

水稻褐飞虱内生共生细菌 *Arsenophonus* 的鉴定和系统分析

王渭霞, 罗 举, 赖凤香, 傅 强*

(中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006)

摘要: 利用 16S rDNA 通用引物扩增了水稻褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 体内共生细菌的序列, 经克隆、测序和 NCBI 数据库比对, 发现褐飞虱体内存在杀雄菌属 *Arsenophonus* 类共生细菌, 系统发育上与粉虱科和木虱科体内的 *Arsenophonus* 属亲缘关系较近。在褐飞虱体内该共生细菌具有两种长度不同的 16S rDNA 序列, 分别为 1 504 bp 和 547 bp, 其中后者为前者中间缺失了 957 bp, 其余序列相同。通过重新设计两对引物进行扩增, 进一步确认不同褐飞虱地理种群及寄主种群均存在两种片段。*Arsenophonus* 特异的 23S rDNA 引物的扩增结果表明, *Arsenophonus* 存在于所有检测的褐飞虱种群中, 但不存在于水稻寄主中。荧光定量 PCR 检测发现 3 个褐飞虱室内寄主种群 *Arsenophonus* 属共生细菌含量不同, 其中 TN1 种群明显高于 Mudgo 种群和 ASD7 种群。此为水稻褐飞虱体内存在 *Arsenophonus* 属共生细菌的首次报道。

关键词: 褐飞虱; 共生菌; 杀雄菌属; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)06-0647-08

Identification and phylogenetic analysis of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae)

WANG Wei-Xia, LUO Ju, LAI Feng-Xiang, FU Qiang* (State Key Laboratory for Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

Abstract: PCR amplification of 16S rDNA with universal primers was conducted to detect the symbiotic bacteria of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). Analysis of the sequences showed that the brown planthoppers contain the symbiotic bacteria *Arsenophonus*, which has close relationship with *Arsenophonus* symbiont of Psyllidae and Aleyrodidae based on phylogenetic analyses. Two 16S rDNA sequences of *Arsenophonus* in *N. lugens* with different sizes were amplified, one is 1 504 bp and the other is 547 bp in length. The shorter one is the deleted product of the longer one by loss of its internal region of 957 bp. With two primers redesigned based on the above 16S rDNA sequences, the result of PCR amplification showed that the two different fragments existed in various host-associated populations and different geographic populations of *N. lugens*. Using 23S rDNA specific primers, the genus *Arsenophonus* was found in all the tested populations of *N. lugens*, but not in the host rice plant. The TN1 population carried significantly higher amount of *Arsenophonus* bacteria than the Mudgo population and ASD7 population assessed by quantitative real-time PCR. This is the first report of *Arsenophonus* bacteria from *N. lugens*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; symbiotic bacteria; *Arsenophonus*; 16S rDNA; phylogenetic relationship

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) (同翅目: 飞虱科) 是以吸取水稻韧皮部汁液为食的水稻生产中的主要害虫, 其适应性强, 易于适应抗性水稻品种

而产生新的致害性(吕仲贤等, 1999)。有研究表明, 刺吸危害的昆虫体内普遍存在内共生菌, 内共生菌的存在可以为宿主提供必须的营养物质、影响

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(“973”计划)项目(2010CB126202); 公益性农业行业专项(200803003); 中央级公益性科研院所基金项目(2009RG004-3); 国家重点实验室自主研究课题(ZZKT200804)

作者简介: 王渭霞, 女, 1974年2月生, 甘肃人, 硕士, 助理研究员, 主要从事水稻害虫致害分子机理的研究, Tel.: 0571-63370348; E-mail: wxiawang@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qiangfu1@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2009-11-26; 接受日期 Accepted: 2010-05-20

宿主昆虫适应环境或人为胁迫(如杀虫剂)的能力(Murad and Svetlana, 2009)。它可以通过产生具有抗真菌作用的代谢物来提高宿主对病原真菌的抗性,或产生有毒物质保护宿主免于被捕食(徐红星等, 2009)。另有一些共生菌可以改变宿主昆虫的种群生态,如在昆虫生殖系统中发现的 *Wolbachia* (Werren, 1997)。因此,对褐飞虱体内共生菌种类的鉴定和分析将有助于了解褐飞虱适应性、有害性易于发生变化的机制。已报道的昆虫内共生菌主要集中在酵母类内共生菌和真细菌类内共生菌。例如蚜虫体内细菌类共生菌布赫纳氏属 *Buehnera*, 通过分析其全基因组发现含有几乎所有必需氨基酸的合成基因,可以为宿主蚜虫提供多种必需氨基酸(Shigenobu *et al.*, 2000)。灰飞虱体内的共生细菌 *Wolbachia* 被证明可以改变宿主的生殖行为,调节繁殖能力,使得含有该共生菌的宿主灰飞虱表现出生殖优势(Giordano *et al.*, 1997)。*Wolbachia* 又称为立克次氏体(O'Neill *et al.*, 1992),自然界中约16%的昆虫物种受其感染。在褐飞虱体内也发现存在有 *Wolbachia* (甘波谊等, 2000)。目前对褐飞虱体内共生菌的研究主要集中于类酵母型共生菌(yeast-like symbiont, YLS),发现 YLS 含有高活性的尿酸酶,能够利用寄主的代谢废弃物(尿酸)合成褐飞虱生长发育所必需的氨基酸, YLS 还可能为褐飞虱提供维生素 B、固醇等营养物质(Sasaki *et al.*, 1996; 王国超等, 2005), YLS 也可能影响褐飞虱对抗性品种的适应性(Lee and Hou, 1987)

由于昆虫体内共生细菌难以人工培养,极大地限制了其研究。随着现代分子生物学研究方法和手段的不断发展和应用,近几年来关于昆虫体内共生细菌的研究有了很大进展。细菌的16S rDNA(编码16S rRNA的基因)在漫长的进化中具有高度的保守性而且其长度适中(约1500个核苷酸)便于测序,近年来已被细菌分类学家广泛用于细菌的遗传特性、分子差异、发育进化和分类学研究(陈文新, 1998)。*Arsenophonus* 属共生菌在昆虫体内的分布已有广泛的报道,但对其功能却知之甚少(Nováková *et al.*, 2009),杀雄菌属有致使寄主昆虫生殖异常的报道(Ghera *et al.*, 1991),但相比于 *Wolbachia*, 对 *Arsenophonus* 共生菌在褐飞虱体内的鉴定、分布和功能尚无报道。本研究通过对16S rDNA的扩增和测序,在褐飞虱体内鉴定出杀雄菌属 *Arsenophonus* 类共生细菌,对褐飞虱体内与其他昆虫体内该属共生菌进行了系统发育的分析,并对

该共生菌在不同褐飞虱地理种群及寄主种群中的分布进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

褐飞虱地理种群:分别于2008年4-9月采自我国不同稻区以及越南和菲律宾等东南亚国家(表1),在室内于感虫水稻品种 TN1 上饲养1~3代后供试。

表1 不同褐飞虱地理种群取样地点与时间

Table 1 The collecting sites and dates for different geographic populations of *Nilaparvata lugens*

取样点 Collection site	经度 Longitude	纬度 Latitude	采集时间 Collecting date
海南陵水 Lingshui, Hainan	109.56°E	18.34°N	2008.4
湖南道县 Daoxian, Hunan	110.33°E	25.29°N	2008.8
湖南汉寿 Hanshou, Hunan	109.64°E	28.70°N	2008.8
江西信丰 Xinfeng, Jiangxi	114.94°E	25.39°N	2008.8
江西宜黄 Yihuang, Jiangxi	116.12°E	27.16°N	2008.8
安徽宣城 Xuancheng, Anhui	118.73°E	31.95°N	2008.9
福建福州 Fuzhou, Fujian	119.18°E	26.04°N	2008.7
浙江富阳 Fuyang, Zhejiang	119.95°E	30.07°N	2008.8
越南广宁 Quangning, Vietnam	106.10°E	20.57°N	2008.6
越南顺化 Shunhua, Vietnam	197.31°E	16.26°N	2008.4
菲律宾 Los Banos, Philippines	120.58°E	14.36°N	2008.7

褐飞虱寄主种群:为本实验室培育的3个褐飞虱寄主种群,即 TN1 种群、Mudgo 种群和 ASD7 种群,分别用感虫水稻品种 TN1 和抗虫水稻品种 Mudgo(含抗虫基因 *Bph1*)、ASD7(含抗虫基因 *bph2*)连续饲养了150多代。

水稻品种:包括感虫品种 TN1, 抗虫水稻品种 Mudgo 和 ASD7, 催芽播种后于温室水泥池培育到分蘖期备用。

1.2 褐飞虱 DNA 提取

每一种群取10头成虫用75%酒精表面消毒,灭菌水清洗5次后提取DNA。先加入150 μL 提取液(1.0% SDS、0.1 mol/L Tris-HCl pH 9.0、0.05 mol/L EDTA、0.1 mol/L NaCl、6.486% 蔗糖)研磨后,再加入450 μL 提取液,65°C 温浴30 min,加入112 μL 8.0 mol/L KAc (pH 9.0),冰浴30 min。加入等体积的氯仿12000 r/min 离心15 min,上清用2倍体积的冰冻无水乙醇室温沉淀1 h,12000

r/min 离心 15 min, 沉淀干燥后用 100 μ L TE 溶解, 定量后储存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增和克隆、测序

取褐飞虱 TN1 种群 DNA 100 ng, 利用 16S rDNA 通用引物 16s-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Amann *et al.*, 1995), 16s-R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Weisburg *et al.*, 1991) 在 25 μ L 体系中进行 PCR 扩增。反应体系为 1 \times PCR buffer、0.2 mmol/L dNTP、0.2 μ mol/L 引物、0.2 U Taq 酶。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s、52 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 对获得的约 1 500 bp 的扩增片断和 550 bp 片断切胶, 参照天根生物技术有限公司生产的 DNA 纯化回收试剂盒 (DP214) 说明回收 PCR 产物。产物参照 Invitrogen 公司的 PCR[®]2.1-Topo 克隆试剂盒 (K4500-01) 说明进行 T-A 克隆, 白斑经菌落 PCR 鉴定后送 Invitrogen 公司测序。

测得序列经相互比对后应用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性搜索, 确定所得序列来源的共生菌类别。在此基础上, 利用获得的褐飞虱共生菌相关的 16S rDNA 序列重新设计引物, 进一步研究不同褐飞虱地理种群和寄主种群中该序列的分布情况。

1.4 褐飞虱共生细菌 16S rDNA 片段序列系统发育树的构建

将测定的褐飞虱 16S rDNA 序列和部分 NCBI 网上下载的其他昆虫体内同一 *Arsenophonus* 属共生细菌的 16S rDNA 序列采用 ClustalX Version 1.83 软件进行多重比对, 通过 MEGA 4.1 软件分析多重比对结果, 并用 Neighbor-Joining 方法构建褐飞虱共生细菌 *Arsenophonus* 属 16S rDNA 序列系统发育树。

1.5 *Arsenophonus* 菌在不同褐飞虱种群的分布

为了研究 *Arsenophonus* 属共生菌是否广泛存在于不同褐飞虱地理种群和寄主种群体内以及该菌是否存在于饲喂褐飞虱的水稻寄主中, 本研究利用 *Arsenophonus* 特异的 23S rDNA 序列引物 (ARS23S-F: 5'-CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA-3', ARS23S-R: 5'-GGTCCTCCAGTTAGTGTACCCAAC-3') (Thao and Baumann, 2004; Murad and Svetlana, 2009) 对不同水稻品种、不同褐飞虱寄主种群和地理种群的 DNA 模板进行 PCR 扩增。扩增体系和条件同 1.3。

1.6 3 种褐飞虱寄主种群中 *Arsenophonus* 属共生菌的定量 PCR 分析

取 3 种褐飞虱寄主种群的成虫各 40 头分为 4 组即 4 个重复, 提取 DNA, 将 DNA 定量后稀释到 100 ng/ μ L, 利用 *Arsenophonus* 属特异的 23S rDNA 引物对 3 种寄主种群中 *Arsenophonus* 属共生菌进行了定量 PCR 分析。以褐飞虱 *actin* 基因作为内参照基因, 其引物设计利用 DNASTAR 软件, 依据 NCBI 数据库中序列 EU179846.1 设计, 引物序列为 Bph-actin F: 5'-CCCCATCGAGCACGGTATCATCA-3', Bph-actin R: 5'-TCTGGGTCATCTTCTCACGGTTGG-3'。定量 PCR 反应体系为 1 \times SYBR Green PCR Master Mix, 0.5 μ mol/L 引物, DNA 1.0 μ L, 反应体积 25 μ L 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 20 s、72 $^{\circ}$ C 40 s 45 个循环。数据分析参照 Livak 和 Schmittgen (2001) 的方法。

1.7 数据统计与分析

不同处理的方差分析与多重比较采用唐启义和冯明光 (2002) 的 DPS 数据处理系统。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 的 PCR 扩增与测序

通过 16S rDNA 通用引物对褐飞虱 TN1 种群试虫的总 DNA 进行扩增, 获得了两种长度不同的扩增片断。较长的片断经克隆后共选取 10 个克隆进行测序, 除其中 3 个克隆序列与未知细菌相似外, 另 7 个克隆的序列长度为 1 504 bp (GenBank 登录号: GU124504), 序列比对发现与木虱科的柑桔木虱 *Diaphorina citri* (GenBank 登录号: AB038366.1) 体内的次生共生菌 *Arsenophonus* 16S rDNA 序列相似度达 99% 以上 (平均 E 值 0.0), G + C 含量 53.6%, 表明褐飞虱 TN1 种群体内含有 *Arsenophonus* 类共生细菌。较短的片断经克隆测序后确定长度为 547 bp (GenBank 登录号: GU124505), 与 1 504 bp 长片断的两头序列相同, 但中间缺失 957 bp, G + C 含量 54.5% (图 1)。

利用测得的 *Arsenophonus* 属共生细菌的 1 504 bp 的 16S rDNA 序列重新设计引物 ARS16s-F2: 5'-CCTAACACATGCAAGTTCGAG-3' 和短片断缺失交接区设计引物 ARS16s-F1: 5'-GCACGGCTGATGTTCTGAAATG-3' 与 16s-R 引物在不同褐飞虱寄主种群和地理种群中进行扩增, 其中引物对 ARS16s-F2 和 16s-R 能够扩增得到两条预期为 1 465 bp、508 bp 的扩增片断, 而 ARS16s-F1 和 16s-R 则得到预期为 448 bp 的扩增带 (图 2), 表明在各褐飞虱种群体内共生细菌 *Arsenophonus* 的 16S rDNA 均存在两种片

段大小不一的序列。

```

1 AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG ATTGAACGCT GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC
61 GGCAGCGGA GGAAGCTTGC TTCCTTGCCG GCGAGCGGG GACGGGTGAC TACGTATGC
16s-F → ARS16s-F2
121 GGATCTGCC CAAGCGGGG GATAACCACT CGAAACGGTC CTAATACCG CATAATCTCT
ARS16s-F1
181 AAGGAGCAA CTGGCCACC CTCAGGCCT CACACCTCC CATGAACCCA TATCAGATTA
241 GCTACTAGGT GGGTAATGG CTCACCTACC CGACGATCTC TAGCTGCTCT GAGAGCATGA
301 TCAGCCACAG TGGCACTCAG ACACGGCCA GACTCCTACC GGAGCCAGCA CTGGGCAATA
361 TTGCACAATG GCGGCAAGCC TCATGCAGCC ATGCGCGGTG TATCAAGAAG GCCTTCGGGT
421 TCTAAACTAC TTTCAGTCTG GAGGAAGCTA TTAAGCTTAA TAACCTTAGC AATTGACCTT
481 AGCGACAGAA GAAGCACCGG CTAACCTCCG GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGCGGTGG
541 AGCGTTAGTC CGAATTAAGT GCGGTAAAGC CCACGCAGGC CCTTAATTAA CTTCGATGTC
601 AAATCCCGG CCTAACCTG GCAATGCCAT TCAAGACTGG TTAAGTACAG TCTTGTAGAG
661 GCGGCTAGAA TTCCATCTCT AGCGCTCAA TCCGTAGACA TGTGCAGGAA TACCCCTGGC
721 GAAGCGGGCC CCTCGACAA AACTGACCG TCATGTGCGA AAGCGTGGG AGCAAAACAGG
781 ATTAGATACC CTGCTAGTCC ACCCTCTAAA CGATGTGGAT TTGGAGGTTG TGCTCATGAA
841 CTCGCGGCTC CGGAGCTAAC GCGTTAAATC GACCCCTTGG GCAGTACGGC CGCAAGCTTA
901 AAATCAAAT CAATTGACCG GCGCCCGCAC AACCGCTGGA GCATGTGCTT TAATTGCATG
961 CAACCGCAAC AACCTTAGCT ACTCTTAGCA TCCACCGAAT CCTTTAGAGA TAGAGGACTG
1021 CCTTCGGAA CGCTGACAGA GGTGCTGGAT TGCTCTCCTC AGCTGCTGTT GTGAAATGTT
1081 GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT ATCCTTTGTT GCCAGCGATT CCGTCGGGAA
ARS16s-F1
1141 CTCAAAGGAG ACTGCCGTG ATAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AGTCATCATG
1201 GCCCTTACGA GTAGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGCGTA TACAGAGAGA GCGGAGCCAG
1261 CGATGGGAA GCGAACTCAG AAAGTACGTC GAAGTCCGGA TTGGAGTCTG CAACTCGACT
1321 CCATGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGCG ATCAGCATGT CCGGTGTAAT ACCTTCCCGG
1381 GCCTTGTACA CACCGCCCT CACACCATG GAGTGGGTTG CAAAAGAAGT AGCTAGCTTA
1441 ACCTTTTGA TGGCGCTTAC CACTTTGTGA TTCATGACTG GGTGAAAGT GTAACAAGGT
1501 AACC ←16s-R

```

图 1 褐飞虱体内共生菌 *Arsenophonus* 的 16S rDNA 序列

Fig. 1 The 16S rDNA sequence of the symbiotic *Arsenophonus* of *Nilaparvata lugens*

序列下划线处表示引物所在位置，阴影部分(957 bp)为短片段所缺失的部分。The underlined sequences are the primer position, and the sequence in shaded is the absent internal region of the shorter DNA fragment.

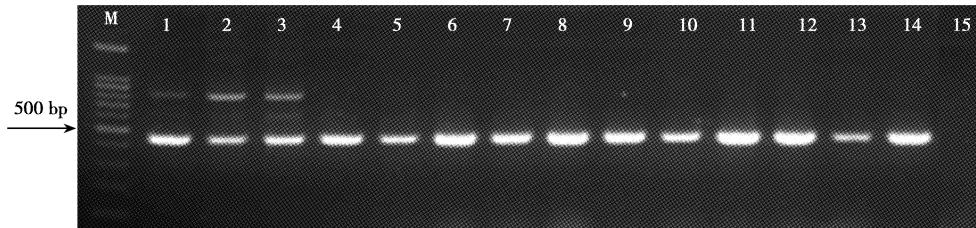


图 2 用 ARS16S-F1/16S-R 引物对不同褐飞虱种群的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification with primer pair ARS16S-F1/16S-R for different populations of *Nilaparvata lugens*

1: TN1 种群 TN1 population; 2: ASD7 种群 ASD7 population; 3: Mudgo 种群 Mudgo population; 4: 浙江富阳 Fuyang, Zhejiang; 5: 越南广宁 Guangning, Vietnam; 6: 越南顺化 Shunhua, Vietnam; 7: 菲律宾马尼拉 Manila, Philippines; 8: 湖南道县 Daoxian, Hunan; 9: 湖南汉寿 Hanshou, Hunan; 10: 江西信丰 Xinfeng, Jiangxi; 11: 福建福州 Fuzhou, Fujian; 12: 海南陵水 Lingshui, Hainan; 13: 安徽宣城 Xuancheng, Anhui; 14: 江西宜黄 Yihuang, Jiangxi; 15: 空白对照 Blank control. 图 4 同 The same for Fig. 4.

2.2 系统分析

长度为 1 504 bp 的序列经比对和构建系统进化树，发现褐飞虱体内克隆的 16S rDNA 序列 (GU124504) 与木虱科 *Diaphorina citri*、*Glycaspis brimblecombei* 和粉虱科 *Dialeurodes hongkongensis*、*Tetraleurodes acaciae* 等其他同翅目昆虫体内的 *Arsenophonus* 属共生细菌归为一类，在进化上较为接近；而与双翅目蝇蝇科 *Trichobius caecus*、*T.*

longipes、*T. yunker* 和虱蝇科 *Lipoptena cervi* 体内的 *Arsenophonus* 属共生细菌亲缘关系较远 (图 3)。

2.3 Arsenophonus 属共生菌在褐飞虱种群及水稻中的分布

利用 *Arsenophonus* 特异的 23S rDNA 引物在不同水稻品种中未检出 *Arsenophonus* (图 4)，而在褐飞虱不同地理种群和寄主种群均检测出 *Arsenophonus* (图 5)，说明 *Arsenophonus* 属共生细菌

广泛存在于不同种群的褐飞虱体内, 而且此菌并非 来源于褐飞虱的食物源(水稻)。

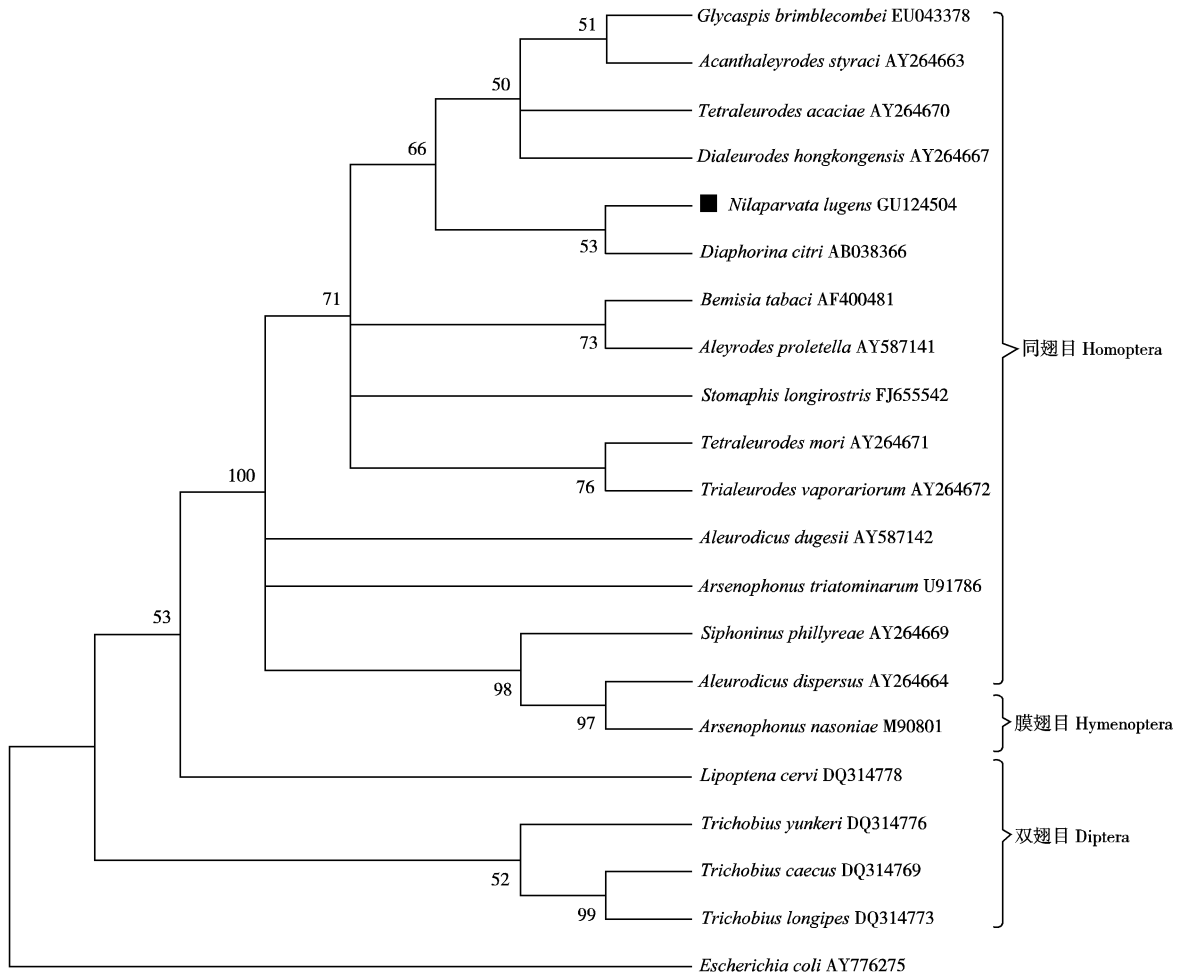


图 3 基于 16S rDNA 序列的褐飞虱体内共生菌 *Arsenophonus* 的系统树

Fig. 3 A phylogenetic tree of endosymbiotic *Arsenophonus* from *Nilaparvata lugens* based on 16S rDNA sequences
Nilaparvata lugens GU124504; 本研究获得的 1 504 bp 序列 The 1 504 bp sequence obtained in this study.

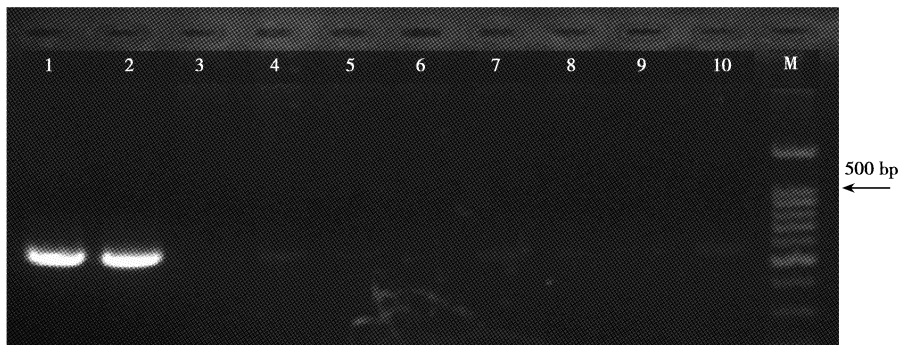


图 4 ARS23S-F/ARS23S-R 对不同寄主水稻的扩增结果

Fig. 4 PCR amplification with primer pair ARS23S-F/ARS23S-R in different rice varieties

1, 2: 褐飞虱 *Nilaparvata lugens*; 3, 4: TN1 水稻品种 Rice variety TN1; 5, 6: ASD7 水稻品种 Rice variety ASD7; 7, 8: Mudgo 水稻品种 Rice variety Mudgo; 9, 10: 空白对照 Blank control; M: 100 bp DNA ladder.

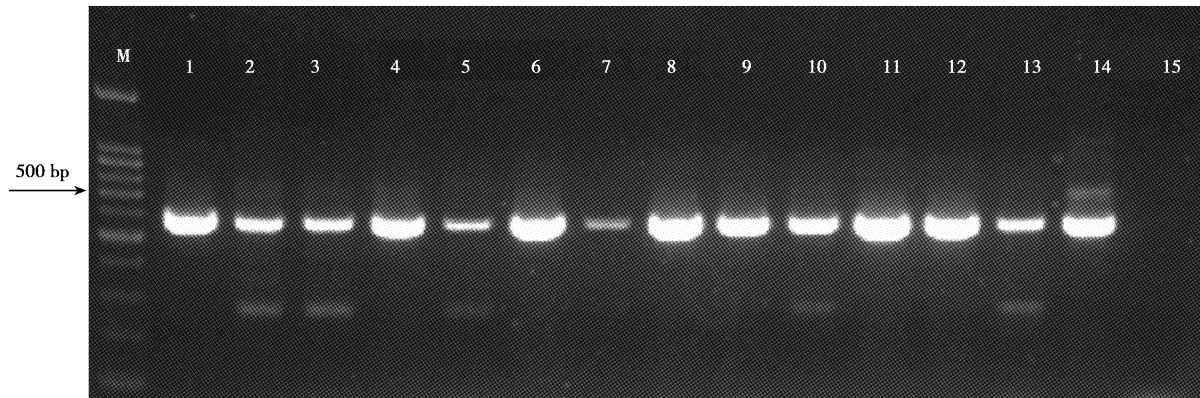


图5 ARS23S-F/ARS23S-R 引物对不同褐飞虱种群的扩增结果

Fig. 5 PCR amplification with primer pair ARS23S-F/ARS23S-R in different populations of *Nilaparvata lugens*

2.4 Arsenophonus 属共生菌在褐飞虱不同致害性种群中的定量 PCR 分析

褐飞虱内参基因 *actin* 和 *Arsenophonus* 23S rDNA 实时荧光定量 PCR 反应扩增产物的融解曲线均成单峰(图 6: A, B), 说明扩增产物单一。Tm 值为 82.6 ~ 83℃。

3 个褐飞虱寄主种群荧光定量 PCR 结果差异显

著, 其中 TN1 种群体内 *Arsenophonus* 属共生菌的 C_T 值(Ars C_T)、ΔC_T 值(Ars C_T- Actin C_T)均最低; TN1 种群的 2^{-ΔΔC_T} 值显著高于 Mudgo 和 ASD7 种群, 后二者间差异不显著(表 2), 表明褐飞虱 TN1 种群 *Arsenophonus* 属共生菌含量显著高于 ASD7 种群和 Mudgo 种群。

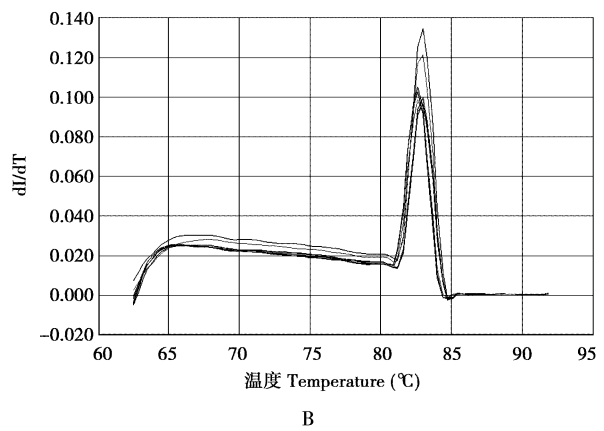
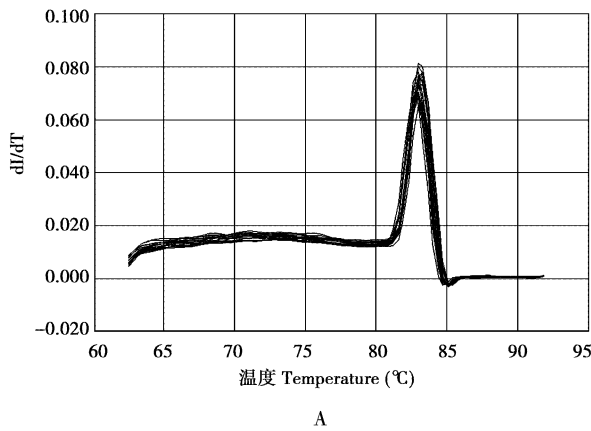


图6 褐飞虱内参基因 *actin* (A) 和 *Arsenophonus* 23S rDNA (B) 扩增产物溶解曲线

Fig. 6 Melting curves of the *actin* (A) and *Arsenophonus* 23S rDNA (B) PCR product of *Nilaparvata lugens*

表2 3 种褐飞虱寄主种群中 *Arsenophonus* 属共生菌实时定量 PCR 分析结果

Table 2 Quantitative real-time PCR of *Arsenophonus* in three host-associated populations of *Nilaparvata lugens*

褐飞虱寄主种群 <i>N. lugens</i> population associated with host plant	Ars C _T	Actin C _T	ΔC _T (Ars C _T - Average Actin C _T)	ΔΔC _T ΔC _T - ΔC _T (TN1)	2 ^{-ΔΔC_T}
TN1 种群 TN1 population	27.31 ± 0.57 c	23.80 ± 0.52 a	3.51 ± 0.57 c	0.00 ± 0.57 c	1.065 ± 0.473 a
Mudgo 种群 Mudgo population	33.91 ± 1.11 a	23.93 ± 0.25 a	9.99 ± 1.11 a	6.48 ± 1.11 a	0.014 ± 0.013 b
ASD7 种群 ASD7 population	30.15 ± 0.35 b	23.60 ± 0.42 a	6.56 ± 0.35 b	3.05 ± 0.35 b	0.124 ± 0.028 b

同一参数不同寄主种群间具不同字母者示经邓肯氏新复极差检测显著差异 (P ≤ 0.05)。Means followed by different letters in a column showed significant difference by Duncan's multiple range test (P ≤ 0.05).

3 讨论

一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 98%, 可认为属于不同的种; 16S rDNA 序列同源性小于 93% ~ 95%, 则可认为属于不同属; 低的 (G + C) mol% 是一个反映寄生物与寄主在远古时代就结合的特征, 而高的 (G + C) mol% 则可以反应其接近自由生活细菌 (Moran and Telang, 1998)。如初生内生共生菌 16S rDNA 通常富含 (A + T)%, (G + C) mol% 为 47% 左右, 说明其与宿主起源的一致性。而次生内生共生菌 16S rDNA 富含 (G + C) mol%, 为 53.4%, 与能够人工培养的细菌的 16S rDNA 接近 (谭周进等, 2007)。本研究在褐飞虱体内克隆到的 16S rDNA 序列 (G + C) mol% 为 53.6%, 说明此类共生细菌可能为次生共生细菌, 与寄主关系松散。同源性比发现该序列与柑桔木虱 *Diaphorina citri* 体内的次生共生菌 *Arsenophonus* 16S rDNA 序列相似度达 99% 以上, 可认为是 *Arsenophonus* 类共生细菌, 本研究还进一步确认该菌普遍存在于不同褐飞虱寄主种群及我国与越南、菲律宾等地的褐飞虱地理种群, 此为水稻褐飞虱体内存在 *Arsenophonus* 属共生细菌的首次报道。

Arsenophonus 是属于 *Proteobacteria* γ 亚类肠杆菌科的一类细菌, 广泛存在于粉虱、木虱、锥蝽等多种昆虫体内 (Thao and Baumann, 2004; Nováková *et al.*, 2009)。有关 *Arsenophonus* 在宿主昆虫体内的功能的研究可见于多例报道。Ghera 等 (1991) 认为 *Arsenophonus* 属共生菌可致使寄主昆虫生殖异常, 如杀雄菌 *A. nasoniae* 对丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的雄性胚胎有致死作用。与其他昆虫体内 *Arsenophonus* 共生细菌不同的是, *A. nasoniae* 是少数可以纯培养的共生细菌之一。这种影响寄主昆虫繁殖的细菌在烟粉虱的研究发现非 B 型种群 ZHJ-1 中能够检出, 而在 B 型中没有检出; B 型烟粉虱的一个特点是繁殖力强, 可能与其缺乏 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 共生菌有关 (阮永明和刘树生, 2005)。Q 型烟粉虱在感染了 *Arsenophonus* 和 *Rickettsia* 或 *Wolbachia* 两种共生菌之后相比于单独感染 *Arsenophonus* 表现出对某些杀虫剂更加敏感, 认为共生菌的存在提高了宿主昆虫对杀虫剂的敏感性 (Murad and Sventlana, 2009)。也有研究表明, 次生共生细菌可能在寄主昆虫适应植物的能力和竞争能力等方面具有重要作用, 进而间接影响寄

主昆虫进化和生物型的形成 (Montllor *et al.*, 2002; Leonardo and Muir, 2003; Oliver *et al.*, 2003; Tsuchida *et al.*, 2004)。*Arsenophonus* 在褐飞虱体内的分布和功能尚待进一步阐明。

本研究发现褐飞虱 TN1 种群体内的 *Arsenophonus* 属的数量要显著多于 Mudgo 种群和 ASD7 种群, 而这 3 个褐飞虱寄主种群对不同抗感品种的有害性明显不同 (孙佳音等, 2009), *Arsenophonus* 属共生菌与褐飞虱寄主种群的有害性是否有关还需进一步研究。

参考文献 (References)

- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cell without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143 - 169.
- Chen WX, 1998. Bacterial phylogeny. *Acta Microbiologica Sinica*, 38: 240 - 243. [陈文新, 1998. 细菌系统发育. 微生物学报, 38: 240 - 243]
- Gan BY, Zhou WG, Zhao XY, Feng LB, Li CB, 2000. Infection and transmission of *Wolbachia* in Chinese planthopper species. *Journal of Fudan University (Natural Science)*, 39(3): 331 - 333. [甘波谊, 周伟国, 赵新燕, 冯丽冰, 李昌本, 2000. *Wolbachia* 在中国稻田飞虱中的感染和传播. 复旦学报(自然科学版), 39(3): 331 - 333]
- Ghera RL, Werren JH, Weisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L, Brenner DJ, 1991. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41(4): 563 - 565.
- Giordano R, Jackson JJ, Robertson HM, 1997. The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(21): 11439 - 11444.
- Lee YH, Hou RF, 1987. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal. *J. Insect Physiol.*, 33: 851 - 860.
- Leonardo TE, Muir GT, 2003. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proc. R. Soc. Lond. Biol.*, 270 (Suppl. 2): S209 - S212.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Lu ZX, Yu XP, Chen JM, 1999. The tolerance differences of brown planthopper biotypes to adverse environmental factors. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 11(6): 301 - 305. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 1999. 褐飞虱不同生物型的抗逆性. 浙江农业学报, 11(6): 301 - 305]
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH, 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2): 189 - 195.
- Moran NA, Telang A, 1998. Bacteriocyte-associated symbionts of

- insects. *Bioscience*, 48: 295–304.
- Murad G, Svetlana K, 2009. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities. *Pest Manag. Sci.*, 65: 939–942.
- Nováková E, Václav H, Moran NA, 2009. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiology*, 9: 143–157.
- Oliver K, Russell J, Moran N, Hunter M, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(4): 1803–1807.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL, Robertson HM, 1992. Phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2669–2702.
- Ruan YM, Liu SS, 2005. Detection and phylogenetic analysis of prokaryotic endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *Acta Entomologica Sinica*, 48(6): 859–865. [阮永明, 刘树生, 2005. 浙江 B 型与非 B 型 (China. ZHJ-1) 烟粉虱种群共生细菌的检测及系统发育分析. 昆虫学报, 48(6): 859–865]
- Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H, 1996. Nitrogen recycling in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast-like endosymbionts in uric acid metabolism. *J. Insect. Physiol.*, 42(2): 125–129.
- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H, 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature*, 407(6800): 81–86.
- Sun JY, Fu Q, Lai FX, Wang WX, 2009. Comparison on morphology and number of yeast-like symbionts in different host-associated populations of *Nilaparvata lugens*. *Chinese Journal of Rice Science*, 23(5): 546–550. [孙佳音, 傅强, 赖凤香, 王渭霞, 2009. 不同褐飞虱寄主种群类酵母共生菌形态和数量的比较. 中国水稻科学, 23(5): 546–550]
- Tan ZJ, Xie BY, Zhou QM, Yang YH, Xiao QM, 2007. Studies on characteristics of 16S rDNA sequences from endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *Microbiology*, 34(3): 487–491. [谭周进, 谢丙炎, 周清明, 杨宇红, 肖启明, 2007. 烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的特性研究. 微生物学通报, 34(3): 487–491]
- Tang QY, Feng MG, 2007. DPS Data Processing System for Practical Statistics. Science Press, Beijing. 43–92. [唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统. 北京: 科学出版社. 43–92]
- Thao ML, Baumann P, 2004. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.*, 48: 140–144.
- Tsuhida T, Koga R, Fukatsu T, 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5666): 1989.
- Wang GC, Fu Q, Zhang ZT, 2005. Relationship between yeast-like symbionts and amino acid requirements in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 48(4): 483–490. [王国超, 傅强, 张志涛, 2005. 褐飞虱体内类酵母共生菌与氨基酸营养的关系. 昆虫学报, 48(4): 483–490]
- Weisburg WC, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697–703.
- Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42: 587–609.
- Xu HX, Zheng XS, Liu SP, Ye GY, Lv ZX, 2009. The role of endosymbionts in insect host resistance against adverse factors. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(3): 350–354. [徐红星, 郑许松, 刘淑平, 叶恭银, 吕仲贤, 2009. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用. 昆虫知识, 46(3): 350–354]

(责任编辑: 袁德成)