

茶尺蠖和灰茶尺蠖内共生菌 *Wolbachia* 的分子检测及序列分析*

周孝贵^{1,2,3**} 付建玉^{2,3} 刘守安^{2,3}
毛腾飞^{2,3} 肖强^{2,3***} 陈学新^{1***}

(1. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058; 2. 中国农业科学院茶叶研究所, 杭州 310008;
3. 农业部茶树生物学与资源利用重点实验室, 杭州 310008)

摘要 【目的】对茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 及其近缘种灰茶尺蠖 *E. grisescens* 体内共生菌 *Wolbachia* 进行分子鉴定, 确定两者体内 *Wolbachia* 的感染率及其进化地位, 为进一步探讨其对茶尺蠖和灰茶尺蠖的潜在影响提供科学依据。【方法】采用 *Wolbachia* 的 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因特异性引物, 通过 PCR 扩增法检测了我国 3 个茶尺蠖地理种群(浙江杭州、余杭和江苏无锡)和 3 个灰茶尺蠖地理种群(浙江新昌、湖北浠水和江西南昌)中 *Wolbachia* 的感染情况, 并进行测序和序列分析。【结果】茶尺蠖和灰茶尺蠖都感染了 *Wolbachia*, 灰茶尺蠖的 *Wolbachia* 感染率为 100%, 但茶尺蠖的 *Wolbachia* 感染率在 22%~95%, 且 PCR 产物电泳得到的条带微弱。*wsp* 序列在茶尺蠖和灰茶尺蠖种间、种内无差异; 但 16S rRNA 序列在茶尺蠖和灰茶尺蠖种间、种内差异为 0.362%~0.727% 之间; 茶尺蠖样本未成功扩增出 *ftsZ* 序列, 灰茶尺蠖样本获得 2 条 *ftsZ* 基因序列差异为 1.647%。基于 *Wolbachia* 的 16S rRNA 和 *wsp* 基因构建的系统发育树表明, 本研究中茶尺蠖和灰茶尺蠖种群所感染的 *Wolbachia* 全部属于 B 组的 Pip 亚组。【结论】茶尺蠖和灰茶尺蠖均被 B 组 Pip 亚组的 *Wolbachia* 感染, 但感染率相差很大, 这为研究 *Wolbachia* 对茶尺蠖和灰茶尺蠖生物学及生态学的影响奠定了基础。

关键词 茶尺蠖, 灰茶尺蠖, *Wolbachia*, 16S rRNA, *ftsZ*, *wsp*, 序列分析

Molecular detection and sequence analysis of *Wolbachia* strains in *Ectropis obliqua* and *Ectropis grisescens* (Lepidoptera: Geometridae)

ZHOU Xiao-Gui^{1,2,3**} FU Jian-Yu^{2,3} LIU Shou-An^{2,3}
MAO Teng-Fei^{2,3} XIAO Qiang^{2,3***} CHEN Xue-Xin^{1***}

(1. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China;

3. Key Laboratory of Tea Biology and Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Hangzhou 310008, China)

Abstract 【Objectives】The infection rates and taxonomic relationships between *Wolbachia* strains in the sister species *Ectropis obliqua* and *E. grisescens* (Lepidoptera: Geometridae) were identified by molecular methods in order to reveal the potential effects of this endosymbiont on these species. 【Methods】*Wolbachia* infection in three populations of *E. obliqua* (Hangzhou and Yuhang, Zhejiang province; Wuxi, Jiangsu Province) and three populations of *E. grisescens* (Xinchang, Zhejiang Province; Xishui, Hubei Province; and Nanchang, Jiangxi Province) were detected using PCR with three specific primers for *Wolbachia* 16S rRNA and the *Wolbachia* *ftsZ* and *wsp* genes. All *Wolbachia* 16S rRNA, *ftsZ* and *wsp* genes from the three *E. grisescens* populations and some *Wolbachia* 16S rRNA and *wsp* genes from the three *E. obliqua* populations, were sequenced and analyzed. 【Results】All *E. obliqua* and *E. grisescens* populations were infected with *Wolbachia*. Infection

*资助项目 Supported projects: 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-2015-TRICAAS)

**第一作者 First author, E-mail: zxcg@tricaas.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: xqtea@vip.163.com; xxchen@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-12-30, 接受日期 Accepted: 2016-05-12

rates of the three *E. griseescens* populations were all 100%, but ranged from 22% to 95% among the three *E. obliqua* populations, with positive PCRs showing only weak bands in the electrophoretogram. There were no intra- and interspecific differences in the *wsp* sequences of *E. obliqua* and *E. griseescens*, however, intra- and interspecific differences in 16S rRNA sequences were between 0.362% and 0.727%, respectively. There was a 1.647% difference in two *ftsZ* haplotypes from *E. griseescens*, moreover, we were unable to successfully amplify *ftsZ* from all *E. obliqua* individuals. A phylogenetic tree based on the 16S rRNA and *wsp* sequences showed that all strains of *Wolbachia* detected belong to the Pip subgroup of the B group.

[Conclusion] All three *E. obliqua* and *E. griseescens* populations tested are infected with *Wolbachia* strains belonging to the Pip subgroup of the B group, but the infection rate varies significantly between *E. obliqua* and *E. griseescens*. These results provide the basis for future study of the effects of *Wolbachia* on the biology and ecology of *E. obliqua* and *E. griseescens*.

Key words *Ectropis obliqua*, *Ectropis griseescens*, *Wolbachia*, 16S rRNA, *ftsZ*, *wsp*, sequence analysis

Wolbachia 是一类呈母性遗传的革兰氏阴性细菌, 广泛存在于昆虫、蜘蛛和螨类等节肢动物和丝状线虫体内, 是昆虫体内分布最广的细胞内共生菌。*Wolbachia* 与其寄主有着复杂的关系, 主要包括引起寄主生殖行为的改变, 表现为诱导产雌孤雌生殖、引起细胞质不亲和、遗传雄性的雌性化、雄性致死和增强生殖力等作用方式 (Charlat *et al.*, 2007; Werren *et al.*, 2008); *Wolbachia* 也可降低或增强宿主对环境的适应性 (周淑香等, 2009)、参与宿主营养代谢等 (Brownlie *et al.*, 2009; Kremer *et al.*, 2009)。因此, *Wolbachia* 有可能是性别决定、体内共生和物种形成等生物学问题的重要线索, 具有重要的科学意义; 同时, *Wolbachia* 在生物防治等领域的潜在用途也倍受关注 (龚鹏等, 2002; 王辉和刘敬泽, 2004; 仲崇翔等, 2006; Werren *et al.*, 2010; 丛斌等, 2014)。

检测 *Wolbachia* 的常用基因有核糖体 16S rRNA (O'Neill *et al.*, 1992)、细胞分裂蛋白基因 *ftsZ* (Casiraghi *et al.*, 2005) 和细菌表面蛋白基因 *wsp* (Zhou *et al.*, 1998) 等。根据不同基因序列的进化关系, *Wolbachia* 被建议分成不同的大组 (Supergroup), 现已发展到包含 A~F 和 H~Q 的 16 个大组 (Glowska *et al.*, 2015)。其中, 感染节肢动物的大多属于 A 和 B 大组。Zhou 等 (1998) 建议根据 *wsp* 序列 2.5% 的差异为标准将两大组下又细分为 12 个亚组 (Subgroup), 现已发展到 20 多个亚组 (Jeyaprakash and Hoy, 2000)。Hilgenboecker 等 (2008) 的分析表明, *Wolbachia* 约感染 66% 的昆虫物种。Ahmed 等

(2015) 的分析表明, *Wolbachia* 约感染 80% 的鳞翅目昆虫物种和其中近 1/4 到 1/3 的个体, 且地理位置相近的地区 *Wolbachia* 的感染水平也相近, 气候和地理位置是影响其感染水平的重要因子。

茶尺蠖 *Ectropis obliqua* (Prout, 1915) 及其近缘种灰茶尺蠖 *Ectropis griseescens* Warren, 1894 属鳞翅目 Lepidoptera 尺蛾科 Geometridae 灰尺蛾亚科 Ennominae 埃尺蛾属 *Ectropis*, 是我国茶树的主要害虫之一。两者在形态上 (特别是幼虫) 和习性上极为相似, 且在江、浙、皖等省混合发生, 生产上常将两种尺蠖统称为茶尺蠖或茶尺蛾 (姜楠等, 2014)。近年研究表明, 茶尺蠖主要分布于上海、浙江、安徽和江苏等地, 国外主要分布于日本和朝鲜半岛; 灰茶尺蠖广泛分布于我国各大茶区, 国外暂无分布报道 (姜楠等, 2014; Zhang *et al.*, 2014)。茶尺蠖和灰茶尺蠖主要通过幼虫取食茶树叶片进行为害, 严重时可使茶树枝梗光秃, 状如火烧, 给茶叶生产造成巨大的经济损失, 严重影响茶叶的产量和质量 (胡萃等, 1994; 张汉鹄和谭济才, 2004; 张觉晚, 2004; 夏英三和万连步, 2014)。前期研究表明, 茶尺蠖和灰茶尺蠖可以在室内杂交, 并产生性比失调等不完全的生殖隔离现象 (Zhang *et al.*, 2014; 席羽等, 2014)。而 *Wolbachia* 能够导致生殖隔离现象的产生, 且该现象很可能发生在物种形成的早期, 例如对 *Nasonia* 近缘种 *N. giraulti* Darling 和 *N. longicornis* Darling 的研究显示, 当 *Wolbachia* 存在时, 其杂交基本不育; 当用抗生素治愈 *Wolbachia* 感染后, 则出现了杂交后代 (Bordenstein *et al.*, 2001)。

本研究利用 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因特异引物对我国江南茶区中江苏无锡、浙江杭州和余杭的茶尺蠖及浙江新昌、湖北浠水和江西南昌的灰茶尺蠖感染的 *Wolbachia* 进行了 PCR 检测和序列分析,初步确定了这些地区茶尺蠖和灰茶尺蠖体内 *Wolbachia* 的感染状况及其进化地位,结果将为研究 *Wolbachia* 感染对茶尺蠖和灰茶尺蠖生物学、生态学及物种进化的影响奠定基础。

表 1 茶尺蠖和灰茶尺蠖采集信息

Table 1 Collection information of *Ectropis obliqua* and *Ectropis griseascens* samples

昆虫 Insect	采集地点 Sampling locality	种群代码 Population code	经纬度 Latitude/longitude	采集时间 (年/月) Sampling time (year/month)
茶尺蠖 <i>E. obliqua</i>	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	HZ	30.18°N, 120.09°E	2014/08-09
	浙江余杭 Yuhang, Zhejiang	YH	30.39°N, 119.90°E	2014/06
	江苏无锡 Wuxi, Jiangsu	WX	31.57°N, 120.20°N	2014/09
灰茶尺蠖 <i>E. griseascens</i>	浙江新昌 Xinchang, Zhejiang	XCH	29.49°N, 120.99°E	2014/04-05
	江西南昌 Nanchang, Jiangxi	NCH	28.37°N, 115.99°E	2014/08
	湖北浠水 Xishui, Hubei	XSH	30.29°N, 113.23°E	2014/09

1.2 总 DNA 的提取

总 DNA 的提取主要参考相关文献步骤 (Andrews, 2013)。取每个地区采集到的尺蠖幼虫或雌成虫样本 (表 3), 将单头样本用 70%乙醇和无菌水进行表面消毒 (成虫先剪去翅膀并用毛笔小心刷去虫体上的鳞片), 晾干后在盛有 PBS 缓冲液的一次性无菌培养皿中解剖, 分别取雌成虫卵巢或幼虫脂肪体, 单只放入 2 mL 无菌硬壁管, 在 Precellys 研磨仪 (法国 Bertin 公司) 中进行研磨, 用 DNeasy Blood & Tissue Kit

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试虫源茶尺蠖 *E. obliqua* 和灰茶尺蠖 *E. griseascens* 均为 2014 年 4—10 月采集于我国 4 省 6 个地区 (表 1)。样品采回后, 参照姜楠等 (2014) 的方法, 采用 CO I 标记对茶尺蠖和灰茶尺蠖进行区分后, 进行后续实验。

(Qiagen, Germany) 试剂盒提取总 DNA。提取的 DNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测质量, 同时用 NanoDrop 2000 微量核酸/蛋白检测仪 (Thermo, 美国) 测定各总 DNA 浓度、纯度。取电泳无降解拖尾弥散现象、且 OD260/OD280 值介于 1.6~2.0、OD260/OD230 值介于 2.0~2.5 的 DNA 样本用于后续扩增实验或 -20°C 保存备用。

1.3 *Wolbachia* 的 PCR 检测

采用 *Wolbachia* 的 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因引物检测其感染情况, 各引物序列如表 2。PCR

表 2 测序用引物
Table 2 Primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Name of primers	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')	退火温度 T _m (°C) Annealing temperature T _m (°C)	产物大小 (bp) Product size (bp)	参考文献 References
16S rRNA	16Sr-wol 99F	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	54	~900	O'Neill <i>et al.</i> , 1992
	16Sr-wol994R	GAATAGGTATGATTTTCATGT			
<i>ftsZ</i>	<i>ftsZ</i> f1	GTTGTCGCAAATACCGATGC	55	~1 050	Werren <i>et al.</i> , 1995
	<i>ftsZ</i> r1	CTTAAGTAAGCTGGTATATC			
<i>wsp</i>	<i>wsp</i> _F1	GTCCAATARSTGATGARGAAAC	59	~580	Baldo <i>et al.</i> , 2006
	<i>wsp</i> _R1	CYGCACCAAYAGYRCTRATAA			

反应采用 50 μL 反应体系: $10\times\text{buffer}$ (Mg^{2+}) 5.0 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 2 μL 、2 mmol/L dNTP Mix 4.0 μL 、rTaq DNA 聚合酶 (5 U/mL) 0.5 μL 、DNA 模板 2 μL 、ddH₂O 34.5 μL 。以前期测序已确定感染 *Wolbachia* 的灰茶尺蠖 DNA 样本作为阳性对照,以 ddH₂O 代替模板 DNA 作为阴性对照。PCR 反应条件: 95°C 变性 3 min; 94°C 1 min, 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 72°C 彻底延伸 10 min。取 3 μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,置于 BDA digital 凝胶成像系统(德国)上观察拍照。将有目的条带的片段经 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN 公司)回收后,送上海华津生物科技有限公司直接双向测序,对测序有双峰的样品进行克隆后再测序。

1.4 序列分析

将测序所得的 DNA 序列用 SeqMan7.1 软件进行校对拼接后,在 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行 BLAST 检索和同源性比对,以确定所得序列为 *Wolbachia* 的 16S rDNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列,并提交到 GenBank 注册。参照相关文献报道,从 GenBank 检索并下载鳞翅目等昆虫 *Wolbachia* 基因序列中有明确分类地位的 16S rRNA、*wsp* 基因代表性序列作为参考序列(表 4),并采用 MEGA6.06 (Tamura *et al.*, 2013) 软件的 ClustalW 多序列比对程序将这些序列分别与本研究所得到的 16S rRNA 基因和 *wsp* 基因序列进行比对,根据 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离,分别采用最大似然法(ML)、最大简约法(MP)和邻位法(NJ)构建系统进化树,均进行 1 000 次的自导复制(Bootstrap replication)检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 茶尺蠖和灰茶尺蠖体内 *Wolbachia* 的检测

本研究分别采用 *Wolbachia* 的 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 3 个基因对茶尺蠖和灰茶尺蠖各 3 个地理种群(表 1)共 150 头个体(表 3)进行了检测。PCR 产物经电泳检测发现(图 1),灰茶

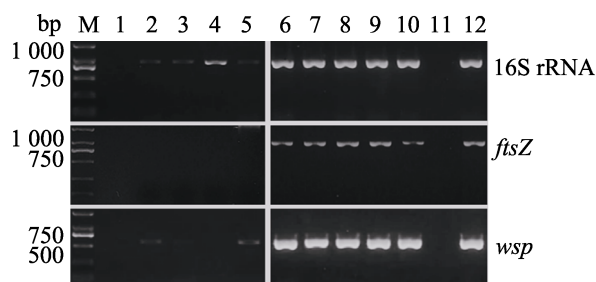


图 1 部分茶尺蠖和灰茶尺蠖体内 *Wolbachia* 的 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Partial PCR products of 16S rRNA, *ftsZ* and *wsp* gene of *Wolbachia* within *Ectropis obliqua* and *Ectropis griseescens*

M: DNA 分子量标准; 1~5: 茶尺蠖; 6~10: 灰茶尺蠖; 11: 阴性对照; 12: 阳性对照。

M: Marker; 1-5: *E. obliqua*; 6-10: *E. griseescens*; 11: Negative control; 12: Positive control.

尺蠖所有个体均能很好地检测到与阳性对照目的基因大小相似的片段,但茶尺蠖仅部分个体检测到 16S rRNA、*wsp* 基因的微弱条带,未检测到 *ftsZ* 基因条带。统计每个样本 3 个基因检测中至少出现 1 个基因条带的样本数发现(表 3),灰茶尺蠖 *Wolbachia* 感染率为 100%,茶尺蠖 *Wolbachia* 的感染率在地区间差异较大,其中无锡种群(WX)最高,达到 95%,杭州种群(HZ)和余杭种群(YH)较低,分别为 46%和 22%。

2.2 茶尺蠖和灰茶尺蠖体内 *Wolbachia* 基因的序列分析

将所有有条带的样品回收后直接双向测序,未检出双峰或多峰,即同一个体未发现双重或多重感染现象。序列经 SeqMan7.1 软件校对拼接后,在 NCBI 网站上 BLAST 检索,结果与 GenBank 中已注册的 *Wolbachia* 的 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因部分序列相似度可达 99%以上,表明本实验所得序列为 *Wolbachia* 基因序列。序列经校对拼接后共获得茶尺蠖 *Wolbachia* 的 16S rRNA 基因序列 37 条(HZ 12 条, YH 4 条, WX 21 条)、*wsp* 基因序列 26 条(HZ 3 条, YH 4 条, WX 19 条),以及灰茶尺蠖 *Wolbachia* 的 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 基因序列各 82 条(XCH 34 条, NCH 24 条, XSH 24 条)。将 16S rRNA、*ftsZ*

表 3 *Wolbachia* 在茶尺蠖和灰茶尺蠖不同种群中的感染情况
Table 3 *Wolbachia* infection in different geographical populations of *Ectropis obliqua* and *Ectropis griseascens*

昆虫 Insect	种群代码 Population code	虫态 Instars	样本量 Sampling size	阳性样本量 Number of positive PCR's				感染率 (%) Infection rate
				16S rDNA	<i>ftsZ</i>	<i>wsp</i>	小计* Subtotal	
茶尺蠖 <i>E. obliqua</i>	HZ	成虫 Adult	16	8	0	2	12	>46
		幼虫 Larve	10	4	0	1	-	-
	YH	幼虫 Larve	18	4	0	4	4	>22
	WX	幼虫 Larve	24	21	0	19	23	>95
灰茶尺蠖 <i>E. griseascens</i>	XCH	成虫 Adult	24	24	24	24	34	100
		幼虫 Larve	10	10	10	10	-	-
	NCH	幼虫 Larve	24	24	24	24	24	100
	XSH	幼虫 Larve	24	24	24	24	24	100

*：该列每个数字代表该种群的单个样本至少扩增出 3 个基因中的 1 个基因条带的样本数量。

*: Number of samples have at least one positive PCR's of the three genes in every sample among the relevant population.

和 *wsp* 基因序列分别截取 852、1 003、533 bp 的中间序列进行比对。

Wolbachia 的 16S rRNA 基因序列比对结果表明，新昌灰茶尺蠖 (XCH) 的 34 条序列完全相同 (GenBank 登录号：KT862198)，该序列与幻紫斑蛱蝶 *H. bolina* 等感染的 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列 (AB052745) 一致 (相似性 100%)；浔水 (XSH) 和南昌 (NCH) 灰茶尺蠖共 48 条序列与茶尺蠖的 35 条序列 (HZ 12 条，YH 4 条，WX 19 条) 完全相同 (GenBank 登录号：KT862199)，与 KT862198 有 6 个碱基差异，并且与感染稻纵卷叶螟 *C. medinalis* (HQ336509) 和蝙蝠蛾科的 *T. sylvina* (EU727124) 的 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列一致 (相似性 100%)；而茶尺蠖另外 2 条序列 (WX 2 条) 完全相同 (GenBank 登录号：KU058642)，该序列与 KT862198 和 KT862199 分别有 5 个和 3 个碱基差异，并且与感染丽蝇蛹集金小蜂 *N. vitripennis* 等昆虫的 *Wolbachia* 16S rRNA 基因相似性较高 (99.88%)。3 条不同 16S rRNA 序列间差异在 0.362%~0.727% 之间，均小于 1%。

Wolbachia 的 *ftsZ* 基因序列比对结果表明，与灰茶尺蠖 *Wolbachia* 的 16S rRNA 基因序列相同，新昌灰茶尺蠖 (XCH) 的 34 条序列完全相同 (GenBank 登录号：KT862200)，该序列与感染日本鹿儿岛等地的幻紫斑蛱蝶 *H. bolina* 的

Wolbachia ftsZ 基因序列 (AB167352) 一致 (相似性 100%)；而浔水 (XSH) 和南昌 (NCH) 灰茶尺蠖的 48 条序列完全相同 (GenBank 登录号：KT862201)，与 KT862200 有 15 个碱基差异 (1.642%)，并且与感染日本冲绳等地的宽边黄粉蝶 *E. hecabe* 的 *Wolbachia ftsZ* 序列 (AB107224) 相似性最高 (99.35%)。

Wolbachia 的 *wsp* 基因序列比对结果表明，与 16S rRNA 和 *ftsZ* 基因不同的是，茶尺蠖和灰茶尺蠖 *Wolbachia* 所有 108 条 *wsp* 基因序列完全相同 (GenBank 登录号：KT633949)，并且与感染幻紫斑蛱蝶 *H. bolina* (AB085181) 的 *Wolbachia wsp* 基因序列一致 (相似性 100%)。

2.3 茶尺蠖和灰茶尺蠖体内 *Wolbachia* 基因的系统发育分析

根据基因序列长度、位置及是否有明确的分类地位报道等为标准，从 GenBank 数据库中下载所有鳞翅目昆虫及其它代表性昆虫物种所感染 *Wolbachia* 的 16S rRNA 基因序列 (表 4)，构建 ML 系统进化树 (图 2)。结果表明，感染茶尺蠖和灰茶尺蠖 *Wolbachia* 的 3 条 16S rRNA 基因序列均被聚到 B 组内 (遗传距离 0~1.22%)，且与幻紫斑蛱蝶 *H. bolina bolina*、稻纵卷叶螟 *C. medinalis* 和蝙蝠蛾科的 *T. sylvina* 所感染 *Wolbachia* 的 16S rRNA 基因序列十分接近，而

表 4 用于系统发育分析的 *Wolbachia* 16S rRNA 基因和 *wsp* 基因序列
Table 4 Reference sequences of *Wolbachia* 16 S rRNA and *wsp* used in the phylogenetic analysis

寄主物种	Host species	Wolbachia 类型 Wolbachia type	GenBank 登录号 GenBank accession no.	
			16S rRNA	wsp
尺蛾科 Geometridae	秋白尺蛾 <i>Epirrita autumnata</i>	B	—	JN543682
	克里氏秋白尺蛾 <i>Epirrita christyi</i>	B	—	JN543672
	茶尺蠖 <i>Ectropis obliqua</i>	B	KU058642* KT862199*	KT633949*
	灰茶尺蠖 <i>Ectropis grisescens</i>	B	KT862198* KT862199*	KT633949*
蝙蝠蛾科 Hepialidae	<i>Triodia sylvina</i>	B	EU727124	—
蛱蝶科 Nymphalidae	幻紫斑蛱蝶 <i>Hypolimnas bolina bolina</i>	B	AB052745	AB085181
蜡螟科 Galleriidae	米蛾 <i>Corcyra cephalonica</i>	B	—	AY634679
螟蛾科 Pyralidae	粉斑螟蛾 <i>Cadra cautella</i>	B	—	AF020076
	二化螟 <i>Chilo suppressalis</i>	B	—	HQ336513
	稻纵卷叶螟 <i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	B	HQ336509	HQ336507 AF481195
	桃蛀螟 <i>Dichocrocis punctiferalis</i>	A	—	GU166599
	地中海粉螟 <i>Ephestia kuehniella</i>	A	—	AF071911
	亚洲玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	A	—	GU166588 GU166591 GU166592 GU166594
		B	—	GU166595
	三化螟 <i>Scirpophaga incertulas</i>	B	—	AF481197 AF481198
	斑幕潜叶蛾 <i>Phyllonorycter blancardella</i>	A	FM883706	FM883704
	西伯利亚赤眼蜂 <i>Trichogramma sibericum</i>	B	—	AF071923
赤眼蜂科 Trichogrammatidae	蛱蝶赤眼蜂 <i>Trichogramma kaykai</i>	B	—	AF071924
	<i>Trichogramma deion</i>	B	—	AF020084
				DQ487096
寡节小蜂科 Eulophidae	螺羸巨柄姬小蜂 <i>Melittobia digitata</i>	B	—	
金小蜂科 Pteromalidae	丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	B	M84686	—
	蝶蛹金小蜂 <i>Pteromalus puparum</i>	B	EU827689 EU827690	—
跳小蜂科 Encyrtidae	<i>Apoanagyrus diversicornis</i>	B	—	AF071916
	阿里食虱跳小蜂 <i>Diaphorencyrtus aligarhensis</i>	B	EF433794	—
蚜小蜂科 Aphelinidae	蚜小蜂科 <i>Aphytis melinus</i>	B	EU981291	—
	丽蚜小蜂 <i>Encarsia formosa</i>	B	—	AF071918
木虱科 Psyllidae	柑桔木虱 <i>Diaphorina citri</i>	B	EF433793 GU563892	
拟步甲科 Tenebrionidae	杂拟谷盗 <i>Tribolium confusum</i>	B	—	AF020083
瓢虫科 Coccinellidae	具斑食蚜瓢虫 <i>Coleomegilla maculata fuscilabris</i>	B	—	AF217724

续表 4 (Table 4 continued)

寄主物种 Host species	Wolbachia 类型 Wolbachia type	GenBank 登录号	GenBank accession no.
		16S rRNA	wsp
叶甲科 Chrysomelidae <i>Diabrotica cristata</i>	A	AY007550	—
蜻科 Libellulidae <i>Perithemis tenera</i>	B	—	AF217725
果蝇科 Drosophilidae 黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	A	Z28983	AF020063
嗜凤梨果蝇 <i>Drosophila pseudoananassae</i>	B	DQ412081	—
拟果蝇 <i>Drosophila simulans</i>	A	NR_074437	AF020068 AF020070
虱蝇科 Hippoboscidae 卡纳尔鸽虱蝇 <i>Pseudolynchia canariensis</i>	B	DQ115538	—
实蝇科 Tephritidae 桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>	B	DQ098949	—
蚊科 Culicidae 尖音库蚊 <i>Culex pipiens</i>	B	x61768	AF020061
致倦库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	B	AM999887	—
蟋蟀科 Gryllidae <i>Gryllus integer</i>	B	U83094	—
野地蟋蟀 <i>Gryllus pennsylvanicus</i>	B	U83090	—
大叶蝉科 Cicadellidae 白翅褐脉大叶蝉 <i>Cofana spectra</i>	B	—	AF481173
飞虱科 Delphacidae 白背飞虱 <i>Sogatella furcifera</i>	B	GQ206310	—
<i>Tagosedes orizicolus</i>	B	—	AF020085
叶螨科 Tetranychidae 苜蓿苔螨 <i>Bryobia praetiosa</i>	B	EU499317	—
酢浆草如叶螨 <i>Tetranychina harti</i>	B	GQ162484	—
二斑叶螨 <i>Tetranychus urticae</i>	B	AY753174	—
植绥螨科 Phytoseiidae 西方盲走螨 <i>Metaseiulus occidentalis</i>	B	AY754820	—
鼠妇科 Porcellionidae 球鼠妇 <i>Armadillidium vulgare</i>	B	—	AF071917

*代表本研所得到的序列。Sequences marked with * are from this study.

与斑幕潜叶蛾 *P. blancardella* 等 A 组 *Wolbachia* 的 16S rRNA 基因序列距离较远 (遗传距离 > 1.47%)。MP 树和 NJ 树结果与 ML 树结果一致。

从 GenBank 数据库中下载鳞翅目昆虫所感染 A、B 组 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列和文献报道的 *Wolbachia* 各 A、B 亚组的标准种 *wsp* 序列, 根据 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离, 参照 Zhou 等 (1998) 以亚组成员与其标准种的 *wsp* 序列之间遗传距离小于 2.5% 为标准划分 *Wolbachia* 亚组的方法选取代表性序列 (表 4), 构建 ML 进化树 (图 3)。结果表明, 感染茶尺蠖和灰茶尺蠖的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列与鳞翅目的克里氏秋白尺蛾 *E. christyi*、幻紫斑蛱蝶 *H. bolina bolina*、米蛾 *C. cephalonica*、稻纵卷叶螟 *C. medinalis*、三化螟 *S. incertulas*、以及双翅目尖

音库蚊 *C. pipiens* 等所感染 B 组 Pip 亚组 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列距离最近 (遗传距离 0~0.24%), 聚为同一枝 (Bootstrap 值=100)。MP 树和 NJ 树结果与 ML 树结果极为相似。因此, 本研究的茶尺蠖和灰茶尺蠖所感染的 *Wolbachia* 属于 B 组的 Pip 亚组。

3 讨论

本研究应用 16S rRNA、*ftsZ* 和 *wsp* 3 个基因进行了 *Wolbachia* 的检测, 综合分析表明茶尺蠖和灰茶尺蠖都感染了 *Wolbachia*, 其中灰茶尺蠖 *Wolbachia* 感染率为 100%, 但茶尺蠖 *Wolbachia* 感染率在不同地区间相差很大。在霾灰蝶属 *Maculinea* 中, *M.alcon* 和 *M.arion* 有 100% 的 *Wolbachia* 感染率, 均为一个单一株系, 但 *M.*

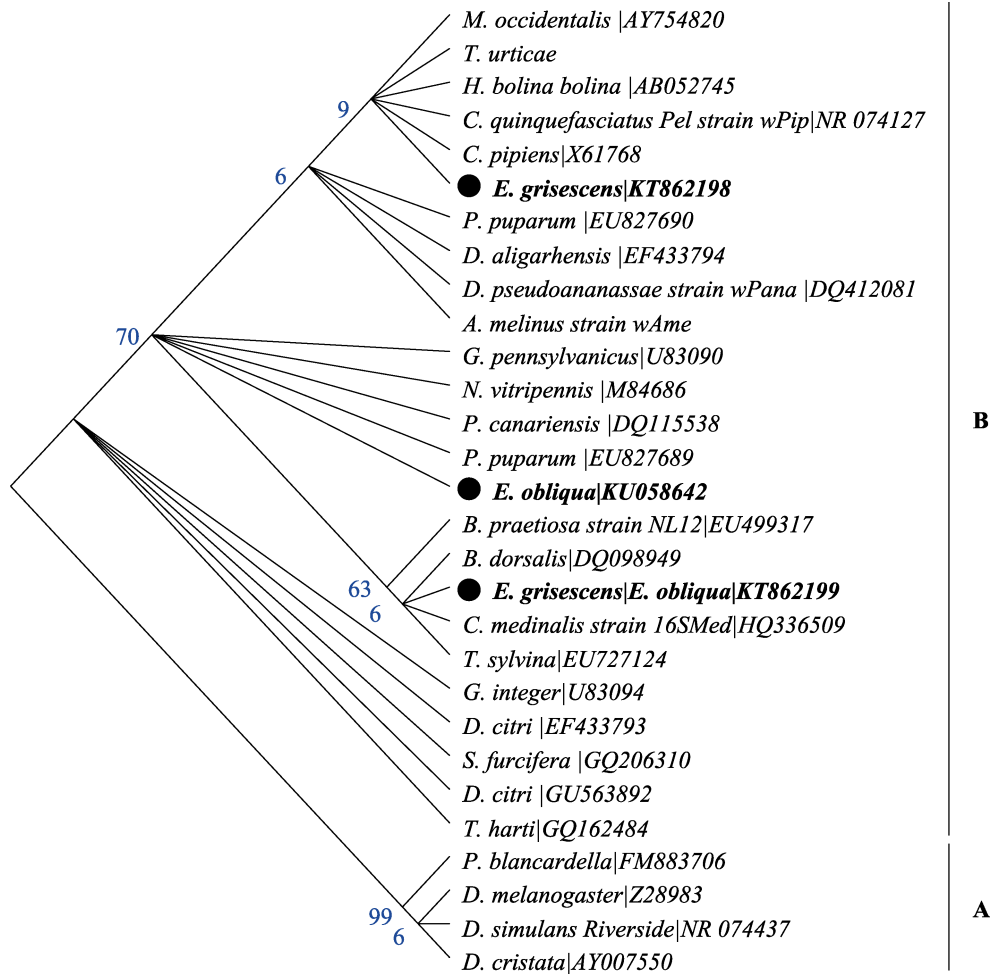


图 2 基于 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列的分子系统发生无根树 (ML 法)

Fig. 2 Unrooted phylogenetic tree of *Wolbachia* based on the 16S rRNA gene sequences with ML method

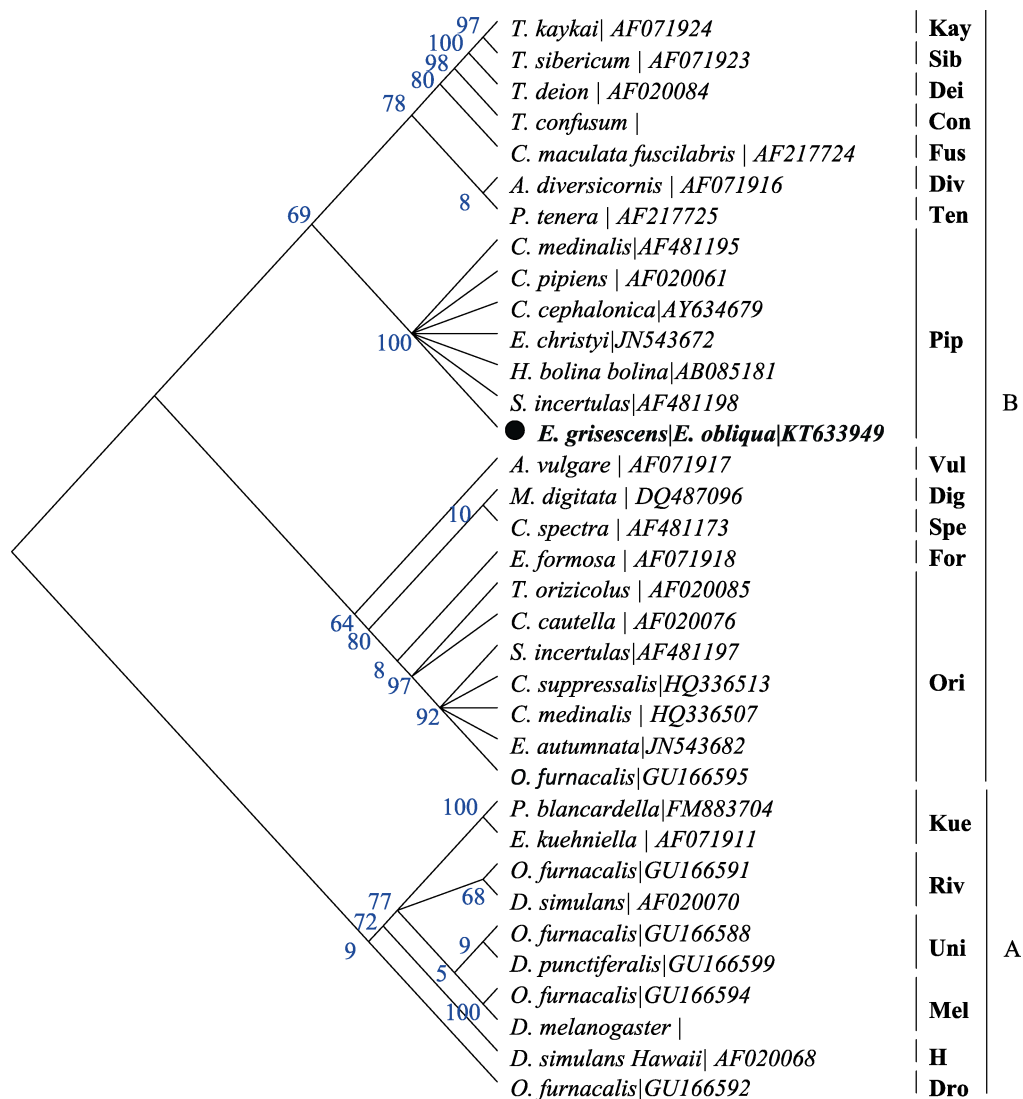
带●标记的序列为本研究所得到的序列。下图同。

Sequences marked with ● are from this study. The same below.

nausithous 和 *M. teleius* 的 *Wolbachia* 感染率非常低, 且都被多个株系感染 (Berezki *et al.*, 2015)。因此, 可能有某些因子限制了 *Wolbachia* 的生长和存活。

靳亮等 (2013) 采用 PCR-DGGE 技术基于 16S rRNA 基因分析了江西南昌茶尺蠖幼虫肠道细菌种群结构和多样性, 结果显示该地区的茶尺蠖感染了 *Wolbachia*, 且占到了肠道细菌的 19.5%。但值得注意的是, 茶尺蠖和灰茶尺蠖是近年结合形态和分子手段才被明确区分的两个近缘种 (姜楠等, 2014), 靳亮等 (2013) 研究中的样本未提供样本的 CO I 等分子鉴定数据, 所取样本是茶尺蠖还是灰茶尺蠖有待进一步核实; 另外, 其所得序列 (KF601917) 为 16S rRNA

的 V6~V8 片段, 本文所采用的为 V1~V6 片段, 所以未与之进行比较。系统进化分析对于了解 *Wolbachia* 在不同寄主体内的进化历史和进化过程有着非常重要的作用 (Zhou *et al.*, 1998), 本研究基于 *wsp* 基因的系统进化分析结果显示, 茶尺蠖和灰茶尺蠖体内的 *Wolbachia* 与感染鳞翅目的克里氏秋白尺蛾 *E. christyi*、幻紫斑蛱蝶 *H. bolina bolina*、米蛾 *C. cephalonica*、稻纵卷叶螟 *C. medinalis*、以及双翅目尖音库蚊 *C. pipiens* 等昆虫体内的 *Wolbachia* 亲缘关系最近, 同源性达 100%, 属于 B 组 Pip 亚组。*Wolbachia* 的传递方式主要为垂直的母系传递, 也可以在同一昆虫种内或种间不同个体、甚至和其它节肢动物间进行水平传递 (甘波谊等, 2002; Werren *et al.*, 2008;

图3 基于 *Wolbachia* *wsp* 基因序列的分子系统发生无根树 (ML 法)Fig. 3 Unrooted phylogenetic tree of *Wolbachia* based on the *wsp* gene sequences with ML method

Stahlhut *et al.*, 2010 ;Bennett *et al.*, 2012 ;Ahmed *et al.*, 2015)。本研究除无锡茶尺蠖的 2 个样本外, 所有被感染的茶尺蠖及湖北浠水、江西南昌的灰茶尺蠖 *Wolbachia* 的 16S rRNA 和 *wsp* 序列完全一致, 并且与其它鳞翅目、双翅目等昆虫所感染 *Wolbachia* 的 16S rRNA 和 *wsp* 序列完全一致。这进一步说明了 *Wolbachia* 在亲缘关系远近不同的昆虫间可能存在水平传递。

Wolbachia 的 Pip 亚组菌株在不同寄主体内有多种功能, 例如在幻紫斑蛱蝶 *H. bolina* 种群中具有杀雄的生殖功能 (Mitsuhashi *et al.*, 2004, 2011 ; Charlat *et al.*, 2005, 2007), 并且在近 50 多年里逐渐出现了抑制杀雄的生殖功能的改变,

这可能与寄主进化有关 (Mitsuhashi *et al.*, 2011) ; 又如在尖音库蚊 *C. pipiens* 中该亚组的 *Wolbachia* 株系具有生殖不亲和的作用 (Pinto *et al.*, 2013)。感染茶尺蠖和灰茶尺蠖的 *Wolbachia* 菌株对其寄主有何功能尚待进一步研究。

综上所述, 茶尺蠖和灰茶尺蠖都被 B 组 Pip 亚组的 *Wolbachia* 感染, 但感染率相差很大, 这种差异的原因以及 *Wolbachia* 在这两近缘种中的功能还有待进一步研究。

致谢: 湖北省农业科学院果树茶叶研究所毛迎新老师及江西省蚕桑茶叶研究所李延生老师分别为本研究提供了部分昆虫样本, 在此表示感谢 !

参考文献 (References)

- Ahmed MZ, Araujo-Jnr EV, Welch JJ, Kawahara AY, 2015. *Wolbachia* in butterflies and moths: geographic structure in infection frequency. *Frontiers in Zoology*, 12(1): 16.
- 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 Pathog*, 10(2): e1004672.
- Andrews ES, 2013. Analyzing arthropods for the presence of bacteria. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 28: E: 1E. 6: 1-E. 6. 1-E. 6. 14.
- Baldo L, Dunning HJ, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MC, Tettelin H, Werren JH, 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(11): 7098–7110.
- Bennett GM, Pantoja NA, O'Grady PM, 2012. Diversity and phylogenetic relationships of *Wolbachia* in *Drosophila* and other native Hawaiian insects. *Fly (Austin)*, 6(4): 273–283.
- Berezcki J, Rác R, Varga Z, Tóth JP, 2015. Controversial patterns of *Wolbachia* infestation in the social parasitic *Maculinea* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 15(3): 591–607.
- Bordenstein SR, O'Hara FP, Werren JH, 2001. *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature*, 409(6821): 707–710.
- Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL, 2009. Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog*, 5(4): e1000368.
- Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen JJ, Werren JH, Bandi C, 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: Clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151(Pt 12): 4015–4022.
- Charlat S, Davies N, Roderick GK, Hurst GD, 2007. Disrupting the timing of *Wolbachia*-induced male-killing. *Biol. Lett.*, 3(2): 154–156.
- Charlat S, Hornett EA, Dyson EA, Ho P, Loc NT, Schilthuizen M, Davies N, Roderick GK, Hurst G, 2005. Prevalence and penetrance variation of male-killing *Wolbachia* across Indo-Pacific populations of the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Mol. Ecol.*, 14(11): 3525–3530.
- Charlat S, Hornett EA, Fullard JH, Davies N, Roderick GK, Wedell N, Hurst GDD, 2007. Extraordinary flux in sex ratio. *Science*, 317(5835): 214.
- Cong B, Zhang TS, Hu ZF, Lei CP, Zhang MZ, Yang Z, Zhang ZT, Bai HY, Dong H, Qian HT, 2014. Biological control effect of thelytokous strain *Trichogramma dendrolimi*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(5): 1289–1298. [丛斌, 张统书, 胡志凤, 类成平, 张明珠, 杨哲, 张柱亭, 白鸿岩, 董辉, 钱海涛, 2014. 松毛虫赤眼蜂孤雌产雌品系田间控害作用研究. 应用昆虫学报, 51(5): 1289–1298.]
- Gan BY, Zhou WG, Feng LB, Shen DL, Li CB, 2002. Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 14–17. [甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 沈大棣, 李昌本, 2002. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. 昆虫学报, 45(1): 14–17]
- Glowska E, Dragun-Damian A, Dabert M, Gerth M, 2015. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection Genetics and Evolution*, 30: 140–146.
- Gong P, Shen ZR, 2002. *Wolbachia* endosymbionts and their manipulation of reproduction of arthropod hosts. *Acta Entomologica Sinica*, 45(2): 241–252. [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.]
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH, 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *Fems. Microbiol. Lett.*, 281(2): 215–220.
- Hu C, Zhu JQ, Ye GY, Hong J, 1994. *Ectropis obliqua* Prout, A Serious Geometrid Pest of Tea Bush in East China. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1–3. [胡萃, 朱俊庆, 叶恭银, 洪健, 1994. 茶尺蠖. 上海: 上海科学技术出版社. 1–3.]
- Jeyaparakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.*, 9(4): 393–405.
- Jiang N, Liu SX, Xue DY, Tang MJ, Xiao Q, Han HX, 2014. External morphology and molecular identification of two tea Geometrid moth from southern China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(4): 987–1002. [姜楠, 刘淑仙, 薛大勇, 唐美君, 肖强, 韩红香, 2014. 我国华东地区两种茶尺蠖的形态和分子鉴定. 应用昆虫学报, 51(4): 987–1002.]
- Jin L, Wang JC, Wang HX, Zhang JG, Yang G, Jin HY, 2013. Bacterial community in midguts of *Ectropis oblique* larvae by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis. *Jiangxi Science*, 31(6): 759–763. [靳亮, 王金昌, 王洪秀, 张贱根, 杨罡, 靳海燕, 2013. 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术分析茶尺蠖幼虫肠道细菌种群结构及多样性. 江西科学, 31(6): 759–763.]
- Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F, 2009. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*, 5(10): e1000630.
- Mitsuhashi W, Fukuda H, Nicho K, Murakami R, 2004. Male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Entomol. Exp. Appl.*, 112(1): 57–64.
- Mitsuhashi W, Ikeda H, Muraji M, 2011. Fifty-year trend towards

- suppression of *Wolbachia*-induced male-killing by its butterfly host, *Hypolimnas bolina*. *J. Insect Sci.*, 11(1): 92.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(7): 2699–2702.
- Pinto SB, Stainton K, Harris S, Kambris Z, Sutton ER, Bonsall MB, Parkhill J, Sinkins SP, 2013. Transcriptional regulation of *Culex pipiens* mosquitoes by *Wolbachia* influences cytoplasmic incompatibility. *PLoS Pathog.*, 9(10): e1003647.
- Stahlhut JK, Desjardins CA, Clark ME, Baldo L, Russell JA, Werren JH, Jaenike J, 2010. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Mol. Ecol.*, 19(9): 1940–1952.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0. *Mol. Biol. Evol.*, 30(12): 2725–2729.
- Wang H, Liu J, 2004. Roles of *wolbachia* on target insect and its biological control potential. *Chinese Journal of Pest Control*, 20(1): 3–5. [王辉, 刘敬泽, 2004. 沃尔巴克氏体对靶标昆虫的作用及生防潜能. 医学动物防制, 20(1): 3–5.]
- Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(10): 741–751.
- Werren JH, Richards S, Desjardins CA, Niehuis O, Gadau J, Colbourne JK, Werren JH, Richards S, Desjardins CA, Niehuis O, Gadau J, Colbourne JK, Beukeboom LW, Desplan C, Elsik CG, Grimmelikhuijzen CJ, Kitts P, Lynch JA, Murphy T, Oliveira DC, Smith CD, van de Zande L, Worley KC, Zdobnov EM, Aerts M, Albert S, Anaya VH, Anzola JM, Barchuk AR, Behura SK, Bera AN, Berenbaum MR, Bertossa RC, Bitondi MM, Bordenstein SR, Bork P, Bornberg-Bauer E, Brunain M, Cazzamali G, Chaboub L, Chacko J, Chavez D, Childers CP, Choi JH, Clark ME, Claudianos C, Clinton RA, Cree AG, Cristino AS, Dang PM, Darby AC, de Graaf DC, Devreese B, Dinh HH, Edwards R, Elango N, Elhaik E, Ermolaeva O, Evans JD, Foret S, Fowler GR, Gerlach D, Gibson JD, Gilbert DG, Graur D, Grunder S, Hagen DE, Han Y, Hauser F, Hultmark D, Hunter HT, Hurst GD, Jhangian SN, Jiang H, Johnson RM, Jones AK, Junier T, Kadowaki T, Kamping A, Kapustin Y, Kechavarzi B, Kim J, Kim J, Kiryutin B, Koevoets T, Kovar CL, Kriventseva EV, Kucharski R, Lee H, Lee SL, Lees K, Lewis LR, Loehlin DW, Logsdon JJ, Lopez JA, Lozado RJ, Maglott D, Maleszka R, Mayampurath A, Mazur DJ, McClure MA, Moore AD, Morgan MB, Muller J, Munoz-Torres MC, Muzny DM, Nazareth LV, Neupert S, Nguyen NB, Nunes FM, Oakeshott JG, Okwuonu GO, Pannebakker BA, Pejaver VR, Peng Z, Pratt SC, Predel R, Pu LL, Ranson H, Raychoudhury R, Rechtsteiner A, Reese JT, Reid JG, Riddle M, Robertson HM, Romero-Severson J, Rosenberg M, Sackton TB, Sattelle DB, Schluns H, Schmitt T, Schneider M, Schuler A, Schurko AM, Shuker DM, Simoes ZL, Sinha S, Smith Z, Solovyev V, Souvorov A, Springauf A, Stafflinger E, Stage DE, Stanke M, Tanaka Y, Telschow A, Trent C, Vattathil S, Verhulst EC, Viljakainen L, Wanner KW, Waterhouse RM, Whitfield JB, Wilkes TE, Williamson M, Willis JH, Wolschin F, Wyder S, Yamada T, Yi SV, Zecher CN, Zhang L, Gibbs RA, 2010. Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. *Science*, 327(5963): 343–348.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. Biol. Sci.*, 261(1360): 55–63.
- Xi Y, Yin KS, Tang MJ, Xiao Q, 2014. Geographic populations of the tea geometrid, *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae) in Zhejiang, eastern China have differentiated into different species. *Acta Entomologica Sinica*, 57(9): 1117–1122. [席羽, 殷坤山, 唐美君, 肖强, 2014. 浙江茶尺蠖地理种群已分化成为不同种. 昆虫学报, 57(9): 1117–1122.]
- Xia YS, Wan LB, 2014. Preliminary Study on the biological characteristics of *Ectropis obliqua* Prout. *Journal of Anhui Agri. Sci.*, 42(29): 10175–10176. [夏英三, 万连步, 2014. 茶尺蠖生物学特性初步研究. 安徽农业科学, 42(29): 10175–10176.]
- Zhang GH, Yuan ZJ, Zhang CX, Yin KS, Tang MJ, Guo HW, Fu JY, Xiao Q, 2014. Detecting deep divergence in seventeen populations of tea geometrid (*Ectropis obliqua* Prout) in China by COI mtDNA and cross-breeding. *PLoS ONE*, 9(6): e99373.
- Zhang HH, Tan JC, 2004. Pest of Tea Plant in China and Its Non-harmful Management. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House., 155, 168. [张汉鹄, 谭济才, 2004. 中国茶树害虫及其无公害治理. 合肥: 安徽科学技术出版社. 155, 168.]
- Zhang JW, 2004. The occurrence and control of *Ectropis griseascens* in Hunan. *Journal of Tea Communication*, 31(2): 18–20. [张觉晚, 2004. 灰茶尺蠖在湖南的发生与防治. 茶叶通讯, 31(2): 18–20.]
- Zhou W, Rousset F, O'Neil S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. Biol. Sci.*, 265(1395): 509–515.
- Zhong CX, Chen J, Qiao J, Yang YZ, 2006. Biological characteristics of *Wolbachia* in small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* and the prospects for application. *Plant Protection*, 32(3): 12–16. [仲崇翔, 陈建, 乔静, 杨益众, 2006. 灰飞虱体内沃尔巴克氏体生物学特性及其利用展望. 植物保护, 32(3): 12–16.]
- Zhou SX, Li Y, Zhang F, 2009. Influence of *Wolbachia* parasitoid on reproduction and the fitness of the wasp *Encarsia formosa*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 36(1): 7–10. [周淑香, 李玉, 张帆, 2009. *Wolbachia* 共生对丽蚜小蜂生殖和适应性的影响. 植物保护学报, 36(1): 7–10.]