研究论文

华南地区柑橘木虱与柑橘粉虱内共生菌检测及其 *Wolbachia* 共生菌的系统发育关系分析*

孙秀新[1**] 师沛琼[1] 许炜明[1] 覃振强[2] 任顺祥[1] 邱宝利[1***]

(1. 广东省生物农药创制与应用重点实验室，广东省农业害虫生物防治工程技术研究中心，华南农业大学昆虫学系，广州 510640；2. 广西农业科学院甘蔗研究所，南宁 530007)

摘 要 **【目的】** 探明不同地理种群的柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 和柑橘粉虱 *Dialeurodes citri* Ashmead 体内昆虫内共生菌的种类及其感染率，并以 *Wolbachia* 共生菌为代表，对其系统发育关系进行分析，为今后自共生菌角度研发柑橘木虱和柑橘粉虱的新型防控技术奠定基础。**【方法】** 以 16S rDNA、23S rDNA 以及 *wsp* 为目标基因，利用 PCR 技术检测采自于广州、湛江、南宁、桂林、厦门的柑橘木虱以及采自广州的柑橘粉虱体内共生菌的种类及其感染率；利用多位点序列分型（MLST）技术和 MEGA 5.0 软件对不同昆虫样本中的 *Wolbachia* 进行系统发育关系分析。**【结果】** 本研究采集的柑橘木虱和柑橘粉虱均含有原生共生菌 *Portiera* 和次生共生菌 *Wolbachia*、*Cardinium*、*Rickettsia*，但该 3 种次生共生菌在不同木虱与粉虱种群的感染率有所不同；*Arsenophonus* 只在广州和湛江种群的柑橘木虱中检出。基于 *wsp* 基因及 MLST 基因序列的 *Wolbachia* 系统发育分析表明，华南地区柑橘木虱和柑橘粉虱体内的 *Wolbachia* 均属于 *Wolbachia* 的 B 大组 Con 亚组。**【结论】** 不同地理种群的柑橘木虱与柑橘粉虱体内感染的共生菌种类及其感染率不同；*Wolabchia* 共生菌与柑橘木虱寄主不存在协同进化关系，在同一采集点存在 *Wolbachia* 通过柑橘寄主在柑橘木虱之间、柑橘木虱与柑橘粉虱之间水平传播的可能性。

关键词 柑橘木虱，柑橘粉虱，内共生菌，*Wolbachia*，系统进化

Endosymbiont detection and phylogeny of *Wolbachia* in *Diaphorina citri* and *Dialeurodes citri*

SUN Xiu-Xin[1**] SHI Pei-Qiong[1] XU Wei-Ming[1] QIN Zhen-Qiang[2]
REN Shun-Xiang[1] QIU Bao-Li[1***]

(1. Key Laboratory of Bio-pesticide Innovation and Application, Engineering Technology Research Center of Agricultural Pest Biocontrol of Guangdong Province, Department of Entomology, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 2. Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract **[Objectives]** To survey the infection rates of different symbiotic bacteria in different geographic populations of the citrus psyllid and citrus whitefly, and to analyze the phylogenetic relationships between different *Wolbachia* populations in order to provide endosymbiont-based scientific support for the continuous management of the citrus psyllid and citrus whitefly. [**Methods**] Endosymbionts in citrus psyllids from Guangzhou, Zhanjiang, Xiamen, Guilin and Nanning, and citrus whiteflies from Guangzhou, were detected using PCR. The phylogenetic relationships of *Wolbachia* were analyzed using a phylogenetic tree constructed with MEGA 5.0 based on the *Wolbachia wsp* and MLST genes detected in citrus psyllids and citrus whiteflies.

*资助项目 Supported projects：国家公益性行业（农业）科研专项（201303019）；广东省科技计划项目（2014A020208100，2015A020209140）；广州市产学研协同创新重大专项对外合作项目（201604030029）；广州市科技计划项目（201509010023）

**第一作者 First author，E-mail：sunxxcn@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：baileyqiu@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2015-11-25，接受日期 Accepted：2016-03-10

[Results] All citrus psyllid and whitefly populations in the current study were infected with the primary endosymbiont *Portiera* and the secondary endosymbionts *Wolbachia*, C*ardinium*, *Rickettsia*, but infection rates of these three endosymbionts varied between different geographical populations. *Arsenophonus* was only detectable in Guangzhou and Zhanjiang psyllid populations. Phylogenetic analysis revealed that *Wolbachia* endosymbionts in all citrus psyllid and whitefly populations were very similar and belonged to the Con group of the *Wolbachia* B supergroup. **[Conclusion]** The species and infection rates of endosymbionts varied among different geographical populations of the citrus psyllid and whitefly. There is no apparent coevolutionary relationship between *Wolbachia* and its psyllid hosts. Indeed, the high homology of *Wolbachia* in different hosts suggests plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between different psyllid hosts.

Key words citrus psyllid, citrus whitefly, endosymbionts, *Wolbachia*, phylogeny

在自然界中，共生细菌与其宿主昆虫的生长发育、生殖、抵御病原物与天敌昆虫寄生等密切相关（Currie *et al.*，2003；Cardoza *et al.*，2006；Oliver *et al.*，2009；任素丽等，2015）。根据共生菌在宿主昆虫体内的分布，以及与宿主的进化关系，可将昆虫内共生菌分为原生共生菌（Primary symbiont）和次生共生菌（Secondary symbiont）。通常，一种昆虫只有一种原生共生菌，但可以感染多种次生共生菌（Douglas，1998）。在众多昆虫内共生菌中，*Wolbachia* 是迄今为止已知的最广泛存在的内共生菌之一，可以诱导宿主生殖过程中细胞质不亲和、孤雌生殖和遗传上雄性雌性化来调节寄宿主后代的种群（Siozios *et al.*，2008；Ahmed *et al.*，2015）。除 *Wolbachia* 之外，*Cardinium*、*Rickettsia* 都被发现与宿主昆虫的生殖调控相关（Hurst *et al.*，1993；Giorgini *et al.*，2010；张开军等，2010；安璇等，2015；尹祥杰等，2015），同时对宿主昆虫的适合度也有影响（Sakurai *et al.*，2005；Himler *et al.*，2011）；杀雄菌 *Arsenophonus* 对宿主昆虫不仅有杀雄作用，还与宿主昆虫的免疫、营养级寄主适应有关（陈宇等，2014）。

柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 属于半翅目（Hemiptera）木虱科（Chermidae），是柑橘、甜橙、九里香等芸香科植物嫩梢期的主要害虫（Halbert and Manjunath，2004；兰景华，2007），也是已知的传播亚洲柑橘黄龙病（Citrus huanglongbing，HLB）的唯一自然虫媒。柑橘粉虱 *Dialeurodes citri* Ashmead 属于半翅目（Hemiptera）粉虱科（Aleyrodidae），也是一种重要的柑橘害虫，除直接取食叶片汁液造成危害外，排出的蜜露也容易诱发霉污病，近几年在我国柑橘主产区发生危害较为严重（Wang *et al.*，2013）。目前，对柑橘木虱与柑橘粉虱的防控仍然以化学药剂为主，但过多的使用化学药剂容易产生农药残留、环境污染等诸多负面影响。近年来，借助于内共生菌对宿主昆虫生殖及免疫防御的调控功能，进一步研究创新柑橘害虫的防控策略正引起人们的兴趣。柑橘木虱与柑橘粉虱都具有刺吸式口器，在为害同一寄主植物时是否存在内共生菌的水平交流与传播尚不清楚。

本研究利用 PCR 技术，对采自于华南 3 省 5 市的柑橘木虱及广州地区的柑橘粉虱种群内共生菌的种类及感染情况进行了检测，通过多位点序列分型（Multilocus sequence typing，MLST）技术对两种半翅目昆虫体内的 *Wolbachia* 系统发育关系进行了分析，以期为今后柑橘木虱和柑橘粉虱内共生菌的深入研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本试验所用材料为 2012 年分别在广东、广西和福建 3 省 5 个地区采集的柑橘木虱成虫与柑橘粉虱成虫，寄主植物均为砂糖桔。试虫均浸泡于 95%的乙醇中，－20℃冰箱中保存备用。样本详细采集信息见表 1。

1.2　柑橘木虱与粉虱内共生菌模板 DNA 的提取

挑取 ddH_2O 充分洗涤过的柑橘木虱或柑橘粉虱，单头置于 1.5 mL 离心管中，加入 200 μL 裂解抽提液（1% SDS，10 mmol/L pH8.0 Tris-HCl，

25 mmol/L NaCl，25 mmol/L pH8.0 EDTA，2 μL 蛋白酶 K）研磨成匀浆后放入 56℃恒温水浴锅中水浴 3 h；水浴完成后，利用酚/氯仿/异戊醇抽提柑橘木虱与柑橘粉虱的总 DNA，溶于 50 μL TE（PH 7.8）中，置于－20℃冰箱中保存备用。

1.3 内共生菌的 PCR 检测

通过各共生菌的特异性引物（表 2），对柑橘木虱、柑橘粉虱进行原生共生菌 *Portiera* 及次生共生菌 *Wolbachia*、*Cardinium*、*Rickettsia*、*Arsenophonus*、*Hamiltonella*、*Fritschea* 进行检测。7 种共生菌的 PCR 反应体系均为 50 μL：10×PCR buffer （Mg^{2+}plus）5 μL、dNTPs（2.5 mmol/L）4 μL、*Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL、上下游引物（20 μmol/L）各 1 μL、模板 DNA 1 μL、ddH_2O 37.5 μL。PCR 扩增完成后，取 5 μL 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 *Wolbachia* MLST 序列 PCR 扩增

多位点序列分型（Multilocus sequence typing，

表 1 柑橘木虱和柑橘粉虱的采集信息

Table 1 The sampling data of citrus psyllid and citrus whitefly

昆虫种类 Insect species	采集地点 Sampling locality	种群代号 Code of population	采集时间 Collection date	试虫数量（头） Sample number
柑橘木虱 *Diaphorina citri*	广东广州 Guangzhou, Guangdong	GZCP	2012.8	30
	广东湛江 Zhanjiang, Guangdong	ZJCP	2012.8	30
	广西南宁 Nanning, Guangxi	NNCP	2012.8	30
	广西桂林 Guilin, Guangxi	GLCP	2012.8	30
	福建厦门 Xiamen, Fujian	XMCP	2012.8	30
柑橘粉虱 *Dialeurodes citri*	广东广州 Guangzhou, Guangdong	GZCW	2012.9	30

表 2 柑橘木虱与柑橘粉虱内共生菌检测所用引物

Table 2 The PCR primers in endosymbionts detection of citrus psyllid and citrus whitefly

基因 Gene	引物 Primer	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	参考文献 References	产物大小（bp） Size range（bp）
Portiera 16S rDNA	28F	TGCAAGTCGAGCGGCATCAT	Zchori-Fein and Brown，2002	~1 000
	1098R	AAAGTTCCCGCCTTATGCGT		
Wolbachia wsp	wsp-81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	Zhou *et al.*，1998	~600
	wsp-691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA		
Cardinium 16S rDNA	CFB-F	GCGGTGTAAAATGAGCGTG	Weeks *et al.*，2003	~400
	CFB-R	ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT		
Rickettsia 16S rDNA	RB-F	GCTCAGAACGAACGCTATC	Gottlieb *et al.*，2006	~900
	RB-R	GAAGGAAAGCATCTCTGC		
Arsenophonus 23S rDNA	Ars23S-1	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA	Thao and Baumann，2004	~600
	Ars23S-2	GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC		
Hamiltonella 16S rDNA	Ham-F	TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG	Zchori-Fein and Brown，2002	~700
	Ham-R	AGTTCAAGACCGCAACCTC		
Fritschea 23S rDNA	U23F	GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA	Everett *et al.*，2005	~600
	23SIGR	TGGCTCATCATGCAAAAGGCA		

MLST）方法选用管家基因 *gat*B、*cox*A、*hcp*A、*ftsZ* 及 *fbp*A。各基因对应的引物序列及片段长度见表 3，所有引物由广州华大基因科技有限公司合成。各基因的扩增体系均为 30 μL：10×PCR buffer （Mg^{2+}plus） 3 μL、dNTPs（2.5 mmol/L） 2.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL、上下游引物（20 μmol/L）各 1 μL、模板 DNA 1 μL、ddH_2O 21 μL。反应程序为：94℃ 2 min；94℃ 30 s，退火 45 s，72℃ 90 s（37 次循环）；72℃ 5 min。其中 *fbp*A 基因的退火温度为 59℃，其余 4 个基因的退火温度为 54℃。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5　PCR 扩增产物的回收与测序

用 OMEGA 公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收 *Wolbachia wsp* 及管家基因的扩增产物。回收产物交由上海英韦创津（Invitrogen）生物技术有限公司，通过 ABI PRISMTM 3730XL 自动测序分析仪进行双向测定。

1.6　序列分析及系统发育树的构建

将测序公司返回的序列信息导入 MEGA5.0 软件，人工核对每个碱基，并进行序列拼接。利用同源序列搜索引擎 BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST），将拼接完成的序列与 GenBank 中的同源序列进行比对，确定是否为所需目的基因。利用 Clustal X（1.83）软件对 *wsp* 基因序列进行对位排序。管家基因的序列串接使用 Sequence Matrix 软件（Windows-1.7.8）完成。

应用 BLAST 方法从 GenBank 中下载 *Wolbachia* A、B 大组以及外群 F 大组 *Brugiamalayi* 的 *Wolbachia wsp* 基因序列（表 4），结合本研究中的 *Wolbachia wsp* 基因序列，利用 MEGA5.0 软件，利用最大简约法 MP（Maximum parsimony method）构建 *Wolbachia* 的系统发育进化树，自导复制值均设置为 1 000 次，构建的系统发育树利用 FigTree 软件（v 1.4.0）编辑。

2　结果与分析

2.1　柑橘木虱与柑橘粉虱内共生菌的种类及其感染率

检测结果表明，本研究中所采集的 5 个柑橘木虱种群和 1 个柑橘粉虱种群，所有个体均有感染 *Portiera* 原生共生菌。*Wolbachia*、*Cardinium*、*Rickettsia* 3 种次生共生菌在所检测的柑橘木虱

表 3　*Wolbachia* MLST 基因的扩增引物
Table 3　The PCR primers of *Wolbachia* MLST genes

基因 Gene	引物 Primer	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	参考文献 References	片段大小（bp） Size range (bp)
gatB	*gatB*-F	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	Baldo *et al.*，2006	471
	gatB-R	TGGYAAYTCRGGYAAAGATGA		
coxA	*coxA*-F	TTGGRGCRATYAACTTTATAG	Baldo *et al.*，2006	487
	coax-R	CTAAAGACTTTKACRCCAGT		
ftsZ	*ftsZ*-F	ATYATGGARCATATAAARGATAG	Baldo *et al.*，2006	524
	ftsZ-R	TCRAGYAATGGATTRGATAT		
hcpA	*hcpA*-F	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	Baldo *et al.*，2006	515
	hcpA-R	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG		
fbpA	*fbpA*-F	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	Baldo *et al.*，2006	509
	fbpA-R	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC		
wsp	*wsp*81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	Zhou *et al.*，1998	600
	*wsp*691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA		

表 4 ***Wolbachia*** 系统发育分析的参考序列

Table 4 The reference sequences of *Wolbachia wsp* gene in phylogeny analysis

组 Group	亚组 Subgroup	寄主 Host	登录号 GenBank accession number
Supergroup A	Haw	*Drosophila simulans*	AF020067
	Pap	*Phlebotomus papatasi*	AF020082
	Aus	*Glossina austeni*	AF020077
	Ri	*Drsophila simulans*	AF020070
	Mel	*Drsophila melanogaster*	AF020063
	Mel	*Drsophila melanogaster*	AF020064
	Mel	*Drsophila simulans*	AF020072
	AlbA	*Aedes albopictus*	AF020058
	Uni	*Muscidifurax uniraptor*	AF020071
	Kue	*Ephestia kuehnlella*	AF071911
	MorS	*Glossina morsitans*	AF020078
	MorS	*Glossina morsitans*	AF020079
Supergroup B	Con	*Tribolium confusum*	AF020083
	Stri	*Laodelphax striatellus*	AF020080
	Dei	*Trichogramma deion*	AF020084
	Kay	*Trichogramma kaykai*	AF071924
	Div	*Apo anagyrus diversicornis*	AF071916
	Pip	*Aedes albopictus*	AF020059
	Pip	*Culex pipiens*	AF020061
Supergroup F	——	*Brugia malayi*	AJ252061

和柑橘粉虱种群中都有个体感染，但各种群的感染率不同。柑橘木虱种群中 *Arsenophonus* 和 *Hamiltonella* 仅在广西南宁种群中未检测到，*Fritschea* 仅在广东广州种群中检测到，但感染率非常低（表 5）。

Arsenophonus、*Hamiltonella* 及 *Fritschea* 在柑橘粉虱中均未检测到。在次生共生菌中，*Wolbachia* 在所有供试种群中的感染率最高。广州地区柑橘木虱与柑橘粉虱样本的共生菌 PCR 检测结果见图 1，图 2。

表 5 柑橘木虱、柑橘粉虱样本中各类共生菌的感染率（%）

Table 5 The infections of various endosymbionts in citrus psyllid and citrus whitefly (%)

种群代号 Population code	*Wolbachia*	*Cardinium*	*Rickettsia*	*Arsenophonus*	*Hamiltonella*
GZCP	100	30	30	30	10
ZJCP	100	20	20	10	20
NNCP	80	20	20	20	20
GLCP	90	10	10	0	0
XMCP	100	20	30	10	10
GZCW	40	20	30	0	0

2.2　基于 *wsp* 基因的不同柑橘木虱与柑橘粉虱的 *Wolbachia* 系统发育分析

经 NCBI 基因库比对，本研究中柑橘木虱和柑橘粉虱种群 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列与

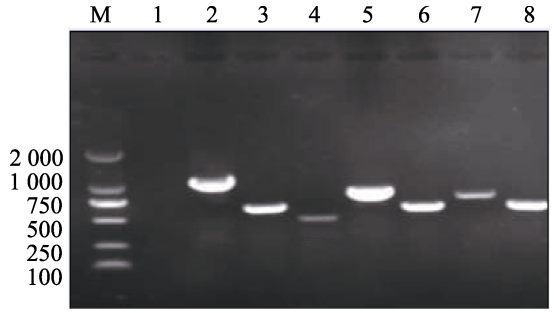

图 1　广州柑橘木虱种群内共生菌的 PCR 检测
Fig. 1　The PCR detection of *Diaphorina citri* in Guangzhou

M: Marker DL2000; 1: 阴性对照 Negative control; 2: *Portiera*; 3: *Wolbachia*; 4: *Cardinium*; 5: *Rickettsia*; 6: *Arsenophonus*; 7: *Hamiltonella*; 8: *Fritschea*. 图 2 同。The same with Fig. 2.

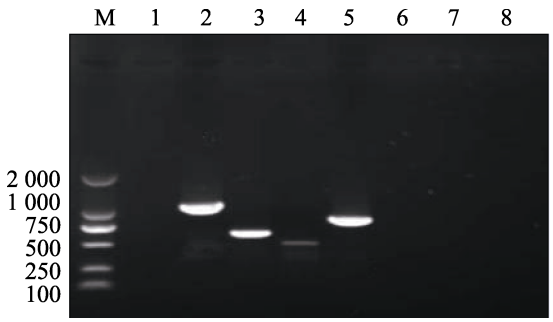

图 2　广州柑橘粉虱种群内共生菌的 PCR 检测
Fig. 2　The PCR detection of *Dialeurodes citri* in Guangzhou, Guangdong

GenBank 中诸多已经登记的 *Wolbachia wsp* 基因序列的同源性高达 98%以上。广州、湛江、桂林和南宁 5 个地区柑橘木虱及广州地区柑橘粉虱所感染 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列同源性为 100%。此外，利用最大简约法构建的 MP 系统发育树表明，我国 5 个不同地区的柑橘木虱和广州地区的柑橘粉虱体内感染的 *Wolbachia* 属于 B 大组的 Con 亚组（图 3）。

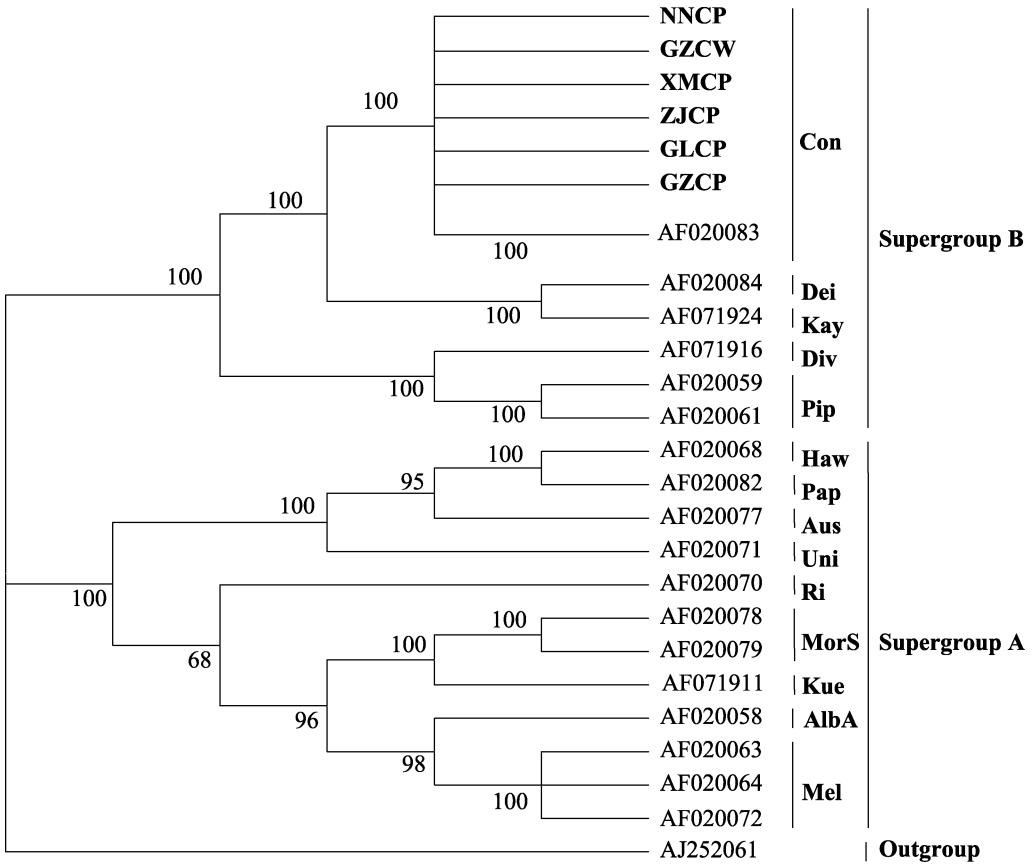

图 3　基于 *wsp* 基因序列的 *Wolbachia* 系统发育树（MP 法）
Fig. 3　The phylogenetic tree of *Wolbachia* based on *wsp* gene (MP)

2.3 基于 MLST 基因的不同柑橘木虱与柑橘粉虱的 *Wolbachia* 系统发育分析

将本研究中柑橘木虱与柑橘粉虱的 *Wolbachia* 5 个 MLST 基因序列分别输入 *Wolbachia* 数据库 http://pubmlst.org/*Wolbachia*/中，在线比对得出各种群所感染 *Wolbachia* 的序列型。结果表明，广州、桂林和南宁的柑橘木虱样本所感染 *Wolbachia* 大部分属于 ST173 型；除此之外，湛江柑橘木虱样本 *Wolbachia* 还有 ST175 型；厦门柑橘木虱样本 *Wolbachia* 分别属于 ST225 型和 ST175。广州柑橘粉虱的 *Wolbachia* 属于 ST173（表 6）。

利用 MP 法构建基于 5 个 MLST 基因复合序列的 *Wolbachia* 系统发育树，结果表明，本研究中柑橘木虱和柑橘粉虱种群感染的 *Wolbachia*（ST173，ST175，ST225）与参考 MLST 序列 *Wolbachia* B 大组 Con 亚组的 ST30 聚为一枝，这表明所测种群感染的 *Wolbachia* 均属于 B 大组的 Con 亚组，与基于 *wsp* 基因构建的 *Wolbachia* 系统进化树所显示的结果一致（图 5）。

表 6 柑橘木虱、柑橘粉虱体内 ***Wolbachia*** **MLST** 分析

Table 6 The MLST analysis of *Wolbachia* in citrus psyllid and citrus whitefly

种群代号 Code of population	寄主 Host	MLST 基因 MLST genes					
		ST	*gatB*	*coxA*	*hcpA*	*ftsZ*	*fbpA*
GZCP	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	173	109	86	29	81	27
GZCW	柑橘粉虱 *Diaphorina citri*	173	109	86	29	81	27
ZJCP-1	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	173	109	86	29	81	27
ZJCP-2	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	175	109	86	29	81	27
GLCP	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	173	109	86	29	81	27
NNCP	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	173	109	86	29	81	27
XMCP-1	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	173	109	86	29	81	27
XMCP-2	柑橘木虱 *Diaphorina citri*	225	140	66	112	29	27

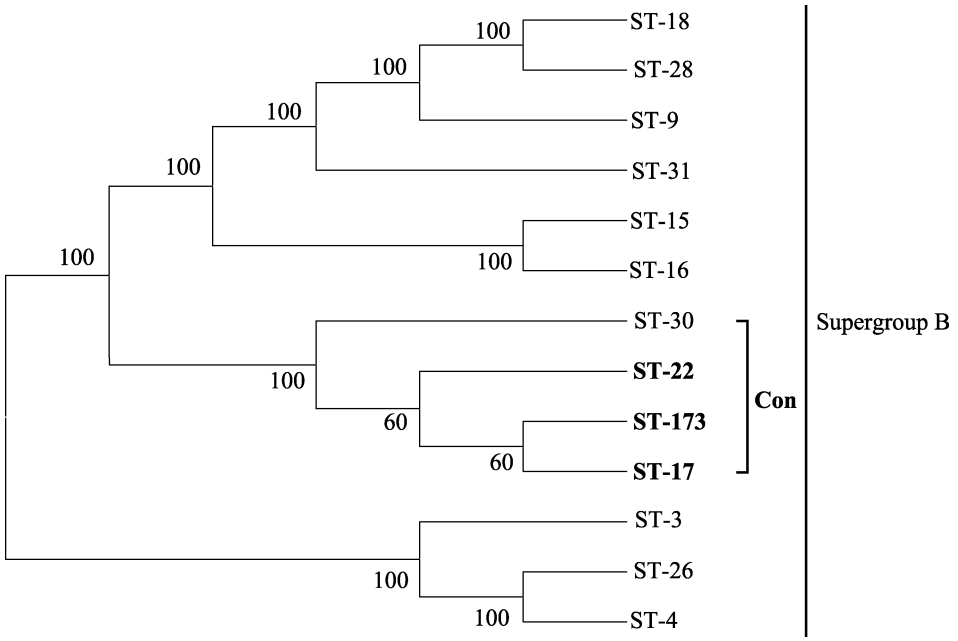

图 4 基于 **MLST** 基因序列的 ***Wolbachia*** 系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of *Wolbachia* based on MLST genes

3　讨论

柑橘木虱与柑橘粉虱都是柑橘等芸香科植物上的主要害虫，柑橘木虱是柑橘黄龙病在田间传播、流行的主要媒介昆虫，而柑橘粉虱则主要诱发柑橘煤烟病，导致柑橘树大量死亡，对世界柑橘产业造成了巨大的经济损失。另一方面，包括柑橘木虱与柑橘粉虱在内的昆虫体内存在多种内共生菌，这些内共生菌对宿主的生殖、生长发育、营养代谢及防御方面都起着十分重要的作用。本研究中，采自广东、福建及广西 3 个省份 5 个地区的柑橘木虱与柑橘粉虱体内，均含有多种共生菌，但每个地理种群之间存在差异，同一地区的柑橘木虱与柑橘粉虱所感染的共生菌种类和感染率也不相同。究其原因，可能与种群所在的地理位置与温度有关，已有报道表明，地理分布、取食的寄主种类（变种）以及温度等都会影响昆虫次生共生菌的感染率（Tsuchida *et al.*，2002；Osaka *et al.*，2008）。

本研究中，所采集的 5 个柑橘木虱种群与广州柑橘粉虱种群都含有 *Wolbachia* 共生菌，并且 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因的同源性达到 100%，进一步证明了同一柑橘植物上的柑橘木虱和柑橘粉虱两种昆虫之间可能存在植物介导的 *Wolbachia* 水平传播。在此之前，已有研究证明昆虫内共生菌 *Rickettsia* 可以通过寄主植物在不同烟粉虱种群之间进行水平传播（Caspi-Fluger *et al.*，2012；李绍建和邱宝利，未发表数据）。与此同时，有研究发现同一种昆虫所感染的 *Wolbachia* 也存在明显的地理隔离现象（Sun *et al.*，2007；Saha *et al.*，2012），如 Sun 等（2007）基于 *Wolbachia wsp* 基因的系统进化树发现，我国桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 不同种群所感染的 *Wolbachia* 存在地理隔离。Saha 等（2012）通过 *Wolbachia ftsZ* 及 *wsp* 基因的系统发育分析发现，我国的柑橘木虱与美国佛罗里达的柑橘木虱所感染的 *Wolbachia* 不同。本研究中我国华南地区不同柑橘木虱种群感染的 *Wolbachia* 同源性极高，未表现出明显的地理隔离，其原因可能有两点，一是华南不同省份之间存在柑橘苗木的贸易往来，而柑橘木虱则可能随着苗木的运输在不同地区之间扩散，使得整个华南地区的柑橘木虱亲缘关系较近，其体内的共生菌也没有发生遗传分化；二是整个华南地区地理位置和气候差异较小，较为单一的环境因素使得 *Wolbachia* 在柑橘木虱不同地理种群之间差异较小。

昆虫内共生菌的研究意义重大，例如可以为植物病害的监测与防控提供新的思路。*Phlomobacter fragariae* 属于类 *Arsenophonus*，可引起草莓的边缘叶绿体坏死，但它同时也是温室白粉虱的内共生菌，这说明植物病原菌可能成为昆虫的内共生菌，昆虫内共生菌也可能成为植物的病原菌，这就预示着可以将昆虫内共生菌的引物用于植物病原菌的检测，可以通过这种途径进行植物病害的监控（Foissac *et al.*，2000）。在动植物的基因工程与改良领域，在不借助于载体的情况下很难直接将外源基因导入昆虫体内，而共生菌可以与昆虫共生的特性恰好为外源基因导入昆虫体内创造了条件（Sandström *et al.*，2001）。灰飞虱传播的水稻条纹叶枯病与其体内的共生菌有着密切的关系，我国正试图通过对内共生菌基因改造对灰飞虱的基因改造，最终实现对水稻条纹叶枯病进行生物防控（邸垫平等，2009）。此外，已有研究表明，蚜虫对有机磷农药的抗性与其内共生菌有关，对昆虫内共生菌与其抗药性机理之间的研究也可为害虫的生物防治提供有效的解决途径（Munson *et al.*，1991；Kontsedalov *et al.*，2008）。

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*, doi: 10.1371/journal.ppat.1004672.

An X, Li YH, Li SJ, Guo CF, Ren SX, Qiu BL, 2015. Preliminary research on the distribution and transmission efficiency of *Rickettsia*, an endosymbiont of whitefly *Bemisia tabaci*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(1): 135−142. [安璇, 李翌菡, 李绍建, 郭长飞, 任顺祥, 邱宝利, 2015. 烟粉虱内共生菌 *Rickettsia* 在植物体内的分布及转移效率初探. 应用昆虫学报,

52(1): 135−142.]

Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH, 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11): 7098−7110.

Cardoza YJ, Klepzig KD, Raffa KF, 2006. Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology*, 31(6): 636−645.

Caspi-Fluger A, Inbar M, Mozes-Daube N, Katzir N, Portnoy V, Belausov 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: 1791−1796.

Chen Y, Wang WX, Chen Y, Fu Q, 2014. Research progress on the bacterial symbiont *Arsenophonus* of insects. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 26(2): 530−536. [陈宇, 王渭霞, 陈洋, 傅强, 2014. 昆虫 *Arsenophonus* 属共生菌的研究进展. 浙江农业学报, 26(2): 530−536.]

Currie CR, Bot ANM, Boomsma JJ, 2003. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, 101(1): 91−102.

Di DP, Miao HQ, Lu YG, Tian LZ, 2009. Molecular detection of *Wolbachia* in small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*). *Acta Agriculturae Boreal-simica*, 24(1): 178−180. [邸垫平, 苗洪芹, 路银贵, 田兰芝, 2009. 灰飞虱体内沃尔巴克氏体的检测. 华北农学报, 24(1): 178−180.]

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

Everett KDE, Thao ML, Horn M, Dyszynaki GE, Baumann P, 2005. Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts 'Candidatus *Fritschea bemisiae*' strain Falk and 'Candidatus *Fritschea eriococci*' strain Elm. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4): 1581−1587.

Foissac X, Danet JL, Zreik L, Gandar J, Nourrisseau JG, Bové JM, Garnier M, 2000. Cloning of the *spot* gene of "Candidatus *Phlomobacter fragariae*" and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection of the bacterium in insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8): 3474−3480.

Giorgini M, Bernardo U, Monti MM, Nappo AG, Gebiola M, 2010. *Rickettsia* symbionts cause parthenogenetic reproduction in the parasitoid wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8): 2589−2599.

Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, Gerling D, Portnoy V, Steinberg S, Tzuri G, Horowitz AR, Belausov E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Gershon M, Gal S, Katzir N, Zchori-Fein E, 2006. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5): 3646−3652.

Halbert SE, Manjunath KL, 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3): 33−353.

Himler AG, Adachi-Hagimori T, Bergen JE, Kozuch A, Kelly SE, Tabashnik BE, Chiel E, Duckworth VE, Dennehy TJ, Zchori-Fein E, 2011. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science*, 332(6026): 254−256.

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) (Coleptera: Coccinellidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 49(2): 195−202.

Kontsedalov S, Zchori-Fein E, Chiel E, Gottlieb Y, Inbar M, Ghanim M, 2008. The presence of *Rickettsia* is associated with increased susceptibility of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides. *Pest Management Science*, 64(8): 789−792.

Lan JH, 2007. The prevention and control of main citrus leaf insect pests. *Science and Technology of Sichuan Agriculture*, (3): 47−49. [兰景华, 2007. 柑橘叶片主要害虫的防治. 四川农业科技, (3): 47−49.]

Munson MA, Baumann P, Clark MA, Baumann L, Moran NA, Voegtlin DJ, Campbell BC, 1991. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *Journal of Bacteriology*, 173(20): 6321−6324.

Oliver KM, Degnan PH, Hunter MS, Moran NA, 2009. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science*, 325(5943): 992−994.

Osaka R, Nomura M, Watada M, Kageyama D, 2008. Negative effects of low temperatures on the vertical transmission and infection density of a *Spiroplasma* endosymbiont in *Drosophila hydei*. *Current Microbiology*, 57(4): 335−339.

Ren SL, Yin XJ, Guo Q, Ren SX, Qiu BL, 2015. Inactive efficiencies of rifampicin and high temperature to *Cardinium* and its effects on the biology of *Bemisia tabaci* host. *Journal of Environmental Entomology*, 37(3): 467-474. [任素丽, 尹祥杰, 郭秋, 任顺祥, 邱宝利, 2015. 利福平与高温对 *Cardinium* 的灭活效果及其对烟粉虱寄主发育与繁殖的影响. 环境昆虫学报, 37(3): 467−474.]

Saha S, Hunter WB, Reese J, Morgan JK, Marutani-Hert M, Huang

H, Lindeberg M, 2012. Survey of endosymbionts in the *Diaphorina citri* metagenome and assembly of a *Wolbachia* wDi draft genome. *PLoS ONE*, 7(11): e50067.

Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, Meng XY, Fukatsu T, 2005. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4069–4075.

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.

Siozios S, Sapountzis P, Ioannidis P, Bourtzis K, 2008. *Wolbachia* symbiosis and insect immune response. *Insect Science*, 15(1): 89–100.

Sun X, Cui LW, Li ZH, 2007. Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae) populations from China. *Environmental Entomology*, 36(5): 1283–1289.

Thao MLL, Baumann P, 2004. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Current Microbiology*, 48(2): 140–144.

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, *Acyrthosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11(10): 2123–2135.

Wang PP, Song XH, Zhang HY, 2013. Isolation and characterization of *Aschersonia placenta* from citrus orchards and its pathogenicity towards *Dialeurodes citri* (Ashmead). *Journal of Invertebrate Pathology*, 112(2): 122–128.

Weeks AR, Velten R, Stouthamer R, 2003. Incidence of a new sex–ratio–distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1526): 1857–1865.

Yin XJ, Sun XX, Ahmed MZ, Ren SX, Qiu BL, 2015. The phylogeny of south China populations of *Bemisia tabaci* and *Encarsia* parasitoid wasps in relation to infection with the *Cardinium* endosymbiont. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(4): 1014–1022. [尹祥杰, 孙秀新, Muhammad Z Ahmed, 任顺祥, 邱宝利, 2015. 南方部分地区烟粉虱及其寄生蜂内共生菌 *Cardinium* 的检测及其系统发育关系. 应用昆虫学报, 52(4): 1014–1022.]

Zhang KJ, Xie RR, Hong XY, 2010. Research of progress of endosymbiont *Cardinium*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 33(5): 1–11. [张开军, 谢蓉蓉, 洪晓月, 2010. 胞内共生菌 *Cardinium* 的研究进展. 南京农业大学学报, 33(5): 1–11.]

Zchori-Fein E, Brown JK, 2002. Diversity of *prokaryotes* associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(6): 711–718.

Zhou W, Rousset F, O'Neill S, 1998. Phylogeny and PCR–based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1395): 509–515.