

# 9种瘿蚜的 *Wolbachia* 分子检测和系统发育分析

任维宾, 杨子祥\*, 杨 瑛, 吴海霞, 陈 航

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:** [目的]以五倍子蚜、杨树瘿蚜和黄连木瘿蚜等9种瘿蚜为实验材料,探讨瘿蚜 *Wolbachia* 与其它自由生活蚜虫携带的 *Wolbachia* 的株系差异及亲缘关系,明确五倍子蚜、杨树瘿蚜和黄连木瘿蚜等9种瘿蚜的 *Wolbachia* 感染情况、株系及系统发育关系。[方法]从田间采集新鲜虫瘿,将蚜虫转移到离心管内,100%乙醇-20℃保存。采用 *Wolbachia* 的16S rRNA、*usp*、*ftsZ*、*groE* 和 *gltA* 基因引物,以瘿蚜的总DNA为模板进行扩增、测序和分析,联合NCBI中 *Wolbachia* 16S rRNA 相关基因序列进行系统发育分析。[结果]在检测的9种瘿蚜中,有3种瘿蚜共3个种群感染有 *Wolbachia*,其中滇叶瘿蚜昆明种群的 *Wolbachia* 属于B超群,肚倍蚜昆明种群和角倍蚜峨眉种群的 *Wolbachia* 可能属于新发现的O超群。[结论]与自由生活的蚜虫相比,瘿蚜的 *Wolbachia* 感染率偏低,且株系间的差异较大。

**关键词:** 瘿蚜;次级共生菌;沃尔巴克氏体;系统发育分析;超群

中图分类号:S899.4

文献标识码:A

文章编号:1001-1498(2018)03-0001-08

## Molecular Detection and Phylogenetic Analysis of *Wolbachia* in Nine Gall Aphid Species

REN Wei-bin, YANG Zi-xiang, YANG Ying, WU Hai-xia, CHEN Hang

(Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Key laboratory of Cultivation and Utilization of Resources Insects, State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** [Objective] To determine the infection and phylogenetic relationships of *Wolbachia* in nine gall aphids hosted on *Rhus* spp., *Populus yunnanensis* and *Pistacia chinensis*. [Method] Fresh aphid galls were collected in the field and transferred the aphids to an Eppendorf tube, and placed in 100% ethanol then deposited in -20℃. The genomic DNA was amplified and sequenced using the primers of 16S rRNA, *usp*, *ftsZ*, *groE* and *gltA* genes. The phylogenetic relationships were analysis using *Wolbachia* 16S rRNA gene sequences and relevant gene sequences from NCBI. [Result] Three species among the nine gall aphids species were infected with *Wolbachia*. The strain from *Pemphigus yunnanensis* of Kunming population belongs to B supergroup, and strain from *Kaburagia rhusicola* of Kunming population and *Schlechtendalia chinensis* of Emei population belong to O supergroup. [Conclusion] Compared with the free-living aphids, *Wolbachia* infected in gall aphids have low infection rates and significant differences among strains.

**Keywords:** gall aphid; facultative symbiont; *Wolbachia*; phylogenetic analysis; supergroup

沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 属于变形菌门 (Proteobacteria),  $\alpha$  变形菌纲 (Alphaproteobacteria), 立克

次氏体目 (Rickettsiales), 立克次氏体科 (Rickettsiaceae), 是广泛存在于节肢动物和线虫体内的一种

收稿日期: 2017-09-20

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (CAFYBB2014ZD005, rirical2014001Z); 国家自然科学基金 (U1402263, 31370651, 31372266)

作者简介: 任维宾 (1991—), 硕士研究生, 主要从事昆虫分子生物学研究。

\* 通讯作者: E-mail: yzx1019@163.com.

胞内共生菌,在昆虫中的感染率约为 66%<sup>[1]</sup>。*Wolbachia* 只有 1 个种 *Wolbachia pipientis*,但存在着不同的株系,目前已发现 14 个超群 (supergroup),分别命名为 supergroup A-F 和 H-O<sup>[2-4]</sup>。*Wolbachia* 的多样性主要基于 *wsp*、16S rRNA *ftsZ*、*gltA* 和 *groEL* 等基因序列的特征,而株系的基因型是基于多位点序列分型 (MLST: multilocus sequence typing) 和 *wsp* 蛋白的 4 个高变区的氨基酸系列来确定<sup>[5-6]</sup>。*Wolbachia* 主要存在于宿主的生殖器官或生殖细胞中,其主要功能是调节宿主的生殖功能,包括雌性化、孤雌生殖、杀雄和胞质不亲和<sup>[7-11]</sup>,使宿主种群倾向于产生感染共生菌的雌性个体,有助于自身在宿主间的扩散与传播。除生殖方面以外,*Wolbachia* 还能以多种方式改变宿主的生物学特性,如:为昆虫宿主提供营养物质、保护宿主免受 RNA 病毒侵染、调控宿主种群的年龄结构和提高宿主干细胞的增殖能力等<sup>[7,12-16]</sup>。由于 *Wolbachia* 在节肢动物中的广泛分布及其对宿主的生殖调控功能,并参与了物种的快速形成与进化,因而可以用于宿主的生物学、生态与进化、发育生物学等的研究,如开发基于内共生菌的害虫和病菌控制方法<sup>[17-18]</sup>,因此 *Wolbachia* 成为目前昆虫学研究的热点。

蚜虫是重要的农林业害虫,但目前关于蚜虫 *Wolbachia* 的研究较少且起步较晚,现有的研究多集中在麦蚜 (*Sitobion miscanthi* (Takahashi))、雪松长足大蚜 (*Cinara cedri* Mimeur) 和豆蚜 (*Aphis craccivora* Koch) 等自由生活的蚜虫中<sup>[2]</sup>,对瘿蚜的 *Wolbachia* 研究很少。瘿蚜是蚜虫中的一个重要类群,目前报道的有 400 多种,约占已知蚜虫总数的 10%,它们能够刺激寄主植物形成虫瘿并在封闭的瘿内生活,具有高湿度的特殊小生境,有些种类还同时具有高单宁和高 CO<sub>2</sub> 浓度等<sup>[19]</sup>。瘿蚜通常对植物有害,但倍蚜虫可以形成一种特殊的虫瘿即五倍子,五倍子富含单宁,广泛应用于医药、化工、矿冶、电子和食品等行业,是重要的资源昆虫产品<sup>[19]</sup>。

本文以五倍子蚜、杨树瘿蚜和黄连木瘿蚜等 9 种瘿蚜为实验材料并提取总 DNA,选取 16S rRNA、*wsp* 和 *ftsZ* 等作为目的基因进行基因测序及系统发育分析,探讨瘿蚜 *Wolbachia* 与其它自由生活蚜虫携带的 *Wolbachia* 的株系差异及亲缘关系,为进一步研究瘿蚜 *Wolbachia* 的株系种类及功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 蚜虫来源

本实验所用的 9 种瘿蚜 14 个种群分别采自云南、四川、湖北和陕西的 7 个县市,包括肚倍蚜 5 个种群,角倍蚜 2 个种群,其它 7 种各 1 个种群,每个种群采集的虫瘿数为 3、6 或 9 个不等(表 1)。从寄主树上采集接近成熟但尚未爆裂的虫瘿,带回室内剖开,取出蚜虫,置于 100% 的乙醇中, -20℃ 保存备用。由于虫瘿内的干雌一般均来自单头干母的孤雌生殖,因此每个虫瘿内的干雌可视为 1 个克隆。

### 1.2 瘿蚜总 DNA 提取及浓度检测

采用 Dzap 基因组 DNA 快速抽提试剂盒(上海生工,中国),按照说明书提供的步骤提取蚜虫总 DNA。取 20 头蚜虫,用 75% 酒精漂洗 2~3 次,清除表面污染。用去离子水浸泡 1 h,去除蚜虫表面酒精。将蚜虫转移至 1.5 mL 离心管,用灭菌枪头破碎虫体,加入 1 mL 裂解液(Dzap)裂解 10 min, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液(约 900 μL)至 1.5 mL 离心管,加入 500 μL 无水乙醇,混匀,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,收集沉淀。加入 1 000 μL 75% 乙醇漂洗 DNA 1 min(注意要让沉淀浮起),12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min,弃上清液。加入 Elution Buffer 或去离子水稀释至 200 μL,充分溶解,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min,将上清液转移至 1.5 mL 离心管。取 2 μL DNA 提取液,用 1.5% 的琼脂糖凝胶和核酸定量仪对 DNA 进行检测,经检测合格的样本置于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 *Wolbachia* 的分子检测

1.3.1 次级共生菌 *Wolbachia* 特定基因的扩增 选择 16Sr RNA、*wsp*、*groEL*、*ftsZ* 和 *gltA* 作为目的基因进行扩增,引物序列及 PCR 反应条件见表 2,PCR 反应体系为 25 μL,其中模板 DNA 1 μL,上下游引物各 1 μL(10 nM),Taq Master Mix 12.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。将 PCR 扩增产物置于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,检测扩增产物的质量。

1.3.2 基因序列测定与分析 对基因扩增产物进行双向序列测定(上海生工),采用 DNASTar Lasergene v7.1-SeqMan 对测序的原始序列进行拼接,拼接序列在 NCBI 中 BLAST 检索,评估和验证测序结果的可信度。联合 NCBI 中的 *Wolbachia* 相关基因序列,采用 MEGA 6.0 和 MrBayes 3.1.2 进行序列比对

表1 蚜虫样品信息和 *Wolbachia* 检测结果Table 1 Aphid samples and their *Wolbachia* infections

蚜虫种类 Species	寄主植物 Host plant	采集地点 Collection location	经度 (E)	纬度 (N)	海拔 /m	采集时间 (年-月) Collection date	检测蚜虫数 Number of tested aphid	感染数 Number of <i>Wolbachia</i> infection
肚倍蚜 <i>Kaburagia rhusicola</i>	青麸杨 <i>Rhus potaninii</i> Maxim.	云南昆明	102°35'	25°02'	2 220	2016-06	6	4
		陕西城固	107°20'	33°06'	602	2016-06	6	0
		陕西宁强	106°15'	32°47'	1 012	2016-07	6	0
		云南盐津	104°22'	28°06'	860	2016-07	6	0
铁倍花蚜 <i>Floraphis meitanensis</i>	红麸杨 <i>Rhus punjabensis</i> var. <i>sinica</i>	四川峨眉	103°26'	29°38'	690	2016-09	3	0
		四川峨眉	103°26'	29°38'	690	2016-08	3	0
倍蛋蚜 <i>Schlechtendalia peitan</i>	盐肤木 <i>Rhus chinensis</i> Mill.	四川峨眉	103°26'	29°38'	690	2016-09	3	0
倍花蚜 <i>Floraphis meitanensis</i>	盐肤木 <i>Rhus chinensis</i> Mill.	四川峨眉	103°26'	29°38'	690	2016-09	3	0
角倍蚜 <i>Schlechtendalia chinensis</i>	盐肤木 <i>Rhus chinensis</i> Mill.	四川峨眉	103°26'	29°38'	690	2016-10	9	1
滇枝癭绵蚜 <i>Pemphigus yangcola</i>	滇杨 <i>Populus yunnanensis</i> Dode	云南昆明	102°45'	25°03'	1 920	2017-05	6	0
滇叶癭绵蚜 <i>Pemphigus yunnanensis</i>	滇杨 <i>Populus yunnanensis</i> Dode	云南昆明	102°45'	25°03'	1 920	2017-05	9	1
杨横癭绵蚜 <i>Pemphigus populitransversus</i>	滇杨 <i>Populus yunnanensis</i> Dode	云南昆明	102°45'	25°03'	1 930	2017-07	9	0
黄连木梳齿毛根蚜 <i>Chaetogeocica folidentata</i>	黄连木 <i>Pistacia chinensis</i> Bunge	云南楚雄	101°30'	25°03'	1 780	2016-09	3	0

表2 *Wolbachia* 检测引物及 PCR 反应条件Table 2 The detection primers of *Wolbachia* and PCR reaction conditions

次级共生菌 Secondary symbiont	基因名称 Gene name	引物名称和序列(5'-3') Primer name and sequence(5'-3')	PCR 反应条件 PCR reaction condition	参考文献 References
16S rRNA	16S281F: CTA TAG CTG ATC TGA GAG GAT	94°C 3 min; 94°C 45 s, 55°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
	16S1372R: YGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC	94°C 3 min; 94°C 45 s, 52°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[20]	
16S rRNA	WspecF: CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG	94°C 3 min; 94°C 45 s, 52°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[21]	
	WspecR: AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC	94°C 3 min; 94°C 45 s, 52°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
<i>Wsp</i>	WSP81F: TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC	94°C 3 min; 94°C 45 s, 55°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
	WSP691R: AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA	94°C 3 min; 94°C 45 s, 55°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
<i>groEL</i>	GroELF: GGT GAG CAG TTR CAR SAA GC	94°C 3 min; 94°C 45 s, 55°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
	GroELR: TAR CCR CGR TCA AAY TGC ATR CCA	94°C 3 min; 94°C 45 s, 53°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
<i>ftsZ</i>	FtsZF: GTT GGY AAA GGT GCA GCA GAA GA	94°C 3 min; 94°C 45 s, 56°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
	FtsZR: CGY ACY CAT TTK GCT GCA GMA TCA A	94°C 3 min; 94°C 45 s, 56°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
<i>gltA</i>	WgltAF1: TAC GAT CCA GGG TTT GTT TCT AC	94°C 3 min; 94°C 45 s, 56°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	
	WgltAR1: CTC ATT AGC TCC ACC GTG TG	94°C 3 min; 94°C 45 s, 56°C 60 s, 72°C 90 s, 35 circles; 72°C 10 min	[3]	

和系统发育分析, ML 树选取 Kmura-Z-Parameter 模型, bootstrap 置信度用 1 000 次自导复制进行评价; BI 分析采用 TPM3 + G 模型, Lest 设置替代模型 nst = 6, 位点速率变异模型为 rates = gamma, MCMC 参数如下: 起始树为随机树, 代数 = 3 000 000, 链数 = 4, 取样频率 = 100, temperature = 0.5, 去除老化树 burnin = 7 500 (25%), 最终构建 50% 的最大合意树

(consensus), 通过后验概率来检验各分支置信度。采用 MEGA 6.0 计算遗传距离。

## 2 结果与分析

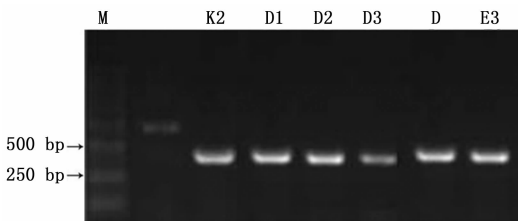
### 2.1 瘿蚜 DNA 样品提取结果

根据瘿蚜样品的数量, 本实验共提取瘿蚜 DNA 样品 87 份, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪

检测后,舍弃不合格的 DNA 样本 3 份,实际检测 DNA 样品 84 份(表 1)。

## 2.2 瘿蚜的 *Wolbachia* 感染情况

采用 *Wolbachia* 特定基因(16S rRNA、*wsp*、*gro-EL*、*ftsZ* 和 *gltA*)引物分别对 9 种瘿蚜的感染情况进行检测,结果仅有 16S rRNA 的 2 对引物 16S 281F/16S 1372R、*wspecF*/*wspecR* 分别在 3 种瘿蚜中扩增出清晰的 DNA 条带(图 1、2),分子量约为 1 050 bp 和 440 bp,而其余 4 个基因引物扩增无条带。表明在检测的 14 个地理种群共 9 种瘿蚜中,有 3 种瘿蚜共 3 个种群感染有 *Wolbachia*,分别为肚倍蚜(*Kaburagia rhusicola* Takagi)昆明种群、角倍蚜(*Schlechtendalia chinensis* (Bell))峨眉种群和滇叶瘿绵蚜(*Pemphigus yunnanensis* (Zhang))昆明种群,其它种类没有检测到有 *Wolbachia* 感染,综合感染率约为 21.4% (表 1)。可见次级共生菌 *Wolbachia* 在这 9 种瘿蚜中并不普遍,其中在肚倍蚜(*K. rhusicola*)昆明种群的感染率为 66.7% (共检测 6 个克隆,其中 4 个携带有 *Wolbachia*)、角倍蚜(*S. chinensis*)峨眉种群和滇叶瘿绵蚜(*P. yunnanensis*)昆明种群的感染率分别为 11.1% (分别检测 9 个克隆,各有 1 个携带有 *Wolbachia*)。



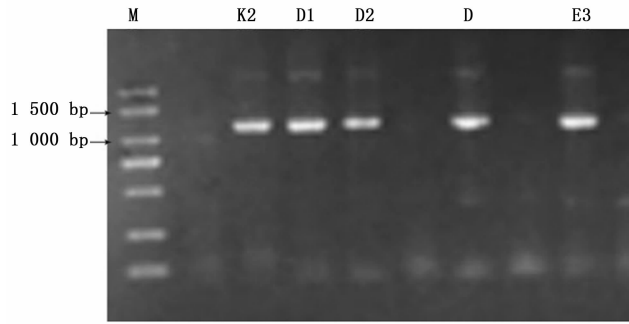
M: DNA Marker; K2: 滇叶瘿绵蚜; D1、D2、D3 和 D: 肚倍蚜; E3: 角倍蚜

图 1 采用 *wspecF*/*wspecR* 引物对瘿蚜 *Wolbachia* 16S rRNA 基因的扩增结果

Fig. 1 Amplified results of *Wolbachia* 16S rRNA gene using *wspecF*/*wspecR* primer

## 2.3 16S rRNA 的序列特征分析

采用 16S 281F/1372R 引物分别对携带有 *Wolbachia* 的肚倍蚜昆明种群、角倍蚜峨眉种群和滇叶瘿绵蚜昆明种群的感染个体进行扩增,分别选择 3 个扩增产物样品进行双向测序。测序结果的峰形图分布均匀,没有重叠峰,表明感染的个体均为 *Wolbachia* 单独感染。对序列拼接后,获得 16S rRNA 基因片段,其中肚倍蚜昆明种群 1 077 bp、角倍蚜峨眉种群 1 061 bp 和滇叶瘿绵蚜昆明种群 1 054 bp,经过统一比对和裁剪,获得的一致序列长度为 1 053 bp。



M: DNA Marker; K2: 滇叶瘿绵蚜; D1、D2、D3 和 D: 肚倍蚜; E3: 角倍蚜

图 2 采用 16S 281F/1372R 引物对瘿蚜 *Wolbachia* 16S rRNA 基因的扩增结果

Fig. 2 Amplified results of *Wolbachia* 16S rRNA gene using 16S 281F/1372R primer

用同样的方法采用 *wspecF*/*wspecR* 引物的对上述 3 个蚜虫种群进行扩增,测序后获得的 16S rRNA 基因序列为:肚倍蚜昆明种群 440 bp、角倍蚜峨眉种群 440 bp 和滇叶瘿绵蚜昆明种群 442 bp。对上述 2 对引物扩增获得的序列进行比对分析,发现 16S 281F/1372R 的扩增序列包含了 *wspecF*/*wspecR* 引物的扩增序列,因此仅选择 16S 281F/1372R 的扩增序列进行系统发育分析。

序列比较分析表明,肚倍蚜(*K. rhusicola*)昆明种群和角倍蚜(*S. chinensis*)峨眉种群的 16S rRNA 序列的相似性很高,而与滇叶瘿绵蚜(*P. yunnanensis*)昆明种群序列有较大差异。将测定的序列在 NCBI 中的 Blastn 的比对结果,3 种瘿蚜中的 *Wolbachia* 株系与多种蚜虫、蚧壳虫和螨虫中检测到的 *Wolbachia* 株系具有高度一致性(表 3)。

## 2.4 基于 16S rRNA 基因系统发育分析

从 NCBI 中选取 48 条 *Wolbachia* 株系的 16S rRNA 基因序列(分别为 14 个超群的代表序列),与本文中获得的 5 条 *Wolbachia* 株系 16S rRNA 基因序列构建系统发育树(图 3),以烟盲蝽(*Nesidiocoris tenuis* (Reuter))和烟粉虱(*Bemisia tabaci* (Gennadius))的次级共生菌 *Rickettsia* 株系为外类群<sup>[22-23]</sup>。结果显示滇叶瘿绵蚜(*P. yunnanensis*)昆明种群感染的 *Wolbachia* 株系与 B 超群的 *Wolbachia* 株系聚成一支,ML 支持率和贝叶斯后验概率较高,分别为 53% 和 91%,且 2 者的遗传距离为 0.003 ~ 0.019 (表 4),均小于 0.02,表明其感染的 *Wolbachia* 株系属于 B 超群。而肚倍蚜(*K. rhusicola*)昆明种群和角倍蚜(*S. chinensis*)峨眉种群感染的 *Wolbachia* 株

系与 O 超群的 *Wolbachia* 株系 (wBt\_10) (寄主为烟粉虱中国种群, Asia III) 聚成一支<sup>[4]</sup>, ML 支持率和贝叶斯后验概率很高, 分别为 99% 和 90%, 表明这两个种群感染的 *Wolbachia* 株系与 wBt\_10 可能同属于新发现的 O 超群, 遗传距离分析也支持上述结果。有研究认为, 确定一个新超群, 16S rRNA 基因的遗

传距离需要大于 2%<sup>[24-25]</sup>。上述肚倍蚜和角倍蚜感染的 4 个 *Wolbachia* 株系与其他 13 个超群代表株系的最小遗传距离为 0.034 (M 超群), 最大遗传距离为 0.102 (I 超群), 而与 O 超群 wBt\_10 株系的遗传距离仅为 0.003 (表 4), 进一步支持这 4 个 *Wolbachia* 株系 wBt\_10 同属于 O 超群。

表 3 瘿蚜 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列的 Blastn 部分比对结果  
Table 3 Blastn results of 16S rRNA gene of *Wolbachia* from gall aphids

宿主昆虫 Host insect	最大序列一致性 Maximum sequence identity/%	比对覆盖度 Query cover/%	E 值 E value	GenBank 登录号 GenBank accession no.
烟粉虱 <i>Bemisia tabaci</i>	99	99	0.0	KF454771.1
雪松长足大蚜 <i>Cinara cedri</i>	98	99	0.0	JN384079.1
蔷薇斑大蚜 <i>Maculolachnus submacula</i>	98	99	0.0	JN384077.1
香蕉蚜 <i>Pentalonia nigronervosa</i>	98	99	0.0	KJ786950.1
褐色桔蚜 <i>Toxoptera citricidus</i>	98	98	0.0	JN384073.1
柳树大蚜 <i>Tuberolachnus salignus</i>	97	99	0.0	JN384085.1
南美谷蚜 <i>Sipha maydis</i>	98	98	0.0	JN384068.1
夹竹桃蚜 <i>Aphis nerii</i>	98	97	0.0	JN384083.1
羽毛螨 <i>Torotroglia cardueli</i>	97	99	0.0	KP114101.1
桧柏蚜 <i>Cinara fresai</i>	98	97	0.0	JN384074.1

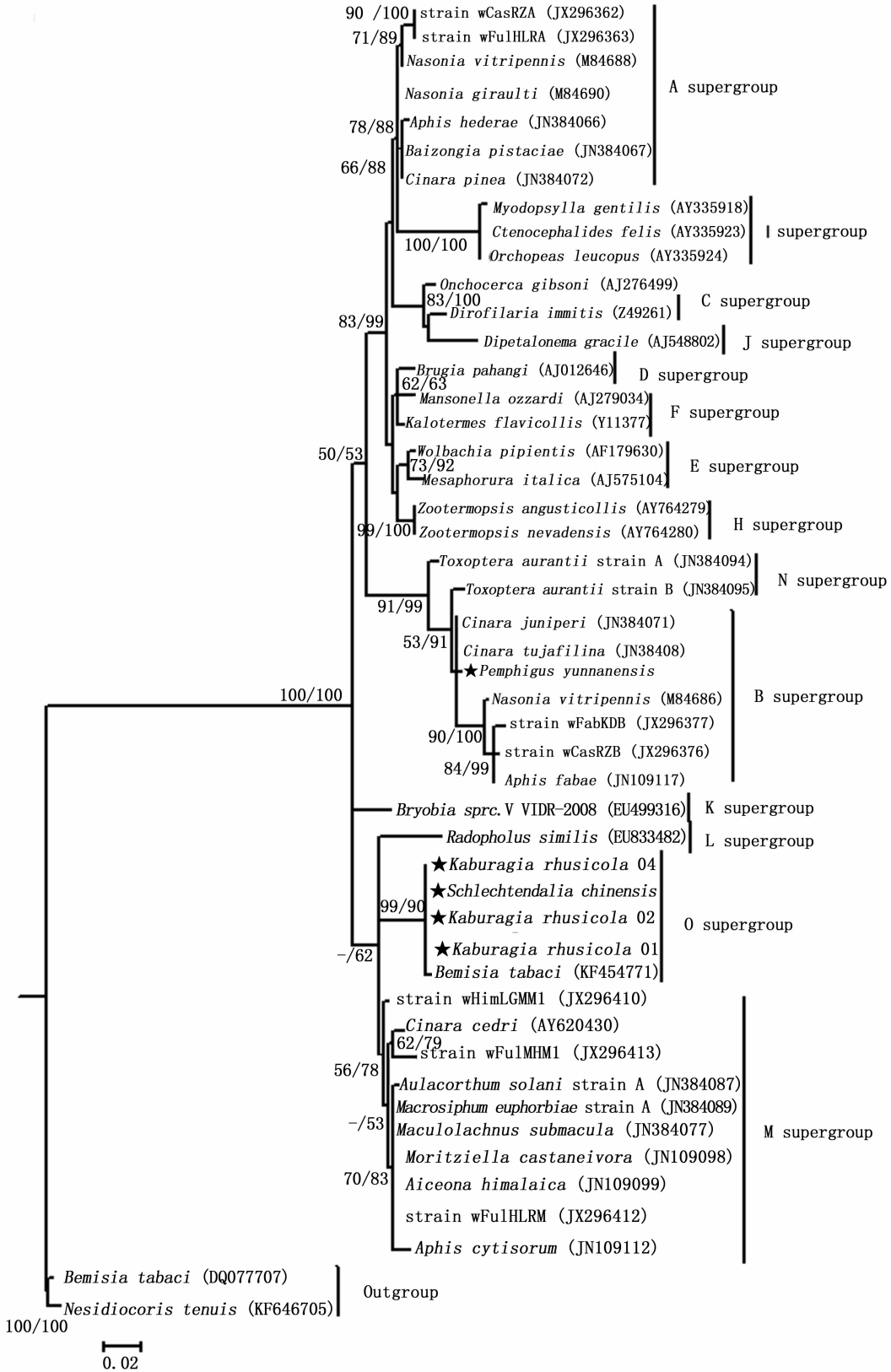
表 4 瘿蚜 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列与各超群代表序列的遗传距离比较结果

Table 4 Comparison of genetic distances between the sequences of *Wolbachia* 16S rRNA gene from gall aphids and the representative sequences of other supergroups

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
A_M84690	1																				
A_JN384072	0.003																				
B_M84686	0.048	0.051																			
B_JN384071	0.048	0.051	0.017																		
B_JN38408	0.048	0.051	0.017	0.000																	
C_AJ276499	0.025	0.028	0.069	0.069	0.069																
D_AJ012646	0.019	0.022	0.057	0.057	0.057	0.034															
E_AF179630	0.014	0.017	0.057	0.051	0.051	0.028	0.022														
F_Y11377	0.014	0.017	0.051	0.051	0.051	0.028	0.011	0.017													
H_AY764279	0.019	0.022	0.057	0.057	0.057	0.039	0.022	0.017	0.017												
I_AY335918	0.046	0.049	0.096	0.096	0.096	0.070	0.064	0.058	0.058	0.064											
I_AY335923	0.043	0.046	0.096	0.096	0.096	0.070	0.064	0.058	0.058	0.064	0.003										
J_AJ548802	0.042	0.039	0.075	0.075	0.075	0.034	0.045	0.045	0.039	0.051	0.089	0.088									
K_EU499316	0.042	0.045	0.067	0.067	0.067	0.057	0.045	0.045	0.040	0.045	0.089	0.089	0.063								
L_EU833482	0.060	0.063	0.094	0.095	0.095	0.075	0.069	0.075	0.069	0.069	0.109	0.105	0.084	0.063							
M_AY620430	0.046	0.048	0.055	0.055	0.055	0.066	0.054	0.054	0.048	0.054	0.090	0.089	0.063	0.042	0.042						
M_JN384077	0.040	0.037	0.061	0.061	0.061	0.060	0.048	0.048	0.043	0.048	0.086	0.086	0.057	0.037	0.042	0.011					
N_JN384094	0.054	0.057	0.037	0.020	0.020	0.075	0.063	0.051	0.057	0.057	0.102	0.102	0.075	0.060	0.085	0.046	0.052				
O_KF454771	0.057	0.060	0.073	0.067	0.067	0.078	0.054	0.066	0.060	0.066	0.106	0.105	0.075	0.060	0.063	0.042	0.037	0.057			
<i>K. rhusicola</i>	0.054	0.057	0.070	0.064	0.064	0.075	0.051	0.063	0.057	0.063	0.102	0.102	0.072	0.057	0.060	0.039	0.034	0.054	0.003		
<i>S. chinensis</i>	0.054	0.057	0.070	0.064	0.064	0.075	0.051	0.063	0.057	0.063	0.102	0.102	0.072	0.057	0.060	0.039	0.034	0.054	0.003	0.000	
<i>P. immunis</i>	0.048	0.051	0.019	0.003	0.003	0.069	0.057	0.051	0.051	0.057	0.096	0.096	0.075	0.067	0.095	0.055	0.061	0.020	0.067	0.064	0.064

注:各超群的代表序列用超群名称和 Genbank 登录号表示,新获得序列用寄主蚜虫的种名和属名表示。

Note: The representative sequence of supergroups is expressed by the supergroup name and the Genbank accession number, the newly acquired sequence is expressed by the name of the host aphid.



*Wolbachia* 的序列用寄主名或株系名和 Genbank 登录号表示。节点为 ML 支持率/贝叶斯后验概率,“-”表示支持率小于 50%,本文新测定的序列用“★”表示。

Note: The sequences of *Wolbachia* used host name or strain name and the Genbank accession number. The nodes of this tree are ML support rate/ Bayesian posterior probability,“-”shows support rate less than 50%, the new sequences of this article represented by“★”.

图 3 采用最大似然法 (ML) 和贝叶斯推论 (BI) 对 *Wolbachia* 株系间 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis inferred from *Wolbachia* 16S rRNA gene sequences using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI)

### 3 讨论

*Wolbachia* 是昆虫中广泛存在的次级共生菌,但在蚜虫中的感染率很低<sup>[26-31]</sup>,其主要原因是感染的浓度较低或不同株系间的基因变异较大,加大了 *Wolbachia* 的检测难度<sup>[2]</sup>,因此关于蚜虫 *Wolbachia* 的研究起步较晚,已有的研究主要集中在自由生活的蚜虫中,对瘿蚜的研究很少,在已经研究过的 300 多种蚜虫中,仅有 2 种瘿蚜<sup>[3]</sup>。本研究对 14 个地理种群的 9 种瘿蚜的 *Wolbachia* 进行检测分析,发现有 3 种瘿蚜各有 1 个种群感染有 *Wolbachia*,综合感染率为 21.4%,与自由生活的蚜虫相比,其感染率偏低<sup>[3]</sup>,其中肚倍蚜(*K. rhusicola*)昆明种群中 *Wolbachia* 感染率为 66.7%,而角倍蚜(*S. chinensis*)峨眉种群和滇叶瘿绵蚜(*P. yunnanensis*)的感染率分别为 11.1%。不同种类或种群间的感染率差异很大,但基本符合已有报道的 *Wolbachia* 在蚜虫中“most or few”的感染模式<sup>[1]</sup>。

*Wolbachia* 的株系间存在丰富的多样性,目前已发现了 14 个超群(supergroup),其中蚜虫中的 *Wolbachia* 属于 4 个超群(A、B、M 和 N),且 M 和 N 超群仅存在于蚜虫中<sup>[3-4]</sup>。Wang Z 等<sup>[3]</sup>检测了 73 种分布于中国的蚜虫的 *Wolbachia* 感染情况,发现 M 超群占主导地位。本研究所发现的滇叶瘿绵蚜 *Wolbachia* 株系属于 B 超群,而肚倍蚜昆明种群和角倍蚜峨眉种群的 *Wolbachia* 株系可能属于新发现的 O 超群。表明瘿蚜携带的 *Wolbachia* 株系与自由生活的蚜虫有较大差别,不仅株系不同,且株系间的差异较大。肚倍蚜和角倍蚜对原生寄主植物具有高度专一性,且大部分生活阶段位于完全封闭的虫瘿内,因此通过取食共同的寄主植物与其他蚜虫或昆虫接触而发生共生菌水平转移的机会极低,这可能是其携带的 *Wolbachia* 株系特殊的原因,其 *Wolbachia* 株系的具体归属和形成原因值得进一步研究。

目前 *Wolbachia* 的检测引物较多,但通用性不好<sup>[2, 6, 32]</sup>,其中 16S rRNA 基因最为保守,扩增效果稳定,但缺点是特异性不好,有时会出现非目标条带<sup>[4]</sup>; *wsp* 基因进化速度快,适用于 *Wolbachia* 株系的分群,其缺点是扩增效果不稳定。蚜虫中的 *Wolbachia* 感染浓度低,且种系变异大,给检测分析带来很大困难,对于寄主专化性高、生活在封闭小环境的瘿蚜更是如此,因为与其他自由生活的蚜虫相比,瘿蚜携带的 *Wolbachia* 株系具有更大的变异。这可能

是本研究中的 4 种蛋白编码基因(*wsp*、*groEL*、*ftsZ* 和 *gltA* 基因)引物在瘿蚜中扩增没有条带的主要原因。因此,开发更加高效且特异性好的 *Wolbachia* 基因引物,将是今后蚜虫,尤其是瘿蚜 *Wolbachia* 研究的重点之一。

### 4 结论

对 9 种瘿蚜 14 个种群的检测结果,有 3 种瘿蚜共 3 个种群感染有次级共生菌 *Wolbachia*,感染率为 21.4%,均为单株系感染。其中滇叶瘿绵蚜昆明种群感染的 *Wolbachia* 属于 B 超群,肚倍蚜昆明种群和角倍蚜峨眉种群感染的 *Wolbachia* 属于新发现的 O 超群。与其他自由生活的蚜虫相比,瘿蚜的 *Wolbachia* 感染率偏低,而且株系不同,且株系间的差异较大。

### 参考文献:

- [1] Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, et al. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 281(2): 215-220.
- [2] Augustinos A A, Santosgarcia D, Dionyssopoulou E, et al. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids is the hidden diversity fully unraveled[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e28695.
- [3] Wang Z, Su X M, Wen J, et al. Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in Chinese aphids[J]. Insect Science, 2014, 21(3): 313-325.
- [4] Bing X L, Xia W Q, Gui J D, et al. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies[J]. Ecology and Evolution, 2014, 13(4): 2714-2737.
- [5] Baldo L, Dunning Hotopp J C, Jolley K A, et al. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipiensis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(11): 7098-7110.
- [6] Paraskevopoulos C, Bordenstein S R, Wernegreen J J, et al. Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in drosophila species[J]. Current Microbiology, 2006, 53(5): 388-395.
- [7] Werren J H, Baldo L, Clark M E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(10): 741-751.
- [8] Stouthamer R, Breeuwer J A, Luck R F, et al. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis[J]. Nature, 1993, 361(6407): 66-68.
- [9] Yen J H, Barr A R. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L.[J]. Nature, 1971, 232(5313): 657-658.
- [10] Gdd H, Men M, Walker L E. The importance of cytoplasmic male

- killing elements in natural populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1993, 49(2): 195–202.
- [11] Rigaud T, Souty-Grosset C, Raimond R, *et al.* Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): Recent acquisitions [J]. *Endocytobiosis and Cell Research*, 1991, 7(3): 259–273.
- [12] Moreira L A, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery J A, *et al.* *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium [J]. *Cell*, 2009, 7(139): 1268–1278.
- [13] McMeniman C J, Lane R V, Cass B N, *et al.* Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti* [J]. *Science*, 2009, 323(5910): 141–144.
- [14] Hedges L M, Brownlie J C, O'Neil S L, *et al.* *Wolbachia* and virus protection in insects [J]. *Science*, 2008, 322(5902): 702.
- [15] Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, *et al.* *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 2(107): 769–774.
- [16] Fast E M, Toomey M E, Panaram K, *et al.* *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche [J]. *Science*, 2011, 334(6058): 990–992.
- [17] Bourtzis K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, 627(1): 104–113.
- [18] Saridaki A, Bourtzis K. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(1): 67–72.
- [19] 杨子祥. 五倍子高产培育技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [20] Werren J H, Windsor D M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium [J]. *Proceeding of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 2000, 267(1450): 1277–1285.
- [21] Zhou W, Rousset F, O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences [J]. *Proceeding of the Royal Society London B: Biological Sciences*, 1998, 265(1395): 509–515.
- [22] Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, *et al.* Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2006, 72(5): 3646–3652.
- [23] Caspi F A, Inbar M, Steinberg S, *et al.* Characterization of the symbiont *Rickettsia* in the mirid bug *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Heteroptera: Miridae) [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2014, 104(6): 681–688.
- [24] Stouthamer R, Breeuwer J A, Luck R F, *et al.* Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis [J]. *Nature*, 1993, 361(6407): 66–68.
- [25] Breeuwer J A, Stouthamer R, Barns S M, *et al.* Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 1(1): 25–36.
- [26] Sintupachee S, Milne J R, Poonchaisri S, *et al.* Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant [J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51(3): 294–301.
- [27] Wang Z, Shen Z R, Song Y D, *et al.* Distribution and diversity of *Wolbachia* in different populations of the wheat aphid *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) in China [J]. *European Journal of Entomology*, 2009, 106(1): 49–55.
- [28] Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species [J]. *Insect Molecular Biology*, 2000, 9(4): 393–405.
- [29] 江幸福, 王 蕾, 张 蕾, 等. 蔬菜蚜虫感染沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的分子检测 [J]. *植物保护*, 2009, 35(4): 63–65.
- [30] Duron O, Bouchon D, Boutin S, *et al.* The diversity of reproductive parasites among arthropods; *Wolbachia* do not walk alone [J]. *BMC Biology*, 2008, 6(1): 1–12.
- [31] West S A, Cook J M, Werren J H, *et al.* *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities [J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(11): 1457–1465.
- [32] Casiraghi M, Bordenstein S R, Baldo L, *et al.* Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *fisZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree [J]. *Microbiology*, 2005, 151(12): 4015–4022.

(责任编辑:张 玲)