



研究论文

四种瘿蜂体内 *Wolbachia* 感染的 PCR 检测 及感染株系的 *wsp* 基因序列分析*

赵 玲¹ 朱道弘^{1**} 刘志伟² 杨筱慧¹

(1. 中南林业科技大学昆虫行为与进化生态学实验室 长沙 410004;

2. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Illinois 61920, USA)

摘 要 *Wolbachia* 为节肢动物等的细胞质共生细菌,能对宿主的繁殖模式进行调控,包括诱导胞质不亲和、孤雌生殖、雌性化及雄性致死。本文采集了分布于美国的 4 种瘿蜂,利用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异性引物,对其 *Wolbachia* 的感染进行了 PCR 检测,证实了栎结瘤瘿蜂 *Callirhytis punctata* Bassett 和摇鼓栎瘿蜂 *Dryocosmus palustris* Osten Sacken 体内具 *Wolbachia* 共生,感染率分别为 60% 和 36%。栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列长度分别为 564 bp 和 561 bp。栎结瘤瘿蜂与摇鼓栎瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的一致性为 94%。栎结瘤瘿蜂与同为栎瘿蜂族的 *Andricus solitarius* (strain 1) 和 *Neuroterus macropterus*, 及客瘿蜂族的 *Synergus crassicornis* 的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列完全一致,与其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列一致性介于 79% ~ 99% 之间。在 NJ 系统发育树中,栎结瘤瘿蜂与栎瘿蜂族的 *A. solitarius* (strain 1), *N. macropterus* 和 *B. pallida*, 以及客瘿蜂族的 *S. crassicornis* 的 *Wolbachia* 同属一支,而摇鼓栎瘿蜂与栎瘿蜂族的麦氏安瘿蜂的 *Wolbachia* 聚集在同一支。除客瘿蜂族的 *Ceroptres cerri* 感染的 *Wolbachia* 属于 B 群之外,其他瘿蜂感染的 *Wolbachia* 均属于 A 群。此外,本文采集的栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂营有性生殖,说明 *Wolbachia* 的共生并不诱导其营产雌孤雌生殖。

关键词 *Wolbachia*, *wsp* 基因, PCR, 系统发育关系, 栎瘿蜂, 草瘿蜂

PCR detection and sequence analysis of the *Wolbachia wsp* gene in four gall wasps

ZHAO Ling¹ ZHU Dao-Hong^{1**} LIU Zhi-Wei² YANG Xiao-Hui¹

(1. Laboratory of Insect Behavior and Evolutionary Ecology, Central South University of Forestry and Technology,

Changsha 410004, China; 2. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University 61920, USA)

Abstract *Wolbachia* is a cytoplasmically inherited bacterium which occurs widely in the reproductive tissues of arthropods. It causes a wide range of alterations to host reproduction, including induction of cytoplasmic incompatibility (CI), parthenogenesis induction (PI), genetic male feminization and male mortality. We examined the presence of *Wolbachia* in four American gall wasps, *Callirhytis punctata* Bassett, *Dryocosmus palustris* Osten Sacken, *Antistrophus silphii* Gillette and *Antistrophus* sp., using polymerase chain reaction and sequence determination of the *Wolbachia wsp* gene. *Wolbachia* infection rates were found to be 60% and 36%, in *C. punctata* and *D. palustris*, respectively, but no infection was detected in the two *Antistrophus* species. The two *wsp* sequences of *C. punctata* and *D. palustris* have lengths of 564 bp and 561 bp, respectively, and were 94% similar. Further comparison with known *wsp* gene sequences in other cynipid wasps revealed a 100% similarity with those in *C. punctata* and *Andricus solitarius* (strain 1), *Neuroterus macropterus* and *Synergus crassicornis* and a similarity ranging between 79% – 99% in the remaining species. Phylogenetic reconstruction of the relationships of *Wolbachia* strains in Cynipidae with known *wsp* sequences indicated that the *Wolbachia* strain of *Callirhytis punctata* is closely related to that of *A. solitarius* (strain 1), *N. macropterus*, *Biorhiza*

* 资助项目:国家自然科学基金(30872036)。

**通讯作者, E-mail: daohongzhu@yeah.net

收稿日期:2012-12-25, 接受日期:2013-02-04

pallida, and *S. crassicornis*, whereas the *Wolbachia* strain of *D. palustris* is closely related to that of *A. mairei*. Addition of the new *wsp* sequences did not change *Wolbachia*'s established pattern of association in cynipid wasps, *i. e.*, the *Wolbachia* strain of *Ceroptres cerri* belongs to the B group whereas that of all other species belong to the A group. Additionally, we used the sexually reproductive generation to examine the presence of *Wolbachia* both in *C. punctate* and *D. palustris*. The results indicate that *Wolbachia* does not induce parthenogenesis in these species.

Key words *Wolbachia*, *wsp* gene, PCR, phylogenetic relationship, Cynipini, Aylacini

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一类以节肢动物及线虫等为宿主的细胞质共生细菌,属于变形菌门(Proteobacteria)的 α 亚门的立克次氏体目(Rickettsiales),为革兰氏阴性细菌(Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999; Weinbauer *et al.*, 2004)。基于 *wsp* 基因序列,可将 *Wolbachia* 划分为 A、B、C、D、E、F、G 和 H 8 个群(group),其中 A 群和 B 群共生于昆虫、螨类和甲壳动物, C 群和 D 群共生于丝状线虫, E 群共生于弹尾纲跳虫, F 群共生于丝状线虫、等翅目的白蚁、半翅目的蜡象及鞘翅目的象甲, G 群和 H 群共生于蜘蛛和白蚁中(Floate *et al.*, 2006)。感染 *Wolbachia* 的昆虫种类估计达 17% ~ 76% (Werren *et al.*, 1995; West *et al.*, 1998; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Werren and Windsor, 2000), 一些学者认为 *Wolbachia* 有可能是自然界分布最广、丰度最大的共生细菌类群(Werren *et al.*, 1995)。其寄主种类也很广泛,如小菜蛾 *Plutella xylostella* (宋月等, 2009)、熊蜂类(李振宇等, 2011)、玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostrinae* (刘宏岳等, 2009) 等中都有检测到 *Wolbachia* 的感染。该菌的传播方式主要为种内的垂直传播,即宿主雌性个体感染的细菌经卵细胞的细胞质传递给子代(Werren, 1997)。但在一些昆虫种类中,也存在水平传播现象(Vavre *et al.*, 1999)。*Wolbachia* 能对被感染的昆虫等节肢动物的生殖方式进行调控,包括引起宿主胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility)、诱导孤雌生殖(parthenogenesis-inducing)、雌性化(feminizing)及雄性致死(male-killing)(Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999)。

瘿蜂科(Cynipidae)为瘿蜂总科(Cynipoidea)中的植食性类群,一般于为害部位形成虫瘿,已知种类约 1 400 种,被划分为两个亚科,即古瘿蜂亚科(Hodiernocynipinae)(均为化石种)和瘿蜂亚科(Cynipinae)(现存种和个别化石种)。瘿蜂亚科包括 6 个族(tribe),即:草瘿蜂族(Aylacini)、栎瘿蜂

族(Cynipini)、豆瘿蜂族(Eschatocerini)、槭瘿蜂族(Pediaspidili)、蔷薇瘿蜂族(Diplolepidini)和客瘿蜂族(Synergini)(Ronquist, 1999; Liu and Ronquist, 2006)。经 PCR 检测,已证实 4 个族的一些瘿蜂种类具 *Wolbachia* 的共生,即草瘿蜂族 4 种(Plantard *et al.*, 1999; Rokas *et al.*, 2002), 栎瘿蜂族 8 种(Abe and Miura, 2002; Rokas *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2007; 杨筱慧等, 2012), 蔷薇瘿蜂族 11 种(Plantard *et al.*, 1999), 客瘿蜂族 6 种(Rokas *et al.*, 2002)。瘿蜂类昆虫具有多种生殖方式,如产雄孤雌生殖(arrhenotoky)、产雌孤雌生殖(thelyotoky)、周期性孤雌生殖(cyclical parthenogenesis)(Ronquist, 1999; Stone *et al.*, 2002)。一些研究已证实,草瘿蜂族和蔷薇瘿蜂族一些产雌孤雌生殖种类的孤雌生殖是 *Wolbachia* 诱导所致(Plantard *et al.*, 1998, 1999)。

我们于美国伊利诺伊州、印第安纳州采集了沼生栎(*Quercus palustris* Muenchh)、樟叶栎(*Quercus imbricaria* Michaux)、串叶松香草(*Silphium perfoliatum* Linn.)及合叶松香草(*Silphium integrifolium* Michaux)的瘿蜂虫瘿,获得了栎瘿蜂族的瘿蜂成虫 2 种,即栎结瘤瘿蜂 *Callirhytis punctata* Bassett 和摇鼓栎瘿蜂 *Dryocosmus palustris* Osten Sacken; 草瘿蜂族的瘿蜂成虫 2 种,即松香草瘿蜂 *Antistrophus silphii* Gillette 和合叶松香草瘿蜂 *Antistrophus* sp. (待发表新种)。利用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异性引物,对获得瘿蜂的 *Wolbachia* 感染进行了 PCR 检测,证实了栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂体内具 *Wolbachia* 共生。经目的基因片段的 DNA 序列分析,与瘿蜂科中已知的其他种类 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的一致性比对,构建了系统发育树。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究的栎结瘤瘿蜂(寄主植物为沼生栎)、

摇鼓栉瘿蜂(寄主植物为沼生栎和樟叶栎)和合叶松香草瘿蜂(寄主植物为合叶松香草)的虫瘿于 2010 年 4 月采自美国伊利诺斯州,松香草瘿蜂(寄主植物为串叶松香草)的虫瘿于 2010 年 4 月采自美国印第安纳州(表 1)。采集的虫瘿保存于室温条件下让其成虫羽化。获得的羽化成虫以无水乙醇浸泡,于 -40°C 的冰箱保存备用。

1.2 总 DNA 的提取

以超纯水洗涤后的瘿蜂成虫 1 个体置于装有 100 μL STE 缓冲液(100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)的 1.5 mL 离心管内,将其充分捣碎。加 10 μL 10% 的 SDS 和蛋白酶 K(20 mg/mL)2 μL ,混匀后 37°C 水浴恒温过夜。加 100 μL 的 PCL(苯酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1)抽提,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液;再加 100 μL PCL 抽提,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液。然后,加 10 μL (3 mol/L)醋酸钠,250 μL 的无水乙醇 -20°C 过夜,经 5°C 14 000 r/min 低温离心 20 min,弃上清液,用 75% 冷乙醇洗涤,再于相同条件低温离心去上清液一次,干燥 15 min 后加 50 μL TE 缓冲液溶解, -4°C 保存备用。

1.3 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的 PCR 扩增

使用的 *wsp* 基因特异性引物为 *wsp*81F (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') 和 *wsp*691R (5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3') (Zhou *et al.*, 1998)。PCR 扩增体积为 25 μL ,包括 2 μL 模板 DNA, 17 μL H_2O , 2.5 μL 10 $\times$ buffer, 1 μL dNTPs (10 mmol/L), 上游和下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 以及 0.4 μL *Taq* DNA 聚合酶 (215 U/ μL)。PCR 扩增循环是: 95°C 预变性 3 min, 95°C 30 s, 52°C 1 min, 72°C 1 min, 共 35 个循环,循环结束后 72°C 处理 7 min。

PCR 扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶于 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中电泳,电压 70 V,电泳时间约 40 min。电泳后以溴化乙锭染色,凝胶成像系统检测并摄影。DNA 分子质量采用上海天根生物公司的 D2000 的 DNA MWMaker 标记。以麦氏安瘿蜂 *Andricus mairei* 的 *Wolbachia* 样本为阳性对照(杨筱慧等, 2012),纯净水为阴性对照。

1.4 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的序列测定及分析

将目的基因片段的 PCR 产物进行回收、纯化,

然后委托上海英骏生物技术有限公司进行双向直接测序。每种瘿蜂测序 3 个体,每个体测 3 个序列,以其一致序列为准。

从 NCBI 网站中下载已登录的瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列,利用 Blast 软件进行一致性比较。使用 MEGA4.0 软件将本研究获得的序列与 GenBank 中下载的其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因进行序列完全排列。由于碱基位点第 74 ~111 bp, 214 ~252 bp 和 518 ~584 bp 3 个区域的核苷酸同源性存在歧义,参照 Braig 等 (1994) 及 Rokas 等 (2002),在后续的分析中排除了这 3 个区域。然后,根据 Kimura's 2-parameter 模型计算遗传距离,依据 Model-Test3.7 最优进化模型设定 Gamma 参数,进行 1 000 次自导复制,使用邻位相连法 (Neighbor-Joining method) 构建 NJ 系统树。

2 结果与分析

2.1 供试瘿蜂种类 *Wolbachia* 的感染

使用 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的特异引物,分别对采自北美的 4 种瘿蜂进行了 PCR 检测,在栎瘿蜂族的栎结瘤瘿蜂和寄主为樟叶栎的摇鼓栉瘿蜂中获得了长度约为 600 bp 的基因片段,证实了 *Wolbachia* 在其体内的感染,其感染率分别为 60% 和 36% (图 1,表 1)。序列分析的结果显示,栎结瘤瘿蜂和摇鼓栉瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列长度分别为 564 bp 和 561 bp,已提交 GenBank 注册,登录号分别为 JX183144 和 KC122917。

2.2 供试瘿蜂与已知瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列一致性及其系统发育树

使用 NCBI 网站的 Blast 工具,对栎结瘤瘿蜂和摇鼓栉瘿蜂、GenBank 已登录的瘿蜂及其他 A、B 群代表性昆虫种类的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列进行了一致性分析。本文检测的栎结瘤瘿蜂与摇鼓栉瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的一致性为 94%。栎结瘤瘿蜂与同为栎瘿蜂族的 *Andricus solitarius* 和 *Neuroterus macropterus* 及客瘿蜂族的 *Synergus crassicorni* 的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列完全一致。与其他瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的序列一致性介于 79% ~99% 之间(表 2)。

使用 MEGA 软件用 NJ 法构建了瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的系统发育树(图 2)。从系统发育图中可以看出,除客瘿蜂族的 *Ceroptres cerri*

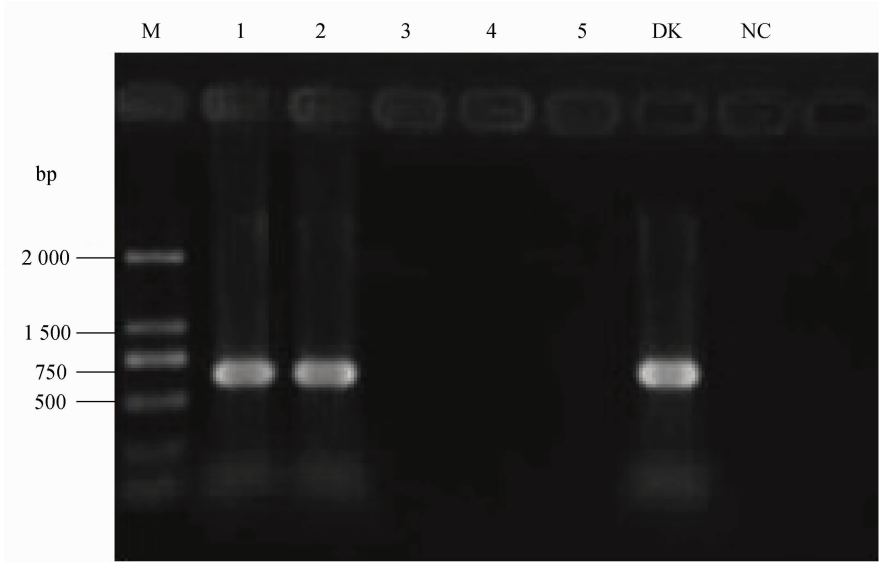


图1 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的 PCR 扩增

Fig.1 The PCR amplification of the *wsp* gene fragment of *Wolbachia*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker;1:栎结瘤瘿蜂 *Callirhytis punctata*;2:摇鼓栎瘿蜂樟叶栎种群 *Quercus imbricaria* strain of *Dryocosmus palustris*;3:摇鼓栎瘿蜂沼生栎种群 *Q. palustris* strain of *Dryocosmus palustris*;4:松香草瘿蜂 *Antistrophus silphii*;5:合叶松香草瘿蜂 *Antistrophus* sp.;DK:麦氏安瘿蜂 *Andricus mairei*;NC: 阴性对照(水)negative control(water).

感染的 *Wolbachia* 属于 B 群之外,其他瘿蜂感染的 *Wolbachia* 均属于 A 群。栎结瘤瘿蜂与栎瘿蜂族的 *A. solitaries* (strain 1)、*N. macropterus* 和 *Biorhiza pallida*, 以及客瘿蜂族的 *S. crassicornis* 的 *Wolbachia* 聚集在同一分支。摇鼓栎瘿蜂与栎瘿蜂族的麦氏安瘿蜂 *A. mairei* 聚合在一起。

3 讨论

瘿蜂科是仅次于瘿蚊 [双翅目 (Diptera) 瘿蚊科 (Cecidomyiidae)] 的第二大造瘿昆虫类群 (Ronquist, 1999; Stone *et al.*, 2002; Liu and Ronquist, 2006)。经 PCR 检测,已证实瘿蜂亚科的草瘿蜂族、栎瘿蜂族、蔷薇瘿蜂族、客瘿蜂族的一些种类具 *Wolbachia* 的共生 (Plantard *et al.*, 1999; Abe and Miura, 2002; Rokas *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2007; 杨筱慧等, 2012)。本研究通过 *Wolbachia* 的外膜蛋白基因 *wsp* 的 PCR 扩增及其序列分析,证实了北美产的栎瘿蜂族的栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂存在 *Wolbachia* 的感染,其感染率分别为 60% 和 36%。从 NJ 系统发育树中可以看出,栎结瘤瘿蜂与栎瘿蜂族的 *A. solitaries* (strain 1)、*N. macropterus* 和 *B. pallida*、以及客瘿蜂族的 *S.*

crassicornis 的 *Wolbachia*, 摇鼓栎瘿蜂与栎瘿蜂族的麦氏安瘿蜂 *A. mairei*、及 A 群 *Wolbachia* 的代表性株系地中海粉螟 *Ephestia kuehniella* 的 *Wolbachia* 聚集在同一分支,说明其 *Wolbachia* 的亲缘关系较近。

Wolbachia 的传播方式主要为种内的垂直传播 (Werren, 1997; Stevens *et al.*, 2001), 但也存在水平传播现象 (Werren *et al.*, 1995; Vavre *et al.*, 1999; Huigens *et al.*, 2000)。客瘿蜂族瘿蜂 (寄居瘿蜂) 本身不具造瘿能力,而是寄居于其它瘿蜂的虫瘿内,造瘿瘿蜂和寄居瘿蜂的幼虫在相同的虫瘿内取食、发育 (Ronquist, 1999; Melika, 2006; Abe *et al.*, 2007; Liljeblad *et al.*, 2008)。Rokas 等 (2002) 发现 3 种客瘿蜂 *S. reinhardi*、*S. diaphanus*、*S. umbraculus* 和 1 种栎瘿蜂族的造瘿蜂 *A. solitarius* (strain 3); 1 种客瘿蜂 *S. crassicornis* 和 2 种栎瘿蜂族的造瘿蜂 *A. solitarius* (strain 1、*N. macropterus*, *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列完全一致,认为是 *Wolbachia* 在客瘿蜂和造瘿瘿蜂之间水平转播的结果。本研究的栎结瘤瘿蜂与同为栎瘿蜂族的 *A. solitarius* (strain 1) 和 *N. macropterus* 及客瘿蜂族的 *S. crassicorni* 的

表 2 栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂与已知瘿蜂 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的同源性比较

Table 2 Sequence affinity of the <i>wsp</i> gene of <i>Wolbachia</i> from <i>Callirhytis punctata</i> , <i>Dryocosmus palustris</i> and other species of Cynipidae					
寄主昆虫 Host insect	核苷酸数目 Number of nucleotides	序列一致性 Identity(%)	寄主繁殖模式 Reproductive mode of host	注册号 Accession number	参考文献 Reference
<i>Callirhytis punctata</i>	564	—	CP	JX183144	—
<i>Andricus solitarius</i>	564	100	CP	AY095153	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Neuroterus macropterus</i>	564	100	T	AY095152	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Synergus crassicorni</i>	564	100	A	AY095154	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Biorhiza pallida</i>	564	99	CP	AF339629	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Callirhytis glandiums</i>	594	95	CP	AY095156	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Synergus gallaepomiformis</i>	588	95	A	AY095155	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Andricus mairiei</i>	561	95	CP	JN710456	杨筱慧等, 2012
<i>Dryocosmus palustris</i>	561	94	CP	KC122917	—
<i>Dryocosmus kuriphilus</i>	573	86	T	DQ493720	Zhu <i>et al.</i> ,2007
<i>Synergus diaphanus</i>	576	86	A	AY095148	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Synergus umbraculus</i>	576	86	A	AY095149	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Synergus reinhardti</i>	576	86	A	AY095147	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Andricus solitarius</i> stain2	573	86	CP	AY095151	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Andricus solitarius</i> stain3	576	86	CP	AY095150	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Plagiotrochus qercusilicis</i>	546	82	T	AY095158	Rokas <i>et al.</i> ,2002
<i>Ceroptres cerri</i>	540	79	A	AY095157	Rokas <i>et al.</i> ,2002

注:CP: 周期性孤雌生殖 cyclic parthenogenesis;T:产雌孤雌生殖 thelytoky;A:产雄孤雌生殖 arrhenotoky.

Wolbachia 的 *wsp* 基因序列完全一致,可以推测也是由于 *Wolbachia* 的水平转播。此外,在本研究采集的摇鼓栎瘿蜂沼生栎种群和樟叶栎种群中,仅检测到樟叶栎种群具 *Wolbachia* 的共生。可以认为摇鼓栎瘿蜂樟叶栎种群感染的 *Wolbachia* 并非其祖先垂直转播的结果,虽然我们未采集到其寄居瘿蜂,或许也是来源于客瘿蜂的水平转播。

瘿蜂类昆虫具有多种生殖方式,如产雄孤雌生殖、产雌孤雌生殖、周期性孤雌生殖 (Ronquist, 1999;Stone *et al.* ,2002)。一些研究已证实,草瘿蜂族和蔷薇瘿蜂族一些产雌孤雌生殖种类的孤雌生殖是 *Wolbachia* 诱导所致 (Plantard *et al.* ,1998, 1999)。栎瘿蜂族昆虫在栎属、栗属等壳斗科植物上形成虫瘿,主要营周期性孤雌生殖,即有性世代与无性世代交替发生,但也有一些种类营产雌孤雌生殖 (Liljeblad *et al.* ,2008)。Abe (1986) 及 Stone 等(2002)推测这些营产雌孤雌生殖种类的生殖方式与 *Wolbachia* 有关,即 *Wolbachia* 的感染导致了有性世代的缺失。栎瘿蜂族中已证实有 8 种感染 *Wolbachia* (Abe and Miura, 2002; Rokas

et al. ,2002; Zhu *et al.* ,2007; 杨筱慧等,2012)。然而,Rokas 等(2001,2002),杨筱慧等(2012)的研究显示 *A. solitarius*、*B. pallida*、*Callirhytis glandium* 及麦氏安瘿蜂虽然具 *Wolbachia* 的感染,但仍有有性生殖世代的出现。Abe 和 Miura (2002)证实了 *Andricus mukaigawae*、Zhu 等(2007)证实了栗瘿蜂体内存在 *Wolbachia*,但 *Wolbachia* 的感染与宿主的产雌孤雌生殖并无关联。本研究采集的栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂均为有性生殖世代,虽检测到了 *Wolbachia* 感染,但显然也不支持 Abe(1986)及 Stone 等(2002)的推测。

参考文献 (References)

Abe Y, Miura K, 2002. Doses *Wolbachia* induce unisexuality in oak gall wasps? (Hymenoptera: Cynipidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* , 95(5):583 – 586.

Abe Y, 1986. Taxonomic status of the *Andricus mukaigawae* complex and its speciation with geographic parthenogenesis (Hymenoptera: Cynipidae). *Appl. Entomol. Zool.* , 21 (3):436 – 447.

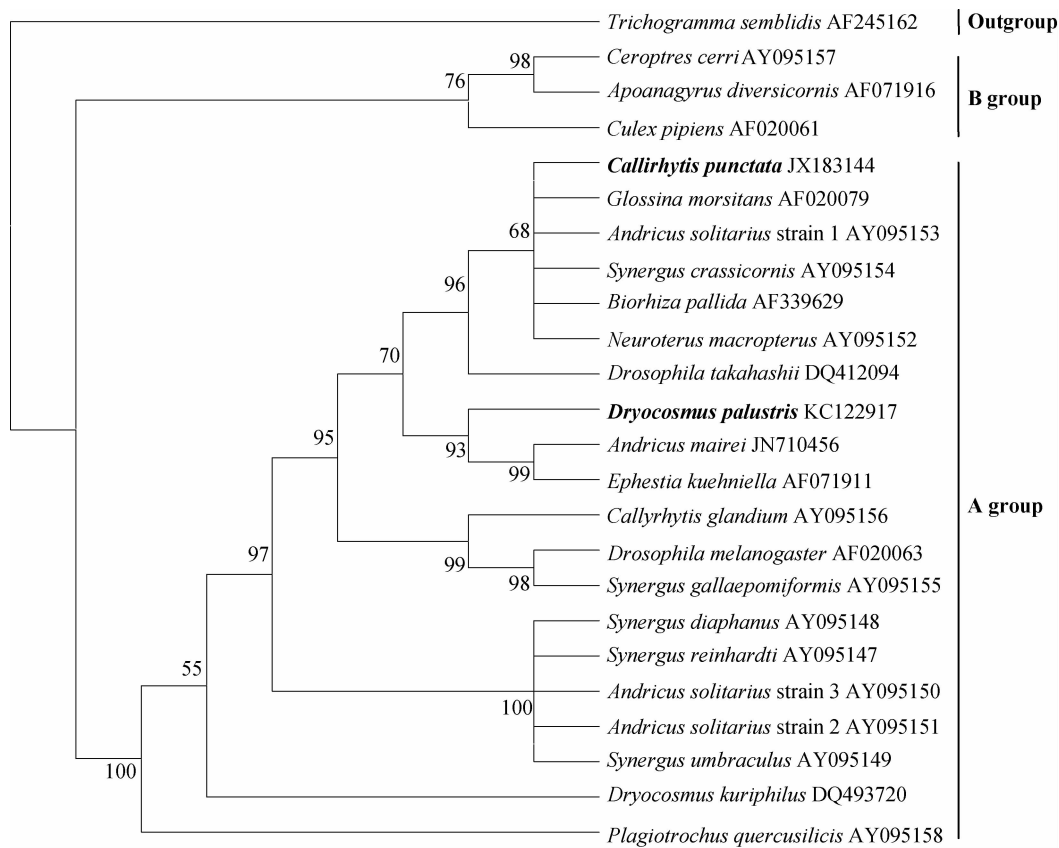


图 2 栎结瘤瘿蜂和摇鼓栎瘿蜂与其他瘿蜂种类 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的系统进化关系

Fig. 2 Phylogenetic relationship of *wsp* gene sequences of *Wolbachia* in *Callirhytis punctata*, *Dryocosmus palustris* and other cynipid gallwasps

分支间的数字指基于 1 000 次自导复制的 bootstrap 值。

Numbers above branches are bootstrap values computed from 1 000 replications.

Abe Y, Melika G, Stone G, 2007. The diversity and phylogeography of cynipid gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the oriental and eastern Palearctic regions, and their associated communities. *Orient Insects*, 41:169 – 212.

Braig HR, Guzman H, Tesh RB, Oneill SL, 1994. Replacement of thenatural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila-simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367(6462):453 – 455.

Huigens ME, Luck RF, Klaassen RH, Maas MF, Timmermans MJ, Stouthamer R, 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405(6783):178 – 179.

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.

Floate KD, Kyei-Poku GK, Coghlin PC, 2006. Overview and relevance of *Wolbachia* bacteria in biocontrol research. *Biocontrol Sci. Tech.*, 16(8):767 – 788.

Liljeblad J, Ronquist F, Nieves-Aldrey JL, Fontal-Cazalla FM, Ros-Farre P, Gaitros D, Pujade-Villar J, 2008. A fully web-illustrated morphological phylogenetic study of relationships among oak gall wasps and their closest relatives (Hymenoptera: Cynipidae). *Zootaxa*, 1796:1 – 73.

Liu ZW, Ronquist F, 2006. Ch. 98 Cynipidae//Fernández F, Sharkey MJ (eds.). *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*, Serie Entomología Colombiana, Sociedad Colombiana de Entomología, Bogotá D. C., Colombia. 839 – 849.

Melika G, 2006. Gallwasps of Ukraine. Cynipidae. *Vestnik Zoologii.*, 1:1 – 646.

Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I, Solignac M, 1998. *Wolbachia*-induced thelytoky in the rose gallwasp

- Diplolepis spinosissima* (Giraud) (Hymenoptera: Cynipidae), and its consequences on the genetic structure of its host. *Proc. R. Soc.*, 265:1075–1080.
- Plantard O, Rasplus JY, Mondor G, Le Clainche I, Solignac M, 1999. Distribution and phylogeny of *Wolbachia* inducing thelytoky in Rhoditini and ‘Aylacini’ (Hymenoptera: Cynipidae). *Insect Mol. Biol.*, 8(2):185–191.
- Rokas A, Atkinson RJ, Brown GS, West SA, Stone G, 2001. Understanding pattern of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia* selective sweep? *J. Hered.*, 87(3):294–304.
- Rokas A, Atkinson RJ, Nieves-Aldrey JL, West SA, Stone GN, 2002. The incidence and diversity of *Wolbachia* in gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) on oak. *Mol. Ecol.*, 11(9):1815–1829.
- Ronquist F, 1999. Phylogeny, classification and evolution of the Cynipoidea. *Zool. Scr.*, 28(1/2):139–164.
- Stevens L, Giordano R, Fialho RF, 2001. Male-killing, nematode infections, bacteriophage infection, and virulence of cytoplasmic bacteria in the genus *Wolbachia*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32:519–545.
- Stone GN, Schonrogge K, Atkinson RJ, Bellido D, Pujade-Villar J, 2002. The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annu. Rev. Entomol.*, 47(1):633–668.
- Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD, 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53:71–102.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M, 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol. Biol. Evol.*, 16:1711–1723.
- Weinbauer MG, Rassoulzadegan F, Fereidoun, 2004. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ. Microbiol.*, 6(1):1–11.
- Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, 42(124):587–609.
- Werren JH, Windsor DM, 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc.*, 267(1450):1277–1285.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia-reproductive* parasites of Arthropods. *Proc. R. Soc.*, 261(1360):55–63.
- West SA, Cook JM, Coderay HCJ, 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol. Ecol.*, 7(11):1457–1465.
- Zhou WG, Rousset F, O’Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc.*, 265(1395):509–515.
- Zhu DH, He YY, Fan YS, Ma MY, Peng DL, 2007. Negative evidence of parthenogenesis induction by *Wolbachia* in a gallwasp species, *Dryocosmus kuriphilus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 124(3):279–284.
- 李振宇, 冯夏, 宋月, 沈佐锐, 耿金虎, 2011. *Wolbachia* 在熊蜂中的双重感染. 应用昆虫学报, 48(4):915–921.
- 刘宏岳, 宋月, 王哲, 沈佐锐, 2009. *Wolbachia* 在我国不同地理种群的玉米螟赤眼蜂中的分布. 昆虫知识, 46(2):266–271.
- 宋月, 王哲, 刘宏岳, 沈佐锐, 2009. *Wolbachia* 在北京地区小菜蛾种群中的感染. 昆虫知识, 46(1):46–50.
- 杨筱慧, 朱道弘, 刘志伟, 赵玲, 2012. 湖南三地区麦氏安瘿蜂体内 *Wolbachia* 的感染及其 *wsp* 基因序列分析. 昆虫学报, 55(2):247–254.