

网络出版时间:2022-04-27 16:41 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.11.011
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20220426.1621.013.html

桉树枝瘿姬小蜂与寄主及寄生蜂体内细菌相似性研究

郭春晖¹,王蕊蕊¹,马洪轩²,彭欣¹,王瀚棠¹,周静¹,
丁芷柔¹,王雪¹,杨振德¹

(1 广西大学 林学院 广西高校林业科学与工程重点实验室,广西 南宁 530004;2 广西国有高峰林场,广西 南宁 530000)

[摘要] **【目的】**研究桉树枝瘿姬小蜂、寄主桉树及其天敌孟氏胯姬小蜂三者体内细菌的相似性,明确内生细菌在桉树枝瘿姬小蜂入侵过程中的作用,为桉树枝瘿姬小蜂入侵和爆发机制研究提供参考。**【方法】**以巨园桉 DH201-2 叶柄和叶脉,无羽化孔虫瘿组织,南宁桉树枝瘿姬小蜂幼虫和雌成虫,四川桉树枝瘿姬小蜂雌成虫和孟氏胯姬小蜂成虫为材料,利用 Illumina HiSeq 2500 平台进行高通量测序方法,对桉树枝瘿姬小蜂、寄主桉树及其天敌孟氏胯姬小蜂三者体内细菌的多样性进行比较分析。**【结果】**在桉树枝瘿姬小蜂、寄主桉树及其天敌孟氏胯姬小蜂三者体内共发现 24 个门,55 个纲,126 个目,225 个科和 497 个属的细菌。Alpha 多样性分析表明,巨园桉 DH201-2 和无羽化孔虫瘿组织体内细菌的丰富度和多样性最高;桉树枝瘿姬小蜂幼虫和成虫体内菌群具有一定的相似性;桉树枝瘿姬小蜂成虫体内菌群组成与孟氏胯姬小蜂成虫体内菌群组成相似。变形菌门(Proteobacteria)是所有样本的优势菌门;甲基杆菌属(*Methylbacillus*)为巨园桉 DH201-2 的优势菌属,链球菌属(*Streptococcus*)为无羽化孔虫瘿组织内生菌的优势菌属,立克次氏体(*Rickettsia*)为桉树枝瘿姬小蜂幼虫,成虫和孟氏胯姬小蜂成虫内生菌的优势菌属。**【结论】**桉树、桉树枝瘿姬小蜂和孟氏胯姬小蜂三者体内细菌具有一定相似性,表明三者共有细菌之间具有密切联系。

[关键词] 桉树枝瘿姬小蜂;桉树;孟氏胯姬小蜂;细菌多样性

[中图分类号] S763.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2022)11-0093-08

Study on the similarity of endosymbiotic bacteria among *Leptocybe invasa* and its host and parasite

GUO Chunhui¹, WANG Ruirui¹, MA Hongxuan², PENG Xin¹, WANG Hantang¹,
ZHOU Jing¹, DING Zhirou¹, WANG Xue¹, YANG Zhengde¹

(1 Key Laboratory of Forestry Science and Engineering in Guangxi University, College of Forestry,
Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China;
2 Guangxi Gaofeng State Owned Forest Farm, Nanning, Guangxi 530000, China)

Abstract: **【Objective】** This study investigated the similarity of endosymbiotic bacteria among eucalyptus, *Leptocybe invasa* and *Quadrastichus mendeli* and clarified the role of endosymbiotic bacteria in the invasion of *L. invasa* to provide basis for understanding invasion and outbreak mechanism of *L. invasa*. **【Method】** The petiole and vein of DH201-2 (*E. grandis* × *E. tereticornis*), tissue without emergence holes gall, larvae and female *L. invasa* from Nanning, as well as *Q. mendeli* and female *L. invasa* from Sichuan were collected for analysis. The endosymbiotic bacteria of eucalyptus, *L. invasa* and *Q. mendeli* were analyzed and compared using Illumina HiSeq 2500. **【Result】** A total of 24 phyla, 55 classes, 126 orders, 225

[收稿日期] 2021-12-03
[基金项目] 广西自然科学基金重点项目(2018GXNSFDA281004);国家自然科学基金面上项目(31971664,31870634);广西自然科学基金面上项目(2018GXNSFAA294008)
[作者简介] 郭春晖(1993—),男,河南新乡人,在读博士,主要从事桉树枝瘿姬小蜂体内微生物研究。E-mail:644232136@qq.com
[通信作者] 杨振德(1966—),男,广西北流人,教授,博士,博士生导师,主要从事昆虫与植物的互作研究。E-mail:dzyang68@126.com

families and 497 genera were detected from eucalyptus, *L. invasa* and *Q. mendeli*. The Alpha diversity showed that the abundance and diversity of bacteria in eucalyptus DH201-2 and gall tissues were the highest. The endosymbiotic bacteria of *L. invasa* adults and larvae had certain similarity and the endosymbiotic bacteria of *L. invasa* and *Q. mendeli* was also similar. Proteobacteria was the dominant phylum in all samples, *Methylobacillus* was the dominant genus in DH201-2, *Streptococcus* was the dominant genus in gall tissues, and *Rickettsia* was the dominant genera in *L. invasa* larvae, adult and *Q. mendeli*. 【Conclusion】 The endosymbiotic bacteria had certain similarity among eucalyptus, *L. invasa* and *Q. mendeli*, indicating close relationship in endosymbiotic bacteria among them.

Key words: *Leptocybe invasa*; eucalyptus; *Quadrastichus mendeli*; bacterial diversity

桉树枝瘿姬小蜂 (*Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle) 属膜翅目 (Hymenoptera) 小蜂总科 (Chalcidoidea) 姬小蜂科 (Eulophidae), 是一种严重危害多种桉树的入侵性致瘿害虫^[1-3]。桉树枝瘿姬小蜂取食桉树嫩叶汁液, 并产卵在桉树的嫩枝及叶柄处危害桉树生长, 严重时可导致桉树死亡^[1-3]。桉树枝瘿姬小蜂起源于澳大利亚, 于 2000 年首次发现于中东和地中海地区, 随后在亚洲、欧洲、非洲、大洋洲和美洲等 45 个国家和地区相继报道该害虫^[1-3]。随着气候的不断变暖以及人类活动的加剧, 桉树枝瘿姬小蜂还有继续扩散的趋势^[1-6]。在中国, 桉树枝瘿姬小蜂首次发现于中越交界处的广西壮族自治区东兴市, 随后该虫迅速扩散入侵到包括广西、海南、台湾、广东、福建、江西、四川、云南和湖南等多个地区, 造成了巨大的经济损失^[5, 7-13]。目前, 关于桉树枝瘿姬小蜂体内的微生物已经有了一些研究, 如 Guo 等^[14]研究发现, 不同性别桉树枝瘿姬小蜂体内细菌群落结构不同, 立克次氏体 (*Rickettsia*) 为雌虫的优势菌; Nugnes 等^[15]研究发现, 桉树枝瘿姬小蜂体内存在两个不同种的立克次氏体, 主要位于雌虫卵巢处, 并认为与桉树枝瘿姬小蜂的繁殖有关; 王蕊蕊等^[12-13]利用传统分离方法发现, 桉树枝瘿姬小蜂体内的细菌会受到季节的影响, 夏季可以分离出更多的细菌。此外, 桉树枝瘿姬小蜂体内的细菌还能够降解桉树的次生代谢物质, 有助于其顺利入侵定殖^[16]。

昆虫体内包含大量的微生物, 包括真菌、细菌和病毒等^[17-19]。在长期协同进化过程中, 许多微生物与宿主昆虫形成密切关系, 并对宿主的繁殖、生存、群落相互作用、以及抵御捕食性和寄生性天敌的能力产生了巨大影响^[20-23]。鉴于微生物的重要功能, 昆虫与其体内微生物之间的关系成为当今的研究热点之一。外界环境中的微生物能够随着食物进入昆虫体内, 比如中华按蚊 (*Anopheles sinensis*) 体内的细菌主要来源于生存的水体环境^[24]; 取食相同食物

的舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 体内细菌结构具有高度的相似性, 而取食不同食物时其体内细菌群落组成就会明显不同^[25]。

为此, 本研究利用高通量测序技术, 对寄主桉树、桉树枝瘿姬小蜂及其寄生蜂孟氏胯姬小蜂体内的细菌进行研究, 分析其内生细菌的多样性和群落构成, 并比较三者体内细菌组成的相似性, 旨在为后续深入研究桉树枝瘿姬小蜂、寄主桉树及其天敌孟氏胯姬小蜂三级营养关系, 以及其体内细菌的传递模式、协同进化关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

桉树叶柄和主脉、无羽化孔虫瘿组织、桉树枝瘿姬小蜂幼虫和雌成虫 (南宁种群), 均采自广西大学林学院校内教学实践基地 (22°51' N, 108°17' E) 种植的巨园桉 DH201-2 (*Eucalyptus grandis* × *E. tereticornis*); 桉树枝瘿姬小蜂雌成虫 (四川种群) 和天敌孟氏胯姬小蜂成虫, 采自攀枝花仁和镇 (26°49' N, 101°75' E) 巨园桉 DH201-2。每个样本的桉树叶柄和主脉、无羽化孔虫瘿组织各 0.6 g。桉树枝瘿姬小蜂幼虫在无菌室中通过解剖无羽化孔的虫瘿组织获得。桉树枝瘿姬小蜂幼虫、刚羽化的雌成虫 (南宁种群和四川种群) 和天敌孟氏胯姬小蜂成虫进行饥饿处理 6 h 后, 各选取 50 头大小一致、生长健康的个体作为一组样本, 先用无菌水冲洗掉虫体表面杂质, 再用 75% 酒精消毒 1 min, 随后用无菌水冲洗 1 min, 重复 3 次。

1.2 试剂与仪器

试剂: PowerSoil® DNA Isolation kit (MO BIO, 12888-100)、Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Q32854)、MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen, 28004) 等, 均购自南宁国拓生物科技有限公司。

仪器:电泳仪电源(DYY-4C)和水平电泳仪(DYCP-31CN),北京六一生物科技有限公司;微量核酸蛋白测定仪(NanoDrop One),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;PCR仪(EASYCYCLER 96),德国耶拿分析仪器股份公司;凝胶成像系统(CHEMI-DOC XRS),伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 细菌基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

将 1.1 节准备的各个样本采用 PowerSoil® DNA Isolation kit (MO BIO, 12888-100)试剂盒进行内生菌基因组 DNA 提取,具体方法参考试剂盒说明书的步骤进行。采用微量核酸蛋白测定仪测定总 DNA 的浓度和纯度,检测合格后的样本保存于一 80 ℃ 备用。

以提取的 DNA 为模板,采用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增细菌 16S rRNA 的 V3-V4 区。扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 60 s,50 ℃ 退火 60 s,72 ℃ 延伸 60 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。PCR 扩增体系:DNA 模板 2 μL, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.2 μL, 正反向引物各 1.5 μL, dNTP 1 μL, 10× Buffer 和 High GC Enhancer 各 10 μL, 用 ddH₂O 补足 50 μL。PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.4 细菌基因组 DNA 文库的构建和测序

利用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher, Q32854) 对上述 PCR 产物进行定量,用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳切取目的片段,利用 MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen, 28004) 回收目的片段。使用 Qubit 3.0 荧光定量仪对按照建库说明构建好的小片段文库进行浓度检测,采用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测其片段范围,Illumina HiSeq 2500 进行双末端测序(北京百迈克生物科技有限公司)。

1.5 数据分析

使用 Overlap 对测试得到的原始标签进行过滤,拼接并去除嵌合体,得到高质量的有效序列(ef-fective Tags)。首先使用 FLASH v1.2.11 软件对每个样本的 reads 进行 PE reads 拼接,得原始 Tags 序列;再使用 Trimmomatic v0.33 软件进行过滤,得到高质量的 clean Tags 序列;最后使用 UCHIME v4.2 软件鉴定并去除嵌合体序列,得到有效序列,并计算其碱基质量值。碱基质量值是衡量测序质量

的重要指标,其计算公式为 $Q = -10 \lg P$,其中 Q 为碱基质量值, P 为概率;碱基质量值(Q)越高表明碱基被测错的概率(P)越小, Q_{20} 和 Q_{30} 分别代表碱基识别正确率大于 99% 和 99.9%,其值越大,说明测序结果越好。

使用 QIIME v1.8.0 软件对这些序列进行聚类,相似性大于 97% 的序列归为一个分类单元,即一个 OTU (operational taxonomic unit)。使用 Mothur v1.30 (<http://www.mothur.org/>) 软件与 SILVA 数据库 (<http://www.arb-silva.de/>) Py-NAST 算法和 RDP Classifier 贝叶斯算法对 OTU 进行分类学分析及 Alpha 多样性分析。利用 QI-IME 软件和 R 语言制作物种丰度表和群落结构图。采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA) 分析不同样本中细菌群落的整体相似性和差异性。

2 结果与分析

2.1 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内细菌高通量测序结果

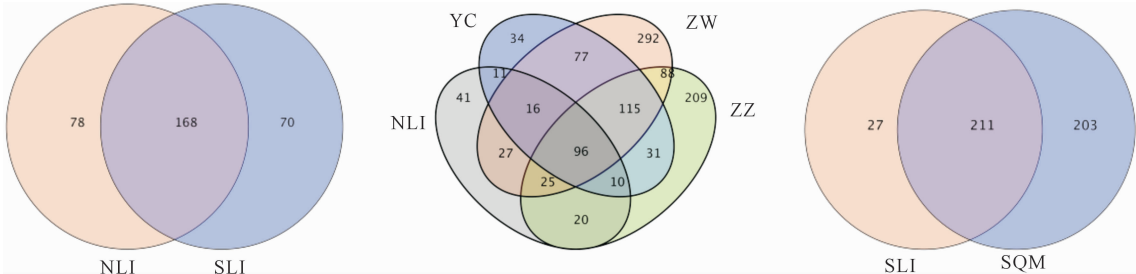
经过高通量测序,本研究共获得 864 135 条有效序列,平均长度均大于 400 bp,有效率均高于 80%, Q_{20} 和 Q_{30} 值均大于 90% (表 1)。以 97% 相似水平对有效序列进行聚类,共获得 1 102 个 OTU,其中南宁桉树枝瘿姬小蜂雌成虫 (NLI)、四川桉树枝瘿姬小蜂雌成虫 (SLI)、四川孟氏胯姬小蜂成虫 (SQM)、桉树枝瘿姬小蜂幼虫 (YC)、巨园桉 DH201-2 叶柄和主脉 (ZW) 及无羽化孔虫瘿内部组织 (ZZ) 样本分别有 246, 238, 414, 390, 736, 594 个 OTU;其中有 96 个 OTU 为 ZW、ZZ、YC 和 NLI 样本所共有,说明桉树枝瘿姬小蜂幼虫和成虫体内的细菌与所取食植物和虫瘿组织体内的细菌具有一定程度的相似性,表明桉树枝瘿姬小蜂可能通过取食从寄主植物获取一定的细菌;有 133 个 OTU 为 YC (占 34.10%) 和 NLI (占 54.07%) 样本所共有,表明桉树枝瘿姬小蜂幼虫和成虫体内的细菌具有一定的相似性;有 168 个 OTU 为 NLI 和 SLI 样本所共有,说明桉树枝瘿姬小蜂体内共有细菌很多;有 211 个 OTU 为 SQM (占 50.97%) 和 SLI (占 88.66%) 样本所共有,表明桉树枝瘿姬小蜂与其天敌孟氏胯姬小蜂体内细菌具有一定的相似性 (图 1)。

表 1 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂 6 个样本内生细菌高通量测序结果
Table 1 Sequencing statistics of 6 samples among eucalyptus,*L. invasa* and *Q. mendeli*

样本 Sample	有效序列数 Effective Tags	有效率/% Effective rate	OTU 数 OTU number	Q_{20} /%	Q_{30} /%
NLI	147 402	86. 80	246	96. 28	93. 05
SLI	147 931	85. 81	238	96. 02	92. 55
SQM	63 497	81. 47	414	95. 88	92. 16
YC	176 490	88. 15	390	97. 63	95. 33
ZW	162 958	81. 50	736	97. 51	95. 04
ZZ	165 857	82. 96	594	97. 50	95. 03
合计 Total	864 135	84. 45	1 102	/	/

注: Q_{20} 和 Q_{30} 表示有效序列中碱基质量值大于 20 和 30 的碱基所占的百分比。NLI. 南宁桉树枝瘿姬小蜂雌成虫;SLI. 四川桉树枝瘿姬小蜂雌成虫;SQM. 四川孟氏胯姬小蜂成虫;YC. 桉树枝瘿姬小蜂幼虫;ZW. 巨园桉 DH201-2 叶柄和主脉;ZZ. 无羽化孔虫瘿内部组织。下同。

Note: Q_{20} and Q_{30} indicate the percentages of base quality value greater than 20 and 30 in effective Tags. NLI. Female adult of *L. invasa* in Nanning;SLI. Female adult of *L. invasa* in Sichuan;SQM. *Q. mendeli* in Sichuan;YC. Larvae of *L. invasa*; ZW. Petiole and main vein of DH201-2 (*E. grandis* × *E. tereticornis*);ZZ. Tissue without emergence holes gall. The same below.



图中每个圈代表一个样本,圈和圈重叠部分的数字代表样本之间共有的 OTU 个数,没有重叠部分的数字代表样本的特有 OTU 个数,圈外字母标签代表样本名称

Each circle represents a sample. The number of circles with overlapping parts represents the number of OTU shared between samples and the number without overlapping parts represents the number of unique OTUs of samples.

The labels outside the circle represent the names of samples

图 1 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂 6 个样本内生细菌的 OTU 数目 Venn 图
Fig. 1 Venn profile of OTU of bacteria in 6 samples of eucalyptus,*L. invasa* and *Q. mendeli*

2. 2 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内细菌群落组成分析

基于 OTU 的注释结果可知,桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内细菌多样性差异明显,6 个样本(NLI、SLI、SQM、YC、ZW 和 ZZ)共获得 24 个

门,55 个纲,126 个目,225 个科,497 个属的细菌,其中 ZW 样本体内细菌在各分类水平上获得的个数最多,而 SLI 样本体内细菌在各分类水平上获得的个数最少(表 2)。

表 2 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂 6 个样本内生细菌不同分类水平的数量

Table 2 Number of species at each classification level of 6 samples among eucalyptus,*L. invasa* and *Q. mendeli*

样本 Sample	内生细菌数 Number of bacteria				
	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus
NLI	11	19	43	78	148
SLI	11	17	40	73	131
SQM	15	30	69	118	235
YC	14	28	64	107	226
ZW	23	45	101	179	381
ZZ	18	41	88	149	317
合计 Total	24	55	126	225	497

由图 2-A 可知,在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)在所有

样本中均存在,其中变形菌门(Proteobacteria)是所有样本的优势菌门,在 SLI、NLI、YC、SQM 样本中相对丰度分别达到了 98. 22%,95. 43%,86. 25%,

67.77%。在 ZW 和 ZZ 样本中,厚壁菌门为次优势菌门,其相对丰度分别达到 31.39%和 31.05%。在 YC 样本中,厚壁菌门相对丰度为 8.09%。在 SQM 样本中,厚壁菌门相对丰度为 9.29%,拟杆菌门相对丰度为 11.10%,放线菌门相对丰度为 6.27%。

由图 2-B 可知,在属水平上,ZW 样本体内菌群中优势菌为甲基杆菌属(*Methylbacillus*),相对丰度为 13.01%,次优势菌为埃希氏菌属(*Escherichia-Shigella*),相对丰度为 8.31%;ZZ 样本体内优势菌

群为链球菌属(*Streptococcus*)和拟杆菌属(*Bacteroides*),相对丰度分别为 7.71%和 6.55%。桉树枝瘿姬小蜂的幼虫(YC)、成虫(NLI 和 SLI)以及天敌孟氏胯姬小蜂(SQM)的优势菌均为立克次氏体属(*Rickettsia*),而立克次氏体属在 ZW 和 ZZ 样本中相对丰度很低,但在 YC、NLI、SLI 和 SQM 样本中的相对丰度分别为 81.49%,93.39%,91.92%和 39.73%。此外,不动杆菌属(*Acinetobacter*)是 SQM 样本中的次优势菌,相对丰度为 20.37%。

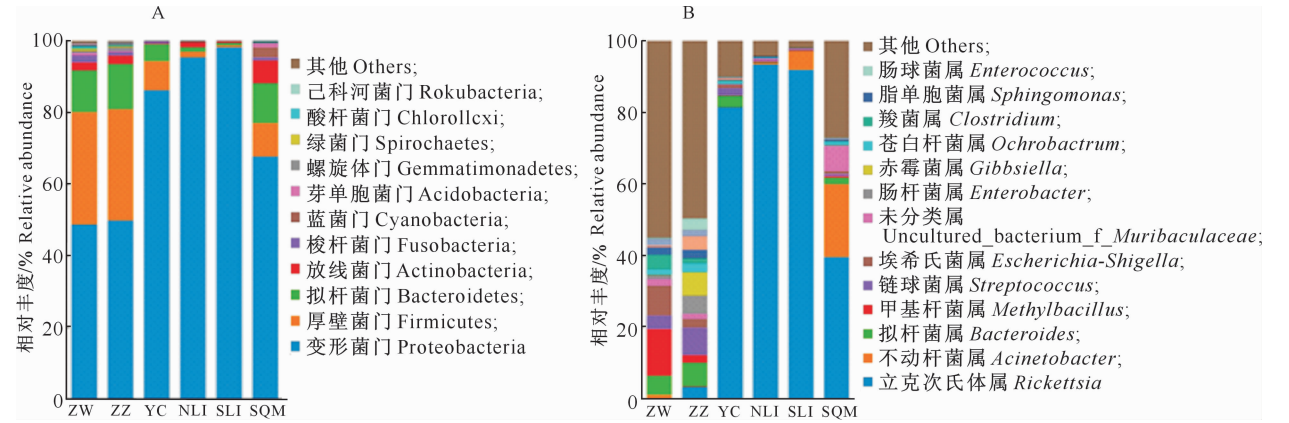


图 2 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内菌群在门(A)和属(B)水平上的组成和结构

Fig. 2 Composition and structure of intestine bacteria in eucalyptus, *L. invasa* and *Q. mendeli* at phylum (A) and genus (B) levels

2.3 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内细菌群落组成相似性分析

主成分分析结果表明,南宁地区桉树枝瘿姬小蜂幼虫、南宁和四川地区桉树枝瘿姬小蜂雌成虫体

内细菌群落结构类似;巨园桉 DH201-2 叶脉和叶柄与无羽化孔虫瘿组织距离较近,说明彼此之间的细菌群落组成有一定的相似性(图 3)。

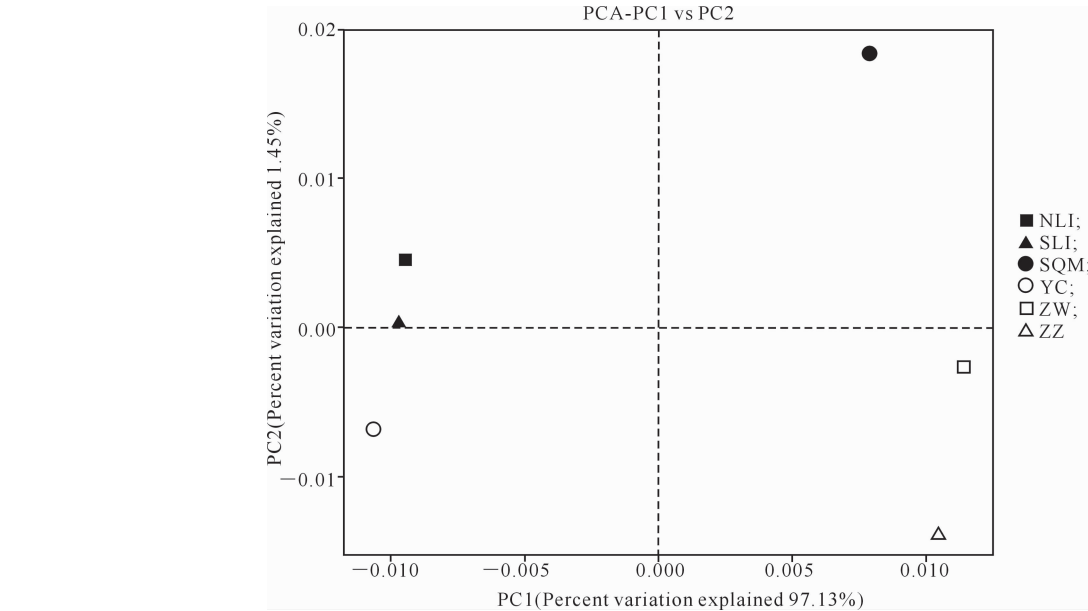


图 3 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内细菌的 PCA 分析结果

Fig. 3 PCA analysis of internal bacteria among eucalyptus, *L. invasa* and *Q. mendeli*

聚类分析结果表明,ZW 和 ZZ 聚为一分支,而 NLI、SLI、YC 和 SQM 聚在另一分支上,说明桉树

枝瘿姬小蜂幼虫、成虫与孟氏胯姬小蜂体内菌群结构和丰度存在一定的相似性(图 4)。

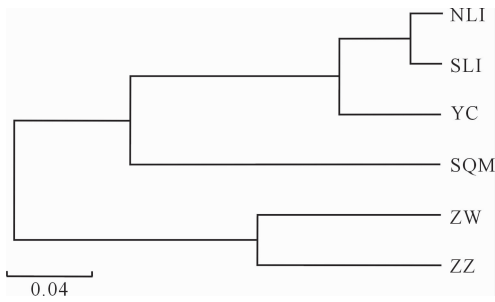


图 4 桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂体内细菌的 UPGMA 分析结果

Fig. 4 UPGMA analysis of internal bacteria among eucalyptus, *L. invasa* and *Q. mendeli*.

3 讨 论

本研究结果表明,桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胯姬小蜂三者体内细菌具有一定的相似性。昆虫体内的细菌可以从外界环境中获取,比如翟小战^[24]研究发现,中华按蚊(*Anopheles sinensis*)体内细菌主要来自于所生活的水体环境中。此外,通过取食昆虫也可以获得一些微生物,比如棉铃虫体内的大多数细菌与所取食叶片内的细菌具有高度相似性^[26-27]。烟粉虱可将体内的沃尔巴克氏体传递给其寄生蜂,而寄生蜂从烟粉虱体内获得的沃尔巴克氏体也可以传递给烟粉虱^[28-30]。本研究发现,巨园桉 DH201-2、无羽化孔虫瘿组织、桉树枝瘿姬小蜂幼虫和成虫体内细菌共有 96 个相同的属,同时巨园桉 DH201-2 和桉树枝瘿姬小蜂成虫体内细菌有 133 个相同的属,彼此之间具有一定的相似性,推测桉树枝瘿姬小蜂体内细菌可能是通过取食巨园桉 DH201-2 获得的,但还需进一步试验证明。本研究结果显示,四川和南宁地区的桉树枝瘿姬小蜂雌成虫体内细菌有 168 个相同的属,四川桉树枝瘿姬小蜂和孟氏胯姬小蜂体内细菌共同享有 211 个属,且这 3 个样本在 UPGMA 聚类图上集聚在一个大分支上,由此可推测南宁地区的桉树枝瘿姬小蜂和孟氏胯姬小蜂体内菌群结构组成具有一定的相似性。昆虫体内的细菌还可能通过繁殖垂直传递给下一代。Knorr 等^[31]报道了红粉甲虫(*Tribolium castaneum*)体内的假单胞菌(*Pseudomonas*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)等可通过母体垂直传递给子代。Koch 等^[32]在分析欧洲蜜蜂(*Bombus terrestris*)体内细菌多样性时发现大多数细菌来自母本体内。Yukuhira 等^[33]发现,褐粉虱(*Nilaparvata lu-*

gens)体内的共生菌与母本卵巢内共生菌相似,说明昆虫体内的细菌还可通过卵巢进行传递。本研究发现,桉树枝瘿姬小蜂幼虫和成虫体内细菌有 11 个相同的门、96 个相同的属,主要菌群组成相对丰度较高并且极为相似,说明桉树枝瘿姬小蜂体内细菌可能是通过母体进行传递的,后续还需通过对其卵、卵巢及各发育阶段进行定量 PCR、荧光原位杂交等试验进一步证实。

本研究还发现立克次氏体(*Rickettsia*)在南宁地区的桉树枝瘿姬小蜂幼虫、成虫和四川地区的桉树枝瘿姬小蜂成虫、孟氏胯姬小蜂体内细菌中相对丰度较高,说明立克次氏体能稳定存在于昆虫体内,并可能是垂直传递的。而其在虫瘿组织体内细菌中仅占 3.48%。这可能是由于桉树枝瘿姬小蜂取食时将体内的立克次氏体传递给植物,也可能是幼虫在虫瘿内生长过程中将体内的立克次氏体传递给植物所造成的。不过目前还没有证据表明桉树枝瘿姬小蜂和孟氏胯姬小蜂体内立克次氏体能够进行水平传递,还需要进一步研究^[34]。已有研究表明,立克次氏体是一种广泛分布于节肢动物体内的母系遗传共生细菌,能够在亲代和子代之间垂直传递,并调控诸多宿主昆虫的生殖行为,诱导孤雌生殖^[35-37]和杀雄等现象^[38-39]。立克次氏体主要存在于桉树枝瘿姬小蜂雌性成虫体内,可能是造成桉树枝瘿姬小蜂孤雌生殖的原因^[14-15]。通过饲喂抗生素来消除雌性体内立克次氏体应该可以增加雄性后代的比例,Giorgini 等^[35]研究发现含有立克次氏体的寄生蜂(*Pnigalio soemius*)仅产生雌虫后代,用质量浓度 20 mg/mL 的利福平处理 24 h 消除立克次氏体后,几乎全部为雄性后代。Hagimori 等^[36]报道了立克次氏体与潜叶蝇类害虫的优势寄生性天敌昆虫美新姬小蜂(*Neochrysocharis formosa*)的孤雌生殖有关,四环素处理后出现了大量雄性后代。因此,未来应用抗生素处理去除其体内的立克次氏体,进一步明确立克次氏体是否参与操纵桉树枝瘿姬小蜂繁殖。除此之外,立克次氏体还可以影响宿主的适合度和抵御环境的能力^[40-44]。比如对感染立克次氏体和未感染立克次氏体的两个 B 型烟粉虱(*Bemisia tabaci* B-biotype)种群的生物学特性研究后发现,感染立克次氏体的烟粉虱在卵至成虫的阶段发育速度更快^[41]。Himler^[42]研究发现,感染立克次氏体还可以提高宿主 B 型烟粉虱的产卵量、存活率及后代雌虫的比例,缩短发育历期。

4 结 论

本研究首次详细比较了桉树-桉树枝瘿姬小蜂-孟氏胫姬小蜂内生细菌群落,发现三者体内细菌有密切联系,且具有一定的相似性。该结果有助于了解桉树-桉树枝瘿姬小蜂-天敌昆虫之间的相互作用,进而从共生菌新角度探讨桉树枝瘿姬小蜂入侵与爆发机制,为桉树枝瘿姬小蜂的“共生入侵”假说提供佐证。

[参考文献]

- [1] Mendel Z, Protasov A, Fisher N, et al. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on eucalyptus [J]. Australian Journal of Entomology, 2004, 43(2): 101-113.
- [2] Ngoc H L, Nahrung H F, Griffiths M, et al. Invasive *Leptocybe* spp. and their natural enemies: global movement of an insect fauna on eucalypts [J]. Biological Control, 2018, 125: 7-14.
- [3] Huang Z Y, Li J, Lu W, et al. Parasitoids of the *Eucalyptus* gall wasp *Leptocybe* spp: a global review [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(30): 29983-29995.
- [4] Huang M, Ge X, Shi H, et al. Prediction of current and future potential distributions of the eucalyptus pest *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) in China using the CLIMEX model [J]. Pest Management Science, 2019, 75 (11): 2958-2968.
- [5] Zheng X L, Yang Z D, Li J, et al. Rapid identification of both sexes of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae): a morphological perspective [J]. African Entomology, 2014, 22(3): 643-650.
- [6] 黄梦伊, 赵佳强, 石 娟. 基于 MaxEnt 对桉树枝瘿姬小蜂在中国发生趋势的预测 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(11): 64-71.
- Huang M Y, Zhao J Q, Shi J. Predicting occurrence tendency of *Leptocybe invasa* in China based on MaxEnt [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2020, 42(11): 64-71.
- [7] 唐 超, 王小君, 万方浩, 等. 桉树枝瘿姬小蜂入侵海南省 [J]. 昆虫知识, 2008, 45(6): 967-971, 1009.
- Tang C, Wang X J, Wan F H, et al. The blue gum chalcid, *Leptocybe invasa*, invaded Hainan Province [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2008, 45(6): 967-971, 1009.
- [8] 张华峰, 陈顺立, 康文通, 等. 桉树枝瘿姬小蜂危害及不同诱导方式对桉树挥发物释放的影响 [J]. 福建林学院学报, 2013 (2): 170-175.
- Zhang H F, Chen S L, Kang W T, et al. Effects of different inductions on volatiles of *Eucalyptus grandis* damaged by *Leptocybe invasa* Fisher et La Salle [J]. Journal of Fujian College of Forestry, 2013(2): 170-175.
- [9] 陈元生, 罗致迪, 于海萍. 气象因子对赣南桉树枝瘿姬小蜂成虫发生量的影响 [J]. 中国植保导刊, 2016, 36(8): 41-45.
- Chen Y S, Luo Z D, Yu H P. Effects of meteorological factors on adult population numbers of *Leptocybe invasa* in Southern Jiangxi province [J]. China Plant Protection, 2016, 36(8): 41-45.
- [10] 朱玉梅, 贺 永, 宋德盟. 东川区桉树枝瘿姬小蜂综合防治初探 [J]. 林业调查规划, 2016, 41(2): 78-81.
- Zhu Y M, He Y, Song D M. Comprehensive prevention and control of *Leptocybe invasa* in Dongchuan district [J]. Forest Inventory and Planning, 2016, 41(2): 78-81.
- [11] 张开存, 李晓艳, 朱 琼, 等. 云南东川桉树枝瘿姬小蜂危害调查 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(8): 163-166.
- Zhang K C, Li X Y, Zhu Q, et al. Damage investigation of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle in Dongchuan district in Yunnan Province [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 163-166.
- [12] 王蕊蕊, 胡 颖, 杨振德, 等. 桉树枝瘿姬小蜂雌成虫体内可培养细菌分离鉴定及多样性分析 [J]. 南方农业学报, 2018, 49 (12): 2432-2439.
- Wang R R, Hu Y, Yang Z D, et al. Isolation, identification and diversity of culturable bacteria in female adults of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle [J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(12): 2432-2439.
- [13] 王蕊蕊, 胡 颖, 杨振德, 等. 夏季桉树枝瘿姬小蜂雌成虫体内可培养细菌的分离与鉴定 [J]. 广西林业科学, 2019, 48(3): 301-306.
- Wang R R, Hu Y, Yang Z D, et al. Isolation and identification of culturable bacteria from female adults of *Leptocybe invasa* in summer [J]. Guangxi Forestry Science, 2019, 48(3): 301-306.
- [14] Guo C, Peng X, Zheng X, et al. Comparison of bacterial diversity and abundance between sexes of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) from China [J]. PeerJ, 2020, 8: e8411.
- [15] Nugnes F, Gebiola M, Monti M M, et al. Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its *Rickettsia* endosymbiont, and associated sex-ratio differences [J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0124660.
- [16] 寇冀蒙, 刘芳华, 刘一澎, 等. 伴生细菌在入侵桉树枝瘿姬小蜂克服桉树抗性中的作用 [J]. 生物安全学报, 2020, 29(1): 31-38.
- Kou J M, Liu F H, Liu Y P, et al. The associated bacteria of *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) facilitate their host to overcome *Eucalyptus* chemical defense [J]. Journal of Biosafety, 2020, 29(1): 31-38.
- [17] Dillon R J, Dillon V M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions [J]. Annual Review of Entomology, 2004, 49: 71-92.
- [18] Crotti E, Balloi A, Hamdi C, et al. Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems [J]. Microbial Biotechnology, 2012, 5(3): 307-317.
- [19] Frago E, Dicke M, Godfray H C. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions [J]. Trends in Ecology &

- Evolution, 2012, 27(12): 705-711.
- [20] 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.
- Yang Y T, Guo J Y, Long C Y, et al. Advances in endosymbionts and their functions in insects [J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(1): 111-122.
- [21] 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.
- Li Q, Fan J, Sun J R, et al. Research progress in the interactions among the plants, insects and endosymbionts [J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(6): 881-891.
- [22] 王四宝, 曲 爽. 昆虫共生菌及其在病虫害防控中的应用前景 [J]. 中国科学院院刊, 2017, 32(8): 863-872.
- Wang S B, Qu S. Insect symbionts and their potential application in pest and vector-borne disease control [J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2017, 32(8): 863-872.
- [23] 杜慧民, 李文彬, 刘润进. 昆虫共生细菌研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42(3): 615-629.
- Du H M, Li W B, Liu R J. Recent advances in the study of insect symbiotic bacteria [J]. Journal of Environmental Entomology, 2020, 42(3): 615-629.
- [24] 翟小战. 中华按蚊肠道细菌群落研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- Zhai X Z. The intestinal bacterial flora community structure of *Anopheles sinensis* mosquitoes (Diptera: Culicidae) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [25] Broderick N A, Raffa K F, Goodman R M, et al. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 293-300.
- [26] Martinson V G, Moy J, Moran N A. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(8): 2830-2840.
- [27] Priya N G, Ojha A, Kajla M K, et al. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera* [J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e30768.
- [28] Duron O, Wilkes T E, Hurst G D. Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale [J]. Ecology Letters, 2010, 13(9): 1139-1148.
- [29] Gehrler L, Vorburger C. Parasitoids as vectors of facultative bacterial endosymbionts in aphids [J]. Biology Letters, 2012, 8(4): 613-615.
- [30] Ahmed M Z, Li S J, Xue X, et al. The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission [J]. PLoS Pathogens, 2015, 10(2): e1004672.
- [31] Knorr E, Schmidtberg H, Arslan D, et al. Translocation of bacteria from the gut to the eggs triggers maternal transgenerational immune priming in *Tribolium castaneum* [J]. Biology Letters, 2015, 11(12): 20150885.
- [32] Koch H, Abrol D P, Li J, et al. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees [J]. Molecular Ecology, 2013, 22(7): 2028-2044.
- [33] Yukuhiro F, Miyoshi T, Noda H. Actin-mediated transovarial transmission of a yeastlike symbiont in the brown planthopper [J]. Journal of Insect Physiology, 2014, 60(1): 111-117.
- [34] Gualteri L, Nugnes F, Nappo A G, et al. Life inside a gall: closeness does not favour horizontal transmission of *Rickettsia* between a gall wasp and its parasitoid [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2017, 93(7): 1-11.
- [35] Giorgini M, Bernardo U, Monti M M, et al. *Rickettsia* symbionts cause parthenogenetic reproduction in the parasitoid wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2589-2599.
- [36] Hagimori T, Abe Y, Date S C, et al. The first finding of a *Rickettsia* bacterium associated with parthenogenesis induction among insects [J]. Current Microbiology, 2006, 52(2): 97-101.
- [37] Adachi-Hagimori T, Miura K, Stouthamer R. A new cytogenetic mechanism for bacterial endosymbiont-induced parthenogenesis [J]. Proceedings of the Royal Society Biological Sciences, 2008, 275(1652): 2667-2673.
- [38] Lawson E T, Mousseau T A, Klaper R, et al. *Rickettsia* associated with male-killing in a buprestid beetle [J]. Heredity, 2001, 86(4): 497-505.
- [39] Majerus T M, Majerus M E. Discovery and identification of a male-killing agent in the Japanese ladybird *Propylea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) [J]. BMC Evolutionary Biology, 2010, 10: 37.
- [40] Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, et al. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 4069-4075.
- [41] Chiel E, Inbar M, Mozes-Daube N, et al. Assessments of fitness effects by the facultative symbiont, *Rickettsia*, in the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. Annals of the Entomological Society of America, 2009, 102(3): 413-418.
- [42] 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.
- [43] Oliver K M, Russell J A, Moran N A, et al. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1803-1807.
- [44] Brumin M, Kotsedalov S, Ghanim M. *Rickettsia* influences thermos tolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype [J]. Insect Science, 2011, 18(1): 57-66.