

褐飞虱不同致害性种群体内共生菌 18S rDNA 部分序列比较

张珏锋, 吕仲贤, 陈法军, 陈建明, 郑许松, 徐红星, 陈列忠, 俞晓平*

(浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所 杭州 310021)

摘要: 分离纯化了褐飞虱 3 种不同致害性种群体内类酵母共生菌 (yeast-like symbionts, YLS) 并对其 18S rDNA 基因序列进行了比较。结果表明, 褐飞虱 3 种不同致害性种群体内类酵母共生菌 18S rDNA 均扩增出 600 bp 左右的片段。依据获得的 18S rDNA 特异性序列结合已知真菌的 18S rDNA 部分序列, 构建了不同宿主的 YLS 分子系统树。结果显示, 褐飞虱 3 种不同致害性种群体内的 YLS 同属于囊菌亚门 (Ascomycotina) 的核菌纲 (Pyrenomycetes), 并与此纲中的 *Hypomyces chrysospermus* 亲缘关系相对最近。

关键词: 褐飞虱; 类酵母共生菌; 子囊菌亚门; 核菌纲; 致害性; 18S rDNA; 分子系统树

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)03-0528-05

The comparison of yeast-like symbionts in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål with different virulence based on partial 18S rDNA sequence

ZHANG Jue-Feng, LU Zhong-Xian, CHEN Fa-Jun, CHEN Jian-Ming, ZHENG Xu-Song, XU Hong-Xing, CHEN Lie-Zhong, YU Xiao-Ping* (Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: The yeast-like symbionts (YLS) were isolated and purified from the fat body of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (BPH) with different virulence reared on various rice resistant varieties. The 18S rDNA sequences of YLS from BPH with different virulence were analyzed and compared with the sequences of other fungi explored from GenBank, and a comprehensive phylogenetic tree was constructed. The phylogenetic analyses suggested that the YLS of BPH with different virulence belonged to the subphylum Ascomycotina, the class Pyrenomycetes, and had the closest genetic relationship with *Hypomyces chrysospermus*.

Key words: *Nilaparvata lugens*; yeast-like symbionts; Ascomycotina; Pyrenomycetes; virulence; 18S rDNA; molecular phylogenetic tree

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 是我国及东南亚地区许多水稻生产国的主要害虫, 不仅通过直接取食造成严重减产, 而且作为植物病毒的介体造成间接危害 (李汝锋等, 1996)。利用抗性基因培育和推广抗性品种是综合治理褐飞虱的优先策略 (Wu *et al.*, 1986), 但由于褐飞虱对水稻抗性品种有很强的适应能力, 长期连续种植抗性水稻品种易使褐飞虱产生新的致害性, 这对抗性水稻品种的选育和推广构成了严重的威胁 (吕仲贤等, 1999)。明确褐飞虱

致害性的产生原因, 对于延长抗性品种的使用寿命和合理布局具有重要意义。褐飞虱对抗性水稻品种致害性变化的研究已有很多, 包括在变化过程中褐飞虱体内的酯酶、可溶性蛋白、特异性蛋白和遗传物质等方面都有详细的报道 (Sogawa, 1978; Goh, 1993; 方继朝等, 1996; Mun, 1997; 许晓风等, 2000), 但这些生理生化的指标都难以完全解释褐飞虱致害性变异的实质。

褐飞虱体内具有大量类酵母共生菌 (yeast-like

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270199, 30470227); 浙江省自然科学基金项目 (Y30449)

作者简介: 张珏锋, 女, 1978 年生, 浙江长兴人, 现从事分子生物学研究, E-mail: zhangjuefeng@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 0571-86404063; E-mail: yuxiaoping@sina.com; yuxp@zaas.org

收稿日期 Received: 2005-08-08; 接受日期 Accepted: 2005-12-07

symbionts, YLS), 属于子囊菌亚门(Ascomycotina)核菌纲(Pyrenomycetes)的假丝酵母属(*Candida*), 存在于腹部脂肪体内, 以卵母细胞垂直传递的方式传给子代(Chen, 1981)。褐飞虱体内的共生菌主要提供营养物质以补充宿主不平衡食物中所缺乏的营养, 共生菌中含有高活性的尿酸酶能利用褐飞虱的代谢氮废物(尿酸)合成必需氨基酸供寄主生长发育(Hongoh and Ishikawa, 1997), 同时共生菌在褐飞虱对水稻营养物质氨基酸的吸收和利用过程中也起着重要作用(Lee and Hou, 1987; 吕仲贤等, 1997)。水稻品种抗性对共生菌的数量有较明显的影响, 取食抗性水稻品种后共生菌数量急剧减少, 其中第 2 代是褐飞虱适应抗性水稻品种的关键代, 体内共生菌数量达到最低点; 至第 3 代起, 共生菌数量又开始回升。当体内共生菌的数量达到稳定之后, 新的致害性种群形成并且可以将这种性质稳定遗传(吕仲贤等, 2001)。这都表明褐飞虱体内共生菌与褐飞虱对水稻品种的致害性差异存在着较为密切的关系。

本文对褐飞虱 3 种不同致害性种群体内类酵母共生菌 18S rDNA 部分序列进行比较, 以期为进一步合理解释褐飞虱体内类酵母菌的变异与褐飞虱致害性的关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗性水稻品种: 含不同抗虫基因的水稻品种 Mudgo(*Bph1*)和 ASD7(*bph2*)以及感虫对照品种 TN1(无抗虫基因)均来自于国际水稻研究所。

1.1.2 供试虫源: 褐飞虱虫源由中国水稻研究所提供。

1.1.3 试剂: 大肠杆菌 *E. coli* TG1 由本实验室保存。克隆质粒 pUCm-T、Taq 聚合酶、IPTG、T4DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒均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 引物参照 White (1990) 等人所设计的 18S rDNA 的引物序列。所用引物的序列及它们在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 18S rDNA 中的位置如下: NS7' (1 129-1 150), 5'-GCAAGTCTGCTGCCAGCAGCC-3'; NS8' (1 769-1 788), 5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'。

1.2 方法

1.2.1 褐飞虱不同致害性种群的获得: 不同致害性褐飞虱分别用 45 ~ 60 天苗龄的水稻品种 TN1、

Mudgo 和 ASD7 在浙江省农科院温室内连续隔离饲养, 温度 25℃, 光照 12L:12D, 相对湿度 80%。取第 2、5、8、11 代褐飞虱测定其在不同抗性品种上的存活率以代表致害性的变异, 当褐飞虱在抗性品种上存活率与对照品种间无显著性差异时, 说明该种群已适应该抗性品种, 形成新的致害性种群。

1.2.2 若虫存活率测定: 水稻品种(TN1, Mudgo, ASD7)播在育苗盆内, 2 叶 1 心期将鉴别品种单本移栽, 60 日龄时剪去分蘖留下主茎, 100 目网罩后, 每一水稻品种设 10 个重复, 每一重复接 10 头 4 ~ 5 龄虫若虫, 10 天后调查存活虫数, 计算存活率。

1.2.3 褐飞虱共生菌的提取: 取褐飞虱雌成虫 10 头, 用 75% 酒精进行表面消毒 3 min, 无菌水漂洗 1 min。解剖腹部取出脂肪体后, 将脂肪体用 75% 酒精消毒、无菌水漂洗, 然后在 -196℃ 液氮中磨成粉状。加入 5 mL YPD 培养基, 25℃ 条件下 200 r/min 摇床培养 24 ~ 28 h, 直至出现絮状物。

1.2.4 共生菌 DNA 的提取: 取 1.5 mL 酵母细胞转移至微量离心管中, 室温下 12 000 g 离心 1 min, 去上清, 按 Sambrook 和 Russell (2002) 的酵母 DNA 提取方法进行。

1.2.5 褐飞虱虫体 DNA 的提取: 取褐飞虱雌成虫 10 头, 取头部, 液氮中研磨并按许晓风等(2000)文献中褐飞虱 DNA 的提取方法提取。

1.2.6 PCR 体系及反应条件: 10 × PCR 缓冲液 (500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 0.01% 明胶, pH 8.5) 5 μL, dNTPs 0.12 mmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 随机引物各 20 ng, 模板 DNA 30 ng, Taq 酶 2.5 U, 灭菌双蒸水补齐至 50 μL。PCR 条件为: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 循环 30 个周期; 72℃ 延伸 6 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 重组质粒的构建: 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, 18S 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) 和 X-Gal (80 μg/mL) 的 LB 平板上, 37℃ 倒置培养过夜。

1.2.8 重组质粒的筛选和鉴定: 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 摇床培养至饱和。取 1.5 mL 的培养物用碱裂解法制备质粒 DNA, PCR 鉴定阳性克隆。

1.2.9 测序和系统发育树的构建:提供经 PCR 鉴定插有目的片段的重组克隆由上海博亚公司测序,测序结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列比对,然后采用 DNASTar 软件进行同源性分析,构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 褐飞虱在不同抗性品种上的致害性变异

本实验分别选取在抗性水稻品种上取食 2、5、

表 1 褐飞虱若虫在不同抗性水稻品种上的成活率

Table 1 The survival rate of the BPH nymph on different rice varieties

水稻品种 Rice varieties	第 2 代 2nd generation	第 5 代 5th generation	第 8 代 8th generation	第 11 代 11th generation
TN1	87.0 ± 2.0 a A	87.0 ± 2.0 a A	88.0 ± 4.0 a A	86.0 ± 2.0 a A
Mudgo	3.0 ± 0.5 b B	70.0 ± 5.0 b B	82.0 ± 8.0 a A	83.0 ± 2.0 a A
ASD7	3.6 ± 0.4 b B	67.3 ± 3.3 b B	80.0 ± 8.0 a A	82.0 ± 1.0 a A

注:表中数据为平均值 ± SE,同一列数据后平均数后的小写(大写)字母不同表示在 $P_{0.05}$ ($P_{0.01}$) 差异显著。

Notes: The data in the table indicate mean ± SE. Means within a column followed by different lowercase (capital) letters are significantly different at $P_{0.05}$ ($P_{0.01}$) level.

2.2 PCR 扩增及测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示(图 1), 3 种不同致害性褐飞虱体内的共生菌 DNA 都扩增出 600 bp 的特异性片段,而空白对照及从褐飞虱头部提取的 DNA 均未扩增出条带。说明按上述方法已提取到纯净的褐飞虱共生菌 DNA。重组质粒经 PCR 扩增后均得到与菌株总 DNA 扩增片段大小相同的产物,说明重组子中均含有目的外源片段。

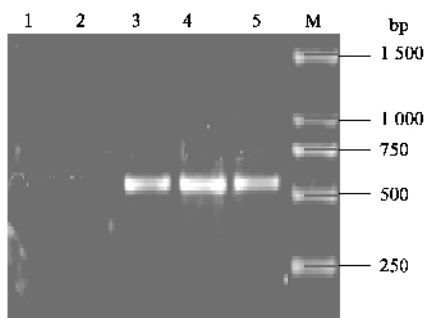


图 1 3 种不同致害性褐飞虱体内类酵母菌 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 PCR results of YLS in three brown planthopper (BPH) populations with different virulence

1: 褐飞虱头部 The PCR amplification products of the DNA of head of BPH; 2: 空白对照 The control; 3, 4, 5: 分别为 TN1、Mudgo、ASD7 致害性种群的褐飞虱体内共生菌 The PCR amplification products of the DNA of symbionts of brown planthopper on TN1, Mudgo and ASD7, respectively; M: 标准分子量 Molecular weight marker.

2.3 DNA 序列比较分析及系统树的构建

测序结果在 GenBank 中进行同源性检索,从

8、11 代的褐飞虱测定其致害性的变化(表 1)。自第 5 代起,褐飞虱在 Mudgo 和 ASD7 上的若虫成活率已远大于 50%,与感虫对照 TN1 上的飞虱存活率并无显著性差异,并且保持稳定。根据测定结果,若虫成活率在水稻品种 Mudgo 和 ASD7 上饲养 5 代之后,褐飞虱的致害性已经发生明显改变,到第 8 代则形成了相对稳定的适合品种 Mudgo 和 ASD7 的致害性种群,因此本实验选取在抗性水稻品种上饲养 8 代的褐飞虱作为实验用虫。

Blast 的结果选取 13 种相似率在 98% 以上的真菌和 3 种不同宿主内的类酵母共生菌,并将他们的序列从 GenBank 中调出,与褐飞虱 3 种不同致害性种群共生菌的 18S rDNA 序列进行比对,结果如图 2 所示。从图 2 可知褐飞虱 3 种致害性种群体内的类酵母菌 18S rDNA 差异极小,与同翅目的灰飞虱 *Laodelphax striatellus*, 白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和蚜虫 *Hamiltonaphis styraci* 体内共生菌的亲缘关系非常接近,上述共生菌均与子囊菌亚门(Ascomycotina) 核菌纲(Pyrenomyces)的 *Hypomyces chrysospermus* 有着较近的亲缘关系。

3 讨论

微生物的世代交替时间短,结构相对简单,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,类酵母菌相对于寄主褐飞虱更容易发生变化或突变。以往的研究已经证明类酵母菌在褐飞虱对水稻营养物质的吸收和利用过程中起着重要作用,褐飞虱种群对抗性水稻品种的致害性变化往往伴随着体内共生菌的变化(张志涛等,1997;吕仲贤等,2001)。本实验所用褐飞虱经过在不同抗性水稻品种上连续饲养,经过存活率的鉴定已证明其致害性发生了改变,并且能稳定遗传。这表明在不同抗性水稻品种抗性物质的影响下,褐飞虱体内的共生菌可能产生变异或者适应品种的共生菌占据了优

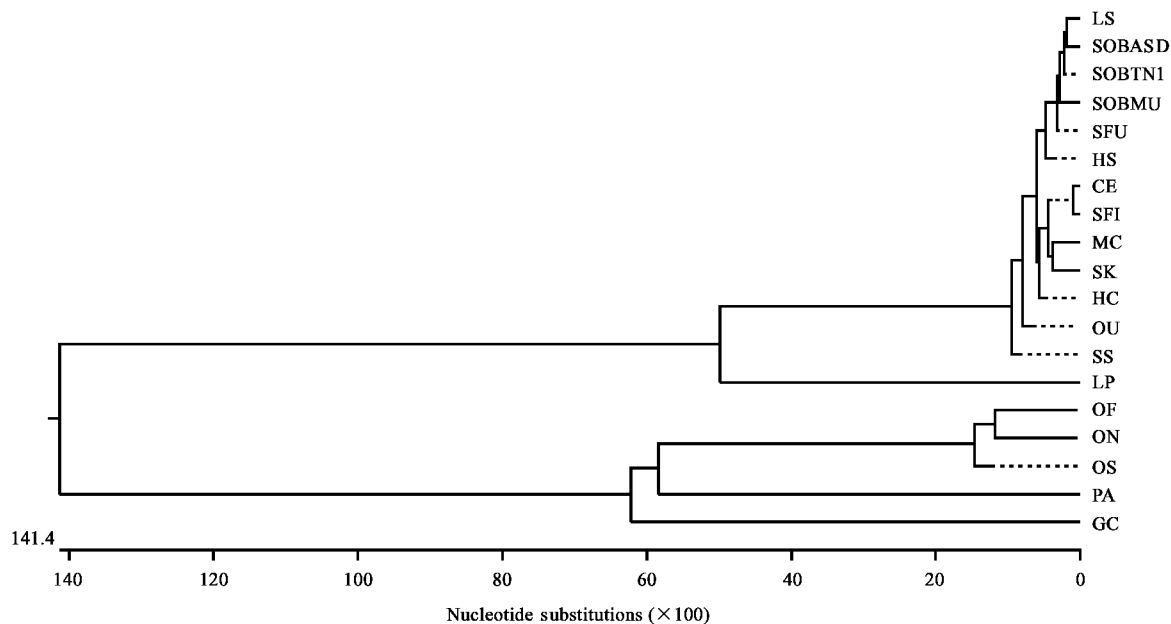


图2 根据 18S 核苷酸序列构建的分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic relationships of YLS in BPH with different virulence to resistant rice varieties based on partial 18S rDNA sequences. 图中虚线代表在严格一致的树中得不到支持的分支 Dotted lines indicating that the branches may collapse in the strict consensus tree; Nucleotide substitutions ($\times 100$): 表示经 100 个重复的 Bootstrap 分析所得的核苷酸替换率 Indicating the nucleotide substitutions of 100 replications of bootstrap analysis. CE: 毛壳属 *Chaetomium elatum* (M83257); GC: 小丛壳属 *Glomerella cingulata* (AY902476); HC: 菌寄生菌属 *Hypomyces chrysospermus* (M89993); HS: 蚜虫共生菌 Symbionts of *Hamiltonaphis styraci* (D55719); LP: 白孔座壳属 *Leucostoma persoonii* (M83259); 灰飞虱共生菌 Symbionts of *Laodelphax striatellus* (AY591577); MC: 小囊菌属 *Microascus cirrosus* (M89994); OF: 长喙属 *Ophiostoma fusiforme* (AY280497); ON: 长喙属 *Ophiostoma nigrocarpum* (AY280490); OS: 长喙属 *Ophiostoma stenoceras* (AY280493); OU: 长喙属 *Ophiostoma ulmi* (U35661); PA: 柄孢壳属 *Podospira anserine* (AY525772); SFI: 粪壳属 *Sordaria fumicola* (X69851); SFU 白背飞虱共生菌 Symbionts of *Sogatella furcifera* (D38477); SK: 烟草步甲内共生菌 *Symbiotaphrina kochii* (AY227717); SOBASD: ASD7 致害性种群褐飞虱体内共生菌 Symbionts of brown planthopper on ASD7; SOBMU: Mudgo 致害性种群褐飞虱体内共生菌 Symbionts of brown planthopper on Mudgo; SOBTN1: TN1 致害性种群褐飞虱体内共生菌 Symbionts of brown planthopper on TN1; SS: 申克孢子丝菌属 *Sporothrix schenckii* (AY280496). 以上括号内编号为真菌和对应昆虫体内共生菌 18S rDNA 序列号 Codes in the brackets are GenBank accession numbers of 18S rDNA of different fungus or endosymbionts.

势,形成了新的适应菌株,从而导致了褐飞虱种群致害性的变化。18S rDNA 由于其在一级结构中的多拷贝及高变区域的高度保守等优点而被广泛用于真核生物的高级分类阶元系统发育关系和进化研究 (AtKins *et al.*, 2000)。褐飞虱 3 种不同致害性种群体内的类酵母菌同属于子囊菌亚门 (Ascomycotina) 的核菌纲 (Pyrenomycetes), 与此纲中已知的菌种 *H. chrysospermus* 亲缘关系最近,这一结果与 Noda 等 (1995) 采用密度梯度离心法直接从褐飞虱体内提取共生菌后鉴定的结果一致。本实验表明 3 种致害性种群体内类酵母菌的 18S rDNA 之间并无显著性差异,此结果说明仅以 18S rDNA 为指标不能反映不同致害性褐飞虱体内类酵母菌的变异情况。产生这种结果有可能是:实验选取的 18S rDNA 片段较适用于真核生物的高级分类阶元系统发育关系研究,过

于保守,在短时间内难以发生变异。褐飞虱在抗性水稻品种上连续取食 8~11 代还远不能使体内共生菌的遗传地位发生变异,虽然寄主褐飞虱在生物学上已经表现出不同的致害性,但有可能其体内的共生菌还处在一个变化的过程中,因此 3 种褐飞虱不同致害性种群体内共生菌部分保守序列未发现差异,今后宜采用进化更快的基因座分析其变异。

参考文献 (References)

- AtKins MS, McArthur AG, Teske AP, 2000. Ancyromonadida: a new phylogenetic lineage among the protozoa closely related to the common ancestor of metazoans, fungi and choanoflagellates (Opisthokonta). *Journal of Molecular Evolution*, 51: 278-285.
- Chen CC, 1981. Studies on the intracellular yeastlike symbiote in brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål. 1. Histological observations and population changes of the symbiote. *Z. Ang. Entomol.*, 91: 321-327.
- Fang JC, Du ZW, Xia LR, Sun JZ, 1996. A study on the biotype specific

- protein in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 39(3): 330–332. [方继朝, 杜正文, 夏礼如, 孙建中, 1996. 褐飞虱生物型特异性蛋白质研究. 昆虫学报, 39(3): 330–332]
- Goh HG, 1993. Variations in leg characters among three biotypes of brown planthopper *Nilaparvata lugens* in Korea. *Korean J. Appl. Entomol. Zool.*, 32(1): 68–75.
- Hongoh Y, Ishikawa H, 1997. Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. *Zoological Science*, 14: 581–586.
- Sambrook J, Russell DW (Translated by Huang PT, Wang JX, Zhu HC), 2002. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press. 485–487. [J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔(黄培堂, 王嘉玺 朱厚础译), 2002. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社. 485–487]
- Lee YH, Hou RF, 1987. Physiological roles of a yeast-like symbiote in reproduction and embryonic development of the brown planthopper. *Insect Physiol.*, 33(11): 852–860.
- Li RD, Ding JH, Hu GW, Su DM, 1996. Brown Planthopper and Its Management. Shanghai: Fudan Press. 1–11. [李汝铎, 丁锦华, 胡国文, 苏德明, 1996. 褐飞虱及其种群管理. 上海: 复旦大学出版社. 1–11]
- Lu ZX, Yu XP, Zheng XS, Chen JM, Zhang ZT, 1997. Variation in virulence of the brown planthopper to resistant rice varieties and its relation to the changes in the activities of endogenous enzymes. *Acta Entomologica Sinica*, 40(Suppl.): 122–127. [吕仲贤, 俞晓平, 郑许松, 陈建明, 张志涛, 1997. 褐飞虱致害性变异过程及其体内酶的变化. 昆虫学报, 40(增刊): 122–127]
- 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]
- Lu ZX, Yu XP, Chen JM, 2001. The population dynamics of symbiote in body of brown planthopper from different geographic fields and adapted to different resistant rice varieties. *Entomological Journal of East China*, 10(1): 44–49. [吕仲贤, 俞晓平, 陈建明, 2001. 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, 10(1): 44–49]
- Mun JH, 1997. Comparison of Intra- and Inter Species Total Soluble Protein Pattern of Rice Planthopper in Korea. Ph.D Thesis, Kyungsang Univ. 42 pp.
- Noda H, Nakashima N, Koizumi M, 1995. Phylogenetic position of yeast-like symbiotes of rice planthoppers based on partial 18S rDNA sequences. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22(5): 639–646.
- Sogawa K, 1978. Electrophoretic variation in esterase among biotype of brown planthopper. *IRRV.*, 3(5): 9.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA: Academic Press. 315–322.
- Wu JT, Heinrichs EA, Medrano FG, 1986. Resistance of wild rice, *Oryza* spp., to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Environ. Entomol.*, 15: 648–653.
- Xu XF, Cheng XN, Zhou YD, 2000. Analysis on RAPD of genome DNA in different brown planthopper biotypes. *Journal of Anhui Agricultural University*, 27(1): 5–8. [许晓风, 程遐年, 邹运鼎, 2000. 褐飞虱不同生物型基因组 DNA 的 RAPD 分析. 安徽农业大学学报, 27(1): 5–8]
- Zhang ZT, Chen W, Jiang RC, Zhang Y, Cai XC, 1997. The virulence shift of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae) on different rice varieties. *Acta Entomologica Sinica*, 40(Suppl.): 110–115. [张志涛, 陈伟, 姜人春, 张燕, 蔡祥承, 1997. 稻褐飞虱致害性的变化. 昆虫学报, 40(增刊): 110–115]

(责任编辑: 吴明宇)