

高温对灰飞虱体内类酵母共生菌和耐药性的影响

张晓婕^{1,2} 俞晓平^{1,*} 陈建明¹

(¹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; * 通讯联系人, E-mail: yxp@cjlu.edu.cn)

Influence of High Temperature on Yeast like Endosymbiotes and Pesticide Resistance of Small Brown Planthopper, *Laodelphax striatellus*

ZHANG Xiaojie^{1,2}, YU Xiaoping^{1,*}, CHEN Jianming¹

(¹Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; ²College of Life and Environment Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; * Corresponding author, E-mail: yxp@cjlu.edu.cn)

Abstract: Newly hatched nymphs of the small brown planthopper (SBPH, *Laodelphax striatellus*), including field and sensitive populations, were subjected to high temperature (35 °C) for 1 d, 2 d and 3 d, respectively. The number of yeast like endosymbiotes in the 3rd instar SBPH reduced by 23.47% - 34.23%, 57.86% - 61.51% and 88.96% - 90.71% after treated with high temperature for 1 d, 2 d, and 3 d, respectively. However, the size of yeast like endosymbiotes was not obviously affected. Resistance of SBPH to three insecticides (imidacloprid, chlorpyrifos and fipronil) decreased with increasing treatment time, with the order of resistance as follows: 1 d > 2 d > 3 d.

Key words: *Laodelphax striatellus*; yeast like endosymbiote; high temperature; pesticide resistance

摘要: 利用 35 °C 高温分别处理灰飞虱田间种群和敏感品系初孵若虫 1~3 d, 然后移至 25 °C 下饲养至 3 龄。经 1、2 和 3 d 处理后, 灰飞虱体内类酵母共生菌数量分别减少了 23.47%~34.23%、57.86%~61.51% 和 88.96%~90.71%; 而类酵母共生菌的个体大小并无显著变化。进一步测定这些灰飞虱种群对杀虫剂吡虫啉、毒死蜱和锐劲特的耐药性, 结果表明, 高温处理时间越长, 灰飞虱对这 3 种农药的耐药性越弱, 即耐药性顺序为 1 d > 2 d > 3 d。

关键词: 灰飞虱; 类酵母共生菌; 高温; 耐药性

中图分类号: Q143⁺ 2; Q935; S435.112⁺ 3; S481⁺ 4

文献标识码: A 文章编号: 1001-7216(2008)04-0416-05

灰飞虱 [*Laodelphax striatellus* (Fallen)] 属同翅目, 飞虱科, 是我国华北及长江流域水稻、玉米、小麦等粮食作物产区的主要害虫^[1-2], 每年造成的直接危害及因携带病毒所造成的间接损失一直是农业生产所面临的严重问题^[3-4]。而且, 由于农药的不合理使用, 灰飞虱对多种农药产生了一定的抗性^[5], 成为灰飞虱防治所面临的重要问题。

近年来, 昆虫体内共生菌的研究越来越引起国内外研究者的重视。有研究表明, 同翅目昆虫体内普遍存在着共生菌, 它与寄主昆虫的营养需求和解毒代谢有着密切联系^[6-8]。蚜虫对有机磷农药的抗性与体内的共生细菌有关^[9]。灰飞虱体内的共生菌主要为类酵母菌, 存在于脂肪体中, 随卵传递给下一代, 其数量随寄主虫龄的增大而增加^[10]。高温、抗生素和农药等能抑制灰飞虱体内类酵母共生菌的数量^[11-12], 缺乏共生菌的灰飞虱生长发育和繁殖受到影响。然而, 共生菌与抗药性之间的关系, 至今尚无相关报道。本实验通过研究缺少类酵母共生菌的

灰飞虱对吡虫啉、毒死蜱和锐劲特 3 种常用杀虫剂的敏感性变化, 探讨灰飞虱体内类酵母共生菌对灰飞虱抗药性的作用, 以期为实现“抑菌防虫”提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫

灰飞虱敏感品系为在本实验室内用大麦连续饲养 26~28 代的灰飞虱; 灰飞虱田间种群采自浙江省农业科学院水稻试验田。

1.1.2 供试药剂

95% 吡虫啉原药 (浙江湖州荣盛农药化工有限公司)、97.7% 毒死蜱原药 (浙江新安化工集团有限公司) 和 87% 锐劲特 (拜耳作物科学公司)。

收稿日期: 2008-01-07; 修改稿收到日期: 2008-04-14。

基金项目: 浙江省重大专项基金资助项目 (2005C12033)。

第一作者简介: 张晓婕 (1982-), 女, 硕士研究生。

1.2 试验方法

1.2.1 35 °C 高温处理对灰飞虱体内类酵母共生菌数量的影响

取灰飞虱田间种群和敏感品系的初孵若虫置于(35 ± 1) °C 的光照培养箱内,光照周期为 16 h 光照 8 h 黑暗,相对湿度为 80% ~ 90%,分别处理 1、2 和 3 d。处理后放入(25 ± 1) °C 的光照培养箱内饲养至 3 龄。取经不同时间处理的灰飞虱 3 龄若虫各 10 头,分别用 500 μL 0.9% 的生理盐水将试虫研磨、匀浆后,直接吸取少量(5 μL)匀浆液滴于血细胞计数板上,用显微镜观察并统计类酵母共生菌的数量,重复 3 ~ 5 次。以未经高温处理的灰飞虱作为对照。

1.2.2 35 °C 高温处理对灰飞虱体内类酵母共生菌大小的影响

从不同处理的灰飞虱 3 龄若虫中随机各取 200 头,每次随机取 10 头,解剖镜(Leica S8 APO, German)下取其腹部进行冷冻切片(Leica CM1900, German)。冷冻切片厚度为 5 ~ 7 μm,冷冻切片箱体温度设置为 -30 °C,切片头温度设置为 -40 °C。样品处理及结晶紫染色过程参照陈法军等^[13]的方法。处理后的样品置于载玻片上,室内风干后在显微镜(Leica DMLS2, German)下观察、拍照(Leica DFC320, German)。

由于灰飞虱体内的类酵母共生菌以卵形为主,利用 IPP 软件随机测定已芽殖的成熟卵形共生菌的长、宽(图 1 A、B 中箭头所示)。

1.2.3 灰飞虱对药剂的敏感性测定

采用大麦浸渍法测定不同处理的灰飞虱对 3 种

药剂的敏感性。将 3 种药剂分别用丙酮配制成母液,并用水稀释成 5 ~ 6 个浓度。取新鲜大麦苗放入药液中浸渍 30 s 后取出阴干。每 1 个试管放入 3 根经药液处理的大麦苗,然后用吸虫管吸取灰飞虱 3 龄若虫置于试管中,每管 20 头,重复 3 ~ 5 次。分别于处理后的 1、2 和 3 d 检查死虫数,并计算死亡率。

1.2.4 统计方法

采用 DPS 数据处理系统双因子方差分析统计不同灰飞虱体内类酵母共生菌的长度和宽度差异;按几率值分析法求出毒力回归线及 LC_{50} 等。

2 结果与分析

2.1 35 °C 高温处理对灰飞虱体内类酵母共生菌数量的影响

实验结果表明,灰飞虱田间种群和敏感品系的初孵若虫在 35 °C 高温下处理 1 d,再饲养至 3 龄若虫,其体内类酵母共生菌数量与对照(25 °C)若虫相比无显著差异;处理 2 d 后,类酵母共生菌数量与对照若虫相比,分别减少了 57.86% 和 61.51%;处理 3 d 后,类酵母共生菌数量减少了 90.71% 和 88.96%,均显著低于对照(表 1)。

2.2 35 °C 高温处理对灰飞虱体内类酵母共生菌形态和大小的影响

实验结果表明,在灰飞虱对照组中,田间种群体内的类酵母共生菌长度极显著大于敏感品系,而宽度无显著差别;35 °C 高温处理 2 d 后田间种群体内的类酵母共生菌的宽度显著小于敏感品系和对照(图 2)。从总体来看,高温对灰飞虱体内类酵母共生

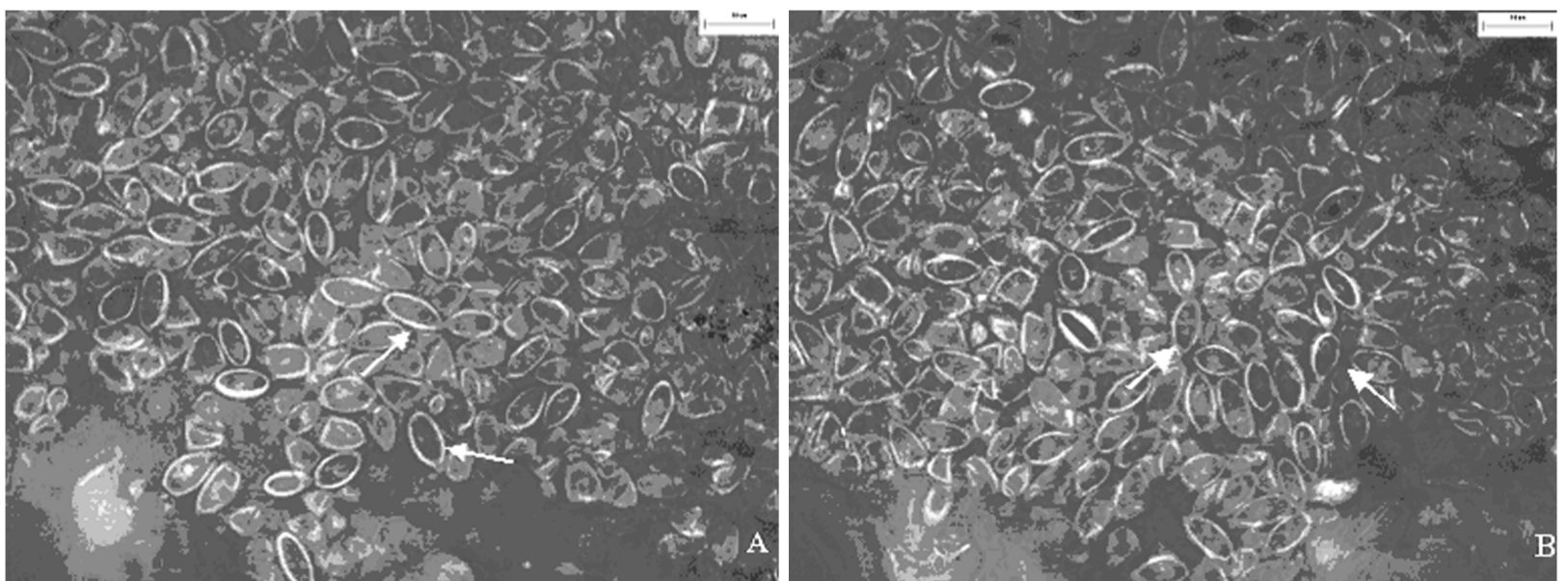


图 1 灰飞虱体内类酵母菌的典型显微照片 (bars = 10 μm)

Fig. 1. Typical micrographs of the yeast like endosymbionts in the small brown planthopper (bars = 10 μm).

A - 田间种群; B - 敏感品系。

A, Field population; B, Sensitive population.

表 1 35 高温处理后灰飞虱 3 龄若虫的酵母菌数量

Table 1 . Number of yeast like endosymbiotes in the 3rd instar nymph of the small brown planthopper after treated at 35 .

处理 Treatment	田间种群 Field population		敏感品系 Sensitive population	
	酵母菌数量 Number of yeast like endosymbiotes ($\times 10^4$)	减少率 Reduction rate / %	酵母菌数量 Number of yeast like endosymbiotes ($\times 10^4$)	减少率 Reduction rate / %
对照 CK	9.8 \pm 1.30 a	-	6.34 \pm 1.14 a	-
1 d	7.5 \pm 1.20 ab	23.47	4.17 \pm 0.92 ab	34.23
2 d	4.13 \pm 1.13 bc	57.86	2.44 \pm 0.74 bc	61.51
3 d	0.91 \pm 0.11 c	90.71	0.70 \pm 0.05 c	88.96

数据后跟相同小写字母者表示同一种群处理间在 0.05 水平上差异不显著。

Data followed by the same lowercase letters within a column indicate no significant difference by the Duncan's test at $P > 0.05$.

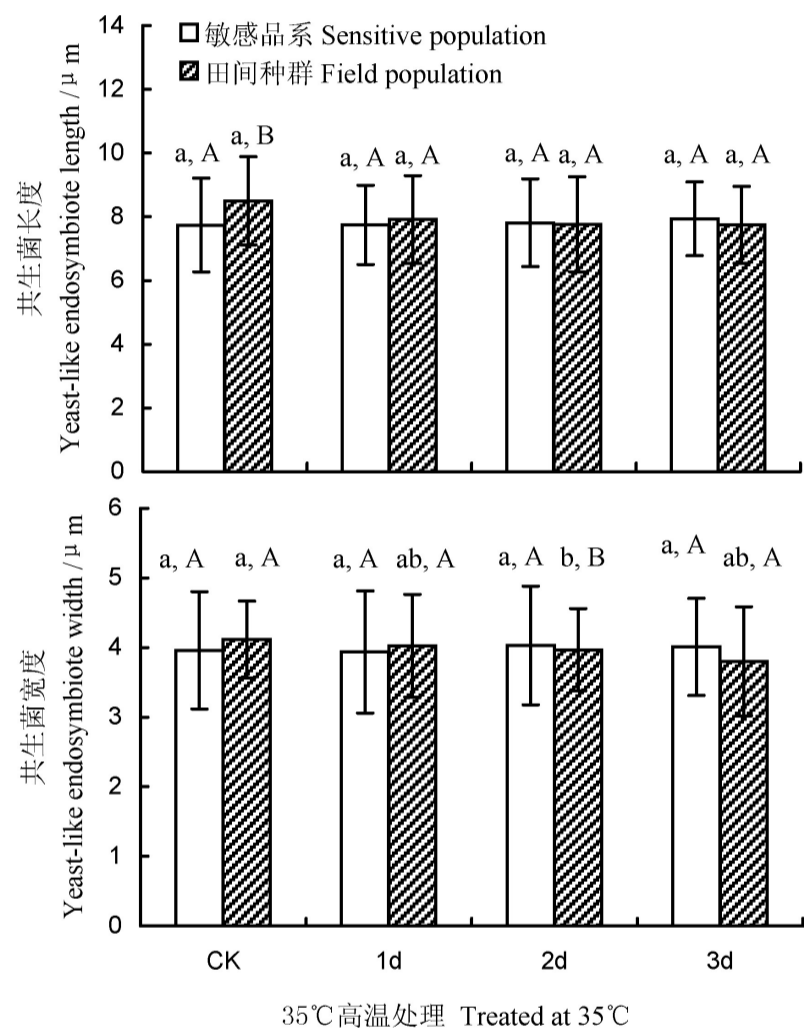


图 2 高温处理的灰飞虱体内酵母菌的长度和宽度

Fig.2 Length and width of yeast like endosymbiotes in the small brown planthopper under high temperature treatment.

相同的小写字母和大写字母分别表示同一种群灰飞虱不同处理间以及相同处理不同种群间差异未达显著水平 (Duncan 检验, $P > 0.05$)。

The same lowercase letters for the same population stand for no significant difference between different treatments and the same uppercase letters for the same treatment stand for no significant difference between populations (Duncan's test, $P > 0.05$).

菌的大小并无显著影响。

2.3 高温处理后灰飞虱的耐药性变化

2.3.1 吡虫啉对灰飞虱的毒力测定

如表 2 所示,灰飞虱田间种群和敏感品系在初孵若虫期经过 35 高温处理 1、2 和 3 d 后,吡虫啉对其 3 龄若虫的毒力 (LC_{50}) 均呈下降趋势,且处理

3 d 后下降幅度较大,说明高温处理时间越长,灰飞虱对吡虫啉的耐药性明显减弱。其中处理 1、2 和 3 d 的田间种群灰飞虱的毒力指数与其对照相比分别为 0.78、0.57 和 0.23,敏感品系的毒力指数分别为 0.87、0.66 和 0.17。

2.3.2 毒死蜱对灰飞虱的毒力测定

初孵若虫经过 35 高温处理 1、2 和 3 d 后,灰飞虱田间种群和敏感品系对毒死蜱的 LC_{50} 均明显下降,即高温处理后,灰飞虱的耐药性降低。其中处理 1 d 后田间种群和敏感品系灰飞虱的 LC_{50} 分别为对照的 0.77 和 0.82;2 d 后下降幅度较大,且田间种群的下降幅度大于敏感品系,其毒力指数分别仅为其对照的 0.38 和 0.50;3 d 后下降幅度相当,降至 0.27 和 0.30 (表 3)。

2.3.3 锐劲特对灰飞虱的毒力测定

与吡虫啉和毒死蜱相似,锐劲特对经 35 高温处理后的灰飞虱 3 龄若虫的毒力也呈下降趋势。田间种群与敏感品系的变化趋势大致相同,高温处理 1 d 后,毒力指数下降较为缓慢,分别为其对照的 0.80 和 0.84;处理 2 d 后,下降幅度较大,毒力指数仅为其对照的 0.33 和 0.34;3 d 后平缓降至 0.13 和 0.26,其 LC_{50} 相近 (表 4)。

3 讨论

存在于昆虫体内的共生菌是与昆虫在进化过程中长期共生的微生物,在寄主生长、繁殖过程中起着十分重要的作用。近年来,昆虫体内共生菌的研究越来越引起国内外的重视。在稻飞虱类酵母共生菌的研究中,共生菌与寄主的营养关系受到广泛关注。Noda 等^[14]曾报道灰飞虱体内的共生酵母菌可以为其提供脂类营养,Sasaki 等^[15]亦报道褐飞虱的共生酵母菌可能与尿酸的再利用有关。而对共生菌在稻飞虱解毒代谢,以及与抗药性关系等方面的研究

表 2 吡虫啉对灰飞虱的毒力

Table 2 . Toxicity of imidacloprid to the small brown planthopper .

虫源 Insect source	高温处理时间 Treated time for high temperature	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LG_{50} (95%的置信限) ¹⁾ LG_{50} (95% confidence interval) ¹⁾ /(mg · L ⁻¹)	<i>P</i>	毒力指数 ²⁾ Toxicity index ²⁾
田间种群 Field population	对照 CK	$y=1.3758x+1.7261$	239.57(174.43 ~ 342.43)	0.0000	1.00
	1 d	$y=1.6142x+1.3479$	187.82(98.56 ~ 437.00)	0.0002	0.78
	2 d	$y=1.4593x+1.8768$	137.74(103.87 ~ 189.10)	0.0000	0.57
	3 d	$y=1.4566x+2.4601$	54.77(33.61 ~ 103.07)	0.0002	0.23
敏感品系 Sensitive population	对照 CK	$y=1.2883x+2.8818$	45.87(12.17 ~ 223.80)	0.0065	1.00
	1 d	$y=1.7023x+2.2844$	39.94(21.56 ~ 98.17)	0.0004	0.87
	2 d	$y=1.2013x+3.5826$	30.49(18.74 ~ 58.86)	0.0002	0.66
	3 d	$y=1.2425x+3.9106$	7.67(4.99 ~ 14.43)	0.0006	0.17

1) LG_{50} 的 95% 置信区间不重叠作为不同处理间毒力差异显著的标准。下同。

2) 毒力指数 = 处理组的 LG_{50} / 对照组的 LG_{50} 。

1) Toxicities of a insecticide in treatments are considered to be significantly different if their respective 95% confidence intervals of the LG_{50} values don't overlap .

2) Toxicity index = LG_{50} of CK / LG_{50} of the treated insects ; The same as in the tables below .

表 3 毒死蜱对灰飞虱的毒力

Table 3 . Toxicity of chlorpyrifos to the small brown planthopper .

虫源 Insect source	高温处理时间 Treated time for high temperature	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LG_{50} (95%的置信限) LG_{50} (95% confidence interval) /(mg · L ⁻¹)	<i>P</i>	毒力指数 Toxicity index
田间种群 Field population	对照 CK	$y=3.9197x-0.9420$	33.14(21.67 ~ 57.93)	0.0002	1.00
	1 d	$y=2.1226x+2.0556$	25.38(8.15 ~ 861.94)	0.0075	0.77
	2 d	$y=1.7087x+3.1616$	12.18(5.58 ~ 72.47)	0.0034	0.38
	3 d	$y=1.6579x+3.4302$	8.99(5.64 ~ 18.48)	0.0007	0.27
敏感品系 Sensitive population	对照 CK	$y=1.8310x+2.9233$	14.94(5.26 ~ 523.68)	0.0091	1.00
	1 d	$y=1.7399x+3.1267$	12.22(6.87 ~ 32.71)	0.0044	0.82
	2 d	$y=2.2050x+3.0896$	7.41(5.39 ~ 11.39)	0.0003	0.50
	3 d	$y=2.7475x+3.3246$	4.53(2.77 ~ 12.24)	0.0011	0.30

表 4 锐劲特对灰飞虱的毒力

Table 4 . Toxicity of fipronil to the small brown planthopper .

虫源 Insect source	高温处理时间 Treated time for high temperature	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LG_{50} (95%的置信限) LG_{50} (95% confidence interval) /(mg · L ⁻¹)	<i>P</i>	毒力指数 Toxicity index
田间种群 Field population	对照 CK	$y=1.8610x+1.4142$	0.93(0.39 ~ 1.89)	0.0187	1.00
	1 d	$y=2.1885x+0.9444$	0.74(0.44 ~ 1.02)	0.0070	0.80
	2 d	$y=1.7383x+2.4310$	0.31(0.07 ~ 395.46)	0.0141	0.33
	3 d	$y=2.0940x+2.7651$	0.12(0.05 ~ 1.18)	0.0057	0.13
敏感品系 Sensitive population	对照 CK	$y=1.5622x+2.5096$	0.38(0.11 ~ 17.33)	0.0061	1.00
	1 d	$y=1.7582x+2.4004$	0.32(0.21 ~ 0.43)	0.0004	0.84
	2 d	$y=1.2728x+3.6125$	0.13(0.05 ~ 0.22)	0.0016	0.34
	3 d	$y=1.0425x+3.9733$	0.10(0.06 ~ 0.17)	0.0008	0.26

较少。

稻飞虱与类酵母共生菌是一个紧密联系的生命系统,前人的研究表明人为减少飞虱体内的类酵母菌数量,会导致其生长发育延迟,存活率、羽化率降低,羽化后成虫体重减轻,产卵量下降等不良影

响[7,16-17]。可以利用物理或化学的方法减少飞虱体内类酵母共生菌的数量。徐红星等^[11]利用甲胺磷和氧化乐果这2种杀虫剂对褐飞虱进行处理,其体内共生菌数量均低于对照。本研究利用高温(35℃)处理灰飞虱初孵若虫,显著降低其体内类酵

母共生菌的数量,这与 Chen 等^[18]处理结果一致,说明高温处理是一种有效降低灰飞虱若虫体内类酵母共生菌的方法。然而高温对类酵母共生菌个体生理和分子水平产生了怎样的影响,共生菌解毒酶活性是否改变等一系列类酵母共生菌内在变化的问题还有待于进一步研究。

有研究表明,昆虫体内的共生菌对杀虫剂、毒枝菌素、植物毒素能起解毒作用。烟草甲体内的类酵母共生菌可以产生水解酶,对食物中的有毒物质进行代谢^[19]。本研究中灰飞虱在经高温 1~3 d 的处理过程中,供试药剂对灰飞虱的毒力指数呈现下降趋势,即耐药性下降,且与处理后灰飞虱体内酵母菌数量的变化趋势相一致。由于在试验处理过程中,灰飞虱体内类酵母菌的个体大小并无明显差异,而数量变化显著,可以初步证明体内共生菌数量变化与灰飞虱的耐药性间存在一定的关系。至于高温处理对共生菌在生理和分子水平上的影响、共生菌在寄主体内解毒代谢的作用机理以及对灰飞虱抗药性产生的影响,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙黛珍,江玲,张迎信. 8 个水稻品种的条纹叶枯病的抗性特征. 中国水稻科学, 2006, 20(3): 219-222.
- [2] 丁锦华. 农业昆虫学. 南京: 江苏科学技术出版社, 1995.
- [3] 孙广仲,陈志清. 灰飞虱传播的病毒病发生流行特点及耕作与栽培措施调整对策. 上海农业科技, 2006(2): 108-109.
- [4] 北京农业大学. 农业植物病理学. 3 版. 北京: 农业出版社, 1984.
- [5] 庄永林,沈晋良,陈峥. 三唑磷对不同翅型稻褐飞虱繁殖力的影响. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 21-24.
- [6] Dadd R H. Nutrition: Organisms// Kerkut G A, Gilbert L I. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 4. Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion. Oxford, UK: Pergamon Press, 1985: 313-390.
- [7] 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.
- [8] Shen S K, Dowd D F. Xenobiotic induction of esterases in cultures of the yeast like symbiont from the cigarette beetle. *Entomol Exp Appl*, 1989, 52(2): 179-184.
- [9] Amiressami M. Investigation of the light microscopical and ultrastructure of the demeton smethyl resistance aphids under consideration of the mycetome symbionts of the *Phorodon humuli* Schrank// Schwemmer W, Schenk H E A. *Endocytobiology*. Berlin: Walter de Gruyter, 1980: 425.
- [10] Chen C C, Cheng L L, Kuan C C, et al. Studies on the intracellular yeast like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Histological observation and population changes of the symbiote. *Zang Ent*, 1981, 91: 32-327.
- [11] 徐红星,郑许松,童中华,等. 杀虫剂对褐飞虱体内共生菌的影响. 浙江农业学报, 2000, 12(3): 126-128.
- [12] Raguraman S, Jayaraj S. Effect of neem on yeast like symbionts harbored by brown planthopper. *JRRN*, 1988, 13(5): 32-33.
- [13] 陈法军,张珏锋,俞晓平,等. 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.
- [14] Noda H, Wada K, Saito T. Sterols in *Laodelphax striatellus* with special reference to the intracellular yeast like symbioses as a sterol source. *Insect Physiol*, 1979, 25: 443-447.
- [15] Sasaki T, Kawamura M, Ishikawa H. Nitrogen recycling in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Involvement of yeast like endosymbionts in uric acid metabolism. *Insect Physiol*, 1996, 42: 125-129.
- [16] 戴华国,宋小玲,吴小毅,等. 高温对稻褐飞虱发育与生殖的影响. 昆虫学报, 1997, 40(增刊): 159-164.
- [17] 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. 植物保护学报, 2001, 28(3): 193-197.
- [18] Chen C C, Cheng L L, Hou R F. Studies on the intracellular yeast like symbiote in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Effects of antibiotics and elevated temperature on the symbionts and their host. *Z Angew Entomol*, 1981, 92: 440-449.
- [19] Shen S K, Dowd P F. 1-naphthyl acetate esterase activity from cultures of the symbiont yeast of the cigarette beetle (Coleoptera, Anobiidae). *J Econ Entomol*, 1991, 84(2): 402-407.