

# 褐飞虱共生解脂假丝酵母抗吡虫啉菌株的驯化

李娜<sup>1,2</sup> 陈建明<sup>1\*</sup> 张珏锋<sup>1</sup> 何月平<sup>1</sup> 陈列忠<sup>1</sup>

- (1. 浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地 浙江省农业科学院  
植物保护与微生物研究所 浙江 杭州 310021)  
(2. 杭州师范大学 生命与环境科学学院 浙江 杭州 310036)

**摘要:** 为进一步研究共生菌在褐飞虱对吡虫啉产生抗性中的生理生化机制, 在稻田杀虫剂对褐飞虱共生解脂假丝酵母生长影响的基础上, 选用不同吡虫啉浓度进行抗药性菌株的驯化。结果表明, 褐飞虱共生解脂假丝酵母在不同吡虫啉浓度(2 000、1 000 和 500 mg/L)的固体培养基上继代培养, 经过 20 代后 2 000 mg/L 培养基上的共生菌菌落数量, 与未加吡虫啉的培养基上的菌落数量差异不明显, 并且连续 3 代稳定后定为抗 2 000 mg/L 吡虫啉的共生菌菌株。在光镜下比较不同抗感吡虫啉菌株假菌丝的形态变化, 发现抗吡虫啉菌株的假菌丝出现畸形, 而且假丝变短, 部分出现了膨大。

**关键词:** 褐飞虱, 解脂假丝酵母, 吡虫啉, 离体培养, 抗药性菌株驯化

## Domestication for imidacloprid-resistant strain of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, symbiote, *Candida lipolytica*

LI Na<sup>1,2</sup> CHEN Jian-Ming<sup>1\*</sup> ZHANG Jue-Feng<sup>1</sup> HE Yue-Ping<sup>1</sup> CHEN Lie-Zhong<sup>1</sup>

- (1. State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China)  
(2. College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou, Zhejiang 310036, China)

**Abstract:** To further study physiological-biochemical mechanism of symbiote in imidacloprid-resistant brown planthopper (*Nilaparvata lugens*), imidacloprid-resistant strain of symbiote, *Candida lipolytica*, was domesticated with different concentrations of imidacloprid based on effect of insecticides on growth and development of *C. lipolytica*. The results indicated that after *in vitro* *C. lipolytica*, on solid culture medium containing 2 000, 1 000 and 500 mg/L imidacloprid were subcultured for continuous 20 generations, the colony numbers of *C. lipolytica* on solid culture medium containing 2 000 mg/L imidacloprid were no significant difference with those on control medium containing non-imidacloprid. When numbers

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30771411); 浙江省自然科学基金项目(No. Y307125)

\*通讯作者: Tel: 86-571-86400486; ✉ chenjm63@163.com

收稿日期: 2010-09-11; 接受日期: 2010-10-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

of colony kept stable for continuous three generations, the domesticated strain was called 2 000 mg/L imidacloprid-resistant one. Morphological changes of imidacloprid -resistant and -susceptible strains pseudohyphae were further observed using light microscope, it was found that pseudohyphae of imidacloprid-resistant strain occurred malformation and become shorter, some appeared enlargement.

**Keywords:** *Nilaparvata lugens*, *Candida lipolytica*, Imidacloprid, *In vitro* culture, Domestication of imidacloprid-resistant strain

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)是我国及东南亚国家水稻生产上的一种迁飞性害虫,严重威胁着我国水稻的安全生产。目前,化学农药仍是防治褐飞虱的主要手段之一,但由于滥用化学杀虫剂,导致褐飞虱产生严重抗药性<sup>[1]</sup>。因此,延缓和治理褐飞虱抗药性是我国水稻生产中急需解决的重要课题。

研究表明,同翅目昆虫(如褐飞虱)体内普遍存在共生菌,这些共生菌与寄主昆虫互惠互利、协同进化,在昆虫的生长发育、繁殖过程中起着十分重要的作用<sup>[2-7]</sup>。我们利用“卵块离体培养法”成功地培养出褐飞虱类酵母共生菌,并利用26S rDNA D1/D2区序列分析从褐飞虱体内分离鉴定出2株共生菌株<sup>[8-9]</sup>,研究发现,杀虫剂(甲胺磷、三唑磷)对褐飞虱体内共生菌的数量影响明显<sup>[10]</sup>,稻田常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱共生菌的生长影响大<sup>[11]</sup>,结合其他学者<sup>[12-14]</sup>对烟草甲共生菌的研究结果,可以说明共生菌在害虫对杀虫剂快速产生抗药性中起作用。

为了阐明体内共生菌在褐飞虱对吡虫啉产生高水平抗药性中的作用及其机制,本文结合前期工作,通过在培养基中添加吡虫啉农药来驯化褐飞虱共生菌菌株,筛选出具有抗吡虫啉能力的共生菌菌株,为进一步研究体内共生菌在褐飞虱对吡虫啉抗性发展中的生理生化和分子机理提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株:**褐飞虱共生解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)来源于浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所从褐飞虱体内分离纯化的菌株。

**1.1.2 培养基:**由浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所植保工程研究室提供的改进后CPDA固

体培养基配方。

**1.1.3 农药:**吡虫啉原药(浓度99.0%),南京红太阳集团有限公司生产。

### 1.2 方法

**1.2.1 褐飞虱共生菌菌液稀释:**取斜面保存的褐飞虱共生解脂假丝酵母菌株,活化后,在无菌条件下,用无菌水将菌落从斜面试管中洗脱下来,依次梯度稀释为 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ,取 $10^{-3}$ 的菌液按照体积比1:100的比例加入到已经预热好、冷却至30℃的固体培养基中,培养基内菌液的稀释度为 $10^{-5}$ 。

**1.2.2 吡虫啉试验浓度和对照配制:**称取1g吡虫啉原药用20mL丙酮完全溶解后,慢慢倒入容量瓶中,加无菌水定容至250mL,配成4000mg/L母液,再等倍稀释成2000、1000、500mg/L备用。对照组(0mg/L):不加吡虫啉、仅为丙酮与无菌水的混合液,即将20mL丙酮倒入容量瓶,加无菌水定容至250mL。

**1.2.3 抗吡虫啉菌株驯化方法:**取经灭菌、直径9cm的培养皿,在无菌条件下,每培养皿加入对应浓度的吡虫啉1mL,再加入含共生菌浓度为 $10^{-5}$ 的培养基9mL,迅速摇动培养皿使二者混匀。待培养基冷却定型后,将培养皿倒置放入28℃恒温培养箱中培养。试验重复4-5次。每天观察共生菌的生长情况,培养60h后,从2000mg/L的培养皿内挑取出现早、生长旺盛、菌落直径较大的菌株,接入斜面培养基,待菌落出现,再接种到平板中进行划线分离。直至菌落和菌体特征均一,得到单一菌落,作为下一代供试菌株,如此循环,直至获得稳定的褐飞虱共生解脂假丝酵母的抗性菌株。

**1.2.4 共生菌菌丝体形态观察:**挑取单菌落涂片,用轻微火焰加热固定,之后用二甲苯脱水透明处

理 2-3 h, 再加热固定, 然后用结晶紫染色法染色 2 min, 用自来水洗去残液, 然后用吸水纸吸干, 风干后即可在显微镜下观察共生菌菌丝体的形态, 并拍摄照片。

### 1.3 数据分析方法

试验数据采用 Excel、DPS3.01 数据处理软件<sup>[15]</sup>进行统计和方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗吡虫啉菌株的驯化结果

试验培养第 1 天, 个别(对照和 500 mg/L 吡虫啉)培养皿内开始出现菌落, 第 2 天开始各培养皿均出现菌落生长, 此时开始统计菌落数的变化。在筛选第 1 至第 3 代, 共生菌在不同浓度吡虫啉的培养基上生长的菌落数量存在着显著差异, 吡虫啉浓度越高, 共生菌菌落数越少, 在最高浓度(2 000 mg/L)下, 每个培养皿上的菌落数只有几十个。第 5 代开始, 共生菌在 500 mg/L 吡虫啉浓度的培养基上的生长菌落数与不含吡虫啉的对照培养基差异不显著, 说明经过连续 5 代的培养, 已产生抗 500 mg/L 吡虫啉的共生菌。连续经过 15 代的吡虫啉处理, 共生菌已能在 1 000 mg/L 吡虫啉浓度的培养基上生长较好, 与对照差异不显著, 说明已产生抗 1 000 mg/L 吡虫啉的共生菌。连续经过 18 代的吡虫啉处理, 共生菌在 2 000 mg/L 吡虫啉浓度的培养基上生长的菌落数与对照差异不显著, 并且在第 19、20 代一直没有显著差异(表 1), 说明已产生抗 2 000 mg/L 吡虫啉的共生菌, 而且抗性比较稳定。如图 1 显示, 连续筛选 20 代后共生菌在不同吡虫啉浓度的培养基上生长的菌落数, 与原始菌株没有明显差异。

### 2.2 褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和敏感菌株的形态比较

选择上述试验筛选得到的褐飞虱共生菌抗吡虫啉菌株和原始菌株进行假菌丝形态比较, 结果(图 2)发现, 抗 2 000 mg/L 吡虫啉的共生菌菌株假菌丝出现畸形, 而且假丝变短, 有些出现了膨大。说明经过 20 代吡虫啉处理后, 虽然褐飞虱共生菌已产生抗 2 000 mg/L 的菌株, 但其形态上已发生一些变化。

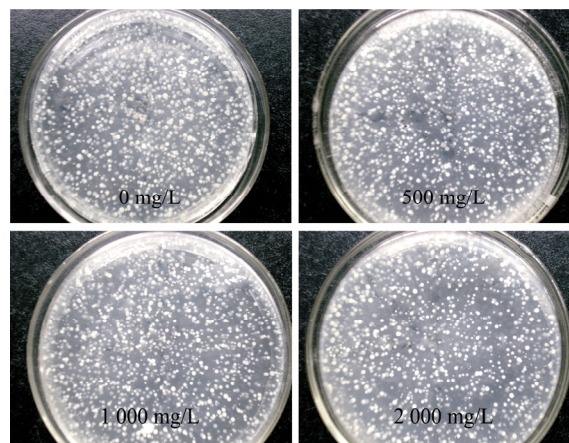


图 1 不同吡虫啉浓度下连续筛选 20 代后褐飞虱共生解脂假丝酵母的生长情况

Fig. 1 Growth of *Nilaparvata lugens* symbiote, *Candida lipolytica*, after domesticated for successive 20 generations under different imidacloprid concentrations

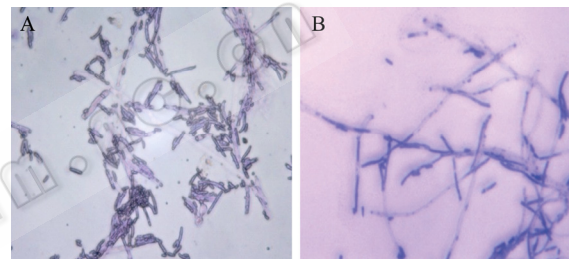


图 2 褐飞虱共生解脂假丝酵母对吡虫啉敏感菌株(A)和抗性菌株(B)的显微形态比较

Fig. 2 Micromorphology of imidacloprid -susceptible and -resistant strains of *Nilaparvata lugens* symbiote, *Candida lipolytica*

Note: A: Susceptible strain; B: Resistant strain.

## 3 讨论

微生物的世代交替时间短, 基因组成相对简单, 因而具有遗传基因易变的特点。在外界条件发生变化的情况下, 类酵母菌相比寄主褐飞虱更容易发生变异或突变。共生菌因其短的生活史及其与寄主密切的营养共生关系而对寄主所处环境变化的反应更敏感、适应更迅捷。在褐飞虱对抗性水稻品种互作过程中其体内的类酵母共生菌的个体发育变小和数量减少<sup>[16]</sup>, 必然减弱“褐飞虱/共生菌”这一营养共生关系, 进而导致寄主昆虫对抗性水稻品种致病性(适应性)的降低。当然, 通过长期的继代取食, 褐飞虱体内共生菌可能产生变异或者适应品种的共生菌占优势。

表 1 褐飞虱共生解脂假丝酵母抗性菌株的驯化结果

Table 1 Domestication for imidacloprid-resistant strain of *Nilaparvata lugens* symbiote, *Candida lipolytica*

代数 Generation	吡虫啉浓度 Concentration of imidacloprid (mg/L)	培养 2 d 菌落数 No. of colony in two-day culture (No./dics)	培养 3 d 菌落数 No. of colony in three-day culture (No./dics)	培养 4 d 菌落数 No. of colony in four-day culture (No./dics)	培养 5 d 菌落数 No. of colony in five-day culture (No./dics)
第 1 代 1st generation	0	403.67±8.14aA	460.00±52.92aA	488.00±52.46aA	501.33±56.19aA
	500	185.00±27.84bB	215.00±22.91bB	246.67±30.55bB	253.33±37.81bB
	1 000	128.33±27.21cC	124.00±22.54cC	163.33±20.82cC	174.67±2.31cC
	2 000	32.67±4.16dD	38.00±6.93dD	41.67±8.74dD	43.00±8.54dD
第 3 代 3rd generation	0	453.33±30.55aA	489.33±28.38aA	516.00±22.27aA	522.00±25.53aA
	500	372.67±25.01bA	400.67±29.14bA	394.67±24.44bB	402.67±24.44bB
	1 000	174.67±37.22cB	196.67±40.41cB	208.00±28.84cC	213.33±24.44cC
	2 000	104.33±7.09dC	123.33±15.28dC	132.67±15.53dD	138.67±12.22dD
第 5 代 5th generation	0	712.00±21.17aA	762.67±20.13aA	781.33±25.72aA	789.33±16.65aA
	500	746.67±36.07aA	798.00±37.04aA	760.00±24.00aA	786.67±40.27aA
	1 000	610.67±48.22bB	664.00±21.17bB	674.67±39.46bB	693.33±37.81bB
	2 000	341.33±20.13cC	402.67±56.76cC	429.33±45.49cC	442.67±25.72cC
第 7 代 7th generation	0	658.67±20.13aA	757.33±45.49aA	792.00±77.15aA	856.00±108.22aA
	500	677.33±40.27aA	722.67±36.07aA	742.67±35.85aA	762.67±20.13aA
	1 000	572.67±46.32bA	597.33±40.27bB	634.67±24.44bB	648.00±36.66bB
	2 000	392.00±62.86cB	440.00±52.92cC	457.33±42.77cC	458.67±25.72cB
第 9 代 9th generation	0	744.00±24.00aA	949.33±62.14aA	1002.67±40.27aA	1061.33±45.49aA
	500	733.33±33.31aA	814.00±55.43aA	924.00±81.19aA	958.67±108.62aA
	1 000	698.67±45.49aA	738.67±44.06bA	846.67±36.95bA	862.67±30.29bA
	2 000	396.00±16.00cB	433.33±24.44cB	497.33±54.45cB	534.67±65.16cB
第 11 代 11th generation	0	966.67±100.66aA	989.33±78.62aA	1033.33±61.1aA	1086.67±83.27aA
	500	841.33±44.96aA	926.67±75.72aA	984.00±94.06aA	1017.33±64.04aA
	1 000	685.33±28.38cB	806.67±30.55bB	920.00±60.00aA	936.00±54.11aA
	2 000	389.33±34.95dC	472.00±39.40dD	508.00±42.33cC	617.33±38.85cC
第 15 代 15th generation	0	730.67±80.53aA	816.00±44.54aA	936.00±63.50aA	1002.67±36.95aA
	500	693.33±62.14aA	781.33±92.72aA	914.67±46.88aA	966.67±80.03aA
	1 000	644.00±52.46aA	737.33±92.38aA	881.33±72.15aA	904.00±32.74aA
	2 000	533.33±60.58bA	586.67±87.76bA	661.33±75.61bB	674.67±68.04bB
第 17 代 17th generation	0	725.33±64.66abA	920.00±40.00aA	1018.67±51.43aA	1101.33±69.90aA
	500	874.67±103.18aA	926.67±61.10aA	1093.33±23.09aA	1120.00±80.00aA
	1 000	669.33±16.65aA	805.33±65.16aA	920.00±80.00aA	1026.67±83.27aA
	2 000	601.33±46.88bA	702.67±69.90bA	874.67±64.17bA	928.00±28.84aA
第 18 代 18th generation	0	760.00±24.00aA	829.33±16.65aA	869.33±32.33aA	1001.33±96.44aA
	500	770.67±9.24aA	850.67±64.66aA	893.33±36.07aA	989.33±48.88aA
	1 000	774.67±16.65aA	813.33±92.03aA	845.33±48.88aA	962.67±28.10aA
	2 000	724.00±16.00aA	780.00±27.71aA	838.00±28.84aA	909.33±56.19aA
第 19 代 19th generation	0	773.33±64.17aA	888.00±69.74aA	901.33±78.93aA	917.33±74.33aA
	500	808.00±60.4aA	888.00±108.22aA	898.67±97.76aA	904.00±107.63aA
	1 000	698.67±30.29aA	784.00±28.84aA	853.33±33.31aA	864.00±42.33aA
	2 000	722.67±83.27aA	788.00±26.23aA	812.67±51.08aA	825.33±59.91aA
第 20 代 20th generation	0	802.67±72.59aA	885.33±53.27aA	922.67±57.87aA	947.33±48.88aA
	500	781.33±53.27aA	936.00±34.87aA	973.33±33.31aA	981.33±25.72aA
	1 000	762.67±88.48aA	904.00±77.15aA	946.67±45.49aA	949.33±56.76aA
	2 000	749.33±44.06aA	866.67±68.04aA	909.33±64.66aA	928.00±57.69aA

注: (1) 表中数据为平均值±标准差; (2) 同一代别, 同一列相同小写字母表示不同浓度间在 0.05 水平上差异不显著, 相同大写字母表示在 0.01 水平上差异不显著。

Note: (1) Data in the table mean average±s; (2) Values followed by the same small letter within a generation and a column are not significantly different ( $P<0.05$ ), followed by the same capital letter mean no significantly difference ( $P<0.01$ ).

程新胜等<sup>[12]</sup>对烟草甲体内类酵母共生菌进行了分离培养, 并对其与烟碱的互作效应做了研究, 发现烟碱的存在对烟草甲的世代发育是不利的, 一定量烟碱的存在, 对烟草甲的存活有抑制作用。我们的研究表明, 稻田常用杀虫剂和杀菌剂农药对褐飞虱类酵母共生菌的生长均有较大的抑制作用, 用 500–2 000 mg/L 吡虫啉处理后共生菌的生长(菌落数量)显著减少, 共生菌的假菌丝生长不舒展、萎缩, 酵母多形成空泡<sup>[11]</sup>。本文通过连续 20 代继代培养获得了抗 2 000 mg/L 吡虫啉的抗性菌株, 发现该抗性菌株假菌丝出现畸形, 假丝变短, 有些出现了膨大, 菌丝形态发生变化(图 2)。说明褐飞虱类酵母共生菌抗性菌株已发生变异。本文驯化的抗性菌株为进一步研究褐飞虱共生菌抗性菌株与敏感菌株的生理生化及分子生物学差异, 以及解释共生菌在褐飞虱对吡虫啉抗性发展中的作用提供研究基础。

## 参 考 文 献

- [1] 中国农业技术推广服务中心药械处. 关于中晚稻褐飞虱对吡虫啉抗药性情况的通报[EB/OL]. (2005-9-28) <http://www.asng.gov.cn/Artice-Show>.
- [2] Chen CC, Cheng LL, Hou RF, et al. Studies on the intracellular yeast-like symbiotes in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. 1. Histological observations and population changes of the symbiote[J]. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 1981, 91(1/5): 321–327.
- [3] Chen CC, Cheng LL, Hou RF. Studies on the intracellular yeast-like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål 2. Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbiote[J]. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 1981, 92(1/5): 440–449.
- [4] Wilkinson TL, Adams D, Minto LB, et al. The impact of host plant on the abundance and function of symbiotic bacteria in an aphid[J]. Journal of Experimental Biology, 2001, 204(Pt17): 3027–3038.
- [5] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌对褐飞虱生长发育和生殖的影响[J]. 植物保护学报, 2001a, 28(3): 193–197.
- [6] 吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 等. 共生菌在褐飞虱致害性变化中的作用[J]. 昆虫学报, 2001b, 44(2): 197–204.
- [7] Lu ZX, Yu XP, Chen JM, et al. Dynamics of yeast-like symbiote and its relationship with the virulence of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, to resistant rice varieties[J]. Journal Asia-Pacific Entomology, 2004, 7(3): 317–323.
- [8] 张珏锋, 吴鸿, 陈建明, 等. 一株褐飞虱内共生菌的分离及分子鉴定[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 551–554.
- [9] 张珏锋, 陈建明, 陈法军, 等. 褐飞虱内共生菌的分离及其 26S rDNA 部分序列分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2211–2216.
- [10] 徐红星, 俞晓平, 吕仲贤, 等. 杀虫剂对褐飞虱体内共生菌的影响[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3): 126–128.
- [11] 陈建明, 何月平, 张珏锋, 等. 常用杀虫剂和杀菌剂对褐飞虱类酵母共生菌生长的影响[J]. 植物保护, 2009, 35(6): 47–51.
- [12] 程新胜, 薛宝燕, 魏重生. 烟草甲体内类酵母共生菌与烟碱的互作效应研究[C]. 中国烟草学会 2004 年学术年会论文集.
- [13] 薛宝燕. 食料与共生菌对烟草甲的影响及烟草甲防治技术研究[D]. 安徽农业大学硕士学位论文, 2005.
- [14] Dowd PF, Shen SK. The contribution of symbiotic yeast to toxin resistance of the cigarette beetle (*Lasioderma serricorne*)[J]. Entomologia Experimentalis Applicata, 1990, 56(3): 241–248.
- [15] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [16] 陈法军, 张珏锋, 陈建明, 等. 水稻与褐飞虱互作过程中虫体内类酵母共生菌的个体大小及数量变化[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 294–298.