



•编者按•

运用基因组学方法探究生物多样性： 大数据时代的“胡克显微镜”

周 欣*

(中国农业大学植物保护学院昆虫学系, 北京 100193)

Understanding biodiversity using genomics: Hooke's microscope in the era of big data

Xin Zhou*

Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193

对生物多样性的好奇和欣赏是人类认识自然的重要动力,而以探究和描述生物多样性为主要内容的分类学也是生命科学发展史上最早的分支学科之一。生物多样性为人类发展提供了基础和资源,为生命机理的认知提供了模型,也为维持可持续发展的生态系统提供了重要的服务功能。

分类学是生物多样性研究的基础,是我们分析多样性组成、度量多样性变化、评价生态系统质量的核心工具。分类学使用生物固有的特征(traits)来进行物种的界定(species delineation),同时根据物种的定义进行物种鉴定(species identification)。自林奈建立现代分类学体系后(Linnaeus, 1758),研究者得以在一个稳定有序的方法系统内对物种的定义进行验证和修订,成就了近300年来分类学以及生物多样性知识体系的持续性积累。应该说,林奈分类学系统是一个经历了时间考验的科学框架,实现了跨类群、跨学科的分类名称标准化。例如,在林奈系统下,发育生物学家基于模式昆虫黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)来理解微小RNA在发育中的作用机理,而进化生物学家得以研究这一机理在果蝇属甚至昆虫纲中的普适性和演化历史(Belles, 2017)。更重要的是,林奈系统对新方法、新证据具有强大的兼容性。随着科学技术的迅速发展,可用于分类学的特征从单一的外部形态学扩展到包括

内部器官结构、染色体特征、核酸/蛋白/小分子序列、生理学等生物学或生态学特征的综合性证据。而这些整合分类学特征均可以统一在林奈分类系统下,使得研究者不需要各自独创一套新的分类体系,而是可以在同一系统中不断完善物种的定义。

在此大背景之下,研究者认识到各种生物特征在界定物种和认知生物多样性方面均存在自身的优势和局限性。经典的形态分类学在特定的场景下遇到了较大的挑战,例如同一种的不同形态(如真菌的孢子和子实体,昆虫的不同生活史阶段)或生物体残片等。针对上述问题,分子分类学(DNA taxonomy)应运而生。核酸序列既是生物遗传信息的载体,也是新性状产生的重要基础,因而在演化过程中既具有一定的保守性,也具有较强的类群特异性。这个特性很自然地使分类学家作为新的分类学特征应用于物种鉴定当中。耐人寻味的是,微生物(真菌、细菌、病毒等)的形态分类本身存在较大的困难,这可能是促成分子分类及分子系统发育方法(如16S rRNA基因)最早在该类群应用的主要原因(Woese & Fox, 1977)。

近十几年来,在真核生物分子分类学领域最突出的进展是国际DNA条形码项目(International Barcode of Life)的建立和实施(Hebert et al, 2003)。这项由全球科学家参与的大型国际合作使用标准

收稿日期: 2019-05-13; 接受日期: 2019-05-13

基金项目: 科技基础资源调查专项(2018FY100403)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xinzhoucaddis@icloud.com

化的DNA序列(DNA条形码)进行跨类群的物种研究,其核心数据库BOLD (Barcode of Life Databases) (Ratnasingham & Herbert, 2007)已包含700多万条条形码序列,涉及近60万物种级别的分类单元(www.boldsystems.org,截至2019年5月)。在统一的国际标准下,DNA条形码允许研究者对有研究基础的、生态系统中常见的动植物物种进行鉴定,并且对分类学和基于分类数据的应用科学产生了巨大的推动作用。我国DNA条形码研究的发展与国际保持同步,近年来在相关应用方面也取得了长足的进步(参见《生物多样性》2015年第3期“DNA条形码应用进展专题”的总结)。作为新的特征证据,DNA条形码在为物种鉴定提供方法的同时,也起到了搭建分类学知识桥梁的关键作用。它通过林奈双名法系统,将具有物种特异性的分子序列与该物种相关的生物学知识关联起来。在构建条形码参考数据库的过程中,这个关键步骤是在分类学家的支撑和监督指导下完成的,这也为分子分类学走向高通量混合体系生物分类奠定了重要基础。

尽管以DNA条形码为代表的分子分类学取得了重要进展,但该方法在生物多样性的实际研究和应用中存在明显的局限性。一方面,生物多样性研究中采集的大部分样本是由多物种组成的,而DNA条形码的核心技术则建立在单一生物样本的分析基础之上,包括样本的分拣、DNA的提取、扩增和测序等。而生物群落的自然分布及定植状态通常不利于单个样本的分离(如土壤动物群落,肠道菌群等),这就极大地限制了条形码技术在复杂生态样本分析中的应用(Hajibabaei et al, 2011)。另一方面,环境中存在大量游离DNA,这些核酸物质包含了该环境的生物多样性组成信息,而核酸样本的分离在操作上则更加困难(Creer et al, 2016)。相比之下,高通量测序技术(high-throughput sequencing)可以同时大量的核酸片段进行测序,并通过生物信息分析对测序的结果进行序列的拆分和物种鉴定,较好地应对了环境混合生物多样性研究的挑战(Zhou et al, 2013)。

为了及时地反映我国在本领域的研究进展和科研热点,《生物多样性》期刊特组织了本期“生物多样性基因组学专辑”,由9篇论文组成,包括6篇综述和3篇研究论文。

目前,使用环境游离DNA (environmental DNA,

eDNA)进行群落多样性分析最能体现多样性组学技术的优势,也是最早开展的系列研究之一。由于eDNA主要是由生物释放到环境中的DNA组成的,检测eDNA样品具有非损伤性采样的优势(即无需采集生物样本本身),在很大程度上避免了对生物群落的干扰,也有利于检测较为隐蔽的类群。基于eDNA的宏条形码(eDNA metabarcoding)被广泛应用于水体(Fronhofer et al, 2018)和土壤群落(Bahram et al, 2018)的多样性监测研究中,并可以与已有的环境监测(environment monitoring)方法较好地契合。在淡水生态系统中,利用大型底栖无脊椎动物多样性的组成和动态变化进行水体质量评估,是水生态研究与应用中的关键步骤。在本专辑中,李萌等(2019)综述了环境DNA技术在这一领域的应用潜力及进展,强调了eDNA技术对于摸清我国水体生态系统多样性组成的重要性。由于高通量测序技术具有较高的灵敏性,该方法对于目标物种的检测具有明显的优势,比如从环境样本中排查是否存在入侵或检验检疫有害物种等。李晗溪等(2019)针对水生生态系统入侵生物的早期监测与预警论述了eDNA和宏条形码技术结合的应用前景,以及引物选择、数据准确性、参考数据库完整性等的影响。李诣远等(2019)建立了宏条形码分析的自动化流程EPPS,将基于eDNA的多样性分析进一步简化,降低了操作分析的难度,并有利于在不同研究之间进行结果共享。

高通量分子分类方法的另一个重要的应用领域是生态网络的分析和构建。在动物(如肉食动物、草食动物、吸血节肢动物等)的食性分析中(Calvignac-Spencer et al, 2013; De Barba et al, 2014),肠道内容物的准确鉴定是构建食物网络的关键环节。多样性组学分析方法可以提供可靠的食物组成信息,很好地解决了消化过程对食物形态特征破坏的问题。与此类似,多样性组学分析方法也有助于研究传粉动物的携粉组成(Bell et al, 2018; 郎丹丹等, 2018),为传粉网络的构建提供关键信息。在本专辑中,邵昕宁等(2019)使用宏条形码技术分析了川西高原的7种食肉动物的食性组成,发现狼(*Canis lupus*)、狗(*C. lupus familiaris*)、棕熊(*Ursus arctos*)、豹猫(*Prionailurus bengalensis*)等在捕食种类上存在共性与一定的分化,积累了基础数据,并有针对性地讨论了与保护生物学相关的问题,如野生动物与

人类社会建设的相关性等。

微生物多样性研究的进展在很大程度上得益于技术方法的进步。300多年前, 胡克基于显微镜的观察结果发表了经典著作*Micrographia* (Hooke, 1665), 将生命科学带入微观世界。而分子分类学, 特别是高通量测序方法对于微生物研究的意义, 可以类比为显微镜对于微生物学的贡献, 让我们从核酸水平重新认知微生物多样性。近期基于高通量测序技术的环境微生物研究揭示, 在海洋(Sunagawa et al, 2015)、土壤(Thompson et al, 2017; Bahram et al, 2018)以及无脊椎动物宿主(Shi et al, 2016)中均存在大量无法用经典方法检测到的细菌和病毒多样性。围绕人类肠道菌群的研究也取得了突飞猛进的发展, 组学研究揭示了大量未知的菌类多样性, 并逐步证明肠道微生态系统对宿主具有重要的功能作用(Qin et al, 2010)。与此类似, 小鼠(Xiao et al, 2015)、猪(Xiao et al, 2016)和蜜蜂(Zheng et al, 2018)等模式动物的肠道菌群研究也取得了突破, 为理解宿主-共生微生物的关系提供了更广泛的模式平台。在本专刊中, 肖雅倩等(2019)综述了模式动物中共生微生物研究的进展, 包括斑马鱼、小鼠、猪和猕猴等, 并强调了宏基因组等新方法对于本领域的推动作用。唐敏等(2019)则探讨了景观环境通过肠道微生物系统对传粉蜜蜂产生影响的可能性, 提出肠道宏基因组学将有助于揭示环境-宿主之间新的互作机制。

目前大部分基于基因组学技术的多样性分析方法依赖于较短的DNA参考序列进行物种鉴定, 比如线粒体或叶绿体标准条形码序列的部分片段, 以及16S rRNA基因的部分区域等。这些方法的优势是可以充分利用现有的参考数据库(如DNA条形码)进行多样性分析, 并通过针对靶标片段的扩增获取大量扩增子产物, 减少了对样本量的要求。显而易见, 标准条形码数据库的构建对于高通量分子分类的准确性至关重要, 准确到物种的多样性组成信息使生物群落的组成单位不再是人为定义的可操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU), 而是具备生物学特征的进化单元。随之而来的是针对关键类群的DNA参考数据库的不断完善。在本专刊中, 张雪等(2019)构建了更为完整的蜜蜂核心肠道菌16S rRNA基因数据库, 补充了东方蜜蜂(*Apis cerana*)核心菌*Apibacter*等的序列, 对蜜蜂肠道微生物数据库

进行了优化。同时, 基于高通量测序技术构建标准DNA条形码数据库的方法(刘山林, 2019)在降低分析成本的同时, 也克服了二代测序技术读长(read length)短的缺点, 有助于进一步提高标准DNA条形码参考数据库的完整性。另一方面, 近期的相关研究扩展了高通量分子分类研究中可用于分类的参考序列的范围, 例如使用全长16S基因(Karst et al, 2018)、全线粒体(Crampton-Platt et al, 2016)、全叶绿体(Lang et al, 2018)甚至全基因组进行物种分类(Hollingsworth et al, 2016)。在本专刊中, 许亚昆等(2019)小结了近期基于三代测序技术的微生物组学的技术和研究进展, 指出长读长高通量测序可提高菌群多样性的分析效率, 甚至可以揭示表观修饰等遗传特征。

一系列新方法特别是基于高通量测序技术的新流程, 大大降低了基因组级别数据库构建的门槛, 为更高效地利用DNA序列进行分类研究创造了条件。值得关注的是, 我国学者近期在动植物物质基因组研究领域取得了一系列令人瞩目的进展, 基于线粒体基因组的昆虫系统发育研究(Song et al, 2016; Wang et al, 2016; Nie et al, 2017; Tang et al, 2019)和基于叶绿体基因组的植物系统发育研究(Li et al, 2019)都为未来分子分类学的升级提供了重要的数据和方法学基础。而基于宏基因组(metagenomics)的分析将有助于在功能基因的遗传多样性维度上来理解生物多样性组成。

从生物类群和生境类型的研究范畴来看, 我国目前的生物多样性组学应用主要集中在水体多样性、动物食性分析、模式动物肠道菌群研究和物种互作的工作中。我们期待, 随着相关研究方法的成熟和推广, 基于高通量测序技术的多样性分析将成为群落生态学研究、生态网络构建、生态环境监测、检验检疫应用、与健康相关的微生物学等领域的常规分析手段。而本领域未来的主要挑战可能来自生物样本采集和保存方法的优化, 以及生物大数据分析方法的流程化、标准化等。这些都为生物多样性科学研究在大数据时代产生新的概念、理论和方法体系提供了新的发展机遇。

参考文献

- Bahram M, Hildebrand F, Forslund SK, Anderson JL, Soudzilovskaia NA, Bodegom PM, Bengtsson-Palme J,

- Anslan S, Coelho LP, Harend H (2018) Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature*, 560, 233–237.
- Bell KL, Burgess KS, Botsch JC, Dobbs EK, Read TD, Brosi BJ (2018) Quantitative and qualitative assessment of pollen DNA metabarcoding using constructed species mixtures. *Molecular Ecology*, 28, 431–455.
- Belles X (2017) MicroRNAs and the evolution of insect metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 62, 111–125.
- Calvignac-Spencer S, Leendertz FH, Gilbert MTP, Schubert G (2013) An invertebrate stomach's view on vertebrate ecology. *BioEssays*, 35, 1004–1013.
- Crampton-Platt A, Yu DW, Zhou X, Vogler AP (2016) Mitochondrial metagenomics: Letting the genes out of the bottle. *GigaScience*, 5, 15.
- Creer S, Deiner K, Frey S, Porazinska D, Taberlet P, Thomas WK, Potter C, Bik HM (2016) The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 1008–1018.
- De Barba M, Miquel C, Boyer F, Mercier C, Rioux D, Coissac E, Taberlet P (2014) DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: Application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources*, 14, 306–323.
- Fronhofer EA, Chler EMA, Walser JC, Deiner K, Altermatt F (2018) Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 7, 12544.
- Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer GAC, Baird DJ (2011) Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE*, 6, e17497.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hollingsworth PM, Li DZ, Van der Bank M, Twyford AD (2016) Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150338.
- Hooke R (1665) *Micrographia: Or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries Thereupon*. Courier Dover Publications. John Martyn and James Allestry, London.
- Karst SM, Dueholm MS, McIlroy SJ, Kirkegaard RH, Nielsen PH, Albertsen M (2018) Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias. *Nature Biotechnology*, 36, 190–195.
- Lang D, Tang M, Hu J, Zhou X (2018) Genome-skimming provides accurate quantification for pollen mixtures. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/408039>.
- Lang DD, Tang M, Zhou X (2018) Qualitative and quantitative molecular construction of plant–pollinator network: Application and prospective. *Biodiversity Science*, 26, 445–456. (in Chinese with English abstract) [郎丹丹, 唐敏, 周欣 (2018) 传粉网络构建的定性定量分子研究: 应用与展望. 生物多样性, 26, 445–456.]
- Li HT, Yi TS, Gao LM, Ma PF, Zhang T, Yang JB, Gitzen-danner MA, Fritsch PW, Cai J, Luo Y, Wang H, Bank M, Zhang SD, Wang QF, Wang J, Zhang ZR, Fu CN, Yang J, Hollingsworth PM, Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Li DZ (2019) Origin of angiosperms and the puzzle of the Jurassic gap. *Nature Plants*, 5, 461–470.
- Li HX, Huang XN, Li SG, Zhan AB (2019) Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems. *Biodiversity Science*, 27, 491–504. (in Chinese with English abstract) [李晗溪, 黄雪娜, 李世国, 战爱斌 (2019) 基于环境DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警. 生物多样性, 27, 491–504.]
- Li M, Wei TT, Shi BY, Hao XY, Xu HG, Sun HY (2019) Biodiversity monitoring of freshwater benthic macroinvertebrates using environmental DNA. *Biodiversity Science*, 27, 480–490. (in Chinese with English abstract) [李萌, 尉婷婷, 史博洋, 郝希阳, 徐海根, 孙红英 (2019) 环境DNA技术在淡水底栖大型无脊椎动物多样性监测中的应用. 生物多样性, 27, 480–490.]
- Li YY, Molik DC, Pfreder ME (2019) EPPS, a metabarcoding bioinformatics pipeline using Nextflow. *Biodiversity Science*, 27, 567–575. (in Chinese with English abstract) [李诣远, Molik DC, Pfreder ME (2019) 基于Nextflow构建的宏条形码自动化分析流程EPPS. 生物多样性, 27, 567–575.]
- Linnaeus C (1758) *Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis* (in Latin), 10th edn. Laurentius Salvius, Stockholm.
- Liu SL (2019) DNA barcoding and emerging reference construction and data analysis technologies. *Biodiversity Science*, 27, 526–533. (in Chinese with English abstract) [刘山林 (2019) DNA条形码参考数据集构建和序列分析相关的新兴技术. 生物多样性, 27, 526–533.]
- Nie RE, Breeschoten T, Timmermans MJTN, Nadein K, Xue HJ, Bai M, Huang Y, Yang XK, Vogler AP (2017) The phylogeny of Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) and the performance of mitochondrial genomes in phylogenetic inference compared to nuclear rRNA genes. *Cladistics*, 34, 113–130.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O,

- Parkhill J, Weissenbach J, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere H, Borruel N, Bruls T, Casellas F, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Forte M, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Jamet A, Juste C, Kaci G, Kleerebezem M, Knol J, Kristensen M, Layec S, Le Roux K, Leclerc M, Maguin E, Melo Minardi R, Oozeer R, Rescigno M, Sanchez N, Tims S, Carlsen T, Varela E, de Vos W, Winogradsky Y, Zoetendal E, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364.
- Shao XN, Song DZ, Huang QW, Li S, Yao M (2019) Fast surveys and molecular diet analysis of carnivores based on fecal DNA and metabarcoding. *Biodiversity Science*, 27, 543–556. (in Chinese with English abstract) [邵昕宁, 宋大昭, 黄巧雯, 李晟, 姚蒙 (2019) 基于粪便DNA及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析. *生物多样性*, 27, 543–556.]
- Shi M, Lin XD, Tian JH, Chen LJ, Chen X, Li CX, Qin XC, Li J, Cao JP, Eden JS, Buchmann J, Wang W, Xu JG, Holmes EC, Zhang YZ (2016) Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540, 539–543.
- Song F, Li H, Jiang P, Zhou X, Liu J, Sun C, Vogler AP, Cai W (2016) Capturing the phylogeny of Holometabola with mitochondrial genome data and Bayesian site-heterogeneous mixture models. *Genome Biology and Evolution*, 8, 1411–1426.
- Sunagawa S, Coelho LP, Chaffron S, Kultima JR, Labadie K, Salazar G, Djahanschiri B, Zeller G, Mende DR, Alberti A (2015) Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348, 1261359.
- Tang M, Zou Y, Su QZ, Zhou X (2019) A new perspective on landscape impact in bee populations: Considering the bee gut microbiome. *Biodiversity Science*, 27, 516–525. (in Chinese with English abstract) [唐敏, 邹怡, 苏秦之, 周欣 (2019) 洞察景观环境影响蜜蜂之新视角: 肠道微生物. *生物多样性*, 27, 516–525.]
- Tang P, Zhu JC, Zheng BY, Wei SJ, Sharkey M, Chen XX, Vogler AP (2019) Mitochondrial phylogenomics of the Hymenoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 131, 8–18.
- Thompson LR, Sanders JG, McDonald D, Amir A, Ladau J, Locey KJ, Prill RJ, Tripathi A, Gibbons SM, Ackermann G (2017) A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551, 457–463.
- Wang Y, Liu X, Garzón-Orduña IJ, Winterton SL, Yan Y, Aspöck U, Aspöck H, Yang D (2016) Mitochondrial phylogenomics illuminates the evolutionary history of Neuropterida. *Cladistics*, 33, 617–636.
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 5088–5090.
- Xiao L, Estellé J, Kiilerich P, Ramayo-Caldas Y, Xia Z, Feng Q, Liang S, Pedersen AO, Kjeldsen NJ, Liu C, Maguin E, Doré J, Pons N, Le Chatelier E, Prifti E, Li J, Jia H, Liu X, Xu X, Ehrlich SD, Madsen L, Kristiansen K, Rogel-Gaillard C, Wang J (2016) A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology*, 1, 16161.
- Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne SB, Xia Z, Qiu X, Li X, Long H, Zhang J, Zhang D, Liu C, Fang Z, Chou J, Glanville J, Hao Q, Kotowska D, Colding C, Licht TR, Wu D, Yu J, Sung JJY, Liang Q, Li J, Jia H, Lan Z, Tremaroli V, Dworzynski P, Nielsen HB, Bäckhed F, Doré J, Le Chatelier E, Ehrlich SD, Lin JC, Arumugam M, Wang J, Madsen L, Kristiansen K (2015) A catalog of the mouse gut metagenome. *Nature Biotechnology*, 33, 1103–1108.
- Xiao YQ, Liu C, Xiao L (2019) The role of model animals in the study of symbiotic microorganisms. *Biodiversity Science*, 27, 505–515. (in Chinese with English abstract) [肖雅倩, 刘传, 肖亮 (2019) 模式动物在共生微生物研究中的作用. *生物多样性*, 27, 505–515.]
- Xu YK, Ma Y, Hu XX, Wang J (2019) Analysis of prospective microbiology research using third-generation sequencing technology. *Biodiversity Science*, 27, 534–542. (in Chinese with English abstract) [许亚昆, 马越, 胡小茜, 王军 (2019) 基于三代测序技术的微生物组学研究进展. *生物多样性*, 27, 534–542.]
- Zhang X, Li XA, Su QZ, Cao QN, Li CY, Niu QS, Zheng H (2019) A curated 16S rRNA reference database for the classification of honeybee and bumblebee gut microbiota. *Biodiversity Science*, 27, 557–566. (in Chinese with English abstract) [张雪, 李兴安, 苏秦之, 曹棋钠, 李晨伊, 牛庆生, 郑浩 (2019) 用于蜜蜂和熊蜂肠道微生物分类的细菌16S rRNA数据库优化. *生物多样性*, 27, 557–566.]
- Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EVS, Moran NA (2018) Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47, 317–325.
- Zhou X, Li Y, Liu S, Yang Q, Su X, Zhou L, Tang M, Fu R, Li J, Huang Q (2013) Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. *GigaScience*, 2, 4.

(责任编辑: 周玉荣)