

浙江 B 型与非 B 型 (China-ZHJ-1) 烟粉虱种群 共生细菌的检测及系统发育分析

阮永明, 刘树生*

(浙江大学应用昆虫学研究所 杭州 310029)

摘要: 烟粉虱体内存在共生细菌, 包括初生共生细菌(primary endosymbiont)和次生共生细菌(secondary endosymbiont)。本研究应用 PCR 技术检测了烟粉虱浙江 B 型和非 B 型 China-ZHJ-1 种群中共生细菌的分布。结果表明, 烟粉虱 B 型和非 B 型体内均存在初生共生细菌, 而两者次生共生细菌的组成存在差异。一种肠杆菌科次生共生细菌仅在 B 型烟粉虱中发现, 而另两种次生共生细菌 *Wolbachia* 和杀雄菌 *Arsenophonus* 仅在非 B 型中发现。初生共生细菌的系统发育分析表明, B 型是入侵生物型, 而浙江非 B 型是本地生物型。

关键词: 烟粉虱; 共生细菌; *Wolbachia*; 杀雄菌; 系统发育; 16S rDNA; 23S rDNA

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2005)06-0859-07

Detection and phylogenetic analysis of prokaryotic endosymbionts in *Bemisia tabaci*

RUAN Yong-Ming, LIU Shu-Sheng* (Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Whiteflies are plant sap-feeding insects that harbor prokaryotic symbionts, including primary and secondary endosymbionts. In this study, PCR-based detection of prokaryotic endosymbionts of a *Bemisia tabaci* B biotype and a non-B biotype China-ZHJ-1 population in Zhejiang, China was performed. Both B and non-B biotype populations harbored a common primary endosymbiont, but different secondary endosymbionts. A secondary endosymbiont of the family Enterobacteriaceae was detected in the B biotype population but not in the non-B biotype. Two other secondary endosymbionts, *Wolbachia* and *Arsenophonus*, were detected in non-B biotype population but not in B biotype. Phylogenetic analysis of primary endosymbionts based on 16S rDNA indicates that the non-B biotype is native to China while the B biotype is an invasive biotype.

Key words: *Bemisia tabaci*; endosymbiont; *Wolbachia*; *Arsenophonus*; phylogenesis; 16S rDNA; 23S rDNA

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 在各大洲广泛分布, 是热带、亚热带及相邻温带地区的一种主要作物害虫 (Brown *et al.*, 1995)。烟粉虱是处于快速进化中的复合种, 具有多种生物型 (Perring, 2001)。罗晨等 (2002) 比较了中国不同区域 5 个烟粉虱种群, 发现这些种群均为 B 型, 它们之间及与国外 B 型烟粉虱之间基因差异很小, 推测我国 B 型烟粉虱是近年入侵的外来种群。中国在 20 世纪 40 年代已有烟粉虱的记载 (周尧, 1949)。我们于 2003 年在浙江萧山棉花上采集到一些烟粉虱, 没有 B 型特有的银叶反应, 通过测定其 mtDNA COI 的序列及依据这些序列所做的系统发育关系分析, 初步推测为中

国本地非 B 型 (臧连生等, 2005)。

胸喙亚目昆虫如蚜虫、木虱、粉蚧和粉虱, 以植物韧皮部汁液为主要或唯一的食物来源。植物韧皮部汁液营养组成不均衡, 碳水化合物含量丰富而必需氨基酸组分欠缺或含量较低 (Sandström and Moran, 1999)。这些昆虫体内均存在共生细菌, 研究表明共生细菌能提供寄主昆虫所缺乏的必需氨基酸 (Douglas, 1998; Moran *et al.*, 2003)。共生细菌根据在寄主体内分布和与寄主进化关系可分为初生共生细菌 (primary endosymbiont) 和次生共生细菌 (secondary endosymbiont)。初生共生细菌最主要的特征是 (1) 通过母代垂直传播到后代而没有自由生活

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”项目 (2002CB111403)

作者简介: 阮永明, 男, 1975 年 3 月生, 福建永定人, 博士生, 讲师, 从事害虫综合治理及入侵生物学研究, E-mail: ruanym@zjnu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: shshliu@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-01-07; 接受日期 Accepted: 2005-06-23

阶段(2)存在并局限于含菌体(mycetome)中的菌胞(mycetocytes 或 bacteriocytes)中(Darby *et al.*, 2001)。除初生共生细菌外,有些昆虫还存在次生共生细菌,次生共生细菌也通过母系传递,但与寄主的共生关系不如初生共生细菌与寄主那么紧密,在寄主体内分布并不局限于菌胞(Moran and Telang, 1998)。

Clark 等(1992)从烟粉虱体内检测出一种与豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 次生共生细菌亲缘关系很近、隶属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的次生共生细菌。粉虱中还检测出杀雄菌属 *Arsenophonus* 共生菌(Thao and Baumann, 2004a)。对杀雄菌属的研究表明,飞虫杀雄菌 *A. nasoniae* 对丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的雄性胚胎有致死作用(Ghera *et al.*, 1991)。*Wolbachia* 广泛分布于节肢动物,并能够改变寄主的生殖行为,包括细胞质不亲和(cytoplasmic incompatibility)、孤雌生殖、雌性化和雄性致死(Clark *et al.*, 1992; Darby *et al.*, 2001; Zehori-Fein and Brown, 2002; Nirgianaki *et al.*, 2003)。Nirgianaki 等(2003)检测了 7 种粉虱中 *Wolbachia* 的分布,发现一些烟粉虱种群感染 *Wolbachia*; 在 13 个 B 型种群中,仅有 1 个也门种群检测出 *Wolbachia*; 而 26 个非 B 种群中,10 个携带 *Wolbachia*。Weeks 等(2003)报道,在烟粉虱 A、B 型中均未检测出 *Wolbachia*。这一结果可能与地理种群不同和样本数偏少有关(检测头数为 3~10 头),同时也反映了 *Wolbachia* 存在的复杂性。

烟粉虱 B 型和非 B 型在寄主植物范围、繁殖力等许多方面存在很大的差异(Brown *et al.*, 1995; 臧连生等, 2005),而烟粉虱不同生物型在共生细菌组成上是否存在差异,及这种差异是否对烟粉虱生物型的形成起一定的作用,目前还不清楚。为探讨这些问题,本研究利用不同共生细菌 16S rDNA 和 23S rDNA 的特异性引物,对烟粉虱外来入侵 B 型、浙江本地非 B 型体内共生细菌的存在情况进行了检测,并对所得初生共生细菌 16S rDNA 的片段与已报道的有关片段做了比较分析,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫:烟粉虱 *B. tabaci* B 型种群采自杭州甘蓝 *Brassica oleracea* var. *capitata*、非 B 型种群(定名为非 B 型 China-ZHJ-1 种群,下面简称非 B 型 ZHJ-1 种群)采自萧山棉花 *Gossypium hirsutum*(臧连

生等, 2005),在人工气候室(12 L:12D; 27 ± 1°C; 60%~80% RH)内以棉花(川棉 109)为寄主维持种群,至实验时已饲养 14~18 代。

1.1.2 酶和试剂:内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I, DNA Marker DL2000, X-Gal, IPTG, PCR 试剂盒 PerfectShot™ *Ex Taq*, 质粒 pMD18-T Vector 均购自 TaKaRa 公司; PCR 产物纯化试剂盒 QIAquick® Gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司; V-gene Rapid Plasmid DNA Daily mini-pre Kit 购自杭州维特洁公司; 蛋白酶 K, Ampicillin 购自上海生工生物工程公司。常用化学试剂为国产分析纯。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取及 PCR 扩增:烟粉虱模板 DNA 的提取参考罗晨等(2002)的方法, PCR 扩增初生共生细菌 16S rDNA 的引物为 28F: 5'-TGCAAGTCCAGCGGCATCAT-3' 和 1098R: 5'-AAAGTTCGCC TTATGC GT-3', PCR 反应参数为: 95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 5 个循环; 然后 95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min, 25 个循环; 循环结束后 72°C 延伸 20 min。扩增肠杆菌科次生共生细菌 16S rDNA 所用引物为: 92F 5'-TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG-3' 和 1343R 5'-CCCGGGAACGTATTCACCGTAG-3', PCR 参数除了 58°C 退火的循环增至 30 个外,与上述 PCR 参数一致(Zehori-Fein and Brown, 2002)。扩增 *Wolbachia* 16S rDNA 的引物为 5'-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3' (16S rDNA, 76-99) 和 5'-GAATAGGTA TGATTTTCATGT-3' (16S rDNA, 1 012-994) (O'Neill *et al.*, 1992), 反应条件为 94°C 5 min, 然后 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 循环 35 次(Nirgianaki *et al.*, 2003)。扩增 *Arsenophonus* 23S rDNA 片段及内含子所用引物为 *Ars23S-1*: 5'-CGTTTGATGAATTC ATAGTCAAA-3' 和 *Ars23S-2*: 5'-GGTCTCCAGTTAGT GTTACCCAAC-3', 反应条件为 95°C 5 min, 然后 95°C 30 s, 60.5°C 30 s, 72°C 45 s, 循环 30 次, 最后 70°C 延伸 10 min(Thao and Baumann, 2004a)。

1.2.2 克隆及测序:PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色。QIAquick® Gel Extraction Kit 回收目的片段。回收的目的片段, 克隆至 pMD 18-T Vector。V-gene Rapid Plasmid DNA Daily mini-pre Kit 提取质粒 DNA, *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切鉴定重组质粒。重组质粒送上海博亚公司测序(测序仪为 ABI PRISM 377)。

1.2.3 序列分析及系统发育分析:从 GenBank 下载

不同地理区域烟粉虱初生共生细菌 16S rDNA 的相应片段,与所得序列用 MEGA version 3.0 进行对位排列(必要时手动编辑)和遗传距离分析(Kimura 2-parameter Model),所用序列登录号及种群特性见表

1。以与初生共生细菌亲缘关系最近的、营自由生活方式的棕榈发酵细菌 *Zymobacter palmae* (登录号为 AF211871)作外群,用 MrBayes v3.0B4 进行贝叶斯分析,主要参数设置为:lnst = 6 rates = gamma。

表 1 本文涉及的烟粉虱种群及其初生共生细菌 16S rDNA 的 GenBank 登记号

Table 1 Whitefly populations used in this study and the GenBank accession numbers of 16S rDNAs of their primary endosymbionts

种群编号 Population code	采集地点 Collecting locality	寄主植物 Host plant	生物型 Biotype	GenBank 登记号 GenBank accession no.
KEN 3	肯尼亚 Kenya	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400460
MEX 12	墨西哥 Mexico	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	未知 Unknown	AF400461
MEX 4	墨西哥 Mexico	未知 Unknown	未知 Unknown	AF400462
TAN 15	坦桑尼亚 Tanzania	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400463
TAN 18	坦桑尼亚 Tanzania	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400464
TAN 3	坦桑尼亚 Tanzania	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400465
UG 23	乌干达 Uganda	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400466
UG 26	乌干达 Uganda	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400467
未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	AY266104
未知 Unknown	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang, China	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	B	AY860528
ZHJ-1	浙江萧山 Xiaoshan, Zhejiang, China	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	non-B	AY860529
未知 Unknown	未知 Unknown	未知 Unknown	B	AF211870
AUS 1	澳大利亚 Australia	<i>Euphorbia cyathophora</i>	未知 Unknown	AF400450
AZ A	美国亚利桑那州 AZ, USA	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	未知 Unknown	AF400451
AZ B	美国亚利桑那州 AZ, USA	一品红 <i>Euphorbia pulcherrima</i>	未知 Unknown	AF400452
CAL A	美国加利福尼亚 CA, USA	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	未知 Unknown	AF400453
CAM W15	喀麦隆 Cameroon	木薯 <i>Manihot esculenta</i>	未知 Unknown	AF400454
CUL	墨西哥 Mexico	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	未知 Unknown	AF400455
BR 8	巴西 Brazil	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	未知 Unknown	AF400456
IN 34	印度 India	大豆 <i>Glycine max</i>	未知 Unknown	AF400457
IS 5	以色列 Israel	Wild <i>Euphorbia</i> spp.	未知 Unknown	AF400458
JAT	波多黎各 Puerto Rico, USA	棉叶麻疯树 <i>Jatropha gossypifolia</i>	未知 Unknown	AF400459

2 结果与分析

B 型和非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱体内共生细菌 PCR 产物电泳图谱见图 1,调查的结果见表 2。

2.1 初生共生细菌

利用初生共生细菌的特异性引物,从所有 B 型和非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱个体中均扩增出 16S rDNA 部分片段。B 型扩增片段为 1 090 bp,非 B 型 ZHJ-1 种群为 1 093 bp,这两个片段的序列相似性达 98%。所测序列中 A + T 含量 B 型为 51.8%,ZHJ-1 为 52.2%。烟粉虱初生共生细菌被命名为 *Candidatus* Portiera aleyrodidarum (Baumann *et al.*, 2004; Thao and Baumann, 2004b)。烟粉虱初生共生细菌的遗传距离见表 3,不同地理区域烟粉虱初生共生细菌相互之间的遗传距离均很小,一般为 0.00 ~ 0.02,平均为 0.01。一个来自乌干达种群的烟粉虱初生共生细菌与来自其他地理区域的烟粉虱初生共

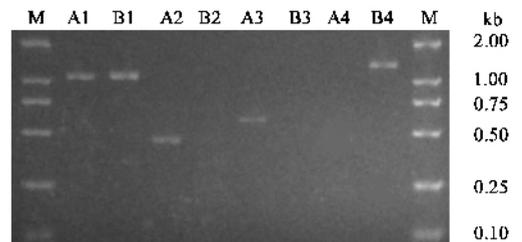


图 1 烟粉虱共生细菌的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of a PCR screening for the presence of prokaryotic endosymbionts of *Bemisia tabaci*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular marker; A: 非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱 Non-B ZHJ-1 population; B: B 型烟粉虱 B biotype; 1: 初生共生细菌 Primary endosymbiont; 2: *Wolbachia*; 3: 杀雄菌属 *Arsenophonus*; 4: 肠杆菌科次生共生细菌 Secondary endosymbiont of Enterobacteriaceae.

生细菌的遗传距离均较大,为 0.05 或 0.06,表现了一定程度的遗传分化。初生共生细菌 16S rDNA 的系统发育树见图 2。从图中可以看出,浙江 B 型与来自以色列及美洲(新大陆)的烟粉虱的初生共生细菌亲缘关系较近,聚为一枝,而非 B 型 ZHJ-1 种群与

来自印度和一些非洲国家(旧大陆)的烟粉虱的初生 共生细菌亲缘关系较近,聚为另一枝。

表 2 B 型和非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱体内共生细菌调查结果及 GenBank 登录号

Table 2 Occurrence of prokaryotic endosymbionts of *Bemisia tabaci* and their GenBank accession numbers

生物型 Biotype	初生共生细菌 Primary endosymbiont	肠杆菌科次生共生细菌 Secondary endosymbiont	<i>Wolbachia</i>	杀雄菌 <i>Arsenophonus</i>
B	AY860528(42/42)	AY860530(4/4)	(0/20)	(0/30)
Non-B ZHJ-1	AY860529(37/37)	(0/4)	AY850932(5/20)	AY860531(15/15)

注:表中数据为样本检出率。

Notes: Data in the table indicate rate of infection.

表 3 不同地理区域烟粉虱的初生共生细菌 16S rDNA 的遗传距离分析

Table 3 Genetic distances between 16S rDNA of primary symbionts of different population of *Bemisia tabaci*

GenBank 登录号 Accession numbers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. AF400460		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2. AF400461	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3. AF400462	0.01	0.02		0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4. AF400463	0.01	0.02	0.02		0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5. AF400464	0.01	0.02	0.02	0.01		0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6. AF400465	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7. AF400466	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01		0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8. AF400467	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
9. AY266104	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.06		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10. AY860528	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11. AY860529	0.01	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.03	0.06	0.02	0.02		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12. AF211870	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.01	0.01	0.02		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13. AF400450	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.06	0.01	0.01	0.01	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14. AF400451	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.05	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15. AF400452	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.02	0.05	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16. AF400453	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17. AF400454	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.06	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18. AF400455	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01		0.00	0.00	0.00	0.00
19. AF400456	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00		0.00	0.00	0.00
20. AF400457	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.05	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01		0.00	0.00
21. AF400458	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.01	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01		0.00
22. AF400459	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.05	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	

注:表中下三角为遗传距离值,上三角为标准误。

Note: In the lower triangle are the values of genetic distance, while in the upper triangle the values of standard error.

2.2 肠杆菌科次生共生细菌

在浙江 B 型和非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱所检样本中, B 型样本均扩增出肠杆菌科(Enterobacteriaceae)次生共生细菌 16S rDNA 的特异性片段,而非 B 型 ZHJ-1 种群未扩出相应的特异性片段。B 型烟粉虱次生共生细菌所扩片段长为 1 274 bp,序列 A + T 含量为 45.9%,与 Zchori-Fein 和 Brown(2002)的结果一致。该次生共生细菌与豌豆蚜次生共生细菌(PABS)16S rDNA 的序列相似性大于 98%,两者分化时间约为 1 700 万 ~ 3 400 万年前,晚于烟粉虱与豌豆蚜共同祖先的分化时间,从而暗示这种次生共生细菌可能属于水平传播(Darby *et al.*, 2001)。

2.3 *Wolbachia*

Wolbachia 16S rDNA 特异性片段仅在非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱个体中扩出,而 B 型种群均未扩出。在非 B 型 ZHJ-1 种群所检个体中,感染率为 25%,扩增片段为 896 bp,序列中 A + T 含量为 55.2%。

2.4 杀雄菌 *Arsenophonus*

杀雄菌 *Arsenophonus* 23S rDNA 特异性片段在非 B 型 ZHJ-1 种群个体中均有检出,而在 B 型种群中均没有扩出。扩增片段长为 582 bp,这说明与飞虫杀雄菌 *A. nasoniae* 不同,非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱杀雄菌 *Arsenophonus* 中 23S rDNA 没有内含子的存在(Thao and Baumann, 2004a)。

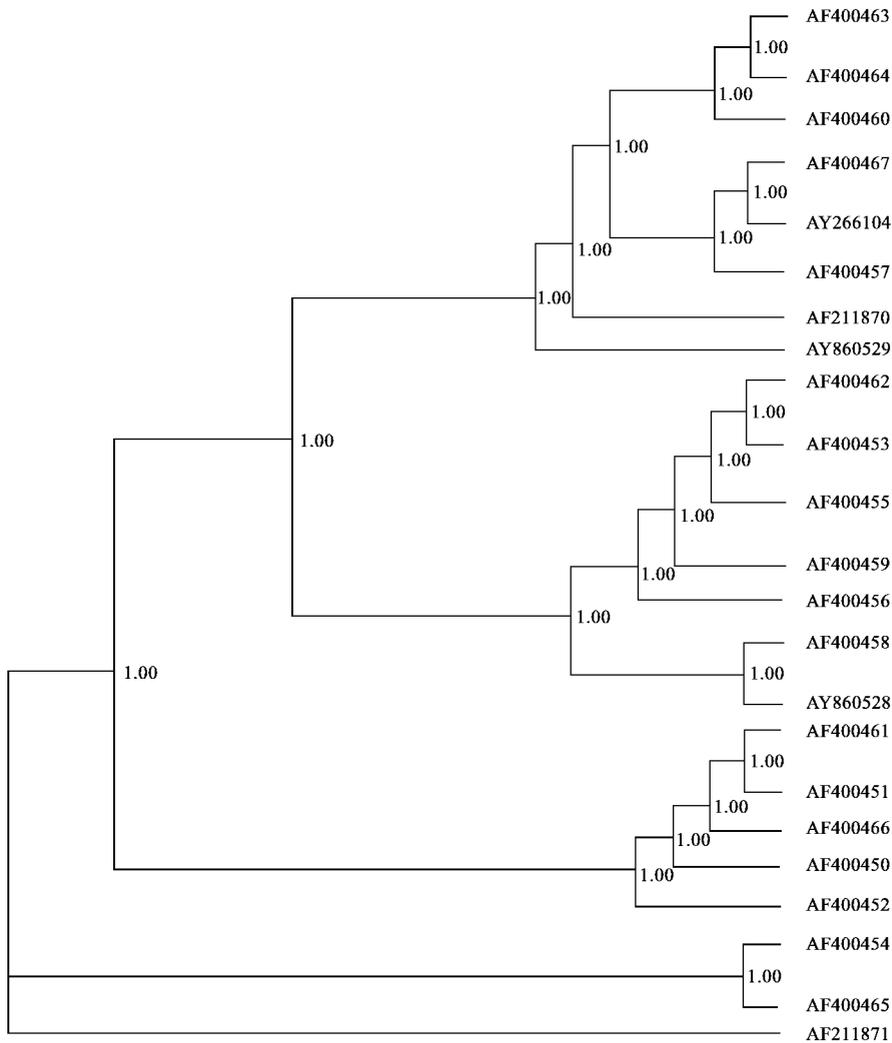


图 2 烟粉虱初生共生细菌 16S rDNA 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of primary symbionts of *Bemisia tabaci* based on the 16S rDNA sequences

3 讨论

以往的研究表明,与蚜虫和木虱类似,烟粉虱不同种群以及同一种群不同个体在共生菌组成上存在差异(Zchori-Fein and Brown, 2002)。本研究结果表明,浙江烟粉虱 B 型和非 B 型种群中均存在初生共生细菌,而次生共生细菌存在组成差异,即 B 型具有一种隶属肠杆菌科的次生共生细菌,而非 B 型具有 *Wolbachia* 和一种隶属杀雄菌属的次生共生细菌。研究表明,初生共生细菌所构建的系统发育树与其寄主昆虫所构建的树通常是一致的,初生共生细菌的系统进化可以反映寄主昆虫的进化关系(Munson *et al.*, 1991; Campbell, 1993; Thao *et al.*, 2000; Zchori-Fein and Brown, 2002; Thao and Baumann, 2004a, 2004b)。烟粉虱初生共生细菌 16S rDNA 的

系统发育树表明,浙江 B 型烟粉虱与来自以色列及美洲(新大陆)的烟粉虱的初生共生细菌聚为一枝;而非 B 型 ZHJ-1 种群与来自印度和一些非洲国家(旧大陆)的烟粉虱的初生共生细菌聚为另一枝,可以作为浙江烟粉虱 B 型是入侵生物型、而非 B 型 ZHJ-1 种群是本地生物型的一个间接证据。16S rDNA 的系统发育树还表明非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱初生共生细菌与核酸序列登录号为 AF211870 的银叶粉虱 *Bemisia argentifolii* (即 B 型烟粉虱)(Thao *et al.*, 2000) 亲缘关系较近,从一方面体现了烟粉虱种下分化的复杂性。

Clack 等(1992)扩增了 A 型和 B 型烟粉虱初生共生细菌 16S rDNA 的部分序列,在扩出的 1.45 kb 片段中,仅有两个碱基的区别,考虑到测序仪的误差,可以认为它们序列相同。这一结论得到 Campbell(1993)研究结果的支持。而本研究扩出的

浙江 B 型和非 B 型 ZHJ-1 种群烟粉虱初生共生细菌 16S rDNA 的 1.09 kb 片段中相似性仅为 98% 这也许反映了不同地理区域烟粉虱初生共生细菌的序列分化程度不一。

初生共生细菌 16S rDNA 序列富含 AT, 这被认为是共生细菌与寄主昆虫长期协同进化中, 细菌基因组的一个重要特征。浙江 B 型与非 B 型 ZHJ-1 种群的初生共生细菌 16S rDNA 的 G + C 含量与以往研究结果近似 (Zchori-Fein and Brown, 2002; Thao and Baumann, 2004b)。初生内共生菌序列富含 AT, 可能反映了其修复 DNA 能力的退化 (多种 DNA 损伤具有 GC 向 AT 突变的倾向) (Wernegreen and Funk, 2004)。次生共生细菌 16S rDNA 序列的 G + C 含量为 54.1%, 正处于营自由生活细菌的 G + C 含量的范围中。

次生共生细菌与寄主昆虫的共生关系并不长期, 反映了次生共生细菌多次独立感染寄主昆虫的可能及其水平传播方式 (Moran and Telang, 1998; Thao and Baumann, 2004b)。有关次生共生细菌对寄主昆虫的功能研究尚很少。有报道除去豌豆蚜的次生共生细菌 PAUS (Pea Aphid U-type Symbiont) 对蚜虫的适应性并无影响 (Leonardo, 2004)。但更多研究表明, 次生共生细菌可能在寄主昆虫适应植物的能力和竞争能力等方面具有重要作用, 进而间接影响寄主昆虫进化和生物型的形成 (Montllor *et al.*, 2002; Zchori-Fein and Brown, 2002; Leonardo and Muir, 2003; Oliver *et al.*, 2003; Tsuchida *et al.*, 2004)。在本研究所测得的烟粉虱 3 种次生共生细菌中, *Wolbachia* 和杀雄菌属 *Arsenophonus* 有致使寄主昆虫生殖异常的报道 (Gherna *et al.*, 1991; Nirgianaki *et al.*, 2003), 这两种影响寄主昆虫繁殖的细菌在非 B 型 ZHJ-1 种群中检出, 而在 B 型中没有检出。B 型烟粉虱的一个特点就是繁殖力强, 这是否与其缺乏 *Wolbachia* 和杀雄菌属 *Arsenophonus* 有关, 值得进一步研究。

致谢 浙江大学应用昆虫学研究所陈学新教授对系统发育分析提供帮助, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所谢丙炎研究员审阅初稿, 特此谢忱。

参考文献 (References)

Baumann L, Thao ML, Funk CJ, Falk BW, Ng JCK, Baumann P, 2004. Sequence analysis of DNA fragments from the genome of the primary endosymbiont of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Curr. Microbiol.*, 48

(1): 77–81.

- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC, 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu. Rev. Entomol.*, 40: 511–534.
- Campbell BC, 1993. Congruent evolution between whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) and their bacterial endosymbionts based on respective 18S and 16S rDNAs. *Curr. Microbiol.*, 26: 129–132.
- Chou I, 1949. *Listo de la konataj Alewodoj "Homoteroj" en cinio*. *Entomologia Sinica* 3(4): 1–18. [周尧, 1949. 中国粉虱名录. 中国昆虫学, 3(4): 1–18]
- Clark MA, Baumann L, Munson MA, Baumann P, Campbell BC, Duffus JE, Osborne LS, Moran NA, 1992. The eubacterial endosymbionts of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) constitute a lineage distinct from the endosymbionts of aphids and mealybugs. *Curr. Microbiol.*, 25: 119–123.
- Darby AC, Birkle LM, Turner SL, Douglas AE, 2001. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 36(1): 43–50.
- Douglas AE, 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.*, 43(1): 17–37.
- Gherna RL, Werren JH, Wisburg W, Cote R, Woese CR, Mandelco L, Brenner DJ, 1991. *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41: 563–565.
- Leonardo TE, 2004. Removal of a specialization-associated symbiont does not affect aphid fitness. *Ecol. Letters*, 7(6): 461–468.
- Leonardo TE, Muir GT, 2003. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270 (Suppl. 2): S209–S212.
- Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt COI) gene sequences for the identification of biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomol. Sinica*, 45(6): 759–763. [罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 胡敦孝, 张芝利, 2002. 利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报, 45(6): 759–763]
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH, 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.*, 27(2): 189–195.
- Moran NA, Telang A, 1998. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience*, 48(4): 295–304.
- Moran NA, Plague GR, Sandstrom JP, Wilcox JL, 2003. A genomic perspective on nutrient provisioning by bacterial symbionts of insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 14 543–14 548.
- Munson MA, Baumann P, Clark MA, Baumann L, Moran NA, Voegtlin DJ, Campbell BC, 1991. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol.*, 173(20): 6 321–6 324.
- Nirgianaki A, Banks GK, Frohlich DR, Veneti Z, Braig HR, Miller TA, Bedford ID, Markham PG, Savakis C, Bourtzis K, 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Curr. Microbiol.*, 47(2): 93–101.

- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2 699 – 2 702.
- Oliver K, Russell J, Moran N, Hunter M, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(4): 1 803 – 1 807.
- Perring TM, 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*, 20: 725 – 737.
- Sandström J, Moran N, 1999. How nutritionally imbalanced is phloem sap for aphids? *Entomologic Experimentalis et Applicata*, 91(1): 203 – 210.
- Thao ML, Baumann P, 2004a. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr. Microbiol.*, 48: 140 – 144.
- Thao ML, Baumann P, 2004b. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6): 3 401 – 3 406.
- Thao ML, Moran NA, Abbot P, Brennan EB, Burckhardt DH, Baumann P, 2000. Cospeciation of Psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(7): 2 898 – 2 905.
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T, 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5 666): 1 989.
- Weeks AR, Velten R, Stouthamer R, 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270(1 526): 1 857 – 1 865.
- Wernegreen JJ, Funk DJ, 2004. Mutation exposed: a neutral explanation for extreme base composition of an endosymbiont genome. *J. Mol. Evol.*, 59(6): 849 – 858.
- Zang LS, Liu SS, Liu YQ, Chen WQ, 2005. A comparative study on the morphological and biological characteristics of the B biotype and a non-B biotype (China-ZHJ-1) of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) from Zhejiang, China. *Acta Entomol. Sinica*, 48(5): 742 – 748. [臧连生, 刘树生, 刘银泉, 陈伟强, 2005. 浙江 B 型与非 B 型 (China-ZHJ-1) 烟粉虱形态学和生物学特性的比较研究. *昆虫学报*, 48(5): 742 – 748]
- Zchori-Fein E, Brown JK, 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 95(6): 711 – 718.

(责任编辑: 袁德成)