

烟粉虱抗、感杀虫剂品系内生菌群落的差异分析

陈露¹, 谷少华¹, 王雄雅¹, 李显春^{1,2*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 美国亚利桑那大学昆虫系, 图森 85721)

摘要 本研究对 B 型和 Q 型烟粉虱的吡虫啉或吡丙醚的抗、感品系进行 16S rRNA 细菌多样性测序分析, 以明确内生菌的种类和数量与烟粉虱生物型和抗性的关系。结果表明 *Candidatus Nitrososphaera*、*Bacillus*、*Sphingobium* 只在 Q 型烟粉虱中存在, 而 *Candidatus Hamiltonella*、*Lactobacillus*、*Helicobacter* 等只在 B 型烟粉虱中存在, 说明这些内生菌可能与烟粉虱 B、Q 两种生物型的分化有关; 内生菌 *Rickettsia*、*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella*、S24-7、*Prevotella* 等在烟粉虱的新烟碱类杀虫剂吡虫啉抗性品系中明显多于敏感品系, 其可能与烟粉虱对吡虫啉的抗性有关; 在对保幼激素类似物杀虫剂吡丙醚的抗性品系中, *Candidatus Hamiltonella*-OTU7、*Candidatus Portiera*-OTU5、*Candidatus Portiera*-OTU190、*Rickettsia*-OTU4、*Rickettsia*-OTU2 的数量明显多于敏感品系, 说明这些内生菌可能与烟粉虱对该类药物的抗性有关。

关键词 烟粉虱; 生物型; 抗药性; 16S rRNA 测序; 内生菌

中图分类号: Q 965 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017141

Comparative analysis of bacterial community between insecticide-resistant and susceptible strains of *Bemisia tabaci*

CHEN Lu¹, GU Shaohua¹, WANG Xiongya¹, LI Xianchun^{1,2}

(1. State Key Laboratory for Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Department of Entomology, University of Arizona, Tucson 85721, USA)

Abstract To study the relationships between biotypes and resistance of *Bemisia tabaci* and its endosymbionts, we compared the microbiota among different strains of B and Q biotypes that are susceptible or resistant to neonicotinoids or pyriproxyfen by using 16S rRNA amplicon sequencing technology. *Candidatus Nitrososphaera*, *Bacillus* and *Sphingobium* were found in Q biotype strain only, whereas *Candidatus Hamiltonella*, *Lactobacillus* and *Helicobacter* were detected only in the B biotype strains. This suggested that these endosymbionts might be related to the differentiation of B/Q biotypes. *Rickettsia*, *Candidatus Portiera*, *Candidatus Hamiltonella*, S24-7 and *Prevotella* were significantly enriched in the imidacloprid resistant strains than in the susceptible strain, suggesting that these endosymbionts might contribute to *B. tabaci*'s resistance to imidacloprid. Furthermore, the pyriproxyfen-resistant strain carried significantly more *Candidatus Hamiltonella*-OTU7, *Candidatus Portiera*-OTU5, *Candidatus Portiera*-OTU190, *Rickettsia*-OTU4 and *Rickettsia*-OTU2 than the susceptible strain, implicating that these endosymbionts might be involved in *B. tabaci*'s resistance to pyriproxyfen. Taken together, the data obtained support the involvements of endosymbionts in B/Q differentiation and their resistance to insecticides.

Key words *Bemisia tabaci*; biotype; insecticide resistance; 16S rRNA amplicon sequencing; endosymbiont

共生菌与节肢动物共生是一种广泛存在的现象, 近年来逐渐成为昆虫学的研究热点之一^[1]。在长期的进化过程中, 昆虫趋向于与一些微生物建立内生关系, 这一现象在鞘翅目和半翅目昆虫如蝉、

蚜虫、褐飞虱、烟粉虱中尤为突出^[2]。昆虫内生菌通常分为两大类: 初生内生菌和次生内生菌^[3-4]。昆虫与内生菌的互作关系多种多样: 一些初生内生菌能够通过自身的代谢活动弥补宿主由

收稿日期: 2017-04-16

修订日期: 2017-04-24

基金项目: 北京市科技新星项目(Z1511000003150118); 北京市青年拔尖个人项目(2015000021223ZK29); 国家自然科学基金(31772164, 31401737)

* 通信作者 E-mail: lxc@email.arizona.edu

于食物源限制而导致的某些必需氨基酸和维生素的缺乏;也可通过分泌毒素、抗生素等物质来降低或防止病原体或外源有害寄生物感染宿主;同时,还能够增强宿主环境适应性,改变宿主入侵性,调控植物生理反应,抑制植物对宿主的不利影响;利用对抗逆性基因精确的表达调控来增强宿主抗药性等^[1]。值得一提的是,即使是同一种共生菌,在不同的宿主体内所发挥的作用也不尽相同^[1]。随着研究的深入,内生菌的新功能不断地被发现,如研究较为成熟的 *Rickettsia*, 当与蚜虫共生时能够提高蚜虫的耐热力、改变蚜虫体色、增强蚜虫对瓢虫的抵抗力、降低其对寄生蜂的抗性,而当其存在于烟粉虱体内时则能够提高烟粉虱的产卵量及后代存活率、增强对宿主的适合度^[5-8]。

20 世纪 90 年代,人们逐渐认识到烟粉虱内生菌具有重要的经济意义,对由其介导的昆虫适应性性状的研究越来越多^[9],但其作用机制尚不明确^[10-12]。内生菌的水平传播方式加速了不同种群间内生菌的交流,致使宿主由于获得环境中新的微生物而产生新的基因型和生物适应性性状,包括耐热性、抗寄生、抗药性以及入侵能力^[1]。有研究表明,烟粉虱 B、Q 生物型与其次生内生菌之间存在一定的关联^[13-14]。不同的烟粉虱生物型 mtDNA 基因序列不同,包含的内共生菌也有各自的特点^[15]。Olivier 等发现,采集于不同地区的不同烟粉虱生物型,其内生菌群落具有特异性^[13]。此外内生菌与昆虫抗药性之间也存在一定关系,如 Xu 等通过 16S rRNA 技术证实肠道内生菌参与了南部长蝽 *Blissus insularis* 对杀虫剂的抗药性^[16]。有研究表明,随着体内内生菌的减少,灰飞虱对杀虫剂的抗性逐渐降低^[17];蚜虫体内的共生菌与有机磷杀虫剂抗性的产生有关^[18]。

目前,烟粉虱对大部分常规杀虫剂均产生了不同程度的抗药性^[19]。对烟粉虱抗性机制的早期研究主要集中在杀虫剂靶标、解毒代谢酶以及药剂排泄基因上,近年来的研究表明内生菌也可能与昆虫对杀虫剂的抗性有关^[20-21], Ghanim 和 Kontsedalov 通过试验发现,烟粉虱不同品系内生菌差异可显著影响其对杀虫剂的抗性^[22]; Xie 等通过转录组分析从分子水平揭示了烟粉虱内生菌与其抗药性之间的关系^[23]。目前,关于

内生菌与昆虫抗药性产生机制的关系主要有两种说法:(1)昆虫通过与能够降解农药的微生物共生而获得抗药性;(2)昆虫肠道的微生物通过改变菌落结构来激活宿主的免疫系统,使宿主的抗药性增强^[24-25]。

目前对烟粉虱内生菌的研究大多局限在以下几个属,包括 1 个初生内生菌 *Portiera aleyrodidarum* 和 6 个次生内生菌: *Hamiltonella*, *Aresenphonus*, *Cardinium*, *Wolbachia*, *Rickettsia*, *Fritschea*^[26], 但较为全面系统地开展烟粉虱不同生物型或不同杀虫剂抗、感品系之间内生菌种类和数量的研究仍为空白。因此,我们期望在前人研究的基础上,通过对烟粉虱抗、感杀虫剂品系内生菌群落的差异比较,揭示烟粉虱内生菌—生物型—抗药性之间的互作关系,这对烟粉虱田间防治、生态系统评估等都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

烟粉虱敏感品系(susceptible strain, S):美国亚利桑那大学昆虫学实验室提供,经过在室内不接触任何农药的条件下采用烟草(‘亚布力旱烟’)连续多代饲养繁育而成。烟粉虱抗性品系(resistant strain, R):美国亚利桑那大学昆虫学实验室提供,经过在室内以高浓度相应农药定期筛选以保持其抗性水平。试验时先对每个品系取 5 头烟粉虱成虫,采用 CAPS 标记法鉴定试验所用 6 个品系烟粉虱的生物型纯度^[26]。各个品系及其代号对应关系见表 1。

1.2 烟粉虱毒力测定

卵的毒力测定参照 Denehy 等^[27]的着卵叶片浸渍法。在预试验的基础上,将吡丙醚用 ddH₂O 配成系列浓度(含 0.1% 的吐温+曲拉通),0.1% 吐温+曲拉通水溶液作为对照,每个浓度 3 个重复。将 1 片真叶期的棉苗放入事先开好透气孔的培养皿中,每皿接入 20 对自然混合日龄的烟粉虱成虫,放入培养箱中,温度(26±1)℃,湿度 70%±10%,光周期 L//D=16 h//8 h,产卵 24 h 之后将棉苗取出并浸入到不同浓度的药液中,20 s 后取出晾干并固定在盛有清水的闪烁瓶内,再次放入培养箱中。7 d 后记录孵化出的 1 龄若虫的数量,并计算孵化率,孵化率=若虫数/卵数×100%。

表 1 试验所用烟粉虱品系信息¹⁾

Table 1 The information of the six tested laboratory strains of *Bemisia tabaci*

品系名称 Strain name	采集地 Place of collection	采集年份 Year of collection	筛选药剂及浓度 Insecticide and concentration used for selection
Yuma-04-B-S	Yuma, Arizona	2004	对吡虫啉敏感
12-10-Gadsen-B-S	Gadsen, Arizona	2012	对吡丙醚敏感
Composite 11-B-R	Yuma, Arizona	2011	抗吡虫啉(100 mg/L)
QC-02-B-R	Queen Creek, Arizona	2002	抗吡丙醚(1 mg/L)
08-52-Q-R	Tucson, Arizona	2008	抗吡虫啉(100 mg/L)
11-50-WFP-Q-R	Tucson, Arizona	2011	抗吡虫啉(100 mg/L)

1) 品系名称代表意义: B=B 型, Q=Q 型, S=敏感品系, R=抗性品系。
Abbreviations in strain names: B=B biotype; Q=Q biotype; S=susceptible strain, and R=resistant strain.

成虫的毒力测定参照 Denehy 等的内吸叶碟法。在预试验的基础上,将吡虫啉用 ddH₂O 配成系列浓度(含 0.1% 的吐温),用 0.1% 吐温水溶液作为对照,每个浓度和对照各 3 个重复。每个浓度的烧杯内插入 3 株 2 片真叶期的去根棉苗(‘京益 1 号’),棉苗于培养箱中内吸吡虫啉 24 h 之后,按浓度由低到高,依次摘下叶片,用打孔器打出直径为 25 mm 的叶碟待用。每个闪烁瓶内加入约 5 mL 3% 的琼脂,常温冷凝后,将叶碟背面朝上仔细贴在闪烁瓶底部的琼脂上。每个闪烁瓶内接入 10 对自然混合日龄的烟粉虱成虫,用透析膜封口,并倒置于温度(26±1)℃、湿度 70%±10%、光周期 L//D=16 h//8 h 的培养箱中,48 h 之后观察,计算校正死亡率。

1.3 毒力测定数据分析

采用 Probit 软件,对毒力测定结果进行数据分析,计算各个品系的 LC₅₀、95% 置信区间和抗性倍数(抗性倍数=抗性品系 LC₅₀/敏感品系 LC₅₀)。抗性倍数在 3 以下定为敏感,3.1~5 倍属于敏感性下降,5.1~10 倍之间为低水平抗性,10.1~40 倍为中水平抗性,40.1~160 倍为高水平抗性,160 倍以上为极高水平抗性^[28]。

1.4 烟粉虱内生菌 16S rRNA 测序分析

每个品系选 10 头成虫,用 95% 乙醇清洗 3 次,

单头提取总 DNA,以该 DNA 为模板,按照 V4 区序列特征合成带有 barcode 的特异引物,引物信息如下:正向引物 16SV4 F 5'-GTGCCAGCMGCCGCG-GTAA-3',反向引物 16S V4 R 5'-GGACTACH-VGGGTWCTCTAAT-3'。PCR 反应体系:50 μL 的反应体系中含有 10×Ex Taq Buffer 5.0 μL,dNTP Mixture 4.0 μL,16S V4 上、下游引物各 1.0 μL,Ex Taq 酶 0.3 μL,稀释 50 倍后的 DNA 模板 1.0 μL,加 ddH₂O 补齐至 50 μL。PCR 反应条件:95℃ 5 min,(95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s)×35 个循环,72℃ 7 min,保持 16℃。16S rRNA PCR 产物的测序、序列拼接和注释均由北京赛默百合生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱各品系毒力测定结果

烟粉虱各品系毒力测定结果表明(表 2),08-52-Q-R、11-50-WFP-Q-R 和 Composite 11-B-R 三个新烟碱类杀虫剂抗性品系成虫对吡虫啉的 LC₅₀ 显著高于新烟碱类杀虫剂敏感品系 Yuma-04-B-S 的 LC₅₀,抗性倍数分别为 144 500、133 800 和 15 600 倍,均达到极高水平抗性。吡丙醚抗性品系 QC-02-B-R 的卵对吡丙醚的 LC₅₀ 也显著高于其敏感品系 12-10-Gadsen-B-S 的 LC₅₀,达到高水平抗性(表 2)。

表 2 烟粉虱各品系的抗药性测定结果

Table 2 Sensitivity of the adults of six laboratory strains of *Bemisia tabaci* to selected insecticides

药剂 Insecticide	品系 Strain name	斜率±SE Slope±SE	LC ₅₀ /mg·L ⁻¹ (95% CI)	抗性倍数 Resistance ratio
吡虫啉 imidacloprid	Yuma-04-B-S	0.491±0.417	0.001	—
吡虫啉 imidacloprid	Composite 11-B-R	1.348±0.085	15.6	15 600
吡虫啉 imidacloprid	08-52-Q-R	2.003±0.162	144.5	144 500
吡虫啉 imidacloprid	11-50-WFP-Q-R	1.884±0.150	133.8	133 800
吡丙醚 pyriproxyfen	12-10-Gadsen-B-S	0.589±0.080	0.025	—
吡丙醚 pyriproxyfen	QC-02-B-R	1.559±0.105	3.56	142.4

2.2 烟粉虱各品系内共生菌的 16S 多样性

16S rRNA PCR 产物的深度测序、序列拼接和注释结果表明,6 个不同品系的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU) 总数目从 141 个(Yuma-04-B-S)到 206 个(11-50-WFP-Q-R)不等,且 OTU 总数在品系 B-S、B-R、Q-R 中呈现递增趋势;对每一品系来说,虽然 2~19 区间的 OTU 数量最多,但作用不大,因此仅选择大于 50 区间所包含的 OTU 进行后续的数据分析(表 3)。

表 3 烟粉虱各品系 OTU 等级统计表

Table 3 OTU rank statistics in the 6 *Bemisia tabaci* strains

品系名称 Strain name	OTU 等级 OTU rank				OTU 总数 Total number of OTUs
	1	2~19	20~49	≥50	
Yuma-04-B-S	0	60	36	47	141
12-10-Gadsen-B-S	11	69	24	38	141
Composite 11-B-R	8	70	33	41	150
QC-02-B-R	20	109	30	30	188
08-52-Q-R	12	119	35	37	201
11-50-WFP-Q-R	11	128	38	30	206

对每一品系所对应的所有 OTU 按照数目多少进行降序排列,取所有样品中排名前 5 的 OTU 进行统计分析,发现 6 个品系共有且含量最多的内共生菌主要分布在 *Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 这三个菌属(图 1)。通过对 6 个品系的横向比较发现,初生共生菌 *Candidatus Portiera* 在 6 个品系中的含量均在 45% 以上,尤其是在品系 QC-02-B-R 中可高达 83.1%;*Rickettsia* 在 Q 型烟粉虱中的含量明显高于 B 型烟粉虱;在 Q 型烟粉虱中并未检测到 *Candidatus Hamiltonella*,而在 4 个 B 型烟粉虱中,3 个品系都含有 *Candidatus Hamiltonella*,仅在对吡丙醚的抗性品系 QC-02-B-R 中未检测到 *Candidatus Hamiltonella* 而检测到了 *Rickettsia*,这可能是由于在抗性品系中 *Rickettsia* 将 *Candidatus Hamiltonella* 竞争掉了的缘故。对每一品系所含有的 OTU 进行纵向比较可以看出,在品系 Yuma-04-B-S 中,*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 的 OTU 数分别占该品系总 OTU 数的 65.1%、12.6%、0,三者共占该品系内共生菌总数的 77%(图 1)。在品系 12-10-Gadsen-B-S 中,*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 的比例分别为 63.8%、5.2%、0,三者共占内共生菌总数的 69%。在品系

Composite 11-B-R 中,*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 的比例分别为 62.3%、6.4%、0,三者共占内共生菌总数的 68.7%。在品系 QC-02-B-R 中,*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 的比例分别为 83.1%、0、4.3%,三者共占内共生菌总数的 87.4%。在品系 08-52-Q-R 中,*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella*、和 *Rickettsia* 的比例分别为 47.4%、0、32.2%,三者共占内共生菌总数的 79.6%。在品系 11-50-WFP-Q-R 中,*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 的比例分别为 46%、0、37.6%,三者共占内共生菌总数的 83.6%(图 1)。

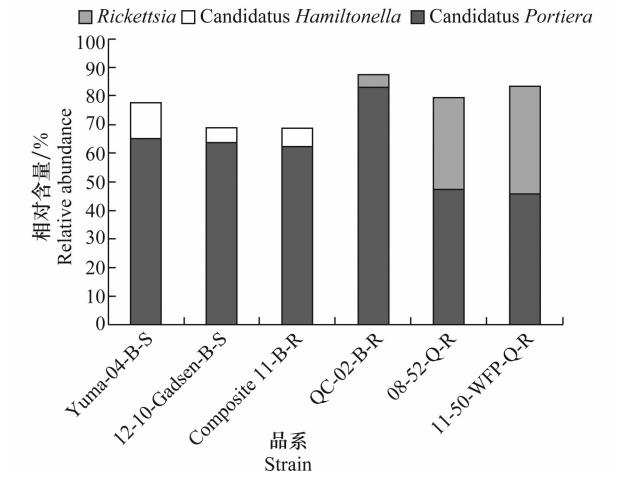


图 1 3 个主要共生菌属在 6 个烟粉虱品系中的相对含量
Fig.1 Relative abundances of *Candidatus Portiera*, *Candidatus Hamiltonella* and *Rickettsia* in the 6 *Bemisia tabaci* strains

2.3 内共生菌对烟粉虱生物型的影响

Composite 11-B-R、08-52-Q-R、11-50-WFP-Q-R 均为对吡虫啉抗性品系,对 Composite 11-B-R 和 08-52-Q-R 这两个品系所包含的 OTU 序列信息做对比分析,发现有 30 个数目在 50 以上的 OTU 仅存在于 Q 型品系 08-52-Q-R,而在 B 型品系 Composite 11-B-R 中未检测到(表 4)。这些 OTU 的属名为: *Candidatus Nitrososphaera*(总数 668)、节杆菌属 *Arthrobacter*(489)、芽胞杆菌属 *Bacillus*(262)、沃尔巴克氏属 *Wolbachia*(154)、铜绿假单胞菌属 *Pseudomonas*(113)、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingobium*(73)、红色杆菌属 *Rubrobacter*(72)、詹森菌属 *Janthinobacterium*(53)和鞘脂菌属 *Sphingobium*(53)(表 4)。

对 Composite 11-B-R 和 11-50-WFP-Q-R 这两

个品系所包含的 OTU 序列进行同样的对比分析,发现有 10 个 OTU 数目在 50 以上,而且仅存在于 Q 型品系 11-50-WFP-Q-R 的 OTU,划归在以下 4 个属:节杆菌属 *Arthrobacter* (325)、*Candidatus Nitrososphaera*(281)、芽胞杆菌属 *Bacillus*(189)和鞘脂菌属 *Sphingobium*(50)(表 5)。通过对表 4、表 5 的综合分析,发现 *Candidatus Nitrososphaera*、*Bacillus* 和 *Sphingobium* 为 2 个 Q 型烟粉虱品系的共有菌属。

同样的 OTU 序列对比分析还发现,数目在 50 以上的 OTU 共有 29 个,且仅存在于 B 型品系 Composite 11-B-R 中,而在 08-52-Q-R 和 11-50-WFP-Q-R 两个 Q 型品系中均未检测到(表 6)。它们属于 *Candidatus Hamiltonella*(10 320)、乳酸菌属 *Lactobacillus*(576)、幽门螺杆菌属 *Helicobacter*(531)、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*(162)、*Akkermansia*(159)、*Prevotella*(117)、普雷沃菌属 *Prevotella*(57)和 *Turicibacter*(54)等菌属(表 6)。

表 4 Composite 11-B-R 和 08-52-Q-R 的内生菌种类(OTUs)和数量比较

Table 4 Comparison of the OTUs and their amounts between Composite 11-B-R and 08-52-Q-R

OTU 编号 OTU code	OTU 数量 Amount of the OTU		属名 Genus name	08-52-Q-R 中该属所有 OTU 的总数量 Total amount of all the OTUs in this genus in 08-52-Q-R
	08-52-Q-R	Composite 11-B-R		
OTU-32	65	0	<i>Candidatus Nitrososphaera</i>	668
OTU-37	108	0		
OTU-43	132	0		
OTU-48	124	0		
OTU-82	81	0		
OTU-94	57	0		
OTU-98	101	0		
OTU-20	298	0	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	489
OTU-30	61	0		
OTU-146	130	0		
OTU-27	91	0	芽胞杆菌属 <i>Bacillus</i>	262
OTU-42	115	0		
OTU-168	56	0		
OTU-44	69	0	沃尔巴克氏属 <i>Wolbachia</i>	154
OTU-57	85	0		
OTU-38	73	0	鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingobium</i>	73
OTU-61	53	0	鞘脂菌属 <i>Sphingobium</i>	53
OTU-84	53	0	詹森菌属(医) <i>Janthinobacterium</i>	53
OTU-93	113	0	铜绿假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	113
OTU-119	72	0	红色杆菌属 <i>Rubrobacter</i>	72

表 5 Composite 11-B-R 和 11-50-WFP-Q-R 的内生菌种类(OTUs)和数量比较

Table 5 Comparison of the OTUs and their amounts between Composite 11-B-R and 11-50-WFP-Q-R

OTU 编号 OTU code	OTU 数量 Amount of the OTU		属名 Genus name	11-50-WFP-Q-R 中该属所有 OTU 的总数量 Total amount of all the OTUs in this genus in 11-50-WFP-Q-R
	11-50-WFP-Q-R	Composite 11-B-R		
OTU-20	169	0	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	325
OTU-30	99	0		
OTU-68	57	0		
OTU-32	84	0	<i>Candidatus Nitrososphaera</i>	281
OTU-37	50	0		
OTU-43	65	0		
OTU-94	82	0		
OTU-27	93	0		
OTU-42	96	0	芽胞杆菌属 <i>Bacillus</i>	189
OTU-61	50	0	鞘脂菌属 <i>Sphingobium</i>	50

表 6 Composite 11-B-R,08-52-Q-R 和 11-50-WFP-Q-R 的内生菌种类(OTUs)和数量比较

Table 6 Comparison of the OTUs and their amounts among Composite 11-B-R,08-52-Q-R and 11-50-WFP-Q-R

OTU 编号 OTU code	OTU 数量 Amount of the OTU		属名 Genus name	Composite 11-B-R 中所有 OTU 的总数量 Total amount of all the OTUs in this genus in composite 11-B-R
	Composite 11-B-R	08-52-Q-R/ 11-50-WFP-Q-R		
OTU-7	4 400	0	Candidatus <i>Hamiltonella</i>	10 320
OTU-9	4 581	0		
OTU-12	904	0		
OTU-324	435	0		
OTU-14	188	0	乳酸菌属 <i>Lactobacillus</i>	576
OTU-18	67	0		
OTU-26	223	0		
OTU-36	98	0		
OTU-15	191	0	幽门螺杆菌属 <i>Helicobacter</i>	531
OTU-17	282	0		
OTU-174	58	0		
OTU-49	112	0	脱硫弧菌属 <i>Desulfovibrio</i>	162
OTU-53	50	0		
OTU-16	71	0	<i>Akkermansia</i>	159
OTU-33	88	0		
OTU-34	66	0	<i>Prevotella</i>	117
OTU-70	51	0		
OTU-90	57	0	普雷沃菌属 <i>Prevotella</i>	57
OTU-66	54	0	<i>Turicibacter</i>	54

2.4 内共生菌对烟粉虱抗性的影响

比较在 B 型吡虫啉敏感品系 Yuma-04-B-S 和抗性品系 Composite 11-B-R 检测到的 OTU 序列,发现排在前六位的 OTU 在抗性品系的数目显著高于敏感品系,倍数差异由大到小分别为:*Rickettsia*-OTU10(17.36 倍)、*Candidatus Portiera*-OTU85 (15 倍)、*Candidatus Hamiltonella*-OTU324(3.51 倍)、S24-7-OTU297(3.25 倍)、*Prevotella*-OTU70(3.18 倍)和 *Candidatus Portiera*-OTU190(3.0 倍)(图 2)。

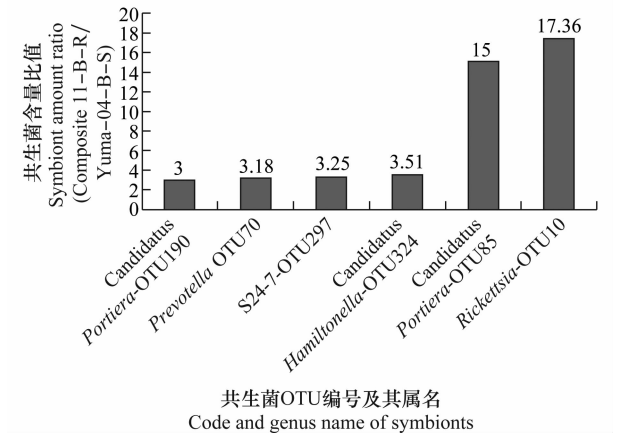


图 2 6 个共生菌 OTU 在对吡虫啉抗性品系 Composite 11-B-R 和敏感品系 Yuma-04-B-S 中的数量比较
Fig. 2 Quantitative comparison of 6 endosymbiont OTUs between the neonicotinoids-resistant Composite 11-B-R and-susceptible Yuma 04-B-S

比较在 B 型吡丙醚敏感品系 12-10-Gadsen-B-S 和抗性品系 QC-02-B-R 检测到的 OTU 序列,发现排在前六位的 OTU 在抗性品系的数目显著高于敏感品系,倍数差异由大到小分别为:*Candidatus Hamiltonella*-OTU7(1 215 倍)、*Candidatus Portiera*-OTU85 (86.67 倍)、*Candidatus Portiera*-OTU5(28 倍)、*Candidatus Portiera*-OTU190(20.8 倍)、*Rickettsia*-OTU4(10.95)和 *Rickettsia*-OTU2(10.03 倍)(图 3)。

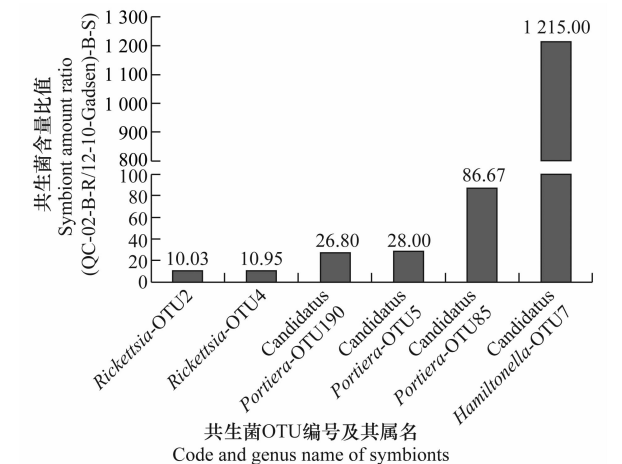


图 3 6 个共生菌 OTU 在对吡丙醚抗性品系 QC-02-B-R 和敏感品系 12-10-Gadsen-B-S 中的数量比较
Fig. 3 Quantitative comparison of 6 endosymbiont OTUs between the pyriproxyfen-resistant QC-02-B-R and susceptible Gadsen-12-10-B-S

3 讨论

本研究借助 16S rRNA 细菌多样性测序技术,在烟粉虱体内发现了更多种类的内共生菌,并对烟粉虱不同生物型或不同抗性品系的内共生菌进行了比较分析。由样品主要属分类水平物种组成柱形图可以看出(图 1),各烟粉虱品系中数量最多的前 3 个内共生菌属占到了各品系内共生菌总量的 68.7%~87.4%,其中,初生共生菌 *Candidatus Portiera* 在 6 个品系中含量均为最多,*Rickettsia* 属在 Q 型烟粉虱中的含量高于 B 型,而 *Candidatus Hamiltonella* 仅能在 B 型烟粉虱中被检测到。这一结果表明,初生内共生菌 *Candidatus Portiera* 在烟粉虱体内是稳定存在的,这与其能够穿透宿主生殖细胞严格进行垂直传播有关^[29-30]。初生内共生菌一般通过合成必需的类胡萝卜素和必需氨基酸来弥补宿主食物源营养物质缺乏或不平衡,类似的内共生菌还有木虱体内的 *Carsonell* 以及蚜虫体内的 *Buchnera aphidicola* 等^[30-31]。由此可见,昆虫初生内共生菌对其生长发育是必不可少的。

Brown 等发现,除了地理环境、繁殖力、抗性、入侵行为等因素之外,内共生菌的种类和数量也是烟粉虱生物型划分的一个重要依据,以上这些因素协同作用,直接或间接地影响烟粉虱生物型的分化^[32]。本研究中,在对吡虫啉产生抗性的 3 个烟粉虱品系中,与 B 型烟粉虱 Composite 11-B-R 相比,内共生菌 *Candidatus Nitrososphaera*、芽胞杆菌属 *Bacillus*、鞘脂菌属 *Sphingobium* 等只在 Q 型烟粉虱 08-52-Q-R 和 11-50-WFP-Q-R 这两个品系中存在(表 4、表 5),相反,内共生菌 *Candidatus Hamiltonella*、乳酸菌属 *Lactobacillus*、幽门螺杆菌属 *Helicobacter*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* 等只能在 B 型烟粉虱 Composite 11-B-R 中检出(表 6),推测这些生物型特异的内共生菌可能在烟粉虱 Q、B 两种生物型分化过程中发挥了一定作用。已有很多研究证实,沃尔巴克氏属 *Wolbachia* 在 B 型烟粉虱中的检出率较低,并缺少衣原体细菌 *Candidatus Fritschea bemisiae* 和类噬胞细菌(CLO),这与我们的结果相似,这些内共生菌的缺失可能与 B 型烟粉虱的入侵机制相关^[4,33]。Chiel 等也得到类似的研究结果,即 *Hamiltonella* 只能在 B 型烟粉虱中检测到,而 *Wolbachia* 和 *Arsenophonus* 只能在 Q 型烟粉虱中检测到,这种关联表明次级内共生菌与烟粉虱生物型存在一定的关系^[14]。

通过对 B 型烟粉虱抗性品系与敏感品系间内共生菌的比较,发现内共生菌 *Rickettsia*、*Candidatus Portiera*、*Candidatus Hamiltonella*、S24-7 和 *Prevotella* 在吡虫啉抗性品系 Composite 11-B-R 中的含量明显高于敏感品系 Yuma-04-B-S(图 2),推测这些共生菌可能与烟粉虱对新烟碱类杀虫剂抗性的形成有关;同时,在烟粉虱对吡丙醚的抗性品系 QC-02-B-R 中发现共生菌 *Candidatus Hamiltonella*-OTU7、*Candidatus Portiera*-OTU85、*Candidatus Portiera*-OTU5、*Candidatus Portiera*-OTU190、*Rickettsia*-OTU4、*Rickettsia*-OTU2 的含量明显高于敏感品系 12-10-Gadsen-B-S,认为它们可能与烟粉虱对保幼激素类似物杀虫剂的抗性形成有关。在其他昆虫中也有相关研究表明内共生菌对昆虫抗药性的产生具有一定影响,例如,灰飞虱对杀虫剂的抗性会随着体内共生菌含量的减少而逐渐降低^[17];蚜虫对有机磷类杀虫剂的抗性产生也与其内共生菌有关^[34]。相关研究发现,在受到高浓度药剂处理后,昆虫内共生菌的含量会迅速增加^[35-36],说明内共生菌在协助宿主对杀虫剂的解毒方面发挥重要作用;点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 在感染伯克氏菌 *Burkholderia* 后,幼虫对有机磷农药的抗性显著提高,这可能是由于伯克氏菌能将高毒的有机磷类杀虫剂水解成低毒活性物质,且该水解产物能够作为碳源直接为宿主提供能量^[37]。

本研究通过分析烟粉虱 B、Q 两种生物型及杀虫剂抗、感品系之间内共生菌种类和数量的差异,认为部分内共生菌可能在烟粉虱生物型分化及抗药性的形成中发挥作用。然而,有研究者指出,由于 16S rRNA 具有趋同性,通过对烟粉虱内共生菌 16S rRNA 进行测序分析,推断烟粉虱内共生菌的作用存在着一定的假定性^[2],因此,还需要进一步研究去验证相关内共生菌的功能作用。

参考文献

- [1] 杨义婷,郭建洋,龙楚云,等. 昆虫内共生菌及其功能研究进展[J]. 昆虫学报, 2014, 57(1): 111-122.
- [2] 李正西,李定旭. 桃蚜自然种群初级和次级共生菌的分子鉴定[J]. 昆虫学报, 2005, 48(5): 810-714.
- [3] 谭周进,肖启明,谢丙炎,等. 昆虫内共生菌研究概况[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 140-143.
- [4] NIRGIANAKI A, BANKS G K, FROHLICH D R, et al. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci* [J]. *Current Microbiology*, 2003, 47(2): 93-101.
- [5] OLIVER K M, DEGNAN P H, BURKE G R, et al. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits [J]. *Annual Review of Entomology*,

2010, 55: 247–266.

- [6] TSUCHIDA T, KOGA R, HORIKAWA M, et al. Symbiotic bacterium modifies aphid body color [J]. *Science*, 2010, 330 (6007): 1102–1104.
- [7] BRUMIN M, KONTSEDALOV S, GHANIM M. *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype [J]. *Insect Science*, 2011, 18(1): 57–66.
- [8] HIMLER A G, ADACHI HAGIMORI T, BERGEN J E, et al. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias [J]. *Science*, 2011, 332(6026): 254–256.
- [9] 王珂, 吴迪. 烟粉虱内共生菌研究进展[J]. *河南科技*, 2012(8): 65.
- [10] TEIXEIRA L, FERREIRA A, ASHBURNER M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* [J]. *PLoS Biology*, 2012, 6(12): e2.
- [11] BROWNLIE J C, JOHNSON K N. Symbiont-mediated protection in insect hosts [J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(8): 348–354.
- [12] KM O, DEGNAN P H, BURKE G R, et al. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits [J]. *Annual Review of Entomology*, 2010, 55(55): 247–266.
- [13] GNANKINÉ O, MOTUON L, HENRI H, et al. Distribution of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotypes and their associated symbiotic bacteria on host plants in West Africa [J]. *Insect Conservation and Diversity*, 2013, 6(3): 411–421.
- [14] CHIEL E, GOTTLIEB Y, ZCHORI-FEIN E, et al. Biotypes-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci* [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2007, 97(4): 407.
- [15] GUEGUEN G, VAVRE F, GNANKINE O, et al. Endosymbiont metacommunities, mtDNA diversity and the evolution of the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex [J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(19): 4365–4376.
- [16] XU Y, BUSS E A, BOUCIAS D G. An initial investigation of the potential association between bacterial symbiosis and insecticide resistance in *Blissus insularis* (Hemiptera: Blissidae) [C]. *Proceedings of the Entomological Society of America Meeting*, Austin, 2013.
- [17] 张晓婕, 俞晓平, 陈建明. 高温对灰飞虱体内类酵母共生菌和耐药性的影响[J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(4): 416–420.
- [18] AMIRESSAMI M. Investigation of the light microscopical and ultrastructure of the demeton-S-methyl resistance aphids under consideration of the mycetome symbionts of the *Phorodon humuli* Schrank [M]. Schwemmer W, Schenk H E A. *Endocytobiology Berlin*; Walter de Gruyter, 1980: 425–443.
- [19] 柳洋. 中国烟粉虱生物型分布、带毒率及抗药性监测[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [20] 李迁, 范佳, 孙京瑞, 等. 昆虫内共生菌-昆虫-植物互作关系研究进展[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(6): 881–891.
- [21] 徐红星, 郑许松, 刘淑平, 等. 昆虫内共生菌在昆虫防御中的作用[J]. *应用昆虫学报*, 2009, 46(3): 350–354.
- [22] GHANIM M, KONTSEDALOV S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities [J]. *Pest Management Science*, 2009, 65(9): 939–942.
- [23] WEN X, MENG Q S, WU Q J, et al. Pyrosequencing the *Bemisia tabaci* transcriptome reveals a highly diverse bacterial community and a robust system for insecticide resistance [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35181.
- [24] 张晓婕. 浙江省灰飞虱抗药性及其与体内共生菌的关系[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2008.
- [25] 刘浩. 德国小蠊共生菌种群变化与抗药性的关系[D]. 济南: 山东师范大学, 2013.
- [26] 刘国霞, 褚栋. 利用 CAPS 方法鉴别中国烟粉虱遗传群[C]// 第三届全国生物入侵大会论文摘要集—全球变化与生物入侵, 2010.
- [27] DENNEHY T J, DEGAİN B A, HARPOLD V S, et al. Extraordinary resistance to insecticides reveals exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* in the New World [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2010, 103(6): 2174–2186.
- [28] 刘凤沂, 李惠陵, 邱建友, 等. 惠州地区褐飞虱对几种药剂的抗药性监测[J]. *应用昆虫学报*, 2010, 47(5): 991–993.
- [29] BAUMANN P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59(1): 155.
- [30] SLOAN D B, MORAN N A. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies [J]. *Biology Letters*, 2012, 8(6): 986–989.
- [31] DOUGLAS A E. Molecular dissection of nutrient exchange at the insect-microbial interface [J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2014, 4(1): 23–28.
- [32] BROWN J K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes [J]. *Virus Research*, 2000, 71(1–2): 233.
- [33] ZCHORIFEIN E, BROWN J K. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2002, 95(6): 711–718.
- [34] AMIRESSAMI M, PETZOLD H. Symbiote investigation and insecticide resistance. Light microscopical and electron microscopical contribution for clarification of the insecticide resistance of the aphids under consideration of the mycetome symbionts of the *Myzus persicae* Sulz [J]. *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, 1977, 82: 253–259.
- [35] SINGH B K, WALKER A, WRIGHT D J. Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 34(9): 1675–1682.
- [36] TAGO K, YONEZAWA S, OHKOUCHI T, et al. Purification and characterization of fenitrothion hydrolase from *Burkholderia* sp. NF100 [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2006, 101(1): 80–82.
- [37] KIKUCHI Y, HAYATSU M, HOSOKAWA T, et al. Symbiont-mediated insecticide resistance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(22): 8618–8622.

(责任编辑: 田 喆)