

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.02.21

杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 感染密度的时间和空间分布状况

沈加飞, 明庆磊, 程超*, 刘缠民, 冯照军

(江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要: 为搞清杂拟谷盗体内沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 感染密度的时间和空间分布状况, 本研究采用实时荧光定量 PCR 方法测定了杂拟谷盗不同发育阶段、不同日龄、不同性别和不同身体部位的 *Wolbachia* 感染密度。结果表明, 杂拟谷盗在卵和成虫期 *Wolbachia* 感染密度高于其幼虫和蛹期, 成虫腹部的 *Wolbachia* 感染密度高于其头部和胸部, 而成虫不同日龄和雌雄之间的 *Wolbachia* 感染密度均没有显著性差异。本研究明确了 *Wolbachia* 在杂拟谷盗体内的时空分布和动态变化规律, 这对于揭示寄主与共生菌之间的互作关系有着重要意义。

关键词: 杂拟谷盗; 沃尔巴克氏体; 感染密度; 时空分布

中图分类号: Q965; S433.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 02-0378-06

The temporal and spatial distribution status of *Wolbachia* infection density in the confused flour beetle *Tribolium confusum*

SHEN Jia-Fei, MING Qing-Lei, CHENG Chao*, LIU Chan-Min, FENG Zhao-Jun (School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China)

Abstract: To clarify the spatiotemporal distribution status of *Wolbachia* infection density in the confused flour beetle *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val), we determined *Wolbachia* infection density in host different developmental stages, ages, sexes and body parts by the real-time fluorogenic quantitative PCR. The results showed that *Wolbachia* infection density was higher in eggs and adults than in larvae and pupae; *Wolbachia* infection density in adult abdomen was higher than in both head and thorax. However, *Wolbachia* infection density in adults did not differ between males and females and among different ages. All in all, observations on *Wolbachia* spatiotemporal infection density dynamics in *T. confusum* help to improve the understanding of interaction relationships between *Wolbachia* and host.

Key words: *Tribolium confusum*; *Wolbachia*; infection density; spatiotemporal distribution

沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 是一类呈母性遗传的革兰氏阴性细胞内共生菌, 广泛存在于昆虫、蜘蛛和螨等节肢动物体内, 是昆虫体内分布最广的细胞内共生菌, 超过 66% 的昆虫体内都存在 (Hilgenboecker *et al.*, 2008)。 *Wolbachia* 首先是在卵巢中被发现的, 它可由卵垂直传递给下一代, 所以最初对 *Wolbachia* 的研究主要集中在寄主的生殖组织, 而忽视了其在非生殖组织中的分布。实

际上, 通过蛋白免疫印迹、点杂交和诊断 PCR 等多种方法鉴定得出: *Wolbachia* 广泛分布在寄主各种组织中, 但在不同寄主的非生殖组织中的分布有很大的差异, 一些寄主中的 *Wolbachia* 分布在大多数的组织中, 一些则主要限制在生殖组织中 (Dobson *et al.*, 1999)。 *Wolbachia* 之所以引起众多学者的关注, 最主要原因就是其对寄主生殖的调控作用, 包括诱导胞质不亲和、孤雌生殖、雌性

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31172159); 江苏师大科研基金重点项目 (13XLA06)

作者简介: 沈加飞, 男, 1990 生, 江苏盐城人, 硕士生, 研究方向为昆虫遗传与进化, E-mail: shenjiafei0118@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: chengchao@jsnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-07-02; 接受日期 Accepted: 2016-01-02

化和雄性致死等 (Hyun *et al.*, 2000)。这些生殖调控作用被认为能够给感染的雌虫提供一种生殖优势, 有利于 *Wolbachia* 在寄主种群中的维持和扩散 (Hoffmann *et al.*, 1990)。研究表明 *Wolbachia* 对寄主生殖的调控强度取决于其在寄主体内的感染密度 (Breeuwer and Werren, 1993; Sinkins *et al.*, 1995; Bourtzis *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003)。近几年, 实时荧光定量 PCR 方法能够实现对寄主体内 *Wolbachia* 感染密度进行快速、灵敏及准确的定量测定, 这对研究 *Wolbachia* 和寄主之间的互作关系有着重要的意义。Noda 等 (2001) 使用实时定量 PCR 方法测定了灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 与白背飞虱 *Sogatella furcifera* 体内 *Wolbachia* 的感染密度。张慧等 (2010) 使用实时定量 PCR 方法测定了褐飞虱长短翅型成虫不同部位的 *Wolbachia* 感染密度。然而, 绝大部分研究只是测定了昆虫成虫体内的 *Wolbachia* 感染密度, 而没有测定昆虫不同发育阶段 (卵、幼虫、蛹和成虫)、不同日龄、不同性别、不同身体部位的 *Wolbachia* 感染密度。

杂拟谷盗 *Tribolium confusum* Jacquelin du Val 属鞘翅目 Coleoptera 拟步行虫科 Tenebrionidae, 是一种重要的世界性储粮害虫, 在我国大部分地区都有分布 (沈兆鹏, 1998; 张生芳和周玉香, 2002)。其幼虫和成虫均可有害面粉、麦麸、米糠和谷物类等, 且成虫体表的臭腺可以分泌含苯醌等致癌性物质的臭液, 使面粉等被害物结块、变色、发臭而不能食用 (Campbell *et al.*, 2004)。目前, 使用化学农药是防治杂拟谷盗的重要手段, 但由于化学杀虫剂的大量使用, 它们的耐药性逐渐提高, 防治更加困难, 同时也存在农药残留问题, 因此探寻绿色、安全、高效的生物防治方法将是今后对杂拟谷盗综合防治的主要策略 (Campbell, 2012)。已有研究表明杂拟谷盗体内存在 *Wolbachia* (Fialho and Stevens, 1997), 它对杂拟谷盗的生殖具有调控作用, 可引起寄主精卵细胞质不亲和 (王阿旻等, 2014), 这表明利用 *Wolbachia* 对杂拟谷盗进行生物防治具有潜在的应用价值。鉴于此, 本研究拟首先建立定量测定杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 感染密度的方法, 然后再对杂拟谷盗不同发育阶段、不同日龄、不同性别和不同身体部位的 *Wolbachia* 感染密度进行定量分析, 以揭示杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 含量的时空动态分布规律, 这将为阐明 *Wolbachia* 和寄主杂拟谷

盗之间的互作关系提供理论依据, 也为今后可能利用 *Wolbachia* 对杂拟谷盗进行生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

将杂拟谷盗置于 29℃、相对湿度 70% 的恒温恒湿培养箱中, 在小麦全麦面粉 (山东潍坊风筝面粉厂生产) 中进行繁殖扩群。筛选并收集不同发育阶段的试虫, 包括卵、2 龄幼虫、4 龄幼虫、6 龄幼虫、蛹、成虫。所用成虫在其蛹期鉴别雌雄并分开饲养, 分别收集羽化 1、5、10、15、20、25 和 30 日龄的雌雄成虫。所有试虫收集后分别装入细胞冻存管并放入液氮中保存备用。

1.2 DNA 提取

用异硫氰酸胍法 (Ming *et al.*, 2006) 提取总 DNA, 室温晾干后溶解于 20 μ L 灭菌的双蒸水中, -20℃ 保存备用。

1.3 *ftsZ* 基因和 *EF-2* 基因的 PCR 扩增与纯化

对每一个 DNA 样品, 分别做 *ftsZ* 基因和 *EF-2* 基因的 PCR 扩增。*ftsZ* 是一种编码细菌细胞分裂蛋白的基因, 本研究用于杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 的检测及其定量分析。*EF-2* 是真核生物蛋白质合成过程中所需要的一种延伸因子, 是单拷贝管家基因, 用作 *Wolbachia* 定量分析的内参基因。*ftsZ* 基因扩增的特异性引物为 *ftsZ*-F (5'-TACTGACTGTTGGAGTTGTAAGTAAGC-3') 和 *ftsZ*-R (5'-TGCCAGTTGCAAGAACAGAACTCTAACTC-3')。*EF-2* 基因扩增的特异性引物为 *EF-2*F (5'-CTGAA GGGTTTGCTGAAGATA-3') 和 *EF-2*R (5'-CGAC GAGTGGTTGGGATAAT-3')。PCR 反应体系总体积是 30 μ L, 其中包括 2 $\times$ PCR Reaction Mix (TIANGEN) 15 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.24 μ L, DNA 模板 1.2 μ L, 上游/下游引物 (10 mol/L) 各 1.2 μ L, 用灭菌双蒸水补足体积。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 57℃ (*EF-2*) /62℃ (*ftsZ*) 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min。将 30 μ L 的扩增产物在 0.75% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 并利用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 对两个目的基因片段进行纯化。

1.4 *ftsZ* 基因和 *EF-2* 基因的克隆

先将纯化的目的基因片段与 pUCm-T 载体 (上

海生工生物工程有限公司) 连接, 然后进行质粒转化和蓝白斑筛选, 并按照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (上海生工生物工程有限公司) 的方法来对质粒进行抽提, 最后对所提取的质粒 DNA 用 *Pst* I 单酶切进行转化子鉴定。

1.5 实时荧光定量 PCR 测定杂拟谷盗体内的 *Wolbachia* 感染密度

采用实时荧光定量 PCR 双标准曲线法对杂拟谷盗不同发育阶段、不同日龄、不同性别以及不同部位的 *Wolbachia* 感染密度进行测定。

1.5.1 标准曲线的建立

用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 分别酶切已经提取的 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因克隆质粒并用 DNA 纯化试剂盒进行纯化, 用 NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific Inc.) 对质粒 DNA 浓度进行测定, 将其按如下公式换算成质粒标准品的初始拷贝数浓度。

质粒初始拷贝数 = $(6.02 \times 10^{23}) \times \text{质粒浓度} (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{质粒和插入基因片段总碱基数} \times 660)$ 。

将质粒用稀释专用水 (Takara) 按 10 倍梯度稀释 8 个浓度, 每个浓度梯度设置 3 个重复, 同时使用 SYBR 荧光定量试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 和 ABI 公司的 ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System 进行实时定量 PCR 扩增, 记录每个反应的 Ct 值, 制定标准曲线。

用于定量 PCR 的引物为: *ftsZ*-F (5'-TGACGCATTTCAACTCGCC-3') 和 *ftsZ*-R (5'-CACTAATTGCCCTATCTTCTCCTTCT-3'), 扩增产物为 179 bp; *EF-2*F (5'-CTGAAGGTTTGGCTGAA GATA-3') 和 *EF-2*R (5'-CGACGAGTGGTTGGGAT AAT-3'), 扩增产物为 352 bp。反应体系包括: 10 μL 2 $\times$ SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa)、上下游引物各 0.8 μL 、50 $\times$ ROX Reference Dye 0.4 μL 、2 μL DNA 模板和 6 μL dd H₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环。

1.5.2 待测样品的实时荧光定量 PCR

取羽化 1、5、10、15、20、25、30 日龄的杂拟谷盗雌性和雄性成虫试虫, 取卵、2 龄幼虫、4 龄幼虫、6 龄幼虫、蛹、成虫时期的试虫, 取杂拟谷盗雌、雄成虫分别在体视显微镜下分离其头部、胸部和腹部。其中, 30 个卵、5 头 2 龄幼虫、10 个头部、5 个胸部、5 个腹部各作为 1 个样品, 其余均为单头试虫作为 1 个样品。

DNA 提取、基因的 PCR 扩增和克隆及实时荧光定量 PCR 方法同上。将样品 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因荧光定量 PCR 所得到的 Ct 值分别代入到相应的线性回归方程中, 计算出样品 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因的初始拷贝数, 然后将 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因初始拷贝数的对数值之比作为寄主体内 *Wolbachia* 的感染密度。每个样品有 3 个重复。

1.6 数据分析

使用 SPSS 13.0 软件, 对杂拟谷盗不同发育阶段、成虫不同日龄以及成虫不同身体部位的 *Wolbachia* 感染密度数据进行单因素方差分析, 并用 Tukey's HSD 检验法进行多重比较; 对不同日龄的雌性和雄性杂拟谷盗成虫及雌性和雄性成虫不同部位的 *Wolbachia* 感染密度数据进行独立样本 T 检验分析。

2 结果与分析

2.1 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因标准曲线的建立

Wolbachia ftsZ 基因和杂拟谷盗 *EF-2* 基因实时荧光定量 PCR 扩增得到的熔解曲线都有单一的峰值, 且峰线窄而尖, 表明用于实时定量 PCR 扩增的两个目的基因的引物特异性很强, 扩增产物单一。根据连续稀释的不同浓度的质粒实时荧光定量 PCR 扩增后得到的 Ct 值绘制出用于进行 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因初始拷贝数定量的标准曲线 (图 1 和图 2)。

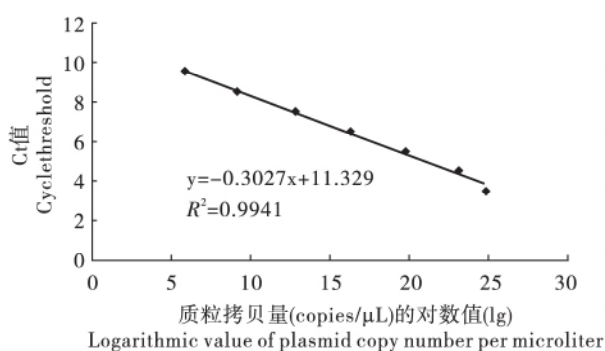


图 1 *ftsZ* 基因的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of *ftsZ* gene

2.2 不同发育阶段的杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 的感染密度

图 3 是杂拟谷盗卵、幼虫、蛹和成虫不同发育阶段体内的 *Wolbachia* 感染密度, 结果显示卵、幼虫、蛹及成虫体内都含有 *Wolbachia*; 卵和成虫

体内的 *Wolbachia* 感染密度显著高于其幼虫和蛹 ($P < 0.01$); 卵与成虫、幼虫与蛹、不同龄幼虫体内的 *Wolbachia* 感染密度差异均不显著 ($P > 0.05$)。

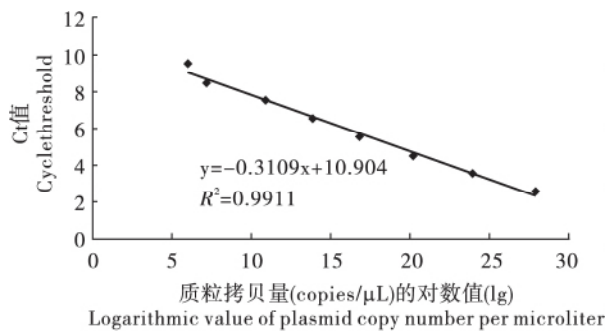


图2 *EF-2* 基因的标准曲线

Fig. 2 The standard curve of *EF-2* gene

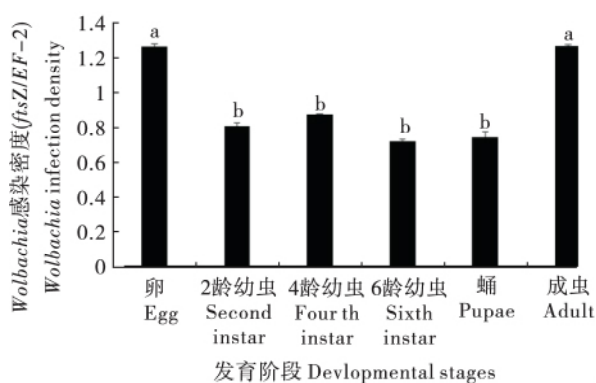


图3 不同发育阶段的杂拟谷盗体内 *Wolbachia* 的密度

Fig. 3 *Wolbachia* infection density in different developmental stages of *Tribolium confusum*

2.3 不同日龄雌性和雄性杂拟谷盗成虫体内 *Wolbachia* 的感染密度

不同日龄的雌性和雄性杂拟谷盗成虫体内 *Wolbachia* 的感染密度结果见图4, 比较分析后可知雌性和雄性成虫体内 *Wolbachia* 感染密度没有显著性差异 ($P > 0.05$), 且不同日龄的杂拟谷盗雄性成虫或雌性成虫体内 *Wolbachia* 感染密度也均没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 杂拟谷盗成虫不同身体部位 *Wolbachia* 的感染密度

图5显示的是杂拟谷盗雌雄成虫不同部位的 *Wolbachia* 密度, 比较分析可知杂拟谷盗雌性成虫腹部的 *Wolbachia* 密度明显高于其头部和胸部 ($P < 0.01$), 但是杂拟谷盗雌性和雄性成虫之间不同部位的 *Wolbachia* 密度没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

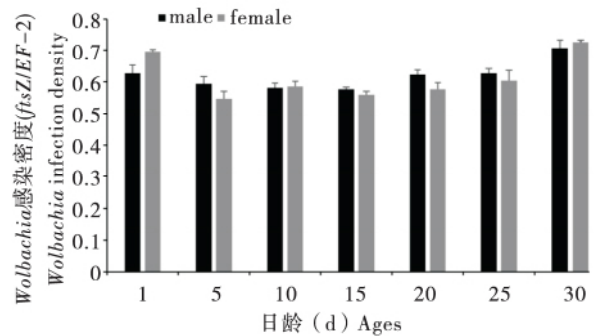


图4 不同日龄的杂拟谷盗雌雄成虫体内 *Wolbachia* 的感染密度

Fig. 4 *Wolbachia* infection density in male and female *Tribolium confusum* adult in different ages

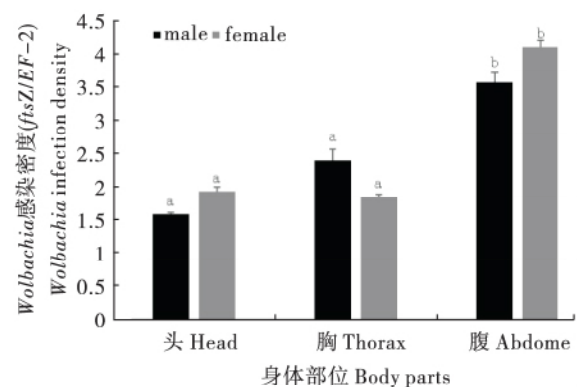


图5 杂拟谷盗雌雄成虫不同部位的 *Wolbachia* 感染密度

Fig. 5 *Wolbachia* infection density in different parts of male and female *Tribolium confusum* adult

3 结论与讨论

本研究选用的内参基因 *EF-2* 是一种编码肽链延伸因子的单拷贝核基因, 是在 mRNA 翻译时促进多肽链延伸的蛋白质因子, 真核细胞的延伸因子有 3 个, 分别称为 *EF-1α*、*EF-1β* 和 *EF-2*。 *ftsZ* 基因是 *Wolbachia* 一种编码细菌细胞分裂蛋白的单拷贝基因, 是一种细菌细胞周期基因, 参与调控细胞分裂过程。本研究使用基因组中 *ftsZ* 和 *EF-2* 基因初始拷贝数对数的比值来表示在寄主体内 *Wolbachia* 的感染密度, 并没有仅仅使用基因组中的 *ftsZ* 基因初始拷贝数来表示在寄主体内 *Wolbachia* 的感染密度, 是因为 *Wolbachia* 相对感染密度表示法不仅可以校正试虫样品的大小和提取 DNA 质和量的不同对定量 PCR 的影响, 而且可以反映出 *Wolbachia* 在寄主组织中每个细胞内的平均

含量,使得 *Wolbachia* 在杂拟谷盗体内感染密度的测定结果更加准确。

本研究中,在杂拟谷盗成虫身体各部位都检测到 *Wolbachia* 的分布,这与其他的研究报道 (Dobson *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2000) 是一致的。*Wolbachia* 在节肢动物不同组织的细胞中都能寄生,这就解释了 *Wolbachia* 为什么在很多节肢动物寄主体内广泛存在。已知 *Wolbachia* 大量存在于寄主的精巢和卵巢中,本实验发现 *Wolbachia* 在杂拟谷盗腹部的感染密度较高,这可能是由于杂拟谷盗腹部的生殖组织中 *Wolbachia* 含量高的缘故。不同日龄的雄性或雌性杂拟谷盗体内的 *Wolbachia* 感染密度均没有明显差异,这可能是由于维持一定的 *Wolbachia* 感染密度是杂拟谷盗成虫完成其生殖功能所必需的。本研究团队以前的研究 (王阿旻等, 2014) 表明 *Wolbachia* 对杂拟谷盗的生殖有调控作用,可引起其胞质不亲和。已有研究也表明, *Wolbachia* 感染密度能影响其诱导寄主胞质不亲和的表现强度。Noda 等 (2001) 报道过 *Wolbachia* 引起灰飞虱的胞质不亲和,甚至在老的成虫中也能诱导强烈的胞质不亲和。Clark 等 (2002) 通过对果蝇的研究,提出了一个 WISS (*Wolbachia* Infected Spermatocyte/ Spermatid) 学说,即精母细胞和精细胞感染的 *Wolbachia* 数量越多,引起果蝇胞质不亲和的强度就越高。

有研究表明,成虫体内 *Wolbachia* 的分布状况早在胚胎发育阶段就已经决定, *Wolbachia* 感染密度高的部位发育成成虫后其相应部位的 *Wolbachia* 也高 (Van Opijnen and Breeuwer, 1999), 并且与细胞骨架密切相关 (Callaini *et al.*, 1994)。在杂拟谷盗不同的发育阶段,卵和成虫体内 *Wolbachia* 的感染密度显著高于其幼虫和蛹,这表明杂拟谷盗发育过程中其体内的 *Wolbachia* 感染密度是动态变化的。尽管具体的机制尚不清楚,但推测可能有两个原因引起 *Wolbachia* 在不同发育阶段对寄主感染密度不同。其一, *Wolbachia* 感染密度是受寄主不同发育阶段细胞增殖所支配的; 其二,由于 *Wolbachia* 在卵细胞质和寄主之间垂直传播且主要影响其生殖,所以 *Wolbachia* 在卵、成虫和腹部的感染密度较高,这与其组织器官的功能是相适应的。

综上所述,本研究系统分析了杂拟谷盗不同发育阶段、不同日龄、不同性别和不同身体部位

的 *Wolbachia* 感染密度,明确了 *Wolbachia* 在杂拟谷盗体内的时空分布和动态变化规律,这对于揭示寄主与共生菌之间的互作关系有着重要意义。

参考文献 (References)

- Breeuwer JAJ, Werren JH. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis* [J]. *Genetics*, 1993, 135: 565–574.
- Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G, *et al.* *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species [J]. *Genetics*, 1996, 144: 1063–1073.
- Cheng Q, Ruel TD, Zhou W, *et al.* Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp [J]. *Medical and Veterinary Entomology*, 2000, 14: 44–50.
- Campbell JF, Arthur FH, Mullen MA. Insect management in food processing facilities [J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2004, 48: 240–295.
- Campbell JF. Attraction of walking *Tribolium castaneum* adults to traps [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2012, 51: 11–22.
- Callaini G, Riparbelli MG, Dilai R. The distribution of cytoplasmic bacteria in the early *Drosophila* embryo mediated by astral microtubules [J]. *Journal of Cell Science*, 1994, 107: 673–682.
- Clark ME, Veneti Z, Bourtzis K, *et al.* The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila* [J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 111: 3–15.
- Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, *et al.* *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29 (2): 153–160.
- Fialho RF, Stevens L. Molecular evidence for single *Wolbachia* infections among geographic strains of the flour beetle *Tribolium confusum* [J]. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 1997, 264: 1065–1068.
- Hoffmann AA, Turelli M, Harshman LG. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* [J]. *Genetics*, 1990, 126 (4): 933–948.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, *et al.* How many species are infected with *Wolbachia* – A statistical analysis of current data [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 281: 215–220.
- Hyun WO, Kim MG, Shin SW, *et al.* Ultrastructural and molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a spider, *Nephila clarata* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 9 (5): 539–543.
- Ikeda T, Ishikawa H, Sasaki T. Infection density of *Wolbachia* and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 84: 1–5.
- Kondo N, Shimada M, Fukatsu T. High prevalence of *Wolbachia* in the azuki bean beetle *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera, Bruchidae)

- [J]. *Zoological Science*, 1999, 16: 955 – 962.
- Ming QL, Wang CZ. Genetic differentiation between *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Helicoverpa assulta* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) based on AFLP markers [J]. *Insect Science*, 2006, 13 (6): 437 – 444.
- Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, et al. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 31: 727 – 737.
- Shen ZP. Identification and control of the important stored – products beetles [J]. *Bulletin of Grain and Oil Storage Science and Technology*, 1998, 6: 41 – 44. [沈兆鹏. 重要储粮甲虫的识别与防治 [J]. 粮油仓储科技通讯, 1998, 6: 41 – 44]
- Sinkins SP, Braig HR, O' Neill SL. *Wolbachia pipientis*: Bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus* [J]. *Experimental Parasitology*, 1995, 81: 284 – 291.
- Van OT, Breeuweer JA. High temperatures eliminate *Wolbachia*, a cytoplasmic incompatibility inducing endosymbiont, from the two – spotted spider mite [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 1999, 23 (11): 871 – 881.
- Wang AM, Cheng C, Pan SY, et al. Regulation of *Wolbachia* on reproduction of host, *Tribolium confusum* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30 (1): 47 – 52. [王阿旻, 程超, 潘沈元, 等. 体内沃尔巴克氏体 (*Wolbachia*) 对寄主杂拟谷盗生殖的调控作用 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30 (1): 47 – 52]
- Zhang SF, Zhou YX. Distribution, host and identification of the important species in *Tribolium* [J]. *Plant Quarantine*, 2002, 6: 349 – 351. [张生芳, 周玉香. 拟谷盗属重要种的分布、寄主及鉴别 [J]. 植物检疫, 2002, 6: 349 – 351]
- Zhang H, Zhang KJ, Hong XY. Infection density of *Wolbachia* in different tissues of macropters and brachypters adults of *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33 (5): 35 – 39. [张慧, 张开军, 洪晓月. 褐飞虱长短翅型成虫不同组织内 *Wolbachia* 的密度 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33 (5): 35 – 39]