

基于 16S rDNA 序列的小贯小绿叶蝉共生细菌多样性研究

毛迎新¹, 谭荣荣¹, 王友平², 陈 勋¹, 王红娟¹, 黄丹娟¹, 龚自明^{1*}

(1. 湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430064; 2. 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 农业部华中作物有害生物综合治理重点实验室, 武汉 430064)

摘要 利用 Illumina HiSeq 技术,对赤壁、大悟、武汉、咸安和英山 5 个茶园小贯小绿叶蝉地理种群的成虫共生细菌 16S rDNA-V4 变异区进行测序,应用 Uparse 和 RDP Classifier 等软件统计和分析样本的物种组成、丰度和多样性。5 个地区小贯小绿叶蝉成虫的 16S rDNA 基因序列文库共获得 239 645 条有效 tags,在 97%相似阈值下将其聚类为 3 403 个 OTUs。共注释到 41 个门,116 个纲,197 个目,272 个科,372 个属,105 个种。5 个样本的共生菌在不同分类水平上的组成有所不同,其中在门水平上,主要优势菌为变形菌门 Proteobacteria(相对丰度 60.6%~97.1%);在纲水平上,相对丰度排名前 5 位中共有的优势菌为 γ -变形菌纲 Gammaproteobacteria 和 α -变形菌纲 Alphaproteobacteria;在属水平上,排名前 10 位中 5 个样本共有的优势菌为盐单胞菌属 *Halomonas*、希瓦氏菌属 *Shewanella* 和沃尔巴克氏体属 *Wolbachia*。小贯小绿叶蝉成虫细菌的 Chao 指数、Ace 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 1 065.55~2 841.89, 1 130.76~2 914.90, 1.07~8.63 和 0.18~0.99。茶园小贯小绿叶蝉成虫共生细菌多样性比较丰富,不同地理种群的小贯小绿叶蝉细菌群落结构和多样性有差异。本研究结果为进一步研究细菌对小贯小绿叶蝉种群生物学的影响奠定了基础。

关键词 小贯小绿叶蝉; 细菌; 16S rDNA; 多样性

中图分类号: S 433.39 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017347

Analysis of the bacterial diversity in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii* based on 16S rDNA sequences

MAO Yingxin¹, TAN Rongrong¹, WANG Youping², CHEN Xun¹,
WANG Hongjuan¹, Huang Danjuan¹, GONG Ziming¹

(1. Institute of Fruits and Tea, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;
2. Institute of Plant Protection, Soil and Fertilizers, Hubei Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Integrated Pest Management of Crop Pests in Central China, Ministry of Agriculture, Wuhan 430064, China)

Abstract The V4 regions of the 16S rDNA of symbiotic bacteria in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii* from five geographical regions including Chibi, Dawu, Wuhan, Xian'an and Yingshan were sequenced by Illumina HiSeq techniques. The numbers of operational taxonomic units (OTUs), bacterial community, species abundance and alpha diversity in samples were analyzed by using Uparse and RDP Classifier software. The results showed that a total of 239 645 effective tags were obtained, which were clustered into 3 403 OTUs, and annotated into 41 phyla, 116 classes, 197 orders, 272 families, 372 genera, and 105 species. At the phyla level, Proteobacteria was the common dominant bacteria (relative abundance 60.6%–97.1%). Gammaproteobacteria and Alphaproteobacteria were the commonly dominant classes in the top 5 classes of bacterial communities between the five samples. *Halomonas*, *Shewanella* and *Wolbachia* were the commonly dominant genera in the top 10 genera of bacterial communities. The indexes of Chao, Ace, Shannon and Simpson were 1 065.55–2 841.89, 1 130.76–

收稿日期: 2017-09-06 修订日期: 2017-10-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0200905);湖北省农业科技创新中心团队项目(2016-620-000-001-032);湖北省第二批现代农业产业技术体系项目

* 通信作者 E-mail: ziminggong@163.com

2 914.90, 1.07–8.63 and 0.18–0.99, respectively. The results indicated that there are diverse bacteria in adults of *E. (M.) onukii*, and there are differences in the bacterial community diversity among *E. (M.) onukii* populations. These results provide a basis for further study of the effects of bacteria on the biology of *E. (M.) onukii*.

Key words *Empoasca (Matsumurasca) onukii*; bacterium; 16S rDNA; diversity

昆虫携带共生菌是一种普遍存在的自然现象。在长期的协同进化过程中,昆虫与其内共生菌之间形成了稳定的互惠共生关系^[1]。昆虫为共生菌提供稳定的生存环境,共生菌在昆虫生命活动中起着重要的作用,如为宿主昆虫提供必需的营养物质,维持宿主昆虫的正常生长发育^[2],增强宿主对病原微生物、天敌等生物胁迫的抵御能力^[3-4],提高宿主的生殖力及雌性比例^[5],调节宿主昆虫对环境和寄主植物的适应性等^[6-7]。共生菌对宿主昆虫有着重要的生物学和生态学意义,因此,有关内共生菌的多样性与功能研究也备受关注。

小贯小绿叶蝉 *Empoasca (Matsumurasca) onukii* 是我国茶区普遍发生的重要害虫,主要以成虫和若虫刺吸为害茶树嫩茎、嫩叶,雌虫产卵会给嫩茎造成机械损伤,严重影响茶叶产量和品质。该叶蝉原属林木中的一种非适生性害虫,当茶树向山区、半山区发展时侵入茶园,并很快蔓延发展成为茶园最主要的优势虫种^[8],在该虫定殖、扩散和暴发的过程中某些内共生菌可能就起着重要的作用。但目前

我国还没有小贯小绿叶蝉内共生菌种类、功能研究的相关报道。为此,本研究利用 16S rDNA 基因文库技术和 Illumina HiSeq 测序技术,对来自湖北不同茶园的小贯小绿叶蝉内共生细菌群落结构及其多样性进行了检测分析,以期为进一步研究内共生菌对小贯小绿叶蝉生物学、生态学的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫来源及 DNA 提取

2015 年 6 月,从湖北省英山县、咸安区、赤壁市、大悟县和武汉市茶园分别采集小贯小绿叶蝉成虫,每个样点 100 头。采样茶园的具体地点、地理坐标以及种植的茶树品种等详见表 1。设置 5 个不同地理种群的样本,即英山种群(YS)、咸安种群(XA)、赤壁种群(CB)、大悟种群(DW)和武汉种群(WH),每个种群随机选取 50 头成虫,用 75% 乙醇表面消毒 90 s,灭菌水清洗 5 次后,用上海生物工程有限公司生产的细菌基因组 DNA 提取试剂盒对样本的基因组 DNA 进行提取。

表 1 小贯小绿叶蝉采样信息

Table 1 Collection information of *Empoasca (Matsumurasca) onukii* samples

| 样本名称 Sample | 采样地点 Location | 地理坐标 Geographic coordinates | 茶树品种 Tea cultivar | 采样日期/月一日 Date |
|----------------|------------------|--------------------------------|----------------------|------------------|
| 英山种群 YS | 湖北省黄冈市英山县温泉镇马蚕村 | 30°41'53"N, 115°39'18"E | 福鼎大白和英山群体种 | 06-12 |
| 咸安种群 XA | 湖北省咸宁市咸安区官埠镇官埠村 | 29°54'36"N, 114°20'05"E | 福鼎大白 | 06-16 |
| 赤壁种群 CB | 湖北省赤壁市新店镇土城村 | 29°37'39"N, 113°44'29"E | 福鼎大白 | 06-16 |
| 大悟种群 DW | 湖北省孝感市大悟县三里城镇 | 31°48'05"N, 114°13'06"E | 福鼎大白 | 06-11 |
| 武汉种群 WH | 湖北省武汉市江夏区金水闸 | 30°17'50"N, 114°08'36"E | 福鼎大白 | 06-24 |

1.2 16S rDNA 的扩增

以提取的基因组 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCG-GTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增 V4 片段。PCR 反应体系为 30 μL: Phusion Master Mix(2×) 15 μL, 引物(2 μmol/L) 3 μL, gDNA(1 ng/μL) 10 μL, ddH₂O 2 μL。PCR 条件:98℃ 预变性 1 min;98℃ 10 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环;72℃ 5 min。

1.3 PCR 产物的纯化

PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,

切取的目的条带,使用 Qiagen QIAquick PCR Purification Kit 胶回收试剂盒回收纯化产物,方法参照试剂盒说明书。

1.4 文库构建及高通量测序

回收的目的片段,用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 定量试剂盒 PCR 定量,文库合格后,使用 Hiseq2500 PE250 进行上机测序。

1.5 测序数据处理

采用 Illumina HiSeq 测序平台得到的原始数据

(raw PE), 存在一定比例的干扰数据(dirty data), 为了使信息分析的结果更加准确、可靠, 首先要进行拼接和质控, 得到 clean tags, 再进行嵌合体过滤, 得到最终用于后续分析的有效数据(effective tags)。

1.6 共生细菌鉴定与多样性分析

利用 Uparse 软件(Uparse v7.0.1001)^[9] 对所有样品的全部有效数据进行聚类, 以 97% 的一致性(identity) 将序列聚类成为操作分类单元 OTUs (operational taxonomic units), 筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。用 RDP Classifier (Version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) 方法与 GreenGene 数据库 (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) 对 OTUs 代表序列进行物种注释分析, 在不同分类水平上统计各样本的群落组成。并对 OTUs

进行丰度、多样性指数分析。选取 Chao 和 Ace 指数反映微生物丰富度, 用 Simpson 和 Shannon 指数反映微生物多样性。

2 结果与分析

2.1 序列拼接和组装

小贯小绿叶蝉成虫的 16S rDNA 序列文库共获得了 239 645 条有效 tags, 以 97% 的一致性作为相似性的阈值将序列聚类为 3 403 个 OTUs。其中, 赤壁小贯小绿叶蝉种群共有 54 060 条有效 tags, 聚类为 2 633 个 OTUs; 大悟种群共有 45 165 条有效 tags, 聚类为 2 370 个 OTUs; 武汉种群共有 35 062 条有效 tags, 聚类为 1 108 个 OTUs; 咸安种群共有 71 534 条有效 tags, 聚类为 1 065 个 OTUs; 英山种群共有 33 824 条有效 tags, 聚类为 2 109 个 OTUs(表 2)。

表 2 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌测序数据的基本信息

Table 2 Sequencing information of bacteria in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii*

| 样本 Sample | 原始数据/条 Raw PE | 拼接得到的序列/条 Raw tags | 过滤后的序列/条 Clean tags | 有效序列/条 Effective tags | OTU 数目/个 Number of OTUs |
|--------------|------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| CB | 87 004 | 58 138 | 57 025 | 54 060 | 2 633 |
| DW | 103 647 | 60 497 | 48 586 | 45 165 | 2 370 |
| WH | 37 213 | 36 446 | 35 625 | 35 062 | 1 108 |
| XA | 76 044 | 73 905 | 72 115 | 71 534 | 1 065 |
| YS | 103 831 | 46 219 | 35 592 | 33 824 | 2 109 |
| 合计 Total | 407 739 | 275 205 | 248 943 | 239 645 | 3 403 |

2.2 小贯小绿叶蝉内共生细菌种类及其丰度

根据 OTUs 的注释结果, 5 个不同地理种群样本合并后的总样本共鉴定获得 41 个门, 116 个纲, 197 个目, 272 个科, 372 个属, 105 个种; 其中赤壁种群鉴定出 37 个门, 101 个纲, 170 个目, 243 个科, 340 个属, 91 个种; 大悟种群鉴定出 32 个门, 100 个

纲, 165 个目, 237 个科, 301 个属, 81 个种; 武汉种群鉴定出 27 个门, 86 个纲, 130 个目, 183 个科, 202 个属, 45 个种; 咸安种群鉴定出 28 个门, 84 个纲, 73 个目, 167 个科, 187 个属, 48 个种; 英山种群鉴定出 36 个门, 103 个纲, 162 个目, 232 个科, 281 个属, 82 个种(表 3)。

表 3 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌分类的基本信息

Table 3 Taxonomic information of bacteria in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii*

| 样本 Sample | 不同分类阶元分类数目/个 Number of different taxonomic categories | | | | | |
|--------------|--|---------|---------|----------|---------|-----------|
| | 门 Phylum | 纲 Class | 目 Order | 科 Family | 属 Genus | 种 Species |
| CB | 37 | 101 | 170 | 243 | 340 | 91 |
| DW | 32 | 100 | 165 | 237 | 301 | 81 |
| WH | 27 | 86 | 130 | 183 | 202 | 45 |
| XA | 28 | 84 | 73 | 167 | 187 | 48 |
| YS | 36 | 103 | 162 | 232 | 281 | 82 |
| 合计 Total | 41 | 116 | 197 | 272 | 372 | 105 |

在门分类水平上(图 1), 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌的 16S rDNA 基因序列共注释到了酸杆菌门

Acidobacteria、放线菌门 Actinobacteria、拟杆菌门 Bacteroidetes、绿弯菌门 Chloroflexi、蓝细菌门 Cya-

nobacteria、厚壁菌门 Firmicutes、芽单胞菌门 Gemmatimonadetes、变形菌门 Proteobacteria 和疣微菌门 Verrucomicrobia 等 41 个门。5 个地理种群样本共生菌的优势菌门均为变形菌门。但不同样本共生菌的门的类别及相对丰度有所不同,如排名前 5 位的门中,赤壁样本依次为变形菌门(61.7%)(括号中的数值为相对丰度,下同)、厚壁菌门(11.3%)、放线菌门(7.4%)、拟杆菌门(5.5%)和酸杆菌门(2.4%);大悟样本依次为变形菌门(71.8%)、放线菌门(6.6%)、拟杆菌门(5.1%)、厚壁菌门(4.6%)和蓝细菌门(3.2%);武汉样本依次为变形菌门(84.6%)、蓝细菌门(8.3%)、放线菌门(1.9%)、拟杆菌门(1.1%)和厚壁菌门(1.1%);咸安样本依次为变形菌门(97.1%)、厚壁菌门(0.9%)、放线菌门(0.4%)、拟杆菌门(0.3%)和酸杆菌门(0.2%);英山样本依次为变形菌门(60.6%)、厚壁菌门(14.1%)、拟杆菌门(6.0%)、放线菌门(5.4%)和酸杆菌门(3.1%)。

在纲分类水平上(表 4),共注释了 γ -变形菌纲 Gammaproteobacteria、 α -变形菌纲 Alphaproteobacteria、梭菌纲 Clostridia、 β -变形菌纲 Betaproteobacteria、放线菌纲 Actinobacteria、芽胞杆菌纲 Bacilli、拟杆菌纲 Bacteroidia、 δ -变形菌纲 Deltaproteobacteria、

黄杆菌纲 Flavobacteriia、芽单胞菌纲 Gemmatimonadetes、嗜热油菌纲 Thermoleophilia 等 116 个纲。在相对丰度排名前 5 位的菌纲中,5 个样本共有的为 γ -变形菌纲和 α -变形菌纲,属于优势菌,二者之和在 5 个样本中的占比分别为,赤壁 53.2%,大悟 57.4%,武汉 83.3%,咸安 96.8%,英山 53.9%。

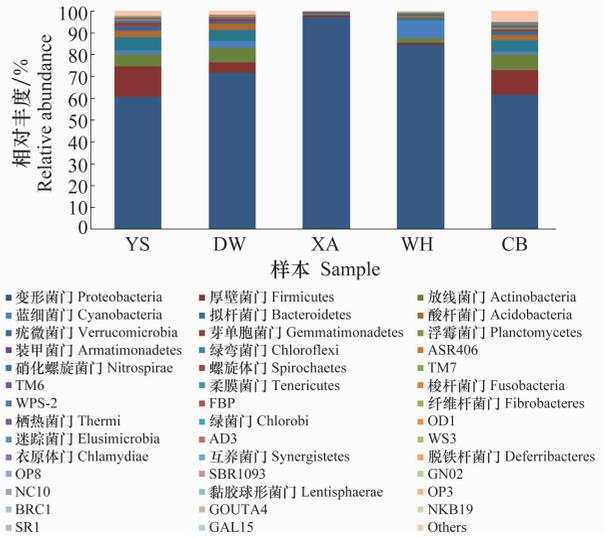


图 1 小贾小绿叶蝉成虫共生菌在门水平的物种比例
Fig. 1 The proportions of the bacteria in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii* at phylum level

表 4 小贾小绿叶蝉成虫共生细菌在纲水平相对丰度排名前 10 的菌群

Table 4 Top 10 abundances of bacterial communities at class level in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii*

| 纲(占比) Class (Proportion) | | | | |
|--|--|--|--|--|
| CB | DW | WH | XA | YS |
| γ -变形菌纲(37.8%) Gammaproteobacteria | γ -变形菌纲(43.4%) Gammaproteobacteria | γ -变形菌纲(79.4%) Gammaproteobacteria | α -变形菌纲(93.4%) Alphaproteobacteria | γ -变形菌纲(30.2%) Gammaproteobacteria |
| α -变形菌纲(15.4%) Alphaproteobacteria | α -变形菌纲(14.0%) Alphaproteobacteria | α -变形菌纲(3.9%) Alphaproteobacteria | γ -变形菌纲(3.4%) Gammaproteobacteria | α -变形菌纲(23.7%) Alphaproteobacteria |
| 梭菌纲(9.0%) Clostridia | β -变形菌纲(12.2%) Betaproteobacteria | 放线菌纲(1.4%) Actinobacteria | 梭菌纲(0.6%) Clostridia | 梭菌纲(8.6%) Clostridia |
| β -变形菌纲(6.2%) Betaproteobacteria | 放线菌纲(4.7%) Actinobacteria | β -变形菌纲(0.8%) Betaproteobacteria | 放线菌纲(0.2%) Actinobacteria | 芽胞杆菌纲(5.4%) Bacilli |
| 放线菌纲(5.6%) Actinobacteria | 拟杆菌纲(2.7%) Bacteroidia | 梭菌纲(0.7%) Clostridia | 芽胞杆菌纲(0.2%) Bacilli | 拟杆菌纲(3.3%) Bacteroidia |
| 芽胞杆菌纲(2.1%) Bacilli | 芽胞杆菌纲(2.6%) Bacilli | 斯巴达杆菌纲(0.5%) Spartobacteria | 拟杆菌纲(0.2%) Bacteroidia | 放线菌纲(2.9%) Actinobacteria |
| δ -变形菌纲(1.9%) Deltaproteobacteria | 梭菌纲(2.0%) Clostridia | 拟杆菌纲(0.5%) Bacteroidia | β -变形菌纲(0.2%) Betaproteobacteria | δ -变形菌纲(2.8%) Deltaproteobacteria |
| 拟杆菌纲(1.8%) Bacteroidia | δ -变形菌纲(1.8%) Deltaproteobacteria | δ -变形菌纲(0.5%) Deltaproteobacteria | δ -变形菌纲(0.1%) Deltaproteobacteria | β -变形菌纲(2.7%) Betaproteobacteria |
| 腐生螺旋菌纲(1.2%) Saprosirae | 嗜热油菌纲(1.1%) Thermoleophilia | 芽胞杆菌纲(0.3%) Bacilli | 嗜热油菌纲(0.1%) Thermoleophilia | 斯巴达杆菌纲(1.7%) Spartobacteria |
| 嗜热油菌纲(1.2%) Thermoleophilia | 酸杆菌纲(1.0%) Acidobacteria | Chloracidobacteria (0.3%) | 斯巴达杆菌纲(0.1%) Spartobacteria | 黄杆菌纲(1.2%) Flavobacteriia |

在目分类水平上(表 5),5 个样本共注释到了 197 个目,其中赤壁样本的共生细菌主要有海洋螺菌目(24.0%)、梭菌目(9.0%)、放线菌目(5.5%)、根瘤菌目(5.4%)和鞘脂单胞菌目(4.5%);大悟样本的共生细菌主要有海洋螺菌目(27.2%)、交替单胞菌目(7.4%)、普罗卡杆菌目(6.0%)、放线菌目(4.7%)、伯克氏菌目(4.6%);武汉样本的共生细菌主要有肠杆菌目(69.9%)、假单胞菌目(3.9%)、气单胞菌目

(2.8%)、放线菌目(1.4%);咸安样本的共生细菌主要有立克次氏体目(92.7%)、海洋螺菌目(1.6%)、梭菌目(0.6%)、交替单胞菌目(0.5%)、假单胞菌目(0.5%);英山样本的共生细菌主要有海洋螺菌目(11.1%)、梭菌目(8.6%)、立克次氏体目(7.6%)、红细菌目(7.0%)、交替单胞菌目(5.3%)。在相对丰度排名前 10 位的优势菌目中,5 个样本共有的为海洋螺菌目、放线菌目、根瘤菌目和鞘脂单胞菌目(表 5)。

表 5 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌在目水平相对丰度排名前 10 的菌群

Table 5 Top 10 abundances of bacterial communities at order level in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii*

| 目(占比) Order (Proportion) | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| CB | DW | WH | XA | YS |
| 海洋螺菌目(24.0%) Oceanospirillales | 海洋螺菌目(27.2%) Oceanospirillales | 肠杆菌目(69.9%) Enterobacteriales | 立克次氏体目(92.7%) Rickettsiales | 海洋螺菌目(11.1%) Oceanospirillales |
| 梭菌目(9.0%) Clostridiales | 交替单胞菌目(7.4%) Alteromonadales | 假单胞菌目(3.9%) Pseudomonadales | 海洋螺菌目(1.6%) Oceanospirillales | 梭菌目(8.6%) Clostridiales |
| 放线菌目(5.5%) Actinomycetales | 普罗卡杆菌目(6.0%) Procabacteriales | 气单胞菌目(2.8%) Aeromonadales | 梭菌目(0.6%) Clostridiales | 立克次氏体目(7.6%) Rickettsiales |
| 根瘤菌目(5.4%) Rhizobiales | 放线菌目(4.7%) Actinomycetales | 放线菌目(1.4%) Actinomycetales | 交替单胞菌目(0.5%) Alteromonadales | 红细菌目(7.0%) Rhodobacterales |
| 鞘脂单胞菌目(4.5%) Sphingomonadales | 伯克氏菌目(4.6%) Burkholderiales | 鞘脂单胞菌目(1.1%) Sphingomonadales | 假单胞菌目(0.5%) Pseudomonadales | 交替单胞菌目(5.3%) Alteromonadales |
| 交替单胞菌目(3.8%) Alteromonadales | 根瘤菌目(4.1%) Rhizobiales | 立克次氏体目(1.1%) Rickettsiales | 肠杆菌目(0.4%) Enterobacteriales | 乳杆菌目(4.1%) Lactobacillales |
| 假单胞菌目(3.6%) Pseudomonadales | 鞘脂单胞菌目(4.0%) Sphingomonadales | 海洋螺菌目(1.0%) Oceanospirillales | 气单胞菌目(0.3%) Aeromonadales | 拟杆菌目(3.3%) Bacteroidales |
| 伯克氏菌目(3.0%) Burkholderiales | 黄单胞菌目(3.1%) Xanthomonadales | 根瘤菌目(1.0%) Rhizobiales | 根瘤菌目(0.3%) Rhizobiales | 鞘脂单胞菌目(3.1%) Sphingomonadales |
| 普罗卡杆菌目(2.4%) Procabacteriales | 拟杆菌目(2.7%) Bacteroidales | 黄单胞菌目(0.9%) Xanthomonadales | 放线菌目(0.2%) Actinomycetales | 根瘤菌目(2.7%) Rhizobiales |
| 黄单胞菌目(2.0%) Xanthomonadales | 立克次氏体目(2.4%) Rickettsiales | 梭菌目(0.7%) Clostridiales | 鞘脂单胞菌目(0.2%) Sphingomonadales | 放线菌目(2.4%) Actinomycetales |

在科分类水平上(表 6),共注释到了 272 个科,主要有盐单胞菌科、鞘脂单胞菌科、肠杆菌科、希瓦氏菌科、黄单胞菌科、立克次氏体科、毛螺菌科、假单胞菌科、瘤胃菌科、普罗卡杆菌科、丛毛单胞菌科等。在相对丰度排名前 10 位的科中,5 个样本共有的为盐单胞菌科、鞘脂单胞菌科、希瓦氏菌科、肠杆菌科、黄单胞菌科。但不同样本的共生菌在科的类别和丰度上有所不同,如相对丰度排名前 5 位的科中,赤壁样本中丰度最高的为盐单胞菌科(23.8%),随后依次为鞘脂单胞菌科(4.1%)、毛螺菌科(4.0%)、希瓦氏菌科(3.2%)和假单胞菌科(2.9%);大悟样本中丰度最高的为盐单胞菌科(27.1%),随后依次为希瓦氏菌科(7.0%)、普罗卡杆菌科(6.0%)、鞘脂单胞菌科(3.7%)和丛毛单胞菌科(3.1%);武汉样本中丰度最高的为肠杆菌科(69.8%),随后依次为假单胞菌科(3.5%)、气单胞菌科(2.6%)、鞘脂单胞菌科(1.1%)

和盐单胞菌科(1.0%);英山样本中丰度由高到低依次为盐单胞菌科(10.8%)、红细菌科(6.9%)、海洋细菌科(6.9%)、毛螺菌科(4.0%)和希瓦氏菌科(3.2%);而咸安样本中立克次氏体科相对丰度最高(92.6%),随后依次为盐单胞菌科(1.6%)、希瓦氏菌科(0.5%)、假单胞菌科(0.4%)和肠杆菌科(0.4%)。

在属分类水平上(表 7),共注释到了 372 个属。在相对丰度排名前 10 的菌属中,5 个样本共有的为盐单胞菌属、希瓦氏菌属、沃尔巴克氏体属。不同样本的优势菌属有所不同,赤壁、大悟和英山样本的优势属为盐单胞菌属(23.8%、27.1%和 8.8%),武汉样本的优势属为泛菌属(61.2%),咸安样本的优势属则为沃尔巴克氏体属(92.6%)。初步分析认为,5 个地理种群小贯小绿叶蝉采样时间都在 6 月份,寄主植物主要是‘福鼎大白’茶树品种,造成共生菌群落结构差异的原因可能与环境因素有关。

表 6 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌在科水平相对丰度排名前 10 的菌群

Table 6 Top 10 abundances of bacterial communities at family level in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii*

| 科(占比) Family (Proportion) | | | | |
|--|--|--|--|--|
| CB | DW | WH | XA | YS |
| 盐单胞菌科(23.8%) <i>Halomonadaceae</i> | 盐单胞菌科(27.1%) <i>Halomonadaceae</i> | 肠杆菌科(69.8%) <i>Enterobacteriaceae</i> | 立克次氏体科(92.6%) <i>Rickettsiaceae</i> | 盐单胞菌科(10.8%) <i>Halomonadaceae</i> |
| 鞘脂单胞菌科(4.1%) <i>Sphingomonadaceae</i> | 希瓦氏菌科(7.0%) <i>Shewanellaceae</i> | 假单胞菌科(3.5%) <i>Pseudomonadaceae</i> | 盐单胞菌科(1.6%) <i>Halomonadaceae</i> | 红细菌科(6.9%) <i>Rhodobacteraceae</i> |
| 毛螺菌科(4.0%) <i>Lachnospiraceae</i> | 普罗卡杆菌科(6.0%) <i>Procabacteriaceae</i> | 气单胞菌科(2.6%) <i>Aeromonadaceae</i> | 希瓦氏菌科(0.5%) <i>Shewanellaceae</i> | 海洋细菌科(6.9%) <i>Pelagibacteraceae</i> |
| 希瓦氏菌科(3.2%) <i>Shewanellaceae</i> | 鞘脂单胞菌科(3.7%) <i>Sphingomonadaceae</i> | 鞘脂单胞菌科(1.1%) <i>Sphingomonadaceae</i> | 假单胞菌科(0.4%) <i>Pseudomonadaceae</i> | 毛螺菌科(4.0%) <i>Lachnospiraceae</i> |
| 假单胞菌科(2.9%) <i>Pseudomonadaceae</i> | 丛毛单胞菌科(3.1%) <i>Comamonadaceae</i> | 盐单胞菌科(1.0%) <i>Halomonadaceae</i> | 肠杆菌科(0.4%) <i>Enterobacteriaceae</i> | 希瓦氏菌科(3.2%) <i>Shewanellaceae</i> |
| 瘤胃菌科(2.4%) <i>Ruminococcaceae</i> | 肠杆菌科(2.3%) <i>Enterobacteriaceae</i> | 黄单胞菌科(0.9%) <i>Xanthomonadaceae</i> | 鞘脂单胞菌科(0.2%) <i>Sphingomonadaceae</i> | 鞘脂单胞菌科(2.6%) <i>Sphingomonadaceae</i> |
| 普罗卡杆菌科(2.4%) <i>Procabacteriaceae</i> | 黄单胞菌科(2.3%) <i>Xanthomonadaceae</i> | 立克次氏体科(0.7%) <i>Rickettsiaceae</i> | 琥珀酸弧菌科(0.2%) <i>Succinivibrionaceae</i> | 肠杆菌科(2.3%) <i>Enterobacteriaceae</i> |
| 肠杆菌科(2.0%) <i>Enterobacteriaceae</i> | 假单胞菌科(1.2%) <i>Pseudomonadaceae</i> | Chthoniobacteraceae (0.5%) | 毛螺菌科(0.2%) <i>Lachnospiraceae</i> | 乳杆菌科(2.3%) <i>Lactobacillaceae</i> |
| 丛毛单胞菌科(2.0%) <i>Comamonadaceae</i> | 草酸杆菌科(1.0%) <i>Oxalobacteraceae</i> | 希瓦氏菌科(0.4%) <i>Shewanellaceae</i> | 瘤胃菌科(0.2%) <i>Ruminococcaceae</i> | 黄单胞菌科(1.9%) <i>Xanthomonadaceae</i> |
| 黄单胞菌科(1.6%) <i>Xanthomonadaceae</i> | 红螺菌科(1.0%) <i>Rhodospirillaceae</i> | 丛毛单胞菌科(0.4%) <i>Comamonadaceae</i> | 黄单胞菌科(0.1%) <i>Xanthomonadaceae</i> | 瘤胃菌科(1.8%) <i>Ruminococcaceae</i> |

表 7 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌在属水平相对丰度排名前 10 的菌群

Table 7 Top 10 abundances of bacterial communities at genus level in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii*

| 属(占比) Genus (Proportion) | | | | |
|--|--|-------------------------------------|--|------------------------------------|
| CB | DW | WH | XA | YS |
| 盐单胞菌属(23.8%) <i>Halomonas</i> | 盐单胞菌属(27.1%) <i>Halomonas</i> | 泛菌属(61.2%) <i>Pantoea</i> | 沃尔巴克氏体属(92.6%) <i>Wolbachia</i> | 盐单胞菌属(8.8%) <i>Halomonas</i> |
| 希瓦氏菌属(3.2%) <i>Shewanella</i> | 希瓦氏菌属(7.0%) <i>Shewanella</i> | 假单胞菌属(3.4%) <i>Pseudomonas</i> | 盐单胞菌属(1.6%) <i>Halomonas</i> | 希瓦氏菌属(3.1%) <i>Shewanella</i> |
| 假单胞菌属(2.8%) <i>Pseudomonas</i> | 鞘脂单胞菌属(1.4%) <i>Sphingomonas</i> | 埃希氏菌属(2.8%) <i>Escherichia</i> | 希瓦氏菌属(0.5%) <i>Shewanella</i> | 乳杆菌属(1.9%) <i>Lactobacillus</i> |
| 鞘脂单胞菌属(2.5%) <i>Sphingomonas</i> | 假单胞菌属(1.0%) <i>Pseudomonas</i> | 气单胞菌属(2.6%) <i>Aeromonas</i> | 假单胞菌属(0.4%) <i>Pseudomonas</i> | <i>Candidatus Portiera</i> (1.6%) |
| 瘤胃球菌属(1.7%) <i>Ruminococcus</i> | 甲基杆菌属(0.8%) <i>Methylobacterium</i> | 盐单胞菌属(1.0%) <i>Halomonas</i> | 泛菌属(0.2%) <i>Pantoea</i> | DA101(1.5%) |
| 梭菌属(1.5%) <i>Clostridium</i> | 沃尔巴克氏体属(0.8%) <i>Wolbachia</i> | 沃尔巴克氏体属(0.7%) <i>Wolbachia</i> | 瘤胃杆菌属(0.1%) <i>Ruminobacter</i> | 梭菌属(1.5%) <i>Clostridium</i> |
| 颤螺旋菌属(1.2%) <i>Oscillospira</i> | 不动杆菌属(0.6%) <i>Acinetobacter</i> | DA101(0.5%) | 鞘脂单胞菌属(0.1%) <i>Sphingomonas</i> | 瘤胃球菌属(1.4%) <i>Ruminococcus</i> |
| 甲基杆菌属(1.2%) <i>Methylobacterium</i> | 泛菌属(0.5%) <i>Pantoea</i> | 鞘脂单胞菌属(0.4%) <i>Sphingomonas</i> | 甲基杆菌属(0.1%) <i>Methylobacterium</i> | 颤螺旋菌属(1.0%) <i>Oscillospira</i> |
| 埃希氏菌属(0.8%) <i>Escherichia</i> | 红游动菌属(0.5%) <i>Rhodoplanes</i> | 不动杆菌属(0.4%) <i>Acinetobacter</i> | DA101(0.1%) | 沃尔巴克氏体属(1.0%) <i>Wolbachia</i> |
| 沃尔巴克氏体属(0.6%) <i>Wolbachia</i> | 链霉菌属(0.5%) <i>Streptomyces</i> | 希瓦氏菌属(0.4%) <i>Shewanella</i> | 埃希氏菌属(0.1%) <i>Escherichia</i> | HTCC2207(0.9%) |

2.3 小贯小绿叶蝉成虫内共生细菌多样性分析

用 Alpha Diversity 对每个样本的多样性进行分析(表 8), Chao 指数和 Ace 指数反映样品中菌群的丰富度, Shannon 指数反映菌群的多样性, Simpson 指数

反映菌群中优势种的集中程度。从丰富度指数看, 赤壁样本最大, Chao 指数、Ace 指数分别为 2 841. 89 和 2 914. 90; 从多样性指数看, 英山样本最大, Shannon 指数 8. 63, 其次为赤壁样本, Shannon 指数 7. 93; 从优

势度指数看,英山样本最大,Simpson 指数为 0.99,咸安样本的 Simpson 指数最小。综合分析看,英山样本和赤壁样本相比其他样本,具有较高的多样性指数、丰富度指数和优势度指数,说明这两个样本中的细菌种类更丰富多样。

表 8 小贯小绿叶蝉成虫共生细菌的多样性指数

Table 8 Alpha diversity of bacteria in adults of *Empoasca* (*Matsumurasca*) *onukii*

| 样本 Sample | 多样性指数 Diversity index | | | |
|--------------|-----------------------|----------|---------|---------|
| | Chao | Ace | Shannon | Simpson |
| CB | 2 841.89 | 2 914.90 | 7.93 | 0.95 |
| DW | 2 273.69 | 2 417.11 | 7.28 | 0.93 |
| WH | 1 065.55 | 1 130.76 | 3.25 | 0.61 |
| XA | 1 132.08 | 1 286.86 | 1.07 | 0.18 |
| YS | 2 394.77 | 2 545.08 | 8.63 | 0.99 |

3 讨论

本研究采用 16S rDNA V4 高变区的高通量测序技术,对 5 个地理种群茶园小贯小绿叶蝉体内的细菌多样性及群落结构组成进行了研究。共注释鉴定获得 41 个门,116 个纲,197 个目,272 个科,372 个属,105 个种。

在所鉴定获得的 41 个门中,变形菌门的细菌是 5 个样本共有的最主要的优势菌(60.6%~97.1%),这与许多昆虫肠道中的优势菌相同。如直翅目的沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*,半翅目的豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*,鳞翅目的茶尺蠖 *Ectropis obliqua*、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*,鞘翅目的天牛 *Saperda vestita* 以及双翅目的地中海实蝇 *Bactrocera minax* 和泽兰实蝇 *Procecidochares utilis* 肠道优势菌均为变形菌门细菌^[10-16]。但是,5 个样本优势菌的组成有所不同,其中咸安样本的优势菌相对简单,仅为变形菌门(97.1%)。而另外 4 个样本相对复杂,除了变形菌门以外,赤壁样本和英山样本的优势菌还有厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门和酸杆菌门;大悟样本和武汉样本的优势菌还包括放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和蓝细菌门。

在属分类阶元,相对丰度排名前 10 的菌属中,盐单胞菌属(1.0%~27.1%)、希瓦氏菌属(0.5%~7.0%)和沃尔巴克氏体属(0.6%~92.6%)的细菌是 5 个样本共有的优势菌。不同样本的优势菌属差异明显,赤壁、大悟和英山样本最主要的优势属均为盐单胞菌属(23.8%、27.1%和 8.8%);武汉样本的

优势属为泛菌属(61.2%);而咸安样本的优势属为沃尔巴克氏体属,占比达 92.6%。盐单胞菌是一类耐盐细菌,在盐湖、盐场、盐碱地、海冰和海洋极端环境中常有分布。最近研究发现,在核桃举肢蛾 *Atrijuglans hetaohei* 和桃蛀螟 *Dichocrocis punctiferalis* 幼虫肠道中都有盐单胞菌属存在^[17],但其生物学功能及对宿主昆虫的作用尚不清楚。5 个地理种群小贯小绿叶蝉共有的优势菌沃尔巴克氏体菌 *Wolbachia*,是一类广泛分布于节肢动物体内的共生菌,它不仅调节宿主的生殖活动,包括诱导细胞质不亲和、孤雌生殖和遗传上雌性雄性化等,还能改变宿主种群适合度,增强宿主抗逆性,如感染 *Wolbachia* 增加了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 对 RNA 病毒的抗性^[18]。

本研究首次获得了不同茶园小贯小绿叶蝉地理种群成虫共生菌的相关信息,初步明确了不同地理种群共生菌的群落结构和优势菌群,为进一步研究共生菌与小贯小绿叶蝉之间的关系提供了基础信息。但这些优势菌群对宿主的生存、繁殖等生物学特性有哪些影响,还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 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[J]. 昆虫学报, 2001, 44(2): 197-204.
- [2] SHIGENOBU S, WILSON A C C. Genomic revelations of amutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(8): 1297-1309.
- [3] SCARBOROUGH C L, FERRARI J, GODFRAY H C J. Aphid protected from pathogen by endosymbiont [J]. Science, 2005, 310(5755): 1781.
- [4] VORBURGER C. The evolutionary ecology of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids [J]. Insect Science, 2014, 21(3): 251-264.
- [5] HIMLER A G, ADACHI-HAGIMORI T, BERGEN J E, et al. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias [J]. Science, 2011, 332(6026): 254-256.
- [6] 单红伟,刘树生,刘银泉. 昆虫共同体对不利温度的响应[J]. 植物保护学报, 2016, 43(1): 24-31.
- [7] TSUCHIDA T, KOGA R, MATSUMOTO S, et al. Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect [J]. Biology Letters, 2011, 7(2): 245-248.
- [8] 陈宗懋. 茶园病虫害区系的构成和演替[J]. 中国茶叶, 1979(1): 6-8.

其中线粒体细胞色素氧化酶亚基I(mtDNA COI) 基因由于其分布的普遍性以及序列和结构的相对保守性而被广泛应用于昆虫不同分类阶元的分子系统学及进化生物学研究, DNA 条形码技术可以用于物种及亲缘关系的鉴定^[14-16]。当前基于昆虫形态将 4 种夜蛾分为 3 个属,但仍争议不断^[7-9]。因此,笔者认为在形态分类的基础上,应从分子水平上进一步研究,以准确分类这 4 种夜蛾,为确定其亲缘关系及系统发育提供重要理论依据。

参考文献

[1] YOSHIMATSU S, KUSIGEMATI K, GYOUTOKU N, et al. Some lepidopterous pests of bamboo and bamboo grass shoots in Japan [J]. Japanese Journal of Entomology, 2005, 8 (3): 91-97.

[2] 舒金平, 滕莹, 张爱良, 等. 竹笋基夜蛾的求偶及交配行为[J]. 应用生态学报, 2012, 23(12): 3421-3428.

[3] 叶碧欢, 张亚波, 滕莹, 等. 笋秀夜蛾的求偶及交配行为[J]. 生态学杂志, 2014, 33(8): 2136-2141.

[4] 徐天森. 中国竹子主要害虫[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 45-52.

[5] 陈贻金. 笋秀夜蛾的研究[J]. 林业科学, 1982(2): 41-49.

[6] 张琴, 莫有迪, 张亚波, 等. 基于线粒体 COI 基因的竹笋夜蛾亲缘关系[J]. 林业科学, 2017, 53(4): 96-104.

[7] 朱弘复, 陈一心. 中国经济昆虫志. 第 6 册. 鳞翅目夜蛾科(二)

(上接 23 页)

[9] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.

[10] DILLON R J, WEBSTER G, WEIGHTMAN A J, et al. Diversity of gut microbiota increases with aging and starvation in the desert locust [J]. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 2010, 97(1): 69-77.

[11] GRENIER A M, NARDON C, RAHBE Y. Observations on the microorganisms occurring in the gut of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1994, 70(1): 91-96.

[12] 靳亮, 王金昌, 王洪秀, 等. 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术分析茶尺蠖幼虫肠道细菌种群结构及多样性[J]. 江西科学, 2013, 31(6): 759-763.

[13] 刘小改, 杨亚军, 廖秋菊, 等. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析[J]. 昆虫学报, 2016, 59(9): 965-976.

[14] SCHLOSS P D, DELALIBERA I, HANDELSMAN J O, et al.

[M]. 北京: 科学出版社, 1964: 1-206.

[8] 陈一心. 中国经济昆虫志. 第 32 册. 鳞翅目夜蛾科(四)[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 1-167.

[9] 陈一心. 鳞翅目: 夜蛾科[M]// 湖南林业厅. 湖南森林昆虫图鉴. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1992: 947-1040.

[10] 席客, 郑建伟, 许建中. 江苏常见的 3 种蛀笋夜蛾比较及防治[J]. 江苏林业科技, 2001, 28(1): 37-45.

[11] 梁光红, 林毓银. 黄甜竹基夜蛾生物学特性及其防治[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003(1): 36-40.

[12] 邵识烦, 陈拓, 黄焕华, 等. 茶秆竹竹笋夜蛾形态特征及生物学习性研究[J]. 广东林业科技, 2002(3): 33-36.

[13] 李后魂. 小蛾类复杂雄性外生殖器的制片方法[J]. 应用昆虫学报, 1996(2): 115-116.

[14] TAUTZ D, ARCTANDER P, MINELLI A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18: 70-74.

[15] HEBERT P D N, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(41): 14812-14817.

[16] LI Qingqing, LI Diyan, YE Hui, et al. Using COI gene sequence to barcode two morphologically alike species: the cotton bollworm and the oriental tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38 (8): 5107-5113.

(责任编辑: 田 喆)

Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae) [J]. Environmental Entomology, 2006, 35(3): 625-629.

[15] BEHAR A, YUVAL B, JURKEVITCH E. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity [J]. Journal of Insect Physiology, 2008, 54(9): 1377-1383.

[16] 张某, 杨璞, 宋家颖, 等. 基于 16SrDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析[J]. 昆虫学报, 2016, 59(2): 200-208.

[17] 王娇莉. 核桃举肢蛾 *Atrijuglans hetaohei* 和桃蛀螟 *Dichocrocis punctiferalis* 幼虫肠道细菌组成及多样性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.

[18] GLASER R L, MEOLA M A. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection [J]. PLoS ONE, 2010, 5(8): e11977.

(责任编辑: 田 喆)