

分类号: S186

单位代码: 10335

密 级:

学 号: 10716084

浙江大学

博士学位论文



中文题目: 水稻-褐飞虱-天敌三者之间体内细菌群落的相互关系研究

英文题目: Relationship of bacteria community between rice plants, brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, and its natural enemies

申请人姓名 徐红星

指导教师 叶恭银 教授

吕仲贤 研究员

学科(专业) 环境生物学

所在学院 农业与生物技术学院

提交日期 二〇一四年五月

水稻-褐飞虱-天敌三者之间体内细菌群落的相互关系研究



论文作者签名:_____

指导教师签名:_____

论文评阅人: _____ 隐名评阅

答辩委员会主席: 刘树生 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 1: 冯明光 教授 博导 浙江大学生命科学学院

委员 2: 姜永根 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 3: 王晓伟 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 4: 陈学新 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 5: 叶恭银 教授 博导 浙江大学农业与生物技术学院

委员 6: 吕仲贤 研究员 博导 浙江省农业科学院

答辩日期: 2014 年 6 月 5 日

Relationship of bacteria community between rice plants,
brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål
and its natural enemies

Author's signature: _____

Supervisor's signature: _____

Examining Committee Chairperson:

Prof. Liu Shu-sheng Zhejiang University

Examining Committee Members:

Prof. Feng Ming-guang Zhejiang University

Prof. Lou Yon-geng Zhejiang University

Prof. Wang Xiao-wei Zhejiang University

Prof. Chen Xue-xin Zhejiang University

Prof. Ye Gong-yin Zhejiang University

Prof. Lu Zhong-xian Zhejiang Academy of Agricultural Sciences

Date of oral defence: 5 June, 2014

浙江大学研究生学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的
研究成果。除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发
表或撰写过的研究成果，也不包含为获得 浙江大学 或其他教育机构的学位或
证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文
中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：

签字日期：

年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 浙江大学 有权保留并向国家有关部门或机构
送交本论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权 浙江大学 可
以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索和传播，可以采用影印、
缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名：

导师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

本研究承蒙

国家重大基础研究发展计划（973）

“稻飞虱成灾机理与可持续治理基础研究”

（编号：2010CB126202）

浙江省重大科技专项（优先主题）项目

（编号：2011C12022）

资助

致 谢

终于开始写这一段文字了，说明我的论文总算“熬”出来了。回首这几年读博的日子，思绪万千却又好象不知道从哪说起，因为我需要感谢的人及需要感谢的事真的很多。

首先，最需要感谢的是两位导师。本论文是在叶恭银教授和吕仲贤研究员的悉心指导下完成的，从论文的选题、试验的设计，到结果分析和论文的撰写，每一个环节都倾注了两位导师大量的心血。两位导师渊博的知识、敏捷的科研思路、严谨的治学态度、勤勉敬业的工作作风、宽厚待人的风范都使我终身难忘，并永远受益。值此论文完成之际，谨向两位导师致以崇高的敬意和衷心的感谢！

在读博的过程中，得到了浙江大学昆虫科学研究所程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、祝增荣教授、娄永根教授、蒋明星教授、沈志诚教授、施祖华教授、唐起义教授、莫建初教授、姚洪渭副教授和时敏副教授等予以的关心、指导和帮助，感谢他们使我得以顺利地完博士研究生阶段的学习。

感谢郑许松、杨亚军、高广春、张珏锋、金亚南、赵启超、王保菊、刘淑平、王新、朱平阳、罗定、郭文卿、何晓婵、何晶晶、董必琴、于莹、刘凯、汪庚伟、李向冬、吴志红和梁齐以及方琦、郭建洋、陈洋、田俊策、汪芳、卢增斌、程璐、朱宇、徐刚、韩乃顺、夏仁英、王飞、齐易香、宁铎、严智超、腾子云、巨青松和刘洋等同事、朋友和同学们在工作、学习和生活上给予的关心和无私的帮助。

学院研究生科老师们以及浙江省农科院人事处、植微所领导和同事们的关心和大力支持，在此一并感谢。

感谢我的爱人陈晓云和女儿徐陈珂，你们的理解、包容和鼓励，给予我坚持完成论文的不懈动力。

最后，再次感谢所有给我以关心、帮助、爱护的老师、亲人、同学和朋友们。同时向参加论文评阅及答辩的各位专家致以诚挚的谢意！

徐红星

2014年6月于杭州

摘 要

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 属迁飞性昆虫, 是我国稻区为害最严重的水稻害虫之一。它暴发频率高、危害发生面积大, 导致水稻产量损失十分惨重。在褐飞虱的综合防治体系中, 抗虫品种的利用已被证明为一种防治褐飞虱最安全、经济、有效的措施。然而, 抗性品种的应用可导致田间褐飞虱种群发生致害性变异。研究褐飞虱致害性变异机理和种群爆发机制, 对于褐飞虱的防控具有重要意义。本文利用多种方法分析了水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的种类及群落特性, 并较深入地研究了褐飞虱体内共生细菌在其适应不同抗性品种过程中的数量变化, 并探索了水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的体外培养。取得以下主要研究结果:

1. 应用变性梯度凝胶电泳 (Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 分析了水稻、褐飞虱和天敌体内细菌的群落结构。结果表明, 褐飞虱与水稻植株、天敌稻虱缨小蜂和黑肩绿盲蝽体内存在丰富的细菌种群, 水稻-褐飞虱-天敌之间有部分相同的条带, 即相同的细菌种类, 但更多的是不同的种类, 尤其是优势种类几乎完全不一样。褐飞虱 1 龄~5 龄若虫体内细菌的菌群结构随其生长发育发生较明显的变化, 而羽化后的成虫与 1 龄若虫之间具有较高的菌群结构相似性。9 个地理种群褐飞虱根据其体内细菌的 DGGE 图谱的聚类分析结果可分为 3 组, 菲律宾单独一组, 泰国海南、云南和浙江种群为一组, 越南、广西、湖南和江西种群为一组, 但是该结果还有待进一步与褐飞虱的系统发育信息进行验证。取食感虫品种的 TN1 种群褐飞虱体内细菌的群落结构相似, 与取食抗虫品种的 ASD7 种群和 Mudgo 种群之间具有较明显的差异, 但取食不同抗虫水稻品种的褐飞虱还未能得到有效区分。从菌群结构上, 通过 DGGE 的方法可以明显区分出水稻植株、褐飞虱及其天敌体内的细菌。

2. 设计了 5 种共生菌的特异性引物, 通过荧光定量 PCR 测定了三个致害性种群褐飞虱体内 5 种共生菌的数量及其在适应不同抗性品种过程中的变化。结果表明, 其中 *Chryseobacterium* 在三个种群褐飞虱体内均为优势菌, 占一半以上。在 TN1 种群中 *Acinetobacter* 含量仅次于 *Chryseobacterium*, 其它三种共生菌数量无显

著差异。Mudgo 种群中除 *Chryseobactium* 以外, *Arsenophonus* 和 *Serratia* 次之, 数量相近, 但与其它两种共生菌数量无显著性差异。当 TN1 种群褐飞虱转移到 ASD7 上之后, 优势菌仍为 *Chryseobactium*, 但原来仅次于 *Chryseobactium* 的 *Acinetobacter* 数量下降至与其它几种共生菌无显著性差异。而当被转移到 Mudgo 上之后, *Serratia* 和 *Arsenophonus* 显著增加, 取代 *Chryseobactium* 成为优势菌, 但在饲养 2 代之后, 显著下降至与其它 3 种共生菌无显著性差异。当适应抗性品种的 ASD7 和 Mudgo 种群褐飞虱转移到感虫品种 TN1 上后, ASD7 种群褐飞虱体内共生菌菌群结构无显著的变化。而 Mudgo 种群褐飞虱体内 *Acinetobacter* 和 *Arthrobacter* 数量短暂上升, 2 代之后恢复到原来的水平。当已分别适应抗虫品种 Mudgo 褐飞虱种群转移到 ASD7 水稻植株上, 其体内各共生菌数量有一定的波动, 但菌群结构变化不大。而 ASD7 种群转移到 Mudgo 水稻植株上之后, 菌群结构发生显著性的变化, *Serratia* 和 *Arsenophonus* 显著增加, 取代 *Chryseobactium* 成为优势菌, 尽管 1 代之后 *Serratia* 和 *Arsenophonus* 数量显著下降, 但仍然高于 *Chryseobactium*。

3. 使用Illumina的MiSeq测序仪, 对水稻 (TN1、ASD7和Mudgo)、褐飞虱 (TN1、ASD7和Mudgo种群) 及天敌 (稻虱缨小蜂、黑肩绿盲蝽) 体内细菌16S rRNA的高变区PCR产物进行双端测序, 并根据测序结果进行各样品体内细菌多样性分析以及各样品之间的比较分析等。共得到reads 804,306条, 平均每个样品的reads数目为100,538.3条, 拼接得到的reads平均有效长度为249.9 bp。对每个样品的reads数目进行统计, 并根据97%相似性将序列聚类成为OTUs, 从属于同一OTU的一组中取1条代表性的序列用于下游的物种注释分析。总共检测到321种细菌, 其中TN1、ASD7和Mudgo水稻植株中分别为165、147和118种; 褐飞虱TN1、ASD7和Mudgo种群分别为151、166和175种; 稻虱缨小蜂和黑肩绿盲蝽分别为219和222种, 其中三个褐飞虱种群、两种天敌体内细菌群落构成上比较相似, 而均与水稻体内细菌群落结果差异较大。在已报道稻飞虱共生细菌中, *Arthrobacter*、*Chryseobacterium*、*Wolbachia*、*Arsenophonus*和*Acinetobacter*在三个水稻品种、三个致害性种群褐飞虱和两种天敌体内均检测到, *Serratia*除TN1和Mudgo植株体内未检测到外, 在ASD7植株、褐飞虱和天敌体内均存在。另外烟粉虱共生细菌

*Rickettsia*在所有样品中均存在，而在黑肩绿盲蝽体内检测到蚜虫体内共生菌 *Buchnera*。

4. 通过在培养基中增加复苏促进因子Rpf，分别对水稻(TN1)、褐飞虱(TN1种群)和天敌(黑肩绿盲蝽)体内细菌进行离体培养，共分离鉴定出细菌种类为：水稻6种、飞虱9种(其中2个菌株同属*Enterobacter symbiont*)和黑肩绿盲蝽4种。*Enterobacter symbiont*可稳定继代培养。

关键词：共生细菌；细菌群落结构；抗性水稻品种；褐飞虱；致害性种群；天敌；黑肩绿盲蝽；稻虱缨小蜂；水平传播；变性梯度凝胶电泳；实时荧光定量 PCR；高通量测序；离体培养

Abstract

The brown planthopper (BPH) *Nilaparvata lugens* (Stål), characterized by its seasonal migration and r-strategy life pattern, has emerged as one of the most serious insect pests affecting rice in China in recent decades. In the integrated management of BPH, the utilization of resistant varieties has been proven to be the safest, most economical and effective measure for controlling BPH. However, application of resistant varieties can induce variation in virulence of BPH populations in the field. Studies on the mechanism of change of virulence of BPH are to provide a foundation for management of BPH. Therefore the relationship of bacterial community in rice plants, BPH and its natural enemies was investigated by using several different methods, and the isolation of bacteria in rice plants, BPH and its predator *Cyrtorhinus lividipennis* *in vitro* were also exposed. The main results are as follows:

1. The structures of bacterial community in different geographic and varietal resistance virulent populations of BPH were analyzed by using denatured gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that the bacterial community in BPH nymph from 1st to 5th instars varied with nymphal growth and development, and the bacterial community in 1st instar BPH nymph was similar with those in adults. Nine geographic BPH populations were obviously divided into three groups based on the cluster analysis of DGGE fingerprint. The first group BPH was only from the Philippines, the second group was from Thailand and the provinces of Hainan, Yunnan and Zhejiang of China, and the third group was from Vietnam and the provinces of Guangxi, Hunan, and Jiangxi of China. BPH populations adapted to different resistant rice varieties, Mudgo (with resistant gene Bph1) and ASD7 (with resistant gene bph2), has similar bacterial community, which was different with those fed on susceptible rice variety, TN1. According the cluster analysis of DGGE profiles of 16S rDNA gene fragments of bacteria, there were significant difference among the bacteria communities of different rice varieties, BPH populations with different virulence and natural enemies

2. The specific primers of five species of endosymbiotic bacteria were designed to determine their numbers in three virulent populations of brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, and to assess changes during adaptation to different resistant varieties using fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR). The results showed that *Chryseobacterium* was the dominant bacteria, accounting for more than half of the total bacteria in all three populations of BPH. In the TN1 population, *Acinetobacter* ranked next to *Chryseobacterium*. There was no significant difference between the numbers of three other endosymbiotic bacteria species. In the Mudgo population, *Arsenophonus* and *Serratia* ranked next to *Chryseobacterium* with similar numbers, and they were not significantly different from two other endosymbiotic bacteria. While in the ASD7 population, *Arthrobacter* and *Acinetobacter* ranked next to *Chryseobacterium*, and all four species of endosymbiotic bacteria were significantly lower than *Chryseobacterium*. When the TN1 population of BPH was transferred to ASD7 (with resistant gene bph2) rice plants, *Chryseobacterium* was still the dominant bacteria, but the originally subdominant *Acinetobacter* declined to a level that was not significantly different from that of other endosymbiotic bacteria. After they were transferred to Mudgo (with resistant gene Bph1), *Serratia* and *Arsenophonus* increased significantly and became the dominant bacteria, replacing *Chryseobacterium*. However, after feeding on Mudgo rice plants for two generations they declined to a level that was not significantly different from that of the three other species. When ASD7 and Mudgo populations of BPH were transferred to the susceptible variety, TN1, the structure of endosymbiotic bacteria in the ASD7 population of BPH showed no significant changes. However, the numbers of *Acinetobacter* and *Arthrobacter* in the Mudgo population of BPH exhibited a transient increase and returned to their original levels after two generations. After the Mudgo population of BPH was transferred to ASD7 rice plants, the quantity of endosymbiotic bacteria fluctuated, but the bacterial structure did not change significantly. However, after the ASD7 population of BPH was transferred to the Mudgo rice plants, the

bacterial structure changed significantly. *Serratia* and *Arsenophonus* increased significantly and became dominant, replacing *Chryseobacterium*. Although the numbers of *Serratia* and *Arsenophonus* decreased significantly after a generation, they were still greater than *Chryseobacterium*. It was presumed that *Chryseobacterium* was dominant in all three populations of virulent BPHs, but had no significant effect on virulence variation of BPH. However, *Serratia* and *Arsenophonus* might be correlated with virulence variation of BPH.

3. To explore the horizontal transmission of bacterium between host plant (rice), herbivorous insects (brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens*) and natural enemies, bacterium species in rice plants (BPH susceptible variety TN1, resistant varieties ASD7 with resistance gene *bph2* and Mudgo with resistance gene *Bph1*), related BPH reared on these three varieties which was named as TN1, ASD7 and Mudgo population, respectively and natural enemies (egg parasitoid *Anagrus nilaparvatae* and predator *Cyrtorhinus lividipennis*) were analyzed using Illumina sequencing technology. There were 100,538.3 reads sequenced from each sample on average and average effective length of these reads was 249.9 bp. Based on sequence clustering at 97% similarity level, all reads from each sample were grouped into different operational taxonomic units (OTUs) and one of representative sequences was choose to species analysis. Totally, 321 kinds of bacteria were detected from all samples. There were 165, 147 and 118 kinds in TN1, ASD7 and Mudgo rice plants, 151, 166 and 175 kinds in TN1, ASD7 and Mudgo populations of BPH, respectively. Numbers of bacterial kinds in *Anagrus nilaparvatae* and *Cyrtorhinus lividipennis* were 219 and 222, which were higher than those in rice plants and BPH. Both of the results of principal coordinate analysis (PCoA) and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) showed that bacterial flora composition within different BPH populations and their natural enemies were very similar, however, they differed from those in rice plants. Five genuses, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Wolbachia*, *Arsenophonus* and *Acinetobacter*, reported as symbiotic bacteria in BPH,

were also found in all three rice varieties, three BPH populations and two natural enemies. *Serratia* was similar except it was not detected in TN1 and Mudgo rice plants. *Rickettsia* which was usually reported as one of secondary endosymbionts in *Bemisia tabaci* also existed in all detected samples. *Buchnera*, the primary endosymbiont of aphids, was only found in predator *Cyrtorhinus lividipennis*. These preliminary results indicated that horizontal transmission of bacterium does exist among host plants, herbivorous insects and natural enemies. Much more studies are needed to find further evidences.

4. Bacteria in TN1 rice plants, TN1 population BPH and its predator *Cyrtorhinus lividipennis* were isolated in vitro with resuscitation promoting factor (Rpf) in medium and molecular characterized. Six species from TN1 rice plants, 9 species from TN1 population BPH and 4 species from predator *Cyrtorhinus lividipennis* were identified according the sequence of 16S rDNA of each strain. Only two strains of *Enterobacter* endosymbiont were isolated from TN1 population BPH and they could grow well in subculture.

Key words: endosymbiont bacteria; bacteria community; brown planthopper (BPH); *Nilaparvata lugens*; virulent to resistant varieties; natural enemy; *Cyrtorhinus lividipennis*; *Anagrus nilaparvatae*; horizontal transmission; Denatured gradient gel electrophoresis (DGGE); fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR); High-throughput sequencing technology; Isolation in vitro

目 录

摘 要 I

AbstractIV

目 录 VIII

第一章 文献综述 1

1.1 共生菌分类 1

1.2 昆虫体内共生菌与宿主的关系 2

1.2.1 昆虫体内共生菌在寄主防御中的作用 3

1.2.1.1 抗病原真菌作用 3

1.2.1.2 抗寄生蜂作用 3

1.2.1.3 抗捕食作用 4

1.2.1.4 共生菌介导的防御作用机制 4

1.2.2 昆虫体内共生菌在其适应寄主植物过程中的作用 5

1.2.2.1 昆虫对寄主植物的适应性 6

1.2.2.2 共生菌在昆虫适应寄主植物过程中的作用 6

1.2.2.3 共生菌介导的寄主植物适应的可能机制 8

1.2.3 昆虫体内共生菌对昆虫的其它影响 8

1.2.3.1 对非生物环境的适应 8

1.2.3.2 对昆虫种群数量的调节 9

1.2.3.3 对昆虫体色的调节 10

1.2.3.4 对昆虫传播病毒病的影响 10

1.3 节肢动物和微生物间的进化适应 11

1.3.1 初生共生菌 12

1.3.2 次生共生菌 14

1.3.3 必需共生菌 14

1.4 共生菌的培养 15

1.4.1 微生物多样性与共生菌培养 15

1.4.2 共生菌难培养的原因 16

1.5 稻飞虱及其体内共生菌 16

1.5.1 稻飞虱及其危害 16

1.5.2 稻飞虱体内的共生菌 17

1.5.2.1 类酵母共生菌 17

1.5.2.2 共生细菌 19

1.6 小结与展望21

1.7 立题依据22

第二章 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的 DGGE 解析24

2.1 材料与方法25

 2.1.1 材料25

 2.1.1.1 水稻品种25

 2.1.1.2 褐飞虱25

 2.1.1.3 稻虱缨小蜂25

 2.1.1.4 黑肩绿盲蝽26

 2.1.1.5 引物26

 2.1.2 方法26

 2.1.2.1 基因组总 DNA 的提取26

 2.1.2.2 16S rDNA V3 区域的 PCR 扩增26

 2.1.2.3 变性梯度凝胶电泳（DGGE）27

2.2 结果与分析27

 2.2.1 不同龄期褐飞虱体内共生细菌的比较27

 2.2.2 不同地理种群褐飞虱体内细菌菌群结构的比较29

 2.2.3 不同致害性的褐飞虱体内细菌菌群结构的差异31

 2.2.4 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌菌群结构的比较33

2.3 讨论33

第三章 褐飞虱适应抗性品种过程中体内共生细菌的变化37

3.1 材料与方法38

 3.1.1 材料38

 3.1.1.1 水稻品种38

 3.1.1.2 褐飞虱38

 3.1.1.3 稻虱缨小蜂38

 3.1.1.4 黑肩绿盲蝽39

 3.1.2 方法39

 3.1.2.1 基因组 DNA 提取39

 3.1.2.2 引物设计与合成39

 3.1.2.3 qRT-PCR 测定不同共生菌的变化39

3.2 结果与分析41

 3.2.1 三个致害性种群褐飞虱共生菌组成及优势菌41

 3.2.2 TN1 种群适应抗虫品种 ASD7 和 Mudgo 过程中体内共生菌的变化 ..42

3.2.3 ASD7 和 Mudgo 种群转移到感虫品种 TN1 上体内共生菌的变化42

3.2.4 ASD7 和 Mudgo 种群在适应抗虫品种过程中体内共生菌的变化43

3.3 讨论44

第四章 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的同源性分析46

4.1 材料与方法47

4.1.1 材料47

4.1.1.1 水稻品种47

4.1.1.2 褐飞虱47

4.1.1.3 稻虱缨小蜂47

4.1.1.4 黑肩绿盲蝽47

4.1.2 方法48

4.1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取48

4.1.2.2 16S rDNA V4 区域的 PCR 扩增48

4.2 结果与分析49

4.2.1 测序质量49

4.2.2 物种注释50

4.2.3 主成份分析51

4.2.4 水稻-褐飞虱-天敌体内共生菌的分析53

4.3 讨论54

第五章 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的培养56

5.1 材料和方法56

5.1.1 材料56

5.1.1.1 水稻品种56

5.1.1.2 褐飞虱57

5.1.1.3 黑肩绿盲蝽57

5.1.1.4 基础培养基和 Rpf.....57

5.1.2 方法57

5.1.2.1 水稻植株上内生菌的培养57

5.1.2.2 褐飞虱和黑肩绿盲蝽体内细菌的培养58

5.1.2.3 培养细菌的分离58

5.1.2.4 培养菌株的鉴定58

5.2 结果与分析59

5.2.1 Rpf 促进细菌生长的效果59

5.2.2 培养菌株的鉴定59

5.2.2.1 PCR 扩增结果59

5.2.2.2 菌株鉴定结果60

5.3 讨论62

第六章 全文总结与今后研究64

参考文献67

附录 攻读博士学位期间已发表的论文和授权发明专利81

第一章 文献综述

在长期协同进化过程中,昆虫与其体内共生菌(endosymbiont)形成了密切的共生关系,共生菌与宿主相互依赖、相互影响、协同进化(Baumann *et al.*, 1995)。共生菌为宿主昆虫合成其食物中缺乏的某些重要营养成分,以弥补其不足,昆虫则为共生菌提供了稳定的生境和营养(谭周进等, 2005a; 王国超等, 2005a; Moran, 2006)。此外,昆虫次生共生菌不仅在昆虫对植物的适应和利用、寄主昆虫的竞争能力以及传播植物病毒等方面具有重要作用(Wilkinson *et al.*, 2001; Zchori-Fein and Brown, 2002; Oliver *et al.*, 2005; 徐红星等, 2009b),而且还与寄主的抗逆性尤其是防御寄生蜂寄生有关(Montllor *et al.*, 2002; Oliver *et al.*, 2005; Haine, 2008)。国内外有关共生菌的特点、在寄主体内的分布、数量变化以及功能等有较多的综述(薛宝燕等, 2004; 谭周进等, 2005a; 王国超等, 2005b; Moran, 2006)。

1.1 共生菌分类

共生菌在昆虫体内的位置和形式因昆虫的种类而不同。共生细菌多存在于蜚蠊目、等翅目、半翅目、虱目、食毛目、鞘翅目和双翅目等昆虫体内;放线菌生活在吸血蝽、欧洲狼蜂等昆虫体内;酵母菌常存在于蜚蠊和白蚁中(王荫长, 1994)、稻飞虱、蚜虫、烟草甲和药材甲等半翅目和鞘翅目昆虫体内存在多种类酵母菌(Noda *et al.*, 1995; 吕仲贤等, 2001a; 苗雪霞等, 2003)。*Wolbachia* 是节肢动物体内发现的一种共生细菌,是迄今为止已知的最为广泛存在的胞内共生菌之一,稻飞虱中也有这种细菌(严健等, 2000; 廖珊等, 2001)。

根据不同的分类依据,昆虫体内的共生菌可分为不同的类群(表 1.1)。根据共生菌在寄主中所处的空间,共生菌可分为体外共生、体表共生和体内共生菌。根据其在寄主体内所处位置,又可分细胞外共生菌、细胞内共生菌。根据分类地位,其又可分为共生酵母菌、细菌和放线菌。根据传播途径,其又可分为垂直传播和水平传播。根据其与寄主的进化关系,又可被分为初生共生菌和次生共生菌。

通常多种共生菌存在于同一个寄主体内，多数为 1-2 种初生共生菌和几种次生共生菌。

表 1.1 共生菌的分类
Table 1.1 Taxonomy of endosymbiont

依据	分类
空间关系	体外共生、体表共生和体内共生菌
所处位置	细胞外共生菌、细胞内共生菌
分类地位	共生酵母菌、细菌和放线菌
传播途径	垂直传播、 水平传播
与寄主的进化关系	初生共生菌、次生共生菌

1.2 昆虫体内共生菌与宿主的关系

根据其生物学和进化史，昆虫内共生菌可以分为两类，初生共生菌和次生共生菌（Dale and Moran, 2006）。初生共生菌主要与寄主的存活和繁殖有关，进行严格的垂直传播。例如蚜虫内共生菌 *Buchunera aphidicola*，能提供给蚜虫必须的营养。次生共生菌主要与寄主的适应性有关，如提高寄主的存活率和繁殖量，通过低水平的水平传播就能在新的寄主体内定殖，有时也能进行垂直传播（Hurst *et al.*, 1999）。次生共生菌对寄主适应性的影响与环境有关，在一种环境中它们是有利的而在另一种环境中可能是有害的。这可能就是一些节肢动物适应于次生共生菌的侵染，而另一些则不能适应的主要原因（Montllor *et al.*, 2002）。

许多昆虫依靠共生菌合成必需的营养物质来弥补其食物中营养的不平衡。例如半翅目昆虫本身没有合成胆固醇、必需氨基酸和维生素的能力，而它们所吸取的植物汁液营养成分较少且不均衡，C/N 比高、脂类和维生素含量低（Wilkinson *et al.*, 2001），故一些学者认为这些营养的供给可能与半翅目昆虫体内的共生菌有关（吕仲贤等, 2001b; 王国超等, 2005）。水稻主要害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 体内的类酵母共生菌能提供高活性的尿酸酶，从而利用寄主的代谢废弃物（尿酸）合成褐飞虱生长发育所必需的氨基酸（Sasaki *et al.*, 1996）。缺少共生菌的褐飞

虱若虫发育历期延长,若虫存活率、雌成虫体重和产卵量等均低于正常的褐飞虱,并且共生菌与褐飞虱抗性品种的适应性有关,从而影响不同致害性种群的形成(吕仲贤等, 2001b)。昆虫体内共生菌不仅能合成宿主所需要的氨基酸、胆固醇、共生素蛋白和其它营养物质,提供宿主分解寄主植物细胞壁的酶,还可以对宿主所吸取的植物次生物质进行解毒作用,同时参与宿主的氮素循环,并将宿主的含氮废弃物转化为固醇类等营养物质,这在半翅目昆虫的营养利用和新陈代谢中具有特别重要的意义(Dauglas, 1998; Wilkinson *et al.*, 2001)。

1.2.1 昆虫体内共生菌在寄主防御中的作用

1.2.1.1 抗病原真菌作用

共生菌具有抵御病原菌的作用,有证据表明,这种保护作用存在于不同的节肢动物中,如虾、龙虾、蚜虫和蚊子等。白蚁的共生细菌具有氧化还原的能力,能抑制外来病原微生物的入侵(Oliver *et al.*, 2003)。蚜虫共生菌 *Regiella insecticola* 在其抗病原真菌 *Pandora neoaphidis* 中起主要作用,提高了蚜虫的适应性。通过人工注射的方法使桃蚜五个缺次生共生菌的种群只感染共生菌 *R. insecticola*, 几代之后发现这五个种群在感染病原真菌 *P. neoaphidis* 时的存活率均显著提高,而且能减少蚜虫死尸上真菌孢子的形成,从而降低病原菌在蚜虫之间的传染(Scarborough *et al.*, 2005)。雌性欧洲狼蜂 *Philanthus triangulum* 会利用其触角中的共生菌(*Streptomyces*)来保护幼虫免受致病真菌的侵害。雌性欧洲狼蜂在封闭蜂房前用触角将共生于触角中的链霉菌运到孵卵蜂房顶部,如果除去这些菌,会增加真菌侵害的发生率和幼虫的死亡率,这表明共生菌产生的抗生素可以抵御致病真菌的侵害(Ferrari *et al.*, 2004)。类似的还有切叶蚁 *Acromyrmex* 和 *Atta* (Kaltenpoth *et al.*, 2005)。

1.2.1.2 抗寄生蜂作用

共生菌除了具有抗病原微生物的作用外,也具有抵御寄生蜂寄生的作用。Falabella 等(2000)认为蚜茧蜂幼虫的生长发育与蚜虫体内共生细菌的功能有密

切联系。Cloutier (2003) 报道被蚜茧蜂寄生过的豌豆蚜体内所含共生菌胞的数量和生物量均有所提高。豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 体内的两种共生菌 *Serratia symbiotica* 和 *Hamiltonella defensa* 与其抵御寄生蜂 *Aphidius ervi* 和 *Aphidius eadyi* 有关 (Gil-Turnes and Fenical, 1992; Oliver *et al.*, 2005), 蚜虫的寄生率可降低 30% 以上, 这种作用并非由蚜虫本身的基因型引起, 而是由其体内共生细菌决定的 (Oliver *et al.*, 2005)。用抗生素去除寄生蜂 *Asobara tabida* 体内的共生菌 *Wolbachia*, 其雌蜂不能形成成熟的卵子 (Falabella *et al.*, 2000)。一种未知共生细菌与 *Encarsia* 寄生蜂产雌孤雌生殖有关, 用抗生素处理后, 还能引起该寄生蜂产卵行为的变化 (Zchori-Fein and Brown, 2002)。

1.2.1.3 抗捕食作用

共生菌也能产生有毒物质保护寄主免于被捕食。白蚁体内共生菌能产生甲烷气体以防御蚂蚁和其它捕食性天敌 (Rasmussen and Khalil, 1983)。Kellner (1999) 最先提出毒隐翅虫 *Paederus* 体内能产生一种聚酮类有毒物质岬毒素 (pederin) 抵御狼蛛的捕食, 后来被证实这是由其体内的一种共生细菌产生的, 而不是甲虫本身产生的 (Kellner, 1999; Dedeine *et al.*, 2001; Kellner, 2001)。90% 以上的毒隐翅虫雌成虫体内具有较高含量的岬毒素, 这些雌成虫的后代也具有此特征, 而不含岬毒素的雌虫则不能产生具有岬毒素的后代 (Kellner, 1999)。

1.2.1.4 共生菌介导的防御作用机制

共生菌介导的防御作用具有多种机制 (表 1.2)。有些产生抗菌的物质, 如靛红 (isatin) 和酪醇 (tyrosol) (Piel, 2002)。有些是通过产生有毒的聚酮类物质 (如草苔虫内酯 bryostatin, 岬毒素 pederin, onnamides 和 theopederins) 来防止寄主被捕食, 这些物质能抑制真核蛋白的合成 (Kellner and Dettner, 1996; Kellner, 2001)。另外, 共生菌 *H. defensa* 产生的毒素可能是这种共生菌防止寄主蚜虫被寄生蜂寄生的机制。这些毒素与志贺毒素 (Shiga) 相似, 具有干扰真核细胞的作用。蚜虫体内防止寄主被寄生蜂寄生的共生菌 *S. symbiotica* 和防御病原真菌的共生菌 *R. insecticola* 也可能产生类似的毒素。除产生抑制生长的毒素

外，也可能存在另一种机制（假说），共生菌可能通过与水平传播的寄生物（horizontal transmission parasites, HTPs）竞争寄主资源来直接保护寄主。它们可能通过改变寄主的行为或增加寄主的防卫能力以阻止疾病的形成，使寄主免于被 HTPs 侵染（Haine, 2008）。

表 1.2 共生菌介导的寄主防御作用

Table 1.2 Roles of endosymbionts in insect hosts resistance against adverse factors

共生菌	寄主	作用目标	作用机制	文献
<i>Hamiltonella defensa</i>	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	寄生蜂	抗菌素	Gil-Turnes and Fenical, 1992; Oliver <i>et al.</i> , 2005
<i>Dictyocoela</i> sp. <i>Regiella insecticola</i>	<i>Gammarus roeseli</i> 豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	寄生性蠕虫 真菌		Haine, 2008 Veiver <i>et al.</i> , 1982; Scarborough <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces</i>	欧洲狼蜂 <i>Philanthus triangulum</i>	真菌	抗真菌物质	Ferrari <i>et al.</i> , 2004
<i>Streptomyces</i>	切叶蚁 <i>Acromyrmex</i> 和 <i>Atta</i>	真菌	抗真菌物质	Kaltenpoth <i>et al.</i> , 2005
<i>Serratic symbiotica</i>	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	寄生蜂		Gil-Turnes and Fenical, 1992
<i>Pseudomonas</i> sp.	毒隐翅虫 <i>Paederus</i> spp.	捕食性狼蛛	聚酮类物质	Kellner, 1999; Dedeine <i>et al.</i> , 2001; Kellner, 2001

1.2.2 昆虫体内共生菌在其适应寄主植物过程中的作用

植食性昆虫通常能利用有限范围的寄主植物，而且不但对植物的种类有特定范围，还选择寄主植物的特定部位。因此，在植食性昆虫对寄主植物的适应过程中，昆虫为适应寄主及环境变化，常分化为不同的寄主专化型或致害性种群（以前也称为生物型）（陈文胜等，1997；王咏妙等，2004）。对寄主植物的专化性

选择是昆虫在与寄主植物长期协同进化过程中的生态特性,它不仅决定昆虫的食物和生境,而且还会影响昆虫与同一寄主植物上其它生物之间的内在关系。

1.2.2.1 昆虫对寄主植物的适应性

大部分蚜虫只能利用有限的几种寄主植物,表现为单食性或寡食性,而且即使是多食性的蚜虫对其寄主植物也存在不同的选择性,形成了特定寄主植物上的专化型(Eastop, 1986)。在人工选择条件下,这种寄主专化型的形成要比自然条件下快的多。在选择实验中,昆虫对产卵场所或寄主植物的利用很快就会表现出明显的选择性(Wasserman and Futuyma, 1981)。一些农业害虫能迅速适应栽培品系及栽培方法的变化,产生新的致害性种群(以前称为生物型)而继续为害。褐飞虱是我国及东南亚许多水稻生产国的主要害虫之一。20 世纪70 年代,虫源地国家(越南等)大面积连续种植国际水稻所抗褐飞虱的水稻品种IR26,导致褐飞虱的致害性发生变化,产生了新的“生物型”(致害性种群)。之后,我国各稻区褐飞虱种群的致害性于80 年代末相继发生了改变(陶林勇等, 1992; Lu *et al.*, 1999),使得生产上推广的抗性品种抗性丧失,使用寿命缩短。B型烟粉虱是世界性入侵害虫,其寄主植物已查明的就达600多种(Liu *et al.*, 2007)。随着研究的不断深入,新的寄主植物种类还在不断增加,为害区域也在不断扩大。

1.2.2.2 共生菌在昆虫适应寄主植物过程中的作用

半翅目昆虫如蚜虫、飞虱、木虱和粉虱等,主要以吸食植物韧皮部汁液为主。植物韧皮部汁液中碳水化合物含量丰富而必需氨基酸组分欠缺或含量较低。这些昆虫本身没有合成胆固醇、必需氨基酸和维生素的能力。这些昆虫体内普遍存在共生菌,并为其寄主昆虫提供必需的脂类化合物、维生素和必需氨基酸等。

在豌豆蚜对新寄主植物的适应过程中,共生菌遗传背景容易发生变化,而导致蚜虫很快形成新的专化型(Campbell, 1990)。体内有共生细菌的甜菜蚜在16种寄植物上的生长率明显高于无共生菌的蚜虫(Ishikawa, 1986)。Simon 等(2003)在研究取食不同寄主植物的豌豆蚜的遗传分化时,认为次生共生细菌与豌豆蚜的寄主适应与分化有某种关联。Leonardo 和 Muir (2003)发现,与不感染或感染

其他共生细菌的豌豆蚜比较,感染 U 型共生菌的豌豆蚜无法在紫花苜蓿上存活,但在白花苜蓿上的繁殖力增倍 (Adams and Douglas, 1997)。利用抗生素除去自然蚜虫种群中的 U 型共生菌,发现除去 U 型共生菌后对蚜虫适应性并没有造成影响,从而认为 U 型共生菌与专食性并无联系 (Leonardo, 2004)。但 Tshuchida 等 (2004) 报道被去除共生菌 *Regiella* 后,豆长管蚜在白花苜蓿上的生殖力降低约 50%。而通过注射感染共生菌的蚜虫血淋巴使其重新恢复感染 *Regiella* 后,其在白花苜蓿的生殖力几乎完全恢复。这一结果表明,感染共生菌 *Regiella* 能提高蚜虫在白花苜蓿上的适应性。当全部去除蚜虫初生共生菌 *Buchnera* 后,另外一种次生共生菌 (pea aphid secondary symbiont, PASS) 会进入菌胞体内的细胞质中 *Buchnera* 所“腾出”的空间,形成一个新的共生系统,维持蚜虫的生存和繁殖。并且当 PASS 的进入使 *Buchnera* 受到抑制时,蚜虫的生长和繁殖不会受到影响。

Zchori-Fein 等 (2002) 应用 16S rDNA 序列分析方法对采自世界范围内不同地区和寄主植物上的不同生物型烟粉虱体内共生菌的组成和多样性进行了研究,发现不同生物型和地理型中的共生菌的 16S rDNA 序列具有很高的同源性,但是产生了不同的适应性。谭周进等 (2004) 对烟粉虱共生菌 16S rDNA 的变异与系统发生的研究表明,北京不同寄主植物上的 B 型烟粉虱共生菌及世界其它地区烟粉虱内共生菌可能是同一种的不同生态型,是共生菌与分化后的烟粉虱长期共同适应的结果 (Koga *et al.*, 2003)。阮永明等 (2005) 应用 PCR 技术检测了烟粉虱浙江 B 型和非 B 型 China- ZHJ-1 种群中的共生菌,结果表明烟粉虱 B 型和非 B 型体内均存在初生共生菌,而两者的次生共生菌的组成存在差异。初生共生细菌的系统发育分析表明, B 型烟粉虱是入侵生物型,而浙江非 B 型是本地生物型。用多种抗生素处理 B 型烟粉虱和浙江土著烟粉虱 (ZHJ1 种群),发现去除烟粉虱体内某些次生共生菌或降低初生共生细菌的量能对烟粉虱的适合度产生一定的影响 (Ruan *et al.*, 2006)。

水稻主要害虫褐飞虱致害性的变异也是其对水稻抗性品种适应的结果。缺共生菌的褐飞虱其若虫历期明显延长,若虫存活率、雌成虫体重和产卵量等均低于正常褐飞虱。在抗性水稻品种取食的褐飞虱,体内共生菌数量急剧下降,其中第 2 代是褐飞虱适应抗性品种的关键代,体内共生菌数量最低;从第 3 代起,共生

菌数量又开始上升。当其数量达到稳定之后,新的致害性种群形成(吕仲贤等, 2001b; Lu *et al.*, 2004)。即褐飞虱体内共生菌与其对水稻品种的致害性变异有着密切的关系。

1.2.2.3 共生菌介导的寄主植物适应的可能机制

昆虫对营养成分的消化利用及对植物次生物质的代谢适应在依靠那些植物进行生长繁殖和建立种群仍是关键性的因素。已有证明,共生微生物可能部分参与植食性昆虫利用寄主植物的遗传变化。蚜虫体内共生细菌为其提供营养物质和代谢酶可能是其生物型形成的主要原因。共生菌提高了蚜虫对植物韧皮部汁液中化学成分的生理想应性。人工饲料饲养实验已经证明食料中的氨基酸成份明显影响蚜虫的表现(Karley *et al.*, 2002)。而且食料中氨基酸的成份和浓度影响共生菌的密度(Wilkinson *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2007)。另外,随蚜虫唾液分泌的、由体内共生菌合成的多糖降解酶能有效地降解抗性寄主植物的新结构多糖物质。

共生菌不仅能合成宿主所需要的氨基酸、胆固醇和其它营养物质,还可以对宿主所吸取的植物次生物质进行解毒作用。植物体内含有如生物碱、氰苷等次生物质,可以防御蚜虫等的植食性昆虫。昆虫体内共生菌能对这些植物次生物质起到解毒作用,包括蚜虫体内共生菌 *Regiella*、烟草甲体内共生菌 *Symbiotaphrina kochii* 等(Dowd, 1991; Leonardo, 2004)。

1.2.3 昆虫体内共生菌对昆虫的其它影响

1.2.3.1 对非生物环境的适应

物种耐受温度变化范围的大小是决定物种分布范围大小的一个重要因子。温度可以直接影响宿主昆虫,也可以间接改变宿主内寄生菌的丰富度或者传播给后代的有效性。通过高温处理会减弱由共生菌 *Wolbachia* 诱导的宿主昆虫孤雌生殖和细胞质不亲和性(Hoffmann *et al.*, 1990),这可能是高温条件下大量内寄生菌存活率下降的结果。当温度从 20℃ 升高到 30℃ 时,稻绿蝽 *Nezara viridula* 共生菌减少 90%,尽管共生菌的减少不会导致宿主昆虫寿命的缩短,但在低温条件下可

以导致其繁殖力下降 (Prado *et al.*, 2009)。同样, 蚜虫也不耐高温 (Dean, 1974; Oliver *et al.*, 2010)。这除了与蚜虫本身不耐高温以外还与其体内的共生菌有关, 在高温条件下, 蚜虫细胞内初生共生菌数量显著下降, 而共生菌为蚜虫提供必须的营养物质, 从而共生菌也限制了蚜虫对高温的耐受力 (Montllor *et al.*, 2002)。由于对耐热选择性的结果, 沙漠和炎热夏天的蚜虫体内共生菌以次生菌为主 (Harmon *et al.*, 2009)。定量 PCR 检测结果发现, 烟粉虱在 40℃ 热处理时, 体内共生菌 *Hamiltonella defensa* 显著下降, *Portiera aleyrodidarum* 第一天变化不大但第 3-5 天时显著下降, 且随着热处理时间的延长烟粉虱死亡率升高 (Shan *et al.*, 2014)。此外, 由共生细菌产生的 GroEL 蛋白可能具有保护寄主蛋白在血液淋巴系统中免受热降解的作用。次生共生菌立克次氏体可能也与烟粉虱的耐热性有关。当立克次氏体分布于宿主昆虫组织时, 在正常温度条件下它能诱导应激相关基因的表达, 然而, 当宿主昆虫遇到高温胁迫时, 立克次氏体数量急剧下降 (Brumin *et al.*, 2011)。

1.2.3.2 对昆虫种群数量的调节

共生菌对寄主种群动态、数量和遗传多样性都具有强烈的影响。在大约 70% 的节肢动物中都广泛存在起着生殖调控作用的内共生菌 (如 *Wolbachia*、*Arsenophonus* 等) (Duron *et al.*, 2008; Hilgenboecker *et al.*, 2008)。这些共生菌通过调控宿主的生殖来达到自身垂直转播的目的, 一是通过细胞质不亲和减少未感染菌雌性; 二是调控在后代中雌性的比例, 通过诱导雌性化和孤雌生殖来达到杀雄作用 (Werren *et al.*, 2008; Engelstadter and Hurst, 2009)。精卵细胞质不亲和 (CI) 即感染寄生菌的雄性和未感染的雌性或感染不同品系寄生菌的雌性宿主交配后, 受精卵不能正常发育, 于胚胎期死亡。未感染寄生菌的雄性和感染的雌性交配时则是亲和的, 感染同种寄生菌的雌雄宿主交配后胚胎也能正常发育, 产生同样感染寄生菌的后代。因此, 与未感染雌性相比, 感染共生菌的雌性更具有繁殖优势, 共生菌也通过诱导宿主精卵细胞质不亲和使自身迅速扩展到整个种群。由于雌雄比例差异大, 可能减少种群内的遗传多样性, 减少有效的虫量规模, 带

来强烈的负面效应，如增加有害突变和更强的遗传漂变。细菌孤雌生殖（PI）也许会导致有性生殖的减少或消失。由于孤雌生殖缺乏遗传物质的交换，宿主种群的遗传多样性将快速下降（Ferrari and Vavre, 2011）。

昆虫内共生菌同样能改变宿主昆虫关于扩散的特性从而影响种群数量。在豌豆蚜虫密度较大的条件下，较体内无 *Regiella insecticola* 的豌豆蚜，体内携带共生菌的蚜虫将产生较少的有翅蚜后代。此外，在几个品系蚜虫的试验中发现，有性繁殖受到体内寄生菌 *Regiella* 的影响（Leonardo and Mondor, 2006）。相反地，在蜘蛛中体内如果存在共生菌立克次体属将有助于群体的长距离分散（Goodacre *et al.*, 2009）。

1.2.3.3 对昆虫体色的调节

许多捕食者和寄生蜂都是通过视觉发现昆虫，躯体颜色作为昆虫的一个重要生物学特性在避敌中起着重要作用。豌豆蚜虫通过不同的体色来适应外界环境，以此逃过天敌的捕食。瓢虫也通过改变体色来迷惑捕食者（Losey *et al.*, 1997）。立克次氏体属共生菌能释放许多醌类物质，使蚜虫体色由红色变为绿色（Tsuchida *et al.*, 2010）。立克次氏体属经常与 *Hamiltonella* 或沙雷氏菌协同作用，能防卫寄生蜂的寄生（Oliver *et al.*, 2010; Tsuchida *et al.*, 2010）。

1.2.3.4 对昆虫传播病毒病的影响

由昆虫内共生菌产生的 GroEL 蛋白对病毒的保护和扩散起着相当重要的作用。van den Heuvel 等（1994）用病毒结合蛋白印迹试验（virus overlay protein blot assay）筛选桃蚜体内可能与马铃薯卷叶病毒（potato leafroll virus, PLRV）结合的分子，结果发现有 5 个蛋白可能与 PLRV 结合有关，其中最容易检测的是分子量为 63KD 的蛋白，被鉴定为蚜虫初生内共生菌（*Buchnera*）合成的 GroEL 蛋白，又称为共生素（symbionin, SymL）。这种蛋白与大肠杆菌 *Escherichia. coli* 的 GroEL 有很高的同源性，所以和 *E. coli* 的 GroEL 一样，是分子伴侣 cpn60 家族成员（Ohtaka *et al.*, 1992; van den Heuvel *et al.*, 1994）。GroEL 的作用是与病毒结合保护植物病毒进入昆虫体内时，阻碍蛋白酶降解病毒，或保护其不被昆虫

免疫系统识别,维持病毒在蚜虫体内的持久传播(谭周进等, 2004b; Whitfield *et al.*, 2011)。禾谷缢管蚜体内分离到的一种与传毒有关的 63kD 的病毒结合蛋白,属于分子伴侣 cpn60 家族(吴云锋等, 1999)。对桃蚜、玉米蚜、烟粉虱等体内与病毒结合的布赫纳氏菌的 groEL 基因也均有研究(崔晓峰等, 2002; 林林等, 2003; 谭周进等, 2004b)。用抗生素处理桃蚜时,可以显著降低其血淋巴中的 *Buchnera* groEL 的表达量,导致其不能传播马铃薯卷叶病毒(PLRV),并影响病毒衣壳的完整性(Hogenhout *et al.*, 1998)。禾谷缢管蚜、二叉蚜和麦长管蚜取食青霉素蔗糖溶液后,传大麦黄矮病毒的效率降低(Hogenhout *et al.*, 1998)。在饲毒前先用蚜虫 *Buchnera* GroEL 抗血清饲喂烟粉虱,其传番茄黄化卷叶病毒的效率下降 80 %以上(Morin *et al.*, 1999)。用酵母双杂交的方法研究 TYLCV-Is (烟粉虱传播)与 AbMV-Is (不能被烟粉虱传播)这两种病毒的衣壳蛋白(CP)与烟粉虱体内共生菌 GroEL 的互作,结果表明这两种病毒的衣壳蛋白均能与 GroEL 有效连结(Morin *et al.*, 2000)。季英华等(2008)和曹卿等(2010)分别从灰飞虱体内克隆得到共生菌 *Wolbachia* 的 GroEL 基因,并测定了全长序列,其开放阅读框为 1659bp,可编码 552 氨基酸,为进一步研究其功能提供了基础。我们也从三种稻飞虱体内克隆获得三个属的共生菌 *Wolbachia*、*Rickettsia* 和 *Arsenophonus* 的 GroEL 基因(未发表资料)。而利用韧皮部特异启动子植物表达载体将 GroEL 基因转化到烟草中,获得抗病毒的苗,可开辟利用共生菌 GroEL 进行植物抗病毒育种的新途径(吴丹等, 2009; 唐前君等, 2010)。

1.3 节肢动物和微生物间的进化适应

物种之间的相互作用也可以推动进化或协同进化改变物种,导致自适应分化和最终种群之间导致生态形态(Schluter, 2009)。在植物—节肢动物、微生物—节肢动物以及植物—微生物直接存在直接的相互作用以外,其中一种生物也能间接地影响另外两种生物间的相互作用。通常初生共生菌与宿主的系统发育是一致的,次生共生菌则可能水平传播或多次侵染。但也有例外,如褚栋等(2006)对烟粉虱复合种 *Bemisia tabaci* (Gennadius) complex 内共生菌的系统发育分析表明,烟粉虱初级内共生菌分为 2 支,一些初级内共生菌和宿主系统发育并不严格一

致。次级内共生菌分为 3 支，一些次级内共生菌可能存在水平传播或多次侵入的现象。而且在烟粉虱不同生物型或地理种群内的分布存在差异。

1.3.1 初生共生菌

长期适应于寄主的进化过程（图 1.1），初生共生菌采取了基因组最小化的策略。共生菌的生活史中很少或者没有基因是传播所必需的。一些营养生产的调节因子和物质交换因子必须存在于昆虫-共生菌系统中。初生共生菌基因大量减少，大部分公开发表的基因组种类都能用。包括三种来自不同蚜虫寄主的 *Buchnera aphidicola* 基因组（Shigenobu *et al.*, 2000; Tamas *et al.*, 2002; van Ham *et al.*, 2003），两种来自蚂蚁的 *Candidatus Blochmannia* 种基因组（Gil *et al.*, 2004; Degnan *et al.*, 2005），一种采采蝇共生菌 *Wigglesworthia glossinidia*（Akman *et al.*, 2002）和一种叶蝉的 *Candidatus Baumannia cicadellinicola* 基因组（Wu *et al.*, 2006）。这些共生菌与大肠杆菌 *Escherichia coli* 和其它肠菌的关系最近。但是，无论是大肠杆菌还是其它这组中的其它自由生活的相关菌的基因组通常都是由约 5000 个基因编码的约 5 兆左右，而初生共生菌只有约 500 个基因编码的 1 兆左右的基因组，小了很多（Gomez-Valero *et al.*, 2004）。初生共生菌基因组序列也同样显示出基因的减少。大肠杆菌有 200 多个基因编码转录调控子，而 *Buchnera* 菌只保留了不到 10 个（Moran *et al.*, 2005）。共生菌的生活史中很少或者没有基因是其传播所必需的，这与现存的 γ -Proteobacteria 其它菌的基因组完全相反。

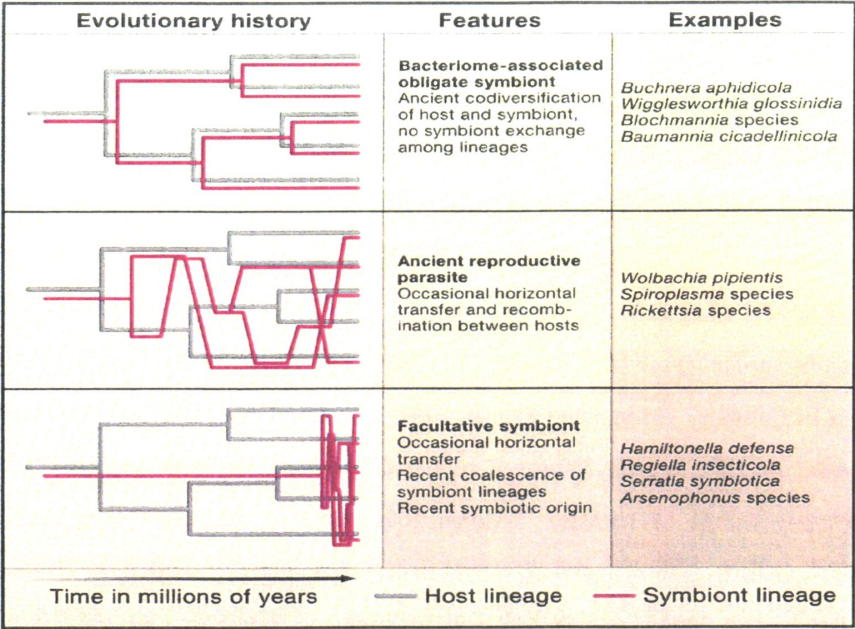


图 1.1 共生菌与寄主的协同进化关系（Dale *et al.*, 2006）

Fig. 1.1 Co-evolution between endosymbiosis and their host

根据对大肠杆菌的研究，很多被认为是必需的基因，在共生菌基因组中缺少了1种或者更多。一个与染色体复制有关的基因在 *Wigglesworthia* 和 *Blochmannia* 基因组中缺失（Akman *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003），可能是其复制是由寄主控制的。同样的，*Buchnera* 基因组缺少近乎普遍的重组酶基因和磷脂合成酶其中之一（Shigenobu *et al.*, 2000; van Ham *et al.*, 2003; Zientz *et al.*, 2004）。而且，已公开发表的初生共生菌基因组拥有基于模式生物的研究所认为所必需的全部基因，被认为是目前为止最小的基因组（Gil *et al.*, 2004; Zientz *et al.*, 2004）。这些压缩基因组缺少很多与自由生活细菌或病原细菌基因组共同的特征。例如，它们没有抗菌素或抗菌素残留，没有插入的序列，没有外源基因吸收或同源再结合的证据。一般来说，它们的基因组序列表明这些必需共生菌存在于高度特化的组织中，把进化的独立性留给了它们的寄主。

1.3.2 次生共生菌

从一些次生共生菌获得的全部或部分共生菌序列显示出在最近的进化史上已经与寄主建立了关系，但仍处于变化中（图 1.1）。这些基因组的特征与那些自由生活模式向共生转变早期的基因组很相似，这为发表的采采蝇共生菌 *S. glossinidius* 的基因组序列提供了最合理的解释。其基因组几乎有一半是由在不同分解期的不活跃的基因组组成的（Toh *et al.*, 2006）。与寄主严格的病原菌 *Mycobacterium leprae* 相似（Cole *et al.*, 2001），说明了一些慢性病菌与共生菌的进化轨道相似性（Moran and Plague, 2004）。一些次生共生菌，如 *Wolbachia*、*Candidatus Hamiltonella defensa*、*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*，具有中等大小的基因组（1-3.5 MB）（Moran, 2005; Wu *et al.*, 2006; Dale *et al.*, 2006）。与驯化的相比，这些次生共生菌可能经历不同株系间高水平的重组，如 *Wolbachia*（Baldo *et al.*, 2006）。在已发表的昆虫 *Wolbachia* 的序列中发现的一些重复序列，可能是对促进在基因组内或基因组间进行重组的一种适应（Wu *et al.*, 2004）。而且，次生共生菌经历噬菌体介导的基因互换（Moran, 2005; Bordenstein and Wernergreen, 2004）。

1.3.3 必需共生菌

正如共生菌的一些不必要的基因一样，不是所有共生菌都是宿主必需的。很长时间以来，提供营养一直被认为是共生菌存在的理由。基于从基因组序列推测的基因总量，昆虫初生共生菌（包括 *Buchnera*、*Wigglesworthia*、*Blochmannia* 和 *Baumannia*），均有着提供给他们寄主营养的能力。Zientz 等（2004）提出了关于共生菌新陈代谢的贡献和需求的更深的考虑，和从全基因组推测的一样。共生菌与寄主不同的关系提供不同的营养，如 *Buchnera* 保留了动物必需氨基酸的合成途径，但是缺失了那些合成非必需氨基酸的途径（Shigenobu *et al.*, 2000）。一些蚜虫品系中合成必需氨基酸亮氨酸和色氨酸的基因在质粒中被扩增，可能使这些营养过量表达。采采蝇的必需共生菌 *Wigglesworthia* 基因组中，氨基酸合成基因缺失，但含有一些基因能够合成大批必需的联合因子。这个结果与采采蝇寄主的食料限制相适应，它们只取食脊椎动物的血，其中包含所有的必需氨基酸但

是缺少必需的联合因子。共存于取食木质部的 sharpshooter 中的初生共生菌 *Buchnera* 和 *Sulsia* 的基因组序列揭示了这些共生菌有互补的合成能力, 一个 (*Buchnera*) 合成一些联合因子, 另一个 (*Sulsia*) 编码必需氨基酸的合成途径 (Wu *et al.*, 2006)。在每一个菌的全基因组序列中, 与寄主营养有关的基因占 10-14%。这些保留与具有相似小基因组的病原菌 (如已测序的 *Mycoplasma* 或立克氏体 *Rickettsia* spp. 形成鲜明的对比, 后者从它们的寄主获取营养, 并且几乎所有的氨基酸合成基因都已经消失 (Dale and Moran, 2006)。

1.4 共生菌的培养

1.4.1 微生物多样性与共生菌培养

目前能培养的细菌种类只占环境中所有细菌很小的一部分 (Giovannoni *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1990a,b)。PCR 和原位杂交等现代分子生物学技术等的发展使得人们从能够更容易地知道微生物群落中未培养菌的多样性 (Muyzer *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997)。例如, 蚜虫体内有 6 种共生细菌, 其中 5 种是通过基因组序列和荧光原位杂交而得知的, 而且曾被认为是不可以培养的。有报道其中 2 种共生细菌在实验室培养中被分离出来 (Darby *et al.*, 2005)。据估计, 10% 的昆虫体内具有细胞内的共生微生物, 但到目前为止, 只有几种共生菌能够体外培养: *Sodalis glossinidius* (Welburn *et al.*, 1987)、*Wolbachia pipientis* (O'Neill *et al.*, 1997)、*Candidatus Arsenophonus triatominarum* (Hypsa and Dale, 1997)、*Candidatus Consessoris aphidicola* 和 *Candidatus Adiaceo* (Darby *et al.*, 2005)。并且只有 *S. glossinidius* 能够在无昆虫细胞的条件下培养 (Dale and Maudlin, 1999; Matthew *et al.*, 2005)。近年在利用昆虫细胞系对 *Wolbachia*、*Arsenophonus* 等共生菌的体外培养也获得成功 (Dale *et al.*, 2006; Furukawa *et al.*, 2008)。另外, 张珏锋等 (2009) 运用卵块离体培养的方法, 从褐飞虱体内分离到两株共生菌 (解脂假丝酵母 *Yarrowia lipolytica* 和嗜盐梗孢酵母 *Sterigmatomyces halophilus*), 证明褐飞虱体内类酵母共生菌可在人工培养基上短期存活。同时也验证了褐飞虱菌胞中存在不同种类的类酵母菌的推测。

1.4.2 共生菌难培养的原因

共生菌不如其它自由生活的细菌那样容易培养,但是也不能完全说明共生菌不能在寄主体外生长。可能是我们不知道它们的生理和营养需求。通过基因组 (Renesto *et al.*, 2003) 和生态学 (Rappe *et al.*, 2002; Leadbetter, 2003) 数据获得目标菌异常生长条件的范围, 提供了 *S. glossinidius* 的生长条件, 最初在昆虫细胞中在较低温度下生长, 后来在固体培养基上, 然后在精细培养基上培养 (Matthew *et al.*, 2005)。对一些共生菌来说, 一定不能用细胞培养是相当难的。初生共生菌的基因组数据表明, 这些细菌失去了大量 DNA, 有时甚至是基因组的大区域 (Shigenobu *et al.*, 2000; Akman *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2003)。不同的共生菌, 缺失的基因不同, 但是, 所有的基因组数据证实了共生菌缺少的基因通常被认为对非共生、自由生活的生命体非常重要的新陈代谢和结构基因。如果这种信赖是新陈代谢的, 那么可以通过调节培养基成分来克服。如果是丢失了细胞壁合成基因 (如 *Buchnera*), 则是独立培养则将非常困难 (Pontes *et al.*, 2009)。

1.5 稻飞虱及其体内共生菌

1.5.1 稻飞虱及其危害

我国水稻上的稻飞虱主要为褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål、白背飞虱 *Sogatella furcifera* Horváth 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* Fallén。20世纪70年代前, 稻飞虱仅仅是水稻生产上的次要害虫。随着耕作制度的改变, 肥水条件的改善以及化肥农药大量不合理的使用, 稻飞虱发生面积逐年扩大, 暴发频率增加, 危害程度加重, 已成为我国水稻上的主要害虫 (程遐年等, 2003; 程家安等, 2008)。例如2005年仅浙江省稻区褐飞虱发生2600万亩次, 特大发生面积达1000万亩; 单季晚稻亩虫量超过100万头, 高的稻田每亩达到1000万头以上, 造成产量损失120万吨 (陆剑飞和黄国洋, 2006)。2006-2009年连续大暴发, 产量损失十分惨重。稻飞虱除直接刺吸稻株的韧皮部汁液, 造成水稻生长缓慢、分蘖延迟、瘪粒增加以外, 还能传播水稻病毒病, 如灰飞虱传的黑条矮缩病 (Rice black-streaked dwarf disease) 和条纹叶枯病 (Rice stripe disease)、白背飞虱传的南方黑条矮缩病 (Southern rice black-streaked dwarf disease)、褐飞虱传的齿叶矮缩病 (Rice ragged

stunt disease) 和草状矮化病 (Rice grassy stunt) 等病毒病, 引起更严重的危害 (姜永根和程家安, 2011; 翟保平等, 2011)。三种飞虱交替或同时暴发成灾, 成为影响我国水稻生产最为重要的限制因素 (程家安等, 2008)。

1.5.2 稻飞虱体内的共生菌

1.5.2.1 类酵母共生菌

稻飞虱体内的类酵母共生菌 (yeast-like symbiotes, YLS) 属于子囊菌亚门 (Ascomycotina) 核菌纲 (Pyrenomycetes) *Candida* 属, 存在部位为脂肪体, 芽孢生殖并以卵母细胞垂直传递给子代。共生菌在褐飞虱甾醇类物质代谢、胆固醇、氨基酸和维生素供给 (Wetzel *et al.*, 1992; 傅强等, 2001; Ferrater *et al.*, 2013) 及氮循环 (Sasaki *et al.*, 1996; Hongoh & Ishikawa, 1997) 等方面起着重要作用, 以弥补其饮食营养的不平衡, 从而保证褐飞虱的正常生长和繁殖; 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 (徐红星等, 2000)。褐飞虱腹部脂肪体中缺乏共生菌和抑制共生菌对褐飞虱的影响主要表现为若虫生长发育缓慢、蜕皮受阻和卵不育, 因为共生菌能生物合成褐飞虱胚胎和胚后发育所需的蛋白质和对胚胎腹节分化产生促进作用 (Lee & Hou, 1987)。高温、抗生素、水稻品种、杀虫剂和杀菌剂等对褐飞虱类酵母共生菌的生长均有较大的抑制作用 (Chen *et al.*, 1981; 徐红星等, 2000; Lu *et al.*, 2004; 陈法军等, 2006a; 陈建明等, 2009; 周岩岩, 2012; Ferrater *et al.*, 2013)。

吕仲贤等 (2001) 报道, 褐飞虱生物型 1 体内共生菌数量普遍比田间种群的褐飞虱共生菌数量高; 与取食感虫品种 TN1 比较, 取食抗虫品种 IR26、Mudgo 和 ASD7 的褐飞虱生物型 1 共生菌数量明显减少; 同时初步证明了褐飞虱体内共生菌的数量在褐飞虱对水稻致害性变化中的作用 (Lu *et al.*, 2004)。除数量变化以外, 在与水稻互作的过程中, 共生菌的大小也会发生变化。与取食感虫品种水稻 TN1 的褐飞虱相比, 取食抗性水稻品种 IR26 (含抗性基因 *Bph1*) 和 IR36 (含抗性基因 *bph2*) 的褐飞虱体内共生菌的长度分别降低 23.2%~24.4% 和 18.0%~32.7%, 宽度分别降低 24.4%~28.8% 和 8.6%~30.6% (陈法军等, 2006b)。

孙佳音等(2009)分别对在不同水稻品种 TN1(感虫品种)、Mudgo(含抗虫基因 *Bph1*)、ASD7(含抗虫基因 *bph2*)上连续饲养了 117 代以上的 3 个褐飞虱寄主种群(分别称为 TN1 种群、Mudgo 种群、ASD7 种群)体内类酵母共生菌的形态和数量进行了比较,结果表明各褐飞虱种群类酵母共生菌的长和宽差异显著,且 ASD7 种群>TN1 种群>Mudgo 种群;长宽比无明显差异。种群间类酵母共生菌数量的差异因试虫性别而异,不同种群的褐飞虱雌虫含菌量无明显差异,雄虫则表现出 TN1 种群>ASD7 种>Mudgo 种群的趋势,其中 TN1 种群与后两者差异显著,后两者间无显著差异。

稻飞虱体内可能存在多种 YLS。三种稻飞虱体内的酵母类共生菌的形态差异明显,灰飞虱和白背飞虱的 YLS 为卵形,长约 11.3 μm ;褐飞虱 YLS 为长梭形和杆状,长约 15 μm (Nasu and Suenaga, 1958; Cheng and Hou, 1996)。通过 18S rDNA 序列对 3 种稻飞虱体内共生菌系统发育的关系研究,发现褐飞虱体内共生菌的分类地位与形态鉴定相同,并且与白背飞虱和灰飞虱具有同种来源和最近的遗传距离(Noda *et al.*, 1995)。对 3 种稻飞虱体内的 YLS 的染色体基因组的研究表明:褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱体内 YLS 的染色体数分别为 4、4 和 5,推测其基因组大小分别为 17.3, 17.6 和 20.1 Mbp(Noda *et al.*, 1995)。基于 3 种稻飞虱体内 YLS 的 18S rDNA 序列比对表明,褐飞虱 YLS 和白背飞虱 YLS 的一致性比其与灰飞虱 YLS 的高,而基于 ITS-5.8 S rDNA 序列比对,灰飞虱 YLS 和白背飞虱 YLS 的一致性比其与褐飞虱 YLS 的要高(周岩岩等, 2012)。

陈法军等(2006)报道,褐飞虱 YLS 为梭形、杆状和卵形为主,个体较大,分别占 30.7%、53.5%和 15.1%;灰飞虱和白背飞虱 YLS 以卵形为主且个体较小,分别占 93.4%和 94.7%。张珏锋等(2009)从褐飞虱体内分离培养出两株 YLS(解脂假丝酵母 *Yarrowia lipolytica*、嗜盐梗孢酵母 *Sterigmatomyces halophilus*)。白旭等(2010)用真菌的通用引物对其 18S rDNA、5.8S-ITS rDNA 全长序列进行扩增,得到一条分子量约为 2 340 bp 的序列与 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。

1.5.2.2 共生细菌

Wolbachia

Wolbachia 存在于宿主的含菌体 (mycetome) 的细胞内, 以经卵传递方式传至后代。*Wolbachia* 是当前稻飞虱中研究较多另一类共生菌。甘波谊等 (2002) 用 PCR 方法检测到不同地区稻田中三种稻飞虱 (灰飞虱、褐飞虱和白背飞虱) 均被 *Wolbachia* 所感染。邓可京等 (1997) 检测了我国 6 个地区灰飞虱的 *Wolbachia* 感染率, 辽宁、北京、上海和云南的灰飞虱的 *Wolbachia* 感染率均接近 100%; 四川为 59.6%; 而宁夏为 0, 且各地区灰飞虱间的交配实验证明了 *Wolbachia* 引起的细胞质不亲和 (CI) 现象的存在。采自中国 7 个省区 9 个地点的白背飞虱雌雄虫感染率差异较大, 雌虫的感染率几乎均为 100%, 而雄虫的感染率从 22.2%~95.0% 不等 (张开军等, 2012)。对 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列的比较和进化分析表明, 褐飞虱各地理种群 *Wolbachia* 均为 B 群, 并可进一步分为 Ori 和 Con 两个亚群。其中 18 个褐飞虱种群中的 *Wolbachia* 属于 Ori 亚群, 广东清远和浙江桐乡褐飞虱种群中的 *Wolbachia* 则属于 Con 亚群, 而菲律宾种群分别检测到同时有 2 个亚群 *Wolbachia* 感染 (屈吕宇, 2013)。

Arsenophonus

Arsenophonus 是 γ -变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 的肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的一种杀雄作用相关的细菌。王渭霞等 (2010) 在褐飞虱体内检测出了 *Arsenophonus*, 并证实不同生物型褐飞虱中该菌含量不同, 在 TN1 水稻上饲养的褐飞虱种群体内的 *Arsenophonus* 属的数量要显著多于 Mudgo 种群和 ASD7 种群, 推测其可能与致害性有关。褐飞虱体内 *Arsenophonus* 类共生细菌具有两种长度不同的 16S rDNA 序列, 分别为 1504bp 和 547bp, 其中后者为前者中间缺失了 957bp, 其余序列相同。褐飞虱 22 个地理种群, 发现均感染 *Arsenophonus*, 但不同地理种群褐飞虱体内的 *Arsenophonus* ATR 氨基酸序列较为保守, 在 177 个氨基酸残基中只有 1-2 个残基差异 (屈吕宇等, 2013)。*Arsenophonus* 除了具有次生共生的特点之外, 还具有部分初生共生菌的特点

(Trowbridge *et al.*, 2006; Perotti *et al.* 2007)。另外, 有报道认为 *Arsenophonus* 可以纯培养 (Dale *et al.*, 2006), 将有利共生菌的研究。

Cardinium

Cardinium 属于拟杆菌门 (Bacteroidetes) 的一个独立分支 (Zchori-Fein *et al.*, 2001)。*Cardinium* 的寄主分布范围比 *Wolbachia* 要窄的多 (Jeyaprakash and Hoy, 2000; Weeks *et al.*, 2003), 但也具有调控寄主生殖的能力 (Weeks *et al.*, 2001; Zchori-Fein *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012)。*Cardinium* 在三种稻飞虱体内均有共生, 但不同稻飞虱的个体感染率差异较大。白背飞虱感染率最高, 最低的也有 80.0% (广西昭平种群), 而褐飞虱和灰飞虱仅在少数个体感染, 感染率 5% 左右 (刘玉坤, 2011)。而且, 白背飞虱中 *Cardinium* 广泛与 *Wolbachia* 双重感染 (张开军等, 2012)。

Serratia

Serratia 在三种稻飞虱个体中均有感染, 且白背飞虱和灰飞虱感染率较高 (分别为 82.7% 和 88.3%), 而褐飞虱感染率较低 (50.7%)。同种飞虱的不同种群之间也存在差异, 如褐飞虱云南勐腊 (83.3%) 和广西昭平 (73.3%) 两个种群显著高于其它种群 (30.0%~36.7%); 白背飞虱和灰飞虱各种群之间均无显著差异 (刘玉坤, 2011)。

Arthrobacter

Arthrobacter 在 3 种稻飞虱体内均处于较高侵染水平, 且 3 种稻飞虱中不同种群的个体感染率差异不大 (刘玉坤, 2011)。其中不同褐飞虱种群感染率均在 90.0% 以上。白背飞虱中感染率最低的种群也达到 86.7%。灰飞虱该菌的平均感染率为 90.8%。

Acinetobacter

Acinetobacter 同样在三种稻飞虱中均可检出, 白背飞虱的感染率较高(平均 80.7%); 而褐飞虱和灰飞虱感染率较低(个别种群除外, 如浙江富阳种群感染率达 90.0%), 平均感染率分别为 38.7%和 30%(刘玉坤, 2011)。

Chryseobacterium

Chryseobacterium 在 3 种稻飞虱中均有发生, 且个体感染率均处于较高水平。褐飞虱该菌的感染率平均为 83.3%; 白背飞虱该菌感染率平均为 90.7%; 灰飞虱该菌的感染率更高, 平均达到了 96.6%(刘玉坤, 2011)。

1.6 小结与展望

共生菌之间、共生菌与寄主之间的关系相当复杂。对蚜虫体内共生菌的研究发现, 当全部去除*Buchnera*后, 另外一种次生共生菌(*pea aphid secondary symbiont*, PASS)会进入菌胞体内的细胞质中*Buchnera*所“腾出”的空间, 形成一个新的共生系统, 维持蚜虫的生存和繁殖(Koga *et al.*, 2003)。并且当PASS的进入使*Buchnera*受到抑制时, 蚜虫的生长和繁殖不会受到影响。共生菌对寄生蜂的生长发育也有着重要影响。如蚜茧蜂*Aphidius ervi*在脱共生菌豌豆蚜*Acyrtosiphon pisum*体内发育到成虫期的时间比在有共生菌蚜虫体内明显延长, 成蜂体重也下降了50%(Pennacchio, 1999)。共生菌对寄主的保护能力与它躲避寄主免疫防卫的能力之间的关系也是一个研究热点。对共生菌的深入研究将有可能明确其功能, 并加以利用。

另外, 研究共生菌在昆虫对寄主植物的适应过程中的功能, 对于合理解释昆虫对不同寄主植物的适应性以及提出有效控制措施、实现“抑菌防虫”等均具有极为重要的理论和现实意义。通过抑制内共生菌来控制害虫, 可减少环境污染和对天敌的伤害(陈列忠等, 2006)。或者在内共生菌中转入和表达抗病毒基因, 从而阻止昆虫传播植物病毒(唐前君等, 2010)。

昆虫初生共生菌与宿主进化的一致性, 次生内共生菌的多样性以及与宿主系统发育的不一致性, 对于研究昆虫的系统进化及生物多样性, 均为很好的证据(Sandstrom, 2001)。体内共生菌由于无法人工培养, 故很难被详细的研究。现代分子生物学研究方法和技术手段的不断发展和应用, 使得近十几年来关于昆虫

体内共生菌的研究有了很大进展。与传统的微生物研究方法相比,分子生物学技术以PCR为基础,具有快速便捷的特点。利用分子生物学手段,可以在不进行共生菌离体培养的条件下进行研究,这就大大地简化了试验工作,特别是随着测序技术的发展,可以加快全基因组测序。

1.7 立题依据

褐飞虱*Nilaparvata lugens* Stål属迁飞性昆虫,是我国稻区为害最严重的水稻害虫之一。它暴发频率高、危害发生面积大,特别是2005-2007年在我国南方稻区特大暴发。仅2005年浙江省稻区褐飞虱发生2600万亩次,特大发生面积达1000万亩,占水稻总种植面积的86%,单季晚稻亩虫量超过100万只,高的稻田每亩达到1000万只以上,造成直接水稻产量损失120万吨(程家安等,2008)。2006~2009年连续大暴发,产量损失十分惨重(农业部全国农业技术推广服务中心内部资料)。因此,研究褐飞虱暴发的生态和生理学机制、有效控制褐飞虱的发生和危害已成为水稻安全生产的当务之急。

抗虫品种的利用是防治褐飞虱最安全和经济的措施。但自20世纪70年代国际水稻研究所推广第一个抗褐飞虱品种IR26(含抗虫基因*Bph1*)以来,由于田间褐飞虱种群致害性的变异,不断出现品种抗性下降甚至抗性完全丧失的现象(陶林勇等,1992;周亦红和韩召军,2003)。褐飞虱种群对水稻致害性的快速变异,会导致以传统方式培育的抗性品种在短期内丧失抗性。因此,研究褐飞虱致害性变异机理和种群爆发机制,提出相应的控制策略具有重要意义。

在长期的协同进化过程中,昆虫与共生菌形成了密切的共生关系(Feldhaar and Gross, 2009; 徐红星等, 2009a)。共生菌合成一些寄主昆虫食物中缺乏的营养成分,以弥补其食物的不足;而昆虫为共生菌提供生境和营养(Moran, 2006; Hosokawa *et al.*, 2009)。此外,共生菌在昆虫对植物的适合度、寄主昆虫的竞争能力和对寄主植物的利用能力等方面也具有重要作用(Oliver *et al.*, 2005; Lyte *et al.*, 2009; 徐红星等, 2009b)。在豌豆蚜*Acyrtosiphon pisum*对新寄主植物的适应过程中,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,导致蚜虫很快形成新的生物型(Campbell, 1990)。Simon等(2003)

在研究取食不同寄主植物的豌豆蚜的遗传分化时,认为次生共生细菌与豌豆蚜的寄主适应与分化有某种关联。Leonardo和Muiru(2003)发现,与不感染或感染其他共生细菌的豌豆蚜比较,感染U型共生菌的豌豆蚜无法在紫花苜蓿上存活,但在白花苜蓿上的繁殖力增倍。以共生菌(类酵母菌)—褐飞虱—水稻为对象,系统研究了YLS在褐飞虱对抗虫品种致害性变异过程的作用。结果表明,YLS数量变化与褐飞虱致害性变化显著正相关(吕仲贤等,2001; Lu Z X *et al.*, 2004)。三种致害性褐飞虱体内类酵母菌在形态学上存在明显的差异(陈法军等,2006)。但进一步对其18S rDNA片段序列进行分析,结果显示3种类酵母菌株的差异极小(张珏锋等,2006)。褐飞虱体内除类酵母菌外,还存在丰富的共生细菌,如*Wolbachia*和*Arsenophonus*等(王渭霞等,2010)。Tang等(2010)建立了三个致害性种群褐飞虱体内共生细菌的16S rDNA文库,并从18个OUT中鉴定出分属4个门(*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*)的细菌种类。然而,共生菌在褐飞虱适应不同抗性品种的作用机制还有待进一步的研究。另外,共生菌传递方式多为垂直传播,通过母系遗传的方式在宿主子代群体中传播扩散(Haine, 2008; Feldhaar and Gross, 2009)。但是,部分共生细菌在除垂直传播外,在种间或种内有一定程度的水平传播。

鉴于此,本文通过对褐飞虱体内共生细菌菌群结构及其水平传播的研究,旨在结合我们以前研究的有关褐飞虱致害性变异的生物学、生态学和生理学的结果,为明确共生细菌在褐飞虱种群发展及致害性变异中所起的作用以及建立基于共生菌的微生态调控的褐飞虱综合治理新途径提供部分依据,具有重要的理论和现实意义。

第二章 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的 DGGE 解析

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 属迁飞性昆虫, 是我国稻区为害最严重的害虫, 暴发频率高, 危害发生面积大。十九世纪七十年代之前, 褐飞虱在大多亚洲水稻生产国均为次要害虫, 随着栽培制度变化, 高产品种推广和水肥条件提高以及大量化学农药的不合理使用, 褐飞虱成为水稻上危害最严重的害虫之一(程遐年等, 2003; 程家安等, 2008)。近年来, 褐飞虱在多数东南亚各水稻生产国也是偏重发生 (Savary *et al.*, 2012)。2005年, 褐飞虱在我国特大爆发, 造成了大面积的“虱烧”和巨大的产量损失(程家安等, 2008), 仅浙江省就损失了120万吨(陆剑飞和黄国洋, 2006)。褐飞虱在长江中下游稻区不能越冬, 其虫源每年春夏之交从中南半岛及我国南方稻区等地迁飞而来, 6、7月份大量迁入我国水稻主产区(巫国瑞等, 1997; 翟保平, 2011), 但正确探测褐飞虱的虫源地及其迁飞途径仍十分困难, 其初始虫源地仍存在争议(翟保平, 2011)。抗虫品种的利用是防治褐飞虱最安全和经济的措施。自20世纪70年代国际水稻研究所推广的第一个抗褐飞虱水稻品种IR26以来, 由于褐飞虱致害性变异, 不断出现品种抗性下降甚至抗性完全丧失的现象 (Lu *et al.*, 2004; 徐红星等, 2008; 陈峰等, 2009; Horgan, 2009)。褐飞虱种群致害性变异, 成为了抗虫育种和褐飞虱防治的主要障碍(李青等, 1999; 吕仲贤等, 2001)。因此, 研究褐飞虱致害性变异机理和种群爆发机制, 提出相应的控制策略具有重要意义。

在长期协同进化过程中, 昆虫与其体内共生菌 (endosymbiont) 形成了密切的共生关系 (Moran, 2006)。昆虫为共生菌提供了生境和营养, 而共生菌则为合成一些寄主昆虫食物中缺乏的营养成分, 以弥补其不足 (王国超等, 2005a; 徐红星等, 2009a; Feldhaar and Gross, 2009; Hosokawa *et al.*, 2009)。我们以共生菌 (类酵母菌)-褐飞虱-水稻为对象, 系统研究了体内类酵母菌在褐飞虱对抗虫品种致害性变异过程的作用。结果表明, 褐飞虱体内共生酵母菌的数量与褐飞虱致害性变化呈显著正相关 (吕仲贤等, 2001; 陈峰等, 2009)。但进一步对其18S rDNA片段序列进行分析, 结果显示3种类酵母菌株的差异极小 (张珏锋等, 2006)。而研究表明, 共生细菌在昆虫对植物的适合度、寄主昆虫的竞争能力和

对寄主植物的利用能力等方面具有重要作用 (Oliver *et al.*, 2005; Lyte *et al.*, 2009)。如豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 对新寄主植物的适应过程中, 共生菌遗传基因的易变性, 导致蚜虫很快形成新的生物型 (Campbell, 1990)。Simon 等 (2003) 在研究取食不同寄主植物的豌豆蚜的遗传分化时, 认为次生共生细菌与豌豆蚜的寄主适应与分化有某种关联。Tang 等 (2010) 建立了三个致害性种群褐飞虱体内共生细菌的 16S rDNA 文库, 并从 18 个 OUT 中鉴定出分属 4 个门 (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*) 的细菌种类。但细菌在褐飞虱致害性变异过程中作用还很少有报道。本文以变性梯度凝胶电泳 (Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 的方法分析褐飞虱体内细菌的群落结构, 以期从细菌群落动态变化探明其在褐飞虱致害性变异中的作用, 为人为合理调控褐飞虱体内菌群结构及褐飞虱的合理控制提供理论依据。

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

2.1.1.1 水稻品种: 感虫水稻品种 TN1、抗虫品种 ASD7 (含 *bph2* 基因) 和 Mudgo (含 *Bph1* 基因) 均由国际水稻研究所提供)。种子于室内催芽后, 播于浙江省农科院温室水槽内, 2 叶 1 心时将秧苗移栽于直径为 9cm 的盆钵中, 常规肥水管理。45-60 天苗龄的水稻植株供饲养虫和试验用。

2.1.1.2 褐飞虱: **不同致害性褐飞虱**: 分别在感虫品种 TN1 和抗虫品种 ASD7 (含 *bph2* 基因)、Mudgo (含 *BPH1* 基因) 上取食 140 代以上形成的 TN1 种群、ASD7 种群和 Mudgo 种群, 由中国水稻所提供。**不同地理种群褐飞虱**: 分别采自越南、菲律宾、泰国、广西、海南、云南、湖南和浙江, -70℃ 保存。

2.1.1.3 稻虱缨小蜂 *Anagrus nilaparvatae*: 用带褐飞虱卵的水稻苗从田间诱集后在浙江省农科院人工气候室内连续饲养。把褐飞虱接入笼罩着的水稻苗产卵 24 小时, 然后撤除笼罩和褐飞虱后把水稻苗放到浙江省农科院水稻田。诱集 48h 后, 把带卵水稻苗搬回 26±1℃、相对湿度 70-90%、L12:D12 的人工气候室中,

每丛带卵水稻苗分别用外面黑布包裹的聚乙烯笼罩（高 60cm，直径 9cm）罩住，顶部开一直径为 1cm 的小口并接上一个倒置的透明玻璃管（直径 1cm、长 6cm）。稻虱缨小蜂羽化后每天更换玻璃管，并分批将玻璃管内经分离鉴定后的稻虱缨小蜂接入罩有带新鲜褐飞虱卵的水稻苗的笼罩内繁殖，稻虱缨小蜂成虫供试验用。

2.1.1.4 黑肩绿盲蝽 *Cytorhinus lividipennis*: 成虫采自中国水稻研究所试验田，用含褐飞虱卵的 45 日龄 TN1 水稻苗在浙江省农科院温室内饲养，每 3~5 天更换含褐飞虱卵的水稻苗。羽化后的黑肩绿盲蝽成虫供试验用。

2.1.1.5 引物: 上下游引物分别为 341f + GC (5'-CGCCCG CCG CGCCCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCGCCC CCT ACG GGA GGC A GC A G-3') 和 517 r (5'-ATTACC GCGGCT GCT GG-3')，由上海生工生物技术有限公司合成。

2.1.2 方法

2.1.2.1 基因组总 DNA 的提取

采用酚-氯仿法提取。分别取 10 头各龄期的褐飞虱放入 2mL 的离心管中，加入 500 μ L 的提取缓冲液（2% (W/V) CTAB, 1 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA and 50 mmol/L Tris-Cl, pH8.0）匀浆，加入终浓度为 4 mg/mL 溶菌酶，37℃ 水浴 1h。然后加入终浓度为 2 mg/mL 的蛋白酶 K 和 1% 的十二烷基硫酸钠溶液，混匀，55℃ 水浴 2h。之后参照 Fuhrman 等（1988）的方法进行，最后用 25 μ L 65℃ 预热的 dd H₂O 溶解 DNA，备用。

2.1.2.2 16S rDNA V3 区域的 PCR 扩增

以提取的总 DNA 为模板，采用 16S rDNA 基因 V3 可变区特异性的引物对 341f + GC 和 517 r 为上下游引物，扩增产物长约 200 bp，用于 DGGE 分析。

PCR扩增体系为：在0.2mL的PCR管中加入（总反应体系为50 μ L）：10 $\times$ PCR buffer（含Mg²⁺）2.5 μ L，2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L，上下游引物（10 μ mol/L）各0.5 μ L，Taq酶（5 U/ μ L）0.5 μ L，DNA 模板2 μ L，dd H₂O补足至50 μ L。

PCR反应条件：采用降落式PCR，94 $^{\circ}$ C预变性5 min；前10个循环为94 $^{\circ}$ C 1min，65 $\sim$ 55 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 45 s，其中每个循环后复性温度下降1 $^{\circ}$ C；后14 个循环为94 $^{\circ}$ C 1 min，55 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 45 s；最后72 $^{\circ}$ C延伸8min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测后，于4 $^{\circ}$ C保存备用。

2.1.2.3 变性梯度凝胶电泳（DGGE）

采用Bio-rad 公司DGGE 分析系统进行试验。8%聚丙烯酰胺（37.5：1），变性剂尿素与去离子甲酰胺的线性梯度为40% $\sim$ 60%。在60 $^{\circ}$ C、80V下电泳10h，用EB染色后拍照。利用Bio-Rad分析软件Quantity one 对图谱进行分析。

2.2 结果与分析

2.2.1 不同龄期褐飞虱体内共生细菌的比较

褐飞虱体内细菌菌群的 16 S rDNA V3 可变区的 PCR-DGGE 指纹图谱见图 2.1。不同龄期褐飞虱体内细菌的 16 S rDNA V3 片段的电泳条带数目和亮度均存在一定的差异。不同龄期的褐飞虱样品均有 1 $\sim$ 3 条较亮的条带，即为褐飞虱体内的优势种。

对 DGGE 图谱进行统计分析的结果如图 2.2 所示，1 龄 $\sim$ 5 龄若虫体内细菌的菌群结构随其生长发育发生较明显的变化，而羽化后的成虫与 1 龄的若虫之间具有较高菌群结构相似性。

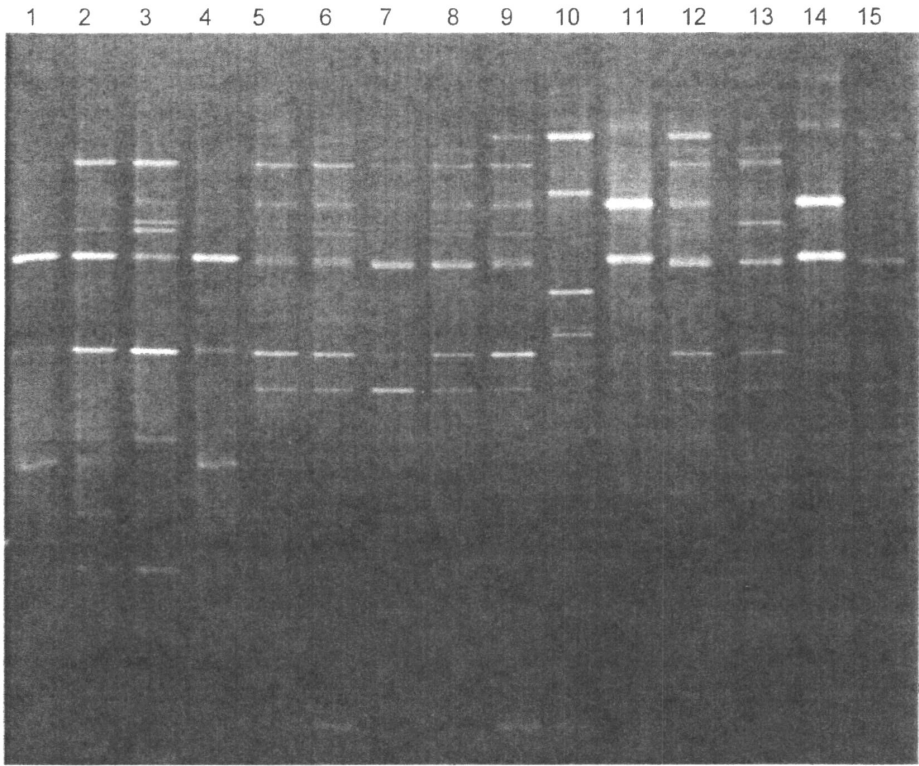


图2.1 不同龄期褐飞虱体内细菌的DGGE图谱

Fig. 2.1 DGGE profile of 16S rDNA gene fragments of bacteria in different instars BPH.

(Note: lane 1 is the first instar BPH, lane 2 is the second instar BPH, lane 3 is the third instar BPH, lanes 4 and 5 are the 4th instar BPH, lanes 6 and 7 are the 5th instar BPH, lanes 8 and 9 are brachypterous female BPH, lanes 10 and 11 are brachypterous male BPH, lanes 12 and 13 are macropterous female BPH, and lanes 14 lane and 15 are macropterous female BPH.)

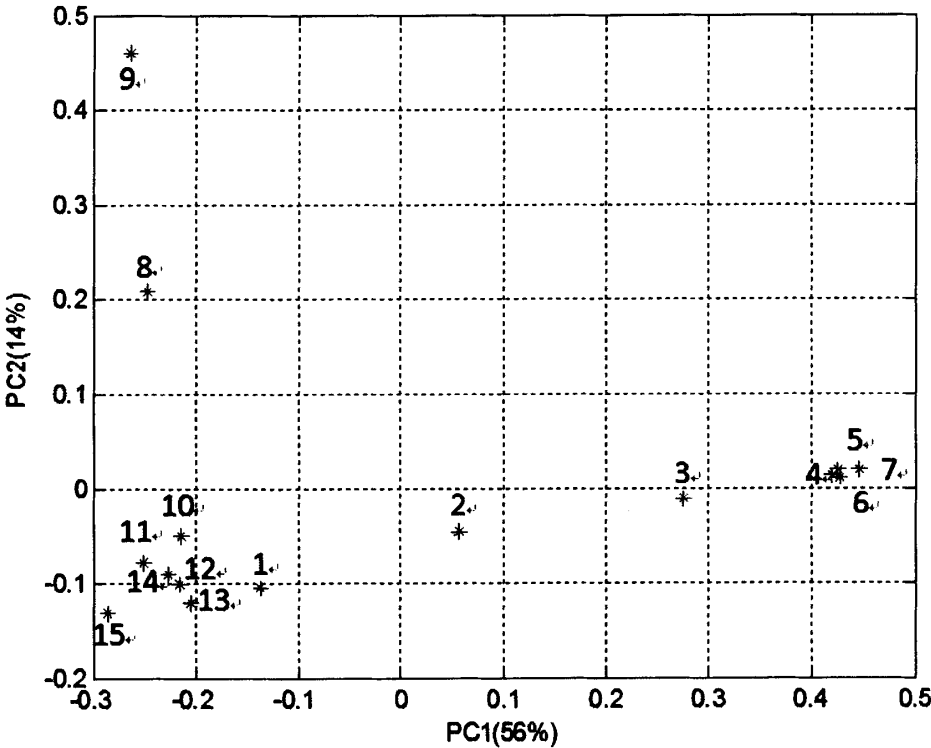


图2.2 不同龄期褐飞虱体内细菌的DGGE分析结果

Fig. 2.2 PCA of DGGE profiles of Fig. 2.1. Only the first principal component (PC1) and the second principal component (PC2) were shown. The plots (*) indicate the bacterial community structure of the samples. The numbers indicate the instars which were the same with Fig. 2.1.

2.2.2 不同地理种群褐飞虱体内细菌菌群结构的比较

结果如图2.3所示，各泳道均有较多的条带，表明不同地理种群褐飞虱雌成虫体内均存在丰富的细菌种群。每个样品较亮的条带数不同，表明不同地理种群褐飞虱体内的优势种类不一样。但各不同地理种群褐飞虱有位置一致的条带存在，说明这些不同种群的褐飞虱存在共有的细菌种类。以UPGMA法对样品DGGE图谱进行聚类分析，结果见图2.4。9个地理种群褐飞虱根据其体内细菌的DGGE图谱的聚类分析结果可分为3组，菲律宾单独一组，泰国海南、云南和浙江种群为

一组，越南、广西、湖南和江西种群为一组。

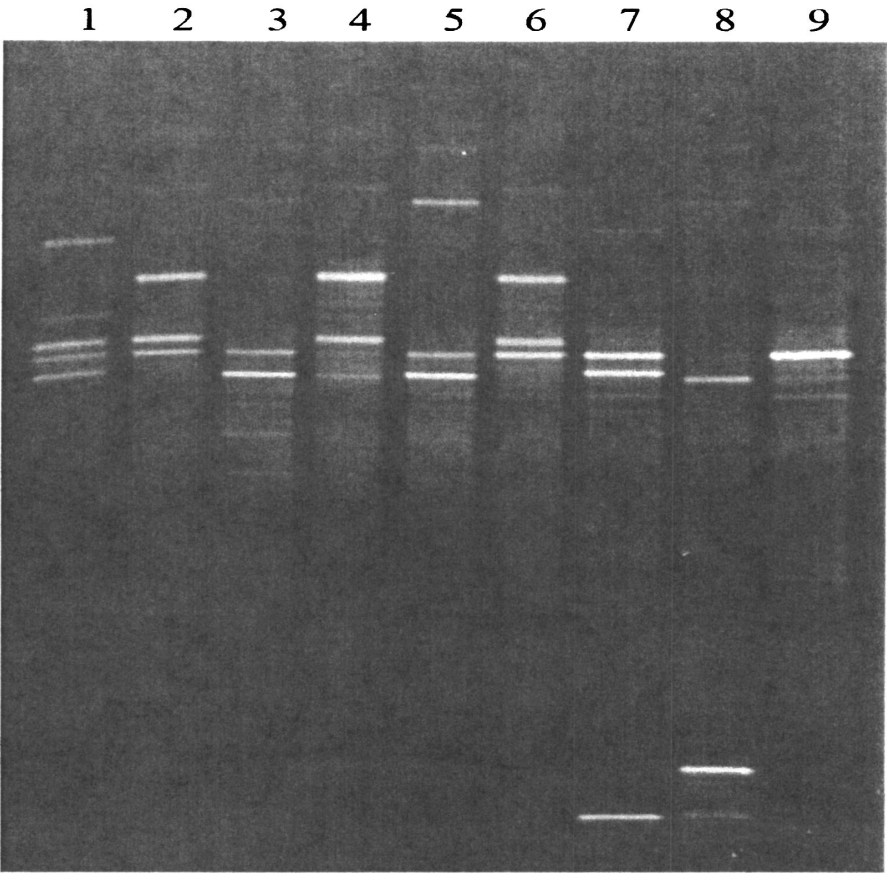


图2.3 不同地理种群褐飞虱体内细菌的DGGE图谱

Fig. 2.3 DGGE profile of 16S rDNA gene fragments of bacteria in different geographic populations of BPH.

(Note: lanes 1 to 9 are the female adult BPH collected from Philippines, Thailand, Vietnam, Hainan, Guangxi, Yunnan, Hunan, Jiangxi and Zhejiang province of China, respectively)

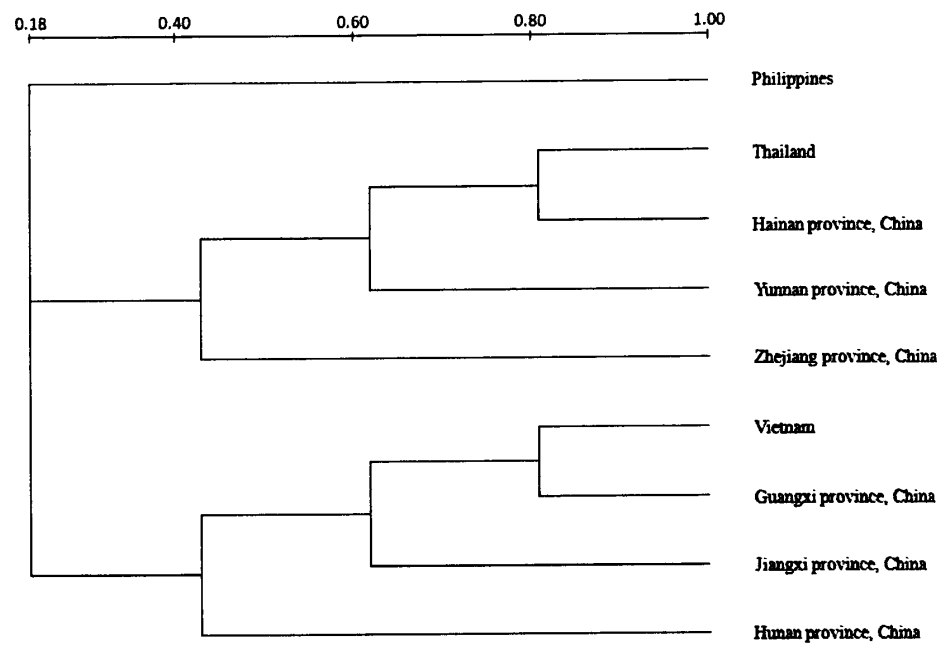


图2.4 不同地理种群褐飞虱体内细菌的DGGE分析结果

Fig. 2.4 The cluster analysis of DGGE profiles of 16S rDNA gene fragments of bacteria in different geographic populations of BPH

2.2.3 不同致害性的褐飞虱体内细菌菌群结构的差异

如图2.5和图2.6所示，取食感虫品种的TN1种群体内细菌群落结构明显与取食抗虫品种的ASD7种群和Mudgo种群不同，优势种的种类和数量也不同。但取食不同抗性基因水稻品种的ASD7种群和Mudgo种群之间的差异还未能有效区分开来。

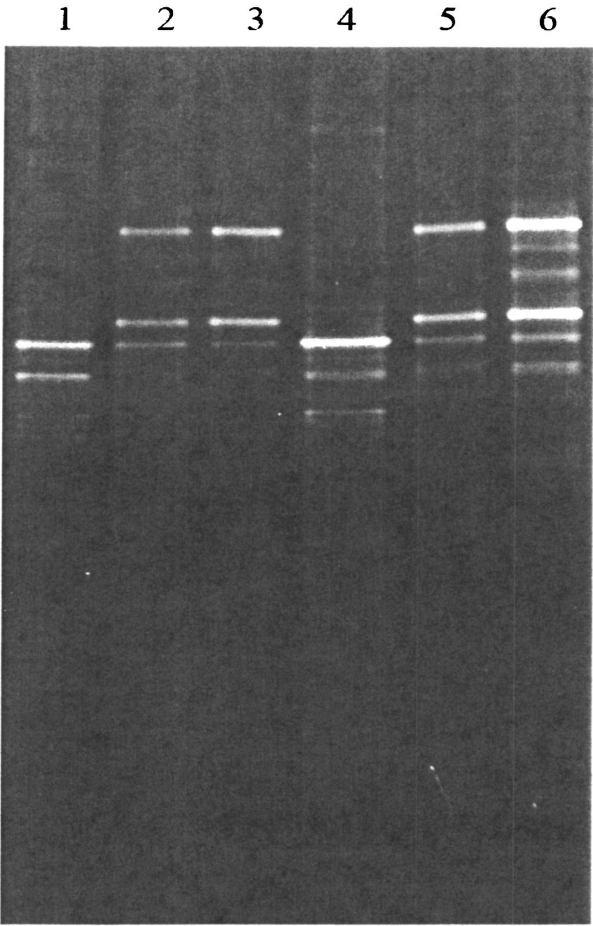


图2.5 不同致害性种群褐飞虱体内细菌的DGGE图谱

Fig. 2.5 DGGE profile of 16S rDNA gene fragments of bacteria in BPH populations with different virulence

(Note: lanes 1 to 3 are the 5th instar nymph of BPH TN1 population, ASD7 population and Mudgo population. Lanes 4 to 6 are brachypterous female BPH of TN1 population, ASD7 population and Mudgo population.)

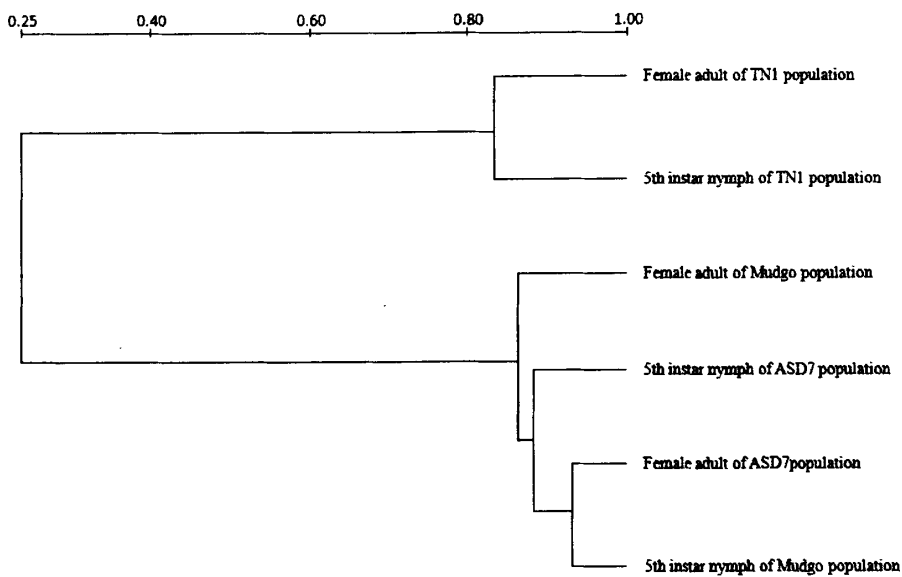


图 2.6 不同致害性种群褐飞虱体内细菌的 DGGE 分析结果

Fig. 2.6 The cluster analysis of DGGE profiles of 16S rDNA gene fragments of bacteria in BPH populations with different virulence

2.2.4 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌菌群结构的比较

从 DGGE 的电泳图谱（图 2.7）来看，褐飞虱与水稻植株、天敌稻虱缨小蜂和黑肩绿盲蝽之间有部分相同的条带，即相同的细菌种类，但更多的是不同的种类，尤其是优势种类几乎完全不一样。从聚类分析结果（图 2.8）来看，DGGE 法可以将水稻植株、褐飞虱及其天敌体内细菌的菌群结构区分出来，但仍无法有效区分不同位置的条带所代表的种类。

2.3 讨论

许多微生物都与寄主之间形成了密切的共生关系。初生内共生菌与宿主进化关系的一致性，次生内共生菌遗传多样性与可塑性及与宿主之间系统发育的不一致性，对研究昆虫的系统进化及其生物多样性，都是很好的证据（Sandstrom *et al.*, 2001）。

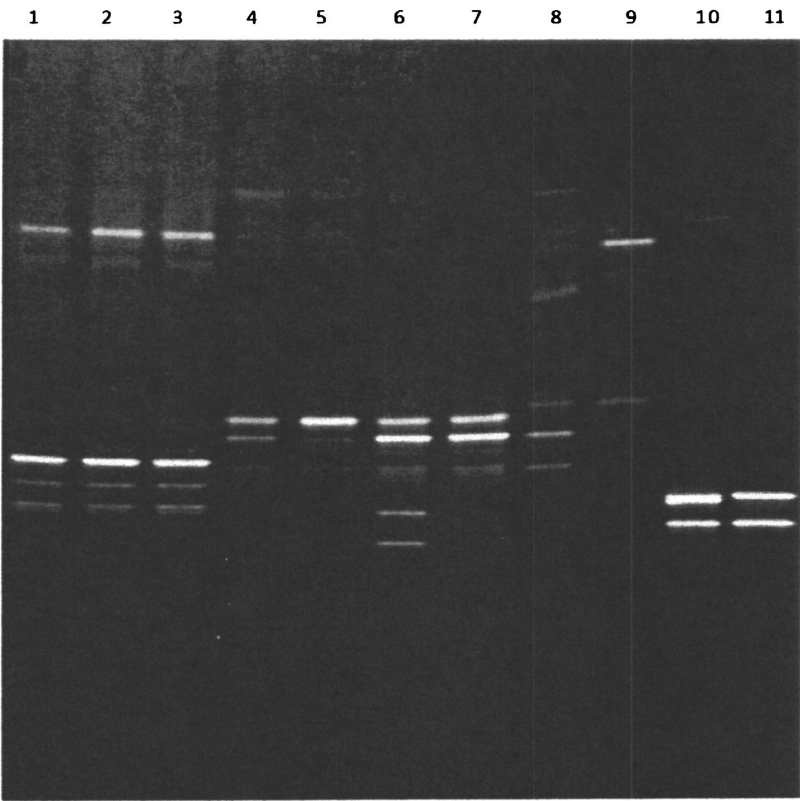


图 2.7 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的 DGGE 图谱

Fig. 2.7 DGGE profile of 16S rDNA gene fragments of bacteria in different rice varieties, BPH populations with different virulence and natural enemies

(Note: lanes 1 to 3 are rice plants of TN1, ASD7 and Mudgo, respectively. 4-7 are the 3th instar, 4th instar nymph, brachypterous female and male adult of BPH, 8-9 are female and male adult of parasitoid *Anagrus nilaparvatae* and 9-11 are female and male adult of predator *Cyrtorhinus lividipennis*, respectively.)

体内共生菌由于难以人工培养，故一直难以被详细的研究（Moran, 2006）。现代分子生物学研究方法和技术手段的不断发展和应用，使得近十几年来关于昆虫体内共生菌的研究有了很大进展。与传统的微生物研究方法相比，分子生物学技

术以 PCR 为基础，具有快速便捷的特点，即不需要进行共生菌的离体培养，这就大大地简化了试验工作。

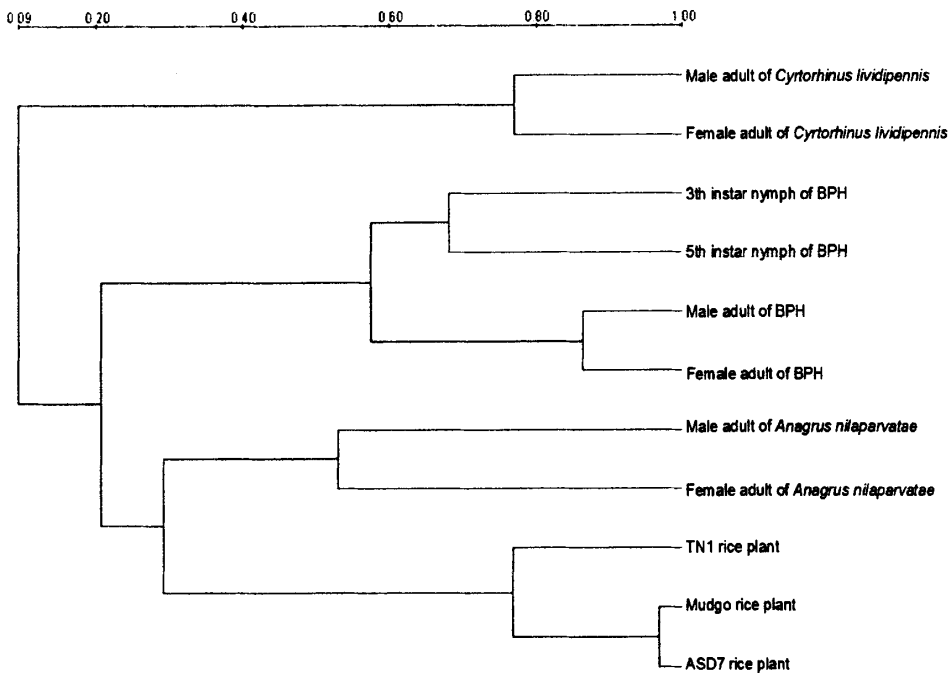


图 2.8 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的 DGGE 分析结果

Fig. 2.8 Cluster analysis of DGGE profiles of 16S rDNA gene fragments of bacteria in different rice varieties, BPH populations with different virulence and natural enemies

王渭霞等（2010）报道了从褐飞虱体内鉴定出共生菌 *Arsennophonus*，且 TN1 种群褐飞虱体内该菌的数量高于 ASD7 和 Mudgo 种群褐飞虱。Tang 等（2010）建立了三个致害性种群褐飞虱体内共生细菌的 16S rDNA 文库，并从 18 个 OUT 中鉴定出分属 4 个门（*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 和 *Bacteroidetes*）的细菌种类。变性梯度凝胶电泳（DGGE）自被 Muyzer 等（1993）引入微生态的研究后，越来越多地运用在了环境微生物生态、人类和动物肠道微生物生态等

的分析,这一技术能较好地解决大多数细菌的不可培养性对研究造成的困难 (Sekiguchi *et al.*, 2002; 倪学勤等, 2009)。我们也用这一方法比较了菲律宾和中国稻虱缨小蜂体内 *Wolbachia* 的差异,结果表明该方法可有效地检测昆虫体内 *Wolbachia* (刘淑平等, 2011)。

本文结果表明,1 龄~5 龄若虫体内细菌的菌群结构随其生长发育发生较明显的变化,而羽化后的成虫与 1 龄的若虫之间具有较高菌群结构相似性。究其原因可能是羽化的过程可能造成羽化后的成虫与 5 龄若虫之间的菌群结构发生了较大的变化,而低龄若虫可能因卵传细菌而与成虫体内细菌的菌群结构较为相似。而不同地理种群褐飞虱体内细菌的 DGGE 结果表明,9 个地理种群褐飞虱根据其体内细菌的 DGGE 图谱的聚类分析结果可分为 3 组,菲律宾单独一组,泰国海南、云南和浙江种群为一组,越南、广西、湖南和江西种群为一组,这与褐飞虱的迁飞途径(巫国瑞等, 1997; Otuka *et al.*, 2008)极其相似,表明越南和泰国可能是我国褐飞虱的有效虫源(翟保平, 2011)。尽管该结果还有待进一步与褐飞虱的系统发育信息进行验证,但褐飞虱体内细菌群落的分析也为研究其迁飞途径提供了一种方法。对不同样品 16S rDNA V3 区的 PCR-DGGE 指纹图谱中共性条带和特异性条带分别进行了割胶回收、克隆和测序,其结果将另文报道。取食感虫品种的 TN1 种群体内细菌群落结构明显与取食抗虫品种的 ASD7 种群和 Mudgo 种群不同,但 PCR-DGGE 方法还未能有效区分取食不同抗虫水稻品种的褐飞虱,还需要进一步优化条件再进行研究。

另外,从水稻-褐飞虱-天敌三者体内细菌的 DGGE 比较的结果来看,感虫水稻品种 TN1、抗性品种 ASD7 和 Mudgo 体内细菌的菌群结构之间无显著的差异。褐飞虱与水稻植株、天敌黑肩绿盲蝽之间有部分相同的细菌种类,但更多的是不同的种类,尤其是优势种类几乎完全不一样。从菌群结构上,通过 DGGE 的方法可以明显区分出水稻植株、褐飞虱及其天敌体内的细菌,但无法区分出不同条带所代表的种类,因此,有待于进一步研究。

第三章 褐飞虱适应抗性品种过程中体内共生细菌的变化

抗虫品种的利用是防治褐飞虱最安全和经济的措施。然而,自70年代国际水稻研究所推广的第一个抗褐飞虱水稻品种IR26(具有Bphl基因)以来,由于田间褐飞虱种群发生致害性变异,品种抗性下降甚至抗性完全丧失(陶林勇等,1992;周亦红和韩召军,2003)。褐飞虱种群对水稻致害性的快速变异,可导致以传统方式培育的抗性品种可在短期内丧失抗性。

共生菌在昆虫对植物的适合度、寄主昆虫的竞争能力和对寄主植物的利用能力等方面也具有重要作用(Oliver *et al.*, 2005; Lyte *et al.*, 2009; 徐红星等, 2009b)。有关稻飞虱共生细菌的定性研究已有报道。Tang 等(2010)建立了三个致害性种群褐飞虱体内共生细菌的16S rDNA文库,并从18个OUT中鉴定出分属4个门(*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Bacteroidetes*)的细菌种类。刘玉坤(2011)分别利用特异性引物,检测了3种稻飞虱(褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱)体内共生细菌的感染率,结果表明, *Arthrobacter*、*Chryseobacterium*在3种稻飞虱体内感染率均较高, *Serratia*、*Wolbachia*、*Arsenophonus*、*Acinetobacter*和 *Cardinium*均至少有一种飞虱的感染率较低($\leq 30\%$); *Serratia*和 *Wolbachia*在灰飞虱和白背飞虱中的感染率明显高于褐飞虱, *Cardinium*和 *Acinetobacter*在白背飞虱中的感染率高于灰飞虱和褐飞虱, *Arsenophonus*则是褐飞虱的感染率较高。然而,共生菌在褐飞虱适应不同抗性品种的作用机制还有待进一步的研究。

实时荧光定量PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)是美国Applied Biosystems公司在PCR技术基础上发展起来的一种高度灵敏的核酸定量技术,由于该技术不仅实现了PCR从定性到定量的飞跃,而且与常规PCR相比,它具有特异性更强、自动化程度高等特点,已被广泛应用到生物学、医学、农业、食品、环保等领域,涉及到分子检测、基因表达、核酸多态性分析和基因突变分析等方面的研究(王光华等,2008)。王渭霞等(2010)报道了从褐飞虱体内鉴定出共生菌*Arsennophonus*,并利用荧光定量PCR

技术检测到TN1种群褐飞虱体内该菌的数量高于ASD7和Mudgo种群褐飞虱，并推测该菌在褐飞虱致害性变异过程中可能起着重要作用。本文根据5种常见的共生细菌的16S rDNA设计了特异性引物，利用荧光定量PCR技术检测了3个致害性种群褐飞虱在适应不同抗性品种过程中体内共生细菌的数量变化，旨在为明确共生细菌在褐飞虱致害性变异过程中的作用提供依据。

3.1 材料与方法

3.1.1 材料

3.1.1.1 水稻品种：感虫水稻品种TN1、抗虫品种ASD7（含bph2基因）和Mudgo（含Bph1基因）均由国际水稻研究所提供）。种子于室内催芽后，播于浙江省农科院温室水槽内，2叶1心时将秧苗移栽于直径为9cm的钵钵中，常规肥水管理。45-60天苗龄的水稻植株供饲养虫和试验用。

3.1.1.2 褐飞虱：分别取在感虫品种 TN1 和抗虫品种 ASD7、Mudgo 上取食 140 代以上形成的 TN1 种群、ASD7 种群和 Mudgo 种群（由中国水稻所提供）成虫，分别交叉接到不同水稻品种（TN1 种群—Mudgo 和 ASD7 稻株、Mudgo 种群—TN1 和 ASD7 稻株、ASD7—Mudgo 和 ASD7 稻株）上产卵，待孵化后记为 F1 代，并在相应的品种上连续饲养 6 代。取各代羽化 24h 内的雌成虫，供试验用。

3.1.1.3 稻虱缨小蜂：用带褐飞虱卵的水稻苗从田间诱集后在浙江省农科院人工气候室内连续饲养。把褐飞虱接入笼罩着的水稻苗产卵 24 小时，然后撤除笼罩和褐飞虱后把水稻苗放到浙江省农科院水稻田。诱集 48h 后，把带卵水稻苗搬回 $26\pm1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 70-90%、L12:D12 的人工气候室中，每丛带卵水稻苗分别用外面黑布包裹的聚乙烯笼罩（高 60cm，直径 9cm）罩住，顶部开一直径为 1cm 的小口并接上一个倒置的透明玻璃管（直径 1cm、长 6cm）。稻虱缨小蜂羽化后每天更换玻璃管，并分批将玻璃管内经分离鉴定后的稻虱缨小蜂接入罩有带新鲜褐飞虱卵的水稻苗的笼罩内繁殖，稻虱缨小蜂成虫供试验用。

3.1.1.4 黑肩绿盲蝽：成虫采自中国水稻研究所试验田，用含褐飞虱卵的 45 日龄 TN1 水稻苗在浙江省农科院温室内饲养，每 3~5 天更换含褐飞虱卵的水稻苗。羽化后的黑肩绿盲蝽成虫供试验用。

3.1.2 方法

3.1.2.1 基因组 DNA 提取

采用酚-氯仿法提取总DNA。分别取10头各龄期的褐飞虱放入2mL的离心管中，加入500 μ L的提取缓冲液(2% (W/V) CTAB, 1 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA and 50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0) 匀浆，加入终浓度为4 mg/mL溶菌酶，37℃水浴1h。然后加入终浓度为2 mg/mL的蛋白酶K和1%的十二烷基硫酸钠溶液，混匀，55℃水浴2h。之后参照Fuhrman等（1988）的方法进行，最后用25 μ L 65℃预热的 dd H₂O溶解 DNA，备用。

3.1.2.2 引物设计与合成

根据之前报道的 5 种共生菌 (*Arthrobacter*、*Arsenophonus*、*Acinetobacter*、*Chryseobacterium* 和 *Serratia*) 16S rDNA 的序列，利用 premier 5 软件设计定量引物（表 3.1），引物除遵循普通引物的设计原则外，3'端还需避开 T 及需要在整个基因序列中检索它的特异性。扩增片段长度均在 100-250 bp 间。引物由上海 Invitrogen 公司合成。选取褐飞虱 18S rDNA 基因做为内参基因。在反应体系最终确立前，要进行引物特异性、引物标准曲线、引物浓度、退火温度和模板浓度的摸索，使得引物的溶解曲线拥有单一峰，即特异性强，同时尽量使得引物和 18S rDNA 基因的扩增效率和退火温度一致。

3.1.2.3 qRT-PCR 测定不同共生菌的变化

通过定量 PCR 测定出的 5 种共生菌的 CT 值，每管样品的三个复孔取平均值用于计算（数值相差在 0.5 以内可用，3 个数值中有 2 个或 3 个接近，数值可用，否者重做），每样品有 3 组数值，即最后得到的数据为平均值 $\pm$ 9 个重复。再通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。最后将换算出的值运用 Sigmaplot 12.5 绘图并用 SPSS13.0

进行方差分析。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 具体计算公式如下： $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-[(CT_{待测组} - CT_{待测 18S rDNA}) - (CT_{对照组} - CT_{对照 18S rDNA})]}$ 。

表 3.1 所用引物序列

Table 3.1 Primer sequences used in qRT-PCR	
引物名称	引物序列
ACI-F	5-GGAGGAATACCGATGGCG-3
ACI-R	5-TGAGTTTTAGTCTTGCGACCGT -3
ARE-F	5-GAAGAAGCACCGGCTAACTC-3
ARE-R	5-CCTCCACATCTCTACGCAT-3
ARTHF	5-CAAGGCGACGACGGGTAG-3
ARTHR	5-TTAGCCGGCGCTTCTTCTGC-3
CAR-F	5-AAGGTGCAAGCGTTATCCG-3
CAR-R	5-GACCAGTAAGCTGCCTACGC-3
CHRY-F	5-AGGTAACGGCTCACCAAGTC-3
CHRY-R	5-TCCTCACTGCTGCCTCCC-3
SER-F	5-GGCGGACGGGTGAGTAAT-3
SER-R	5-GGGCACATCTGATGGCAAG-3
Nil18S-F	5-TAGGACCTCGGTTCTATTTTGTTG -3
Nil18S-R	5-GCTGGCAGGCATTGTTTATG -3

PCR 反应体系:

试 剂	体 积
SYBR Premix	10 μl
primer F (10 pmol)	1 μl
primer R (10 pmol)	1 μl
模板 DNA	1 μl
RNase Free ddH ₂ O	补足反应体积至 20 μl

PCR 反应基本程序为:

95 ℃预变性 3 min; 然后 95℃变性 5 s, 再是 55℃-62.5℃ 退火延伸 25 s (循环 40 次), 最后是 65℃-95℃溶解曲线的绘制。

引物标准曲线的制作

将同一模板进行至少五个梯度的稀释 (10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 和 10^{10}), 然后按照反应体系和条件进行标准曲线的制作。选择与 18S rDNA 的扩增效率相近的特异性较好的引物。

3.2 结果与分析

3.2.1 三个致害性种群褐飞虱共生菌组成及优势菌

三个致害性种群褐飞虱体内 5 种共生菌的数量如表 3.1 所示, 其中 *Chryseobactium* 在三个种群褐飞虱体内均为优势菌, 占一半以上。在 TN1 种群中 *Acinetobacter* 含量仅次于 *Chryseobactium*, 其它三种共生菌数量无显著差异。在 ASD7 种群中, *Chryseobactium* 占绝对优势。Mudgo 种群中除 *Chryseobactium* 以外, *Arsenophonus* 和 *Serratia* 次之, 数量相近, 但与其余两种共生菌数量无显著性差异。而在 ASD7 种群中, *Arthrobacter* 和 *Acinetobacter* 数量低于 *Chryseobacterium*, 但四种共生细菌的数量均显著低于 *Chryseobacterium*。

表 3.2 三个致害性种群褐飞虱体内共生菌的数量比较

Table 4.1 Numbers of endosymbiont bacteria in BPH populations with different virulence to resistant rice varieties

共生菌	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群
<i>Acinetobacter</i> (ACI)	7.15±2.66 b	0.05±0.02 b	1.10±0.81 b
<i>Arsenophonus</i> (ARSE)	1.63±0.54 c	0.00098±0.00025 b	3.55±2.27 ab
<i>Chryseobactium</i> (CHR)	12.34±2.96 a	5.35±0.36 a	11.20±5.08 a
<i>Serratia</i> (SER)	1.25±0.39 c	0.00024±0.00014 b	3.19±2.02 ab
<i>Arthrobacter</i> (ARTH)	1.79±0.37 c	0.33±0.02 b	1.17±0.45 b

3.2.2 TN1 种群适应抗虫品种 ASD7 和 Mudgo 过程中体内共生菌的变化

适应感虫品种 TN1 的褐飞虱种群转移到抗性品种 ASD7 和 Mudgo 上，体内共生菌的数量变化如图 3.1 所示。当转移到 ASD7 上之后，优势菌仍为 *Chryseobactium*，但原来仅次于 *Chryseobactium* 的 *Acinetobacter* 数量下降至与其它几种共生菌无显著性差异。而当被转移到 Mudgo 上之后，*Serratia* 和 *Arsenophonus* 显著增加，取代 *Chryseobactium* 成为优势菌，但在饲养 2 代之后，显著下降至与其它 3 种共生菌无显著性差异。

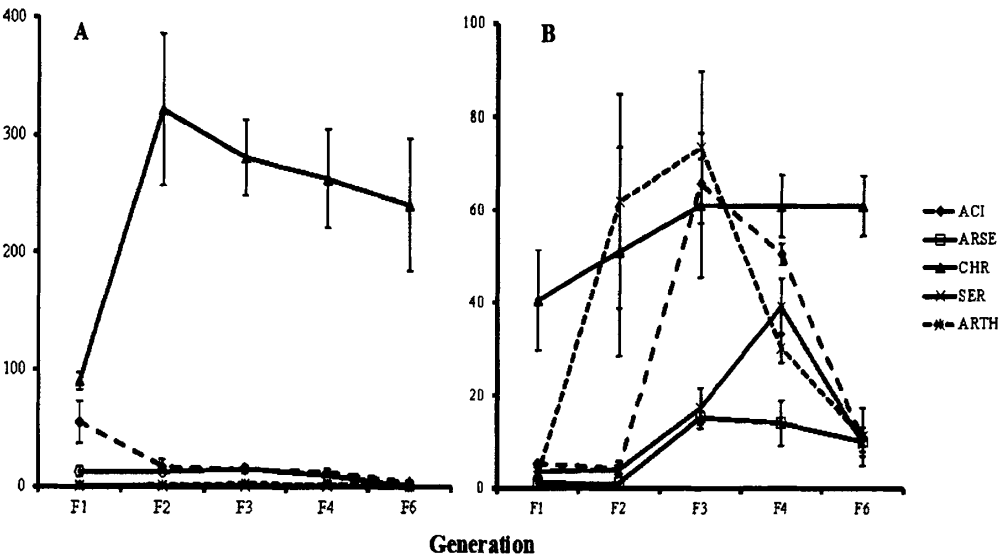


图 3.1 TN1 种群适应抗虫品种 ASD7 和 Mudgo 过程中体内共生菌的变化

Fig. 3.1 Dynamics of endosymbiont bacteria in adaption of TN1 populaiaon BPH to resistant rice varieties ASD7 and Mudgo

(Note: A- TN1 population BPH was transferred to ASD7 rice plants; B- TN1 population BPH was transferred to Mudgo rice plants)

3.2.3 ASD7 和 Mudgo 种群转移到感虫品种 TN1 上体内共生菌的变化

当适应抗性品种的 ASD7 和 Mudgo 种群褐飞虱转移到感虫品种 TN1 上后，ASD7 种群褐飞虱体内共生菌菌群结构无显著的变化。而 Mudgo 种群褐飞虱体

内 *Acinetobacter* 和 *Arthrobacter* 数量短暂上升，2 代之后恢复到原来的水平（图 3.2）。

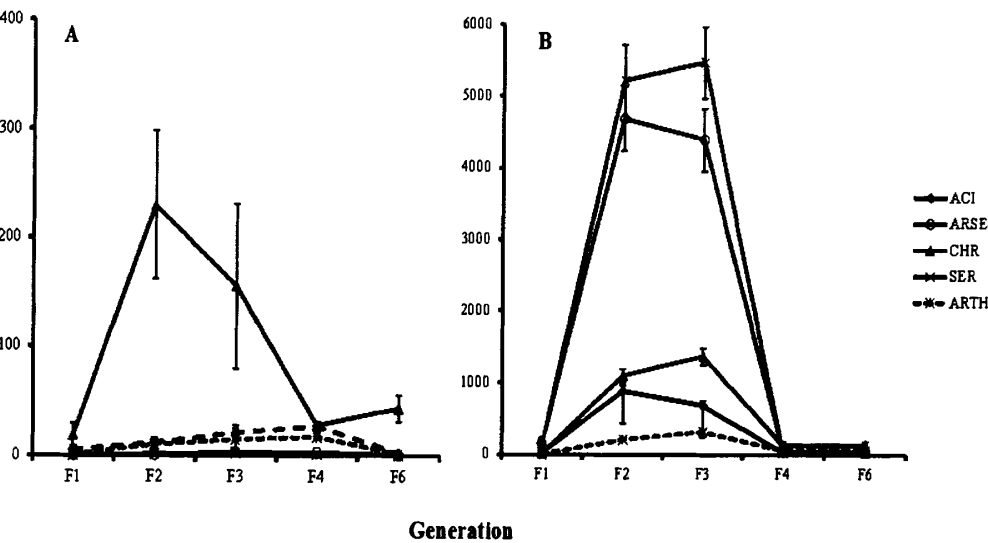


图 3.2 ASD7 和 Mudgo 种群转移到感虫品种 TN1 上体内共生菌的变化

Fig. 3.2 Dynamics of endosymbiont bacteria in BPH adults of ASD7 and Mudgo populaitions fed on susceptible rice variety TN1

(Note: A- ASD7population BPH was transferred to TN1 rice plants; B- Mudgo population BPH was transferred to TN1rice plants)

3.2.4 ASD7 和 Mudgo 种群在适应抗虫品种过程中体内共生菌的变化

Mudgo 种群褐飞虱转移到 ASD7 水稻植株上，其体内各共生菌数量有一定的波动，但菌群结构变化不大。而 ASD7 种群转移到 Mudgo 水稻植株上之后，菌群结构发生显著性的变化，*Serratia* 和 *Arsenophonus* 显著增加，取代 *Chryseobactium* 成为优势菌，尽管 1 代之后 *Serratia* 和 *Arsenophonus* 数量显著下降，但仍然高于 *Chryseobactium*（图 3.3）。

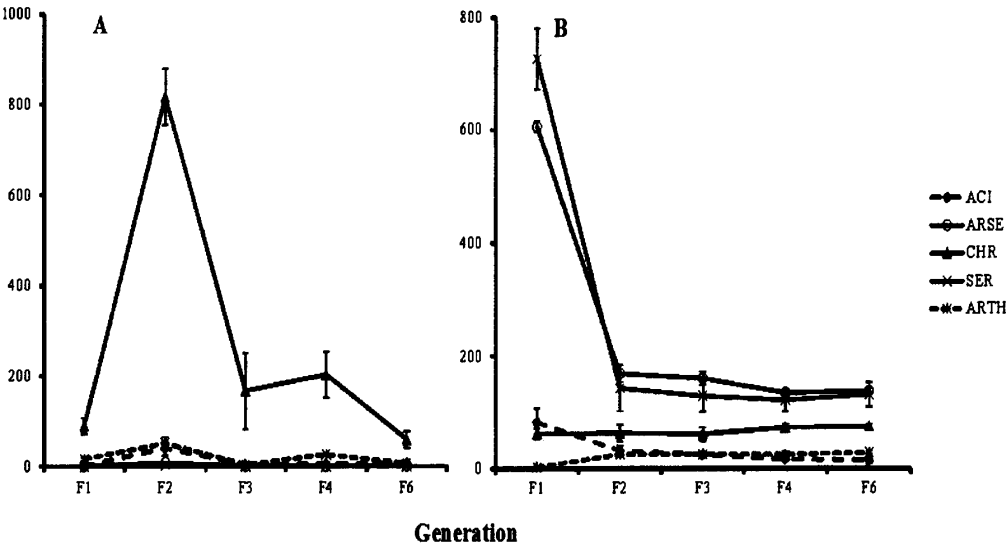


图 3.3 ASD7 和 Mudgo 种群在适应抗虫品种过程中体内共生菌的变化

Fig. 3.3 Dynamics of endosymbiont bacteria in BPH adults of ASD7 and Mudgo populations during adaption to resistant rice varieties ASD7 and Mudgo, respectively

(Note: A- ASD7 population BPH was transferred to Mudgo rice plants; B- Mudgo population BPH was transferred to ASD7 rice plants)

3.3 讨论

在长期协同进化过程中，昆虫与其体内共生菌（endosymbiont）形成了密切的共生关系（Feldhaar and Gross, 2009；徐红星等，2009a）。昆虫为共生菌提供了稳定的小生境和营养，而昆虫依靠共生菌合成食物中缺乏的某些重要营养成分，以弥补其不足（Moran, 2006；Hosokawa *et al.*, 2009）。此外，共生菌在昆虫对植物的适合度、寄主昆虫的竞争能力和对寄主植物的利用能力等方面也具有重要作用（Oliver *et al.*, 2005；Lyte *et al.*, 2009；徐红星等，2009b）。在豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 对新寄主植物的适应过程中，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，导致蚜虫很快形成新的生物型（Campbell, 1990）。Simon等（2003）在研究取食不同寄主植物的豌豆蚜的遗传分化时，认为次生共生细菌与豌豆蚜的寄主适应与分化有某种关联。Leonardo和Muiru

(2003)发现, 与不感染或感染其他共生细菌的豌豆蚜比较, 感染U型共生菌的豌豆蚜无法在紫花苜蓿上存活, 但在白花苜蓿上的繁殖力增倍。以共生菌(类酵母菌)—褐飞虱—水稻为对象, 系统研究了体内类酵母菌在褐飞虱对抗虫品种致害性变异过程的作用, 结果表明, 类酵母菌的数量变化与褐飞虱致害性变化呈显著正相关(吕仲贤等, 2001; Lu *et al.*, 2004)。三种致害性褐飞虱体内类酵母菌在形态学上存在明显的差异(陈法军等, 2006)。但进一步对其18S rDNA片段序列进行分析, 结果显示3种类酵母菌株的差异极小(张珏锋等, 2006)。褐飞虱体内除类酵母菌外, 还存在丰富的共生细菌(王渭霞等, 2009; Tang *et al.*, 2010; 刘玉坤, 2011)。我们的结果表明, 7种已报道的共生细菌中由于*Wolbachia*共生菌在荧光定量PCR检测时, 出现2个峰, 因此无法通过本文试验检测其数量变化。但也间接证实了褐飞虱可能感染了至少有两种*Wolbachia*。*Cardinium*则可能由于丰度问题, 在褐飞虱体内共生细菌的菌群中含量相当低, 故没有被检测到。刘玉坤(2011)报道, 褐飞虱仅在个别种群的个别个体中有检出, 感染率极低。在检测到5种共生细菌中, 尽管*Chryseobactium*在3个致害性种群褐飞虱体内均为优势菌, 占一半以上, 推测其可能与褐飞虱致害性变异过程中无明显作用。无论是TN1种群还是ASD7种群褐飞虱被转移到抗性品种Mudgo上时, 其体内共生细菌的菌群结构发生显著性的变化, *Serratia*和*Arsenophonus*显著增加, 取代*Chryseobactium*成为优势菌, 尽管1代之后*Serratia*和*Arsenophonus*数量显著下降, 但仍然高于*Chryseobactium*, 推测可能与*Serratia*和*Arsenophonus*褐飞虱致害性变异有关。尽管王渭霞等(2010)也报道了TN1种群褐飞虱体内*Arsenophonus*的数量高于ASD7和Mudgo种群褐飞虱, 并推测该菌在褐飞虱致害性变异过程中可能起着重要作用, 但仍需进一步证实。

第四章 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的同源性分析

共生菌传递方式多为垂直传播,通过母系遗传的方式在宿主子代群体中传播扩散(Haine, 2008; Feldhaar and Gross, 2009)。但是,部分共生细菌在除垂直传播外,在种间或种内有一定程度的水平传播,并且已有报道人工水平转染共生细菌获得成功。Jager 等(1997)发现感染 *Wolbachia* 的赤眼蜂(*Trichogramma*)含菌个体与未感染 *Wolbachia* 的未含菌个体在同一寄主内发育时, *Wolbachia* 可由含菌个体传递给不含菌个体,并垂直传递给下一代。Grenier 等(1998)采用微注射的方法将与短管赤眼蜂 *Trichogramma pretiosum* 中共生的 *Wolbachia* 转移到松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi* 中。Sasaki 等(2000)从粉斑螟 *Cadra cautella* 体内 *Wolbachia* 转染到地中海粉螟 *Ephestia kuehniella* 中,粉斑螟原供体表现为胞质不亲和,而地中海粉螟中表现成为杀雄作用。王翠敏等(2006)通过共享食物源方法将 *Wolbachia* 自食胚赤眼蜂 *T. embryophagum* 水平转染于国内工厂化生产大面积应用的松毛虫赤眼蜂体内,获得完全为产雌孤雌生殖型式的松毛虫赤眼蜂种群,已连续稳定遗传 40 余代。通过共享同一寄主卵,短管赤眼蜂 *T. pretiosum* 体内的 *Wolbachia* 被水平传递到拟澳洲赤眼蜂 *T. confusum* 后,对其寿命、生殖力和嗅觉反应等均有影响(潘雪红等, 2007)。张海燕等(2009)也认为食胚赤眼蜂较适合作为赤眼蜂种间 *Wolbachia* 水平人工转染的供体。Kawai 等(2009)改进转染的方法,将灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内的共生菌 *Wolbachia* 转染到褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 获得成功,并表现出明显的胞质不亲和性。尤其引人注目是,共生菌在不同亚目间昆虫的人工水平转染已获得成功,继 Braig 等(1994)从白蚊伊蚊 *Aedes albopictus* 中将一种 B 亚群引起胞质不亲和的 *Wolbachia* 成功转入果蝇 *Drosophila melanogaster* 体内之后,将果蝇中具有抗病毒作用的 *Wolbachia* wMel 菌株成功地转染到伊蚊 Aa23 和 C6/36 细胞系中(Hedges *et al.*, 2008; Voronin *et al.*, 2009)。本文通过对不同致害性褐飞虱体内共生菌与不同抗性品种水稻以及褐飞虱主要天敌体内细菌的多样性及同源性分

析,旨在为明确共生菌水平传播以及基于褐飞虱体内共生菌菌群的微生态调控的褐飞虱综合治理新途径提供依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 材料

4.1.1.1 水稻品种：感虫水稻品种 TN1、抗虫品种 ASD7(含 bph2 基因)和 Mudgo(含 Bph1 基因)均由国际水稻研究所提供)。种子于室内催芽后,播于浙江省农科院温室水槽内,2 叶 1 心时将秧苗移栽于直径为 9cm 的盆钵中,常规肥水管理。45-60 天苗龄的水稻植株供饲养虫和试验用。

4.1.1.2 褐飞虱：分别在感虫品种 TN1 和抗虫品种 ASD7、Mudgo 上取食 140 代以上形成的 TN1 种群、ASD7 种群和 Mudgo 种群,由中国水稻所提供。在浙江省农科院温室内分别用 TN1、ASD7 和 Mudgo 水稻植株连续饲养,供试验用。

4.1.1.3 稻虱缨小蜂：用带褐飞虱卵的水稻苗从田间诱集后在浙江省农科院人工气候室内连续饲养。把褐飞虱接入笼罩着的水稻苗产卵 24 小时,然后撤除笼罩和褐飞虱后把水稻苗放到浙江省农科院水稻田。诱集 48h 后,把带卵水稻苗搬回 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 70-90%、L12:D12 的人工气候室中,每丛带卵水稻苗分别用外面黑布包裹的聚乙烯笼罩(高 60cm,直径 9cm)罩住,顶部开一直径为 1cm 的小口并接上一个倒置的透明玻璃管(直径 1cm、长 6cm)。稻虱缨小蜂羽化后每天更换玻璃管,并分批将玻璃管内经分离鉴定后的稻虱缨小蜂接入罩有带新鲜褐飞虱卵的水稻苗的笼罩内繁殖,稻虱缨小蜂成虫供试验用。

4.1.1.4 黑肩绿盲蝽：成虫采自中国水稻研究所试验田,用含褐飞虱卵的 45 日龄 TN1 水稻苗在浙江省农科院温室内饲养,每 3~5 天更换含褐飞虱卵的水稻苗。羽化后的黑肩绿盲蝽成虫供试验用。

4.1.2 方法

4.1.2.1 细菌基因组 DNA 的提取

采用酚-氯仿法提取。分别取1g水稻叶鞘用液氮碾磨后或10头昆虫放入2mL的离心管中，加入500 μ L的提取缓冲液（2% (W/V) CTAB, 1 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA and 50 mmol/L Tris-Cl, pH8.0）匀浆，加入终浓度为4 mg/mL溶菌酶，37℃水浴1h。然后加入终浓度为2 mg/mL的蛋白酶K和1%的十二烷基硫酸钠溶液，混匀，55℃水浴2h。之后参照Fuhrman等（1988）的方法进行，最后用25 μ L 65℃预热的dd H₂O溶解 DNA，备用。

4.1.2.2 16S rDNA V4 区域的 PCR 扩增

以提取的总DNA 为模板，经纯化后采用16S rDNA 基因V4区特异性的引物对扩增，产物长约250 bp，浓度不低于20ng/ μ L的PCR产物送北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序分析。

PCR 扩增体系为：在0.2 mL 的PCR管中加入（总反应体系为50 μ L）：10 $\times$ PCR buffer（含Mg²⁺）2.5 μ L，2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L，上下游引物（10 μ mol/L）各0.5 μ L，Taq酶（5 U/ μ L）0.5 μ L，DNA 模板2 μ L，dd H₂O补足至50 μ L。

PCR 反应条件：采用降落式PCR，94℃预变性5 min；前10个循环为94℃ 1min，65~55℃ 1min，72℃ 45 s，其中每个循环后复性温度下降1℃；后14个循环为94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 45 s；最后72℃延伸8 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测后，于4℃保存备用。

使用Illumina的MiSeq测序仪，对水稻（TN1、ASD7和Mudgo）、褐飞虱（TN1、ASD7和Mudgo种群）及天敌（稻虱缨小蜂、黑肩绿盲蝽）体内细菌16S rRNA的高变区PCR产物进行双端测序，并根据测序结果进行各样品体内细菌多样性分析以及各样品之间的比较分析等。

4.2 结果与分析

4.2.1 测序质量

如表 4.1 和 4.2 所示，一共得到 reads 804,306.0 条，平均每个样品的 reads 数目为 100,538.3 条，拼接得到的 reads 平均有效长度为 249.9 bp。对每个样品的 reads 数目进行统计，并根据 97%相似性将序列聚类成为 OTUs。

表 4.1 所有样品中所测到的 Reads 数目
Table 4.1 Numbers of reads detected from all samples and their average length

总 Reads 数目	平均 Reads 数目	平均片段长度
804306.0	100538.3	249.9

表 4.2 分样品 Reads 数目统计
Table 4.2 Number of reads for each sample

样品		Reads 数目
水稻	TN1	116 194
	ASD7	93 992
	Mudgo	49 099
褐飞虱	TN1 种群	68 299
	ASD7 种群	104 133
	Mudgo 种群	111 543
天敌	黑肩绿盲蝽	108 080
	稻虱缨小蜂	152 866

4.2.2 物种注释

从属于同一 OTU 的一组中取 1 条代表性的序列用于下游的物种注释分析。总共检测到 321 种细菌，其中 TN1、ASD7 和 Mudgo 水稻植株中分别为 165、147 和 118 种；褐飞虱 TN1、ASD7 和 Mudgo 种群分别为 151、166 和 175 种；稻虱缨小蜂和黑肩绿盲蝽分别为 219 和 222 种（图 4.1）。其中各样品中各种细菌所占的比例如图 4.2 所示。

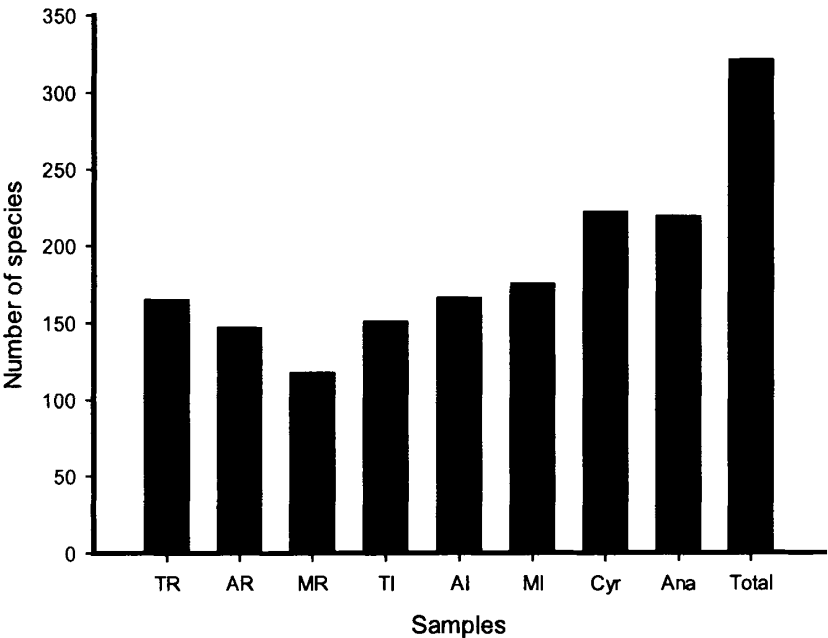


图 4.1 各样品所包含的细菌种类

Fig. 4.1 Number of species of each sample

(Note: TR-TN1 rice plants, AR-ASD7 rice plants, MR-Mudgo rice plants, TI-brachypterous female BPH of TN1 population, AI- brachypterous female BPH of ASD7 population, MI- brachypterous female BPH of Mudgo population, Cyr- female *Cyrtorhinus livldipennis*, Ana- female *Anagrus nilaparvatae*)

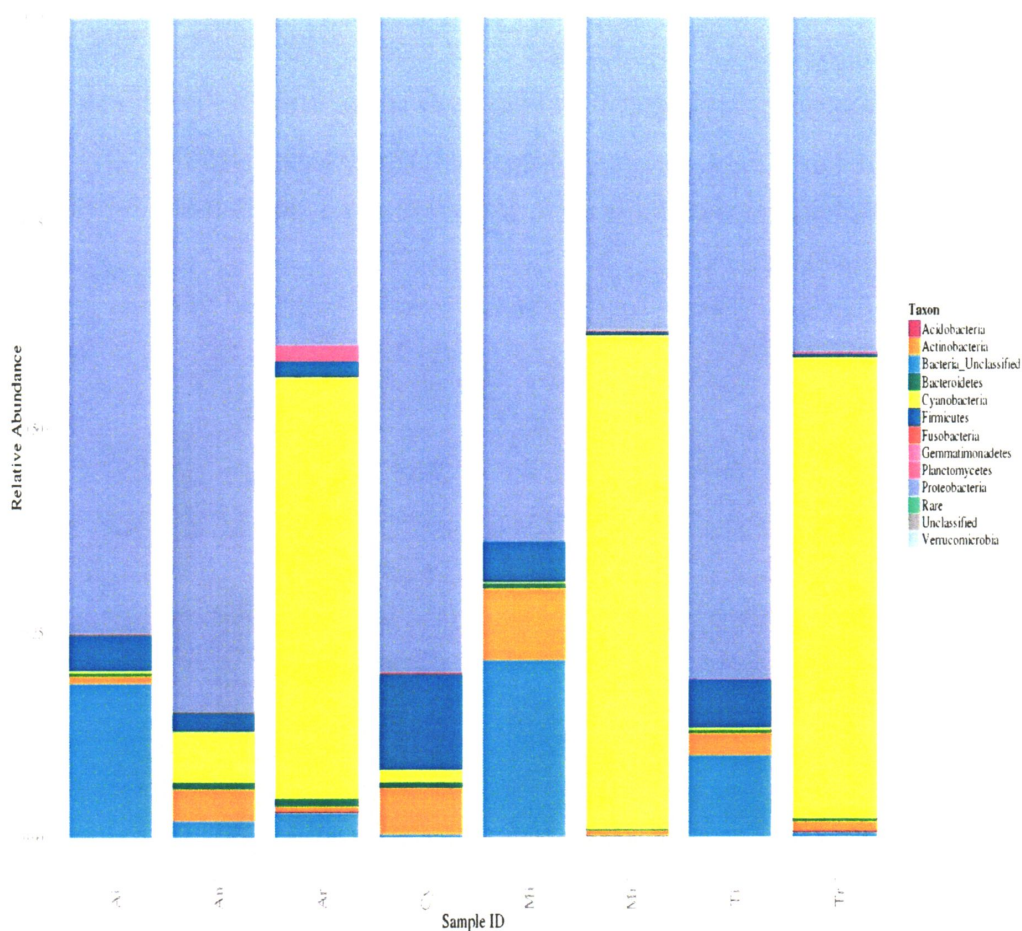


图 4.2 各样品中各种细菌所占的比例

Fig. 4.2 Proportions of bacterium in rice plant, brown planthopper, and its natural enemies (Note: the same with Fig. 4.1)

4.2.3 主成份分析

结果如图 4.3 和图 4.4 所示，无论是主成份分析还是聚类结果均表明，三个褐飞虱种群、两种天敌体内细菌群落构成上比较相似，而均与水稻体内细菌群落结果差异较大。

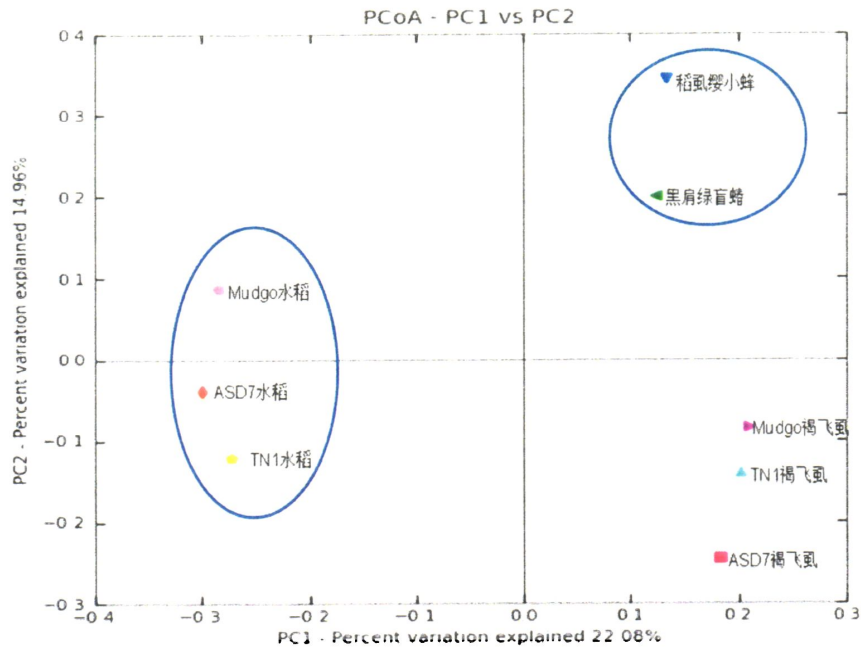


图 4.3 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌群落的相似性分析

Fig. 4.3 Similarity analysis of bacteria communities in rice plant, brown planthopper, and its natural enemies

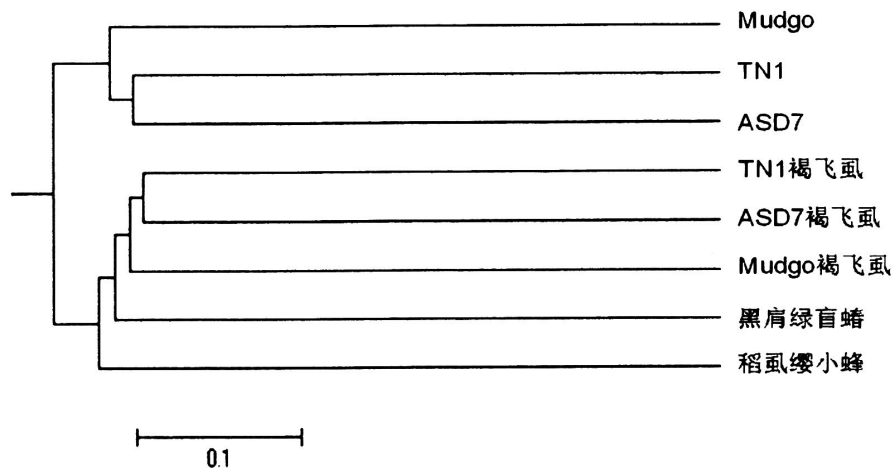


图 4.4 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌 16S rDNA 的聚类分析结果

Fig. 4.4 The cluster analysis of electrophoresis profiles of 16S rDNA gene fragments of bacteria in rice plant, brown planthopper, and its natural enemies

4.2.4 水稻-褐飞虱-天敌体内共生菌的分析

在已报道稻飞虱共生细菌中，*Arthrobacter*、*Chryseobacterium*、*Wolbachia*、*Arsenophonus* 和 *Acinetobacter* 在三个水稻品种、三个致害性种群褐飞虱和两种天敌体内均检测到，*Serratia* 除 TN1 和 Mudgo 植株体内未检测到外，在 ASD7 植株、褐飞虱和天敌体内均存在。另外烟粉虱共生细菌 *Rickettsia* 在所有样品中均存在，而在黑肩绿盲蝽体内检测到蚜虫体内共生菌 *Buchnera*（表 4.3）。

表 4.3 水稻-褐飞虱-天敌体内共生菌的比较
Table 4.3 Comparison of endosymbiont bacteria in rice plant, brown planthopper, and its natural enemies

共生细菌	水稻品种			褐飞虱种群			天敌	
	TN1	ASD7	Mudgo	TN1	ASD7	Mudgo	黑 肩 绿 盲 蝽	稻 虱 缨 小 蜂
<i>Arthrobacter</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chryseobacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Wolbachia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i>	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Arsenophonus</i>	?	?	?	+	+	+	?	?
<i>Cardinium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rickettsia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Buchnera</i>	-	-	-	-	-	-	+	-

Note: “+”: It was detected. “-”: It was not detected. “?”: It was uncertainty.

4.3 讨论

根据其生物学和进化史,昆虫内共生菌可以分为两类,初生共生菌和次生共生菌。初生共生菌昆虫初生共生菌,包括 *Buchnera*、*Wigglesworthia*、*Blochmannia* 和 *Baumannia* 等,均有着提供给它们寄主营养的能力因此主要与寄主的存活和繁殖有关,进行严格的垂直传播 (Dale and Moran, 2006)。次生共生菌主要与寄主的适应性有关,如提高寄主的存活率和繁殖量,通过低水平的水平传播就能在新的寄主体内定殖,有时也能进行垂直传播 (Hurst *et al.*, 1999)。次生共生菌对寄主适应性的影响与环境有关,在一种环境中它们是有利的而在另一种环境中可能是有害的。这可能就是一些节肢动物适应于次生共生菌的侵染,而另一些则不能适应的主要原因 (Montllor *et al.*, 2002)。次生共生菌与宿主的协同进化时间短,且在宿主体内定殖也不稳定 (Dale and Moran, 2006)。

基于系统发生和寄主分布以及种间或种内共生菌的水平传播研究证实一些共生细菌能够很容易的侵入新的寄主体内,并建立起稳定的关系 (Dobson *et al.*, 2002; Russell and Moran, 2003; Dyall *et al.*, 2004; Baumann, 2005; 王翠敏等, 2006; Vorurger *et al.*, 2010)。近年来,研究人员从单纯研究共生菌的数量和功能转身其对与宿主之间的关系甚至是植物-昆虫-共生菌三者之间互作的研究。体内共生菌由于难以人工培养,故一直难以被详细的研究。近年来随着分子研究技术的进步,分子生物学研究技术已成为研究此类共生菌的主要手段。与传统的微生物研究方法相比,分子生物学技术以 PCR 为基础,具有快速便捷的特点,即不需要进行共生菌的离体培养,这就大大地简化了试验工作。尤其是近年来,高通量测序技术的快速发展,有望加快昆虫共生菌的起源和功能等研究。

本文通过对水稻-褐飞虱-天敌三营养层体内细菌的 16S rDNA 测序 V4 区全长进行高通量测序,并与 16S rDNA 数据库进行比对分析,从而对它们体内细菌多样性进行研究,总的来说,变形菌门 (Proteobacteria) 和蓝菌门 (Cyanobacteria) 细菌为优势菌群。从种类数量来说,其中 TN1、ASD7 和 Mudgo 水稻植株中分别为 165、147 和 118 种;褐飞虱 TN1、ASD7 和 Mudgo 种群分别为 151、166 和 175 种;稻虱缨小蜂和黑肩绿盲蝽分别为 219 和 222 种。无论是主成份分析还

是聚类结果均表明,三个褐飞虱种群、两种天敌体内细菌群落构成上比较相似,而均与水稻体内细菌群落结果差异较大。在已报道的几种共生菌中,*Arthrobacter*、*Chryseobacterium*、*Wolbachia*、*Arsenophonus* 和 *Acinetobacter* 在三个水稻品种、三个致害性种群褐飞虱和两种天敌体内均检测到,*Serratia* 除 TN1 和 Mudgo 植株体内未检测到外,在 ASD7 植株、褐飞虱和天敌体内均存在。烟粉虱中常见的共生细菌 *Rickettsia* 在所有样品中均存在。一个奇怪的结果是黑肩绿盲蝽体内也检测到蚜虫体内的初生共生菌 *Buchnera*, 是否与黑肩绿盲蝽在主要捕食稻飞虱和稻叶蝉的卵和低龄幼虫之外,也可能捕食一些其它猎物有关。另外,除了已报道的几种共生菌以外,还有很多细菌种类在水稻-褐飞虱-天敌三营养层内均有检测到。

最近,除垂直传播外,有研究认为昆虫的一些共生菌是从环境中获取的。Kikuchi (2009) 认为点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 体内共生菌 *Burkholderia* 是从大豆植株的根际获取的,而且室内培养实验也证实了这一点。在棉花植株上取食的烟粉虱体内共生菌也可以通过取食植物水平传播到其它不含有此类共生菌的昆虫里 (Frago et al., 2012)。另外,几乎包括昆虫在内的所有动物都从肠道中获得丰富的微生物。由于肠道菌群对昆虫宿主发育和免疫功能而被认为是昆虫肠道必要的组成部分,因此昆虫肠道菌群中的微生物目前也被认为是共生菌 (Moya et al., 2008; Brune and Ohkuma, 2011)。然而,这些关于不同营养层共生菌的同源性以及种类多样性的研究均只是定性的,为明确共生菌的多样性对宿主的功能等方面仍需要利用宏基因组测序等技术开展进一步的研究。

第五章 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的培养

尽管 PCR 技术、原位杂交和测序等现代分子生物学技术等的发展使得人们从能够更容易地知道微生物群落中未培养菌的多样性 (Muyzer *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997)。例如, 蚜虫体内有 6 种共生细菌, 其中 5 种是通过基因组序列和荧光原位杂交而得知的, 而且曾被认为是不可以培养的。有报道其中 2 种共生细菌在实验室培养中被分离出来 (Darby *et al.*, 2005)。由于体外无法培养的共生菌, 在研究其与宿主的关系及其功能, 以及在为测序提供高纯度、足够量的 DNA 样品等方面均非常困难。因此, 共生菌的离体培养对于推动昆虫共生菌的研究具有重要意义。

到目前为止, *Sodalis glossinidius* (Welburn *et al.*, 1987)、*Wolbachia pipientis* (O'Neill *et al.*, 1997)、*Candidatus Arsenophonus triatominarum* (Hypsa and Dale, 1997)、*Candidatus Consessoris aphidicola* 和 *Candidatus Adiaceo* (Darby *et al.*, 2005)。并且只有 *S. glossinidius* 能够在无昆虫细胞的条件下培养 (Dale and Maudlin, 1999; Matthew *et al.*, 2005) 能够体外培养。张珏锋等 (2009) 运用卵块离体培养的方法, 从褐飞虱体内分离到两株共生菌, 分别为解脂假丝酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 和嗜盐梗孢酵母 (*Sterigmatomyces halophilus*), 证明褐飞虱体内类酵母共生菌可在人工培养基上短期存活。同时也验证了褐飞虱菌胞中存在不同种类类酵母菌的推测。而关于褐飞虱体内共生细菌的培养还鲜有报道。本文通过水稻-褐飞虱-天敌三营养层体内细菌的培养的探索, 旨在为明确水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的同源性以及共生菌在褐飞虱致害性变异过程中的作用提供依据。

5.1 材料和方法

5.1.1 材料

5.1.1.1 水稻品种: 感虫水稻品种 TN1 由国际水稻研究所提供。种子于室内催芽

后，播于浙江省农科院温室水槽内，两叶一心时将秧苗移栽于直径为 9cm 的钵中，常规肥水管理。45-60 天苗龄的水稻植株供饲养虫和试验用。

5.1.1.2 褐飞虱：在感虫品种 TN1 上取食 140 代以上形成的 TN1 种群，由中国水稻所提供。在浙江省农科院温室内分别用 TN1 水稻植株连续饲养，供试验用。

5.1.1.3 黑肩绿盲蝽：成虫采自中国水稻研究所试验田，用含褐飞虱卵的 45 日龄 TN1 水稻苗在浙江省农科院温室内饲养，每 3~5 天更换含褐飞虱卵的水稻苗。羽化后的黑肩绿盲蝽成虫供试验用。

5.1.1.4 基础培养基和 Rpf：胰蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、氯化钠 10g、加水补足至 1 升（配固体培养基时则再加入琼脂 15g 后），121℃灭菌 30 分钟。复苏促生长因子（resuscitation promoting factor, Rpf）制备液，由浙江师范大学提供。

5.1.2 方法

5.1.2.1 水稻植株上内生菌的培养：每个品种从主茎离泥 5cm 处往上选取一段 4cm 长的茎秆，置于 5ml 离心管内进行表面消毒。先用 75%酒精浸泡 30s，无菌水清洗 3 次，然后用有效氯含量为 5%的 NaClO 浸泡 30s 后之后用蒸馏水漂洗 3 次，在无菌滤纸上晾干。取一部分经表面消毒的茎秆做印迹试验：将消毒后的样品置于事先准备好的 LB 固体培养基上，保持 20min，做为空白对照和处理组一起培养，如果空白对照的印迹上长菌则说明表面消毒不成功，放弃本次培养。其余的稻茎用灭菌剪刀剪碎后，加入经灭菌的石英砂和 0.5ml 无菌水在研钵中研磨。10% (V/V)含 Rpf 制备液至液体培养基中作为处理组，以添加等量不含 Rpf 制备液作为对照组，将以 10% (V/V)的样品悬液，以十倍浓度梯度系列稀释到 10^{-6} ，每组重复 3 次，30℃静置培养。根据培养时间记录处理组与对照组培养液的混浊情况，浑浊为阳性，不浑浊为阴性。

5.1.2.2 褐飞虱和黑肩绿盲蝽体内细菌的培养：选取羽化 48h 内的雌成虫，放入 -70℃ 冰箱，5min 后拿出放入 2ml 离心管内，参照 6.1.2.1 方法进行表面灭菌和印迹试验，然后将雌成虫置于已灭菌的 1.5ml 离心管中，加入 0.5ml 无菌水至研钵，充分研磨，其余同 6.1.2.1。

5.1.2.3 培养细菌的分离：从呈现阳性的培养液中吸取 20μlLB 固体培养基表面，涂板后盖上培养皿盖，用灭菌的 Parafilm 膜封口，并置于 30℃ 培养箱中培养。每天定时观察，待菌落长出后，逐步记录菌落的生长过程和特征，拍照。根据菌落大小、形态和颜色等挑取菌落进行分离和斜面培养。

5.1.2.4 培养菌株的鉴定：选取不同的菌落进一步分离培养后，用上海生工的 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取各菌株 DNA。具体如下：取过夜培养细菌加入离心管中，10000 rpm 离心 30 S，收集菌体，弃上清。加入 180 μl Digestion Buffer，重悬菌体，加入 20 μl Proteinase K 溶液，充分混匀。56℃ 水浴 30 min，间或混匀。加入 200 μl BD Buffer，充分颠倒混匀。加入 200 μl 无水乙醇，充分颠倒混匀。将吸附柱放入收集管中，将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加入吸附柱中，静置 2 min，12000 rpm 离心 3 min，倒掉收集管中的液体。向吸附柱中加入 500 μl PW Solution，10000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的液体。向吸附柱中加入 500 μl Wash Solution，10000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的液体。将吸附柱重新放回收集管中，12000 rpm 离心 2 min。将吸附柱放入干净的 1.5 ml 离心管中，加入 50-100 μl 预热至 60℃ 的 Elution Buffer，静置 3 min，10000 rpm 离心 1 min，将所得到的 DNA 溶液置于 -20℃ 保存，待用。用引物对 27F 和 1492R 扩增各菌株 16S rDNA 序列（1500bp 左右）并送上海生工生物工程有限公司测序，根据测序结果到 NCBI 网站 Blast，比对并确定种类。

PCR反应体系为：

试剂	体积（μl）
Template	0.5
10×Buffer（with Mg ²⁺ ）	2.5
58	

dNTP （各2.5mM）	1
F（10uM）	0.5
R（10uM）	0.5
ddH ₂ O	补足至25

PCR循环条件:

温度	时间	程序
98℃	3 min	预变性
98℃	25 sec	} 30 cycle
55℃	25sec	
72℃	1 min	
72℃	10 min	修复延伸
4℃	∞	终止反应

PCR 结束后,以 1%琼脂糖凝胶,150V、100mA、电泳 20min 后,用 BIO-RAD GelDoc2000 凝胶成像系统检测,并切割所需目的条带,用上海生工的 UNIQ-10 柱式 DNA 纯化试剂盒进行纯化,回收后的产物直接送上海生工生物工程技术服务有限公司测序.16SrDNA 序列在核糖体数据库 <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp> 上比对。

5.2 结果与分析

5.2.1 Rpf 促进细菌生长的效果

在培养基中添加促生长因子 Rpf,能显著地促进细菌的生长(如图 5.1 所示),根据菌落大小、形态和颜色等挑取菌株 200 余株。

5.2.2 培养菌株的鉴定

5.2.2.1 PCR 扩增结果

结果如图 5.2 所示,所有准备鉴定的菌株均扩增出 1500bp 左右的 16S rDNA 目标片段。

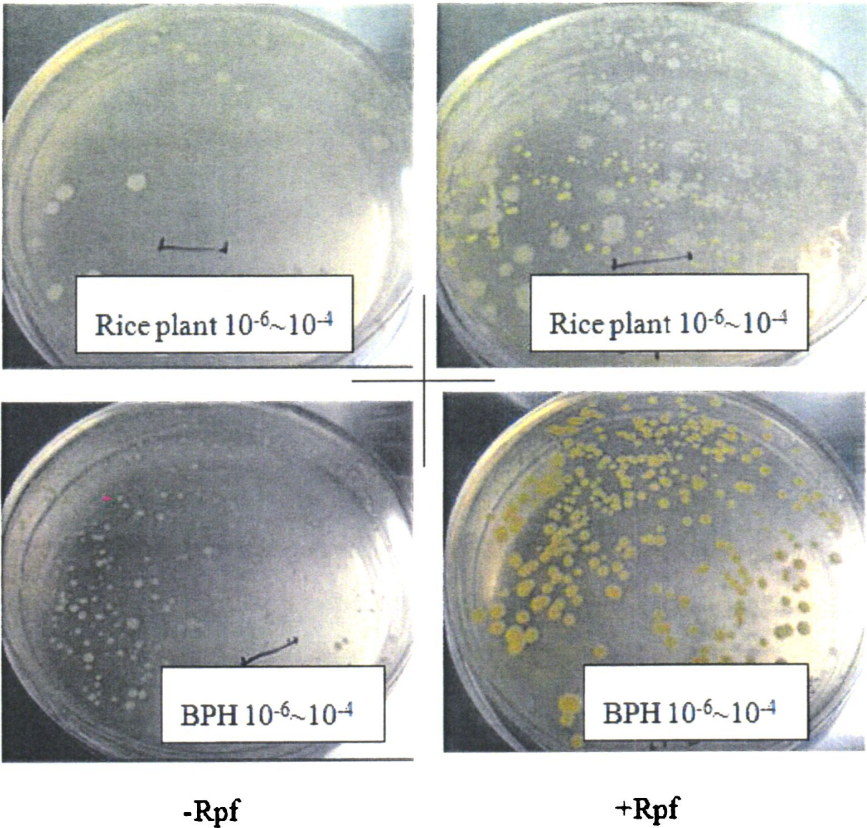


图 5.1 培养基中添加复苏促生长因子 Rpf 后的效果

Fig. 5.1 Effect of resuscitation promoting factor (Rpf) on the growth of bacteria from rice plants, brown planthopper (BPH) and natural enemies

5.2.2.2 菌株鉴定结果

结果如表 5.1 所示，一共鉴定出细菌种类为：水稻 6 种、飞虱 9 种（其中 2 个菌株同属 *Enterobacter symbiont*）和黑肩绿盲蝽 4 种，并可稳定继代培养。

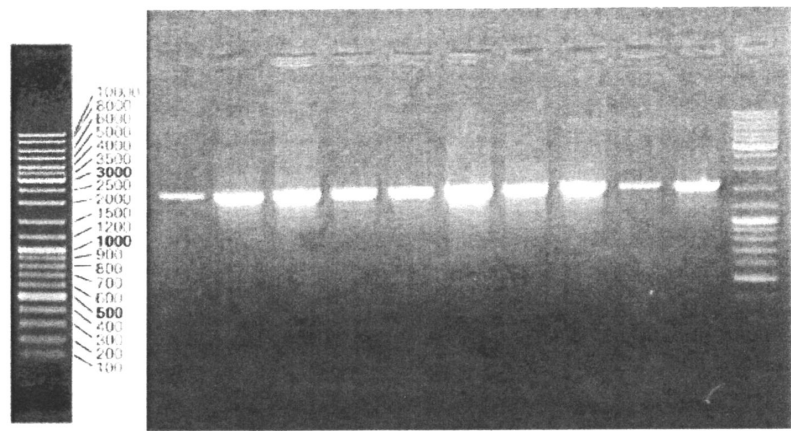


图 5.2 部分鉴定菌株 16S rDNA 的 PCR 产物电泳图

Fig. 5.2 Electrophoresis profile of 16S rDNA gene fragments of bacteria from rice plants, brown planthopper (BPH) and natural enemies

表 5.1 从水稻-褐飞虱-天敌体内培养的细菌种类鉴定结果

Table 5.1 Identification of bacteria from rice plants, brown planthopper (BPH) and natural enemies based on sequences of 16S rDNA gene fragments

来源	复苏促进因子	细菌种类	数量
水稻	+RPF	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus pumilus</i>	6 种
	-RPF	<i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Staphylococcus</i> sp.	2 种
褐飞虱	+RPF	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Leucobacter tardus</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Enterobacter symbiont</i> <i>Staphylococcus</i> sp. (3)	9 种

黑肩绿盲蝽	-RPF	<i>Bacillus cereus</i>	3 种
		<i>Bacillus pumilus</i>	
		<i>Staphylococcus</i> sp.	
	+RPF	<i>Microbacterium oxydans</i>	4 种
		<i>Brevibacterium</i>	
		<i>epidermidis</i>	
	-RPF	<i>Bacillus pumilus</i>	2 种
		<i>Microbacterium oxydans</i>	
		<i>Brevibacterium aureum</i>	

5.3 讨论

尽管分子生物学技术的快速发展,如基因组测序、宏基因组和转录基因组等,使用近年来对共生菌的研究尤其是在 系统发生和功能多样性方面 进展迅猛。如可以通过 DNA 序列鉴别共生菌,重建寄主-共生菌的系统发育史,分析共生菌基因和基因组等。但同时也存在一些障碍,如胞内共生菌通常在寄主细胞中大量存在,并仅限于菌胞中,这在提取 DNA 时容易受寄主 DNA 的污染。另外,一些次生共生菌在寄主体内数量很少,提取其 DNA 时回收率很低等。虽然 DNA 技术的进步,可使用一些改进的方法能解决部分困难,但 共生菌培养分离已经是而且将继续是这些有机体研究的一个限制性因素。而且,共生菌的 纯培养可以了解微生物的生理、细胞和细胞间的作用以及新陈代谢的途径等 (Keller and Zengler, 2004), 并可以使得研究人员更容易地通过基因组、转录、蛋白质组学和代谢组学等方面研究昆虫-共生菌的关系。

基因组研究 (Renesto *et al.*, 2003) 和生态学 (Rappe *et al.*, 2002; Leadbetter, 2003) 研究结果又可以反映出适合共生菌的生长条件范围,如 *Sodalis glossinidius* (Welburn *et al.*, 1987)。这些试验提供了正确的培养条件,提供了 *S. glossinidius* 的生长条件,使得其最初在昆虫细胞中在较低温度下生长,后来在固体培养基上,然后在精细培养基上成功培养 (Matthew *et al.*, 2005)。

细菌复苏促生长因子 (Resuscitation-promoting factor, Rpf) 最初是在藤黄微球菌中发现,该因子可以在 10⁻¹²g 水平以自分泌和旁分泌形式促进休眠菌的复活和生长,其机制可能是参与了细胞间的信号转导。Rpf 除能促使休眠菌复活和生

长以外,对正常生长的细菌也有效。由于 Rpf 的功能类似于真核生物的生长因子,所以被称为细菌的生长因子。自 Mukamolova 等(1998)发现 Rpf 以来,主要集中在医学流行病学和免疫学对分支杆菌属的部分菌种的生长刺激、抗体、类似基因克隆和作用机制等方面(Oliver *et al.*, 2010; Nikitushkin *et al.*, 2011)。近年来,随着其在土壤生态环境中 VBNC 状态菌的形成机理、分析近缘菌种间在生态环境中的消长规律等方面的应用(丁林贤等, 2012),有望成为一种未知资源细菌开发利用的新途径。本章的结果表明,在培养基中添加 Rpf,能显著促进昆虫体内细菌的可培养性。尽管目前只分离到一种 *Enterobacter symbiont*,并且可以继代培养,虽与 *Arsennophonus* 同属肠杆菌科(Enterobacteriaceae),但两者的关系有待进一步研究。

第六章 全文总结与今后研究

全文总结

协同进化 (coevolution) 是指相互作用的物种间彼此因为适应对方性状的进化而交互发生可遗传的改变, 其概念已广泛用于物种间相互作用的研究。“Coevolution”一词最早出现在 Ehrlich *et al.* (1964) 关于蝴蝶与植物关系的研究中, 他们强调植物次生物质在昆虫与植物的营养关系中发挥了关键性作用, 认为物种间的交互作用是物种适应和物种形成的动力 (Feldhaar, 2011)。昆虫内共生菌与宿主的进化关系, 对研究昆虫的系统进化及生物多样性是一个有利的工具。初生内共生菌与宿主进化关系的一致性, 次生内共生菌遗传多样性与可塑性及与宿主之间系统发育的不一致性, 对研究昆虫的系统进化及其生物多样性, 都是很好的证据 (Sandstrom, 2001)。近年来, 随着对共生菌与昆虫宿主的互利共生关系的研究不断深入, 宿主越来越多的被作为全功能体研究, 作为一个有机体, 它的表现型是由其宿主的基因组和寄主携带的所有体内共生菌的基因组共同决定的 (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Rosenberg *et al.*, 2010)。

以往对共生菌研究较多的是, 通过测定除去共生菌或是在提供的食物中缺少一些能由共生菌提供的物质条件下观察宿主适合度的降低情况。已经随着测序技术的发展, 基因组时代为自然环境下及种群和群落生态学的背景下研究昆虫-共生菌的关系提供了便利。随着越来越多的共生菌基因组的发表, 为明确共生菌的功能提供了确切的证据 (Feldhaar *et al.*, 2007; Gunduz & Douglas, 2009), 也为明确共生菌对昆虫在群体水平的表现型变异影响提供了新的方法 (Hosokawa *et al.*, 2008; Oliver *et al.*, 2008; Vorburger *et al.*, 2009)。

本文中, 通过PCR-DGGE方法对褐飞虱体内细菌的16S rDNA V3区进行比较发现, 取食感虫品种的TN1种群体内细菌群落结构明显与取食抗虫品种的ASD7种群和Mudgo种群不同, 但该方法还未能有效区分取食不同抗虫水稻品种的褐飞虱细菌体内细菌种类和数量的差异。进一步用荧光定量PCR对不同致害性种群褐飞虱适应不同抗性品种的过程中5种共生细菌的变化, 结果表明, 尽管 *Chryseobacterium* 在3个致害性种群褐飞虱体内均为优势菌, 占一半以上, 然而在功

能上该菌可能与褐飞虱致害性变异无明显作用。推测 *Serratia* 和 *Arsenophonus* 可能与褐飞虱致害性变异有关。这与王渭霞等 (2009) 报道的 TN1 种群褐飞虱体内 *Arsenophonus* 的数量高于 ASD7 和 Mudgo 种群褐飞虱, 并推测该菌在褐飞虱致害性变异过程中可能起着重要作用的结果是一致的, 但仍需进一步证实。通过对水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的 16S rDNA V4 区进行高通量测序, 结果表明在已报道稻飞虱共生细菌中, *Arthrobacter*、*Chryseobacterium*、*Wolbachia*、*Arsenophonus* 和 *Acinetobacter* 在三个水稻品种、三个致害性种群褐飞虱和两种天敌体内均检测到, *Serratia* 除 TN1 和 Mudgo 植株体内未检测到外, 在 ASD7 植株、褐飞虱和天敌体内均存在。另外烟粉虱共生细菌 *Rickettsia* 在所有样品中均存在, 而在黑肩绿盲蝽体内检测到蚜虫体内共生菌 *Buchnera*, 说明了次生内共生菌遗传多样性与可塑性, 也证明了昆虫的一些共生菌是从环境中获取的。

本研究的特点和创新点

1) 用荧光定量 PCR 的方法, 测定了 3 个不同致害性种群褐飞虱在适应不同抗性品种的过程中, 体内共生菌数量的变化。明确了 *Chryseobacterium* 在 3 个致害性种群褐飞虱体内均为优势菌, 占一半以上, 然而在功能上该菌可能与褐飞虱致害性变异无明显作用。无论是 TN1 种群还是 ASD7 种群褐飞虱被转移到抗性品种 Mudgo 上时, 其体内共生细菌的菌群结构发生显著性的变化, *Serratia* 和 *Arsenophonus* 显著增加, 取代 *Chryseobacterium* 成为优势菌, 尽管 1 代之后 *Serratia* 和 *Arsenophonus* 数量显著下降, 但仍然高于 *Chryseobacterium*, 推测可能与 *Serratia* 和 *Arsenophonus* 褐飞虱致害性变异有关。

2) 对水稻-褐飞虱-天敌三营养层体内细菌的 16S rDNA 测序 V4 区全长进行高通量测序, 并与 16S rDNA 数据库进行比对分析。水稻植株、褐飞虱和天敌体内均是以变形菌门 (Proteobacteria) 和蓝菌门 (Cyanobacteria) 细菌为优势菌群。从种类数来说, 其中 TN1、ASD7 和 Mudgo 水稻植株中分别为 165、147 和 118 种; 褐飞虱 TN1、ASD7 和 Mudgo 种群分别为 151、166 和 175 种; 稻飞虱小蜂和黑肩绿盲蝽分别为 219 和 222 种。无论是主成份分析还是聚类结果均表明, 三

个褐飞虱种群、两种天敌体内细菌群落构成上比较相似，而均与水稻体内细菌群落结果差异较大。在已报道的几种共生菌中，*Arthrobacter*、*Chryseobacterium*、*Wolbachia*、*Arsenophonus* 和 *Acinetobacter* 在三个水稻品种、三个致害性种群褐飞虱和两种天敌体内均检测到，*Serratia* 除 TN1 和 Mudgo 植株体内未检测到外，在 ASD7 植株、褐飞虱和天敌体内均存在。烟粉虱中常见的共生细菌 *Rickettsia* 在所有样品中均存在，并且黑肩绿盲蝽体内也检测到蚜虫体内的初生共生菌 *Buchnera*。

3) 就无昆虫细胞条件下共生菌的培养进行了探索，明确了添加促生长因子 (Rpf) 可以增加被培养细菌的种类和数量。分离到 2 株肠杆菌科 (*Enterobacter*) 共生菌，并且可以继代培养，与 *Arsennophonus* 同属肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)，但两者的关系有待进一步研究。

不足之处及今后研究方向

虽然本文就水稻-褐飞虱-天敌体内细菌比较做了一些工作，总结所做的工作不难发现还有很多工作需要进一步完善：

1. 由于 *Wolbachia* 共生菌在荧光定量 PCR 检测时，出现 2 个峰，因此无法未能检测其在褐飞虱适应不同抗性品种过程中的数量变化，但也间接证实了褐飞虱可能感染了至少有两种 *Wolbachia*。*Cardinium* 则可能由于丰度问题，在褐飞虱体内共生细菌的菌群中含量相当低，没有被检测到。针对这 2 种共生菌，需要进一步优化引物和 PCR 条件后进行测定。

2. 分别用抗生素处理水稻和褐飞虱，去除部分内生菌和共生细菌，并分别用抗性素处理的和正常的水稻植株饲养褐飞虱，结合离体培养的共生菌饲喂试验，分析水稻植株、褐飞虱及天敌体内细菌的变化，进一步验证共生菌在水稻-褐飞虱-天敌之间横向传播及其机制。

3. 调整培养基配方（包括 Rpf 的含量）和培养条件，进一步对无昆虫细胞条件下共生菌的培养开展探索，并与利用昆虫细胞系培养的共生菌进行比较，进一步针对培养得到的共生菌开展生物学及其功能研究。

参考文献

- 1) 白旭, 董胜张, 庞琨, 等. 灰飞虱体内一种酵母类共生菌的分子鉴定. 昆虫学报. 2010, 53(6): 640-646
- 2) 曹卿, 杨杰, 王军, 等. 灰飞虱共生菌groEL基因的克隆、生物信息学分析及其植物二元表达载体构建. 分子植物育种. 2010, 8(1): 35-40
- 3) 陈法军, 曾敏, 张珏峰, 等. 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, 2006a, 31(4): 728-735
- 4) 陈法军, 张珏峰, 周彦铨等. 不同地理种群褐飞虱体内共生酵母菌的个体大小及数量差异. 昆虫知识. 2006b, 43(4): 460-465
- 5) 陈峰, 傅强, 罗举, 等. 苗期抗性不同的水稻品种成株期对褐飞虱的抗性. 中国水稻科学. 2009, 23(2): 201-206
- 6) 陈建明, 何月平, 张珏峰, 等. 常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响. 植物保护. 2009, 35(6): 47-51
- 7) 陈列忠, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌在褐飞虱防治中的应用. 农药. 2006, 45(11): 726-729
- 8) 陈文胜, 古德就, 李卫, 等. 烟蚜寄主专化性的研究. 华南农业大学学报. 1997, 18(4): 54-58
- 9) 程家安, 朱金良, 祝增荣, 等. 稻田飞虱灾变与环境调控. 环境昆虫学报. 2008, 30 (2): 176-182
- 10) 程遐年, 吴进才, 马飞. 褐飞虱研究与防治. 北京: 中国农业出版社. 2003
- 11) 褚栋, 刘国霞, 陶云荔, 等. 烟粉虱复合种内共生菌多样性及其生物学意义. 昆虫学报. 2006, 49(4): 687-694
- 12) 崔晓峰, 吴云锋, 林林, 等. 桃蚜体内与病毒结合的共生菌 *Buchnera* groEL 基因克隆和序列分析. 中国病毒学. 2002, 17(1): 69-72
- 13) 邓可京, 杨琰云, 胡成业. 灰飞虱共生菌 *Wolbachia* 引起的细胞质不亲和性. 复旦学报(自然科学版). 1997, 36(5): 500-506
- 14) 丁林贤, 张萍华, 洪华嫦, 等. 藤黄微球菌Rpf活性蛋白的制取及其对红球菌VBNC菌体的复苏作用. 微生物学报. 2012, 52(1): 77-89
- 15) 傅强, 张志涛, 胡萃, 等. 高温对酵母类共生菌和褐飞虱氨基酸需求的影响. 昆虫学报, 2001, 44 (4): 534-540
- 16) 甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 等. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. 昆虫学报. 2002, 45(1): 14-17

- 17) 季英华, 史文琦, 程兆榜, 等. 灰飞虱体内共生菌 *Wolbachia* 的 groEL 基因克隆及序列分析. 南京师大学报(自然科学版). 2008, 31(4): 119-123
- 18) 李青, 罗善昱, 韦素美, 等. 褐飞虱生物型测定及其与迁飞关系分析. 昆虫知识. 1999, 36(5): 257-260
- 19) 廖珊, 康琳, 陈晓爱, 等. *Wolbachia* 在灰飞虱体内的分布. 复旦学报(自然科学版). 2001, 40(5): 539-543
- 20) 林林, 吴云锋, 崔晓峰. 玉米蚜体内参与传毒的共生菌阳基因的克隆和原核表达. 中国病毒学. 2003, 18(1): 54-57
- 21) 刘淑平, 王新, 徐红星, 等. 应用巢式 PCR-DGGE 技术分析稻虱缨小蜂体内 *Wolbachia* 的多样性. 昆虫学报. 2011, 54(12): 1354-1360.
- 22) 刘玉坤. 三种稻飞虱寄主适应、防御酶与共生菌的比较. 中国农业科学院. 硕士论文. 2011
- 23) 陆剑飞, 黄国洋. 浙江省褐飞虱暴发成灾的原因与治理对策. 农药科学与管理. 2006, 27(1): 42-43
- 24) 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响. 植物保护学报. 2001a, 28(3): 193-197
- 25) 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用. 昆虫学报. 2001b, 44(2): 197-204
- 26) 苗雪霞, 丁德诚. 蚜虫与其胞内共生细菌的相互作用. 生命科学. 2003, 15(4): 242-247
- 27) 倪学勤, Gong J S, Yu H, 等. PCR-DGGE 技术分析蛋鸡 MHC 基因对肠道细菌种群结构的影响. 中国农业科学. 2009, 42(7): 2564-2571
- 28) 潘雪红, 何余容, 陈科伟, 等. *Wolbachia* 感染对拟澳洲赤眼蜂寿命、生殖力和嗅觉反应的影响. 昆虫学报. 2007, 50(3): 207-214
- 29) 屈吕宇. 褐飞虱内共生细菌 *Wolbachia* 与 *Arsenophonus* 竞争关系的分析. 浙江大学硕士论文. 2013
- 30) 阮永明, 刘树生. 浙江 B 型和非 B 型烟粉虱种群共生菌的检验及系统发育研究. 昆虫学报. 2005, 48(6): 859-865
- 31) 孙佳音, 傅强, 赖凤香, 等. 不同褐飞虱寄主种群类酵母共生菌形态和数量的比较. 中国水稻科学. 2009, 23(5): 546-550
- 32) 谭周进, 肖启明, 谢丙炎. 昆虫内共生菌研究概况. 微生物学通报. 2005, 32(4): 140-143
- 33) 谭周进, 谢丙炎, 肖启明, 等. 烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的变异与系统发生.

- 微生物学报. 2004a, 44(4): 436-439
- 34) 谭周进, 谢丙炎, 肖启明, 等. 烟粉虱内共生菌传毒相关groEL基因的克隆及其原核表达. 植物病理学报. 2004b, 34(4): 314-318
- 35) 唐前君, 张德咏, 刘勇, 等. 烟粉虱内共生菌传毒相关 groEL 基因 dsRNA 载体的构建及其在烟草中的表达. 湖南农业大学学报(自然科学版). 2010, 36(6): 620-625
- 36) 陶林勇, 俞晓平, 巫国瑞. 我国褐飞虱生物型监测初报. 中国农业科学, 1992, 25(3): 9-13
- 37) 王翠敏, 丛 斌, 崔宝玉, 等. 松毛虫赤眼蜂两性生殖品系与孤雌产雌品系生物学特性的比较. 中国生物防治. 2006, 22(2): 96-100
- 38) 王光华, 赵伟春, 程家安. 实时荧光定量PCR技术及其在昆虫学研究中的应用. 昆虫学报. 2008, 51(12): 1293-1303
- 39) 王国超, 傅强, 赖凤香, 等. 褐飞虱体内类酵母共生菌与氨基酸营养的关系. 昆虫学报. 2005a, 48(4): 483-490
- 40) 王国超, 傅强, 张志涛. 稻飞虱体内的类酵母共生菌及其营养功能. 昆虫知识. 2005b, 42(4): 353-358
- 41) 王渭霞, 罗 举, 赖凤香, 等. 水稻褐飞虱内生共生细菌*Arsenophonus*的鉴定和系统分析. 昆虫学报. 2010, 53(6): 647-654
- 42) 王荫长. 昆虫生理生化学. 北京: 中国农业出版社. 1994
- 43) 王咏妙, 张鹏飞, 陈建群. 棉蚜寄主专化型及其形成的行为机理. 昆虫学报. 2004, 47(6): 760-767
- 44) 巫国瑞, 俞晓平, 陶林勇. 褐飞虱和白背飞虱灾害的长期预测. 中国农业科学. 1997, 30(4): 25-29.
- 45) 吴丹, 张保龙, 倪万潮, 等. 烟草转GroEL 基因抗双生病毒的研究. 江苏农业学报. 2009, 25(2): 260-264
- 46) 吴云锋, 林林, 崔晓峰. 麦二叉蚜体内病毒结合蛋白基因的克隆和原核表达. 病毒学报. 2002, 18(3): 275-278
- 47) 徐红星, 吕仲贤, 陈建明, 等. 褐飞虱在适应抗性水稻品种“IR26”过程中的氨基酸含量变化. 中国生态农业学报. 2008, 16 (4): 925-928.
- 48) 徐红星, 郑许松, 刘淑平, 等. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. 昆虫知识. 2009a, 46(3): 350-354
- 49) 徐红星, 郑许松, 吕仲贤. 昆虫体内共生菌在其适应寄主植物过程中的作用. 中国植物保护学会 2009 学术年会《粮食安全与植保科技创新》. 北京: 中国农业科学技术出版社. 2009b, 523-526

- 50) 徐红星, 郑许松, 董中华, 等. 杀虫剂对褐飞虱体内共生菌的影响. 浙江农业学报. 2000, 12 (3): 126-128
- 51) 薛宝燕, 程新胜, 陈树仁, 等. 昆虫共生菌研究进展. 中国微生态学杂志, 2004, 16(3): 189-191
- 52) 严健, 邓可京, 曹清玉, 等. 灰飞虱类酵母型共生菌 18S rDNA 序列变异及系统发生. 遗传学报. 2000, 27(3): 219-226
- 53) 翟保平. 稻飞虱: 国际视野下的中国问题. 应用昆虫学报. 2011, 48(5): 1184-1193
- 54) 张海燕, 王倩, 付海滨, 等. 赤眼蜂种间沃尔巴克氏体水平人工转染供体蜂种的筛选. 中国生物防治. 2009, 25(3): 2881-2884
- 55) 张珏锋, 陈建明, 陈法军, 等. 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. 2009, 42(6): 2211-2216
- 56) 张珏锋, 吕仲贤, 陈法军, 等. 褐飞虱不同致害性种群体内共生菌 18S rDNA 部分序列比较. 昆虫学报. 2006, 49(3): 528-532
- 57) 张开军, 朱文超, 刘静, 等. 白背飞虱中的 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 双重感染特性. 昆虫学报. 2012, 55(12): 1345-1354
- 58) 周岩岩, 董胜张, 白旭, 等. 三种稻飞虱体内类酵母共生菌 18S rDNA 和 ITS-5.8S rDNA 序列克隆及进化分析. 昆虫学报. 2012, 55(4): 482-487
- 59) 周亦红, 韩召军. 褐飞虱生物型研究进展: 致害性变异的遗传机制. 昆虫知识. 2003, 40(3): 199-203
- 60) Adams D, Douglas A E. How symbiotic bacteria influence plant utilization by the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. Oecologia. 1997, 110(4): 528-532
- 61) Akman L, Yamashita A, Watanabe H, *et al.* Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. Nat. Genet. 2002, 32: 402-407
- 62) Baumann P, Lai C Y, Roubakhsh D, *et al.* Genetics, physiology, and revolutionary relationship of the genus *Buchnera* intracellular symbionts of aphids. Annu. Rev. Microbiol. 1995, 49: 55-94
- 63) Baumann P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. Annu. Rev. Microbiol. 2005, 59: 155-189
- 64) Bordenstein S R, Wernegreen J J. Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): Infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. Mol. Biol. Evol. 2004, 21: 1981-1991
- 65) Braig R H, Guzman H, Tesh R B, *et al.* Replacement of the natural *Wolbachia* symbiont of *Drosophila simulans* with a mosquito counterpart. Nature. 1994, 367:

453-455

- 66) Brumin M, Kontsedalov S, Ghanim M. *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Sci.* 2011, 18: 57-66
- 67) Brune A, Ohkuma M. Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. In: Bignell D E, *et al.* eds. *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer, Dordrecht, the Netherlands. 2011, 439-476
- 68) Campbell B C. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insect. In: Bernays E A. eds. *Insect-Plant Interaction*. Vol.1. Florida: CRC Press Inc. 1990, 1-44
- 69) Chen C C, Cheng L L, Chen Kuan C, *et al.* Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. I. Histological observations and population changes of the symbiote. *J. Appl. Entomol.* 1981, 91: 321-327
- 70) Cheng D J, Hou R F. Ultrastructure of the yeast like endosymbiont in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homopteran: Delphacidae). *Endocyt. Cell Res.* 1996, 11: 107-117
- 71) Cloutier C, Douglas A E. Impact of a parasitoid on the bacterial symbiosis of its aphid host. *Entomol. Exp. Appl.* 2003, 109: 13-19
- 72) Cole S T, Eiglmeier K, Parkhill J, *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001, 409: 1007-1011
- 73) Dale C, Beeton M, Harbison C, *et al.* Isolation, pure culture and characterization of *Candidatus Arsenophonus arthropodicus*, an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscoid louse fly, *Pseudolynchia canariensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72: 2997-3004
- 74) Dale C, Maudlin I. *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. Nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49: 267-275
- 75) Dale C, Moran N A. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell.* 2006, 126: 453-465
- 76) Darby A C, Chandler S M, Welburn S C, *et al.* Aphid-symbiotic bacteria cultured in insect cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71: 4833-4839
- 77) Dean G J. Effect of temperature on cereal aphids *Metopolophium dirhodum* (Wlk.), *Rhopalosiphum padi* (L.) and *Macrosiphum avenae* (F.) (Hem., Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 1974, 63: 401-409
- 78) Dedeine F, Vavre F, Fleury F, *et al.* Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98: 6247-6252

- 79) Degnan P H, Lazarus A B, Wernegreen J J. Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res.* 2005, 15: 1023-1033
- 80) Dobson S L, Bourtzis K, Braig H R, *et al.* *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999, 29: 153-160
- 81) Douglas A E. Nutritional interactions in insect microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Ann. Rev. Entomol.* 1998, 43: 17-37
- 82) Dowd P F. Symbiont mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa V A, *et al.* eds. *Microbial Mediation of Plant-Herbivore Interactions*. Wiley Interscience. New York. 1991, 411-440
- 83) Duron O, Bouchon D, Boutin S, *et al.* The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* 2008, 6: 27
- 84) Dyll S D, Brown M T, Johnson P J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 2004, 304(9): 253-257
- 85) Eastop V F. Aphid plant associations. In: Stone A R, *et al.*, eds. *Coevolution and Systematics*. Oxford: Clarendon Press. 1986, 35-54
- 86) Engelstädter J, Hurst G D D. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2009, 40: 127-149
- 87) Falabella P, Tremblay E, Pennacchio F. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. *Entomol. Exp. Appl.* 2000, 97: 1-9
- 88) Feldhaar H, Gross R. Insects as hosts for mutualistic bacteria. *IJMM.* 2009, 299: 1-8
- 89) Feldhaar H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* 2011, 36: 533-543
- 90) Ferrari J, Darby A C, Daniell T J, *et al.* Linking the bacterial community in pea aphids with host plant use and natural enemy resistance. *Ecol. Entomol.* 2004, 29: 60-65
- 91) Ferrari J, Vavre F. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philos T. R. Soc. SOC B: Biol. Sci.* 2011, 366: 1389-1400
- 92) Frago E, Dicke M, Godfray H C J. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends Ecol. Evol.* 2012, 27(12): 705-711
- 93) Fuhrman J A, Comeau D E, Hagstrom A, *et al.* Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, 54: 1426-1429
- 94) Furukawa S, Tanaka K, Fukatsu T, *et al.* In vitro infection of *Wolbachia* in insect cell lines. *Appl. Entomol. Zool.* 2008, 43 (4): 519-525

- 95) Gil R, Silva F J, Pereto J, *et al.* Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004, 68: 518-537
- 96) Gil R, Silva F J, Zientz E, *et al.* The genome sequence of *Blochmannia flordanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100: 9388-9393
- 97) Gil-Turnes MS, Fenical W. Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biol. Bull.* 1992, 182: 105-108
- 98) Giovannoni S J, Britschgi T B, Moyer C L, *et al.* Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature.* 1990, 345: 60-63
- 99) Gomez-Valero L, Soriano-Navarro M, Perez-Brocal V, *et al.* Coexistence of *Wolbachia* with *Buchnera aphidicola* and a secondary symbiont in the aphid *Cinara cedri*. *J. Bacteriol.* 2004, 186: 6626-6633
- 100) Goodacre S L, Martin O Y, Bonte D, *et al.* Microbial modification of host longdistance dispersal capacity. *BMC Biol.* 2009, 7: 32
- 101) Grenier S, Pintureau B, Heddi A, *et al.* Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. London (B).* 1998, 265: 1441-1445
- 102) Haine E. R. Symbiont mediated protection. *Proc. R. Soc. London (B).* 2008, 275: 353-361
- 103) Harmon J P, Moran N A, Ives A R. Species response to environmental change: impacts of food web interactions and evolution. *Science.* 2009, 323: 1347-1350
- 104) Harris L R, Kelly S E, Hunter M S, *et al.* Population dynamics and rapid spread of Cardinium, a bacterial endosymbiont causing cytoplasmic incompatibility in *Encarsia pergandiella* (Hymenoptera: Aphelinidae). *Heredity.* 2010, 104: 239-246
- 105) Hedges L M, Brownlie J C, O'Neill S L, *et al.* *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science.* 2008, 322: 702
- 106) Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, *et al.* How many species are infected with *Wolbachia*? a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008, 2: 215-220
- 107) Hoffmann A A, Turelli M, Harshman L G. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics.* 1990, 126: 933-948
- 108) Hogenhout S A, Ammar E D, Whitfield A E *et al.* Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2008, 46: 327-35
- 109) Hongoh Y, Ishikawa H. Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. *Zool. Sci.* 1997, 14:581-586

- 110) Horgan F. Mechanisms of resistance: a major gap in understanding planthopper-rice interaction. In: Heong K L and Hardy B eds. *Planthoppers: new threats to the sustainability of intensive rice production systems in Asia*. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute. 2009, 281-302
- 111) Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, *et al.* *Wolbachia* as a bacteriocyte associated nutritional mutualist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009, 107(2): 769-774
- 112) Hurst G D D, Anbutsu H, Kutsukake M, *et al.* Hidden from the host, *Spiroplasma* bacteria infecting *Drosophila* do not cause an immune responses, but are suppressed by ectopic immune activation. *Insect Mol. Biol.* 2003, 12: 93-97
- 113) Hurst G D D, Bandi C, Sacchi L, *et al.* *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited *Flavobacteria* that kill males only. *Parasitol.* 1999, 118: 125-134
- 114) Hypsa V, Dale C. In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*”, an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997, 47: 1140-1144
- 115) Jager C R, Pintureau B, Grenier S, *et al.* Detection of *Wolbachia* within Trichogrammatidae species using FtsZ-PCR, and horizontal transfer by microinjection. *Proc. Exper. Appl. Entomol.* 1997, 8: 47-52
- 116) Jeyaprakash A, Hoy M A. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 2000, 9(4): 393-405
- 117) Kaltenpoth M, Götter W, Herzner G, *et al.* Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr. Biol.* 2005, 15: 475-479
- 118) Karley A J, Douglas A E, Parker W E. Amino acid composition and nutritional quality of potato leaf phloem sap for aphids. *J. Exp. Biol.* 2002, 205: 3009-3018
- 119) Kawai S, Matsumoto Y, Gotoh T, *et al.* Transinfection of *Wolbachia* in planthoppers: nymphal injection of cultured *Wolbachia* and infection dynamics. *Environ. Entomol.* 2009, 38(6): 1626-1633
- 120) Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity. *Nature Rev. Microbiol.* 2004, 2: 141-150
- 121) Kellner R L L, Dettner K. Differential efficacy of toxin pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. *Oecologia.* 1996, 107: 293-300
- 122) Kellner R L L. Suppression of pederin biosynthesis through antibiotic elimination of endosymbionts in *Paederus sabaeus*. *J. Insect Physiol.* 2001, 47: 475-483

- 123) Kellner RLL. What is the basis of pederin polymorphism in *Paederus riparius* rove beetles? The endosymbiotic hypothesis. *Entomol. Exp. Appl.* 1999, 93: 41-49
- 124) Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, *et al.* Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *BMC Biol.* 2009, 7: 2
- 125) 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 apida. *Proc. R. Soc. London (B)*. 2003, 270: 2543-2550
- 126) Leadbetter J R. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003, 6: 274-281
- 127) Lee Y H, Hou R F. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). *J. Insect Physiol.* 1987, 33: 851-860
- 128) Leonardo T E, Mondor E B. Symbiont modifies host lifehistory traits that affect gene flow. *Proc. R. Soc. London (B)*. 2006, 273: 1079-1084
- 129) Leonardo T E, Muir G T. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proc. R. Soc. London (B)*. 2003, 270: S209-212
- 130) Liu S S, De Barro P J, Xu J, *et al.* Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science*. 2007, 318: 1769-1772
- 131) Liu W T, Marsh T L, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63: 4516-4522
- 132) Losey J E, Ives A R, Harmon J, *et al.* A polymorphism maintained by opposite patterns of parasitism and predation. *Nature*. 1997, 388: 269-272
- 133) Lu Z X, Yu X P, Chen J M, *et al.* Dynamics of yeast-like symbiote and its relationship with the virulence of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to resistant rice varieties. *J. Asia-Pacific Entomol.* 2004, 7(3): 317-323
- 134) Lyte M, Gaykema R, Goehler L E. Behavior modification of host by microbes. *BMC Biol.* 2009, 7(32): 121-127
- 135) Matthew C Z, Darby A C, Young S A, *et al.* The rapid isolation and growth dynamics of the tsetse symbiont *Sodalis glossinidius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005, 248: 69-74

- 136) Montllor C B, Maxmen A, Purcell A H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* 2002, 27: 189-195
- 137) Moran N A, Degnan P H, Santos S R, *et al.* The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005, 102: 16919-16926
- 138) Moran N A, Dunbar H E, Wilcox J L. Regulation of transcription in a reduced bacterial genome: Nutrient-provisioning genes of the obligate symbiont, *Buchnera aphidicola*. *J. Bacteriol.* 2005, 187: 4229-4237
- 139) Moran N A, Plague G R. Genomic changes following host restriction in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2004, 14: 627-633
- 140) Moran N A. Symbiosis. *Curr Biol.* 2006, 16: 866-871
- 141) Morin S, Ghanim M, Sobol I, *et al.* The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *J. Virol.* 2000, 276: 404-416
- 142) Morin S, Ghanim M, Zeidan M, *et al.* A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *J. Virol.* 1999, 256: 75-84
- 143) Moya A, Pereto J, Gil R, *et al.* Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Rev. Genet.* 2008, 9: 218-229
- 144) Mukamolova G V, Kaprelyants A S, Young D I, *et al.* A bacterial cytokine. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* 1998, 95: 8916-8921
- 145) Muyzer G, Dewaal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59: 695-700
- 146) Nasu S, Suenaga H. On the embryonic development of planthoppers. *Bull. Kyushu Agr. Expt. Stn.* 1958, 5: 71-84
- 147) Nikitushkin V D, Demina G R, Kaprelyants A S. Effect of secreted Rpf protein on intracellular contacts in *Micrococcus luteus* and *Mycobacterium smegmatis* cultures. *Microbiol.* 2011, 80(2): 143-149
- 148) Noda H, Kodama K. Phylogenetic position of yeast-like endosymbionts of anobiid beetles. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62(1): 162-167
- 149) Noda H, Nakashima N, Koizumi M. Phylogenetic position of yeastlike symbiotes of rice planthopper based on partial 18S rDNA sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1995, 25(5): 639-646

- 150) O'Neill S L, Pettigrew M M, Sinkins S P, *et al.* *In vitro* cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol. Biol.* 1997, 6: 33-39
- 151) Ohtaka C, Nakamura H, Ishikawa H. Structures of chaperonins from a intracellular symbiont and their functional expression in *Escherichia coli* GroE Mutants. *J. Bacteriol.* 1992, 174: 1869-1874
- 152) Oliver K M, Degnan P H, Burke G R, *et al.* Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu. Rev. Entomol.* 2010, 55: 247-266
- 153) Oliver K M, Moran N A, Hunter M S. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005, 102: 12795-12800
- 154) Oliver K M, Russell J A, Moran N A, *et al.* Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003, 100: 1803-1807
- 155) Otuka A, Matsumura M, Watanabe T, *et al.* A migration analysis for rice planthoppers, *Sogatella furcifera* (Horváth) and *Nilaparvata lugens* (Stål) (Delphacidae), emigrating from northern Vietnam from April to May. *Appl. Entomol. Zool.* 2008, 43(4): 527-534
- 156) Pennacchio F, Fanti P, Falabella P, *et al.* Arch. Development and nutrition of the braconid wasp, *Aphidius ervi* in aposymbiotic host aphids. *Insect Biochem. Physiol.* 1999, 40(1): 53-63
- 157) Perotti M A, Allen J M, Reed D L, *et al.* Host-symbiont interactions of the primary endosymbiont of human head and bodylice. *FASEB J.* 2007, 21(4): 1058-1066
- 158) Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of paederus beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99: 14002-14007
- 159) Pontes M, Smith K, *et al.* Insect facultative symbionts: biology, culture, and genetic modification. In: Bourtzis K, Miller T A. (Eds.) *Insect Symbiosis* (vol. 3). CRC Press, Boca Raton. 2009
- 160) Prado S S, Golden M, Follett P A, *et al.* Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). *Environ. Entomol.* 2009, 38: 103-109
- 161) Rappe M S, Connon S A, Vergin K L, *et al.* Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature.* 2002, 418: 630-631
- 162) Rasmussen R A, Khalil M A K. Global production of methane by termites. *Nature.* 1983, 301: 700-702

- 163) Renesto P, Crapoulet N, Ogata H, *et al.* Genome based design of a cell free culture medium for *Tropheryma whipplei*. *Lancet*. 2003, 362: 447-449
- 164) Shan H W, Lu Y H, Bing X L, *et al.* Differential responses of the whitefly *Bemisia tabaci* symbionts to unfavorable low and high temperature. *Microbial Ecology*. 2014, Doi: 10.1007/s00248-014-0424-3
- 165) Ruan Y M, Xu J, Liu S S. Effects of antibiotics on fitness of the B biotype and a non-B biotype of the white fly *Bemisia tabaci*. *Entomol. Exp. Appl.* 2006, 121(2): 159-166
- 166) Russell J A, Latorre A, Sabater-Munoz B, *et al.* Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.* 2003, 12: 1061-1075
- 167) Sandstrom J P, Russel J A, White J P, *et al.* Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts in insects. *Mol. Ecol.* 2001, 10: 217
- 168) Sasaki T and Ishikawa H. Transinfection of *Wolbachia* in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Heredity*. 2000, 85: 130-135
- 169) Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H. Nitrogen recycling in brown planthopper *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. *J. Insect Physiol.* 1996, 42(2): 125-129
- 170) Savary S, Horgan F, Willocquet L, *et al.* A review of principles for sustainable pest management in rice. *Crop Prot.* 2012, 32: 54-63.
- 171) Scarborough C L, Ferrari J, Godfray H C J. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*. 2005, 310: 3781
- 172) Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, *et al.* Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(13): 5142-5150
- 173) Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, *et al.* Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp APS. *Nature*. 2000, 407: 81-86
- 174) Simon J C, Carré S, Boutin M. *et al.* Host based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proc. R. Soc. London (B)*. 2003, 270: 1703-1712
- 175) Tamas I, Klasson L, Canback B, *et al.* 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*. 2002, 296: 2376-2379
- 176) Tang M, Lv L, Jing S, *et al.* Bacterium symbionts of the brown planthopper,

- Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76(6): 1740-1745
- 177) Toh H, Weiss B L, Perkin S A, *et al.* Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. Genome Res. 2006, 16: 149-156
- 178) Trowbridge R E, Dittmar K, Whiting M F. Identification and phylogenetic analysis of *Arsenophonus* and *Photorhabdus* type bacteria from adult Hippoboscidae and Streblidae (Hippoboscoidea). J. Invert. Pathol. 2006, 91(1): 64-68
- 179) Tshuchida T, Koga R, Fukatsu T. Host plant specialization governed by facultative symbiont. Science. 2004, 303: 1989
- 180) Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, *et al.* Symbiotic bacterium modifies aphid body colour. Science. 2010, 330: 1102-1104.
- 181) van den Heuvel J F J M, Bruyere A, Hogenhout S A, *et al.* The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. J. Virol. 1997, 71: 7258-7265
- 182) van Ham R C, Kamerbeek J, Palacios C, *et al.* Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003, 100: 581-586
- 183) Vorburger C, Gehrler L, Rodriguez P. A strain of the bacterial symbiont Regiella insecticola protects aphids against parasitoids. Biol. Lett. 2010, 6: 109-111
- 184) Voronin D, TranVan V, Potier P, *et al.* Transinfection and growth discrepancy of *Drosophila* *Wolbachia* strain wMel in cell lines of the mosquito *Aedes albopictus*. J. Appl. Microbio. 2009, 12: 1-9
- 185) Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. FEMS Microbiol. Rev. 1990a, 6(2-3): 105-115
- 186) Ward D M, Weller R, Bateson M M. 16S ribosomal RNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature. 1990b, 345: 63-66
- 187) Wasserman S S, Futuyma D J. Evolution of host plant utilization in laboratory populations of the southern cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae). Evolution. 1981, 35: 605-617
- 188) Weeks A R, Velten R, Stouthamer R. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. Proc. R. Soc. Lond. B. 2003, 270: 1857-1865

- 189) Weeks A R, Marec F, Breeuwer J A J. A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*. 2001, 292: 2479-2482.
- 190) Welburn S C, Maudlin I, Ellis D S. In vitro cultivation of *Rickettsia*-like organisms from *Glossina* spp. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1987, 81: 331-335
- 191) Werren J H, Baldo L, Clark M E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 6: 741-751
- 192) Wetzel J M, Ohnishi M, Fujita T, *et al.* Diversity in steroidogenesis of symbiotic microorganisms from planthoppers. *J. Chem. Ecol.* 1992, 18: 2 083-2 094
- 193) Whitfield A E, Rotenberg D, Aritua V, *et al.* Analysis of expressed sequence tags from Maize mosaic rhabdovirus-infected gut tissues of *Peregrinus maidis* reveals the presence of key components of insect innate immunity. *Insect Mol. Biol.* 2011, 20(2): 225-242
- 194) Wilkinson T L, Adams D, Minto L B, *et al.* The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid. *J. Exp. Biol.* 2001, 204: 3027-3038
- 195) Wilkinson T L, Koga R, Fukatsu T. The role of host nutrition in symbiont regulation –the impact of dietary nitrogen on the proliferation of obligate and facultative bacterial endosymbionts in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 1362-1366
- 196) Wu D, Daugherty S C, van Aken S E, *et al.* Metabolic complementarity and genomics of the dual symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* 2006, 4: e188
- 197) Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly S E, *et al.* A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, 98: 12555-12560
- 198) Zchori-Fein E, Brown J K. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2002, 95(6): 711-718
- 199) Zhu L Y, Zhang K J, Zhang Y K, *et al.* *Wolbachia* strengthens *Cardinium* induced cytoplasmic incompatibility in the spider mite *Tetranychus piercei* McGregor. *Curr. Microbiol.* 2012, 65(5): 516-523
- 200) Zientz E, Dandekar T, Gross R. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004, 68: 745-777

附录 攻读博士学位期间已发表的论文和授权发明专利

I 已发表论文

- (1) **Xu Hong-xing (徐红星)**, Zheng Xu-song, Yang Yajun, Wang Xin, Ye Gongyin, Lu Zhong-xian*. Bacterial community in different populations of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). Rice Science. 2014, 21(1): 59-64
- (2) **Xu Hong-xing (徐红星)**, He Xiao-chan, Zheng Xu-song, Yang Ya-jun, Lu Zong-xian*. Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) directly affects the feeding and reproduction behavior of its vector, *Sogatella furcifera* (Horváth) (Hemiptera: Delphacidae). Virology Journal. 2014, 1: 55
- (3) **Xu Hong-xing (徐红星)**, He Xiao-chan, Zheng Xu-song, Yang Ya-jun, Lu Zong-xian*. Influence of rice black streaked dwarf virus on the ecological fitness of non-vector planthopper *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). Insect Science. 2013, 00, 1-8, DOI 10.1111/1744-7917.12045
- (4) **徐红星**, 郑许松, 杨亚军, 王新, 傅强, 叶恭银*, 吕仲贤*. 褐飞虱体内细菌群落的 PCR-DGGE 分析. 中国水稻科学. 2014, 28(2): 217-222,
- (5) **徐红星**, 郑许松, 刘淑平, 叶恭银, 吕仲贤. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. 昆虫知识, 2009, 46(3): 350-354
- (6) **徐红星**, 郑许松, 吕仲贤. 昆虫体内共生菌在其适应寄主植物过程中的作用. 中国植物保护学会2009学术年会《粮食安全与植保科技创新》. 北京: 中国农业科学技术出版社, 523-526

II 拟发表论文

- (1) Xu Hongxing, *et al.* Changes of endosymbiot bacteria in the adaptation of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) to different resistant rice varieties.
- (2) Xu Hongxing, *et al.* Diversity and relationship of bacteria in rice plant, brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) and natural enemies

- (3) Xu Hongxing, *et al.* Identification of a strain of *Enterobacter* symbiont isolated from brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) in vitro.

III 发明专利

- (1) 徐红星, 吕仲贤, 郑许松, 等. 一种防治褐飞虱的植物源农药. 专利号 ZL201110304191.7
- (2) 徐红星, 吕仲贤, 陈桂华, 等. 一种田间评价水稻抗稻飞虱特性的方法. 专利号 ZL201010162757.2
- (3) 徐红星, 吕仲贤, 郑许松, 等. 一种稻飞虱及其天敌的饲养装置. 专利号 ZL201110304604.1

附表 水稻-褐飞虱-天敌体内细菌的种类

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>A17</i>	<i>A17</i>	<i>A4</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>A17</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>A4</i>	<i>Abiotrophia</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>A4</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Abiotrophia</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Acidovorax</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Acidovorax</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Actinomadura</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Actinobacillus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinotalea</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinobacillus</i>	<i>Actinomadura</i>
<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomycetospora</i>
<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Aerococcus</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Aeromicrobium</i>
<i>Agrococcus</i>	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Aggregatibacter</i>
<i>Agromyces</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Alkanindiges</i>	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>Agrobacterium</i>
<i>Alkanindiges</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Alkanindiges</i>	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrococcus</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrococcus</i>
<i>Alloiococcus</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Aneurinibacillus</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Agrococcus</i>	<i>Agromyces</i>
<i>Anaeromyxobacter</i>	<i>Amaricoccus</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Amaricoccus</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Alkanindiges</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Akkermansia</i>
<i>Anaerostipes</i>	<i>Anaerococcus</i>	<i>Aquicella</i>	<i>Anaerococcus</i>	<i>Alkanindiges</i>	<i>Allobaculum</i>	<i>Alcanivorax</i>	<i>Alkanindiges</i>
<i>Aquabacterium</i>	<i>Anaerolinea</i>	<i>Aquimonas</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Alkanindiges</i>	<i>Alloiococcus</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Aquicella</i>	<i>Amaricoccus</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Alloiococcus</i>	<i>Amaricoccus</i>
<i>Asticcacaulis</i>	<i>Aquicella</i>	<i>Asticcacaulis</i>	<i>Arenimonas</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Aquicella</i>	<i>Aminobacter</i>	<i>Anaerococcus</i>
<i>Azohydromonas</i>	<i>Armatimonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Aquicella</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Anaerococcus</i>	<i>Aquabacterium</i>
<i>Azospira</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Azoarcus</i>	<i>Arenimonas</i>	<i>Asticcacaulis</i>	<i>Aquabacterium</i>	<i>Aquicella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Asticcacaulis</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Azohydromonas</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arenimonas</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>Balneimonas</i>	<i>Azohydromonas</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Asticcacaulis</i>	<i>Azospira</i>	<i>Asticcacaulis</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Bdellovibrio</i>	<i>Azospira</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Atopobium</i>	<i>Asticcacaulis</i>
<i>Blastomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Balneimonas</i>	<i>Azohydromonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Azohydromonas</i>	<i>Azohydromonas</i>
<i>Bosea</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Azorhizophilus</i>	<i>Azospirillum</i>
<i>Brachybacterium</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Balneimonas</i>	<i>Balneimonas</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Bacteriovorax</i>	<i>Balneimonas</i>
<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bdellovibrio</i>
<i>Bulleidia</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Balneimonas</i>	<i>Blastomonas</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Bulleidia</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Bosea</i>
<i>Candidatus</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Bulleidia</i>	<i>Blastomonas</i>	<i>Brachybacterium</i>
<i>Candidatus</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Brachybacterium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Brevibacillus</i>
<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevundimonas</i>
<i>Cardiobacterium</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Buchnera</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Cardiobacterium</i>	<i>Devosia</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Bulleidia</i>	<i>Bulleidia</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Cardiobacterium</i>	<i>Cardiobacterium</i>	<i>Catonella</i>	<i>C39</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Chromohalobacter</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Dyadobacter</i>	<i>Catonella</i>	<i>Catenulispora</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Caloramator</i>	<i>Calothrix</i>
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Catonella</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Chromohalobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Chitinophaga</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>
<i>Comamonas</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Chitinophaga</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>Corynebacterium</i>	<i>Chthoniobacter</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Chromohalobacter</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chromohalobacter</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>
<i>Deinococcus</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Candidatus</i>
<i>Desulfobulbus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Candidatus</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Devosia</i>	<i>Devosia</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Cardiobacterium</i>
<i>Dietzia</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Devosia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Couchioplanes</i>	<i>Catonella</i>	<i>Catenibacterium</i>
<i>Dok59</i>	<i>Edaphobacter</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Dialister</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Catonella</i>
<i>Dyadobacter</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Dermabacter</i>	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Caulobacter</i>
<i>Elizabethkingia</i>	<i>Emticicia</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Devosia</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Cellvibrio</i>	<i>Cellulomonas</i>
<i>Emticicia</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Devosia</i>	<i>CF231</i>	<i>Cellvibrio</i>
<i>Enhydrobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Kaistobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Dokdonella</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Chitinophaga</i>	<i>Chromobacterium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Dokdonella</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Chromohalobacter</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erythromicrobium</i>	<i>Emticicia</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Chromohalobacter</i>	<i>Chryseobacterium</i>
<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Emticicia</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Fimbriimonas</i>	<i>Legionella</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Comamonas</i>
<i>Flectobacillus</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Gardnerella</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Couchioplanes</i>
<i>Gemmata</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus</i>
<i>Glycomyces</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Filifactor</i>	<i>Filifactor</i>	<i>DA101</i>	<i>Deinococcus</i>
<i>Gordonia</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Luteolibacter</i>	<i>Granulicella</i>	<i>Fimbriimonas</i>	<i>Fimbriimonas</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Dermabacter</i>
<i>Haemophilus</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Marinibacillus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Devosia</i>	<i>Dermacoccus</i>
<i>Halomonas</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Marinobacter</i>	<i>Haererehalobacter</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Dietzia</i>	<i>Devosia</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>HAW</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Glycomyces</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Dyadobacter</i>	<i>Dialister</i>
<i>Helicobacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Methylophaga</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Dietzia</i>
<i>HTCC</i>	<i>Hyphomonas</i>	<i>Methylotenera</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>GOUTA19</i>	<i>GOUTA19</i>	<i>Emticicia</i>	<i>Dyadobacter</i>
<i>Hydrocarboniphaga</i>	<i>Knoellia</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Elizabethkingia</i>
<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Haererehalobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enhydrobacter</i>
<i>Hydrogenophilus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Knoellia</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Hymenobacter</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Hydrocarboniphaga</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Erwinia</i>
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Legionella</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrocarboniphaga</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium</i>
<i>Hyphomonas</i>	<i>Leptolynghya</i>	<i>Nocardioideis</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Hydrogenophilus</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Facklamia</i>	<i>Faecalibacterium</i>
<i>Kaistobacter</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Legionella</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hydrogenophilus</i>	<i>Filifactor</i>	<i>Filifactor</i>
<i>Kocuria</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hylemonella</i>	<i>Finegoldia</i>	<i>Fimbriimonas</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Hyphomonas</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Flavisolibacter</i>	<i>Finegoldia</i>
<i>Lautropia</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavisolibacter</i>
<i>Legionella</i>	<i>Luteibacter</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Jeotgaliococcus</i>	<i>Kingella</i>	<i>Frigoribacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Leptotrichia</i>	<i>Luteolibacter</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Kaistia</i>	<i>Knoellia</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Leucobacter</i>	<i>Lutibacterium</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Kaistobacter</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Gemmata</i>	<i>Gardnerella</i>
<i>Limnobacter</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Pigmentiphaga</i>	<i>Lutibacterium</i>	<i>Kingella</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Gemmatimonas</i>	<i>Gemmata</i>
<i>Luteimonas</i>	<i>Marinibacillus</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Knoellia</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Gordonia</i>
<i>Luteolibacter</i>	<i>Meiothermus</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Marinibacillus</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Legionella</i>	<i>Glycomyces</i>	<i>GOUTA19</i>
<i>Lutibacterium</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Magnetospirillum</i>	<i>Methylotenera</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Haererehalobacter</i>
<i>Marinibacillus</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Prostheobacter</i>	<i>Methylotenera</i>	<i>Lautropia</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Haloanella</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>Mesorhizobium</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Pseudidiomarina</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Legionella</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Halomonas</i>
<i>Methylobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Luteibacter</i>	<i>heteroC45_4W</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>Methylothena</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Magnetospirillum</i>	<i>Hydrocarboniphaga</i>	<i>Herpetosiphon</i>
<i>Methyloversatilis</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Marinibacillus</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Hydrogenophaga</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Luteolibacter</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>Hydrogenophilus</i>	<i>Hydrogenophilus</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Hymenobacter</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Rheinheimera</i>	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylophaga</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Nocardioideis</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Methylophaga</i>	<i>Methylothena</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Methylothena</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Jeotgaliococcus</i>	<i>Knoellia</i>
<i>Nonomuraea</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Riemerella</i>	<i>Oribacterium</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Kaistia</i>	<i>Kocuria</i>
<i>Novosphingobium</i>	<i>Oribacterium</i>	<i>Roseomonas</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Kaistobacter</i>	<i>Kribbella</i>
<i>Ochrobactrum</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Rothia</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Kingella</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Oribacterium</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Rubrivivax</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Knoellia</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Paenibacillus</i>	<i>Parapedobacter</i>	<i>Rubrobacter</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Myroides</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Lautropia</i>
<i>Parabacteroides</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Parapedobacter</i>	<i>Myroides</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Kribbella</i>	<i>Legionella</i>
<i>Paracoccus</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Schlegelella</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lentzea</i>
<i>Parapedobacter</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Peptoniphilus</i>	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Nevskia</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leptolyngbya</i>
<i>Pedomicrobium</i>	<i>Phenylobacterium</i>	<i>Solibacillus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Nevskia</i>	<i>Niabella</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Leptothrix</i>
<i>Peptococcus</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Phenylobacterium</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Nocardioideis</i>	<i>Lautropia</i>	<i>Leptotrichia</i>
<i>Peptoniphilus</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Pigmentiphaga</i>	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Legionella</i>	<i>Leucobacter</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Sphingopyxis</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Lentzea</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Phaeosporillum</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Oribacterium</i>	<i>Odoribacter</i>	<i>Leptotrichia</i>	<i>Limnobacter</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>Phenyllobacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Oribacterium</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Luteibacter</i>
<i>Pigmentiphaga</i>	<i>Pseudaminobacter</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Promicromonospora</i>	<i>Pandoraea</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Limnobacter</i>	<i>Luteimonas</i>
<i>Pirellula</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Parabacteroides</i>	<i>Pandoraea</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Lysobacter</i>
<i>Planctomyces</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Tsukamurella</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Luteolibacter</i>	<i>Marinibacillus</i>
<i>Planifilum</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Parapedobacter</i>	<i>Parapedobacter</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Mesorhizobium</i>
<i>Plankothrix</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Weissella</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Marinibacillus</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Wolbachia</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Peptoniphilus</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Meiothermus</i>	<i>Methylotenera</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Zhouia</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Methyloversatilis</i>
<i>Prochlorococcus</i>	<i>Rhodobacter</i>		<i>Rhizobium</i>	<i>Phenyllobacterium</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Microbacterium</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>		<i>Rhodobacter</i>	<i>Pigmentiphaga</i>	<i>Phenyllobacterium</i>	<i>Methylophaga</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Prostheobacter</i>	<i>Rhodoplanes</i>		<i>Rickettsia</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Pigmentiphaga</i>	<i>Methylotenera</i>	<i>Mogibacterium</i>
<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Rickettsia</i>		<i>Riemerella</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Methyloversatilis</i>	<i>Moryella</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Riemerella</i>		<i>Roseomonas</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Pseudonocardia</i>	<i>Rothia</i>		<i>Rothia</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Myroides</i>
<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Rubrivivax</i>		<i>Rubrivivax</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Promicromonospora</i>	<i>Mogibacterium</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Psychrobacter</i>	<i>Rubrobacter</i>		<i>Rubrobacter</i>	<i>Prostheobacter</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Nesterenkonia</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>Saccharopolyspora</i>		<i>Ruminococcus</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Propionivibrio</i>	<i>Myroides</i>	<i>Nevskia</i>
<i>RFN20</i>	<i>Schlegelella</i>		<i>Schlegelella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Proteus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Rhodobacter</i>	<i>Serratia</i>		<i>Serratia</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Providencia</i>	<i>Nesterenkonia</i>	<i>Nocardioides</i>
<i>Rhodococcus</i>	<i>Shewanella</i>		<i>Shewanella</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Pseudidiomarina</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Novispirillum</i>
<i>Rhodoplanes</i>	<i>Shinella</i>		<i>Skermanella</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Nocardioides</i>	<i>Novosphingobium</i>
<i>Rickettsia</i>	<i>Sphingobacterium</i>		<i>Sneathia</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Novispirillum</i>	<i>Ochrobactrum</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>Riemerella</i>	<i>Sphingomonas</i>		<i>Sphaerochaeta</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Oleomonas</i>
<i>Roseburia</i>	<i>Sphingopyxis</i>		<i>Sphingobacterium</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Oribacterium</i>
<i>Roseomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>		<i>Sphingomonas</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Oscillospira</i>
<i>Rothia</i>	<i>Stenotrophomonas</i>		<i>Staphylococcus</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Opitutus</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Rubrivivax</i>	<i>Sterolibacterium</i>		<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Riemerella</i>	<i>Rheinheimera</i>	<i>Oribacterium</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Rubrobacter</i>	<i>Streptococcus</i>		<i>Streptococcus</i>	<i>Rothia</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Parapedobacter</i>
<i>Ruminococcus</i>	<i>Streptomyces</i>		<i>Streptomyces</i>	<i>Rubrivivax</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Parascardovia</i>
<i>Runella</i>	<i>Syntrophobacter</i>		<i>Tepidimonas</i>	<i>Rubrobacter</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Paenisporosarcina</i>	<i>Patulibacter</i>
<i>Saccharomonospora</i>	<i>Tetragenococcus</i>		<i>Tetragenococcus</i>	<i>Runella</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Parahacteroides</i>	<i>Pedobacter</i>
<i>Schlegelella</i>	<i>Treponema</i>		<i>Tetrathiobacter</i>	<i>Saccharomonospora</i>	<i>Riemerella</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>Shewanella</i>	<i>Tsukamurella</i>		<i>Thermomonas</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Roseomonas</i>	<i>Parapedobacter</i>	<i>Peptoniphilus</i>
<i>Shinella</i>	<i>Veillonella</i>		<i>Thiobacillus</i>	<i>Schlegelella</i>	<i>Rothia</i>	<i>Parascardovia</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Solihacillus</i>	<i>Wautersiella</i>		<i>Treponema</i>	<i>Sediminibacterium</i>	<i>Rubrivivax</i>	<i>Patulibacter</i>	<i>Phaeospirillum</i>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Weissella</i>		<i>Tsukamurella</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Rubrobacter</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Phascolarctobacterium</i>
<i>Sphingobium</i>	<i>Wolbachia</i>		<i>Veillonella</i>	<i>Serratia</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Phenylobacterium</i>
<i>Sphingomonas</i>			<i>Wautersiella</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Salinispora</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Phormidium</i>
<i>Sphingopyxis</i>			<i>Weissella</i>	<i>Skermanella</i>	<i>Schlegelella</i>	<i>Peptoniphilus</i>	<i>Pigmentiphaga</i>
<i>Sporosarcina</i>			<i>Wolbachia</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Planctomyces</i>
<i>Staphylococcus</i>			<i>Zhouia</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Serratia</i>	<i>Phenylobacterium</i>	<i>Planktothrix</i>
<i>Stenotrophomonas</i>				<i>Sphingomonas</i>	<i>Shewanella</i>	<i>Phormidium</i>	<i>Porphyromonas</i>
<i>Streptococcus</i>				<i>Sphingopyxis</i>	<i>Skermanella</i>	<i>Pigmentiphaga</i>	<i>Prevotella</i>
<i>Streptomyces</i>				<i>Staphylococcus</i>	<i>Sphaerochaeta</i>	<i>Pimelobacter</i>	<i>Propionibacterium</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
<i>Succinivibrio</i>				<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Pirellula</i>	<i>Prosthecobacter</i>
<i>Sulfurospirillum</i>				<i>Streptococcus</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Planctomyces</i>	<i>Proteus</i>
<i>Tepidimonas</i>				<i>Streptomyces</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Pseudaminobacter</i>
<i>Thermobispora</i>				<i>Terriglobus</i>	<i>Sphingopyxis</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Pseudochrobactrum</i>
<i>Thermomonas</i>				<i>Treponema</i>	<i>Spirosoma</i>	<i>Promicromonospora</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>
<i>Treponema</i>				<i>Tsukamurella</i>	<i>Sporosarcina</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Tsukamurella</i>				<i>Veillonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Propionicimonas</i>	<i>Pseudonocardia</i>
<i>Veillonella</i>				<i>Wautersiella</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Prosthecobacter</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>
<i>Vogesella</i>				<i>Weissella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Pseudaminobacter</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Wolbachia</i>				<i>Williamsia</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Pseudidiomarina</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Zhouia</i>				<i>Wolbachia</i>	<i>Tepidimonas</i>	<i>Pseudochrobactrum</i>	<i>Rheinheimera</i>
				<i>Zhouia</i>	<i>Terriglobus</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	<i>Rhizobium</i>
					<i>Tetragenococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Rhodobacter</i>
					<i>Treponema</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Rhodococcus</i>
					<i>Tsukamurella</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Rhodocyclus</i>
					<i>Veillonella</i>	<i>Psychrobacter</i>	<i>Rhodoplanes</i>
					<i>Wautersiella</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Rickettsia</i>
					<i>Weissella</i>	<i>Rheinheimera</i>	<i>Roseomonas</i>
					<i>Wolbachia</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Rothia</i>
					<i>Xanthomonas</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>Rubellimicrobium</i>
					<i>Zhouia</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rubrivivax</i>
						<i>Rhodoplanes</i>	<i>Rubrobacter</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
						<i>Rickettsia</i>	<i>Ruminococcus</i>
						<i>Riemerella</i>	<i>Rummeliibacillus</i>
						<i>Roseomonas</i>	<i>Saccharomonospora</i>
						<i>Rothia</i>	<i>Saccharopolyspora</i>
						<i>Rubellimicrobium</i>	<i>Schlegelella</i>
						<i>Rubrivivax</i>	<i>Serratia</i>
						<i>Rubrobacter</i>	<i>Shewanella</i>
						<i>Ruminococcus</i>	<i>Shuttleworthia</i>
						<i>Rummeliibacillus</i>	<i>Skermanella</i>
						<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Sneathia</i>
						<i>Schlegelella</i>	<i>Sphingobacterium</i>
						<i>Sediminibacterium</i>	<i>Sphingobium</i>
						<i>Selenomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>
						<i>Serratia</i>	<i>Sphingopyxis</i>
						<i>Shewanella</i>	<i>Spirosoma</i>
						<i>Shinella</i>	<i>Sporosarcina</i>
						<i>Sneathia</i>	<i>Staphylococcus</i>
						<i>Solibacillus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
						<i>Sphaerochaeta</i>	<i>Streptococcus</i>
						<i>Sphingobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
						<i>Sphingobium</i>	<i>Sutterella</i>
						<i>Sphingomonas</i>	<i>Tannerella</i>

(续上表)

水稻品种			褐飞虱			天敌	
TN1	ASD7	Mudgo	TN1 种群	ASD7 种群	Mudgo 种群	稻虱缨小蜂	黑肩绿盲蝽
						<i>Sphingopyxis</i>	<i>Tatlockia</i>
						<i>Staphylococcus</i>	<i>Tepidimonas</i>
						<i>Stenotrophomonas</i>	<i>TG5</i>
						<i>Streptococcus</i>	<i>Thermomonas</i>
						<i>Streptomyces</i>	<i>Thiobacillus</i>
						<i>Tepidimonas</i>	<i>Trabulsiella</i>
						<i>TG5</i>	<i>Treponema</i>
						<i>Thermomonas</i>	<i>Tsukamurella</i>
						<i>Trabulsiella</i>	<i>Veillonella</i>
						<i>Treponema</i>	<i>Wautersiella</i>
						<i>Tsukamurella</i>	<i>Weissella</i>
						<i>Veillonella</i>	<i>Wolbachia</i>
						<i>Wautersiella</i>	<i>Zhouia</i>
						<i>Weissella</i>	<i>Zymomonas</i>
						<i>Williamsia</i>	
						<i>Wolbachia</i>	
						<i>Xanthobacter</i>	
						<i>Xanthomonas</i>	
						<i>Xylella</i>	
						<i>YRC22</i>	
						<i>Zhouia</i>	