

不同地理种群赤拟谷盗肠道细菌 群落多样性分析*

王争艳** 王 洋 何梦婷 鲁玉杰***

(河南工业大学, 粮油食品学院, 郑州 450001)

摘 要 【目的】了解储粮害虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)成虫肠道细菌群落组成及多样性。【方法】利用 Illumina MiSeq 高通量测序技术对 3 个地理种群的赤拟谷盗雄虫肠道细菌 16S rDNA 的 V3-V4 变异区进行测序分析。【结果】从赤拟谷盗肠道样本中共测得 465 293 条 reads, 聚类为 113 个 OTU, 共注释到 8 门、15 纲、33 目、52 科和 79 属的细菌。其中, 优势菌门包括变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria) 等, 优势菌属包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌科未鉴定属 (Unclassified-f-Enterobacteriaceae)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、肠球菌属 (*Enterococcus*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 等。3 个地理种群的赤拟谷盗肠道细菌的 Shannon 指数、Simpson 指数、Ace 指数和 Chao 指数分别为 1.5-1.7、0.3、79.7-133.2 和 76.4-85.2。【结论】不同地理种群的赤拟谷盗成虫的肠道细菌群落组成存在显著差异。

关键词 赤拟谷盗; 肠道细菌; 多样性; 16S rDNA; 高通量测序

Diversity of intestinal bacteria in different geographic populations of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae)

WANG Zheng-Yan** WANG Yang HE Meng-Ting LU Yu-Jie***

(Henan University of Technology, School of Food Science and Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract [Objectives] To reveal the community structure and diversity of the intestinal bacteria of *Tribolium castaneum*. [Methods] The Illumina MiSeq high-throughput sequencing platform was used to sequence the V3-V4 regions of the bacterial 16S rDNA gene in the intestine of adult male *T. castaneum* from three geographic populations. [Results] A total of 465 293 reads and 113 OTUs were obtained and annotated into 8 phyla, 15 classes, 33 orders, 52 families and 79 genera. The most common phyla were the Proteobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria. The most abundant genera were *Pseudomonas*, unclassified-f-Enterobacteriaceae, *Acinetobacter*, *Enterococcus* and *Rhizobium*. The Shannon, Simpson, Ace and Chao indices were 1.5-1.7, 0.30, 79.7-133.2 and 76.4-85.2, respectively. [Conclusion] Bacterial community structure and diversity differ among different geographic populations of *T. castaneum*.

Key words *Tribolium castaneum*; gut bacteria; diversity; 16S rDNA; high-throughput sequencing

赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (Herbst)是一种重要的储粮害虫,其成虫和幼虫几乎能危害所有的动植物干性制品,尤其偏好取食谷物及谷物类制品,在面粉厂发生尤为严重。除直接取食外,

赤拟谷盗成虫臭腺分泌的醌类物质会使粮食发霉、产生异味,导致粮食无法食用,严重损害了粮食储藏期间的经济效益(李承军等,2011)。目前,化学防治是赤拟谷盗的主要治理手段,但

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目(31601890);河南工业大学河南省属高校基本科研业务费专项资金(2016XTCX01);河南省科技攻关项目(202102110059)

**第一作者 First author, E-mail: zywangedu@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: luyujie1971@163.com

收稿日期 Received: 2019-01-08; 接受日期 Accepted: 2019-05-17

广泛产生的抗药性增加了其防治难度 (Opit *et al.*, 2012)。因此, 寻找化学防治的替代技术成为赤拟谷盗防治体系中亟待解决的问题。研究表明, 肠道微生物能参与昆虫的生理和进化过程, 影响昆虫的营养、生长发育、天敌防御和化学通讯等 (Engel and Moran, 2013)。研究赤拟谷盗的肠道微生物可以为其防治提供新的思路。

早期, 关于赤拟谷盗肠道共生微生物的研究主要依赖传统的离体培养技术。采取传统培养法研究赤拟谷盗肠道共生菌的多样性发现, 可体外培养的细菌有肠球菌属 (*Enterococcus*)、气球菌属 (*Aerococcus*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*), 可体外培养的真菌有曲霉菌属 (*Aspergillus*) 等 (Larson *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2015)。昆虫共生菌生长所需的条件复杂, 绝大多数共生菌目前难以进行人工培养 (梅承等, 2018), 根据体外培养结果无法对赤拟谷盗肠道微生物的群落结构和多样性进行更为详细的分析。因此, 本研究采用高通量测序技术, 对 3 个地理种群的赤拟谷盗雄成虫肠道细菌的 16S rDNA 的 V3-V4 变异区测序, 并分析其群落组成和多样性, 为后续研究赤拟谷盗肠道细菌对宿主的功能及开发绿色防控新技术提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

赤拟谷盗的 3 个地理种群于 2017 年 6 月分别采集自浙江嘉兴 (ZJX)、河南郑州 (HNZZ) 和湖北武汉 (HBWH)。在实验室内, 以全麦粉作为饲料, 在温度为 $(29 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $50\% \pm 5\%$ 、光周期 16 L : 8 D 的条件下饲养赤拟谷盗。为减少人工饲养条件对赤拟谷盗自然种群肠道菌组成的影响, 选取自然种群 F_1 代羽化 1 周的成虫进行肠道细菌群落组成分析。

1.2 赤拟谷盗肠道细菌总 DNA 抽提

在预实验中发现, 赤拟谷盗雌、雄成虫的肠道细菌组成在属的水平上不存在明显差异 (未发

表数据), 因此仅选择雄虫进行实验。挑选 30 头健康雄虫进行解剖。为避免肠道过路菌的干扰, 解剖前对试虫进行 24 h 的饥饿处理。依次使用 75%乙醇和无菌水清洗雄虫体表后, 解剖获得完整肠道并放入磷酸盐缓冲液中。按照 Axy Prep 试剂盒 (Central Avenue, Union City, USA) 说明书进行总 DNA 抽提, 最后用 50 μL 的 dd H_2O 溶解总 DNA。测定总 DNA 抽提物的浓度和 OD 值, 并用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测质量 (杨晓晴等, 2018)。每个地理种群重复 3 次。

1.3 PCR 扩增及产物纯化

以 1.2 提取的肠道细菌总 DNA 为模板, 用正向引物 338F 和反向引物 806R 对 16S rDNA 的 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增 (杨晓晴等, 2018)。扩增程序为: 95°C 预变性 3 min, 27 个循环 (95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s), 最后 72°C 延伸扩增 10 min。扩增体系: $5 \times$ Buffer 4 μL , dNTPs ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , 正反引物各 0.8 μL , FastPfu 聚合酶 0.4 μL , BSA 溶液 0.2 μL , DNA 模板 10 ng, 补充 dd H_2O 至 20 μL 。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶检验后进行胶回收, 利用 DNA 纯化试剂盒进行纯化 (王洋, 2019)。

1.4 高通量测序和 OTU 聚类

依据 Illumina 平台的操作规程, 按照上海美吉生物医药科技有限公司的要求, 使用 1.3 纯化的 PCR 扩增片段构建文库, 检测合格后利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。原始数据上传到 NCBI 数据库。应用 USEARCH 和 QIIME 软件在 97%相似度下对有效 reads 进行操作分类单元 (OTU) 聚类。

1.5 赤拟谷盗肠道细菌群落多样性分析

利用 UCHIME 软件剔除嵌合体后进行物种分类注释, 选用 Silva 数据库进行物种比对 (比对阈值为 70%)。使用 Mothur 软件进行肠道菌组成 Alpha 多样性分析, 采用 Shannon、Simpson、Ace 和 Chao 指数评价肠道细菌群落组成的多样性。其中, 利用 Ace 和 Chao 指数评价细菌群落

组成的丰富度, 利用 Shannon 指数评价细菌群落组成的多样性, 这 3 类指数数值越大群落组成越复杂; 利用 Simpson 指数评价细菌群落中优势菌种的集中程度, 其数值越小群落组成越复杂 (Chao, 1984; Chao *et al.*, 2000; Kuczynski *et al.*, 2011)。对 3 个地理种群的赤拟谷盗肠道细菌群落组成进行主成分分析 (PCA), 分析群落组成的 Beta 多样性。使用二维坐标图反映多组数据的差异, 组成相似的样本在 PCA 图中的距离较近 (王洋, 2019)。

1.6 数据统计与分析

使用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 检验比较不同地理种群的赤拟谷盗肠道细菌组成的差异, 评价某个种群肠道细菌组成的优势菌门或属, 在 $P=0.05$ 的水平上比较差异显著性。利用 SPSS16.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 赤拟谷盗肠道细菌基因序列 OTU 聚类分析

经 16S rDNA 高通量测序, 从 3 个地理种群的赤拟谷盗雄虫肠道细菌的样本中共获得 465 293 条有效 reads, 在 97% 相似水平下聚类得到 113 个 OTU, 对其进行注释得到 8 门、15 纲、33 目、52 科和 79 属的细菌。其中, 从 HNZZ 种群的肠道样本中平均获得 52 108 条有效 reads, 并得到 76 个聚类 OTU, 注释到 7 门、11 纲、24 目、40 科和 52 属的细菌; 从 HBWH 种群的肠道样本中平均获得 52 200 条有效 reads, 并得到 82 个聚类 OTU, 注释到 7 门、12 纲、28 目、41 科和 59 属的细菌; 从 ZJJX 种群的肠道样本中平均获得 50 790 条有效 reads, 并得到 89 个聚类 OTU, 注释到 7 门、14 纲、31 目、43 科和 65 属的细菌。

HNZZ、HBWH 和 ZJJX 这 3 个地理种群的赤拟谷盗雄虫肠道细菌的丰富度稀释性曲线逐渐进入平稳状态 (图 1), 说明测序数据达到饱和, 可以用于其它分析。同时, Shannon 指数也进入平稳状态 (图 2), 进一步说明测序数据足够大, 可以覆盖肠道细菌群落中的绝大部分物种。

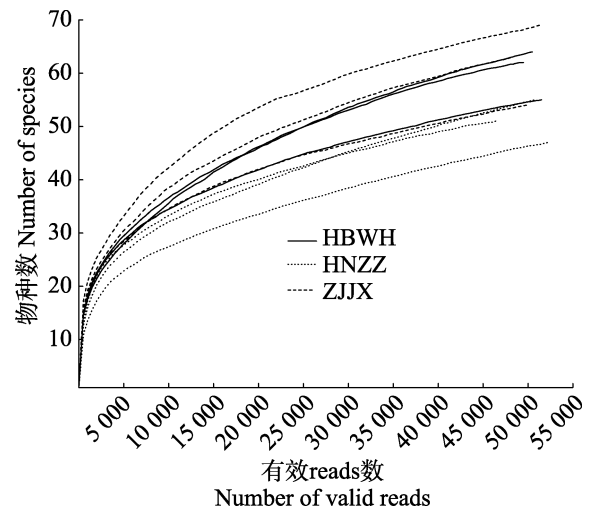


图 1 赤拟谷盗雄虫肠道细菌的丰富度稀释性曲线
Fig. 1 Rarefaction curves of gut bacteria of male *Tribolium castaneum*

HBWH、HNZZ 和 ZJJX 代表赤拟谷盗的不同地理种群。下同。

HNZZ, HBWH and ZJJX mean different populations of *T. castaneum*. The same below.

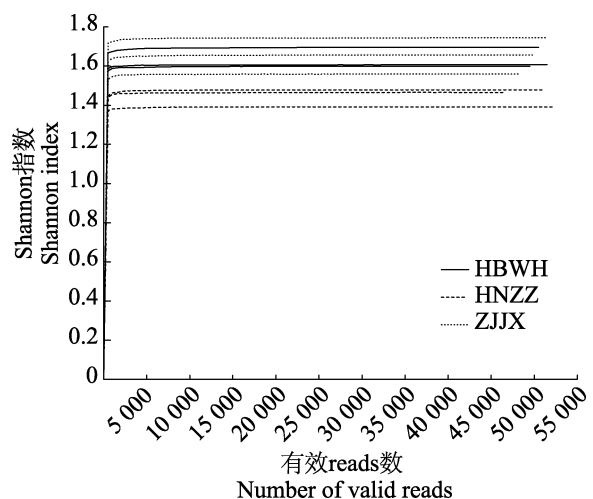


图 2 赤拟谷盗雄虫肠道细菌的 Shannon 曲线
Fig. 2 Shannon curves of gut bacteria of male *Tribolium castaneum*

2.2 赤拟谷盗雄虫肠道细菌群落组成分析

从赤拟谷盗肠道所有样本的细菌 16S rDNA 的基因序列共注释到 8 个门。赤拟谷盗肠道菌中丰度较高 ($\geq 0.17\%$) 的菌门分别是变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria)。其中, 变形菌门是 HBWH、ZJJX 和 HNZZ 这 3 个种群的优势肠道

菌门,分别占群落组成的 75.3%、95.9%和 99.3%,并且其在 HBWH 种群中的丰度显著低于 HNZZ 和 ZJJX 种群。HBWH 种群的次优肠道菌门为厚壁菌门, ZJJX 种群的次优肠道菌门为放线菌门,并且厚壁菌门和放线菌门在 3 个地理种群肠道菌组成中的丰度存在显著差异(表 1)。赤拟谷盗肠道菌中丰度较低($\leq 0.11\%$)的菌门有蓝藻菌门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、梭杆菌门(Fusobacteria)和异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-thermus)。

表 1 赤拟谷盗雄虫肠道细菌优势菌门及其相对丰度
Table 1 Dominant phyla and their relative abundance of gut bacteria of male *Tribolium castaneum*

门 Phylum	相对丰度(%) Relative abundance (%)		
	HBWH	ZJJX	HNZZ
变形菌门 Proteobacteria	75.3±2.8Ab	95.9±2.5Aa	99.3±0.4Aa
厚壁菌门 Firmicutes	23.0±2.7Ba	0.3±0.1Cb	0.4±0.2Bb
放线菌门 Actinobacteria	1.8±0.3Cab	3.7±1.4Ba	0.2±0.1Bb

表中数据为平均值±标准误,同列数据后标有相同大写字母表示差异不显著,同行数据后标有相同小写字母表示差异不显著(单因素方差分析, Tukey 检验, $P=0.05$)。下表同。

Data in the table are mean±SE, and followed by the same capital letters in the same column or lower-case letters in the same row are not significantly different (One-way ANOVA, Tukey test, $P=0.05$). The same below.

从赤拟谷盗所有肠道样本细菌的 16S rDNA 的基因序列共注释到 79 个属,包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌科未鉴定属(Unclassified-f-Enterobacteriaceae)、不动杆菌属(*Acineteobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、生丝微菌属(*Hyphomicrobium*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、潘多拉菌属(*Pandora*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和无色菌属(*Achromobacter*)

等。不同地理种群赤拟谷盗肠道优势菌属的丰度差异显著。HBWH 种群肠道优势菌属为肠杆菌科未鉴定属、肠球菌属、假单胞菌属和不动杆菌属, ZJJX 种群肠道优势菌属为假单胞菌属、不动杆菌属和肠杆菌科未鉴定属, HNZZ 种群肠道优势菌属为不动杆菌属、假单胞菌属和肠杆菌科未鉴定属(表 2)。

表 2 赤拟谷盗雄虫肠道细菌优势菌属及其相对丰度
Table 2 Dominant genera and their relative abundance of gut bacteria of male *Tribolium castaneum*

属 Genus	相对丰度(%) Relative abundance (%)		
	HBWH	ZJJX	HNZZ
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	12.4±0.9Cc	48.0±3.7Aa	30.6±0.3Bb
肠杆菌科未鉴定属 Unclassified-f-Enterobacteriaceae	43.4±3.1Aa	12.7±1.9Cc	26.3±2.1Cb
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	12.3±0.3Cc	20.9±3.8Bb	35.2±1.6Aa
肠球菌属 <i>Enterococcus</i>	22.8±2.7Ba	—	0.2±0.2Eb
根瘤菌属 <i>Rhizobium</i>	3.7±0.3Da	2.0±0.2Db	4.7±0.2Da
慢生根瘤菌属 <i>Bradyrhizobium</i>	1.6±0.2Da	4.1±0.5Db	0.1±0.0Eb
气微菌属 <i>Aeromicrobium</i>	1.7±0.3Dab	3.7±1.4Da	0.0±0.0Eb
短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	4.1±0.4Da	1.6±0.2Da	0.1±0.0Eb

—表示该属未检出。— means the genus not detected.

2.3 赤拟谷盗肠道细菌群落多样性分析

赤拟谷盗肠道细菌组成 Alpha 多样性分析结果见表 3。HNZZ 种群肠道细菌的 Shannon 指数为 1.5, 小于 HBWH 种群的 1.6 和 ZJJX 种群的 1.7, 说明 HBWH 种群和 ZJJX 种群肠道细菌群落的多样性要高于 HNZZ 种群。Simpson 指数在 3 个种群中的差异微小, 说明肠道优势菌种集中程度在不同地理种群中变化不大。HBWH 种群肠道细菌的 Ace 指数和 Chao 指数均小于 ZJJX 和 HNZZ 种群, 但是差异不显著, 说明 ZJJX 和 HNZZ 种群肠道群落的丰富度略高于 HBWH 种群。

表 3 赤拟谷盗雄虫肠道细菌 Alpha 多样性指数
Table 3 Alpha diversity indices of gut bacteria of male *Tribolium castaneum*

种群 Populations	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	Ace 指数 Ace index	Chao 指数 Chao index
HBWH	1.6±0.0A	0.3±0.0A	79.7±4.4A	76.4±2.1A
ZJJX	1.7±0.1A	0.3±0.0A	84.5±1.4A	85.2±3.8A
HNZZ	1.5±0.0B	0.3±0.0A	133.2±27.9A	84.2±14.9A

赤拟谷盗肠道细菌组成 Beta 多样性分析结果见图 3。通过 PCA 分析发现,第一主成分的贡献率为 79.74%,第二主成分的贡献率为 16.34%。结果表明相同地理种群肠道样本的细菌群落组成一致性较高,而不同地理种群肠道样本的细菌群落组成的差异显著。

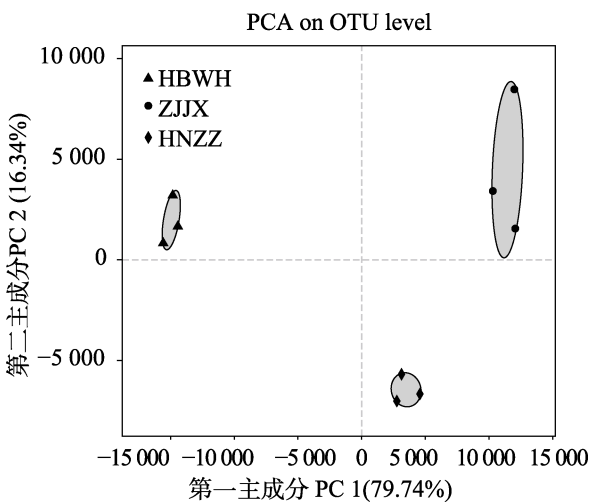


图 3 赤拟谷盗雄虫肠道细菌 PCA 分析
Fig. 3 PCA analysis of gut bacteria of male *Tribolium castaneum*

3 讨论

本研究基于 16S rDNA 高通量测序技术对不同地理种群赤拟谷盗雄虫的肠道细菌群落多样性进行了分析,共注释到 8 门,15 纲,33 目,52 科和 79 属的细菌。赤拟谷盗肠道细菌的优势菌门为变形菌门、厚壁菌门和放线菌门。这些菌门同样是许多半翅目、鳞翅目、双翅目或鞘翅目昆虫肠道中的优势菌门(刘小改,2017;梁燕婷等,2018;杨晓晴等,2018)。ZJJX、HBWH 和 HNZZ 这 3 个地理种群的赤拟谷盗肠道细菌优势菌属均包括假单胞菌属(12.4%-48.0%)、肠杆菌

科未鉴定属(12.7%-43.4%)、不动杆菌属(12.3%-35.2%)、肠球菌属(0-22.8%)和根瘤菌属(2.0%-4.7%)等,和之前的研究结果相比,不动杆菌属和根瘤菌属是新检测到的细菌属。此外,首次在赤拟谷盗中检测到了低丰度(<0.5%)的代尔夫特菌属、潘多拉菌属、无色菌属和鞘氨醇单胞菌属细菌(Larson *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2015)。

多样性分析表明,3 个地理种群的赤拟谷盗肠道细菌的组成在“门”和“属”的水平上均存在显著差异,这证实环境因素可以影响昆虫肠道微生物的组成(Su *et al.*, 2016)。在不同地理种群的稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner、舞毒蛾 *Lymantria dispar* L.、大青叶蝉 *Cicadella viridis* (L.)和西方蜜蜂 *Apis mellifera* L.的肠道微生物多样性研究中出现类似的结果(刘小改,2017;高姗姗,2018)。昆虫肠道微生物参与宿主的生长发育、营养代谢和环境适应性等生理和生物学过程,起着不可替代的作用(杨晓晴等,2018)。行为测定也发现,不同地理种群赤拟谷盗的交配选择行为存在显著差异(王洋,2019)。因此,在将来的研究中通过肠道菌体外培养、去除和回接实验,明确特定肠道菌对赤拟谷盗交配选择行为的影响,有助于理解赤拟谷盗对不同环境适应性的分化及其化学通讯行为变异的机制,并为赤拟谷盗诱捕技术的研发提供新思路。

参考文献 (References)

Chao A, 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4): 265–270.
Chao A, Hwang WH, Chen YC, Kuo CY, 2000. Estimating the number of shared species in two communities. *Statistica Sinica*, 10(1): 227–246.

- Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5): 699–735.
- Gao SS, 2018. Diversity of intestinal bacteria in three lepidopteran larvae damaging maize ears. Master dissertation. Taian: Shandong Agricultural University. [高珊珊, 2018. 三种鳞翅目玉米穗虫幼虫肠道细菌多样性研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, Gonzalez A, Caporaso JG, Knight R, 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Current Protocols in Bioinformatics*, 36(1): 10.7.1–10.7.20.
- Kumari CP, Sivadasan R, Jose A, 2011. Microflora associated with the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *International Journal of Agricultural Technology*, 7(6): 1625–1631.
- Larson Z, Subramanyam B, Zurek L, Herrman T, 2008. Diversity and antibiotic resistance of enterococci associated with stored-product insects collected from feed mills. *Journal of Stored Products Research*, 44(2): 198–203.
- Li CJ, Wang YY, Liu X, Sang M, Li B, 2011. Progresses in research on the functional genomics on *Tribolium castaneum*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1544–1552. [李承军, 王艳允, 刘幸, 桑明, 李斌, 2011. 赤拟谷盗功能基因组学研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1544–1552.]
- Liang YT, Liu YC, Gao Y, Wang HB, Xu YS, 2018. Diversity analysis on gut microbiota of *Glyphodes pyloalis* (Walker) under high temperature. *Journal of Zhejiang University*, 44(2): 215–222. [梁燕婷, 刘云财, 高云, 王华兵, 徐豫松, 2018. 高温条件下桑螟肠道微生物的多样性分析. 浙江大学学报, 44(2): 215–222.]
- Liu XG, 2017. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the intestine of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Master dissertation. Chongqing: Southwest University. [刘小改, 2017. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落组成与多样性分析. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Mei C, Fan S, Yang H, 2018. The strategies of isolation of insect gut microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica*, 58(6): 985–994. [梅承, 范硕, 杨红, 2018. 昆虫肠道微生物分离培养策略及研究进展. 微生物学报, 58(6): 985–994.]
- Opit GP, Phillips TW, Aikins MJ, Hasan MM, 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma. *Journal of Economic Entomology*, 105(4): 1107–1114.
- Patil VS, Salunkhe RC, Patil RH, Hussenseder C, Shouche YS, Ramana VV, 2015. *Enterobacillus tribolii*. gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Enterobacteriaceae, isolated from the gut of a red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(5): 1207–1216.
- Su MM, Guo L, Tao YL, Zhang Y, Wan FH, Chu D, 2016. Effects of host plant factors on the bacterial communities associated with two whitefly sibling species. *PLoS ONE*, 11(3): e0152183.
- Wang Y, 2019. The effect of gut microbiota in chemical communication of *Tribolium castaneum*. Master thesis. Zhengzhou: Henan University of Technology. [王洋, 2019. 肠道微生物对赤拟谷盗化学通讯的影响研究. 硕士学位论文. 郑州: 河南工业大学.]
- Yang XQ, Wang ZL, Wang TZ, Yu XP, 2018. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) by 16S rRNA high-throughput sequencing. *Acta Entomologica Sinica*, 61(2): 200–208. [杨晓晴, 王正亮, 王天召, 俞晓平, 2018. 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. 昆虫学报, 61(2): 200–208.]