基于 16S rDNA 序列的 *Wolbachia* 的检测及分型

曲 哲[1,2], 丛 斌[1,*], 褚 栋[2,*], 董 辉[1]
(1. 沈阳农业大学植物保护学院,沈阳 110161; 2. 山东省农业科学院高新技术研究中心
农业部黄淮海作物遗传改良与生物技术重点开放实验室, 济南 250100)

摘要: *Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物体内的一类共生细菌。采用 16S rDNA 特异片段的 PCR-RFLP 方法对烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)不同生物型及米蛾 *Corcyra cephalonica* (Stainton)共生菌 *Wolbachia* 进行了检测与分型分析。基于 *wsp* 基因对烟粉虱共生菌 B 组 *Wolbachia* 以及米蛾共生菌 *Wolbachia* 进行了系统树分析,并对相应的 *Wolbachia*16S rDNA 特异片段进行了克隆、测序以及序列比对。结果表明:16S rDNA 的特异片段经 *Nhe* Ⅰ酶切后 RFLP 图谱可有效检测与鉴别 *Wolbachia*。烟粉虱共生菌 *Wolbachia* 的 16S rDNA 特异片段经 *Vsp* Ⅰ酶切后可得到预期 RFLP 图谱,而米蛾共生菌 B 组 *Wolbachia* (基于 *wsp* 序列分析为 B 组)则产生不同的 RFLP 图谱。序列分析表明,Nauru 型烟粉虱体内 B 组 *Wolbachia* 的 16S rDNA 片段序列与已知 B 组 *Wolbachia* 对应序列(DQ278884)同源性为 100%;米蛾体内 B 组 *Wolbachia* 16S rDNA 特异片段有碱基变异,并存在于 *Vsp* Ⅰ识别位点内,这是导致 *Vsp* Ⅰ酶切后 RFLP 图谱不同的原因。结果提示,B 组 *Wolbachia* 16S rDNA 特异片段经 *Vsp* Ⅰ酶切的 RFLP 图谱存在多态性。本研究结果可为今后 *Wolbachia* 的检测与分型提供借鉴。

关键词: *Wolbachia*; 16S rDNA; PCR-RFLP; RFLP 图谱; 烟粉虱; 米蛾
中图分类号: Q969 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)05-0582-06

Detection and type determination of *Wolbachia* based on 16S rDNA sequences

QU Zhe[1,2], CONG Bin[1,*], CHU Dong[2,*], DONG Hui[1] (1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; 2. High-tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Huanghuaihai, Ministry of Agriculture, Jinan 250100, China)

Abstract: *Wolbachia* are intracellular bacteria widely infecting the arthropod species. In this study, the 16S rDNA specific fragment for *Wolbachia* was digested with endonucleases *Nhe* I and *Vsp* I, respectively, to detect and determine the type of *Wolbachia* within different biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Corcyra cephalonica* (Stainton). The phylogenetic analysis of the B-type *Wolbachia* within *B. tabaci* and that within *C. cephalonica* was carried out based on the *wsp* gene. The 16S rDNA fragments of the corresponding *Wolbachia* were cloned, sequenced and analyzed. The results showed that the 16S rDNA fragments digested with *Nhe* I can be used to detect *Wolbachia*. The RFLP patterns of 16S rDNA digested with *Vsp* I of *Wolbachia* within *B. tabaci* were consistent with the expected, while within *C. cephalonica* not. The sequence analysis showed that genetic variation occurred within 16S rDNA fragment for B-group *Wolbachia* within *C. cephalonica*, which resulted in a different RFLP pattern from that of *B. tabaci* biotype Nauru. The results suggest that the RFLP pattern with *Vsp* I for B group *Wolbachia* is polymorphic. The procedure developed here may facilitate the future research on the *Wolbachia* detection and type determination.

Key words: *Wolbachia*; 16S rDNA; PCR-RFLP; RFLP pattern; *Bemisia tabaci*; *Corcyra cephalonica*

Wolbachia 属是广泛分布于节肢动物体内的一类共生细菌。该共生菌于 1924 年在尖音库蚊 *Culex pipiens* 的生殖组织里首次发现,但直到 20 世纪 70 年代才引起人们的广泛关注(Stouthamer *et al.*,

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2009CB119200);国家自然科学基金项目(30500331; 30771410);山东省自然科学杰出青年基金项目(JQ200811)

作者简介: 曲哲,女,1982 年生,硕士研究生,吉林省镇赉县人,主要从事有害生物与环境安全方面的研究, E-mail: quzhe_19820705@163.com
*通讯作者 Authors for correspondence, E-mail: cong_bin@21cn.com; chinachudong@sina.com

收稿日期 Received: 2008-12-12;接受日期 Accepted: 2009-02-23

1999)。*Wolbachia* 能够诱导其宿主产生胞质不亲和(CI)、孤雌生殖(PI)、雌性化或杀雄等现象(Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999)。此外,*Wolbachia* 对宿主种群适合度(褚栋等,2005b)以及线粒体遗传学(Hurst and Jiggins,2005)等方面也有影响。因此,*Wolbachia* 检测及快速分型技术对于该共生菌的生物学影响及其利用等研究具有重要的理论意义与指导价值。

当前,以 PCR 为基础的分子检测技术成为了 *Wolbachia* 分布及其多样性研究的有用工具(龚鹏和沈佐锐,2002)。以 16S rDNA 和 fts Z 基因进行系统发育分析可将 *Wolbachia* 分为 6 个组群,其中 A 和 B 组群只存在于节肢动物体内(Werren *et al.*,1995;Lo *et al.*,2002)。相对于 16S rDNA 等非编码区和 fts Z 基因区的诊断技术,以编码 *Wolbachia* 表面蛋白的基因 *wsp* 为目标区段的诊断技术其准确性更高(龚鹏和沈佐锐,2002)。但近年来的研究表明,与 *wsp* 的引物相比,基于 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异引物更加灵敏(Li *et al.*,2007;郭晓鹏和李正西,2008;林煌真和李正西,2008),并且较之前的研究(Zchori-Fein and Brown, 2002; Nirgianaki *et al.*, 2003; 褚栋等, 2005a;阮永明和刘树生,2005;Chiel *et al.*,2007)在技术上有了很大的改进。这些不断发展的技术与方法为 *Wolbachia* 的深入研究提供了有力工具。

最近的研究表明,利用基于 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异引物并配合限制性内切酶 *Nhe* Ⅰ和 *Vsp* Ⅰ进行双酶切的方法可检测并区分感染的 *Wolbachia* 的不同组群(Li *et al.*,2007;郭晓鹏和李正西,2008;林煌真和李正西,2008)。上述研究指出,*Wolbachia* 的 16S rDNA 特异片段经 *Nhe* Ⅰ酶切后出现 2 条带;A 组群 *Wolbachia* 经 *Vsp* Ⅰ酶切后,可出现 1 条带(314 bp),而 B 组群 *Wolbachia* 经 *Vsp* Ⅰ酶切后则会出现 3 条带(164,94,56 bp)。

本研究在 Li 等(2007)的研究基础上,采用 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异引物对烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)不同生物型和米蛾 *Corcyra cephalonica*(Stainton)进行了检测,并分别利用内切酶 *Nhe* Ⅰ和 *Vsp* Ⅰ对特异片段进行进一步鉴定和分型研究,结果发现米蛾共生菌 *Wolbachia* 16S rDNA 特异片段经 *Vsp* Ⅰ酶切后的 RFLP 图谱不同于预期图谱。在此基础上,基于 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因对烟粉虱共生菌 B 组 *Wolbachia* 以及米蛾共生菌 *Wolbachia* 进行了系统树分析,并对相应的 *Wolbachia* 16S rDNA 特异片段进行了克隆测序以及序列比对。结果提示,B 组 *Wolbachia* 16S rDNA 经 *Vsp* Ⅰ酶切后 RFLP 图谱存在多态性。该方面的研究结果对将来 *Wolbachia* 的检测及分型研究提供了借鉴。

1　材料和方法

1.1　实验虫源

本研究所采用的烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)(B 型、Q 型及 Nauru 型)成虫置无水乙醇,浸泡于离心管中,于 -20℃保存备用。利用线粒体细胞色素氧化酶Ⅰ(mt COI)(褚栋等,2005c)对烟粉虱生物型进行了鉴定,其中 Nauru 型烟粉虱由国立台湾大学谢志宏博士提供。米蛾 *Corcyra cephalonica*(Stainton)来自本实验室,用麦麸和玉米面饲养。

1.2　基于 *Wolbachia* 16S rDNA 的 PCR 扩增及酶切分型

单头烟粉虱及米蛾 DNA 的提取方法参照褚栋等(2005c)。烟粉虱及米蛾内共生菌 *Wolbachia* 的检测方法参照 Li 等(2007),利用 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异引物 16S 315f(5′-GCATGAGTGAAGAAGGCC-3′)与 16S 628r(5′-AGATAGA CGCCTTCGCCA-3′)进行 PCR 扩增。反应体系中,以 dd H_2O 替代 DNA 模板作为 PCR 的空白对照。PCR 产物用 2% 琼脂糖(1 × TAE)电泳检测后,分别利用内切酶 *Nhe* Ⅰ和 *Vsp* Ⅰ进行酶切分析,酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。*Nhe* Ⅰ酶切图谱可确定是否为 *Wolbachia*,*Vsp* Ⅰ酶切图谱可对 *Wolbachia* 进行分型以确定 *Wolbachia* 的组群。利用此方法对台湾 Nauru 型烟粉虱种群(25 头)、13 个国外烟粉虱种群(包括 B 型和 Q 型,共 102 头)和米蛾(158 头)个体的内共生菌进行了扩增以及酶切分型。

1.3　*Wolbachia wsp* 基因的 PCR 扩增、测序及序列分析

利用 *Wolbachia wsp* 基因的特异引物 81F 与 691R(Zhou *et al.*,1998)扩增单头烟粉虱、米蛾体内 *Wolbachia*。PCR 反应程序参考 Zhou 等(1998)。PCR 反应体系为 25 μL,含 2.5 μL 反应缓冲液,1.25 U Taq 酶,2 mmol/L $MgCl_2$,0.35 mmol/L dNTP,引物(81F,691R)分别 2 μmol/L,模板 DNA 为 1 μL,用 ddH_2O 定容至 25 μL。取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖(1 × TAE)电泳检测,将目的片段纯化后直接测序。由于米蛾(158 头)共生菌 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异片段经内切酶 *Vsp* Ⅰ酶

切后的 RFLP 图谱一致(均产生 2 条带),所以随机分别克隆 2 头米蛾共生菌的 *wsp* 基因并测序,并克隆测序 2 头 Nauru 型烟粉虱 B 组 *Wolbachia wsp* 基因作为对照。

下载 GenBank 中已知 A 组与 B 组 *Wolbachia* 不同亚组群 *wsp* 基因序列(除 Pip 亚组取 2 条序列外,每个亚组仅取 1 条序列),利用 Clustal W 软件(Thompson *et al.*, 1994)进行序列比对后,利用 MEGA4.1 软件(Tamura *et al.*,2007)根据 Kimura 2-paramter 模型计算出不同 *Wolbachia* 的遗传距离;采用 Kimura 2-paramter 模型,最小进化法(ME)和邻位法(NJ)构建系统树,系统树各分支的置信度(bootstrap)均进行 1 000 次的重复检验。

1.4 *Wolbachia* 16S rDNA 克隆测序与分析

由于米蛾体内 *Wolbachia* 经 *Vsp* Ⅰ酶切后的 RFLP 图谱不同于预期的图谱。因此,将 Nauru 型烟粉虱 B 组 *Wolbachia*、米蛾体内 *Wolbachia* 的 16S rDNA 的特异片段进行了克隆测序。步骤如下:Nauru 型烟粉虱、米蛾体内 *Wolbachia* 的 16S rDNA 特异片段在紫外灯下切割回收,纯化后与 pMD18-T 载体[宝生物工程(大连)有限公司]连接,然后将连接产物与感受态细胞(JM109)(北京全式金生物技术有限公司)进行热激转化。转化子于含氨苄抗性的 LB 培养基上倒置培养,筛选阳性克隆。序列测定由山东省农业科学院高新技术研究中心测序室完成。将所获得的序列与报道的 A 组 *Wolbachia* 序列(DQ278885)、B 组 *Wolbachia* 序列(DQ278884)一起,利用 Clustal W 软件(Thompson *et al.*,1994)进行序列比对后,利用 MEGA4.1 软件(Tamura *et al.*, 2007)进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 基于 *Wolbachia* 16S rDNA 的分子检测与分型

利用 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异引物 16S 315f/16S 628r 检测烟粉虱不同生物型和米蛾 *Wolbachia* 感染情况,可产生预期 PCR 产物(314 bp)。烟粉虱不同生物型及米蛾体内扩增的 *Wolbachia*(无论 A 组还是 B 组)片段经内切酶 *Nhe* Ⅰ酶切可产生 2 条带(220 和 94 bp),从而可验证预期 PCR 产物来自 *Wolbachia*。多数情况下,如预期结果相似,烟粉虱体内 *Wolbachia* 经内切酶 *Vsp* Ⅰ酶切后,可出现 1 条带(314 bp)与 3 条带(164,94 和 56 bp)两种类型,这表明 *Wolbachia* 分别为 A 和 B 组群;其中 Nauru 型烟粉虱 *Wolbachia* 均为 B 组。而以米蛾体内 *Wolbachia* 16S rDNA 经内切酶 *Vsp* Ⅰ酶切后 RFLP 图谱不同于上述两种情况,而是只产生 2 条带(图 1)。

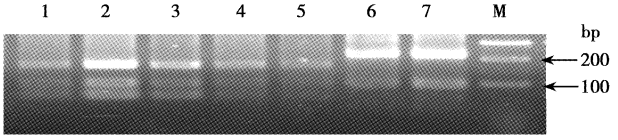

图 1 烟粉虱及米蛾 *Wolbachia* 16S rDNA PCR-RFLP 分析图谱(*Vsp* Ⅰ酶切)

Fig. 1 16S rDNA (*Vsp* Ⅰ digested) PCR-RFLP patterns (*Vsp* Ⅰ digested) of *Wolbachia* within *Bemisia tabaci* and *Corcyra cephalonica*

1-5:烟粉虱 *Wolbachia* 16S rDNA PCR-RFLP 图谱 16S rDNA PCR-RFLP pattern of *Wolbachia* within B. tabaci; 6-7:米蛾 *Wolbachia* 16S rDNA PCR-RFLP 图谱 16S rDNA PCR-RFLP pattern of *Wolbachia* within *C. cephalonica*; M: DNA 分子量标准物 DNA molecular weight Marker.

2.2 基于 *wsp* 基因 *Wolbachia* 的序列分析

将 Nauru 型烟粉虱体内 B 组 *Wolbachia*(GenBank 登录号为 FJ545746、FJ545748)和米蛾体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列(GenBank 登录号为 FJ545745、FJ545747)与 GenBank 中已知 *Wolbachia wsp* 基因序列遗传距离分析(结果未显示)表明:来自 Nauru 型烟粉虱的 *Wolbachia* 与 B 组 Con/Rug 亚组的 AJ291372wBtab1 相似度达 100%;米蛾体内 *Wolbachia* 与 B 组 Pip 亚组的 AF020059wAlbB 以及 AF217717wTabB1 相似度最高,相似度在 98.3% ~ 98.9%之间。最小进化法(ME)构建系统树(图 2)表明,Nauru 型烟粉虱和米蛾体内 *Wolbachia* 分别属于 B 组 Con/Rug 亚组、Pip 亚组。邻位法(NJ)构建的系统树也得到相似结果。

2.3 *Wolbachia* 16S rDNA 序列分析

将 Nauru 型烟粉虱体内 B 组 *Wolbachia* 克隆测序得到的序列(GenBank 登录号为 FJ545749)与报道的 A 组 *Wolbachia* 序列(DQ278885)、B 组 *Wolbachia* 序列(DQ278884)相比较,同源性分别为 96.7%和 100%,米蛾体内 B 组 *Wolbachia*(GenBank 登录号为 FJ545750)与 A 组 *Wolbachia* 序列(DQ278885)和 B 组 *Wolbachia* 序列(DQ278884)同源性分别为 96%和 99.4%。

感染米蛾的 B 组 *Wolbachia* 相对于已知 B 组 *Wolbachia* 序列(DQ278884)以及 Nauru 型烟粉虱体内 B 组 *Wolbachia*,除了第 1 个碱基发生变异外,第 163 个碱基也发生了变异,即 A→G。此变异碱基在内切酶 *Vsp* Ⅰ的识别位点内(图 3)。因此,米蛾 B 组 *Wolbachia*16S rDNA 片段 *Vsp* Ⅰ酶切后只产生 2 条带(220 和 94 bp)。

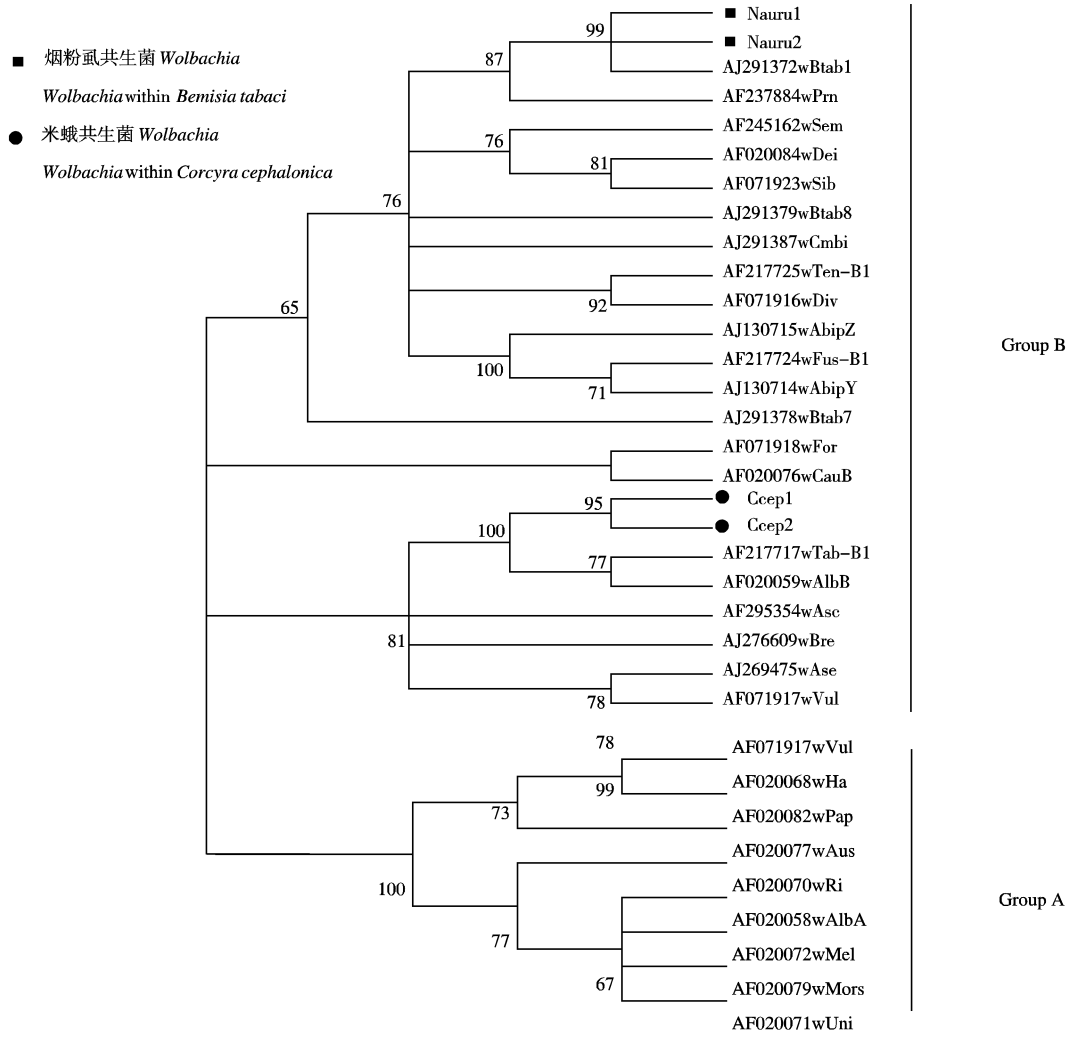

图 2　基于 *wsp* 基因利用最小进化法(ME)构建不同亚组 *Wolbachia* 的系统树

Fig. 2 Phylogenetic trees of *Wolbachia* by ME method based on *wsp* sequences

DQ278885	GCG	CGT	AGG	CGG	ATT	AGT	AAG	TTA	AAA	GTG
DQ278884	GCG	CGT	AGG	CTG	ATT	AAT	AAG	TTA	AAA	GTG
Nauru-Wol	GCG	CGT	AGG	CTG	ATT	AAT	AAG	TTA	AAA	GTG
Ccep-Wol	GCG	CGT	AGG	CTG	GTT	AAT	AAG	TTA	AAA	GTG

图 3　烟粉虱和米蛾 *Wolbachia* 16S rDNA 序列与已知序列的比较

Fig. 3 Comparison on 16S rDNA sequences of *Wolbachia* within *Bemisia tabaci*, *Corcyra cephalonica* and known sequences

DQ278885 和 DQ278884 分别为 *Wolbachia* A 组和 B 组;Nauru-Wol 和 Ccep-Wol 分别为 Nauru 型烟粉虱和米蛾 *Wolbachia*;粗体字标注为内切酶 *Vsp* Ⅰ的识别位点。DQ278885 and DQ278884 belong to *Wolbachia* groups A and B, respectively, Nauru-Wol and Ccep-Wol come from *Bemisia tabaci* biotype Nauru and *Corcyra cephalonica*, respectively. The recognition site of *Vsp* Ⅰ is marked in bold type.

3　结论与讨论

已有报道表明,基于 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异引物 16S 315f/16S 628r 的 PCR 扩增常产生 339 bp 的 PCR 产物(Li *et al.*,2007),在本研究中,我们使用 2% 的琼脂糖电泳可以区分目的片段(314 bp)与这条 339 bp 的非目的片段。同时,利用 16S rDNA 的特异片段经 *Nhe* Ⅰ酶切后的 RFLP 图谱可证实扩增片段是目的片段。使用此方法与 *wsp* 基因特异引物(81F 与 691R)(Zhou *et al.*,1998)检测的方法对 13 个大陆烟粉虱种群的 125 头个体(B 型 79 头、Q 型 46 头)检测结果(待发表)表明,相对于 *wsp* 基因的检测方法,16S rDNA 的特异片段确实能够提高对 *Wolbachia* 的感染率。

本研究表明,仅利用 *Vsp* Ⅰ进行酶切后的 RFLP 图谱可确定 *Wolbachia* 是属于 A 组群还是 B 组群,即:A 组群 *Wolbachia* 酶切后可出现 1 条带(314 bp),B 组群 *Wolbachia* 酶切后会出现 3 条带(164, 94, 56 bp)。

表 1 本研究中使用的不同亚组 *Wolbachia* 的参考序列

Table 1 The reference sequences of *Wolbachia* subgroups used in the study

组群 Group	亚组群 Subgroup	GenBank 登录号 GenBank accession no.	编码 Code	参考文献 References
A	Mel	AF020072	AF020072wMel	Zhou *et al*., 1998
	AlbA	AF020058	AF020058wAlbA	Zhou *et al*., 1998
	Mors	AF020079	AF020079wMors	Zhou *et al*., 1998
	Riu	AF020070	AF020070wRiu	Zhou *et al*., 1998
	Uni	AF020071	AF020071wUni	Zhou *et al*., 1998
	Haw	AF020068	AF020068wHaw	Zhou *et al*., 1998
	Pap	AF020082	AF020082wPap	Zhou *et al*., 1998
	Aus	AF020077	AF020077wAus	Zhou *et al*., 1998
B	Pip	AF020059	AF020059wAlbB	Zhou *et al*., 1998
	Con/Rug	AJ291372	AJ291372wBtab1	Nirgianaki *et al*., 2003
	Prn	AF237884	AF237884wPrn	Nirgianaki *et al*., 2003
	Btab2	AJ291379	AJ291379wBtab8	Nirgianaki *et al*., 2003
	Ten-B1	AF217725	AF217725wTen-B1	Nirgianaki *et al*., 2003
	Btab1	AJ291378	AJ291378wBtab7	Nirgianaki *et al*., 2003
	Cmbi	AJ291387	AJ291387wCmbi	Nirgianaki *et al*., 2003
	Div	AF071916	AF071916wDiv	Nirgianaki *et al*., 2003
	Sem	AF245162	AF245162wSem	Nirgianaki *et al*., 2003
	Dei	AF020084	AF020084wDei	Nirgianaki *et al*., 2003
	Sib	AF071923	AF071923wSib	Nirgianaki *et al*., 2003
	Pip	AF217717	AF217717wTabB1	Nirgianaki *et al*., 2003
	Fus-B1	AF217724	AF217724wFus-B1	Nirgianaki *et al*., 2003
	AbipY	AJ130714	AJ130714wAbipY	Nirgianaki *et al*., 2003
	AbipZ	AJ130715	AJ130715wAbipZ	Nirgianaki *et al*., 2003
	Asc	AF295354	AF295354wAsc	Nirgianaki *et al*., 2003
	Bre	AJ276609	AJ276609wBre	Nirgianaki *et al*., 2003
	Ase	AJ269475	AJ269475wAse	Nirgianaki *et al*., 2003
	Vul	AF071917	AF071917wVul	Nirgianaki *et al*., 2003
	For	AF071918	AF071918wFor	Nirgianaki *et al*., 2003
	CauB	AF020076	AF020076wCauB	Nirgianaki *et al*., 2003

这种 *Wolbachia* 分型方法可快速有效地检测 *Wolbachia* 并鉴别该共生菌的组群。利用上述 *Wolbachia* 16S rDNA 的 *Vsp* Ⅰ酶切图谱对 13 个国外 B 型、Q 型烟粉虱种群(102 头)和米蛾(158 头)个体的内共生菌进行了扩增以及酶切分型(待发表)的结果表明,烟粉虱体内 *Wolbachia* 存在 A 和 B 组群 2 种类型。而米蛾(158 头)体内 B 组 *Wolbachia*(基于 *wsp* 序列鉴定)的 16S rDNA 经内切酶 *Vsp* Ⅰ酶切后 RFLP 图谱均不同于上述两种情况,均只产生 2 条带。

本研究进一步分析发现,米蛾体内的 B 组 *Wolbachia* 16S rDNA 的特异片段存在碱基变异,而且变异碱基存在于内切酶 *Vsp* Ⅰ的识别位点中,从而导致 *Vsp* Ⅰ酶切图谱不同于 Nauru 型烟粉虱体内 B 组 *Wolbachia* 的酶切图谱。这表明,B 组 *Wolbachia* 的 16S rDNA 特异片段经 *Vsp* Ⅰ酶切的 RFLP 图谱存在多态性。这是否是 B 组 Pip 亚组 *Wolbachia* 特有的变异还有待于对更多不同亚组 *Wolbachia* 16S rDNA 特异片段进一步研究。

近年来,随着生物技术的进步,对 *Wolbachia* 的

检测技术已取得了重要进展,如 *Wolbachia* 的 PCR 分子检测和分型技术等(龚鹏和沈佐锐,2002;Li *et al*., 2007)。本文研究结果可为今后 *Wolbachia* 的检测与鉴定提供借鉴。

致谢　台湾大学谢佳宏博士为实验提供了 Nauru 型烟粉虱,中国农业大学李正西博士为 *Wolbachia* 的分型技术存在的问题提出了宝贵意见。

参 考 文 献 (References)

Chiel E, Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Katzir N, Inbar M, Ghanim M, 2007. Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bull. Entomol. Res*., 97: 407 - 415.

Chu D, Cong B, Zhang YJ, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2005a. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in different *Bemisia tabaci* biotypes. *Acta Entomol. Sin*., 48(4): 518 - 525. [褚栋, 丛斌, 张友军, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁, 2005a. 不同生物型烟粉虱体内 *Wolbachia* 共生菌的检测及其系统树分析. 昆虫学报, 48(4): 518 - 525]

Chu D, Zhang YJ, Bi YP, Fu HB, 2005b. *Wolbachia* endosymbionts and their effects on the fitness of the arthropod hosts. *Acta Microbiol. Sin*., 45(5): 817 - 820. [褚栋, 张友军, 毕玉平, 付海滨, 2005b. *Wolbachia* 属共生菌及其对节肢动物宿主适合度的影响. 微生物学报, 45(5): 817 - 820]

Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2005c. Sequences analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Sci. Agri. Sin*., 38(1): 76 - 85. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁, 2005c. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学, 38(1): 76 - 85]

Gong P, Shen ZR, 2002. Molecular diagnostic techniques of *Wolbachia*. *Hereditas*, 24(2): 207 - 210. [龚鹏, 沈佐锐, 2002. PCR 为基础的分子技术检测沃尔巴克氏体的研究进展. 遗传, 24 (2): 207 - 210]

Guo XP, Li ZX, 2008. *Wolbachia* extensively harbored by *Bemisia tabaci* in China. *Acta Microbiol. Sin*., 48 (1): 63 - 67. [郭晓鹏, 李正西, 2008. 我国烟粉虱自然种群中存在广泛的 *Wolbachia* 感染现象. 微生物学报, 48(1): 63 - 67]

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: 1 525 - 1 534.

Li ZX, Lin HZ, Guo XP, 2007. Prevalencc of *Wolbachia* infection in *Benisia tabaci*. *Curr. Microbiol*., 54: 467 - 471.

Lin HZ, Li ZX, 2008. Characteristics of *Wolbachia* infection in natural populations of *Bemisia tabaci* in Fujian province. *Acta Entomol. Sin*., 51(1): 14 - 19. [林煌真, 李正西, 2008. 福建省烟粉虱自然种群 *Wolbachia* 感染特点. 昆虫学报, 51(1): 14 - 19]

Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C, 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol. Biol. Evol*., 19: 341 - 346.

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: 93 - 101.

Ruan YM, Liu SS, 2005. Detection and phylogenetic analysis of prokaryotic endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *Acta Entomol. Sin*., 48(6): 859 - 865. [阮永明, 刘树生, 2005. 浙江 B 型与非 B 型(China-ZHJ-1)烟粉虱种群共生细菌的检测及系统发育分析. 昆虫学报, 48(6): 859 - 865]

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GD, 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Ann. Rev. Microbiol*., 53: 71 - 102.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007, MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. *Mol. Biol. Evol*., 24: 1 563 - 1 599.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*., 22: 4 673 - 4 680.

Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Ann. Rev. Entomol*., 142: 587 - 609.

Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 261: 55 - 63.

Zchori-Fein E, Brown JK, 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am*., 95: 711 - 718.

Zhou W, Rousset F, O'Neil S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 265: 505 - 515.

(责任编辑: 袁德成)