

片突菱纹叶蝉感染枣疯植原体与 *Wolbachia* 的检测及系统发育分析*

郭家洛^{1**} 王金萱^{1**} 贺光学² 哈帕孜·恰合班³ 代丽珍¹
黄利斌¹ 张志勇¹ 张铁强¹ 任争光¹ 王进忠^{1***}

(1. 北京农学院, 生物与资源环境学院, 农业农村部华北都市农业重点实验室, 北京 102206; 2. 广西桂林市灌阳县
自然资源局森林病虫害防治检疫站, 广西 541600; 3. 新疆青河县农业技术推广中心, 新疆 836200)

摘要 【目的】探讨片突菱纹叶蝉 *Hishimonus lamellatus* Cai et Kuo 不同种群中枣疯植原体与沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 的感染情况和 *Wolbachia* 在不同器官组织分布, 明确枣园菱纹叶蝉中 *Wolbachia* 的感染类型和分类地位, 为研究 *Wolbachia* 感染对枣疯植原体潜在介体叶蝉生物学及生态学影响奠定基础。【方法】通过枣疯植原体和 *Wolbachia* 的基因特异性引物对片突菱纹叶蝉田间自然种群和实验室种群进行分子检测和鉴定。【结果】田间采集的片突菱纹叶蝉成虫植原体感染率在 55%-61% 之间, 而 *Wolbachia* 感染率为 3%-4%。田间采集的片突菱纹叶蝉自然种群经室内饲养, 在 1-4 龄若虫中检测到 *Wolbachia*, 2-5 龄若虫中检测到了植原体。片突菱纹叶蝉实验室饲养无植原体种群在其卵巢、卵和若虫中发现感染 *Wolbachia*, 在其唾液腺和消化道也检测到了 *Wolbachia*, 感染率在 58%-100% 之间。基于 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因构建系统发育树, 发现片突菱纹叶蝉体内的 2 个 *Wolbachia* 株系同属于 B 大组, 但不同于 B 大组其他株系, 属于新株系 wLam1 和 wLam2。【结论】片突菱纹叶蝉成虫采自田间种群可以感染枣疯植原体和 *Wolbachia*, 无植原体叶蝉实验室饲养种群成虫感染 *Wolbachia* 显著高于田间种群, 片突菱纹叶蝉体内 2 个 *Wolbachia* 株系属于 B 大组。这一研究结果为 *Wolbachia* 作为介体叶蝉生物防治剂进一步利用提供了基础信息。

关键词 片突菱纹叶蝉; 潜在介体; 枣疯植原体; 沃尔巴克氏体; 系统发育分析

Infection of *Hishimonus lamellatus* by *Wolbachia* (Rickettsiales: Alphaproteobacteria) and jujube witches'-broom phytoplasma, and phylogenetic analysis of these pathogens

GUO Jia-Luo^{1**} WANG Jin-Xuan^{1**} HE Guang-Xue² Hapazi · Qiaheban³ DAI Li-Zhen¹
HUANG Li-Bin¹ ZHANG Zhi-Yong¹ ZHANG Tie-Qiang¹ REN Zheng-Guang¹ WANG Jin-Zhong^{1***}

(1. Key Laboratory of Urban Agriculture (North China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Forest Pest Control and Quarantine Station of Guanyang Natural Resources Bureau of Guilin City, Guangxi Province, Guilin 541600, China; 3. Agriculture Promotion Center of Qinghe County, Xinjiang 836200, China)

Abstract 【Objectives】To explore the infection of jujube witches'-broom (JWB) phytoplasma and *Wolbachia* in different populations of the leafhopper, *Hishimonus lamellatus* Cai et Kuoh and the distribution of *Wolbachia* in different organs and tissues of the leafhopper, and to clarify the infection types and taxonomic status of *Wolbachia* in *Hishimonus* at jujube orchard, which laid a foundation for the study on the effects of *Wolbachia* infection on the biology and ecology of potential vectors of jujube witches'-broom phytoplasma. 【Methods】Molecular detection and identification of field and laboratory populations of *Hishimonus lamellatus* were

*资助项目 Supported projects: 北京市自然科学基金与北京市教育委员会科技计划重点项目 (KZ 201810020026); 北京市自然科学基金 (6182002); 国家自然科学基金项目 (31272099); 北京市科学技术委员会 (Z15100002115030-2)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 570186559@qq.com; 1289271449@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jinzhw9276@163.com

收稿日期 Received: 2021-01-30; 接受日期 Accepted: 2021-06-04

carried out by using gene-specific primers of Phytoplasma and *Wolbachia*. **[Results]** The infection rate of JWB-phytoplasma of natural populations of *Hishimonus lamellatus* adults collected in jujube orchards was 55%-61%, while the infection rate of *Wolbachia* was 3%-4%. When the natural populations of the leafhopper are reared and laid eggs, which hatched to nymphs, *Wolbachia* was detected in the 1st to 4th instar nymphs, and phytoplasma was detected in the 2nd to 5th instar nymphs. *Wolbachia* infection was found in ovaries, eggs and nymphs of the laboratory colonies reared the leafhopper phytoplasma-free, and was also detected in salivary glands and alimentary tract, with infection rates was between 58% and 100%. Phylogenetic tree was constructed based on *wsp* gene of *Wolbachia*. It was found that two *Wolbachia* strains belonging to group B belonged to novel strains wLam1 and wLam2, which were different from other strains of group B. **[Conclusion]** The natural populations of adult leafhoppers could be infected with JWB-phytoplasma and *Wolbachia*. The colonies of adult leafhoppers phytoplasma-free reared in the laboratory were infected with *Wolbachia* significantly more than those from the natural populations. Two *Wolbachia* strains in *Hishimonus* belonged to group B. The results provided basic information for the further use of *Wolbachia* as a biocontrol agent for leafhopper vectors.

Key words *Hishimonus lamellatus*; potential vector; Jujube witches'-broom phytoplasma

枣疯病 (Jujube witches'-broom, JWB) 是由植原体 (Phytoplasma) 引起一类病害, 因其防治难度大, 给我国广大枣产区枣生产造成了巨大经济损失 (田国忠等, 2002; 刘孟军, 2010)。如北京密云金丝小枣几乎绝灭, 甘肃泾川县梨枣大量减产, 并对古枣树品种保护和利用也构成了严重的威胁 (王合等, 2018; Wang *et al.*, 2018)。多年来, 虽然在枣疯病发生和危害、病原检测、枣疯病原系统分类、传播方式及植原体分布和转移规律、发病因素、枣树组织培养脱毒和抗生素治疗等方面进行大量研究 (温秀军等, 2001; 徐启聪等, 2009; 石小玉等, 2014; 陈昱圻等, 2015), 但是依然缺乏有效的防治手段。

目前, 已知枣疯植原体的传播方式有嫁接和介体昆虫 (王焯等, 1984; 郝新迪等, 2021), 但在自然情况下, 植原体病害传播流行以介体昆虫为主 (Weintraub and Beanland, 2006)。早年报道, 枣疯植原体介体昆虫之一是凹缘菱纹叶蝉 *Hishimonus sellatus* Uhler (孙淑梅等, 1988)。近年来, 我们调查发现在北京地区枣园存在片突菱纹叶蝉 *Hishimonus lamellatus* Cai et Kuoh 和凹缘菱纹叶蝉混合发生现象, 其中片突菱纹叶蝉可能是传播枣疯植原体潜在介体昆虫 (Hao *et al.*, 2015; 代丽珍等, 2019)。目前介体昆虫防治的主要措施是使用化学药剂, 但是长期使用化学农药对生态环境造成破坏。因此, 探索新的方法控制介体昆虫传播, 阻止植原体病害流行蔓延具有重要意义。

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一种细胞内、母系遗传的细菌, 广泛存在于节肢动物和线虫中 (Werren, 1997; Bandi *et al.*, 1998)。研究表明 *Wolbachia* 的感染发生在 20%-80% 的昆虫物种中, 并且在半翅目、鞘翅目、双翅目、膜翅目、鳞翅目和直翅目中尤其普遍 (Werren, 2000; Zug and Hammerstein, 2012)。*Wolbachia* 是生殖系统共生菌, 可通过诱导雌性化、胞质不亲和、孤雌生殖、增强雌性繁殖力和杀雄作用等多种方式调控宿主昆虫的生殖行为 (Stouthamer *et al.*, 1999; Hurst and Jiggins, 2000)。另外, 一些 *Wolbachia* 相关株系对宿主有益, 如保护宿主免受病毒感染, 或为宿主补充必需的营养物质 (Hedges *et al.*, 2008; Hosokawa *et al.*, 2010)。

Wolbachia 作为一种新的潜在介体昆虫和害虫生物控制剂已得到广泛应用 (Bourtzis *et al.*, 2014; Hoffmann *et al.*, 2015)。如来自果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *Wolbachia* 株系转入到埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 后, 缩短了介体蚊子寿命, 减少了登革热病毒的传播 (McMeniman *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2011), 并且对使用 *Wolbachia* 控制介体蚊虫的研究进行了广泛调查 (Hoffmann *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2017)。此外, *Wolbachia* 也应用于农作物害虫管理, 如从樱桃实蝇 *Rhagoletis cerasi* 的 *Wolbachia* 株系转入到地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 中, 在地中海实蝇中诱导胞质不亲和从而阻断病原体传播 (Zabalou *et al.*, 2004)。因此, *Wolbachia* 可以

作为昆虫传播病原体(包括植原体)的生物防治剂(Shaw *et al.*, 2016; Chuche *et al.*, 2017)。

然而有关 *Wolbachia* 感染介体叶蝉的研究较少(Mitsuhashi *et al.*, 2002; Wiwatanaratnabutr, 2015; Wangkeeree *et al.*, 2020)。因此, 研究 *Wolbachia* 在枣疯植原体潜在介体昆虫片突菱纹叶蝉种群中的自然感染状况及其在叶蝉体内器官组织分布和遗传进化地位, 明确介体叶蝉感染植原体与 *Wolbachia* 之间关系, 为探索介体昆虫防治新技术和有效控制枣疯病流行提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

2019 年 8 月至 2020 年 10 月, 于北京市昌平区北京农学院科技园区(116°18'03"E, 40°05'55"N)和海淀区北京市农林科学院林业果树研究所(116°23'29"E, 39°54'20"N)果园枣树上采集片突菱纹叶蝉, 并带回室内。将采集的部分片突菱纹叶蝉置于养虫笼内饲养, 另一部分片突菱纹叶蝉单头置于装有 100%乙醇的螺口管中, 保存在 -20℃ 的冰箱中用于分子检测分析(Pagliari *et al.*, 2018)。

基于雄性生殖器解剖和本实验室已建立的多重 PCR 法对枣园两个地区采集的 2 种菱纹叶蝉进行鉴定(Hao *et al.*, 2015)。经鉴定共采集片突菱纹叶蝉 120 头, 其中雌性成虫 71 头, 雄性成虫 49 头。2012 年 9 月, 将采自北京市昌平区流村镇王家园枣园枣树上的片突菱纹叶蝉建立无植原体实验室种群, 为了保持无植原体片突菱纹叶蝉种群的纯净和无植原体, 每 2 个月随机取出 10 头叶蝉进行枣疯植原体的检测和菱纹叶蝉种类鉴定。

1.2 片突菱纹叶蝉饲养及样本制备

选择高度为 20 cm 的枣苗饲喂片突菱纹叶蝉成虫, 待成虫产卵后, 将卵移至健康枣苗上饲养至实验所需龄期。饲养过程中收集叶蝉各虫态标本 3-5 头, 进行分子检测。饲养条件控制温度(25±1)℃, 湿度 60%±10%, 光周期为 16L:8D。

片突菱纹叶蝉成虫的解剖参照 Dai 等(2019)的方法, 将完全成熟的叶蝉成虫(通过翅的发育鉴定)放置在凹槽载玻片上, 用移液枪滴加 PBS 缓冲溶液在体视显微镜(Motic, K 系列)下用解剖针挑出位于腹部的消化道、唾腺和卵巢等器官组织, 获取 5 头菱纹叶蝉雌虫卵巢已发育成熟卵、唾液腺、消化道和卵巢作为一组标本, 重复 3 次作分子检测使用。

1.3 总 DNA 的提取

将片突菱纹叶蝉标本放入 1.5 mL 的离心管中, 并向管内倒入 500 μL 液氮, 用手持研磨器充分研磨至粉末状, 按照微量标本基因组提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)说明书提取每头片突菱纹叶蝉总 DNA, 用 30 μL TE 缓冲液洗脱, 用 Qubit 4.0 荧光计(赛默飞世尔科技公司)测定样品 DNA 浓度。

1.4 PCR 扩增及电泳检测

PCR 反应在 G-Storm 自动热循环仪(英国 GRI 公司)中进行, 体系如下: DNA 模板 2 μL, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 上下游引物各 1 μL, 加入 ddH₂O 补充至 25 μL。片突菱纹叶蝉体内枣疯植原体的检测使用 P1/P7 引物扩增, 用 3 种不同的遗传标记来检测 *Wolbachia* 感染(表 1), 包括核糖体小亚基的基因 16S rDNA, 细胞分裂蛋白基因 *ftsZ* 和编码外膜蛋白基因 *wsp* 基因引物。将 5 μL PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上运行, 然后用 Glodview 染色在 SN-NJ0601 凝胶成像紫外分析仪(北京信诺莱伯仪器有限公司)下观察来确定扩增子的大小。产生预期大小产物的样本被确认为 *Wolbachia* 感染阳性。由于这是来自北京叶蝉的第一次 *Wolbachia* 检测, 因此没有阳性或阴性对照。为了证实 *Wolbachia* 在片突菱纹叶蝉中的存在, 将条带清晰的未纯化的 PCR 产物 20 μL 委托上海生工公司进行双向测序并进行拼接。

1.5 序列分析

将 *Wolbachia* 所有显示有条带的 PCR 样品进行双向测序后, 未检出重叠峰, 表示同一个体没

表 1 用于 *Wolbachia* 和枣疯植原体的 PCR 扩增的引物和程序
Table 1 Oligonucleotides and thermal profiles used in PCR amplifications of *Wolbachia* and JWB

基因 Gene	引物 Primer	反应程序 Thermal profile	扩增子 Fragment profile	参考文献 References
<i>wsp</i>	<i>wsp</i> -81F 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3'	94 °C 1 min	≈600	Zhou <i>et al.</i> , 1998
	<i>wsp</i> -691R 5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'	94 °C 30 s		
		50 °C 1 min		
		72 °C 1 min		
		72 °C 10 min		
16S <i>rDNA</i>	16Sr- <i>wol</i> 99F 5'-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3'	95 °C 2 min	≈900	O'Neill <i>et al.</i> , 1992
	16Sr- <i>wol</i> 994R 5'-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3'	95 °C 1 min		
		55 °C 1 min		
		72 °C 1 min		
		72 °C 20 min		
<i>ftsZ</i>	<i>FtsZ</i> -f1 5'-GTTGTCGCAAATACCGATGC-3'	94 °C 2 min	≈1 055	Werren <i>et al.</i> , 1995
	<i>FtsZ</i> r1 5'-CTTAAGTAAGCTGGTATATC-3'	94 °C 1 min		
		55 °C 1 min		
		72 °C 90 s		
		72 °C 10 min		
JWB	P1 5'-AAGAGTTTCCTGGCTCAGGATT-3'	95 °C 5 min	≈1 830	Deng and Hiruki, 1991
	P7 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	94 °C 30 s		
		52 °C 30 s		
		72 °C 160 s		
		72 °C 10 min		

有发现双重或者多重感染现象。序列经 Chromas 软件校对后，在 NCBI 网站上 BLAST 检索，将公司返回的序列信息在 NCBI 网站进行 BLAST 检索和同源性比对（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>），以确定所得序列为 *Wolbachia* 的 16S *rDNA*、*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列。应用 BLAST 方法从 GenBank 检索并下载 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因 A、B 大组有明确分类地位的代表性序列作为参考序列（表 4），并采用 MEGA 7.0 软件的 Clustal W 多序列比对程序将这些序列分别与本研究所得到的基因 *wsp* 基因序列进行比对，根据 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离，分别采用最大似然法（Maximum likelihood, ML）构建

系统进化树，均进行 1 000 次的 Bootstrap 检验分子系统树各分枝的置信度。

2 结果与分析

2.1 片突菱纹叶蝉枣疯植原体和 *Wolbachia* 的 PCR 检测

利用植原体特异性引物对片突菱纹叶蝉标本进行检测。结果表明片突菱纹叶蝉种群可以扩增出 1 830 bp 左右的目的片段，片突菱纹叶蝉田间自然种群能够携带枣疯植原体，是潜在的枣疯植原体介体昆虫（图 1）。使用 *Wolbachia* 的 *wsp*、16S *rDNA* 和 *ftsZ* 基因特异性引物对片突菱纹叶

蝉田间自然种群样本进行检测, 部分样本 *Wolbachia* 检测呈阳性 (图 1, 表 2), 扩增片段的大小与 *Wolbachia* 的 *wsp*、*16S rDNA* 和 *ftsZ* 基因的预期结果一致, 并且研究还发现枣疯植原体和 *Wolbachia* 可以共同存在于同一个体叶蝉中。

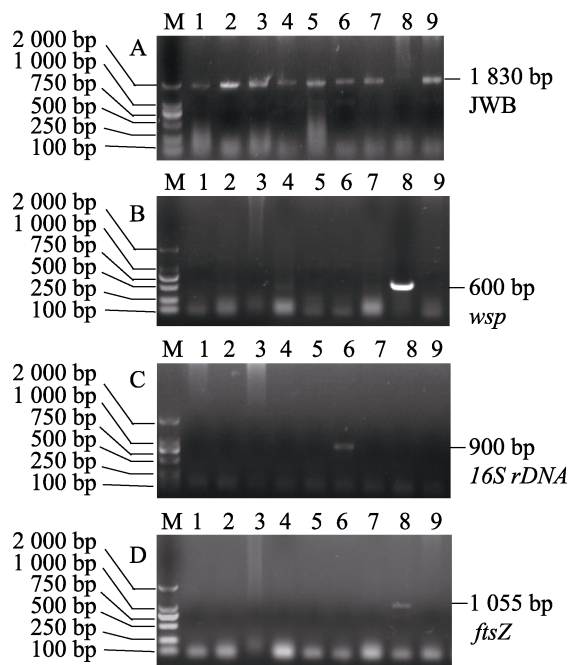


图 1 片突菱纹叶蝉体内枣疯植原体(A)和 *Wolbachia* (B/C/D)的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR products of JWB phytoplasma (A) and *Wolbachia* (B/C/D) in *Hishimonus lamellatus*

M: 2 000 bp Marker; 1-9: 片突菱纹叶蝉。

M: 2 000 bp Marker; 1- 9: *Hishimonus lamellatus*.

2.2 片突菱纹叶蝉田间自然种群枣疯植原体和 *Wolbachia* 感染率

田间自然种群中片突菱纹叶蝉雌、雄成虫均可感染枣疯植原体, 其中 61% (43/71) 的片突菱纹叶蝉雌虫和 55% (27/49) 的片突菱纹叶蝉雄虫显示植原体阳性 (表 2)。对其后代 1-5 龄若虫进行分子检测, 发现 2-5 龄若虫都能检测到枣疯植原体, 其中 3 龄若虫感染率最高为 37%, 在 1 龄若虫样本中未检测到枣疯植原体。*Wolbachia* 测试发现片突菱纹叶蝉雌雄成虫均可感染, 4% (3/71) 的片突菱纹叶蝉雌虫和 3% (1/49) 的片突菱纹叶蝉雄虫显示 *Wolbachia* 阳性。对其后代 1-5 龄若虫进行分子测定, 发现 1-4 龄若虫都能检测到 *Wolbachia*, 其中 4 龄若虫感染率最高为 29%, 在 5 龄若虫样本中未检测到 *Wolbachia*。

2.3 片突菱纹叶蝉室内种群雌虫及若虫 *Wolbachia* 感染率

本研究对 2012 年开始实验室室内饲养的片突菱纹叶蝉无植原体种群雌成虫进行解剖, 取体内唾液腺、消化道、卵巢、卵和若虫进行 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因特异性引物分子检测, 结果显示所有样本都感染了 *Wolbachia* (表 3), 雌性卵巢和卵中不仅含有 *Wolbachia*, 在重要器官组织唾液腺和消化道中也检测到其存在, 并且感

表 2 *Wolbachia* 和枣疯植原体在片突菱纹叶蝉田间自然种群中感染情况
Table 2 Infection of *Wolbachia* and JWB phytoplasma in the populations of *Hishimonus lamellatus* collected in the fields

虫态 Stage	总样本量 Sampling size	阳性样本量 Number of positive					<i>Wolbachia</i> 感染率 (%) <i>Wolbachia</i> infection rate	JWB 感染率 (%) JWB infection rate
		<i>wsp</i>	<i>ftsZ</i>	<i>16S rDNA</i>	总计* Subtotal	JWB		
成虫 雌虫 Female	71	3	1	2	3	43	4	61
Adult 雄虫 Male	49	1	0	0	1	27	2	55
若虫 1 龄 1st instar	31	1	0	0	1	0	3	0
Nymph 2 龄 2nd instar	19	1	0	0	1	1	5	5
3 龄 3rd instar	30	1	0	0	1	11	3	37
4 龄 4th instar	21	6	0	1	6	3	29	14
5 龄 5th instar	7	0	0	0	0	1	0	14

*表示该样本至少扩增出 3 个基因条带其中的 1 个基因的样本数量。

* indicates the number of samples in which at least one of the three gene has been amplified.

表 3 无植原体的片突菱纹叶蝉室内饲养种群雌成虫主要器官组织和若虫 *Wolbachia* 感染情况

Table 3 Infection of *Hishimonus lamellatus* female adult organs and nymphs *Wolbachia* in laboratory colonies without phytoplasma

样本 Samples	总样 本量 Sampling size	wsp 阳性 样本量 Number of wsp positive	<i>Wolbachia</i> 感染 率 (%) <i>Wolbachia</i> infection rate
唾液腺 Salivary glands	18	17	94
消化道 Digestive tracts	18	17	94
卵巢 Ovaries	18	15	83
卵 Eggs	26	15	58
3 龄若虫 3rd instar nymph	12	12	100
4 龄若虫 4th instar nymph	12	9	75

染率都为 94%。无植原体的片突菱纹叶蝉实验室饲养种群 3 龄若虫 *Wolbachia* 感染率为 100%，4 龄若虫 *Wolbachia* 感染率为 75%。

2.4 *Wolbachia* 的基因序列相似性分析

结果与 GenBank 中已注册的 *Wolbachia* 的 16S rDNA、ftsZ 和 wsp 基因序列相似度可达 97% 以上，表明本研所得序列为 *Wolbachia* 基因序列。本研究发现片突菱纹叶蝉感染了 2 种不同的 *Wolbachia* 株系，按照 *Wolbachia* 株系的命名规则把它们命名为 wLam1 (MV756042) 和 wLam2 (MV756043)。几乎所有的片突菱纹叶蝉成虫感染的 *Wolbachia* 株系都是 wLam1，仅在 1 头成虫中发现了感染 *Wolbachia* 的另外一个株系 wLam2。总计得到 wsp 序列 16 条，其中 wLam1 株系的 wsp 基因有完全相同的 7 条序列片段，wLam2 株系的 wsp 序列片段有 1 条，两种株系的序列相似性为 80.83%，有 101 个碱基不同。wLam1 株系的 wsp 序列经校对剪切后片段长度为 530 bp，与叶蝉科的拟菱纹叶蝉 *Hishimonoides sellatiformis* (Genbank 登录号：AB073735) 具有 97.93% 的序列相似性。wLam2 株系的 wsp 序列经校对剪切后片段长度为 527 bp，与木虱科的柑桔木虱 *Diaphorina citri* (Genbank 登录号：

KF680772) 具有 99.62% 的序列相似性。片突菱纹叶蝉的唾液腺、消化道、雌性内生殖器官、卵和不同龄期若虫感染 *Wolbachia* 的 wsp 基因经测序都属于 wLam1 株系。wLam1 株系的 16S rDNA 序列 2 条完全相同，与叶蝉科的拟菱纹叶蝉 *Hishimonoides sellatiformis* (Genbank 登录号：AB073729) 具有 99.88% 的序列相似性，wLam2 株系未扩增出 16S rDNA 基因片段。得到了 wLam1 株系的 ftsZ 序列 1 条，与叶蝉科的凹缘菱纹叶蝉 *Hishimonus sellatus* (Genbank 登录号：AB078035) 具有 99.39% 的序列相似性，wLam2 株系未扩增出 ftsZ 基因片段。

2.5 片突菱纹叶蝉体内 *Wolbachia* wsp 基因的系统发育分析

将引自 NCBI 中的 17 条不同宿主昆虫体内 *Wolbachia* 的 wsp 基因序列片段 (表 4) 与本研究的片突菱纹叶蝉体内 2 个 *Wolbachia* 株系的 wsp 基因片段一起输入到 MEGA 7.0 中，经过多序列比对后构建 ML 系统发育树的拓扑结构 (图 2) 可以看出 *Wolbachia* 的 wsp 基因分为 A、B 两个大组，其中片突菱纹叶蝉体内的 2 个 *Wolbachia* 株系同属于 B 大组，但不同于 B 大组其他株系，属于新株系 wLam1 和 wLam2。

3 讨论

Wolbachia 对昆虫生殖系统、种群适合度及发育特性产生影响，并可作为防治害虫和介体病害的生物控制剂，近年来，不同昆虫感染 *Wolbachia* 成为研究的热点 (Werren *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2011)。为探索 *Wolbachia* 用于控制介体叶蝉应用潜力，本文研究枣疯植原体潜在介体叶蝉中植原体和 *Wolbachia* 的感染情况。结果表明片突菱纹叶蝉成虫田间自然种群中枣疯植原体感染率在 55%-61% 之间，这与代丽珍等 (2019) 发现片突菱纹叶蝉能够感染枣疯植原体，是枣疯病潜在的介体昆虫结果一致。本研究应用 16S rDNA、ftsZ 和 wsp 的 3 个基因确定了叶蝉体内 *Wolbachia* 的感染，而 *Wolbachia* 不同的特异性引物对不同宿主昆虫中检测 *Wolbachia*

表 4 用于系统发育分析的 *Wolbachia* *wsp* 基因序列
Table 4 Reference sequences of *Wolbachia* *wsp* used in the phylogenetic analysis

昆虫科代表 Representative of entomology	宿主物种 Host species	<i>Wolbachia</i> 类型 <i>Wolbachia</i> type	登录号 GenBank
叶蝉科 Cicadellidae	拟菱纹叶蝉 <i>Hishimonoides sellatiformis</i>	B	AB073735
木虱科 Psyllidae	柑桔木虱 <i>Diaphorina citri</i>	B	KF680772
叶螨科 Tetranychidae	中国红叶螨 <i>Tetranychus pueraricola</i>	B	AB096228
	神泽叶螨 <i>Tetranychus kanzawai</i>	B	AB096221
	针叶小爪螨 <i>Oligonychus gotohi</i>	B	EU780671
瓢虫科 Coccinellidae	具斑食蚜瓢虫 <i>Coleomegilla maculata</i>	B	AF217724
蜻科 Libellulidae	<i>Perithemis tenera</i>	B	AF217725
跳小蜂科 Encyrtidae	<i>Apoanagyrus diversicornis</i>	B	AF071916
蚊科 Culicidae	尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i>	B	AF020061
	白纹伊蚊 <i>Aedes albopictus</i>	B	AF020059
赤眼蜂科 Trichogrammatidae	<i>Trichogramma sibericum</i>	B	AF071923
	<i>Trichogramma deion</i>	B	AF020084
	<i>Trichogramma semblidis</i>	B	AF245162
	<i>Trichogramma kaykai</i>	B	AF071924
螟蛾科 Pyralidae	地中海粉螟 <i>Ephestia kuehniella</i>	A	AF071911
象甲科 Curculionidae	沟眶象 <i>Eucryptorrhynchus chinensis</i>	A	KP713759
果蝇科 Drosophilidae	拟果蝇 <i>Drosophila simulans</i>	A	AF020070
	<i>Drosophila sechellia</i>	A	AF020073

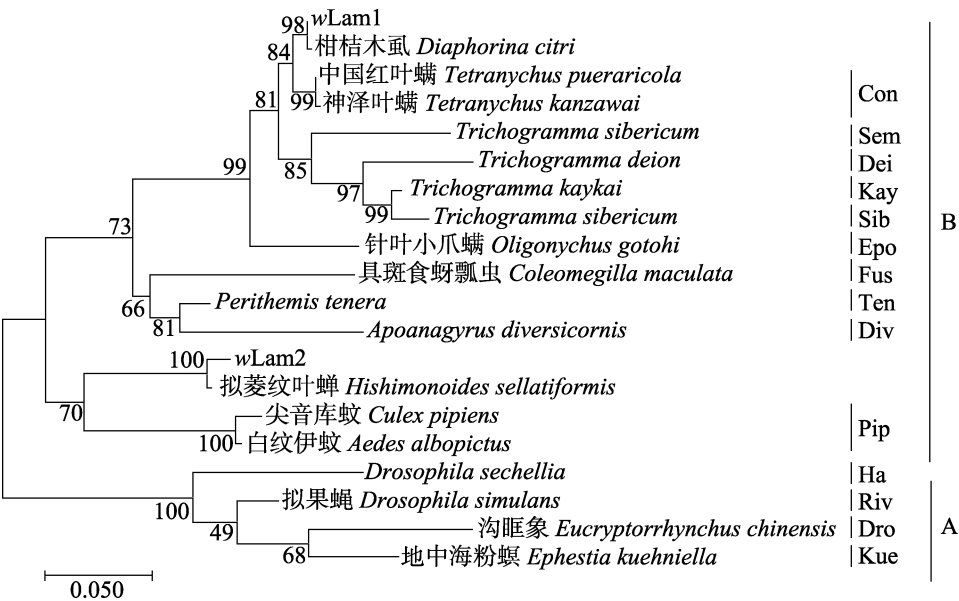


图 2 基于 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列构建的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on *Wolbachia* *wsp* gene sequence

A, B 代表大组, Con, Sem, Dei 等表示 *Wolbachia* 的株系名称; *Wolbachia* 的序列用昆虫寄主名表示, GenBank 登录号等具体信息详见表 4。

A and B represent the supergroup, Con, Sem, Dei, etc. represent the strain names of *Wolbachia*. The sequence of *Wolbachia* is expressed by insect host name, and specific information such as GenBank accession number is shown in Table 4.

的效率不同 (Hong *et al.*, 2002)。因此, 通过 3 对引物进行分析能够获得更准确的数据, 并且还能检测到 *Wolbachia* 的其它基因。

由于 *Wolbachia* 经卵巢垂直传播传递, 且与生殖器官有关 (Werren, 1997; Zchori *et al.*, 1998)。本研究发现在片突菱纹叶蝉体内, *Wolbachia* 存在于唾液腺、消化道、卵巢和卵中, 这与 *Wolbachia* 在其它节肢动物的研究结果相似 (Dobson *et al.*, 1999; Mitsuhashiet *al.*, 2002)。Wangkeeree 等 (2020) 认为甘蔗百叶病介体条纹闭颜叶蝉 *Yamatotettix flavovittatus* 卵和若虫中 *Wolbachia* 感染是通过垂直传递获得的, 但在卵巢中未发现 *Wolbachia*。本研究在片突菱纹叶蝉的卵巢、卵和若虫中均发现 *Wolbachia*, 说明片突菱纹叶蝉 *Wolbachia* 的感染也可能是经卵巢垂直传递的。*Wolbachia* 在不同昆虫器官组织中定位和密度可能取决于 *Wolbachia* 与宿主昆虫共同进化、传播途径和 *Wolbachia* 相互作用 (Pietri *et al.*, 2016)。

本研究结果显示实验室长期饲养片突菱纹叶蝉无植原体种群感染 *Wolbachia* 显著高于田间自然种群, 实验室饲养种群比田间自然种群的更容易将 *Wolbachia* 传递给后代, 这与 Turell 等 (1992) 研究结果一致。*Wolbachia* 感染率的变化通常发生在同一昆虫宿主中, 同一物种的感染率要么非常高 (> 90%), 要么非常低 (< 10%) (Hilgenboecker *et al.*, 2008)。有关烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Nirgianaki *et al.*, 2003)、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Chai *et al.*, 2011) 和温带臭虫 *Cimex lectularius* (Akhoundi *et al.*, 2016) 的研究结果也存在这一现象。说明自然界可能存在着一些抑制 *Wolbachia* 的因素 (高温、抗生素), 这些因素可以清除或者降低 *Wolbachia* 密度, 而且 *Wolbachia* 需要达到一定滴度后才能遗传给后代 (Hoffmann *et al.*, 1990)。在自然界片突菱纹叶蝉种群中, 枣疯植原体和 *Wolbachia* 是混合感染的, 枣疯植原体自然感染率 (约 58%) 远大于 *Wolbachia* 自然感染率 (约 3%)。Vautrin 等 (2007) 发现细菌对感染 *Wolbachia* 种群中有限资源的竞争以及未感染 *Wolbachia* 种群间缺乏竞争的现象, 表明细菌间相互作用形成了介体昆

虫种群间植原体感染率差异。Krstic 等 (2018) 认为 *Wolbachia* 具有与植原体竞争的特性, 植原体感染率高的介体昆虫群体更不易感染 *Wolbachia*。而 *Wolbachia* 能否影响枣疯植原体在片突菱纹叶蝉种群中传播和控制叶蝉传播植原体还需进一步探究。

基于 *wsp* 和 16S rDNA 基因, *Wolbachia* 被分类为 14 个大组 A-N (Augustinos *et al.*, 2011)。其中 A 和 B 大组在昆虫中分布最为广泛 (Zhou *et al.*, 1998)。本研究发现片突菱纹叶蝉体内的 *Wolbachia* 不同于其它株系, 属于新的株系 wLam1 和 wLam2。Mitsuhashi 等 (2002) 根据 *wsp* 基因发现拟菱纹叶蝉中的 *Wolbachia* 的 2 个新株系, Kikuchi 和 Fukatsu (2003) 研究了 19 个科 134 种昆虫的 *Wolbachia* 感染, 也显示了 *Wolbachia* 几个新株系。而片突菱纹叶蝉种群的 2 个 *Wolbachia* 株系对于调控枣疯植原体潜在介体片突菱纹叶蝉传播作用还需深入研究, 为了解 *Wolbachia* 生物学特性, 控制植原体和介体昆虫的策略提供良好的思路。

参考文献 (References)

- Akhoundi M, Cannet A, Loubatier C, Berenger JM, Delaunay P, 2016. Molecular characterization of *Wolbachia* infection in bed bugs (*Cimex lectularius*) collected from several localities in France. *Parasite-journal de la Societe Francaise de Parasitologie*, 23(31): 1–6.
- Augustinos AA, Santos-Garcia D, Dionyssopoulou E, Moreira M, Bourtzis K, 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: Is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS ONE*, 6(12): 1–11.
- Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML, 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1413): 2407–2413.
- Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, Rasgon JL, Calvitti M, Moreira LA, Bossin HC, Moretti R, Baton LA, Hughes GL, Mavingui P, Gilles JRL, 2014. Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, 132(1): S150–S163.
- Chai HN, Du YZ, Qiu BL, Zhai BP, 2011. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in the asiatic rice leafroller, *Cnaphalocrocis medinalis*, in Chinese populations. *Journal of Insect Science*, 11(123): 1–13.
- Chen YQ, Hao SD, Wang H, Tao WQ, Zhang ZY, Wang JZ, 2015. Isolation and purification of phytoplasma genomic DNA from jujube witches'-broom plant by ultracentrifugation combining

- with real-time PCR. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 30(2): 5–9. [陈昱圻, 郝少东, 王合, 陶万强, 张志勇, 王进忠, 2015. 超速离心结合 Real-time PCR 分离纯化枣疯病病原体 DNA. 北京农学院学报, 30(2): 5–9.]
- Chuche J, Auricau-Bouvery N, Danet JL, Thiéry D, 2017. Use the insiders: Could insect facultative symbionts control vector-borne plant diseases? *Journal of Pest Science*, 90(1): 51–68.
- Dai LZ, Guo JL, Feng YH, Wang L, Hao SD, Guo L, Yang BD, Ren ZG, Wang JZ, 2019. Leafhopper species screening of potential vector transmitting jujube witches'-broom phytoplasma in Beijing. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 34(3): 59–65. [代丽珍, 郭家洛, 冯玉环, 王龙, 郝少东, 郭力, 杨宝东, 任争光, 王进忠, 2019. 北京地区枣疯病病原体潜在介体叶蝉种类筛查. 北京农学院学报, 34(3): 59–65.]
- Dai LZ, Yang BD, Wang JZ, Zhang ZY, Yang R, Zhang TQ, Ren ZG, Lin CL, 2019. The anatomy and ultrastructure of the digestive tract and salivary glands of *Hishimonus lamellatus* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Insect Science*, 19(4): 1–8.
- Deng S, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Elsevier*, 14(1): 53–61.
- Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL, 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissue. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(2): 153–160.
- Hao SD, Chen YQ, Wang JZ, Wang H, Tao WQ, Zhang ZY, Shi XY, Zhou S, 2015. Multiplex-PCR for identification of two species in genus *Hishimonus* (Hemiptera: Cicadellidae) in jujube orchards. *Journal of Economic Entomology*, 108(5): 2443–2449.
- Hao XD, Lu JJ, Dai LZ, Zhang TQ, Wang JZ, Wang L, Guo JL, Ren ZG, Wang JW, 2021. Determination of 6 jujube varieties trees against jujube witches'-broom disease and difference of the transfer characteristics of phytoplasma. *Journal of Fruit Science*, 38(4): 560–568. [郝新迪, 路瑾瑾, 代丽珍, 张铁强, 王进忠, 王龙, 郭家洛, 任争光, 王建文, 2021. 6个枣品种枣疯病抗性 与枣疯病病原体迁移特性差异研究. 果树学报, 38(4): 560–568.]
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN, 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322(5902): 702.
- 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 Microbiology Letters*, 281(2): 215–222.
- Hoffmann AA, Turelli M, Harshman LG, 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 126(4): 933–948.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL, 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361): 454–457.
- Hoffmann AA, Ross PA, Rašić G, 2015. *Wolbachia* strains for disease control: Ecological and evolutionary considerations. *Evolutionary Applications*, 8(8): 751–768.
- Hong XY, Gotoh T, Noda H, 2002. Sensitivity comparison of PCR primers for detecting *Wolbachia* in spider mites. *Applied Entomology and Zoology*, 37(3): 379–383.
- Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T, Moran NA, 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2): 769–774.
- Hurst GDD, Jiggins FM, 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence and implications. *Emerging Infectious Diseases*, 6(4): 329–336.
- Kikuchi Y, Fukatsu T, 2003. Diversity of *Wolbachia* endosymbionts in Heteropteran bugs. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10): 6082–6090.
- Krstić O, Cvrković T, Mitrović M, Radonjić S, Hrnić S, 2018. *Wolbachia* infection in natural populations of *Dictyophara europaea*, an alternative vector of grapevine Flavescence dorée phytoplasma: Effects and interactions. *Annals of Applied Biology*, 172(1): 1–18.
- Liu MJ, 2010. Jujube Witches' Broom. Beijing: China Agriculture Press. 25–32. [刘孟军, 2010. 枣疯病. 北京: 中国农业出版社. 25–32.]
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O'Neill SL, 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910): 141–144.
- Mitsuhashi W, Saiki T, Wei W, Kawakita H, Sato M, 2002. Two novel strains of *Wolbachia* coexisting in both species of mulberry leafhoppers. *Insect Molecular Biology*, 11(6): 577–584.
- Nirgianaki A, Banks GK, Frohlich DR, Veneti Z, Braig HR, Miller TA, Bedford ID, Markham PG, Bourtzis SK, 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology*, 47(2): 93–101.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7): 2699–702.
- Pagliari L, Chuche J, Bosco D, Thiéry D, 2019. Phytoplasma Transmission: Insect rearing and infection protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1875: 21–36.
- Pietri JE, DeBruhl H, Sullivan W, 2016. The rich somatic life of *Wolbachia*. *Microbiologyopen*, 5(6): 923–936.
- Shaw WR, Marcenac P, Childs LM, Buckee CO, Baldini F, Sawadogo SP, Dabiré RK, Diabaté A, Catteruccia F, 2016. *Wolbachia* infections in natural *Anopheles* populations affect egg laying and negatively correlate with Plasmodium development. *Nature Communications*, 7(1): 207–211.
- Shi XY, Hao SD, Wang H, Tao WQ, Yang BD, Zhang ZY, Xue Z, Sun SL, Wang JZ, 2014. Studies on migration characters of jujube witches'-broom phytoplasma into new-born tissues of

- jujube after overwinter. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 29(3): 56–60. [石小玉, 郝少东, 王合, 陶万强, 杨宝东, 张志勇, 薛正, 孙淑玲, 王进忠, 2014. 枣疯病植原体越冬后向枣树不同类型新生组织转移特性研究. 北京农学院学报, 29(3): 56–60.]
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD, 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiolog*, 53(53): 71–102.
- Sun SM, Zhang FW, Tian XD, 1988. Studies on the biology and control of *Hishimonus sellatus* Uhler a vector of jujube witches' broom disease. *Acta Phytophylacica*, 15(3): 173–177. [孙淑梅, 张凤舞, 田旭东, 1988. 枣疯病的媒介昆虫——凹缘菱纹叶蝉生物学和防治研究. 植物保护学报, 15(3): 173–177.]
- Tian GZ, Zhang ZS, Li ZQ, Guo JH, Shen YP, 2002. Dynamics of jujube witches' broom disease and factors of great influence at ecologically different regions in China. *Scientia Silvae Sinicae*, 8(2): 83–91. [田国忠, 张志善, 李志清, 郭加虎, 申艳普, 2002. 我国不同地区枣疯病发生动态和主导因子分析. 林业科学, 8(2): 83–91]
- Turelli M, Hoffmann AA, Mckechne SW, 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics*, 132(3): 713–723.
- Vautrin E, Genieys S, Charles S, Vavre F, 2007. Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *Journal of Evolutionary Biolog*, 21(1): 145–161.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA, 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361): 450–453.
- Wang H, Ren ZG, Pan YP, Feng SK, Lin CL, Chang EZ, Yu SS, Tian GZ, 2018. Determination of individual jujube trees against jujube witches'-broom disease and screening of resistant varieties from the ancient individual jujube trees growing in Beijing. *Scientia Silvae Sinicae*, 54(8): 124–132. [王合, 任争光, 潘彦平, 冯术快, 林彩丽, 常恩忠, 于少帅, 田国忠, 2008. 北京市区古枣树单株种源抗枣疯病测定与抗病品种(系)筛选. 林业科学, 54(8): 124–132.]
- Wang J, Song L, Jiao Q, Yang S, Gao R, Lu X, Zhou G, 2018. Comparative genome analysis of jujube witches'-broom phytoplasma, an obligate pathogen that causes jujube witches'-broom disease. *BMC Genomics*: 19(1): 689.
- Wangkeeree J, Tewaruxsa P, Roddee J, Hanboonsong Y, Martin O, 2020. *Wolbachia* (Rickettsiales: Alphaproteobacteria) infection in the leafhopper vector of sugarcane white leaf disease. *Journal of Insect Science*, 20(3): 20.
- Wang Z, Zhou PZ, Yu BW, Jiang XY, Zhang CA, 1984. On the bionomics and control of *Hishimonoides Chinensis* Aunfrieve, the vector of jujube witches'-broom disease. *Acta Phytophylacica Sinica*, 11(4): 247–252. [王焯, 周佩珍, 于保文, 姜秀英, 张承安, 1984. 枣疯病媒介昆虫-中华拟菱纹叶蝉生物学和防治的研究. 植物保护学报, 11(4): 247–252.]
- Weintraub PG, Beanland LA, 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91–111.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 261(1360): 55–63.
- Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42: 587–609.
- Werren JH, Windsor DM, 2000. *Wolbachia* infection in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1450): 1277–1285.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10): 741–751.
- Wen XJ, Sun ZH, Sun SX, Shi ZR, Chen DT, 2001. Selection of resistant varieties and individuals of jujube trees to jujube witches'-broom disease. *Scientia Silvae Sinicae*, 37(5): 87–92. [温秀军, 孙朝晖, 孙士学, 史忠儒, 陈德廷, 2001. 抗枣疯病枣树品种及品系的选择. 林业科学, 37(5): 87–92.]
- Wiwatanaratnabutr I, 2015. *Wolbachia* infection in leafhoppers and planthoppers: Diversity, density and geographic distribution in tropical rice agroecosystems. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(2): 277–282.
- Xu QC, Tian GZ, Wang ZL, Kong FH, Li Y, Wang H, 2009. Molecular detection and variability of jujube witches'-broom phytoplasmas from different cultivars in various regions of China. *Acta Microbiologica Sinica*, 49(11): 1510–1519. [徐启聪, 田国忠, 王振亮, 孔繁华, 李永, 王合, 2009. 中国各地不同枣树品种上枣疯病病原体的 PCR 检测及分子变异分析. 微生物学报, 49(11): 1510–1519.]
- Ye X, Wang HY, Chen P, Fu B, Zhang MY, Li JD, Zheng XB, Tan B, Feng JC, 2017. Combination of iTRAQ proteomics and RNA-seq transcriptomics reveals multiple levels of regulation in phytoplasma-infected *Ziziphus jujuba* Mill. *Horticulture Research*, 4(1): 316–319.
- Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C, Bourtzis K, Law JH, 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(42): 15042–15045.
- Zchori FE, Roush RT, Rosen D, 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Current Microbiology*, 36(1): 1–8.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *The Royal Society*, 265(1395): 509–515.
- Zug R, Hammerstein P, 2012. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of Terrestrial arthropod species are infected. *PLoS ONE*, 7(6): e38544.