



基于高通量测序的褐飞虱肠道微生物多样性分析

王天召[#], 王正亮[#], 朱杭锋, 王紫晔, 俞晓平^{*}

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】探明褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 成虫肠道微生物群落结构和多样性。【方法】分离褐飞虱成虫完整肠道并提取总 DNA, 利用 Illumina MiSeq (PE300) 技术对其肠道细菌 16S rRNA 的 V3-V4 变异区和真菌 ITS2 序列进行测序, 统计肠道微生物的操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 数量, 分析其物种组成、丰度及 Alpha 多样性。并通过 qPCR 技术验证随机挑选注释到的 4 种肠道菌的高通量测序数据的有效性。【结果】分别获得褐飞虱成虫肠道细菌 16S rRNA 和真菌 ITS2 优质序列 32 395 和 24 986 条, 根据序列相似性进行聚类分析分别获得 235 和 128 个 OTUs。其中, 细菌共注释到 7 个门, 15 个纲, 26 个目, 45 个科和 73 个属; 真菌共鉴定到 3 个门, 9 个纲, 12 个目, 15 个科和 18 个属。在门分类水平上, 细菌以变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 为优势门类; 真菌以子囊菌门 (Ascomycota) 为绝对优势菌门。在属分类水平上, 细菌的优势属为不动杆菌属 *Acinetobacter* 以及紫单胞菌科 (Porphyromonadaceae) 未确定属和毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 未确定属, 其丰度分别为 36.37%, 17.22% 和 15.01%; 真菌的优势属为粪壳菌纲 (Sordariomycetes) 未确定属, 丰度为 95.77%。Alpha 多样性分析结果显示, 褐飞虱肠道细菌 (真菌) 的观测物种数、Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 235 (128), 262.64 (165.40), 3.90 (0.91) 和 0.62 (0.75)。4 种肠道菌的 qPCR 结果显示高通量测序数据具有较高的有效性。【结论】褐飞虱成虫肠道细菌和真菌群落整体多样性比较丰富。研究结果为从共生微生物角度解析褐飞虱的环境适应性以及开发基于微生物防治的新技术等方面提供了依据。

关键词: 褐飞虱; 肠道微生物; 16S rRNA; ITS2; 高通量测序; 细菌; 真菌; 物种多样性

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2019)03-0323-11

Analysis of the gut microbial diversity of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) by high-throughput sequencing

WANG Tian-Zhao[#], WANG Zheng-Liang[#], ZHU Hang-Feng, WANG Zi-Ye, YU Xiao-Ping^{*} (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 【Aim】 To reveal the gut microbial community structure and diversity in adults of the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens*. 【Methods】 The total gut DNA was extracted from the adult BPH. The V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene and the fungal ITS2 fragments were sequenced by Illumina MiSeq (PE300), and then the number of operational taxonomic units (OTUs), species composition, abundance and alpha diversity of gut microbes were analyzed. The high-throughput

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601698); 浙江省杰出青年基金项目(LR19C140001); 中国科协青年人才托举工程(2016QNRC001)

作者简介: 王天召, 男, 1995 年 1 月生, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学及分子生物学, E-mail: 731006391@qq.com; 王正亮, 男, 1984 年 3 月生, 安徽安庆人, 博士, 副教授, 研究方向为农业昆虫与害虫防治, E-mail: zhengliang_w0234@163.com

[#]并列第一作者 Authors with equal contribution

^{*} 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yuxiaoping19630306@163.com

收稿日期 Received: 2018-10-16; 接受日期 Accepted: 2018-12-25

sequencing data of four randomly selected gut microbes annotated were verified by qPCR. 【Results】 A total of 32 395 valid tags and 235 OTUs were obtained for gut bacteria of adult BPH, while the numbers of valid tags and OTUs for gut fungi were 24 986 and 128, respectively. The total OTUs of gut bacteria were annotated into 7 phyla, 15 classes, 26 orders, 45 families and 73 genera, while the fungal OTUs were annotated into 3 phyla, 9 classes, 12 orders, 15 families and 18 genera. At the phylum levels, the dominant gut bacteria were Proteobacteria, Bacteroidetes and Firmicutes, while the dominant gut fungi with the highest abundance belonged to Ascomycota. *Acinetobacter*, one indeterminate genus in Porphyromonadaceae and one indeterminate genus in Lachnospiraceae were dominated at the genus level in the bacterial communities, with the abundance of 36.37%, 17.22% and 15.01%, respectively. Fungi belonging to an indeterminate genus in Sordariomycetes were the most dominant, accounting for 95.77%. The alpha diversity analysis revealed that the number of observed species, Chao1 index, Shannon index and Simpson index were 235, 262.64, 3.90 and 0.62 for gut bacteria, and 128, 165.40, 0.91 and 0.75 for gut fungi, respectively. The qPCR results of four gut microbes confirmed that the high-throughput sequencing data had a high validity. 【Conclusion】 The results indicate that the bacteria and fungi are diverse in the gut of adult BPH. The results of this study not only lay the foundation for the further studies on the environmental adaptation mechanisms of BPH from a microbial standpoint, but also facilitate the studies on the development of new technology for the biocontrol of BPH.

Key words: *Nilaparvata lugens*; gut microbiota; 16S rRNA; ITS2; high-throughput sequencing; bacteria; fungi; species diversity

昆虫肠道是昆虫存储食物、消化和排泄的场所,其中定殖着大量的微生物,其与宿主在长期协同进化过程中形成了紧密的互利共生关系(Engel and Moran, 2013)。一方面,昆虫为肠道微生物提供稳定的生存环境和必要的营养物质(Pang *et al.*, 2016; Peterson and Scharf, 2016)。昆虫肠道微环境可以影响肠道微生物的群落结构和代谢活动,从而赋予肠道微生物种类多样性和宿主特异性的特点(Kim *et al.*, 2013; Kuraishi *et al.*, 2013)。另一方面,昆虫肠道微生物参与调控宿主生长发育、营养代谢和环境适应性等诸多生物学过程,是调控宿主生物学性状的重要调节因子(Douglas, 2015; Hammer and Bowers, 2015)。鉴于昆虫肠道微生物的重要功能,相关研究已越来越受国内外学者重视。近年来,利用昆虫共生微生物控制害虫的新理论和新策略受到广泛关注,其中部分已成功付诸实践(王四宝和曲爽, 2017)。如将过表达抗疟效应分子的肠道共生细菌引入宿主中肠后,能够显著抑制疟原虫的发育,从而达到降低蚊虫传播疟疾的媒介效能(Wang *et al.*, 2012);将抗生素与杀虫剂配伍喷施,能显著减少褐飞虱体内共生菌的数量,从而极大地提高了杀虫剂控制褐飞虱效果(Shentu *et al.*, 2016)。显而易见,探明昆虫肠道微生物的群落结构及其多样性是研发上述基于共生关系的害虫防治新技术的前提和

基础。

早期关于昆虫肠道微生物多样性研究主要受到分析技术的限制。传统的体外离体培养技术完全忽略了肠道中绝大部分不可培养的微生物种类,严重低估肠道微生物的多样性(曹伟等, 2015)。基于特定分子标记基因(如细菌 16S rRNA 和真菌 18S rRNA)的变性梯度凝胶电泳技术和克隆文库测序技术又存在操作步骤繁琐,检测灵敏度低的缺陷(Dong *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2013; 徐红星等, 2014)。宏基因组技术可以避开微生物分离培养的过程,能够准确、快速、高通量地解读微生物群体的多样性与丰度,在测定昆虫肠道微生物的群落结构,研究昆虫与肠道菌群间的互作关系,发掘新的、具有特定功能的肠道微生物及其关键基因方面呈现巨大的优势(Shi *et al.*, 2010)。该技术已广泛应用于一些经济昆虫和社会性昆虫肠道微生物的研究,如家蚕 *Bombyx mori*(Li *et al.*, 2012; 周洪英等, 2015)和白蚁(Makonde *et al.*, 2013; 李丹红等, 2017)。近年来,在一些重要农业害虫中,相关研究也取得了一定进展(刘小改等, 2016; 杨晓晴等, 2018)。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 属半翅目(Hemiptera) 飞虱科(Delphacidae),是我国水稻上最具破坏性的害虫之一。该害虫通过直接吸食水稻汁液和产卵破

坏水稻组织造成干枯倒伏,而且还能传播水稻病毒病,引起水稻产量的重大损失(吕进等, 2013)。鉴于肠道微生物在昆虫生长发育、食物降解、解毒代谢以及免疫调节等诸多生理过程中的重要功能(Morrison *et al.*, 2009; Frago *et al.*, 2012), 褐飞虱肠道微生物极大可能可以作为防治褐飞虱的新型靶标,并在此基础上开发出新的褐飞虱防控技术。因此,有必要对褐飞虱肠道微生物开展研究。以往关于褐飞虱肠道微生物多样性的研究主要基于克隆文库测序法,且研究仅针对于肠道细菌(李香香等, 2011)。直至目前,运用宏基因组技术全面分析褐飞虱肠道细菌和真菌群落结构和多样性的研究还未见报道。为此,本研究采用基于 16S rRNA 和 ITS (internal transcribed spacer) 序列的高通量测序策略分别检测了羽化 24 h 内的褐飞虱成虫肠道细菌和真菌的种类组成及多样性,以期为褐飞虱防治新技术的开发提供可利用的微生物资源,也为从共生微生物角度揭示褐飞虱的环境适应性以及与微生物协同进化机制的研究奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

供试褐飞虱采自于浙江省杭州市郊区水稻田,在人工气候室内以感虫水稻品种 TN1 连续饲养 50 代以上并维持种群。饲养温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$, 光周期 16L:8D。选取羽化 24 h 内的褐飞虱雌雄成虫作为供试昆虫。

1.2 褐飞虱肠道分离及总基因组 DNA 提取

取羽化 24 h 内的褐飞虱雌雄成虫各 100 头,饥饿处理 6 h,随后用 75% 的酒精对虫体表面消毒 3 次,每次 3 min,再用无菌水清洗 5 遍。在无菌水中解剖虫体,仔细分离出肠道,置于一个已灭菌的 2 mL 离心管中,保存于 -20°C 冰箱中待用。使用 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, 德国) 试剂盒,参照说明书提取褐飞虱肠道总基因组,得到的总 DNA 用 50 μL 无菌 ddH₂O 溶解。使用微量蛋白核酸测定仪 (NanoDrop 2000, 美国) 测定 DNA 浓度及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值,并用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提质量。检测合格后的样品保存于 -80°C 备用。

1.3 细菌 16S rRNA 基因和真菌 ITS 基因的 PCR 扩增和高通量测序

以 1.2 节抽提的褐飞虱肠道总基因组为模板,分别以通用引物对 333F/806R (5'-ACTCCTAC

GGGAGGCAGCAG-3'; 5'-GGACTACHVGGGTWTCT AAT-3') 和 FITS7/RITS4 (5'-GTGARTCATCGAATC TTTG-3';5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增细菌 16S rRNA V3 + V4 区域(张军毅等, 2015) 和真菌 ITS2 区(Blaalid *et al.*, 2013)。PCR 扩增体系总体积均为 50 μL : 基因组 DNA 模板 2 μL , TransStartTaq DNA Polymerase 0.5 μL , 10 × Buffer 5 μL , 引物 338F/806R 或 FITS7/RITS4 (10 mmol/L) 各 1 μL , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μL , ddH₂O 36.5 μL 。PCR 扩增条件: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增反应重复 3 次, PCR 扩增产物合并后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,浓度和特异性合格后送杭州联川生物技术股份有限公司进行高通量测序。采用 Illumina MiSeq PE300 测序平台进行双端测序。

1.4 高通量测序数据分析

MiSeq 测序完成后,对获得的原始序列 (raw reads) 进行质量控制,舍弃低质量序列 (50 个连续碱基平均质量 < 25, 序列长度 < 50 bp, 模糊碱基 ≥ 1)。运用 Flash (V1.0.3) 软件将双端数据进行拼接, UCHIME Algorithm 软件去除嵌合体,剔除宿主自身序列后,获得优质序列 (clean reads) 数据。用软件 QIIME 对优质序列在 97% 水平上进行操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 聚类,并利用 Silva 和 UNITE 数据库分别对 1.3 节扩增获得的褐飞虱成虫肠道细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 序列进行物种注释。基于 OUT 的统计结果,利用 Mothur 软件计算 Alpha 多样性指数,包括反映样品中群落丰富度的 Chao1 指数和观测物种数 (number of observed species), 以及反映样品中物种多样性的 Shannon 指数和 Simpson 指数。

1.5 高通量测序结果验证

高通量测序数据的有效性用普通 PCR 和定量 (qPCR) 法来验证。随机挑选注释到的 4 种肠道菌,基于其序列信息设计所需特异性 qPCR 引物 (表 1), 以 1.2 节得到的褐飞虱肠道总 DNA 为模板, 先进行普通 PCR, 验证引物特异性并确定 qPCR 的最佳退火温度。接着将扩增得到的 PCR 片段分别与 pUC19-T 载体相连,转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态菌株中,筛选鉴定阳性克隆后抽提其质粒,作为标准质粒。将标准质粒进行 10 倍梯度浓度稀释,每个标准品稀释 6 个梯度,以稀释梯度浓度的 log₁₀ 对数值为横坐标, qPCR 的 Ct 值为纵坐标,

分别获得 4 个质粒标准品的标准曲线。然后,以 1.2 节提取的褐飞虱成虫肠道总基因组 DNA 为模板分别进行 qPCR 检测。qPCR 扩增体系: SYBR Green Mix 10 μ L, 基因组 DNA 模板 2 μ L, 正反向引物(10 mmol/L) 各 0.5 μ L, 加 ddH₂O 补齐至 20 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s,

57~60 $^{\circ}$ C (根据不同菌株的特异性引物而定) 退火 30 s, 40 个循环, 反应结束后进行溶解曲线分析。每个样品重复 4 次, 将得到的平均 Ct 值代入标准曲线方程, 计算基因拷贝数。采用 SPSS (V21.0) 软件计算各组数据的均值和标准差, 以用于褐飞虱肠道中相应菌株的定量统计分析。

表 1 褐飞虱成虫 4 种肠道菌 qPCR 引物

Table 1 qPCR primers of four microbial strains in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

肠道菌 Gut microbial strains	引物 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences	退火温度($^{\circ}$ C) Annealing temperature
乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> sp.	LaF LaR	TTCCAATGCACTACTCCGGTTAA CGTAGGTGGCAAGCGTTATCC	57
不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> sp.	AcF AcR	CTCTACGCATTTACCCGCTAC GTTAATACCTAAAAGTGAGTGGACGT	59
隐球酵母菌 <i>Cryptococcus</i> sp.	CrF CrR	GCGATGGCAGGTTATGAGCAG CAAGCCTGATCCAGCAAT	52
蜜生节担菌 <i>Wallemia mellicola</i>	WmF WmR	CTACAAATTACTAAGCGGAGAT TTCCGTAGACTACGCTCTGTTT	60

2 结果

2.1 序列拼接组装与 OTU 聚类分析

褐飞虱成虫肠道细菌 16S rRNA 高通量测序共

产生原始序列 35 864 条, 质控拼接后得到优质序列为 32 395 条。真菌 ITS2 高通量测序共得到 26 540 条原始序列, 拼接优化后优质序列为 24 986 条。基于 97% 的相似水平, 褐飞虱肠道细菌和真菌通过聚类分析分别获得 235 和 128 个 OTUs (表 2)。

表 2 褐飞虱成虫肠道细菌 16S rRNA 和真菌 ITS2 高通量测序基本信息

Table 2 Basic information of high-throughput sequencing of bacterial 16S rRNA and fungal ITS2 in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

基因 Gene	原始标签数 Number of raw tags	有效标签数 Number of valid tags	OTU 数 Number of OTUs	不同分类阶元分类单元数目(个) Number of taxa of different taxonomic categories				
				门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
16S rRNA	35 864	32 395	235	7	15	26	45	73
ITS2	26 540	24 986	128	3	9	12	15	18

采用对测序序列进行随机抽样的方法, 以抽到的序列数与它们所能代表的 OTU 数目构建褐飞虱肠道微生物高通量测序结果的稀释性曲线(图 1)。从图 1 中可以看出, 16S rRNA 测序的稀释曲线在 97% 相似性水平下逐渐趋向平坦但尚未完全进入平台期, 表明继续增加测序量会有少量新的细菌 OTUs 产生。从 ITS2 测序的稀释曲线看, 曲线斜率逐渐降低并进入平台期, 表明目前已获得的测序数据量足以覆盖褐飞虱肠道大多数真菌类群。因此, 本研究测序量基本能反映褐飞虱肠道细菌和真菌群落的组成和种类。

2.2 褐飞虱成虫肠道细菌和真菌的种类组成及其丰度

基于 OTUs 的分类结果表明, 褐飞虱肠道样本中细菌分属于 7 个门, 15 个纲, 26 个目, 45 个科和

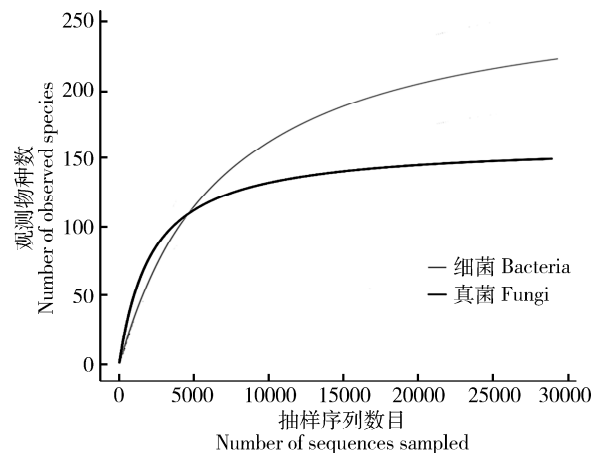


图 1 褐飞虱成虫肠道细菌和真菌观测物种数稀释曲线
Fig. 1 Rarefaction curves of the number of observed species for bacterial and fungal communities in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

73 个属; 肠道真菌共鉴定获得 3 个门, 9 个纲, 12 个目, 15 个科和 18 个属(表 2)。

褐飞虱肠道样本在门分类阶元水平上的微生物群落组成如图 2 所示。高通量测序的 16S rRNA 序列共注释到了变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)和柔膜菌门(Tenericutes)等 7 个门。

其中变形菌门、拟杆菌门和厚壁菌门细菌为优势菌, 其丰度分别占总数的 38.68%, 28.67% 和 25.68% (图 2: A)。褐飞虱肠道中真菌型微生物的 ITS 序列共注释了 3 个门, 分别为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和一个未确定门(indeterminate phylum)。其中子囊菌门真菌所占比例最大(99.26%), 担子菌门真菌丰度仅占 0.63% (图 2: B)。

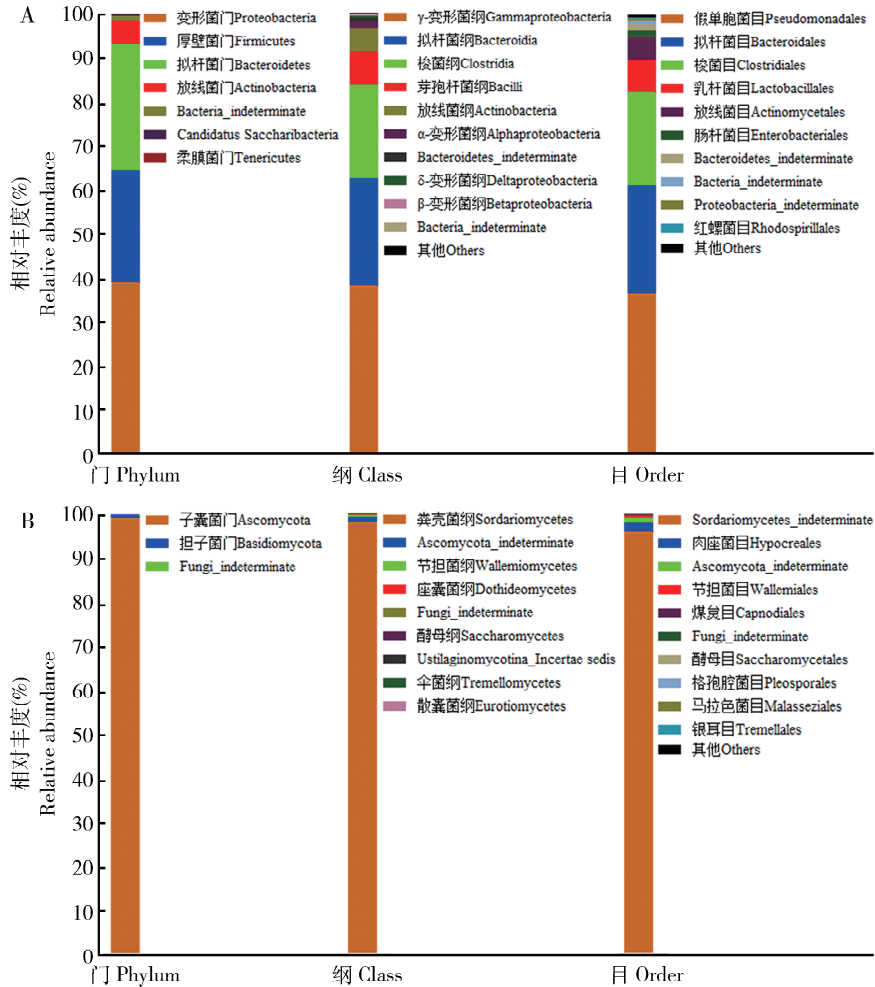


图 2 褐飞虱成虫肠道内在门、纲和目分类阶元上相对丰度排名前 10 的细菌(A)和真菌(B)

Fig. 2 Relative abundances of the top 10 bacteria (A) and fungi (B) at the phylum, class and order levels in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

在纲分类阶元水平, 褐飞虱肠道细菌隶属于 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、拟杆菌纲 (Bacteroidia)、梭菌纲 (Clostridia)、芽孢杆菌纲 (Bacilli) 和放线菌纲 (Actinobacteria) 等 15 个纲(图 2: A)。其中 γ -变形菌纲为优势菌纲, 占比 37.99%, 拟杆菌纲和梭菌纲次之, 丰度分别为 24.61% 和 21.17%。褐飞虱肠道真菌共注释到了包括粪壳菌纲 (Sordariomycetes)、座囊菌纲 (Dothideomycetes)、酵母纲 (Saccharomycetes)、节担

菌纲 (Wallemiomycetes) 和黑粉菌纲 Ustilaginomycetes 在内的 9 个纲(图 2: B)。其中粪壳菌纲真菌占优, 其丰度占总数的 97.90%。

在目分类阶元上, 褐飞虱肠道细菌在假单胞菌目 (Pseudomonadales)、拟杆菌目 (Bacteroidales)、梭菌目 (Clostridiales)、乳杆菌目 (Lactobacillales)、放线菌目 (Actinomycetales)、肠杆菌目 (Enterobacteriales) 等 26 个目中均有分布(图 2: A)。其中假单胞菌目、拟杆菌目和梭菌目细菌丰度较高, 占比分别为

36.50%, 24.61% 和 21.06%, 其余 23 个目共占 17.83%。褐飞虱肠道真菌共注释到了 12 个目(图 2: B), 其中粪壳菌纲未确定目(indeterminate order)真菌丰度占绝对优势(95.77%), 其次是肉座菌目(Hypocreales)和子囊菌门(Ascomycota)未确定目(indeterminate order), 其丰度分别为 2.13% 和 1.12%。上述 3 个目的真菌丰度累计超过 99.00%, 剩余 9 个目的真菌丰度仅占 0.98%。

在科分类阶元上, 褐飞虱肠道细菌隶属于 45 个科。其中丰度超过 5% 的有 5 个科, 分别为莫拉菌科(Moraxellaceae) (36.50%)、紫单胞菌科(Porphryomonadaceae) (18.42%)、毛螺菌科(Lachnospiraceae) (15.27%)、乳杆菌科(Lactobacillaceae) (7.33%) 和微杆菌科

(Microbacteriaceae) (5.22%)。褐飞虱肠道真菌共覆盖 15 个科, 除 3 个未确定科外, 其余科真菌丰度均不足 1%。粪壳菌纲未确定科占比最高, 丰度为 95.77%; 肉座菌目未确定科次之, 丰度为 2.11% (表 3)。

在属分类阶元上, 褐飞虱肠道样本分别注释到了 73 个属的细菌和 18 个属的真菌。其中细菌主要隶属于不动杆菌属 *Acinetobacter*、紫单胞菌科未确定属、毛螺菌科未确定属、乳杆菌属 *Lactobacillus* 和微杆菌属 *Microbacterium*。真菌主要分布于粪壳菌纲下未确定属、肉座菌目未确定属、节担菌属 *Wallemia* 和隐球酵母属 *Cryptococcus*。不动杆菌属为细菌的优势属, 丰度占总数的 36.37%; 粪壳菌纲未确定属为真菌优势属, 丰度为 95.77% (表 3)。

表 3 褐飞虱成虫肠道内各科和属分类阶元上相对丰度排前 10 的细菌和真菌

Table 3 Relative abundance of the top 10 bacteria and fungi at the family and genus levels in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

细菌 Bacteria		真菌 Fungi	
科 Family	属 Genus	科 Family	属 Genus
莫拉菌科 Moraxellaceae (36.50%)	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (36.37%)	粪壳菌纲未确定科 Indeterminate family of Sordariomycetes (95.77%)	粪壳菌纲未确定属 Indeterminate genus family of Sordariomycetes (95.77%)
紫单胞菌科 Porphyromonadaceae (18.42%)	紫单胞菌科未确定属 Indeterminate genus of Porphyromonadaceae (17.22%)	肉座菌目未确定科 Indeterminate family of Hypocreales (2.11%)	肉座菌目未确定属 Indeterminate genus of Hypocreales (2.11%)
毛螺菌科 Lachnospiraceae (15.27%)	毛螺菌科未确定属 Indeterminate genus of Lachnospiraceae (15.01%)	子囊菌门未确定科 Indeterminate family of Ascomycota (1.12%)	子囊菌门未确定属 Indeterminate genus of Ascomycota (1.12%)
乳杆菌科 Lactobacillaceae (7.33%)	乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i> (7.33%)	节担菌科 Wallemiaceae (0.60%)	节担菌属 <i>Wallemia</i> (0.60%)
微杆菌科 Microbacteriaceae (5.22%)	微杆菌属 <i>Microbacterium</i> (5.21%)	煤炱科 Capnodiaceae (0.11%)	煤炱属 <i>Capnodium</i> (0.11%)
普雷沃氏菌科 Prevotellaceae (3.30%)	普氏菌属 <i>Prevotella</i> (2.51%)	德巴列酵母科 Debaryomycetaceae (0.05%)	<i>Meyerozyma</i> (0.05%)
瘤胃菌科 Ruminococcaceae (3.18%)	瘤胃菌科未确定属 Indeterminate genus of Ruminococcaceae (2.07%)	马拉色菌科 Malasseziales (0.02%)	马拉色菌属 <i>Malassezia</i> (0.02%)
肠杆菌科 Enterobacteriaceae (2.51%)	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> (2.01%)	球壳菌科 Mycosphaerellaceae (0.02%)	隐球酵母属 <i>Cryptococcus</i> (0.01%)
拟杆菌目未确定科 Indeterminate family of Bacteroidales (2.01%)	巴氏杆菌属 <i>Barnesiella</i> (1.34%)	冬虫夏草科 Cordycipitaceae (0.02%)	酵母菌属 <i>Saccharomyces</i> (0.01%)
醋酸杆菌科 Acetobacteraceae (1.34%)	葡糖醋杆菌属 <i>Gluconacetobacter</i> (1.06%)	散囊菌科 Eurotiaceae (0.01%)	青霉菌 <i>Penicillium</i> (0.01%)

括号中数据为相对丰度。Data in brackets are the relative abundance.

2.3 褐飞虱肠道细菌和真菌 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性指数评估可以反映样本内菌群的

多样性。本研究选取观测物种数、Chao1、Shannon 和 Simpson 4 个常用指数来分析褐飞虱肠道菌群的

多样性。观测物种数和 Chao1 指数值越大,表示样品中群落丰富度越高;Shannon 指数越高,Simpson 指数越小,说明样品中的物种多样性越高。由表 4 可知,褐飞虱肠道中细菌和真菌种类均具有较高的丰富度和多样性。

表 4 褐飞虱成虫肠道内细菌和真菌多样性指数统计
Table 4 Diversity indices of bacteria and fungi in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

类群 Groups	多样性指数 Diversity indices			
	观测物种数 Number of observed species	Chao1	Shannon	Simpson
细菌 Bacteria	235	262.64	3.90	0.62
真菌 Fungi	128	165.40	0.91	0.75

Rank-abundance 曲线可以同时展现样品中所含物种的丰富程度和均匀程度。其中物种的丰富程度由曲线的横轴长度来反映,曲线越宽,说明样品中物种组成越丰富。物种的均匀度由曲线形状来反映,曲线越平坦,说明样品中物种组成的均匀度越高。由图 3 可知,褐飞虱肠道中的细菌和真菌均组成丰富,但均匀度不高,即存在一些丰度占比较高的细菌或真菌种类。

2.4 高通量测序结果的 qPCR 验证

随机选取褐飞虱肠道中丰度存在差异的 2 种肠道细菌(不动杆菌 *Acinetobacter* sp. 和乳杆菌 *Lactobacillus* sp.) 和 2 种肠道真菌(蜜生节担菌 *Wallemia mellicola* 和隐球酵母菌 *Cryptococcus* sp.), 基于其测序信息设计特异性引物(表 1), 利用 qPCR 技术验证高通量测序数据的有效性。如图 4 所示,

PCR 均能从褐飞虱肠道微生物基因组中扩增出单一条带,且测序验证准确(图 4: A)。qPCR 显示溶解曲线均为单一峰,上述结果表明所设计引物特异性较好。qPCR 结果显示,不动杆菌的拷贝数为 $39\,953 \pm 5\,297$, 数量是乳杆菌($5\,836 \pm 768$) 的 7.54 倍,而蜜生节担菌和隐球酵母菌的拷贝数分别为 $62\,700 \pm 7\,270$ 和 $2\,155 \pm 383$, 两者丰度比为 29.10。高通量测序分析中,不动杆菌与乳杆菌所占丰度分别为 36.37% 和 7.33% (表 3), 其丰度比为 4.96, 蜜生节担菌与隐球酵母菌所占丰度分别为 0.21% 和 0.01%, 其丰度比为 21.10 (图 4: B)。由此可见,4 个肠道菌在褐飞虱肠道中的丰度占比与宏基因组结果基本一致,从而验证了高通量测序数据具有较高的可靠性。

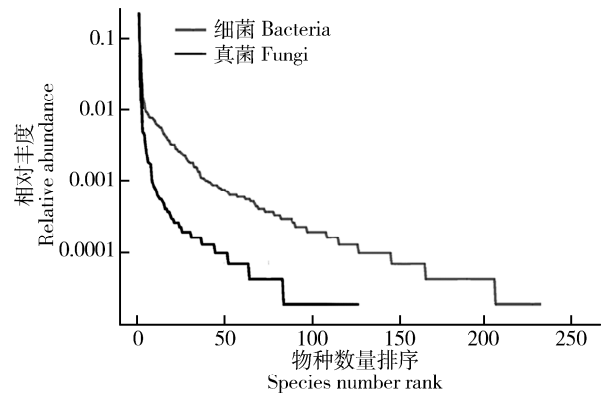


图 3 褐飞虱成虫肠道细菌和真菌 OTUs 的 Rank-abundance 曲线

Fig. 3 Rank-abundance curves of bacterial and fungal OTUs in the gut of adult *Nilaparvata lugens*

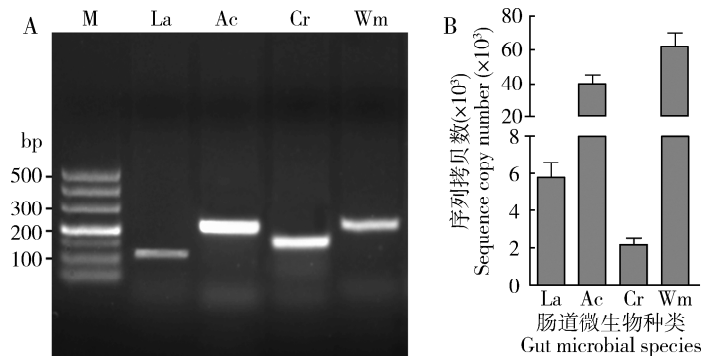


图 4 褐飞虱成虫肠道微生物多样性高通量测序结果的 PCR (A) 和 qPCR (B) 验证

Fig. 4 Verification of the high-throughput sequencing results for microbial diversity analysis in the gut of adult *Nilaparvata lugens* by PCR (A) and qPCR (B)

La: 乳杆菌 *Lactobacillus* sp.; Ac: 不动杆菌 *Acinetobacter* sp.; Cr: 隐球酵母菌 *Cryptococcus* sp.; Wm: 蜜生节担菌 *Wallemia mellicola*.

3 讨论

昆虫肠道中栖息着大量微生物,其种类多样、群落结构复杂,参与宿主营养代谢、能量平衡、免疫防御、种内通讯和交配生殖等诸多生命过程(Boman and Hultmark, 1987; Robacker and Lauzon, 2002; Morrison *et al.*, 2009; Frago *et al.*, 2012)。以往关于褐飞虱肠道微生物的研究主要采用离体平板培养和克隆文库法,且集中于细菌群落结构和多样性分析方面(李香香, 2011; 李香香等, 2011)。近年来,高通量测序技术为全面掌握褐飞虱肠道菌群结构提供了强有力的分析手段。本研究通过 Illumina Miseq 测序技术检测细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 序列的方法,系统分析了褐飞虱成虫肠道内细菌和真菌的种类多样性和群落结构组成。

研究结果表明,褐飞虱肠道细菌种类丰富,16S rRNA 序列一共注释到了 7 个门,15 个纲,26 个目,45 个科,73 个属。以往研究发现,尽管不同种类的昆虫肠道菌优势门存在差异,但变形菌门均是最主要的肠道细菌群体之一(Yun *et al.*, 2014)。本研究中关于褐飞虱优势菌门的分析也支持上述结果,变形菌门细菌丰度在褐飞虱肠道细菌中占比最高(38.68%)(图 2)。除此之外,拟杆菌门和厚壁菌门细菌亦是褐飞虱肠道优势菌,此结果与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 和栖北散白蚁 *Reticulitermes speratus* 肠道优势细菌类似(Ohkuma *et al.*, 2002; Schloss *et al.*, 2006)。如在光肩星天牛肠道优势菌依次为变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门(Schloss *et al.*, 2006)。褐飞虱肠道样本中共鉴定到 73 个属细菌,远远高于传统的基于平板培养技术和文库构建法的检测结果。如利用体外平板培养技术,李香香等(2011)仅从褐飞虱成虫肠道内分离到了包括不动杆菌属 *Acinetobacter*、欧文氏菌属 *Erwinia*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、微杆菌属 *Microbacterium*、肠杆菌属 *Enterobacter* 和金黄杆菌属 *Chryseobacterium* 在内的 6 属细菌。本研究中不仅也检测到这些细菌,还发现大量不可培养的但属于优势属的细菌,如紫单胞菌科未确定属(17.22%)和毛螺菌科未确定属(15.01%)。可见,基于 16S rRNA 的 Illumina MiSeq 高通量测序技术能够更加全面地揭示褐飞虱肠道微生物的结构组成和多样性。

本研究发现,不动杆菌属为褐飞虱肠道细菌中

丰度最高(36.37%)的优势菌(表 3)。该菌也常见于其他昆虫肠道内,具有协助宿主食物消化和氮素转化的功能(Briones-Roblero *et al.*, 2017),但其生物学意义尚不完全明确。鉴于该菌可在褐飞虱体外离体培养的特性,后续关于其理化特性、定位分布、数量动态、传递方式和生物学功能的研究将变得切实可行。此外,褐飞虱肠道中还检测到一定比例(7.33%)的乳杆菌属细菌(表 3)。该属细菌因具有合成诸多碳水化合物降解酶(如果胶降解酶、糖苷水解酶、多糖水解酶)的能力,有可能参与褐飞虱的营养代谢过程(张筠等, 2017)。目前亦有报道称乳杆菌属细菌对昆虫抗药性的产生有一定的积极作用(Xia *et al.*, 2013),且其他可能参与有毒物质解毒过程的细菌(如肠球菌属和伯克氏菌属细菌)在褐飞虱肠道菌群中也有发现,但这些肠道菌属与褐飞虱抗药性产生的相关性有待进一步的研究。沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 是广泛存在于节肢动物体内并调控宿主生殖行为的共生细菌,并存在于诸多昆虫肠道内(施婉君等, 2002; Yun *et al.*, 2014)。李香香等(2011)通过构建 16S rRNA 克隆文库的方法,在褐飞虱肠道中鉴定到了该菌的存在。然而,本研究中并未检测到上述细菌,类似结果也见于其他昆虫肠道微生物多样性研究中(刘小改等, 2016; 田小燕等, 2017; 蒋宇等, 2018)。出现上述差异结果的一个原因可能与宿主昆虫的取样种群有关。如屈吕宇等(2013)对 22 个褐飞虱不同地理种群感染 *Wolbachia* 的情况进行检测分析时,发现其中杭州 2009 年种群中检测不到该菌。此外,昆虫体内微生物多样性也与宿主取食和环境因素有关(Su *et al.*, 2016)。有研究报道在实验室中以单一水稻品种饲养褐飞虱时,其体内 *Wolbachia* 的感染频率随着饲养代数的增加而呈下降趋势(Wang *et al.*, 2015)。本研究是以室内饲养于 TN1 水稻上 50 余代的实验种群为对象,这也可能是本研究结果中未检测到 *Wolbachia* 的一个重要原因。

基于 OTUs 的分类结果,褐飞虱肠道真菌隶属于 3 个门,9 个纲,12 个目,15 个科,18 个属。其中隶属于囊菌门(99.26%)、粪壳菌纲(97.90%)的真菌占绝对优势,此结果与光肩星天牛肠道真菌优势菌群相同(Mason *et al.*, 2019),但与有些昆虫肠道中的优势菌不同。如杨丽平等(2017)基于 ITS 序列的 DNA 条形码技术分析了我国 5 科 8 种蝗虫肠道的共生真菌多样性,结果表明其优势菌门为担子菌门,优势菌目为木耳目(Auriculariales)和银耳目

(Tremellales)。目前,关于褐飞虱真菌型微生物的研究主要集中于褐飞虱脂肪体内的类酵母共生菌,如张钰峰等(2007)利用卵块培养的方法从褐飞虱体内分离了两株共生真菌,经鉴定为解脂假丝酵母 *Yarrowia lipolytica* 和嗜盐梗孢酵母 *Sterigmatomyces halophilus*。Hou 等(2013)通过 18S rDNA 和 5.8S-ITS 序列测定结合变性梯度凝胶电泳技术证明了褐飞虱脂肪体内存在 Noda 菌、季也蒙毕赤酵母 *Pichia guilliermondii*、假丝酵母 *Candida* sp. 以及一些无法体外培养的酵母型共生真菌。本研究在褐飞虱肠道中也检测到了一些酵母型真菌,如隐球酵母菌 *Cryptococcus* sp. 和酵母菌 *Saccharomyces* sp.。然而,由于本研究中注释到的肠道真菌大部分 OTU 未鉴定到低级分类阶元,来源于脂肪体和肠道中的酵母型真菌是否有同源关系和类似功能,还暂不清楚。此外诸多研究表明,昆虫肠道真菌是许多天然活性产物和先导药物的重要来源。例如,陈君芝等(2014)从中华剑角蝗 *Acrida cinerea* 肠道中分离培养了 18 株共生真菌,发现其中 2 株镰刀菌属 *Fusarium* 真菌的次级代谢产物对魔芋软腐菌具有较强的抑制作用。大刀螳螂肠道共生菌光轮层炭壳 *Daldinia eschscholzii* 能够产生骨架新颖的聚酮类化合物,而该类化合物具有很好的免疫抑制活性(Zhang *et al.*, 2008)。褐飞虱肠道菌群中也发现可能具有产生抑菌活性物质能力的真菌(如青霉菌属 *Penicillium*) ,但其中具有生防潜能的菌株有待进一步挖掘确证。

综上所述,褐飞虱肠道微生物丰富多样。利用微生物进行褐飞虱防治是当前褐飞虱生物防控的一种优选策略,其中共生微生物是褐飞虱生物防治中尚未开发的一类重要资源。本研究首次基于分子标记(细菌 16S rRNA 和真菌 ITS)的宏基因组策略全面解析了褐飞虱肠道微生物的群落结构和多样性,研究结果为开发基于共生关系的褐飞虱“以菌治虫”技术提供了依据,也为后续揭示褐飞虱的环境适应性以及虫-菌协同进化机制研究奠定了理论基础。

参考文献 (References)

- Blaalid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kausarud H, 2013. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.*, 13(2): 218–224.
- Boman HG, Hultmark D, 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 41: 103–126.
- Briones-Roblero CI, Rodríguez-Díaz R, Santiago-Cruz JA, Zúñiga G, Rivera-Orduña FN, 2017. Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). *Folia Microbiol.*, 62(1): 1–9.
- Cao W, Ma Z, Yu XP, 2015. Isolation and sensitivity to fungicides of the yeast-like symbiont *Pichia anomala* (Hemiascomycetes: Saccharomycetaceae) from *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(3): 271–280. [曹伟, 马正, 俞晓平, 2015. 灰飞虱体内类酵母共生菌异常毕赤酵母的分离培养及其对杀菌剂的敏感性. 昆虫学报, 58(3): 271–280]
- Chen JZ, Tu X, Cheng F, Chen JF, Deng ZS, 2014. Isolation, identification and antibacterial activity of intestinal symbiotic fungi from *Acrida cinerea*. *J. China Three Gorges Univ. (Nat. Sci.)*, 36(3): 108–112. [陈君芝, 涂璇, 程凡, 陈剑锋, 邓张双, 2014. 中华剑角蝗肠道共生真菌的分离鉴定及抑菌活性筛选. 三峡大学学报(自然科学版), 36(3): 108–112]
- Dong SZ, Pang K, Bai X, Yu XP, Hao PY, 2011. Identification of two species of yeast-like symbionts in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Curr. Microbiol.*, 62(4): 1133–1138.
- Douglas AE, 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu. Rev. Entomol.*, 60: 17–34.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699–735.
- Frago E, Dicke M, Godfray HC, 2012. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends Ecol. Evol.*, 27(12): 705–711.
- Hammer TJ, Bowers MD, 2015. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia*, 179(1): 1–14.
- Hou Y, Ma Z, Dong S, Chen YH, Yu X, 2013. Analysis of yeast-like symbiont diversity in the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, using a novel nested PCR-DGGE protocol. *Curr. Microbiol.*, 67(3): 263–270.
- Jiang Y, Sun BH, Cao YY, Zhai YN, Wan X, 2018. Diversity of gut bacterial communities in male adults of *Odontolabis fallaciosa* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Lucanidae) with different mandibular forms. *Acta Entomol. Sin.*, 61(3): 322–330. [蒋宇, 孙丙华, 曹玉言, 翟勇宁, 万霞, 2018. 华美奥锹甲不同颚型雄性成虫肠道细菌群落多样性. 昆虫学报, 61(3): 322–330]
- Kim JK, Kim NH, Jang HA, Kikuchi Y, Kim CH, Fukatsu T, Lee BL, 2013. Specific midgut region controlling the symbiont population in an insect-microbe gut symbiotic association. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(23): 7229–7233.
- Kuraishi T, Hori A, Kurata S, 2013. Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front. Physiol.*, 4: 375.
- Li DH, Wang Y, Yang H, 2017. The intestinal microbiome of termite that decomposes lignocellulose efficiently. *Acta Microbiol. Sin.*, 57(6): 876–884. [李丹红, 王誉, 杨红, 2017. 高效降解木质纤维素的白蚁肠道微生物组. 微生物学报, 57(6): 876–884]
- Li XX, 2011. Diversity of Bacterial in Intestinal Canal of *Nilaparvata lugens* (Stål). MSc Thesis, Nanjing Agricultural University,

- Nanjing. [李香香, 2011. 稻飞虱肠道细菌多样性分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文]
- Li XX, Yang H, Wang ZW, Su JY, 2011. Diversity of bacterial in intestinal canal of *Nilaparvata lugens* (Stål). *Jiangsu Agric. Sci.*, (1): 126–129. [李香香, 杨焜, 王志伟, 苏建亚, 2011. 褐飞虱肠道细菌多样性分析. 江苏农业科学, (1): 126–129]
- Li Y, Wang G, Tian J, Liu H, Yang H, 2012. Transcriptome analysis of the silkworm (*Bombyx mori*) by high-throughput RNA sequencing. *PLoS ONE*, 7(8): e43713.
- Liu XG, Yang YJ, Liao QJ, Xu HX, Liu YH, Lu ZX, 2016. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the intestine of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(9): 965–976. [刘小改, 杨亚军, 廖秋菊, 徐红星, 刘映红, 吕仲贤, 2016. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析. 昆虫学报, 59(9): 965–976]
- Lv J, Zhu ZR, Lou YG, Cheng JA, 2013. Review of research into outbreaks and management of rice planthoppers. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(3): 565–574. [吕进, 祝增荣, 娄永根, 程家安, 2013. 稻飞虱灾变和治理研究透析. 应用昆虫学报, 50(3): 565–574]
- Makonde HM, Boga HI, Osiemo Z, Mwirichia R, Mackenzie LM, Göker M, Klenk HP, 2013. 16S-rRNA-based analysis of bacterial diversity in the gut of fungus-cultivating termites (*Microtermes* and *Odontotermes* species). *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 104(5): 869–883.
- Mason CJ, Campbell AM, Scully ED, Hoover K, 2019. Bacterial and fungal midgut community dynamics and transfer between mother and brood in the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*), an invasive xylophage. *Microb. Ecol.*, 77(1): 230–242.
- Morrison M, Pope PB, Denman SE, McSweeney CS, 2009. Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new? *Curr. Opin. Biotech.*, 20(3): 358–363.
- Ohkuma M, Noda S, Hongoh Y, Kudo T, 2002. Diverse bacteria related to the bacteroides subgroup of the CFB phylum within the gut symbiotic communities of various termites. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 66(1): 78–84.
- Pang K, Dong SZ, Hou Y, Bian YL, Yang K, Yu XP, 2012. Cultivation, identification and quantification of one species of yeast-like symbiotes, *Candida*, in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Sci.*, 19(4): 477–484.
- Pang X, Xiao X, Liu Y, Zhang R, Liu J, Liu Q, Wang P, Cheng G, 2016. Mosquito C-type lectins maintain gut microbiome homeostasis. *Nat. Microbiol.*, 1(5): 16023.
- Peterson BF, Scharf ME, 2016. Lower termite associations with microbes: synergy, protection, and interplay. *Front. Microbiol.*, 7: 422.
- Qu LY, Lou YH, Huang HJ, Ding ZJ, Ye YX, Zhang CX, 2013. Molecular detection of the endosymbiont *Wolbachia* in different Asian populations of the brown planthopper. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(5): 1320–1327. [屈吕宇, 楼怡寒, 黄海剑, 丁张军, 叶雨轩, 张传溪, 2015. 亚洲不同地理种群褐飞虱内共生菌 *Wolbachia* 的分子检测. 应用昆虫学报, 50(5): 1320–1327]
- Robacker DC, Lauzon CR, 2002. Purine metabolizing capability of *Enterobacter agglomerans* affects volatiles production and attractiveness to Mexican fruit fly. *J. Chem. Ecol.*, 28(8): 1549–1563.
- Schloss PD, Delalibera I, Handelsman J, Raffa KF, 2006. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.*, 35(3): 625–629.
- Shentu XP, Li DT, Xu JF, She L, Yu XP, 2016. Effects of fungicides on the yeast-like symbiotes and their host, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera; Delphacidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 128: 16–21.
- Shi WB, Syrenne R, Sun JZ, Yuan JS, 2010. Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the ‘omics’ age. *Insect Sci.*, 17(3): 199–219.
- Shi WJ, Cheng JA, Zhu ZR, Jiang MX, Lou YY, 2002. Progress in the studies of insect symbiont *Wolbachia*. *Acta Ecol. Sin.*, 22(3): 409–419. [施婉君, 程家安, 祝增荣, 蒋明星, 娄永根, 2002. 昆虫共生细菌 *Wolbachia* 的研究进展. 生态学报, 22(3): 409–419]
- Su MM, Guo L, Tao YL, Zhang YJ, Wan FH, Chu D, 2016. Effects of host plant factors on the bacterial communities associated with two whitefly sibling species. *PLoS ONE*, 11(3): e0152183.
- Tian XY, Song FP, Zhang J, Liu RM, Zhang XP, Duan JY, Shu CL, 2017. Diversity of gut bacteria in larval *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Scarabaeidae) fed on corn stalk. *Acta Entomol. Sin.*, 60(6): 632–641. [田小燕, 宋福平, 张杰, 刘荣梅, 张兴鹏, 段江燕, 束长龙, 2017. 饲喂玉米秸秆的白星花金龟幼虫肠道细菌多样性. 昆虫学报, 60(6): 632–641]
- Wang SB, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M, 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(31): 12734–12739.
- Wang SB, Qu S, 2017. Insect symbionts and their potential application in pest and vector-borne disease control. *Bull. Chin. Acad. Sci.*, 32(8): 863–872. [王四宝, 曲爽, 2017. 昆虫共生菌及其在病虫害防控中的应用前景. 中国科学院院刊, 32(8): 863–872]
- Wang WX, Zhu TH, Lai FX, Fu Q, 2015. Diversity and infection frequency of symbiotic bacteria in different populations of the rice brown planthopper in China. *J. Entomol. Sci.*, 50(1): 47–66.
- Xia X, Zheng D, Zhong H, Qin B, Gurr GM, Vasseur L, Lin H, Bai J, He W, You M, 2013. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS ONE*, 8(7): e68852.
- Xu HX, Zheng XS, Yang YJ, Wang X, Fu Q, Ye GY, Lü ZX, 2014. PCR-DGGE analysis of the bacterial community in different populations of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Chin. J. Rice Sci.*, 28(2): 217–222. [徐红星, 郑许松, 杨亚军, 王新, 傅强, 叶恭银, 吕仲贤, 2014. 褐飞虱体内细菌群落的 PCR-DGGE 分析. 中国水稻科学, 28(2): 217–222]
- Yang LP, Chang HH, Li J, Zhang ZB, Huang Y, 2017. Study of the

- biodiversity in intestinal symbiotic fungi in grasshoppers species by using DNA meta-barcoding. *Acta Ecol. Sin.*, 37(20): 6905 - 6913. [杨丽平, 常会会, 李杰, 张智斌, 黄原, 2017. 基于 DNA 复合条形码技术的蝗虫肠道共生真菌多样性研究. 生态学报, 37(20): 6905 - 6913]
- Yang XQ, Wang ZL, Wang TZ, Yu XP, 2018. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) by 16S rRNA high-throughput sequencing. *Acta Entomol. Sin.*, 61(2): 200 - 208. [杨晓晴, 王正亮, 王天召, 俞晓平, 2018. 基于 16S rRNA 高通量测序的灰飞虱体内细菌群落结构及多样性分析. 昆虫学报, 61(2): 200 - 208]
- Yun JH, Roh SW, Whon TW, Jung MJ, Kim MS, Park DS, Yoon C, Nam YD, Kim YJ, Choi JH, Kim JY, Shin NR, Kim SH, Lee WJ, Bae JW, 2014. Insects gut bacterial diversity determined by host environmental habitat, diet, developmental stage and phylogeny. *Appl. Environ. Microb.*, 13(6): 5254 - 5264.
- Zhang JY, Zhu BC, Xu C, Ding X, Li JF, Zhang XG, Lu ZH, 2015. Strategy of selecting 16S rRNA hypervariable regions for matagenome-phylogentic marker genes based analysis. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 26(11): 3545 - 3553. [张军毅, 朱冰川, 徐超, 丁啸, 李俊锋, 张学工, 陆祖宏, 2015. 基于分子标记的宏基因组 16S rRNA 基因高变区选择策略. 应用生态学报, 26(11): 3545 - 3553]
- Zhang Y, Meng XC, 2017. Stress responses and impact of carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *J. Chin. Inst. Food Sci. Tech.*, 17(6): 145 - 151. [张筠, 孟祥晨, 2017. 乳酸菌的胁迫应答及其对碳水化合物代谢的影响. 中国食品学报, 17(6): 145 - 151]
- Zhang YF, Wu H, Chen JM, Zheng XS, Chen LZ, Yu XP, 2007. A strain isolated from brown planthopper and its molecular identification. *Chin. J. Rice Sci.*, 21(5): 551 - 554. [张珏锋, 吴鸿, 陈建明, 郑许松, 陈列忠, 俞晓平, 2007. 一株褐飞虱内共生菌的分离及分子鉴定. 中国水稻科学, 21(5): 551 - 554]
- Zhang YL, Ge HM, Zhao W, Dong H, Xu Q, Li SH, Li J, Zhang J, Song YC, Tan RX, 2008. Unprecedented immunosuppressive polyketides from *Daldivia eschscholzi*, a mantis-associated fungus. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47(31): 5823 - 5826.
- Zhou HY, Sun B, Wu HL, Hu XM, Hao Y, Ye JM, 2015. Research progress of intestinal microbial function of insect and silkworm. *North Seric.*, 36(4): 1 - 4. [周洪英, 孙波, 吴洪丽, 胡兴明, 郝瑜, 叶建美, 2015. 昆虫肠道微生物功能及家蚕肠道微生物研究进展. 北方蚕业, 36(4): 1 - 4]

(责任编辑: 马丽萍)