

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2015.04.009

Wolbachia 对苹果蠹蛾生殖调控的作用

冯宏祖¹, 曹 玉¹, 杨明禄¹, 刘慧敏¹, 许建军^{2*}

¹塔里木大学/新疆建设兵团南疆特色果树生产工程实验室/农业部阿拉尔作物有害生物科学观测实验站
/塔里木大学南疆农业有害生物综合治理重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300;
²新疆农业科学院植物保护研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091

摘要:【背景】苹果蠹蛾是重要的果树害虫和检疫对象。研究显示,苹果蠹蛾体内所含的 *Wolbachia* 属于具有诱导胞质不亲和(CI)现象的 A 组中 Dor 亚组。本研究目的在于摸清苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia* 对宿主的生殖调控是否具有诱导胞质不亲和的功能。【方法】通过饲喂抗生素消除苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia*,比较感染与消除 *Wolbachia* 的苹果蠹蛾生态适合度以及 *Wolbachia* 感染对苹果蠹蛾生殖的影响。【结果】消除 *Wolbachia* 后,苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代各虫态的发育历期、产卵量、孵化率和蛹的存活率与对照无显著差异;*Wolbachia* 对苹果蠹蛾成虫的寿命、产卵前期、平均产卵量和性别比例均无影响。不同处理苹果蠹蛾之间的杂交试验结果表明,4 种杂交的苹果蠹蛾都能产卵,且卵可以正常孵化。【结论与意义】在自然状态下苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia* 不能诱导其宿主的胞质不亲和现象。
关键词: *Wolbachia*; 苹果蠹蛾; 生殖调控; 胞质不亲和

The effects of *Wolbachia* on the reproduction of *Cydia pomonella* (L.)

Hong-zu FENG¹, Yu CAO¹, Ming-lu YANG¹, Hui-min LIU¹, Jian-jun XU^{2*}

¹Tarim University/Engineering Laboratory of Featured Fruit Tree in Southern Xinjiang, XPCC/Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests in Alar, Ministry of Agriculture, P. R. China/Southern Xinjiang Key Laboratory of IPM of Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China; ²Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China

Abstract:【Background】Codling moth (*Cydia pomonella*) is the most serious fruit tree and quarantine pest in Chinese orchards. The species is host to *Wolbachia*, Dor subgroup of the A group, which induce cytoplasmic incompatibility. The aim of this study is to find out if the *Wolbachia* induce cytoplasmic incompatibility to reproductive regulation in *C. pomonella*.【Method】The relative fitness of *C. pomonella* with active *Wolbachia* was compared to individuals in which *Wolbachia* was eliminate by antibiotics.【Result】We found no significant differences in development duration, fecundity, hatchability and pupal survival of the F₁, and F₂ generations between the two groups. *Wolbachia* infection had no effect on adult life span, the pre-oviposition period, fecundity and female ratio in *C. pomonella*. Hybridization tests showed that hybrids could lay eggs, and these eggs were normal.【Conclusion and significance】*Wolbachia* in *C. pomonella* did not induce host cytoplasmic incompatibility.

Key words: *Wolbachia*; *Cydia pomonella* (L.); reproduction manipulation; cytoplasmic incompatibility

沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 是一类呈母性遗传的细胞内寄生细菌,属于变形菌纲 Proteobacteria 的 α 亚群。近年的研究表明,66% 以上的节肢动物(包括昆虫、螨类)种类都存在 *Wolbachia* 的感染(Hilgenboecker *et al.*, 2008),并因其能操纵寄主的生殖而备受关注。*Wolbachia* 对寄主生殖的调控主要包括胞质不亲和(Cytoplasmic incompatibility, CI)、孤雌生殖、雌性化和杀雄等,其中最常见的调控方式为诱导胞质不亲和(Serbus *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008)。*Wolbachia* 导致寄主杂交细胞质不亲和现象在昆虫进化和分类学研究中具有重要意义,也为通过遗传操纵的方法防治昆虫提供了新思路(董鹏和王进军, 2006)。近年来,我国在 *Wolbachia* 的分布和检测方面做了大量的工作,已在很多昆虫

收稿日期(Received): 2015-05-12 接受日期(Accepted): 2015-09-28
基金项目: 国家自然科学基金(31060242); 新疆维吾尔自治区财政林业科技专项(新林计发[2014]40 号文)
作者简介: 冯宏祖,男,教授。研究方向: 害虫综合治理。E-mail: fhzzky@163.com
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: xjj@163.com

(螨)体内发现了 *Wolbachia* 的感染,并对其系统发育进行了分析(甘波谊等,2002;苗慧等,2006;宋社吾等,2002;王欢等,2006)。这些研究对全面掌握 *Wolbachia* 在我国昆虫中的感染情况以及分析其对节肢动物生殖的影响奠定了基础。

苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* (L.)原产于欧洲,是我国重要的进境植物检疫性害虫。目前,在我国新疆全境,甘肃、内蒙古、宁夏、黑龙江和吉林等部分地区发生,对我国东部苹果产业安全生产构成严重威胁(张润志等,2012)。作者前期的研究显示:苹果蠹蛾体内所含的 *Wolbachia* 与膜翅目细蜂科的锤角细蜂 *Trichopria drosophilae* (Perkins)所感染的 *Wolbachia* 具有较近的亲缘关系(冯宏祖等,2014),而锤角细蜂所含的 *Wolbachia* 属于具有诱导 CI 现象的 A 组中 Dor 亚组。本研究目的在于摸清苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia* 对宿主的生殖调控是否具有诱导胞质不亲和的功能,以明确此共生细菌对苹果蠹蛾的生殖调控产生的作用及影响。

1 材料与方法

1.1 无 *Wolbachia* 苹果蠹蛾品系的培育

苹果蠹蛾成虫饲喂 $1.2\sim3.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 头孢氨苄蜂蜜水溶液,幼虫饲喂含同样浓度抗生素的人工饲料,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养(RH: $75\%\pm5\%$),16 h 光/8 h 暗,连续喂食 3 代,各代取 20 头经 PCR 检测(冯宏祖等,2014)体内有无 *Wolbachia* 的存在。

1.2 不同苹果蠹蛾品系杂交后的繁殖力、卵孵化率和性别比例

将消除共生微生物 *Wolbachia* 的苹果蠹蛾进行 4 组杂交试验(1.1 结果表明,抗生素饲喂 2 代后已检测不出该共生菌,杂交试验虫源为饲喂抗生素的第 3 代苹果蠹蛾): $\text{♀}^{\text{w}^-}\times\text{♂}^{\text{w}^-}$ 、 $\text{♀}^{\text{w}^-}\times\text{♂}^{\text{w}^+}$ 、 $\text{♀}^{\text{w}^+}\times\text{♂}^{\text{w}^-}$ 和 $\text{♀}^{\text{w}^+}\times\text{♂}^{\text{w}^+}$,每个杂交组都配 30 对刚羽化为成虫的苹果蠹蛾,放入直径为 10 cm 的无色塑料杯中进行单对饲养。饲养条件:温度为 $(25\pm0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $75\%\sim80\%$ RH。观察记录不同杂交组的产卵量、卵孵化率和性别比例。

1.3 消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F_1 、 F_2 代的生态适合度

在养虫笼内放入蜡纸并接入若干苹果蠹蛾成

虫,饲喂含抗生素的蜂蜜水溶液,在 $(25\pm0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $75\%\sim80\%$ RH 的条件下让其产卵。24 h 后移去养虫笼中的成虫,将粘附有卵的蜡纸剪成若干小片,每一小片上只保存 1 粒卵,置于直径为 10 cm 的无色塑料杯中进行单头饲养;卵孵化后,在杯中加入少量的人工饲料(含抗生素)继续培养,羽化为成虫后雌雄配对,雌虫产卵后,挑取一定数量的卵,继续在相同条件下培养观察。试验一直进行到第 1、2 代成虫全部死亡为止。以共生有 *Wolbachia* 的苹果蠹蛾为对照,在不含抗生素人工饲料上饲养。每个处理挑取卵 135 头,重复 3 次。观察记录各虫态的发育历期、产卵量、孵化率、幼虫和蛹存活率及雌雄寿命和性别比例。

1.4 数据处理

试验所得数据按项目进行加权平均,用 SPSS 软件进行方差分析、显著性测验及模型拟合等,并组建实验种群生命表。

2 结果与分析

2.1 苹果蠹蛾体内 *Wolbachia* 的消除

在蜂蜜水和人工饲料中添加抗生素能去除苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia*。苹果蠹蛾经抗生素处理后, F_1 代 20 头中只有 2 头检测到 *Wolbachia* 的存在,但 PCR 电泳检测条带的亮度不及对照(即田间自然种群), F_2 和 F_3 代没有扩增出相应的条带,表明 *Wolbachia* 已消除。

2.2 *Wolbachia* 对苹果蠹蛾生殖的影响

杂交试验结果(表 1)表明,4 种杂交的苹果蠹蛾都能产卵,且卵可以正常孵化。根据细胞质不亲和的理论,杂交 $\text{♀}^{\text{w}^-}\times\text{♂}^{\text{w}^+}$ 不能产卵或所产卵不能正常孵化,说明苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia* 不能诱导其宿主的细胞质不亲和现象。在所有的杂交组合中,当苹果蠹蛾雌雄个体同时共生有 *Wolbachia* 时产卵量最多(31.6 粒),卵的孵化率最高(84.71%),产卵期最长(4.2 d),产卵前期最短(2.9 d),但与其他组合均无显著差异($P>0.05$),说明当苹果蠹蛾雌雄个体同时被 *Wolbachia* 共生时才能达到产卵的最优化,可能有利于 *Wolbachia* 在该宿主种群的稳定存在和传播。而杂交组 $\text{♀}^{\text{w}^-}\times\text{♂}^{\text{w}^-}$ 的产卵量、孵化率最低。

表 1 *Wolbachia* 的感染对苹果蠹蛾生殖的影响
Table 1 Effect of *Wolbachia* on the reproduction of *C. pomonella*

杂交组合 Cross combination	产卵前期 Preoviposition period (d)	产卵期 Spawning period (d)	每雌平均产卵量(粒) Average number of eggs produced by per female	孵化率 Hatching rate (%)
♀ w ⁺ × ♂ w ⁺	2.9±0.7	4.2±1.2	31.6±9.3	84.71±3.35
♀ w ⁻ × ♂ w ⁻	3.2±0.9	3.9±1.3	29.2±10.2	82.92±7.61
♀ w ⁻ × ♂ w ⁺	3.1±0.7	4.0±1.3	29.9±10.6	83.74±6.19
♀ w ⁺ × ♂ w ⁻	3.0±0.6	4.2±1.0	30.9±9.2	84.09±9.04

所有组合的处理数均为 30 对。
N=30 for all combinations.

2.3 消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代的生态
适合度

结果表明,消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代各虫态的发育历期、产卵量、孵化率和蛹的存活率与对照均无显著差异,而幼虫存活率与对照差异

显著(表 2)。这主要是由于对照的人工饲料中没有加抗生素,极易霉变,导致幼虫死亡率升高。*Wolbachia* 对苹果蠹蛾的成虫寿命、产卵前期和性别比例均无影响(表 3)。

表 2 消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾各虫态的发育历期和存活率
Table 2 The development duration and survival of *C. pomonella* after eliminating *Wolbachia*

处理 Treatment	卵期 Egg stage (d)	幼虫期 Larval stage (d)	蛹期 Pupal stage (d)	全世代 Total development (d)	每雌产卵量(粒) Fecundity (no.eggs/female)	孵化率 Hatching rate (%)	存活率 Survival (%)	
							幼虫 Larva	蛹 Pupa
CK	4.87±0.76a	22.04±1.33a	10.85±1.27a	37.74±3.33a	28.80±9.26a	55.53±19.33a	36.67±6.22b	86.36±7.32a
F ₁	5.12±0.73a	23.03±1.98a	11.06±1.47a	39.21±4.21a	27.07±13.23a	58.86±10.79a	54.67±6.45a	87.10±6.02a
F ₂	5.07±0.79a	22.41±1.50a	10.55±0.99a	38.66±3.56a	27.80±9.98a	61.05±16.39a	56.67±6.40a	85.29±6.07a

同列数据后附不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Data in a column followed by different letters are significantly different ($P<0.05$).

表 3 消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾的
雌性比、寿命和产卵前期

Table 3 The female ratio, life span, preoviposition period
of *C. pomonella* after eliminating *Wolbachia*

处理 Treatment	产卵前期 Preoviposition period (d)	寿命 Life span (d)		雌性比 Female ratio
		雄虫 Male	雌虫 Female	
CK	2.47±0.52	15.93±2.87	16.53±2.13	0.54±0.05
F ₁	2.67±1.84	16.27±4.67	17.33±3.36	0.52±0.05
F ₂	2.33±0.49	16.13±2.23	17.87±2.67	0.53±0.05

2.4 消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代的种群
生命表

根据苹果蠹蛾种群的存活率和成虫繁殖力,分别组建消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代的实验种群特定年龄生命表(表 4),表中的起始卵数为假定数,各发育阶段的存活率、雌成虫比例、单雌产卵量均为实际观察值。下代产卵量由起始数量、世代存活率、雌性比和平均产卵量的乘积求得,种群趋势指数是预计下代卵量与当代实际卵量的比值。结果表明,CK、F₁、F₂ 代的种群趋势指数分别为

2.73、3.73、2.89,均大于 1,表明下代种群数量都呈增长趋势。由于人工饲料饲养苹果蠹蛾中,产卵量低、幼虫死亡率高(尤其是不加抗生素的对照)的问题未得到解决,3 个处理的种群趋势指数均比较小。以净增殖率为指标,感染和未感染 *Wolbachia* 的苹果蠹蛾种群的适合度无显著差异。

表 4 消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代的种群生命表
Table 4 The life table of *C. pomonella* eliminating *Wolbachia*
from F₁, F₂ generation

指标 Index	CK	F ₁	F ₂
起始卵量(粒) Initial no. of eggs	100	100	100
幼虫存活率 Larval survival (%)	55.53	58.86	61.05
蛹存活率 Pupal survival (%)	20.36	30.41	34.60
成虫羽化率 Rate of adult emergence (%)	17.58	26.49	29.51
雌成虫比例 Female ratio	0.54	0.52	0.53
平均产卵量(粒) Average number of eggs	28.80	27.07	27.80
预计下代卵量(粒) Prediction of egg number for subsequent generation	273.47	372.83	288.88
种群趋势指数 Population trend index	2.73	3.73	2.89

3 讨论

近年来的研究表明, *Wolbachia* 除具有调控宿主生殖的作用外, 对宿主适合度也有不同程度的影响, 但其能够在寄主种群中稳定遗传, 更多地依赖于其对寄主产生的生殖调控作用(潘雪红等, 2007; 杨克冬等, 2008; Serbus *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008)。一些 *Wolbachia* 品系能够提高节肢动物雌性宿主的生殖力, 而双翅目和膜翅目昆虫中的 *Wolbachia* 能够降低宿主的生命周期、存活率和运动能力等(Fry *et al.*, 2004)。目前, 昆虫等节肢动物受 *Wolbachia* 感染后, 是否存在 CI 现象、CI 产生的机理等是 *Wolbachia* 研究最热门的领域之一。本研究采用抗生素处理的方法去除了苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia*, 进而研究 *Wolbachia* 感染对苹果蠹蛾生殖及适合度的影响。结果表明, 经抗生素处理后, F₂ 和 F₃ 代中的 *Wolbachia* 已清除。消除 *Wolbachia* 后苹果蠹蛾 F₁、F₂ 代各虫态的发育历期、产卵量、孵化率和蛹的存活率与对照无显著差异; *Wolbachia* 对苹果蠹蛾成虫寿命、产卵前期和性别比例均无影响。此外, 4 种杂交的苹果蠹蛾都能产卵, 且卵可以正常孵化, 说明在自然状态下苹果蠹蛾体内的 *Wolbachia* 不能诱导其宿主的细胞质不亲和现象。这与同苹果蠹蛾具有亲缘关系的锤角细蜂受 *Wolbachia* 的影响截然不同, 是否与苹果蠹蛾的生存环境、共生菌消除方式有关, 还需进一步研究。同时, 本试验只对 4 组苹果蠹蛾每雌平均产卵量、孵化率进行了统计分析, 而 *Wolbachia* 对苹果蠹蛾的影响是否会在其继代中表现或累计表现, 也需要进一步验证。既然 *Wolbachia* 不能诱导苹果蠹蛾的细胞质不亲和现象, 那么其对苹果蠹蛾起何作用仍亟待研究。

参考文献

董鹏, 王进军. 2006. 沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 对宿主的生殖调控作用及其研究进展. 昆虫知识, 43(3): 288-294.
冯宏祖, 王月萍, 曹玉, 杨明禄, 刘慧敏, 许建军. 2014. 苹

果蠹蛾体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因克隆与序列分析. 应用昆虫学报, 51(3): 725-732.
甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 沈大棱, 李昌本. 2002. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. 昆虫学报, 45(1): 14-17.
苗慧, 洪晓月, 谢霖, 薛晓峰. 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.
潘雪红, 何余容, 陈科伟, 潘飞, 盘梅. 2007. *Wolbachia* 感染对拟澳洲赤眼蜂寿命、生殖力和嗅觉反应的影响. 昆虫学报, 50(3): 207-214.
宋社吾, 赵彤言, 董言德, 蒋书楠, 陆宝麟. 2002. 我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与分析. 昆虫学报, 45(5): 571-577.
王欢, 李凯, 刘怀, 胡萃, 叶恭银. 2006. 两种金小蜂体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因分子检测及序列分析. 植物保护学报, 33(3): 235-240.
杨克冬, 张海燕, 钱海涛, 董辉, 张莹, 丛斌. 2008. 沃尔巴克氏体感染对松毛虫赤眼蜂生殖力、发育历期和存活的影响. 中国生物防治, 24(3): 210-214.
张润志, 王福祥, 张雅林, 陈汉杰, 罗进仓, 王勤英, 刘万学, 艾尼瓦尔·木沙, 等. 2012. 入侵生物苹果蠹蛾监测与防控技术研究——公益性行业(农业)科研专项(200903042)进展. 应用昆虫学报, 49(1): 37-42.
Fry A J, Palmer M R and Rand D M. 2004. Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 93: 379-389.
Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A and Werren J H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281: 215-220.
Serbus L R, Casper-Lindley C, Landmann F and Sullivan W. 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia* host interactions. *Annual Review of Genetics*, 42: 683-707.
Werren J H, Baldo L and Clark M L. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 741-751.

(责任编辑: 杨郁霞)

