

网络出版时间:2014-12-12 09:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.01.013

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20141212.0930.013.html

不同地理种群麦长管蚜 3 种次级共生菌 检测与系统发育分析

罗 晨^a, 胡祖庆^a, 于永昂^b, 杨 杰^a, 张改生^b, 赵惠燕^a

(西北农林科技大学 a 旱区作物逆境生物学国家重点实验室 植物保护学院, b 国家杨凌农业生物技术育种中心,
国家小麦改良中心杨凌分中心, 小麦育种教育部工程研究中心, 陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**次级共生菌 *Serratic symbiotica* (PASS)、*Hamiltonella defensa* (PABS)、*Regiella insecticola* (PAUS) 广泛存在于蚜虫体内。研究其在我国麦长管蚜(*Sitobion avenae* (Fabricius)) 体内的感染情况及遗传多样性, 为进一步研究感染次级共生菌对麦长管蚜的生态学和生物学影响奠定基础。**【方法】**利用 16S rDNA 特异引物, 对陕西杨凌、安徽滁州、陕西五丁关、河南郑州、山西太谷和新疆石河子 6 个地理种群麦长管蚜体内 PASS、PABS 和 PAUS 共生菌进行了 Long-PCR 检测、测序和系统发育分析。**【结果】**(1) 所有 6 个地理种群均感染 PASS 和 PAUS(感染率均为 100%), 而陕西杨凌、安徽滁州、新疆石河子 3 个地理种群感染 PABS(感染率 15%~70%), 其余 3 个地理种群均未感染 PABS。(2) 16S rDNA 序列的比对分析表明, 感染 PASS、PABS 和 PAUS 的 6 个地理种群的株系均具有高度一致的序列。(3) 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树表明, 我国麦长管蚜体内感染的这 3 种次级共生菌中, PASS 和 PABS 共生菌的亲缘关系较近。**【结论】**PASS 和 PAUS 广泛存在于中国不同地理种群麦长管蚜体内, 且具有较低的遗传多样性。

[关键词] 麦长管蚜; 地理种群; 次级共生菌; 系统发育分析; 16S rDNA

[中图分类号] Q965.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)01-0141-06

Detection and phylogenetic analysis of three facultative endosymbionts in grain aphid, *Sitobion avenae* from different geographical regions

LUO Chen^a, HU Zu-qing^a, YU Yong-ang^b, YANG Jie^a,
ZHANG Gai-sheng^b, ZHAO Hui-yan^a

(a State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, b National Yangling
Agricultural Biotechnology & Breeding Center, Yangling Branch of State Wheat Improvement Center, Wheat Breeding
Engineering Research Center Ministry of Education, Key Laboratory of Crop Heterosis of Shaanxi Province,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** Secondary symbionts, *Serratic symbiotica* (PASS), *Hamiltonella defensa* (PABS) and *Regiella insecticola* (PAUS), exist widely in grain aphid, which induce changes in biological and ecological characteristics of aphids. This paper researched the genetic diversity and phylogeny of PASS, PABS and PAUS in 6 geographical populations of *Sitobion avenae* in wheat in China. **【Method】** Special primers of 16S rDNA were used to conduct Long-PCR detection, sequence analysis, and phylogenetic a-

[收稿日期] 2014-07-24

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划项目(2013K02-12); 西北农林科技大学基本科研业务费专项(QN2013011); 西北农林科技大学博士后科研启动基金项目(2013BSJJ114)

[作者简介] 罗 晨(1989—), 男, 陕西咸阳人, 硕士, 主要从事昆虫体内微生物研究。E-mail: lczhibao@163.com

[通信作者] 赵惠燕(1955—), 女, 陕西铜川人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫生态学。E-mail: zhaohy@nwsuaf.edu.cn

analysis for PASS, PABS and PAUS in 6 geographical regions including Yangling Shaanxi, Chuzhou Anhui, Wudingguan Shaanxi, Zhengzhou Henan, Taigu Shanxi, and Shihezi Xinjiang. 【Result】 (1) All 6 geographical populations of *S. avenae* were infected by PASS and PAUS with the infection rate of 100%, and *S. avenae* populations from Yangling Shaanxi, Chuzhou Anhui, and Shihezi Xinjiang were also infected by PABS with the infection rate of 15%—70%. (2) The comparison of 16S rDNA gene sequences showed that the gene sequences of PASS, PABS, and PAUS from all 6 geographical populations were highly identical. (3) The phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA gene showed that PASS and PABS had close genetic relationship. 【Conclusion】 PASS and PAUS existed diffusely in *S. avenae* populations from different geographical regions of China, and they had poor genetic diversity.

Key words: *Sitobion avenae*; geographical populations; facultative endosymbionts; phylogenetic analysis; 16S rDNA

昆虫体内次级共生菌 *Serratia symbiotica* (PASS)、*Regiella insecticola* (PAUS) 和 *Hamiltonella defensa* (PABS) 均属于 γ -变形门菌^[1-4]。它们对宿主昆虫的生长和生活虽不是必需的,但在宿主抵御逆境胁迫时具有重要的作用。PASS 可以帮助寄主抵抗高温^[5-6]; PAUS 可以帮助寄主抵抗真菌和影响寄主的取食行为^[7-8]; PABS 能保护宿主昆虫抵抗天敌^[9-12]。次级共生菌在自然种群中既可以垂直传播,也可以水平传播^[13-16]。昆虫体内可以含有一种或多种次级共生菌^[17-18]。美国加利福尼亚当地超过 80% 的昆虫体内都可以检测到 PASS; 日本超过 35% 的昆虫体内含有 PASS^[19-20]。在中国,对昆虫体内次级共生菌 *Rickettsia* 和 *Wolbachia* 的检测已经开始^[21-22],但有关上述 3 种 (PASS、PAUS 和 PABS) 次级共生菌的检测还未见报道,而次级共生菌的检测是研究其对宿主昆虫生态学和生物学影响的基础。目前,16S rDNA 被普遍用于次级共生菌的检测和序列分析^[23]。

麦长管蚜 (*Sitobion avenae* (Fabricius)) 属半翅目 (Hemiptera) 蚜科 (Aphididae), 是小麦生育期最重要的世界性害虫类群之一。麦长管蚜为害对小麦的产量和品质影响显著^[24-25]。麦长管蚜除直接吸食植物的汁液、分泌蜜露影响植物光合作用外,还能传播多种植物病毒病。国外研究表明,麦长管蚜体内存在次级共生菌^[26],并且麦长管蚜与其体内共生菌已建立了互利共生的关系^[27],但目前我国有关麦长管蚜体内次级共生菌种类、分布及功能研究尚未见相关报道。

次级共生菌对宿主蚜虫的生物学与生态学具有重要影响,是研究共生关系的模型,已成为广大学者研究的热点。为了揭示我国不同地理种群麦长管蚜体内次级共生菌的感染情况,本研究利用次级共生

菌 PASS、PAUS 和 PABS 的 16S rDNA 基因特异引物,对我国 6 个地理种群麦长管蚜进行 Long-PCR 检测,并对检测结果进行比较;对感染个体体内次级共生菌的 16S rDNA 基因片段进行了测序,构建系统发育树,为进一步研究感染次级共生菌对麦长管蚜的生态学和生物学影响奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

试验所用的麦长管蚜分别采自我国陕西杨凌 (34.36°N, 108.72°E)、安徽滁州 (32.33°N, 118.31°E)、陕西五丁关 (32.83°N, 106.25°E)、河南郑州 (34.46°N, 113.40°E)、山西太谷 (34.36°N, 110.15°E) 和新疆石河子 (44.18°N, 86.00°E) 6 个地理种群,每个地理种群采集 3 个样点。由于蚜虫具有孤雌生殖的特征,为了避免采集到同一母蚜所产的后代,采集时尽量使样点之间相隔至少 10 m。用无水乙醇浸泡采集到的成虫,保存在 -20 °C 条件下备用。

1.2 麦长管蚜总 DNA 的提取

取麦长管蚜,用无菌水清洗 2 次,每次 2 min。本试验采取单头单提,每个地理种群提取 20 头。使用 DNA 提取试剂盒提取 DNA (庄盟生物,北京)。对提取的 DNA 进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。-20 °C 保存备用。

1.3 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌检测

分别利用 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌的 16S rDNA 基因的特异引物 (根据已知豌豆蚜体内共生菌的保守序列设计,引物序列见表 1),对 6 个不同地理种群麦长管蚜体内共生菌进行 Long-PCR 检测。Long-PCR 的扩增体系为 20 μ L: 上、下游引物各 1.5 μ L (10 μ mol/L), DNA 模板 3 μ L, Goldstar TaqMan Mixture (CWBIO) 10 μ L, RNase-Free

Water 4 μ L。Long-PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s(循环 10 次,每个循环温度降低 0.5 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s(循环 30 次)(PASS、PAUS 的退火温度增加至 67 $^{\circ}$ C),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;

最后,72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。扩增产物全部用于琼脂糖凝胶电泳(PASS、PAUS 用 2.0%的琼脂糖凝胶;PABS 用 1.0%琼脂糖凝胶)检测,用凝胶成像系统拍照记录,然后用 DNA 胶回收试剂盒进行胶回收(庄盟生物,北京),测序。

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers used in the study

目标共生菌 Target symbiont	目标基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小/kb Production size
PASS	16S rDNA	16 SerratiaF	AGAAATGGGATGTTTACAAG	0.35
		16 SerratiaR	ATCATAGTGCCTCCTGACC	
PAUS	16S rDNA	16 RegiellaF	GGTGCGAAAGCGTGGGTA	0.34
		16 RegiellaR	TCCGTGGATGTCAAAGAGTAGGT	
PABS	16S rDNA	16 HamiF	AGCACAGTTTACTGAGTTCA	1.3
		16 HamiR	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	

1.4 系统发育树分析

感染次级共生菌的所有蚜虫个体的 DNA 均进行 PCR 扩增和胶回收产物测序,得到 16S rDNA 序列。将测序结果拼接后在 NCBI 上进行 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索,以确保获得的序列片段为 16S rDNA 基因的序列片段。用 DNAMAN 软件对 6 种不同地理种群同源基因进行比对分析,并从 GenBank 基因数据库中检索相关蚜虫体内相同共生菌序列相似性较高的 16S rDNA 序列并下载。同时,使用 MEGA5.0 基于 Maximum Composite Likelihood 模型计算序列间的遗传距离,构建系统发育树,系统树各分支的置信

度(bootstrap) 均进行 1 000 次重复检验。

2 结果与分析

2.1 麦长管蚜不同地理种群体内共生菌的感染情况

利用 16S rDNA 基因对我国 6 个地理种群麦长管蚜共计 120 头个体感染情况的检测结果见表 2。由表 2 可以看出,麦长管蚜体内 PASS、PAUS 共生菌的感染率均为 100%。PABS 共生菌在安徽滁州、陕西杨凌和新疆石河子的感染率分别为 70%,30%和 15%,但在陕西五丁关、河南郑州和山西太谷 3 个地理种群均没有检测到 PABS 共生菌。

表 2 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌在麦长管蚜不同地理种群中的感染情况

Table 2 PASS,PAUS and PABS infection of grain aphid,*Sitobion avenae* from different geographical regions

采集地点 Sampling location	感染率/% Infection rate		
	PASS	PAUS	PABS
陕西杨凌 Yangling,Shaanxi	100	100	30
安徽滁州 Chuzhou,Anhui	100	100	70
陕西五丁关 Wudinguan,Shaanxi	100	100	0
河南郑州 Zhengzhou,Henan	100	100	0
山西太谷 Taigu,Shanxi	100	100	0
新疆石河子 Shihezi,Xinjiang	100	100	15

2.2 地理种群间 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌序列差异

安徽滁州、陕西五丁关、河南郑州、新疆石河子、陕西杨凌和山西太谷的 PASS、PAUS 共生菌 16S rDNA 序列已上传至 GenBank,其中 PASS 的序列号分别为 KM035988、KM035989、KM035990、KM035991、KM035992、KM035993,PAUS 的序列号分别为 KM035994、KM035995、KM035996、KM035997、KM035998、KM035999。陕西杨凌、安徽滁州和新疆石河子的 PABS 共生菌 16S rDNA 序列也已上传至 GenBank,序列号分别为 KM036000、

KM036001、KM036002。

测序结果表明,PASS 共生菌 16S rDNA 片段在安徽滁州、陕西五丁关、河南郑州、山西太谷和陕西杨凌 5 个地理种群的碱基序列完全一致;而与其他 5 个地理种群的碱基序列相比,新疆石河子的碱基序列在第 5,68 位上的碱基存在差异(新疆石河子的碱基均为 G,其他地理种群的均为 A),在第 21、43 位上,新疆石河子的序列分别多出了 1 个 C 和 G 碱基。通过 DNAMAN 对其不同基因序列进行相似性分析认为,安徽滁州、陕西五丁关、河南郑州、山西太谷和陕西杨凌这 5 个地理种群的碱基序列与新疆

石河子的碱基序列的相似度为 98.28%。

测序结果表明,PAUS 共生菌 16S rDNA 片段在陕西五丁关和陕西杨凌的碱基序列完全一致;河南郑州和新疆石河子的碱基序列完全一致。6 个地理种群间的碱基序列差异主要发生在 49,122,133 和 140 位点上。通过 DNAMAN 对其不同基因序列进行相似性分析认为,不同地理种群麦长管蚜基因间最大相似度为 99.50%,最小相似度为 97.99%。

PABS 共生菌 16S rDNA 片段的测序结果表明:陕西杨凌和安徽滁州 476,704 位点上的碱基有差异(陕西杨凌的分别是 G、T,安徽滁州的分别是 C、C);陕西杨凌和新疆石河子相比,只在 1 037 位点上有差异(分别是 G、T);安徽滁州和新疆石河子相比,在 476,704 和 1 037 位点上有差异(安徽滁州的分别是 C、C、G,新疆石河子的分别是 G、T、T)。通过 DNAMAN 对其不同基因序列进行相似性分析认为:不同地理种群麦长管蚜基因间最大相似度为 99.92%,最小相似度为 99.77%;新疆石河子与烟粉虱体内相同共生菌的相似度为 89.07%,与豌豆

蚜体内相同共生菌的相似度为 94.84%,与黑豆蚜体内相同共生菌的相似度为 95.66%。

通过以上分析认为,6 个地理种群的 PASS、PAUS 和 3 个地理种群的 PABS 共生菌基因序列相似性极高,相似性最小的为 97.99%。共生菌研究中若相似性大于 97.5%的株系即可归为一类。因此,认为不同地理种群体内的 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌均为单菌系。

2.3 地理种群间 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌系统发育分析

将测序所得序列导入 NCBI BLAST,结果证实为 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌的 16S rDNA 基因序列。通过 MEGA5.0 软件采用 NJ 邻接法建立系统发育树(图 1),发现各地理种群的 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌分别与其自己本身相似的共生菌聚集在一起。从图 1 可以看出,PASS 和 PABS 共生菌的亲缘关系较近。本试验使用最大相似度法(ML)和最小进化法(ME)构建的系统发育树结果相似。

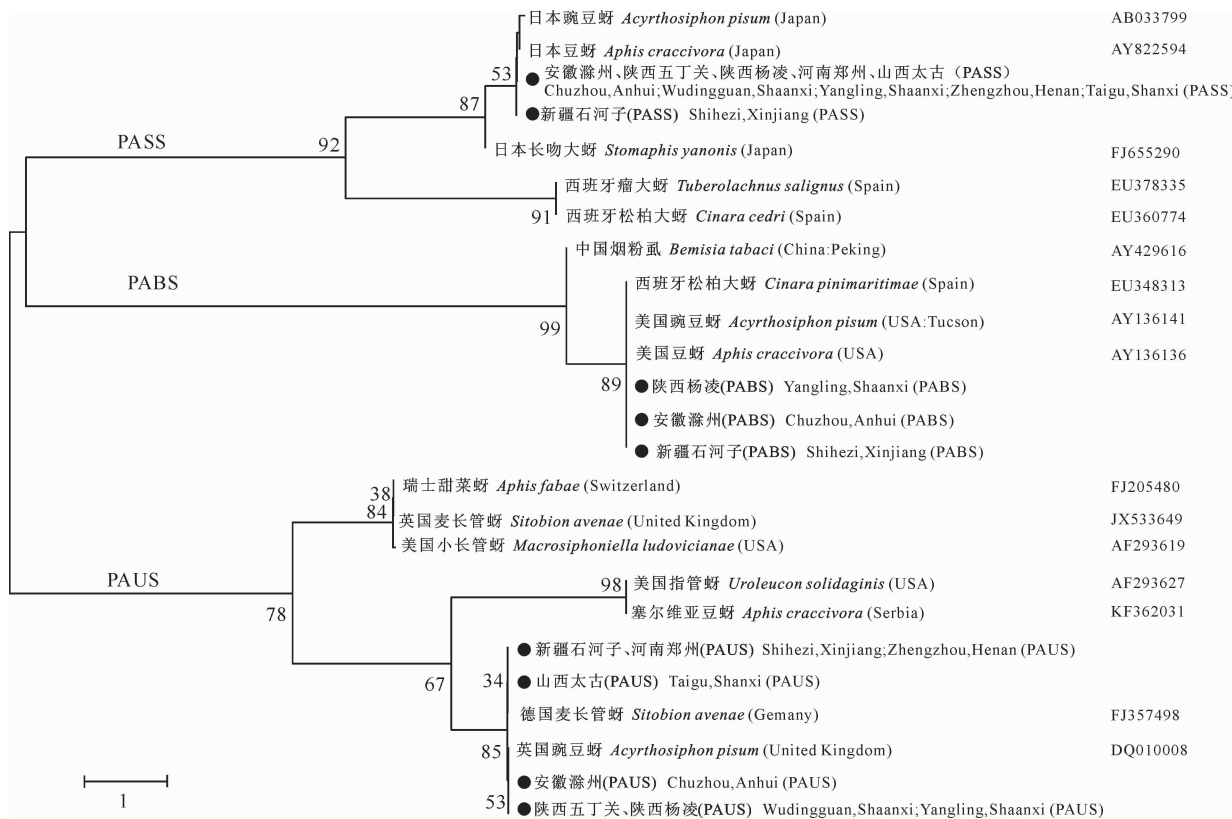


图 1 基于 16S rDNA 基因的 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌系统发育树分析(NJ 邻接法)

Fig. 1 Phylogenetic tree of PASS, PAUS and PABS based on 16S rDNA sequences using NJ method

由图 1 还可以看出,6 个地理种群的 PASS 共生菌的亲缘关系较近,特别是安徽滁州、陕西五丁

关、河南郑州、山西太谷、陕西杨凌的 PASS 共生菌的碱基序列都完全一样。6 个地理种群的 PAUS 共

生菌的亲缘关系较近,其中新疆石河子、河南郑州和山西太谷的 PAUS 共生菌的亲缘关系更为接近,安徽滁州、陕西五丁关和陕西杨凌的 PAUS 共生菌的亲缘关系更为接近;本研究中新疆石河子和河南郑州麦长管蚜的 PAUS 共生菌与来自德国的麦长管蚜的 PAUS 共生菌的 16S rDNA 序列完全一样,而与来自英国的麦长管蚜的 PAUS 共生菌的 16S rDNA 序列亲缘关系较远。陕西杨凌、安徽滁州和新疆石河子 3 个地理种群麦长管蚜的 PABS 共生菌亲缘关系较近;所有蚜科的 PABS 共生菌与烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) PABS 共生菌的亲缘关系较远。

3 讨 论

PASS、PAUS 和 PABS 共生菌在豌豆蚜中的研究技术已经成熟^[1-12],而我国麦长管蚜次级共生菌分布状态尚未见报道。本研究对中国不同地理种群麦长管蚜体内 3 种次级共生菌 PASS、PAUS 和 PABS 进行了检测,结果发现,我国不同地理种群麦长管蚜体内的次级共生菌均存在多重感染,这与国外报道的麦长管蚜体内同时含有 7 种常见次级共生菌的至少 3 种的结果是一致的^[28]。PASS 和 PAUS 共生菌在中国的 6 个地理种群的感染率均为 100%,而日本种群的感染率分别为 38.7% 和 16.0%^[20],说明 PASS 和 PAUS 共生菌在中国的麦长管蚜体内的感染率高于日本,这可能是由于日本和中国的地理位置不同所致,也可能是 PASS 和 PAUS 共生菌在自然界中存在水平转移现象所致。PABS 共生菌只在安徽滁州、陕西杨凌和新疆石河子 3 个地理种群中被发现,而在陕西五丁关、河南郑州和山西太谷这 3 个地理种群中没有检测到,且 3 个感染 PABS 共生菌的地理种群的感染率均较低。推测其原因可能是:(1)蚜虫体内所感染次级共生菌的种类和感染率与地理位置有关;(2)PABS 共生菌在我国麦长管蚜体内的感染率普遍较低。豌豆蚜体内最常见的次级共生菌是 PABS 共生菌^[28],而在本研究的结果是 PASS 和 PAUS 共生菌的感染率高,而 PABS 的感染率相对很低,可能是因为不同种间蚜虫的感染情况是不同的,其具体原因还有待进一步研究。

本研究中 PABS 共生菌在安徽滁州、陕西杨凌和新疆石河子的感染率分别为 70%,30% 和 15%,而安徽滁州、陕西杨凌和新疆石河子分别位于中国的西部、中部和东部。不难发现,本试验中,PABS 共生菌在中国麦长管蚜体内的感染率由西部向东部

依次降低,推测 PABS 共生菌的感染率与地理位置和自然环境有着密切关系,特别是与海拔有关,因此在研究麦长管蚜遗传分化的过程中,选择样本时应考虑地理位置、自然环境等因素。由于本试验地理种群较少,还不能完全得出上述结论,需要进一步试验验证。

本研究在麦长管蚜的有翅型和无翅型个体中都检测到 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌的存在,说明这 3 种共生菌普遍存在于不同地理种群的有翅型和无翅型麦长管蚜个体中,但有翅型和无翅型麦长管蚜个体间的 PASS、PAUS 和 PABS 共生菌的基因差异是否大于有翅型麦长管蚜个体间或无翅型麦长管蚜个体间,这 3 种共生菌在有翅型和无翅型麦长管蚜体内存在的部位是否相同,还有待进一步深入研究。

本研究的这 3 种次级共生菌中,PASS 与 PABS 共生菌的亲缘关系明显较近,根据 DNAMAN 基因序列相似度也证明了这一点;对 PABS 来说,本试验所采用的麦长管蚜体内共生菌的亲缘关系要高于其他种,通过 DNAMAN 对其不同基因序列进行相似性分析认为:不同地理种群麦长管蚜基因间最大相似度为 99.92%,最小相似度为 99.77%,而新疆石河子与烟粉虱体内相同共生菌的相似度为 89.07%,与豌豆蚜体内相同共生菌的相似度为 94.84%,与黑豆蚜体内相同共生菌的相似度为 95.66%,说明不同种间蚜虫体内次级共生菌基因存在差异。

本试验每个地理种群的 20 个个体采取的试验方法、条件和手段完全相同,但 Long-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳后条带的亮度差异明显,通过核酸浓度测定仪所得结果也是差距较大,推测即使同一地理种群麦长管蚜不同个体间所含的同一种共生菌的数量是不同的。

[参考文献]

- [1] Chen D Q, Montllor C B, Purcell A H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2000, 95: 315-323.
- [2] Darby A C, Birkle L M, Turner S L, et al. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 36: 43-50.
- [3] Sandström J P, Russell J A, White J P, et al. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids [J]. *Molecular Ecology*, 2001, 10: 217-228.
- [4] Darby A C, Chandler S M, Welburn S C, et al. Aphid-symbiotic bacteria cultured in insect cell lines [J]. *Applied and Environ-*

- mental Microbiology, 2005, 71: 4833-4839.
- [5] Montllor C B, Maxman A, Purcell A H. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids [J]. Ecological Entomology, 2002, 27: 189-195.
 - [6] Russell J A, Moran N A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids; Variation among symbionts and across temperatures [J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2006, 273: 603-610.
 - [7] Leonardo T E. Removal of a specialization-associated symbiont does not affect aphid fitness [J]. Ecology Letters, 2004, 7: 461-468.
 - [8] Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T. Host plant specialization governed by facultative symbiont [J]. Science, 2004, 303: 1989.
 - [9] Desneux N, Barta R J, Hoelmer K A, et al. Multifaceted determinants of host specificity in an aphid parasitoid [J]. Oecologia, 2009, 160: 387-398.
 - [10] Ferrari J, West J A, Via S, et al. Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex [J]. Evolution, 2012, 66: 375-390.
 - [11] Oliver K M, Russell J A, Moran N A, et al. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2003, 100: 1803-1807.
 - [12] Schmid M, Sieber R, Zimmermann Y S, et al. Development specificity and sublethal effects of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids [J]. Functional Ecology, 2012, 26: 207-215.
 - [13] Darby A C, Douglas A E. Elucidation of the transmission patterns of an insect-borne bacterium [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 4403-4407.
 - [14] Haynes S, Darby A C, Daniell T J, et al. The diversity of bacteria associated with natural aphid populations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 7216-7223.
 - [15] Russell J A, Latorre A, Sabater-Munoz B, et al. Side-stepping secondary symbionts; Widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea [J]. Molecular Ecology, 2003, 12: 1061-1075.
 - [16] Simon J C, Carre S, Boutin M, et al. Host-based divergence in populations of the pea aphid; Insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts [J]. Proceedings of the Royal Society of London B, 2003, 270: 1703-1712.
 - [17] Oliver K M, Degnan P H, Burke G R, et al. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits [J]. Annual Review of Entomology, 2010, 55: 247-266.
 - [18] Russell J A, Weldon S, Smith A H, et al. Uncovering symbiont-driven genetic diversity across North American pea aphids [J]. Molecular Ecology, 2013, 22: 2045-2059.
 - [19] Chen D Q, Purcell A H. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids [J]. Current Microbiology, 1997, 34: 220-225.
 - [20] Tsuchida T, Koga R, Shibao H, et al. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* [J]. Molecular Ecology, 2002, 11: 2123-2135.
 - [21] Li T, Xiao J H, Xu Z H, et al. A possibly new *Rickettsia*-like genus symbiont is found in Chinese wheat pest aphid, *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106: 418-421.
 - [22] Wang Z, Shen Z R, Song Y, et al. Distribution and diversity of *Wolbachia* in different populations of the wheat aphid *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) in China [J]. European Journal of Entomology, 2009, 106: 49-55.
 - [23] Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification; wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species [J]. Insect Molecular Biology, 2000, 9 (4): 393-405.
 - [24] 杨效文. 麦长管蚜穗型蚜研究初报 [J]. 华北农学报, 1991, 6 (2): 103-107.
Yang X W. Research of spike type of *Sitobion avenae* [J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica, 1991, 6 (2): 103-107. (in Chinese)
 - [25] 杨益众, 林冠伦, 胡长富. 麦蚜危害后对小麦品质影响的研究 [J]. 昆虫知识, 1991, 28 (2): 70-72.
Yang Y Z, Lin G L, Hu C F. Research on the effects of wheat aphid damage on wheat quality [J]. Entomological Knowledge, 1991, 28 (2): 70-72. (in Chinese)
 - [26] Hughes L, Bazzaz F A. Effects of elevated CO₂ on five plant-aphid interaction [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2001, 99 (1): 87-96.
 - [27] 冯 利, 孙玉诚, 戈 峰, 等. 蚜虫-内共生菌的互利共生研究综述 [J]. 江西农业学报, 2008, 20 (6): 65-68.
Feng L, Sun Y C, Ge F, et al. Mutualism between aphid and their endosymbionts [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2008, 20 (6): 65-68. (in Chinese)
 - [28] Lukasik P, Dawid M A, Ferrari J, et al. The diversity and fitness effects of infection with facultative endosymbionts in the grain aphid, *Sitobion avenae* [J]. Oecologia, 2013, 173: 985-996.