

# 一株褐飞虱内共生菌的分离及分子鉴定

张珏锋<sup>1,2</sup> 吴 鸿<sup>1</sup> 陈建明<sup>2</sup> 郑许松<sup>2</sup> 陈列忠<sup>2</sup> 俞晓平<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江林学院, 浙江 临安 311300; <sup>2</sup> 浙江省农业科学院 植物保护与微生物研究所, 浙江 杭州 310021; \* 通讯联系人, E-mail: yxp@cjlu.edu.cn)

## A Strain Isolated from Brown Planthopper and Its Molecular Identification

ZHANG Jue feng<sup>1,2</sup>, WU Hong<sup>1</sup>, CHEN Jian ming<sup>2</sup>, ZHENG Xu song<sup>2</sup>, CHEN Lie zhong<sup>2</sup>, YU Xiao ping<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup> Zhejiang Forest University, Lin an 311300, China; <sup>2</sup> Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; \* Corresponding author, E mail: yxp@cjlu.edu.cn)

**Abstract:** A strain of yeast like symbiotes (YLS) was isolated from the eggs of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål, BPH), and named as strain 34. The 26S rDNA sequence of strain 34 was highly homologous with that of the YLS directly isolated from BPH, and the strains both belonged to the *Yarrowia lipolytica* of subphylum Ascomycotina class Pyrenomyces. The results showed that the strain 34 had the genetic relationship with the yeast like symbiotes of BPH. Moreover, it was concluded that the YLS of BPH could be cultured *in vitro*.

**Key words:** brown planthopper; culture *in vitro*; yeast like symbiotes; *Yarrowia lipolytica*; strain isolation; molecular identification

**摘 要:** 运用卵块离体培养法,从褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål) 卵块中分离筛选到 1 株类酵母菌菌株,命名为 34 号菌株。比较 34 号菌株与直接从褐飞虱虫体内分离的类酵母共生菌 (yeast like symbiotes, YLS) 26S rDNA 序列同源性,并将结果在 GenBank 核酸序列数据库中进行同源序列搜索,结果显示两种菌株都与子囊菌亚门 (Ascomycotina) 核菌纲 (Pyrenomyces) 的解脂假丝酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 显示出较近的亲缘关系,初步表明分离所得 34 号菌株可能为褐飞虱内共生菌的一种,同时也说明褐飞虱体内共生菌可通过离体培养的方式获得。

**关键词:** 褐飞虱; 离体培养; 类酵母共生菌; 解脂假丝酵母 菌株分离; 分子鉴定

中图分类号: Q143<sup>+</sup> 2; Q949.326.1; S435.112<sup>+</sup> 3

文献标识码: A 文章编号: 1001-7216(2007)05-0551-04

褐飞虱 (*Nilaparvata lugens* Stål) 是亚洲最严重的水稻害虫之一,主要通过吸食叶鞘部汁液对水稻直接产生伤害<sup>[1]</sup>。利用水稻品种抗虫性是控制褐飞虱为害最为经济有效的防治方法,但随着抗性品种的大面积种植,田间褐飞虱的致害性发生改变,导致水稻品种抗性消失<sup>[2]</sup>。类酵母菌 (yeast like symbiotes, YLS) 是存在于褐飞虱腹部脂肪体内的一种共生菌,该菌在褐飞虱营养学上具有重要意义<sup>[3-5]</sup>。褐飞虱及其体内共生菌之间存在相互适应、长期共存、互惠互利和协同进化的关系<sup>[4]</sup>。共生菌遗传基因的易变性使其遗传背景容易发生变化或突变,在褐飞虱适应抗虫品种形成新致害性种群的过程中,共生菌的遗传物质可能已发生了变异,此种变异可能导致褐飞虱对水稻抗性品种致害性发生改变。因此,在褐飞虱致害性变异过程中,类酵母共生菌可能起着比寄主本身更重要的作用<sup>[6-8]</sup>。随着生物技术的发展,一种新的害虫防治思路即媒介昆虫共生菌技术逐渐形成。由于共生菌类酵母菌属于单细胞生物,在进行基因工程改造时比对宿主昆虫进行操作要方便得多,因而利用基因工程方法转化这些共生菌,降低它在宿主营养及生殖方面所起的作用,不仅可以降低褐飞虱的发生率,找出产生褐飞虱致害性的变化位点,而且可以减少植物病毒的传播。因此,明确褐飞虱体内共生类酵母菌的种类组成、种属发生地位至关重要,而目前仅仅明确类酵母菌属于子囊菌亚门 (Ascomycotina)、核菌纲 (Pyrenomyces) 的假丝酵母属 (*Candida*),进一步信息的获得需要对共生菌进行更详细的研究,最好的模式是对离体共生菌进行研究。由于类酵母共生菌和宿主褐飞

虱相互融合的关系,采用分离宿主脂肪体细胞进行培养的方法很难排除来自虫体内环境的污染。类酵母共生菌以卵母细胞垂直传递的方式直接传递给子代,因而在褐飞虱的卵块中包含了类酵母共生菌的全部遗传信息<sup>[9]</sup>。Nasu 等<sup>[10]</sup>曾报道运用卵块离体法成功地从褐飞虱体内分离出两株类酵母菌株,但并未对培养菌株作进一步鉴定。本实验运用卵块离体培养法从褐飞虱体内分离出 1 株共生菌株,并且通过测定培养菌株及虫体内类酵母菌株 26S rDNA 部分序列的方法初步证明了培养菌株与褐飞虱内共生菌的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 仪 器 设 备

试验所用冷冻切片机为 Leica CM1900 冷冻切片机,切片厚度范围为 0 ~ 50 μm,箱体最低控制温度为 -40℃,切片头最低控制温度为 -50℃。虫体组织冷冻切片后的显微观察采用 Leica DM LS2 正置生物显微镜。

#### 1.1.2 水 稻 品 种

水稻品种 TN1 分批分期播种,2 叶 1 心期移栽至水泥槽,分蘖拔节期移入盆钵中待用。

收稿日期: 2006-11-13; 修改稿收到日期: 2007-06-29。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30470227); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y305630, Y304400)。

第一作者简介: 张珏锋 (1978-), 女, 本科学生。

### 1.1.3 褐飞虱虫源

褐飞虱虫源由中国水稻研究所提供,浙江省农业科学院温室内连续隔离饲养,温度 25~30℃,光照 12 h/d 相对湿度 80%~95%,用水稻品种 TN1 连续饲养 4 代后使用。

### 1.1.4 试剂

样品包埋剂选用 Leica CM1900 冷冻切片机配套包埋剂,组织染色选用常规染色剂结晶紫。Grace 昆虫细胞培养基购自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TG1 由本实验室保存;酵母 DNA 提取试剂盒购自杭州 X-gene 公司;克隆质粒 pUCmT、*Taq* 聚合酶、IPTG、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司;X-Gal 购自 Sigma 公司;其余试剂均为进口或国产分析纯。PCR 引物由上海生工生物用品有限公司合成,用于扩增菌株 26S rDNA 片段序列,引物序列为:NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3',NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'<sup>[11]</sup>。

## 1.2 方法

### 1.2.1 共生菌的冷冻切片

取带卵水稻苗,无菌水冲洗后解剖取卵块;取羽化 3 d 后的褐飞虱雌雄虫各 30 头,解剖取腹部。在解剖出的卵块、腹部组织滴加少许冷冻切片包埋剂,放置于 Leica 冷冻切片机内预冻 30 min。将冷冻切片机箱体温度设置为 -30℃,刀头温度设置为 -50℃,组织块表面修整后切片,切片厚度约为 4~5 μm,展平的切片贴于载玻片。结晶紫染色、封固后,待用。

### 1.2.2 培养基的配置

Grace 昆虫细胞培养基按说明书配置,过滤灭菌、待用。

### 1.2.3 共生菌的离体培养及其形态观察

解剖带卵 TN1 稻苗,取卵块,无菌水冲洗,数取 300 颗,表面消毒,研磨,加入 10 mL 无菌水,配置成悬浊液。在预先灭菌的平皿中加入悬浊液 1 mL,然后缓缓注入 9 mL 预先灭菌的培养基,摇匀,9 个重复,放入 25℃ 培养箱中观察并记录结果。对照平皿中加入 1 mL 无菌水。

### 1.2.4 培养菌株及褐飞虱体内共生菌 DNA 提取

用接种环挑取少量旺盛生长的培养菌株,加入到 100 mL 配置好的液体培养基中,25℃ 下 200 r/min 摇床培养 24

~28 h,直至出现絮状物。DNA 的提取参照酵母 DNA 提取试剂盒说明。

取羽化 3 d 的雌褐飞虱成虫 5 头,解剖取腹部,表面消毒,研磨后加入到 100 mL 配置好的液体培养基中,后期处理同上。

### 1.2.5 PCR 扩增和测序

根据 Kurtzman 和 Robnett<sup>[11]</sup> 的方法,用引物 NL1 和 NL4 PCR 扩增两份样品 26S rDNA 近 5' 端的 D1/D2 区域,扩增条件为:95℃ 下预变性 5 min;94℃ 下 1 min,52℃ 下 1 min,72℃ 下 80 s,循环 36 次;最后 72℃ 下延伸 8 min,4℃ 下保存。

### 1.2.6 克隆与重组质粒的筛选与鉴定

PCR 产物的回收参照试剂盒说明,回收产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测回收效率,26S rDNA 基因片段与克隆质粒 T-Vector 连接(参照产品说明书),14℃ 连接过夜,连接产物转化 *E. coli* 感受态细胞后,涂于含有 Amp(100 μg/mL)、IPTG(0.5 mmol/L)、X-gal(80 μg/mL)的 LB 平板上,倒置培养过夜。用灭菌牙签挑取阳性克隆至 5 mL 的 LB 培养基(含 5 μL 50 μg/mL Amp)中,37℃ 下 200 r/min 摇床培养 36 h。取 1.5 mL 培养物用碱裂解法制备质粒 DNA,PCR 鉴定阳性克隆。将经 PCR 鉴定插有目的片段的重组克隆送杭州华大基因测序,测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索。

## 2 结果与分析

### 2.1 褐飞虱体内共生菌的形态学观察

显微观察可知褐飞虱腹部和卵块内类酵母共生菌的形态均以长卵圆形(图 1 A, B)为主,平均长度为 8~10 μm,宽度为 0.5~2.0 μm。此结果与陈法军等<sup>[12,13]</sup>的观察结果相一致。从形态、大小上观察,褐飞虱虫体内类酵母共生菌与卵块内的无明显差异。

### 2.2 培养菌落的形态学观察

卵块研磨液离体培养 30 h 后,有白色菌落长出,菌落厚实、表面较湿润、平坦无皱褶、边缘不规则,显微镜下观察,细胞呈椭圆形(图 1 C),接近于杆状,多端芽殖,长度为 2~13 μm,宽度为 0.5~2.0 μm。此菌株暂时命名为 34 号菌株。

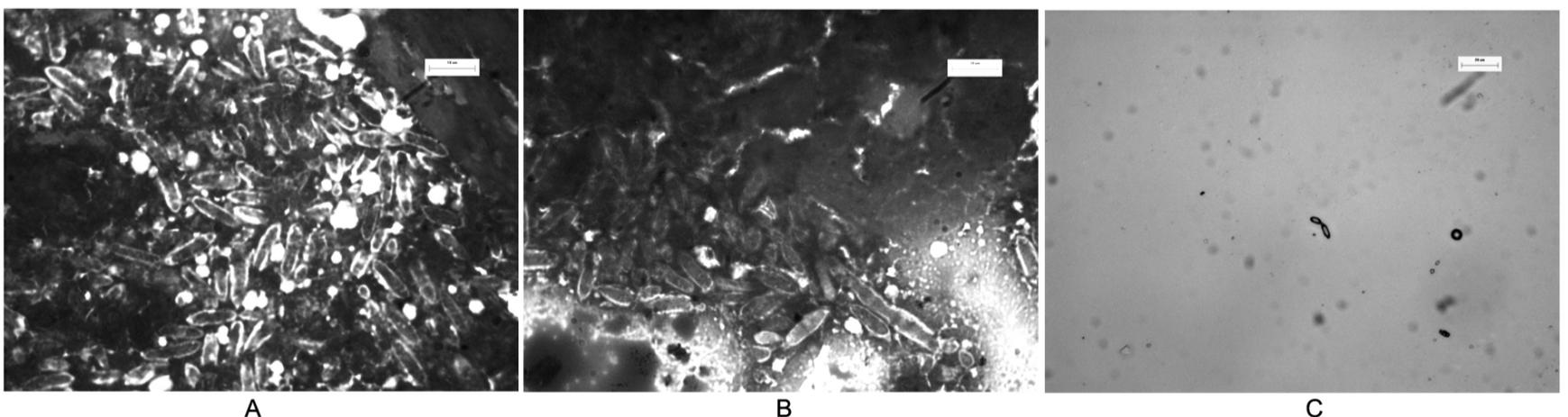


图 1 类酵母共生菌的形态

Fig. 1. Characteristics of the yeast like symbionts (YLS).

A - 褐飞虱体内共生菌的形态; B - 卵块内共生菌的形态; C - 34 号菌株形态。

A, Characteristics of the YLS in the brown planthopper; B, Characteristics of the YLS in the eggs of the brown planthopper; C, Characteristics of the strain 34.

2.3 DNA 序列比较分析

34号离体培养菌株和褐飞虱体内共生菌株 26S rDNA 区域 PCR 扩增产物,电泳后均有约 500 bp 条带显示(图 2)。PCR 产物转化质粒后测序,结果经 GenBank 核酸序列数据库同源序列搜索,发现与编号为 AF335977 的解脂假丝酵母(*Yarrowia lipolytica*) 显示出较近的亲缘关系。图 3 中结果显示虫体内类酵母共生菌(YLS)与 AF335977 显示为 99.8%的同源性,34号菌株与 AF335977 显示为 99.2%的同源性,YLS 与 34号菌株显示 95.1%的同源性。因此,可初步确定培养菌株与褐飞虱体内共生菌之间存在亲缘关系,34号菌株为褐飞虱内共生菌离体培养所得菌株。

3 讨论

共生关系研究的理想模式是:参与共生的生物能够保存,并能在分离的条件下分别进行研究;共生系统可以由组成它的生物重新组合。只有在解决共生菌分离与纯化的前提下,确定褐飞虱体内类酵母菌的种类组成与种属发生地位,才能利用核酸序列数据库中公布的信息开展进一步的类酵母共生菌的基因改造实验。由于寄主内环境与体外环境

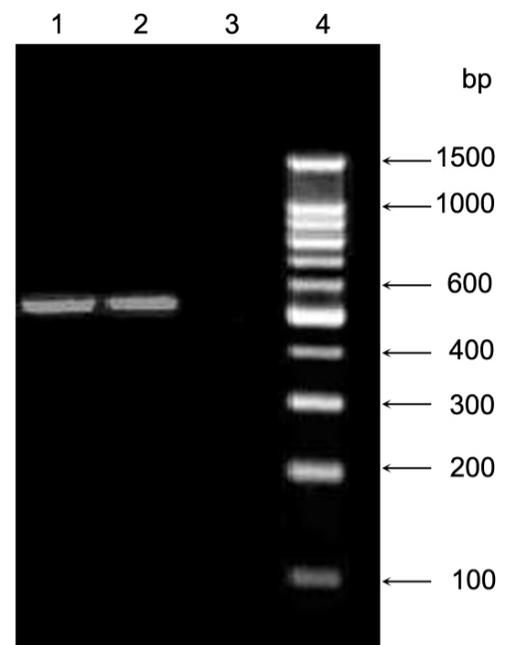


图 2 26S rDNA 片段扩增结果  
Fig.2 PCR amplification results for 26S rDNA of the yeast like symbiotes(YLS).  
1 - 34 号菌株; 2 - 褐飞虱体内共生菌; 3 - 阴性对照; 4 - Marker.  
Lane 1, Strain 34; Lane 2, YLS of BPH; Lane 3, Negative control; Lane 4, Marker.

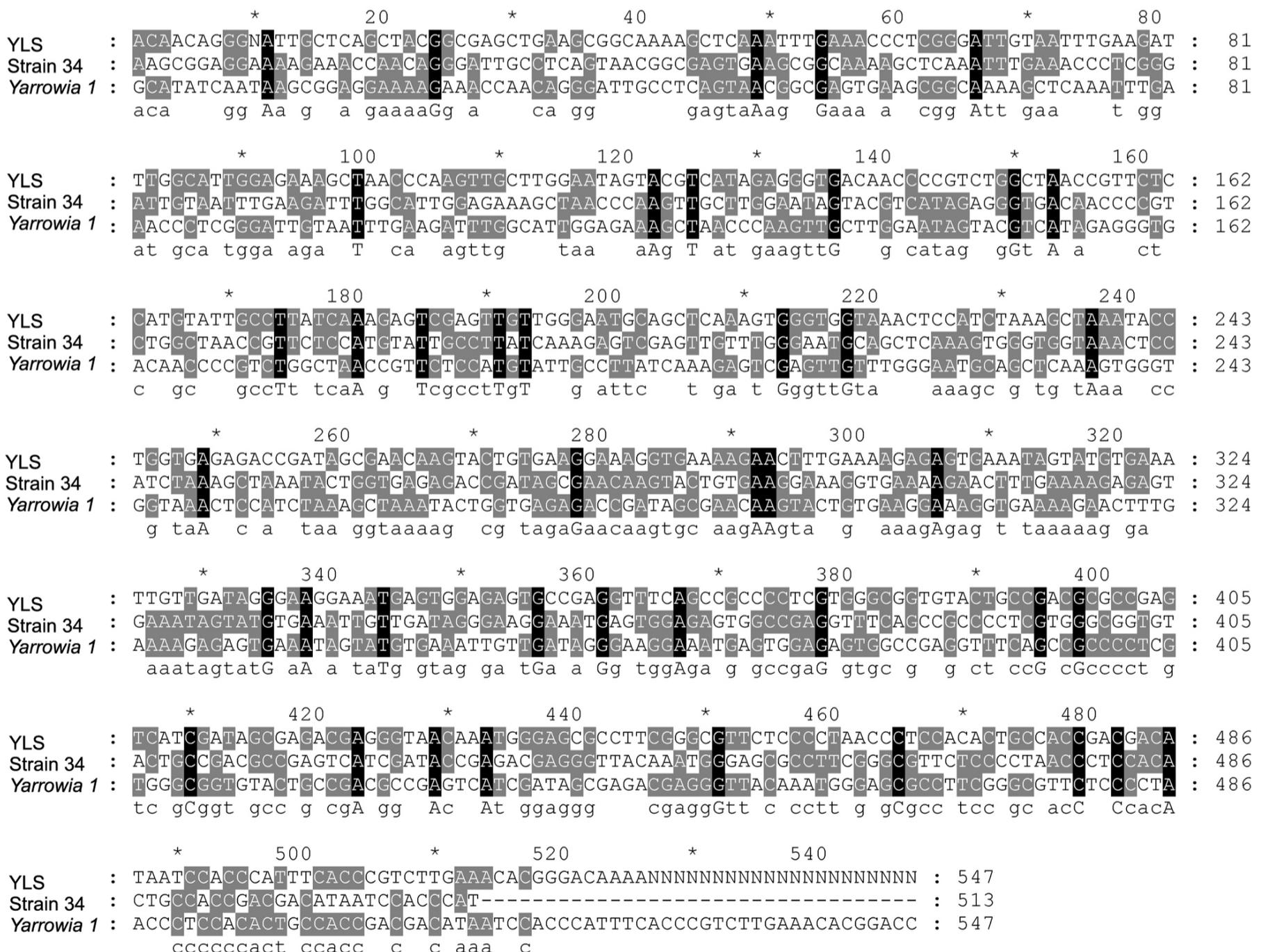


图 3 34号菌株与虫体内类酵母共生菌(YLS)26S rDNA 序列比较  
Fig 3 . The 26S rDNA sequence alignments of strain 34 and YLS directly isolated from BPH .

\* 每相邻两数值的中间值。  
\* The middle value of the close numericals .

的差异, 长期以来的观点认为褐飞虱体内共生菌是难以离体培养的。本实验运用褐飞虱体内类酵母菌通过卵母细胞垂直传递的特性, 采用卵块离体培养排除了虫体内环境的污染, 又保留了类酵母菌的全部遗传信息。培养所得 34 号菌株在形态、大小上与虫体内共生类酵母菌株无明显差异。假丝酵母属及其有性型和无性型子囊菌酵母几乎所有已知种模式菌株的 26S rDNA 的碱基序列<sup>[11]</sup> (约 500 ~ 600 bp) 均已在 GenBank/EMBL/DBJ 等国际核酸序列数据库中公布, 用这段序列可以将绝大部分种区别开, 且种内不同菌株间的碱基差异不大于 1%。本研究中 26S rDNA 的碱基序列分析显示, 34 号菌株、褐飞虱体内共生类酵母菌与子囊菌亚门 (Ascomycotina) 核菌纲 (Pyrenomycetes) 的解脂假丝酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 显示出较近的亲缘关系。这初步说明褐飞虱体内的类酵母菌株可以通过离体培养的方式获得。

Noda 等<sup>[14]</sup> 曾采用梯度离心法将类酵母共生菌直接从褐飞虱体内分离, 18S rDNA 序列测定显示类酵母共生菌与子囊菌亚门 (Ascomycotina) 核菌纲 (Pyrenomycetes) 的 *Hypomyces chrysospermus* 亲缘关系最近, 对不同致害性褐飞虱体内共生菌 18S rDNA 的序列分析也显示同样的结果<sup>[15]</sup>。这与本实验结果存在一定差异, 但 18S rDNA 作为一段保守序列, 很难显示属以下差异。类酵母共生菌的核糖核酸酶实验发现部分类酵母的 RNA 被消解而部分未被消解<sup>[16]</sup>。陈法军等<sup>[12-13]</sup> 通过褐飞虱虫体的冷冻切片也观察到了类酵母菌的多种形态。据此推测褐飞虱体内可能存在多种类酵母共生菌, 或类酵母共生菌种类在褐飞虱的不同发育阶段也发生相应变化。Noda 等采用梯度离心分离取得的可能仅仅是褐飞虱体内类酵母共生菌的混合物, 本实验中所获得的 34 号菌株也只是褐飞虱体内多种共生菌中的一种或存在于卵块阶段的菌株, 两者存在差异也是可能的。

目前对虫体内共生菌起源的看法与植物细胞器起源普遍一致: 自然界中的虫体早期感染或捕获某种微生物, 在长期的进化过程中两种生物以共生的方式协调发展, 因而内共生菌在遗传基因序列的保守片段部分与其自然界的祖先保持一致, 然而与寄主在长期共存中必然有协同发展的趋势。在 34 号菌株的保存过程中发现 A 保存的离体菌株, 40 d 转接 1 次, 6 个月后菌落生长速率减缓, 但镜检未发现形态、大小有明显变化。这表明褐飞虱内共生菌对虫体内环境存在依赖性, 保存于人工培养基上的离体菌株, 其生理功能是否会产生变化, 能否与虫体内保持一致, 都需要进一步鉴定。此外, 如离体酵母菌改造成功, 转化后的菌株如何返回虫体, 以及返还虫体之后的菌株相关的功能是否可以表达等都是需要进一步解决的问题。

#### 参考文献:

[1] 李汝铎, 丁锦华, 胡国文, 等. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社, 1996.

[2] 张志涛, 陈伟, 姜人春, 等. 稻褐飞虱致害性的转化. 昆虫

学报, 1997, 40 (增刊): 110-115.

- [3] Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H. Nitrogen recycling in brown planthopper *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast like endosymbionts in uric acid metabolism. *J Insect Physiol*, 1996, 42(2): 125-129.
- [4] Baumann P, Baumann L, Lai C Y, et al. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: Intracellular symbionts of aphids. *Ann Rev Microbiol*, 1995, 49: 55-94.
- [5] 傅强, 张志涛, 胡萃, 等. 高温处理后褐飞虱体内共生酵母菌和氨基酸需求的变化. 昆虫学报, 2001, 44(4): 534-540.
- [6] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 不同虫源和致害性的褐飞虱体内共生菌的种群动态. 华东昆虫学报, 2001, 10(1): 44-49.
- [7] Hongoh Y, Ishikawa H. Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. *Zool Sci*, 1997, 14: 581-586.
- [8] Lee Y H, Hou R F. Physiological roles of a yeast like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper. *Insect Physiol*, 1987, 33(11): 852-860.
- [9] Chen C C, Cheng L L, Kuan C C, et al. Studies on the intracellular yeast like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål: Histological observations and population changes of the symbiote. *Z Angew Entomol*, 1981, 91: 321-327.
- [10] Nasu S, Kusumi T, Suwa Y. Symbiotes of planthopper: Isolation of intracellular symbiotic microorganisms from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, and immunological comparison of the symbiotes associated with rice planthoppers (Hemiptera: Delphacidae). *Appl Entomol Zool*, 1981, 16(2): 88-93.
- [11] Kurtzman C P, Robnett C J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1216-1223.
- [12] 陈法军, 张珏锋. 褐飞虱体内酵母类共生菌的形态观察. 动物分类学报, 2006, 31(1): 55-62.
- [13] 陈法军, 曾敏, 张珏锋, 等. 三种稻飞虱成虫体内酵母类共生菌形态差异. 动物分类学报, 2006, 31(4): 728-735.
- [14] Noda H, Nakashima N, Koizumi M. Phylogenetic position of yeast like symbiotes of rice planthoppers based on partial 18S rDNA sequences. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25(5): 639-646.
- [15] 张珏锋, 陈建明, 俞晓平, 等. 褐飞虱不同致害性种群体内共生菌 18S rDNA 部分序列比较. 昆虫学报, 2006, 49(3): 528-532.
- [16] Noda H. Histological and histochemical observation of intracellular yeast like symbiotes in the fat body of the smaller brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Appl Entomol Zool*, 1977, 12(2): 134-141.