

蚜虫共生细菌多重 PCR 检测体系的建立

李彤[#], 蒋月丽[#], 连红梅, 武予清^{*}, 苗进, 巩中军, 段云

(河南省农业科学院植物保护研究所, 河南省农作物病虫害防治重点实验室,
农业农村部华北南部有害生物治理重点实验室, 郑州 450002)

摘要 蚜虫中具有多种共生菌,使用常规 PCR 对它们进行检测,耗时耗力,而多重 PCR 可以更加高效地进行多种细菌的检测。沃尔巴克氏菌 *Wolbachia pipientis*、杀雄菌属共生菌 *Arsenophonus* 和蚜虫 U 型共生菌 *Regiella insecticola* 是蚜虫中常见的 3 种共生菌。本研究针对沃尔巴克氏菌、杀雄菌属共生菌和蚜虫 U 型共生菌,分别选择以 *wsp* 基因、*yaeT* 基因和 *gltA* 基因作为靶标,进行了多重 PCR 引物的设计和扩增体系的优化。结果显示,本研究建立的多重 PCR 体系在检测 3 种蚜虫常见共生菌时,具有较高的扩增特异性、准确性和直观性及较高的检测灵敏度,共生菌的最低检测浓度为 10^4 拷贝/ μL ,远低于共生菌在蚜虫 1 龄若虫总 DNA 中的浓度(10^8 拷贝/ μL),可以完全满足蚜虫共生菌检测工作的需要。

关键词 沃尔巴克氏菌; 杀雄菌属共生菌; 蚜虫 U 型共生菌; 多重 PCR

中图分类号: S 433.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019069

Establishment of multiplex PCR detection system for symbiotic bacteria of aphids

LI Tong[#], JIANG Yueli[#], LIAN Hongmei, WU Yuqing^{*}, MIAO Jin, GONG Zhongjun, DUAN Yun

(Henan Key Laboratory of Crop Pests Control, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops
in Southern Region of North China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Plant Protection,
Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Aphids harbor many bacterial symbionts. Although conventional PCR is universally used in the detection of aphid bacterial symbionts, however, it is a time-consuming way when multiple aphid bacterial symbionts should be detected in the same sample. Previous researches revealed that the multiplex PCR had high efficiency in the multiple bacteria detections. *Wolbachia*, *Arsenophonus* and *Regiella insecticola* are the three universal bacterial symbionts in aphids. In this study, we employ three protein coding genes, *wsp*, *yaeT* and *gltA*, as targets to design the multiplex PCR primers and establish an optimized detection system. The results showed that the multiplex PCR system established in this study had high amplification specificity and accuracy in the detection of the three aphid bacterial symbionts. Moreover, the minimum detection concentration of symbiotic bacteria was 10^4 copies/ μL , lower than that of that in the total DNA of the first instar aphid, 10^8 copies/ μL , indicating that the multiplex PCR system also had the high sensitivity in the bacterial symbionts detection, which will fully meet the requirements in the detection of aphid bacterial symbionts.

Key words *Wolbachia pipientis*; *Arsenophonus*; *Regiella insecticola*; multiplex PCR

蚜虫属半翅目,胸喙亚目 Sternorrhyncha,是一类重要的经济害虫^[1]。蚜虫主要以植物韧皮部的汁液为食,而植物韧皮部汁液是一类营养极其不均衡的食物,富含碳水化合物,却缺少动物生长发育所必须的氨基酸^[2]。蚜虫和细菌的关系密切,几乎所有

的蚜虫中都含有一种可遗传的共生细菌——*Buchnera aphidicola*^[3]。研究表明,*B. aphidicola* 可以合成蚜虫生长发育所需的氨基酸,它和蚜虫寄主之间具有专性共生的关系^[4-5]。相对于专性共生菌,蚜虫中还存在另外一类具有垂直传播能力的共生细

收稿日期: 2019-02-21

修订日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(31601897);河南省农业科学院杰出青年基金

* 通信作者 E-mail: yuqingwu36@hotmail.com

为并列第一作者

菌,由于它们和蚜虫之间不存在专性共生的关系,因此被统称为蚜虫兼性共生菌。蚜虫兼性共生菌具有多样化的生态学功能,如增强蚜虫对高温的忍耐^[6],增强蚜虫对寄生蜂寄生和真菌感染的抵抗能力^[7-8],扩大蚜虫的寄主范围^[9]等。

蚜虫共生菌对生存环境要求苛刻,基本上都不能在蚜虫体外进行纯培养,因此目前已知的蚜虫共生菌都是通过使用分子手段进行鉴定的^[10]。共生菌已经被认为是蚜虫体内另外一种遗传变异的来源^[11],以其为对象开展的蚜虫种群遗传结构分析、真核和原核生物互作,以及利用共生菌作为介体开展对蚜虫的生物防治都是目前国内外研究的热点^[11-13]。而对蚜虫中共生菌的物种进行快速、准确的鉴定,是开展上述研究工作的前提。

在前期的研究工作中,研究者基本上都是使用常规 PCR 检测方法,合成单对引物对单个蚜虫共生菌进行鉴定,而 1 次 PCR 扩增只能在单个样品中检测到 1 种共生菌。但是,在实际调查研究中,往往需要同时在多达几百个,甚至上千个蚜虫样品中检测多种共生菌。因此,使用常规 PCR 开展蚜虫共生菌物种的多样性检测,需要耗费大量的人力物力。而依托于多个细菌物种基因设计和优化的多重 PCR 体系,可以一次在单个样品中检测多个细菌物种,是一种高效的分子检测方法,并已经广泛应用在环境微生物和病原微生物检测中^[14-16]。沃尔巴克氏菌 *Wolbachia pipientis*、杀雄菌属共生菌 *Arsenophonus* 和蚜虫 U 型共生菌 *Regiella insecticola* 是蚜虫中常见的 3 种共生菌^[17-19]。本研究中,针对它们设计和优化了一套能快速、准确、直观并兼有高灵敏度的多重 PCR 反应体系,可以通过一次多重 PCR 扩

增,揭示待测蚜虫中 3 种共生菌的感染情况,为今后开展蚜虫共生菌的检测工作提供了极大的便利,并节省大量的成本。

1 材料和方法

1.1 供试蚜虫材料

使用的蚜虫材料是 2013 年 4 月采集自河南郑州、原阳麦田的麦长管蚜(又称荻草谷网蚜)*Sitobion miscanthi* 和禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*,随后在实验室进行单雌饲养,检测其共生菌感染情况。建立了室内单独感染沃尔巴克氏菌和杀雄菌属共生菌的禾谷缢管蚜种群;单独感染蚜虫 U 型共生菌的麦长管蚜种群;未感染共生菌的麦长管蚜对照种群。

1.2 蚜虫样品总 DNA 的提取

取出饲养的单头蚜虫,在 75%乙醇中进行多次漂洗以除去蚜虫表面菌污染,然后在无菌水中浸泡 1~2 h 去除乙醇。使用灭菌的移液器枪头对蚜虫样品进行研磨,然后使用动物组织和细菌通用 DNA 提取试剂盒进行总 DNA 的提取(EasyPure Genomic DNA Extraction Kit,北京金式金生物技术有限公司),提取后的蚜虫样品总 DNA 置于 4℃ 保存备用。

1.3 PCR 引物设计

使用 3 个蛋白质编码基因作为靶标开展相关的多重 PCR 引物组合的设计。*wsp* 基因编码外膜蛋白,是国际上对沃尔巴克氏菌进行检测和分型的通用基因^[20]; *yaeT* 基因编码外膜蛋白组装因子,已经广泛应用于杀雄菌属共生菌株系的多基因分型^[18]; *gltA* 基因编码细菌中的柠檬酸合成酶,已经成功用于蚜虫 U 型共生菌的检测^[21]。本研究设计的引物序列见表 1。

表 1 三种常见蚜虫共生菌多重 PCR 检测的引物
Table 1 Primers for the detections of three aphid universal bacterial symbionts

共生菌名称 Bacterial symbiont	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product
沃尔巴克氏菌 <i>Wolbachia pipientis</i>	Wol-F(上游引物)	ATAGCTGGTGGTGGTGCATT	435
	Wol-R(下游引物)	TGCACCAACAGTGCTGTAAAC	
杀雄菌属共生菌 <i>Arsenophonus</i>	Ars-F(上游引物)	AGCGCTATTTTCAACGGGTA	294
	Ars-R(下游引物)	CGATTACTCGGTAGCGGTGT	
蚜虫 U 型共生菌 <i>Regiella insecticola</i>	Reg-F(上游引物)	ACTGCTCCATCGTGGTTTTC	174
	Reg-R(下游引物)	CCACGAAAAAGATGCCAAAT	

1.4 常规 PCR

1.4.1 引物浓度梯度筛选

PCR 扩增反应体系为 50 μL: 10×PCR Buffer

(100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl) 5 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4 μL, 5 U/μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL, 10 μmol/L 的上、下游单基因引物各

1~2.0 μL , DNA 模板 1 μL , 25 mmol/L 的 MgCl_2 3 μL , 去离子水补至 50 μL 。

PCR 扩增反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.4.2 克隆和测序

目的片段使用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (EasyPure Quick Gel Extraction Kit, 北京全式金生物技术有限公司) 进行纯化回收; 将回收片段与 pEASY-T1 Simple Cloning Vector (北京全式金生物技术有限公司) 按照载体说明书要求的体系进行混合, 在 25℃ 连接 10 min, 随后转化到 *E. coli* Top10 感受态细胞中, 培养 10 h; 使用 M13-F: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' 和 M13-R: 5'-CAG-GAAACAGCTATGAC-3' 筛选阳性克隆, 送往上海生工(生物工程股份有限公司) 测序。

测序结果使用 MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件进行拼接^[22], 并进一步在 GenBank 中使用 BLASTn 进行比对分析, 确定其序列来源。

1.4.3 质粒标准品构建

使用质粒提取试剂盒 (EasyPure Plasmid Mini-Prep Kit, 北京全式金生物技术有限公司) 提取阳性克隆中的质粒, 然后将质粒浓度分别稀释为 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 拷贝/ μL 的标准品。

1.5 多重 PCR

1.5.1 引物浓度梯度筛选

PCR 扩增反应体系为 50 μL : 10×PCR Buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl) 5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4 μL , 5 U/ μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游多基因引物各 1~2.0 μL , 10^4 拷贝/ μL 的混合质粒模板 1 μL , 25 mmol/L 的 MgCl_2 3 μL , 去离子水补至 50 μL 。

PCR 扩增反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.5.2 引物扩增灵敏度

分别以浓度为 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 拷贝/ μL 的混合质粒为模板, 进行多重 PCR 扩增反应, 考察多重 PCR 检测模板的灵敏度。

PCR 扩增反应的反应体系为 50 μL : 10×PCR

Buffer (100 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl) 5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTPs 4 μL , 5 U/ μL 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上、下游多基因引物各 2.0 μL , 混合质粒模板 1 μL , 25 mmol/L 的 MgCl_2 3 μL , 去离子水补至 50 μL 。

PCR 扩增反应的反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.5.3 多重 PCR 检测蚜虫样品中共生菌的感染情况

分别以单独感染沃尔巴克氏菌的禾谷缢管蚜的总 DNA、单独感染杀雄菌属共生菌的禾谷缢管蚜的总 DNA、单独感染蚜虫 U 型共生菌的麦长管蚜的总 DNA 和未感染共生菌的麦长管蚜的总 DNA 为模板, 判断多重 PCR 反应体系对蚜虫共生菌感染检测的效果。

2 结果与分析

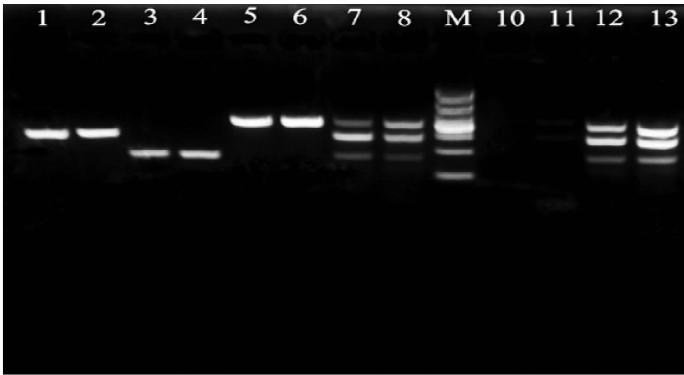
2.1 常规 PCR 结果

如图 1 中 1~6 泳道所示, 3 种共生菌在单引物扩增时均未出现非特异扩增条带, 说明引物具有较高的特异性; 而且引物浓度对单引物扩增结果影响不大。将克隆测序结果在 GenBank 中进行 BLASTn 比对分析, 结果显示其最相似的序列均为相关蚜虫共生菌的序列, 进一步确定了常规 PCR 扩增结果的准确性。

2.2 多重 PCR 结果

如图 1 中 7~8 泳道所示, 多重引物对组在扩增时均未出现非特异扩增条带, 具有较高的特异性, 而且引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 相对于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 有较好的扩增效果。如图 1 中泳道 10~13 所示, 本研究设计的多重 PCR 反应体系最低可以检测到浓度为 10^4 拷贝/ μL 分别含有 *wsp* 基因、*yaeT* 基因、*gltA* 基因的混合质粒, 具有较高的检测灵敏度。

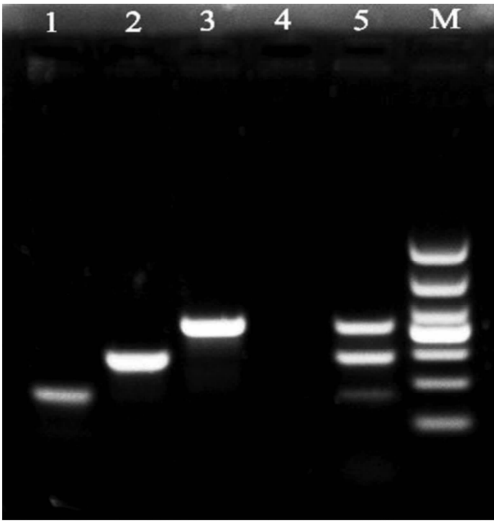
进一步在蚜虫总 DNA 中验证了多重 PCR 扩增体系检测蚜虫样品中共生菌感染情况的可行性。结果(图 2)显示, 在感染共生菌的蚜虫样品中均扩增出了特异性条带, 而在未感染蚜虫共生菌的样品中无扩增条带。而且扩增片段间长度差异都超过 100 bp, 普通的琼脂糖凝胶电泳就可以完全清楚分辨不同的扩增产物, 从而直观地反映出待测的蚜虫样品中共生菌的感染情况。



1~6泳道为常规PCR; 7~8泳道为多重PCR; 10~13为多重PCR扩增灵敏度检测。1、3、5、7引物浓度为0.2 $\mu\text{mol/L}$, 2、4、6、8引物浓度为0.4 $\mu\text{mol/L}$; 10~13使用的混合质粒模板分别为 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 拷贝/ μL 。M: DL1000 Marker, 从上到下片段大小依次为: 1 000、700、500、400、300、200、100 bp
Lane 1~6 shows the conventional PCR amplifications; lane 7~8 shows multiplex PCR amplifications; lane 10~13 shows the sensitivity tests of multiplex PCR systems. The primer concentrations used in the amplifications of lane 1, 3, 5, and 7 are 0.2 $\mu\text{mol/L}$. The primer concentrations used in the amplifications of lane 2, 4, 6, and 8 are 0.4 $\mu\text{mol/L}$. The templates for the amplifications of lane 10~13 are the mixed plasmids of 10^2 , 10^3 , 10^4 , and 10^5 copies/ μL . M: DL1000 Marker, contains fragments of 1 000, 700, 500, 400, 300, 200, and 100 bp

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification results



1: 单独感染沃尔巴克氏菌的禾谷缢管蚜的总DNA; 2: 单独感染杀雄菌属共生菌的禾谷缢管蚜的总DNA; 3: 单独感染蚜虫U型共生菌的麦长管蚜的总DNA; 4: 未感染共生菌的麦长管蚜的总DNA; 5: 混合质粒阳性对照。M: DL 1000 Marker, 从上到下片段大小依次为: 1 000、700、500、400、300、200、100 bp
Lane 1: The amplification in the total DNA of *Rhopalosiphum padi* single infected by *Wolbachia pipientis*; Lane 2: The amplification in the total DNA of *Rhopalosiphum padi* single infected by *Arsenophonus*; Lane 3: The amplification in the total DNA of *Sitobion miscanthi* single infected by *Regiella insecticola*; Lane 4: The amplification in the total DNA of *Sitobion miscanthi* uninfected by bacterial symbionts; Lane 5: The amplification in the mixed plasmids. M: DL 1000 Marker, containing fragments of 1 000, 700, 500, 400, 300, 200, and 100 bp

图 2 多重 PCR 在蚜虫样品中扩增结果

Fig. 2 Multiplex PCR amplifications in the total aphid DNA samples

3 结论与讨论

细菌是世界上种类最多,分布最广的一类微生物

物,研究发现仅在健康人体皮肤表面就分布有约 1 000种细菌^[23],而昆虫作为物种多样性最丰富的动物类群,和细菌之间也具有密切的联系^[24]。蚜虫,是较早开展共生菌研究的昆虫类群之一,早在 20 世纪 60 年代,研究者就通过显微镜观察到蚜虫体内具有多种形态的共生细菌^[25]。近 20 年里,以细菌 16S rRNA 基因作为主要的分子标记,研究者已经在蚜虫中鉴定了多种共生菌,它们分别属于不同的细菌类群,包括 α 变形菌纲^[26-27], γ 变形菌纲^[18-19] 和柔膜菌纲^[28]。在前期的研究中,研究人员基本上都是针对特定蚜虫共生菌合成特异的 16S rRNA 基因引物,使用常规 PCR 方法进行下游的共生菌检测和鉴定工作。在蚜虫共生菌相关的研究中,往往需要对多个样品和多种共生菌进行检测,使用常规 PCR 方法就显得耗时耗力。而利用多个引物组合构建的多重 PCR 体系已经广泛应用在环境微生物和致病微生物的高效检测和鉴定工作中。

本研究中,我们针对 3 种常见的蚜虫共生菌,沃尔巴克氏菌、杀雄菌属共生菌和蚜虫 U 型共生菌,分别选择在其相关研究中经常使用的 3 种蛋白质编码基因, *wsP* 基因、*yaeT* 基因和 *gltA* 基因作为目标基因进行了多重 PCR 扩增引物的设计,通过常规 PCR 扩增和克隆测序,确定了引物扩增的特异性和准确性,并进一步优化了多重 PCR 扩增体系。本研究中构建的多重 PCR 反应体系最低可以检测到的

共生菌浓度为 10^4 拷贝/ μL 。而前期的研究发现,共生菌在蚜虫 1 龄若虫总 DNA 中的浓度就超过了 10^8 拷贝/ μL ^[29-30]。因此,本研究设计的多重 PCR 反应体系具有较高的扩增灵敏度,完全可以满足在蚜虫样品中进行 3 种常见共生菌的检测,并大大降低了工作量,提升了工作效率,节省了相关的检测费用。本研究中,我们使用已建立的多重 PCR 反应体系,在禾谷缢管蚜和麦长管蚜样品中进行了共生菌的感染检测,结果显示,和常规检测结果一致,也并未出现非特异扩增,具有较高的共生菌感染检测特异性。但是,需要注意的是,由于不同蚜虫种类的遗传背景存在着差异,因此,建议在其他蚜虫种类中使用本研究建立的多重 PCR 反应体系时,先对扩增产物进行测序,确定序列来源,避免假阳性结果。另外,在将来的研究中,我们也将针对其他蚜虫共生菌,设计出可以和本研究多重 PCR 反应体系相兼容的检测系统,进一步简化蚜虫共生菌的检测和鉴定工作。

参考文献

- [1] 张广学, 钟铁森. 中国经济昆虫志第二十五册 同翅目 蚜虫类 (一)[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 1-387.
- [2] DOUGLAS A E, MINTO L B, WILKINSON T L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204: 349-358.
- [3] MUNSON M A, BAUMANN P, KINSEY M G. *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids [J]. *International Journal Systemic and Evolutionary Microbiology*, 1991, 41: 566-568.
- [4] DOUGLAS A E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*[J]. *Annual Review of Entomology*, 1998, 43: 17-37.
- [5] SHIGENOBU S, WATANABE H, HATTORI M, et al. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS [J]. *Nature*, 2000, 407: 81-86.
- [6] MONTLLOR C B, MAXMEN A, PURCELL A H. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress [J]. *Ecological Entomology*, 2002, 27 (2): 189-195.
- [7] SCARBOROUGH C L, FERRARI J, GODFRAY H C. Aphid protected from pathogen by endosymbiont [J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1781.
- [8] OLIVER K M, MORAN N A, HUNTER M S. Variation in

- resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(36): 12795-12800.
- [9] TSUCHIDA T, KOGA R, FUKATSU T. Host plant specialization governed by facultative symbiont [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 1989.
 - [10] SANDSTRÖM J P, RUSSELL J A, WHITE J P, et al. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids [J]. *Molecular Ecology*, 2010, 10(1): 217-228.
 - [11] RUSSELL J A, WELDON S, SMITH A, et al. Uncovering symbiont-driven genetic diversity across north american pea aphids [J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(7): 2045-2059.
 - [12] ZHANG Bo, EDWARDS O, KANG Le, et al. A multi-genome analysis approach enables tracking of the invasion of a single russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) clone throughout the new world [J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23(8): 1940-1951.
 - [13] ARORA A K, DOUGLAS A E. Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2017, 103: 10-17.
 - [14] 董睿, 孙端方. 多重荧光 PCR 方法检测食品中致病菌的实用研究[J]. *现代食品*, 2018(14): 86-87.
 - [15] 姜华, 焦阳, 李远宏, 等. 多重 PCR 检测婴幼儿配方奶粉中 3 种食源性致病菌[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 213-218.
 - [16] 张飞燕, 赵玲, 金洁, 等. 多重 PCR 技术在实验动物病原检测中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(10): 111-116.
 - [17] WANG Ze, SU Xiaomin, WEN Juan, et al. Widespread infection and diverse infection patterns of *Wolbachia* in chinese aphids [J]. *Insect Science*, 2014, 21(3): 313-325.
 - [18] JOUSSELIN E, COEUR d'ACIER A, VANLERBERGHE-MASUTTI F, et al. Evolution and diversity of *Arsenophonus* endosymbionts in aphids [J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22 (1): 260-270.
 - [19] MORAN N A, RUSSELL J A, KOGA R, et al. Evolutionary relationships of three new species of enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3302-3310.
 - [20] ZHOU Weiguo, ROUSSET F, O'NEILL R S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences [J]. *Proceedings: Biological Sciences*, 1998, 265 (1395): 509-515.
 - [21] LI Tong, XIAO Jinhua, WU Yuqing, et al. Diversity of bacterial symbionts in populations of *Sitobion miscanthi* (Homoptera: Aphididae) in China [J]. *Environmental Entomology*, 2014, 43(3): 605-611.
 - [22] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10):

2731 - 2739.

[23] GRICE E A, KONG H H, CONLAN S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome [J]. Science, 2009, 324(5931): 1190 - 1192.

[24] SANCHEZ-CONTRERAS M, VLISIDOU I. The diversity of insect bacteria interactions and its applications for disease control [J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2008, 25(1): 303 - 344.

[25] BUCHNER P. Symbiosis in animals which suck plant juices, in endosymbiosis of animals with plant microorganisms [M]. New York: Interscience, 1965: 210 - 432.

[26] CHEN Deqiao, CAMPBELL B C, PURCELL A H. A new *Rickettsia* from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris) [J]. Current Microbiology, 1996, 33 (2): 123 - 128.

[27] LI Tong, XIAO Jinhua, XU Zhaohuan, et al. A possibly new

Rickettsia-like genus symbiont is found in chinese wheat pest aphid, *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106(3): 418 - 421.

[28] FUKATSU T, TSUCHIDA T, NIKOH N, et al. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(3): 1284 - 1291.

[29] 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 aphid [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1533): 2543 - 2550.

[30] LI Tong, XIAO Jinhua, XU Zhaohuan, et al. Cellular tropism, population dynamics, host range and taxonomic status of an aphid secondary symbiont, SMLS (*Sitobion miscanthi* L type symbiont) [J/OL]. PLoS ONE, 2011, 6(7): e21944.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 116 页)

[7] 谢兰芬,何鹏飞,吴毅歆,等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 对玉米叶斑病的防治效果[J]. 玉米科学, 2017, 25(2): 130 - 135.

[8] 崔文艳,何朋杰,尚娟,等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 对玉米的防病促生长效果研究[J]. 玉米科学, 2015, 23(5): 153 - 158.

[9] GARGE S S, NERURKAR A S. Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017, 9: 48 - 57.

[10] LIU Chunming, YANG Zhenfu, HE Pengfei, et al. Deciphering the bacterial and fungal communities in clubroot-affected cabbage rhizosphere treated with *Bacillus subtilis* XF-1 [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2018, 256: 12 - 22.

[11] SHAO Jiahui, XU Zhihui, ZHANG Nan, et al. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 [J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51(3): 321 - 330.

[12] 何鹏飞. B9601-Y2 菌株的基因组解析及部分功能验证[D].

武汉: 华中农业大学, 2014.

[13] 汪汉成, 杨双剑, 许冬青, 等. 苯并噻二唑对漂浮育苗烟草白粉病的诱导抗性及其对烟苗安全性研究[J]. 植物保护, 2012, 38(6): 123 - 126.

[14] 邱德文. 生物农药研究进展与未来展望[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 81 - 89.

[15] WANG Li, LI Xiaobao, SUO Haicui, et al. Soft rot of potatoes caused by *Bacillus amyloliquefaciens* in Guangdong province, China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2017, 39(4): 533 - 539.

[16] DES ESSARTS Y R, CIGNA J, QUÉTU-LAURENT A, et al. Biocontrol of the potato blackleg and soft rot diseases caused by *Dickeya dianthicola* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(1): 268 - 278.

[17] HE Pengjie, CUI Wenyan, MUNIR S, et al. *Plasmodiophora brassicae* root hair interaction and control by *Bacillus subtilis* XF-1 in Chinese cabbage [J]. Biological Control, 2019, 128: 56 - 63.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 128 页)

[9] 陈绘画,王坚姬,徐志宏,等. 基于响应面方法的马尾松毛虫发生量混沌特性检测及其预测[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(9): 94 - 96.

[10] 田万银,徐华潮. 浙江沿海防护林马尾松毛虫的预测预报模型[J]. 环境昆虫学报, 2012, 34(4): 401 - 406.

[11] 费海泽,王鸿斌,孔祥波,等. 马尾松毛虫发生相关气象因子筛选及预测[J]. 东北林业大学学报, 2014, 41(1): 136 - 140.

[12] 王庆,毕猛,杜婷,等. 基于气象因子的马尾松毛虫发生率空间格局研究[J]. 林业科学研究, 2016, 29(2): 256 - 260.

[13] 张孝羲. 昆虫生态及预测预报[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 205 - 221.

[14] 许章华,李聪慧,刘健. 马尾松毛虫害等级的 Fisher 判别分析[J]. 农业机械学报, 2014, 45(6): 401 - 406.

[15] 徐克学. 生物数学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 40 - 50.

[16] 周夏芝,王振兴,余燕,等. 马尾松毛虫幼虫高峰期发生量的预测模型研究[J]. 应用昆虫学报, 2017, 54(6): 1031 - 1043.

(责任编辑: 田 喆)