

桃蚜自然种群初级和次级共生菌的分子鉴定

李正西, 李定旭

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

摘要: 蚜虫不仅带有专性初级内共生菌, 还常常带有不同类群的兼性次级共生菌。本研究采用真细菌 16S rDNA 的通用引物, 从桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 烟草种群体内扩增出 1.5 kb 的共迁移目的条带, 然后将其克隆, 并在阳性克隆筛选时进行了 RFLP 分析。当采用 *EcoR* I 进行单酶切分析时, 目的片段被切割成 ~650 bp 和 ~850 bp 两个小片段; 当采用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切分析时, 该蚜群共生菌酶切谱带被分成 2 组, 其中 1 组(Group I) 只具有一个 *EcoR* I 酶切位点, 而另 1 组(Group II) 不仅具有一个 *EcoR* I 酶切位点, 还具有一个 *Hind* III 酶切位点, 而且 Group I 为优势共生菌群。在此基础上分别对 2 组共生菌的 16S rDNA 全序列(~1.5 kb) 进行了测定, 结果表明: Group I 属于泛菌属 *Pantoea*, 与成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 亲缘关系最近(同源性达 99.70%), 而 Group II 属于蚜虫的专性内共生菌, 即 *Buchnera aphidicola* (同源性达 99.50%)。这是在蚜虫体内存在泛菌次级共生菌的首次报道。

关键词: 桃蚜; 共生菌; *Buchnera aphidicola*; 泛菌; 分子鉴定; 16S rDNA

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)05-0810-05

Molecular identification of the primary and secondary symbionts of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)

LI Zheng-Xi, LI Ding-Xu (Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Aphids harbor not only primary endosymbionts, namely *Buchnera aphidicola*, but also different secondary symbionts. A single comigrating DNA band of about 1.5 kb was amplified from a population of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) collected from the experimental fields in China Agricultural University (Beijing) using a pair of "universal" primers designed based on the full 16S rDNA of a wide range of eubacteria. This target DNA was then ligated to T-vector and cloned into *E. coli* DH5 α . The clones were analyzed using restriction fragment length polymorphism (RFLP). The results showed that *EcoR* I cut the insert into two sub-fragments (~650 bp and ~850 bp) in all assayed samples, while double digestion with *EcoR* I and *Hind* III resulted in two different groups of RE (restriction enzyme) bands, with Group I having only one *EcoR* I site but Group II having one *EcoR* I site and one *Hind* III site. Meanwhile, Group I is dominant. Based on RE grouping, the full 16S rDNA representative sequences from different groups were sequenced, and the phylogenetic analysis demonstrated that Group I belonged to *Pantoea*, closely related to *P. agglomerans* (homology: 99.70%), whereas Group II was closely related to *Buchnera aphidicola*, the obligate symbiont of aphids (homology: 99.50%). This is the first report that *Pantoea* exists in aphids.

Key words: *Myzus persicae*; symbionts; *Buchnera aphidicola*; *Pantoea*; molecular identification; 16S rDNA

许多昆虫的食物来源缺乏一种或多种必需营养素, 而其内共生菌(endosymbionts)通过生物合成活动可能为寄主补足这些必需营养素(Dadd, 1985), 因此昆虫在进化过程中趋向于建立内共生关系, 尤其是同翅目(包括蚜虫、粉虱、介壳虫、木虱和蝉)和鞘翅目昆虫(Buchner, 1965)。蚜虫是研究共生关系的理想模型, 因为几乎所有蚜虫种类中都带有一种革

兰氏阴性的球形胞内共生菌, 即 *Buchnera*。这种共生菌存在于腹部的含菌细胞(mycetocytes 或 bacteriocytes)的胞质中, 含菌细胞是一种专为内共生而特化的肥大细胞(Baumann *et al.*, 1995)。迄今(12/2004)几乎所有关于蚜虫共生微生物的研究都集中在包括 *Buchnera* 属的 γ 变形菌纲(γ -proteobacterium), 它们占蚜虫内共生微生物的 90%

基金项目: 中华人民共和国教育部留学回国人员科研启动基金项目(21163512)

作者简介: 李正西, 男, 1964 年生, 湖南人, 博士, 副教授, 主要从事分子昆虫学与昆虫生态学研究, E-mail: zxli@cau.edu.cn

收稿日期 Received: 2004-12-16; 接受日期 Accepted: 2005-03-29

还要多(Baumann *et al.*, 1995)。它们是专性垂直传播的,对于蚜虫的正常生长和繁殖是必需的(Douglas, 1998)。事实上,蚜虫与其共生菌 *Buchnera* 已建立了密切的互利关系,即共生体离开寄主细胞无法存活,而蚜虫如果去除其共生菌也将不育或死亡(Ohtaka and Ishikawa, 1991)。这种内共生关系的进化起源非常古老,因为各种亲缘关系较远的蚜虫 *Buchnera* 共生菌可能是由共同的祖先细菌衍生而来的(Moran *et al.*, 1993)。

Buchnera 属于变形菌门(Proteobacteria)的 γ 亚群(γ -proteobacteria)(Unterman *et al.*, 1989)。它们在蚜虫中普遍存在,因此被称为初级共生菌(primary symbionts 或 P-symbionts)。然而,许多蚜虫还包含另外一到多种其他细菌类群,称为次级共生菌(secondary symbionts 或 S-symbionts)(Chen *et al.*, 2000),如豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 带有螺原体 *Spiroplasma* (Fukatsu *et al.*, 2001)、欧文氏菌 *Erwinia* (Harada and Ishikawa, 1997) 和葡萄球菌 *Staphylococcus* (Birkle, 1997)。这些次级共生菌类群在蚜虫体内比 *Buchnera* 通常具有更广的组织分布,在蚜虫中既可以垂直传播,也可以水平传播(Russell *et al.*, 2003)。用于鉴别蚜虫次级共生菌的关键特征是它们不象 *Buchnera* 那样在任何蚜虫种类中都普遍存在(Darby *et al.*, 2003)。

总结前人有关蚜虫与其次级共生菌相互作用关系的研究,发现这些研究最大的局限在于所采用的蚜虫种群一般都经过实验室内长期的饲养。但是,这些蚜虫种群的共生菌的种类可能因室内长期饲养而改变(Domingo *et al.*, 1998)。本研究的目标是尝试利用分子生物学手段检测桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer) 自然种群中的微生物群落,包括真细菌(eubacteria)16S rRNA 基因(16S rDNA)通用引物 PCR 限制片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法和 DNA 克隆测序及序列同源性分析。

1 材料与方法

1.1 实验虫源

本研究所采用的桃蚜于 2004 年 9 月采自中国农业大学实验地(北京),寄主为烟草。所采集的蚜虫全部为无翅侨居蚜,样品用无水乙醇浸泡保存(-20°C)。

1.2 总 DNA 抽提

将 50 头浸泡在无水乙醇中的无翅侨居蚜在液氮中研碎,加入 400 μL 裂解缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, 1% (V/V) SDS (sodium dodecyl sulfate)和 1% (W/V) 蛋白酶 K)温育 1 h (56°C)。总 DNA 的提取遵循标准的苯酚/氯仿抽提程序(Sambrook *et al.*, 1989),最后用 RNase A (100 mg/mL)在 37°C 处理 2 h,再经过苯酚/氯仿抽提,最后用乙醇沉淀 DNA。

单头蚜虫 DNA 的抽提采用 Bender 等(1983)的方法,略加改进。从所采集桃蚜烟草种群中随机选取 10 头,先分别将单头蚜虫置于 1.5 mL 离心管中,然后将离心管浸入液氮(注意不要让液氮进入离心管),然后用塑料研杵将蚜虫捣碎。接下来在管中加入 100 μL 裂解缓冲液(0.1 mol/L NaCl, 0.2 mol/L 蔗糖, 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1), 0.05 mol/L EDTA, 0.5% SDS)并进一步将内容物匀浆,然后在 65°C 水浴 30 min。加入 8 mol/L KCl,使其工作浓度为 1 mol/L,冰浴 30 min,然后在 $16\ 000 \times g$ 离心 15 min,并将上清液转移到新管中,加入等体积 100% 乙醇,室温下 5 min,再用 $16\ 000 \times g$ 离心 15 min。弃上清液,沉淀用 70% 冰冻乙醇洗 1 次,然后用 100% 冰冻乙醇洗 1 次,室温下干燥 10 min,用 40 μL 纯水重悬。

1.3 桃蚜共生菌 16S rDNA PCR 扩增

16S 1.5 kb 正向引物(F): 5'-CATGGCTCAGATTGAACGCTGGCG-3' (相当于 *E. coli* 16S rDNA 18 - 41 位); 反向引物(R): 5'-CCCCTACGGTTACCTTGTACGAC-3' (相当于 *E. coli* 16S rDNA 1 494 - 1 517 位)(product = 1 500 bp)(Chen *et al.*, 1996)。该对“通用引物”能从广泛的真细菌中扩增出 16S rDNA。PCR 反应条件: 25 μL 反应体系包含 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , Mg^{2+} (2.5 mmol/L) 2.5 μL , dNTP (各 2.5 mmol/L) 2 μL , 模板 DNA 1 μL , Taq 酶(北京天为公司) 2 U, 加去离子水至 25 μL ; 热循环程序为 95°C 3 min, 接着进行 38 个循环(94°C 45 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min 30 s),最后在 72°C 反应 7 min 后结束。PCR 扩增的模板采用上述随机选取的单头蚜虫总 DNA, 共重复 10 次。由于 PCR 扩增采用的是真细菌的“通用引物”,因此 PCR 扩增产物代表的是任一单头蚜虫体内真细菌 16S rDNA PCR 扩增的混合产物。

1.4 目的片段克隆

PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,将目的条带切下、回收、纯化(北京天为公司)后与 T-载体(北京天为公司)连接,再进行标准的蓝白斑筛选

(Sambrook *et al.*, 1989)。上述所有操作均参照相关公司操作指南进行。重组质粒的插入片段来自上述单头蚜虫 PCR 扩增的混合产物。

1.5 限制酶酶切分析

限制性内切酶为 *EcoR* I 和 *Hind* III (Fermentas 公司产品), 反应体系为 10 μ L, 包含 10 \times 缓冲液 1 μ L (单酶切和双酶切均采用共同的 R⁺ 缓冲液), 质粒 DNA 0.2 μ g, 内切酶 4 U, 加去离子水至 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育过夜。酶切产物采用 1.4% 琼脂糖 (BBI 公司产品) 电泳分离。

1.6 测序及序列同源性分析

将酶切鉴定图谱进行比较、分组, 从不同组中挑选代表进行 16S rDNA 全长序列测序 (北京博亚公司)。将不同反应所获序列进行拼接, 参考引物序列获得全长序列 (约 1.5 kb)。同时再选取若干克隆进行部分测序, 以进行对照。将不同序列进行 BLAST 分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 然后在 GenBank 数据库中下载相关参考序列, 进行同源性分析 (MEGA3.0) (Kimura, 1980)。

2 结果

2.1 桃蚜共生菌 16S rDNA PCR 扩增、目的片段克隆及限制酶酶切分析

真细菌 16S rDNA 的通用引物从桃蚜总 DNA 模板中扩增出约 1.5 kb 的共迁移目的条带, 将该条带连接到 T-载体上转化到感受态受体菌 *E. coli* HD5 α 后, 直接用内切酶筛选阳性克隆。当采用 *EcoR* I 进行单酶切时, 插入片段被切割成 ~650 bp 和 ~850 bp 两个小片段 (图 1); 当用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切时, 所有样品的酶切图谱可分成 2 组, 其中 1 组 (Group I) 只存在一个 *EcoR* I 酶切位点, 而另 1 组 (Group II) 不仅存在一个 *EcoR* I 酶切位点, 还另外存在一个 *Hind* III 酶切位点, 而且大部分样品属于 Group I 图谱 (图 2)。

2.2 桃蚜共生菌 16S rDNA 序列及其同源性分析

根据酶切图谱分组, 分别选取不同组阳性克隆 1~3 个进行测序, 但各组只分别测定 1 个全长序列 (16S6 为 1 504 bp, 16S2 为 1 498 bp, 它们的 GenBank 登录号分别为 AY849937 和 AY849936)。核苷酸序列酶切位点分析发现: 16S6 (Group II) 在第 658 位具有 1 个 *EcoR* I 识别位点 G/AATTC, 同时第 63 位还具有 1 个 *Hind* III 识别位点 A/AGCTT; 然而, 16S2 (Group I) 只在第 655 位具有 1 个 *EcoR* I 识别位点,

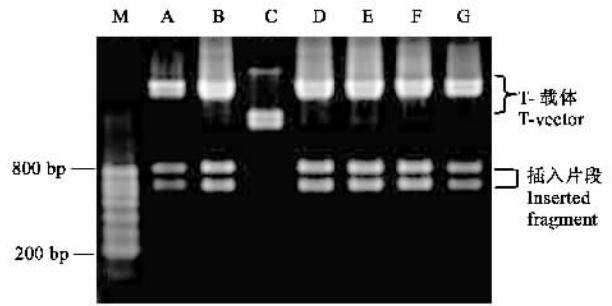


图 1 用 *EcoR* I 进行单酶切时, 所有插入片段被切割成 ~650 bp 和 ~850 bp 两个小片段

Fig. 1 All inserts were cut into two sub-fragments (~650 bp and 850 bp) using *EcoR* I

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker (200–800 bp);
A, B, D, E, F, G: 阳性克隆 Positive clones;
C: 阴性对照 (空质粒) Negative control (T-vector).

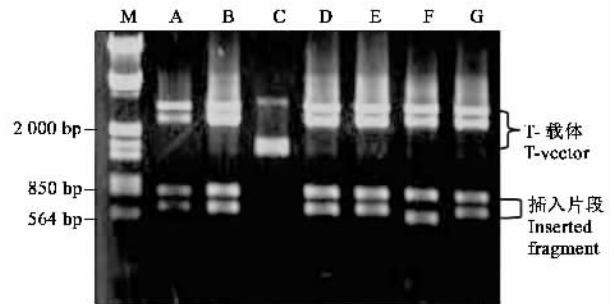


图 2 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切时, 酶切图谱分成 2 组

Fig. 2 *EcoR* I and *Hind* III differentiate all inserts into two groups
M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker (λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III); A, B, D, E 和 G 为一组, 只存在一个 *EcoR* I 酶切位点 Group I includes lane A, B, D, E 和 G, with only one *EcoR* I site; F 自成一组, 存在一个 *EcoR* I 酶切位点和另外一个 *Hind* III 酶切位点 F belongs to Group II with one *EcoR* I site and one *Hind* III site; C: 阴性对照 (空质粒) Negative control (T-vector).

与上述酶切图谱 (图 1 和图 2) 完全吻合。

在克隆测序和 BLAST 基础之上确定如下参考序列, 其注册号分别为: M63249 (*Buchnera aphidicola*), AF364847 (*Pantoea ananatis*), AF130928 (*Enterobacter agglomerans*), AY395010 (*Pantoea agglomerans*), U80202 (*Erwinia herbicola*), AY642383 (*Pantoea stewartii*), U80196 (*Erwinia ananas*), U80209 (*Erwinia uredovora*), U80183 (*Erwinia milletiae*), AF025365 (*Citrobacter freundii*), AF530476 (*Escherichia vulneris*), AJ853891 (*Enterobacter ludwigii*), Z96078 (*Enterobacter cancerogenus*), U78183 (*Klebsiella oxytoca*), AY567708 (*Candidatus Cuticobacterium kirbyi*) 和 AF395913 (*Enterobacter aerogenes*)。采用 MEGA3.0

距离模型 Kimura 2-parameter (Complete Deletion; Rates among rates: Uniform) 计算出不同序列样本间的遗传距离: 总平均距离为 0.183; 16S6 (Group II 的代表) 与 *Buchnera aphidicola* 之间的遗传距离为 0.005 ± 0.002 (Sites = 1 410; Transitions + Transversions; Bootstrap = 600 replicates), 而它们之间的同源性达 99.50%; 16S2 (Group I 的代表) 与 *Enterobacter agglomerans* 和 *Pantoea agglomerans*

(*Enterobacter agglomerans* 与 *Pantoea agglomerans* 之间的遗传距离为 0, 实为同种异名) 之间的遗传距离为 0.002 ± 0.002 , 而它们之间的同源性达 99.70%。基于 16S rDNA 序列构建的桃蚜(北京烟草种群)初级和次级共生菌的无根 NJ 进化树表明: 16S2 (Group I) 与 *Enterobacter agglomerans* 和 *Pantoea agglomerans* 聚在一枝, 而 16S6 (Group II) 与蚜虫专性内共生菌聚在另一枝(图 3)。

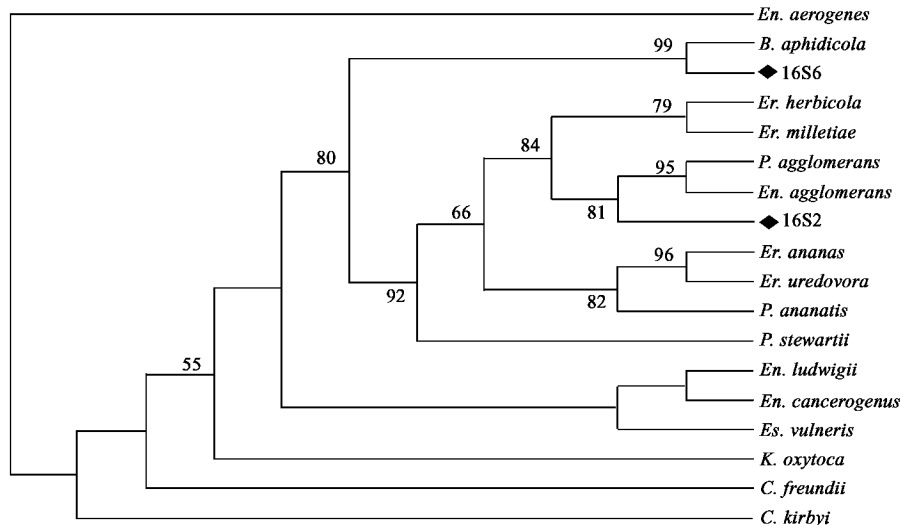


图 3 基于 16S rDNA 序列推导的桃蚜(北京烟草种群)初级和次级共生菌的无根 NJ 进化树

Fig. 3 Unrooted neighbor-joining tree constructed based on 16S rDNA sequences of the symbionts of a tobacco population of *Myzus persicae* and other closely related γ -proteobacteria

节点上的数字为 bootstrap 1 000 次检验值(低于 50% 不显)。16S6 对应的共生菌属于 Group II, GenBank 注册号为 AY849937; 16S2 对应的共生菌属于 Group I, GenBank 注册号为 AY849936.

The bootstrap values obtained with 1 000 resamplings are shown at the nodes (values of less than 50% are not shown). 16S6 is a representative of Group II (GenBank accession no. AY849937), while 16S2 is a representative of Group I (GenBank accession no. AY849936).

3 结论和讨论

本研究结果表明, 桃蚜北京烟草种群具有至少 2 种共生菌, 即专性(初级)共生菌 *Buchnera aphidicola* 和另一种次级共生菌。该次级共生菌属于泛菌类, 与 *Enterobacter agglomerans* 和 *Pantoea agglomerans* 亲缘关系极为相近(同源性达 99.70%)。该发现是迄今有关在蚜虫体内存在泛菌次级共生菌的首次报道。正如其他研究者所指出, 基于 16S rDNA 核苷酸序列推断细菌的系统发育归属存在一定的假定性, 因为细菌 16S rDNA 具有趋同性(homoplasmy)(Werren *et al.*, 1994), 因此该蚜群体内次级共生菌的系统发育地位还需要其他补充证据。但无论如何, 16S rDNA 序列同源性分析结果表明该共生菌与 *Enterobacter agglomerans* 和 *Pantoea agglomerans* 亲缘关系极为相近, 应该属于同一种。

我们也采用节肢动物普遍带有的共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因通用引物检测了该桃蚜群体, 结果没有发现 *Wolbachia* 的存在。由于通过 PCR 方法将无法检测到蚜虫体内丰度过低的内共生菌, 因此本研究不能排除该蚜群体内存在其他低丰度内共生菌的可能。

尽管对蚜虫与其初级内共生体之间的互利关系已有较好的研究基础, 但控制该特定共生关系的生态学基础以及影响其动态的各种因素仍然需要进一步研究, 而对于兼性共生, 其侵染的效应及其生态学相互作用要复杂得多, 因为各种次级共生菌类群的生态学各不相同, 对这些共生菌的深入研究将可能揭示非病原性微生物与动物(包括昆虫)进行联系的生态对策。最近的研究发现, 豌豆蚜兼性共生菌能提高天敌寄生蜂幼虫的死亡率, 从而增强蚜虫对天敌寄生的抵抗能力(Oliver *et al.*, 2003)。事实上, 即使胞内永久性微生物的存在也并不都能给宿主带

来好处,如节肢动物的寄生性共生体 *Wolbachia* 能引起宿主胞质不亲合并调节宿主的生殖行为(Werren *et al.*, 1995)。有证据表明,蚜虫的次级共生菌可因细菌类群和环境条件不同而对宿主的生态适合度产生正效应、负效应或无效应(Douglas *et al.*, 2002; Montllor *et al.*, 2002; Darby *et al.*, 2003)。许多在昆虫肠道伴随昆虫完成整个生活周期的细菌属于次级共生体,它们可能是寄生性的,或是互利共生,例如白蚁和蟑螂就依赖兼性互利共生菌在后肠帮助消化。另有些互利共生的肠道细菌能为宿主提供营养或降解有毒化合物,从而使带有这些共生菌的宿主占据优势(Campbell, 1990),这类微生物大多属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae),它们一般随食物被摄取,并随粪便被排泄,因此很难定留在肠道,因而不能被稳定地传给下一代。一般认为,永久性联系是能传代的,即宿主经过若干代后相同的共生菌仍然存在。昆虫与其肠道微生物的相互作用关系非常复杂,将永久性共生关系与暂时性联系区分开来将是另一个值得关注的课题。泛菌属 *Pantoea* 是一类植源性致病原核生物,它们在蚜虫体内的分布值得进一步研究,而它们在桃蚜北京烟草种群中的存在是永久性还是暂时性的及其所具有的生态学意义有待进一步探明。

参 考 文 献 (References)

- Baumann PL, Lai CY, Rouhakhsh D, Moran NA, Clark MA, 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 55–94.
- Bender W, Spierer P, Hogness DS, 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 168: 17–33.
- Birkle LM, 1997. A Molecular Characterization of the Mitochondria and Bacteria of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Ph. D. Thesis. University of York, York, United Kingdom. 25–34.
- Buchner P, 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. New York, NY: Interscience. 67–232.
- Campbell BC, 1990. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In: Bernays EA ed. *Insect-Plant Interactions*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1–45.
- Chen DQ, Campbell BC, Purcell AH, 1996. A new Rickettsia from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Curr. Microbiol.*, 33: 123–128.
- Chen DQ, Montllor CB, Purcell AH, 2000. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomol. Exp. Appl.*, 95: 315–323.
- Dadd RH, 1985. Nutrition: organisms. In: Kerkut GA, Gilbert LI eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 4. Elmsford (NY): Pergamon Press. 315–319.
- Darby AC, Tosh CR, Walters KFA, Douglas AE, 2003. The significance of a facultative bacterium to natural populations of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Ecol. Entomol.*, 28: 145–150.
- Domingo JWS, Kaufman MG, Klug MJ, Tiedje JM, 1998. Characterization of the cricket hindgut microbiota with fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 752–755.
- Douglas AE, 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria. *Buchnera. Annu. Rev. Entomol.*, 43: 17–37.
- Douglas AE, Darby AC, Birkle LM, Walters KFA, 2002. The ecological significance of symbiotic microorganisms in animals—perspectives from the microbiota of aphids. In: Hails RM, Beringer J, Godfray HCJ eds. *Genes in the Environment*. Oxford: Blackwell Publishing. 306–325.
- Fukatsu T, Tsuchida T, Nikoh N, Koga R, 2001. Spiroplasma symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1 284–1 291.
- Harada H, Ishikawa H, 1997. Experimental pathogenicity of *Erwinia aphidicola* to pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43: 363–367.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111–120.
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH, 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.*, 27: 189–195.
- Moran NA, Munson MA, Baumann P, Ishikawa H, 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 253: 167–171.
- Ohtaka C, Ishikawa H, 1991. Effects of heat treatment on the symbiotic system of an aphid mycetocyte. *Symbiosis*, 11: 19–30.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *PNAS*, 100 (4): 1 803–1 807.
- Russell JA, Latorre A, Sabater-Munoz B, Moya A, Moran NA, 2003. Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.*, 12: 1 061–1 075.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 11–255.
- Unterman BM, Baumann P, McLean DL, 1989. Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. *J. Bacteriol.*, 171: 2 970–2 974.
- Werren JH, Hurst GDD, Zhang W, Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Majerus MEN, 1994. Rickettsial relative associated with male killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.*, 176: 388–394.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 261: 55–71.