

柏大蚜和松大蚜体内细菌的 16S rRNA-RFLP 分析

杨青青, 南小宁, 王云果, 郭新荣, 贺 虹*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:利用 16S rRNA-RFLP 方法分析了同一样地柏大蚜和松大蚜体内细菌的组成。结果表明: 2 种蚜虫体内细菌主要由其初级内共生菌 *Buchnera aphidicola* 和次级内共生菌 *Candidatus Serratia symbiotica* 组成, 但各自所占的比例存在差异; 在柏大蚜克隆文库中, *B. aphidicola* 和 *Ca. Serratia symbiotica* 分别占 37% 和 56%, 还有少量的霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) 占 7%; 在松大蚜克隆文库中, *B. aphidicola* 和 *Ca. Serratia symbiotica* 分别占 66.7% 和 33.3%。表明 2 种蚜虫体内的微生物组成比较简单且相似, 内共生菌种类相同。

关键词:柏大蚜; 松大蚜; 细菌; 16S rRNA-RFLP

中图分类号: S763.306 文献标志码: A 文章编号: 1001-7461(2015)06-0168-06

Composition of the Bacteria Associated with *Cinara tujaefilina* and *C. pinitabulaeformis* Based on 16S rRNA-RFLP Analysis

YANG Qing-qing, NAN Xiao-ning, WANG Yun-guo, Guo Xin-rong, HE Hong*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The bacterial communities within bodies of *Cinara tujaefilina* and *C. pinitabulaeformis* were analyzed by 16S rRNA-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) method aiming at comparing their endosymbionts composition and differences between *C. tujaefilina* and *C. pinitabulaeformis* which grow in same site. The results showed that the bacteria in two aphid species were consisted of primary endosymbiont *Buchnera aphidicola* and secondary endosymbiont *Candidatus Serratia symbiotica* with different proportions in each clone library. In the clone library of *C. tujaefilina*, *B. aphidicola* and *Ca. Serratia symbiotica* accounted for 37% and 56%, respectively, and *Enterobacter hormaechei* accounted for 7%. In the library of *C. pinitabulaeformis*, *B. aphidicola* and *Ca. Serratia symbiotica* accounted for 66.7% and 33.3%, respectively. The results indicated that the bacterial compositions of the two aphid species were simple and similar, and they had the same kinds of endosymbiosis.

Key words: *Cinara tujaefilina*; *C. pinitabulaeformis*; bacterium; 16S rRNA-RFLP

蚜虫是重要的农林业害虫, 主要通过刺吸式口器取食植物韧皮部汁液, 造成树势衰弱甚至死亡^[1-2]。蚜虫体内普遍存在专性胞内共生细菌布赫纳什菌(*Buchnera*), 被称为蚜虫的初级内共生菌, 能够为寄主蚜虫提供食物中缺乏的必需氨基酸和维生素, 对蚜虫营养代谢和正常发育具有重要作用, 并能够从蚜虫母体垂直传播至后代^[3]。此外, 蚜虫体

内还存在 1 种或多种其他细菌类群, 称为次级内共生菌 (secondary symbionts 或 S-symbionts), 这些次级内共生菌在蚜虫体内分布广泛, 在蚜虫中既可以垂直传播, 也可水平传播, 对寄主蚜虫具有潜在的有益作用^[4-5]。目前已发现的蚜虫次级内共生菌种类较多, 且在不同蚜虫中的分布存在差异^[6-7], 如在豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 体内发现螺原体

收稿日期: 2014-12-30 修回日期: 2015-03-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070342); 林业公益性行业科研专项 (201404302-4)。

作者简介: 杨青青, 女, 在读硕士, 研究方向: 森林昆虫学。E-mail: ldyangqing@163.com

* 通信作者: 贺 虹, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 森林昆虫学。E-mail: hehong@nwsuaf.edu.cn

(*Spiroplasma*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和欧文氏菌(*Erwinia*)^[8-10];桃蚜体内发现泛菌(*Pantoea*)的分布^[11];一些蚜虫感染 *Candidatus* Hamiltonella defense^[12];大蚜亚科的蚜虫种类普遍具有 *Candidatus* Serratia symbiotica^[13-14];从球蚜(*Pineus strobi*)中发现 2 种新的内共生菌^[15],且越来越多的研究关注蚜虫中其他细菌的分布^[16-18]。

近年来,随着分子生物学技术的发展,基于 16S rRNA 基因的分子生物学技术为揭示微生物多样性开辟了一条新的途径,有效克服了传统培养方法的局限性。基于细菌 16S rRNA 基因的限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP),不依赖于传统培养方法,利用限制性酶切片段长度差异来检测微生物多样性^[19]。该方法准确度高、结果的重复性和分辨率高,已成为研究微生物多样性最常用的手段之一。

柏大蚜(*Cinara tujaefilina*)和松大蚜(*C. pin-itabulaeformis*)均属于大蚜亚科(Lachninae),是危害我国柏树和松树的主要蚜虫种类^[20-21],为了解这 2 种蚜虫体内内共生菌的组成,采用基于细菌 16S rRNA 基因的 RFLP 分析方法,对分布于同一地区的柏大蚜和松大蚜体内的细菌群落进行研究,旨在为蚜虫内共生菌的研究提供更为丰富的信息。

1 材料与方法

1.1 蚜虫采集及基因组总 DNA 的提取

所用的蚜虫于 2013 年 7 月采自于陕西省杨凌西北农林科技大学南校区校园内。在相邻分布的侧柏林和油松林中分别采集柏大蚜和松大蚜的无翅雌成蚜,将采集的蚜虫浸泡于无水乙醇中带回实验室进行基因组 DNA 的提取^[11]。利用动物组织 DNA 提取试剂盒(Tiangen,北京)分别提取 2 种蚜虫的基因组总 DNA,每种蚜虫各 10 头混合进行提取,具体提取步骤参照试剂盒说明书进行。

1.2 细菌 16S rRNA-RFLP 分析

1.2.1 细菌 16S rRNA 基因全长的 PCR 扩增 分别以所获得的 2 种蚜虫的基因组总 DNA 为模板,利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增^[22]。PCR 扩增体系(25.0 μ L)包括:0.5 μ L Taq-Polymerase(5 U \cdot μ L⁻¹),2.5 μ L 10 \times PCR buffer(Mg²⁺ free),2.0 μ L dNTP Mixture(2.5 mmol),1.5 μ L MgCl₂(25 mmol),27F 和 1492R 引物(10 μ mol)各 1.0 μ L,2.0 μ L 基因组总 DNA 模板,灭菌 ddH₂O 补充

至 25.0 μ L。PCR 反应条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C,4 min;94 $^{\circ}$ C,30 s;55 $^{\circ}$ C,45 s;72 $^{\circ}$ C,2 min,28 个循环;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 7 min。所得产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳分离。分离条带用 DNA 纯化试剂盒(Tiagen 北京)纯化回收。

1.2.2 16S rRNA 基因克隆文库的构建和 RFLP 分析 将回收纯化的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体(TaKaRa)中。然后在 42 $^{\circ}$ C 条件下,将连接产物转化到 *Ecoli* DH5 α 感受态细胞中,在 LB/Amp^r 平板上过夜培养。具体操作过程参考文献的方法^[22]。从 LB/Amp^r 平板上挑选阳性克隆子,转接到含 Amp 的 LB 平板上,构建>200 个克隆子的 pMD-19T - 16S rRNA 克隆文库,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h。通过菌落 PCR 方法,随机挑取文库中 200 个不同的阳性克隆制成菌悬液作为模板,利用 pMD19-T 载体通用引物 M13 重新扩增插入的 16S rRNA 基因片段,将扩增出的含有目的片段的 PCR 产物分别利用限制性内切酶 *Afa* I 和 *Hha* I 进行单酶切反应,酶切反应体系参照说明书进行。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,经溴化乙锭(EB)染色和凝胶电泳成像系统照像后,进行 RFLP 带型图谱分析。根据 RFLP 带型图谱对所有的克隆子进行分型,每一个不同的酶切带型作为一个分类操作单元(Operational Taxonomic Unit,OTU),从每种 OUT 类型中随机挑选 3 个不同克隆的菌落进行摇菌,然后将菌液送往上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.3 序列分析

利用软件 DNASTar 中 Lasergene 7 软件对原始序列进行拼接和校对,并切除首尾乱序。将校对后的序列在 GenBank NCBI 数据库中进行 Blast 比对并下载同源性最高的序列,整理后的序列在 ClustalX 2.1 软件中进行多重比对,比对结果在 MEGA 5.05 中检测出最理想的建树模型^[23],然后构建最大似然系统发育树(Maxium Likelihood),并结合 Ribosomal Database Project 数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/>)确定细菌的分类地位,依据细菌 97% 的序列相似性作为判定种类的标准。

2 结果与分析

2.1 2 种蚜虫体内微生物 16S rRNA 基因文库的构建和 PCR-RFLP 分析

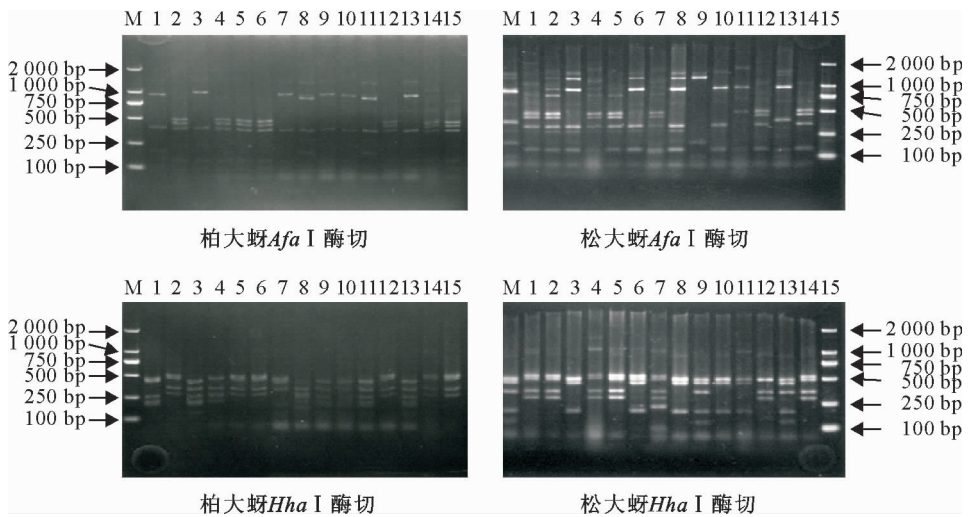
分别以柏大蚜和松大蚜基因组总 DNA 为模板,利用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增,均得到大小为 1 500 bp 左右的 PCR 扩增片段。

将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上进行连接转化,构建了 2 个 16S rRNA 基因克隆文库。从每个克隆文库随机挑取 200 个白色菌斑进行阳性克隆的 PCR 验证,其中柏大蚜阳性克隆为 185 个,松大蚜的阳性克隆为 190 个,阳性率分别为 92.5%和 95%。分别利用 *Hha* I 和 *Afa* I 2 种限制性内切酶对阳性克隆的 PCR 产物进行单酶切(图 1),从柏大蚜克隆文库获得 12 个不同的酶切类型,从松大蚜克隆文库获得 6 个不同的酶切类型。

2.2 柏大蚜和松大蚜 16S rRNA 基因克隆文库的细菌组成

选取代表不同酶切类型的克隆子进行测序,并

在 NCBI 上进行序列比对(表 1)。2 种蚜虫体内的细菌组成主要以其初级内共生菌 *Buchnera aphidicola* 和次级内共生菌 *Candidatus Serratia symbiotica* 为主,细菌组成比较简单和相似,但是两种内共生菌所占的比例存在差异。在柏大蚜克隆文库中,*B. aphidicola* 占 37%,*Ca. Serratia symbiotica* 占 56%,霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*)占 7%;在松大蚜克隆文库中,*B. aphidicola* 占 66.7%,*Ca. Serratia symbiotica* 占 33.3%。这些细菌均隶属于 γ -变形菌门(γ -Proteobacteria)肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。



M:DNA Marker IV;1-15:随机选择的阳性克隆子 Several positive clones selected randomly from two clone libraries.

图 1 2 个克隆文库部分阳性克隆子的 *Hha* I 和 *Afa* I 酶切图谱

Fig. 1 Restriction fragment patterns of *Hha* I and *Afa* I in two libraries

表 1 柏大蚜和松大蚜体内代表性克隆子 16S rRNA-RFLP 序列在 GenBank 中的比对结果

Table 1 GenBank BLAST results for the 16S rRNA-RFLP sequences of the representative clones isolated from two aphids *C. tuja filina* and *C. pinitabulaeformis*

克隆子编号	登录号	Genbank 中同源性最高的细菌种类	一致性/%	占克隆文库的比例/%
柏大蚜克隆文库	B-86	<i>Buchnera aphidicola</i> (EU334773. 1) (γ -proteobacteria; Enterobacteriaceae.)	100	37
	B-80	<i>Enterobacter hormaechei</i> (JF772054. 1) (γ -proteobacteria; Enterobacteriaceae)	99	7
	B-16		99	
	B-68		99	
	B-110	<i>Candidatus Serratia symbiotica</i> (FJ655521. 1) (γ -proteobacteria; Enterobacteriaceae)	97	56
	B-127		97	
	B-142		97	
	B-199		98	
松大蚜克隆文库	S-19		97	
	S-23		97	
	S-46	<i>Buchnera aphidicola</i> (FJ655492. 1)	97	66.7
	S-194		97	
	S-132		97	
	S-170		98	
	S-189	<i>Candidatus Serratia symbiotica</i> (FJ655526. 1)	98	33.3
	S-197		98	
	S-200		97	

2.3 系统发育分析

利用柏大蚜和松大蚜代表性克隆子序列以及与 GenBank 中比对得到的同源性最高的序列进行系统发育分析,构建 ML 系统进化树(图 2)可以看出,2 种蚜虫的初级内共生菌和次级内共生菌分别聚在不同的分支上。柏大蚜的克隆子 B-16、B-68、B-110、B-127、B-142、B-199 和松大蚜的克隆子 S-19、S-170、S-132 和 S-189 与 GenBank 中其他蚜虫的次级共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 聚在一枝,但是

柏大蚜和松大蚜的克隆子分别聚在不同的亚支,表现出明显的寄主专化型,其中柏大蚜的次级共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 聚在分支 A,而松大蚜的次级共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 聚在分支 B。柏大蚜的克隆子 B-86 与 GenBank 中柏大蚜的初级共生菌聚在一起,而松大蚜的克隆子 S-19、S-23、S-46、S-194、S-197 和 S-200 则完全聚在另外一支,也表现出明显的寄主专化性。另外,B-80 与 *Enterobacter* sp. 和 *E. hormaechei* 聚在一起,属于肠杆菌属细菌。

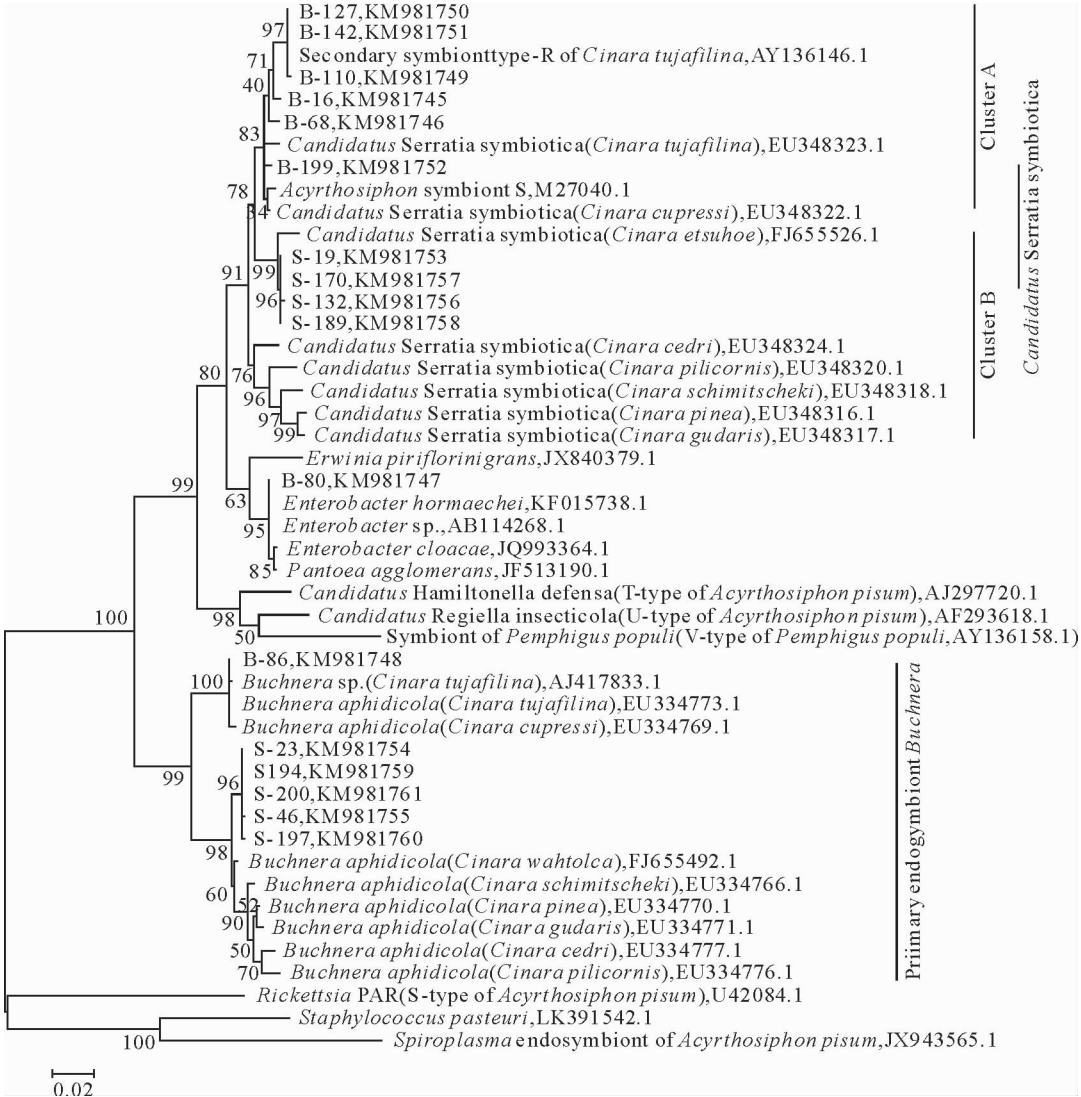


图 2 基于 16S rRNA 序列构建的柏大蚜和松大蚜体内细菌的 ML 进化树

Fig. 2 A phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of bacteria in *C. tujaefilina* and *C. pinitabulae formis* by Maximum Likelihood method

3 结论与讨论

蚜虫取食的植物韧皮部汁液富含碳水化合物,而缺乏含氮的营养物质,因此,其体内普遍存在初级内共生菌 *B. aphidicola* 为其合成必需的氨基酸。另外,在一些蚜虫中也发现不同类型的兼性内共生菌,为蚜虫的生存提供了一些潜在的有益作用,如次

级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 通过减轻热冲击的有害影响来保护含菌胞中的共生体^[24-26],并且可以提高寄主蚜虫对寄生蜂的抵抗力^[27],并通过合成一些必需氨基酸,从而减少寄主蚜虫对初级内共生菌 *Buchnera* 的依赖^[28-29]。在一些蚜虫的生长发育中其初级内共生菌不需要兼性内共生菌的参与来合成寄主必需的氨基酸,然而在大蚜亚科的一些种

类中,如雪松长足大蚜(*C. cedri*)其体内初级内共生菌和兼性内共生菌共同存在,兼性内共生菌的基因组弥补了初级内共生菌基因组中所缺乏的合成一些特定氨基酸的能力,兼性内共生菌可以取代初级内共生菌的一部分功能,显示出初级内共生菌和兼性内共生菌通力合作为寄主蚜虫的生存提供理想的条件^[30]。

柏大蚜和松大蚜体内细菌组成非常简单,主要由其初级共生菌 *B. aphidicola* 和次级共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 组成,仅在柏大蚜中发现少量的肠杆菌,并且次级共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 在柏大蚜和松大蚜体内均占有较高的比例,与 G. R. Burke^[31] 等关于大蚜亚科的种类对于该种次级共生菌具有较高的感染率的研究结果一致。

大蚜亚科(Lachninae)中的次级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 在长期的演化过程中至少分化出了两个分支,分支 A 出现在蚜虫的不同亚科(包括大蚜亚科),而分支 B 仅仅存在于大蚜亚科,而柏大蚜的次级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 属于分支 A^[14,31]。为了确定本研究中松大蚜的次级内共生菌属于哪个分支,利用前人发表的蚜虫次级内共生菌序列与本研究获得的 2 种蚜虫的次级内共生菌序列构建了 ML 系统发育树,确定了本研究中柏大蚜的次级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 属于分支 A,而松大蚜的次级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 属于分支 B,显示出 2 种蚜虫内共生菌的系统发育地位存在明显的差异。此外,2 种蚜虫体内初级内共生菌和次级内共生菌所占的比例存在差异,在柏大蚜中初级内共生菌 *B. aphidicola* 占 37%,次级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 占 56%;在松大蚜中初级内共生菌 *B. aphidicola* 占 66.7%,次级内共生菌 *Ca. Serratia symbiotica* 占 33.3%。

参考文献:

[1] BAUMANN P, BAUMANN L, LAI C Y, *et al.* Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*:intracellular symbionts of aphids [J]. Annual Review of Microbiology, 1995, 49(1):55-94.

[2] 黄晓磊,乔格侠. 蚜虫学研究现状与学科发展趋势[J]. 昆虫学报,2006,49(6):1017-1026.

HUANG X L, QIAO G X. Research status and trends in aphidology[J]. Acta Entomologica Sinica, 2006, 49(6):1017-1026. (in Chinese)

[3] NAKABACHI A, ISHIKAWA H. Differential display of mRNAs related to amino acid metabolism in the endosymbiotic system of aphids [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 27(12):1057-1062.

[4] BAUMANN P L. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects [J]. Annual Review of Microbiology, 2005, 59(1):155-189.

[5] SCARBOROUGH C L, FERRARI J, GODFRAY H C J. A-aphid protected from pathogen by endosymbiont[J]. Science, 2005, 310(5755):1781.

[6] FUKATSU T, NIKOH N, KAWAI R. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta:Homoptera) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7):2748-2758.

[7] 李献辉,李保平. 蚜虫与体内布赫纳什菌及其次生内共生菌的相互关系[J]. 昆虫知识,2006,43(4):443-447.

[8] FUKATSU T. Secondary intracellular symbiotic bacteria in aphids of the genus *Yamatocallis* (Homoptera: Aphididae: Drepanosiphinae)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11):5315-5320.

[9] BIRKLE L. A molecular characterization of the mitochondria and bacteria of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*[D]. United Kingdom:University of York. 1997.

[10] HARADA H, ISHIKAWA H. Experimentmal pathogenicity of *Erwinia Aphidicola* to pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. Journal of General and Applied Microbiology, 1997, 43(6):363-367.

[11] 李正西,李定旭. 桃蚜自然种群初级和次级共生菌的分子鉴定[J]. 昆虫学报,2005,48(5):810-814.

LI Z X, LI D X. Molecular identification of the primary and secondary symbionts of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2005, 48(5):810-814. (in Chinese)

[12] 邵孝利,饶琼,梁军,等. 节肢动物共生细菌 *Hamiltonella* 的分布、传播、功能及基因组研究[J]. 环境昆虫学报,2014,36(2):252-259.

BING X L, RAO Q, LUAN J, *et al.* The distribution, transmission, functions and genomics of the symbiont *Hamiltonella* of invertebrates[J]. Journal of Environmental Entomology, 2014, 36(2):252-259. (in Chinese)

[13] HAYNES S, DARBY A C, DANIELL T J, *et al.* Diversity of bacteria associated with natural aphid populations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12):7216-7223.

[14] LAMELAS A, PÉREZ-BROCAL V, GÓMEZ-VALERO L, *et al.* Evolution of the secondary symbiont “*Candidatus Serratia symbiotica*” in aphid species of the subfamily Lachninae [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(13):4237-4240.

[15] TOENSHOFF E R, SZABÓ G, GRUBER D, *et al.* The pine bark adelgid, *Pineus strobe*, contains two novel bacteriocyte-associated gammaproteobacterial symbionts[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(3):878-885.

[16] ARNEODO J D, ORTEGO J. Exploring the bacterial microbiota associated with nativesouth American species of Aphis (Hemiptera: Aphididae) [J]. Environmental Entomology, 2014, 43(3):589-594.

[17] LI T, XIAO J H, WU Y Q. Diversity of bacterial symbionts in populations of *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae)

in China[J]. Environmental Entomology, 2014, 43(3):605-611.

[18] WANG Z, SU X M, WEN J, *et al.* Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in Chinese aphids[J]. Insect Science, 2014, 21(3):313-325.

[19] 张洪勋,王晓谊,齐鸿雁. 微生物生态学研究方法进展[J]. 生态学报,2003, 23(5):988-995

ZHANG H X, WANG X Y, QI H Y. Development in research methods of microbialecolgy[J]. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(5):988-995. (in Chinese)

[20] ZHANG G X, CHEN X L. Studies on the phylogeny and host plant association of Lachnidae (Homoptera: Aphidinea) [J]. Entomologia Sinica, 2008, 6(3):193-208.

[21] 张翔,刘思源,徐小军,等. 五种林木蚜虫的 RAPD 分析[J]. 西北林学院学报,2006,21(1):105-106.

ZHANG X,LIU S Y,XU X J, *et al.* RAPD analysis of five forest aphid species[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(1):105-106. (in Chinese)

[22] HE H, CHEN Y Y, ZHANG Y L, *et al.* Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr[J]. Environmental Entomology, 2011, 40(6):1405-1409.

[23] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

[24] CHEN D Q, MONTLLOR C B, PURCELL A H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* and the blue alfalfa aphid *A. kondoi*[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2000, 95(3):315-323.

[25] MONTLLOR C, MAXMEN A, PURCELL A H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon isum* under heat stress [J]. Ecological Entomology, 2002, 27(2):189-195.

[26] RUSSELL J A, MORAN N A. Costs and benefits of symbiont infection in aphids:variation among symbionts and across temperatures[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2006, 273(1586):603-610.

[27] OLIVER K M, MORAN N A, HUNTER M S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(36):12795-12800.

[28] KOGA R, TSUCHIDA T, FUKATSU T. Changing partners in an obligate symbiosis:a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2003, 270(1533):2543-2550.

[29] KOGA R, TSUCHIDA T, SAKURAI M, *et al.* Selective elimination of aphid endosymbionts:effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 60(2):229-239.

[30] LAMELAS A, GOSALBES M J, MANZANO-MARÍN A, *et al.* *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*:a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont [J]. Plos Genetics, 2011, 7(11):e1002357.

[31] BURKE G R, NORMARK B B, FAVRET C, *et al.* Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(16):5328-5335.

(上接第 142 页)

[9] 曹有龙, 刘兰英, 李晓莺, 等. 枸杞鲜果类胡萝卜素超声提取工艺优化及光稳定性 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(5):20-22.

CAO Y L, LIU L Y, LI X Y, *et al.* Ultrasonic extraction technology and stability to light of carotenoids in wolfberry fruit[J]. Food Research and Development, 2014, 35(5): 20-22. (in Chinese)

[10] 戴雄泽,王利群,陈文超,等. 辣椒果实发育过程中果色与类胡萝卜素的变化 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(11): 4004-4011.

DAI X Z, WANG L Q, CHEN W C *et al.* Changes of fruit colors and carotenoids contents during the development of pepper fruit[J]. Scientia Agriculture Sinica, 2009, 42(11): 4004-4011. (in Chinese)

[11] 颜少宾,张好艳,马瑞娟,等. 黄肉桃果实发育阶段类胡萝卜素的变化 [J]. 果树学报, 2013, 30(2):260-266.

YAN S B, ZHANG Y Y, MA R J *et al.* Changes of carotenoids composition of yellow peach during fruit development [J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(2):260-266. (in Chinese)

[12] 杨祥燕,蔡元保,孙光明. 菠萝果肉颜色的形成与类胡萝卜素组分变化的关系 [J]. 果树学报, 2010, 27(1):135-139.

YANG X Y, CAI Y B, SUN G M. Relationship between color formation and change in composition of carotenoids in flesh of pineapple fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2010, 27(1): 135-139. (in Chinese)

[13] 陶俊,张上隆,张良诚,等. 柑橘果皮颜色的形成与类胡萝卜素组分变化的关系 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(2):121-126.

TAO J, ZHANG S L, ZHANG L C *et al.* Relationship between color formation and change in composition of carotenoids in peel of citrus fruit[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2003, 29(12):121-126. (in Chinese)

[14] ZHENG J, DING C, WANG L, *et al.* Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau [J]. Food Chemistry, 2011, 126(3):859-865.

[15] 郝峰鸽 杨立峰,周秀梅. 4 种彩叶植物生长期色素含量研究 [J]. 西北林学院学报, 2006, 21(6):63-65.

HAO F G, YANG L F, ZHOU X M. Studies on contents of pigments in the leaves of four color-leaved plants in their growth period [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2006, 21(6):63-65. (in Chinese)