

# 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

杨晓晴, 王正亮, 王天召, 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】探明灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内细菌的群落结构和种类多样性。【方法】采用 Illumina MiSeq 测序平台对新羽化 24 h 的灰飞虱雌雄成虫体内细菌 16S rRNA 的 V3-V4 变异区序列进行高通量测序, 应用 USEARCH 和 Silva 等软件和数据库来统计样品序列数目和操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) 数量, 分析灰飞虱雌雄成虫体内细菌的种类组成、丰度、Alpha 多样性及其差异。【结果】灰飞虱雌、雄成虫样本分别获得 29 333 和 25 919 条有效序列, 根据序列相似性进行聚类分析分别获得 55 和 57 个 OTUs。其中, 雌、雄成虫两类样本共有 OTU 数目 20 个, 特有的 OTU 数目分别为 35 和 37 个。基于 OTU 物种分类分析, 雌雄成虫样本中细菌种类一共覆盖 7 个门、15 个纲、23 个目、33 个科、56 个属和 73 个种。在门、纲、目和科分类阶元上, 雌雄成虫两类样本均以变形菌门 (Proteobacteria, 雌 99.96%/雄 99.16%)、 $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria, 雌 97.76%/雄 97.84%)、红螺菌目 (Rhodospirillales, 雌 83.92%/雄 53.21%) 和醋酸杆菌科 (Acetobacteraceae, 雌 83.90%/雄 53.17%) 中的细菌为优势菌。在属分类阶元上, 灰飞虱雌雄成虫体内优势菌为醋酸杆菌科未分类属 (unclassified Acetobacteraceae), 沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 次之, 后者在雌、雄成虫体内丰度分别为 13.81% 和 44.52%。在种水平上, 灰飞虱雌、雄成虫体内特有细菌分别为 21 和 32 个种, 但两类样本中性别特有种的丰度普遍极低, 均不足 0.5%。【结论】灰飞虱雌雄成虫间细菌群落组成和种类多样性存在差异。本研究为进一步挖掘灰飞虱体内关键微生物并解析其生物学功能及其利用等方面奠定了基础。

**关键词:** 灰飞虱; 16S rRNA; 高通量测序; 细菌; 多样性

**中图分类号:** Q965.8   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0454-6296(2018)02-0200-09

## Analysis of the bacterial community structure and diversity in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) by 16S rRNA high-throughput sequencing

YANG Xiao-Qing, WANG Zheng-Liang, WANG Tian-Zhao, 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 bacterial community structure and diversity in the small brown planthopper (SBPH), *Laodelphax striatellus*. 【Methods】 The Illumina MiSeq high-throughput sequencing platform was used to sequence the V3-V4 regions of the bacterial 16S rRNA gene in the newly emerged female and male adults (24 h after emergence) of *L. striatellus*. The numbers of sequences and operational taxonomic units (OTUs) and the abundance and diversity of the bacterial communities were

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601698); 浙江省自然科学基金项目(LQ16C140002)

作者简介: 杨晓晴, 女, 1992 年 10 月生, 山西大同人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学及分子生物学, E-mail: 18867142935@163.com

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

收稿日期 Received: 2017-09-06; 接受日期 Accepted: 2017-10-25

analyzed using the related softwares and databases including USEARCH and Silva. 【Results】 A total of 29 333 valid tags and 55 OTUs were obtained from female adults of *L. striatellus*, while the numbers of valid tags and OTUs from male adults were 25 919 and 57, respectively. Among them, 20 OTUs were shared between the two samples of female and male adults, and the unique OTU numbers for female and male adults were 35 and 37, respectively. The total OTUs of the two samples were annotated into 7 phyla, 15 classes, 23 orders, 33 families, 56 genera, and 73 species. At the levels of phylum, class, order and family, the most dominant bacteria in both samples of female and male adults were from Proteobacteria (99.96% for female and 99.16% for male), Alphaproteobacteria (97.76% for female and 97.84% for male), Rhodospirillales (83.92% for female and 53.21% for male), and Acetobacteraceae (83.90% for female and 53.17% for male), respectively. At the genus level, the dominant bacteria with the highest abundance belonged to an undetermined genus in Acetobacteraceae (unclassified Acetobacteraceae). The second dominant genus was *Wolbachia*, accounting for 13.81% and 44.52% in female and male adults, respectively. At the species level, the numbers of specific bacterial species in male and female adults were 21 and 32, respectively. However, the abundance of the sex-specific species in the two samples was generally low (less than 0.5%). 【Conclusion】 The results indicate that the bacteria in *L. striatellus* adults are diverse and the bacterial community structure and diversity are different between female and male adults. This study lays the foundation for further studies on the excavation and utilization of microorganism resources for the biocontrol of *L. striatellus*.

**Key words:** *Laodelphax striatellus*; 16S rRNA; high-throughput sequencing; bacteria; diversity

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallén 属半翅目 (Hemiptera) 飞虱科 (Delphacidae), 是亚洲地区重要的农业害虫, 我国以长江中下游和华北稻区发生最为严重 (Otuka *et al.*, 2010; 吕进等, 2013)。灰飞虱除以刺吸危害水稻、大麦、小麦、玉米等多种经济作物外, 还能传播水稻黑条矮缩病、水稻条纹叶枯病、小麦丛矮病及玉米粗缩病等多种病毒病害, 造成作物产量的巨大损失 (Yamamura and Yokozawa, 2002; 刘海建等, 2007)。目前, 使用化学杀虫剂仍是防治灰飞虱的重要手段, 但由此也带来了抗药性和环境危害等诸多问题 (Endo *et al.*, 2002; 王彦华, 2010)。因此, 寻求一条新的防治途径, 有效减少化学杀虫剂的使用, 是开展灰飞虱防控工作的关键所在。

昆虫体内含有大量的微生物, 形成复杂的微生物群落, 在昆虫生长发育及繁殖过程中发挥重要的作用, 是害虫防治中尚未开发的一类重要资源 (Douglas, 2007; Crotti *et al.*, 2012)。有研究表明, 同其他半翅目害虫 (如蚜虫、粉虱等) 一样, 灰飞虱体内亦存在众多微生物群体, 与灰飞虱生长繁殖、营养代谢和抗药性产生等过程密切相关 (乐文静等, 2011; Cao *et al.*, 2015)。最近几年, 稻飞虱体内微生物菌群的研究受到了学者的广泛重视, 并提出了抑菌防虫的新思路, 即通过抑制稻飞虱体内微生物

(特别是共生菌) 直接或间接达到控制稻飞虱的目的 (陈列忠等, 2006; Berasategui *et al.*, 2016)。而明确灰飞虱体内微生物多样性、挖掘关键微生物种类并解析其生物学功能以期利用是实现抑菌防虫的前提和基础。

目前, 关于灰飞虱体内微生物的研究主要依赖于传统离体培养技术, 但灰飞虱体内微环境很难人为模拟, 分离过程重复性差、易污染, 离体培养很难成功 (曹伟等, 2015)。尽管变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术的应用可以在一定程度上提高昆虫体内微生物研究的种类和范围, 但其存在操作复杂, 重复性差等缺陷 (Dong *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013)。随着测序技术和宏基因组技术的快速发展, 使得昆虫体内微生物的研究变得更加全面和方便 (Shi *et al.*, 2010)。当前, 国内外对半翅目昆虫体内微生物的研究开展较多, 特别是对刺吸植物汁液的蚜科、粉虱科等刺吸式昆虫的研究较为深入, 但对灰飞虱体内微生物的系统性研究还严重缺乏 (De Clerck *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2016)。为此, 本研究采用 16S rRNA 测序的宏基因组策略分别检测了刚羽化灰飞虱雌雄成虫体内细菌的种类组成及其多样性, 以期掌握灰飞虱体内细菌型微生物的资源状况, 为后续研究灰飞虱体内细菌的生态功能和互作机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

灰飞虱雌、雄成虫均采自于浙江省杭州市郊区水稻田,在人工气候室内(温度  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $70\% \pm 5\%$ ,光周期 16L:8D)以大麦 *Hordeum vulgare* 苗继代饲养 50 代以上并维持种群。选取饲养获得的灰飞虱刚羽化 24 h 的雌、雄成虫作为供试昆虫。

### 1.2 灰飞虱体内微生物总基因组 DNA 的提取与含量测定

分别取刚羽化 24 h 的灰飞虱雌、雄成虫,以 50 头完整虫体作为一组供试。各组先进行 6 h 的饥饿处理,以除去体内可能随取食而进入的微生物。接着使用 75% 的酒精表面消毒虫体 3 次,每次 3 min,再用无菌蒸馏水清洗 5 遍,晾干虫体。运用 DNeasy Tissue Kit(Qiagen, Hilden, Germany)试剂盒参照说明书分别提取灰飞虱雌、雄成虫体内微生物总基因组 DNA,最后总 DNA 用 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 溶解。使用微量核酸蛋白测定仪(NanoDrop 2000, USA)测定总 DNA 浓度及 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值,并用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测抽提质量。检测合格后的 DNA 样品保存于  $-80^\circ\text{C}$  备用。

### 1.3 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和高通量测序

将按 1.2 节抽提的总 DNA 为模板,以通用引物 338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' 扩增细菌 16S rRNA V3 + V4 区域。PCR 扩增体系:基因组 DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , TransStart Taq DNA Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$  Buffer 5  $\mu\text{L}$ , 引物 338F/806R (10 mmol/L) 各 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs(各 2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件:94 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$  变性 30 s, 55 $^\circ\text{C}$  退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 35 个循环;72 $^\circ\text{C}$  延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen, USA)割胶回收。每供试组做 3 个重复,重复样本 PCR 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用于后续高通量测序。测序由杭州联川生物技术股份有限公司完成,采用 Illumina MiSeq PE300 高通量测序平台进行双端测序。

### 1.4 数据分析

MiSeq Illumina 测序完成后,将下机的原始标签(raw tags)利用 Overlap 将双端数据进行拼接,并进行质控、嵌合体过滤,获得高质量的有效标签(valid

tags)。利用软件 USEARCH(v7.1)将相似的有效标签进行聚类。相似性高于 97% 的序列归为一个分类单元,即一个 OTU (operational taxonomic unit)。采用 RDP Classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,选用 Silva 核糖体数据库。使用软件 Mothur 进行 Alpha 多样性分析。基于 OTU 的结果计算菌群多样性。菌群多样性的指数采用 Shannon 指数、Simpson 指数、Chao1 指数(Chao, 1984; Chao *et al.*, 2000; Kuczynski *et al.*, 2011)和注释物种数(number of annotated species)。其中,Chao1 指数和注释物种数反映样品中群落丰富度,Shannon 指数反映群落的多样性,Simpson 指数反映群落中优势种的集中程度。Chao1 指数、注释物种数和 Shannon 指数越大,Simpson 指数越小,说明样品中的物种越丰富多样。

## 2 结果

### 2.1 序列拼接与聚类分析

灰飞虱细菌 16S rRNA 高通量测序共得到原始标签为 55 435 条,拼接优化后有效标签为 55 252 条。在 97% 相似性水平上进行聚类,共得到 92 个 OTUs。其中,灰飞虱雌、雄成虫样本测序原始标签分别为 29 384 和 26 051 条,对应优化后分别得到 29 333 和 25 919 条有效标签。在 97% 相似度下可分别将其聚类为用于物种分类的 55 和 57 个 OTUs (表 1)。其中,两类样本共有的 OTU 数目为 20 个,雌、雄成虫特有的 OTU 数目为 35 和 37 个。

表 1 灰飞虱体内细菌 16S rRNA 高通量测序基本信息

Table 1 Basic information of high-throughput sequencing based on bacteria 16S rRNA in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*

样本 Sample	原始标签数 Number of raw tags	有效标签数 Number of valid tags	共有 OTU 数 Number of shared OTUs	特有 OTU 数 Number of unique OTUs
雌成虫 Female adult	29 384	29 333	20	35
雄成虫 Male adult	26 051	25 919	20	37

### 2.2 灰飞虱体内细菌种类组成及其丰度分析

基于 OTUs 的分类结果,分别在各分类等级上对灰飞虱雌、雄成虫样本中细菌种类和相对丰度进行了统计分析(表 2)。在门分类阶元水平上,灰飞

表 2 灰飞虱雌雄成虫体内在目、科和属分类等级上相对丰度排名前 15 的细菌

Table 2 Relative abundance of top 15 bacteria at the levels of order, family and genus in female and male adults of the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*

目 Order		科 Family		属 Genus	
雌成虫 Female adult	雄成虫 Male adult	雌成虫 Female adult	雄成虫 Male adult	雌成虫 Female adult	雄成虫 Male adult
红螺菌目 Rhodospirillales (83.92%)	红螺菌目 Rhodospirillales (53.21%)	醋酸杆菌科 Acetobacteraceae (83.90%)	醋酸杆菌科 Acetobacteraceae (53.17%)	醋酸杆菌科未鉴定属 Unclassified (83.76%)	醋酸杆菌科未鉴定属 Unclassified (53.12%)
立克次氏体目 Rickettsiales (13.81%)	立克次氏体目 Rickettsiales (44.52%)	立克次氏体科 Rickettsiaceae (13.81%)	立克次氏体科 Rickettsiaceae (44.52%)	沃尔巴克氏体属 <i>Wolbachia</i> (13.81%)	沃尔巴克氏体属 <i>Wolbachia</i> (44.52%)
肠杆菌目 Enterobacteriales (2.04%)	假单胞菌目 Pseudomonadales (0.69%)	肠杆菌科 Enterobacteriaceae (2.04%)	莫拉菌科 Moraxellaceae (0.64%)	克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i> (0.67%)	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (0.63%)
伯克氏菌目 Burkholderiales (0.10%)	放线菌目 Actinomycetales (0.44%)	草酸杆菌科 Oxalobacteraceae (0.07%)	微杆菌科 Microbacteriaceae (0.36%)	特拉布斯氏菌属 <i>Trabulsiella</i> (0.40%)	细杆菌属 <i>Microbacterium</i> (0.36%)
假单胞菌目 Pseudomonadales (0.04%)	伯克氏菌目 Burkholderiales (0.39%)	莫拉菌科 Moraxellaceae (0.04%)	丛毛单胞菌科 Comamonadaceae (0.24%)	<i>Kosakonia</i> (0.35%)	草螺菌属 <i>Herbaspirillum</i> (0.15%)
放线菌目 Actinomycetales (0.03%)	肠杆菌目 Enterobacteriales (0.11%)	丛毛单胞菌科 Comamonadaceae (0.03%)	草酸杆菌科 Oxalobacteraceae (0.15%)	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> (0.32%)	丛毛单胞菌属 <i>Comamonas</i> (0.10%)
鞘脂单胞菌目 Sphingomonadales (0.02%)	鞘脂杆菌目 Sphingobacteriales (0.10%)	红螺菌科 Rhodospirillaceae (0.02%)	肠杆菌科 Enterobacteriaceae (0.11%)	泛菌属 <i>Pantoea</i> (0.20%)	代尔夫特菌属 <i>Delftia</i> (0.09%)
黄单胞菌目 Xanthomonadales (0.01%)	黄单胞菌目 Xanthomonadales (0.09%)	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae (0.02%)	鞘脂杆菌科 Sphingobacteriaceae (0.09%)	葡糖醋杆菌属 <i>Gluconacetobacter</i> (0.14%)	鞘脂杆菌属 <i>Sphingobacterium</i> (0.09%)
根瘤菌目 Rhizobiales (0.01%)	噬纤维菌目 Cytophagales (0.08%)	微杆菌科 Microbacteriaceae (0.02%)	噬纤维菌科 Cytophagaceae (0.08%)	埃希氏菌属 <i>Escherichia</i> (0.07%)	金黄杆菌属 <i>Chryseobacterium</i> (0.07%)
气单胞菌目 Aeromonadales (0.01%)	黄杆菌目 Flavobacteriales (0.08%)	黄单胞菌科 Xanthomonadaceae (0.01%)	黄杆菌科 Flavobacteriaceae (0.08%)	草螺菌属 <i>Herbaspirillum</i> (0.05%)	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (0.06%)
噬纤维菌目 Cytophagales (0.01%)	鞘脂单胞菌目 Sphingomonadales (0.06%)	甲基杆菌科 Methylobacteriaceae (0.01%)	鞘脂单胞菌科 Sphingomonadaceae (0.06%)	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> (0.03%)	葡糖醋杆菌属 <i>Gluconacetobacter</i> (0.06%)
拟杆菌目 Bacteroidales (0.01%)	红环菌目 Rhodocyclales (0.03%)	假诺卡氏菌科 Pseudonocardiaceae (0.01%)	黄单胞菌科 Xanthomonadaceae (0.05%)	<i>Oleomonas</i> (0.02%)	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i> (0.05%)
	根瘤菌目 Rhizobiales (0.02%)	华杆菌科 Sinobacteraceae (0.01%)	假单胞菌科 Pseudomonadaceae (0.04%)	鞘脂单胞菌属 <i>Sphingomonas</i> (0.02%)	特拉布斯氏菌属 <i>Trabulsiella</i> (0.05%)
	柄杆菌目 Caulobacteriales (0.02%)	假单胞菌科 Pseudomonadaceae (0.01%)	华杆菌科 Sinobacteraceae (0.04%)	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> (0.02%)	管杆菌属 <i>Siphonobacter</i> (0.05%)
	支原体目 Mycoplasmatales (0.01%)	气单胞菌科 Aeromonadaceae (0.01%)	红螺菌科 Rhodospirillaceae (0.03%)	杜榭氏菌属 <i>Duganella</i> (0.02%)	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> (0.04%)

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

虱雌成虫体内细菌型微生物的 16S rRNA 基因序列共注释到了变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、蓝藻门 (Cyanobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 4 个门, 其中以变形菌门细菌为优势菌, 丰度占总数的 99.96%。灰飞虱雄成虫样本中的细菌种类除包含与雌成虫样本中相同的上述 4 个菌门之外, 还涵盖厚壁菌门 (Firmicutes), Candidatus Saccharibacteria 门和柔膜菌门 (Tenericutes), 同样以变形菌门细菌占优 (99.16%)。在纲分类阶元水平上, 灰飞虱雌、雄成虫样本共注释到了 15 个纲, 主要有  $\alpha$ -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、 $\gamma$ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria)、 $\beta$ -变形菌纲 (Betaproteobacteria)、放线菌纲 (Actinobacteria)、黄小杆菌纲 (Flavobacteriia)、鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia)、噬纤维菌纲 (Cytophagia) 和  $\delta$ -变形菌纲 (Deltaproteobacteria) 等。雌雄成虫体内均以  $\alpha$ -变形菌纲为优势菌纲,  $\gamma$ -变形菌纲细菌丰度次之, 但两者的相对丰度在雌雄成虫中略有差异, 如雌成虫体内  $\alpha$ -变形菌纲和  $\gamma$ -变形菌纲的丰度分别为 97.76% 和 2.09%, 而雄虫体内相应丰度分别为 97.84% 和 0.89%。在目分类阶元水平上, 共注释到了包括红螺菌目 (Rhodospirillales)、立克次氏体目 (Rickettsiales)、伯克氏菌目 (Burkholderiales)、肠杆菌目 (Enterobacteriales) 和假单胞菌目 (Pseudomonadales) 在内的 23 个目。其中 10 个目为两类样本共有, 且样本共有的种类中多数具有相对较高的丰度, 如红螺菌目和立克次氏体目, 其丰度在雌成虫体内分别占 83.92% 和 13.81%, 在雄成虫体内分别占 53.21% 和 44.52%。在科分类阶元水平上, 共覆盖 33 个科, 主要有醋酸杆菌科 (Acetobacteraceae)、立克次氏体科 (Rickettsiaceae)、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)、莫拉菌科 (Moraxellaceae)、草酸杆菌科 (Oxalobacteraceae)、丛毛单胞菌科 (Comamonadaceae) 和微杆菌科 (Microbacteriaceae) 等。其中, 灰飞虱雌成虫体内以红螺菌目醋酸杆菌科细菌为主, 占比为 83.90%。雄成虫体内检测的优势菌为红螺菌目醋酸杆菌科和立克次氏体目立克次氏体科细菌, 其丰度分别为 53.17% 和 44.52%。在属分类阶元水平上, 共注释到了 56 个属, 包括沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*、细杆菌属 *Microbacterium*、特拉布斯氏菌属 *Trabulsiella*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、肠杆菌属 *Enterobacter* 等。其中, 灰飞虱雌雄成虫体内共有 16 属细菌, 优势菌均为醋酸杆菌科未分类属 (unclassified), 其丰度在雌、

雄成虫中分别为 83.76% 和 53.12%, 沃尔巴克氏体属次之, 相应丰度分别为 13.81% 和 44.52%。在种分类阶元水平, 注释到包括 *Enterobacter asburiae*, *Acinetobacter rhizosphaerae* 和 *Siphonobacter aquaeclarae* 在内的 73 种细菌, 其中雌、雄成虫体内特有细菌分别为 21 和 32 个种, 但两类样本中性别特有种的丰度普遍极低, 丰度均不足 0.5%。

### 2.3 灰飞虱体内细菌多样性分析

Alpha 多样性指数评估可以反映样本中细菌群落的丰富度和多样性。本研究选取注释物种数、Chao1、Shannon 和 Simpson 4 个常用的 Alpha 多样性指数进行分析。由表 3 可见, 灰飞虱雌雄成虫体内细菌种类有较高的丰富度和多样性。其中雌、雄成虫体内细菌注释物种数分别为 41 和 52 种, Shannon 指数分别为 0.83 和 1.26, Simpson 指数分别为 0.28 和 0.52, Chao1 指数分别为 72.33 和 84.00。Chao1 指数和 Shannon 指数越大, Simpson 指数越小, 说明样品中的物种越丰富多样。因此, 灰飞虱雄成虫体内细菌物种丰度明显高于雌成虫。

表 3 灰飞虱雌雄成虫体内细菌的多样性指数统计  
Table 3 Statistics of alpha diversity indices of the bacteria in female and male adults of the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*

样本 Samples	多样性指数 Diversity indices			
	注释物种数 (雌雄共有种/ 性别特有种) Number of annotated species (Female and male shared species/Sex-specific species)	Shannon	Simpson	Chao1
	雌成虫 Female adult	41 (20/21)	0.83	0.28
雄成虫 Male adult	52 (20/32)	1.26	0.52	84.00

对序列进行随机抽样, 统计抽样样本的序列数和各指数, 分别绘制曲线。结果表明各曲线均已到达平台期, 说明更大的测序量不会引起物种多样性的显著增长, 基于现有数据量的分析结果准确可靠。其中 Shannon 指数和 Chao1 指数随抽样序列数量的变化曲线如图 1 所示。

## 3 讨论

16S rRNA 测序技术可以避免微生物分离培养

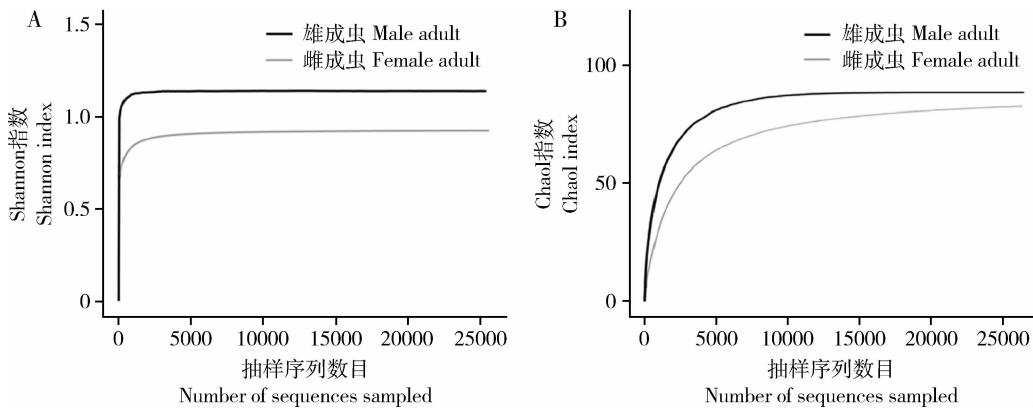


图1 Shannon 指数(A)和 Chao1 指数(B)随抽样序列数量的变化曲线

Fig. 1 Relationship between the Shannon (A) and Chao1 (B) indices and the number of sequences sampled

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(Hughes *et al.*, 2001)。目前,该技术已经广泛应用于土壤微生物的研究,但在分析重要农业害虫体内微生物种类组成、群落结构和多样性的研究中还相对较少(Jousselin *et al.*, 2016)。本研究采用 16S rRNA 和 Illumina Miseq 测序技术首次全面分析了灰飞虱雌雄成虫体内细菌菌落组成,为进一步探索利用灰飞虱体内微生物资源进行害虫防治奠定了基础。

本研究表明,灰飞虱雌雄成虫体内细菌型微生物一共注释鉴定获得 7 个门,15 个纲,23 个目,33 个科,56 个属,73 个种。这些细菌除沃尔巴克氏菌外,其他种类细菌在灰飞虱中均为首次报道。在鉴定的 7 个门中,以变形菌门细菌为主(99%),此结果与同属半翅目的其他昆虫肠道内优势菌群相同,如豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、点蜂缘椿象 *Riptortus clavatus* 和扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (Haynes *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2007; 王震杰, 2014)。在鳞翅目稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 和小菜蛾 *Plutella xylostella*, 双翅目泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* 和地中海实蝇 *Ceratitis capitata*, 直翅目沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 以及鞘翅目椴六点楔天牛 *Saperda vestita* 肠道中,变形菌门同样为其优势菌门(Schloss *et al.*, 2006; Behar *et al.*, 2008; Dillon *et al.*, 2010; 夏晓峰, 2014; 刘小改等, 2016; 张某等, 2016)。灰飞虱体内微生物主要聚集于肠道和脂肪体内(陈法军等, 2006)。本研究结果表明,该优势菌门亦可能主要来源于灰飞虱肠道内。

在本研究从灰飞虱成虫体内鉴定的 56 个细菌属中,优势菌属为醋酸杆菌科未分类属(unclassified)。研究表明,醋酸杆菌科细菌在昆虫

体内广泛存在,其宿主范围包括昆虫纲的半翅目、膜翅目、鞘翅目、鳞翅目和双翅目。该菌在宿主肠道、马氏管、唾液腺和生殖组织内均有分布,但目前对其在昆虫宿主体内生物学生态学功能等尚不完全明确(Crotti *et al.*, 2010)。沃尔巴克氏体属 *Wolbachia* 为次优势属,与泽兰实蝇肠道微生物优势属相同(张某等, 2016)。*Wolbachia* 是一种广泛分布于节肢动物体内的共生细菌,能够在亲代和子代之间垂直传递,并调控诸多宿主昆虫的生殖行为,导致胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility, CI)、孤雌生殖(parthenogenesis inducing, PI)和杀雄(male killing)等现象(Zabalou *et al.*, 2004)。除此之外,*Wolbachia* 还参与宿主昆虫的营养代谢和环境适应过程(Hedges *et al.*, 2008),如 *Wolbachia* 能帮助温带臭虫 *Cimex lectularius* 宿主合成维生素 B,能提高尖音库蚊 *Culex pipiens* 对杀虫剂的抗性(Berticat *et al.*, 2002; Nikoh *et al.*, 2014)。已有研究表明,*Wolbachia* 广泛分布于灰飞虱生殖组织(如精巢和卵巢)和非生殖组织(如头、胸、腹、唾液腺和消化道)中,导致细胞质不亲和现象,但与其体内携带水稻条纹病毒(*Rice stripe virus*, RSV)的特点不存在明显的相关性(仲崇翔等, 2006; Zhang *et al.*, 2010)。但 *Wolbachia* 能否参与灰飞虱的营养代谢,以及增强对化学农药、外源病原物侵染的抗性等方面还需进一步研究。*Arsenophonus* 属细菌也是昆虫体内的一类常见共生细菌,寄主范围广,与杀雄作用相关(Nováková *et al.*, 2009)。该菌在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 体内已有发现,并通过第 2 代高通量测序技术测定了其全基因组序列(王渭霞等, 2010; Xue *et al.*, 2014),但在本研究的灰飞虱体内没有被检测到。有报道称 *Arsenophonus* 和 *Wolbachia* 在褐飞虱

体内可能存在竞争关系,两种菌很少共同存在于同一褐飞虱个体内(Qu *et al.*, 2013)。上述现象是否也出现在灰飞虱群体中有待进一步的验证。

昆虫体内微生物多样性与性别、品种、食物以及环境因素相关(Su *et al.*, 2016)。雌雄昆虫由于生理代谢等的不同可能导致体内微生物菌群存在差异。本研究中关于灰飞虱雌雄成虫体内微生物多样性比较的结果支持上述推论。尽管灰飞虱雌雄成虫体内的优势类群在各分类阶元等级上未发现明显差异,均为变形菌门、 $\alpha$ -变形菌纲、红螺菌目、醋酸杆菌科细菌,但其相对丰度不尽相同。此外,除共有细菌种类外,雌雄成虫中各具有自身的特有细菌种类。在家蚕 *Bombyx mori* 和螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* 肠道微生物多样性研究中呈现类似结果,雄性家蚕和雌性家蚕肠道中优势属不尽相同,雄蚕中有 23 个属的细菌丰度是雌蚕的 1.5 倍以上,而在雌蚕肠道中的狭义梭菌属 *Clostridium sensu stricto* 和苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 丰度分别是雄蚕的 9.19 和 5.07 倍(许刚等, 2015)。通过 DGGE 技术分析表明,螺旋粉虱不同性别之间肠道微生物的组成与丰度比率也具有一定的差异,如雄成虫中不含有 D114 条带(王甸洪等, 2012)。灰飞虱可取食水稻,小麦、大麦和玉米等多种禾本科作物,进一步研究取食不同寄主条件下体内微生物群落的结构组成和多样性,将有利于对灰飞虱寄主多样性及相关方面的研究。

昆虫体内含有大量微生物,其中诸多菌群在长期进化过程中与宿主昆虫之间形成了互利共生的关系,与宿主的生长发育、营养代谢和环境适应性息息相关(Engel and Moran, 2013; Wan *et al.*, 2014)。探明昆虫体内微生物种类组成,群落结构,丰度变化等信息有利于深入了解其系统发育及与宿主协同进化关系,为阐述昆虫的适应性、多样性以及与共生微生物协同进化机制奠定理论基础。本研究基于 16S rRNA 高通量测序技术全面分析了重要农业害虫灰飞虱体内微生物群落结构及多样性,极大丰富了灰飞虱体内微生物相关信息,研究结果有助于灰飞虱体内关键微生物种类的挖掘及其生物学功能的解析,为进一步开发基于宿主-寄生或共生微生物互作关系的灰飞虱绿色防控技术提供新思路。

## 参考文献 (References)

Behar A, Yuval B, Jurkevitch E, 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and their impact on host longevity. *J. Insect Physiol.*, 54(9): 1377 - 1383.

- Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M, 2016. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(4): 1567 - 1577.
- Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M, 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 269(1498): 1413 - 1416.
- Cao W, Ma Z, Chen YH, Yu XP, 2015. *Pichia anomala*, a new species of yeast-like endosymbionts and its variation in small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*). *J. Biosci. Bioeng.*, 119(6): 669 - 673.
- 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]
- Chao A, 1984. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.*, 11: 265 - 270.
- Chao A, Hwang WH, Chen YC, Kuo CY, 2000. Estimating the number of shared species in two communities. *Stat. Sin.*, 10: 227 - 246.
- Chen FJ, Zeng M, Zhang JF, Chen LZ, Lu ZX, Ye GY, Yu XP, 2006. Morphological difference of the yeast-like endosymbionts in adult planthoppers of *Nilaparvata lugens* (Stål), *Laodelphax striatellus* (Fallén) and *Sogatella furcifera* (Horvath). *Acta Zootaxon. Sin.*, 31(4): 728 - 735. [陈法军, 曾敏, 张珏锋, 陈列忠, 吕仲贤, 叶恭银, 俞晓平, 2006. 三种稻飞虱成虫体内酵母类共生菌的形态差异. 动物分类学报, 31(4): 728 - 735]
- Chen LZ, Yu XP, Chen JM, Lu ZX, Zheng XS, Zhang JF, 2006. Advance in research on the application of symbionts in the management of the brown planthoppers, *Nilaparvata lugens* Stål. *Agrochemicals*, 45(11): 726 - 729. [陈列忠, 俞晓平, 陈建明, 吕仲贤, 郑许松, 张珏锋等, 2006. 共生菌在褐飞虱防治中的应用. 农药, 45(11): 726 - 729]
- Crotti E, Balloi A, Hamdi C, Sansonno L, Marzorati M, Gonella E, Favia G, Cherif A, Bandi C, Alma A, Daffonchio D, 2012. Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems. *Microb. Biotechnol.*, 5(3): 307 - 317.
- Crotti E, Rizzi A, Chouaia B, Ricci I, Favia G, Alma A, Sacchi L, Bourtzis K, Mandrioli M, Cherif A, Bandi C, Daffonchio D, 2010. Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(21): 6963 - 6970.
- De Clerck C, Fujiwara A, Joncour P, Léonard S, Félix ML, Francis F, Jijakli MH, Tsuchida T, Massart S, 2015. A metagenomic approach from aphid's hemolymph sheds light on the potential roles of co-existing endosymbionts. *Microbiome*, 3(1): 63.
- Dillon RJ, Webster G, Weightman AJ, Charnley AK, 2010. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust. *Anton. Leeuw.*, 97(1): 69 - 77.
- 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, 2007. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends Biotechnol.*, 25(8): 338–342.
- Endo S, Takahashi A, Tsurumachi M, 2002. Insecticide susceptibility of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallén (Homoptera: Delphacidae), collected from East Asia. *Appl. Entomol. Zool.*, 37(1): 79–84.
- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699–735.
- Haynes S, Darby AC, Daniell TJ, Webster G, van Veen FJF, Godfray HCJ, Prosser JJ, Douglas AE, 2003. Diversity of bacteria associated with natural aphid populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7216–7223.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN, 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322(5902): 702.
- Hou Y, Ma Z, Dong SZ, Chen YH, Yu XP, 2013. Analysis of yeast-like symbiote diversity in the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, using a novel nested PCR-DGGE protocol. *Curr. Microbiol.*, 67(3): 263–270.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM, 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10): 4399–4406.
- Jousselin E, Clamens AL, Galan M, Bernard M, Maman S, Gschloessl B, Dupont G, Meseguer AS, Calevro F, Coeur d'Acier A, 2016. Assessment of a 16S rRNA amplicon Illumina sequencing procedure for studying the microbiome of a symbiont-rich aphid genus. *Mol. Ecol. Resour.*, 16(3): 628–640.
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T, 2007. Insect-microbe mutualism without vertical transmission; a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(13): 4308–4316.
- Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R, 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, Chapter 10; unit 10.7. doi: 10.1002/0471250953.bi1007s36.
- Le WJ, Shi WQ, Ji YH, Zhou YJ, 2011. Relationship between *Wolbachia* and rice stripe virus infection in *Laodelphax striatellus*. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 34(1): 46–50. [乐文静, 史文琦, 季英华, 周益军, 2011. 灰飞虱体内 *Wolbachia* 的感染与其携带水稻条纹病毒的相关性分析. *南京农业大学学报*, 34(1): 46–50]
- Liu HJ, Cheng ZB, Wang Y, Wei BQ, Ren CM, Zhou YJ, Fan YJ, 2007. Preliminary study on transmission of rice stripe virus by small brown planthopper. *Jiangsu J. Agric. Sci.*, 23(5): 492–494. [刘海建, 程兆榜, 王跃, 魏邦庆, 任春梅, 周益军, 范永坚, 2007. 灰飞虱传递水稻条纹病毒研究初报. *江苏农业学报*, 23(5): 492–494]
- 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]
- Lu 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]
- Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T, 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111(28): 10257–10262.
- Nováková E, Hypša V, Moran NA, 2009. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiol.*, 9: 143.
- Otuka A, Matsumura M, Sanada-Morimura S, Takeuchi H, Watanabe T, Ohtsu R, Inoue H, 2010. The 2008 overseas mass migration of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*, and subsequent outbreak of rice stripe disease in western Japan. *Appl. Entomol. Zool.*, 45(2): 259–266.
- Qu LY, Lou YH, Fan HW, Ye YX, Huang HJ, Hu MQ, Zhu YN, Zhang CX, 2013. Two endosymbiotic bacteria, *Wolbachia* and *Arsenophonus*, in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Symbiosis*, 61(1): 47–53.
- Schloss PD, Delalibera I Jr, Handelsman JO, 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.
- Shi W, 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.
- 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.
- Wan PJ, Yang L, Wang WX, Fan JM, Fu Q, Li GQ, 2014. Constructing the major biosynthesis pathways for amino acids in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae), based on the transcriptome data. *Insect Mol. Biol.*, 23(2): 152–164.
- Wang DH, Wu WJ, Fu YG, 2012. Bacterial community in *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae) estimated by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis. *Acta Entomol. Sin.*, 55(7): 772–781. [王甸洪, 吴伟坚, 符悦冠, 2012. 螺旋粉虱成虫体内细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16S rRNA 文库序列分析. *昆虫学报*, 55(7): 772–781]
- Wang WX, Luo J, Lai FX, Fu Q, 2010. Identification and phylogenetic analysis of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 53(6): 647–654. [王渭霞, 罗举, 赖凤香, 傅强, 2010. 水稻褐飞虱内生共生细菌 *Arsenophonus* 的鉴定和系统分析. *昆虫学报*, 53(6): 647–654]
- Wang YH, Wu CX, Zhao XP, Cang T, Chen LP, Yu RX, Wu SG, Wang Q, 2010. Advances in the research of insecticide resistance of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Plant Prot.*, 36(4): 29–35. [王彦华, 吴长兴, 赵学平, 苍涛, 陈丽萍, 俞瑞鲜, 吴声敢, 王强, 2010. 灰飞虱对杀虫剂抗药性的研究进展. *植物保护*, 36(4): 29–35]



- Wang ZJ, 2014. Molecule Identification and Analyse of the Symbiont Microorganism in Mealybug (*Phenacoccus solenopsis* Tinsley). MSc Thesis, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang. [王震杰, 2014. 扶桑绵粉蚧共生微生物的分子鉴定及分析. 浙江金华: 浙江师范大学硕士学位论文]
- Xia XF, 2014. Organizational Diversity and Functional Characterization of Microbiota in the Midgut of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). PhD Dissertation, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. [夏晓峰, 2014. 小菜蛾中肠微生物多样性及其功能研究. 福州: 福建农林大学博士学位论文]
- Xu G, Sun ZL, Hu XL, Xue RY, Cao GL, Gong CL, 2015. Analysis on intestinal bacterial diversity in silkworm (*Bombyx mori*) based on 16S rRNA gene sequences. *Sci. Seric.*, 41(4): 641–649. [许刚, 孙振丽, 胡小龙, 薛仁宇, 曹广力, 贡成良, 2015. 基于 16S rRNA 基因序列分析家蚕肠道细菌的多样性. 蚕业科学, 41(4): 641–649]
- Xue J, Zhou X, Zhang CX, Yu LL, Fan HW, Wang Z, Xu HJ, Xi Y, Zhu ZR, Zhou WW, Pan PL, Li BL, Colbourne JK, Noda H, Suetsugu Y, Kobayashi T, Zheng Y, Liu SL, Zhang R, Liu Y, Luo YD, Fang DM, Chen Y, Zhan DL, Lv XD, Cai Y, Wang ZB, Huang HJ, Cheng RL, Zhang XC, Lou YH, Yu B, Zhuo JC, Ye YX, Zhang WQ, Shen ZC, Yang HM, Wang J, Wang J, Bao YY, Cheng JA, 2014. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biol.*, 15(12): 521.
- Yamamura K, Yokozawa M, 2002. Prediction of a geographical shift in the prevalence of rice stripe virus disease transmitted by the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Hemiptera: Delphacidae), under global warming. *Appl. Entomol. Zool.*, 37(1): 181–190.
- Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C, Bourtzis K, 2004. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(42): 15042–15045.
- Zhang FJ, Guo HY, Zheng HJ, Zhou T, Zhou YJ, Wang SY, Fang RX, Qian W, Chen XY, 2010. Massively parallel pyrosequencing-based transcriptome analyses of small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*), a vector insect transmitting rice stripe virus (RSV). *BMC Genomics*, 11(1): 303.
- Zhang M, Yang P, Zhu JY, Yuan Y, Gui FR, Gao X, Wu GX, 2016. Analysis of the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis* (Diptera: Trypetidae) based on 16S rDNA gene sequence. *Acta Entomol. Sin.*, 59(2): 200–208. [张某, 杨璞, 朱家颖, 袁远, 桂富荣, 高熹, 吴国星, 2016. 基于 16S rDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析. 昆虫学报, 59(2): 200–208]
- 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 Prot.*, 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]

(责任编辑: 马丽萍)