

# 小麦和大豆蚜虫中内共生菌 *Wolbachia* 的感染检测和系统发育分析

李彤<sup>1,2</sup>, 武予清<sup>1,\*</sup>, 肖金花<sup>2,\*</sup>, 段云<sup>1</sup>, 蒋月丽<sup>1</sup>, 苗进<sup>1</sup>, 巩中军<sup>1</sup>

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 郑州 450002; 2. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学国家重点实验室, 北京 100101)

**摘要:** *Wolbachia* 是一类在节肢动物中广泛感染的胞内共生菌。为了了解其在我国蚜虫中的感染情况, 本研究通过扩增 *wsp* 基因片段对采集自我国多个地区的 3 种小麦蚜虫( 荻草谷网蚜 *Sitobion miscanthi*、麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 和禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*) 和 1 种大豆蚜虫( 大豆蚜 *Aphis glycines*) 样品进行了内共生菌 *Wolbachia* 的感染检测。结果显示: 3 种小麦蚜虫中均未检测出 *Wolbachia*。大豆蚜也仅在采集自北京和杭州的种群中发现了 *Wolbachia* 的感染, 感染率分别为 95.8% 和 22.9%, 并且所检测的个体均为单株系感染。*wsp* 基因序列的比对分析显示, 大豆蚜感染的 *Wolbachia* 株系与多个亲缘关系较远的昆虫物种中所感染的 *Wolbachia* 株系间具有高度一致的基因序列。*wsp* 基因序列构建的系统发育关系和序列一致性均表明大豆蚜感染的 *Wolbachia* 株系属于 B 大组 *CauB* 组。本研究为今后探讨 *Wolbachia* 在我国蚜虫中的寄主范围和株系多样性提供了数据支持。

**关键词:** 荻草谷网蚜; 麦二叉蚜; 禾谷缢管蚜; 大豆蚜; *Wolbachia*; 线粒体基因; *wsp* 基因; 系统发育分析

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)02-0195-06

## Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in wheat and soybean aphids in China

LI Tong<sup>1,2</sup>, WU Yu-Qing<sup>1,\*</sup>, XIAO Jin-Hua<sup>2,\*</sup>, DUAN Yun<sup>1</sup>, JIANG Yue-Li<sup>1</sup>, MIAO Jin<sup>1</sup>, GONG Zhong-Jun<sup>1</sup> (1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

**Abstract:** *Wolbachia* is a group of intracellular symbionts ubiquitous in arthropods. To investigate the *Wolbachia* infection in Chinese aphids, we amplified the *wsp* gene of *Wolbachia* in different geographical populations of three wheat aphids (*Sitobion miscanthi*, *Schizaphis graminum* and *Rhopalosiphum padi*) and one soybean aphid (*Aphis glycines*) in this study. The results showed that *Wolbachia* was not detected in the three wheat aphids. In *A. glycines*, *Wolbachia* was only detected in two geographical populations of Beijing and Hangzhou, with the infection rates of 95.8% and 22.9%, respectively. Moreover, the sequenced samples were infected with single *Wolbachia* strain. The Blastn search results showed that *wsp* gene sequences are similar among *Wolbachia* strains isolated from *A. glycines* and from some distantly related host insect species. The *wsp* gene phylogeny revealed that *Wolbachia* strains isolated from *A. glycines* belong to *Wolbachia* B supergroup, *CauB* group. This study provides the data for further investigation on host range and strain diversity of *Wolbachia* in Chinese aphid species.

**Key words:** *Sitobion miscanthi*; *Schizaphis graminum*; *Rhopalosiphum padi*; *Aphis glycines*; *Wolbachia*; mitochondrial gene; *wsp* gene; phylogenetic analysis

沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 属于变形菌门 (Proteobacteria),  $\alpha$  变形菌纲 (Alphaproteobacteria), 无形体科 (Anaplasmataceae)。研究发现 *Wolbachia* 通过多种方式来操纵寄主的生殖方式, 如诱导胞质不亲和 (Yen and Barr, 1971), 诱导孤雌生殖

(Stouthamer *et al.*, 1993), 杀雄 (Hurst *et al.*, 1993) 和诱导雌性化 (Rigaud *et al.*, 1991)。*Wolbachia* 是一类细胞内共生菌, 对生活的环境要求十分苛刻, 不适用传统细菌培养的方法对其进行检测, 其感染基本上是通过扩增相关基因来确定的, 常用的检测

基金项目: 公益性农业行业科研专项(201103022); 河南农业科学院博士启动基金

作者简介: 李彤, 男, 1984 年 1 月生, 博士, 助理研究员, 主要从事昆虫生态和分子生物学研究, E-mail: tongli84@hotmail.com

\* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yuqingwu36@hotmail.com; xiaojh@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2012-10-23; 接受日期 Accepted: 2012-12-31

基因有 16S rRNA 基因(核糖体基因), *ftsZ* 基因(编码细胞分裂蛋白)和 *wsp* 基因(编码细胞外膜蛋白)。通过使用常规的 PCR 检测技术,研究发现约有 16%~22% 的被检测的昆虫样品感染 *Wolbachia* (Werren *et al.*, 1995; West *et al.*, 1998; Werren and Windsor, 2000), 使用 Long PCR 方法发现 76% 的节肢动物样品(大多数为昆虫)感染 *Wolbachia* (Jeyaprakash and Hoy, 2000)。最近,通过统计学分析,有研究者推断约有 40%~66% 的节肢动物感染 *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Zug and Hammerstein, 2012), 可以说 *Wolbachia* 是昆虫中分布最广泛的内共生菌之一。

蚜虫是一类半翅目昆虫,它们以植物韧皮部的汁液为食,很多种类是重要的农业和经济害虫,可以危害多种重要的粮食和经济作物,给人类的生产生活造成了巨大的损失。全世界蚜虫种类约有 4 400 多种,我国有 1 000 多种,占世界种类的 1/4 (姜丽云等, 2011)。按照目前所推断的 *Wolbachia* 在昆虫中的感染率,蚜虫中也应该有较多的种类感染 *Wolbachia*。但早期涉及蚜虫 *Wolbachia* 感染检测的多个国外研究中 (West *et al.*, 1998; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Haynes *et al.*, 2003; Kittayapong *et al.*, 2003; Nirgianaki *et al.*, 2003; Gómez-Valero *et al.*, 2004; Zchori-Fein and Perlman, 2004), 仅发现褐色桔蚜 *Toxoptera citricida* (Jeyaprakash and Hoy, 2000), 雪松长足大蚜 *Cinara cedri* (Gómez-Valero *et al.*, 2004) 感染,占全部检测蚜虫种类的 6.06% (2/33)。而我国蚜虫种类中,约有 5 种蚜虫曾被检测到感染 *Wolbachia*, 分别是荻草谷网蚜 *Sitobion miscanthi* (Wang *et al.*, 2009), 棉蚜 *Aphis gossypii* (国伟和沈佐锐, 2004), 萝卜蚜 *Lipaphis erysimi*, 甘蓝蚜 *Brevicoryne brassicae* 和桃蚜 *Myzus persicae* (江幸福等, 2009)。近期相关研究表明,可能是由于较低的感染浓度和感染株系间较大的基因变异增加了蚜虫中 *Wolbachia* 检测的难度 (Augustinos *et al.*, 2011)。

为了进一步了解 *Wolbachia* 在我国蚜虫中的分布,本研究对采集自多个地区的 3 种小麦蚜虫(荻草谷网蚜 *S. miscanthi*、麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 和禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*) 和 1 种大豆蚜虫(大豆蚜 *Aphis glycines*) 进行了 *Wolbachia* 的感染检测,结果显示仅在大豆蚜北京和杭州种群中检测到了 *Wolbachia* 的感染;通过对 *wsp* 基因序列的分析,大豆蚜感染的 *Wolbachia* 株系属于 B 大组中的 *CauB* 组。

## 1 材料与方法

### 1.1 蚜虫样品采集

4 种蚜虫(荻草谷网蚜、麦二叉蚜、禾谷缢管蚜和大豆蚜)的采集地、采样数和寄主信息详见表 1。由于蚜虫具有孤雌生殖的特性,为了避免采集到同一母蚜所产的后代,使样本具有代表性,采集时尽量使个体之间相隔较远的距离。采集到的蚜虫立刻浸泡在 95% 的无水乙醇中,便于后续的 DNA 提取和 PCR 扩增。

### 1.2 蚜虫总 DNA 提取和 DNA 质量检测

取出在 95% 酒精浸泡的单头蚜虫,在 75% 酒精中进行多次漂洗以除去蚜虫表面菌污染,然后在无菌水中浸泡 1~2 h 去除酒精。使用烧过的无菌移液器枪头对样品进行研磨,然后使用 DNA 提取试剂盒 (EasyPure Genomic DNA Extraction Kit, 北京全式金公司产品) 对单头蚜虫进行总 DNA 的提取,并通过扩增蚜虫的延伸因子基因 (*ef1 $\alpha$* ) 对 DNA 提取质量进行评估,并在后续的实验中去掉 DNA 质量差的样品。*ef1 $\alpha$*  是蚜虫基因组中的单拷贝基因,相对于多拷贝基因如 28S rRNA 和线粒体基因,它更适用于评估共生菌检测样品的共生菌 DNA 质量 (Wolfgang *et al.*, 2009)。

### 1.3 内共生菌 *Wolbachia* 的检测和 *wsp* 基因的扩增

使用 *Wolbachia* 16S rRNA 基因的通用引物 16SF (5'-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3') 和 16SR (5'-GAATAGGTATRATTTTCATGT-3') (O'Neill *et al.*, 1992) 对样品进行感染检测,选择 *Wolbachia* 感染的榕小蜂 DNA 作为阳性对照 (Xiao *et al.*, 2012), 双蒸水作为阴性对照。为了进一步明确蚜虫所感染 *Wolbachia* 的株系和进化地位,在阳性样品中使用 *wsp81F* (5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3') 和 *wsp691R* (5'-AAAAATTAACCGCTACTCCA-3') (Zhou *et al.*, 1998) 扩增 *Wolbachia* 株系对应的 *wsp* 基因,不通过克隆步骤,直接进行测序(上海生工生物工程有限公司)。PCR 反应体系: 20  $\mu$ L 体系,包括 10  $\mu$ L 2  $\times$  TransTaq-T PCR SuperMix(北京全式金公司),上、下游引物各 0.6  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L,去离子水 7.8  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 38 个循环,每个循环包括: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 53~55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 最后一个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 蚜虫样品采集信息和 *Wolbachia* 感染情况  
Table 1 Aphid samples and their *Wolbachia* infections in China

蚜虫 Aphid species	采样地 Collection locality	经度( E ) / 纬度( N ) Longitude/Latitude	采集日期 Collecting date	寄主 Host plants	检测个体数 Number of individuals tested	<i>Wolbachia</i> 感染个体数 Number of individuals with <i>Wolbachia</i> infection
荻草谷网蚜 <i>Sitobion miscanthi</i>	青海西宁 Xining, Qinghai	101°45′/36°38′	2009-07-02	小麦 Wheat	17	0
	新疆石河子 Shihezi, Xinjiang	84°45′/43°20′	2009-04-25	小麦 Wheat	15	0
	四川江油 Jiangyou, Sichuan	104°42′/31°48′	2009-03-17	小麦 Wheat	15	0
	云南红河 Honghe, Yunnan	102°54′/23°01′	2008-08-24	小麦 Wheat	21	0
	陕西杨凌 Yangling, Shaanxi	108°4′/34°16′	2009-04-02	小麦 Wheat	22	0
麦二叉蚜 <i>Schizaphis graminum</i>	山西太原 Taiyuan, Shanxi	112°5′/37°8′	2009-04-25	小麦 Wheat	10	0
禾谷缢管蚜 <i>Rhopalosiphum padi</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	114°2′/30°5′	2009-05-10	小麦 Wheat	5	0
	江苏南京 Nanjing, Jiangsu	118°7′/32°0′	2009-05-15	小麦 Wheat	15	0
	北京 Beijing	116°4′/39°9′	2009-04-10	小麦 Wheat	5	0
	河南郑州 Zhengzhou, Henan	113°6′/34°7′	2009-05-20	小麦 Wheat	18	0
大豆蚜 <i>Aphis glycines</i>	北京 Beijing	116°4′/39°9′	2008-07-24	大豆 Soybean	24	23
	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	120°1′/30°2′	2008-08-05	大豆 Soybean	35	8
	宁夏六盘山 Liupanshan, Ningxia	106°20′/35°30′	2008-04-03	蒿 Wormwood	5	0

#### 1.4 *wsp* 基因序列测定和分析

使用 MEGA 5.05 软件( Tamura *et al.*, 2011) 对测序所得的原始序列进行拼接, 并对拼接序列的可信性和来源进行评估。由于 *wsp* 基因是蛋白质编码基因, 因此拼接好的序列首先按照细菌遗传密码子表进行翻译, 以检测序列中是否存在错误编码的碱基。然后在 NCBI ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ) 中对核酸序列使用 Blastn 进行比对分析, 根据其最相似序列所对应的物种来确定拼接序列的来源。结合 Zhou( 1998) 的研究结果, 使用 *wsp* 基因序列构建系统发育树, 对 *Wolbachia* 株系和进化地位进行分析。*wsp* 基因的多序列比对使用 MEGA 软件中的 ClustalW 方法进行, 选择软件默认的比对参数, 空位开放罚分 = 15, 空位延伸罚分 = 6.6。选

择邻接法( Neighbor-Joining, NJ) 构建相应 *Wolbachia* 株系间的系统发育关系, 模型选择为 Kimura 2-parameter, 序列间的空位和缺失数据进行比对删除( pairwise deletion)。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚜虫中 *Wolbachia* 的感染情况

参照阳性对照和阴性对照, 结果显示多个地区采集的 3 种小麦蚜虫( 荻草谷网蚜、麦二叉蚜和禾谷缢管蚜) 均没有 *Wolbachia* 感染。而在采集的 3 个大豆蚜种群中, 其中有两个种群中发现了 *Wolbachia* 的感染: 北京种群( 感染率为 95.8% ) 和杭州种群( 感染率为 22.9% ) ( 表 1)。

## 2.2 *wsp* 基因的序列比对分析

对北京和杭州大豆蚜 *Wolbachia* 感染个体进行了 *wsp* 基因的扩增,并分别对其中 3 个样品进行了测序。直接测序结果没有出现重叠峰,表明所测序的感染个体均为 *Wolbachia* 株系单独感染,两个感染种群内多个个体具有相同的 *wsp* 基因序列,而种群间 *wsp* 基因序列也具有高度的一致性,仅在 5' 端含有一个碱基的插入(杭州种群)和缺失(北京种群)。按照细菌密码子表,对得到的两种序列进行翻译,结果显示两种序列均可以正常翻译,表明了

序列中不存在错误编码的碱基。*wsp* 基因序列在 NCBI 中的 Blastn 的比对结果显示,在大豆蚜中检测到的 *Wolbachia* 株系和在多个昆虫物种中已检测到的 *Wolbachia* 株系具有高度的序列一致性(表 2),暗示着 *Wolbachia* 在这些物种中或许发生过水平传播,但是这种推断需要进一步在株系间进行多个基因序列的比对来验证,即 *Wolbachia* Multilocus Sequence Typing(MLST)。*wsp* 基因序列在 NCBI 中的登录号分别为 JX286701(北京感染种群)和 JX286702(杭州感染种群)。

表 2 大豆蚜 *Wolbachia wsp* 基因序列 Blastn 比对结果

Table 2 Blastn results of *wsp* gene sequences of *Wolbachia* from *Aphis glycines*

寄主 Host	最大序列一致性(%) Maximum sequence identity	比对覆盖度(%) Query coverage	E 值 E value	GenBank 登录号 GenBank accession no.
二斑叶螨 <i>Tetranychus urticae</i>	99	100	0.0	GU014542
梭毒隐翅虫 <i>Paederus fuscipes</i>	99	100	0.0	EU916189
斑缘豆粉蝶 <i>Colias erate</i>	99	100	0.0	AB094379
红灰蝶 <i>Lycaena phlaeas</i>	99	100	0.0	AB094377
菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i>	99	100	0.0	AB094374
稻纵卷叶螟 <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	99	100	0.0	HQ336507
伪褐飞虱 <i>Nilaparvata muii</i>	99	100	0.0	GU289811
亚洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	99	100	0.0	GU166595
小弄蝶 <i>Leptalina unicolor</i>	99	100	0.0	AB094387
紫胶虫 <i>Kerria lacca</i>	99	100	0.0	JQ837254

## 2.3 基于 *wsp* 基因的系统发育分析

*wsp* 基因构建的系统发育树(图 1)清楚地显示,大豆蚜感染的 *Wolbachia* 株系位于 B 大组内部,和在 *Ephestia cautella* 和 *Tagosodes orizicolus* 中检测到的 *Wolbachia* 株系聚为一支(Bootstrap 值 = 100)。在该分支中 *Wolbachia* 株系间 *wsp* 基因的最小差异为 0.7%,最大的差异为 2.4%。按照 Zhou 等(1998)提出的在 *Wolbachia* 大组下的小组划分标准,即 *wsp* 基因一致性大于 97.5% 的株系可以分为一组,则大豆蚜所感染的 *Wolbachia* 株系与在 *E. cautella* 和 *T. orizicolus* 中检测到的 *Wolbachia* 株系共同属于 *CauB* 组。

## 3 讨论

本研究中,针对采集自多个地区的 3 种小麦蚜虫和大豆蚜进行了 *Wolbachia* 的感染检测,结果显示仅在采集自北京和杭州的大豆蚜种群中发现了 *Wolbachia* 感染,并且检测的个体均为单株系感染。

北京和杭州大豆蚜种群感染的 *Wolbachia* 株系具有几乎一致的 *wsp* 基因序列,并且和多个昆虫物种中感染的 *Wolbachia* 株系之间存在较高的序列一致性,暗示着大豆蚜和这些昆虫之间可能发生过 *Wolbachia* 的水平传播,但这种推断需要进一步进行 *Wolbachia* 的 MLST 分析才能确定。另外,通过对 *wsp* 基因序列分析发现大豆蚜感染的 *Wolbachia* 株系属于 B 大组中的 *CauB* 组。早期国外(West *et al.*, 1998; Jeyaprakash and Hoy, 2000; Haynes *et al.*, 2003; Kittayapong *et al.*, 2003; Nirgianaki *et al.*, 2003; Gómez-Valero *et al.*, 2004; Zchori-Fein and Perlman, 2004) 和国内研究(国伟和沈佐锐, 2004; 江幸福等, 2009; Wang *et al.*, 2009) 中,蚜虫中仅有小部分种类被检测到 *Wolbachia* 感染,不符合 *Wolbachia* 在昆虫中具有较高感染率的推论。最近的研究表明,可能是由于较低感染浓度和感染株系间较大的基因变异增加了 *Wolbachia* 在蚜虫中的检测难度(Augustinos *et al.*, 2011)。本研究发现, *Wolbachia* 的感染在蚜虫中不同物种间和同种的不同

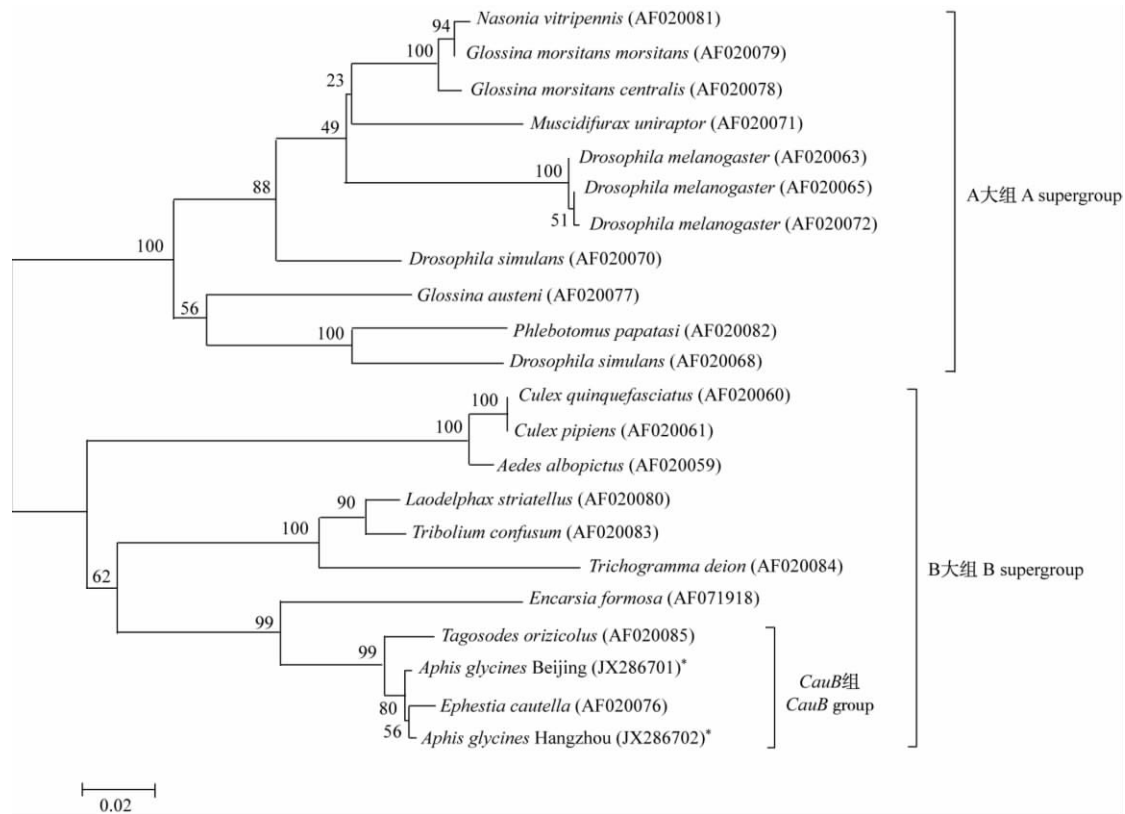


图 1 使用邻接法对 *Wolbachia* 株系间 *wsp* 基因的系统发育分析

Fig. 1 Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic analysis based on *Wolbachia* *wsp* gene sequences

节点附近的数字表示 1 000 次自举检验得到的 Bootstrap 值; 星号表示从大豆蚜虫中扩增得到的 *Wolbachia* 株系; 比例尺表示每个位点的碱基替换数。Numbers near nodes indicate the Bootstrap values from 1 000 replicates. The asterisk highlights the *Wolbachia* strains isolated from *Aphis glycines*. The bar indicates the estimated number of substitutions per site.

地理种群间也存在着较为明显的差异, 而早期对蚜虫中 *Wolbachia* 检测往往选择了较少的个体或单一的地理种群, 这也有可能是 *Wolbachia* 在蚜虫中检出率低的一个原因。另外, 也需注意到蚜虫中具有多种不同类型内共生菌 (Russell *et al.*, 2003), 它们和 *Wolbachia* 具有相同的生态位, 内共生菌物种间的相互竞争也可能导致 *Wolbachia* 在蚜虫种类中的实际感染率较低。总之, 为了更加清楚地了解蚜虫中 *Wolbachia* 的感染和分布情况, 对多个蚜虫物种的检测是必须的, 但是也需考虑到同一蚜虫物种地理种群间的感染差异和其他蚜虫内共生菌感染对 *Wolbachia* 的影响。

*Wolbachia* 在寄主中具有多种作用, 包括诱导胞质不亲和 (Yen and Barr, 1971), 诱导孤雌生殖 (Stouthamer *et al.*, 1993), 杀雄 (Hurst *et al.*, 1993) 和诱导雌性化 (Rigaud *et al.*, 1991)。另外, *Wolbachia* 也可以使寄主的线粒体基因的多态性发生变化。随着 *Wolbachia* 在整个寄主种群中的扩散, 而与其相关联的线粒体类型将在感染种群中扩散,

导致相对于不感染个体, 感染个体线粒体基因的多态性将降低 (Jiggins, 2003; Hurst and Jiggins, 2005)。为了观察 *Wolbachia* 是否会影响大豆蚜感染种群的线粒体基因多态性, 我们将感染和不感染的蚜虫个体的 CO I 基因序列进行了对比, 结果显示它们之间几乎没有发生变异 (677 个碱基只有 2 个变异位点), 表明 *Wolbachia* 的感染可能并没有对大豆蚜的线粒体基因多态性造成影响 (另文发表)。

*Wolbachia* 通过操纵寄主的生殖方式, 产生较多感染的雌性后代或阻止未感染的雌性交配生产以达到维持其在整个种群中的感染 (王哲和乔格侠, 2011)。蚜虫的生殖方式是以产雌孤雌生殖为主, *Wolbachia* 在其他昆虫寄主中所具有的生殖调控的功能是否在蚜虫中依然发挥作用, 又或者, *Wolbachia* 是否在蚜虫中具有新的功能来维持其在蚜虫中的感染, 这将是未来研究蚜虫 *Wolbachia* 的重要方向。

## 参考文献 (References)

- Augustinos AA, Santos-García D, Dionyssopoulou E, Moreira M, Papapanagiotou A, Scarvelakis M, Doudoumis V, Ramos S, Aguiar AF, Borges PA, Khadem M, Latorre A, Tsiamis G, Bourtzis K, 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PLoS ONE*, 6(12): e28695.
- Gómez-Valero L, Soriano-Navarro M, Perez-Brocá V, Heddi A, Moya A, García-Verdugo JM, Latorre A, 2004. Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *J. Bacteriol.*, 186(19): 6626–6633.
- Guo W, Shen ZR, 2004. Molecular identification of *usp* gene of *Wolbachia* infected in *Aphis gossypii* Glover. *J. Microbiol.*, 24(2): 1–3. [国伟, 沈佐锐, 2004. 棉蚜体内感染沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的分子检测. *微生物学杂志*, 24(2): 1–3]
- Haynes S, Darby AC, Daniell TJ, Webster G, Van Veen FJ, Godfray HC, Prosser JI, Douglas AE, 2003. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7216–7223.
- 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 Microbiol. Lett.*, 281(2): 215–220.
- Hurst GD, Jiggins FM, 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. Biol. Sci.*, 272(2): 1525–1534.
- Hurst GDD, Majerus MEN, Walker LE, 1993. The importance of cytoplasmic male killing elements in natural populations of the two spot ladybird, *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Coleoptera: Goccinellidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 49(2): 195–202.
- Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *usp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9(4): 393–405.
- Jiang LY, Qiao GX, Zhang GX, Zhong TS, 2011. Fauna of Agricultural and Forestry Aphids in Northeast China. Science Press, Beijing. 19–20. [姜丽云, 乔格侠, 张广学, 钟铁森, 2011. 东北农林蚜虫志. 北京: 科学出版社. 19–20]
- Jiang XF, Wang L, Zhang L, Luo LZ, 2009. Molecular detection of *Wolbachia* in three species of vegetable aphids collected from Beijing suburb. *Plant Protection*, 35(4): 63–65. [江幸福, 王蕾, 张蕾, 罗礼智, 2009. 蔬菜蚜虫感染沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 的分子检测. *植物保护*, 35(4): 63–65]
- Jiggins FM, 2003. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics*, 164(1): 5–12.
- Kittayapong P, Jamnongluk W, Thipaksorn A, Milne JR, Sindhusake C, 2003. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. *Mol. Ecol.*, 12(4): 1049–1060.
- Nirgianaki A, Banks GK, Frohlich DR, Veneti Z, Braig HR, Miller TA, Bedford ID, Markham PG, Savakis C, Bourtzis K, 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Curr. Microbiol.*, 47(2): 93–101.
- O' Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7): 2699–2702.
- Rigaud T, Souty-Grosset C, Raimond R, Mocquard J, Juchault P, 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. *Endocytobiosis and Cell Research*, 7: 259–273.
- Russell JA, Latorre A, Sabater-Munoz B, Moya A, Moran NA, 2003. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.*, 12: 1061–1075.
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Luck RF, Werren JH, 1993. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361(6407): 66–68.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731–2739.
- Wang Z, Qiao GX, 2011. Current research trends on the endosymbiont *Wolbachia* in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1823–1834. [王哲, 乔格侠, 2011. *Wolbachia* 与昆虫寄主关系研究进展. *应用昆虫学报*, 48(6): 1823–1834]
- Wang Z, Shen ZR, Song Y, Liu HY, Li ZX, 2009. Distribution and diversity of *Wolbachia* in different populations of the wheat aphid *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) in China. *Eur. J. Entomol.*, 106: 49–55.
- Werren JH, Windsor D, Guo L, 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 262(1364): 197–204.
- Werren JH, Windsor DM, 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267(1450): 1277–1285.
- West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray HCJ, 1998. *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Mol. Ecol.*, 7(11): 1457–1465.
- Wolfgang A, Markus R, Dimitrios NA, Christian S, 2009. Evidence for low-titre infections in insect symbiosis: *Wolbachia* in the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytinae). *Environ. Microbiol.*, 11(8): 1923–1933.
- Xiao JH, Wang NX, Murphy RW, Cook J, Jia LY, Huang DW, 2012. *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. *Evolution*, 66(6): 1907–1916.
- Yen JH, Barr AR, 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, 232(5313): 657–658.
- Zehori-Fein E, Perlman SJ, 2004. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol. Ecol.*, 13(7): 2009–2016.
- Zhou W, Rousset F, O' Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *usp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265(1395): 509.
- 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.

(责任编辑: 赵利辉)