachia* ♀ $\times$ 不感染 *Wolbachia* ♂, 不感染 *Wolbachia* ♀ $\times$ 不感染 *Wolbachia* ♂ 4 种杂交组合进行杂交。每个杂交组合分别从完全感染或处理后不感染的品系中挑取 15 头静Ⅲ态雌螨(成熟前的最后一个静止期, 未经交配)和 15 头雄螨进行交配。雌螨蜕皮成为成熟个体的 2 d 后将雄螨移走。从开始产卵的第 1 天算起, 产卵 5 d 后移走雌虫。将所有的卵饲养至成虫阶段, PCR 检测后代中所有雌螨的 *Wolbachia* 感染情况。

1.5 *Wolbachia* 在二斑叶螨种群中感染率的动态变化

从二斑叶螨同一地理种群筛选出的 100% 感染 *Wolbachia* 和 100% 不感染的品系中各挑出 15 头雌成螨、15 头雄成螨(共 60 头), 并放入同一叶碟上, 使其产卵 3 d。该代的感染率即为 50%。当下一代(F₁代)的雌螨羽化 5 d 后, 随机挑出 40 头 PCR 检测 *Wolbachia* 感染率, 另挑出 30 头雌螨转移到新的叶碟上。F₁代的雌螨在新的叶碟上产卵 3 d 后移走, 其后代即为 F₂代。F₂代的雌螨羽化 5 d 后, 随机挑出 40 头用于检测感染率, 另挑出 30 头转移到新的叶碟上, 依次类推。每代设 3 个重复, 各自成独立的组, 即 3 组模拟种群, 每代共检测 120 头样本。二斑叶螨湖南长沙检测 10 代, 辽宁兴城地理种群检测 14 代, 二斑叶螨江苏徐州地理种群检测 22 代。所有的实验均在 25 $^{\circ}$ C, L:D = 16:8 条件下进行。

1.6 数据整理和分析

本研究中我们用 Hoffmann 等(1990)构建的模型预测二斑叶螨地理种群的 *Wolbachia* 感染率动态, 与实验中检测到的 *Wolbachia* 感染率动态比对进行分析。Hoffmann 模型通过以下公式来预测 p_{t+1} (即 $t+1$ 代的种群感染率):

$$p_{t+1} = \frac{p_t(1-\mu)(1-s_f)}{1-sfp_t-s_hp_t(1-p_t)-\mu_s p_t^2(1-s_f)}。$$

其中, $s_f = 1 - F$; $s_h = 1 - H$; p_t 为 t 代的种群感染率。 H 表示感染 *Wolbachia* 的雄虫与不感染的雌虫不亲和授精的相对孵化率, F 表示感染 *Wolbachia* 的雌虫的相对生殖力(产卵力), μ 表示感染 *Wolbachia* 的雌虫产生不感染后代的比例。 H, F 值均由杂交数据计算得到。

将模拟种群中感染率数据与预测数据进行处理并输入 SPSS 软件, 使用 SPSS 软件进行作图 and 数据分析, 统计方法使用卡平方测试法(χ^2 -test)。

2 结果与分析

2.1 *Wolbachia* 的垂直传播效率

二斑叶螨辽宁兴城、江苏徐州和湖南长沙 3 个地理种群均以 4 种杂交组合形式进行杂交实验, PCR 检测 F_1 代所有雌螨体内 *Wolbachia* 的感染情况, 结果见表 1。 3 个地理种群感染 *Wolbachia* 和不感染 *Wolbachia* 的雄螨与感染 *Wolbachia* 的雌螨杂交, 产生的后代均感染 *Wolbachia*。 而无论是感染 *Wolbachia* 还是不感染 *Wolbachia* 的雄螨与不感染 *Wolbachia* 的雌螨杂交, 产生的后代无一感染 *Wolbachia*。 结果表明, 无论雄螨的感染状态如何, 感染 *Wolbachia* 的雌螨产生的后代必然感染 *Wolbachia*, 而不感染 *Wolbachia* 的雌螨产生的后代必不感染 *Wolbachia*。 3 个地理种群 *Wolbachia* 的垂直传播效率为 100%。

表 1 二斑叶螨辽宁兴城、江苏徐州和湖南长沙 3 个地理种群 F_1 代 *Wolbachia* 的感染率
Table 1 Infection rates among the F_1 progeny in the Liaoning (LN), Jiangsu (JS) and Hunan (HN) populations of *Tetranychus urticae*

杂交类型 Cross type (♀ × ♂)	辽宁兴城 LN (%)	江苏徐州 JS (%)	湖南长沙 HN (%)
U × U	0 (250)	0 (289)	0 (235)
U × W	0 (55)	0 (259)	0 (45)
W × U	100 (262)	100 (304)	100 (369)
W × W	100 (219)	100 (319)	100 (520)

注: U 代表不感染 *Wolbachia*, W 代表感染 *Wolbachia*。 括号外的数字代表 *Wolbachia* 的感染率, 括号内数字代表 PCR 检测的个体数。
U stands for uninfected, W for infected. Numbers outside parenthesis are the infection rates; numbers inside parenthesis are PCR-investigated individuals.

2.2 二斑叶螨湖南长沙种群中 *Wolbachia* 的感染动态

二斑叶螨湖南长沙地理种群设置 *Wolbachia* 感染率为 50% 的品系后, PCR 连续检测 10 代 *Wolbachia* 的感染率。 二斑叶螨湖南长沙(HN)种群 *Wolbachia* 感染率动态变化见图 1。 F_1 代感染率为 46.67%, 略低于母本的感染率(50%)。 HN 种群前 4 代感染率上升快, F_4 即超过 90%, 相邻世代间感染率差异均显著(卡平方测试), F_5 代开始感染率缓慢上升, 直到 F_7 代达到 100%, 并能够稳定保持 100% 感染率至 F_{10} 。 $F_1 \sim F_6$ 代的感染率依次为 46.67%, 65.00%, 76.67%, 92.50%, 97.50%, 99.17%。

根据 Hoffmann 模型预测 HN 种群连续世代的感染率。 二斑叶螨湖南长沙地理种群 *Wolbachia* 的垂直传播效率为 100%, $\mu = 0$ 。 根据杂交数据, 发现感染 *Wolbachia* 的雌螨的产卵量显著高于不感染的雌螨, 感染 *Wolbachia* 的雌虫的相对生殖力(产卵力) $F = 1.38$ 。 感染 *Wolbachia* 的雄虫与不感染的雌虫不亲和授精的相对孵化率 $H = 0.32$ 。 Hoffmann 模型预测的 *Wolbachia* 感染率分别为 67.65% (F_1), 84.51% (F_2), 97.88% (F_3), 98.67% (F_4), 99.76% (F_5), 100% ($F_6 \sim F_{10}$)。

将实验测得的感染率与模型预测值相比, $F_1 \sim F_4$ 代 *Wolbachia* 感染率的观测值显著低于预测值, $F_5 \sim F_{10}$ 观测值与预测值之间没有显著差异。 模型预测 *Wolbachia* 感染率在 F_6 代能达到 100%, 而实测发现 *Wolbachia* 感染率于 F_7 代达到 100%。 但从上升趋势来看, 感染率持续上升且上升快速, 并不慢于预测的速度, 即感染动态与期望的基本相符。 导致 $F_1 \sim F_6$ 代感染率低于期望值并最终较预测的晚 1 代达到 100% 感染的原因, 不是由于感染率上升速度慢, 而是由于在 F_1 代时, 感染率仅有 46.67%, 还没有达到 50% (初始的感染率), 与期望的 F_1 代感染率 67.65% 存在显著差异。

2.3 二斑叶螨辽宁兴城种群中 *Wolbachia* 的感染率动态

二斑叶螨辽宁兴城地理种群设置 *Wolbachia* 感染率为 50% 的品系后, PCR 连续检测 14 代 *Wolbachia* 的感染率。 二斑叶螨辽宁兴城(LN)种群 *Wolbachia* 感染率动态变化见图 2。 F_1 代感染率为 55.83%, 略高于母本的感染率(50%)。 $F_2 \sim F_5$

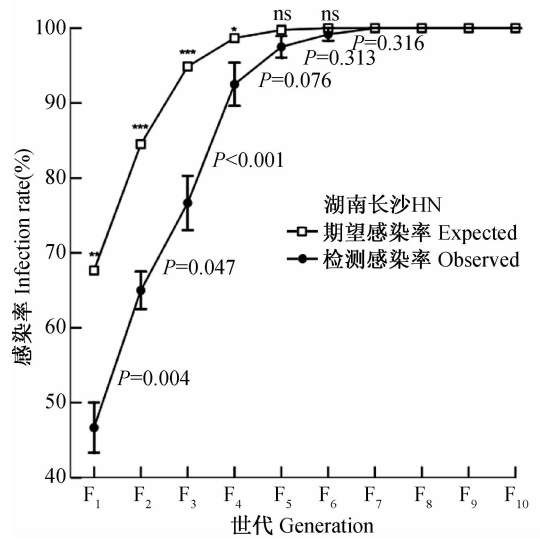


图 1 二斑叶螨湖南长沙种群中 *Wolbachia* 的感染动态

Fig.1 Infection dynamics of *Wolbachia* in the HN artificial population of *Tetranychus urticae*

二斑叶螨湖南长沙模拟种群中连续世代感染率检测值和期望值比较。 P 值是根据卡平方测验得到的相邻世代间的感染率差异。期望感染率变化是根据 Hoffmann 模型得到的 ($\mu = 0, F = 1.38, H = 0.32$)。各世代感染率检测值和期望值之间的差异显著性也是根据卡平方测验得到的。ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, 标记在期望感染率值上方。下图同。

Observed and predicted spread rate of *Wolbachia* infection in the HN population of *T. urticae*. For each generation, three replicates were set up and 40 female adults were sampled from each replicate to check *Wolbachia* infection. Bars indicate standard errors. P -value is the difference between two neighbouring generations, based on χ^2 -test. The expected infection rate change line was drawn up using the model of Hoffmann *et al.* (1990). $u = 0, F = 1.38, H = 0.32$. The tests between the observed and the expected infection rate at every generation were also done using χ^2 -test. ns: $P < 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$. The symbols were marked at the expected infection rate value. The same below.

代感染率分别为 62.50%, 77.50%, 81.67%, 85.00%。其后感染率一直保持在 90% 以上,直到 F_{12} 代达到 100%,并稳定持续 100% 的感染率到 F_{14} 。LN 种群相邻世代间,只有 F_2 和 F_3 代, F_3 和 F_6 代间感染率差异是显著的 (P 值分别为 0.011 和 0.038,卡平方测试)。

根据 Hoffmann 模型预测 LN 种群连续世代的感染率。二斑叶螨辽宁兴城地理种群 *Wolbachia* 的垂直传播效率为 100%, $\mu = 0$ 。根据杂交数据,发现感染 *Wolbachia* 的雌螨与不感染的雌螨的产卵量间没有差异,感染 *Wolbachia* 的雌虫的相对生殖力(产卵力) $F = 1$ 。感染 *Wolbachia* 的雄虫与不感染的雌虫不亲和授精的相对孵化率 $H = 0.47$ 。Hoffmann 模型预测的 *Wolbachia* 感染率分别为 57.64% (F_1), 66.60% (F_2), 75.89% (F_3), 84.13% (F_4), 90.44% (F_5), 94.51% (F_6),

97.45% (F_7), 98.52% (F_8), 99.52% (F_9), 100% ($F_{10} \sim F_{14}$)。

将实验测得的感染率与模型预测值相比, F_1 代感染率与期望值之间不存在显著差异,这点与二斑叶螨湖南长沙地理种群不同。 $F_2 \sim F_{11}$ 代中只有 F_7 代感染率(90.83%)与期望值(97.45%)之间存在显著差异 ($\chi^2 = 4.855, P = 0.027$)。Hoffmann 模型预测,种群感染率在 F_{10} 代时可达 100%,而实验中,实际检测到 F_{12} 代时感染率才达到 100% 感染,相差 2 代。从上升趋势来看,辽宁兴城种群 *Wolbachia* 感染率上升缓慢, F_7 代感染率出现稍许回落,致使种群达到 100% 感染的时间长于期望,但各代实测与期望值之间统计上没有显著差异。LN 模拟种群感染动态与期望的基本符合。

2.4 二斑叶螨江苏徐州种群中 *Wolbachia* 的感染

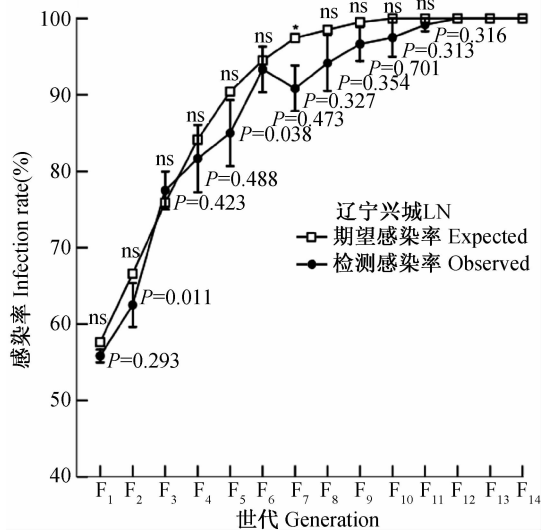


图 2 二斑叶螨辽宁兴城种群中 *Wolbachia* 的感染动态

Fig. 2 Infection dynamics of *Wolbachia* in the LN population of *Tetranychus urticae*

率动态

二斑叶螨江苏徐州地理种群设置 *Wolbachia* 感染率为 50% 的品系后,PCR 连续检测 22 代 *Wolbachia* 的感染率。在二斑叶螨江苏徐州 (JS) 种群中 *Wolbachia* 的垂直传播效率为 100% , $\mu = 0$ 。根据杂交数据,感染 *Wolbachia* 的雌螨与不感染的雌螨的产卵量间没有差异,感染 *Wolbachia* 的雌虫的相对生殖力(产卵力) $F = 1$ 。感染 *Wolbachia* 的雄虫与不感染的雌虫杂交组合的孵化率与其他亲

和组合间的孵化率间没有差异,不亲和受精的相对孵化率 $H = 1$ 。模型预测该地理种群感染率应一直维持在 50%。

实际观测发现, $F_1 \sim F_6$ 代感染率在 45% ~ 60% 之间,各代检测值和期望值之间无显著差异。自 F_7 代开始感染率一直在 65% 以上,显著高于期望值。 F_{20} 代感染率达到 100%,并能稳定持续到 F_{22} 。 $F_1 \sim F_{20}$ 相邻两代间只有 F_8 与 F_9 (分别为 75.00% ,85.83% ; $\chi^2 = 4.471$, $P = 0.034$),以及 F_{12}

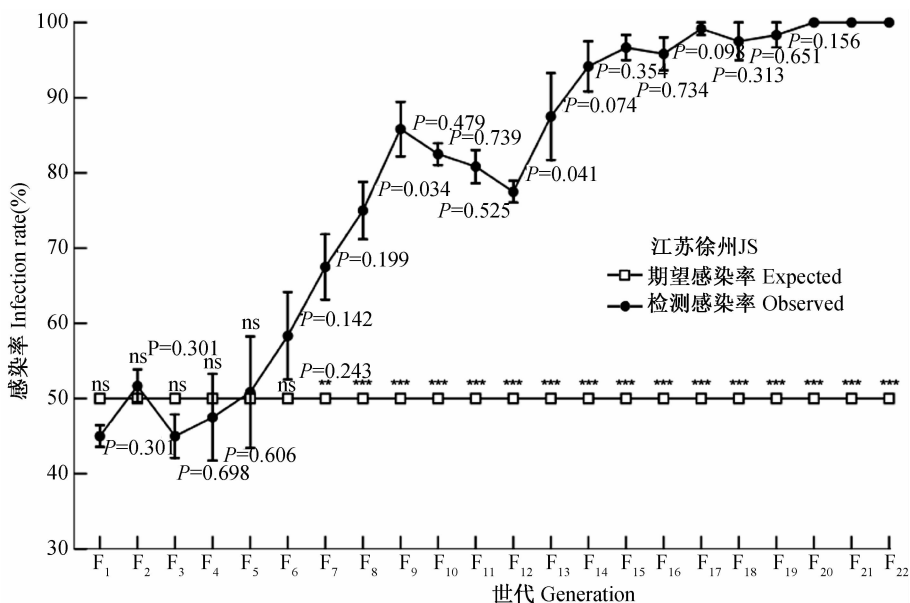


图 3 二斑叶螨江苏徐州种群中 *Wolbachia* 的感染动态

Fig. 3 Infection dynamics of *Wolbachia* in the JS population of *Tetranychus urticae*

与 F_{13} (分别为 77.50%, 87.50%; $\chi^2 = 4.156$, $P = 0.041$) 间有显著差异。

JS 种群中, *Wolbachia* 感染动态与期望不符。虽然二斑叶螨江苏徐州地理种群中感染的 *Wolbachia* 不能引起胞质不亲和, 但感染率仍能达到 100%, 只是比其它两个种群需要更多的世代数。

3 讨论

为了研究二斑叶螨中共生菌 *Wolbachia* 的扩散规律, 我们检测了二斑叶螨湖南长沙、辽宁兴城、江苏徐州 3 个地理种群实验室条件下连续世代的感染率动态。结果显示, 当 *Wolbachia* 初始感染率为 50%, 3 个地理种群的感染率最终都能达到 100%, 而不是维持到一个特定的感染率水平。*Wolbachia* 通过不同的策略促进其在种群中扩散。

Wolbachia 的感染动态曾在日本神泽叶螨 *T. kanzawai* Kishida 中有过研究。*Wolbachia* 感染率在连续种群中上升非常缓慢, 15 代时仅能达到 62.5%。该叶螨种群中 *Wolbachia* 不能诱导胞质不亲和, 完全母性遗传, 感染 *Wolbachia* 与不感染 *Wolbachia* 的品系间产卵力也没有差异。但是感染品系的卵孵化率以及若螨的成活率均低于不感染品系 (Hong *et al.*, 2002)。本研究中, *Wolbachia* 在中国二斑叶螨江苏徐州种群中同样不能诱导胞质不亲和, 完全母性遗传, 感染品系与不感染品系的产卵力、孵化率、存活率均没有显著差异。模型预测江苏徐州种群 *Wolbachia* 的感染率应稳定维持在 50%。实际观测发现, *Wolbachia* 的扩散速度明显快于神泽叶螨, 感染率在 F_7 代就达到 65%, F_{15} 代已经高达 96.67%, 在 F_{20} 代时达到 100%。

理论上, 不能诱导胞质不亲和的 *Wolbachia* 品系不能在种群中稳定存在, 除非该品系能完全母性遗传或能够给寄主提供适合度优势 (Turelli and Hoffmann, 1995)。江苏徐州种群的 *Wolbachia* 不能诱导 CI 但能在种群中扩散并达到 100% 的感染率, 可能有以下几个原因: (1) 感染 *Wolbachia* 的雌螨产生后代的雌性比例高于不感染品系 (Xie *et al.*, 2011)。*Wolbachia* 主要通过胞质垂直传播给后代, 而雄虫对 *Wolbachia* 的传播来说没有意义, 因此感染 *Wolbachia* 的雌性后代的增加能促进其在种群中的扩散 (Egas *et al.*, 2002)。(2) 感染 *Wolbachia* 的雌螨的寿命显著长于不感染的雌螨。

成虫孵化 5 d, 21% 不感染 *Wolbachia* 的雌螨死亡。感染 *Wolbachia* 的雌螨只有 4% 的个体死亡。而感染品系与不感染品系间的产卵力并没有差异 (Xie *et al.*, 2011)。由此产生的结果是, 感染 *Wolbachia* 的品系整体产生的后代数要多于不感染品系, 从而使后代中不感染 *Wolbachia* 的个体的比例逐渐下降。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中不能诱导 CI 的 *Wolbachia* 能在种群中广泛存在即被认为是其给寄主提供了生殖力和存活方面的优势 (Fry *et al.*, 2004)。(3) 100% 的胞质遗传。感染 *Wolbachia* 的雌虫产生不感染后代的比例 μ 是预测 *Wolbachia* 种群动态的数学模型中一个重要参数。澳大利亚的拟果蝇 *D. simulans* 中不能诱导 CI 的 *Wolbachia* 能在种群中稳定存在主要依赖其完美的胞质遗传 (Hoffmann *et al.*, 1996)。

在二斑叶螨湖南长沙和辽宁兴城地理种群中, *Wolbachia* 均能引起胞质不亲和。湖南长沙种群 *Wolbachia* 能诱导高强度 CI, 而辽宁兴城种群的 *Wolbachia* 只能诱导中等强度的 CI。*Wolbachia* 诱导 CI 能对感染品系提供生殖优势, 从而能促进其自身在种群中扩散。CI 强度是决定 *Wolbachia* 扩散速率的主要因子之一。而适合度优势与 CI 的结合能降低 *Wolbachia* 在新种群中扩散的起始感染率, 并能加速 *Wolbachia* 的扩散 (Dobson *et al.*, 2002, 2004)。无论模型预测还是实际观测都表明湖南长沙种群 *Wolbachia* 的扩散速度是最快的。除了诱导高强度 CI 外, 湖南长沙种群 *Wolbachia* 对寄主提供的产卵力优势进一步加快了 *Wolbachia* 的扩散速率。湖南长沙种群 *Wolbachia* 感染率持续上升且上升快速, 并不慢于预测的速度, 感染动态与期望基本相符。而导致 $F_1 \sim F_6$ 代感染率低于期望值并最终较预测的晚 1 代达到 100% 感染的原因, 不是由于感染率上升速度慢, 而是由于在 F_1 代时, 感染率仅有 46.67%, 还没有达到 50% (初始的感染率), 与期望的 F_1 代感染率 67.65% 存在显著差异。造成 F_1 代感染率低的原因可能是 HN 种群感染的 *Wolbachia* 诱导高强度 CI, 诱导 CI 对 *Wolbachia* 有利而对寄主有害。寄主为避免 CI 而选择与亲和的配偶进行交配, 这在某种程度上会降低 *Wolbachia* 的感染率。Vala 等 (2004) 研究发现二斑叶螨中感染和不感染 *Wolbachia* 的雌成螨 (*Wolbachia* 能引起胞质不亲和) 对产卵位置是一定的选择性, 并且会择优选择亲和的配偶进行交

配,从而避免 CI 或者降低 CI 的几率在生殖上获利。而辽宁兴城种群实测 *Wolbachia* 感染率比预测晚两代达到 100% 有可能是 *Wolbachia* 缩短了感染品系寿命。前 6 d 的产卵高峰期中,48% 的感染品系的雌螨都已经死亡,而不感染品系只有 12% 的雌螨死亡(Xie *et al.*, 2011)。这在某种程度上会减少感染 *Wolbachia* 的品系的种群数量,延缓了 *Wolbachia* 在种群中的扩散。

本研究中,共生菌 *Wolbachia* 通过对二斑叶螨不同地理种群生殖和适合度的不同影响,最终达到维持感染状态并扩散传播的目的。江苏徐州种群 *Wolbachia* 主要通过提高寄主雌性比和寿命在种群中扩散,辽宁兴城种群 *Wolbachia* 通过诱导中等强度 CI 在种群中扩散,而湖南长沙种群通过诱导高强度 CI 以及提高寄主的产卵力在种群中扩散,且扩散速度最快。而在自然界中,*Wolbachia* 的扩散还受世代重叠、叶螨密集度、环境因素等其它条件的影响,*Wolbachia* 扩散速度必然与实验中的扩散速度有一定差异。尽管如此,本实验的结果仍能在一定程度上说明了低临界值和较快的扩散速率是共生菌 *Wolbachia* 会在中国二斑叶螨中分布如此广泛,并且感染率在逐年上升的一个主要原因。今后,我们在预测感染率动态时除了考虑数学模型中的三大因子(F 、 H 、 μ)外,还需考虑其它的一些因素,例如后代性比,寿命和发育历期等。本研究结果为今后利用 *Wolbachia* 的扩散规律控制有害生物及疾病传播提供了基础。

参考文献 (References)

- Alam U, Medlock J, Brelsfoard C, Pais R, Lohs C, Balmand S, Carnogursky J, Heddi A, Takac P, Galvani A, Aksoy S, 2011. *Wolbachia* symbiont infections induce strong cytoplasmic incompatibility in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathog.*, 7(12):e1002145.
- Dobson SL, Marsland E, Rattanadechakul W, 2002. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics*, 160(3):1087 – 1094.
- Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ, 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, 93(2):135 – 142.
- Egas M, Vala F, Breeuwer JAJ, 2002. On the evolution of cytoplasmic incompatibility in haplodiploid species. *Evolution*, 56(6):1101 – 1109.
- Fry AJ, Palmer MR, Rand DM, 2004. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93(4):379 – 389.
- 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(2):215 – 220.
- Hoffmann AA, Clancy D, Duncan J, 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity*, 76(Pt1):1 – 8.
- Hoffmann AA, Hercus M, Dagher H, 1998. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 148(1):221 – 231.
- Hoffmann AA, Turelli M, Harshman LG, 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 126(4):933 – 948.
- 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.
- Negri I, Franchini A, Gonella E, Daffonchio D, Mazzoglio PJ, Mandrioli M, Alma A, 2009. Unravelling the *Wolbachia* evolutionary role: the reprogramming of the host genomic imprinting. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 276(1666):2485 – 2491.
- Rasgon JL, Scott TW, 2003. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics*, 165(4):2029 – 2038.
- Reumer BM, van Alphen JJM, Kraaijeveld K, 2012. Occasional males in parthenogenetic populations of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae): low *Wolbachia* titer or incomplete coadaptation? *Heredity*, 108(3):341 – 346.
- Reynolds KT, Hoffmann AA, 2002. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genet. Res.*, 80(2):79 – 87.
- Riparbelli MG, Giordano R, Ueyama M, Callaini G, 2012. *Wolbachia*-mediated male killing is associated with defective chromatin remodeling. *PLoS ONE*, 7(1):e30045.
- Turelli M, Hoffmann AA, 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, 140(4):1319 – 1338.
- Vala F, Egas M, Breeuwer JAJ, Sabelis MW, 2004.

- Wolbachia* affects oviposition and mating behaviour of its spider mite host. *J. Evol. Biol.*, 17(3):692 – 700.
- Xie L, Miao H, Hong XY, 2006. The two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch and the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) in China mixed in their *Wolbachia* phylogenetic tree. *Zootaxa*, 1165:33 – 46.
- Xie RR, Cheng XL, Hong XY, 2011. Variable fitness and reproductive effects of *Wolbachia* infection in populations of the two-spotted mite *Tetranychus urticae* Koch in China. *Appl. Entomol. Zool.*, 46(1):95 – 102.
- Zhou WG, Rousset F, O' Neill SL, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265(1395):509 – 515.
- 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.