

昆虫と土壌細菌の共生

害虫カメムシ-土壌間にみられる殺虫剤分解菌の動態解明

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	伊藤,英臣
発行元	土壌微生物研究会
巻/号	69巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 34-38
発行年月	2015年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



昆虫と土壤細菌の共生：害虫カメムシ土壤間にみられる殺虫剤分解菌の動態解明

シンポジウム

伊藤英臣

産業技術総合研究所 北海道センター
生物プロセス研究部門 環境生物機能開発研究グループ,
〒062-8517 北海道札幌市豊平区月寒東2-17-2-1

Selective infection of insecticide - degrading bacteria from ambient soils to the bean bug *Riptortus pedestris*

Hideomi Itoh

Bioproduction Research Institute
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) Hokkaido
2-17-2-1 Tsukisamu-higashi, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido 062-8517, Japan

Keywords : insect, soil microbiota, symbiosis, *Burkholderia*, insecticide

1. 昆虫と共生細菌

多くの昆虫がその体内に共生細菌を保有していることは古くから知られていたが (Buchner, 1965), 近年の研究によってこれら共生細菌がただ存在しているのではなく, 宿主昆虫の栄養代謝において極めて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。植物の師管液を吸って生きるアブラムシは, 師管液にほとんど含まれない必須アミノ酸を体内の共生細菌によって合成してもらい補完している (Sasaki *et al.*, 1991; Shigenobu *et al.*, 2000)。また, シラミやツエツエバエといった脊椎動物の血液のみをエサとする吸血性昆虫は, 動物の血液にほとんど含まれていないビタミン B 類の合成を体内の共生細菌に頼っている (Aksoy, 2003)。さらに食材性昆虫のシロアリは, 食べた木質の消化をほぼ完全に消化管内に共生する細菌や原生生物に代行してもらっている (Tokuda and Watanabe, 2007; Warnecke *et al.*, 2007)。このように共生細菌は宿主昆虫の栄養代謝にきわめて重要であり, 昆虫は共生細菌なくして生存・繁殖は不可能といえる。宿主昆虫も, 大切なパートナーである共生細菌を次世代へと確実に受け渡すために, 「食糞する」, 「卵の中に入れる」, 「卵の表面に塗布する」, 「幼虫が食べる分泌液に混ぜておく」といった共生細菌の母子間伝達方法を発達させており, 幾代にもわたって共生細菌を維持していることが分かってきた (Nalepa *et al.*, 2001; Kikuchi *et al.*, 2009)。

2. ホソヘリカメムシは共生細菌を土壤から獲得する

ところが近年, 共生細菌を親世代から一切受け継がず, わざわざ生息環境から共生細菌を取り込む昆虫が発見された。それは, ダイズの重要害虫として知られるホソヘリカメムシと

いう昆虫である (Fig. 1A)。ホソヘリカメムシは消化管の一部に「盲囊」と呼ばれる袋状組織を多数発達させており, その内腔に *Betaproteobacteria* 綱 *Burkholderia* 属の共生細菌を保有している (Fig. 1B, C, D)。このカメムシは, 他の昆虫に見られるような共生細菌の母子間伝播は行わず, 幼虫期に土壤から *Burkholderia* 属細菌を体内に取込んで共生器官に定着させていることが明らかになった (Kikuchi *et al.*, 2005, 2007, 2011a)。また, *Burkholderia* との共生によってホソヘリカメムシは成長期間が短縮し, 体サイズ・産卵数が増加するなど, 高い適応度効果が得ることも分かってきた (Kikuchi *et al.*, 2007; Kikuchi and Fukatsu 2014)。このように雑多な環境微生物の中から特定の共生微生物を獲得する例は, 植物と根粒菌や菌根菌の共生系 (Verma *et al.*, 2010; Denison and Kiers, 2011), ミミイカと発光細菌の共生系 (Nyholm *et al.*, 2004), 海底熱水噴出孔に棲息するチューブワームと独立栄養細菌の共生系 (Nussbaumer *et al.*, 2006) に代表されるように, 陸上植物や海産無脊椎動物では普通に見られるが, ホソヘリカメムシ以外の陸上動物ではほとんど報告されていない。

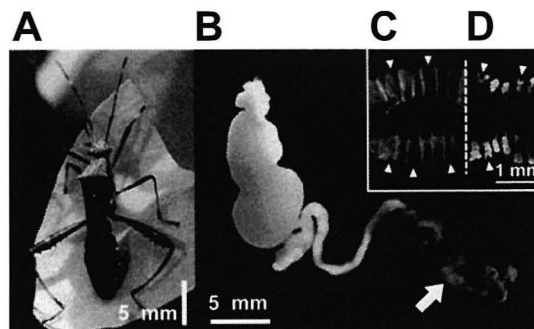


Fig. 1 ホソヘリカメムシとその共生器官 (Kikuchi *et al.*, 2012 より引用)。A, ホソヘリカメムシの成虫 (♂)。B, 解剖して摘出した消化管。左上が口側, 右下が肛門側。矢印が共生器官を示す。C, 共生器官の拡大図。矢印は盲囊を示す。D, 蛍光染色図。白く見えるものが共生細菌。

2015年1月22日受付・2015年1月29日受理

* Corresponding author.

E-mail: hideomi-itou@aist.go.jp

3. 土壌細菌が害虫に殺虫剤抵抗性を与える!!

ホソヘリカメムシの共生細菌 *Burkholderia* は土壌環境で普遍的に検出される細菌群の1つであるが、中には殺虫剤を分解・資化して増殖するものも知られている (Keprasertsupa *et al.*, 2001; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007, 2009)。ホソヘリカメムシの駆除においても使用されており、世界的に汎用性が高い有機リン系殺虫剤のひとつであるフェニトロチオン (*O,O*-dimethyl *O*-(3-methyl-p-nitrophenyl) phosphorothioate, MEP) を分解できる *Burkholderia* も農耕地土壌から単離されている (Tago *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009)。これら MEP 分解 *Burkholderia* を実験的にホソヘリカメムシの幼虫に経口接種したところ、消化管の共生器官に安定的に定着することが確認された (Kikuchi *et al.*, 2012)。さらに驚くべきことに、MEP 分解 *Burkholderia* が共生したホソヘリカメムシは MEP に抵抗性を示すことが明らかになった (Kikuchi *et al.*, 2012)。従来、害虫の殺虫剤抵抗性は害虫自身の遺伝子によって決まるものと当たり前のようにみなされてきた (Denholm and Rowland, 1992; Whalon *et al.*, 2008; Heckel, 2012)。しかし、ホソヘリカメムシに殺虫剤分解細菌を共生させる実験により、共生細菌の遺伝子によって宿主昆虫が殺虫剤抵抗性を獲得するという、従来の定説とは全く異なる新たな学術的知見が得られたといえる。さらに、ホソヘリカメムシと同様に生息環境から *Burkholderia* 属の共生細菌を獲得するカンシャコバネナガカメムシ (サトウキビの重要害虫) において、一般農家のサトウキビ畑から MEP 分解 *Burkholderia* を共生させた個体が見つかった (Itoh *et al.*, 2014a; Kikuchi *et al.*, 2012)。このことは、「共生細菌による害虫の殺虫剤抵抗性化」が実験室内の限定的な現象という訳ではなく、実際の野外農耕地でも十分に起こりえる重要な現象であることを示している。

実環境中では、①殺虫剤をまくと土壌中で殺虫剤を分解・資化する細菌 (殺虫剤分解菌) が増殖し、②増殖した殺虫剤分解菌が害虫に取り込まれ、腸内に定着して害虫を抵抗性にする、といったプロセスを経て「共生細菌による害虫の殺虫剤抵抗性化」が起こると推測される。しかしながら、殺虫剤散布によって土壌細菌叢、さらにはそこに生息するカメムシの腸内共生細菌叢がどのように変遷するのか、その動態についてはまったく分かっていない。土壌由来の共生細菌が昆虫に殺虫剤抵抗性を付与することは、当然ながら現行の化学農薬に依存した害虫防除政策においては全く考慮されていない盲点とも言える。したがって、昆虫と土壌の殺虫剤分解菌の共生の成立のメカニズムを総合的に理解することにより、学術的に有用な知見が得られるのみならず、殺虫剤抵抗性害虫の発生リスク評価や土壌細菌との共生関係の破綻を狙った「共生阻害剤」(薬剤や拮抗菌を用いる) といった、新たな害虫防除技術シーズの創出も期待できる。

以下、土壌とカメムシ間における殺虫剤分解菌の動態解明の一端である、「殺虫剤の散布頻度に応じて分解菌に感染した害虫カメムシがどのくらい出現するのか?」(本稿5)、「どのような殺虫剤分解菌がどの程度の選択性をもって害虫カメムシに取込まれるのか?」(本稿6) というトピックについて、最新の研究成果を紹介する。

4. 土壌細菌叢およびカメムシの腸内共生細菌叢の同時解析

土壌とカメムシ間における殺虫剤分解菌の動態を調べるために、

Fig. 2 のような室内実験系を構築した。まずポットに土壌を充填し、1週間に1度の頻度で殺虫剤の MEP を散布した。未散布のもの、2回、4回、6回散布した土壌について、表層土壌を採取して分解菌の単離、16S rRNA 遺伝子の定量 PCR、および次世代シーケンサー (Miseq シーケンサー, Illumina) を用いた PCR アンプリコンシーケンシングによって土壌細菌叢の解析を行った (本稿5)。さらに、これらの土壌を用いてホソヘリカメムシを飼育し、カメムシに感染した細菌の単離や次世代シーケンシング解析を行った。Fig. 2 に示すように、土壌に覆いをして、カメムシのエサとしてダイズの苗とマメを置き、1ポットあたり15匹のホソヘリカメムシの幼虫を放って多頭飼育した。飼育開始から約20日後に成虫に脱皮したホソヘリカメムシを回収し、解剖して共生器官を摘出し解析した (本稿6)。



Fig. 2 室内実験系。ポットに土壌を充填し、殺虫剤を散布した。土壌細菌叢の解析用に表層土壌の一部を採取した後、ダイズの芽出しと種子を置いてホソヘリカメムシの幼虫を飼育した。各処理ポットは3反復設けた。

5. カメムシの殺虫剤分解菌への感染率は土壌中の殺虫剤分解菌密度に依存する

土壌中の殺虫剤分解菌の量的動態に関しては、筆者らのこれまでの解析結果と同様に (Itoh *et al.*, 2014b), MEP 散布前の土壌において MEP 分解菌は検出限界値以下であった ($<10^2$ cfu g⁻¹-dry soil, Fig. 3A) が、殺虫剤の散布を重ねるに従って、土壌中の分解菌密度が有意に上昇した (Fig. 3A)。そして、MEP 分解菌に感染したカメムシも、散布前の土壌で育てた個体群からはまったく検出されなかったものの、散布後の土壌で育てた個体群からは検出された (Fig. 3B)。また、土壌中の MEP 分解菌密度の上昇にともなって、MEP 分解菌に感染した個体の割合も上昇し、6回散布した土壌においては92%の個体が MEP 分解菌に感染していた (Fig. 3B)。これらのことは、本稿3で述べた「殺虫剤散布により土壌中の殺虫剤分解菌密度が上昇し、これに伴いカメムシが分解菌へ接触する頻度が上昇し、カメムシは分解菌に感染しやすくなる」という仮説を支持するものである。この結果はまた、殺虫剤の過剰散布が「共生細菌による害虫の殺虫剤抵抗性化」を大幅に促進する危険性についても示唆している。一般的には、過剰量の殺虫剤散布は主に農作物への残留や周辺環境への汚染を考慮して注意喚起されているにすぎないが、共生細菌による害虫の殺虫剤抵抗性獲得という観点からも極めて重要だと考えられる。

一方で、殺虫剤分解菌に感染した害虫が発生しないような、土壌中の殺虫剤分解菌の密度の閾値が存在することも分かった。今

回の結果からは正確な閾値を算出することは難しいが、土壌中の分解菌密度が 10^2 CFU g⁻¹ dry soil よりも低く保てれば、殺虫剤分解菌に感染したカメムシの出現を防ぐことができると推測される。すなわち、あらかじめ室内実験系において殺虫剤を散布した際の土壌中の殺虫剤分解菌の密度を調べれば、耕作前に圃場の殺虫剤抵抗性害虫の出現リスクを評価できる可能性を示している。

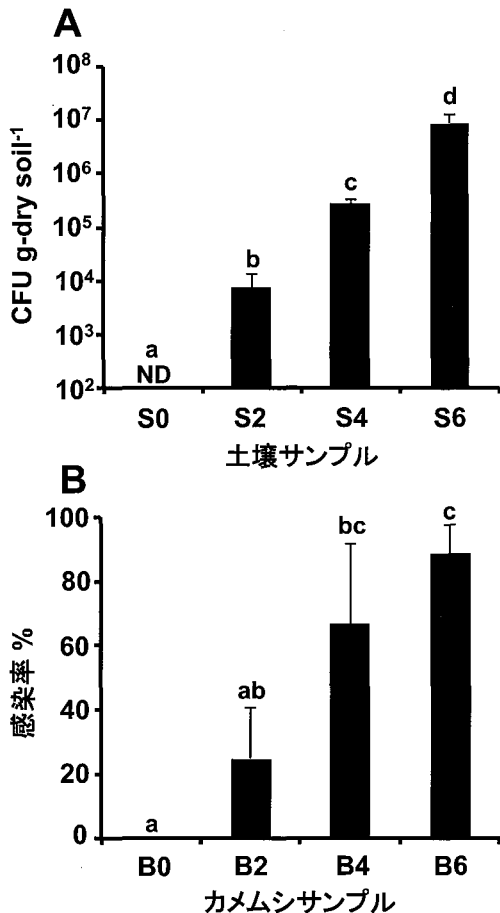


Fig. 3 MEP 散布による土壌およびカメムシ共生器官の MEP 分解菌の量的変動（単離培養法）。A, MEP 散布による土壌中の MEP 分解菌の CFU の経時変化。ND は検出限界以下 ($<1.0 \times 10^2$ CFU g⁻¹ dry soil) であることを示す。B, MEP 分解菌に感染したホソヘリカメムシの割合の変遷。同じアルファベットで示されたデータ間には有意差がないことを示す ($P < 0.05$, $n = 3$)。サンプル ID について、S は土壌、B はカメムシのサンプルを示し、数字は殺虫剤の散布回数を示す。(例) S2, MEP を 2 回散布した土壌; B2, MEP を 2 回散布した土壌を用いて飼育したカメムシ。

6. カメムシは土壌中のわずかな分解菌を選択的に獲得する

次に、土壌およびカメムシ共生器官から単離培養した殺虫剤分解菌を 16S rRNA 遺伝子の配列に基づき同定したところ、そのほとんどが *Burkholderia* 属細菌であることが明らかとなった。このことは、単純に土壌で増殖した *Burkholderia* 属細菌がカメムシに感染したと解釈することができるかもしれない。しかし、環境土壌中には数 10 万種を超える雑多な土壌細菌が生息し、その 99% が単離培養できないことを考えると、実際にどの程度の選択性をもってホソヘリカメムシが *Burkholderia* 属細菌を取込んでいるのかは慎重に検討する必要があるだろう。そこで筆者ら

は、上記実験に用いた土壌とカメムシ共生器官の細菌叢を次世代シーケンサーを用いて比較調査した。まず土壌を調べたところ、MEP 散布の処理期間において群集サイズ（総細菌数）は変化しなかったが、散布回数が増えるにしたがって細菌叢全体に対する *Burkholderia* 属細菌の割合が増加することが明らかとなった。このことから、本稿 5 の単離培養法による結果からも支持されるように、土壌の *Burkholderia* 属細菌の密度が上昇したことが示唆された。しかしながら、処理期間を通して *Burkholderia* 属細菌の割合は土壌細菌叢全体において 10% にも満たず、特に MEP 分解菌に感染したカメムシが現れはじめた「MEP を 2 回散布した土壌」においてもわずか 0.5% であった。次に、MEP 分解菌に感染していたカメムシの共生器官の細菌群集構造を調査したところ、1 個体あたり平均 3 万配列が得られたが、どの個体も 99.8% 以上は *Burkholderia* 属細菌の配列に近縁であり、極めて単純な細菌叢であることが明らかになった。これら土壌とカメムシの菌叢に関する解析結果は、単離培養法で考えられたよりも、非常に高い選択性によって *Burkholderia* 属細菌のカメムシへの感染が起きていることを示している。

ここで、これまでに知られている *Burkholderia* 属の系統について整理しておきたい。*Burkholderia* は土壌細菌として知られるばかりでなく、動物や植物の病原細菌 (Coenye *et al.*, 2001)、植物の成長を促進する根圏細菌 (Suárez-Moreno *et al.*, 2012)、また、ホソヘリカメムシに加え、その近縁種のカメムシの共生細菌としても知られている (Kikuchi *et al.*, 2011b)。これらの単離株の 16S rRNA 遺伝子の配列を統合して進化系統樹を作製したところ、*Burkholderia* 属細菌は主に 3 系統に分かれることが明らかとなった。すなわちその 3 系統とは、植物の地上部や根圏（根粒を含む）に由来するエンドファイトが含まれる系統 (Plant-associated beneficial and environmental clade, PBE (Suárez-Moreno *et al.*, 2012))、ヒトや家畜、植物に病原性を示す系統 (Pathogenic clade, PAT (Coenye *et al.*, 2001))、そしてカメムシの共生細菌系統 (Stinkbug-associated beneficial and environmental clade, SBE (Kikuchi *et al.*, 2011b; Itoh *et al.*, 2014a)) であり、土壌由来の *Burkholderia* はまとまった系統を形成することなく、主な 3 系統のどの系統にも分布した。さらに配列群を 99% 以上の相同性を示す群にクラスタリングしたところ、22 のサブ系統群が形成された。

この 22 の *Burkholderia* サブ系統群に対して、本研究において土壌およびカメムシから単離された MEP 分解性 *Burkholderia* 属細菌の配列をマッピングしたところ (Fig. 4)、散布回数によって土壌における *Burkholderia* 属細菌の優占種は異なった一方、カメムシに感染した MEP 分解 *Burkholderia* の大部分は SBE 系統であることが明らかとなった。MEP を 2 回、4 回散布した際の土壌中の *Burkholderia* 属細菌においては PAT 系統や PBE 系統が優占種であるにも関わらず、それら土壌の上で飼育したカメムシは土壌中ではむしろマイナーな SBE 系統の *Burkholderia* のみを取り込んでいた。特に、MEP 分解菌に感染したカメムシが現れはじめた散布処理 2 回の実験系に由来するカメムシにおいては、土壌の細菌叢全体のわずか 0.006% を占めるにすぎない SBE 系統 (Fig. 4 の * のサブ系統) を取込んでいることが明らかとなった。これまでの研究から、野外のホソヘリカメムシは *Burkholderia* の SBE 系統を特異的に保有していることが報告されていたが (Kikuchi *et al.* 2005, 2011b)、土壌中の *Burkholderia* 属細菌の詳細な系統解析や昆虫・土壌間の細菌叢の比較解析の例がなかったため、選択性の程度についてはよくわかっていなかった

た。今回の土壌細菌叢およびカメムシの腸内共生細菌叢の同時解析により、たとえ PBE 系統や PAT 系統の *Burkholderia* が土壌中で優占していても、ホソヘリカメムシは極めて高い選択性によって土壌中でわずかししか存在しない SBE 系統の *Burkholderia* 属細菌 (MEP 分解菌) を取り込み共生させることが示された。

ホソヘリカメムシが複雑な土壌細菌叢の中から *Burkholderia* の SBE 系統を選択的に取り込む分子メカニズムについてはほとんどわかっていない。本稿 2 でも一部述べたが、マメ科植物は雑多な土壌微生物叢から根粒菌を選択的に獲得できることが知られているが、その選択機構に関する分子メカニズムは詳細に明らかになってきている。宿主植物は根からフライボノイド化合物分泌し、それを根粒菌が特異的に認識して nod-factor と呼ばれる特殊なリポオリゴ糖を合成し、さらにそれを宿主植物が認識して根粒菌を根に取り込むことが知られている (Haag *et al.*, 2013)。また、ミミイカが海水から発光細菌 *Aliivibrio fischeri* のみを獲得する機構については、発光器官の繊毛の生えた上皮突起に海水の中の細菌がトラップされ、その細菌集団の中から、運動性がありかつ宿主の免疫系を回避できる *Aliivibrio fischeri* のみが発光器官の中で優占することが知られている (Nyholm *et al.*, 2004)。ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系においても、これらに類似するような宿主-共生細菌間の認識機構や定着に関わる機構があるのかもしれない。最近のホソヘリカメムシの消化管の網羅的な遺伝子発現解析から、共生器官の手前の消化官領域 (Fig. 1 の矢印より左側の器官) では、カメムシ側から溶菌酵素や抗菌ペプチドが分泌されていることが示唆されている (Futahashi *et al.*

2013)。土壌から体内に取込んだ雑多な細菌群に対して選別を行い、目的の *Burkholderia* だけを共生器官に取り込む機構がホソヘリカメムシには発達しているのかもしれない。

7. 総 括

近年提唱された殺虫剤抵抗性の新規発達メカニズム (共生細菌による害虫の殺虫剤抵抗性化) の全貌解明に向け、本研究によって土壌と害虫間における殺虫剤分解菌の動態をはじめ詳細に明らかにすることができた。殺虫剤の散布により土壌中の殺虫剤分解菌が増殖することで、ホソヘリカメムシが殺虫剤分解菌に感染しやすくなることを立証し、ホソヘリカメムシは極めて高い選択性を持って土壌中のわずかな殺虫剤分解菌を獲得していることが明らかとなった (Fig. 5)。今後は、ホソヘリカメムシによる共生細菌の選別機構や、カメムシ体内に定着した殺虫剤分解菌による解毒機構の分子メカニズムの解明といった、よりミクロな見地からの解析も加え、本現象の総合的な理解を目指したい。それと同時に、本現象の一般性についても検証していきたいと考えている。これまでに、20 科 124 種のカメムシの共生細菌について網羅的に調べたところ、6 科 39 種に及ぶカメムシが *Burkholderia* を共生細菌として保有することが分かっている (Kikuchi *et al.*, 2011b)。その中にはコメの重要害虫である斑点米カメムシ (クモヘリカメムシやホソハリカメムシなど) も含まれるが、その 1 種について本稿 3. で述べたようなホソヘリカメムシと同様の室内実験系を用いて調べたところ、MEP 分解 *Burkholderia* に感染すると MEP 抵抗性を示すことが分かってきた (Itoh *et al.*, unpublished)。このように、他種の害虫カメムシにおいても土壌由来の共生細菌による殺虫剤抵抗性化現象が起こりえるのか、今後検証していきたい。

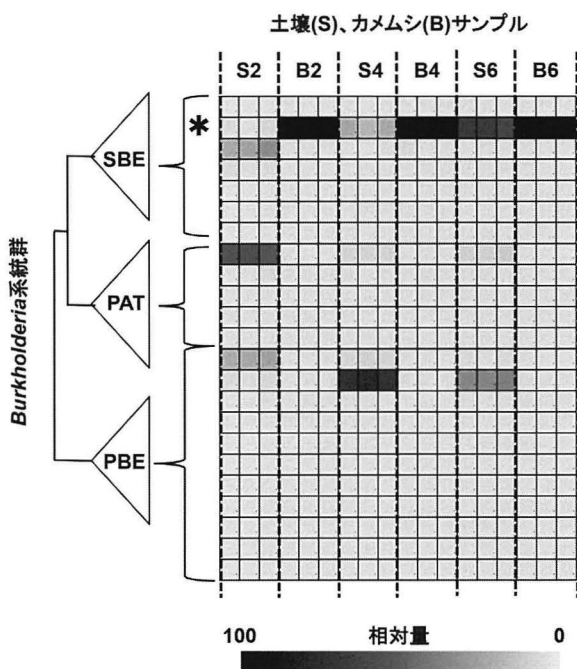


Fig. 4 土壌および殺虫剤分解菌に感染したカメムシ由来の *Burkholderia* の系統比較。左端の系統樹はこれまでに報告されている *Burkholderia* の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹であり、カメムシの共生器官から単離されたグループ (SBE: Stinkbug-associated beneficial and environmental clade)、動植物に対して病原性を示すグループ (PAT: Pathogenic clade)、植物の内生菌として単離されたグループ (PBE: Plant-associated beneficial and environmental clade) に大別される。各行は *Burkholderia* のサブ系統群 (99% 以上の相同性を持つ単位群) を、各列は土壌およびカメムシ共生器官における *Burkholderia* 内の OTU 組成を示す。* はカメムシから高頻度に検出されたグループを示す。

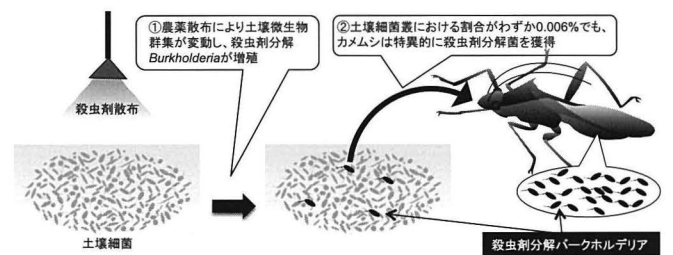


Fig. 5 土壌-ホソヘリカメムシ間における殺虫剤分解菌の動態のまとめ。

要 旨

多くの動植物はその体内に共生微生物を持ち、緊密な相互作用を行っている。これまでに共生微生物の多くは宿主の栄養代謝に寄与することが知られているが、ときに驚くべき機能を宿主に賦与する。ダイズ害虫のホソヘリカメムシは、毎世代環境土壌中から *Burkholderia* 属の共生細菌を獲得し腸内に保持することが知られている。近年、このカメムシが殺虫剤分解菌を取込んで、殺虫剤抵抗性になってしまう驚くべき現象を発見した。また、殺虫剤散布土壌と一緒にホソヘリカメムシを飼育し、殺虫剤散布により土壌中の殺虫剤分解菌が増殖すると害虫は殺虫剤分解菌を取込みやすくなることや、土壌中にわずかししか生息しない特定の系統の殺虫剤分解菌しか取込まないといったことも分かってきた。本稿ではホソヘリカメムシの共生系についてレビューするとともに、「共生細菌による害虫の殺虫剤抵抗性化」の実態解明に重要な、土壌-カメムシ間における殺虫剤分解菌の感染動態について

最新の知見を含め総括する。

引用文献

- 1) Aksoy S (2003) Symbiosis in tsetse. In *Insect Symbiosis*, Ed. K. Bourtzis and T.A. Miller, p.53-65, CRC Press, New York
- 2) Buchner P (1965) Endosymbioses of animals with plant microorganisms. John Wiley and Sons, New York
- 3) Coenye T, Vandamme P, Govan JR and LiPuma JJ (2001) Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3427-3436
- 4) Denholm I and Rowland MW (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Ann. Rev. Entomol.*, 37, 91-112
- 5) Denison RF and Kiers ET (2011) Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Cur. Biol.*, 21, R775-R785
- 6) Futahashi R, Tanaka K, Tanahashi M, Nikoh N, Kikuchi Y, Lee BL and Fukatsu T (2013) Gene expression in gut symbiotic organ of stinkbug affected by extracellular bacterial symbiont. *PloS ONE*, 8, e64557
- 7) Haag AF, Arnold MF, Myka KK, Kerscher B, Dall'Angelo S, et al. (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium* - legume symbiosis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37, 364-383
- 8) Heckel DG (2012) Insecticide resistance after silent spring. *Science*, 337, 1612-1614
- 9) Itoh H, Aita M, Nagayama A, Meng XY, Kamagata Y, Navarro R, et al. (2014a) Evidence of environmental and vertical transmission of *Burkholderia* symbionts in the oriental chinch bug *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5974-5983
- 10) Itoh H, Navarro R, Takeshita K, Tago K, Hayatsu M, Hori T and Kikuchi Y (2014b) Bacterial population succession and adaptation affected by insecticide application and soil spraying history. *Front. Microbiol.*, 5
- 11) Keprarsertsupa C, Upathamb ES, Sukhapanthb N and Prempreed P (2001) Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil Bacteria. *Scienceasia*, 27, 261-270
- 12) Kikuchi Y, Meng XY and Fukatsu T (2005) Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4035-4043
- 13) Kikuchi Y, Hosokawa T and Fukatsu T (2007) Insect - microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4308-4316
- 14) Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes Environ.*, 24, 195-204
- 15) Kikuchi Y, Hosokawa T and Fukatsu T (2011a) Specific developmental window for establishment of an insect - microbe gut symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 4075-4081
- 16) Kikuchi Y, Hosokawa T and Fukatsu T (2011b) An ancient but promiscuous host - symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *ISME J.*, 5, 446-460
- 17) Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K and Fukatsu T (2012) Symbiont - mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109, 8618-8622
- 18) Kikuchi Y and Fukatsu T (2014) Live imaging of symbiosis: spatiotemporal infection dynamics of a GFP - labelled *Burkholderia* symbiont in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Molecular ecology*, 23, 1445-1456
- 19) Kim T, Ahn JH, Choi MK, Weon HY, Kim MS, Seong CN, et al. (2007) Cloning and expression of a parathion hydrolase gene from a soil bacterium, *Burkholderia* sp. JBA3. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 1890-1893
- 20) Kim KD, Ahn JH, Kim T, Park SC, Seong CN, Song HG, et al. (2009) Genetic and phenotypic diversity of fenitrothion - degrading bacteria isolated from soils. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 113-120
- 21) Kuklinsky - Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Pizzirani - Kleiner A and Azevedo J (2005) Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil.*, 273, 91-99
- 22) Nalepa CA, Bignell DE and Bandi C (2001) Detritivory, coprophagy, and the evolution of digestive mutualisms in Dictyoptera. *Insectes Sociaux*, 48, 194-201
- 23) Nussbaumer AD, Fisher CR, and Bright M (2006) Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature*, 441, 345-348
- 24) Nyholm SV and McFall - Ngai M (2004) The winnowing: establishing the squid - *Vibrio* symbiosis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 632-642
- 25) Sasaki T, Hayashi H and Ishikawa H (1991) Growth and reproduction of the symbiotic and aposymbiotic pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* maintained on artificial diets. *J. Insect Physiol.*, 37, 749-756
- 26) Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y and Ishikawa H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp APS. *Nature*, 407, 81-86
- 27) Suárez - Moreno ZR, Caballero - Mellado J, Coutinho BG, Mendonça - Previato, L and James EK (2012) Common features of environmental and potentially beneficial plant - associated *Burkholderia*. *Microb. Ecol.*, 63, 249-266
- 28) Tago K, Sekiya E, Kiho A, Katsuyama C, Hoshito Y, Yamada N, et al. (2006) Diversity of fenitrothion - degrading bacteria in soils from distant geographical areas. *Microbes Environ.*, 21, 58-64
- 29) Tokuda G and Watanabe H (2007) Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biol. Lett.*, 3, 336-339
- 30) Verma JP, Yadav J, Tiwari KN and Lavakush SV (2010) Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int. J. Agric. Res.*, 5, 954-983
- 31) Warnecke F, Luginbühl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, et al. (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood - feeding higher termite. *Nature*, 450, 560-565
- 32) Whalon ME, Mota - Sanchez D and Hollingworth RM (2008) Global pesticide resistance in arthropods. CABI New York.
- 33) Zhang Z, Hong Q, Xu J, Zhang X and Li S (2006) Isolation of fenitrothion - degrading strain *Burkholderia* sp. FDS-1 and cloning of mpd gene. *Biodegradation*, 17, 275-283