

实蝇共生菌研究进展

柳丽君, 李志红, 戴 阳

中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193

摘要: 实蝇类昆虫(双翅目 Diptera:实蝇科 Tephritidae)是重要的农业害虫,为害农作物茎秆和水果,严重影响农业生产和果蔬贸易,被许多国家列为重要的检疫性有害生物。实蝇共生菌对宿主实蝇的取食、生殖、发育及环境适应能力具有重要作用。目前,已有 21 个属的共生细菌(*Enterobacter*、*Klebsiella*、*Citrobacter*、*Pseudomonas*、*Providencia*、*Erwinia*、*Acetobacter*、*Serratia*、*Proteus*、*Hafnia*、*Cedecea*、*Arthrobacter*、*Lactobacillus*、*Micrococcus*、*Streptococcus*、*Staphylococcus*、*Vibrio*、*Hafnia*、*Deinococcaceae*、*Bacillus*、*Wolbachia*)以及 1 个属的共生真菌(*Candida*)被鉴定。其中,肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae*、产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca*、成团泛菌 *Pantoea agglomerans*、费氏柠檬酸杆菌 *Citrobter freundii*、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 和沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 普遍存在于实蝇中且备受大家的关注。*Wolbachia* 作为初级共生菌,主要分布于宿主的卵巢和产卵器中;其他次级共生菌则主要分布于宿主的消化道内。共生菌与宿主种群、宿主的地理分布、寄主植物以及宿主入侵能力之间的关系尚未明确。研究实蝇共生菌,对于发现新的实蝇诱饵,提高不育实蝇的环境适应性,以及提出新的实蝇防治技术具有重要意义。本文概述了实蝇共生菌的分布、种类、生物学特性、功能以及相关的研究方法,提出了研究中有待解决的问题,并探讨了下一步的研究热点。

关键词: 实蝇; 共生菌; 研究进展; 问题; 展望

Research progress on the bacterial and fungal symbionts in fruit flies(Diptera: Tephritidae)

Li-jun LIU, Zhi-hong LI, Yang DAI

College of Agronomy and Biotechnology, China Agriculture University, Beijing 100193, China

Abstract: Fruit flies (Diptera: Tephritidae) constitute a group of important agricultural pests, that harm crop plants and fruits, seriously affecting agricultural production and trade in fruit and vegetables. They are classified as important quarantine pests in many countries. Symbionts may provide proteins which are absent in the diets for fruit flies and help them keep normal ovipositional ability. They can also improve host adaptability to the environment. Twenty one genus of bacterial symbionts, including *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Erwinia*, *Acetobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Hafnia*, *Cedecea*, *Arthrobacter*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Hafnia*, *Deinococcaceae*, *Bacillus*, *Wolbachia*, and one genus of fungi symbiont (*Candida*) have been identified so far. *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobter freundii*, *Enterobacter cloacae* and *Wolbachia* are the most prevalent symbionts and have always been paid close attention to. *Wolbachia* as primary symbiont often was found in the ovary and ovipositor of hosts, while other second symbionts reside in the hosts' digestive tract. The association between symbionts and host fruit flies' population, distribution, invasion ability and host plant have not been defined. Research on fruit fly symbionts has the potential to make a significant contribution to find new baits, enhance the adaptability of sterile male adults and develop new control methods against this group of pests. In this review, the distribution, species, biological characteristics, function of symbionts in fruit flies and related research methods are summarized.

Key words: fruit fly; symbiont; research progress; problem; prospect

昆虫共生菌(symbiont)是指存在于昆虫体内特定部位的微生物,它与宿主昆虫相互依赖、相互影响、协同进化(Baumann *et al.*, 1995)。宿主昆虫为共生菌提供稳定的小生境和营养成分,共生菌则帮助宿主合成自身不能合成的必需的营养物质,降解宿主体内的有毒物质,协助宿主消化特殊食物(薛宝燕等,2004);有

些共生菌(如沃尔巴克氏体 *Wolbachia*)还可调节宿主昆虫的生殖活动(龚鹏等,2002),可作为病毒传递的媒介(冯利等,2008)。共生菌分为初级和次级 2 类。初级共生菌垂直传递,调节宿主的存活和繁殖;次级共生菌既可垂直传递,也可在同一世代不同个体间水平传递,影响宿主对环境的适应性(谭周进等,2005)。目

前,有关昆虫共生菌的研究主要集中在社会性昆虫与其共生菌的共生关系上,如蚜虫(aphid)与布克纳什菌 *Buchnera aphidicola* (Buchner, 1965)、舌蝇(tsetse)与魏格沃菌 *Wigglesworthia glossinidia* (Aksoy *et al.*, 1997)、烟粉虱(cotton whitefly)与其共生菌(Skaljac *et al.*, 2010; Chiel *et al.*, 2009; Zchori-Fein & Brown, 2002)等的共生关系。有关非社会性昆虫共生菌的研究较少,实蝇便是其中一类。

实蝇科 Tephritidae 属于节肢动物门 Arthropoda 昆虫纲 Insecta 双翅目 Diptera, 是植食性昆虫。成虫在寄主植物的果实内或茎秆中产卵,卵在其中发育成幼虫;幼虫为潜食性,可形成虫瘿,为害包括果实、茎及叶在内的多个植物器官,降低水果品质和产量。其寄主范围广,生活周期短,繁殖力强,世代重叠严重,造成的危害大,防治困难,给农业生产和果蔬贸易造成了巨大影响,许多国家已将其列为重要的检疫性有害生物(陈乃中, 2009; 吴佳教, 2009)。

实蝇共生菌可作为宿主食物,参与宿主的碳氮循环,为宿主提供食物中缺少的营养物质,也可帮助实蝇降解食物中的有毒物质(Robacker & Lauzon, 2002)。因此,研究实蝇共生菌,对发现新的实蝇诱饵、提高不育实蝇的环境适应性,以及提出新的实蝇防治技术均具有重要意义。

1 实蝇共生菌的分布

1.1 胞内共生菌

胞内共生菌多是初级共生菌。它在寄主体内的分布十分稳定,且与宿主实蝇具有稳定的遗传发育一致性(Donovan *et al.*, 2004)。该类共生菌主要分布于特定细胞的胞质内,这些细胞被称为菌胞(bacteriocytes) (Buchner, 1965)。

1.2 胞外共生菌

胞外共生菌多是次级共生菌。它在实蝇幼虫阶段主要分布于中肠外的突囊中;羽化出成虫后,则主要分布于头部的食道球内。继 Petri *et al.* (1909) 发现了可在油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* 不同世代之间传递的共生菌——沙氏极毛杆菌 *Pseudomonas savastanoi* 后, Capuzzo *et al.* (2005) 又详细描述了该菌在成虫体内的分布和转移情况。该菌主要分布于成虫头部的食道球(咽泡)内,细菌在该器官内迅速增殖,形成菌团,并向中肠移动。雌性成虫肛腺附近也富集了该类细菌,并可通过产卵将其传递到卵内。在幼虫阶段,该菌在肠道内增殖;其在蛹内的精确位置尚未确定。

胞外共生菌在不同种宿主实蝇中的分布不同。

花翅实蝇亚科 Tephritinae 的食道球比油橄榄实蝇小,缺少细菌分布。该类实蝇共生菌主要分布于中肠围食膜之外,与上皮细胞相连。因此,这些共生菌并不直接与食物接触,也不参与食物在肠道内的转运过程(Girolami, 1983)。

由于胞外共生菌主要分布于宿主实蝇体腔内,并未完全与体腔内的其他物质隔离,容易被外来微生物入侵和取代,导致共生关系稳固性下降。尽管该类共生菌与宿主实蝇的协同进化现象不常见,但它对宿主的生物学功能却不可忽视。

1.3 胞内和胞外共生菌之间的转变

胞内和胞外共生菌的定义并不是完全绝对的,伴随着实蝇个体的发育,共生菌也会出现胞内和胞外的转变。Capuzzo *et al.* (2005) 在油橄榄实蝇中分离到一株内共生菌,因其与桃色欧文氏杆菌 *Erwinia persicina* 及大黄杆菌 *E. rhapontici* 的同源性高达 97%, 将其命名为 *Candidatus Erwinia dacicola*。Estes *et al.* (2009) 研究发现,该菌在油橄榄实蝇的发育过程中,存在由胞内向胞外转移的过程。在幼虫阶段主要分布于中肠胃盲囊胞内,但在成虫阶段,到达前肠肠腔和产卵管后,却转移到胞外。该特征可使该菌在多食性、全变态宿主昆虫的发育中保持稳定的生存状态。

2 实蝇共生菌种类

2.1 实蝇共生细菌

共生细菌一直是实蝇共生菌研究的重点。已报道的常见 4 个属的重要经济实蝇共生细菌种类见表 1。根据其作用,可将其分为初级共生细菌和次级共生细菌 2 大类。

2.1.1 初级共生细菌——*Wolbachia* *Wolbachia* 是一类广泛分布于节肢动物体内的共生细菌,通过卵的细胞质传播,对宿主的生殖活动起着重要的调控作用(如诱导胞质不亲和、杀雄、改变生殖力等)。近年来,该菌已成为国际生物学研究的热点(施婉君等, 2002)。

自 20 世纪 70 年代以来,欧洲樱桃绕实蝇 *Rhagoletis cerasi* 一直是在细胞质不亲和研究中广泛采用的野生模式生物。2002 年, Riegler & Stauffer 首次报道在樱桃绕实蝇中发现了 *Wolbachia* 菌;并在同一种实蝇中分离到 2 株不同的 *Wolbachia* 菌株——wCer1 和 wCer2, 其中,欧洲南部和中部的樱桃绕实蝇存在被这 2 株菌交叉感染的现象;同时证明了 wCer1 菌株可以引起宿主生殖发育中的细胞质不亲和。2004 年, Riegler *et al.* 成功地将这 2 株菌人工转移到模式生物拟果蝇 *Drosophila simulans* 中, 其中, wCer1 菌株被成功导入后快速消失, wCer2 菌株虽然可以在新的宿主中

成功定殖,但引起宿主细胞质不亲和的程度较低。2 株菌在新的宿主中不能自然维持,证明该种共生菌在不同种生物之间的自然转移可能受到不同因素的限制,除非可以绕过生态学障碍。此外,Arthofer *et al.* 在

2009 年研究了 *Wolbachia* 菌在樱桃绕实蝇中的感染多样性,指出 *Wolbachia* 的地理分布变异性可以影响其种群动力学,影响对宿主昆虫的控制,并会对自然入侵和人工诱导的 *Wolbachia* 菌株产生障碍。

表 1 常见重要经济实蝇共生细菌种类
Table 1 Symbiotic bacteria of important economic fruit flies

实蝇属名 Genus	实蝇种名 Species	已报道的内共生细菌 Symbiotic bacteria	参考文献 References
小条实蝇属 <i>Ceratitis</i>	地中海实蝇 <i>C. capitata</i>	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.	
		克雷伯式菌属 <i>Klebsiella</i> sp.	Marchini <i>et al.</i> ,2002
		柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i> sp.	Lauzon <i>et al.</i> ,2009
		果胶杆菌属 <i>Pectobacterium</i> sp.	Ben-Yosef <i>et al.</i> ,2008a
		绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Behar <i>et al.</i> ,2008c
		产酸克雷伯氏菌 <i>K. oxytoca</i>	Ben-Yosef <i>et al.</i> ,2008b
		聚团肠杆菌 <i>E. agglomerans</i>	
		<i>Wolbachia</i>	Rocha <i>et al.</i> ,2005
		芽孢杆菌 <i>Bacillus</i> sp.	
		欧文氏杆菌 <i>Erwinia</i> sp.	Belcari <i>et al.</i> ,2003
果实蝇属 <i>Bactrocera</i>	油橄榄实蝇 <i>B. oleae</i>	乳酸菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	Bextine <i>et al.</i> ,2005
		微球菌 <i>Micrococcus</i> sp.	Konstantopoulou <i>et al.</i> ,2005
		假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> sp.	Tsiropoulos,1983
		链球菌 <i>Streptococcus</i> sp.	Stamopoulos & Tzanetakis,1988
		柠檬酸杆菌	
		变形杆菌 <i>Proteus</i> sp.	Capuzzo <i>et al.</i> ,2005
		<i>Providencia</i> , 肠杆菌, <i>Hafnia</i>	Sacchetti <i>et al.</i> ,2008
		克雷伯式菌, <i>Serratia</i>	Petri,1909
		黄单胞菌 <i>Xanthomonas</i> sp.	Kounatidis <i>et al.</i> ,2009
		<i>Erwinia daciicola</i>	
	橘小实蝇 <i>B. dorsalis</i>	醋酸杆菌 <i>Acetobacter tropicalis</i>	
		弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	
		阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	Jang & Nishijima,1990
		肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	
	南亚果实蝇 <i>B. tau</i>	<i>Wolbachia</i>	Sun <i>et al.</i> ,2007
		恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>	
		草生欧文氏菌 <i>Erwinia herbicola</i>	Sood & Nath,2002
		戴氏西地西菌 <i>Cedecea davisae</i>	
	瓜实蝇 <i>B. cucurbitae</i>	节杆菌 <i>Arthrobacter</i> sp.	
		嗜麦芽黄单胞菌 <i>X. maltophilia</i>	
		聚团肠杆菌	
		克雷伯式产酸菌	Prabhakar <i>et al.</i> ,2009
	南亚果实蝇 <i>B. tau</i>	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> sp.	
		<i>Wolbachia</i>	Jamnongluk <i>et al.</i> ,2002
		聚团肠杆菌	Peloquin <i>et al.</i> ,2000
		肺炎杆菌	Peloquin <i>et al.</i> ,2002
绕实蝇属 <i>Rhagoletis</i>	苹果绕实蝇 <i>R. pomonella</i>	苹果腐烂假单胞菌 <i>Pseudomonas melophthora</i>	
		聚团肠杆菌	Lauzon <i>et al.</i> ,2000
		克雷伯式产酸菌	Baerwald & Boush,1968
		肺炎杆菌	Lauzon <i>et al.</i> ,2003
	欧洲樱桃绕实蝇 <i>R. cerasi</i>	粘质沙雷菌 <i>Serratia marcescens</i>	
		<i>Wolbachia</i>	Riegler & Stauffer,2002
			Riegler <i>et al.</i> ,2004
			Arthofer <i>et al.</i> ,2009
	按实蝇属 <i>Anaswepha</i>	肠杆菌,假单胞菌	Robacker <i>et al.</i> ,2004
		弧菌 <i>vibrio</i> sp.,微球菌 Deinococcacea,芽孢杆菌	Kuzina <i>et al.</i> ,2001

除樱桃实蝇外,在其他实蝇中也发现过 *Wolbachia*。2002 年, Jamnongluk *et al.* 从 *B. ascita* 中分离到 5 株不同的 *Wolbachia* 菌。2005 年, Rocha *et al.* 在地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 中首次发现 *Wolbachia*。2007 年, Sun *et al.* 首次证明了我国橘小实蝇 *B. dorsalis* 也能被 *Wolbachia* 菌感染, 该菌可以与宿主实蝇协同进化, 既可以在亲代和子代之间垂直传递, 也可以在不同个体间水平传递; 该菌影响橘小实蝇子代的存活率, 但并未证明该菌和橘小实蝇的入侵相关。继从按实蝇属 *Anaswepha* sp. 的 2 个种中发现 *Wolbachia* 后, Coscrato *et al.* (2009) 检测了巴西不同地区的 10 种按实蝇样本, 发现 *Wolbachia* 广泛存在于按实蝇及果蝇中; 序列相似性分析表明, 果蝇感染的 *Wolbachia* 与 Zhou *et al.* (1998) 发现的 wMel 为同一菌株, 表明该菌在果蝇之间存在大量的横向转移。

2.1.2 次级共生细菌 (1) 肠杆菌科有益菌。由表 1 可知, 实蝇共生菌大部分属于肠杆菌科, 其中, 肠杆菌 *Enterobacter*、柠檬酸杆菌 *Citrobacter*、克雷伯式菌 *Klebsiella* 普遍存在于各类宿主实蝇消化道内。有关实蝇消化道共生菌的研究中, 使用最多的研究对象是小条实蝇属的地中海实蝇和果实蝇属的油橄榄实蝇。

地中海实蝇是一类世界性杂食性入侵害虫, 因其对水果的危害极其严重, 而被各国列为植物检疫的对象 (Behar *et al.*, 2008a)。肠杆菌属和克雷伯式菌属是在地中海实蝇消化系统中最常分离到的 2 类共生菌。Marchini *et al.* (2002) 比较了野生和人工饲养的地中海实蝇种群共生菌的差异, 发现在这 2 个种群内均存在产酸克雷伯式菌和聚团肠杆菌; 并通过扫描电镜观察了 2 种内共生菌的形态, 除 1 株外, 其他分离到的菌株均对存在于实蝇卵表面、由雌蝇生殖腺分泌产生的抗生素敏感。

油橄榄实蝇主要分布于地中海地区, 可为害橄榄, 严重时会造成橄榄减产 70% (Alberola *et al.*, 1999)。Sacchetti *et al.* (2008) 研究表明, 橄榄树上的细菌通过实蝇唇瓣上的拟气管取食进入虫体, 并在食道球中定殖, 在消化系统内传递; *E. dacicola* 除了参与氮固定和果胶降解外, 还可为幼虫提供氨基酸及其他一些橄榄果中缺少的营养元素。Kounatidis *et al.* (2009) 在油橄榄实蝇野生和实验室种群中均发现了一种新的共生菌——醋酸杆菌 *Acetobacter tropicalis*, 推测该菌可能与

实蝇的糖代谢有关, 并通过参与摄入食物的消化过程影响宿主的营养和生理状况, 还可以通过调节不同内共生物的比例维持肠内稳态。

许多研究者就肠道内共生细菌对抗生素的敏感性进行了研究。如 Kuzina *et al.* (2001) 研究了从墨西哥按实蝇 *A. ludens* 中分离到的 18 株细菌对抗生素的敏感性。

(2) 致病菌。除有益菌以外, 实蝇体内还存在许多致病菌。如从地中海实蝇体内分离到的绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* (Behar *et al.*, 2008b)、从油橄榄实蝇和墨西哥按实蝇体内分离到的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. (Alberola *et al.*, 1999), 以及从苹果实蝇中分离到的粘质沙雷菌 *Serratia marcescens* (Lauzon *et al.*, 2003) 等。

2.2 实蝇共生真菌

有关实蝇共生真菌的研究较少, 目前仅报道了 2 例。Rosa *et al.* (2006) 从按实蝇幼虫中分离到 4 株假丝酵母 *Candida azymoides*, 经鉴定, 该假丝酵母是阿斯米假丝酵母 *C. azym* 的近缘种。Chakri *et al.* (2007) 从油橄榄实蝇幼虫的内共生微生物群落中分离到 1 株酵母菌, 该酵母菌可以降解橄榄油生产废水中的多酚类物质; 通过传统的形态学鉴定和分子生物学 5.8S 核糖体基因比对, 将该菌株命名为迪丹斯假丝酵母 *C. diddensiae*。该菌株可以帮助油橄榄实蝇幼虫抵抗取食橄榄时产生的多酚类物质, 有利于其生存和发育。

3 实蝇共生菌的生物学特性

3.1 独特的遗传性状

胞内共生菌分布于细胞质内, 与宿主联系密切, 更易与宿主之间进行基因交换。由它与宿主系统发育的一致性推测, 最初是由单一细菌感染宿主的祖先, 然后两者共同进化。因此, 共生细菌相对于可单独存活的细菌具有独特的遗传性状, 如较小的基因组、较高的 A + T 含量等。这些特征使该菌的进化速率加快、遗传漂变增加 (Moran & Baumann, 2000)。

3.2 不可培养性

大部分实蝇共生菌可在宿主体内增殖, 不可分离培养。Capuzzo *et al.* (2005) 研究表明, 体表消毒实蝇的食道球和肠内容物接种后仅出现零星的菌落, 而未消毒实蝇的食道球和肠内容物出现了大量

的菌落,证明采用分离培养方法所获得的细菌,大部分不是共生菌,而是一些体表寄生菌。当然,也存在一些可培养的共生菌。Kounatidis *et al.* (2009)采用针对醋酸杆菌的特殊培养基,从油橄榄实蝇中分离到1株醋酸杆菌,该菌可以降解并利用培养基中的 CaCO_3 底物。

4 实蝇共生菌对宿主实蝇的作用

初级共生菌可通过引起宿主实蝇细胞质不亲和而影响其生殖,该部分研究主要集中在 *Wolbachia* 上(Riegler & Stauffer, 2002)。次级共生菌对实蝇的生长发育和环境适应性具有重要的作用,主要表现在4个方面。

4.1 参与碳氮循环

共生菌可为宿主提供食物中缺少的必需氨基酸和矿物质。Baerwald & Boush (1968)从被苹果绕实蝇 *R. pomonella* 幼虫、蛹、成虫感染的苹果组织中检测到苹果腐烂假单胞菌 *Pseudomonas melophthora*, 研究发现,该菌可以合成色氨酸,推测该菌可为宿主提供苹果中缺少的氨基酸(Miyazaki *et al.*, 1968)。Lauzon *et al.* (1994)从苹果绕实蝇中分离到聚团肠杆菌 *E. agglomerans*、克雷伯氏产酸菌 *K. oxytoca* 和肺炎杆菌 *K. pneumoniae*, 这3种菌均能将不溶性的无毒尿酸降解为可溶性的氨。从聚团肠杆菌中分离到的一种具尿酸酶活性、可降解嘌呤的蛋白有利于苹果实蝇成虫的存活(Lauzon *et al.*, 2000)。此外,将含酚类物质的苹果叶浸出物和聚团肠杆菌一起培养12 h后,蛋白质、氨基酸及还原糖含量升高;24 h后,还原糖含量降低,蛋白质和氨基酸含量升高(Lauzon *et al.*, 2003),说明该菌可以为宿主合成氨基酸。Behar *et al.* (2005)在离体的地中海实蝇肠道内及活成虫体内发现了产固氮还原酶的细菌;证实了这些细菌可降解果胶,能通过引起寄主果实的提前成熟保证自己充足的食物(Behar *et al.*, 2008a);并可通过提高雄虫和雌虫的交配产卵率(Ben-Yosef *et al.*, 2008b),最终提高自身对环境的适应能力。共生菌的这些作用具有取食依赖性,当实蝇取食比较全面、食物中富含所有其生长发育所必需的营养成分时,共生菌的作用并不明显;只有当其取食限制性营养成分的食物时,共生菌才在延长宿主寿命、提高宿主适应性方面,表现出很明显的作用(Ben-Yosef *et al.*, 2008a)。

4.2 引诱实蝇取食产卵

共生菌可产生特殊的挥发性物质,引诱雌性成虫到特定的寄主内产卵。研究表明,不同来源的聚团肠杆菌对不同宿主具有不同的引诱能力,且墨西哥按实蝇来源(MFF)菌株比苹果绕实蝇来源(AMF)菌株产生更多的2,5-二甲基吡嗪,但AMF菌株比MFF菌株更具引诱性(Robacker *et al.*, 2004)。Robacker *et al.* (2009)还研究发现,以尿酸为主要氮源的培养基培养的菌可产生更多的氨和2-壬酮;且上清液中可挥发物质的含量高于菌体悬液,使得上清液和培养液对墨西哥按实蝇的引诱能力高于菌体和空白培养基。另外,从橘小实蝇肠道内分离到的共生菌,可以产生挥发性成分2-丁酮(2-Butanone)及一些胺类物质,以引诱橘小实蝇到不同的寄主果实上取食;在缺少食物的情况下,共生菌本身也可被宿主实蝇当作食物,保证其正常的生长发育(Jang & Nishijima, 1990)。

4.3 降解食物中的有毒物质

研究表明,从苹果绕实蝇中分离到的聚团肠杆菌可以将植物源有毒物质根皮苷降解脱毒。苹果绕实蝇取食不同浓度的无菌根皮苷溶液后,均可在24 h内死亡,但聚团肠杆菌可在3 d内消除低浓度根皮苷溶液对苹果绕实蝇的毒性(Robacker & Lauzon, 2002)。

4.4 抑制有害菌的生长

Behar *et al.* (2008b)采用“自杀式”PCR方法,确定了地中海实蝇中除肠杆菌外,还存在一种非优势共生菌——绿脓杆菌。该菌是致病菌,可影响寄主实蝇的发育,缩短其寿命,但在与肠杆菌同时存在的情况下,其致病能力大大减弱。说明肠杆菌可以阻止致病菌在实蝇体内的定殖,提高实蝇的适应性。

5 实蝇共生菌研究方法

5.1 共生菌种类的确定

传统实蝇共生菌的研究方法包括针对可培养菌的分离培养鉴定技术,以及针对不可培养菌的分子生物学和显微成像技术。(1)分离培养鉴定技术。通常将实蝇整个虫体或特定部位组织打碎,制定不同稀释度的菌悬液(Capuzzo *et al.*, 2005),涂布特定的选择培养基平板,获得不同菌的纯培养,然后对该菌进行形态与分子鉴定。(2)分子生物学技术。主要包括共生菌16S rRNA基因文库的构建(Kounatidis *et al.*, 2009)及变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技

术。PCR-DGGE 技术需要先提取实蝇体内的宏基因组,通用引物扩增共生菌 16S rRNA 基因片段,然后采用 DGGE 电泳技术将不同序列的基因片段分开并测序,通过序列分析确定内共生菌的种类。(3)显微

成像技术。通过扫描电镜、透射电镜、激光共聚焦显微镜等仪器,直接观察分布于虫体不同位置的共生菌。3 种方法的优缺点见表 2。

表 2 共生菌研究方法的比较
Table 2 Comparison among three research methods of symbiont

方法名称 Method name	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
分离培养鉴定技术 Identification technology of isolation and cultivation	1. 信息全面,可通过形态特征和分子鉴定确定菌的种类; 2. 获得纯培养后,可进行后续生物学试验,明确菌对宿主的功能; 3. 可推测其生理生化功能,有利于对菌的改造。	仅针对可培养菌,无法获得所有共生菌的信息。
分子生物学技术 Molecular biotechnology 16S rRNA 基因文库 16S rRNA gene library PCR-DGGE	不受不可培养菌的限制,可获得大量详细信息,得到的共生菌种类全面。 1. 快速直观; 2. 便于不同个体或样品之间的比较,有利于找到其相同或相异共生菌。	1. 工作量大、繁琐; 2. 仅通过 16S rRNA 基因比对,某些菌无法被确定到种。 1. 由于电泳本身的缺陷,只能分离 500 bp 以下的片段,获得的序列信息不够全面 (Schabereiter-Gurtner <i>et al.</i> , 2003); 2. 同种菌可能具有不同的电泳条带; 3. 操作繁琐,要求高。
显微成像技术 Micro-imaging technique	形象直观,结论具说服力,可直接确定共生菌在宿主体内的分布情况。	仅能确定共生菌的存在,无法区别其形态相似性及分类地位。

在实际应用中,应有针对性地选择研究方法。笔者认为,若要系统地研究某类实蝇共生菌的多样性,应采用 16S rRNA 基因文库构建的方法,以免造成对一些不可培养共生菌的忽略;若要研究共生菌对宿主的功能,则应采取分离培养技术,获得目的菌的纯培养后进行功能验证;若要研究共生菌在实蝇体内的定位,则应选取显微成像技术;而在实蝇初级共生菌与宿主协同进化关系的研究中,多采取分子生物学技术获得共生菌的相关目的基因。

3 种研究方法并不是孤立的,在具体研究中往往被结合使用。如 Kounatidis *et al.* 在 2009 年的研究中,首先通过建立 16S rRNA 基因文库的方法,确定油橄榄实蝇含有 3 种共生菌,并计算出每种菌所占的比例;然后通过透射电镜技术,观察到该实蝇的 1 种共生菌,并将其确定为醋酸杆菌;最后对醋酸杆菌进行了选择性的分离培养,研究了其理化性质,并推测了其对宿主的作用。

5.2 共生菌与宿主共生关系的确定

共生菌研究的关键是其与宿主实蝇共生关系的确定。对于不可培养菌,一般采用分子生物学技术,通过检测同代实蝇不同虫态及不同世代个体中特定基因的表达,确定其共生关系;对于可培养细菌,则可将分离到的菌重新接种到宿主实蝇体内,

通过观察该菌在宿主体内定殖、分布以及在不同世代间的传递,确定其共生关系。

Lauzon *et al.* (2009) 选取地中海实蝇及其体内发现的聚团肠杆菌和肺炎杆菌为研究对象,分别将 EGFP 和 DsRed 等 2 种荧光蛋白基因导入这 2 种细菌中,然后使用转化过的细菌给实蝇喂食,通过荧光显微镜和扫描电镜观察,确定了 2 种菌在实蝇体内的数量、定殖及分布位置。同样的方法也被用于观察这 2 种细菌在核桃实蝇 *R. juglandis* 肠内的分布与定殖情况 (Peloquin *et al.*, 2002)。

5.3 共生菌在宿主体内的定位

研究共生菌在宿主体内的定位,有利于推测其对宿主的作用。研究方法分为 3 种。(1)选取宿主实蝇特定部位分别进行共生菌筛查,可明确共生菌在宿主每个器官的分布情况。(2)荧光标记技术。将荧光蛋白基因导入共生菌,再将共生菌导入宿主,通过检测荧光信号所处位置定位共生菌。Kounatidis *et al.* (2009) 在分离到醋酸杆菌之后,将 GFP 和 DsRed 等 2 种基因分别导入该醋酸杆菌和大肠杆菌 DH-5 α ,然后通过喂食将其导入油橄榄实蝇。发现醋酸杆菌可在寄主体内定殖,而大肠杆菌无法定殖,这在一定程度上证明了醋酸杆菌和油橄榄实蝇的共生关系。(3)荧光原位杂交技术。该技术建立在获得共生菌部分基因序列的基础

上,通过获得的基因序列设计寡核苷酸探针,采用荧光染料标记探针,探针和共生菌的互补核酸序列在细胞内完整地结合,通过荧光信号,直观地检测到共生菌在宿主体内的分布情况(Tang *et al.* ,2010)。

6 研究中有待解决的问题

6.1 试验材料的选择

由于实蝇是重要的农业害虫,人工饲养需要在国家检疫部门特批的单位进行,并严格对其进行隔离,这给实蝇生物学试验的开展造成了不便。此外,利用实蝇实验室种群进行生物学试验,无法完全模拟其在自然环境中的各种行为和生理生态特征,因此,共生菌对实蝇实验室种群的作用也无法等同于其在自然条件下对宿主的作用。只有在自然环境下,以实蝇野生种群为研究对象,才能真正明确共生菌对宿主实蝇的作用。但由于实蝇具有很高的环境适应性和迁飞能力,一旦建立种群,会对当地的农业生产造成很大影响,这使得以实蝇野生种群为研究对象变得困难,进一步阻碍了实蝇共生菌功能的研究。

6.2 共生菌分离技术

传统的分离技术主要包括组织悬液涂布平板培养、显微镜下挑取单菌落培养、梯度离心法等(陈法军等,2005)。但对于大部分不可培养菌,只能通过提取 DNA,扩增其 16S rRNA 基因来获得部分遗传信息,进而确定其种类,无法在实验室条件下进行功能的研究。而共生关系研究的理想模式是:参与共生的生物能够保存,并能在分离的条件下分别进行研究;共生系统可以由组成它的生物重新组合(张珏锋等,2006)。因此,只有在解决共生菌分离纯化的前提下,才能更好地研究其功能,并对其进行改造。

6.3 非优势菌的检测

在已知的实蝇共生菌中,肠杆菌是绝对优势种群,一些非优势种群常常被忽视,而这些非优势种群有可能对宿主有更重要的影响。虽然已有研究提出用“自杀式”PCR 扩增实蝇体内的非优势种群(Behar *et al.* ,2008b),但目前还没有更好的办法消除优势肠道共生菌的影响。

7 展望

实蝇分布极其广泛,属于入侵性害虫,到达新的入侵地后,能够迅速占领生态位,形成种群,严重影响当地的农业生产。研究实蝇的种群遗传、入侵途

径、入侵机制及扩散蔓延规律,对于及早制定检疫措施、降低实蝇危害水平等具有重要意义。在现有的实蝇防治方法中,不育技术具有广阔的发展前景,但不育雄虫较低的生产力和较强的环境适应性阻碍了该类技术的推广应用。

笔者认为,以下问题将成为实蝇共生菌的研究热点。首先是共生菌与实蝇入侵之间的关系,包括明确共生菌对实蝇种群遗传的影响及其机制;其次是共生菌生物学和遗传特征、共生菌基因组的改造、将改造的共生菌导入宿主的方法、不同宿主实蝇共生菌的差异、不同地理种群宿主实蝇共生菌的差异、不同种类共生菌对实蝇的引诱能力,以及新型实蝇生防制剂的开发等。这些问题的研究对提高不育雄虫的生活能力、不育技术推广等具有重要意义。

此外,现阶段已发现的实蝇共生菌多是次级共生菌,初级共生菌仅有 *Wolbachia*。在其他昆虫共生菌的研究中,发现次级共生菌会在进化过程中向初级共生菌转变。如在蚜虫中就存在初级共生菌布克纳什菌被次级共生菌“*Ca. Serratia symbiotica*”取代的现象,且该菌具备为宿主合成必需氨基酸的功能,同时能与宿主协同进化(Burke *et al.* ,2009)。在实蝇中是否也存在这种现象,这种现象与实蝇的种群分化具有怎样的联系,对其生物入侵又具有怎样的作用等,都有待进一步研究。

参考文献

陈法军,张珏锋,俞晓平. 2005. 稻飞虱酵母类胞内共生菌的组织学研究进展. 昆虫知识,42(6):607-611.
陈乃中. 2009. 中国进境植物检疫性有害生物——昆虫卷. 北京:中国农业出版社.
冯利,孙玉诚,戈峰,马骏. 2008. 蚜虫—内共生菌的互利共生研究综述. 江西农业学报,20(6):65-68.
龚鹏,沈佐锐,李志红. 2002. *Wolbachia* 属共生细菌及其对节肢动物生殖活动的调控作用. 昆虫学报,45(2):241-252.
施婉君,程家安,祝增荣. 2002. 昆虫共生细菌 *Wolbachia* 的研究进展. 生态学报,22(3):409-419.
谭周进,肖启明,谢丙炎,杨宇红,冯兰香. 2005. 昆虫内共生菌研究概况. 微生物学通报,32(4):140-143.
吴佳教. 2009. 实蝇类重要害虫鉴定图册. 广州:广东科技出版社.
薛宝燕,程新生,陈树仁,魏重生. 2004. 昆虫共生菌研究进展. 中国微生物学杂志,16(3):189-191.
张珏锋,吕仲贤,陈法军,陈建明,郑许松,徐红星,陈列忠,俞晓平. 2006. 褐飞虱不同致害性种群体内共生菌 18S rDNA 部分序列比较. 昆虫学报,49(3):528-532.
Aksoy S, Chen X and Hypsa V. 1997. Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of

- tsetse (Diptera: Glossinidae). *Insect Molecular Biology*, 6: 183 – 190.
- Alberola T M, Aptosoglou S, Arsenakis M, Bel Y, Delrio G, El-lar D J, Ferré J, Granero F, Guttman D M and Koliais S. 1999. Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 74:127 – 136.
- Arthofer W, Riegler M, Schneider D, Krammer M, Miller W J and Stauffer C. 2009. Hidden *Wolbachia* diversity in field populations of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 18:3816 – 3830.
- Baerwald R J and Boush G M. 1968. Demonstration of the bacterial symbiote *Pseudomonas melophthora* in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*, by fluorescent-antibody technique. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11:251 – 259.
- Baumann P, Baumann L, Lai C Y, Rouhbakhsh D, Moran N A and Clark M A. 1995. Genetics, physiology, and revolutionary relationship of the genus *Buchnera* intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology*, 49:55 – 94.
- Behar A, Yuval B and Jurkevitch E. 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Molecular Ecology*, 14:2637 – 2643.
- Behar A, Yuval B and Jurkevitch E. 2008a. Community structure of the Mediterranean fruit fly microbiota: seasonal and spatial sources of variation. *Israel Journal of Ecology and Evolution*, 54:181 – 191.
- Behar A, Yuval B and Jurkevitch E. 2008b. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and their impact on host longevity. *Journal of Insect Physiology*, 54:1377 – 1383.
- Behar A, Jurkevitch E and Yuval B. 2008c. Bringing back the fruit into fruit fly-bacteria interactions. *Molecular Ecology*, 17:1375 – 1386.
- Belcari A, Sacchetti P, Marchi G and Surico G. 2003. La mosca delle olive e la simbiosi batterica. *Informatore Fitopatologico*, 53(9):55 – 59.
- Ben-Yosef M, Behar A, Jurkevitch E and Yuval B. 2008a. Bacteria-diet interactions affect longevity in the medfly-*Ceratitidis capitata*. *Journal of Applied Entomology*, 132:690 – 694.
- Ben-Yosef M, Jurkevitch E and Yuval B. 2008b. Effect of bacteria on nutritional status and reproductive success of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Physiological Entomology*, 33:145 – 154.
- Bextine B, Lauzon C, Potter S, Lampe D and Miller T A. 2005. Establishment of a genetically marked insect-derived symbiont in multiple host plants. *Current Microbiology*, 50:1 – 7.
- Buchner P. 1965. *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. New York: Interscience Publishers.
- Burke G R, Normark B B, Favret C and Moran N A. 2009. Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:5328 – 5335.
- Capuzzo C, Firrao G, Mazzon L, Squartini A and Girolami V. 2005. ‘*Candidatus* Erwinia dacicola’, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1641 – 1647.
- Chakri M, El-Haidani A, El-Mzibri M, Haggoud A, Iraqui M, Houari A and Koraichi S I. 2007. Yeast strains from the endogenous microflora of the olive flies *Bactrocera oleae* larvae which could degrade the olive oil mill wastewaters polyphenols. *Annals of Microbiology*, 57:143 – 147.
- Chiel E, Inbar M, Mozes-Daube N, White J A, Hunter M S and Zchori-Fein E. 2009. Assessments of fitness effects by the facultative symbiont *Rickettsia* in the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102:413 – 418.
- Coscrato V E, Braz A S K, Perondini A L, Selivon D and Marinho C L. 2009. *Wolbachia* in anastrepha fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 59:295 – 301.
- Donovan S E, Purdy K J, Kane M D and Eggleton P. 2004. Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3884 – 3892.
- Estes A M, Hearn D J, Bronstein J L and Pierson E A. 2009. The olive fly endosymbiont, ‘*Candidatus* Erwinia dacicola’, switches from an intracellular existence to an extracellular existence during host insect development. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:7097 – 7106.
- Girolami V. 1983. Fruit fly symbiosis and adult survival: general aspects//Rotterdam R C. *Fruit Flies of Economic Importance*. Athens: Proc CEC/IOBC Int Symp, 74 – 76.
- Jamnongluk W, Kittayapong P, Baimai V and O’Neill S L. 2002. *Wolbachia* infections of tephritid fruit flies: molecular evidence for five distinct strains in a single host species. *Current Microbiology*, 45:255 – 260.
- Jang E B and Nishijima K A. 1990. Identification and attractancy of bacteria associated with *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, 19:1726 – 1731.
- Konstantopoulou M A, Raptopoulos D G, Stavrakis N G and Mazomenos B E. 2005. Microflora species and their volatile compounds affecting development of an alcohol dehydrogenase homozygous strain (Adh-I) of *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 98:1943 – 1949.
- Kounatidis I, Crotti E, Sapountzis P, Sacchi L, Rizzi A, Chouaia B, Bandi C, Alma A, Daffonchio D, Mavragani-Tsipidou P and Bourtzis K. 2009. *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *Applied and Environmental Microbiology*, 75:3281 – 3288.
- Kuzina L V, Peloquin J J, Vacek D C and Miller T A. 2001. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 42:290 – 294.
- Lauzon C R, Sjogren R E and Maccollom G B. 1994. Characteristics of bacteria isolated from two tephritid species, *Rhagoletis pomonella* and *Ceratitidis capitata*. *Proceedings, Fourth In-*

- ternational Fruit Fly Symposium. Sand Key, Florida.
- Lauzon C R, Sjogren R E and Prokopy R J. 2000. Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: a postulated role in attraction. *Journal of Chemical Ecology*, 26:953 – 967.
- Lauzon C R, Bussert T G, Sjogren R E and Prokopy R J. 2003. *Serratia marcescens* as a bacterial pathogen of *Rhagoletis pomonella* flies (Diptera: Tephritidae). *European Journal of Entomology*, 100:87 – 92.
- Lauzon C R, McCombs S D, Potter S E and Peabody N C. 2009. Establishment and vertical passage of *Enterobacter (Pantoea) agglomerans* and *Klebsiella pneumoniae* through all life stages of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102:85 – 95.
- Marchini D, Rosetto M, Dallai R and Marri L. 2002. Bacteria associated with the oesophageal bulb of the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Current Microbiology*, 44: 120 – 124.
- Miyazaki S, Bousch G M and Baerwald R J. 1968. Amino acid synthesis by *Pseudomonas melophthora*, bacterial symbiote of *Rhagoletis pomonella* (Diptera). *Journal of Insect Physiology*, 14:513 – 518.
- Moran N A and Baumann P. 2000. Bacterial endosymbionts in animals. *Current Opinion in Microbiology*, 3:270 – 275.
- Peloquin J J, Kuzina L, Lauzon C R and Miller T A. 2000. Transformation of internal extracellular bacteria isolated from *Rhagoletis completa* Cresson gut with enhanced green fluorescent protein. *Current Microbiology*, 40:367 – 371.
- Peloquin J J, Lauzon C R, Potter S and Miller T A. 2002. Transformed bacterial symbionts re-introduced to and detected in host gut. *Current Microbiology*, 45:41 – 45.
- Petri L. 1909. *Ricerche Sopra i Batteri Intestinali della Mosca Olearia*. Roma: Memorie della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma (in Italian).
- Prabhakar C S, Sood P, Kapoor V, Kanwar S S, Mehta P K and Sharma P N. 2009. Molecular and biochemical characterization of three bacterial symbionts of fruit fly, *Bactrocera tau* (Tephritidae: Diptera). *Journal of General and Applied Microbiology*, 55:479 – 487.
- Riegler M and Stauffer C. 2002. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 11:2425 – 2434.
- Riegler M, Charlat S, Stauffer C and Mercot H. 2004. *Wolbachia* transfer from *Rhagoletis cerasi* to *Drosophila simulans*: investigating the outcomes of host-symbiont coevolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:273 – 279.
- Robacker D C and Lauzon C R. 2002. Purine metabolizing capability of (*Enterobacter agglomerans*) affects volatiles production and attractiveness to Mexican fruit fly. *Journal of Chemical Ecology*, 28:1549 – 1563.
- Robacker D C, Lauzon C R and He X. 2004. Volatiles production and attractiveness to the Mexican fruit fly of *Enterobacter agglomerans* isolated from apple maggot and Mexican fruit flies. *Journal of Chemical Ecology*, 30:1329 – 1347.
- Robacker D C, Lauzon C R, Patt J, Margara F and Sacchetti P. 2009. Attraction of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae) to bacteria: effects of culturing medium on odour volatiles. *Journal of Applied Entomology*, 133:155 – 163.
- Rocha L S, Mascarenhas R O, Perondini A L P and Selivon D. 2005. Occurrence of *Wolbachia* in Brazilian samples of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 34:1013 – 1015.
- Rosa C A, Morais P B, Lachanee M A, Pimenta R S, Santos R O, Trindade R C, Figueroa D L, Resende M A and Braganca M A L. 2006. *Candida azymoides* sp. nov., a yeast species from tropical fruits and larva (Ascomycota) of *Anastrepha murronota* (Diptera: Tephritidae). *Lundiana*, 7(2):83 – 86.
- Sacchetti P, Granchietti A, Landini S, Viti C, Giovannetti L and Belcari A. 2008. Relationships between the olive fly and bacteria. *Journal of Applied Entomology*, 132:682 – 689.
- Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W and Rolke S. 2003. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 52:251 – 260.
- Skaljac M, Zanic K, Ban S G, Kontsedalov S and Ghanim M. 2010. Co-infection and localization of secondary symbionts in two whitefly species. *BMC Microbiology*, 10:142.
- Sood P and Nath A. 2002. Bacteria associated with *Bactrocera* sp. (Diptera: Tephritidae)—isolation and identification. *Pest Management and Economic Zoology*, 10:1 – 9.
- Stamopoulos D C and Tzanetakis N M. 1988. Bacterial flora isolated from the oesophageal bulb of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Gmelin). *Entomologia Hellenica*, 6(6):43 – 48.
- Sun X, Cui L and Li Z. 2007. Diversity and phylogeny of *Wolbachia* infecting *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) populations from China. *Environment Entomology*, 36:1283 – 1289.
- Tang M, Lv L, Jing S L, Zhu L L and He G C. 2010. Bacterial symbionts of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76:1740 – 1745.
- Tsiropoulos G I. 1983. Microflora associated with wild and laboratory reared olive fruit flies *Dacus oleae* (Gmel.). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 96:337 – 340.
- Zchori-Fein E and Brown J K. 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95:711 – 718.
- Zhou W, Rousset F and O'Neil S L. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strain using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 265:509 – 515.