

灰飞虱体内类酵母共生菌异常毕赤酵母的分离培养及其对杀菌剂的敏感性

曹伟, 马正, 俞晓平*

(中国计量学院生命科学学院, 浙江省生物计量与检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】随着杀虫剂等化学农药的大规模使用,灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 的抗性不断增强,防治效果下降,因此寻找新的防治方法尤为重要。本研究探索使用杀菌剂来减少灰飞虱体内共生菌的数量,以降低灰飞虱的活力,为“抑菌防虫”提供理论依据。【方法】对灰飞虱体内的类酵母共生菌(yeast-like symbiotes, YLS)进行离体培养并鉴定,测定离体培养 YLS 对不同浓度不同种类杀菌剂的敏感性,将对其抑制作用明显的杀菌剂喷施于麦苗,待灰飞虱取食后统计灰飞虱死亡率、体重,并通过荧光定量 PCR 检测体内共生菌的数量变化。【结果】离体培养得到 1 株 YLS,经碳源同化实验和 18S rDNA 分子鉴定,将该菌株归为异常毕赤酵母 *Pichia anomala*,以变性梯度凝胶电泳(denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术验证了该菌株在灰飞虱体内的存在。对杀菌剂敏感性的测定结果显示,70% 丙森锌和 50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯对 *P. anomala* 抑制效果明显,而氟吡菌胺 + 霜霉威盐酸盐(687.5 g a. i. / L)与 40% 啞霉胺对 *P. anomala* 的抑制效果较差。用对 *P. anomala* 抑制效果明显的两种杀菌剂(70% 丙森锌和 50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯)以 800 mg/L 浓度喷施麦苗,灰飞虱取食喷施麦苗后的死亡率分别达到 46.7% 与 63.3%,显著高于对照,而体重比对照组显著低。荧光定量检测结果表明,灰飞虱体内 3 种共生菌(*Noda* 菌、季也蒙毕赤酵母和异常毕赤酵母)的数量在使用了各种杀菌剂后均显著降低。【结论】结果说明,体外喷施杀菌剂对灰飞虱体内共生菌有抑制作用,进而对灰飞虱的生长存活产生影响,这为杀菌剂与杀虫剂的协同使用防治灰飞虱奠定基础。

关键词: 灰飞虱; 异常毕赤酵母; 离体培养; 杀菌剂; 生物防治; 变性梯度凝胶电泳

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2015)03-0271-10

Isolation and sensitivity to fungicides of the yeast-like symbiont *Pichia anomala* (Hemiascomycetes: Saccharomycetaceae) from *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae)

CAO Wei, MA Zheng, YU Xiao-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: 【Aim】 With the extensive application of chemical pesticides, the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* has increased its resistance to pesticides so that the control effect of pesticides on *L. striatellus* is weakened. Therefore it is crucial to explore a new method for controlling this pest. In this study, we attempt to inhibit the abundance of symbiotes inside *L. striatellus* by fungicides to weaken the vitality of this pest, so as to provide a theoretical foundation for controlling *L. striatellus* through inhibiting yeast-like symbiont (YLS). 【Methods】 The yeast-like symbiont was isolated from *L. striatellus* via *in vitro* culture and the susceptibility of the isolated YLS to different concentrations of fungicides was examined. The fungicides with apparently higher ability to inhibit the growth of YLS were applied on wheat seedlings used for feeding *L. striatellus*. The mortality and body weight of *L. striatellus* adults were measured and the variation of the amount of YLS inside *L. striatellus* was examined through real-time florescent quantitative PCR. 【Results】 A strain of YLS was successfully isolated and identified as *Pichia anomala* based on the corresponding carbon assimilation experiment and 18S rDNA phylogenetic analysis. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) result further confirmed the existence of this strain in *L.*

基金项目: 国家重大基础研究规划(“973”计划)项目(2012CB114100); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2012AA021601)

作者简介: 曹伟, 男, 1989 年生, 陕西西安人, 硕士研究生, 研究方向为农业病虫害的生物防治, E-mail: visityc@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yuxiaoping19630306@163.com

收稿日期 Received: 2014-10-27; 接受日期 Accepted: 2015-03-05

striatellus. The test results of sensitivity to fungicides indicated that 70% propineb and 50% tebuconazole + 25% trifloxystrobin had obvious inhibitory effects on the growth of *P. anomala* while fluopicolide + propamocarb hydrochloride (687.5 g a. i. /L) and 40% pyrimethanil had relatively less inhibitory effects on the growth of *P. anomala*. When two fungicides (70% propineb and 50% tebuconazole + 25% trifloxystrobin with obvious inhibitory effect were applied on wheat seedlings at the concentration of 800 mg/L, the mortality of *L. striatellus* adults feeding the treated wheat seedlings reached 46.7% and 63.3%, respectively, which was apparently higher than that of the control group, and the body weight of *L. striatellus* adults in the treatment group was also less than that of the control group. Real-time fluorescent quantitative PCR results indicated that the amount of YLS of three strains (*Hypomyces chrysospermus*, *Pichia guilliermondii*, and *P. anomala*) inside *L. striatellus* dropped sharply after different fungicides were applied. 【Conclusion】 The results suggest that the fungicides applied *in vitro* on *L. striatellus* have inhibitory effects on their YLS, thus impacting the survival of *L. striatellus*, and this validates the feasibility of “reduction in use of pesticides through use of fungicides” strategy in controlling *L. striatellus*.

Key words: *Laodelphax striatellus*; *Pichia anomala*; *in vitro* culture; fungicide; biological control; denatured gradient gel electrophoresis (DGGE)

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 属于半翅目 (Hemiptera) 飞虱科 (Delphacidae), 是一种重要的农业害虫, 除以刺吸危害水稻、大麦、小麦等作物外, 还传播水稻条纹叶枯病、水稻黑条矮缩病和玉米粗缩病等病毒, 造成巨大产量损失 (丁锦华和苏建亚, 2001)。目前对灰飞虱的防治主要采用化学杀虫剂。但由于长期大量和不合理的使用杀虫剂, 导致灰飞虱对很多杀虫剂产生了不同程度的抗性 (王彦华等, 2010), 而人们为提高杀虫效果则不断加大杀虫剂的使用剂量, 如此形成恶性循环, 不仅飞虱难以得到防治, 同时对环境和非靶标生物产生了严重的危害。因此寻找新的防治途径, 有效减少化学杀虫剂的使用是灰飞虱防治的关键。

研究发现类酵母共生菌 (yeast-like symbiotes, YLS) 存在于飞虱腹部脂肪体中, 已有报道它与褐飞虱的氨基酸代谢 (Koyama, 1985) 及营养提供息息相关 (Lee and Hou, 1987), 对褐飞虱的生长、发育、繁殖、致害性变化等方面起到重要作用 (吕仲贤等, 2001a, 2001b)。由此陈列忠等 (2006) 提出了“抑菌防虫”的新思路, 即通过抑制飞虱体内的共生菌, 降低飞虱的活力及耐药性, 并对其前景及可行性进行了讨论。已有研究发现, 经过高温处理后的灰飞虱, 其体内的共生菌数量明显减少, 最终导致灰飞虱的耐药性减弱 (张晓婕等, 2008)。研究发现杀菌剂对褐飞虱体内共生菌有较大的抑制作用 (陈建明等, 2009), 且对褐飞虱 2、3 龄若虫杀伤作用明显 (陈建明等, 1998), 并且杀菌剂相比杀虫剂具有毒性低、对菌株靶标性强等特点, 因此, 杀菌剂与杀虫

剂的协同使用将成为防治飞虱的一种新途径, 在不影响杀虫效果甚至提高杀虫效果的情况下, 将大大减少化学杀虫剂的使用。但杀菌剂的筛选还缺少理论依据, 同时杀菌剂对灰飞虱及其体内共生菌直接影响的相关研究也未见报道。

明确灰飞虱体内共生菌的多样性, 以及共生菌的离体培养及生理特性的研究是实现灰飞虱“抑菌防虫”的关键。陈法军等 (2006) 通过冷冻切片和显微观察初步认为, 灰飞虱体内存在多种 YLS; 本研究组前期通过分子检测生物学技术证明灰飞虱体内存在 YLS, 如 Noda 菌 *Hypomyces chrysospermus* 和季也蒙毕赤酵母菌 *Pichia guilliermondii* 的存在 (白旭等, 2010)。由于人们很难模拟昆虫体内的微环境, 因此 YLS 的离体培养非常困难。Kusumi 等 (1979) 曾离体培养得到几株灰飞虱 YLS, 但未见对其进行准确鉴定和特性研究。

本实验从灰飞虱体内成功分离培养得到了一株 YLS, 通过 18S rDNA 分子鉴定将其归为异常毕赤酵母 *Pichia anomala*, 并运用变性梯度凝胶电泳 (denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术对灰飞虱体内存在的 YLS 种类做了初步鉴定, 同时验证了异常毕赤酵母在灰飞虱体内存在的真实性。该技术在研究微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性 (Muyzer *et al.*, 1993), 在鉴定褐飞虱体内共生菌多样性中已得到较好的应用 (Hou *et al.*, 2013)。本实验对该菌株的生理生化特性以及对不同浓度下不同种类杀菌剂的敏感性进行了研究, 筛选抑制作用明显的杀菌剂喷施麦苗, 待飞

物技术有限公司测序,测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索。

1.6.4 序列分析与系统进化树的构建:采用 Clustal X (1.83)将测序获得的 18S rDNA 序列与其他相近种的 18S rDNA 序列进行多重对比,之后用 MEGA (4.1)软件采用邻近距离 (Neighbor-Joining) 算法构建进化树,以 Noda 菌 *H. chrysospermus* 为外源物种,用自展法 (Bootstrap) 生成 1 000 个自展数据集。

1.7 灰飞虱体内 YLS 的 DGGE 分析

1.7.1 灰飞虱体内总 YLS 基因组的提取:提取方法参照侯云 (2013) 并有所改动:取刚羽化的雌成虫 100 头,75% 的酒精表面消毒 3 次,每次 3 min,无菌水漂洗 3 次,每次 3 min。剖取腹部脂肪体,75% 酒精消毒、无菌水漂洗,然后用终浓度为 30% 的 percoll,7 000 r/min 离心 10 min,去上层杂蛋白和脂肪,下层沉淀用终浓度为 75% percoll,10 000 r/min 超速离心 2 min,75% 层的絮状物即为类酵母共生菌,用酵母基因组 DNA 试剂盒提取基因组。

1.7.2 巢式 PCR:第一轮 PCR:以上述提取基因组为模板,扩增 18S rDNA-5.8S rDNA-ITS 序列全长,扩增引物为通用引物 NS1/ITS4,扩增体系及条件同 1.6.2 节。巢式 PCR:将 PCR 产物 1:100 稀释后作为模板,扩增引物为通用引物 NFGC/NR,ITS3GC/ITS4,分别扩增 18S rDNA,ITS 序列中的一段,为了提高 DGGE 的检测效率,在上游引物的 5' 端加 40 个碱基的 GC 夹子,序列见表 1。扩增体系同第一轮 PCR,扩增条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。扩增完成后,取 5 μL PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7.3 变性梯度凝胶电泳 (DGGE):制备浓度为 8% 的聚丙烯酰胺 (丙烯酰胺:双丙烯酰胺 = 37.5:1, v/v),变性范围:20% ~ 50%,取 10 μL 巢式 PCR 产物加 2 μL 6 × loading buffer 混合上样,电泳条件为 60℃,80 V,12.5 h。电泳后进行银染参考梁宏伟等 (2008)。将凝胶上的可见特征条带切割下并回收至 1.5 mL Eppendorf 管中标记,无菌水漂洗几次后,捣碎,加 50 μL 无菌水,4℃ 过夜,短暂离心,收集上清液为模板扩增,所用引物、体系、程序同巢式 PCR,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。目的条带测序同 1.6.3 节。

1.8 不同杀菌剂对共生菌的抑制作用

测定 4 种供试杀菌剂对离体培养 YLS 的抑制作用。配制 YPD 培养基 (20 mL/150 mL 锥形瓶),灭菌

后待其冷却至 45℃,在无菌操作台中用移液枪加入与所需浓度相应体积的杀菌剂,混匀后倒入无菌培养皿,待培养基凝固后取 100 μL 离体培养 YLS 菌液涂布于培养基上。将培养皿用封口膜密封好后于 28℃ 恒温培养箱进行培养,分别于第 1,2 和 3 天后观察菌落生长情况并记录。每个处理分别设置 3 个重复。

1.9 不同杀菌剂对灰飞虱死亡率及体重的影响

杀虫剂吡虫啉按最小推荐浓度 40 mg/L 配制,杀菌剂采用 400 和 800 mg/L 两个浓度。在 18 mm × 180 mm 玻璃试管中进行,每个试管中放入 2 株喷洒过农药的麦苗,并加入 10 头刚羽化的雌成虫,用双层纱布封口,放置于人工气候箱中饲养,以喷洒水为空白对照,每组 3 个重复。在 1 ~ 5 d 内,每天对每管中灰飞虱的死亡率进行统计。第 5 天,将每管中剩余活虫称重统计,取平均值。之后,每个处理取 10 头活虫提取体内 YLS 基因组,解剖收集其脂肪体后直接用酵母基因组 DNA 提取试剂盒进行提取,用于 YLS 的绝对荧光定量 PCR 实验。

1.10 绝对荧光定量 PCR 对灰飞虱体内 YLS 数量的测定

1.10.1 质粒标准品的构建:通过 Primers 5 和 Oligo7 软件针对 3 种灰飞虱共生菌,包括 Noda 菌 *H. chrysospermus*,季也蒙毕赤酵母 *P. guilliermondii* 和异常毕赤酵母 *P. anomala* 设计了特异的荧光引物,分别为 HF/HR, MF/MR, PF/PR (表 1),并以刚羽化雌成虫共生菌的基因组为模板,进行普通 PCR,筛选荧光引物以及确定 qPCR 的最佳退火温度。将扩增得到的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上,然后将已连接有目的片段的质粒导入 *E. coli* JM109 感受态中,重组质粒的筛选与鉴定同 1.6.3 节,质粒浓度的测定参考 Whelan 等 (2003)。

1.10.2 3 种共生菌的 qPCR 测定:将标准质粒进行 10 倍梯度稀释,每个标准品稀释 6 个梯度,以稀释倍数的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标,分别获得 3 个质粒标准品的标准曲线。以 1.7 节提取的共生菌基因组为模板,扩增体系如下:SYBR Green Mix 12.5 μL,模板 2 μL,引物各 0.5 μL,加 ddH₂O 补齐至 25 μL。反应程序为:94℃ 预变性 1 min;94℃ 变性 10 s,57℃ (Noda 菌) 或 56℃ (季也蒙毕赤酵母) 或 55℃ (异常毕赤酵母) 退火 30 s,40 个循环。

1.11 数据分析

灰飞虱在不同农药下死亡率及体重的数据统计采用 Microsoft Excel 2010 与 DPS v7.05 软件,不同组间进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),以

LSD 算法进行多重比较分析差异显著性,有显著差异($P < 0.05$),极显著差异($P < 0.01$)。所有数据均用平均数 \pm 标准差表示。对灰飞虱死亡率、体重及其体内共生菌数量相关性的分析采用软件 SPSS Statistics v19.0,以 Pearson 算法,双变量 T 检验分析。用 Microsoft Excel 2010 制作不同农药对灰飞虱死亡率、体重及其体内 YLS 数量影响的变化图。

2 结果

2.1 灰飞虱 YLS 的离体培养与生理生化特性

在离体培养实验所用的 5 种培养基中,只有在 YPD 培养基上分离得到了一株类酵母共生菌(图 1),该菌株呈乳白色,表面光滑并伴有芳香气味。生理生化特性分析发现,该菌在 4 ~ 36℃ 下均可生长,其中在 24 ~ 32℃ 生长良好,28℃ 为最适生长温度。在 pH 2 ~ 12 范围内均可生长,最适 pH 为 7。12 种碳源的同化的结果见表 2,与酵母分类手册(Kurtzman *et al.*, 1998)中异常毕赤酵母的描述基本一致。

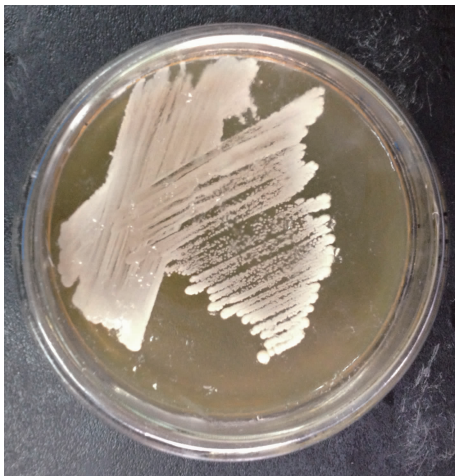


图 1 在 YPD 培养基上 YLS 的分离纯化

Fig. 1 Isolation and purification of YLS on the YPD medium

2.2 离体培养 YLS 的分子鉴定及 DGGE 验证

采用 18S rDNA 通用引物 NS1/NS8 扩增得到一条长约 1 766 bp 的序列(GenBank 登录号: KJ659884)(图 2),通过同源性分析对比发现与 *P. anomala* 18S rDNA 序列(GenBank 登录号: X58054)具有极高的一致性(99%),从系统进化树(图 3)中可以看出,我们分离到的此株 YLS 与 *P. anomala* 归为一类。DGGE 图谱结果表明,以 ITS3GC-ITS4 和 NFGC-NR 为内引物扩增共得到 10 条特异条带

表 2 异常毕赤酵母菌在氮基础培养基上的碳源同化结果

Table 2 Carbon assimilation pattern of *Pichia anomala* on yeast nitrogen base

碳源 Carbon source	生长情况 Growth	碳源 Carbon source	生长情况 Growth
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	-	D-鼠李糖 D-Rhamnose	-
D-果糖 D-Fructose	++	D-核糖 D-Ribose	-
D-葡萄糖 D-Glucose	++	D-木糖 D-Xylose	-
D-半乳糖 D-Galactose	-	D-蔗糖 D-Sucrose	+
乳糖 Lactose	-	淀粉 Starch	-
甘露醇 Mannitol	+++	甘油 Glycerin	+++

+++ : 大量生长 Vast; ++ : 较多生长 Major; + : 少量生长 Little; - : 不生长或基本不生长 Negative.

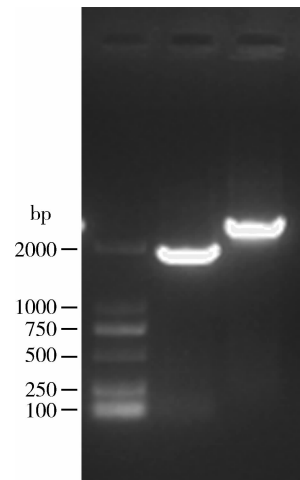


图 2 离体培养 YLS 18S rDNA 的扩增条带

Fig. 2 Amplification product of 18S rDNA from *in vitro* cultured YLS

M: DL2000 DNA marker; 1: 以 NS1-NS8 为引物的扩增条带 Amplicon with primer NS1-NS8.

(图 4),片段大小约 298 ~ 377 bp,其中既包含已报道的 Noda 菌、季也蒙毕赤酵母和假丝酵母,还包含一些不能培养的真菌,以及本实验离体培养得到的异常毕赤酵母菌(表 3)。从而验证了异常毕赤酵母菌在灰飞虱体内的存在。

2.3 不同杀菌剂对异常毕赤酵母的抑制作用

表 4 列出的是不同浓度杀菌剂下,灰飞虱体内分离得到的 *P. anomala* 在固体培养基上的生长情况。70% 丙森锌的抑制效果最为明显,当浓度达到

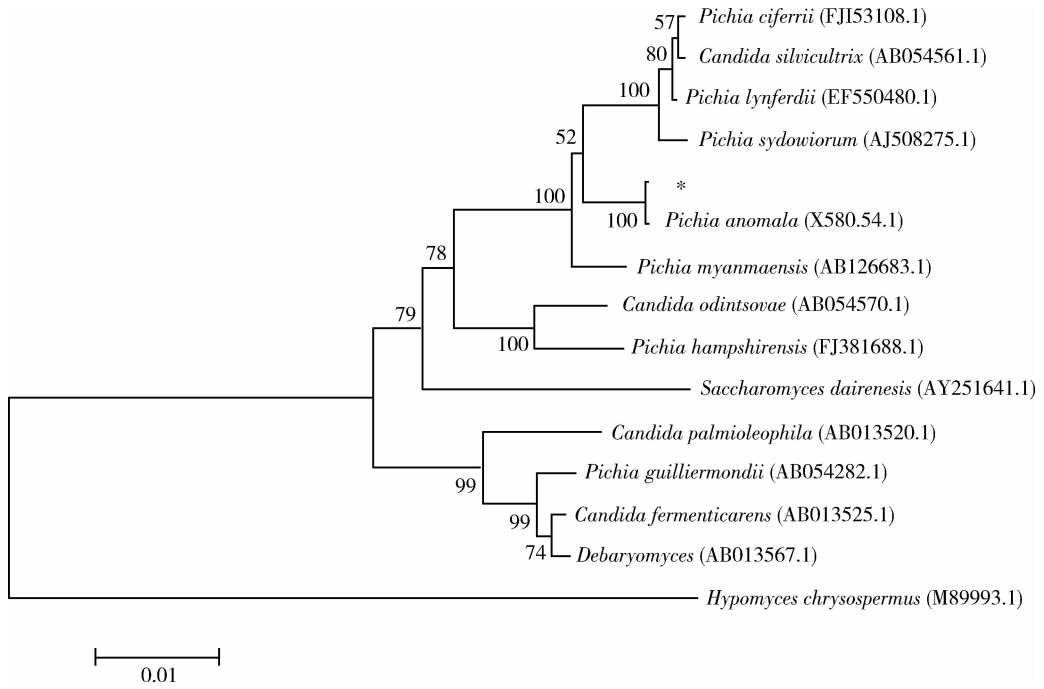


图3 基于 18S rDNA 构建的灰飞虱体内分离得到的 YLS 与近缘种间的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the isolated YLS from *Laodelphax striatellus* and other close related strains based on 18S rDNA sequence

*: 本实验中分离得到的 YLS (YLS isolated in this study).

表3 DGGE 特异条带的鉴定

Table 3 Identification of specific DGGE bands

序列长度 Sequence size (bp)	引物 Primers	最似序列物种名称及其序列登录号 Name of the closest relative species and the GenBank accession no. of the homologous sequences	序列一致性 Sequence identity (%)
298	NFGC-NR	<i>Pichia anomala</i> (EF427893)	99
305	NFGC-NR	<i>Candida</i> (HQ916867)	99
308	NFGC-NR	<i>Hypomyces chrysospermus</i> (AF267232)	99
373	ITS3GC-ITS4	<i>Pichia anomala</i> (AF218991)	99
377	ITS3GC-ITS4	<i>Pichia guilliermondii</i> (KF468192)	99
335	ITS3GC-ITS4	Uncultured fungus (KF800290)	99

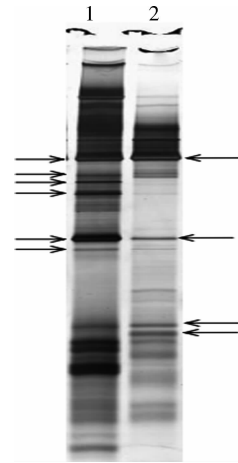


图4 YLS 的 DGGE 图谱

Fig. 4 Identification of YLS by using DGGE

1: 以 NFGC-NR 为内引物扩增 18S rDNA 区域片段 The 18S rDNA fragments amplified with primers NFGC-NR; 2: 以 ITS3GC-ITS4 为内引物扩增 ITS 区域片段 The ITS fragments amplified with primers ITS3GC-ITS4. 箭头所指为特异性条带。The arrows indicate the excised specific bands.

400 mg/L 时 *P. anomala* 不能生长, 50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯的抑制效果其次, 当浓度达到 800 mg/L 时 *P. anomala* 不能生长, 而氟吡菌胺 + 霜霉威盐酸盐、40% 嘧霉胺对 *P. anomala* 的抑制效果较弱。

2.4 不同农药对灰飞虱及其体内共生菌的影响

根据 *P. anomala* 对不同农药的敏感性, 选取 *P. anomala* 敏感的杀菌剂 70% 丙森锌、50% 戊唑醇

+ 25% 肟菌酯, 以及敏感性较差的 40% 嘧霉胺进行试验, 以清水为阴性对照, 杀虫剂吡虫啉为阳性对照。实验结果显示 (图 5, 表 5), 吡虫啉处理下灰飞虱的死亡率达 98.3%, 而两种杀菌剂 70% 丙森锌、50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯对灰飞虱的影响明显, 在 800 mg/L 浓度下导致灰飞虱死亡率达 46% 以上, 且处理后灰飞虱的体重也显著轻于其他处理。

表 4 不同杀菌剂对异常毕赤酵母的抑制作用

Table 4 Inhibitory effect of different fungicides on *Pichia anomala*

杀菌剂浓度 Fungicide concentration (mg/L)	70% 丙森锌 70% Propineb	50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯 50% Tebuconazole + 25% trifloxystrobin	氟吡菌胺 + 霜霉威盐酸盐 Fluopicolide + propamocarb (687.5 g a. i. /L)	40% 啉霉胺 Pyrimethanil (400 g a. i. /L)
50	+++	++		
100	++	+		
200	+	+		
400	-	+	+++	+++
800		-	+++	+++
1 600			+++	++
6 400			+++	++
12 000			++	+

+++ : 大量生长 Vast; ++ : 较多生长 Major; + : 少量生长 Little; - : 不生长或基本不生长 Negative.

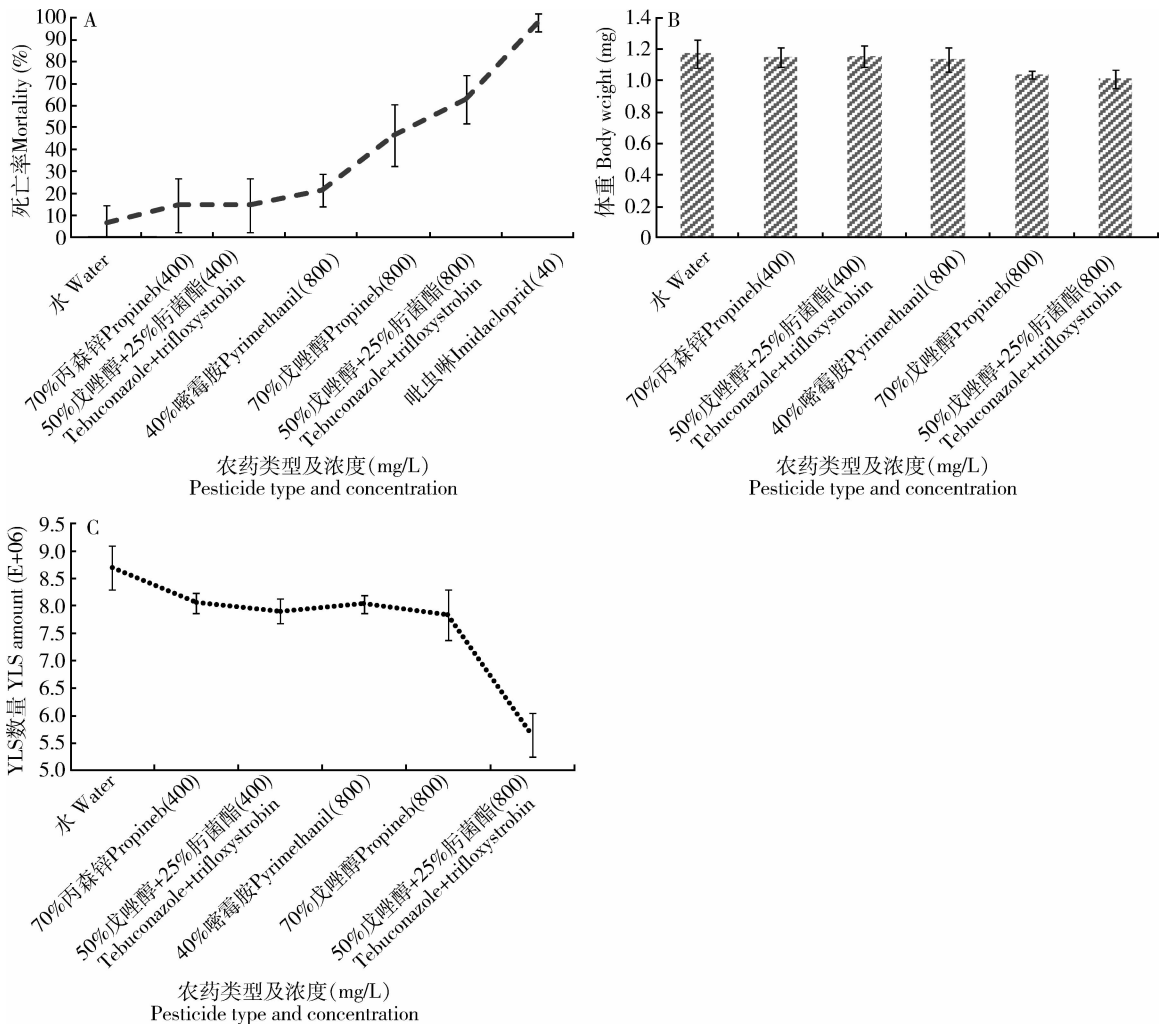


图 5 不同农药对灰飞虱成虫死亡率 (A)、体重 (B) 及其体内 YLS 数量 (C) 的影响

Fig. 5 Influence of different pesticides on the mortality (A) and body weight (B) of *Laodelphax striatellus* adults and the amount of YLS (C) in their bodies

YLS 数量为 3 种 YLS (Noda 菌、季也蒙毕赤酵母和异常毕赤酵母) 的总数。The amount of YLS is the total of YLS of three strains (*Hypomyces chrysospermus*, *Pichia guilliermondii*, and *P. anomala*).

喷洒杀菌剂后灰飞虱体内的 3 种 YLS (Noda 菌、季也蒙毕赤酵母和异常毕赤酵母) 的绝对荧光定量 PCR 测定结果表明(表 5), 杀菌剂处理后灰飞虱体内的 YLS 数量均显著低于对照组。经相关性分析发现(表 6), 灰飞虱的死亡率、体重与其体内 YLS 的数量相关性显著, 其中灰飞虱体内 YLS 数量

与其死亡率呈极显著负相关, 与体重极显著正相关。喷洒不同农药后灰飞虱死亡率、体重及其体内共生菌数量的变化关系如图 5 所示, 随着灰飞虱死亡率的上升, 灰飞虱体重及体内共生菌数量相应下降。表明杀菌剂可以通过抑制灰飞虱体内的 YLS 而对灰飞虱产生影响。

表 5 不同农药对灰飞虱成虫死亡率和体重及体内 YLS 数量的影响

Table 5 Influence of different pesticides on the mortality and body weight of *Laodelphax striatellus* adults and the amount of YLS in their bodies

农药 Pesticides	浓度 Concentration (mg/L)	死亡率(%) Mortality	体重(mg) Body weight	体内 YLS 的数量 Amount of YLS in <i>L. striatellus</i>		
				Noda 菌($\times 10^6$) <i>Hypomyces</i> <i>chrysospermus</i>	季也蒙毕赤酵母 ($\times 10^3$) <i>Pichia guilliermondii</i>	异常毕赤母 ($\times 10^2$) <i>Pichia anomala</i>
70% 丙森锌 Propineb	400	15.0 \pm 12.2 de D	1.145 \pm 0.063 a	8.047 \pm 0.189 bAB	1.849 \pm 0.108 bB	1.557 \pm 0.074 bB
70% 丙森锌 Propineb	800	46.7 \pm 14.1 cC	1.034 \pm 0.024 b	7.833 \pm 0.463 bAB	1.398 \pm 0.043 cC	0.373 \pm 0.034 dD
50% 戊唑醇 Tebuconazole + 25% 肟菌酯 Trifloxystrobin	400	15.0 \pm 12.2 deD	1.154 \pm 0.069 a	7.900 \pm 0.219 bAB	1.684 \pm 0.037 bBC	1.319 \pm 0.041 bcBC
50% 戊唑醇 Tebuconazole + 25% 肟菌酯 Trifloxystrobin	800	63.3 \pm 11.2 bB	1.007 \pm 0.057 b	5.640 \pm 0.394 cC	0.587 \pm 0.179 dD	0.324 \pm 0.061 dD
40% 嘧霉胺 Pyrimethanil	800	21.7 \pm 7.5 dD	1.131 \pm 0.080 a	8.033 \pm 0.163 bAB	1.717 \pm 0.100 bBC	1.154 \pm 0.079 cC
吡虫啉 Imidacloprid	40	98.3 \pm 4.1 aA	ND	ND	ND	ND
水 Water		6.7 \pm 8.2 eD	1.170 \pm 0.090 a	8.697 \pm 0.398 aA	2.476 \pm 0.233 aA	2.142 \pm 0.319 aA

ND: 未能检测到 Not detected. 结果为平均值 \pm 标准差, 3 个重复, 同一列不同小写字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$, LSD 检验), 同一列不同大写字母表示存在极显著差异 ($P < 0.01$, LSD 检验)。The results are means \pm SD of three replicates. Means within a column followed by different lowercase and capital letters are significantly different ($P < 0.05$) and extremely significant different ($P < 0.01$) (LSD test), respectively.

表 6 灰飞虱成虫死亡率、体重及其体内 YLS 数量的相关性

Table 6 Correlation of the mortality and body weight of *Laodelphax striatellus* adults and the amount of YLS in them

		死亡率 Mortality	体重 Body weight	YLS 数量 Amount of YLS
死亡率 Mortality	Pearson correlation	1	-0.865 *	-0.913 **
	Sig. (2-tailed)		0.012	0.004
	N	7	7	7
体重 Body weight	Pearson correlation	-0.865 *	1	0.976 **
	Sig. (2-tailed)	0.012		0
	N	7	7	7
YLS 数量 Amount of YLS	Pearson correlation	-0.913 **	0.976 **	1
	Sig. (2-tailed)	0.004	0	
	N	7	7	7

* 在 0.05 水平(双侧)上显著相关 Significant correlation at the 0.05 level (2-tailed); ** 在 0.01 水平(双侧)上显著相关 Significant correlation at the 0.01 level (2-tailed).

3 讨论

本实验从共生菌的离体培养入手, 成功从灰飞

虱体内分离到一株 YLS, 经分子鉴定为异常毕赤酵母 *P. anomala*, 同时该菌株的碳源同化能力与酵母分类手册(Kurtzman, 1998)中异常毕赤酵母的描述基本一致。已有报道该菌存在于蚊类(*Anopheles*

stephensi, *An. gambiae*, *Aedes aegypti* 和 *Ae. albopictus*) 体内, 并对控制蚊虫疾病的传播具有重要的作用(Ricci *et al.*, 2011), 但在灰飞虱中的发现尚属首次。由于共生菌的离体培养存在重复性差、易污染等问题, 本实验反复多次并利用不同酵母培养基进行实验操作, 均在 YPD 培养基上获得该菌株, 且该菌株可以稳定传代培养。本研究组前期证实 DGGE 技术可用于分析褐飞虱体内 YLS 的多样性。为了验证该菌株并非实验操作中污染所致, 本文以灰飞虱为研究对象, 通过 DGGE 检测不仅有前人已发现了的 Noda 菌和季也蒙毕赤酵母, 还发现了假丝酵母及其他不能培养的真菌。不仅说明 DGGE 技术分析飞虱共生菌种群的有效性, 更重要的是发现了异常毕赤酵母, 验证了该菌株在灰飞虱体内存在的真实性和体外培养获得异常毕赤酵母菌的准确性。有研究表明, YLS 作为飞虱体内与飞虱在进化过程中长期共生的微生物, 在寄主的生长、繁殖过程中起着十分重要的作用。本实验组前期从褐飞虱体内分离的假丝酵母(Pang *et al.*, 2012), 已成为研究褐飞虱适应外界环境变化的重要检测指标。因此, 本研究离体培养获得的 *P. anomala* 有望成为研究灰飞虱的重要指示微生物, 通过其生物学功能及代谢途径研究有助于阐明该菌株与寄主特定的互作关系以及灰飞虱变异机制。

灰飞虱一直是我国重要的农业害虫, 但是多年来过分地依赖于化学农药的使用, 不仅导致了较为严重的环境问题, 同时也导致了灰飞虱产生严重的抗药性, 防治难度不断上升, 寻找新的治虫途径迫在眉睫。本研究检测了 *P. anomala* 对不同杀菌剂的敏感性, 发现 *P. anomala* 对 70% 丙森锌和 50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯两种杀菌剂较为敏感。本实验用喷洒 70% 丙森锌、50% 戊唑醇 + 25% 肟菌酯两种杀菌剂的麦苗饲喂灰飞虱, 结果发现: 与对照组相比, 实验组灰飞虱体内的 3 种 YLS 数量明显减少, 从而导致灰飞虱的体重降低、死亡率明显上升, 且随着杀菌剂的测试浓度的提高, 3 种 YLS 的数量减少更为明显, 灰飞虱的死亡率与体内 YLS 的数量呈负相关趋势。本实验结果证实, 以 *P. anomala* 为靶标微生物筛选的杀菌剂可作用于灰飞虱体内的 YLS 从而降低灰飞虱的活力, 实验结果为“抑菌防虫”提供了新的理论依据, 也为今后减少杀虫剂的使用, 开发杀虫剂和杀菌剂混合剂型生物农药防治灰飞虱提供了新思路。

参考文献 (References)

- Bai X, Dong SZ, Pang K, Bian YL, Yu XP, 2010. Identification of one yeast-like symbiont from the small planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallén) (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(6): 640–646. [白旭, 董胜张, 庞琨, 边亚琳, 俞晓平, 2010. 灰飞虱体内一种类酵母共生菌的分子鉴定. 昆虫学报, 53(6): 640–646]
- Chen FJ, Zeng M, Zhang JF, Chen LZ, Lu ZX, Ye GY, Yu XP, 2006. Morphological difference of the yeast-like endosymbionts in adult planthoppers of *Nilaparvata lugens* (Stål), *Laodelphax striatellus* (Fallén) and *Sogatella furcifera* (Horvath). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 31(4): 728–735. [陈法军, 曾敏, 张珏锋, 陈列忠, 吕仲贤, 叶恭银, 俞晓平, 2006. 三种稻飞虱成虫体内酵母类共生菌的形态差异. 动物分类学报, 31(4): 728–735]
- Chen JM, He YP, Zhang JF, Li N, Chen LZ, Yu XP, 2009. Effects of insecticides and fungicides on growth of endosymbionts isolated from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Plant Protection*, 35(6): 47–51. [陈建明, 何月平, 张珏锋, 李娜, 陈列忠, 俞晓平, 2009. 常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响. 植物保护, 35(6): 47–51]
- Chen JM, Yu XP, Lu ZX, Zheng XS, 1998. Insecticidal effects of paddy field fungicides on nymphs of rice brown planthopper. *Chinese Journal of Rice Science*, 12(3): 155–158. [陈建明, 俞晓平, 吕仲贤, 郑许松, 1998. 稻田常用杀菌剂对褐飞虱若虫的杀伤作用. 中国水稻科学, 12(3): 155–158]
- Chen LZ, Yu XP, Chen JM, Lu ZX, Zheng XS, Zhang JF, 2006. Advance in research on the application of symbionts in the management of the brown planthoppers, *Nilaparvata lugens* Stål. *Agrochemicals*, 45(11): 726–729. [陈列忠, 俞晓平, 陈建明, 吕仲贤, 郑许松, 张珏锋, 2006. 共生菌在褐飞虱防治中的应用. 农药, 45(11): 726–729]
- Ding JH, Su JY, 2001. *Agricultural Entomology*. China Agriculture Press, Beijing. 174–176. [丁锦华, 苏建亚, 2002. 农业昆虫学. 北京: 中国农业出版社. 174–176]
- Gu JP, Zhang Q, Liu BF, Fang DH, 2005. Improvement and analysis in experimental technology of microorganic auxanography. *Microbiology China*, 32(1): 90–93. [辜建平, 张庆, 刘邦芳, 方德华, 2005. 微生物生长谱法实验技术的改进与探析. 微生物学通报, 32(1): 90–93]
- Hou Y, 2013. Diversity of Yeast-like Symbionts (YLS) in Brown Planthopper and Its Variation in Different Nymph Periods and on Different Resistant Rice. MSc Thesis, China Jiliang University, Hangzhou. [侯云, 2013. 褐飞虱体内类酵母共生菌的多样性及其在不同虫龄和不同抗性水稻上的变化规律. 杭州: 中国计量学院硕士学位论文]
- Hou Y, Ma Z, Dong S, Chen YH, Yu X, 2013. Analysis of yeast-like symbiont diversity in the brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* Stål, using a novel nested PCR-DGGE protocol. *Curr. Microbiol.*, 67(3): 263–270.
- Koyama K, 1985. Nutritional physiology of the brown rice planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). II. Essential amino

- acids for nymphal development. *Appl. Entomol. Zool.*, 20(4): 424–430.
- Kurtzman CP, Fell JW, 1998. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam. 273–352.
- Kusumi T, Suwa Y, Kita H, Nasu S, 1979. Symbiotes of planthoppers: I. The isolation of intracellular symbiotes from the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* Fallén (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 14(4): 459–463.
- Lee YH, Hou RF, 1987. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *J. Insect Physiol.*, 33(11): 851–860.
- Liang HW, Wang CZ, Li Z, Luo XZ, Zou GW, 2008. Improvement of the silver-stained technique of polyacrylamide gel electrophoresis. *Hereditas (Beijing)*, 30(10): 1379–1382. [梁宏伟, 王长忠, 李忠, 罗相忠, 邹桂伟, 2008. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立. *遗传*, 30(10): 1379–1382]
- Lv ZX, Yu XP, Chen JM, Zheng XS, Xu HX, 2001a. The effect of endosymbiote on the development and reproduction of brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. *Acta Phytophylacica Sinica*, 28(3): 193–197. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 2001a. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响. *植物保护学报*, 28(3): 193–197]
- Lv ZX, Yu XP, Chen JM, Zheng XS, Xu HX, Tao LY, 2001b. Role of endosymbiote in virulence change of the brown planthopper to rice resistance varieties. *Acta Entomologica Sinica*, 44(2): 197–204. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 陶林勇, 2001b. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用. *昆虫学报*, 44(2): 197–204]
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3): 695–700.
- Noda H, Nakashima N, Koizumi M, 1995. Phylogenetic position of yeast-like symbiotes of rice planthoppers based on partial 18S rDNA sequences. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25(5): 639–646.
- Pang K, Dong SZ, Hou Y, Bian YL, Yang K, Yu XP, 2012. Cultivation, identification and quantification of one species of yeast-like symbiotes, *Candida*, in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Science*, 19(4): 477–484.
- Ricci I, Mosca M, Valzano M, Damiani C, Scuppa P, Rossi P, Crotti E, Cappelli A, Ulissi U, Capone A, Esposito F, Alma A, Mandrioli M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G, 2011. Different mosquito species host *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*): perspectives on vector-borne diseases symbiotic control. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 99(1): 43–50.
- Wang YH, Wu CX, Zhao XP, Cang T, Chen LP, Yu RX, Wu SG, Wang Q, 2010. Advances in the research of insecticide resistance of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Plant Protection*, 36(4): 29–35. [王彦华, 吴长兴, 赵学平, 苍涛, 陈丽萍, 俞瑞鲜, 吴声敢, 王强, 2010. 灰飞虱对杀虫剂抗药性的研究进展. *植物保护*, 36(4): 29–35]
- Whelan JA, Russell NB, Whelan MA, 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods*, 278(1): 261–269.
- Zhang XJ, Yu XP, Chen JM, 2008. Influence of high temperature on yeast-like endosymbiotes and pesticide resistance of small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Chinese Journal of Rice Science* 22(4): 416–420. [张晓婕, 俞晓平, 陈建明, 2008. 高温对灰飞虱体内类酵母共生菌和耐药性的影响. *中国水稻科学*, 22(4): 416–420]

(责任编辑: 赵利辉)