

共生菌 *Asaia* 在四种鳞翅目害虫中的感染情况*

高雪瑶¹ 杨现明² 陆宴辉^{2**} 梁革梅²

(1. 中国农业大学生物学院, 北京 100193;

2. 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193)

摘要 【目的】*Asaia* 属醋酸菌已被证明与双翅目、膜翅目、半翅目和鳞翅目的多种昆虫存在着重要的共生关系。本研究检测斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius)、粘虫 *Mythimna separata* Walker、小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg 和甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus 体内 *Asaia* 的感染情况, 并研究了 *Asaia* 的传递效率。【方法】基于 16 s rDNA 特异序列检测, 分析 *Asaia* 在 4 种鳞翅目害虫中的感染情况。通过建立感染 *Asaia* 的斜纹夜蛾品系, 检测其垂直传递效率。【结果】*Asaia* 在斜纹夜蛾、粘虫、小地老虎和甘蓝夜蛾田间种群中均有感染, 其感染率分别为 45.8%、66.7%、47.2% 和 31.0%。系统发育分析表明, *Asaia* 16S rDNA 序列可分为 3 种序列型 ST1、ST2 和 ST3, 其中 4 种昆虫中均含有 ST1 序列型。父母亲本均感染 *Asaia* 的斜纹夜蛾后代, *Asaia* 感染率达到 91.7%。【结论】*Asaia* 在鳞翅目害虫中存在较高的感染率, 在昆虫物种间可能存在水平传递并且在种内可进行垂直传递。

关键词 *Asaia*, 细菌, 16S rDNA, 斜纹夜蛾, 粘虫, 小地老虎, 甘蓝夜蛾

Prevalence of infection of the bacteria *Asaia* in four Lepidopteran species

GAO Xue-Yao¹ YANG Xian-Ming² LU Yan-Hui^{2**} LIANG Ge-Mei²

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract 【Objectives】Bacteria of the genus *Asaia* can symbiotically colonize insects of phylogenetically distant genera and orders, e.g. Diptera, Hymenoptera, Hemiptera and Lepidoptera. Our aim in this study was to investigate the prevalence of *Asaia* infection in four Lepidopteran species; *Prodenia litura* (Fabricius), *Mythimna separata* Walker, *Agrotis ypsilon* Rottemberg and *Mamestra brassicae* Linnaeus, and to analyze its mode of transmission within and between species. 【Methods】*Asaia* infection rates were investigated using the polymerase chain reaction (PCR) with primers targeting the *Asaia* 16S rDNA sequence. An *Asaia*-infected *P. litura* strain was established to study the vertical transmission of *Asaia*. 【Results】We found that *P. litura*, *M. separata*, *A. ypsilon* and *M. brassicae*, were all infected with *Asaia* bacteria with infection rates of 45.8%, 66.7%, 47.2% and 31.0%, respectively. Phylogenetic analysis based on the *Asaia* 16S rDNA sequences revealed three sequence types: ST1, ST2 and ST3. All four species were infected with the ST1 type indicating a high possibility of horizontal transmission of *Asaia* among species. Our results also demonstrate the vertical transmission of *Asaia* from infected *P. litura* to their offspring. 【Conclusion】*Asaia* has a high prevalence in the four Lepidopteran species examined and can be both horizontally, and vertically, transmitted.

Key words *Asaia*, bacteria, 16S rDNA, *Prodenia litura*, *Leucania separate*, *Agrotis ypsilon*, *Mamestra brassicae*

*资助项目 Supported projects: 中国博士后科学基金 (2014M561112); 国家自然科学基金 (31321004)

**通讯作者 Corresponding author, E-mail: yhlu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2015-11-13, 接受日期 Accepted: 2016-03-03

昆虫体内含有多种共生细菌 (Dillon and Dillon 2004; Moran *et al.*, 2008)。细菌与昆虫寄主在长期进化过程中形成了复杂的关系, 如互利共生、同食共生、偏利共生和具有致病能力等 (Hooper and Gordon 2001; Moran *et al.*, 2008; Moya *et al.*, 2008)。如魏格沃斯菌 *Wigglesworthia glossinidia brevipalpis* 可为寄主舌蝇 *Glossina brevipalpis* 提供维生素等营养物质, 使其正常生长发育 (Akman *et al.*, 2002); 豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 专性共生菌——巴克纳氏菌 *Buchnera aphidicola* 可为寄主提供必需氨基酸、维生素等营养物质 (Shigenobu and Wilson 2011); 黄粉虫幼虫 *Tenebrio molitor* 肠道细菌可参与植物细胞壁的降解和糖苷的解毒, 对难消化食物和植物次生代谢物的解毒起着重要作用 (Genta *et al.*, 2006)。共生细菌还可以通过抵抗寄生物和病原物的侵染 (Scarborough *et al.*, 2005) 提高寄主的耐热性 (Dunbar *et al.*, 2007) 促进适应新的植物寄主 (Tsuchida *et al.*, 2011) 改变寄主颜色从而给寄主提供保护色 (Tsuchida *et al.*, 2010) 产生性信息素和聚集素 (Brand *et al.*, 1975; Sharon *et al.*, 2010) 等方式, 提高寄主适合度并建立互利共生关系。有的细菌是昆虫的病原菌, 如已被广泛应用于害虫生物防治中的苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Aronson *et al.*, 1986)。随着高通量测序技术 (如 Roche 454 和 Illumina) 的发展并且在昆虫细菌群落结构研究中得到广泛应用 (Kautz *et al.*, 2013; Rogers and Backus, 2014), 新的共生细菌不断被发现。

Asaia 是属于醋酸菌科 *Acetobacteriaceae* 的一种醋酸菌 (Acetic acid bacteria, AAB)。醋酸菌可以将不同种类的酒精和糖类氧化成醋酸, 种类主要包括 *Acetobacter*、*Gluconobacter*、*Gluconacetobacter*、*Asaia* 等属。醋酸菌除了在植物中被发现, 在昆虫中也存在共生关系 (Crotti *et al.*, 2008, 2009; Chouaia *et al.*, 2010)。其中, *Asaia* 醋酸菌已被证实存在于双翅目 (如冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Favia *et al.*, 2007; Crotti *et al.*, 2009) 半翅目 (如葡萄带叶蝉 *Scaphoideus titanus* (Crotti *et al.*, 2009; Gonella *et al.*, 2012) 膜翅目 (如意大利蜜蜂 *Apis mellifera* (Good *et al.*, 2014) 和一种蚁类 *Cephalotes varians* (Kautz *et al.*, 2013)) 和鳞翅目 (如菜青虫 *Pieris rapae* (Robinson *et al.*, 2010)) 昆虫中。*Asaia* 共生菌对其寄主生长、繁殖过程起着十分重要的作用, 如在冈比亚按蚊中, *Asaia* 可以垂直传递并且促进寄主幼虫的发育 (Mitraka *et al.*, 2013)。另外, 由于 *Asaia* 能同时与疟原虫 *Plasmodium* 共生于寄主斯氏按蚊的肠道和唾液腺中, *Asaia* sp. 能发挥免疫调控作用激活寄主抗菌肽的表达而自身不受抑制, 因此可以对 *Asaia* 进行遗传改造, 使其产生抗寄生虫分子来降低媒介传播疟疾的能力 (Favia *et al.*, 2007; Favia *et al.*, 2008; Capone *et al.*, 2013)。

本文检测了 4 种重要的农业害虫斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius)、粘虫 *Mythimna separata* Walker、小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg 和甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus 中 *Asaia* 的感染率, 并对 *Asaia* 的 16S rDNA 序列进行了系统发育分析, 并研究了 *Asaia* 在斜纹夜蛾中的垂直传递效率。

本文检测了 4 种重要的农业害虫斜纹夜蛾 *Prodenia litura* (Fabricius)、粘虫 *Mythimna separata* Walker、小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg 和甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* Linnaeus 中 *Asaia* 的感染率, 并对 *Asaia* 的 16S rDNA 序列进行了系统发育分析, 并研究了 *Asaia* 在斜纹夜蛾中的垂直传递效率。

1 材料与方法

1.1 昆虫的采集

实验昆虫采集自河北省廊坊市中国农业科学院廊坊试验基地 (39.53°N, 116.70°E; 2014 年) 和山东省长岛县北隍城岛 (38°23'N, 120°55'E; 2013 年)。采集的 4 种昆虫分别为: 斜纹夜蛾、粘虫、小地老虎和甘蓝夜蛾, 采集地点及样本量见表 1。所采集的虫态均为成虫, 夜间通过探照灯诱虫器 (GT75 型, 自制) 诱捕获得 (封洪强, 2003)。

1.2 DNA 提取

基因组 DNA 提取步骤参照天根生化科技有限公司动物血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit) 的说明书进行提取。

1.3 共生细菌 *Asaia* 感染率的检测

使用 *Asaia* 细菌 16S rDNA 特异性引物 Asafor

(5'-GCG CGT AGG CGG TTT ACA C-3') 和 Asarev (5'-AGC GTC AGT AAT GAG CCA GGT T-3')(Favia *et al.*, 2008) 检测 *Asaia* 细菌在以上几种鳞翅目昆虫中的感染率。50 μ L PCR 扩增反应体系含: 0.75 U EasyTaq DNA 聚合酶, 1 $\times$ EasyTaq 缓冲液 (包含 2 mmol/L $MgCl_2$; TransGen Biotech), 0.2 mmol/L dNTPs (TransGen Biotech), 1 μ L DNA 模板, 上游和下游引物各 0.4 μ mol/L。PCR 反应条件为: 94 3 min; 94 30 s, 53 30 s, 72 30 s 共 35 个循环; 终延伸 72 5 min。取 PCR 反应产物 3 μ L, 在 1.0% (g/mL) 的琼脂糖凝胶上 120 V 电压电泳 30 min, 最后在 Gel Doc EQ 凝胶成像系统 (Bio-Rad, Hercules, CA) 下观察。扩增的 PCR 产物直接送至中美泰和生物技术有限公司进行测序。每个物种挑取约 10 头感染 *Asaia* 的个体进行 16S rDNA 序列测序, 测得的序列长度为 174 bp。共测得 56 条 *Asaia* 16S rDNA 序列序列: 测得山东长岛粘虫、小地老虎和甘蓝夜蛾序列分别为 16、15 和 6 条序列, 测得廊坊粘虫、小地老虎和斜纹夜蛾分别 6、5 和 8 条序列。

1.4 *Asaia* 16S rDNA 基因序列分析

利用 CodonCode Aligner 3.6.1 (CodonCode, Dedham, MA, USA) 查看 16S rDNA 的正反向序列波峰并进行编辑和拼接。利用 Clustal X 2.0.11 比对拼接后的一致序列 (Larkin *et al.*, 2007)。利用 BLAST 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 网站上进行同源序列查找并下载相关序列进行系统发育分析。利用 DNASP v5 软件计算序列分化与序列型个数。比对结果输入 MEGA 4.0 软件 (Tamura *et al.*, 2007), 基于 Kimura-2 Parameter 模型计算各序列间的遗传距离。利用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 各个分支的 Bootstrap 置信度用 1 000 次自展来评价。

1.5 *Asaia* 在斜纹夜蛾中的垂直传递效率检测

以室内饲养的斜纹夜蛾种群, 通过单对配对

建立感染 *Asaia* 斜纹夜蛾品系, 主要步骤如下: 将室内饲养的斜纹夜蛾进行单对配对产卵, 刚羽化的雌雄虫单对配对放入已消毒的 250 mL 塑料杯中, 用已灭菌医用纱布覆盖杯口以供产卵, 并供以 10% 的糖水作为成虫营养液。将孵化的幼虫接入 24 孔板, 养至 5 龄后接入指形管中, 均用人工饲料饲养, 人工饲料配方参照梁革梅等 (1999) 方法, 待斜纹夜蛾长至成虫时进行按 1.2 和 1.3 描述方法进行 *Asaia* 细菌的检测。若亲本与子代均 100% 感染 *Asaia*, 则本种群用于垂直传递实验。感染 *Asaia* 的雌雄虫进行单对配对后, 后代按以上方法饲养至成虫并检测斜纹夜蛾后代 *Asaia* 的感染率, 共检测 36 头。斜纹夜蛾饲养条件为温度 (27 ± 1), 光照 D16:L8, 相对湿度 70%。

2 结果与分析

2.1 共生细菌 *Asaia* 对 4 种鳞翅目害虫的感染率

采自河北廊坊的斜纹夜蛾 *Asaia* 细菌感染率为 45.8%; 河北廊坊和山东长岛粘虫的感染率分别为 41.7% 和 81.0%; 河北廊坊和山东长岛小地老虎的感染率分别为 33.3% 和 54.2%; 山东长岛甘蓝夜蛾的感染率为 31.0% (表 1)。

共测得 4 个物种共 56 条 16S rDNA 序列, 经过 DnaSP 分析发现共有 3 种序列型 (ST1、ST2 和 ST3), 其中有 4 个变异位点。序列型 ST1 共有 42 条序列, ST2 共有 13 条序列, ST3 对应 1 条序列。为避免 PCR 扩增和测序过程中出现误差, ST3 序列经过两次测序验证。

粘虫和小地老虎共有 2 种 *Asaia* 序列型 ST1 和 ST2, 甘蓝夜蛾有 2 种序列型 ST1 和 ST3, 斜纹夜蛾只有 1 种序列型 ST1。其中粘虫、斜纹夜蛾、小地老虎和甘蓝夜蛾感染的 *Asaia* 均有一种序列型 ST1。另外感染 *Asaia* ST2 序列型的物种包括粘虫和小地老虎。从地理种群的分布来看, 3 个序列型并没有明显的地理分化格局, 均比较均匀的分布。邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树表明 ST3 单独形成一个分支。ST1、ST2、*Asaia* *spathodeae*、*Asaia* *bogorensis* 处在同一个分支 (图 1)。表明以上鳞翅目害虫中感染

表 1 *Asaia* 在 4 种鳞翅目害虫中的感染率
Table 1 The infection rate of *Asaia* in four species of Lepidopterous pests

昆虫种类 Species	河北廊坊 Langfang, Hebei Province				山东长岛 Changdao, Shandong Province			
	样本个数 Sample number	感染个数 <i>Asaia</i> -infected number	感染率 Infection rate	<i>Asaia</i> 序列型 <i>Asaia</i> sequence type	样本个数 Sample number	感染个数 <i>Asaia</i> -infected number	感染率 Infection rate	<i>Asaia</i> 序列型 <i>Asaia</i> sequence type
斜纹夜蛾 <i>Prodenia litura</i>	24	11	45.8%	ST1(8)	—	—		
粘虫 <i>Mythimna separata</i>	24	10	41.7%	ST1(3), ST2(3)	42	34	81.0%	ST1(11), ST2(5)
小地老虎 <i>Agrotis ypsilon</i>	24	8	33.3%	ST1(5), ST2(3)	48	26	54.2%	ST1(10), ST2(2)
甘蓝夜蛾 <i>Mamestra brassicae</i>	—	—			42	13	31.0%	ST1(5), ST3(1)

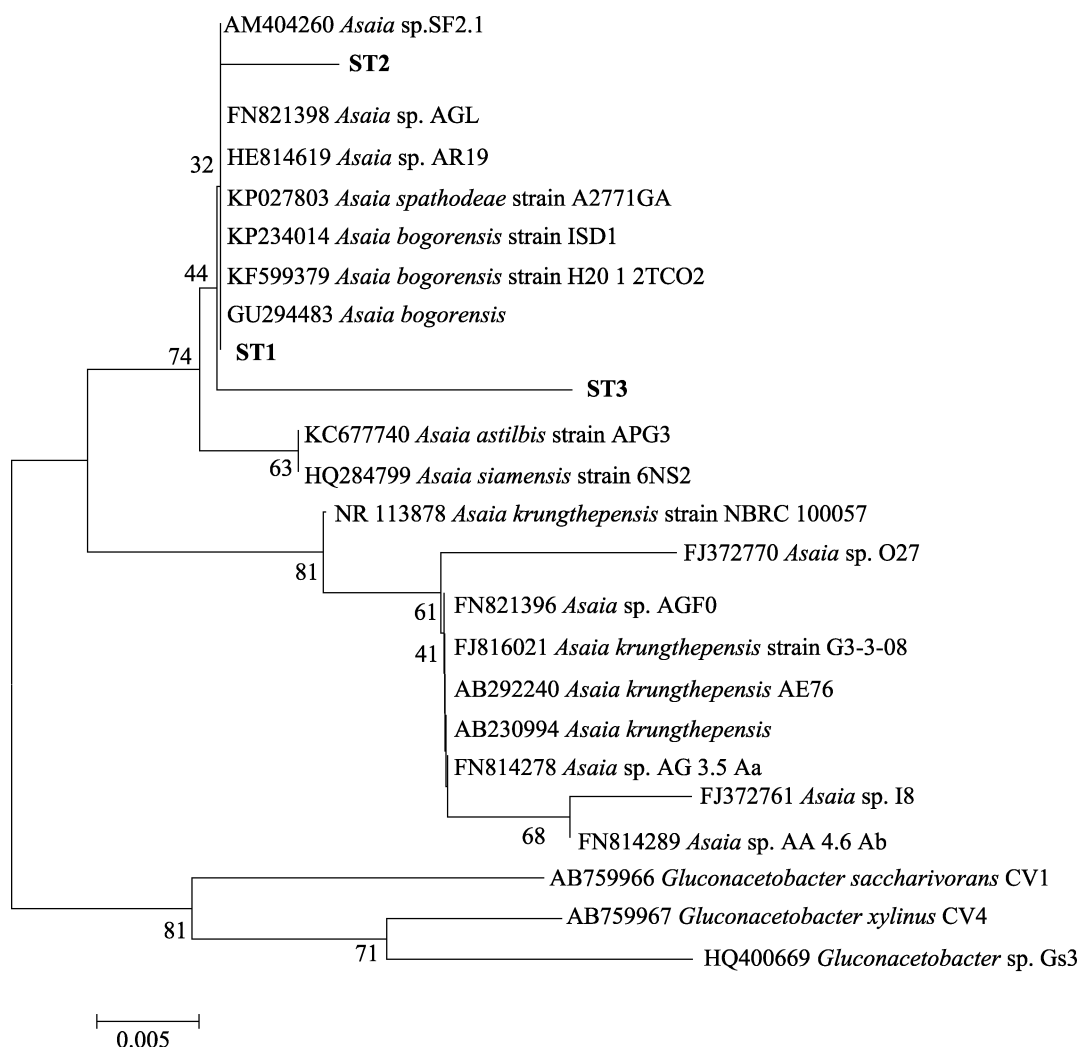


图 1 4 种鳞翅目害虫 *Asaia* 和 *Asaia* 属代表性的 16 S rDNA 序列的 NJ 系统发育树
Fig. 1 The NJ phylogenetic tree based on the 16 S rDNA sequences of *Asaia* from four species of Lepidopterous pests and representative 16 S rDNA sequences of the genus *Asaia*

的 *Asaia* 可能为物种 *Asaia spathodeae*、*Asaia bogorensis*。

2.2 共生细菌 *Asaia* 在斜纹夜蛾中的垂直传递效率

由均感染 *Asaia* 的斜纹夜蛾父本母本产生的 36 头后代中, *Asaia* 携带率为 91.7%, 表明 *Asaia* 具有较高的垂直传递效率。

3 讨论

本研究表明, 在重要的鳞翅目农业害虫斜纹夜蛾、粘虫、小地老虎和甘蓝夜蛾 4 种昆虫中, *Asaia* 具有很高的感染率(感染率从 31%~91%)。在之前研究中, *Asaia* 已被证实存在于双翅目、半翅目、膜翅目和鳞翅目等昆虫中(Crotti *et al.*, 2008, 2009; Tang *et al.*, 2010; Gonella *et al.*, 2012)。通过对 *Asaia* 16S rDNA 进行分析表明, 本研究中检测的 4 种重要的农业害虫同时感染 ST1 株系 *Asaia*, 粘虫和小地老虎还感染 ST2 株系, 表明 *Asaia* 可能在几种昆虫中进行水平传递。水平传递方式可能与相同的寄主植物相关, 以上 4 种害虫均为多食性昆虫, 可取食多种相同的寄主植物(郭予元, 2015)。已有研究表明, 在葡萄带叶蝉 *S. titanus* 中, *Asaia* 可以通过取食和交配两种方式进行水平传递(Gonella *et al.*, 2012)。*Asaia* 是否能在以上几种鳞翅目害虫中水平传递仍然需要生物学实验来进一步的验证。本研究表明在斜纹夜蛾体内 *Asaia* 可以进行垂直传递。在斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 的卵细胞、生殖腺、蛹和幼虫体内都有 *Asaia* 的感染, 且可以传递给后代, 证明 *Asaia* 可以在按蚊中进行垂直传递(Favia *et al.*, 2007)。本研究证实 *Asaia* 在重要的鳞翅目害虫中存在较高的感染率。*Asaia* 较高的垂直传递效率和可能具有的水平传递能力是导致寄主具有较高的感染率的原因。已有研究表明, 昆虫内共生菌可通过提高寄主适合度的方式来促进自身的传递和扩散。如 *Rickettsia* 可以提高烟粉虱产卵量和成活率、加快发育速度、调节性比来提高寄主的适合度从而促进自身在寄主种群的传播和扩散(Himler

et al., 2011)。如 *Wolbachia* 可以通过诱导胞质不亲和(Cytoplasmatic incompatibility)给感染的个体提供生殖优势, 从而促进其自身在种群内扩散(Hoffmann *et al.*, 1990)。*Asaia* 细菌是否会通过提高寄主适合度, 从而有利于自身生存的这一问题仍然需要进一步的研究。

虽然本研究中所用的 *Asaia* 特异性引物获得的 16S rDNA 序列片段长度仅为 174 bp, 长度较短且获得的序列比较保守, 但是能准确地反映 *Asaia* 在这几种农业害虫中的感染情况。利用长片段、多位点的分子标记可能更有利于反映 *Asaia* 与几种害虫的协同进化关系。

由于昆虫体内共同存在多种细菌, 细菌-细菌之间也存在着一定的互作关系。这种互作关系的阐明对人类疾病的防治和农业害虫的治理将会产生重要的作用。Hughes 等(2014)的研究表明昆虫自身的微生物群落(包括 *Asaia*)将会抑制 *Wolbachia* 在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 内的转染效率, 而水平转染 *Wolbachia* 之后的蚊虫可抑制其传播疾病(Kambris *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2011)。生物体内除了细菌之间的互作, 可能还会存在细菌与病毒之间的互作, 如 Walker 等(2011)发现 *Wolbachia* 可抑制埃及伊蚊 *Aedes aegypt* 传播的登革热病毒。因此, 对 *Asaia* 与其他微生物(细菌或病毒)间的互作关系、协同进化过程进行深入研究, 能对寄主与细菌间的互作关系提供新的认知。

综上所述, 本研究发现 *Asaia* 醋酸菌在鳞翅目害虫中具有较高的感染率, 能进行垂直传递, 并且可能存在水平传递。本研究为下一步解析 *Asaia* 属醋酸菌对鳞翅目害虫的生理作用及生物学意义, 奠定了重要基础。

参考文献 (References)

- Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M, Aksoy S. 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.*, 32(3): 402-407.
- Aronson AI, Beckman W, Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews*, 50(1): 1.

- Brand JM, Bracke JW, Markovetz AJ, Wood DL, Browne LE, 1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature*, 254(5496): 136–137.
- Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, Crotti E, Epis S, Angeletti M, Valzano M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Mandrioli M, Favia G, 2013. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit Vectors*, 6(1): 182.
- Chouaia B, Rossi P, Montagna M, Ricci I, Crotti E, Damiani C, Epis S, Faye I, Sagnon N, Alma A, Favia G, Daffonchio D, Bandi C, 2010. Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(22): 7444–7450.
- Crotti E, Damiani C, Pajoro M, Gonella E, Rizzi A, Ricci I, Negri I, Scuppa P, Rossi P, Ballarini P, Raddadi N, Marzorati M, Sacchi L, Clementi E, Genchi M, Mandrioli M, Bandi C, Favia G, Alma A, Daffonchio D, 2009. *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environ. Microbiol.*, 11(12): 3252–3264.
- Crotti E, Pajoro M, Damiani C, Ricci I, Negri I, Rizzi A, Clementi E, Raddadi N, Scuppa P, Marzorati M, Pasqualini L, Bandi C, Sacchi L, Favia G, Alma A, Daffonchio D, 2008. *Asaia*, a transformable bacterium, associated with *Scaphoideus titanus*, the vector of "flavescence doree". *B. Insectol.*, 61(1): 219–220.
- Dillon RJ, Dillon VM, 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.*, 49(1): 71–92.
- Dunbar HE, Wilson ACC, Ferguson NR, Moran NA, 2007. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol.*, 5(5): 1006–1015.
- Feng HQ, 2003. Community aloft and radar observations of seasonal migration of insects in northern China. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [封洪强, 2003. 华北地区空中昆虫群落及昆虫季节性迁移的雷达观测. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, Rizzi A, Urso R, Brusetti L, Borin S, Mora D, Scuppa P, Pasqualini L, Clementi E, Genchi M, Corona S, Negri I, Grandi G, Alma A, Kramer L, Esposito F, Bandi C, Sacchi L, Daffonchio D, 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(21): 9047–9051.
- Favia G, Ricci I, Marzorati M, Negri I, Alma A, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, 2008. Bacteria of the genus *Asaia*: A potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 627(1): 49–59.
- Genta FA, Dillon RJ, Terra WR, Ferreira C, 2006. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.*, 52(6): 593–601.
- Gonella E, Crotti E, Rizzi A, Mandrioli M, Favia G, Daffonchio D, Alma A, 2012. Horizontal transmission of the symbiotic bacterium *Asaia* sp. in the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). *BMC Microbiol.*, 12(Suppl 1): S4.
- Good AP, Gauthier MPL, Vannette RL, Fukami T, 2014. Honey bees avoid nectar colonized by three bacterial species, but not by a yeast species, isolated from the bee gut. *PLoS ONE*, 9(1): e86494.
- Guo YY, 2015. Crop Diseases and Insect Pests in China Third Edition (Vol.III). Beijing: China Agriculture Press. [郭予元, 2015. 中国农作物病虫害 (中册). 北京: 中国农业出版社. 375-1440]
- Himler AG, Adachi-Hagimori T, Bergen JE, Kozuch A, Kelly SE, Tabashnik BE, Chiel E, Duckworth VE, Dennehy TJ, Zchori-Fein E, Hunter MS, 2011. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science*, 332(6026): 254–256.
- Hoffmann AA, Turelli M, Harshman LG, 1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 126(4): 933–948.
- Hooper LV, Gordon JI, 2001. Commensal host–bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519): 1115–1118.
- Hughes GL, Dodson BL, Johnson RM, Murdock CC, Tsujimoto H, Suzuki Y, Patt AA, Cui L, Nossa CW, Barry RM, Sakamoto JM, Hornett EA, Rasgon JL, 2014. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles mosquitoes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111(34): 12498–12503.
- Hughes GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL, 2011. *Wolbachia* infections are virulent and inhibit the human malaria parasite *Plasmodium Falciparum* in *Anopheles Gambiae*. *PLoS Pathog.*, 7(5): e1002043.
- Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MSC, Godfray HCJ, Sinden RE, Sinkins SP, 2010. *Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits *Plasmodium* development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog.*, 6(10): e1001143.
- Kautz S, Rubin BE, Russell JA, & Moreau CS, 2013. Surveying the microbiome of ants: comparing 454 pyrosequencing with traditional methods to uncover bacterial diversity. *Appl. Environm. Microbiol.*, 79(2): 525–534.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Liang GM, Wu KM, Yu, HK, Li KK, Feng X, Guo, YY, 2008. Changes of inheritance mode and fitness in *Helicoverpa*

- armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) along with its resistance evolution to Cry1Ac toxin. *J. Invertebr. Pathol.*, 97(2): 142–149.
- Mitraka E, Stathopoulos S, Siden-Kiamos I, Christophides GK, Louis C, 2013. *Asaia* accelerates larval development of *Anopheles gambiae*. *Pathog. Glob. Health.*, 107(6): 305–311.
- Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A, 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet.*, 42(1): 165–190.
- Moya A, Pereto J, Gil R, Latorre A, 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nat. Rev. Genet.*, 9(3): 218–229.
- Robinson CJ, Schloss P, Ramos Y, Raffa K, Handelsman J, 2010. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microbial. Ecol.*, 59(2): 199–211.
- Rogers EE, Backus EA, 2014. Anterior foregut microbiota of the glassy-winged sharpshooter explored using deep 16S rRNA gene sequencing from individual insects. *PLoS ONE*, 9(9): e106215.
- Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ, 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755): 1781–1781.
- Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(46): 20051–20056.
- Shigenobu S, Wilson ACC, 2011. Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cell Mol. Life Sci.*, 68(8): 1297–1309.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8): 1596–1599.
- Tang M, Lv L, Jing SL, Zhu LL, He GC, 2010. Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(6): 1740–1745.
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, Matsumoto S, Simon JC, Fukatsu T, 2010. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science*, 330(6007): 1102–1104.
- Tsuchida T, Koga R, Matsumoto S, Fukatsu T, 2011. Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect. *Biol. Letters*, 7(2): 245–248.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA, 2011. The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361): 450–453.