烟粉虱内共生菌 *Rickettsia* 在植物体内的形态及动态变化*

师沛琼[1, 2**] 谢丽珠[1] 徐 进[1] 刘 媛[2, 3] 邱宝利[2, 3***]

（1. 广东海洋大学滨海农业学院，湛江 524088；2. 广东省生物农药创制与应用重点实验室，广州 510640；
3. 广东省农业害虫生物防治工程技术研究中心，广州 510640）

摘 要 **【目的】** 通过研究烟粉虱 *Bemisia tabaci* 取食传入植物体内的昆虫内共生菌种类，探明其在不同植物中的分布形态及时空动态。**【方法】** 以 B 型烟粉虱、棉花、番茄、豇豆为实验材料，利用常规 PCR 检测烟粉虱取食后传入植物体内的共生菌种类；利用透射电镜（Transmission electron microscope，TEM）检测 *Rickettsia* 传入植物后的分布及形态；利用 q-PCR 技术检测豇豆叶片中 *Rickettsia* 含量的动态变化。**【结果】** B 型烟粉虱体内含有原生共生菌 *Portiera*、次生共生菌 *Rickettsia*，*Hamiltonella* 和 *Hemipteriphilus*，但只检测到 *Rickettsia* 可经烟粉虱传入棉花、番茄、豇豆植物体内，并可在植物体内存活、转移。在 3 种植物体内 *Rickettsia* 均分布于叶片韧皮部的筛管细胞中。烟粉虱、棉花、番茄组织内的 *Rickettsia* 形态基本一致，但豇豆中 *Rickettsia* 在形态上较小而钝圆。相同数量的烟粉虱取食，在豇豆体内最先检测到 *Rickettsia*。随着烟粉虱取食时间的增加，豇豆体内的 *Rickettsia* 含量先增加后下降；而当无烟粉虱持续取食时，一定时间段内豇豆体内的 *Rickettsia* 先下降再小幅度上升，并可以在一定时间内保持不变。基于 16S rDNA 序列的系统发育分析表明，传入棉花、番茄、豇豆叶片中的 *Rickettsia* 与 B 型烟粉虱体内的 *Rickettsia* 高度同源。**【结论】** *Rickettsia* 可经烟粉虱取食传入植物体内，分布并存活于韧皮部的筛管细胞中，并可在植物不同叶片之间转移；在不同植物宿主中，*Rickettsia* 的形态会发生轻微变化；烟粉虱对 *Rickettsia* 的传播效率受到植物种类的影响。

关键词 烟粉虱；内共生菌；*Rickettsia*；水平传播；宿主昆虫；宿主植物

The morphology and spatiotemporal dynamics of the *Rickettsia* endosymbiont transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* to host plants

SHI Pei-Qiong[1, 2**] XIE Li-Zhu[1] XU Jin[1] LIU Yuan[2, 3] QIU Bao-Li[2, 3***]

(1. College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
2. Key Laboratory of Bio-pesticide Innovation and Application, Guangzhou 510640, China;
3. Engineering Technology Research Center of Agricultural Pest Biocontrol of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China)

Abstract **[Objectives]** To detect endosymbiont species transmitted to plants by the feeding behavior of the whitefly *Bemisia tabaci*, and the morphology and spatiotemporal dynamics of *Rickettsia* in different host plants. **[Methods]** The transmission of endosymbionts by the *B. tabaci* B biotype into cotton, tomato and cowpea plants was investigated. Endosymbionts were detected by PCR and the location and morphology of *Rickettsia* in plants observed with TEM. Dynamic changes in *Rickettsia* titers in cowpea leaves was detected with q-PCR. **[Results]** The *B. tabaci* B biotype is infected with the obligate endosymbiont *Portiera* and the facultative endosymbionts *Rickettsia*, *Hamiltonella* and *Hemipteriphilus*. Only

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金项目（31672028）；大学生创新创业训练计划项目（S201910566062）；博士启动费及研究生培养经费（R19025，R19029）

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

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：baileyqiu@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2020-02-21；接受日期 Accepted：2020-05-15

Rickettsia was transmitted to cotton, tomato and cowpea plants by *B. tabaci* feeding activity. *Rickettsia* can move between different plant leaves and TEM revealed that it is located in the sieve tube cells of plant phloem. The morphology of *Rickettsia* in *B. tabaci*, cotton and tomato leaves was similar, but it was relatively smaller and slight rounder in cowpea leaves. The titers of *Rickettsia* in cowpea plants first increased, then decreased, with increased duration of continuous feeding by *B. tabaci*. However, in cowpea plants that had been fed on by whiteflies for only 7 days it first decreased, then increased slightly, then remained basically unchanged. Phylogenetic analysis based on variation in the 16S rDNA sequence indicates that *Rickettsia* found in cotton, tomato and cowpea leaves is identical to *Rickettsia* in *B. tabaci*. **[Conclusion]** *Rickettsia* can be transmitted to host plants by the feeding activity of *B. tabaci* after which it becomes localized in the sieve tube cells of phloem and can move between different leaves. The morphology of *Rickettsia* may vary slightly in different hosts, and the efficiency of transmission of *Rickettsia* varies with host plant species.

Key words *Bemisia tabaci*; endosymbiont; *Rickettsia*; horizontal transmission; insect host; plant host

昆虫内共生菌常被分为原生共生菌（Primary symbiont）和次生共生菌（Secondary symbiont）（Baumann，2005）。原生共生菌通常可为宿主昆虫提供生长发育所必需的营养物质（Sloan and Moran，2012），这在以植物汁液为食的刺吸式口器昆虫中尤为普遍，比如蚜虫中的 *Buchnera aphidicola*、粉蚧中的 *Tremblaya princeps*、木虱中的 *Garsonella ruddii*、粉虱中的 *Portiera aleyrodidarum* 等（Baumann，2005）。昆虫的次生共生菌，如 *Wolbachia*、*Rickettsia* 等，虽不是宿主昆虫生长繁殖所必需的，但一系列前期研究表明它们不但能影响宿主昆虫的适应性，如增强宿主对天敌昆虫及病原菌、温度等的抵抗能力（Montllor *et al.*, 2002；Oliver *et al.*, 2003, 2005；Scarborough *et al.*，2005），扩大宿主昆虫的寄主植物范围（Tsuchida *et al.*，2004），而且能调控宿主昆虫的生殖（雌性化、杀雄、胞质不亲和）（Engelstadter and Telschow，2009）。烟粉虱 *Bemisia tabaci*（Gennadius）属半翅目 Hemiptera 粉虱科 Aleyrodidae 小粉虱属 *Bemisia*，取食植物韧皮部，能传播多种植物病毒，是一种世界性分布的重大蔬菜花卉害虫（Bai *et al.*, 2019；Tang *et al.*, 2020），其体内内共生菌种类丰富，包括原生共生菌 *Portiera* 以及 *Hamiltonella*、*Wolbachia*、*Rickettsia*、*Cardinium*、*Arsenophonus*、*Spiroplasma*、*Hemipteriphilus* 等多种次生共生菌（Gottlieb *et al.*, 2008；Bing *et al.*, 2013；Tang *et al.*, 2018）。

原生共生菌与宿主昆虫有着严格的协同进化关系（Moran *et al.*, 2008；Kaiser *et al.*, 2010），通常呈母系垂直传播，即由雌性带菌昆虫传给后代；而次生共生菌与宿主昆虫没有明显的协同进化关系（Ratzka *et al.*，2011），在垂直传播之外还能进行水平传播（Caspi-Fluger *et al.*，2012）。目前已知的水平传播途径主要有寄生蜂介导的水平传播、两性交配介导的水平传播及植物介导的水平传播（Moran and Dunbar，2006；Chiel *et al.*，2009；Caspi-Fluger *et al.*，2012；Ahmed *et al.*，2015）。在植物介导的水平传播方面，已有研究表明，*Wolbachia*、*Rickettsia* 等能够通过寄主植物在烟粉虱等不同昆虫个体之间传播（Sintupachee *et al.*，2006；Caspi-Fluger *et al.*，2012；Li *et al.*，2017a，2017b）。植物可作为昆虫内共生菌的桥梁宿主，然而，昆虫内共生菌进入植物体内之后，其在植物中的形态分布及含量动态变化规律等尚不清楚，传入植物体内的昆虫内共生菌与宿主植物的互作影响我们也不得而知。

本研究利用 PCR 技术首先检测烟粉虱 B 生物型体内共生菌的主要种类，然后通过透射电镜（TEM）对比 *Rickettsia* 在棉花、番茄与豇豆 3 种不同寄主植物体内的分布形态，并利用 q-PCR 检测 *Rickettsia* 在豇豆叶片内含量的时空动态变化。研究结果可为今后深入研究昆虫内共生菌的水平传播途径提供参考，也可为研究植物与昆虫内共生菌的互作关系奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

供试植物：干净无病虫的棉花、番茄与豇豆

植株，品种分别为鲁棉研 32 号（山东棉花研究中心）、新金丰 1 号（广州长合种子有限公司）和丰产 2 号油青豆角（广东省农业科学院蔬菜研究所）。自然条件下，将供试植物种植于预先加入灭菌后的营养土的干净花盆（直径 15 cm）中，生长期间将花盆置于干净的不锈钢养虫笼（60 cm×60 cm×60 cm）内，棉花和番茄苗长至 6-8 叶期时用于实验，豇豆苗长至 4-6 叶期时用于实验。

供试昆虫：以 B 型烟粉虱为供试昆虫，原始种群于 2015 年采自广州。前期研究表明该 B 型烟粉虱种群感染的内共生菌有原生共生菌 *Portiera*，次生共生菌 *Rickettsia*、*Hamiltonella* 以及 *Hemipteriphilus*（Shi *et al.*，2018）。供试昆虫以干净无病虫的棉花植株为寄主植物进行继代饲养，并将其置于不锈钢纱网养虫笼内以避免其它昆虫混入。饲养场所为人工气候室，温度为（28±1）℃，湿度为 70%-80%，每日光照时长为 14 h。

1.2 实验方法

1.2.1 烟粉虱内共生菌阳性植物样品的接种 参考 Caspi-Fluger 等（2012）的方法并做轻微改变，具体为取干净无病虫的植物，将其中 1-2 片完全展开的叶片用尼龙网袋（10 cm×15 cm，70 目）罩住，之后将盆栽植物置于养虫笼内供 B 型烟粉虱取食 15 d，使烟粉虱通过刺吸取食将其体内的共生菌传至植物叶片，该叶片为后续研究中用于检测的叶片。

1.2.2 植物中烟粉虱内共生菌的 PCR 检测 为了检测经烟粉虱取食传至植物体内的共生菌种类，待植物被烟粉虱取食 15 d 后，以被罩叶片为材料，沿主脉取约 0.1 g 植物组织，用植物组织基因组 DNA 提取试剂盒（天根，北京）提取棉花、番茄和豇豆植物的基因组 DNA，利用 PCR 技术检测 3 种植物叶片中共生菌的具体种类，相关共生菌的特异性引物见表 1。PCR 反应体系为 25 μL：10×PCR buffer（Mg2+plus）5 μL、dNTPs（2.5 mmol·L^{-1}）4 μL、*Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL、上下游引物（20 μmol·L^{-1}）各 1 μL、模板 DNA 1 μL、ddH_2O 37.5 μL。反应程序为：94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s，退火 45 s，72 ℃ 90 s（30 次循环），最后 72 ℃ 5 min。PCR 扩增完成后，取 5 μL 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测，以 *Rickettsia* 阳性烟粉虱为阳性对照，ddH_2O 为阴性对照。

为了进一步确定传入植物叶片中的烟粉虱内共生菌是否存活，采用植物组织 RNA 提取试剂盒（天根，北京）提取上述植物被罩叶片的总 RNA，采用逆转录试剂盒 PrimerScript^{TM} Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara，北京），按照试剂盒说明书以植物总 RNA 为模板合成 cDNA。以 cDNA 为模板扩增 *Rickettsia* 的引物信息见表 1，扩增程序为 94 ℃ 2 min；94 ℃ 30 s，58℃ 45 s，72 ℃ 90 s（30 次循环），最后 72 ℃ 5 min。

表 1 用于普通 PCR 检测的烟粉虱内共生菌引物

Table 1 The PCR primers and protocols for endosymbionts detection

内共生菌 Endosymbiont	基因 Gene	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	片段大小（bp） Size range (bp)	退火温度（℃） Annealing temperature
Portiera [a]	16S rDNA	F: TGCAAGTCGAGCGGCATCAT R: AAAGTTCCCGCCTTATGCGT	1 000	60
Rickettsia [b]	16S rDNA	F: GCTCAGAACGAACGCTATC R: GAAGGAAAGCATCTCTGC	900	58
Hamiltonella [c]	16S rDNA	F: TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG R: AGTTCAAGACCGCAACCTC	700	52
Hemipteriphilus[d]	16S rDNA	F: GCTCAGAACGAACGCTRKC R: TTCGCCACTGGTGTTCCTC	700	60

[a] 序列参考自 Zchori-Fein and Brown（2002）；[b] 序列参考自 Gottlieb 等（2006）；[c] 序列参考自 Chiel 等（2007）；[d] 序列参考自 Bing 等（2013）。

[a] sequences obtained from Zchori-Fein and Brown (2002); [b] sequences obtained from Gottlieb *et al.* (2006); [c] sequences obtained from Chiel *et al.* (2007); [d] sequences obtained from Bing *et al.* (2013).

1.2.3　*Rickettsia* 的 TEM 检测　取上述烟粉虱取食的棉花、番茄与豇豆叶片主脉用于 TEM 制片，已感染有 *Rickettsia* 的烟粉虱为阳性对照，干净植物为阴性对照。TEM 制样具体步骤为：将烟粉虱雌成虫以及约 0.3 cm 长的叶片主脉，放入 4%戊二醛溶液中室温固定 3 h 后置于 4 ℃保存过夜；磷酸缓冲液漂洗 4 次，每次 10 min；依次用 30%、50%、70%、80%和 90%的乙醇脱水，每次 10 min，之后用 100%乙醇脱水 2 次，每次 15 min；用 100%丙酮脱水 2 次，每次 15 min；依次用不同体积比例的丙酮：树脂（3∶1，1∶1，1∶3）溶液漂洗，每次 15 min，之后纯树脂漂洗 30 min；纯树脂包埋；切片机切片；上机观察。

1.2.4　*Rickettsia* 在不同植物中的传播效率　选用干净无虫的棉花、番茄、豇豆植株，每株选取一片完全展开的中部叶片，用夹叶接虫盒（直径 6 cm，高 4 cm）接入初羽化的 B 型烟粉虱雄虫 60 头，分别于接虫后的第 3 天、第 5 天和第 7 天移除接入的烟粉虱，选取接虫盒内的植物组织，沿着叶片主脉并以此为中心线切取 0.1 g 植物组织（约长 4 cm×宽 1 cm），PCR 检测接虫区域是否感染有 *Rickettsia*。DNA 的提取及 *Rickettsia* 检测方法同 1.2.2 所述。分别记录第 3 天、第 5 天和第 7 天每种植物中 *Rickettsia* 的检出率。实验设置 3 个生物学重复，每个重复中每种植物处理 10 株。

1.2.5　植物叶片中 *Rickettsia* 含量的动态变化　选取豇豆为寄主植物，使用 q-PCR 检测 *Rickettsia* 传入植物后，随时间推移其在植物体内的含量变化。实验设置 2 个处理组进行含量检测：（1）不去虫处理组：挑取干净的豇豆叶片，用夹叶接虫盒（直径 6 cm，高 4 cm）将叶片固定，并接入 30 对初羽化的 *Rickettsia* 阳性烟粉虱；接虫后第 7、14、21、28、35 天于接虫叶片的未接虫区域（接虫盒以外的部分叶片），从接虫盒边缘起，沿着叶片主脉并以此为中心线切取 0.1 g 植物组织（约长 4 cm×宽 1 cm）提取基因组 DNA，每个时间段 3 个生物学重复。（2）去虫处理组：豇豆叶片处理同不去虫处理组，接虫盒中接入 60 头初羽化的 *Rickettsia* 阳性烟粉虱雄虫；7 d 后移除烟粉虱，并于接虫后第 7、10、12、14、16、18 天，选取接虫盒内的植物组织，沿着叶片主脉并以此为中心线切取 0.1 g 植物组织（约长 4 cm×宽 1 cm）提取基因组 DNA，每个时间段 3 个生物学重复。

豇豆叶片基因组 DNA 的提取方法同 1.2.2 中采用的植物基因组 DNA 提取方法。以 *Rickettsia* 的柠檬酸合酶基因（*Citrate synthase*，*gltA*）为目的基因进行特异性扩增（F: 5′-CGGATTGCTTTACTTAC-3′，R: 5′-AAATACG-CCACCTCTA-3′）（Pan *et al.*，2013），内参基因为豇豆的 *VuPp2A* 基因（F: 5′-CATTGTTGAGC-TTGCTGAGG-3′；R: 5′-GAGCACC AAGCTTG-TCATCA-3′）（Da Silva *et al.*，2015）。定量 PCR 的反应体系共 10 μL，含有 5 μL Thunderbird SYBR Green PCR mix，上下游引物各 0.5 μL（10 μmol·L^{-1}），DNA 模板 2 μL，ddH_2O 2 μL。

1.2.6　烟粉虱及植物体内共生菌的系统发育分析　为了进一步验证传入植物的 *Rickettsia* 与烟粉虱体内的 *Rickettsia* 的同源性，将 1.2.2 中的扩增产物用 OMEGA 公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收。回收产物交由美吉生物技术有限公司（上海），通过 ABI PRISMTM 3730XL 自动测序分析仪进行双向测定。将所得序列与实验中 *Rickettsia* 阳性烟粉虱体内 *Rickettsia* 的 16S rDNA 扩增序列进行比对。同时，从 GenBank 中下载属于不同群组的 *Rickettsia* 16S rDNA 序列为参考（表 2），连同本研究中的 *Rickettsia* 序列，

表 2　*Rickettsia* 系统发育分析参考序列
Table 2　Reference sequences used in *Rickettsia* phylogenetic analysis

组 Group	宿主 Host	GenBank 登录号 GenBank accession
Adalia	二星瓢虫 *Adalia bipunctata*	FJ609401
Adalia	十星瓢虫 *Adalia decempunctata*	FJ609404
Orientia	纤恙螨 *Leptotrombidium* sp.	U17256
Typhus	人蚤 *Pulex irritans*	NR 036948
Typhus	未知 Unknown	L36221
Meloidae	芫菁 Meloidae species	FJ609389
Bellii	烟粉虱 *Bemisia tabaci*	MH908685
Torix	膨蛭 *Torix tagoi*	AB066351

利用 MEGA 5.0 软件，采用 Kimura 2-parameter 距离模型邻接法（Neighbor-Joining，NJ）构建系统发育树，各分支置信度（Bootstrap）均设置为 1 000 次。

1.3 数据处理

用实时荧光定量 PCR 仪自带软件 Bio Rad CFX Manager 进行 qPCR 数据归一化处理；用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算共生菌的相对表达量；利用 SPSS 18.0 计算各组实验数据的平均值和标准误，并进行方差分析（Foster *et al.*, 2005）；使用 Sigmaplot 10.0 进行作图，误差线为标准误。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱取食将 *Rickettsia* 传入植物叶片

本研究中 B 型烟粉虱种群感染有原生共生菌 *Portiera* 及次生共生菌 *Rickettsia*，*Hamiltonella* 以及 *Hemipteriphilus*，以这 4 种共生菌的特异性引物进行扩增，在烟粉虱取食后的番茄、棉花、豇豆叶片中均仅扩增出 *Rickettsia* 的特异性片段（图 1：A）。由于 *Rickettsia* 是在非烟粉虱直接取食的叶片中检测到，所以这也说明，经烟粉虱取食传入植物的 *Rickettsia* 能够在植物体内转移。以 cDNA 模板进行 *Rickettsia* 的特异性扩增，在棉花、豇豆、番茄中均扩增出 *Rickettsia* 目的条带（图 1：B），说明经烟粉虱取食传入植物叶片中的 *Rickettsia* 在植物体内可以存活。

2.2 *Rickettsia* 在不同宿主体内的形态

Rickettsia 呈杆状，大小约 0.5 μm×2 μm，形状多不规则。本实验通过透射电镜在 *Rickettsia* 阳性的烟粉虱腹部（图 2：A）、阳性番茄叶片（图 2：B）、棉花叶片（图 2：C）、豇豆叶片（图 2：D）的韧皮部细胞中均观察到该杆状细菌（图 2），而阴性对照中未观察到该细菌。从图 2 中可以看出，在棉花和番茄中，*Rickettsia* 的形状与烟粉虱体内的基本一致，但在豇豆叶片中，*Rickettsia* 在形态上更显钝圆，长度也较短。

2.3 *Rickettsia* 在不同植物中的传播效率

释放烟粉虱取食棉花、番茄、豇豆叶片，检测接虫后不同时间段 *Rickettsia* 在以上 3 种植物叶片上的感染情况，结果如表 3 所示。相同数量（60 头）的烟粉虱取食 3 种植物后，在豇豆上取食 3 d 即可在叶片中检测到 *Rickettsia*，在棉花

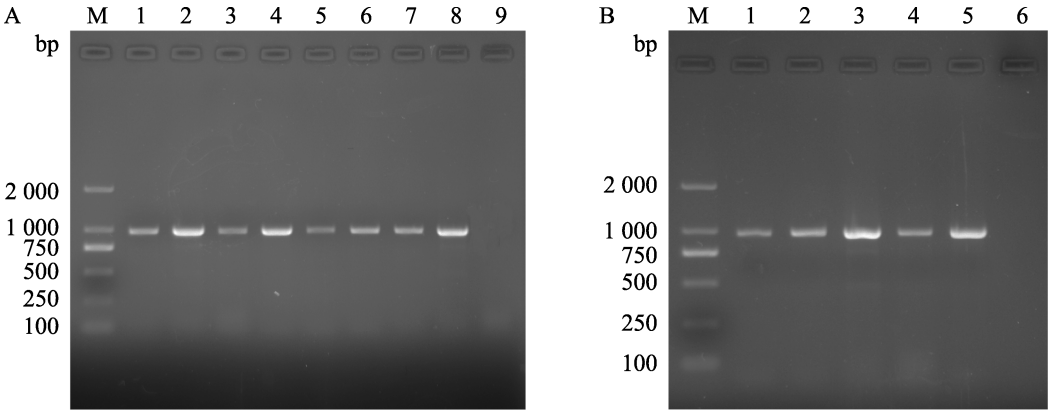

图 1 PCR 检测植物叶片中的 *Rickettsia*

Fig. 1 *Rickettsia* in plants detected by PCR

A. 以植物 DNA 为模板进行扩增；泳道 1，2：番茄中的 *Rickettsia*；泳道 3，4：豇豆中的 *Rickettsia*；泳道 5-7：棉花中的 *Rickettsia*；泳道 8：烟粉虱体内的 *Rickettsia*；泳道 9：ddH_2O；B. 以 cDNA 模板进行扩增；泳道 1：棉花中的 *Rickettsia*；泳道 2：番茄中的 *Rickettsia*；泳道 3，4：豇豆中的 *Rickettsia*；泳道 5：烟粉虱体内的 *Rickettsia*；泳道 6：ddH_2O；M：DNA marker。

A. PCR products using plant DNA as the templates; 1, 2: *Rickettsia* in tomato; 3, 4: *Rickettsia* in cowpea; 5-7: *Rickettsia* in cotton; 8: *Rickettsia* in whitefly; 9: ddH_2O; B. PCR products using cDNA as the templates; 1: *Rickettsia* in cotton; 2: *Rickettsia* in tomato; 3, 4: *Rickettsia* in cowpea; 5: *Rickettsia* in whitefly; 6: ddH_2O; M: DNA marker.

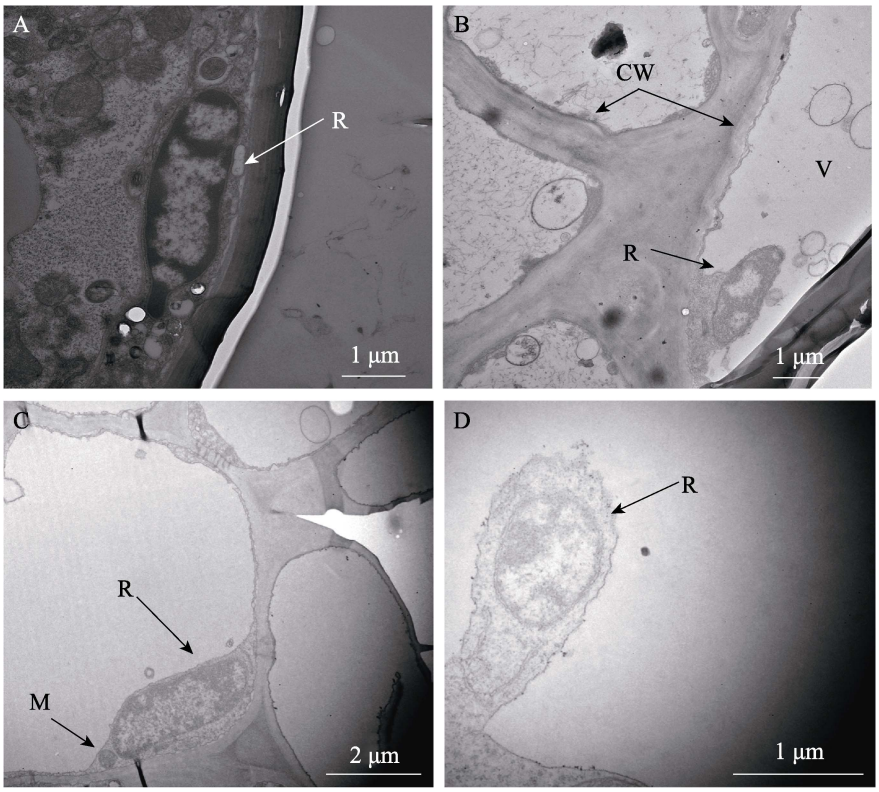

图 2　烟粉虱腹部及植物叶片韧皮部筛管细胞中的 *Rickettsia*

Fig. 2　*Rickettsia* in whitefly abdomen and phloem sieve tube cells of plants

A. 烟粉虱腹部；B. 番茄叶片；C. 棉花叶片；D. 豇豆叶片。R：*Rickettsia*；M：线粒体；CW：细胞壁；V：液泡。
A. Whitefly abdomen; B. Tomato leaf; C. Cotton leaf; D. Cowpea leaf. R: *Rickettsia*; M: Mitochondria; CW: Cell wall; V: Vacuole.

表 3　*Rickettsia* 在豇豆、番茄和棉花 3 种植物中不同时间段的感染率

Table 3　Infection rates of *Rickettsia* in cowpea, tomato and cotton plants at different periods

植物 Plants	植物叶片中 *Rickettsia* 的检出率（%） *Rickettsia* detection rates in plant leaves		
	3 d	5 d	7 d
棉花 Cotton	0 b	46.67±3.333 c	90.00±5.774 a
番茄 Tomato	0 b	66.67±3.333 b	100 a
豇豆 Cowpea	46.67±3.333 a	93.33±3.333 a	100 a

同列数据后标有不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Different lowercase letters in the same column of data indicate significant difference at the 0.05 level.

和番茄叶片中第 5 天才能检测到 *Rickettsia* 的存在，而且棉花叶片中的检出率要低于番茄叶片；在第 7 天所有的豇豆和番茄接虫叶片均能检测到 *Rickettsia*。结果表明在以上 3 种植物中，烟粉虱更易将 *Rickettsia* 传入豇豆叶片，番茄叶片次之，棉花叶片最慢。

2.4　*Rickettsia* 在植物体内的动态变化

两组处理中，豇豆叶片中 *Rickettsia* 的含量变化如图 3 所示。由图 3 可知，在不去虫处理组中，接入 30 对烟粉虱取食后，接虫后的 7-28 d 中，传入豇豆叶片的 *Rickettsia* 呈先增加后减少的趋势，在 14 d 达到最大。在去虫处理组中，接虫 7 d 后将烟粉虱移除，传入豇豆叶片中的 *Rickettsia* 随时间的推移其含量先下降，之后有一个小幅度回升保持平稳的趋势。总体来讲，相同时间段内去虫组处理中叶片的 *Rickettsia* 的含量要低于不去虫处理组。

2.5 烟粉虱与植物体内 *Rickettsia* 的系统关系分析

通过 PCR 扩增，获得了本研究中 B 型烟粉虱所感染的 *Rickettsia*，以及经 B 型烟粉虱取食传入棉花、番茄、豇豆体内的 *Rickettsia* 16S rDNA 序列，与从 GenBank 中下载的 8 条 *Rickettsia* 16S rDNA 序列一起构建了系统关系树（图 4）。结果表明，B 型烟粉虱感染的 *Rickettsia* 属于 Bellii 群组，经烟粉虱取食传入棉花、番茄、豇豆体内的 *Rickettsia* 与 B 型烟粉虱体内的 *Rickettsia* 同源性为 100%，说明棉花、番茄、豇豆体内的 *Rickettsia* 是由 B 型烟粉虱取食传入的，并且 *Rickettsia* 具有高度的保守性。

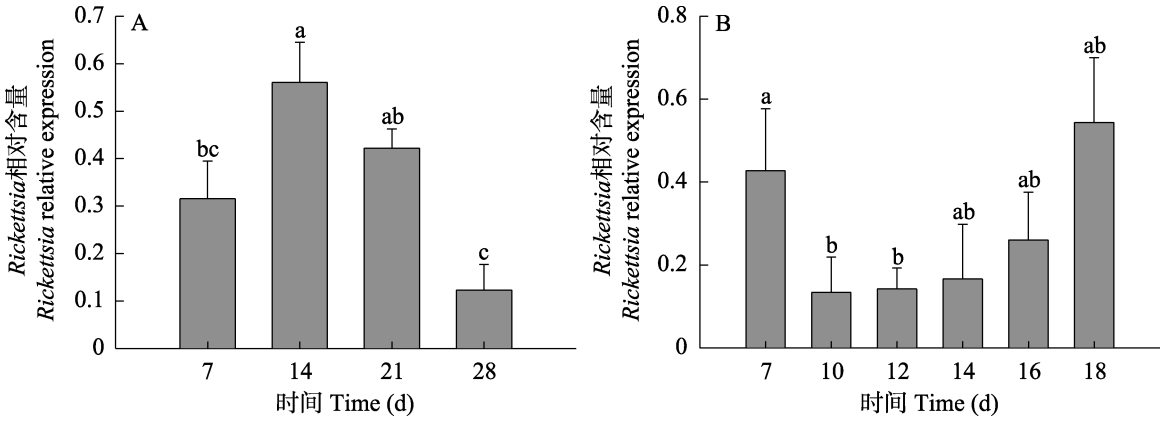

图 3 不同处理豇豆叶片中 *Rickettsia* 含量变化趋势

Fig. 3 The change trends of *Rickettsia* titers in cowpea leaves with different treatments

A. 不去虫处理组；B. 去虫处理组。柱子标有不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

A. Leaves with whitefly continuously feeding; B. Leaves that whitefly removed after 7 days feeding. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at the level 0.05.

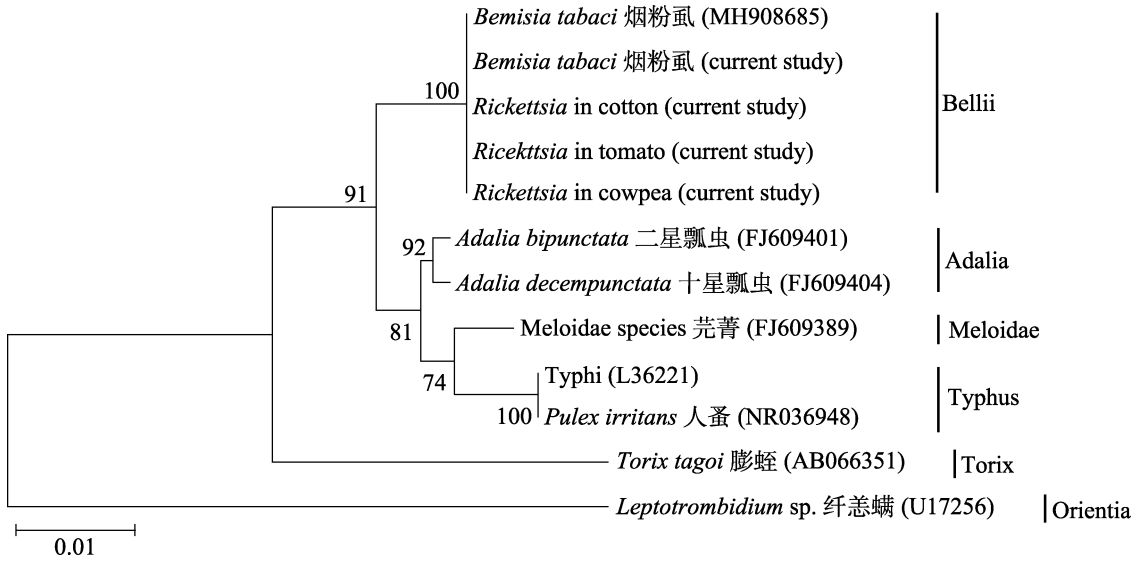

图 4 研究中不同来源的 *Rickettsia* 的同源关系比较

Fig. 4 The phylogenetic analysis of *Rickettsia* from different hosts

3 讨论

Sintupachee 等（2006）通过对南瓜上的烟粉虱、飞虱 *Nisia nervosa*，跳甲 *Phyllotreta* sp.以及盲蝽 *Halticus minutus* 体内 *Wolbachia* 系统发育关系的研究，率先提出植食性昆虫体内感染的内共

生菌系统遗传关系非常接近，植物有可能作为介体促进昆虫内共生菌在不同宿主之间的水平传播这一假设。Caspi-Fluger 等（2012）和 Li 等（2017b）随后也证明了烟粉虱通过取食可将 *Rickettsia* 传入棉花等寄主植物。本研究中所用的 B 型烟粉虱感染有原生共生菌 *Portiera* 和次生共生菌 *Rickettsia*，*Hamiltonella* 以及 *Hemipteriphilus*，我们发现在烟粉虱取食一段时间后，利用常规 PCR 检测以上共生菌在棉花、番茄、豇豆叶片内的传入情况，结果仅检测到 *Rickettsia* 的特异性条带。究其原因，不同昆虫内共生菌在宿主昆虫体内的分布形式有所不同，例如在烟粉虱体内，*Portiera*、*Hamiltonella* 分布于特定的含菌细胞中（Gottlieb *et al.*，2008），而 *Rickettsia* 的分布形式、分布位置多样，除分布于含菌细胞内，还分布于血淋巴、唾液腺等中（Gottlieb *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017b; Shi *et al.*, 2018）。*Portiera*、*Hamiltonella* 以及 *Hemipteriphilus* 未能在植物体内检测到，或许是因为其限制性的分布于含菌细胞中。本研究中我们验证了 *Rickettsia* 经烟粉虱的取食介导，可以进入到多种植物体叶片内，因此我们推测多数寄主植物都可能成为 *Rickettsia* 等昆虫内共生菌的桥梁宿主，从而进一步促进了昆虫内共生菌在不同昆虫宿主中的感染与传播。

本研究结果表明，经烟粉虱传入棉花、番茄、豇豆叶片中的 *Rickettsia* 分布于植物韧皮部的筛管细胞中，且每个筛管细胞中仅观察到单个细菌。郝晓娟（2010）研究表明，维管束系统中的植物内生细菌数量均较低，如果存在大量细菌将导致维管束系统的堵塞，进而引起植物患病。在本研究中，*Rickettsia* 在筛管细胞中数量较少，没有观察到 *Rickettsia* 对棉花、番茄、豇豆的细胞壁及胞间层有破坏作用，这可能是 *Rickettsia* 传入植物后，不引起显著的植物病害症状的原因之一。*Rickettsia* 同柑橘黄龙病病原菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus（*C*Las）一样，目前还无法实现体外培养，在植物体内它们均限制性地分布于植物的韧皮部，而 *C*Las 在植物单个筛管细胞中可存在数个，且能够破坏植物的细胞壁及筛管细胞的胞间层（Shokrollah *et al.*，2010）。

由于 *Rickettsia* 是在非烟粉虱直接取食的叶片中检测到的，这也说明，经烟粉虱取食传入植物的 *Rickettsia* 能够在植物体内转移，之所以能够这样，或许是因为 *Rickettsia* 限制性地分布于植物的筛管细胞中，进而借韧皮部同化物的运输而在植株体内转移。在 *Rickettsia* 的形态方面，烟粉虱、棉花、番茄中的 *Rickettsia* 在形态、大小上较一致，在豇豆叶片中则更小、更钝圆一些，这是否是 *Rickettsia* 对不同植物做出的一种适应性反应，亦或是因为豇豆的叶片组织不同于棉花和番茄的叶片组织，还有待进一步研究。

Li 等（2017b）及安璇等（2015）的前期研究发现，在植物中检测出 *Rickettsia* 的时间与寄主植物上取食烟粉虱种群数量密切相关，取食植物的烟粉虱数量越多，越早在植物体内检测到 *Rickettsia*。除此之外，*Rickettsia* 在植物中的最早检出时间还受到烟粉虱种类的影响，相同数量的 B 型与 Q 型烟粉虱相比，在 B 型烟粉虱取食的叶片中最先检测到 *Rickettsia*（Li *et al.*，2017b）。在本研究中，相同数量的 B 型烟粉虱取食，最早在豇豆叶片中检测到 *Rickettsia*，这就说明植物本身也会影响到 *Rickettsia* 的传入，产生这种影响是烟粉虱在不同寄主植物上的取食量、繁殖量、*Rickettsia* 的传入量不同，还是植物韧皮部汁液的营养成分及含量不同，或者是植物防御反应的力度有所不同，还需要进一步研究。

本文用 q-PCR 检测了 *Rickettsia* 经烟粉虱取食传入豇豆后，在豇豆体内含量的时空动态。总体来说，随着时间的推移，*Rickettsia* 并不会在植物体内持续增加，但也不会迅速死亡，它与植物之间或许存在着一种平衡，正是这种平衡使得植物成为其桥梁宿主，从而促进自身在不同昆虫间的水平传播。

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.

An X, Li YH, LI SJ, Guo CF, Ren SX, Qiu BL, 2015. Preliminary

research on the distribution and transmission efficiency of *Rickettsia*, an endosymbiont of whitefly *Bemisia tabaci*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(1): 135–142. [安璇, 李翌涵, 李绍建, 郭长飞, 任顺祥, 邱宝利, 2015. 烟粉虱内共生菌 *Rickettsia* 在植物体内的分布及转移效率初探. 应用昆虫学报, 52(1): 135–142.]

Baumann P, 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59: 155–189.

Bai J, Liu XN, Lu MX, Du YZ, 2019. Characterization of genes encoding small heat shock proteins from *Bemisia tabaci* and expression under thermal stress. *Peer J.*, 7: e6992.

Bing XL, Yang J, Zchori-Fein E, Wang XW, Liu SS, 2013. Characterization of a newly discovered symbiont of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Appl. Environ. Microb.*, 79(2): 569–575.

Caspi-Fluger A, Inbar M, Mozes-Daube N, Katzir N, Portnoy V, Belausov E, Hunter MS, Zchori-Fein E, 2012. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734): 1791–1796.

Chiel E, Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Katzir N, Inbar M, Ghanim M, 2007. Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research*, 97(4): 407–413.

Chiel E, Zchori-Fein E, Inbar M, Gottlieb Y, Adachi-Hagimori T, Kelly SE, Asplen MK, Hunter MS, 2009. Almost there: Transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE*, 4(3): e4767.

Da Silva HAP, Nardeli SM, Alves-Ferreira M, Simões-Araújo JL, 2015. Evaluation of reference genes for RT-qPCR normalization in cowpea under drought stress during biological nitrogen fixation. *Crop Science*, 55(4): 1660–1672.

Engelstadter J, Telschow A, 2009. Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity*, 103(3): 196–207.

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharra A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, Vincze T, Ingram J, Moran L, Lapidus A, Omelchenko M, Kyrpides N, Ghedin E, Wang S, Goltsman E, Joukov V, Ostrovskaya O, Tsukerman K, Mazur M, Comb D, Koonin E, Slatko B, 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology*, 3(4): e121.

Gottlieb Y, Ghanim M, Gueguen G, Kontsedalov S, Vavre F, Fleury F, Zchori-Fein E, 2008. Inherited intracellular ecosystem: Symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *The FASEB Journal*, 22(7): 2591–2599.

Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, Gerling D, Portnoy V, Steinberg S, Tzuri G, Horowitz AR, Belausov E, Mozes-Daube N, Gershon M, Gal S, Katzir N, Zchori-Fein E, 2006. Identification and localization of a *Rickettsia* sp in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl. Environ. Microb.*, 72(5): 3646–3652.

Hao XJ, 2010. Endophytic Bacteria. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press. 16–32. [郝晓娟, 2010. 植物内生菌. 北京: 中国农业科学技术出版社. 16–32.]

Kaiser W, Huguet E, Casas J, Commin C, Giron D, 2010. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1692): 2311–2319.

Li SJ, Ahmed MZ, Lv N, Shi PQ, Wang XM, Huang JL, Qiu BL, 2017a. Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME Journal*, 11(4): 1019–1028.

Li YH, Ahmed MZ, Li SJ, Lv N, Shi PQ, Chen XS, Qiu BL, 2017b. Plant-mediated horizontal transmission of *Rickettsia* endosymbiont between different whitefly species. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(12): fix138.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH, 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27(2): 189–195.

Moran NA, Dunbar HE, 2006. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(34): 12803–12806.

Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A, 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42: 165–190.

Oliver KM, Moran NA, Hunter MS, 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36): 12795–12800.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4): 1803–1807.

Pan HP, Chu D, Liu BM, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Xu BY, Zhang YJ, 2013. Relative amount of symbionts in insect hosts changes with host-plant adaptation and insecticide resistance. *Environmental Entomology*, 42(1): 74–78.

Ratzka C, Liang CG, Dandekar T, Gross R, Feldhaar H, 2011. Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(8): 529–536.

Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ, 2005. Aphid protected

from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755): 1781–1781.

Shi PQ, Wang L, Liu Y, An X, Chen XS, Ahmed MZ, Sang W, 2018. Infection dynamics of endosymbionts reveal three novel localization patterns of *Rickettsia* during the development of whitefly *Bemisia tabaci*. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(11): fiy165.

Shokrollah H, Abdullah T, Sijam K, Abdullah S, 2010. Ultrastructures of *Candidatus* Liberibacter asiaticus and its damage in huanglongbing (HLB) infected citrus. *African Journal of Biotechnology*, 9(36): 5897–5901.

Sintupachee S, Milne JR, Poonchaisri S, Baimai V, Kittayapong P, 2006. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial Ecology*, 51(3): 294–301.

Sloan DB, Moran NA, 2012. Genome reduction and co-evolution between the primary and secondary bacterial symbionts of psyllids. *Molecular Biology and Evolution*, 29(12): 3781–3792.

Tang XT, Cai L, Shen Y, Du YZ, 2018. Diversity and evolution of the endosymbionts of *Bemisia tabaci* in China. *PeerJ*., 6: e5516.

Tang XT, Cai L, Shen Y, Xu LL, Du YZ, 2020. Competitive displacement between *Bemisia tabaci* MEAM1 and MED and evidence for multiple invasions of MED. *Insects*, 11(1): 35.

Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T, 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5666): 1989–1989.

Zchori-Fein E, Brown JK, 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(6): 711–718.