植物保护学报 Journal of Plant Protection，2018，45(4)：766-772 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2018.2017010

# 草间钻头蛛共生菌多样性测定及沃尔巴克氏体感染对宿主发育历期和性比的影响

苏其琛[1] 云月利[1*] 胡国文[1] 李长春[2] 彭 宇[1*]

（1. 湖北大学生命科学学院，湖北省生物资源与绿色转化协同创新中心，武汉 430062；2. 湖北工程学院，特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室，孝感 432000）

**摘要：**为了解草间钻头蛛*Hylyphantes graminicola*体内共生菌的组成及共生菌对宿主的影响，通过高通量测序技术确定其体内的优势共生菌，采用常规PCR法对草间钻头蛛进行优势共生菌的感染检测，并研究了优势共生菌感染对草间钻头蛛子代的发育历期和性比的影响。结果表明：经高通量测序细菌16S rDNA的V3、V4区，确定草间钻头蛛的优势共生菌为沃尔巴克氏体*Wolbachia*和*Cardinium*。167头被检测蜘蛛中，*Cardinium*的感染率为100.00%，沃尔巴克氏体的感染率为38.92%。感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛$F_1$代雌蛛的2龄期、3龄期、4龄期和总历期均极显著低于未感染的草间钻头蛛，感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛$F_1$代雌蛛1龄期显著低于未感染的$F_1$代个体，感染和未感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛$F_1$代雌蛛的卵期和5龄期均无显著差异。感染沃尔巴克氏体后，草间钻头蛛$F_1$代雄蛛的1龄期和总历期极显著缩短，2龄期、3龄期和5龄期显著缩短，而卵期和4龄期与未感染沃尔巴克氏体的$F_1$代雄蛛之间无显著差异。另外，沃尔巴克氏体感染极显著提高了草间钻头蛛的子代性比。

**关键词：**草间钻头蛛；共生菌多样性；沃尔巴克氏体；发育历期；性比

# Detection of symbiont diversity in spider *Hylyphantes graminicola* and the impact of *Wolbachia* on developmental duration and sex ratio of host offspring

Su Qichen[1] Yun Yueli[1*] Hu Guowen[1] Li Changchun[2] Peng Yu[1*]

（1. Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China；2. Hubei Key Laboratory for Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, Hubei Province, China）

**Abstract:** In order to understand the symbiont community of spider *Hylyphantes graminicola* and the impact of the symbionts on their hosts, the dominant symbionts were detected with high-throughput sequencing and PCR amplification, and then the effects of dominant symbionts on the developmental duration and sex ratio of $F_1$ generation of *H. graminicola* were tested. The results showed that *Wolbachia* and *Cardinium* were the dominant symbiotic bacteria in *H. graminicola* through high-throughput sequencing of 16S rDNA V3 and V4 regions of the bacteria. The infection rate of *Wolbachia* and *Cardinium* were screened among 167 individuals of *H. graminicola*, and the results showed that the infection rate of C*ardinium* and *Wolbachia* was 100.00% and 38.92%, respectively. The developmental durations of 2nd, 3rd, 4th instars and total duration of the female individuals in $F_1$ generation from *Wolbachia*-positive mother spiders were significantly less than that from *Wolbachia*-negative mother spiders, and the

基金项目：国家自然科学基金(31401982，31672317)，湖北省对外科技合作项目(2016AHB003)

* 通信作者（Authors for correspondence），E-mail：yueliyun@hubu.edu.cn，pengyu@hubu.edu.cn

收稿日期：2017-01-04

duration of 1st instars of the female individuals from *Wobachia*-positive mother was significantly shorter than that from *Wolbachia*-negative mothers, but the durations of egg stage and 5th instars of the female individuals from *Wolbachia*-positive and -negative mothers had no significant difference. For the male offspring, *Wolbachia* infection significantly shortened the 1st, 2nd, 3rd, 5th instar durations and total duration, but the durations of egg stage and 4th instars had no significant difference between the offspring from two types of spiders. The sex ratio (female : male) of offspring infected with *Wolbachia* was significantly elevated.

**Key words:** *Hylyphantes graminicola*; diversity of symbionts; *Wolbachia*; developmental duration; sex ratio

共生菌广泛存在于动物体的细胞和组织内（Burke et al.，2010），对宿主的生殖和生长都有一定程度的影响（McFall-Ngai，2002；Werren et al.，2008；Brucker & Bordenstein，2012）。根据共生菌与宿主的相互作用，有专性共生菌与兼性共生菌之分（Moran，2006），前者为宿主提供生存所必需的营养物质，与宿主是互利共生关系，蚜虫体内的布赫那氏菌 *Buchnera* 是这类共生菌的典型代表（Douglas，1998；Wilson et al.，2006；单红伟等，2016）；后者不是宿主生存所必需，但也会对宿主的生殖和适合度有一定影响（Gunnarsson et al.，2009；云月利等，2013；李迁等，2016）。为了更加深入研究宿主与共生菌的相互作用，国内外学者先后开展了大量关于共生菌感染检测的研究，但多集中于对常见内共生菌沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 在昆虫纲宿主中的分布（Martin & Goodacre，2009；Atyame et al.，2011；Bian et al.，2013）及其对宿主生殖的影响研究（Perlman et al.，2008；Fast et al.，2011；Blagrove et al.，2012），未能对宿主体内的共生菌群落进行全面测定。近年来高通量测序技术的出现，为全面深入了解宿主体内的共生菌群落提供了技术平台，关于昆虫共生菌多样性研究已开展了部分工作（Bili et al.，2016；Muturi et al.，2016），但迄今为止，还未对蜘蛛体内的共生菌进行深入研究。蜘蛛作为一种农林害虫的天敌，开展蜘蛛体内共生菌多样性及共生菌对宿主生殖和适合度影响的研究将为更好地利用蜘蛛进行害虫生物防治提供重要的前提和基础。

蜘蛛内生菌的研究较昆虫内生菌起步晚，但也有大量研究证明蜘蛛体内含有沃尔巴克氏体（Rowley et al.，2004；Wang et al.，2010）、*Cardinium*（Martin & Goodacre，2009）和 *Spiroplasma* 等多种内生菌（Goodacre et al.，2006；Jin et al.，2013），且部分共生菌种类对宿主的生殖和适合度有一定程度的影响（云月利等，2013；Vanthournout et al.，2014；Vanthournout & Hendrickx，2016）。但由于蜘蛛自相残杀的习性，其室内养殖必须单头单管进行，使得蜘蛛的大规模人工养殖尚未实现。再加上部分蜘蛛种类发育历期较长（Foelix，2011），故关于共生菌感染对蜘蛛发育历期的影响研究一直未见报道。

为了更加深入全面地了解蜘蛛共生菌群的组成及共生菌对宿主发育历期和性比的影响，本研究以个体小、年发生代数多、室内养殖方法较为成熟的草间钻头蛛 *Hylyphantes graminicola* 为材料，通过高通量测序细菌 16S rRNA 的 V3、V4 区，对草间钻头蛛体内的共生菌群进行测定，并采用普通 PCR 法对草间钻头蛛体内的优势共生菌感染率进行检测，在此基础上研究优势共生菌感染对草间钻头蛛子代的发育历期及性比的影响，以期为更好地发挥蜘蛛作为农林害虫天敌的生物防治作用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试蜘蛛：成熟的草间钻头蛛于2015年7月采集于河南省洛阳市裴村的玉米植株上，该玉米田无农药使用史。用1.5 cm×5.0 cm指形管于田间单头单管收集该蜘蛛，以脱脂棉球塞住管口，防止逃逸。将采集到的167头雌性草间钻头蛛转入室内智能人工气候箱中，于温度28±1℃、相对湿度（65±5）%、光照周期16 L∶8 D条件下用本实验室培养的不含沃尔巴克氏体的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 饲养，产子代后备用。

试剂：Dneasy Blood & Tissue Kit DNA 提取试剂盒，德国Qiagen公司；DNA Marker，天根生化科技（北京）有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

仪器：智能人工气候箱HP250-GS-C，武汉瑞华仪器设备有限公司；奥林巴斯Olympus SZX7体式显微镜，日本Olympus公司；NanoPhotometer NP80 Touch微量核酸蛋白检测仪，德国Implen GmbH公司；Molecular Imager® Gel Doc XR凝胶成像系统，美国Bio-Rad公司；Illumina HiSeq 2500 高通量测序

仪，美国Illumina公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 草间钻头蛛共生菌多样性检测与分析

选取10头经饥饿处理15 d的草间钻头蛛雌蛛，超声清洗蜘蛛表面3 min，再用无菌水清洗3次后，用DNA提取试剂盒分别提取每头蜘蛛的总DNA。利用微量核酸蛋白检测仪测定每个DNA样品的浓度，10个DNA样品按照两两等浓度混合制成5个混合DNA样品，编号T1~T5，通过Illumina Hiseq 2500高通量测序仪对细菌16S rDNA的V3和V4可变区进行高通量测序并对结果进行生物信息学分析。高通量测序由北京百迈克生物科技有限公司完成。

Illumina HiSeq 2500高通量测序平台获得的原始测序序列，使用FLASH 1.2.7软件进行双端序列拼接，使用Trimmomatic 0.33软件对拼接后的序列进行过滤、UCHIME 4.2软件进行嵌合体鉴定和去除，得到最终有效序列。使用QIIME 1.8.0软件中的UCLUST程序对所有有效序列在97%的相似度水平下进行聚类，如果序列之间的相似性高于97%就将其定义为一个分类操作单元(operational taxanomic units，OTU)，每个OTU对应于一种代表序列。并基于Silva(细菌)分类学数据库对OTU进行分类学注释，在不同分类学水平上未得到注释的以unknown表示。利用维恩图(Venn)展示样品间特有及共有的OUT数。某一共生菌的相对丰度是指其OTU数占宿主菌群总OTU数的百分比。

#### 1.2.2 蜘蛛体内沃尔巴克氏体和*Cardinium*感染检测

待供试的167头草间钻头蛛雌蛛每头产下3个卵袋后，提取母代蜘蛛的DNA，通过常规PCR法检测沃尔巴克氏体和*Cardinium*的感染情况。沃尔巴克氏体检测引物为*wsp*81F(5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3′)和*wsp*691R(5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3′)，*Cardinium*检测引物为Ch-F(5′-TACTGTAAGAATAAGCACCGGC-3′)和CLOR(5′-GCCACTTGTCTTCAAGCTCTACCAAC-3′)，由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。30 μL PCR反应体系：上下游引物各1 μL、*Taq* DNA聚合酶0.5 μL、dNTPs 1 μL、10×Buffer 3 μL、模板0.5 μL、无菌水23 μL。PCR扩增条件：94℃预变性3 min；94℃变性1 min，55℃退火1 min(*Cardinium*退火温度为60℃)，72℃延伸1 min，40个循环；最后72℃延伸7 min，4℃冷却保存。PCR产物用浓度为1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分析，在紫外光下观察DNA条带并记录感染情况，计算共生菌感染率。感染率=感染某一共生菌的草间钻头蛛个数/检测的草间钻头蛛总数×100%。

#### 1.2.3 沃尔巴克氏体感染对子代发育历期影响的测定

自草间钻头蛛母代开始产卵后，每隔24 h观察卵及$F_1$代的发育情况。所有孵化出的子代经过编号后单头单管饲养于1.5 cm×5.0 cm的玻璃试管中，试管底部放置浸润水的人造海绵给蜘蛛提供充足的水分。装有供试蜘蛛的试管置于人工培养箱中在温度28±1℃、相对湿度(65±5)%、光照周期16 L∶8 D条件下以实验室培养的不含沃尔巴克氏体的黑腹果蝇饲养。2龄期喂食经冷冻处死的黑腹果蝇，从3龄期开始喂食活体黑腹果蝇。

沃尔巴克氏体在同一宿主种内主要表现为垂直传播，即由母体传给子代(Werren，1997)，母体草间钻头蛛有沃尔巴克氏体感染，其子代就会有感染。本研究中通过分别检测母体和子代的方法来验证沃尔巴克氏体的垂直传播：若检测到母体蜘蛛有沃尔巴克氏体感染，再随机选取$F_1$代2龄期和3龄期的幼蛛各10头进行沃尔巴克氏体感染检测。若母代与子代检测结果一致，则说明草间钻头蛛有沃尔巴克氏体感染，且遵循垂直传播规律由母体传递给子代。同样的方法检测并确定未感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛个体，从而在实验室建立沃尔巴克氏体感染的草间钻头蛛种群与未感染种群。分别记录沃尔巴克氏体感染和未感染情况下，草间钻头蛛的卵历期、1龄期、2龄期、3龄期、4龄期、5龄期和总发育历期。从产生卵袋开始到孵化出1龄幼蛛之前的时间为卵期，1龄幼蛛体黄白色且透明，生活在卵袋内，2龄幼蛛体色加深，由1龄孵化为2龄后即从卵袋爬出(赵敬钊，1993)。从2龄期开始以蜕皮来判断其是否进入了下一个龄期。

#### 1.2.4 沃尔巴克氏体感染对子代性比影响的测定

用来分析沃尔巴克氏体感染对草间钻头蛛子代性比影响所选取的每头母代蜘蛛，包括沃尔巴克氏体感染和未感染种群，要求其产生的$F_1$代成熟个体数不少于20头。待$F_1$代发育成熟后，在体式显微镜下鉴别蜘蛛的雌雄。记录$F_1$代感染和未感染沃尔巴克氏体草间钻头蛛的雌雄个体数，计算雌雄性比。

### 1.3 数据分析

采用SPSS 20.0统计软件对试验数据进行统计分析，用独立样本的*u*-检验法进行沃尔巴克氏体感染与未感染的草间钻头蛛发育历期间的差异显著性检验，*t*-测验法进行沃尔巴克氏体感染与未感染的草间钻头蛛子代性比间的差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 草间钻头蛛共生菌的多样性

草间钻头蛛体内共生菌多样性测定结果显示，沃尔巴克氏体和*Cardinium*是草间钻头蛛体内占绝对优势的共生菌。样品T1中沃尔巴克氏体的相对丰度为60.73%，*Cardinium*的相对丰度为33.33%；样品T2和T3中沃尔巴克氏体的相对丰度分别达到96.90%和90.14%；样品T4中*Cardinium*的相对丰度为77.22%；样品T5中*Cardinium*的相对丰度为31.96%，立克次氏体属细菌*Rickettsia*的相对分度为27.83%（图1）。所检测的5个混合DNA样品T1~T5全部都有*Cardinium*感染，除样品T5外，其余4个样品都检测到有沃尔巴克氏体感染。

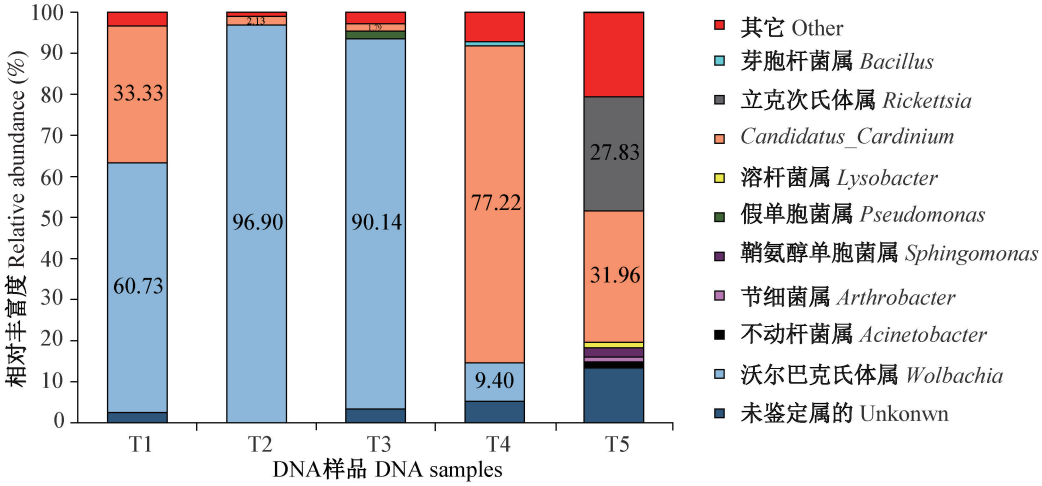


**图1 草间钻头蛛体内共生菌在属水平上的多样性**

Fig. 1 Diversity of symbiotic bacteria at genus level in *Hylyphantes graminicola*

T1~T5：代表5个DNA混合样品。把相对丰富度小于1%的属归为其它，在属分类水平上未得到分类学注释的细菌类群以unknown表示，不同的颜色代表不同属的共生菌。T1−T5：Mixtures of five DNAs. Others indicate the genera of bacteria whose relative abundance is less than 1%. The bacteria without being annotated at genus level were shown with ‘unknown’. Different colors indicate different symbiotic bacteria at genus level.

草间钻头蛛5个混合样品的OUT维恩图结果显示，样品T1~T5共同享有的OUT数为47个，样品T5特有的OUT数为53个，是5个样品中最多的，其次为样品T4，特有OUT数为26个（图2）。

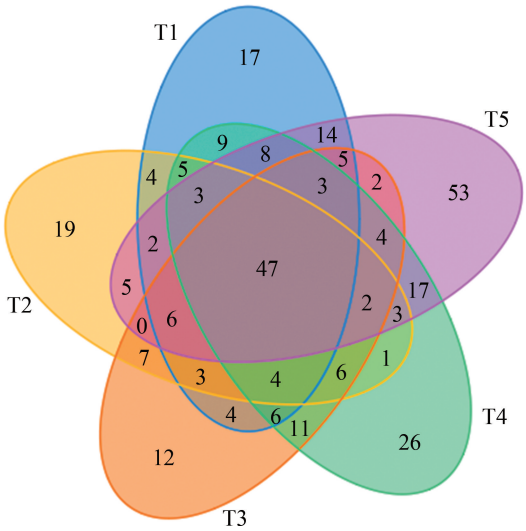


**图2 草间钻头蛛5个DNA混合样品T1~T5间OUT的维恩图**

Fig. 2 OUT Venn diagram between five DNA mixed samples T1−T5 of *Hylyphantes graminicola*

每一种颜色代表一个样品，重叠的区域代表不同样品间共有的OTU数，未重叠的区域代表各样品特有的OTU数。Each color represents one sample. The overlap area represents common OTUs, and the non-overlap area represents specific OTUs.

### 2.2 草间钻头蛛沃尔巴克氏体和*Cardinium*感染结果

经常规PCR检测，167头草间钻头蛛中，感染沃尔巴克氏体的有65头，感染率为38.92%；感染*Cardinium*的有167头，感染率为100.00%。

### 2.3 沃尔巴克氏体感染对草间钻头蛛发育历期的影响

室内养殖获得了无沃尔巴克氏体感染和有沃尔巴克氏体感染的草间钻头蛛雌蛛所产生的$F_1$代共1 329头蜘蛛个体，用于沃尔巴克氏体感染对草间钻头蛛发育历期的影响研究。感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛$F_1$代雌蛛的2龄、3龄、4龄和总的发育历期均极显著低于未感染的草间钻头蛛（$P<0.01$），感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛$F_1$代雌蛛的1龄发育历期显著低于未感染的$F_1$代个体（$P<0.05$），感染和未感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛雌蛛的卵期和5龄发育历期均无显著差异（表1）。

感染沃尔巴克氏体后，草间钻头蛛$F_1$代雄蛛的1龄和总的发育历期极显著缩短（$P<0.01$），2龄、3龄和5龄的发育历期显著缩短（$P<0.05$），而卵期和4龄发育历期在感染和未感染沃尔巴克氏体的雄蛛之间没有显著差异（表1）。

**表1 沃尔巴克氏体感染与未感染草间钻头蛛$F_1$代雌、雄蛛各发育历期的比较**

Table 1 Comparison of the developmental durations of female and male *Hylyphantes graminicola* in $F_1$ generation between *Wolbachia*-positive and -negative groups

| 龄期 Instar | 雌蛛 Female（d） | | | 雄蛛 Male（d） | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 未感染 Negative | 感染 Positive | *P* | 未感染 Negative | 感染 Positive | *P* |
| 卵期 Egg stage | 4.72±0.02 | 4.68±0.03 | 0.158 | 4.69±0.03 | 4.65±0.03 | 0.315 |
| 1龄期 Duration of 1st instar | 2.03±0.01 | 2.01±0.01 | 0.019* | 2.05±0.01 | 2.01±0.01 | 0.003** |
| 2龄期 Duration of 2nd instar | 10.86±0.17 | 9.97±0.20 | <0.001** | 10.56±0.21 | 9.79±0.22 | 0.020* |
| 3龄期 Duration of 3rd instar | 8.18±0.12 | 7.78±0.14 | 0.004** | 8.05±0.14 | 7.62±0.16 | 0.049* |
| 4龄期 Duration of 4th instar | 5.62±0.09 | 5.24±0.10 | 0.003** | 5.32±0.10 | 5.15±0.11 | 0.136 |
| 5龄期 Duration of 5th instar | 5.93±0.10 | 5.81±0.11 | 0.374 | 5.25±0.10 | 4.94±0.09 | 0.023* |
| 总历期 Total duration | 37.34±0.28 | 35.48±0.34 | <0.001** | 35.92±0.35 | 34.14±0.35 | 0.001** |

表中数据为平均数±标准误。**和*分别表示经*u*-检验法检验在$P<0.01$和$P<0.05$水平差异显著。Data are mean±SE. ** or * indicates significant difference at $P<0.01$ or $P<0.05$ level by *u*-test, respectively.

### 2.4 沃尔巴克氏体感染对草间钻头蛛子代性比的影响

筛选获得沃尔巴克氏体感染与未感染的母代草间钻头蛛产生的共1 490头成熟的$F_1$代个体数用于沃尔巴克氏体感染对子代性比影响的分析。未感染沃尔巴克氏体的$F_1$代雌雄性比为1.34±0.04（$n$=789），感染沃尔巴克氏体的$F_1$代雌雄性比为1.61±0.08（$n$=701），感染沃尔巴克氏体的子代雌雄性比较无感染子代极显著提高（$P$=0.005，图3）。

## 3 讨论

蜘蛛作为重要的害虫天敌，其体内共生菌群的检测与分析对于害虫生物防治有着重要的理论指导意义。本研究结果显示，皿蛛科蜘蛛草间钻头蛛体内的优势共生菌为*Cardinium*和沃尔巴克氏体。这与Vanthournout & Hendrickx（2015）对一种小蜘蛛*Oedothorax gibbosus*的共生菌群检测结果一致。内共生菌沃尔巴克氏体和*Cardinium*与宿主可能存在着某种特殊的相互作用。沃尔巴克氏体对草间钻头蛛生殖和适合度的影响已有相关研究报道（云月利等，2013），但关于*Cardinium*与草间钻头蛛宿主的相互作用研究还未见报道，故开展宿主与共生菌相互作用研究依然是目前共生菌研究的核心内容。

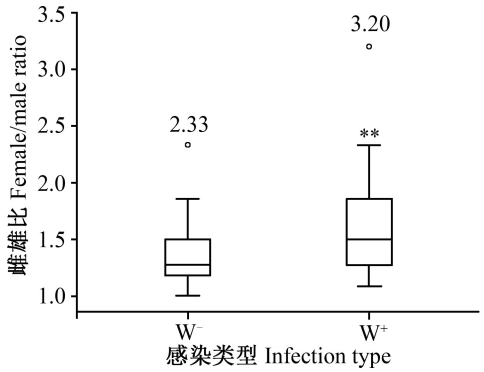


**图3 沃尔巴克氏体感染与未感染草间钻头蛛$F_1$代雌雄性比**

Fig. 3 The female/male ration of *Hylyphantes graminicola* in $F_1$ generation between *Wolbachia*-positive and -negative groups

图中数据为平均数±标准误。**表示经*t*测验法检验在$P<0.01$水平差异显著。$W^-$和$W^+$：分别为未感染和感染沃尔巴克氏体的雌蛛。圆点数值表示离群值。Data are mean±SE. ** indicates significant difference at $P<0.01$ level by *t* test. $W^-$ or $W^+$: female spider without or with *Wolbachia* infection. The dots represent outliers.

沃尔巴克氏体是节肢动物体内主要的内生菌并影响部分宿主的生殖（Goodacre et al.，2006；Duron et al.，2008a，b）。有研究表明沃尔巴克氏体可以影响蜘蛛的性比和交配行为（Gunnarsson et al.，2009；Vanthournout et al.，2014；Vanthournout & Hendrickx，2016）。本研究中感染沃尔巴克氏体的个体与未感染个体之间存在生长发育历期和雌雄性比的差异：感染沃尔巴克氏体的草间钻头蛛个体其总发育历期极显著缩短，雌雄性比极显著高于未感染个体。本研究关于沃尔巴克氏体感染对宿主雌雄性比的影响与之前的研究结果一致，即沃尔巴克氏体感染可以提高被感染宿主的雌雄性比（Gunnarsson et al.，2009；Vanthournout & Hendrickx，2016）。关于沃尔巴克氏体对宿主生长发育历期的影响在蜘蛛中尚未见报道。本研究以年发生代数多的草间钻头蛛为材料，且在草间钻头蛛的低龄期（1龄期和2龄期）饲以冷冻处理的果蝇替代人工饲料或活体果蝇，极大地提高了草间钻头蛛幼蛛的成活率，从而可以进一步研究沃尔巴克氏体对宿主生长发育历期的影响。本研究实现了对草间钻头蛛的室内成功养殖，从而为以草间钻头蛛作模式材料，进一步研究共生菌与蜘蛛宿主之间的相互作用及进化关系奠定了基础。

*Cardinium*和沃尔巴克氏体一样，对宿主的生殖具有调控作用，能引起雌性化（Perlman et al.，2008）、细胞质不亲和（Hunter et al.，2003；刘颖等，2010）和诱导孤雌生殖（Zchori-Fein et al.，2001）。还有报道认为，*Cardinium*能提高宿主的生殖力，对宿主的适合度也有影响（Weeks & Stouthamer，2004；Wang et al.，2008）。本研究中采集于洛阳市裴村的167头草间钻头蛛，*Cardinium*的感染率为100.00%。*Cardinium*在草间钻头蛛中有如此高的感染率，是否预示着此*Cardinium*内共生菌品系与洛阳市的草间钻头蛛宿主之间存在着一种特殊的共生关系，且*Cardinium*共生菌的感染在草间钻头蛛的生长发育和繁殖中起着不可或缺的作用？尽管去除蜘蛛体内共生菌存在一定的难度（云月利等，2013），但研究*Cardinium*与草间钻头蛛之间的相互作用对于进一步揭示蜘蛛宿主与共生菌之间的相互作用具有重要的理论研究意义。

## 参 考 文 献（References）


Atyame CM, Duron O, Tortosa P, Pasteur N, Fort P, Weill M. 2011. Multiple *Wolbachia* determinants control the evolution of cytoplasmic incompatibilities in *Culex pipiens* mosquito populations. Molecular Ecology, 20(2): 286−298

Bian GW, Joshi D, Dong YM, Lu P, Zhou GL, Pan XL, Xu Y, Dimopoulos G, Xi ZY. 2013. *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* population and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. Science, 340(6133): 748−751

Bili M, Cortesero AM, Mougel C, Gauthier JP, Ermel G, Simon JC, Outreman Y, Terrat S, Mahéo F, Poinsot D. 2016. Bacterial community diversity harboured by interacting species. PLoS ONE, 11 (6): e0155392

Blagrove MS, Arias-Goeta C, Failloux AB, Sinkins SP. 2012. *Wolbachia* strain *w*Mel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109 (1): 255−260

Brucker RM, Bordenstein SR. 2012. Speciation by symbiosis. Trends in Ecology & Evolution, 27(8): 443−451

Burke G, Fiehn O, Moran N. 2010. Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids. The ISME Journal, 4(2): 242−252

Douglas AE. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual Review of Entomology, 43: 17−37

Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstädter J, Hurst GD. 2008a. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. BMC Biology, 6: 27

Duron O, Hurst GD, Hornett EA, Josling JA, Engelstädter J. 2008b. High incidence of the maternally inherited bacterium *Cardinium* in spiders. Molecular Ecology, 17(6): 1427−1437

Fast EM, Toomey ME, Panaram K, Desjardins D, Kolaczyk ED, Frydman HM. 2011. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. Science, 334(6058): 990−992

Foelix RF. 2011. Biology of spider (3rd edition). Oxford: Oxford University Press, pp. 432

Goodacre SL, Martin OY, Thomas CFG, Hewitt GM. 2006. *Wolbachia* and other endosymbiont infections in spiders. Molecular Ecology, 15(2): 517−527

Gunnarsson B, Goodacre SL, Hewitt GM. 2009. Sex ratio, mating behaviour and *Wolbachia* infections in a sheetweb spider. Biological Journal of the Linnean Society, 98(1): 181−186

Hunter MS, Perlman SJ, Kelly SE. 2003. A bacterial symbiont in the *Bacteroidetes* induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. Proceedings of the Royal Society of London B, 270: 2185− 2190

Jin Y, Deng C, Qiao HP, Yun YL, Peng Y. 2013. Molecular detection and phylogenetic relationships of three symbiotic bacteria in spiders (Araneae) from China. Entomological News, 123(3): 225−236

Li Q, Fan J, Sun JR, Wang MQ, Frederic 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, 王满囷, 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]

Liu Y, Xie RR, Hong XY. 2010. Manipulation of symbiont *Cardinium* on the reproduction of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). Acta Entomologica Sinica, 53(11): 1233−1240 (in Chinese) [刘颖, 谢蓉蓉, 洪晓月. 2010. 共生菌 *Cardinium* 对朱砂叶螨的生殖调控作用. 昆虫学报, 53(11): 1233−1240]

Martin OY, Goodacre SL. 2009. Widespread infections by the bacterial endosymbiont *Cardinium* in arachnids. Journal of Arachnology, 37 (1): 106−108

McFall-Ngai MJ. 2002. Unseen forces: the influence of bacteria on animal development. Developmental Biology, 242(1): 1−14

Moran NA. 2006. Symbiosis. Current Biology, 16(20): 866−871

Muturi EJ, Ramirez JL, Rooney AP, Dunlap C. 2016. Association between fertilizer-mediated changes in microbial communities and *Aedes albopictus* growth and survival. Acta Tropica, 164: 54−63

Perlman SJ, Kelly SE, Hunter MS. 2008. Population biology of cytoplasmic incompatibility: maintenance and spread of *Cardinium* symbionts in a parasitic wasp. Genetics, 178(2): 1003−1011

Rowley SM, Raven RJ, McGraw EA. 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. Current Microbiology, 49(3): 208−214

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]

Vanthournout B, Hendrickx F. 2015. Endosymbiont dominated bacterial communities in a dwarf spider. PLoS ONE, 10(2): e0117297

Vanthournout B, Hendrickx F. 2016. Hidden suppression of sex ratio distortion suggests red queen dynamics between *Wolbachia* and its dwarf spider host. Journal of Evolutionary Biology, 29(8): 1488−1494

Vanthournout B, Vandomme V, Hendrickx F. 2014. Sex ratio bias caused by endosymbiont infection in the dwarf spider *Oedothorax retusus*. Journal of Arachnology, 42(1): 24−33

Wang JJ, Dong P, Xiao LS, Dou W. 2008. Effects of removal of *Cardinium* infection on fitness of the stored-product pest *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelididae). Journal of Economic Entomology, 101(5): 1711−1717

Wang ZY, Deng C, Yun YL, Jian C, Peng Y. 2010. Molecular detection and the phylogenetic of *Wolbachia* in Chinese spiders (Araneae). Journal of Arachnology, 38(2): 237−241

Weeks AR, Stouthamer R. 2004. Increased fecundity associated with infection by a *Cytophaga*-like intracellular bacterium in the predatory mite, *Metaseiulus occidentalis*. Proceedings of the Royal Society of London B, 271(S4): 193−195

Werren JH. 1997. Biology of *Wolbachia*. Annual Review of Entomology, 42: 587−609

Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nature Reviews Microbiology, 6(10): 741−751

Wilson ACC, Dunbar HE, Davis GK, Hunter WB, Stern DL, Moran NA. 2006. A dual-genome microarray for the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, and its obligate bacterial symbiont, *Buchnera aphidicola*. BMC Genomics, 7: 50

Yun YL, Yang QW, Wang YF, Peng Y, Jiao XG. 2013. The removal and influence of *Wolbachia* on the reproductive and fitness in *Hylyphantes graminicola.* Journal of Plant Protection, 40(2): 145−148 (in Chinese) [云月利, 杨启伟, 王玉凤, 彭宇, 焦晓国. 2013. 草间钻头蛛体内沃尔巴克氏体的去除及其感染对宿主生殖和适合度的影响. 植物保护学报, 40(2): 145−148]

Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, Karr TL, Hunter MS. 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(22): 12555−12560

Zhao JZ. 1993. Spiders in the cotton fields in China. Wuhan: Wuhan Press (in Chinese) [赵敬钊. 1993. 中国棉田蜘蛛. 武汉: 武汉出版社]

（责任编辑：李美娟）