

Wolbachia 属共生细菌及其对节肢动物生殖活动的调控作用

龚 鹏, 沈佐锐*, 李志红

(中国农业大学植物保护学院, 北京 100094)

摘要: *Wolbachia* 属是广泛分布于节肢动物生殖组织内的一类共生细菌。这些共生菌通过卵的细胞质传播并参与多种调控其宿主生殖活动的机制, 包括: 诱导生殖不亲和、诱导孤雌生殖、雌性化、雄性致死和调节繁殖力。*Wolbachia* 被认为与性别决定、共生关系和物种形成等重要生物学问题密切相关, 是探索这些研究领域的新线索。而且 *Wolbachia* 可作为特定的载体对其宿主种群进行遗传调控, 如增强寄生蜂在害虫生物防治中的作用, 控制线虫引起的疾病传播。该文综述了 *Wolbachia* 的形态学及存在部位、基因组结构、系统发育、种的命名、水平传递和 *Wolbachia* 对其宿主生殖活动的调控作用, 并分析了 *Wolbachia* 研究的科学意义和发展趋势, 以期引起我国生物学家对 *Wolbachia* 研究的注意和快速切入。

关键词: *Wolbachia*; 共生细菌; 节肢动物; 生殖调控; 胞质不亲和

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 02-0241-12

Wolbachia endosymbionts and their manipulation of reproduction of arthropod hosts

GONG Peng, SHEN Zuo-Rui, LI Zhi-Hong (College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: *Wolbachia* is a common and widespread group of symbiotic bacteria found in reproductive tissues of arthropods. These bacteria are transmitted through the cytoplasm of eggs and have evolved various mechanisms for manipulating reproduction of their hosts, including induction of reproductive incompatibility, parthenogenesis, feminization, male killing, fecundity or fertility modifying. *Wolbachia* is thought to be major factors in the evolution of sex determination, eusociality, and speciation. It is a new clue for those research fields. *Wolbachia* is also of interest as vectors for the modification of their host populations, in the improvement of parasitoid wasps in biological pest control, and as a new method for interfering with diseases caused by filarial nematodes. In this paper, *Wolbachia* biology is reviewed, including morphological description and distribution, genome sequences, phylogeny and naming of *Wolbachia* species, horizontal transfer and phenotypic effects on their host. The science value of *Wolbachia* and potential directions for future research are also discussed.

Key words: *Wolbachia*; symbiotic bacteria; arthropods; manipulation of reproduction; cytoplasmic incompatibility

近些年来发现 *Wolbachia* 属的共生细菌在昆虫、螨类、等足目动物和线虫中有很高的侵染率。这些在细胞内共生的 α -亚门的 Proteobacteria 是 Hertig 和 Wolbach 1924 年首次报道的: 在蚊子 *Culex pipiens* 卵巢中发现一种不知名的立克次氏体。Hertig 为了纪念他的合作者 Wolbach, 1936 年将这种立克次氏体正式定名为 *Wolbachia pipientis*。从正式定名一直到 70 年代以前, 这种共生细菌丝毫未引起人们的

注意, 这期间, 很少有关于 *manipulation of reproduction* 的研究报道。1971 年, Yen 和 Barr 发现蚊子中的 *W. pipientis* 引起杂交不亲和, 即不含 *Wolbachia* 的雌蚊的卵被内含 *Wolbachia* 的雄蚊的精子授精后, 受精卵不能存活。当发现 *Wolbachia* 的侵染及其对宿主的影响不止蚊子这一例, 也出现在其他一些昆虫中时, *Wolbachia* 逐渐引起了一些生物学家的关注, 对 *Wolbachia* 的研究也随之开展起来, 尤其是

基金项目: 瑞典国际基金 IFS 资助项目 (C/3257-1)

第一作者简介: 龚鹏, 女, 1972 年生, 博士后, 研究方向为昆虫生态学

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2001-04-09; 接受日期 Accepted: 2001-12-20

PCR 等分子生物学技术的应用大大加速了 *Wolbachia* 的研究。最近 10 年中的研究已证实了这种共生细菌的广泛存在。至少有 16% 的新热带区昆虫中有 *Wolbachia* 的共生, 而且除了昆虫, *Wolbachia* 也普遍存在于蛛形纲蛛类 (Hyun *et al.*, 2000) 和螨类 (Breeuwer and Jacobs, 1996)、陆生等足目动物 (Bouchon *et al.*, 1998) 和丝状线虫 (Bandi *et al.*, 1998) 中。Jeyaprakash 和 Hoy 检测了 63 种节肢动物, 有 *Wolbachia* 共生的物种高达 76% (Jeyaprakash and Hoy, 2000)。 *Wolbachia* 有可能是分布最广、丰度最大的共生细菌类群 (Werren *et al.*, 1995)。

这种共生细菌不仅广泛分布, 而且对其宿主有不寻常的影响, 这也是近年来 *Wolbachia* 被关注和大力研究的原因之一。在 *Wolbachia* 对其宿主的影响中, 研究的最多最深入的是 *Wolbachia* 诱导的胞质不亲和。 *Wolbachia* 对其宿主生物学还有其他一些始料未及的奇特调控, 如诱导孤雌生殖 (Stouthamer *et al.*, 1990)、遗传雄性的雌性化 (Rousset *et al.*, 1992)、杀雄 (雄性胚胎致死) (Hurst *et al.*, 1999; Jiggins *et al.*, 1998) 和宿主生殖力的增强 (Girin and Bouletreau, 1995)。 *Wolbachia* 对其宿主的调控和宿主基因组对这些调控的反应可能暗含着性别决定的进化 (Rigaud and Juchault, 1993)、物种形成 (Breeuwer and Werren, 1990; Hurst and Schilthuisen, 1998) 和共生关系的重要机理。同时 *Wolbachia* 也暗含着重要的应用价值。如 *Wolbachia* 有可能作为工具对其宿主进行遗传改造来调整其传带病毒的能力; 丝虫有可能由于其 *Wolbachia* 共生细菌干扰其传带病毒而使某些疾病得到控制; 害虫生物防治中所用的寄生蜂被孤雌生殖 *Wolbachia* 共生后, 可诱导孤雌生殖, 其生防效能将会增强。

1 *Wolbachia* 的形态学、存在部位及密度

Hertig (1936) 对 *Wolbachia* 的形态学有过详细的描述。 *Wolbachia* 具有立克次氏体的一般特征, 这种共生细菌有两种形态: 一种是不规则杆状, 长度约 0.5 ~ 1.3 μm ; 另一种是球孢状, 直径约 0.5 μm 的小球孢与直径 1 ~ 1.8 μm 的大球孢相邻, 大球孢内含 1 到若干个小球孢。这些大球孢中的小球孢可能是细菌细胞近期分裂形成的 (King, 1970)。

多型水平显然随宿主细胞年龄的增长而增长 (Wright, 1979)。 *Wolbachia* 存在于一个由三层膜包被的小室中, 最外层的膜来自宿主组织, 次外层是细菌的细胞外壁, 最内层由细菌质膜组成 (Louis and Nigro, 1989)。细胞内的共生细菌一般都有多层膜的包被, 这些膜可能在宿主对原核生物的控制中起作用 (Wright, 1979)。

在蚊子中, *Wolbachia* 主要存在于生殖组织细胞的胞质中, 研究表明 *Wolbachia* 大量存在于卵巢和精巢中。在卵巢中, *Wolbachia* 丰度最高的是滋卵细胞, 正是发生复制的所在 (Louis and Nigro, 1989; Zchori *et al.*, 1998)。滋卵细胞的内容物通过胞质桥进入发育中的卵, 在卵细胞中, *Wolbachia* 与微管相关, 这种相关被认为对 *Wolbachia* 引起的胞质不亲和和孤雌生殖非常重要 (Kose and Karr, 1995)。有时在马氏管中也发现 *Wolbachia*, 还曾经在临近体腔的肌肉组织 (Hertig, 1936)、血细胞 (Rigaud *et al.*, 1991) 和血淋巴 (Dobson *et al.*, 1999) 中发现过 *Wolbachia*。在一些物种, 如果蝇 *Drosophila simulans* (Louis and Nigro, 1989)、叶蜂达博寡节小蜂 *Dahlbominus fuscipennis* (Byers and Wilkes, 1970) 和木虱 *Armadillidium vulgare* (Rigaud *et al.*, 1991) 的神经组织中也发现了 *Wolbachia*。与神经组织的这种密切相关有可能使 *Wolbachia* 直接影响宿主的行为。

Wolbachia 在不同种的宿主中数量变化相当大。一个雌性木虱中的 *Wolbachia* 数量约为 66 000 ~ 164 000 (Rigaud *et al.*, 1991)。在赤眼蜂属小型蜂种的单头卵中可有 250 ~ 670 个 *Wolbachia* (Stouthamer *et al.*, 1993)。果蝇的单头卵中可有 500 000 个 *Wolbachia*, 雄蝇中估计有 36.5×10^6 个 *Wolbachia* (Bourtzis *et al.*, 1996)。最近又发展了一些量化 PCR (quantitative PCR) 方法, 如 DNA sequencer 和实时序列检测系统 (real-time sequence detection system), 来检测宿主体内 *Wolbachia* 的密度 (Hiroaki *et al.*, 2001)。

Wolbachia 的共生在同种宿主的同种生物型间有差异。如亚洲稻瘿蚊 *Orseoloa oryzae* (Wood-Mason) 的雌性个体和雄性个体的 1 mtDNA 型有 *Wolbachia* 的共生, 而雄性个体的 2 mtDNA 型和 3 mtDNA 型无 *Wolbachia* 的共生 (Behura *et al.*, 2001)。同一物种的某些地理种群有 *Wolbachia* 的共生, 而另一些地理种群则没有 *Wolbachia* 共生。如火蚁 *Solenopsis invicta* 的南美本地种群有 *Wolbachia* 的共

生, 而引进种群则没有 *Wolbachia* 共生 (Shoemaker *et al.*, 2000)。

2 *Wolbachia* 的基因组结构与与宿主的相互作用

对于 *Wolbachia* 基因组结构, 目前所知较少。在 *Drosophila* spp. 的分子遗传学研究中偶然得到两个 *Wolbachia* 的基因, *ftsZ* (Holden *et al.*, 1993) 和 *dnaA* (Bourtzis *et al.*, 1996)。Bensaadimerchemek 等 (1996) 明确了 *Wolbachia* 近乎完全的 16S rDNA 和 23S rDNA 序列。和其他大多数细菌不同, *Wolbachia* 的 16S rDNA 和 23S rDNA 并不定位在同一区域。

Masui 等 (1999) 报道了从 wTai *Wolbachia* 品系中分离到一种插入序列, 将其命名为 ISW1。周伟国等 (2001) 采用 RDA (representational difference analysis) 方法分析不同表型 *Wolbachia* 的基因组差异, 发现在强烈诱导胞质不相容性的 *Wolbachia* 品系 wRi 的基因组中, 存在一个潜在的可转移遗传因子, 将其命名为 WISE (*Wolbachia* insertion sequence element)。还不知道 *Wolbachia* 是否携带质粒, 但是, 间接的证据表明 *Wolbachia* 中可能有一种病毒性物体的侵染 (Williams *et al.*, 1993)。这些 *Wolbachia* 基因组中的插入序列和可转移遗传因子有可能成为 *Wolbachia* 的理论研究和遗传改造工程中的有力工具。

Wolbachia 与宿主体内系统之间会有一定的相互作用, 而这方面的研究非常缺乏。目前仅有 Bourtzis 等 (2000) 对 *Wolbachia* 与宿主免疫系统之间的相互作用进行研究, 结果显示 *Wolbachia* 的存在与否并不影响宿主 *Drosophila simulans* 和 *Aedes albopictus* 抗菌基因的转录。

3 *Wolbachia* 的系统分化

Wolbachia 家族中的成员属于 Proteobacteria 的 α -亚门 (Weisburg *et al.*, 1989)。与 *Wolbachia* 关系最近的是一些立克次氏体, 包括: 马埃里希氏体 *Ehrlichia equi*、犬埃里希氏体 *Ehrlichia canis*、反刍类考德里氏体 *Cowdria ruminata* 和边缘无形体 *Anaplasma marginale*, 它们由节肢动物传带而寄生于哺乳动物血液中; 腺热埃里希氏体 *Ehrlichia sennetsu* 和里氏埃里希氏体 *Ehrlichia risticii* 与 *Wolbachia* 关系较远, 也是哺乳动物的病原菌; 立克次氏体属

(*Rickettsia*) 的细菌与 *Wolbachia* 关系相对更远些 (Roux and Raoult, 1995)。

16S rDNA 序列的研究结果表明 (Breeuwer *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1992; Rousset *et al.*, 1992; Stouthamer *et al.*, 1993), 不同 *Wolbachia* 的 16S rDNA 序列的差异很小 (1% ~ 2%), 说明 16S rDNA 的进化速度很慢, 不适用于对 *Wolbachia* 多样性进行较精细的研究。近期研究中用进化速度较快的一些编码蛋白的基因的序列进行小尺度系统分化关系的分析, 如细胞分裂蛋白基因 *ftsZ* (Giordano *et al.*, 1997; Schilthuisen *et al.*, 1998; Werren *et al.*, 1995b); 细菌热击蛋白基因 *groEl* (Masui *et al.*, 1997) 和细菌表面蛋白基因 *wsp* (van Meer *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1998)。FtsZ 序列系统遗传学的分析表明: *Wolbachia* 分为 A、B、C、D 4 个群 (groups) (Bandi *et al.*, 1998; Werren *et al.*, 1995b)。A 群和 B 群的 *Wolbachia* 共生于昆虫、鳞类和甲壳动物体内, C 群和 D 群的 *Wolbachia* 共生于丝状线虫体内。根据同义替换率 (synonymous substitution rate) 的计算推断 A 群和 B 群的分化大约始于 60MYA (Werren *et al.*, 1995b), 而 C 群和 D 群的分化大约始于 100MYA (Bandi *et al.*, 1998)。在 *wsp* 序列分析的基础上, A 群和 B 群的 *Wolbachia* 又被细分为 12 个亚群 (subgroups)。A 群中有 Mel、AlbA、Mors、Riv、Uni、Haw、Pap 和 Aus 8 个亚群, B 群中有 Con、Dei、Pip 和 CauB 4 个亚群 (Zhou *et al.*, 1998)。

4 *Wolbachia* 的命名系统

由于缺乏一个统一的命名标准和命名系统, 研究者们难以对不断发现的 *Wolbachia* 家族中的不同成员进行正式的定名。有些 *Wolbachia* 品系曾被命名, 如 *W. postica* (Hsiao and Hsiao 1985)、*W. trichogrammae* (Louis *et al.*, 1993) 和 *W. popcorn* (Min and Benzer, 1997), 但这些命名都未得到正式认可。得到正式认可的命名只有最早在蚊子 *Culex pipiens* 体内发现的 *Wolbachia*, 定名为 *W. pipientis*。另外 *W. persica* 的命名最初也曾被认可, 根据其亚显微结构的相似性归入 *Wolbachia* 属, 但 Weisburg 等 (1989) 指出 *W. persica* 其实是一种 γ 亚门的细菌, 与真正的立克次氏体无关。

曾有一些系统被用来对 *Wolbachia* 的不同品系进行命名。如 Rousset 和 Stordeur (1994) 对果蝇

D. simulans 中引起胞质不亲和的各种 *Wolbachia* 品系进行命名: *w* 字母 (斜体小写) 后加上寄主采集地 (大写), 如在美国加州的 Riverside 采集的果蝇中发现的 *Wolbachia* 命名为 *wRI*。尽管这一命名系统对果蝇中 *Wolbachia* 的研究很有效, 但对于其他寄主中发现的 *Wolbachia* 就难以纳入这一系统。因此, 我们需要的是一个通用的系统。Zhou 等 (1998) 建立了一个基于 *wsp* 基因序列的通用命名系统。在这一系统中, *Wolbachia* 可根据标准种分为不同的群 (group), 每群中的成员与其标准种的 *wsp* 基因序列差异不得大于 2.5%。每群的命名通常包含其标准种的前三个字母。这一系统将 *Wolbachia* 的以往的 A、B 两群分别作为 A 总群和 B 总群 (supergroup), 总群之下又分群 (group)。目前越来越多的 *Wolbachia* 研究 (Zhou *et al.*, 1998; van Meer *et al.*, 1999; Malloch *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2002a) 采用了这一分类命名系统, 并增加了新的群。A 总群中已有 10 个群, B 总群中有 9 个群得到指明和认定。

5 *Wolbachia* 的水平传递

垂直传递是 *Wolbachia* 在宿主种内的基本传递模式 (Hoffman *et al.*, 1990), 但有趣的是, *Wolbachia* 在同种宿主的不同个体间也有水平传递。Huigens 等 (2000) 通过试验证实, 当蚬蝶赤眼蜂 *Trichogramma kaykai* 的含菌个体和未含菌个体共享同一食物源时, *Wolbachia* 可由含菌个体传染给未含菌的同种个体。而且水平传来的 *Wolbachia* 可在新宿主中垂直传递给其后代。

Wolbachia 在不同种的宿主间亦有不同程度的水平传递。Werren 等 (1995b) 首次报道了 *Wolbachia* 在不同种间的水平传递: 金小蜂 *Nasonia giraulti* 和它的寄主丽蝇体内都有 *Wolbachia*, 尽管这两种寄主的亲缘关系较远, 但它们所共生的 *Wolbachia* 的系统遗传关系非常接近。这个发现不仅表明 *Wolbachia* 在不同种间的水平传递, 而且显示寄生蜂与其寄主是 *Wolbachia* 种间传递一个可能的传播机制。

甘波泣等 (2002) 的研究是 *Wolbachia* 通过寄生蜂实现种间水平传递的又一证据。灰飞虱 *Laodelphax striatellus*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、白背飞虱 *Sogatella furcifera* 是属于不同属的昆虫, 而它们感染的 *Wolbachia* 具有完全一样的 *wsp* 基因序列。

而且在能同时感染这 3 种昆虫的寄生蜂稻虱红螯蜂中发现了同种 *Wolbachia* 的共生, 说明寄生蜂有可能是 *Wolbachia* 横向水平传播的一种常见机制。

Wolbachia 系统进化关系与宿主系统进化关系的比较是目前分析推测 *Wolbachia* 水平传递的主要方法之一。*FtsZ* 和 16S rDNA 序列分析表明: A 群 *Wolbachia* 的水平传递程度较强。对一些鞘翅目、双翅目、膜翅目和鳞翅目昆虫体内 *Wolbachia* Adm 不同群的隔离进行 *ftsZ* 序列分析, 可推测出这些共生菌的分化不超过 1.6MYA (Werren *et al.*, 1995b)。而它们各自的昆虫宿主的分化已超过 200MYA (Hennig, 1981)。膜翅目日光蜂科的 *Aphytis* 属几种寄生蜂中 A 群 *Wolbachia* 的系统进化关系的分析是 *Wolbachia* 水平传递的又一例证 (Gottlieb *et al.*, 1998)。B 群 *Wolbachia* 在不同的宿主种间也有水平传递。而线虫中共生的 C、D 群的 *Wolbachia* 的水平传递程度很低。节肢动物 (含 A、B 群的 *Wolbachia*) 与线虫 (含 C、D 群的 *Wolbachia*) 间极少有 *Wolbachia* 的水平传递 (Bandi *et al.*, 1998)。

Wolbachia 显然能够耐受不同宿主的细胞内环境。一些研究用微注射的方法将 *Wolbachia* 人为地从其宿主转入了原本没有 *Wolbachia* 共生的物种中 (Boyle *et al.*, 1993; Braig *et al.*, 1994; Karr, 1994; Rousset and Stordeur, 1994)。其中最值得注意的是从白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 中将一种 B 亚群中引起胞质不亲和的 *Wolbachia* 成功转入果蝇中 (Braig *et al.*, 1994), 这是亚目间的人工转移, 而且受体物种不是 B 亚群 *Wolbachia* 的自然宿主。Grenier 等 (1998) 实现了 *Wolbachia* 在寄生蜂 (微小昆虫) 中从短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* 到松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi* 人为的种间水平转移。

不同的共生细菌其宿主范围会有差异。可以推测: 某种 *Wolbachia* 与宿主协同进化的愈久, 其水平传递的可能性愈低。不同系统发育距离的物种间 *Wolbachia* 水平传递的可能性研究显然是探索这种共生物与其宿主基因组相互作用模式的有力工具。而且, *Wolbachia* 的水平传递可以作为载体使特定基因在其宿主种群中传播。

6 *Wolbachia* 对宿主生殖活动的调控

6.1 诱导胞质不亲和 (cytoplasmic incompatibility, CI)

Wolbachia 对节肢动物宿主最普遍和常见的影

响是诱导胞质不亲和 (CI)。 *Wolbachia* 诱导的胞质不亲和是精子和卵细胞之间的生殖不亲和。 CI 的表现型为: 受精后不久精子染色体的正常减数分裂被破坏, 导致载具不同胞质因子的宿主品系间难以产生后代。 最典型的是父本染色体被剔除以致胚胎是单倍体。 在双倍体物种和一些单倍-双倍体螨类中, 这种单倍体胚胎最终死亡, 而在另一些单倍-双倍体物种, 如胡蜂中, 这种单倍体胚胎发育为正常的雄性个体 (Breeuwer, 1997; Giordano *et al.*, 1997; Johanowicz and Hoy, 1998)。 因此, *Wolbachia* 所诱导的 CI 有两种表现结果: 后代致死和偏重雄性的性比不平衡。

CI 在昆虫中普遍存在, 许多昆虫目中都有报道, 包括: 鞘翅目、双翅目、同翅目、膜翅目、直翅目和鳞翅目 (Giordano *et al.*, 1997)。 近几年中, *Wolbachia* 诱导的 CI 在昆虫外的其他节肢动物物种中也有报道, 如一些螨类 (Breeuwer, 1997; Johanowicz and Hoy, 1995) 和一些甲壳纲等足目物种 (Rigaud and Rousset, 1996; Rousset *et al.*, 1992)。 *Wolbachia* 诱导的 CI 在昆虫中发现的较多可能是由于对其他节肢动物类群的研究力度相对较小。

CI 对杂交的影响最典型的是单向不亲和, 即内含 *Wolbachia* 的雄性不含 *Wolbachia* 的雌性间的杂交不亲和, 而反交是亲和的。 然而在蚊子 *C. pipiens* (Laven, 1957; Magnin *et al.*, 1987)、伊蚊 *Aedes scutellaris* (Dev, 1986)、果蝇 *D. simulans* (O'Neill and Karr, 1990)、*Nasonia* 属的某些蜂类和 *Cryllus* 属的某些蟋蟀 (Breeuwer and Werren, 1990) 中有双向不亲和现象的报道, 被认为是内载不同 *Wolbachia*, 因而雄个体与雌个体杂交不亲和。 微生物介导的不亲和, 尤其是双向不亲和引起特别的关注, 因为它造成的生殖隔离可能在物种形成中起着重要作用 (Hurst and Schilthuisen, 1998; Werren, 1997)。

CI 的群体生物学和细胞学研究已有了相当的积累。 一般认为, CI 现象的产生是由于 *Wolbachia* 结合了宿主的某种生殖细胞特异染色体蛋白质并在随后精子发生过程中将这种蛋白质携至精细胞外, 从而影响了受精后的第 1 次有丝分裂过程 (Callaini *et al.*, 1997), 使减数分裂中亲本染色体不正常凝缩 (Reed and Werren, 1995)。 胞质不亲和中显然有两个组成系统的参与: 精子中共生细菌的“修饰”和受精卵中共生细菌的“营救”。 根据这个模型, 精巢内的共生细菌对发育中的精子进行修饰

(可能是通过染色质粘合蛋白)。 只有卵中存在相同的共生细菌才能营救这种修饰。 如果没有营救, 就导致卵和精子的不亲和。 这一模型与单向不亲和 (未被 *Wolbachia* 侵染的卵不能营救被 *Wolbachia* 侵染的雄性中被修饰的精子) 和双向不亲和 (不同的 *Wolbachia* 群其修饰-营救系统是不同的) 是一致的。

已证实一些因素影响 CI 的表达, 如 *Wolbachia* 品系、双侵染或单侵染、共生菌密度、寄主基因型和龄期以及环境因素。 这些因素相互作用, 构成宿主地理种群间复杂的不亲和关系 (Dev, 1986; Laven, 1957; Magnin *et al.*, 1987; Mercot *et al.*, 1995; Montchamp-Moreau *et al.*, 1991; Rousset and Solignac, 1995; Solignac *et al.*, 1994)。 对两种飞虱 *Laodelphax striatellus* 和 *Sogatella furcifera* 的研究表明宿主的 CI 水平与雄性个体体内的 *Wolbachia* 含量呈正相关 (Hiroaki *et al.*, 2001)。

6.2 诱导孤雌生殖 (parthenogenesis-inducing, PI)

Stouthamer 等 (1990) 发现共生细菌引起一些赤眼蜂品系的孤雌生殖, 进一步的研究则发现这种相关的胞质细菌是 *Wolbachia* (Stouthamer *et al.*, 1993a; Stouthamer and Werren, 1993c)。 雄性个体不能传递 *Wolbachia* 给后代, 因而对于 *Wolbachia* 的共生生活是多余的。 诱导孤雌生殖的 *Wolbachia* (PI *Wolbachia*) 为了支持其共生生活而对宿主进行的这种诱导完全孤雌生殖的生殖调控简直是绝妙的。

A 和 B 两个群中都有 PI *Wolbachia*, 已发现它们存在于许多膜翅目的寄生蜂中, 如掠蝇金小蜂 *Muscidifurax* spp., 赤眼蜂 *Trichogramma* spp., (Stouthamer *et al.*, 1993); 黄金蚜小蜂 *Aphytis* spp., 恩蚜小蜂 *Encarsia* spp., *Leptopilina* spp., (Legner, 1987; Stouthamer *et al.*, 1993; Werren *et al.*, 1995b; Zchori *et al.*, 1995); 蚜茧蜂 *Lysiphlebus* spp. (Stary, 1999); 瘿蜂 *Diplolepis* spp., *Rhoditini* spp., *Aylacini* spp. (Plantard *et al.*, 1999)。 还不清楚 *Wolbachia* 是否能诱导除膜翅目之外其他昆虫的孤雌生殖。 根据其细胞遗传学机理, PI *Wolbachia* 可能多分布在单倍体-双倍体种中。 在孤雌生殖的象鼻虫中发现 *Wolbachia* (Werren *et al.*, 1995b)。 探究象鼻虫的孤雌生殖是否与 *Wolbachia* 相关的抗生素处理试验还没有进行。 在其他昆虫目中 PI *Wolbachia* 的发现将是非常重要的。

内含 PI *Wolbachia* 的雌性个体所产的卵不经受

精即可发育为雌性后代。这是通过对第一次减数分裂的调控实现的 (Stouthamer and Kazmer, 1994)。内含 PI *Wolbachia* 的卵, 其第一次减数分裂的后期是不正常的, 导致未受精的卵具有双倍体核。膜翅目和其他一些昆虫类群有着特殊的性决定系统: 单倍体卵发育为雄性, 双倍体卵发育为雌性。不含 PI *Wolbachia* 的卵受精后成为二倍体, 发育为雌性; 未受精的卵为单倍体, 发育为雄性。而内含 PI *Wolbachia* 的卵不经受精, 全部发育为雌性, 即孤雌生殖。在一些物种中, 内含 PI *Wolbachia* 的个体和不含 PI *Wolbachia* 的个体共同存在, 内含 PI *Wolbachia* 的雌性仍能与不含 PI *Wolbachia* 的雄性交配, 在这种交配的情形下, *Wolbachia* 不干涉正常的减数分裂过程, 单倍体卵受精后成为双倍体 (Rousset and Stordeur, 1994)。在膜翅目中, 已证实 *Wolbachia* 参与至少 40 多个物种的孤雌生殖 (Stouthamer et al., 1997)。

PI *Wolbachia* 的细胞遗传学机制在赤眼蜂中研究的最为深入 (Stouthamer and Kazmer, 1994)。第一次减数分裂, 前期染色体凝缩正常但在中期未分离导致核的双倍性。这一机理即配子双倍性且导致了各位点的纯合。后续的减数分裂都是正常的。配子双倍性在骚扰角蝇金小蜂 *Muscidifurax uniraptor* 中也有报道 (Legner et al., 1985)。要明确 PI *Wolbachia* 如何引起配子双倍性, 需要对此进行详尽的分子生物学和细胞遗传学研究。可能的机理包括中心体或纺锤体组成的破坏, 纺锤体到染色体的连接, 或纺锤体动力学。

PI *Wolbachia* 不仅影响减数分裂过程, 也影响着后代的产量。内含 PI *Wolbachia* 的雌个体一般比同物种不含 PI *Wolbachia* 的雌个体的产卵量少 (Stouthamer and Luck, 1993b)。在一些物种中, PI *Wolbachia* 的承递随雌个体的龄期、产卵量而减小。而且 PI *Wolbachia* 的表达受母体孵育温度的影响。雌性个体养育在高温下产生的雄性个体增多 (Louis et al., 1993; Stouthamer et al., 1990), 某些物种的内含 PI *Wolbachia* 的雌性个体养育在 28℃ 下, 产生一些间性个体 (Stouthamer, 1997)。

6.3 诱导雌性化 (feminizing)

具有雌性化作用的共生物, 如一些细菌和原生生物, 能改变其寄主正常的性别决定方式, 使原本应发育为雄性的个体发育成为雌性。目前已在海生 amphipod 的甲壳类动物、陆生等足目的甲壳类动物和某些鳞翅目昆虫 (如亚洲玉米螟 *Ostrinia furnaca-*

lis) 这三类生物中发现具有雌性化作用的共生物。其中第一类生物中的雌性化共生物经证实为原生生物 (Bulnheim et al., 1968; Ginsburg-Vogel et al., 1980; Terry et al., 1997); 而后两类生物中的雌性化特性可被抗生素“治愈” (Kageyama et al., 1998; Rigaud et al., 1991), 而且与 *Wolbachia* 的共生有关 (Rousset et al., 1992)。

研究的最好实例是木虱 *Armadillidium vulgare* (Rigaud et al., 1991)。在这个种中, *Wolbachia* 通过抑制雄腺来导致雌性化 (Martin et al., 1990)。从雌性亲本遗传获得的 *Wolbachia* 以某种方式阻止雄腺的形成, 因而保证雌性个体的发育 (LeGrand et al., 1987)。将 *Wolbachia* 接入腺体已分化的木虱雄性成体中, 其雌性化的作用很明显, 这种雄性个体发育为间性表型, 分化出一些雌性的性特征。雄性激素在这些间性个体中仍然起作用 (Juchault and Legrand, 1985), 表明成体中的 *Wolbachia* 并不影响雄腺产生激素的能力, 而是影响宿主对激素的反应能力。诱导雌性化的 *Wolbachia* 的种群动力学是非常有趣的问题。和其他性比的扭转因素一样, 雌性化细菌的出现产生了对正常性决定的遗传对抗, 导致性决定系统的快速进化 (Juchault et al., 1994; Rigaud and Juchault, 1993)。

6.4 杀雄 (male-killing)

在已报道的动物的母系遗传因素中, 首要且特殊的胞质影响就是在胚胎发育过程中使雄性后代致死 (Lus, 1947)。胚胎发育中的雄性致死已在 20 多种昆虫中有过报道 (Hurst et al., 1997), 而且发现这一特性对抗生素敏感, 即抗生素处理可治疗这种雄性致死, 说明这种杀雄作用是由一些细菌引起的。用 PCR 扩增 16S rDNA 序列的方法已证实 6 种细菌与杀雄特性相关, 这 6 种细菌分属真细菌中不同的类群: 2 种是 *Spiroplasma* 属柔膜细菌, 1 种属于 *Flavobacteria-Bacteroides* 类群, 1 种属于 Proteobacteria 的 γ 类群, 还有 2 种分属于 Proteobacteria 中 α 类群的 *Rickettsia* 属和 *Wolbachia* 属 (Hackett et al., 1986; Hurst et al., 1996; Hurst et al., 1997; Werren et al., 1986; Werren et al., 1994)。

在 *Wolbachia* 对寄主的生殖调控中, 杀雄作用是非常特殊的。CI 和 PI 这些调控只与 *Wolbachia* 这一种细菌相关, 而杀雄这种生殖调控与多种因子相关, 杀雄因子的多样性使得这种调控更易发展和进化。目前非常缺乏有关细菌导致雄性胚胎死亡详细生化过程的研究。有关使宿主雄性致死的 *Wolba-*

chia 的研究也还刚刚起步。

迄今为止, 在两种昆虫中发现了杀雄的 *Wolbachia*。一个是二星瓢虫 *Adalia bipunctata*。除了 *Wolbachia*, 在这个物种中还发现了另外两种杀雄细菌。另一个有杀雄 *Wolbachia* 共生的物种是一种非洲蝴蝶 *Acraea encedon* (Jiggins *et al.*, 1998)。 *Wolbachia* 是这种蝴蝶中发现的惟一的杀雄因子。杀雄 *Wolbachia* 的这两种宿主的性决定系统是迥然不同的: 二星瓢虫是雄性异配型。而这种蝴蝶是雌性异配型, 这说明杀雄 *Wolbachia* 不受性决定系统的限制, 所以普遍存在的可能性很大, 至少在昆虫中是这样的。

已发现的杀雄 *Wolbachia* 都属于 *Wolbachia* 的 B 群, Hurst 等 (1999) 根据 *wsp* 序列的分析认为二星瓢虫中有两种杀雄 *Wolbachia* 的共生。这两种杀雄 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列有差异但在系统进化上是同一起源, Hurst 的研究进一步说明 *Wolbachia* 可能是驱动节肢动物进化的重要因素。

6.5 增强雌性繁殖力和雄性生育力 (fecundity and fertility-modifying)

共生物扩大其传播的另一方法是提高共生宿主个体的生殖力。Vavre 等 (1999) 发现摩洛哥赤眼蜂 *T. bouratachae* 中共生的 *Wolbachia* 属于 A 亚群, 它并不象其他赤眼蜂中共生的 B 亚群 *Wolbachia* 那样诱导寄主的孤雌生殖, 也不象其他某些昆虫中共生的与其系统发育关系较近的 A 亚群 *Wolbachia* 那样导致胞质不亲和, 深入的研究表明这种 A 亚群的 *Wolbachia* 促进雌性个体繁殖率的提高。体内有 *Wolbachia* 共生的寄生蜂的产仔率约是经“治疗”不含 *Wolbachia* 的寄生蜂产仔率的 2 倍 (Girin and Bouletreau, 1995)。抗生素处理去除 *Wolbachia* 在果蝇中的共生后, 出现果蝇雌性个体繁殖力的暂时下降, 三代之后其繁殖力与有 *Wolbachia* 共生的果蝇的繁殖力相同 (Poinsot and Mercot, 1997)。虽然这种现象的缘由还不清楚, 但已表明 CI *Wolbachia* 也能增强共生宿主雌性个体的繁殖力。

Wolbachia 在突眼蝇 *S. beccarii* 体内的共生没有引起任何的不亲和现象和对雌性个体繁殖力的影响, 但雄性个体在被“治疗”不含 *Wolbachia* 后, 生育力明显下降 (Hariri *et al.*, 1998)。在粉甲 *Tribolium confusum* 中也报道了 *Wolbachia* 对雄性生育力的影响, 雌性个体与有 *Wolbachia* 共生的雄性个体和无 *Wolbachia* 共生的雄性个体交配, 有 *Wolbachia* 共生的雄性个体的精子在竞争中取胜而使大多数卵

子受精 (Wade and Chang, 1995)。

7 *Wolbachia* 研究的科学意义

7.1 *Wolbachia* 与物种形成

Wolbachia 导致 CI 的这种种间隔离机制不仅对共生细菌有重要意义, 而且也是重要的物种形成机制 (Perrot-Minnot *et al.*, 1996)。单向的 CI 与其他一些反向生殖隔离机制 (如杂交不育和不存活或交配前隔离) 相结合能导致双向生殖隔离。北美的蟋蟀 *Gryllus* 属的种中有这样的例子 (Harrison and Rand, 1989; Werren *et al.*, 1995b)。

尤其是当双向不亲和发生时, *Wolbachia* 可能由于引起种群间的生殖不亲和而促进快速的物种形成 (Breeuwer and Werren, 1990; Conner and Saul, 1986; Laven, 1959; Thompson, 1987)。部分和完全的双向不亲和现象在 *D. simulans* (Clancy and Hoffmann, 1996) 和 *C. pipiens* (Laven, 1967) 的不同品系间及 *Nasonia* 的姊妹种间 (Breeuwer and Werren, 1990) 都有报道。毛颜寄蝇 *Trichopria drosophilae* 的地理种群间发现存在双向的生殖隔离而且与载体不同的 *Wolbachia* 有关。棉红蜘蛛 (Boer, 1982) 和柑橘红蜘蛛 (Takafuji and Fujimoto, 1985) 的种群间的生殖不亲和可能也与 *Wolbachia* 有关。这些例子表明 *Wolbachia* 导致的双向不亲和是节肢动物物种快速形成的一个可能的机制。近来研究发现 16% 以上的昆虫体内有这种细菌, 这也支持了这个假说的可能性 (Werren *et al.*, 1995a)。

Nasonia 复合体是研究 *Wolbachia* 参与物种形成的典型例子。*Nasonia* 寄生蜂是 3 个姊妹种 (*N. vitripennis*、*N. giraulti* 和 *N. longicornis*) 的复合体。*N. vitripennis* 是世界性的, 而另两种在北美各区发生而且与 *N. vitripennis* 在很多地区是分布区重叠的。每一 *Nasonia* 种都有 A 亚群和 B 亚群 *Wolbachia* 的双重侵染 (Breeuwer *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995b)。由于 *Wolbachia*, 这 3 个种显示出彼此间完全的或近乎完全的生殖不亲和 (Breeuwer and Werren, 1990)。这些姊妹种间通常不发生杂交除非其 *Wolbachia* 被进行了抗生素治疗 (Breeuwer and Werren, 1990; Breeuwer and Werren, 1995)。渐渗杂交实验也显示这种种间的双向不亲和是由于共生细菌的不同而不是寄主基因型间的反应 (Breeuwer and Werren, 1993)。*Nasonia* 复合体的研究表明 *Wolbachia* 能参与物种形成。但还不清楚双向不亲

和是发生在物种形成之前并对其有可能的促进作用, 还是发生在端始种的分离之后。

Wolbachia 导致的生殖隔离是一个非常复杂的系统, 已有试验证据表明寄主基因组能影响不亲和的水平 (Bordenstein and Werren, 1998)。解决 *Wolbachia* 和寄主基因组在生殖隔离这一复杂系统中的相对作用将是一个非常有前景和相当活跃的研究领域。

7.2 生物防治的潜在意义

7.2.1 CI 作为一种调控害虫种群的方法: 甚至在引起 CI 的这种病原体还未确认和定名之前, 已有试验在尝试将 *Wolbachia* 引起的 CI 作为控制蚊子的一种方法 (Laven, 1967)。其方法类似于雄性不育昆虫释放术, 基本思想是: 释放大量可与雌蚊进行不亲和交配的雄蚊, 由于 CI 的作用, 交配后不产生后代。虽然对实验室种群和自然种群都获得了良好的效果, 但分离雌雄个体的工作量非常大, 使这一应用 *Wolbachia* 的不育昆虫释放技术难以大规模应用。

另一种尝试是用双向不亲和的 *Wolbachia* 实现种群替换 (Laven and Aslamkhan, 1970)。它的目的是将现有种群替换为同物种中比原种群危害小的另一种群。小规模试验已取得成功 (Curtis and Adak, 1974; Curtis, 1976)。但这种方法要求原种群与新种群间必须是绝对的不亲和, 如果原种群的基因由原种群中雄个体的可亲和精子在繁殖中带入新种群, 种群替换就失败了。

近些年最被关注的研究工作是对这些携带致病因子的节肢动物体内的 *Wolbachia* 进行改造 (加入抗寄生或抗病毒基因), 以使其宿主中携带的致病因子失效。舌蝇 (锥虫病的载体) 和猎蝽 (Chagas 病的载体) 体内共生物发育改造系统已获得成功 (Beard *et al.*, 1993)。如果能获得抗寄生或抗病毒基因的有效表达, 接下来要面对的重要环节是用改造后对病毒等无感受性的基因型替代自然种群。因此彻底了解 CI *Wolbachia* 的种群动力学是直接应用 CI *Wolbachia* 的关键。

还有一种被关注的方法是 *Wolbachia* 作为一种驱动因子将新的特性引入原种群。*Wolbachia* 在 *D. simulans* 加利福尼亚种群中的共生显示还有其他胞质因素与 *Wolbachia* 共生的传播偶联 (Turelli and Hoffmann, 1991; Turelli *et al.*, 1992)。可以通过与 *Wolbachia* 偶联的并进行了一些遗传调整的胞质遗传因素 (如病毒或共生细菌) 对野生种群进行改良

而使其具有一些理想的特性 (Beard *et al.*, 1993)。CI *Wolbachia* 在其中作为一种驱动力辅助理想基因的表达。这种包含理想基因的胞质因素应与 *Wolbachia* 的侵染保持关联性。如果失去这种关联, 那就只有 *Wolbachia* 的传播却不发生理想的遗传改良了。为了让这种改良特性得以传播, 最好对 *Wolbachia* 也进行一些改造。

7.2.2 通过导入 PI *Wolbachia* 来改良寄生蜂: 生物防治中常常用到寄生蜂。寄生蜂幼虫取食害虫来保持其发育进程, 因而对害虫种群有控制作用。而内含 PI *Wolbachia* 的寄生蜂在控制害虫方面优于不含 PI *Wolbachia* 的寄生蜂。PI *Wolbachia* 的共生诱导其寄主进行孤雌生殖, 而孤雌生殖对寄生蜂的生防效能和工厂化生产有重大的意义: (1) 孤雌生殖个体将有更高的种群增殖率和更高的穿刺产卵率; (2) 由于不需与雄性个体的交配, 孤雌生殖个体更容易在低种群密度下进入新生境并建立种群; (3) 不需饲养雄性个体, 孤雌生殖会降低规模化培养的成本。

Wolbachia 的人为的转接技术在一些物种中已获得成功。这种微注射转入的方法目前对 CI *Wolbachia* 应用较多, 还未用于 PI *Wolbachia*。如果 PI *Wolbachia* 能在寄生蜂种间和其他天敌生物中进行一定的转移, 那么这种共生细菌将使天敌生物的生防潜能大大增强。

7.2.3 *Wolbachia* 有可能成为重要的遗传工程生物: 更为雄心勃勃的设想是将 *Wolbachia* 作为遗传工程生物来应用。一些研究工作正在将其设计为遗传工程的载体。*Wolbachia* 作为载体不仅可用于分子生物学和遗传学的研究 (如质粒), 还可用于遗传工程中生产特定的蛋白质。挑选具高繁殖率的宿主作为生物反应器。把目标基因嵌入 *Wolbachia* 这种载体, 并通过载体载入生物反应器将目标基因高效的表达为目标蛋白。如一些医用蛋白有可能通过这种途径来进行大规模低成本的生产。

8 *Wolbachia* 研究的发展趋势

Wolbachia 引起了人们广泛的兴趣, 这种共生菌的研究将在近年内迅速增长。还有一些关键问题要进一步探究: CI、PI 和雌性化 *Wolbachia* 的生化机理? *Wolbachia* 的分布究竟有多广 (如脊椎动物中是否有 *Wolbachia*)? *Wolbachia* 在物种间如何转移? *Wolbachia* 的侵染在种内和种间的进化轨迹?

Wolbachia 是否促进物种形成? *Wolbachia* 能否有效的用于生物防治? 对这些问题的回答会带来重大的科学进步。

而且现在已经获得一些非常重要的技术和方法, 如 *Wolbachia* 的 PCR 分子检测技术 (龚鹏和沈佐锐, 2002b); 昆虫细胞中 *Wolbachia* 的培养技术 (O'Neill *et al.*, 1995) 等, 这样就有可能对 *Wolbachia* 进行更深入详尽的生化 and 遗传学研究。因而 *Wolbachia* 研究的下一个十年将是令人激动、蓬勃发展的重要时期。

致谢 承蒙澳大利亚悉尼大学 Geoff Gurr 教授和英国洛桑实验站杨效文教授惠赠部分文献资料, 特此致谢!

参 考 文 献 (References)

- Bandi C, Anderson T J C, Genchi C, Blaxter M L, 1998. Phylogeny of *Wolbachia*-like bacteria in filarial nematodes. *Proc. R. Soc. London (B)*, 265: 2 407 - 2 413.
- Beard C B, O'Neill S L, Tesh R B, Richards F F, Aksoy S, 1993. Modification of arthropod vector competence via symbiotic bacteria. *Parasitol. Today*, 9: 179 - 183.
- Behura S K, Sahu S C, Mohan M, Nair S, 2001. *Wolbachia* in the Asian rice gall midge, *Orseoloa oryzae* (Wood-Mason): correlation between host mitotypes and infection status. *Insect Molecular Biology*, 10 (2): 163 - 171.
- Bensaadimerchermek N, Salvado J C, Cagnon C, Karama S, Mouches C, 1996. Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S ribosomal-RNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prokaryotic parasite of insect gonads. *Gene*, 165: 81 - 86.
- Boer R, 1982. Laboratory hybridization between semi-compatible races of the arhenotokous spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Evolution*, 36: 553 - 560.
- Bordenstein S R, Werren J H, 1998. Effects of A and B *Wolbachia* and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility between two *Nasonia* species. *Genetics*, 148: 1 833 - 1 844.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P, 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. London (B)*, 265: 1 081 - 1 090.
- Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G, Savakis C, 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics*, 144: 1 063 - 1 073.
- Bourtzis K, Pettigrew M M, O'Neill S L, 2000. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Molecular Biology*, 9 (6): 635 - 639.
- Boyle L, O'Neill S L, Robertson H M, Karr T L, 1993. Inter- and intra-specific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, 260: 1 796 - 1 799.
- Braig H R, Guzman H, Tesh R B, O'Neill S L, 1994. Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. *Nature*, 367 (3): 453 - 455.
- Breeuwer J A J, Werren J H, 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346: 558 - 560.
- Breeuwer J A J, Stouthamer R, Barns S M, Pelletier D A, Weisburg W G, Werren J H, 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol. Biol.*, 1: 25 - 36.
- Breeuwer J A J, Werren J H, 1993. Effect of genotype on cytoplasmic incompatibility between two species of *Nasonia*. *Heredity*, 70: 428 - 436.
- Breeuwer J A J, Werren J H, 1995. Hybrid breakdown between two haplodiploid species: the role of nuclear and cytoplasmic genes. *Evolution*, 49: 705 - 717.
- Breeuwer J A J, Jacobs G, 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp. Appl. Acarol.*, 20: 421 - 434.
- Breeuwer J A J, 1997. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in the spider mite *Tetranychus urticae* and *T. turkestanii*. *Heredity*, 79: 41 - 47.
- Byers J R, Wilkes A, 1970. A rickettsialike microorganism in *Dahlbominus fuscipennis*: observations on its occurrence and ultrastructure. *Can. J. Zool.*, 48: 959 - 964.
- Callaini G, Dallai R, Riparbelli M G, 1997. *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *J. Cell Sci.*, 110: 271 - 280.
- Clancy D J, Hoffmann A A, 1996. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: evolving complexity. *Trends Ecol. Syst.*, 11: 145 - 146.
- Conner G W, Saul G B, 1986. Acquisition of incompatibility by inbred wild-type stocks of *Mormoniella*. *J. Hered.*, 77: 211 - 213.
- Curtis C F, Adak T, 1974. Population replacement in *Culex fatigans* by means of cytoplasmic incompatibility. 1. Laboratory experiments with non-overlapping generations. *Bull. WHO*, 51: 249 - 255.
- Curtis C F, 1976. Population replacement in *Culex fatigans* by means of cytoplasmic incompatibility. 2. Field cage experiments with overlapping generations. *Bull. WHO*, 53: 107 - 119.
- Dev V, 1986. Non-reciprocal fertility among species of the *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* group. *Experientia*, 42: 803 - 806.
- Dobson S L, Bourtzis K, Braig H R, Jones B F, Zhou W, Rousset F, O'Neill S L, 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 153 - 160.
- Gan B Y, Zhou W G, Feng L B, Shen D L, Li C B, 2002. Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45 (1): 14 - 17. [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]
- Ginsburg-Vogel T, Carre-Lecuyer M C, Fried-Montaufer M C, 1980. Transmission experimentale del la thelygenie liee a l'intersexualite chez *Orchestia gammarellus* (Pallas): analyse des genotypes sexuels dans la

- descendance des femelles thelygenes. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 122: 261 – 270.
- Giordano R, Jackson J J, Robertson H M, 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94 (21): 11 439 – 11 444.
- Girin C, Bouletreau M, 1995. Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Experientia*, 51 (4): 398 – 401.
- Gong P, Shen Z R, 2002a. Molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in *Trichogramma dendrolimi*. *Progress in Natural Science*, 12 (1): 86 – 89.
- Gong P, Shen Z R, 2002b. Molecular diagnostic techniques of *Wolbachia*. *Hereditas*, 24 (2): 205 – 208. [龚鹏, 沈佐锐, 2002. *Wolbachia* 的 PCR 分子检测技术. *遗传*, 24 (2): 205 – 208]
- Gottlieb Y, Zehori-Fein E, Faktor O, Rosen D, 1998. Phylogenetic analysis of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in the genus *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Molecular Biology*, 7 (4): 393 – 396.
- Grenier S, Pintureau B, Heddi A, Lassabliere F, Jager C, Louis C, Khatchadourian C, 1998. Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond.* (B), 265: 1 441 – 1 445.
- Hackett K J, Lynn D E, Williamson D L, Ginsberg A S, Whitcomb R F, 1986. Cultivation of the *Drosophila* sex-ratio Spiroplasm. *Science*, 232: 1 253 – 1 255.
- Hariri A R, Werren J H, Wilkinson G S, 1998. Distribution and reproductive effects of *Wolbachia* in stalk-eyed flies. *Heredity*, 81: 254 – 260.
- Harrison R G, Rand D M, 1989. Mosaic hybrid zones and the nature of species boundaries. In: Otte D, Endler J A eds. *Speciation and Its Consequences*. Sunderland, MA: Sinauer. 111 – 134.
- Hennig W, 1981. *Insect Phylogeny*. Chichester, NY: Wiley.
- Hertig M, Wolbach S B, 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J. Med. Res.*, 44: 329 – 374.
- Hertig M, 1936. The rickettsia, *Wolbachia pipiens* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, 28: 453 – 486.
- Hiroaki N, Koizumi Y, Zhang Q, Deng K J, 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 727 – 737.
- Hoffman A A, Turelli M, Harshman L G, 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 126: 933 – 948.
- Holden P R, Brookfield J F Y, Jones P, 1993. Cloning and characterization of an *ftsZ* homologue from a bacterial symbiont of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, 240 (2): 213 – 220.
- Hsiao C, Hsiao T H, 1985. Rickettsia as the cause of cytoplasmic incompatibility in the alfalfa weevil, *Hypera postica*. *J. Invert. Pathol.*, 45: 244 – 246.
- Huigens M E, Luck R F, Klaassen R H G, Maas M F P M, Timmermans M J T N, Stouthamer R, 2000. Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405: 178 – 179.
- Hurst G D D, Hammarton T C, Obrycki J J, Tamsin M O, Majerus L E, 1996. Male-killing bacterium in a fifth ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Heredity*, 77: 177 – 185.
- Hurst G D D, Hammarton T C, Bandi C, Majerus T M O, Bertrand D, Majerus M E N, 1997. The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria. *Genet. Res. Camb.*, 70: 1 – 6.
- Hurst G D D, Schilthuisen M, 1998. Selfish genetic elements and speciation. *Heredity*, 80: 2 – 8.
- Hurst G D D, Jiggins F M, Van der Schulenburg J H G, Bertrand D, West S A, 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proc. R. Soc. London.* (B), 266: 735 – 740.
- Hyun W O, Kim M G, Shin S W, Bae K S, Ahn Y J, Park H Y, 2000. Ultrastructural and molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a spider, *Nephila clavata*. *Insect Molecular Biology*, 9 (5): 539 – 543.
- Jeyaprakash A, Hoy M A, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *usp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9 (4): 393 – 405.
- Jiggins F M, Hurst G D D, Majerus M E N, 1998. Sex ratio distortion in *Acraea encedon* is caused by a male-killing bacterium. *Heredity*, 81: 87 – 91.
- Johanowicz D L, Hoy M A, 1995. Molecular evidence for a *Wolbachia* endocytobiont in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 21A: 198.
- Johanowicz D L, Hoy M A, 1998. Experimental induction and termination of nonreciprocal reproductive incompatibilities in a parahaloid mite. *Entomol. Exp. Appl.*, 87: 51 – 58.
- Juchault P, Legrand J J, 1985. Contribution a l'etude du mecanisme de l'etat refractaire a l'hormone androgene chez les Armadillidium vulgare herbergeant une bacterie feminisante. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 463 – 467.
- Juchault P, Frelon M, Bouchon D, Rigaud T, 1994. New evidence for feminizing bacteria in terrestrial isopods: evolutionary implications. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.*, 317: 225 – 230.
- Kageyama D, Hoshizaki S, Ishikawa Y, 1998. Female biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81: 311 – 316.
- Karr T L, 1994. Giant steps sideways. *Curr. Biol.*, 4: 537 – 540.
- King R C, 1970. Ovarian development. *Drosophila Melanogaster*. Academic Press, New York.
- Kose H, Karr T L, 1995. Organization of *Wolbachia pipiens* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by anti-*Wolbachia* monoclonal antibody. *Mech. Dev.*, 51: 275 – 288.
- Laven H, 1957. Vererbung durch Kerngene und das Problem der ausserkaryotischen Vererbung bei *Culex pipiens*. II. Ausserkaryotische Vererbung. *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsleh.*, 88: 478 – 516.
- Laven H, 1959. Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 24: 166 – 173.
- Laven H, 1967. Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature*, 261: 383 – 384.

- Laven H, 1967. Speciation and evolution in *Culex pipiens*. In: Wright J W, Pal R, eds. *Genetics of Insect Vectors of Disease*, Holland: Elsevier. 251 - 275.
- Laven H, Aslamkhan M, 1970. Control of *Culex pipiens* and *C. p. fatigans* with integrated genetical systems. *Pak. J. Sci.*, 22: 303 - 312.
- Legner E F, 1985. Effects of scheduled high temperature on male production in thelytokous *Muscidifurax uniraptor*. *Can. Entomol.*, 117: 383 - 389.
- Legner E F, 1987. Transfer of thelytoky to arrhenotokous *Muscidifurax raptor* Girault and Sanders (Hymenoptera: Pteromalidae). *Can. Entomol.*, 119: 265 - 271.
- LeGrand J J, LeGrand-Hamelin E, Juchault P, 1987. Sex determination in Crustacea. *Biol. Rev.*, 62: 439 - 470.
- Louis C, Nigro L, 1989. Ultrastructural evidence of *Wolbachia* Rickettsiales in *Drosophila simulans* and their relationships with unidirectional cross-incompatibility. *J. Invert. Pathol.*, 54: 39 - 44.
- Louis C, Pinturesu B, Chapelle L, 1993. Research on the origin of unisexuality: thermotherapy cures both rickettsia and thelytokous parthenogenesis in a *Trichogramma* species. *C. R. Acad. Sci. III Paris*, 316: 27 - 33.
- Lus Y Y, 1947. Some rules of reproduction in populations of *Adalia bipunctata*. II. Non-male strains in populations. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 57: 951 - 954.
- Magnin M, Pasteur N, Raymond M, 1987. Multiple incompatibilities within populations of *Culex pipiens* in southern France. *Genetica*, 74: 125 - 130.
- Malloch G, Fenton B, Butcher R D J, 2000. Molecular evidence for multiple infections of a new subgroup of *Wolbachia* in the European raspberry beetle, *Byturus tomentosus*. *Molecular Ecology*, 9: 77 - 90.
- Martin G, Juchault P, Sorokine O, Van Dorsselaer A, 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80: 349 - 354.
- Masui S, Sasaki T, Ishikawa H, 1997. GroE-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. *Zool. Sci.*, 14: 701 - 706.
- Masui S, Sasaki T, Ishikawa H, 1999. The first detection of the insertion sequence ISW1 in the intracellular reproductive parasite *Wolbachia*. *Plasmid*, 42: 13 - 17.
- Mercot H, Liorente B, Jacques M, Atlan A, Montchamp-Moreau C, 1995. Variability within the *Seychelles* cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 141: 1 015 - 1 023.
- Min K T, Benzer S, 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10 792 - 10 796.
- Montchamp-Moreau C, Ferveur J F, Jacques M, 1991. Geographic distribution and inheritance of three cytoplasmic incompatibility types in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 129: 399 - 407.
- O'Neill S L, Karr T L, 1990. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, 348: 178 - 180.
- O'Neill S L, Giordano R, Colbert A M E, Karr T L, Robertson H M, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2 699 - 2 702.
- O'Neill S L, Pettigrew M M, Andreadis T G, Tesh R B, 1995. An *in-vitro* system for culturing *Wolbachia* symbionts of arthropods. *J. Cell Biochem.*, 21A: 210.
- Perrot-Minnot M J, Guo L, Werren J H, 1996. Single and double infections of *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. *Genetics*, 143: 961 - 972.
- Plantard O, Rasplus J Y, 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.
- Poinsot D, Mercot H, 1997. *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans*: does the female host bear a physiological cost. *Evolution*, 51: 180 - 186.
- Reed K M, Werren J H, 1995. Induction of paternal genome loss by the paternal sex-ratio chromosome and cytoplasmic incompatibility bacteria (*Wolbachia*). A comparative study of early embryonic events. *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 408 - 418.
- Rigaud T, Juchault P, Mocuquard J, 1991. Experimental study of temperature effects on the sex ratio of broods in terrestrial Crustacea *Armadillidium vulgare* Latr.: possible implications in natural populations. *J. Evol. Biol.*, 4: 603 - 617.
- Rigaud T, Souty-Grosset C, Raimond R, Mocuquard J, Juchault P, 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. *Endocytobiosis Cell. Res.*, 7: 259 - 273.
- Rigaud T, Juchault P, 1993. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics*, 133 (2): 247 - 252.
- Rigaud T, Rousset F, 1996. What generates the diversity of *Wolbachia*-arthropod interactions? *Biodivers. Conserv.*, 5: 999 - 1 013.
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M, 1992. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. London (B)*, 250: 91 - 98.
- Rousset F, Vauhin D, Solignac M, 1992. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation to host mitochondrial type. *Proc. R. Soc. London (B)*, 247: 163 - 168.
- Rousset F, Stordeur E, 1994. Properties of *Drosophila simulans* strains experimentally infected by different clones of the bacterium *Wolbachia*. *Heredity*, 72: 325 - 331.
- Rousset F, Solignac M, 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbioses during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6 389 - 6 393.
- Roux V, Raoult D, 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.*, 146: 385 - 396.
- Schilthuisen M, Honda J, Stouthamer R, 1998. Parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma kaykai* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) originates from a single infection. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 91: 410 - 414.
- Shoemaker D D, Ross K G, Keller L, Vargo E L, Werren J H, 2000. *Wol-*

- bachia* infections in native and introduced populations of fire ants *Solenopsis* spp. *Insect Molecular Biology*, 9 (6): 661–673.
- Solignac M, Vautrautrin D, Rousset F, 1994. Widespread occurrence of the proteobacteria *Wolbachia* and partial cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. III Paris*, 317: 461–470.
- Stary P, 1999. Biology and distribution of microbe-associated thelytokous populations of aphid parasitoids (Hym., Braconidae, Aphidiinae). *Journal of Applied Entomology*, 123 (4): 231–235.
- Stouthamer R, Luck R F, Hamilton W D, 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2 424–2 427.
- Stouthamer R, Breeuwer J A J, Lucy R F, Werren J H, 1993a. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361: 66–68.
- Stouthamer R, Luck R F, 1993b. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomol. Exp. Appl.*, 67: 317–327.
- Stouthamer R, Werren J H, 1993c. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Invert. Pathol.*, 61: 6–9.
- Stouthamer R, Kazner D J, 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity*, 73: 317–327.
- Stouthamer R, 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. New York: Oxford University Press. 102–124.
- Takafuji A, Fujimoto H, 1985. Reproductive compatibility between populations of the citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acarina: Tetranychidae). *Res. Popul. Ecol.*, 27: 361–372.
- Terry R S, Dunn A M, Smith J E, 1997. Cellular distribution of a feminizing microsporidian parasite: a strategy for transovarial transmission. *Parasitology*, 115: 157–163.
- Thompson J N, 1987. Symbiont-induced speciation. *Biol. J. Linn. Soc.*, 32: 385–393.
- Turelli M, Hoffmann A A, 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature*, 353: 440–442.
- Turelli M, Hoffmann A A, McKechnie S W, 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics*, 132: 713–723.
- Van Meer M M M, Witteveldt J, Stouthamer R, 1999. Detailed phylogeny of *Wolbachia* clones involved in the alteration of its host's phenotype based on the *usp* gene. *Insect Mol. Biol.*, 8: 399–408.
- Vavre F, Girin C, Bouletreau M, 1999. Phylogenetic status of a fecundity-enhancing *Wolbachia* that does not induce thelytoky in *Trichogramma*. *Insect Molecular Biology*, 8 (1): 67–72.
- Wade M J, Chang N W, 1995. Increased male fertility in *Tribolium confusum* beetles after infection with the intracellular parasite *Wolbachia*. *Nature*, 51: 72–74.
- Weisburg W G, Dobson M E, Samuel J E, Dasch G A, Mallavia L P, et al., 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.*, 4 202–4 206.
- Werren J H, 1997. *Wolbachia* and speciation. In: Howard D, Berlocher S, eds. *Endless Forms: Species and Speciation*. New York: Oxford Univ. Press.
- Werren J H, Skinner S W, Huger A M, 1986. Male-killing bacteria in a parasitic wasp. *Science*, 231: 990–992.
- Werren J H, Hurst G D D, Zhang W, Breeuwer J A J, Stouthamer R, Majerus M E N, 1994. Rickettsial relative associated with male-killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.*, 176: 388–394.
- Werren J H, Windsor D, Guo L R, 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. Royal Soc. London (B)*, 262: 197–204.
- Werren J H, Zhang W, Guo L R, 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. London (B)*, 261: 55–63.
- Williams E H, Fields S, Saul G B, 1993. Transfer of incompatibility factors between stocks of *Nasonia* (= *Mormoniella*) *vitripennis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 61: 206–210.
- Wright J D, 1979. The etiology and biology of cytoplasmic incompatibility in the *Aedes scutellaris* group. Ph.Dthesis. Univ. Calif. Los Angeles. 199.
- Yen J H, Barr A R, 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, 232: 657–658.
- Zehori F E, Faktor O, Zeidan M, Gottlieb Y, Czosnek H, Rosen D, 1995. Parthenogenesis-inducing microorganisms in *Aphytis* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Insect Mol. Biol.*, 4: 173–178.
- Zehori F E, Roush R T, Rosen D, 1998. Distribution of parthenogenesis-inducing symbionts in ovaries and eggs of *Aphytis*. *Curr. Microbiol.*, 36: 1–8.
- Zhou W G, Gan B Y, Zhao X Y, Zhao S Y, Li C B, 2001. Isolation and characterization of a transmissible factor in *Wolbachia*. *Progress in Natural Science*, 11 (1): 105–109. [周伟国, 甘波谊, 赵新燕, 赵寿元, 李昌本, 2001. *Wolbachia* 中一个新的可转移遗传因子的分离和鉴定. 自然科学进展, 11 (1): 105–109]
- Zhou W G, Rousset F, O'Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *usp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. (B)*, 265: 509–515.