

褐飞虱体内 *Arsenophonus*、*Wolbachia*、*Spiroplasma* 和 *Cardinium* 四种次生共生菌感染分析*

姜建军^{1,2**} 王凤英¹ 黄立飞¹ 陈红松¹ 杨 朗^{1***}

(1. 广西农业科学院植物保护研究所/广西作物病虫害生物学重点实验室, 南宁 530007;

2. 广西作物遗传改良生物技术重点实验室, 南宁 530007)

摘 要 【目的】 *Arsenophonus*、*Wolbachia*、*Spiroplasma* 和 *Cardinium* 是广泛分布于昆虫体内的次生共生菌, 能对寄主昆虫的生殖和发育生理产生影响, 明确不同地理种群褐飞虱体内 4 种共生菌的感染和系统发育关系可为利用共生菌防治害虫提供技术依据。【方法】 利用 *Arsenophonus* 特异性 23S rRNA 基因引物, *Wolbachia*、*Spiroplasma* 和 *Cardinium* 各自的 16S rRNA 基因引物 PCR 检测广西 10 个地市、海南海口及上海、江苏南京、湖南长沙共 14 个地理种群褐飞虱雌、雄虫体内共生菌感染情况, 并对扩增到的基因片段进行测序、构建系统发育树。【结果】 不同地区 2014 年和 2015 年褐飞虱体内 *Arsenophonus* 感染率最高的分别为河池种群 (30%) 和长沙种群 (20%)、*Wolbachia* 感染率最高为河池种群 (20%) 和南京种群 (30%), 而 *Spiroplasma* 和 *Cardinium* 在褐飞虱各种群内均未检测到。序列比对和发育分析表明, 褐飞虱体内 *Arsenophonus* 与同翅目昆虫白蜡虫 *Ericerus pela* Chavannes 体内感染的该菌关系最近; 而感染 *Wolbachia* 菌的系统发育分析表明, 除海南种群有一个个体感染 *Wolbachia* 菌 A 群外, 其余种群感染的全部为 B 群; 同时所有感染两类共生菌的个体中并未发现共感染现象。【结论】 不同地理种群褐飞虱感染 *Arsenophonus* 和 *Wolbachia* 两类共生菌的感染率并不一致; 总体上褐飞虱雌虫 *Wolbachia* 感染率要高于雄虫, 褐飞虱体内感染的两类共生菌与其它昆虫体内的共生菌序列高度一致或类似, 且在所有检测的地理种群中均未发现有 *Spiroplasma* 和 *Cardinium* 感染。

关键词 褐飞虱, 共生菌, *Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*

Detection and analysis of four secondary endosymbiotic bacteria (*Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Spiroplasma* and *Cardinium*) in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphaciade)

JIANG Jian-Jun^{1,2**} WANG Feng-Ying¹ HUANG Li-Fei¹ CHEN Hong-Song¹ YANG Lang^{1***}

(1. Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests/ Plant Protection Research Institute,

Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Guangxi Crop Genetic

Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China)

Abstract [Objectives] Insects are often infected by the endosymbiotic bacteria *Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Spiroplasma* and *Cardinium* and the detection and analysis of these bacteria in different geographic populations of the brown planthopper could provide information helpful for the control of this pest. [Methods] Specimens from 14 geographic brown planthopper populations were collected in 2014 and 2015, and their endosymbiotic bacteria identified with PCR. Phylogenetic trees were

*资助项目 Supported projects: 广西自然科学基金(2014GXNSFBA118080); 国家自然科学基金地区基金(31360438); 广西作物病虫害生物学重点实验室基金(14-045-50-ST-11)

**第一作者 First author, E-mail: jiangjianjun8008@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: ylyanglang@gxaas.net

收稿日期 Received: 2016-10-08, 接受日期 Accepted: 2016-12-31

constructed using Mega5.01 based on variation in the 23S rRNA gene of *Arsenophonus* and the 16S rRNA gene of *Wolbachia* detected in brown planthopper specimens. **[Results]** *Spiroplasma* and *Cardinium* were not detected in any samples. In 2014, the highest *Wolbachia* and *Arsenophonus* infection rates, 20% and 30%, respectively, were detected in the Hechi population. In 2015, the highest *Wolbachia* and *Arsenophonus* infection rates, 30% and 20%, respectively, were detected in the Nanjing and Changsha populations. Phylogenetic analysis revealed that *Arsenophonus* detected in the brown planthopper populations sampled was most closely related that found in the Homoptera. With the exception of the Haikou population, which was infected with the *Wolbachia* A supergroup, all other brown planthopper populations were infected with the *Wolbachia* B supergroup. There was no evidence of co-infection by *Arsenophonus* and *Wolbachia*. **[Conclusion]** The infection rates of *Arsenophonus* and *Wolbachia* varied among different geographical populations of the brown planthopper. More females were infected with *Wolbachia* than males. The *Arsenophonus* 23S rRNA gene and the *Wolbachia* 16S rRNA genes found in brown planthoppers are similar to those in other insects. There was no evidence of co-infection of by *Arsenophonus* and *Wolbachia* in the brown planthopper populations sampled, nor were *Spiroplasma* and *Cardinium* detected in any of the sampled populations.

Key words *Nilaparvata lugens* (Stål), endosymbiote, *Arsenophonus*, *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Cardinium*

共生菌是广泛存在于生物体内的一种细菌, 根据其在宿主体内的存在方式和寄主关系又分为初生共生菌和次生共生菌。一般来说, 初生共生菌在长期的进化中已经同寄主形成了协同共生的关系, 对寄主的生长发育具有重要意义, 是寄主必不可少的 (Douglas, 1998; 柴焕娜等, 2013)。次生共生菌相对于寄主并不是必要的, 在不同的条件下对寄主各有利弊。因此, 人们利用次生共生菌对寄主的影响特征通过生物防治控制农业害虫。研究表明次生共生菌可以影响寄主适应生存能力、生殖调控、寄主昆虫抗药性、抗天敌能力、致病性、耐热性等 (Berticat *et al.*, 2002; Harcombe and Hoffmann, 2004; Brownlie and Johnson, 2009; 瞿钰峰等, 2015)。在昆虫中, *Wolbachia* 是已知的研究最多, 感染昆虫种类最广泛的次生共生菌, 该菌能诱导寄主产雌性孤雌生殖, 引起细胞质不亲和性 (CI), 雄性致死和遗传雄性雌性化等 (Werren *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2015; 李培光等, 2015; 陈茜等, 2016)。利用上述特征, *Wolbachia* 在抗登革热、疟原虫和丝虫病控制方面已经取得了应用性成果 (Xi *et al.*, 2005a, 2005b; 李永军等, 2015)。共生菌 *Arsenophonus* 和 *Spiroplasma* 对寄主昆虫具有杀雄作用外 (Skinner, 1985; Mc and Me, 2006), 也可影响寄主昆虫的适合度、寄主昆虫传播植物病原关系等 (Fukatsu *et al.*, 2001; 陈宇等, 2014a), 另外 *Spiroplasma* 可导致昆虫疾

病如致蜜蜂的“五月病”和“爬蜂病”等; *Cardinium* 和 *Wolbachia* 一样, 对宿主的生殖具有调控作用, 包括胞质不亲和、诱导孤雌生殖、雌性化, 还能影响寄主的适合度 (张开军等, 2010)。

褐飞虱属同翅目飞虱科, 主要分布在日本、朝鲜半岛、泰国、缅甸、越南、菲律宾和中国等东南亚和南亚国家, 是为害水稻的重要专一性迁飞害虫, 通过刺吸式口器吸食水稻茎液并传播病害, 很容易对杀虫剂和抗虫水稻品种产生抗性, 给农业生产造成重大经济损失。目前, 化学防治仍是防控褐飞虱为害的主要手段, 而由此对环境产生的污染越来越严重, 人们迫切希望能够找到一种环境友好型防控策略, 而利用共生菌与寄主间的独特关系调控害虫正引起人们的关注, 并取得了一定的成功, 如利用 *Wolbachia* 在控制蚊虫传播抗登革热和疟疾方面。迄今为止, 研究人员已经在褐飞虱体内发现了次生共生菌如 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus*, 并研究了其对寄主褐飞虱的适合度及生殖影响, 在褐飞虱感染情况方面, 前人学者已经对不同的地理种群间进行过调查研究, 但不同种群内感染率、雌雄虫感染是否存在差别及年度间是否一致等问题还未见报道。因此, 本研究连续两年对不同地理种群褐飞虱雌雄个体内感染 *Arsenophonus*、*Wolbachia*、*Spiroplasma* 和 *Cardinium* 4 种次生共生菌的情况进行了检测,

并分析了感染的 *Arsenophonus* 和 *Wolbachia* 的系统发育关系, 以期为褐飞虱体内共生菌的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源: 供试褐飞虱样本为 2014 年和 2015 年 9—10 月份采自广西南宁、北海、桂林、贺州、河池、百色、凭祥、梧州、玉林、防城港、

江苏南京、上海、湖南长沙和海南省海口共 14 个地理种群 (图 1 和表 1)。样本采集后放入 75% 酒精中, 带回实验室 - 20℃ 保存。

试剂: *rTaq* 酶、DL2000 DNA Marker、PCR 产物纯化试剂盒购自大连宝生物公司; 琼脂糖、TAE 电泳缓冲液、EDTA、Tris、NaCl、蛋白酶 K、TE 缓冲液购自上海生物工程公司; 其它常用试剂均为国产; PCR 引物由上海生物工程公司合成。

仪器: Research plus 移液器, 德国艾本德公

表 1 褐飞虱采集及 4 种次生共生菌检测

Table 1 The collection data and the infection status of four secondary endosymbionts in the *Nilaparvata lugens*

采集地点 (代码) Site (Code)	采集时间 Collection date	样本量 (♀/♂) Sample number	感染个体 Number of infection <i>N. lugens</i>							
			<i>Wolbachia</i>		<i>Arsenophonus</i>		<i>Spiroplasma</i>		<i>Cardinium</i>	
			2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
南宁 Nanning (NN)	2014/2015.10	10/10	1♀+0♂	1♀+0♂	1♀+1♂	0	0	0	0	0
北海 Beihai (BH)	2014/2015.10	10/10	1♀+2♂	1♀+1♂	1♀+0♂	0	0	0	0	0
桂林 Guilin (GL)	2014/2015.10	10/10	3♀+0♂	3♀+1♂	0♀+1♂	1♀+2♂	0	0	0	0
贺州 Hezhou (HZ)	2014/2015.10	10/10	2♀+0♂	2♀+0♂	0	1♀+1♂	0	0	0	0
河池 Hechi (HC)	2014/2015.10	10/10	4♀+0♂	1♀+0♂	3♀+3♂	0♀+1♂	0	0	0	0
百色 Baise (BS)	2014/2015.10	10/10	1♀+1♂	1♀+2♂	3♀+1♂	0	0	0	0	0
凭祥 Pingxiang (PX)	2014/2015.10	10/10	1♀+0♂	0	0	1♀+♂	0	0	0	0
梧州 Wuzhou (WZ)	2014/2015.10	10/10	1♀+1♂	2♀+0♂	2♀+2♂	1♀+1♂	0	0	0	0
玉林 Yulin (YL)	2014/2015.10	10/10	0	1♀+0♂	0♀+2♂	0♀+1♂	0	0	0	0
防城 Fangcheng (FC)	2014/2015.10	10/10	3♀+0♂	1♀+1♂	0	1♀+♂	0	0	0	0
南京 Nanjing (NJ)	2014/2015.9	10/10	2♀+0♂	5♀+1♂	0	1♀+♂	0	0	0	0
上海 Shanghai (SH)	2014/2015.9	10/10	1♀+1♂	0	3♀+2♂	2♀+♂	0	0	0	0
长沙 Changsha (CS)	2014/2015.9	10/10	0	1♀+1♂	3♀+2♂	2♀+2♂	0	0	0	0
海口 Haikou (HK)	2014/2015.10	10/10	2♀+1♂	2♀+1♂	1♀+0♂	0♀+1♂	0	0	0	0
总计 Total		140♀+140♂	21♀+6♂	19♀+8♂	17♀+14♂	10♀+9♂	0	0	0	0

司;台式离心机 1-14,德国 Sigma 公司;DYCP-6D 型水平电泳仪,北京六一仪器厂;SX-500 高压灭菌锅,日本 TOMY 公司;Firereader 紫外凝胶成像系统,英国 UVITEC 公司;PowerCycler PCR 仪,德国耶拿公司;SW-CJ-2D 型超净工作台,苏州净化设备有限公司;GT100 震动球磨仪,北京格瑞德曼公司。

1.2 方法

1.2.1 单头褐飞虱基因组 DNA 提取 每个地理种群的褐飞虱雌雄成虫各取 10 头, DNA 提取参照温硕洋和何晓芳 (2003) 的方法, 置于 75% 酒精中保存采集的样本取出后放入 TE pH 8.0 溶液浸泡 12 h, 然后单头放入灭菌离心管中, 加入 DNA 提取液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH 9.0, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L NaCl) 研磨, 加入蛋白酶 K (400 $\mu\text{g/mL}$), 56°C 水浴 1 h, 然后 95°C 50 s, 3 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液即为褐飞虱基因组 DNA, -20°C 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增检测 根据 NCBI 数据库中褐飞虱 COI 序列 (获取号: JX880069.1) 自行设计褐飞虱 COI 基因扩增引物用于 PCR 扩增检测所提样本 DNA 的质量, 共生菌 *Arsenophonus* 采用 23S rRNA 基因特异性引物 (M11 and Baumann, 2004; 王渭霞等, 2010)、*Wolbachia* (Heddi *et al.*, 1999)、*Spiroplasma* (Kageyama *et al.*, 2006) 和 *Cardinium* (Weeks *et al.*, 2003) 均采用各自 16S rRNA 基因特异性引物检测, 全部序列引物见表 2。所有 PCR 反应体系均为 25 μL , 包含 2.5 μL PCR buffer, 2 μL dNTPs (各 2.5 mmol), 上下游引物各 1.25 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), *Taq* 酶 0.0625 μL (5 U/ μL), DNA 模板 1.25 μL , 加灭菌水 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 50~57°C (依据各引物退火温度 T_m 值, 表 1) 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 7 min, 4°C 保存。每次 PCR 扩增均设置阴性和阳性对照, 以灭菌水 ddH₂O 代替 DNA 为阴性对照, 共生菌

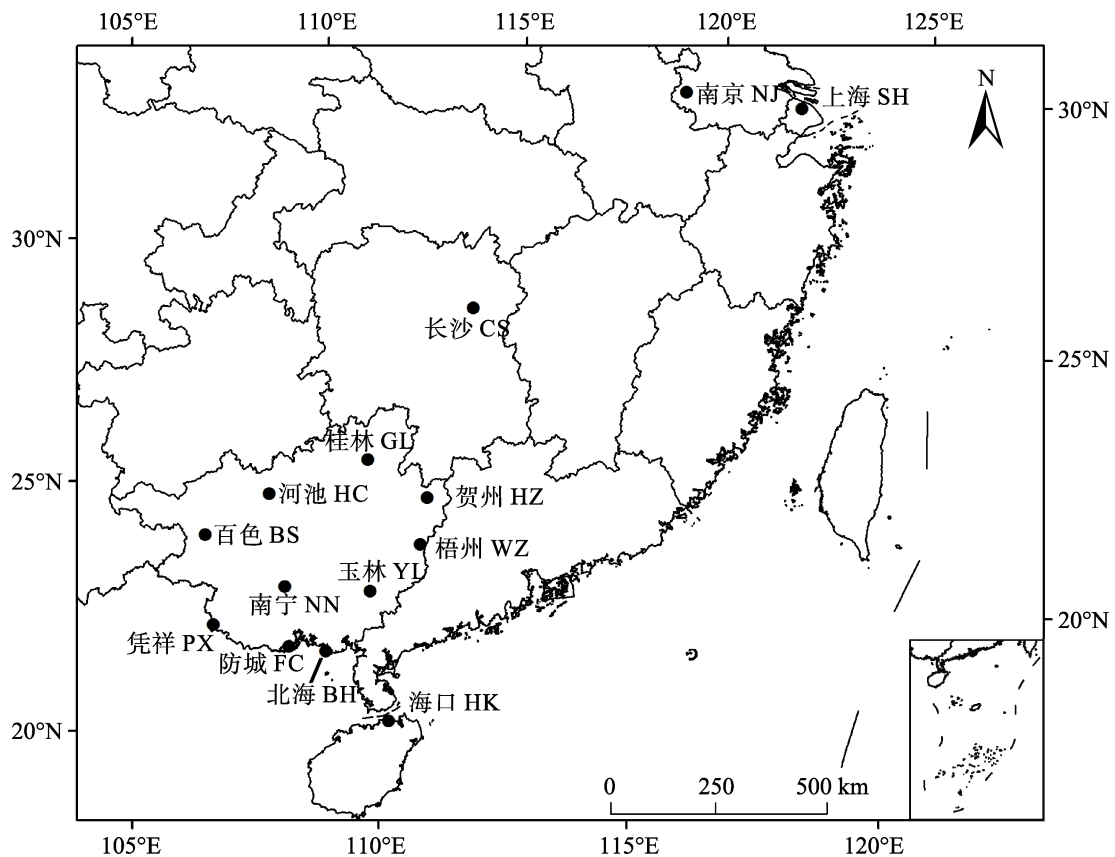


图 1 褐飞虱地理种群样本采集点

Fig. 1 The collection sites of the sampling geographical populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens*

Arsenophonus 和 *Wolbachia* 以前期实验得到的感染褐飞虱样本 DNA 为阳性对照, *Cardinium* 菌以感染的白背飞虱 DNA 样为阳性对照, *Spiroplasma* 菌以感染的黑腹果蝇 DNA 样为阳性对照。各反应 PCR 产物取 5 μ L 用于 1.5% 琼脂凝胶电泳, 凝胶电泳成像系统观察记录扩增结果。

1.2.3 序列测序和系统发育分析 感染共生菌的全部 PCR 产物纯化后直接进行测序, 测序由上海生物工程有限公司完成。测序质量、序列比

对及拼接采用 MEGA 5.01 软件分析, 拼接后的序列利用 NCBI 网站上的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 功能进行同源序列搜索, 确定所扩增的序列为目的基因。构建系统发育树时相同地理种群中有相同序列时, 只选取其中一条序列。在 MEGA 5.01 软件中, 采用 Kimura 2-paramter 模型计算序列间的遗传距离, 邻接法 (NJ) 构建系统树, 系统树各分支置信度 (Bootstrap) 均进行 1 000 次的重复检验。

表 2 本研究所用引物信息
Table 2 The PCR primers data in this study

引物 Primer	序列 Sequence	退火温度 Annealing temperature	扩增长度 Size range (bp)	扩增基因 Gene	参考文献 References
BHP-CO I -F BHP-CO I -R	CATTATCGCTAGATTATCC TCAGAGTATCGTCGTGGT	52	163	mtCO I gene of <i>Nilaparvata lugens</i>	自行设计 Designed in this study
Ars23S-1 Ars23S-2	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA GGTCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC	57	582	23S rRNA gene of <i>Arsenophonus</i>	Thao <i>et al.</i> , 2004
16S-F 16S-R	CGGGGGAAAAATTTATTGCT AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	55	589	16S rRNA gene of <i>Wolbachia</i>	Heddi <i>et al.</i> , 1999
SpoulF SpoulR	GCTTAACTCCAGTTCGCC GCTYAACTCCAGKTCGCC	52	421	16S rRNA gene of <i>Spiroplasma</i>	Kageyama <i>et al.</i> , 2006
CLOf CLOr1	GCGGTGTAAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT	57	450	16S rRNA gene of <i>Cardinium</i>	Weeks <i>et al.</i> , 2003

2 结果与分析

2.1 褐飞虱基因组 DNA 提取

采用褐飞虱特异性引物对所有样本进行 PCR 扩增、电泳检测后, 均显示有一条 160 bp 左右的特异性条带, 表明所提取的 DNA 样本符合要求, 可以进行下一步的分析。

2.2 不同地理种群褐飞虱体内 4 种共生菌的检测

分别对 14 个地理种群样本, 雌雄各 10 头, 采用 16S rDNA 基因特异性引物 PCR 扩增检测结果 (表 1) 表明, 2014 年玉林、长沙和 2015 年凭祥、上海种群样本中未检测出 *Wolbachia* 外, 其它种群中均检测到了 *Wolbachia* 感染, 但有些种群中仅雌虫或雄虫体内感染 *Wolbachia*, 仅雌虫体内感染 *Wolbachia* 有 2014 采集样本: 南宁、

桂林、贺州、河池、凭祥、防城港、南京和 2015 年采集样本: 南宁、贺州、河池、梧州、玉林; 仅雄虫体内感染 *Wolbachia* 的有 2014 年梧州样本及 2015 防城港和长沙样本。雌虫感染率 2014 年最高的为河池种群 40%, 2015 年最高为南京种群 50%; 2014 年和 2015 年雄虫感染率最高的分别为北海种群和百色种群, 感染率均为 20% (表 3)。总体上, 采集的褐飞虱体内 *Wolbachia* 雌虫感染率要高于雄虫, 2014 年检测的全部样本中, 雌虫 *Wolbachia* 平均感染率为 15%, 雄虫为 4.29%; 2015 年雌虫平均感染率为 13.57%, 雄虫为 5.71%。

全部地理种群连续两年的检测结果中, 除 2014 年贺州、凭祥、防城港、南京种群和 2015 年南宁、北海、百色种群未检测出感染 *Arsenophonus* 外, 其它种群均有 *Arsenophonus*

表 3 不同地理种群褐飞虱体内共生菌的感染率
Table 3 The infection rate of various endosymbionts in different geographic populations of the brown planthopper

采集地点 (代码) Site (Code)	样本量 (头) Sample number	Wolbachia 感染率 (%) Wolbachia infection rate			Arsenophonus 感染率 (%) Arsenophonus infection rate			Spiroplasma 感染率 (%) Spiroplasma infection rate		
		2014 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2015 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2015 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2014 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2015 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2014 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2015 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2014 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)	2015 总感染率 (雌+雄) Total (female + male)
南宁 Nanning (NN)	20(10♀+10♂)	5(10♀+0♂)	5(10♀+0♂)	10(10♀+10♂)	0	0	0	0	0	0
北海 Beihai (BH)	20(10♀+10♂)	15(10♀+20♂)	10(10♀+10♂)	5(10♀+0♂)	0	0	0	0	0	0
桂林 Guilin (GL)	20(10♀+10♂)	15(30♀+0♂)	20(30♀+10♂)	5(0♀+10♂)	15(10♀+20♂)	0	0	0	0	0
贺州 Hezhou (HZ)	20(10♀+10♂)	10(20♀+0♂)	10(20♀+0♂)	0	10(10♀+10♂)	0	0	0	0	0
河池 Hechi (HC)	20(10♀+10♂)	20(40♀+0♂)	5(10♀+0♂)	30(30♀+30♂)	5(0♀+10♂)	0	0	0	0	0
百色 Baise (BS)	20(10♀+10♂)	10(10♀+10♂)	15(10♀+20♂)	20(30♀+10♂)	0	0	0	0	0	0
凭祥 Pingxiang (PX)	20(10♀+10♂)	5(10♀+0♂)	0	0	5(10♀+0♂)	0	0	0	0	0
梧州 Wuzhou (WZ)	20(10♀+10♂)	5(0♀+10♂)	10(20♀+0♂)	20(20♀+20♂)	10(10♀+10♂)	0	0	0	0	0
玉林 Yulin (YL)	20(10♀+10♂)	0	5(10♀+0♂)	10(0♀+20♂)	5(0♀+10♂)	0	0	0	0	0
防城 Fangcheng (FC)	20(10♀+10♂)	15(30♀+0♂)	5(0♀+10♂)	0	5(10♀+0♂)	0	0	0	0	0
南京 Nanjing (NJ)	20(10♀+10♂)	10(20♀+0♂)	30(50♀+10♂)	0	5(10♀+0♂)	0	0	0	0	0
上海 Shanghai (SH)	20(10♀+10♂)	10(10♀+10♂)	0	25(30♀+20♂)	10(20♀+0♂)	0	0	0	0	0
长沙 Changsha (CS)	20(10♀+10♂)	0	5(0♀+10♂)	25(30♀+20♂)	20(20♀+20♂)	0	0	0	0	0
海口 Haikou (HK)	20(10♀+10♂)	15(20♀+10♂)	15(20♀+10♂)	5(10♀+0♂)	5(0♀+10♂)	0	0	0	0	0
总计 Total	280(140♀+140♂)	9.6(15♀+4.3♂)	9.6(13.6♀+5.7♂)	11.1(12.1♀+10♂)	6.8(7.1♀+6.4♂)	0	0	0	0	0

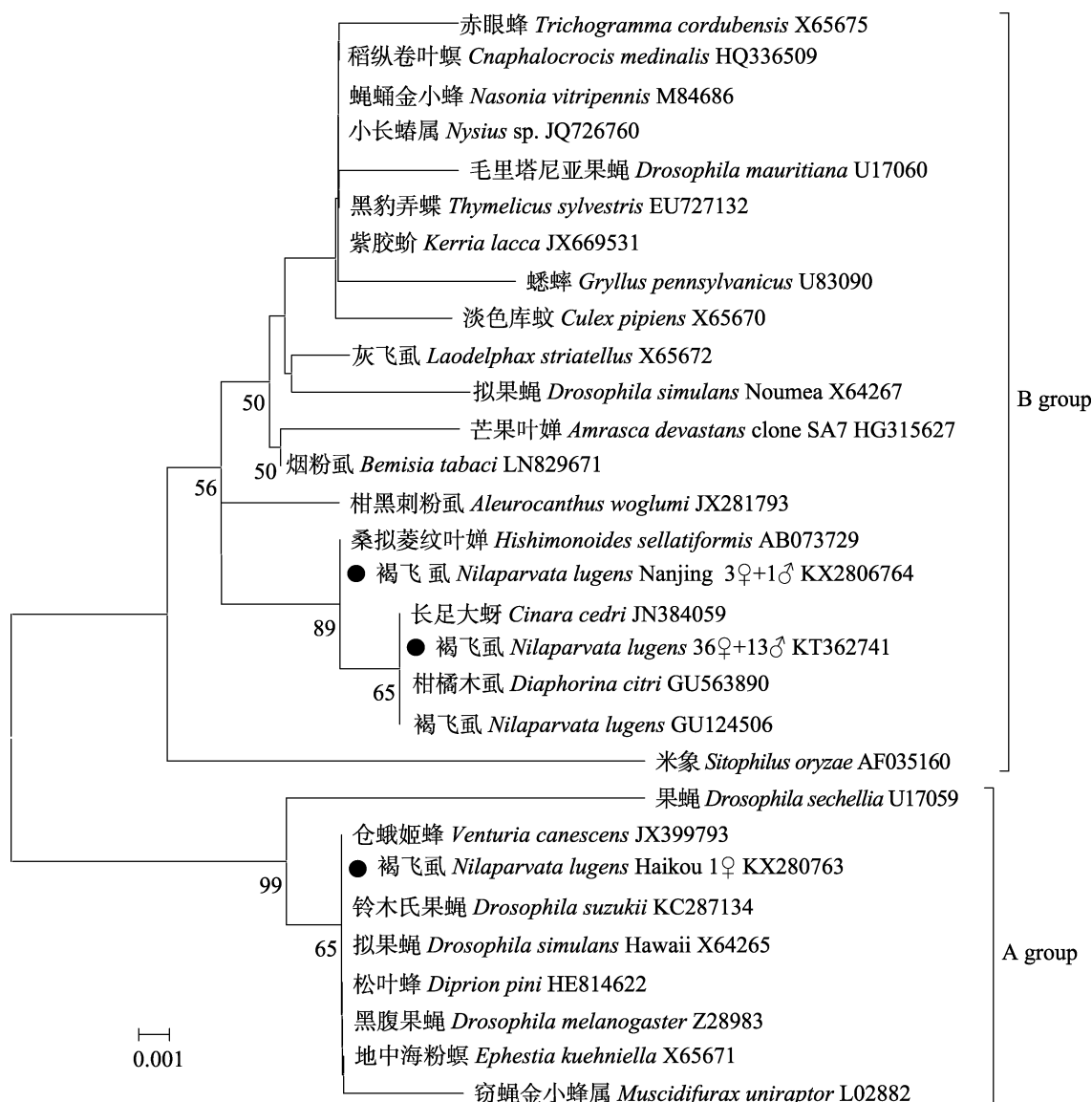


图 2 基于 16S rRNA 基因构建的褐飞虱体内 *Wolbachia* 系统发育树 (NJ 法)

Fig. 2 The NJ-phylogenetic tree inferred from 16S rRNA gene sequences of *Wolbachia* in *Nilaparvata lugens*

● 为本研究扩增得到的序列。下图同。

The symbol ● represents the sequences were obtained in this study. The same below.

菌感染现象, 2014 年雌虫中有 17 个样本感染 *Arsenophonus*, 平均感染率为 12.14%, 雄虫有 14 个样本感染, 平均感染率为 10%, 2015 年雌虫中有 10 个样本感染 *Arsenophonus*, 平均感染率为 7.14%, 雄虫有 9 个样本感染, 平均感染率为 6.43% (表 2, 表 3)。

2014 年和 2015 年所有采集样本中均未检测到 *Spiroplasma* 和 *Cardinium*, 另外在感染 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 共生菌的褐飞虱个体中均未发现两种菌共感染现象 (表 2, 表 3)。

2.3 褐飞虱体内 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 共生菌的序列比对及系统发育分析

将褐飞虱体内检测到的全部 *Wolbachia* 16S rRNA 进行测序、拼接比对, 全部 54 个序列中, 共有 3 种基因型, 其中 2015 年南京种群样本有 2 种基因型 (片段长度为 590 bp, GenBank 获取号为: KX280764 和 KT362741), 但两种基因型只差别一个碱基。2014 年海南种群有 2 种基因型 (GenBank 获取号为: KX280763 和 KT362741),

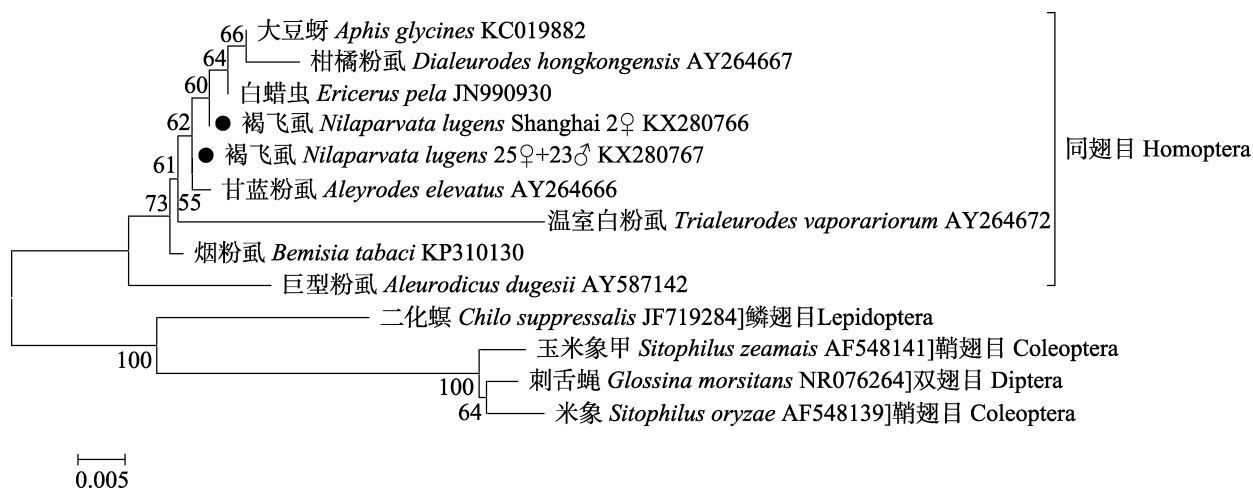


图3 基于 23S rRNA 基因构建的褐飞虱体内 *Arsenophonus* 系统发育树 (NJ 法)

Fig. 3 The NJ-phylogenetic tree inferred from 23S rRNA gene sequences of *Wolbachia* in *Nilaparvata lugens*

其它种群样本序列均一致 (GenBank 获取号为: KT362741), 经序列比对分析, 其中 2014 年海南种群中有 1 个雌性感染的 *Wolbachia* 属于 A 群外 (KX280763), 其它全部样本感染的均为 B 群 (KT362741 和 KX280764)。

对褐飞虱感染的 *Arsenophonus* 23S rDNA 基因测序后, 获得 532 bp 长度的片段序列, 拼接比对后发现全部 47 个样本中, 大部分种群感染的 *Arsenophonus* 23S rDNA 基因序列均完全一致 (GenBank 获取号为: KX280766), 仅在 2015 年上海种群中的两个雌性个体感染的 23S rDNA 基因序列同其它种群有一个碱基差异 (GenBank 获取号为: KX280767)。

从 NCBI 数据库中下载不同昆虫体内感染的 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列, 并利用 MEGA 5.01 软件将褐飞虱体内与其它昆虫体内的 *Wolbachia* 16S rRNA 基因序列进行比对分析, 并构建系统发育树 (图 1)。系统发育结果表明, 本研究大部分褐飞虱体内感染的 *Wolbachia* 属于 B 群, 同已知的同长足大蚜 *Cinara cedri*、柑橘木虱 *Diaphorina citri*、褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、桑拟菱纹叶蝉 *Hishimonoides sellatifomis* 等体内的 *Wolbachia* 16S rRNA 序列进化关系较近, 相似性在 99% 以上。但在 2015 年海南种群中的一个雌性个体感染的 *Wolbachia* 属于 A 群, 同仓蛾姬蜂 *Venturia canescens* JX399793、铃木

氏果蝇 *Drosophila suzukii* KC287134、拟果蝇 *Drosophila simulans* Hawaii X64265、松叶蜂 *Diprion pini* HE814622 等物种体内的 *Wolbachia* 16S rRNA 进化关系较近, 序列相似性为 100%。

将褐飞虱体内感染的 *Arsenophonus* 23S rDNA 与其它昆虫体内的 *Arsenophonus* 23S rDNA 序列在 MEGA 5.01 软件中比对分析, 并构建系统发育树 (图 2), 结果表明, 褐飞虱 *Arsenophonus* 23S rDNA 基因序列同其它同翅目昆虫大豆蚜 *Aphis glycines* KC019882、柑橘粉虱 *Dialeurodes hongkongensis* AY264667、白蜡虫 *Ericerus pela* JN990930、甘蓝粉虱 *Aleyrodes elevatus* AY264666 和温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* AY264672 等昆虫体内的 *Arsenophonus* 进化关系较近, 聚为一个分支, 其序列相似性在 96%~99%。鳞翅目的二化螟 *Chilo suppressalis* JF719284、鞘翅目的玉米象甲 *Sitophilus zeamais* AF548141 和米象 *Sitophilus oryzae* AF548139 及双翅目的刺舌蝇 *Glossina morsitans* NR076264 体内感染的 *Arsenophonus* 23S rDNA 基因序列聚为一支, 同褐飞虱体内 *Arsenophonus* 23S rDNA 基因序列相似性在 92%~94%。

3 讨论

利用 *Arsenophonus*、*Wolbachia*、*Spiroplasma* 和 *Cardinium* 4 种共生菌的特异性基因序列检测

了其 14 个褐飞虱地理种群中的感染情况, 结果分析表明 *Arsenophonus* 和 *Wolbachia* 共生菌在褐飞虱体内均有感染, 但 *Spiroplasma* 和 *Cardinium* 共生菌在所用样本中未能检测到。

本研究中, 除了 2014 年玉林和长沙褐飞虱种群及 2015 年贺州和凭祥种群未检测到 *Wolbachia* 共生菌外, 其它种群均连续两年的样本中均有 *Wolbachia* 感染, 但各种群之间感染率并不相同, 从 0~30% (2015 年南京种群) 不等, 而序列比对结果表明大部分样本中感染的 *Wolbachia* 16S rRNA 序列完全一致, 在系统进化关系上属于 B 大群。这种现象可能与褐飞虱的迁飞性及已报道的昆虫体内共生菌感染率与种群所处的地理位置气候相关 (孙秀新等, 2016), 褐飞虱每年 3—5 月份从东南亚地区迁入我国并进一步北迁 (翟保平, 2011), 期间经过数代繁殖后 (Sōgawa, 2003), 9—10 月份开始回迁, 由于迁入地年度间的气候变化、寄主品种更换等可能影响其感染率。而每年的回迁与迁出交替, 使各种群褐飞虱的亲缘关系较近, 其体内共生菌没有产生遗传分化, 可能是其序列一致的原因。另外, 在全部感染的 54 头样本中, 2014 年海南样本 1 头雌虫体内的 *Wolbachia* 16S rRNA 序列经分析属于 A 群 2015 年南京样本中有 1 头雌虫和 3 头雄虫体内的 *Wolbachia* 16S rRNA 序列虽然属于 B 群, 但同褐飞虱体内 *Wolbachia* 大部分序列有一个碱基的差别, 同桑拟菱纹叶蝉、马铃薯尖翅虱和长沫叶蝉等昆虫体内的序列相似性为 100%, 推断其原因可能和 *Wolbachia* 的水平传播方式有关。褐飞虱田间拟寄生物比较广泛, 在褐飞虱体内发现少数个体 *Wolbachia* 菌序列差别, 可能是褐飞虱田间寄生蜂和拟寄生物在寄生时发生了共生菌水平传播作用。已有的研究表明 *Wolbachia* 可通过稻虱红螯蜂在稻田褐飞虱、灰飞虱和白背飞虱之间进行传播 (Noda *et al.*, 2001; 甘波谊等, 2002)。

褐飞虱与其它昆虫体内 *Arsenophonus* 23S rRNA 基因序列构建的进化树中, 褐飞虱 *Arsenophonus* 与同翅目柑橘粉虱、白蜡虫甘蓝粉虱等昆虫体内 *Arsenophonus* 进化距离较近, 聚为一支, 而鳞翅目二化螟、双翅目刺舌蝇和鞘翅

目的玉米象甲、米象聚为一支, 这与先前王渭霞等 (2010) 利用 16S rDNA 序列分析褐飞虱体内 *Arsenophonus* 系统发育关系与木虱科和粉虱科等其它同翅目昆虫体内的 *Arsenophonus* 共生菌归为一类, 在进化上较为接近的结果一致。这也间接说明了 *Arsenophonus* 可以在不同昆虫寄主之间可以发生水平传播, 并且其可能与寄主间存在协同进化的可能性。

另外在本研究中, 在褐飞虱体雌虫内 *Wolbachia* 感染率要高于雄虫, 两年雄虫感染率分别为 15% 和 13.57%, 雌虫为 4.29% 和 5.71%, 而在对铃木氏果蝇不同地理种群中的 *Wolbachia* 检测表明, 总体上雌虫感染率 (38.8%) 要低于雄虫感染率 (44.4%) (于毅等, 2013), 与褐飞虱雌雄感染率比相反。研究表明 *Wolbachia* 对寄主具有雌性化和杀雄作用, 但 Zhang 等 (2010) 及张慧 (2010) 发现共生菌 *Wolbachia* 在海南三亚, 广西南宁和云南宁洱 3 个地理种群的褐飞虱中均不能诱导 CI, 后代的性比也没有差异, 且这 3 个种群感染的 *Wolbachia* 是同一个株系 (wLug), 本研究中 14 个地理种群褐飞虱总体上雌虫 *Wolbachia* 感染率要高于雄虫的具体原因还需要今后进一步的研究。

Arsenophonus 虽然具有杀雄作用, 但陈宇等 (2014b) 研究表明, *Arsenophonus* 对褐飞虱后代数量及性比没有显著的作用, 无雄性致死作用, 本研究结果褐飞虱雌雄虫 *Arsenophonus* 的感染率差别不大, 间接证实了这一点。同时, 褐飞虱感染 *Arsenophonus* 的年度间差异是否和迁飞有关尚不清楚, 但有研究表明, 次生共生菌是短期发生的且不稳定, 受生存的地理气候和寄主品种等影响较大 (Tsuchida *et al.*, 2002; Osaka *et al.*, 2008; 于卫卫等, 2013)。王渭霞等 (2010) 研究显示, 水稻感虫品种 TN1 饲养的褐飞虱种群内 *Arsenophonus* 属共生菌含量显著高于抗虫水稻品种 ASD7 和 Mudgo 饲养的种群; 同时褐飞虱暴发也存在年份差异, 这与全球气候变化存在着密切关系 (祝树德等, 1994; 包云轩等, 2014), 这些为我们今后阐述褐飞虱体内共生菌 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 感染存在地理种群和

年度间差异提供了思路。

本文连续两年调查分析了不同地区褐飞虱雌雄虫体内 *Arsenophonus*、*Wolbachia*、*Spiroplasma* 和 *Cardinium* 4 种共生菌的感染情况，并对感染的 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 进行了系统进化分析，可为今后利用共生菌防治褐飞虱研究提供技术参考。

参考文献 (References)

- Ahmed MZ, Li SJ, Xue X, Yin XJ, Ren SX, Jiggins FM, Greeff JM, Qiu BL, 2015. The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. *PLoS Pathogens*, 11(2): e1004672.
- Bao YX, Jiang R, Xie XJ, Zhu YQ, Yang RM, Zhu F, 2014. Impact of climate anomalies on catastrophic immigrations of *Nilaparvata lugens* (Stål) in Jiangsu Province. *Acta Ecologica Sinica*, 34(23): 7078–7092. [包云轩, 蒋蓉, 谢晓金, 朱叶芹, 杨荣明, 朱凤, 2014. 近 30 年气候异常对江苏省褐飞虱灾变性迁入的影响. *生态学报*, 34(23): 7078–7092.]
- Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M, 2002. High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 269 (1498): 1413–1416.
- Brownlie JC, Johnson KN, 2009. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiology*, 17(8): 348–354.
- Chai HN, Wu HY, Du YZ, 2013. Detection and analysis of symbiotic bacteria, *Arsenophonus* and *Wolbachia*, in striped stemborer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 24(12): 3517–3522. [柴焕娜, 吴海燕, 杜予州, 2013. 水稻二化螟内共生菌杀雄菌属和沃尔巴克氏体的检测与分析. *应用生态学报*, 24(12): 3517–3522.]
- Chen Q, Wang LY, Yang ZC, Zhao CJ, He L, Zhang HY, 2016. Temperature regulates the reproduction mode of *Trichogramma embryophagum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by influencing the titer of endosymbiont *Wolbachia*. *Acta Entomologica Sinica*, 59(4): 464–471. [陈茜, 王丽艳, 杨志强, 赵长江, 贺琳, 张海燕, 2016. 温度通过影响 *Wolbachia* 滴度调控赤眼蜂生殖方式. *昆虫学报*, 59(4): 464–471.]
- Chen Y, Wang WX, Chen Y, Fu Q, 2014a. Research progress on the bacterial symbiont *Arsenophonus* of insects. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 26(2): 530–536. [陈宇, 王渭霞, 陈洋, 傅强, 2014. 昆虫 *Arsenophonus* 属共生菌的研究进展. *浙江农业学报*, 26(2): 530–536.]
- Chen Y, Chen Y, Wang WX, Lai FX, Fu Q, 2014b. A preliminary study on the transfer mode and biological significance of endosymbiont *Arsenophonus* in *Nilaparvata lugens*, 2014. *Chinese Journal of Rice Science*, 28(1): 92–96. [陈宇, 陈洋, 王渭霞, 赖凤香, 傅强, 2014. 褐飞虱杀雄菌属共生菌 *Arsenophonus* 的传递方式与生物学意义初探. *中国水稻科学*, 28(1): 92–96.]
- Douglas AE, 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43(1): 17–37.
- Fukatsu T, Tsuchida T, Nikoh N, Koga R, 2001. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied & Environmental Microbiology*, 67(3): 1284–1291.
- Gan YP, Zhou WG, Feng LB, Shen DL, Li CB, 2002. Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 14–17. [甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 沈大棱, 李昌本, 2002. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. *昆虫学报*, 45(1): 14–17.]
- Harcombe WH, Hoffmann AA, 2004. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(1): 45–50.
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles HN, Ardon P, 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(12): 6814–6819.
- Kageyama D, Anbutsu H, Watada M, Hosokawa T, Shimada MF, Ukatsu T, 2006. Prevalence of a Non-Male-Killing *Spiroplasma* in Natural Populations of *Drosophila hydei*. *Applied & Environmental Microbiology*, 72(10): 6667–6673.
- Li PG, Qiu SQ, Ye BH, Wang YX, Huang DW, 2015. Influence of removing *Wolbachia* on the reproductive fitness and adult longevity of *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(9): 966–972. [李培光, 邱仕祺, 叶保华, 王宁新, 黄大卫, 2015. 去除 *Wolbachia* 对丽蝇蛹集金小蜂繁殖适合度和成蜂寿命的影响. *昆虫学报*, 58(9): 966–972.]
- Liu YJ, Liu QY, Xi ZY, 2015. Blocking the transmission of mosquito borne diseases through *Wolbachia* based population replacement. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 26(1): 11–15. [李永军, 刘起勇, 奚志勇, 2015. 应用沃尔巴克氏体通过种群替换阻断蚊媒病的传播. *中国媒介生物学及控制杂志*, 26(1): 11–15.]
- Mc T, Me M, 2006. A new male-killing parasitism: *Spiroplasma* bacteria infect the ladybird beetle *Anisosticta novemdecimpunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Parasitology*, 132(Pt 6): 757–765.
- Mil T, Baumann P, 2004. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Stenomorphina: Aleyrodidae). *Current Microbiology*, 48(2): 140–144.
- Noda H, Koizumi Y, Zhang Q, Deng K, 2001. Infection density of *Wolbachia* and incompatibility level in two planthopper species, *Laodelphax striatellus* and *Sogatella furcifera*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 31(6/7): 727–737.

- Osaka R, Nomura M, Watada M, Kageyama D, 2008. Negative effects of low temperatures on the vertical transmission and infection density of a *Spiroplasma* endosymbiont in *Drosophila hydei*. *Current Microbiology*, 57(4): 335–339.
- Qu YF, Li YT, Liu XD, Fang JC, Guo HF, 2015. Relationships between infection with facultative symbionts and sex ratio of *Bemisia tabaci* on different host plants. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(1): 89–95. [瞿钰峰, 李永腾, 刘向东, 方继朝, 郭慧芳, 2015. 不同寄主植物上烟粉虱次生共生菌感染与性比相关性. 应用昆虫学报, 52(1): 89–95.]
- Skinner SW, 1985. Son-killer: a third extrachromosomal factor affecting the sex ratio in the parasitoid wasp, *Nasonia* (*Mormoniella*) *vitripennis*. *Genetics*, 109 (109): 745–759.
- Sōgawa K, 2003. The rice brown planthopper: Feeding physiology and host plant interactions. *Annual Review of Entomology*, 27 (1): 49–73.
- Sun XX, Shi PQ, Xu WM, Qin ZQ, Ren SX Qiu BL, 2016. Endosymbiont detection and phylogeny of *Wolbachia* in *Diaphorina citri* and *Dialeurodes citri*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(4): 772–781. [孙秀新, 师沛琼, 许伟明, 覃振强, 任顺祥, 邱宝利, 2016. 华南地区柑橘木虱与柑橘粉虱内共生菌检测及其 *Wolbachia* 共生菌的系统发育关系分析. 应用昆虫学报, 53(4): 772–781.]
- Tsuchida T, Koga R, Shibao H, Matsumoto T, Fukatsu T, 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11 (10): 2123–2135.
- Wang WX, Luo J, Lai FX, Fu Q, 2010. Identification and phylogenetic analysis of symbiotic bacteria *Arsenophonus* from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 53(6): 647–654. [王渭霞, 罗举, 赖凤香, 傅强, 2010. 水稻褐飞虱内生共生细菌 *Arsenophonus* 的鉴定和系统分析. 昆虫学报, 53(6): 647–654.]
- Weeks AR, Velten R, Stouthamer R, 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 270(1526): 1857–1865.
- Wen SY, He XF, 2003. A method of rapid preparation of trace-DNA templates of insects for PCR. *Acta Entomologica Sinica*, 40(3): 276–279. [温硕洋, 何晓芳, 2003. 一种适用于昆虫痕量 DNA 模板制备的方法. 昆虫知识, 40(3): 276–279.]
- Werren JH, Baldo L, Clark ME, 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (10): 741–751.
- Xi Z, Dean JL, Khoo C, Dobson SL, 2005a. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 35(8): 903–910.
- Xi Z, Khoo CC, Dobson SL, 2005b. *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*, 310(5746): 326–328.
- Yu WW, Du YZ, Li WD, 2013. Detection and phylogenetic analysis of three secondary endosymbionts in populations of *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Hainan, southern China. *Acta Entomologica Sinica*, 56(1): 18–28. [于卫卫, 杜予州, 李伟东, 2013. 海南地区螺旋粉虱三类次级内共生菌的检测及系统发育分析. 昆虫学报, 56(1): 18–28.]
- Yu Y, Wang J, Tao YL, Guo D, Chu D, 2013. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in different geographical populations of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(3): 323–328. [于毅, 王静, 陶云荔, 国栋, 褚栋, 2013. 铃木氏果蝇不同地理种群中 *Wolbachia* 的检测和系统发育分析. 昆虫学报, 56(3): 323–328.]
- Zhai BP, 2011. Rice planthoppers: A China problem under the international perspectives. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(5): 1184–1193. [翟保平, 2011. 稻飞虱: 国际视野下的中国问题. 应用昆虫学报, 48(5): 1184–1193.]
- Zhang H, 2010. Effect of endosymbionts *Wolbachia* on the reproduction and fitness of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) and infection density dynamics of *Wolbachia* in the hosts. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [张慧, 2010. 共生菌 *Wolbachia* 对褐飞虱生殖和适合度的影响及其体内感染密度的动态研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Zhang H, Zhang K, Hong X, 2010. Population dynamics of noncytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* in *Nilaparvata lugens* and its effects on host adult life span and female fitness. *Environmental Entomology*, 39(6): 1801–1809.
- Zhang KJ, Xie RR, Hong XY, 2010. Research progress of endosymbiont *Cardinium*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 33(5): 1–11. [张开军, 谢蓉蓉, 洪晓月, 2010. 胞内共生菌 *Cardinium* 的研究进展. 南京农业大学学报, 33(5): 1–11.]
- Zhu SD, Lu ZQ, Hang SB, Xu H, 1994. The effect of temperature on the brown planthopper population. *Entomology Journal of East China*, 3(1): 53–59. [祝树德, 陆自强, 杭杉保, 徐海, 1994. 温度对褐飞虱种群调控作用研究. 华东昆虫学报, 3(1): 53–59.]