



徐天梅, 黄钰, 肖关丽, 陈斌. 白背飞虱雌雄成虫肠道可培养细菌种类组成及差异分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 158–169.

白背飞虱雌雄成虫肠道可培养细菌种类组成及差异分析

徐天梅¹, 黄钰², 肖关丽^{2*}, 陈斌^{1*}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南昆明 650201;

2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201)

摘要: 为弄清白背飞虱成虫肠道细菌组成及雌雄成虫之间的组成差异, 本研究采用传统培养法, 对云南省元江县水稻田白背飞虱雌雄成虫肠道可培养细菌种类组成进行了分离培养, 并采用形态及 16S rDNA 序列比对方法进行细菌的种属鉴定。结果表明: 从白背飞虱肠道内分离鉴定出细菌 3 门 8 科 12 属 20 种, 优势菌门均为厚壁菌门 Firmicutes (50%), 雌成虫肠道优势菌属为葡萄球菌属 *Staphylococcus* (25%), 优势菌种为松鼠葡萄球菌 *Staphylococcus squirrel* (25%); 雄成虫肠道优势菌属为芽孢杆菌属 *Bacillus* (22%) 和微杆菌属 *Microbacter* (22%), 优势菌种为产左聚糖微杆菌 *Microbacterium laevaniformans* (22%)。其中, 雌性成虫肠道内共分离获得细菌 3 门 8 科 8 属 12 种, 包括芽孢杆菌属 *Bacillus* 3 种; 葡萄球菌属 *Staphylococcus* 1 种; 微杆菌属 *Exiguobacterium* 1 种; 不动杆菌属 *Acinetobacter* 1 种; 泛菌属 *Pantoea* 1 种; 假单胞菌属 *Pseudomonas* 2 种; 苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 1 种; 微杆菌属 *Microbacterium* 2 种。雄性成虫肠道内分离细菌 3 门 8 科 10 属 12 种, 其中梭形杆菌属 *Lysinibacillus* 1 种; 假杆菌属 *Fictibacillus* 1 种; 芽孢杆菌属 *Bacillus* 3 种; 葡萄球菌属 *Staphylococcus* 1 种; 微小杆菌属 *Exiguobacterium* 1 种; 肠杆菌属 *Enterobacter* 1 种; 不动杆菌属 *Acinetobacter* 1 种; 假单胞菌属 *Pseudomonas* 1 种; 寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 1 种; 微杆菌属 *Microbacterium* 1 种。白背飞虱雌雄成虫肠道内细菌共同种类有 4 种, 分别为松鼠葡萄球菌、乙酰微小杆菌、产左聚糖微杆菌和 *Acinetobacter soli*。该研究将为深入研究白背飞虱肠道细菌功能和雌雄虫肠道细菌组成差异及其机理研究提供理论依据。

关键词: 白背飞虱; 雌雄成虫; 肠道细菌; 分离鉴定

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 01-0158-12

Composition and differential analysis of culturable bacteria community in the gut of male and female *Sogatella furcifera* (Horváth)

XU Tian-Mei¹, HUANG Yu², XIAO Guan-Li^{2*}, CHEN Bin^{1*} (1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, China; 2. College of Agriculture & Biology Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In order to clarify the composition of intestinal bacteria of adult *Sogatella furcifera* (Horváth) and the difference between male and female adults, this study isolated and cultured the composition of intestinal bacteria of adult *S. furcifera* in paddy field of Yuanjiang County, Yunnan Province by using

基金项目: 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题 (gzkf201901); 国家自然科学基金 (31660537); 云南农业大学学生创新基金 (2020ZKX090)

作者简介: 徐天梅, 女, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理生化, E-mail: 1561348158@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 陈斌, 博士, 教授, 主要研究方向为害虫综合治理研究, E-mail: chbins@163.com; 肖关丽, 教授, 主要从事作物栽培研究, E-mail: glxiao9@163.com

收稿日期 Received: 2020-01-04; 接受日期 Accepted: 2020-06-18

traditional culture method, and identified the species of bacteria by using morphological and 16S rDNA sequence alignment method. The results showed that 20 species, 12 genera, 8 families, 3 phyla of bacteria were isolated and identified from the intestinal tract of the planthopper. The dominant bacteria Phylum are Firmicutes (50%). The dominant bacteria genera in the intestinal tract of female adults are *Staphylococcus* (25%) and the dominant bacteria species are *Staphylococcus squirrel* (25%). The dominant bacteria genera in the intestinal tract of male adults are *Bacillus* (22%) and *Microbacter* (22%), and the dominant bacteria species are *Microbacterium laevaniformans* (22%). Among them, 12 species belonging to 8 genera, 8 families and 3 phyla were isolated from the intestinal tract of female adults, including 3 species of *Bacillus*, 1 species of *Staphylococcus*, 1 species of *Acinetobacter*, 1 species of *Pantoea*, 2 species of *Pseudomonas*, 1 species of *Ochrobactrum*, 2 species of *Microbacterium*. In the intestinal tract of male adults, 12 species, 10 genera, 8 families and 3 phyla were isolated, including 1 species of *Lysinibacillus*, 1 species of *Fictibacillus*, 3 species of *Bacillus*, 1 species of *Staphylococcus*, 1 species of *Exiguobacterium*, 1 species of *Enterobacter*, 1 species of *Acinetobacter*, 1 species of *Pseudomonas*, 1 species of *Stenotrophomonas*, 1 species of *Microbacterium*. There are four common species of bacteria in the gut of male and female adults of *Sogatella furcifera* (Horváth), namely *Staphylococcus squirrel*, *Micrococcus acetylus*, *Micrococcus dextrogenes* and *Acinetobacter soli*. This study will provide a theoretical basis for the further study of the intestinal bacterial function of *Sogatella furcifera* (Horváth), and the difference of intestinal bacterial composition between male and female and its mechanism.

Key words: *Sogatella furcifera* (Horváth); male and female adults; intestinal bacteria; isolation and identification

白背飞虱 *Sogatella furcifera* (Horváth), 属于半翅目同翅亚目飞虱科, 有较强的迁飞性, 是水稻上的重要害虫。该虫可以在水稻、麦类、高粱、玉米、稗草等 18 种作物和杂草上完成生活史 (徐安隆等, 2015)。

昆虫肠道是取食、消化和吸收营养物质的场所, 含有多种微生物, 这些微生物在昆虫的营养代谢、生长发育及生殖行为等方面发挥至关重要的作用 (李香香等, 2011), 其中细菌所占的比率超过九成 (Egert *et al.*, 2003)。昆虫与肠道细菌相互依赖、相互影响、共同进化 (Baumann *et al.*, 1995), 昆虫为肠道细菌提供稳定的生活环境和补充营养物质 (Kaltenpoth *et al.*, 2014), 肠道细菌则帮助宿主合成营养物质、参与宿主免疫防御和生殖代谢 (Frago *et al.*, 2012)。例如小菜蛾 *Plutella xylostella* 肠道细菌可以促进虫体的生长发育 (沈金洪等, 2018), 而且能够介导宿主小菜蛾对农药毒死蜱的抗性 (Xia *et al.*, 2018), 并通过产生脂酶降解茚虫威杀虫剂 (Ramya *et al.*, 2016)。

杨晓晴等 (2018) 基于 16S rRNA 高通量测序分析了灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内细菌群落结

构及多样性, 结果表明灰飞虱雌雄成虫体内细菌种类一共有 7 门 56 属和 73 种。王天召等基于高通量测序法对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 肠道微生物多样性进行了研究, 发现褐飞虱肠道内细菌共注释到 7 门 15 纲 26 目 45 科和 73 属, 不动杆菌属 *Acinetobacter* 为优势属, 其丰度为 36.37% (王天召, 2019); 李香香等通过 16S rRNA 测序对褐飞虱肠道细菌多样性进行分析, 从褐飞虱室内种群肠道内鉴定得到 13 种细菌, 其中以不动杆菌属、窄食单胞菌属、苍白杆菌属与 TM7 最为常见 (李香香等, 2011)。康小影等基于对细菌 16S rRNA 基因片段的序列分析, 在白背飞虱体内 - 检测到 11 种细菌, 隶属于 γ - α - β -变形菌纲、拟杆菌纲、放线菌纲和芽孢杆菌纲。其中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 为细菌的主要种类, 其次是成团泛菌 *Pantoea agglomerans* (康小影等, 2014)。关于白背飞虱雌雄成虫肠道细菌的多样性, 已有研究发现白背飞虱雌雄成虫肠道细菌共属于 8 属 15 种, 其中芽孢杆菌属 *Bacillus* 为优势菌属 (李香香, 2010)。白背飞虱肠道细菌种类丰富, 但白背飞虱雌雄虫体内分别有哪些可培养细菌, 目前还不清楚, 且云南元江县独特的干热河谷气候对白背飞

虱肠道微生物组成是否有影响,目前尚不明确。

本研究以云南省元江县水稻田白背飞虱为材料,采用分离培养法研究白背飞虱雌雄成虫的肠道可培养细菌的组成,以期为元江县白背飞虱肠道细菌功能和雌雄虫肠道细菌组成差异及其机理研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 白背飞虱的田间采集

2019年6月,在云南省元江县(101°39′~102°22′E, 23°18′~23°55′N),未施用过农药的水稻田(水稻品种为元江地方品种)中,采用扫网法收集稻田白背飞虱成虫,并选择大小一致、健康活跃的成虫供试。

1.2 白背飞虱雌雄虫鉴别

背面观主要看腹部末端的形状,雌虫腹部末端尖锐,腹部中央纵沟内有一长形产卵器,雄虫腹部末端平秃,呈开口状,内藏外生殖器的各部构造,此外,一般雌虫的体形大于雄虫,雄虫的体色较雌虫为深(程遐年等,2003)。

1.3 白背飞虱肠道细菌的分离培养

1.3.1 肠道解剖

将白背飞虱成虫装入尼龙网中再置于冰上使其昏迷,用75%酒精进行表面消毒两次,每次60 s,再全部浸泡在灭菌水中去除消毒液,将洗净的成虫转入灭菌的解剖蜡盘上,取下飞虱头部,再用镊子夹住飞虱腹部末端,轻轻使劲将飞虱的全部肠道拉出,用灭菌水漂洗,去除卵巢、脂肪体和其他内脏器官,取出整个肠道置于1.5 mL离心管中,并在离心管内加入0.5 mL 0.8%生理盐水,立即置于冰上(李香香,2010)。解剖时确保每个雌雄虫处理30头虫,并给每个处理都编号放在-80℃的冰箱中保存备用。

1.3.2 培养基配制

细菌分离选用LB培养基和牛肉膏蛋白胨培养基。其中LB培养基由胰蛋白胨10 g, NaCl 10 g, 酵母浸粉5 g, 琼脂20 g, 无菌去离子水1 L配制而成,再用4% NaOH溶液调节pH 7.0。牛肉膏蛋白胨培养基由牛肉膏3 g, 蛋白胨10 g, NaCl 5 g, 琼脂20 g, 无菌去离子水1 L配制而成,再用4% NaOH溶液调pH 7.4~7.6。培养基配好后放在高温灭菌锅中121℃高温灭菌21 min(耿海荣等,2019)。

1.3.3 匀浆与涂板

将解剖好的肠道加磷酸缓冲液后研磨至匀浆,充分摇匀后取10 μL连续稀释10倍,稀释3次得到原浓度的 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} ,稀释后将每个浓度涂布在不同的培养基上,每个培养基涂布100 μL。涂布完成后写好标签,置于 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中培养48 h,每天定时观察,并挑取不同形状、颜色、质地的单菌落置于LB培养基上继续纯化(Klass *et al.*, 1999),每个菌落纯化5次。

1.4 培养细菌形态及生化指标测定

1.4.1 革兰氏反应

取一滴3% KOH溶液滴于载玻片中央,用接种环挑取待测菌落放在溶液中,用昆虫针轻轻搅动后将菌液向上提起,观察提起的时候有无粘丝。根据粘丝判断革兰氏阴性或阳性(李香香,2010),其中有粘丝相连的为革兰氏阴性菌,记为“-”,无粘丝的是革兰氏阳性菌,记为“+”。

1.4.2 过氧化氢酶反应

将纯化后的细菌单菌落挑取到新的LB液体培养基中,放在摇床上,30℃下培养48 h。取0.5 mL 3% H_2O_2 溶液加入液体培养基中,若观察到大量的气泡,则为阳性记为“+”,没有气泡产生则为阴性记为“-”。

1.5 DNA提取及数据分析

采用冻融法提取DNA,分别在离心管中加入500 μL的无菌双蒸水,挑取已纯化的单菌落到离心管中,振荡后用液氮将离心管冷冻10 min,置于100℃水浴锅中水浴5 min,取出后涡旋30 s,12 000 r/min离心2 min,上清液可作为PCR模板。16S rRNA基因扩增选用细菌通用引物:27F: 5′-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3′和1429R: 5′-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3′,反应体系为25 μL:两种引物各1 μL,模板DNA 1 μL,PCRmix 12.5 μL, dd H_2O 9.5 μL。反应条件:94℃热变性5 min, 94℃变性1 min, 53℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 32个循环, 72℃延伸10 min。PCR结束后取2 μL PCR产物进行凝胶电泳检测。鉴定好的PCR产物送上海生工生物技术有限公司测序(冯广达等,2013)。

运用Contigexpress软件对测序结果进行拼接,将拼接好的16S rDNA序列提交到NCBI网站上,查找相似性最高的典型菌株并下载序列,运用MEGA 7.06软件,采用国际通用的邻接法(Neighbour-Joining)和Kimura双参数校正模型构建系统发育树(郑亚强等,2017)。

2 结果与分析

2.1 白背飞虱肠道细菌人工培养特征及生化指标

从白背飞虱肠道分离出的 30 株菌，形状主要为圆形和不规则，颜色主要是黄色、淡黄色、淡橘色、白色，高度有凸起和扁平，边缘形状有光滑、不规则及出现透明圈 3 种，透明度主要是透

明和半透明，湿度主要为湿润、半湿润和干燥，直径大小不一。革兰氏染色反应表明分离的菌株中有 9 株为革兰氏阴性菌，21 株为革兰氏阳性菌；过氧化氢酶反应测定后发现，分离的 30 个菌株均呈阳性。

2.2 白背飞虱肠道细菌序列比对结果

白背飞虱雌、雄虫肠道细菌菌株测序后与 NCBI 数据库比对，其结果如表 2。

表 1 人工培养基培养特征及生化指标描述
Table 1 Characteristic of isolated bacterial strains in cultrue medium

菌株 编号 Strain No.	革兰氏 染色 Gram's dyeing	过氧化氢 酶反应 Catalase reaction	形状 Shape	颜色 Colour	高度 Height	边缘形状 Edge shape	透明度 Transparency	湿度 Humidity	直径 (mm) Diameter
XA4	-	+	圆形 Circular	乳白色 Milky white	扁平 Flat	光滑，有透明圈 Smooth with transparent circle	不透明 Opaque	湿润 Moist	8.74
NRX2	+	+	圆形 Circular	白色 White	凸起 Bulge	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	2.93
XA9	-	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	扁平 Flat	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	5.19
XA2	+	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	扁平 Flat	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.81
XA7	+	+	圆形 Circular	黄色 Yellow	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	2.91
XA6	+	+	圆形 Circular	黄色 Yellow	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.27
NRX4	+	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.52
XA8	+	+	圆形 Circular	白色 White	扁平 Flat	光滑 Smooth	不透明 Opaque	干燥 Dry	3.22
XA3	+	+	圆形 Circular	橘黄色 Orange	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	潮湿 Damp	4.20
XA5	-	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	凸起 Bulge	光滑 Smooth	半透明 Translucent	潮湿 Damp	1.66
NRX5	+	+	不规则 Irregularity	白色 White	扁平 Flat	不规则 Irregularity	不透明 Opaque	半湿润 Semi humid	4.43
XA1	+	+	圆形 Circular	白色 White	扁平 Flat	不规则 Irregularity	不透明 Opaque	半湿润 Semi humid	3.75
NRX3	-	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	扁平 Flat	光滑，有透明圈 Smooth with transparent circle	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.27

续表 1 Continued table 1

菌株 编号 Strain No.	革兰氏 染色 Gram's dyeing	过氧化氢 酶反应 Catalase reaction	形状 Shape	颜色 Colour	高度 Height	边缘形状 Edge shape	透明度 Transparency	湿度 Humidity	直径 (mm) Diameter
NRX6	-	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	凸起 Bulge	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	1.26
CA1	+	+	圆形 Circular	米黄色 Beige	扁平 Flat	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	4.35
CA10	-	+	圆形 Circular	淡黄色 Canary yellow	扁平 Flat	不规则, 有透明圈 Irregular, with transparent circle	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.12
NRC1	+	+	不规则 Irregularity	淡橘色 Canary yellow	扁平 Flat	啮齿状 Rodent shaped	不透明 Opaque	湿润 Moist	8.33
CL3	+	+	圆形 Circular	黄色 Yellow	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.45
CA3	-	+	不规则 Irregularity	淡黄色 Canary yellow	扁平 Flat	不规则, 有透明圈 Irregular, with transparent circle	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.69
CA4	+	+	圆形 Circular	黄色 Yellow	扁平 Flat	光滑, 有透明圈 Smooth with transparent circle	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.64
CA12	+	+	圆形 Circular	白色 White	凸起 Bulge	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	1.62
CA5	+	+	圆形 Circular	米黄色 Beige	扁平 Flat	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.13
CA2	+	+	圆形 Circular	米黄色 Beige	扁平 Flat	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.14
CL5	+	+	圆形 Circular	淡橘色 Orange	凸起 Bulge	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	1.82
CL2	+	+	圆形 Circular	白色 White	凸起 Bulge	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	1.94
CA7	-	+	不规则 Irregularity	淡黄色 Canary yellow	扁平 Flat	光滑 Smooth	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.89
CL1	+	+	圆形 Circular	米黄色 Beige	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.55
CL4	+	+	不规则 Irregularity	白色 White	扁平 Flat	不规则 Irregularity	半透明 Translucent	湿润 Moist	3.44
CA1	+	+	不规则 Irregularity	白色 White	扁平 Flat	不规则 Irregularity	不透明 Opaque	半湿润 Semi humid	3.92
CA6	-	+	圆形 Circular	橘黄色 Orange	凸起 Bulge	光滑 Smooth	不透明 Opaque	湿润 Moist	3.51

注: 含“C”字母的菌株为雌虫肠道分离的细菌, 含“X”字母的菌株为雄虫肠道分离的细菌, 下同。Note: Strains with “C” letter were bacteria isolated from female intestinal tract, and strains with “X” letter were bacteria isolated from male intestinal tract, the same below.

表 2 分离菌株与 NCBI 数据库典型菌株的比对结果

Table 2 Comparison of sequencing results between isolated strains and typical strains in NCBI database

菌株编号 Strain No.	所属门 Phylum	所属科 Family	所属属 Genus	高相似度菌株 The most similar strain	相似度 (%) Identity	登录号 Accession No.
XA2		肠杆菌科 Enterobacteriaceae	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	阿氏肠杆菌 <i>Enterobacter asburiae</i>	93.15	CP011863.1
XA9		莫拉氏菌科 Moraxellaceae	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter soli</i>	99.64	NR044454.1
CA3				<i>Acinetobacter soli</i>	99.93	NR044454.1
CA4		欧文菌科 Owenidae	泛菌属 <i>Pantoea</i>	分散泛菌 <i>Pantoea dispersa</i>	99.57	AB907780.1
CA7				<i>Pseudomonas otitidis</i>	99.72	NR043289.1
CA10	变形菌门 Proteobacteria			<i>Pseudomonas otitidis</i>	99.93	NR043289.1
CA6		假单胞菌科 Pseudomonadaceae	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	蒙氏假单胞杆菌 <i>Pseudomonas mosselii</i>	99.72	NR024924.1
XA4				台湾假单胞菌 <i>Pseudomonas taiwanensis</i>	99.93	NR116172.1
CL2		布氏杆菌科 Brucellae	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum pseudogrignone</i>	99.85	NR042589.1
XA5		黄单胞菌科 Xanthomonadaceae	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	嗜多养单胞菌 <i>Stenotrophomonas pavanii</i>	96.49	NR118008.1
CL3				产左聚糖微杆菌 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	99.41	NR044935.1
NRX2				产左聚糖微杆菌 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	99.49	NR044935.1
XA6	放线菌门 Actinobacteria	微杆菌科 Microbacteriidae	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	产左聚糖微杆菌 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	99.41	NR044935.1
XA7				产左聚糖微杆菌 <i>Microbacterium laevaniformans</i>	99.56	NR044935.1
CL5				砖红色微杆菌 <i>Microbacterium testaceum</i>	98.77	NR026163.1
NRX5			梭形杆菌属 <i>Lysinibacillus</i>	赖氨酸芽孢杆菌 <i>Lysinibacillus macroides</i>	99.56	KY643638.1
NRX6			假杆菌属 <i>Fictibacillus</i>	<i>Fictibacillus enclensis</i>	98.72	NR133744.1
NRX3	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌科 Bacillaceae	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	地下芽孢杆菌 <i>Bacillus subterraneus</i>	97.20	NR104749.1
NRC1				马氏芽孢杆菌 <i>Bacillus marisflavi</i>	99.58	NR118437.1

续表 1 Continued table 1

菌株编号 Strain No.	所属门 Phylum	所属科 Family	所属属 Genus	高相似度菌株 The most similar strain	相似度 (%) Identity	登录号 Accession No.
CL4	厚壁菌门 Firmicutes	芽孢杆菌科 Bacillaceae	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	炭疽芽孢杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	99.31	NR041248.1
XA8				空气芽孢杆菌 <i>Bacillus aerius</i>	99.43	MK850542.1
XA1				烟酸芽孢杆菌 <i>Bacillus niacini</i>	98.66	NR113777.1
CA1				环状芽孢杆菌 <i>Bacillus circulans</i>	99.85	NR118445.1
CA5		葡萄球菌科 Staphylococcidae	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	99.72	LS483305.1
CA11				松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	99.79	LS483305.1
CL1				松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	99.86	LS483305.1
NRX4				松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	99.58	LS483305.1
CA2				松鼠葡萄球菌 <i>Staphylococcus sciuri</i>	99.51	LS483305.1
XA3		微小杆菌科 Microbacteriidae	微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	乙酰微小杆菌 <i>Exiguobacterium acetylicum</i>	99.38	NR043479.1
CA12				乙酰微小杆菌 <i>Exiguobacterium acetylicum</i>	99.17	NR043479.1

在培养基上分离培养获得的雌雄虫肠道细菌共 30 株, 属于 3 门 8 科 12 属 20 种。其中, 白背飞虱雌虫肠道细菌有 16 株, 分属于 3 门 8 科 8 属 12 种, 分别为厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌科 Bacillaceae 芽孢杆菌属 *Bacillus* 马氏芽孢杆菌 *Bacillus marisflavi* 1 株、炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis* 1 株、环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* 1 株、葡萄球菌科 Staphylococcidae 葡萄球菌属 *Staphylococcus* 松鼠葡萄球菌 *Staphylococcus sciuri* 4 株、微小杆菌科 Microbacteriidae 微小杆菌属 *Exiguobacterium* 乙酰微小杆菌 *Exiguobacterium acetylicum* 1 株; 变形菌门 Proteobacteria 莫拉氏菌科 Moraxellaceae 不动杆菌属 *Acinetobacter* 的 *Acinetobacter soli* 1 株、欧文菌科 Owenidae 泛菌属 *Pantoea* 分散泛菌 *Pantoea dispersa* 1 株、假单胞菌

科 Pseudomonadaceae 假单胞菌属 *Pseudomonas* 的 *Pseudomonas otitidis* 2 株、蒙氏假单胞杆菌 *Pseudomonas mosselii* 1 株、布氏杆菌科 Brucellae 苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 的 *Ochrobactrum pseudogrignone* 1 株; 放线菌门 Actinobacteria 微杆菌科 Microbacteriidae 微杆菌属 *Microbacterium* 产左聚糖微杆菌 *Microbacterium laevaniformans* 1 株、砖红色微杆菌 *Microbacterium testaceum* 1 株。

从白背飞虱雄虫肠道中分离获得细菌 14 株, 分属于 3 门 8 科 10 属 12 种, 分别为厚壁菌门 Firmicutes 芽孢杆菌科 Bacillaceae 梭形杆菌属 *Lysinibacillus* 赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus macroides* 1 株、假杆菌属 *Fictibacillus* 的 *Fictibacillus enclensis* 1 株、芽孢杆菌属 *Bacillus* 地下芽孢杆菌 *Bacillus subterraneus* 1 株、空气芽孢杆菌 *Bacillus*

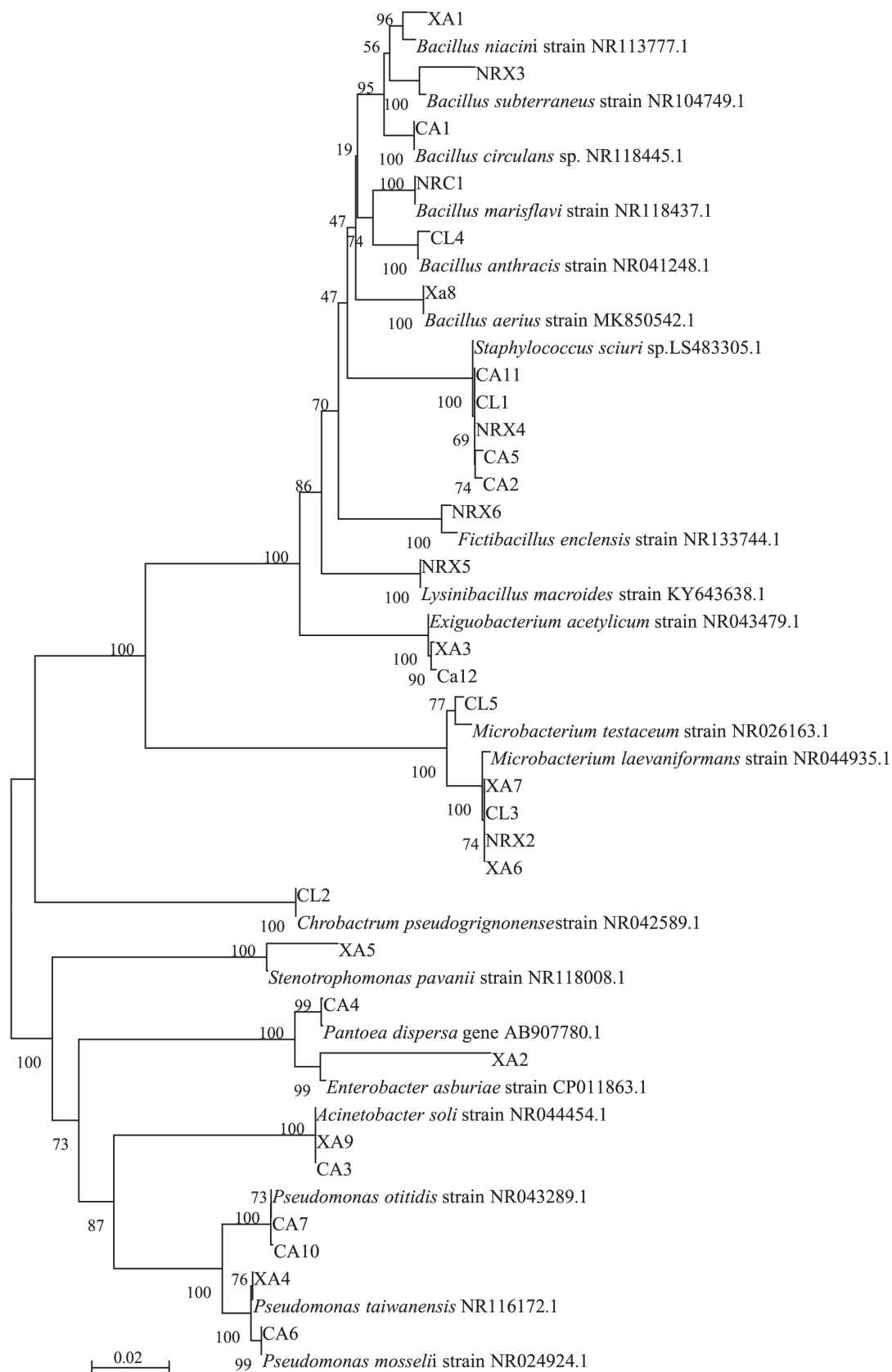


图1 基于16S rDNA序列的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

aerius 1 株、烟酸芽孢杆菌 *Bacillus niacin* 1 株、葡萄球菌科 Staphylococcidae 葡萄球菌属 *Staphylococcus* 松鼠葡萄球菌 *Staphylococcus sciuri* 1 株、微小杆菌科 Microbacteriidae 微小杆菌属 *Exiguobacterium* 乙酰微小杆菌 *Exiguobacterium acetylicum* 1 株; 变形菌门 Proteobacteria 肠杆菌科 Enterobacteriaceae 肠杆菌属 *Enterobacter* 阿氏肠杆菌 *Enterobacter asburiae* 1 株、莫拉氏菌科 Moraxellaceae 不动杆菌属 *Acinetobacter* 的 *Acinetobacter soli* 1 株、假单胞菌科 Pseudomonadaceae 假单胞菌属 *Pseudomonas* 台湾假单胞菌 *Pseudomonas taiwanensis* 1 株、黄单胞菌科 Xanthomonadaceae 寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 嗜多养单胞菌 *Stenotrophomonas pavanii* 1 株; 放线菌门 Actinobacteria 微杆菌科 Microbacteriidae 微杆菌属 *Microbacterium* 产左聚糖微杆菌 *Microbacterium laevaniformans* 3 株。

白背飞虱雌、雄成虫肠道中相同的细菌有 4 种, 分别为厚壁菌门葡萄球菌科松鼠葡萄球菌、微小杆菌科微小杆菌属乙酰微小杆菌、放线菌门微杆菌科微杆菌属产左聚糖微杆菌、变形菌门莫拉氏菌科不动杆菌属 *Acinetobacter soli*。

2.3 系统发育树分析

系统发育树分为 3 大支 12 个小支, 厚壁菌门芽孢杆菌属的菌株 XA1 与它的模式菌株 *Bacillus niacinistrain* 聚为一类, NRX3 和它的模式菌株 *Bacillus subterraneus* 聚为一类, CA1 和它的模式菌株 *Bacillus circulans* 聚为一类, 这 3 小支又聚在一起合成一大支, 表明这 3 种细菌的亲缘关系较近; NRC1 与它的模式菌株 *Bacillus marisflavi* 聚为一类, CL4 与它的模式菌株 *Bacillus anthracis* 聚为一类, 这 2 小支又单独聚成一大支, 说明这两株的亲缘关系比较近; XA8 与它的模式菌株 *Bacillus aerius* 单独聚为一类; 葡萄球菌属的 CA11、LCL1、NRX4、CA5、CA2 与它们的模式菌株 *Staphylococcus sciuri* 单独聚为一类; 假杆菌属的 NRX6 与它的模式菌株 *Fictibacillus enclensis* 聚成一类; 梭形杆菌属的 NRX5 与它的模式菌株 *Lysinibacillus macroides* 聚成一类; 微小杆菌属的菌株 XA3 与 CA12 和它们的模式菌株 *Exiguobacterium acetylicum* 单独聚为一类。放线菌门微杆菌属的菌株 CL5 与它的模式菌株 *Microbacterium testaceum* 聚为一类, XA7、CL3、NRX2、XA6 与它们的模式菌株 *Microbacterium laevaniformans* 聚为一类, 这两小支又聚为一大支,

说明这两个种亲缘关系较近。变形菌门苍白杆菌属的 CL2 与它的模式菌株 *Ochrobactrum pseudogrignonense* 单独聚为一类; 寡养单胞菌属的 XA5 与它的模式菌株 *Stenotrophomonas pavanii* 单独聚为一类; 泛菌属的 CA4 与它的模式菌株 *Pantoea dispersa* 聚为一类, 肠杆菌属的 XA2 与它的模式菌株 *Enterobacter asburiae* 聚为一类, 这两小支又聚为一大支, 表明这两种细菌的亲缘关系较近; 不动杆菌属的 XA9、CA3 与它们的模式菌株 *Acinetobacter soli* 单独聚为一类; 假单胞菌属的 CA7、CA10 与它们的模式菌株 *Pseudomonas otitidis* 单独聚为一类; XA4 与它的模式菌株 *Pseudomonas taiwanensis* 聚为一类, CA6 与它的模式菌株 *Pseudomonas mosselii* 聚为一类, 这两小支又聚为一大支, 表明这两种细菌的亲缘关系较近。

2.4 白背飞虱肠道可培养细菌属种组成情况分析

从属水平上看, 白背飞虱雌性成虫肠道中可培养的细菌有 8 个属, 分别为葡萄球菌属、微小杆菌属、不动杆菌属、泛菌属、假单胞菌属、苍白杆菌属、微杆菌属、芽孢杆菌属。其中, 葡萄球菌属相对多度为 25%, 是分离菌株中的优势菌属。雄性成虫肠中可培养的细菌有 10 个属, 分别为葡萄球菌属、微小杆菌属、肠杆菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、直养单胞菌属、微杆菌属、梭形杆菌属、假杆菌属、芽孢杆菌属。其中, 芽孢杆菌属和微杆菌属相对多度为 22%, 均是分离菌株中的优势菌属。

从种水平上看, 白背飞虱雌性成虫肠道中可培养的细菌有 12 种, 分别为: 松鼠葡萄球菌、乙酰微小杆菌、*Acinetobacter soli*、分散泛菌、*Pseudomonas otitidis*、蒙氏假单胞杆菌、*Ochrobactrum pseudogrignonense*、产左聚糖微杆菌、砖红色微杆菌、马氏芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、环状芽孢杆菌。其中, 松鼠葡萄球菌是分离菌株中的优势菌种, 相对多度为 25%。雄性成虫肠道中可培养的细菌有 12 种, 分别为松鼠葡萄球菌、乙酰微小杆菌、阿氏肠杆菌、*Acinetobacter soli*、台湾假单胞杆菌、嗜多养假单胞杆菌、产左聚糖微杆菌、*Fictibacillus enclensis*、赖氨酸芽孢杆菌、地下芽孢杆菌、空气芽孢杆菌、烟酸芽孢杆菌。其中, 产左聚糖微杆菌是分离菌株中的优势菌种, 相对多度为 22%。

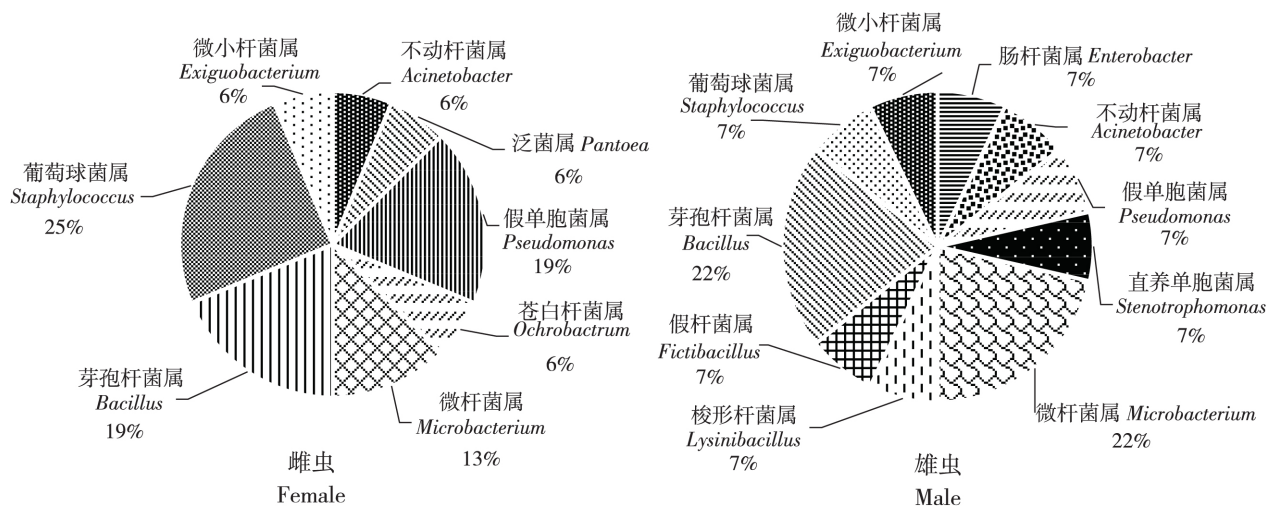


图2 白背飞虱雌雄虫肠道可培养细菌在属水平上的组成情况

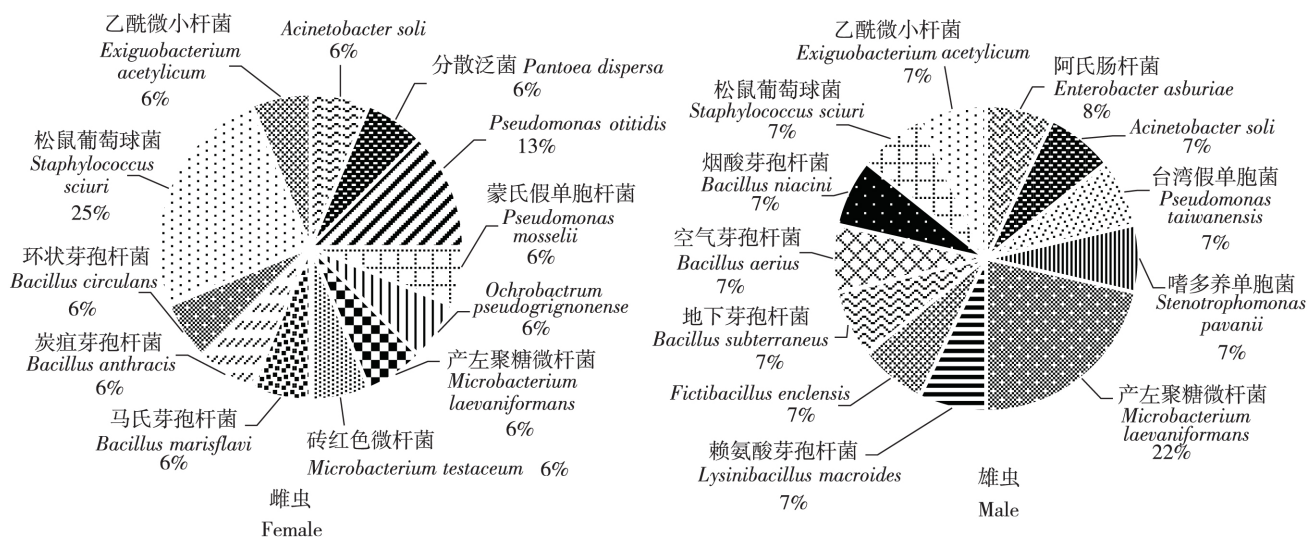
Fig. 2 Composition of culturable bacteria in the gut of female and male *Sogatella furcifera* at the genus level

图3 白背飞虱雌雄虫肠道可培养细菌在种水平上的组成情况

Fig. 3 Composition of culturable bacteria in the gut of female and male *Sogatella furcifera* at the species level

3 结论与讨论

对白背飞虱肠道细菌的研究已有一些报道，然而不同地区白背飞虱肠道内细菌组成不尽相同。康小影 (2014) 基于对细菌基因片段的克隆与序列分析，系统调查了采集于浙江富阳的白背飞虱体内细菌种类，从该地白背飞虱体内检测到 11 种细菌，隶属于 γ -、 α -、 β -变形菌纲、拟杆菌纲、放线菌纲和芽孢杆菌纲，其中 *Wolbachia* 和 *Cardinium* 为细菌的主要种类，其次是成团泛菌 *Pantoea agglomerans* (康小影, 2014)。李香香

(2010) 用 LB 培养基和 NA 培养基分离了采集于南京农业大学江浦农场的白背飞虱，发现该地白背飞虱雌雄虫肠道可培养细菌有 8 属 15 种，分别为金黄杆菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属、放线菌属、短波单胞菌属、微杆菌属、不动杆菌属以及一株不可培养的微生物，其中芽孢杆菌属 *Bacillus* 为优势菌属 (李香香, 2010)。本研究利用 LB 培养基和 NA 培养基，对云南省元江县水稻田白背飞虱雌雄成虫肠道中分离获得 3 门 12 属 20 种细菌。从门水平看，共分离到厚壁菌门、变形菌门和放线菌门，而厚壁菌门为优势菌门，与王天召等报道的褐飞虱肠道微生物组成相似 (王天召等, 2019)；从属水平上看，云南元江水稻田

白背虱肠道内细菌种类共有 12 个属, 南京地区种群共有 8 个属, 而本研究中雌雄虫肠道中的芽孢杆菌属、葡萄球菌属、微杆菌属、不动杆菌属等 4 个属和与此前报道相一致 (李香香等, 2010), 这可能与使用的分离培养基相同有关。

此外, 本研究还发现白背飞虱雌雄虫肠道内均含有假单胞菌属和微小杆菌属。据报道, 假单胞菌属细菌可降解苯酚、氯酚、多环芳烃、2, 4-D、甲苯、烷基磺酸盐和苯氧乙酸 (栗旭阳等, 2019)。微小杆菌属可以产生多种分泌酶, 由于有些分泌酶在较宽的温度及酸碱条件下具有稳定性, 因此微小杆菌已在环境修复、植物营养及发酵工业等方面有一些实际的应用 (张莹等, 2013), 而本研究的样品采集地元江县是典型的干热河谷气候, 气温显著高于省内同纬度地区 (陈宗瑜, 2001), 微小杆菌属可能对白背飞虱能在本地生长繁殖具有重要作用。关于这两个菌属的相应功能, 还需要进一步研究探讨。

同种昆虫不同性别其肠道内微生物多样性存在差异 (魏晓莹等, 2019)。家蚕雌雄个体肠道除了共有的优势菌属, 雄性肠道中特有的优势菌属是 *Ralstonia*、*Methylobacterium* 和 *Staphylococcus*; 而雌性肠道中特有的优势菌属是 *Petrobacter*、*Clostridium sensu stricto* (许刚等, 2015); 研究发现灰飞虱雌雄成虫体内特有细菌分别为雌 21 种和雄 32 种 (杨晓晴, 2018)。本研究中, 白背飞虱雌雄成虫肠道内细菌共同种类有 4 种, 分别为松鼠葡萄球菌、乙酰微小杆菌、产左聚糖微杆菌和 *Acinetobacter soli*。其中, 雌成虫肠道优势菌属为葡萄球菌属, 优势菌种为松鼠葡萄球菌; 雄成虫肠道优势菌属为芽孢杆菌属和微杆菌属, 优势菌种为产左聚糖微杆菌。有研究表明松鼠葡萄球菌产生的一种特殊的挥发性化学物质是重要的引诱剂和产卵刺激剂 (Leroy *et al.*, 2011); 产左聚糖微杆菌具有产生果糖的作用, 能作为增稠剂和稳定剂, 具有抗肿瘤和免疫刺激活性 (Oh *et al.*, 2004)。这两种菌对白背飞虱雌雄成虫的影响, 还有待进一步的挖掘。

参考文献 (References)

- Baumann P, Qureshi SA, Jackson SP. Transcription: New insights from studies on Archaea [J]. *Trends in Genetics*, 1995, 11 (7): 279 – 283.
- Chen XN, Wu JC, Ma F. Research and Control of Brown Planthopper [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003. [程遐年, 吴进才, 马飞. 褐飞虱研究与防治 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003]
- Chen ZY, General Introduction to Yunnan Climate [M]. China Meteorological Press, 2001. [陈宗瑜. 云南气候总论 [M]. 气象出版社, 2001]
- Egert M, Wagner B, Lemke T, *et al.* Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus – feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae) [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69 (11): 6659 – 6668.
- Feng GD, Chen MB, Yang SZ, *et al.* A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34 (3): 439 – 442. [冯广达, 陈美标, 羊宋贞, 等. 用于 PCR 扩增的细菌 DNA 提取方法比较 [J]. 华南农业大学学报, 2013, 34 (3): 439 – 442]
- Frago E, Dicke M, Godfray HCJ. Insect symbionts as hidden players in insect – plant interactions [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2012, 27 (12): 705 – 711.
- Geng HR, Zhang CX, Zhao YJ, *et al.* Study on heat resistant *Bacillus subtilis* with high degradation efficiency of zearalenone [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33 (7): 1399 – 1407. [耿海荣, 张晨曦, 赵月菊, 等. 一株高效降解玉米赤霉烯酮的耐酸耐高温枯草芽孢杆菌的研究 [J]. 核农学报, 2019, 33 (7): 1399 – 1407]
- Kaltenpoth M, Engl T. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera [J]. *Functional Ecology*, 2014, 28 (2): 315 – 327.
- Kang XY. Bacterial Diversity in Whitebacked Planthopper and Its Relationship with the Acquisition of Southern Rice Black – streaked Dwarf Virus [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014. [康小影. 白背飞虱体内细菌多样性及其与携带南方水稻黑条矮缩病毒能力的关系研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014]
- Klaas VDL, Lim BT, Rondeel JMM, *et al.* Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: A comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14 (10): 2433 – 2437.
- Leroy PD, Sabri A, Heuskin, Stéphanie, *et al.* Microorganisms from aphid honeydew attract and enhance the efficacy of natural enemies [J]. *Nature Communications*, 2011, 2 (2): 2 – 348.
- Li XX. Analysis of Gut Bacteria Diversity from Rice Planthoppers [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010. [李香香. 稻飞虱肠道细菌多样性分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010]
- Li XX, Yang H, Wang ZW, *et al.* Diversity of bacterial in intestinal canal of *Nilaparvata lugens* (Stål) [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 1: 126 – 129. [李香香, 杨焯, 王志伟, 等. 褐飞虱肠道细菌多样性分析 [J]. 江苏农业科学, 2011, 1: 126 – 129]
- Li XY, Huang LL, Guo QN, *et al.* Isolating screening and identification involved in 2, 4 – D degradation [J]. *Progress in Biotechnology*, 2019, 9 (4): 384 – 395. [栗旭阳, 黄丽玲, 郭倩楠, 等. 除草剂 2, 4 – D 降解菌株的分离、筛选与鉴定 [J]. 生物技术进展, 2019, 9 (4): 384 – 395]
- Oh IK, Yoo SH, Bae IY, *et al.* Effects of *Microbacterium laevaniformans* levans molecular weight on cytotoxicity [J]. *Journal of Microbiology*

- and Biotechnology, 2004, 14 (5): 985–990.
- Ramya SL, Venkatesan T, Srinivasa Murthy K, et al. Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47 (2): 327–336.
- Shen JH, Wang Q, Xia XF, et al. Effect of antibiotics and gut bacteria on fitness of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58 (6): 1025–1035. [沈金红, 王倩, 夏晓峰, 等. 抗生素和肠道细菌对小菜蛾适合度的影响 [J]. 微生物学报, 2018, 58 (6): 1025–1035]
- Wang TZ, Wang ZL, Zhu HF, et al. Analysis of the gut microbial diversity of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) by high-throughput sequencing [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2019, 62 (3): 323–333. [王天召, 王正亮, 朱杭锋, 等. 基于高通量测序的褐飞虱肠道微生物多样性分析 [J]. 昆虫学报, 2019, 62 (3): 323–333]
- Wei XY, Guo CL, Zhu D. Research progress on the factors influencing microbiota diversity in insect [J]. *Journal of Biosafety*, 2019, 28 (3): 170–176. [魏晓莹, 郭晨亮, 褚栋. 昆虫体内微生物多样性的影响因素研究进展 [J]. 生物安全学报, 2019, 28 (3): 170–176]
- Xia XF, Sun BT, Gurr Geoff M, et al. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 23 (9): 25
- Xu G, Sun ZL, Hu XL, et al. Analysis on intestinal bacterial diversity in silkworm (*Bombyx mori*) based on 16S rRNA gene sequences [J]. *Science of Sericulture*, 2015, 41 (4): 641–649. [许刚, 孙振丽, 胡小龙, 等. 基于 16S rRNA 基因序列分析家蚕肠道细菌的多样性 [J]. 蚕业科学, 2015, 41 (4): 641–649]
- Xu AL, Chen S, He WA, et al. Progress on rice resistance to brown planthopper and white-backed planthopper [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46 (9): 1628–1635. [徐安隆, 陈曙, 贺文爱, 等. 水稻抗褐飞虱与白背飞虱研究进展 [J]. 南方农业学报, 2015, 46 (9): 1628–1635]
- Yang XQ, Wang ZL, Wang TZ, et al. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) by 16S rRNA high-throughput sequencing [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2018, 61 (2): 200–208. [杨晓晴, 王正亮, 王天召, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序的灰飞虱体内细菌群落结构及多样性分析 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (2): 200–208]
- Zhang Y, Shi P, Ma J. *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2013, 19 (5): 898–904. [张莹, 石萍, 马炯. 微小杆菌 *Exiguobacterium* spp. 及其环境应用研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19 (5): 898–904]
- Zheng YQ, Du GZ, Li YF, et al. Isolation and identification of bacteria from larval gut of the potato tuberworm, *Phthorimaea operculella* (Zeller) and the degradation for plant-based macromolecular compounds [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (3): 525–532. [郑亚强, 杜广祖, 李亦菲, 等. 马铃薯块茎蛾肠道细菌分离鉴定及其对植物源大分子化合物的降解作用 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (3): 525–532]
- Zhou HY. Purification and Characterization of A Secreted Dnase from *Exiguobacterium* sp. yc3 [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015. [周瀚瀛. 微小杆菌 yc3 (*Exiguobacterium* sp. yc3) 分泌的耐热 DNA 酶的分离纯化及相关特性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015]