



灰飞虱核心共生菌的鉴定

孙红波^{1,2}, 姜军³, 陈丽莹⁴, 宋泽润¹, 刘达¹, 杨杰^{1,2}, 霍岩¹, 方荣祥^{1,2}, 张莉莉^{1,2*}

1 中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 开封市祥符区农业科学研究所, 河南 开封 475100

4 浙江大学农业与生物技术学院, 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310058

孙红波, 姜军, 陈丽莹, 宋泽润, 刘达, 杨杰, 霍岩, 方荣祥, 张莉莉. 灰飞虱核心共生菌的鉴定. 微生物学报, 2022, 62(1): 160–175.

Sun Hongbo, Jiang Jun, Chen Liying, Song Zerun, Liu Da, Yang Jie, Huo Yan, Fang Rongxiang, Zhang Lili. Identification of the core symbiotic bacteria of *Laodelphax striatellus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 160–175.

摘要: 媒介昆虫的核心共生菌能被用作基因工程菌发挥抗病毒功能。灰飞虱是一种重要的农业害虫, 其传播的水稻条纹病毒造成水稻的大面积减产甚至绝收。【目的】本研究对不同稻区及温室饲养的灰飞虱进行菌群组成分析并初步鉴定灰飞虱的核心共生菌。【方法】通过 16S rDNA 介导的二代测序技术, 分析了 2018–2020 年间采集自云南昆明、河南开封、河南范县稻区以及温室的灰飞虱的菌群组成。【结果】所有 37 个灰飞虱测序样本均携带细胞内和细胞外共生菌, 细胞内生菌沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)为灰飞虱最稳定的核心共生菌, 在所有样本中存在, 平均相对丰度 51.96%, 其代表性序列 OTU45 占据该属 85 条 OTU 序列总数的 96.55%。除 *Wolbachia* 之外, 其他常见核心菌均为胞外菌, 其中 4 种平均相对丰度最高的常见核心菌分别为不动杆菌属、泛菌属、肠杆菌属和假单胞菌属, 在 10 种常见核心菌中平均占比 0.25%–2.97%。不同稻区的灰飞虱各有优势菌, 昆明为立克次体属, 范县为杀雄菌属和 *Cardinium*, 开封为醋杆菌属、泛菌属和 *Sulcia*。这些田间的优势菌包括多种细胞内生菌。稻田灰飞虱在温室进行 24 h 蔗糖饲喂后, *Wolbachia* 相对丰度显著升高, 菌群结构与温室灰飞虱更加接近; 继代培养后, 除 *Wolbachia* 之外的细胞内生菌丢失或以低丰度存在于部分样本中。【结论】本研究初步阐明灰飞虱的菌群组成并鉴定了常见核心菌及 3 个中国稻区的优势共生菌, 为通过核心菌进行抗病毒的研究提供了可选择的共生工程菌靶标。

关键词: 核心共生菌; 灰飞虱; 温室; 稻田

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1200503)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1200503)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64806916; Fax: +86-10-64806543; E-mail: zhangll@im.ac.cn

Received: 16 March 2021; Revised: 24 May 2021; Published online: 3 June 2021

Identification of the core symbiotic bacteria of *Laodelphax striatellus*

SUN Hongbo^{1,2}, JIANG Jun³, CHEN Liying⁴, SONG Zerun¹, LIU Da¹, YANG Jie^{1,2}, HUO Yan¹, FANG Rongxiang^{1,2}, ZHANG Lili^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Institute of Agricultural Science in Xiangfu District, Kaifeng, Kaifeng 475100, Henan, China

4 State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

Abstract: The core symbiotic bacteria of insect vectors have the potential to be used as genetically engineered bacteria to control arboviruses. *Laodelphax striatellus* is an important agricultural pest and also the transmission vector of rice stripe virus, the causative agent of rice stripe disease that occurred with dramatic yield reduction or even no harvest. **[Objective]** In this study, the bacterial communities of *L. striatellus* were sequenced through 16S rDNA next-generation sequencing methods, and the core symbiotic bacteria were identified. **[Methods]** From 2018 to 2020, *L. striatellus* have been collected from the rice fields in Kunming of Yunnan Province, and in Kaifeng and Fanxian of Henan province, as well as in the greenhouse, in which microbiomes were sequenced and analyzed. **[Results]** All 37 *L. striatellus* sequencing samples carry both intracellular and extracellular bacteria. In the genus level, the intracellular bacteria *Wolbachia* exhibited the highest average relative abundance of 51.96%. Its representative OTU (OTU45) accounts for 96.55% of the total number of 85 OTUs and exists in all sequenced insect samples. Except for *Wolbachia*, all the other common core bacteria were extracellular, in which the four core genera with high abundances were *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Enterobacter* and *Pseudomonas*, with average relative abundances of 0.25%–2.97% in all ten common core genera. There are dominant bacteria in insect samples from different rice fields. High-abundant *Rickettsia* were found in Kunming samples, both *Arsonophonus* and *Cardinium* were identified in Fanxian samples, and *Acetobacter*, *Sulcia* and *Pantoea* were found in Kaifeng samples. These rice-field dominant bacteria include a variety of intracellular bacteria. When the rice-field insects were fed with sucrose for 24 h in the greenhouse, the relative abundance of *Wolbachia* increased significantly and the microbial composition became closer to that of the greenhouse. Within the offsprings of these rice-field insects, the intracellular bacteria, except for *Wolbachia*, lost or existed in a few samples with low level. **[Conclusion]** This study preliminarily clarified the symbiotic bacterial composition of *L. striatellus*, identified common core bacteria and identified dominant symbiotic bacteria in the three Chinese rice areas, providing engineered bacteria for antiviral research through insect vector's core bacteria.

Keywords: core symbiotic bacteria; *Laodelphax striatellus*; greenhouse; rice field

媒介昆虫传播多种病原微生物,引起人和动物的疾病以及农作物病害。通过控制病原在虫媒体内的传播过程,能够阻止病原由虫媒向动植物宿主的传播,从而达到抗病的目的。以虫媒体内存在的核心共生菌为载体,表达抗病功能基因,对病原侵染进行干预,是一种有效的新型抗病策略。如按蚊的核心共生菌沙雷氏菌属新菌株 *Serratia bacterium* strain (AS1),兼具垂直和水平传播能力、易于从环境中获得、在按蚊群体中传播、并能在蚊群中代代相传。对 AS1 菌株进行改造,使之高效分泌表达抗疟效应蛋白,达到了在按蚊肠道内特异性杀灭疟原虫的目标,从而减少了携带疟原虫的蚊子,阻止了疟原虫向人类宿主的传播^[1]。沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*)细菌是一类在昆虫中普遍存在的细胞内共生菌,可通过细胞质不相容性使细菌在昆虫种群内传播^[2]。将抗登革热病毒的 *Wolbachia* 感染埃及伊蚊,可以阻断 II 型登革热病毒在埃及伊蚊中的传播,为控制登革热提供了虫媒共生菌方案^[3]。灰飞虱和褐飞虱是水稻害虫,也是水稻病毒的传播媒介。将灰飞虱 *Wolbachia* 菌株 w Stri 导入褐飞虱,有效抑制了褐飞虱对水稻齿叶矮缩病毒的传播^[4]。发掘具有特定定殖特性的虫媒核心共生菌,是通过虫媒进行病害防控的重要内容。

鉴定宿主核心微生物组的主要目的是定义一组微生物,为所有或者绝大多数宿主的微生物组共有,且对宿主的生物学功能非常重要。但是,越来越多的研究表明,很少能有一组微生物被所有宿主共享,且共享的微生物也并不总是和宿主的生物学功能相关联。因此,核心微生物组越来越多地通过多种限制条件来进行区分,可分为:常见核心菌(common core)、时空核心菌(temporal core)、生态核心菌(ecological core)、功能核心菌(functional core)

和宿主适应性核心菌(host adapted core)。常见核心菌以较高频率出现在宿主种群内;时空核心菌在特定的时间或/和地域或宿主的特定发育阶段出现,具有可预测性;生态核心菌对于塑造宿主菌群结构多样性和稳定性发挥作用;功能核心菌与宿主适应性核心菌均参与宿主的生物学功能,区别在于功能核心菌的功能可被其他微生物取代,而宿主适应性核心菌多为专性或近似于专性共生,其对宿主的功能具有不可替代性^[5]。

昆虫细胞内共生菌定殖于昆虫细胞内,可分为初级和次级内共生菌两个类别。其中初级内共生菌为专性共生,常生活在宿主特化的结构组织内,这种组织称为共生菌胞,宿主的正常生命活动离不开初级内共生菌;次级内共生菌为兼性共生,可形成多组织定殖,包括感染肠道、脂肪体和唾液腺等^[6]。次级内共生菌虽然与宿主的共生关系非常紧密且能为宿主提供多种生物学功能,但其从昆虫体内缺失却并不影响昆虫的存活。次级内共生菌在昆虫宿主种群中的数量通过多种方式维持,包括垂直传播、不能垂直传播时高的水平传播率、调控性别比例增加携菌后代、提高宿主生殖力以保持对次级内共生菌的选择优势等^[7-8]。由于次级内共生菌的选择优势和介导种群替换的特点,其成为基因工程菌较为理想的目标。但是,细胞内共生菌不能在无细胞培养基中生长,其遗传操作的条件较为苛刻^[9]。

大多数胞外菌,如肠道菌群,则更容易实现在营养培养基上的生长和较为简便的遗传转化^[10],肠道是虫媒病毒起始侵染的位点,通过调节肠道微生态系统,可以达到改变昆虫与其传播的病原微生物的互作关系,进而影响病原的侵染^[11],因此昆虫宿主体内普遍存在或对宿主有特定功能的核心共生菌,是基因工程菌的

潜在候选菌株。

灰飞虱是半翅目飞虱科昆虫,其传播的水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)引起水稻条纹叶枯病,在中国和亚洲各稻区广泛流行,造成重大的经济损失^[12]。目前对灰飞虱共生菌的研究一方面揭示了灰飞虱菌群的组成结构:灰飞虱细胞内生菌 *Wolbachia* 为丰度最高的共生菌^[13],肠道菌群的组成随地域的不同而有较大变化^[14];另一方面阐明了 *Wolbachia* 侵染在塑造灰飞虱菌群中发挥的作用,以及灰飞虱在受抗生素处理^[15]或宿主植物变化^[16]等因素影响下菌群组成的变化。目前的研究尚没有对灰飞虱的核心菌进行分类鉴定。本研究对温室和 3 个稻区 12 个条件下的 37 个灰飞虱样本进行微生物组测序,分析微生物组的组成方式,鉴定常见核心菌及各稻区的优势共生菌,为灰飞虱相关虫媒病毒的防控提供共生工程菌靶标。

1 材料与方法

1.1 实验设计

为从多因素多水平测定灰飞虱微生物组结构并鉴定核心共生菌,我们设计了以下样本采集方式:

(1) 在 2019 及 2020 年从北京温室(以下简称为 GH)以及中国 3 个稻区,包括云南昆明(以下简称为 YN)、河南开封(以下简称为 KF)和河南范县(以下简称为 FX),分别采集灰飞虱样本,以此代表地域因素对微生物组结构的影响。测序样本数共计 16 个。

(2) 在河南开封稻区,从 2018–2020 年间分别采集灰飞虱样本;以此代表同一地域的时间因素对微生物组结构的影响。测序样本数共计 11 个,其中 2020 年开封 3 样本与上述地域因素下开封地区样本为同一批次样本。

(3) 将开封灰飞虱带回北京温室,以蔗糖溶

液进行人工饲喂,在饲喂后的 0、6 和 24 h 分别采集灰飞虱样本,以此代表改变的食物来源对微生物组结构的影响。测序样本数共计 9 个。将范县灰飞虱带回北京温室,在温室培养的水稻上饲喂并获得子代昆虫,收集子代幼虫样本,以此代表改变的培养环境及继代对微生物组结构的影响。测序样本数共计 4 个。

1.2 灰飞虱样本采集

温室灰飞虱从浙江稻区采集并在北京的温室长期饲养。稻田灰飞虱采集时间为每年的 5 月至 9 月。用捕虫网采集后饥饿 1 h,然后放置在含有 100%无水乙醇的离心管中^[13],干冰低温运输后置于-80 °C 冰箱保存用于 DNA 提取。温室灰飞虱样本采集后置于 1.5 mL 离心管,冰上饥饿处理 1 h 后进行后续实验。10 到 15 头灰飞虱作为一个测序样本。

1.3 灰飞虱全虫基因组 DNA 提取

用 70%酒精清洗灰飞虱 3 次,然后用无菌 ddH₂O 清洗 2 次,于液氮冷冻研磨成粉末状,采用基因组 DNA 提取试剂盒(Blood & Cell Culture DNA Mini Kit, Qiagen, USA)提取基因组 DNA 并溶于无菌 ddH₂O。

1.4 16S rDNA 扩增子样品制备及 Illumina 二代测序

用含有 Barcode 序列的细菌 16S rDNA 特异性引物 V3F (5'-ACGGHCCARACTCCTACGGA A-3')和 V4R (5'-CTACCMGGGTATCTAATCCK G-3')^[17] PCR 扩增 16S rDNA 的 V3–V4 区片段。反应体系: 10×PCR Buffer 3 μL; 10 mmol/L dNTPs 0.6 μL; 50 mmol/L MgCl₂ 0.9 μL; Platinum TM Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) 0.12 μL; 优化引物 V3F 和 V4R 各 0.6 μL; DNA 模板 50 ng; ddH₂O 补足至 30 μL。扩增程序: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。每个 DNA 样品设置 3 个 PCR 重复,每个样品的扩增总产

物为 3 份重复 PCR 产物的总和。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收后通过 Nano Drop One 荧光定量系统定量(Thermo Fisher Scientific 公司)。质检合格后(条带正常,浓度合适),进行相应比例的混合后由上海美吉生物医药科技有限公司通过 Illumina MiSeq PE300 平台进行上机测序。

1.5 数据分析

将不同批次的原始 Fastq 测序文件整合,采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并分别在域(domain)、界(kingdom)、门(phylum)、纲(class)、目(order)、科(family)、属(genus)和种(species)分类学水平统计各样本的群落物种组成,并采用 silvia138_16s 细菌数据库进行分类比对。滤除单个样本中 OTU 序列数小于 5 的 OTU。利用美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com/>)、R 语言和 Excel 等生信分析平台及软件对测序数据进行包括 α 多样性、 β 多样性、物种组成、物种组间差异及 KEGG 功能预测等生物信息学分析。使用 Adobe Illustrator 对原始图片进行文字处理及格式调整。

2 结果与分析

2.1 测序数据统计

本研究对 2019 年和 2020 年温室、2018–2020 年昆明、开封和范县的 37 个灰飞虱样本进行微生物组的 16S rDNA 二代测序及生物信息学分析,共设置 12 个测序条件。原始数据优化后(97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并去除在单个样本中序列条数小于 5 的 OTU),共得到 1 849 623 条有效序列,组成 540 条优化 OTU, 199 个属, 13 个门。

2.2 温室灰飞虱菌群以 *Wolbachia* 为主

温室代表较为简单可控和相对稳定的培养

环境。对 2019 年和 2020 年温室灰飞虱的菌群组成进行分析发现:温室灰飞虱菌群以变形菌门为主,在所有测序样本中的相对丰度为 98.90%–99.76%,平均相对丰度为 99.24%;其次是厚壁菌门,相对丰度为 0.02%–0.7% (图 1A)。在属水平, *Wolbachia* 相对丰度高达 87.62%–97.62%,平均相对丰度为 92.46%。除 *Wolbachia* 之外,其他相对丰度较高的细菌均为细胞外共生。其中不动杆菌属(*Acinetobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)和根瘤菌属(*Rhizobium*)存在于所有的测序样本中,平均相对丰度分别为 0.9%、0.45%、1.47%和 0.31%。肠杆菌(*Enterobacter*)存在于 67%的样本中,平均相对丰度为 2.68% (图 1B)。 β 多样性分析表明:温室灰飞虱菌群组成在不同的测序样本之间差异较大,但与取样年份之间的关联较小(图 1C)。

2.3 不同稻区灰飞虱的菌群组成差异显著

不同地域水稻种植区的灰飞虱菌群组成差别较大,这些差别表现在优势菌组成、 α 多样性和 β 多样性(图 2A–D)。在门水平,昆明灰飞虱主要是变形菌门,占比 99.95%,另有少量的放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门;范县以变形菌门和拟杆菌门为主,占比分别为 93.22%和 6.76%,厚壁菌门和放线菌门含量极低;开封灰飞虱菌群的变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和厚壁菌门分别占比为 72.01%、26.78%、0.53%和 0.52% (图 2A)。在属水平, *Wolbachia* 存在于所有样本,占比为 29.02%–98.69% (图 2B)。除 *Wolbachia* 外,不同稻区的灰飞虱各有优势菌,这一现象与之前的报道相似^[14]。其中昆明稻区的优势菌为立克次体属(*Rickettsia*),平均占比 56.76%;范县优势菌为杀雄菌属(*Arsonophonus*)和 *Cardinium*,平均占比分别为 12.36%和 6.76%;开封稻区的优势菌为醋杆菌

属 (*Acetobacterace*, 12.09%)、*Sulcia* 内生菌 (26.72%)和 *Pantoea* (5.1%)。3 个稻区总体平均相对丰度前 10 位的共生菌分别为细胞内生菌 *Wolbachia*、*Rickettsia*、*Sulcia*、*Cardinium*、*Nasuia*、*Arsonophonus* 和细胞外的

Acetobacterace、*Pseudomonas*、*Acinetobacter*、*Pantoea* (图 2B)。开封地区灰飞虱菌群物种多样性和丰富度(α 多样性)明显高于云南和范县地区(图 2C), β 多样性分析显示云南、开封、范县三地灰飞虱菌群结构差异显著(图 2D)。

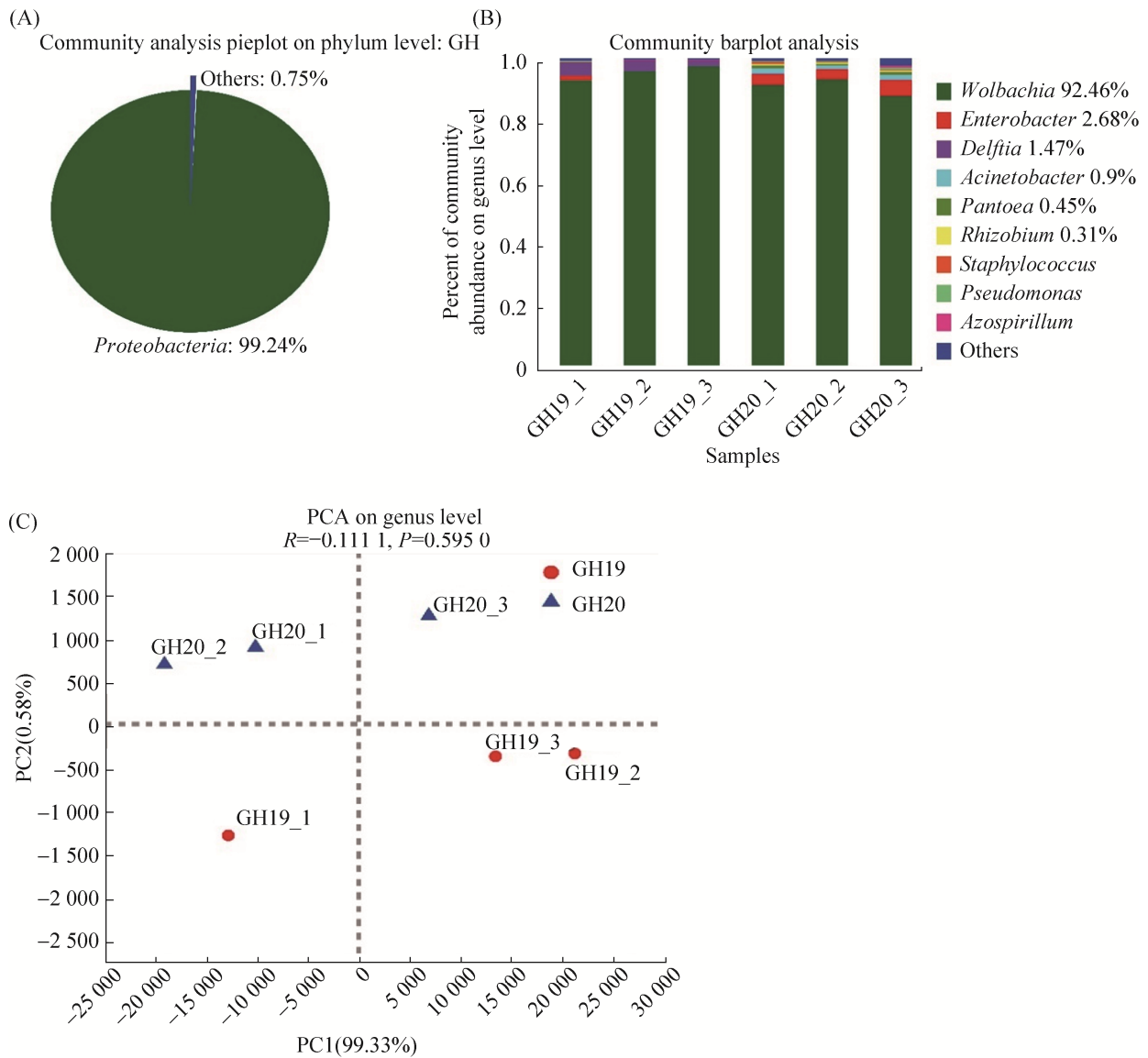


图 1 温室灰飞虱菌群结构解析

Figure 1 Analysis of the bacterial community structure of the greenhouse *L. striatellus*. A: relative abundance at phylum level. B: relative abundance at genus level. Taxa with relative abundance >0.1% are shown. GH19_1–GH19_3, *L. striatellus* sample No. 1–3 in 2019; GH20_1–GH20_3, *L. striatellus* sample No. 1–3 in 2020. C: β -diversity using principal component analysis (PCA) analysis at the genus level.

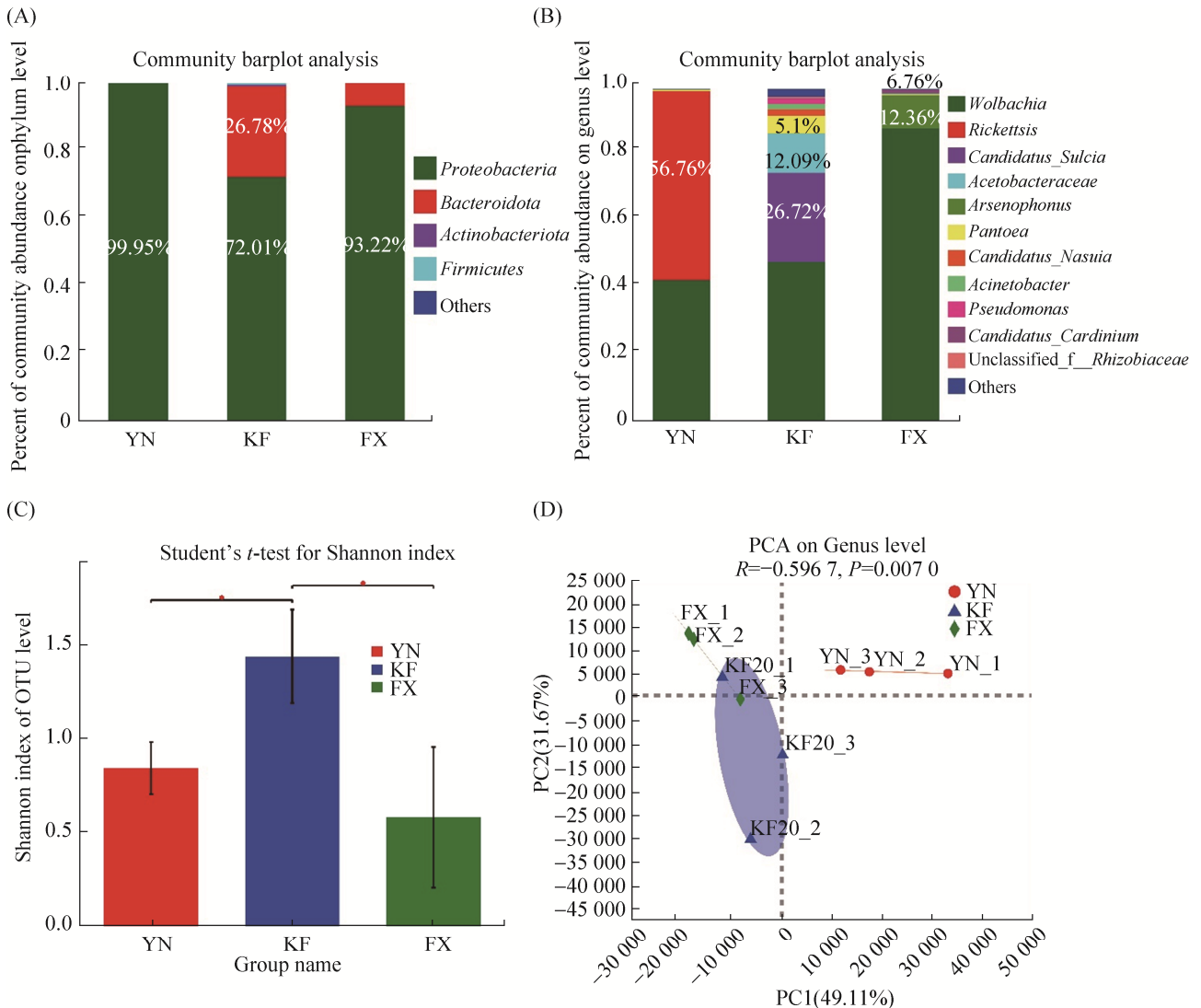


图 2 不同地域灰飞虱菌群结构解析

Figure 2 Analysis of the bacterial community structure of *L. striatellus* in different rice areas. A: relative abundance at phylum level. B: relative abundance at genus level. C: Shannon index on OTU level. Abscissa represents the group name, ordinate represents mean value of Shannon index of each group. For the two groups with significant differences is marked as *, $P < 0.05$. D: PCA analysis on genus level. YN, KF and FX: insects collected from Kunming, Yunnan; Kaifeng, Henan; and Fanxian, Henan, respectively. Taxa with relative abundance $> 0.1\%$ are shown in Figure A and B.

2.4 同一稻区不同时间灰飞虱的优势菌组成差别较大

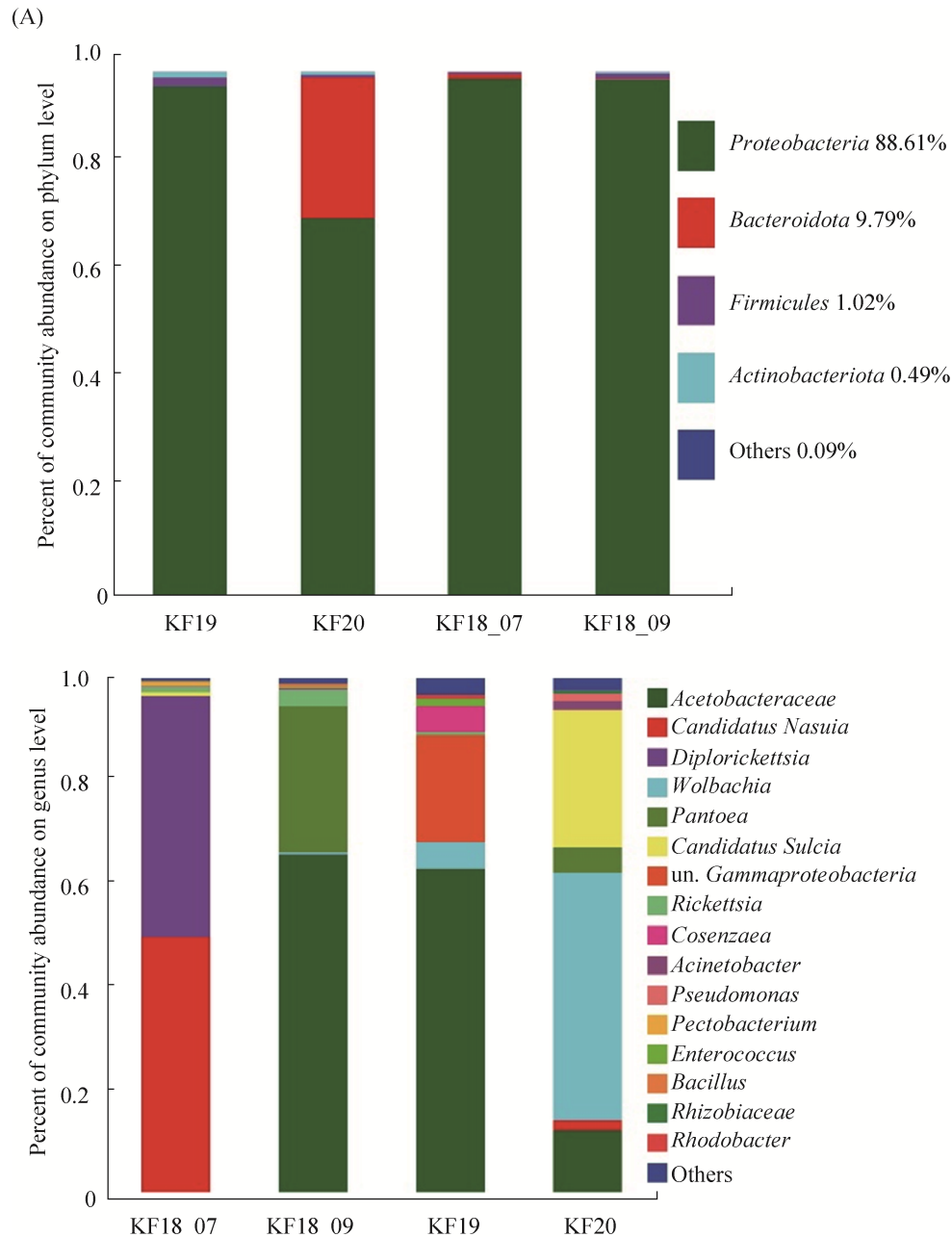
对连续三年从开封稻区采集的灰飞虱进行菌群测序,发现不同年份或不同月份的灰飞虱样本均以变形菌门为主($> 95\%$),仅2020年的样本有较高丰度的拟杆菌门(26.78%),为细胞内

生菌 *Sulcia* 属在其中一个样本中的高丰度所致。三年所有样本中,变形菌门、拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门平均占比分别为 88.61%、9.79%、1.02%和 0.49%(图 3A)。

在属水平, *Wolbachia* 在 2018 和 2019 年的样本中相对丰度很低,分别为 0.31%和 5.21%。

除 *Wolbachia* 外, 2018 年 9 月的灰飞虱样本优势菌为 *Nasuia*、*Acetobacter*、*Pantoea*、*Rickettsia*、*Sulcia*; 2018 年 7 月优势菌为 *Diplorickettsia*、*Acetobacter*、*Nasuia*、*Pantoea*; 2019 年优势菌为 *Acetobacter*、Unclassified *Gammaproteobacteria*、*Cosenzaea*、*Enterobacter*、*Rhodobacter* 和 *Rickettsia* (图 3A)。这些优势菌的相对丰度在不同样本之间差异较大(图 3C), 例如: *Acetobacter*

属共生菌在 6 个样本中的相对丰度为 29.76%–86.61%; *Nasuia* 在 3 个样本丰度较高, 分别为 5.30%、5.51%和 91.36%; 2 个样本中 *Diplorickettsia* 丰度较高, 分别为 5.60%和 90.20%; 4 个样本 *Pantoea* 丰度较高, 分别为 2.30%、9.62%、12.36%和 68.34%; 一个样本 Unclassified *Gammaproteobacteria* 较高, 为 61.33%(图 3C)。β 多样性分析显示 2019 和 2020 年



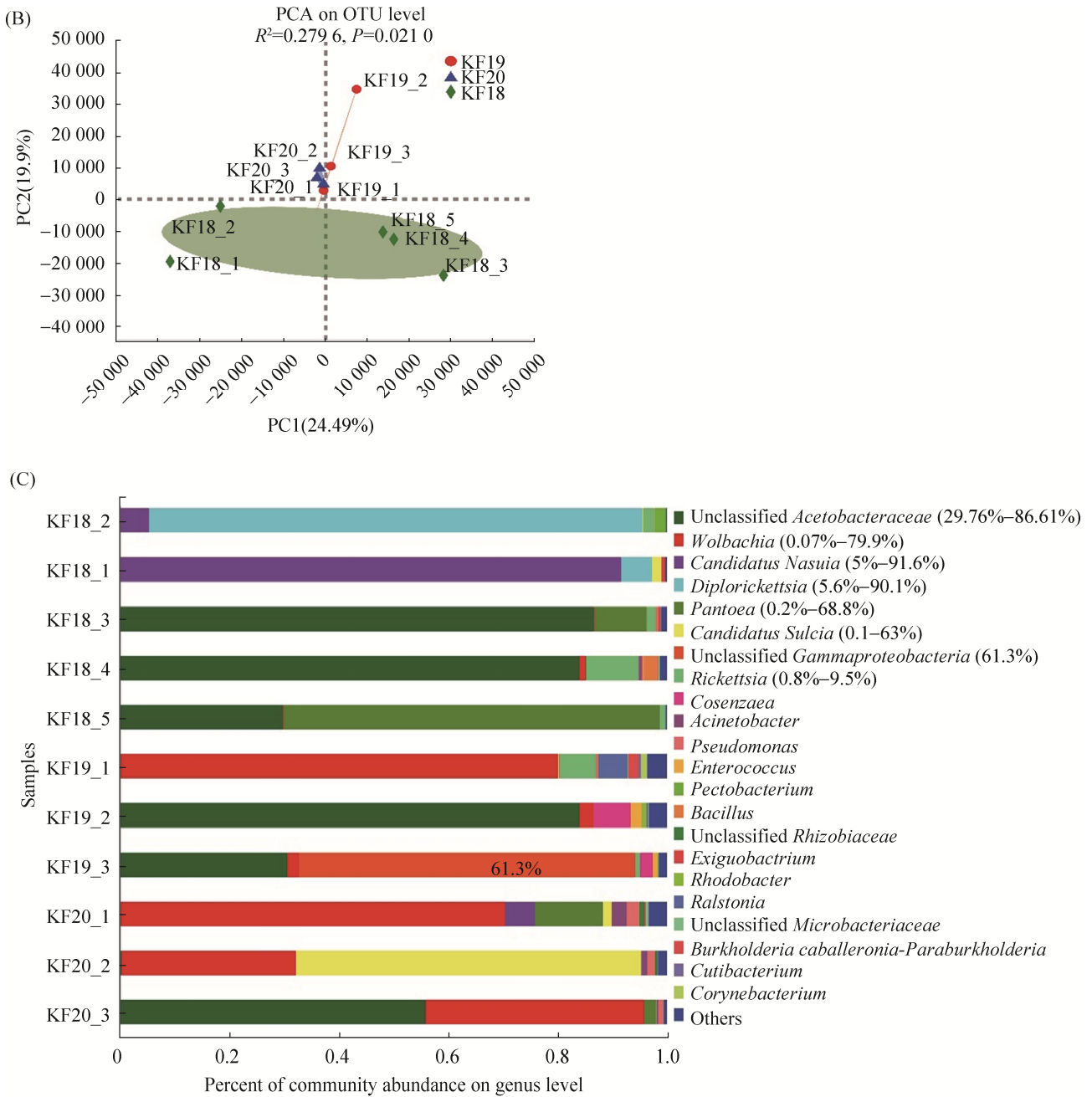


图3 时间变量下灰飞虱菌群结构解析

Figure 3 Analysis of the bacterial community structure of *L. striatellus* under time variables. A: the average relative abundance on phylum level (left) and genus level (right). KF18_07, KF18_09, KF19, KF20, the Kaifeng *L. striatellus* samples collected in July 2018, September 2018, 2019 and 2020, respectively. B: PCA analysis on OTU level. C: analysis of the bacterial community structure of each *L. striatellus* sequencing sample on genus level. KF18-1-KF18-2, the two *L. striatellus* samples collected in July 2018; KF18-3-KF18-5, the three *L. striatellus* samples collected in September 2018; KF19-1-KF19-3 and KF20-1-KF20-3, the three *L. striatellus* samples collected in 2019 and 2020, respectively. Taxa with relative abundance > 0.1% are displayed in Figure A.

的灰飞虱样本菌群结构相近,与2018年样本差别较大(图3B)。Anosim相似性分析显示 R^2 为0.279,而残差超过0.7,说明时间变量不是影响灰飞虱共生菌组成的主要因素, P 值0.02,说明不同时间点菌群组成差异显著。4个时间点共有的细菌为29个属,其中平均相对丰度高于1%的共有属有5个,分别为:*Wolbachia*、*Pseudomonas*、*Rickettsia*、*Enterobacter*和*Acinetobacter*。

2.5 稻田灰飞虱在温室饲养后菌群结构的变化

将温室与稻田灰飞虱菌群进行比较发现:所有的温室和稻田灰飞虱样本,其菌群均由细胞内和细胞外共生菌共同组成。温室灰飞虱显著的特点为,*Wolbachia*是主要的细胞内生菌(在少数样本中检测到极低丰度的*Rickettsia*),其相对丰度显著高于多种来源的稻田灰飞虱*Wolbachia*,而大多数稻田灰飞虱则携带超过一种细胞内生菌。

为检测环境变化对菌群结构的影响,我们采集开封稻田灰飞虱并置于温室中,以无菌蔗糖溶液饲喂24h。属水平菌群结构分析显示:蔗糖饲喂后*Wolbachia*的相对丰度上升明显,多种其他细胞内生菌丰度降低(图4A),而 β 多样性分析显示蔗糖饲喂后的灰飞虱与大田灰飞虱菌群差异不显著, $(R^2=0.358, P=0.234)$,图4B)。我们进而将范县稻田的灰飞虱以温室水稻继代培养,发现:子代灰飞虱*Wolbachia*的相对丰度进一步升高,而其他细胞内生菌,如*Arsonophonus*和*Cardinium*,则检测不到(图4C), β 多样性显示继代培养后菌群结构与大田来源灰飞虱差异显著(图4D)。这些结果表明:改变的环境条件使得多种共生菌的相对丰度发生了显著变化,相应于温室条件,*Wolbachia*相对丰度升高而多种稻田优势菌相对丰度下降

(图4E),其中,田间灰飞虱通过取食获得的多种昆虫细胞内生菌在缺乏这些内生菌的环境中灰飞虱逐渐丢失,可能原因是其无法被灰飞虱垂直传播。

2.6 灰飞虱核心共生菌的鉴定

为鉴定不随时间、地域、生活环境变化的常见核心菌,我们通过韦恩图在属水平分析所有12个测序条件共有的细菌属(图5),鉴定到10个常见核心细菌属,包括*Wolbachia*、*Sphingomonas*、*Rhizobium*、*Pseudomonas*、*Enterobacter*、*Acinetobacter*、*Pantoea*、*Delftia*、*Stenotrophomonas*和*Microbacterium*。其中*Wolbachia*丰度最高,其次是*Pantoea*(4.97%)、*Enterobacter*(0.77%)和*Acinetobacter*(0.67%)(图5A和C)。对每个细菌属进行OTU水平的分析,获得8个核心OTU。其中OTU45为*Wolbachia*代表性序列,占核心OTU序列总数的93.82%,*Pantoea*代表序列OTU141占4.67%(图5B和D)。

不同的稻田环境下存在一些在特定样本中高丰度的共生菌,包括开封稻区出现的*Acetobacter*、*Diplorickettsia*、*Nasuia*、*Sulcia*、*Pantoea*和Unclassified *Gammaproteobacteria*,昆明稻区的*Rickettsia*,范县稻区的*Arsenophonus*和*Cardinium*。这些高丰度的共生菌多为细胞内生菌,可能是稻田有多种昆虫取食水稻,促进了其他昆虫所携带的细胞内生菌的水平传播。

在OTU水平分析10种常见核心菌和8种在不同地域内出现的高丰度优势菌(表1)。灰飞虱常见核心菌*Wolbachia*共检测到85条OTU序列,其中OTU45占据该属OTU序列总数的96.55%,除了在2018年7月开封样本中分布较少,其余样本中该条OTU均以较高的丰度存在。

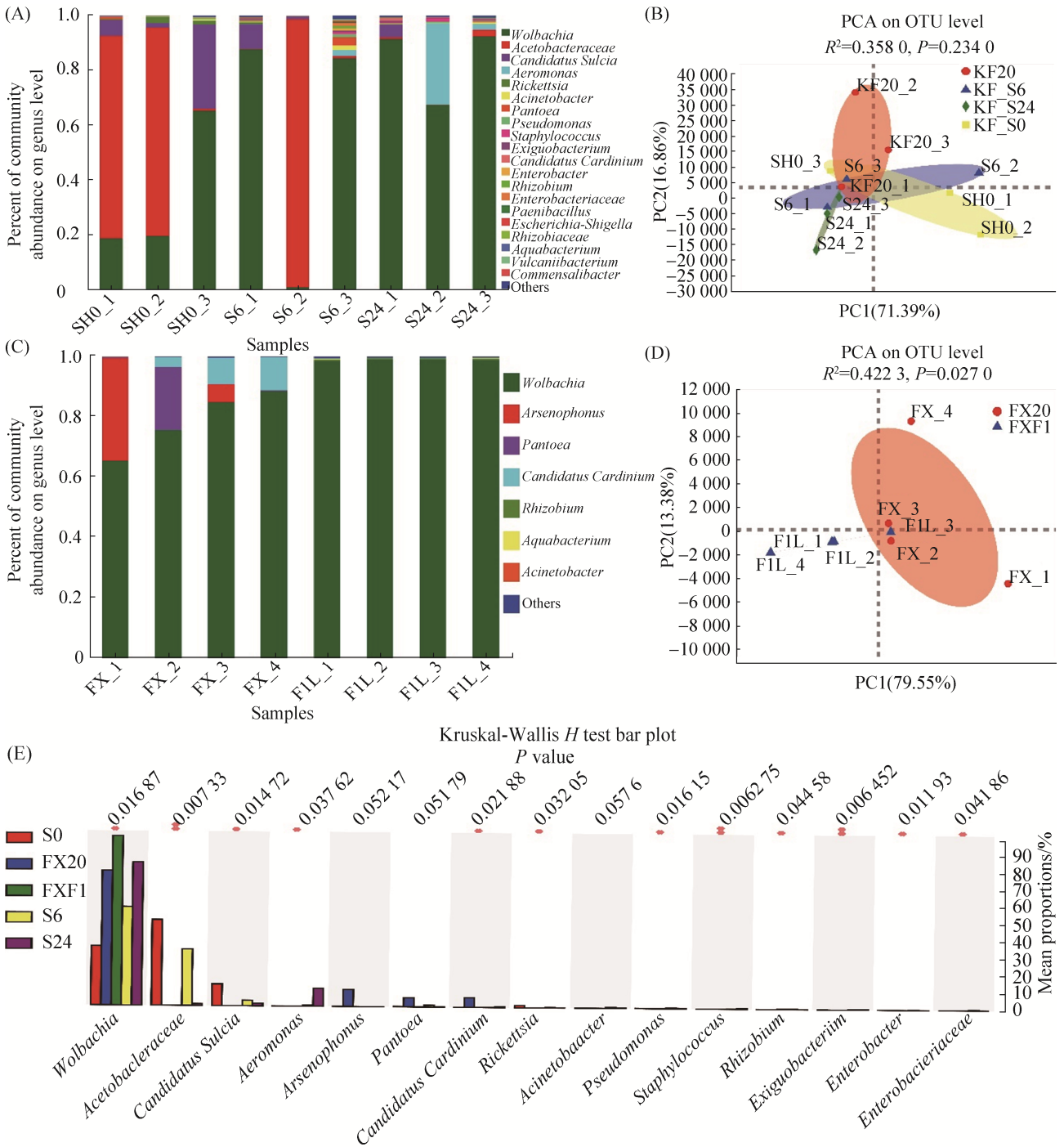


图 4 稻田灰飞虱在温室蔗糖饲喂与继代培养后菌群结构变化

Figure 4 Microbiome structures of sucrose-fed field insects or their offspring. A–B: after Kaifeng *L. striatellus* was fed with sucrose in greenhouse, the bacterial community structure was analyzed at the genus level (A) and the β -diversity was analyzed using PCA at the OTU level (B). SH0: without sucrose feeding, S6: 6 hours post sucrose feeding, S24: 24 hours post sucrose feeding. C–D: after FanXian *L. striatellus* generates offsprings in greenhouse, the bacterial community structure was analyzed at the genus level (C) and the β -diversity was analyzed using PCA at the OTU level (D). FX(FIL1-FIL4): FanXian insects, FXF1(FX 1-FX 4): offsprings of Fanxian insects. E: Kruskal-Wallis rank sum test to show the differentially abundant taxa. The X-axis represents the genus name, the Y-axis represents the average relative abundance. The number on the top is the P value, $*P \leq 0.05$.

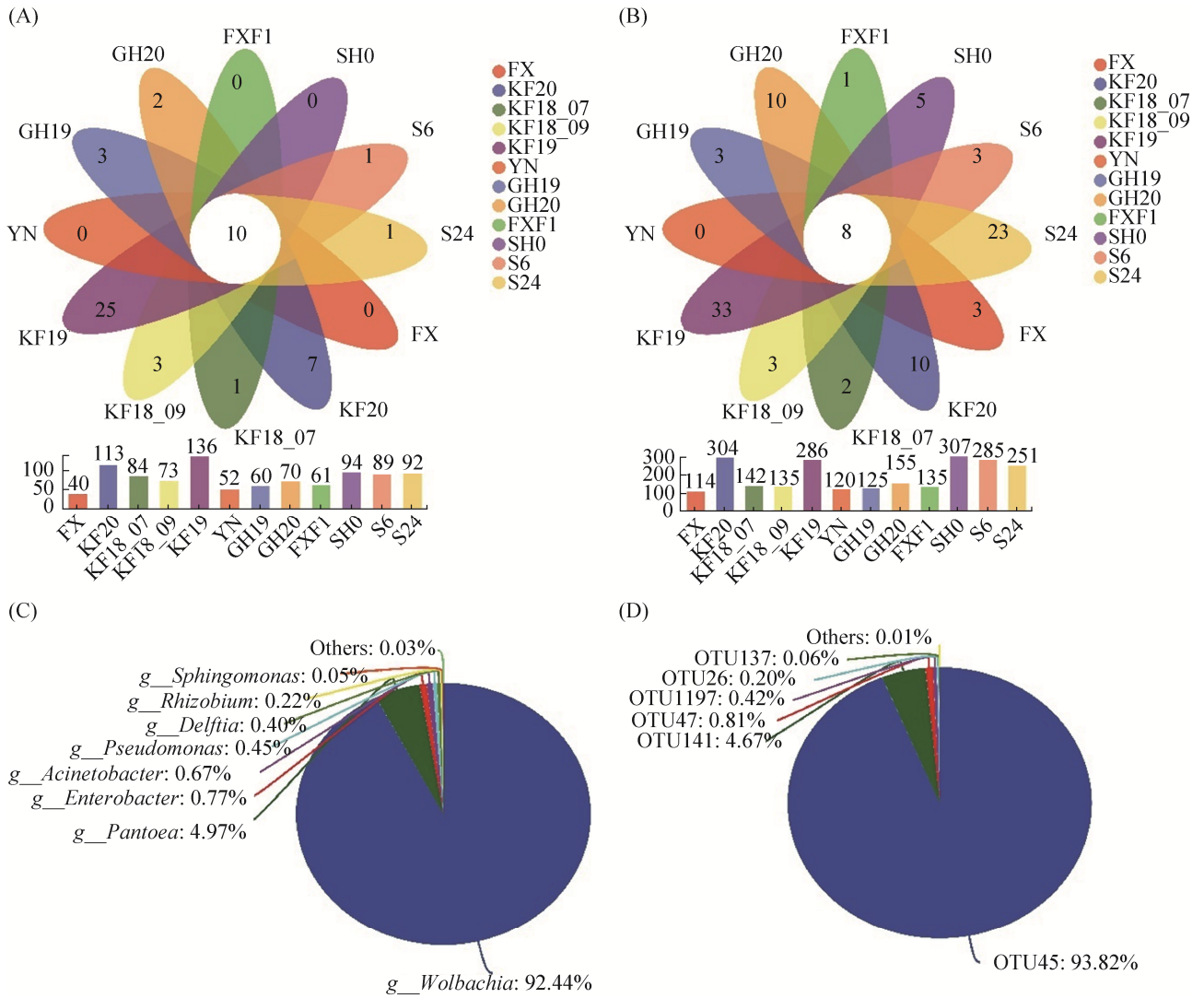


图 5 韦恩图展示灰飞虱的常见核心菌

Figure 5 Venn diagram shows the common core bacteria of *L. striatellus*. A–B: Venn diagrams show the common core bacterial genera (A) and the common core OTUs (B). C–D: relative abundance of the 10 common core genera (C) and the 8 core OTUs (D).

其他常见核心菌 OTU 分布情况如下：(1) *Pantoea* 属含 12 条 OTU 代表序列，其中核心 OTU141 占该属总 OTU 序列的 89.25%；(2) *Enterobacteria* OTU47 占其总 4 条 OTU 序列的 95%，在不同类型样本中分布广泛；(3) *Acinetobacter* 共有 5 条 OTU，其中 OTU42 在样本间分布较广，占 5 条 OTU 序列总数的 67.25%；(4) *Pseudomonas* OTU 3211 占该属 12 条 OTU 序

列总数的 81%；(5) *Rhizobium* OTU26 占该属 5 条 OTU 序列总数的 85%；(6) *Sphingomonas* 含有 5 条 OTU，序列占比较低；(7) *Delftia* 仅 1 条 OTU 序列，OTU1197，多集中在 2019 年温室样本中，其他样本有少量分布；(8) *Microbacterium* 含量较低，相对丰度低于 0.03%，3 条 OTU 总计 220 条测序序列；(9) *Stenotrophomonas* 仅 65 条测序序列，由 OTU1329 这一条 OTU 组成。

表 1 灰飞虱核心菌 OTU 分析

Table 1 Core OTUs analysis of *L. striatellus*

Genus	Species	OTU numbers	Representive OTU	Proportion/%
Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	112	OTU1277	9.23
Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	112	OTU3757	12.91
Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	112	OTU3090	48.86
Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	Unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	112	OTU3637	22.60
<i>Diplorickettsia</i>	Uncultured <i>Rickettsiella</i> sp. <i>Diplorickettsia</i>	1	OTU596	100.00
<i>Candidatus Nasuia</i>	Unclassified <i>Candidatus Nasuia</i>	3	OTU598	96.65
<i>Candidatus Sulcia</i>	Uncultured <i>Candidatus Sulcia</i> sp.	15	OTU1208	96.00
<i>Candidatus Cardinium</i>	Uncultured <i>Candidatus Cardinium</i>	5	OTU143	87.00
Unclassified <i>Gammaproteobacteria</i>	Unclassified <i>c Gammaproteobacteria</i>	1	OTU1215	100.00
<i>Wolbachia</i>	Uncultured bacterium <i>Wolbachia</i>	88	OTU45	96.55
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>	8	OTU1251	4.83
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	8	OTU137	5.08
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter soli</i>	8	OTU42	89.27
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex sp.	4	OTU47	95.00
<i>Pantoea</i>	Unclassified <i>Pantoea</i>	12	OTU141	93.60
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	5	OTU140	66.44
<i>Rhizobium</i>	<i>Allorhizobium vitis</i>	5	OTU26	85.00
<i>Arsenophonus</i>	Unclassified <i>Arsenophonus</i>	4	OTU2364	81.00
<i>Arsenophonus</i>	Uncultured bacterium <i>Arsenophonus</i>	4	OTU2006	9.99
<i>Rickettsia</i>	Unclassified <i>Rickettsia</i>	3	OTU3938	89.73
<i>Rickettsia</i>	Unclassified <i>Rickettsia</i>	3	OTU1189	10.26
<i>Pseudomonas</i>	Unclassified <i>Pseudomonas</i>	8	OTU 3211	81.00
<i>Delftia</i>	<i>Delftia</i>	1	OTU1197	100.00
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	3	OTU2772	83.00
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	1	OTU1329	100.00

稻田高丰度共生菌 OTU 分布情况如下：(1) *Acetobacter* 属共计 112 条 OUT，其中 4 条 OTU 组成总 OTU 序列总数的 93.60%，该菌在云南及温室环境下均不存在，但开封稻田灰飞虱在温室饲养后，同代次内该属细菌并不丢失；(2) *Diplorickettsia* 仅含 1 条 OTU 代表序列 OTU596；(3) *Candidatus_Nasuia* 属共有 3 条 OTU 序列，其中 OTU598 占比 96.65%，集中在 2018 年及 2020 年开封样本中；(4) *Candidatus_Sulcia* 属含有 15 条 OTU 序列，其中 OTU1208 在 2020 年开封多个测序样本中存在，占该属 OTU 序列总数的 96%；(5) Unclassified *Gammaproteobacteria* 仅有 1 条

OTU1215，以较高丰度存在于 2019 年开封第 3 号样本中；(6) *Arsenophonus* 属含有 4 条 OTU 代表序列，其中 OTU2364 占比最高达 81%，所有序列集中在范县灰飞虱 FX_01,FX_02 两个样本；(7) *Candidatus_Cardinium* 含有 5 条 OTU 代表序列，其中 OTU143 占比 87%，序列多集中在范县灰飞虱 FX_02 和 FX_03 两个样本，其他个别样本有少量分布；(8) *Rickettsia* 属核心 OTU 为 OTU3938，占 3 种 *Rickettsia* OTU 序列总数的 89.24%；*Rickettsia* OTU1189 在昆明 3 个样本中不存在，但在开封不同年份的样本中有广泛分布，相对丰度较低。

3 讨论

本研究通过对不同地域、不同时间及温室的灰飞虱进行菌群测序和分析,初步阐明了灰飞虱共生菌的基本组成和变化规律,并鉴定了常见核心菌及3个中国稻区的优势菌。灰飞虱的菌群结构表现出一些显著的特点:一是本研究中所涉及的所有灰飞虱样本,均携带细胞内和细胞外两种类别的共生菌。在温室条件下,细胞内生菌以 *Wolbachia* 为主,其相对丰度高于90%以上。除了 *Wolbachia* 之外,在极少数的样本中能检测到很低丰度的 *Rickettsia* 细胞内生菌。在稻田环境下,灰飞虱的细胞内生菌种类丰富。其二是灰飞虱菌群受环境影响较大,随着地域和时间的不同,优势菌的组成变化明显。本研究所采集的3个地区的稻田灰飞虱,分别有特定的优势菌,如仅在开封稻区检测到高丰度的 *Acetobacter*、在部分开封样本中检测到高丰度的细胞内生菌 *Nasuia* 和 *Cardinium*、仅在范县检测到高丰度的 *Arsenophonus*、以及仅在昆明灰飞虱体内占据较高相对丰度的 *Rickettsia*。将携带这些高丰度优势菌的灰飞虱置于温室条件下培养24 h,在部分样本中优势菌保持高丰度,而在多数样本中,优势菌的丰度会下降。综合不同样本的菌群组成及变化规律,我们初步鉴定了灰飞虱的核心共生菌,包括在不同条件下以一定丰度存在的10种常见核心菌和特定稻田样本中高丰度存在的8种优势菌。其中, *Wolbachia* 为灰飞虱的次级细胞内共生菌,可以在多种组织,包括中肠、脂肪体和唾液腺中定殖,并能侵入卵巢进行垂直传播。其他各共生菌的定殖位置及传播特征,目前均未有报道。

本研究中, *Acetobacter* 属在开封稻田灰飞虱体内连续3年都检测到较高的相对丰度,在 OTU

水平与已报道的按蚊共生菌 *Asaia* 以及白背飞虱共生菌 *Asaia* 在16S rDNA序列上高度同源。该株 *Asaia* 菌株均能体外培养并以较高的丰度在昆虫肠道定殖,是潜在的基因工程菌^[18]。其中 *Asaia* SF2.1 菌株已在抗疟研究中得到较好的应用^[19]。*Wolbachia* 是重要的昆虫细胞内共生菌^[2],在多种昆虫宿主中发挥抗病毒^[3,20-22]、具有增强宿主对杀虫剂的适应性^[23]、塑造宿主菌群结构^[13]、调节宿主固有免疫系统^[24]等功能。灰飞虱 *Wolbachia* 在温室和稻田样本中的核心 OTU 序列完全相同,该菌株在稻田其他昆虫,如褐飞虱、叶蝉等体内占据生态位的能力值得探索。*Acinetobacter*、*Pantoea* 和 *Rhizobium* 在灰飞虱体内稳定存在,这3个属的细菌均在部分样本中表现出较高的相对丰度,其中 *Acinetobacter* 在多数样本中相对丰度高于1%, *Pantoea* 在开封灰飞虱体内最高相对丰度达到68.8%。这3个属的细菌作为基因工程菌需要更明确的组织定位和定量分析。稻田灰飞虱携带较多的细胞内生菌,可能的原因是稻田环境有多种昆虫生活,导致了昆虫胞内菌的水平传播,例如 *Nasuia*、*Sulcia*、*Cardinium* 是蚜虫和叶蝉常见的细胞内生菌^[25-27]。温室饲养的媒介昆虫如何更真实地反映田间的复杂情况,将是媒介昆虫与虫媒病毒互作及载体工程菌使用中需要探究的重要问题。

参考文献

- [1] Wang SB, Dos-Santos ALA, Huang W, Liu KC, Oshaghi MA, Wei G, Agre P, Jacobs-Lorena M. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science*, 2017, 357(6358): 1399-1402.
- [2] Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(10): 741-751.
- [3] Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y,

- Axford J, Kriesner P, Lloyd AL, Ritchie SA, O'Neill SL, Hoffmann AA. The w Mel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 2011, 476(7361): 450–453.
- [4] Gong JT, Li YJ, Li TP, Liang YK, Hu LC, Zhang DJ, Zhou CY, Yang C, Zhang X, Zha SS, Duan XZ, Baton LA, Hong XY, Hoffmann AA, Xi ZY. Stable introduction of plant-virus-inhibiting *Wolbachia* into planthoppers for rice protection. *Current Biology*, 2020, 30(24): 4837–4845.e5.
- [5] Risely A. Applying the core microbiome to understand host-microbe systems. *Journal of Animal Ecology*, 2020, 89(7): 1549–1558.
- [6] Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou WG, Rousset F, O'Neill SL. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 29(2): 153–160.
- [7] Hurst GD, Frost CL. Reproductive parasitism: maternally inherited symbionts in a biparental world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015, 7(5): a017699.
- [8] Yin CH, Sun P, Yu X, Wang PH, Cheng G. Roles of symbiotic microorganisms in arboviral infection of arthropod vectors. *Trends in Parasitology*, 2020, 36(7): 607–615.
- [9] McCutcheon JP. The bacterial essence of tiny symbiont genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(1): 73–78.
- [10] Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, Fujie M, Satoh N, Fukatsu T. Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. *Nature Microbiology*, 2016, 1: 15011.
- [11] Wu P, Yu X, Wang PH, Cheng G. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2019, 21: e1.
- [12] Nault LR. Transmission biology, vector specificity and evolution of planthopper-transmitted plant viruses. Planthoppers. Boston, MA: Springer US, 1994: 429–448.
- [13] Duan XZ, Sun JT, Wang LT, Shu XH, Guo Y, Keiichiro M, Zhu YX, Bing XL, Hoffmann AA, Hong XY. Recent infection by *Wolbachia* alters microbial communities in wild *Laodelphax striatellus* populations. *Microbiome*, 2020, 8(1): 104.
- [14] Liu WW, Zhang XW, Wu N, Ren YD, Wang XF. High diversity and functional complementation of alimentary canal microbiota ensure small brown planthopper to adapt different biogeographic environments. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2953.
- [15] Bing XL, Zhao DS, Peng CW, Huang HJ, Hong XY. Similarities and spatial variations of bacterial and fungal communities in field rice planthopper (Hemiptera: Delphacidae) populations. *Insect Science*, 2020, 27(5): 947–963.
- [16] Pan HB, Li MY, Wu W, Wang ZL, Yu XP. Host-plant induced shifts in microbial community structure in small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Economic Entomology*, 2021, 114(2): 937–946.
- [17] 张莉莉, 陈丽莹. 一种解析水稻叶际内生细菌菌群结构的方法. 中国, 201710187212.9. 2020-06-23.
- [18] Li F, Li P, Hua HX, Hou ML, Wang FL. Diversity, tissue localization, and infection pattern of bacterial symbionts of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Microbial Ecology*, 2020, 79(3): 720–730.
- [19] Shane JL, Grogan CL, Cwalina C, Lampe DJ. Blood meal-induced inhibition of vector-borne disease by transgenic microbiota. *Nature Communications*, 2018, 9: 4127.
- [20] Panteleev DY, Goryacheva II, Andrianov BV, Reznik NL, Lazebny OE, Kulikov AM. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* enhances the nonspecific resistance to insect pathogens and alters behavior of *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics*, 2007, 43(9): 1066–1069.
- [21] Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. The bacterial

- symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 2008, 6(12): e2.
- [22] Martinez J, Bruner-Montero G, Arunkumar R, Smith SCL, Day JP, Longdon B, Jiggins FM. Virus evolution in *Wolbachia*-infected *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2019, 286(1914): 20192117.
- [23] Liu XD, Guo HF. Importance of endosymbionts *Wolbachia* and *Rickettsia* in insect resistance development. *Current Opinion in Insect Science*, 2019, 33: 84–90.
- [24] Horak RD, Leonard SP, Moran NA. Symbionts shape host innate immunity in honeybees. *Proceedings Biological Sciences*, 2020, 287(1933): 20201184.
- [25] Kobiaka M, Michalik A, Walczak M, Junkiert U, Szklarzewicz T. *Sulcia* symbiont of the leafhopper *Macrostelus laevis* (Ribaut, 1927) (Insecta, Hemiptera, Cicadellidae: Deltocephalinae) harbors *Arsenophonus* bacteria. *Protoplasma*, 2016, 253(3): 903–912.
- [26] Konecka E, Olszanowski Z. A new *Cardinium* group of bacteria found in *Achipteria coleoptrata* (Acari: Oribatida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2019, 131: 64–71.
- [27] Kobiaka M, Michalik A, Szwedko J, Szklarzewicz T. Diversity of symbiotic microbiota in Deltocephalinae leafhoppers (Insecta, hemiptera, cicadellidae). *Arthropod Structure & Development*, 2018, 47(3): 268–278.

(本文责编 张晓丽)