

灰飞虱体内一种酵母类共生菌的分子鉴定

白旭, 董胜张, 庞琨, 边亚琳, 俞晓平*

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

摘要: 为明确稻飞虱体内酵母类共生菌 (yeast-like symbiont, YLS) 的种类, 采用超速离心的方法分离纯化灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) 体内 YLS, 用真菌的通用引物对其 18S rDNA、5.8S-ITS rDNA 全长序列进行扩增。结果得到一条分子量约为 2 340 bp 的序列。序列同源性分析表明, 该菌与 Noda 等所报道的类酵母菌的 18S rDNA 序列差异较大 (同源性只有 89.6%), 而与季也蒙毕赤酵母 *Pichia guilliermondii* 有 99.8% 的同源性。原位杂交 (ISH) 和巢氏 PCR 均证明该菌存在于灰飞虱脂肪体和卵内, 但数量较少。因此, 灰飞虱体内 YLS 除了 Noda 等报道的类酵母菌外, 尚存在另外一种季也蒙毕赤酵母菌。

关键词: 灰飞虱; 类酵母共生菌; 季也蒙毕赤酵母; 分子鉴定; 巢氏 PCR; 原位杂交

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)06-0640-07

Identification of one yeast-like symbiont from the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Homoptera: Delphacidae)

BAI Xu, DONG Sheng-Zhang, PANG Kun, BIAN Ya-Lin, YU Xiao-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To determine the species of the yeast-like symbiont (YLS) in the rice planthoppers, the YLS was first isolated and purified by ultracentrifugation from the fat bodies of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallén), and then 18S rDNA and 5.8S-ITS rDNA sequences of the YLS were amplified with the general primers for fungi. Sequence homology analysis showed that 18S rDNA and 5.8S-ITS rDNA obtained were different from the strain that Noda *et al.* had identified previously, but showed high homology (99.8%) with those of *Pichia guilliermondii*. The results of *in situ* hybridization (ISH) and nested PCR proved that this kind of *Pichia*-like symbiont existed in the body of *L. striatellus* and involved in the transovarial transmission. The results suggest that there exist other YLS in *L. striatellus* besides the kind of YLS identified by Noda *et al.*

Key words: *Laodelphax striatellus*; yeast-like symbiont (YLS); *Pichia guilliermondii*; molecular identification; nested PCR; *in situ* hybridization

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (Fallén) 属同翅目 (Homoptera) 飞虱科 (Delphacidae), 是亚洲地区主要的水稻害虫之一 (Kisimoto, 1989), 对农作物的危害除以成虫、若虫刺吸危害外, 还传播水稻条纹叶枯病、黑条矮缩病、小麦丛矮病和玉米粗缩病等病毒病, 给农业生产造成巨大损失 (林凌伟等, 2001; 孙黛珍等, 2006)。类酵母共生菌 (yeast-like symbiont, YLS) 是存在于稻飞虱体内的一种优势内共生菌, 主要聚集在雌虫腹部脂肪体中, 随卵传递

给下一代 (Chen *et al.*, 1981; Cheng and Hou, 2001), 对稻飞虱生长发育, 致害性变化等方面起到重要作用。YLS 可为寄主提供氨基酸、固醇类物质以及蛋白质等多种营养成分, 来弥补其饮食营养的不平衡, 保证褐飞虱的正常生长和繁殖 (Lee and Hou, 1987; Sasaki *et al.*, 1996); 且缺失 YLS 会直接造成褐飞虱对杀虫剂等外源物质的抵抗能力明显下降、死亡率上升, 推测 YLS 在褐飞虱对水稻抗性品种致害性变异过程中可能发挥着比褐飞虱自身

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3080031, Y3080410); 瑞典国际科学基金 IFS (C/4689-1); 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2008BADA5B06-01)

作者简介: 白旭, 女, 1984 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生态学, E-mail: baixu07@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yxp@cjl. edu. cn

收稿日期 Received: 2009-12-29; 接受日期 Accepted: 2010-02-26

更重要的作用(Chen *et al.*, 1981)。因此,明确稻飞虱体内类酵母共生菌的种类组成、种属发生地位至关重要。

Noda 等(1995)采用密度梯度离心法从褐飞虱体内分离得到 YLS, 18S rDNA 序列测定显示与子囊菌亚门(Ascomycotina)核菌纲(Pyrenomycetes)的 *Hypomyces chrysospermus* 亲缘关系最近,并且认为该菌更像是真子囊菌属,而不是真正酵母菌(本文把该菌简称为“Noda 菌”),且把它暂分类到内座菌目(Hypocreales),且没确定其种类。Fukatsu 和 Ishikawa(1996)发现蚜虫 *Hamiltonaphis styraci* 体内的 YLS 和飞虱体内的 YLS 亲缘关系相近,但是因为所测序列不够完全,同样把这种 YLS 分类到内座菌目(Hypocreales),没做更具体的分类。Noda 和 Kodama(1996)对烟草甲 *Lasioderma serricorne* (Fabricius)体内 YLS 的 rRNA 基因测序,发现其体内的 YLS 来源于早期的真子囊菌纲的丝状真菌。因此,目前对昆虫体内 YLS 的研究,普遍认为其体内主要存在一种与 Noda 等(1995)报道的相似的共生菌,是否存在其他种类的类酵母菌未见相关报道。近年来,陈法军等(2006)通过冷冻切片和显微观察的方法发现,3 种稻飞虱体内均存在形态不同的类酵母菌,推测稻飞虱体内可能存在多种 YLS。张珏锋等(2007, 2009)通过卵块培养的方法,从褐飞虱体内分离培养出两株菌,与解脂假丝酵母 *Yarrowia lipolytica*、嗜盐梗孢酵母 *Sterigmatomyces halophilus* 的序列相似性分别达到 100% 和 99.8%。因此,这些研究表明稻飞虱体内除了存在 Noda 等报道的共生菌外,尚存在其他种类的酵母类共生菌。

酵母菌同属的 5.8S rDNA 序列很相似,但其两侧间隔序列在长度和序列上有高度变异性,可以提供丰富的变异位点和信息位点,5.8S-ITS 间区序列的这种特性成为目前鉴定酵母菌理想的模板(周春艳等, 2006)。因此,本实验运用密度梯度离心法分离得到灰飞虱体内共生菌,对其核糖体上 18S rDNA, 5.8S-ITS rDNA 同时扩增得到其全长序列,并结合原位杂交技术,对灰飞虱体内的 YLS 进行种类鉴定,以进一步明确灰飞虱体内 YLS 的种群及数量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试虫源: 实验所用灰飞虱为本实验室建

立的种群,在人工气候箱中,温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $80\% \pm 5\%$, 16L:8D 条件下,采用大麦苗继代饲养 25 代以上。

1.1.2 卵的获取: 挑选刚羽化的灰飞虱,雌雄配对放入长有健壮大麦苗的试管内培养,温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $80\% \pm 5\%$, 16L:8D 条件下,培养 5 d 后,在体视镜下解剖麦苗,取出卵粒。

1.2 共生菌的分离纯化

参照 Noda 和 Omura(1992)的方法,有所改动。

脂肪体中 YLS 的分离纯化: 取褐飞虱雌虫 100 头,用 75% 酒精进行表面消毒 3 min, 无菌水漂洗 1 min。解剖腹部取出脂肪体,将脂肪体用 75% 酒精消毒、无菌水漂洗,然后用终浓度为 30% 的 percoll, 2 000 g 离心 10 min, 去除上层杂蛋白和脂肪体,下层沉淀用终浓度为 75% percoll, 100 000 g, 超速离心 20 min, 75% 层的絮状物即为 YLS。

卵粒中共生菌的分离纯化: 取解剖到的灰飞虱卵 2 000 粒,用 75% 酒精进行表面消毒 3 min, 无菌水漂洗 1 min, 研磨棒研磨,然后用终浓度为 30% 的 percoll, 2 000 g 离心 10 min, 去除上层杂蛋白和脂肪体,下层沉淀用终浓度为 75% percoll, 100 000 g, 超速离心 20 min, 75% 层的絮状物即为 YLS。

1.3 共生菌 DNA 的提取及 PCR 扩增

1.3.1 YLS DNA 的提取: 用酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司,具体方法参照试剂盒说明书进行。

1.3.2 18S rDNA、5.8S-ITS rDNA 全长 PCR 扩增: 上述所提取的脂肪体 YLS DNA 样品直接作扩增模板,所用引物为 18S rDNA 及 ITS 区的真菌核糖体 DNA 通用引物 NS1 和 ITS4(表 1),引物由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 本研究所用 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR used in this study

引物 Primers	序列 Sequence	来源 Source
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGCTCTC-3'	Noda <i>et al.</i> , 1995
NS8	5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'	Noda <i>et al.</i> , 1995
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	周春艳等, 2006
Pichia1	5'-GCCTTTCCTTCTGGCTAAC-3'	
Pichia2	5'-GTGACTATACCAGCAAAAAG-3'	
Pichia3	5'-TGTGCTGGCGATGTTCA-3'	
Pichia4	5'-GCCGAATGGTTAGCCAGAAG-3'	

反应体系为 50 μL ，其中包括 1 μL LaTaq DNA 聚合酶 (5 U/ μL)，引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL ，4 μL dNTP (2.5 mmol/L)，5 μL 10 \times buffer (含 Mg^{2+})，2 μL DNA 模板，加灭菌双蒸水至 50 μL 。PCR 反应程序为：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 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；扩增完成后，取 5 μL 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 克隆与重组质粒的筛选与鉴定：PCR 产物电泳回收纯化后，连接到 T-easy 载体上 (Promega)，连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α ，挑取白色菌落至 5 mL 的 LB 培养液 (含 5 μL 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp) 中，37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡过夜。取 200 μL 的菌液，用煮沸法制备质粒 DNA，PCR 鉴定阳性克隆。提供经 PCR 鉴定插有目的片段的重组克隆送上海英骏公司测序，测序结果通过在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索。每个 PCR 产物至少挑取 5 个单菌落用于序列测定。

1.4 巢式 PCR

上述所提的脂肪体 YLS DNA 及卵中 YLS DNA 样品作扩增模板，进行 PCR 扩增。

第一轮 PCR：所用引物为真菌 18S rDNA 通用引物 NS1 和 NS8 (表 1)。反应体系为 20 μL ，其中包括 0.2 μL LaTaq DNA 聚合酶 (5 U/ μL)，引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL ，1.5 μL dNTP (2.5 mmol/L)，1.8 μL 10 \times buffer (含 Mg^{2+})，0.5 μL DNA 模板，加灭菌双蒸水至 20 μL 。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min；扩增完成后，取 5 μL 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

第二轮 PCR：第一轮 PCR 产物稀释 100 倍后作模板，引物为根据测定得到的目标菌 *L-Pichia* 18S rDNA 序列信息，结合灰飞虱体内其他菌的序列，以及 GenBank 中所有已知的毕赤酵母菌的 18S rDNA 序列信息，设计两对 *L-Pichia* 18S rDNA 的特异性引物，*Pichia*1 和 *Pichia*2，*Pichia*3 和 *Pichia*4 (表 1)，反应体系同上。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；取 PCR 产物各 5 μL ，1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 原位杂交

1.5.1 冷冻切片：取刚羽化的灰飞虱雌虫，解剖取腹部。在解剖出的腹部组织滴加少许冷冻切片包

埋剂，放置于 Leica CM1900 冷冻切片机内预冻 30 min。将冷冻切片机箱体温度设置为 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，刀头温度设置为 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，组织块表面修整后切片，切片厚度为 4 μm ，展平的切片贴于多聚赖氨酸处理过的载玻片，37 $^{\circ}\text{C}$ ，2 h 烘干备用。

1.5.2 探针设计：本实验中，探针系针对 *L-Pichia* ITS 区设计。根据测定的目标菌 *L-Pichia* ITS 区 DNA 序列信息，结合灰飞虱体内其他菌的序列，以及 GenBank 中所有已知的毕赤酵母的 ITS 序列信息，通过序列对比找出适合探针设计的区域，以 Primer Premier 5 软件设计探针，并手工对比优化设计了一条特异性探针，命名为 L-Pic: CACAATTTAATTATTTTACAGT，探针采用 3' 端地高辛标记，方法为寡核苷酸加尾标记，探针由上海生工生物工程有限公司合成。

1.5.3 原位杂交：本实验所用原位杂交方法参考 Hayden 等 (2001) 进行优化和修订，4 μm 厚冷冻切片经 0.01 mol/L PBS 冲洗 5 min \times 2 次；滴加 0.3% Triton X-100，室温处理 10 min，PBS 洗涤；3% H_2O_2 -甲醇封闭缓冲液中处理 20 min，0.01 mol/L PBS 冲洗；0.2 mol/L HCl 室温处理 15 min，PBS 洗涤；1 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min；0.1 mol/L TEA 孵育 5 min，2 \times SSC 冲洗 10 min；每张切片滴加 20 μL 预杂交液，置湿盒中，40 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 30 min，再加稀释浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 探针，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min，冰上放置 1 min，切片置湿盒中 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 h；依次 2 \times SSC，0.5 \times SSC，0.2 \times SSC 反复振荡，滴加封闭液，37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min；滴加生物素化鼠抗地高辛，37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min，PBS 洗涤，滴加 SABC (室温) 30 min，PBS 洗涤，DAB 显色，水洗、脱水、封片。杂交缓冲液中不加探针作空白对照。

2 结果与分析

2.1 YLS 的分离纯化与 DNA 提取

直接解剖初羽灰飞虱雌虫，得到其腹部脂肪体，未经纯化的腹部脂肪体中含有大量 YLS、杂质和飞虱本身的细胞，严重影响类酵母共生菌 DNA 的提取纯度 (图 1: A)；采用密度梯度离心法，通过超速离心，收集 75% 的 percoll 层，该分离溶液中有大量 YLS 细胞及少许飞虱本身的细胞，不存在其他杂质，得到纯度较高的 YLS 细胞 (图 1: B)。

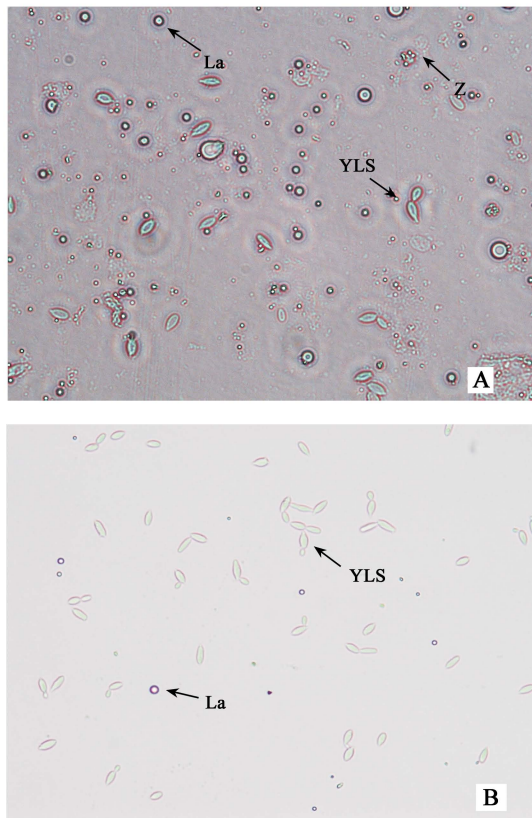


图 1 纯化前(A)和纯化后(B)的 YLS 细胞

Fig. 1 YLS cells before (A)
and after purification (B)

La: 灰飞虱细胞 *Laodelphax striatellus* cells;
Z: 杂质 Impurity; YLS: 共生菌细胞 YLS cells.

2.2 YLS 的 18S、5.8S -ITS 序列克隆与同源性分析

采用 18S rDNA 和 ITS 序列的通用引物, 从灰飞虱脂肪体内 YLS 的基因组进行扩增获得一个约 2 340 bp 的序列, 序列测定发现该序列含有 18S、5.8S -ITS 区域, 且 5 个单克隆测定的序列完全相同。同源性比对结果, 与 Noda 公布(GenBank 登录号: AF267232)的灰飞虱体内 YLS 序列 18S 的比对结果差异很大(同源性只有 89.6%)(图 2)。将结果经 GenBank 核苷酸序列数据库同源序列搜索, 发现与季也蒙毕赤酵母菌 *Pichia guilliermondii* 的 18S、5.8S-ITS rDNA (GenBank 登录号分别为 AB105434, EU568967)仅有 4 个碱基差异(图 3), 显示有 99.8% 的同源性, 说明灰飞虱体内尚存在另一种与季也蒙毕赤酵母菌相似的内共生菌, 将其序列命名为 *L-Pichia*。

2.3 *L-Pichia* 的巢式 PCR 验证

以灰飞虱脂肪体及卵块中分离得到的 YLS 基

因组 DNA 为模板, 第一轮 PCR 扩增, 采用 18S rDNA 的通用引物, 两个样品均得到 18S rDNA 的全长序列, 片段长 1 771 bp, 与预计相符(图 4: A)。第二轮 PCR 采用 *L-Pichia* 18S rDNA 的两对特异性引物, 各样品均得到约 688 bp(图 4: B)和 439 bp(图 4: B)的两条带, 与目标片段长度一致。说明脂肪体和卵中分离得到的 YLS 均含有 *L-Pichia* 的特异性条带, 进一步证明 *L-Pichia* 是灰飞虱体内的一种共生菌, 且通过灰飞虱的卵垂直传递给下一代。

2.4 原位杂交体内验证

用 *L-Pichia* ITS 区特异性探针, 3'端地高辛标记的 L-Pic 与灰飞虱腹部组织切片进行原位杂交, 杂交结果显示, 有部分 YLS 细胞被染成墨绿色(图 5: B), 而没加探针的空白对照中, 则未发现染成墨绿色的 YLS 细胞(图 5: A), 说明灰飞虱体内存在 *L-Pichia* YLS, 并由图 5(B)可知, 杂交信号为阳性的细胞数量较少, 可见这种 *L-Pichia* YLS 在灰飞虱体内数量较少, 尚存在大量的其他种类 YLS。

3 讨论

飞虱与多数刺吸危害的同翅目昆虫如蚜虫和叶蝉一样, 体内普遍存在酵母类共生菌, 且基于核糖体小亚基和大亚基部分序列分析发现, 这些内共生菌属于子囊菌亚门(Ascomycotina)核菌纲(Pyrenomycetes), 并将它们暂归为内座菌目(Hypocreales)麦角科(Clavicipitaceae)(Noda *et al.*, 1995; Fukatsu and Ishikawa, 1996; Suh *et al.*, 2001)。本研究采用真菌分类学上惯用的 ITS 序列的通用引物对灰飞虱体内酵母类共生菌的基因组进行扩增, 获得了一株与季也蒙毕赤酵母 *P. guilliermondii* 有 99.8% 的同源性的菌株, 进一步通过原位杂交和巢式 PCR 验证了该菌存在于灰飞虱脂肪体和卵内, 且其形态特征及生殖方式与季也蒙毕赤酵母相似, 因此, 初步证明灰飞虱体内的这种酵母类共生菌属于季也蒙毕赤酵母。基于该酵母菌 18S、5.8S-ITS rDNA 同源性分析发现, 与 Noda 等(1995)报道的灰飞虱体内的酵母菌不同。因此, 推测灰飞虱体内的酵母类共生菌除了 Noda 报道的酵母菌外, 尚存在一种类似于毕赤酵母的内共生菌。



图 2 灰飞虱体内 *L-Pichia* 与 Noda 等(1995)鉴定的 YLS 18S rDNA 全长序列比对

Fig. 2 Alignment of 18S rDNA sequence between YLS identified by Noda and *L-Pichia* from *Laodelphax striatellus*

L-Noda: Noda 等(1995)鉴定的灰飞虱体内 YLS 18S rDNA 序列 18S rDNA sequence of YLS identified by Noda *et al.* (1995); L-Pichia: 灰飞虱体内克隆得到的 *L-Pichia* 18S rDNA 序列 18S rDNA sequence of *L-Pichia* from *Laodelphax striatellus*.

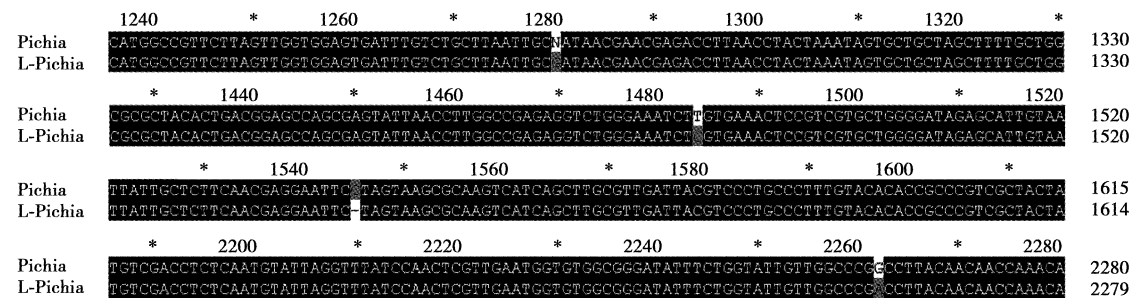


图 3 灰飞虱体内 *L-Pichia* 与季也蒙毕赤酵母菌 18S 和 ITS-5.8S rDNA 区全长序列比对

Fig. 3 Alignment of 18S and ITS-5.8S rDNA sequence between *Pichia guilliermondii* and *L-Pichia* from *Laodelphax striatellus*

Pichia: *Pichia guilliermondii* 18S 和 ITS-5.8S rDNA 序列 18S and ITS-5.8S rDNA sequence of *Pichia guilliermondii*; L-Pichia: 灰飞虱体内克隆得到的 *L-Pichia* 18S 和 ITS-5.8S rDNA 序列 18S and ITS-5.8S rDNA sequence of *L-Pichia* DNA from *Laodelphax striatellus*.

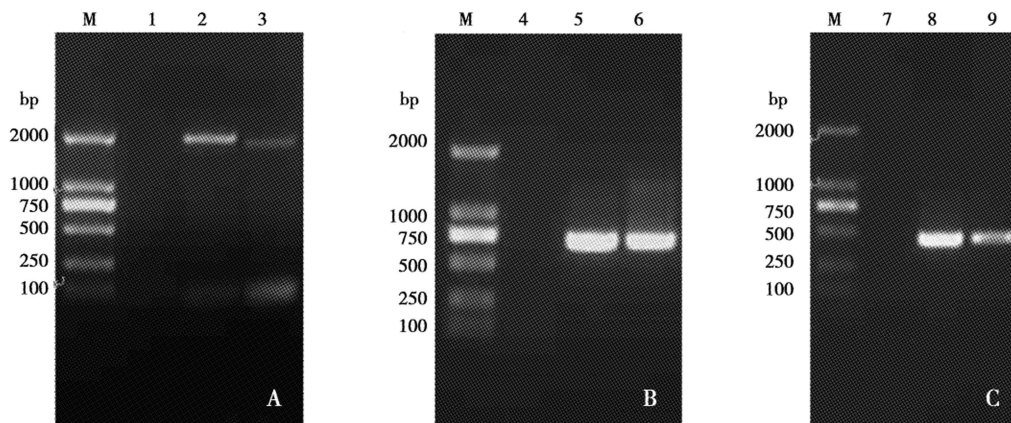


图 4 灰飞虱 *L-Pichia* 18S rDNA Nested-PCR 扩增结果

Fig. 4 The results of nested-PCR for *L-Pichia* 18S rDNA in *Laodelphax striatellus*

M: DL 2000 DNA Marker; 1, 4, 7: 空白对照 Blank control; 2, 5, 8: 脂肪体中 YLS (YLS isolated from fat bodies); 3, 6, 9: 卵中 YLS (YLS isolated from eggs).

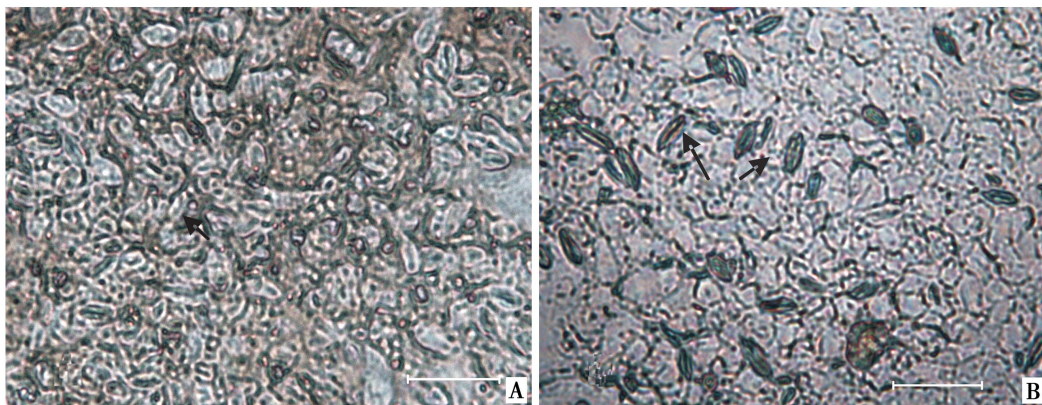


图 5 腹部脂肪体中 *L-Pichia* 原位杂交检测结果

Fig. 5 *In situ* hybridization detection of *L-Pichia* YLS in fat body

A: 没加探针的对照 CK without probe; B: 针对 *L-Pichia* 的特异性探针 L-Pic probe specific for *L-Pichia*. 标尺 Bar = 0.02 mm.

关于稻飞虱体内类酵母共生菌的种类的多样性至今未能明确。Kagayama 等 (1993) 通过卵块培养法, 结合 18S rDNA 酶切带型分析发现, 褐飞虱体内至少存在 7 种不同的酵母菌。陈法军等 (2006) 通过冷冻切片观察到稻飞虱体内类酵母菌存在多种形态, 据此推测飞虱体内酵母菌存在多样性。张珏锋等 (2007, 2009) 通过卵块培养的方法, 从褐飞虱体内分离纯化了一株与解脂假丝酵母 *Yarrowia lipolytica* 26S rDNA D1/D2 完全相似的酵母菌。本研究通过酵母菌 ITS 序列分析, 从灰飞虱体内鉴定了一株与季也蒙毕赤酵母高度同源的酵母菌, 且该菌随飞虱的卵进行世代传递。但是, 通过对季也蒙毕赤酵母与 *Noda* 菌在灰飞虱体内的相对含量比较发现 (数据未发表), *Noda* 菌的数量显著高于季也蒙毕赤酵母, 即 *Noda* 菌为灰飞虱体内的优势菌,

这可能是通过 18S rDNA 通用引物扩增飞虱体内类酵母共生菌基因组时, 只能获得 *Noda* 菌的原因。因此, 稻飞虱体内酵母共生菌除了 *Noda* 菌外, 尚存在其他种类的酵母菌。

参 考 文 献 (References)

- Chen CC, Cheng LL, Chen Kuan C, Hou RF, 1981. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. 1. Histological observations and population changes of the symbiote. *Z. Ang. Entomol.*, 91: 321 - 327.
- Chen FJ, Ceng M, Zhang JF, Chen LZ, Lu ZX, Ye GY, Yu XP, 2006. Morphological difference of the yeast-like endosymbiotes in adult planthoppers of *Nilaparvata lugens* (Stål), *Laodelphax striatellus* (Fallen) and *Sogatella furcifera* (Horvath). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 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]

- Cheng DJ, Hou RF, 2001. Histological observations on transovarial transmission of a yeast-like symbiote in *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera, Delphacidae). *Tissue and Cell*, 33(3): 273–279.
- Fukatsu T, Ishikama H, 1996. Phylogenetic position of yeast-like symbiote of *Hamiltonaphis styraci* (Homoptera, Aphididae) based on 18S rDNA sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 383–388.
- Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV, 2001. *In situ* hybridization for the identification of yeast-like organisms in tissue section. *Diagn. Mol. Pathol.*, 10(1): 15–23.
- Kagayama KI, Shiragami N, Nagamine T, Umehara T, Mitsui T, 1993. Isolation and classification of intracellular symbiotes from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, based on analysis of 18S-ribosomal DNA. *Journal of Pesticide Science*, 18(3): 231–237.
- Kisimoto R, 1989. Flexible diapause response to photoperiod of a laboratory selected line in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallen. *Applied Entomology and Zoology*, 24(1): 157–159.
- Lee YH, Hou RF, 1987. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *Insect Physiology*, 33: 851–860.
- Lin LW, Dong GK, Wang EG, 2001. Research and control practice on rice black-streaked dwarf virus-borne insects. *Entomological Knowledge*, 38(6): 426–428. [林凌伟, 董国堃, 汪恩国, 2001. 水稻黑条矮缩病传毒昆虫的防治实践与研究. 昆虫知识, 38(6): 426–428]
- Noda H, Kodama K, 1996. Phylogenetic position of yeast-like endosymbionts of anobiid beetles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1): 162–167
- Noda H, Nakashima N, Koizumi M, 1995. Phylogenetic position of yeast-like symbiotes of rice planthoppers based on partial 18S rDNA sequences. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(5): 639–646.
- Noda H, Omura T, 1992. Purification of yeast-like symbiotes of planthoppers. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 104–105.
- Sasaki T, Kawamura M, Ishikama H, 1996. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*; Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. *Insect Physiology*, 42(2): 125–129.
- Suh SO, Noda H, Blackwell M, 2001. Insect symbiosis: Derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. *Mol. Biol. Evol.*, 18(6): 995–1000.
- Suh SO, Spatafora JW, Ochiel GRS, Evans H, Blackwell M, 1998. Molecular phylogenetic study of a termite pathogen *Cordycepioides bisporus*. *Mycologia*, 90(4): 611–617.
- Sun DZ, Jiang L, Zhang YX, Cheng XN, Wang CM, Zhai HQ, Wan JM, 2006. Resistance to rice stripe virus in eight rice varieties. *Chin. J. Rice Sci.*, 20(2): 219–222. [孙黛珍, 江玲, 张迎信, 程遐年, 王春明, 瞿虎渠, 万建民, 2006. 8个水稻品种的条纹叶枯病的抗性特征. 中国水稻科学, 20(2): 219–222]
- Zhang JF, Chen JM, Chen FJ, Zheng XS, Chen LZ, Yu XP, 2009. The isolation of yeast-like-symbiotes in the brown planthopper and the sequences analysis of its 26S rDNA. *Scientia Agricultura Sinica*, 42(6): 2211–2216. [张珏锋, 陈建明, 陈法军, 郑许松, 陈列忠, 俞晓平, 2009. 褐飞虱内共生菌的分离及其26S rDNA部分序列分析. 中国农业科学, 42(6): 2211–2216]
- Zhang JF, 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]
- Zhou CY, Zhang XL, Wang GL, 2006. Several methods for yeast identification. *China Brewing*, (8): 51–54. [周春艳, 张秀玲, 王冠蕾, 2006. 酵母菌的5种鉴定方法. 中国酿造, (8): 51–54]

(责任编辑: 袁德成)