

# 不同地区不同寄主植物上孤雌桃蚜及不同蚜型 桃蚜共生菌的多样性

刘艳红<sup>1,2</sup> 马瑞燕<sup>2</sup> 刘同先<sup>1,3\*</sup>

(1. 西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 农业部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2. 山西农业大学农学院, 太谷 030801;  
3. 青岛农业大学植物医学学院, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 为了解桃蚜 *Myzus persicae* 共生菌动态变化的影响因素, 利用诊断 PCR、通用引物 PCR 及 PCR-DGGE 技术检测不同地区、不同寄主植物、不同蚜型桃蚜体内共生菌的种类, 并用诊断 PCR 技术测定桃蚜体内次生共生菌的感染率。结果显示, 不同地区、不同寄主植物、不同蚜型桃蚜体内初生共生菌布赫纳氏菌 *Buchnera aphidicola* 的 16S rRNA 基因序列高度一致。不同地区相同寄主上孤雌桃蚜体内次生共生菌的种类和感染率均不相同。同一地区不同寄主上孤雌桃蚜体内次生共生菌的种类和感染率略有差异。桃树上不同蚜型桃蚜体内次生共生菌种类有很大差异, 孤雌蚜、雌性蚜和雄蚜未感染次生共生菌, 卵和干雌分别感染杀雄菌 *Arsenophonus* 和沃尔巴克氏菌 *Wolbachia*, 干母感染沙雷氏菌 *Serratia symbiotica* 和杀雄菌。表明寄主植物、地理位置和生殖方式都影响桃蚜体内次生共生菌的感染模式, 不同蚜型间次生共生菌菌群变化更大。

**关键词:** 桃蚜; 地区; 寄主植物; 蚜型; 共生菌

## Diversity of endosymbionts in viviparous females of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) collected on different host plants from distinct regions in China and in different morphs collected on peach trees

Liu Yanhong<sup>1,2</sup> Ma Ruiyan<sup>2</sup> Liu Tongxian<sup>1,3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Key Laboratory of IPM of Crop Pests on the Northwest Loess Plateaus of Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 3. College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

**Abstract:** To clarify the influencing factors of endosymbiont dynamics in *Myzus persicae*, diagnostic PCR with specific primers, PCR with universal primers and PCR-denatured gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) were used to detect the type of endosymbionts in viviparous females of *M. persicae* collected on different host plants from distinct regions in China and in different morphs collected on peach trees, and the diagnostic PCR was utilized to examine the infection frequencies of the secondary endosymbionts (S-endosymbionts) in *M. persicae*. The results showed that the partial sequences of 16S rRNA gene of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbionts in all samples showed high similarity among different morphs, regions and host plants. As for the viviparous females collected on the same host plants, the types and infection frequencies of S-endosymbionts were different among regions. The

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB114105), 国家自然科学基金(31272089), 国家现代农业产业技术体系(CARS-25-B-06)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: txliu@qau.edu.cn

收稿日期: 2017-07-26

types and infection frequencies of S-endosymbionts of the viviparous females had little differences in different host plants from the same region. The S-endosymbionts were greatly different among aphid morphs. The viviparous females, oviparous females and males did not harbor S-endosymbionts. *Arsenophonus* was detected in overwintering eggs. *Wolbachia* was screened in fundatrigeniae, and both *Serratia symbiotica* and *Arsenophonus* were found in fundatrices. The results indicated that the factors involving host plant, geographical location and reproductive mode could affect the infection dynamics of S-endosymbionts in *M. persicae*, among which morphs had greater impact on the infection patterns of S-endosymbionts.

**Key words:** green peach aphid; region; host plant; aphid morph; endosymbiont

桃蚜 *Myzus persicae* Sulzer 属半翅目蚜科瘤蚜属, 是一种全球性分布的多食性害虫, 可在 74 科 400 多种植物上取食为害。桃蚜营转寄主生活, 其冬寄主(原生寄主)主要有桃、梨、李等蔷薇科果树, 夏寄主(侨居寄主)主要有甘蓝、白菜、萝卜、油菜、茄子、烟草、菠菜等植物, 可传播 100 多种植物病毒(王圣印等, 2016)。营全周期生活的桃蚜, 在不同季节有不同蚜型, 且在不同地区、不同植物间转主和迁移为害, 给桃蚜的综合治理带来了很大的困难(侯有明等, 1999)。

几乎所有的蚜虫都含有内共生菌, 二者在长期的进化过程中建立了密切的互利共生关系(von Dohlen & Moran, 2000; 李迁等, 2016)。蚜虫的共生菌包括一种垂直传播的专性共生菌(初生共生菌)布赫纳氏菌 *Buchnera aphidicola* 和一种或多种兼性共生菌(次生共生菌)。初生共生菌是蚜虫生长发育所必需的, 能够为蚜虫提供必需营养、提供能源、消化植物及抗杀虫剂等(Douglas, 2015; 刘艳红, 2016)。次生共生菌对蚜虫的生长发育并非必需, 主要赋予蚜虫一些防御特性并提高蚜虫对环境的适应能力(Tsuchida et al., 2004; Vorburger et al., 2013; 李迁等, 2016)。目前, 已鉴定到 9 种蚜虫次生共生菌, 包括 T 型共生肠杆菌 *Hamiltonella defensa*、U 型共生肠杆菌 *Regiella insecticola*、沙雷氏菌 *Serratia symbiotica*(R 型菌)、X 型共生肠杆菌(pea aphid X-type symbiont, PAXS)、立克次氏体 *Rickettsia*(S 型菌)、立克次氏小体 *Rickettsiella*、杀雄菌 *Arsenophonus*、沃尔巴克氏菌 *Wolbachia* 和螺原体 *Spiroplasma* (Simon et al., 2011)。

次生共生菌与豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* 的地理分有密切相关, 如美国的豌豆蚜感染沙雷氏菌、T 型共生肠杆菌、U 型共生肠杆菌和立克次氏体, 且在加利福尼亚种群中沙雷氏菌和立克次氏体感染率非常高, 与抵御当地的高温有密切关系(Chen et al.,

2000); 英国的豌豆蚜通常感染沙雷氏菌、T 型共生肠杆菌、U 型共生肠杆菌和螺原体; 法国的豌豆蚜体内有沙雷氏菌、T 型共生肠杆菌、U 型共生肠杆菌和立克次氏体(Oliver et al., 2010)。日本豌豆蚜的次生共生菌也表现出明显的地理分布型, 几乎所有地区的豌豆蚜都感染沙雷氏菌且感染率非常高, 东北部的豌豆蚜中 U 型共生肠杆菌的感染率比较高, 西南部的豌豆蚜中立克次氏体和螺原体的感染率非常低, 中部个别豌豆蚜品系感染有螺原体(Fukatsu et al., 2001; Tsuchida et al., 2002)。同一地区的不同蚜虫个体可能感染不同类型的次生共生菌, 但是同一个体同时感染 2 种甚至更多种次生共生菌的概率很小, 可能受寄主植物、温度和降水等环境因素影响(Tsuchida et al., 2002)。

次生共生菌参与蚜虫对寄主植物的利用和寄主专化型的形成, 从不同寄主植物上采集的蚜虫常感染不同类型的次生共生菌(刘艳红, 2016)。如白花三叶草上采集的豌豆蚜体内 U 型共生肠杆菌的感染率很高, 而紫花苜蓿和百脉根上采集的豌豆蚜体内 T 型共生肠杆菌的感染率很高(Ferrari et al., 2004; Russell et al., 2013); 感染 U 型共生肠杆菌的豌豆蚜在紫花苜蓿上很难存活(Leonardo & Muiru, 2003); 将长期适应白花三叶草的豌豆蚜的血淋巴注射到取食其它植物的豌豆蚜体内, 后者也可以取食白花三叶草(Tsuchida et al., 2011)。

生殖方式也影响昆虫体内次生共生菌的感染状况(Pan et al., 2012)。次生共生菌的水平传播在昆虫生活的环境中经常发生, 如通过交配(Moran & Dunbar, 2006)、取食植物(Caspi-Fluger et al., 2012)、寄生蜂和螨等天敌(Ahmed et al., 2015)进行传播或直接从环境中获得新的次生共生菌(Kikuchi et al., 2007)。次级共生菌多样的传播方式, 使其可以在同种或不同种昆虫间快速扩散。营全周期生活的桃蚜有不同的蚜型, 进行不同的生殖方式, 干母、干雌、有

翅孤雌型、无翅孤雌型进行无性生殖,雌性蚜、雄蚜和卵进行有性生殖,且不同蚜型为害的主要寄主也不同,蚜虫的多型是对环境条件的一种适应(汪珍春等,2015),而关于桃蚜体内共生菌动态变化的研究鲜有报道。本研究以我国从南到北多个地区不同寄主植物上采集或室内饲养的孤雌桃蚜及陕西省桃树上不同蚜型的桃蚜为对象,检测其体内共生菌的感染类型和感染率,以期明确桃蚜共生菌群动态变化的影响因素,为建立以共生菌为靶标的害虫防治新策略提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试桃蚜:试验所用的无翅和有翅孤雌桃蚜大多数于2013—2015年采自于广东省广州市天河区( $113.3^{\circ}$ E  $23.3^{\circ}$ N)田间的甘蓝和烟草、山西省太谷县( $112.5^{\circ}$ E  $37.4^{\circ}$ N)的桃园桃树、北京市朝阳区( $116.5^{\circ}$ E  $39.8^{\circ}$ N)公园的桃树、辽宁省葫芦岛市( $120.6^{\circ}$ E  $40.9^{\circ}$ N)田间的甘蓝及陕西省杨凌区( $108.1^{\circ}$ E  $34.3^{\circ}$ N)田间或温室的甘蓝、油菜、茄子、烟草、菠菜和桃树上,部分为饲养在实验室甘蓝(秦甘70)、茄子(紫长茄)和烟草(秦烟95)上形成单雌系,所用单雌系遗传背景均一致。试验所用的不同蚜型采自陕西省杨凌区西北农林科技大学桃园。将采集到的桃蚜保存于无水乙醇中,通过形态观察及线粒体细胞色素氧化酶COI标记鉴定后备用(Foottit et al., 2008; 刘艳红, 2016)。

试剂:SDS裂解液(1% SDS、50 mmol/L pH 8.0的Tris-HCl、0.25 mmol/L NaCl、25 mmol/L pH 8.0的EDTA-Na<sub>2</sub>)、TE缓冲液(10 mmol/L pH 8.0的Tris-HCl、1 mmol/L pH 8.0的EDTA-Na<sub>2</sub>)、TaKaRa 2×*rTaq* Premix、Ex *Taq*酶、dNTP Mixture、DH5 $\alpha$ 感受态细胞,宝生物工程(大连)有限公司;100%变性储存液(含7 mol/L尿素和40%甲酰胺)、10%过硫酸铵溶液、pGEM-T Vector载体,美国Promega公司;AxyPre DNA凝胶回收试剂盒,康宁生命科学(吴江)有限公司。

仪器:DK-8D恒温水浴锅,上海森信实验仪器有限公司;5424高速离心机,德国Eppendorf公司;NanoDrop 2000C紫外分光光度计,基因有限公司;ALD1244梯度PCR仪、164-5050核酸电泳仪、Gel-Doc XR+全自动凝胶成像系统、DCode<sup>TM</sup>变性梯度凝胶电泳槽,美国BIO-RAD公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 桃蚜全基因组DNA的提取

参照宋月等(2014)和刘艳红(2016)的SDS法

提取桃蚜的全基因组DNA。蚜虫在75%乙醇中漂洗3次洗掉体表的细菌,再用已灭菌蒸馏水洗去体表残余的酒精,置于1.5 mL离心管内,加100 μL SDS裂解液,用研磨棒充分匀浆,再加100 μL裂解液冲洗研磨棒,65°C水浴30 min,加3 mol/L KAc溶液100 μL,涡旋混匀后冰浴1 h以上,12 000 r/min离心15 min,将上清液转移至新的离心管内,加等体积的异丙醇,轻轻混匀后室温静置10 min,12 000 r/min离心15 min,吸走异丙醇,沉淀用200 μL的70%乙醇洗1次,7 500 r/min离心5 min,吸走酒精,室温干燥5 min左右待乙醇完全挥发后,加入20~40 μL TE缓冲液或ddH<sub>2</sub>O溶解DNA,用紫外分光光度计及1%琼脂糖凝胶检测DNA质量后,-20°C保存备用。

#### 1.2.2 共生菌的诊断PCR和通用引物PCR检测

为了全面准确地检测桃蚜体内的共生菌,本研究采用诊断PCR和通用引物PCR技术检测不同地区、不同寄主植物及不同蚜型桃蚜体内的共生菌。

检测蚜虫共生菌的基因特异性引物和通用引物序列均参考Liu et al.(2016)。根据次生共生菌16S rRNA和23S rRNA基因串联在一起的特点,利用跨越这2个区域的通用引物进行PCR可以有效地检测次生共生菌(Sandström et al., 2001)。诊断PCR和通用引物PCR均为25 μL反应体系,包括2×*rTaq* Premix 12.5 μL、10 μmol/L上下游引物各0.5 μL、DNA模板2 μL、9.5 μL ddH<sub>2</sub>O。反应条件按照Liu et al.(2016)方法进行,95°C预变性5 min;35个循环包括95°C变性30 s,55~58°C退火30 s(不同引物最佳退火温度不同),72°C延伸1 min;72°C延伸10 min。PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳,对目的条带切胶回收,克隆测序。为了提高次生共生菌的检出率,通用引物PCR的每个条带回收产物挑取50个克隆进行测序。

将测序结果进行BLASTn比对,按照伯杰氏系统学手册进行菌种鉴定,序列相似性在60%以上的认为同一菌种,相似性在20%~60%之间的认为是同属不同菌种,序列相似性在20%以下的为不同属的菌种(Krieg & Holt, 1984)。

#### 1.2.3 桃蚜体内次生共生菌感染率的测定

根据刘艳红(2016)、Liu et al.(2016)和Simões et al.(2011)的方法,利用次生共生菌的23S rRNA和16S rRNA基因的快速检测引物23SR-typeF2(5'-AGCGCCGGTAAGGTGATATG-3')和23SR-typeR2(5'-CCGCCCTACTCATCGAACTC-3'),16S Wspecf(5'-CATACCTATTGAAAGGGATAG-3')和16S Wsp-

ecr(5'-AGCTTCGAGTGAAACCAATT-3')测定桃蚜体内的次生共生菌感染率。提取单头桃蚜的DNA,进行诊断PCR,反应体系同1.2.2,扩增条件:95℃变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸6 min。每个地理种群每种寄主植物上随机选择30头桃蚜检测次生共生菌的感染率。

#### 1.2.4 共生菌的PCR-DGGE法检测

采用变性梯度凝胶电泳PCR(PCR-denatured gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)检测陕西省不同寄主植物上采集的孤雌桃蚜、室内不同寄主植物上饲养的孤雌桃蚜及桃树上采集的干母和干雌。PCR-DGGE所用的引物为细菌16S rRNA基因V3区的1对通用引物357F(5'-CCTACGGGAGGCAG-CAG-3')和518R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),GC夹子(CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGG-GCGGGGGCACGGGGGG)加在357F的5'端以保证DNA片段的稳定性并有利于检测发生在高熔点区的突变(丁陈利等,2010)。50 μL PCR反应体系:10×Ex Taq Buffer 5 μL,dNTPs 4 μL、10 μmol/L上下游引物各2 μL,DNA模板5 μL,Ex Taq 0.25 μL,ddH<sub>2</sub>O补足50 μL。扩增条件为:95℃预变性5 min;94℃变性1 min,64~55℃退火1 min(每个循环降低0.5℃),72℃延伸1 min,20个循环;72℃延伸5 min。为了去除异源双链核酸分子,进行修复PCR:95℃预变性30 s;50℃变性30 s,72℃延伸1 min,10个循环;72℃延伸10 min。PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,切下目的条带,置于无菌的1.5 mL离心管中,超纯水清洗2次,晾干表面水分后,用胶回收试剂盒纯化后进行DGGE,即使用8%的聚丙稀酸胺凝胶,变性梯度为40%~65%(Lin et al.,2015)。对分离到的条带切胶回收,克隆测序。测序结果进行BLASTn比对,共生菌种属鉴定方法同1.2.2。

## 2 结果与分析

### 2.1 诊断PCR检测共生菌种类

#### 2.1.1 初生共生菌

不同地区:于广东、陕西、辽宁3省甘蓝上采集的孤雌桃蚜,广东省和陕西省烟草上采集的孤雌桃蚜以及陕西省、山西省和北京市桃树上采集的孤雌桃蚜体内的初生共生菌布赫纳氏菌16S rRNA序列均完全相同,GenBank登录号为KM577346(表1)。

不同寄主:采集于陕西省桃树、油菜、甘蓝、烟草、茄子、菠菜等不同寄主植物上的孤雌桃蚜的布赫

纳氏菌16S rRNA序列完全相同,从广东省甘蓝和烟草上采集的孤雌桃蚜的布赫纳氏菌16S rRNA序列也完全相同,GenBank登录号同上(表1)。

不同蚜型:陕西省桃树上不同蚜型桃蚜体内布赫纳氏菌16S rRNA序列存在差异。雌性蚜、雄蚜和越冬卵内的布赫纳氏菌16S rRNA序列完全相同,GenBank登录号同上,与已报道的马铃薯上采集的桃蚜体内的布赫纳氏菌F009菌株16S rRNA序列(GenBank登录号CP002703)的相似性高达99%;干母和干雌体内的布赫纳氏菌16S rRNA序列完全相同,与孤雌桃蚜相应基因序列相似性为98%(表1)。

#### 2.1.2 次生共生菌

不同地区:广东、陕西、辽宁3省甘蓝上采集的孤雌桃蚜感染不同类型的次生共生菌,广东省甘蓝上孤雌蚜感染沃尔巴克氏菌(GenBank登录号为KM577345),陕西省甘蓝上孤雌蚜感染沙雷氏菌(GenBank登录号KM577348),辽宁省甘蓝上孤雌蚜未检测到已知种类的次生共生菌。广东省和陕西省烟草上采集的孤雌桃蚜也感染不同类型的次生共生菌,广东省烟草上孤雌蚜感染沃尔巴克氏菌(GenBank登录号为KM577345),陕西省烟草上孤雌蚜感染沙雷氏菌(GenBank登录号KM577348)。陕西省、山西省和北京市桃树上采集的孤雌桃蚜次生共生菌也不同,陕西省桃树上孤雌蚜未感染次生共生菌,山西省和北京市桃树上采集的孤雌蚜都感染沃尔巴克氏菌(GenBank登录号KM577345),且16S rRNA基因序列一致,与吉氏集金小蜂*Nasonia giraulti*和长角集金小蜂*N. longicornis*的沃尔巴克氏菌相应基因序列(登录号M84690和M84691)完全一致(表1)。

不同寄主:陕西省不同寄主植物上孤雌桃蚜的次生共生菌也不完全相同,桃树上孤雌蚜未感染次生共生菌,茄子上孤雌蚜同时感染沙雷氏菌(GenBank登录号KM577348)和沃尔巴克氏菌(GenBank登录号KM577345),油菜、甘蓝、烟草和菠菜上孤雌蚜都感染沙雷氏菌(GenBank登录号KM577348),且16S rRNA基因序列一致。广东省甘蓝和烟草上采集的孤雌蚜都感染沃尔巴克氏菌,与陕西省茄子上无翅孤雌蚜及山西省桃蚜和北京市桃树上无翅孤雌蚜的沃尔巴克氏菌16S rRNA基因序列完全一致(表1)。

不同蚜型:陕西省桃树上的干雌感染沃尔巴克氏菌,16S rRNA基因序列与孤雌桃蚜体内沃尔巴克氏菌相应基因序列完全一致;孤雌桃蚜、雌性蚜和雄蚜体内均未检测到已知种类的次生共生菌(表1)。

表1 不同地区、不同寄主、不同蚜型桃蚜体内共生菌的感染情况

Table 1 Infection status of endosymbionts in viviparous females of *Myzus persicae* collected on various host plants from different regions and in different morphs collected on peach trees

采集地点 Location	寄主植物 Host plant	蚜型 Morph	初生共生菌(布赫纳氏菌) P-symbiont ( <i>B. aphidicola</i> )	次生共生菌 S-symbiont	检测方法 Detection method	感染率 (%) Infection frequency
北京 Beijing	桃树 Peach tree	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	北京、广东、山西、辽宁和陕西不 同寄主上孤雌桃蚜体内布赫纳氏 菌 16S rRNA 基因序列一致。	沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	10.0
		有翅孤雌蚜 Alate viviparous female	The partial sequences of 16S rRNA gene of <i>B. aphidicola</i> in viviparous females of <i>M. persicae</i> were the same among different host plants from Beijing, Guangdong, Shanxi, Liaoning and Shaanxi.	沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	10.0
广东 Guangdong	甘蓝 Cabbage	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	10.0	
		烟草 Tobacco	沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	6.7	
山西 Shanxi	桃树 Peach tree	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	6.7	
		甘蓝 Cabbage	-	诊断 PCR Diagnostic PCR	-	
陕西 Shaanxi	油菜 Oilseed rape	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	沙雷氏菌 <i>S. symbiotica</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	100.0	
		甘蓝 Cabbage	沙雷氏菌 <i>S. symbiotica</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	100.0	
陕西 Shaanxi	烟草 Tobacco	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	沙雷氏菌 <i>S. symbiotica</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	100.0	
		茄子 Eggplant	沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia</i>	诊断 PCR 和通 用引物 PCR Diagnostic PCR and PCR with universal primers	80.0	
陕西 Shaanxi	菠菜 Spinach	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	沙雷氏菌 <i>S. symbiotica</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	100.0	
		桃树 Peach tree	干母 Fundatrices	沙雷氏菌 <i>S. symbiotica</i>	通用引物 PCR PCR with universal primers	未测 No test
陕西 Shaanxi	桃树 Peach tree	干雌 Fundatrigeniae	干母和干雌内布赫纳氏菌 16S rRNA 基因序列一致,与孤雌桃 蚜相应基因序列相似性 98%。 The 16S rRNA sequences of <i>B. aphidicola</i> in fundatrices and fundatrigeniae were the same, and had 98% similarity with that in viviparous females.	杀雄菌 <i>Arsenophonus</i>	诊断 PCR Diagnostic PCR	未测 No test
		雄蚜 Male	布赫纳氏菌在雄蚜、雌性蚜和卵 中完全一致,与桃蚜布赫纳氏菌 F009 菌株序列相似性达 99%。	-	诊断 PCR Diagnostic PCR	-
陕西 Shaanxi	桃树 Peach tree	雌性蚜 Female	The 16S rRNA sequences of <i>B. aphidicola</i> in males, females and eggs were the same and had 99%	-	诊断 PCR Diagnostic PCR	-
		卵 Egg	相似性与 F009 病毒株相似性 99%。	杀雄菌 <i>Arsenophonus</i>	通用引物 PCR PCR with universal primers	未测 No test

-表示未检测到次生共生菌。- represents no S-endosymbiont detected in the samples.

## 2.2 通用引物 PCR 检测共生菌种类

检测陕西省茄子上孤雌桃蚜体内次生共生菌时,发现所有测序成功的克隆均为沙雷氏菌(Gen-

Bank 登录号为 KM577347),与豌豆蚜沙雷氏菌 16S rRNA+tRNA-Glu+23S rRNA 序列(GenBank 登录号 AY296732)相似性为 99%。

检测陕西省桃树上干母体内次生共生菌时,发现测序成功的28个阳性重组子中25个克隆与大蚜亚科的沙雷氏菌16S rRNA序列(GenBank登录号KP866544)相似性高达99%;3个克隆与蚜虫*Aphis melosae*的杀雄菌16S rRNA+IGS+23S rRNA序列(GenBank登录号KF824522)相似性高达96%。说明干母同时感染了沙雷氏菌和杀雄菌,由于沙雷氏菌被检测出的概率更高,所以干母体内沙雷氏菌的含量可能比杀雄菌高。

检测陕西省桃树越冬卵的次生共生菌时,发现所有测序成功的克隆与枸杞蚜*Aphis sp.*的杀雄菌16S rRNA+IGS+23S rRNA序列(GenBank登录号为KF824529)相似性高达99%,所以越冬卵感染有杀雄菌。

综上,陕西省桃树上的干雌感染沃尔巴克氏菌,干母感染沙雷氏菌和杀雄菌,卵感染杀雄菌,孤雌桃蚜、雌性蚜和雄蚜体内均未检测到已知种类的次生共生菌(表1)。

### 2.3 次生共生菌的感染率

于广东省、山西省和北京市采集的桃蚜体内的沃尔巴克氏菌感染率很低,广东省甘蓝和烟草上采集的无翅孤雌蚜体内沃尔巴克氏菌感染率分别为10.0%和6.7%,山西省和北京市桃树上采集的无翅孤雌蚜体内沃尔巴克氏菌感染率分别为6.7%和10.0%;陕西省茄子上的孤雌桃蚜体内沃尔巴克氏菌感染率非常高,达80.0%。陕西省油菜、甘蓝、烟草、茄子和菠菜上的孤雌蚜体内沙雷氏菌的感染率均为100.0%。由于样品限制,干母、干雌和卵中次生共生菌的感染率未测定(表1)。

### 2.4 PCR-DGGE 检测共生菌种类

对陕西省不同寄主植物(甘蓝、茄子、烟草、油菜、桃树)上采集的孤雌桃蚜,桃树上采集的干母和干雌以及实验室长期饲养在不同寄主植物(甘蓝、茄子、烟草)上的单雌系孤雌桃蚜体内的共生菌进行检测,PCR扩增产物经DGGE分离后条带分布结果见图1,实验室甘蓝、野外甘蓝、实验室茄子上的孤雌桃蚜及桃树上干母的条带测序成功,比对显示大多数为初生共生菌布赫纳氏菌,其16S rRNA基因序列基本一致,与已报道的桃蚜布赫纳氏菌F009菌株基因序列(GenBank登录号CP002703)相似性为95%~100%,干母的布赫纳氏菌与孤雌桃蚜的相似性达99%~100%(表2)。实验室甘蓝上孤雌桃蚜共生菌测序成功的条带有5条(B-1~B-5),只有1条带B-2为次生共生菌(表2),比对显示与豌豆蚜MR88

品系沙雷氏菌16S rRNA序列(GenBank登录号AB033779)相似性为98%,说明实验室甘蓝上的孤雌桃蚜感染有次生共生菌沙雷氏菌,由于被检测出的概率比布赫纳氏菌更低,所以沙雷氏菌的浓度可能比该菌低很多。

## 3 讨论

本研究表明桃蚜体内初生共生菌几乎不受寄主植物、采集地区及生殖方式的影响。从不同地区不同寄主植物上采集的孤雌桃蚜体内布赫纳氏菌16S rRNA基因序列都一致,大量研究表明具有共生关系的双方——蚜虫和布赫纳氏菌具有严格的系统发育一致性(刘琳等,2013)。不同蚜型桃蚜体内布赫纳氏菌16S rRNA基因序列间有细微差异。雌性蚜、雄蚜和卵中布赫纳氏菌16S rRNA基因序列与干母、干雌及孤雌桃蚜体内相应基因序列不完全相同。营全周期生活的桃蚜中雌性蚜、雄蚜和卵为有性生殖阶段,它们体内的布赫纳氏菌可能由于交配而产生了变异。根据蚜虫和布赫纳氏菌种下水平的平行演化关系,利用布赫纳氏菌的一些基因,包括16S rRNA基因研究蚜虫种群遗传学(刘琳等,2013),推测本试验中不同蚜型体内布赫纳氏菌的差异可能是由于蚜虫种群不同。布赫纳氏菌在蚜虫中专性垂直传播,由亲代卵巢传给胚胎或正在发育的卵(Brinza et al., 2009; 刘艳红, 2016; 张元臣, 2016),尽管不同蚜型桃蚜体内初生共生菌与孤雌桃蚜有细微差别,本研究仍表明初生共生菌在桃蚜体内的传播高度保守。

孤雌桃蚜体内次生共生菌在不同寄主植物间尤其是冬寄主和夏寄主间差异很大。从陕西省冬寄主桃树上采集的孤雌桃蚜中未检测到次生共生菌,从夏寄主甘蓝、油菜、烟草、茄子和菠菜上采集的孤雌桃蚜所有个体均感染沙雷氏菌。孤雌桃蚜从冬寄主迁飞至夏寄主时,经历更复杂的寄主形态、营养、生境等变异,因此冬寄主和夏寄主上孤雌桃蚜体内共生菌差异可能更大。广东省夏寄主甘蓝和烟草上的孤雌桃蚜都感染沃尔巴克氏菌,感染率均较低。推测同一地区有翅孤雌桃蚜在不同夏寄主间迁飞,进行稳定的孤雌生殖,使种群趋于一致,导致体内次生共生菌相似。次生共生菌可以为蚜虫提供获取营养的帮助或与初生共生菌竞争或提供蚜虫必需的营养物质,或赋予蚜虫某些防御功能从而影响蚜虫在寄主植物上的表现,因此不同寄主植物上蚜虫体内次生共生菌的差异可能是由于共生菌的感染更有利

蚜虫适应寄主植物(Oliver et al., 2010)。沙雷氏菌可以提高豌豆蚜抗高温和抗寄生蜂的能力(Montlror et al., 2002; Oliver et al., 2003; 单红伟等, 2016),笔者关于桃蚜沙雷氏菌作用的研究也表明陕西省夏寄主上采集的桃蚜普遍感染该菌可能与提高桃蚜的耐热性和桃蚜对烟蚜茧蜂卵和幼虫的免疫反应有关

(未发表)。Ahmed et al.(2015)研究表明,寄生蜂可以介导昆虫体内次生共生菌的水平传播,本研究检测到茄子上孤雌桃蚜感染的沃尔巴克氏菌,与2种金小蜂中的沃尔巴克氏菌完全一致,由于上述供试桃蚜采自野外,因此其体内的沃尔巴克氏菌可能是由寄生蜂叮刺或寄生行为传播获得。

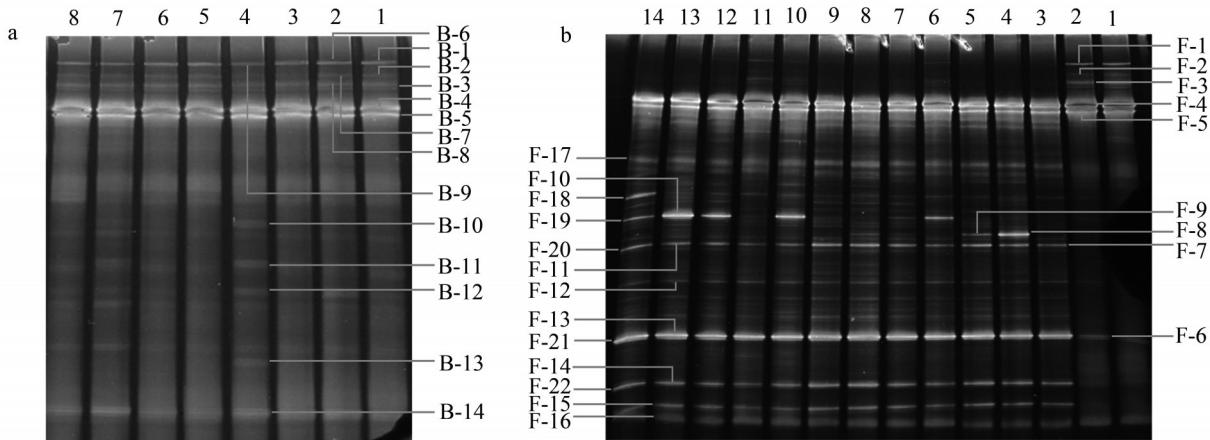


图1 陕西省不同寄主植物上孤雌桃蚜及桃树上不同蚜型桃蚜体内共生菌的PCR-DGGE 检测图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR-denatured gradient gel electrophoresis detecting endosymbionts in viviparous females of *Myzus persicae* collected on various host plants and in different morphs collected on peach trees from Shaanxi Province

a: 电泳时的后板胶, 其上条带记为B-。1~2: 分别为实验室和野外甘蓝上无翅孤雌蚜, 其上条带分别为B-1~B-5和B-6~B-8; 3~5: 实验室茄子上无翅孤雌蚜, 泳道4上条带为B-9~B-14; 6: 野外茄子上无翅孤雌蚜; 7~8: 分别为实验室和野外烟草上无翅孤雌蚜。b: 电泳时的前板胶, 其上条带记为F-。1~2: 实验室甘蓝上有翅孤雌蚜, 泳道2上条带为F-1~F-6; 3~5: 野外油菜上无翅孤雌蚜, 其上条带分别为F-7、F-8、F-9; 6~8: 桃树上无翅孤雌蚜; 9~11: 桃树上干雌; 12~14: 桃树上干母, 泳道13上条带为F-10~F-16, 泳道14上条带为F-17~F-22。a: Back gel and bands on it are denoted as B-. 1~2: endosymbionts in apterous viviparous females on cabbage in the laboratory and in the field and bands are from B-1 to B-5 and from B-6 to B-8, respectively; 3~5: the apterous viviparous females on eggplant in the laboratory and bands on lane 4 are B-9 to B-14; 6: the apterous viviparous female on eggplant in the field; 7~8: the apterous viviparous females on tobacco in the laboratory and in the field, respectively. b: Front gel and bands on it are marked as F-. 1~2: endosymbionts in alate viviparous females on cabbage in the laboratory and bands on lane 2 are from F-1 to F-6; 3~5: the apterous viviparous females on oilseed rape in the field and bands on them are F-7, F-8 and F-9, respectively; 6~8: the apterous viviparous females on peach tree; 9~11: the fundatrices on peach tree; 12~14: fundatrices on peach tree and bands on lane 13 are from F-10 to F-16, and bands on lane 14 are from F-17 to F-22.

蚜虫共生菌的感染状况受地理因素的影响。陕西省和辽宁省甘蓝上采集的孤雌桃蚜体内次生共生菌不同;陕西省和广东省烟草上采集的孤雌桃蚜体内的次生共生菌也不同;陕西省、山西省和北京市桃树上的孤雌桃蚜体内的次生共生菌及感染率也不相同。孤雌桃蚜体内次生共生菌的感染类型和感染率表现出明显的地理分布型,与豌豆蚜、烟粉虱 *Bemisia tabaci* 体内次生共生菌的感染模式相似,都存在明显的地理差异,可能与温度、降水和寄主植物等有关(Tsuchida et al., 2002; Pan et al., 2012)。广东

省、山西省和北京市孤雌桃蚜体内沃尔巴克氏菌的感染率非常低(6.7%~10.0%),而陕西省茄子上孤雌桃蚜体内沃尔巴克氏菌的感染率非常高(80%),与沃尔巴克氏菌“most-or-few”的感染模式一致,蚜虫体内沃尔巴克氏菌的感染率非常高(>90.0%)或者非常低(<10.0%),再次证明蚜虫中该菌感染的普遍性和差异性(Wang et al., 2009; 2014; Augustinos et al., 2011)。目前沃尔巴克氏菌与其它昆虫相互作用的研究已比较深入,但该菌对蚜虫的作用仍不清楚。

表2 陕西省不同寄主植物上孤雌桃蚜及桃树上不同蚜型桃蚜体内共生菌在PCR-DGG检测图上的条带信息

Table 2 Band information of endosymbionts in viviparous females of *Myzus persicae* collected on various host plants and in different morphs collected on peach trees from Shaanxi Province on PCR-DGGE gels

条带 Band	样品来源 Sample source	蚜型 Morph	GenBank 登录号 Accession no.	共生菌信息 Endosymbiont information
B-1	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523325	与桃蚜布赫纳氏菌F009菌株16S rRNA序列一致 This sequence was the same with the reported partial sequence of 16S rRNA gene in <i>B. aphidicola</i> F009 strain
B-2	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523343	与豌豆蚜MR88品系沙雷氏菌16S rRNA序列相似性98% The sequence of B-2 had 98% similarity with the reported partial sequence of 16S rRNA gene in <i>S. symbiotica</i> in <i>A. pisum</i> MR88 clone
B-3	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523326	与B-1序列完全相同 The sequence of B-3 was the same as that of B-1
B-4	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523327	与B-1序列相似性99% The sequence of B-4 had 99% similarity with B-1
B-5	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523328	与B-1序列完全相同 The sequence of B-5 was the same as that of B-1
B-6	野外甘蓝 Cabbage in the field	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523329	与B-1序列完全相同 The sequence of B-6 was the same as that of B-1
B-9	实验室茄子 Eggplant in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523330	与B-1序列相似性95% The sequence of B-9 had 95% similarity with B-1
B-10	实验室茄子 Eggplant in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523331	与B-1序列完全相同 The sequence of B-10 was the same as that of B-1
B-12	实验室茄子 Eggplant in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523332	与B-1序列完全相同 The sequence of B-12 was the same as that of B-1
B-13	实验室茄子 Eggplant in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523333	与B-1序列完全相同 The sequence of B-13 was the same as that of B-1
B-14	实验室茄子 Eggplant in the laboratory	无翅孤雌蚜 Apterous viviparous female	KM523334	与B-1序列完全相同 The sequence of B-14 was the same as that of B-1
F-3	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	有翅孤雌蚜 Alate viviparous female	KM523335	与B-1序列完全相同 The sequence of F-3 was the same as that of B-1
F-4	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	有翅孤雌蚜 Alate viviparous female	KM523336	与B-1序列完全相同 The sequence of F-4 was the same as that of B-1
F-6	实验室甘蓝 Cabbage in the laboratory	有翅孤雌蚜 Alate viviparous female	KM523337	与B-1序列完全相同 The sequence of F-6 was the same as that of B-1
F-11	野外桃树 Peach tree in the field	干母 Fundatrices	KM523338	与B-1序列相似性99% The sequence of F-11 had 99% similarity with B-1
F-14	野外桃树 Peach tree in the field	干母 Fundatrices	KM523339	与B-1序列完全相同 The sequence of F-14 was the same as that of B-1
F-15	野外桃树 Peach tree in the field	干母 Fundatrices	KM523340	与B-1序列完全相同 The sequence of F-15 was the same as that of B-1
F-16	野外桃树 Peach tree in the field	干母 Fundatrices	KM523341	与B-1序列相似性99% The sequence of F-16 had 99% similarity with B-1
F-17	野外桃树 Peach tree in the field	干母 Fundatrices	KM523342	与B-1序列完全相同 The sequence of F-17 was the same as that of B-1

桃树上不同蚜型桃蚜体内次生共生菌的感染类型具有明显差异,进行有性生殖的雌性蚜和雄蚜体内未检测到次生共生菌,但是越冬卵感染了杀雄菌;进行无性生殖的干母同时感染沙雷氏菌和杀雄菌,干母感染有沃尔巴克氏菌,但是孤雌桃蚜未感染次生共生菌。不同共生菌赋予昆虫对环境的适应性不同,不同蚜型桃蚜的生殖方式不同,发生的季节不同,所处的环境包括温度、光周期、降雨、寄主植物类型和营养、天敌、农药使用等也不尽相同,在不同的选择压下,蚜虫通过与其它感染类群交配可能使后代感染其它次生共生菌或调控已经感染的次生共生菌菌群(杨义婷等,2014)。携带次生共生菌意味着竞争消耗自身营养,付出适合度代价,如果对蚜虫生殖不利,则该类次生共生菌在宿主体内可能会慢慢消失(Oliver et al., 2008; Ferrari & Vavre, 2011; 杨义婷等,2014)。因为本试验中所用的不同蚜型的桃蚜采自田间桃树上,其遗传交配及共生菌来源等诸多因素无法控制,所以通过人为获得遗传背景和共生菌感染状态一致的桃蚜,并研究子代各蚜型体内的共生菌,将有助于合理地解释共生菌在桃蚜整个生活史中的发生动态。

Pan et al.(2012)研究表明,遗传因素(生物型、性别)和环境因素(寄主植物、地理位置)能够改变次生共生菌垂直传播的保真度、水平传播的频率及对昆虫的相对适合度。本试验发现寄主植物、地理位置和生殖方式都影响桃蚜体内次生共生菌的感染模式,不同蚜型间次生共生菌菌群变化更大。本研究所用的桃蚜种群有限,为进一步确定以上因素对桃蚜次生共生菌感染模式的影响,应扩大供试桃蚜的数量,进一步丰富样品采集点和采集时间,为桃蚜的治理提供新思路。

## 参 考 文 献 (References)

- Ahmed MZ, Li SJ, Xue X, Yin XJ, Ren SX, Jiggins FM, Greeff JM, Qiu BL. 2015. The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. PLoS Pathogens, 10(2): e1004672
- Augustinos AA, Santos-Garcia D, Dionyssopoulou E, Moreira M, Papanagiotou A, Scarvelakis M, Doudoumis V, Ramos S, Aguilar AF, Borges PAV, et al. 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? PLoS ONE, 6(12): e28695
- Brinza L, Viñuelas J, Cottret L, Calevra F, Rahbé Y, Febvay G, Duport G, Colella S, Rabaté A, Gautier C, et al. 2009. Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Comptes Rendus Biologies, 332(11): 1034–1049
- Caspi-Fluger A, Inbar M, Mozes-Daube N, Katzir N, Portnoy V, Beilausov E, Hunter MS, Zchori-Fein E. 2012. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 279(1734): 1791–1796
- Chen DQ, Montllor CB, Purcell AH. 2000. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 95(3): 315–323
- Ding CL, Wang P, Xiao M. 2010. Optimization of PCR-DGGE conditions for analyzing the diversity of rhizosphere bacteria in wetland. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 39(4): 408–414 (in Chinese) [丁陈利, 王平, 肖明. 2010. PCR-DGGE 分析湿地植物根际土壤细菌群落实验条件优化. 上海师范大学学报(自然科学版), 39(4): 408–414]
- Douglas AE. 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. Annual Review of Entomology, 60: 17–34
- Ferrari J, Darby AC, Daniell TJ, Godfray HCJ, Douglas AE. 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. Ecological Entomology, 29(1): 60–65
- Ferrari J, Vavre F. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 366 (1569): 1389–1400
- Foottit RG, Maw HEL, von Dohlen CD, Hebert PDN. 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. Molecular Ecology Resources, 8(6): 1189–1201
- Fukatsu T, Tsukuda T, Nikoh N, Koga R. 2001. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). Applied and Environmental Microbiology, 67(3): 1284–1291
- Hou YM, Liu SY, Zhou JH, Hu ZD, Hu MR, Zhao YX. 1999. Researches on population dynamics of green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on different host plants. Agricultural Research in the Arid Areas, 17(4): 45–49 (in Chinese) [侯有明, 刘绍友, 周清华, 胡作栋, 胡美绒, 赵耀先. 1999. 不同寄主植物上桃蚜种群动态的研究. 干旱地区农业研究, 17(4): 45–49]
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T. 2007. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. Applied and Environmental Microbiology, 73(13): 4308–4316
- Krieg NR, Holt JG. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London
- Leonardo TE, Muir GT. 2003. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270 (S2): 209–212
- Li Q, Fan J, Sun JR, Wang MQ, Francis F, Chen JL. 2016. Research progress in the interactions among the plants, insects and endosymbionts. Journal of Plant Protection, 43(6): 881–891 (in Chinese) [李迁, 范佳, 孙京瑞, 王满园, Frederic Francis, 陈巨莲. 2016. 昆虫内共生菌-昆虫-植物互作关系研究进展. 植物保护学报, 43(6): 881–891]

- Lin XL, Pan QJ, Tian HG, Douglas AE, Liu TX. 2015. Bacteria abundance and diversity of different life stages of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), revealed by bacteria culture-dependent and PCR-DGGE methods. *Insect Science*, 22(3): 375–385
- Liu L, Huang XL, Qiao GX. 2013. Trends in research on the primary endosymbiont of aphids, *Buchnera aphidicola*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(5): 1419–1427 (in Chinese) [刘琳, 黄晓磊, 乔格侠. 2013. 蚜虫初级内共生菌 *Buchnera aphidicola* 研究进展. *应用昆虫学报*, 50(5): 1419–1427]
- Liu YH. 2016. Role of symbionts in using nitrogen nutrition of host plants and defending against stresses: a case study for *Myzus persicae*. Ph. D Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [刘艳红. 2016. 共生菌在提高桃蚜利用寄主植物氮营养及防御能力中的作用. 博士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Liu YH, Kang ZW, Guo Y, Zhu GS, Rahman Shah MM, Song Y, Fan YL, Jing XF, Liu TX. 2016. Nitrogen hurdle of host alternation for a polyphagous aphid and the associated changes of endosymbionts. *Scientific Reports*, 6: 24781
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2): 189–195
- Moran NA, Dunbar HE. 2006. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34): 12803–12806
- Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS. 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1632): 293–299
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA. 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology*, 55: 247–266
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4): 1803–1807
- Pan H, Li X, Ge D, Wang S, Wu Q, Xie W, Jiao X, Chu D, Liu B, Xu B, et al. 2012. Factors affecting population dynamics of maternally transmitted endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *PLoS ONE*, 7(2): e30760
- Russell JA, Weldon S, Smith AH, Kim KL, Hu Y, Lukasik P, Doll S, Anastopoulos I, Novin M, Oliver KM. 2013. Uncovering symbiont-driven genetic diversity across North American pea aphids. *Molecular Ecology*, 22(7): 2045–2059
- Sandström JP, Russell JA, White JP, Moran NA. 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology*, 10(1): 217–228
- Shan HW, Liu SS, Liu YQ. 2016. Responses of insect holobionts to unfavorable temperatures. *Journal of Plant Protection*, 43(1): 24–31 (in Chinese) [单红伟, 刘树生, 刘银泉. 2016. 昆虫共生体对不利温度的响应. *植物保护学报*, 43(1): 24–31]
- Simões PM, Mialdea G, Reiss D, Sagot MF, Charlat S. 2011. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. *Molecular Ecology Resources*, 11(3): 567–572
- Simon JC, Boutin S, Tsuchida T, Koga R, Le Gallic JF, Frantz A, Outreman Y, Fukatsu T. 2011. Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS ONE*, 6(7): e21831
- Song Y, Fan YL, Wu LJ, Zhang ZF, Liu YH, Liu TX. 2014. Comparison and optimization of genomic DNA extraction from endosymbionts of aphids. *Journal of Plant Protection*, 41(6): 643–648 (in Chinese) [宋月, 樊永亮, 武丽娟, 张战风, 刘艳红, 刘同先. 2014. 蚜虫内共生菌基因组DNA提取方法的比较和优化. *植物保护学报*, 41(6): 643–648]
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T. 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5666): 1989
- Tsuchida T, Koga R, Matsumoto S, Fukatsu T. 2011. Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect. *Biology Letters*, 7(2): 245–248
- Tsuchida T, Koga R, Shibao H, Matsumoto T, Fukatsu T. 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11(10): 2123–2135
- von Dohlen CD, Moran NA. 2000. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71(4): 689–717
- Vorburger C, Ganeshanandamoorthy P, Kwiatkowski M. 2013. Comparing constitutive and induced costs of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Ecology and Evolution*, 3(3): 706–713
- Wang SY, Niu YJ, Liang NN, Liu TX. 2016. Feeding and parasitic functional responses of the parasitoid *Aphelinus asychis* Walker to green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Plant Protection*, 43(2): 267–274 (in Chinese) [王圣印, 牛雨佳, 梁宁宁, 刘同先. 2016. 短翅蚜小蜂对桃蚜的取食和寄生功能反应. *植物保护学报*, 43(2): 267–274]
- 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. *European Journal of Entomology*, 106(1): 49–55
- Wang Z, Su XM, Wen J, Jiang LY, Qiao GX. 2014. Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in Chinese aphids. *Insect Science*, 21(3): 313–325
- Wang ZC, Deng QF, Chen SY, Zheng YS, Jiang LY. 2015. Rapid identification of aphids on *Hibiscus syriacus* Linn. in Guangzhou based on DNA barcoding. *Journal of Environmental Entomology*, 37(3): 583–590 (in Chinese) [汪珍春, 邓其芬, 陈诗颖, 郑毅胜, 姜立云. 2015. DNA条形码快速鉴定广州木槿蚜虫. *环境昆虫学报*, 37(3): 583–590]
- Yang YT, Guo JY, Long CY, Liu H, Wan FH. 2014. Advances in endosymbionts and their functions in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 57(1): 111–112 (in Chinese) [杨义婷, 郭建洋, 龙楚云, 刘怀, 万方浩. 2014. 昆虫内共生菌及其功能研究进展. *昆虫学报*, 57(1): 111–122]
- Zhang YC. 2016. The regulation mechanisms of population density of *Buchnera aphidicola* in *Aphis gossypii* Glover. Ph. D Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [张元臣. 2016. 棉蚜体内原生共生菌 *Buchnera aphidicola* 种群密度的调控机制. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]