

褐飞虱内共生菌的分离及其 26S rDNA 部分序列分析

张珏锋, 陈建明, 陈法军, 郑许松, 陈列忠, 俞晓平

(浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

摘要:【目的】类酵母菌 (Yeast-Like-Symbiots, YLS) 是存在于褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål) 腹部的一种共生菌, 分离获得该共生菌的离体菌株, 并鉴定其种属, 对于研究褐飞虱致害性变异具有重要意义。【方法】首次运用卵块离体培养的方法、采用改进后的培养基配方, 从褐飞虱体内分离到两株共生菌。并运用分子生物学手段, 测定离体菌株 26 SrDNA D₁/D₂ 区域序列, 分析鉴定菌株种属。【结果】所得菌株与解脂假丝酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、嗜盐梗孢酵母 (*Sterigmatomyces halophilus*) 的序列相似性分别达到 100% 和 99.8%。【结论】证明褐飞虱体内类酵母共生菌可进行离体培养, 并可在人工培养基上存活。同时也验证了褐飞虱菌胞中存在不同种类的类酵母菌, 类酵母共生菌为混合物的推测。

关键词: 褐飞虱; 类酵母; 离体培养; 26SrDNA; 解脂假丝酵母; 嗜盐梗孢酵母

The Isolation of Yeast-Like-Symbiots in the Brown Planthopper and the Sequences Analysis of Its 26S rDNA

ZHANG Jue-feng, CHEN Jian-ming, CHEN Fa-jun, ZHENG Xu-song, CHEN Lie-zhong, YU Xiao-ping

(Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: 【Objective】Yeast-like-symbiots (YLS) is the kind of symbionts existing in the abdomen of brown planthopper (BPH), isolated and identified the yeast-like-symbiots of the brown planthopper is very important for studying the virulence variation of the BPH. 【Method】Two strains of YLS were isolated from eggs of BPH (*Nilaparvata lugens* Stål), and which were identified to species level with the 26S rDNA sequences. 【Result】The results showed the cultured strains belongs to the *Yarrowia lipolytica* and *Sterigmatomyces halophilus*. 【Conclusion】The symbiotes of BPH can be cultured *in vitro* and survived in artificial culture medium, and the YLS are the complex and which are composed with several different yeasts.

Key words: Brown planthopper; Yeast-like symbiots; culture *in vitro*; 26SrDNA; *Yarrowia lipolytica*; *Sterigmatomyces halophilus*

0 引言

【研究意义】褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål) 是亚洲最严重的水稻害虫之一, 主要通过吸食叶鞘部汁液对水稻直接产生伤害^[1]。利用水稻品种抗虫性是控制褐飞虱为害最为经济有效的方法, 但随着抗性品种的大面积种植, 田间褐飞虱的致害性会发生改变, 导致水稻品种抗性消失^[2-4]。类酵母菌 (yeast-like-symbiots, YLS) 是存在于褐飞虱腹部脂肪体内的一种共生菌, 该菌在褐飞虱体内甾醇类物质

代谢^[5]、氨基酸和维生素供给^[6-8]以及氮循环^[9-10]中起重要作用, 此外, 类酵母共生菌还能合成褐飞虱胚胎发育和胚后发育所需的蛋白质^[11]。褐飞虱及其体内共生菌之间存在相互适应、长期共存、互惠互利和协同进化的关系。共生菌遗传基因的易变性使其遗传背景容易发生变化或突变。在褐飞虱适应抗虫品种、形成新致害性种群的过程中, 共生菌的遗传物质可能已发生了变异。此种变异可能导致褐飞虱对水稻抗性品种致害性发生改变。因此, 在褐飞虱致害性变异过程中, 类酵母共生菌可能起着比寄主本身更为重要的作用^[12]。

收稿日期: 2008-04-17; 接受日期: 2008-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30470227), 浙江省自然科学基金项目 (Y305630, Y304400)

作者简介: 张珏锋 (1978—), 女, 浙江长兴人, 研究实习员, 研究方向为褐飞虱共生菌分子生物学。Tel: 0571-86404077; E-mail: zhangjuefeng@sina.com。通信作者俞晓平 (1963—), 男, 浙江杭州人, 研究员, 博士, 研究方向为有害生物综合治理。Tel: 0571-86404063; E-mail: yxp@cjl.u.edu.cn

随着生物技术的发展,提出了一种新的害虫防治思路媒介昆虫-共生菌技术(VIST)。由于共生菌类酵母菌属于单细胞生物,在进行基因工程改造时比对宿主昆虫进行操作要方便得多。因而,利用基因工程方法转化这些共生菌,降低其在宿主营养及生殖方面所起的作用,不仅可以降低褐飞虱的发生率,找出产生褐飞虱致害性的变化位点,而且可以减少植物病毒的传播。因此,明确褐飞虱体内共生类酵母菌的种类组成、种属发生地位至关重要。而目前仅仅明确类酵母菌属于子囊菌亚门(Pyrenomycetes)的假丝酵母属(*Candida*),更多信息的获得还需要对共生菌进行更详细地研究,最好的模式是对离体共生菌进行研究。

【前人研究进展】由于类酵母共生菌和宿主褐飞虱相互融合,采用分离宿主脂肪体细胞进行培养的方法很难排除来自虫体内环境的污染。昆虫体内类酵母共生菌的离体培养在褐飞虱^[13]和烟草窃蠹^[14]上曾有报道,但两者都采用解剖虫体进行培养的方法,且未对离体培养菌株进行鉴定。褐飞虱体内类酵母共生菌以卵母细胞垂直传递的方式直接传递给子代,因此在褐飞虱的卵块中包含了类酵母共生菌的全部遗传信息。本实验在褐飞虱卵块中观察到的类酵母菌形态种类与虫体腹部切片没有差异。【本研究切入点】本研究首次运用卵块离体培养法从褐飞虱体内分离出两株共生菌株,并运用分子生物学技术测定了培养菌株26S rDNA D1/D2区域的碱基序列,初步鉴定为类酵母菌株。【拟解决的关键问题】从包含虫体全部遗传信息的卵块中获得类酵母共生菌离体菌株,建立褐飞虱共生菌离体培养技术为转化类酵母共生菌遗传学背景,使其在与抗性水稻品种的互作中,遗传学背景不易发生变化,为延长抗性水稻品种的田间使用寿命等实验的进一步开展奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻品种 水稻品种 TN1 分批分期播种,两叶一心期移栽至水泥槽,分蘖拔节期移入钵钵中待用。

1.1.2 褐飞虱虫源 由中国水稻研究所提供,在浙江省农业科学院温室连续隔离饲养,温度 25~30℃,光照 12 h/d,相对湿度 80%~95%,用水稻品种 TN1 连续饲养 4 代后使用。

1.1.3 实验用试剂 Grace 昆虫细胞培养基(Invitrogen 公司);大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1 由(本实验室保存);酵母 DNA 提取试剂盒购自杭

州 X-gene 公司;克隆质粒 pUCm-T、Taq 聚合酶、IPTG、T₄DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司;X-Gal 购自 Sigma 公司;其余试剂均为进口或国产分析纯。PCR 引物由上海生工生物用品有限公司合成,序列如下: NL1:5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAGGAA AAG-3' NL4:5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'^[15]。

1.2 方法

1.2.1 共生菌的冷冻切片 取羽化 3 d 后的雌雄褐飞虱成虫各 5 头放置于事先放置了 60 日龄 TN1 水稻的纱笼内,20 个重复,5 d 后取稻苗,用无菌水冲洗后解剖取卵块;羽化 3 天后的褐飞虱雌雄虫各 30 头,解剖出腹部脂肪体。在卵块、解剖出的脂肪体上滴加少许冷冻切片包埋剂,放置于 Leica 冷冻切片机内冷冻 3~5 min,组织块表面修整后,进行切片,切片厚度约为 4~5 μm,展平的切片贴于载玻片后用苏木精-伊红染色、封固后进行形态检测。

1.2.2 培养基的配置 参考文献[15], Grace 昆虫细胞培养基按说明书配置,添加实验室前期实验筛选出的某些物质,按要求灭菌、待用。

1.2.3 共生菌的离体培养及其形态观察 解剖带卵 TN1 稻苗,取卵块,无菌水冲洗,数取 100 颗,表面消毒后,在-196℃液氮中研磨成粉状,并用无菌水配置成 10⁻¹ 的溶液,在每一平皿中加入配置好的溶液 1 ml,然后缓缓注入 9 ml 预先灭菌的培养基,摇匀,parafilm 膜封口,放入 25℃培养箱中观察并记录结果,对照平皿中加入 1 ml 无菌水。

1.2.4 DNA 微量提取 用接种环挑取少量旺盛生长的培养菌株,加入到 2 ml 配置好的液体培养基,25℃下 200 r/min 摇床培养 24~28 h,直至出现絮状物,DNA 的提取参照酵母 DNA 提取试剂盒说明。

1.2.5 PCR 扩增和测序 根据文献[16]的方法,用引物 NL1 和 NL4 PCR 扩增供试菌株 26S rDNA 近 5'端的 D1/D2 区域,95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min 20 s, 循环 36 次; 72℃ 8 min; 4℃ 保存。

1.2.6 克隆与筛选 PCR 产物的回收参照试剂盒说明,回收产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测回收效率,26 SrDNA 基因片段与克隆质粒 T-Vector 的连接(参照产品说明书),14℃连接过夜。连接产物转化 *E. coli* 感受态细胞后,涂于含有 Amp (100 μg·ml⁻¹)、IPTG (0.5 mmol·L⁻¹)、/X-gal (80 μg·ml⁻¹) 的 LB 平板上,倒置培养过夜。

1.2.7 重组质粒的筛选和鉴定 用灭菌牙签挑取阳

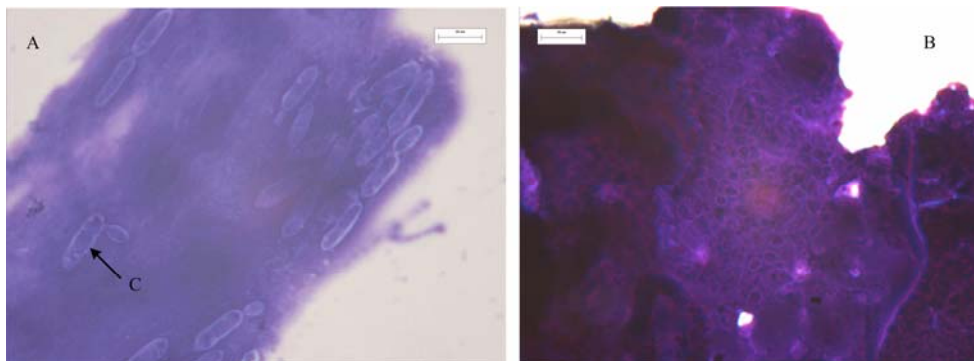
性克隆至 5 ml 的 LB 培养基 (含 $5 \mu\text{l}$ $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Amp) 中, 37°C 下 200 r/min 摇床培养 36 h。取 1.5 ml 的培养物用碱裂解法制备质粒 DNA, PCR 鉴定阳性克隆。

1.2.8 测序 将经 PCR 鉴定插有目的片段的重组克隆由上海博亚公司测序, 测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索, 然后采用 DNASTar 软件进行同源性分析, 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱体内共生菌的形态学观察

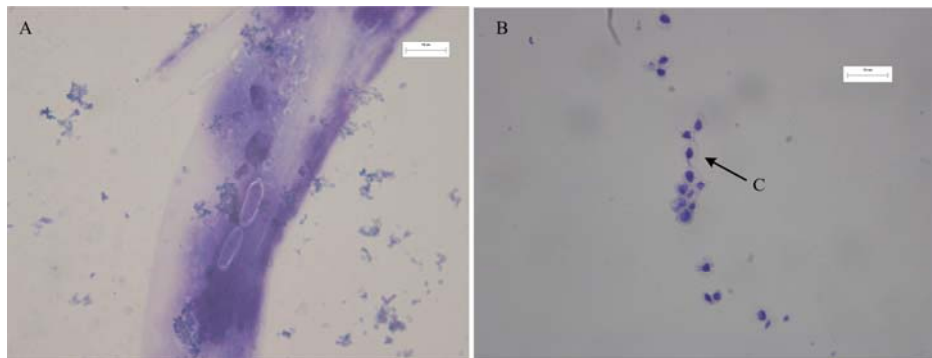
取供试虫体的腹部切片观察可以看到, 褐飞虱腹部的共生菌包裹在一个近似圆形的组织之内, 称之为菌胞, 褐飞虱体内的类酵母在形态上以卵圆形 (图 1-A)、不规则圆形 (图 1-B) 两种形态为主, 长度为 $2\sim 10 \mu\text{m}$, 宽度为 $0.5\sim 2 \mu\text{m}$, 多端芽殖, 出芽形成的单细胞连接形成假菌丝。从形态、大小上观察, 卵块与褐飞虱雌成虫脂肪体内的类酵母共生菌无明显差异。除图 1、图 2 所示两种主要形态之外, 褐飞虱体内类酵母共生菌还存在其它多种形态^[17]。



A: 卵圆形; B: 不规则圆形; C: 图中箭头所指为正在进行芽殖的共生菌
A: Characteristics of oval; B: Characteristics of irregular cycle; C: The budding of the YLS

图 1 褐飞虱雌成虫体内共生菌的形态

Fig. 1 Characteristics of the YLS of female adult of BPH



A: YLS-1 菌株的形态; B: YLS-2 菌株的形态; C: 箭头所指为假菌丝
A: Characteristics of the strains of YLS-1; B: Characteristics of the strains of YLS-2; C: *Pseudohypha*

图 2 培养菌株共生菌形态

Fig. 2 Characteristics of the cultured strains

2.2 培养菌落的形态学观察

卵块离体培养 30 h 后, 有白色、黄色两种菌落长

出, 前者菌落厚实、表面较湿润、平坦无皱褶, 边缘不规则, 在 $400\times$ 显微镜下观察, 细胞呈椭圆形, 接

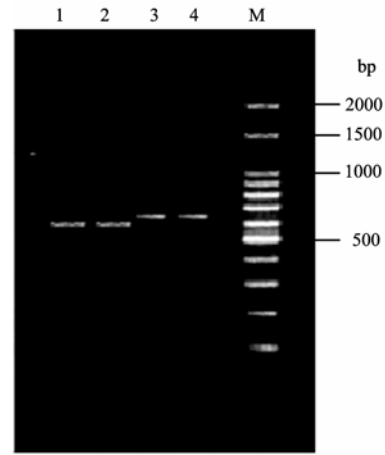
近于杆状，多端芽殖，长度为 8~10 μm，宽度为 0.5~2 μm 与图 1-A 中 YLS 在形态上相似。培养 3 d 后，细胞有自溶现象，慢慢呈细丝状，此菌株暂时命名为 YLS-1 号菌株（图 2）。后者呈土黄色，菌落厚实、呈豆腐渣状，表面不平整、较前者干燥，边缘不规则，在 400× 显微镜下观察，细胞呈不规则圆球状（图 2），与图 1-B 中 YLS 相似，长度为 2.5~4 μm，宽度为 2~4 μm，并且连接成串，形成假菌丝（图 2-B 中箭头所指），此菌株暂时命名为 YLS-2 号菌株。

2.3 PCR 扩增及测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示（图 3），从图中可知，YLS-1、YLS-2 菌株的 26S rDNA 片段大小略有差异，不过大小都在 600 bp 左右。

2.4 DNA 序列比较分析及系统树的构建

用校正后的供试菌株的 D1/D2 区域序列，在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索，以比较供试菌株与已知酵母菌相应序列的相似程度。为显示供试菌株与已知酵母菌的亲缘关系及其系统地位，根据同源序列搜索结果，下载相关酵母菌种的 26S rDNA D1/D2 区域序列（表），与供试菌株的序列放在一起，用 DNASTar 软件进行匹配排列，建立系统发生树。结果如图 4 所示，从虫体中分离的 YLS-1 共生酵母菌与解脂假丝酵母（*Candida lipolytica*）显示出较



1~2: YLS-1 菌株; 3~4: YLS-2 菌株; M: 标准分子量
1-2: YLS-1; 3-4: YLS-2; M: Marker

图 3 培养菌株 26SrDNA 片段扩增结果

Fig. 3 The results of PCR amplification for 26S rDNA sequences

近的亲缘关系，YLS-2 共生酵母菌与嗜盐梗孢酵母（*Sterigmatomyces halophilus*）显示出较近的亲缘关系，但从分子系统树上并未显示培养菌株与褐飞虱体内共生菌株 26S rDNA D1/D2 区序列之间有较近的亲缘关系。

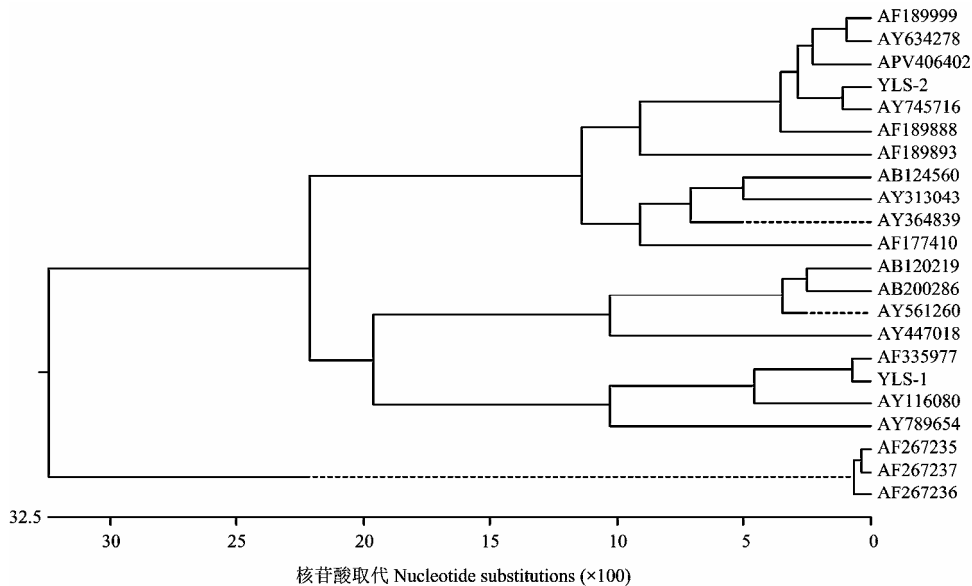


图 4 根据核苷酸序列构建的分子系统树

Fig. 4 Phylogenetic relationships of YLS in BPH based on DNA sequences

表 部分 26SrDNA 序列已知的真菌

Table List of the fungi whose 26SrDNA sequences were used for molecule phylogenetic analysis

序号 No.	接受号 Accession No.	分类学地位 Taxonomic status	序号 No.	接受号 Accession No.	分类学地位 Taxonomic status
1	AF335977	<i>Yarrowia lipolytica</i>	11	AF189888	<i>Bensingtonia ingoldii</i>
2	AY634278	<i>Agaricostilbum hyphaenes</i>	12	APU406402	<i>Agaricostilbum pulcherrimum</i>
3	AY789654	<i>Candida hispaniensis</i>	13	AF189893	<i>Bensingtonia naganensis</i>
4	AY561260	<i>Pichia falcaomoraisii</i>	14	AB124560	<i>Sporobolomyces diospyroris</i>
5	AB120219	<i>Candida krabiensis</i>	15	AY313043	<i>Sporobolomyces sp. TY-197</i>
6	AY447018	<i>Zygoascus hellenicus var. hellenicus</i>	16	AY364839	<i>Sporobolomyces clavatus</i>
7	AY116080	<i>Candida galli</i>	17	AF177410	<i>Kurtzmanomyces tardus</i>
8	AB200286	<i>Pichia thermomethanolica</i>	18	AF267235	YLS of <i>Laodelphax striatellus</i>
9	AY745716	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	19	AF267236	YLS of <i>Nilaparvata lugens</i>
10	AF189999	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	20	AF267237	YLS of <i>Sogatella furcifera</i>

3 讨论

由于寄主内环境与体外环境的差异, 长期以来的观点认为褐飞虱体内共生菌是难以离体培养的。Nasu 等^[13]从褐飞虱体内分离出两株菌株, 从形态上初步认定为类酵母共生菌。本实验在 Nasu 等实验的基础上, 创新性地采用卵块离体培养法, 培养得到在形态、大小上与虫体内主要菌株相似的菌株, 并且通过分子生物学手段鉴定为子囊菌亚门的解脂假丝酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 和担子菌亚门的嗜盐梗孢酵母 (*Sterigmatomyces halophilus*), 初步认定为褐飞虱体内类酵母共生菌离体菌株。但与褐飞虱体内的共生菌酵母菌在 26S rDNA D1/D2 区序列比对未显示出较近的亲缘关系。褐飞虱体内类酵母共生菌的传统分离方法是采用物理密度梯度离心法, Noda 等对离心所得菌株 18SrDNA 序列鉴定为子囊菌亚门 (Ascomycotina) 核菌纲 (Pyrenomycetes), 并与此纲中的 *H. chrysospermus* 亲缘关系最近^[18], 但采用该方法分离的前提是类酵母共生菌是由单一菌株组成。在核糖核酸酶实验中发现褐飞虱体内部分类酵母的 RNA 被消解而其它的则未被消解^[19]; 陈法军等^[17]采用冷冻切片结合显微摄影技术在褐飞虱雌成虫腹部观察到除卵圆形、不规则圆形两种主要形态之外, 还存在杆状、具假隔膜形、具假隔膜不规则形等多种其它形态; 据此推测: 在褐飞虱菌胞中存在不同种类的类酵母菌。由于采用离心法获得往往是共生菌的混合物, 因而笔者在将离体菌株与褐飞虱体内类酵母共生菌 26S rDNA D1/D2 区序列比对时未出现亲缘较近的现象。

共生关系研究的理想模式是: 参与共生的生物能够保存, 并能在分离的条件下分别进行研究; 共生系统可以由组成它的生物重新组合。只有在解决共生菌

的分离与纯化的前提下, 基本确定褐飞虱体内类酵母菌的种类组成, 才可实现对褐飞虱体内类酵母共生菌的改造。本实验采用的卵块离体培养保持了类酵母共生菌的全部遗传信息且避免了来自虫体内环境污染, 结果验证了褐飞虱菌胞中存在不同种类类酵母菌, 证明褐飞虱体内类酵母共生菌为混合物的推测。明确类酵母共生菌的种属发生地位为利用已在核酸序列数据库中公布的信息开展进一步的基因改造实验奠定了基础。如能转化类酵母共生菌内某些蛋白质的遗传学背景, 使其在抗性水稻品种的诱导下, 遗传学背景不易发生变化, 从而能使抗性水稻品种的田间使用寿命延长, 褐飞虱体内类酵母共生菌的离体培养为进一步开展实验提供了基础。

离体菌株保存于 4℃ 药品冷藏柜中, 每隔 40 d 转接一次, 6 个月之后 YLS-2 菌株嗜盐梗孢酵母出现菌种退化现象。主要表现为, 菌落生长速度减缓, 但镜检未发现形态、大小有明显变化。YLS-1 菌株解脂假丝酵母无明显退化现象, 处于进一步观察之中。由于类酵母共生菌与宿主互惠共生的关系, 离开宿主飞虱的类酵母菌株的长期保存有很大困难。同时, 离体菌株长期保存于人工培养基上, 其生理功能是否会产生变化也需进一步鉴定。此外, 如离体酵母菌的改造成功, 转化后的菌株如何返回回虫体; 返回虫体之后的菌株相关的功能是否可以表达等都是需要进一步解决的问题。

4 结论

采用卵块离体培养的方法可从褐飞虱体内分离出共生菌。分离出的两株共生菌株, 用分子生物学的方法初步鉴定为酵母菌株。初步证明: 褐飞虱体内的共生菌可以进行离体培养, 并可在人工合成培养基上

存活。

References

- [1] 李汝铎, 丁锦华, 胡国文, 苏德明. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社, 1996: 1-11.
- Li R D, Ding J H, Hu G W, Su D M. *Brown Planthopper and Its Management*. Shanghai: Fudan Press, 1996: 1-11. (in Chinese)
- [2] 张志涛, 陈伟, 姜人春. 稻褐飞虱致病性的转化. 昆虫学报, 1997, 40(增): 110-115.
- Zhang Z T, Chen W, Jiang R C. The virulence shift of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*(Stål) (Homoptera: Delphacidae) on different rice varieties. *Acta Entomologica Sinica*, 1997, 40(Suppl.): 110-115. (in Chinese)
- [3] 俞晓平. 白背飞虱和褐飞虱的生物型饲养. 植物保护, 1990, 16(4): 43-44.
- Yu X P. Rearing the biotypes of *Sogatella furcifera* and *Nilaparvata lugens*. *Plant Protection*, 1990, 16(4): 43-44. (in Chinese)
- [4] 苏昌潮, 程遐年, 翟虎渠. 水稻抗褐飞虱遗传和育种研究. 杂交水稻, 2003, 18(4): 1-6.
- Su C C, Cheng X N, Zhai H Q. Progress in studies on genetics of resistance to rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* stål) and breeding of resistant cultivars. *Hybrid Rice*, 2003, 18(4): 1-6. (in Chinese)
- [5] Hiroaki Noda, Yoko Koizumi. Sterol biosynthesis by symbiotes: cytochrome P450 sterol C-22 desaturase genes from yeastlike symbiotes of rice planthoppers and anobiid beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33: 649-658.
- [6] 傅强, 张志涛, 胡萃. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化. 昆虫学报, 2001, 44(4): 534-540.
- Fu Q, Zhang Z T, Hu C. The effects of high temperature on amino acid requirements both yeast-like symbionts and of *Nilaparvata lugens*. *Acta Entomologica Sinica*, 2001, 44(4): 534-540. (in Chinese)
- [7] Fu Q, Zhang Z T, Hu C. The differentiation of amino acid requirements in three host-related populations of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* stål. *Entomologica Sinica*, 2001, 8(4): 361-369.
- [8] 王国超, 傅强, 张志涛. 褐飞虱体内类酵母共生菌与氨基酸营养的关系. 昆虫学报, 2005, 48(4): 483-490.
- Wang G C, Fu Q, Zhang Z T. Relationship between yeast-like symbiotes and amino acid requirements in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48(3): 483-490. (in Chinese)
- [9] Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H. Nitrogen recycling in brown planthopper *Nilaparvata lugens*: involvement of yeast like endosymbionts in uric acid metabolism. *Journal of Insect Physiology*, 1996, 42(2): 125-129.
- [10] Hongoh Y, Ishikawa H. Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. *Zoological Society of Japan*, 1997, 14: 581-586.
- [11] Foissac X, Edwards M G, Du J P. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown planthopper; *Nilaparvata lugens*:Delphacidae)-identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 32: 967-978.
- [12] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响. 植物保护学报, 2001, 28(3): 193-197.
- Lü Z X, Yu X P, Chen J M. The effect of endosymbiote on the development and reproduction of brown planthopper *Nilaparvata lugens* stål. *Acta phytophylacica Sinica*, 2001, 28(3): 193-197. (in Chinese)
- [13] Nasu Socho, Takaaki Kusumi, Yoshihide Suwa. Symbiotes of Planthopper: II. Isolation of intracellular symbiotic microorganisms from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, and immunological comparison of the symbiotes associated with rice planthoppers (Hemiptera:Delphacidae). *Applied Entomology & Zoology*, 1981, 16(2): 88-93.
- [14] Hiroaki Noda, Kentaro Kodama. Phylogenetic position of yeastlike endosymbionts of anobiid beetles. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(1): 162-167.
- [15] Grace T D C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 1962, 195: 788-789.
- [16] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
- Bai F Y, Jia J H, Liang H Y. Molecular taxonomic study on the problematic candida strains based on 26S rDNAD1/D2 domain sequence comparison. *Mycosystema*, 2002, 21(1): 27-32. (in Chinese)
- [17] 陈法军, 张珏锋. 褐飞虱体内酵母类共生菌的形态观察. 动物分类学报, 2006, 31(1): 55-62.
- Chen F J, Zhang J F. Morphological observation on the yeast-like endosymbiotes in brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2006, 31(1): 55-62. (in Chinese)
- [18] Noda H, Nakashima N, Koizumi M. Phylogenetic position of yeast-like symbiotes of rice planthoppers based on partial 18S rDNA sequences. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 25(5): 639-646.
- [19] Noda H. Histological and histochemical observation of intracellular yeast like symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Applied Entomology & Zoology*, 1977, 12(2): 134-141.

(责任编辑 王红艳)