

基于 16S rDNA 基因的中国部分 地区非 B 型烟粉虱系统发育关系分析

沈媛¹, 杜予州^{1,*}, 金桂华², 邱宝利², 郑福山^{1,2}, 任顺祥^{2,*}

(1. 扬州大学应用昆虫研究所, 扬州 225009;

2. 华南农业大学资源环境学院昆虫学系/教育部生物防治工程中心, 广州 510642)

摘要:【目的】烟粉虱 *Bemisia tabaci* 是一个快速进化的复合种。由于近年来烟粉虱危害不断增加, 其生物型问题也越来越受到关注。在我国, 不仅存在危害严重的 B 型烟粉虱, 同时也已发现多种非 B 型烟粉虱。通过鉴定我国部分地区目前发生的烟粉虱生物型种类, 分析它们与世界各地不同生物型之间的关系, 可为我国烟粉虱的生物型检测和综合防治提供依据。【方法】利用 16S rDNA 基因作为分子标记, 鉴定了 2005 年与 2006 年在我国 6 个省份(自治区)采集的 22 个非 B 型烟粉虱样本的生物型, 并探讨了各生物型之间的系统进化关系。【结果】所研究的 22 个非 B 型烟粉虱归属于 Q 型、Nauru 型和 An 型, 3 种生物型之间的遗传距离在 10% 以上, 但是 Q 生物型与 B 生物型之间的亲缘关系最近, 遗传距离在 2.8% ~ 4.0% 范围内; 进化分歧数据还表明, 不同生物型之间的遗传距离明显大于同一生物型内遗传距离, 其中 Q 型内部差异最小, 在 0.9% 以内; 同时结果表明目前在我国多个生物型共同存在是一个普遍的现象, 其中 Nauru 型的分布较广泛; 在云南地区检测到的非 B 型烟粉虱生物型类型最多。【结论】烟粉虱生物型遗传分化复杂, 利用 16S rDNA 基因能有效鉴定烟粉虱的生物型。

关键词: 烟粉虱; 生物型; 16S rDNA; 遗传距离; 系统发育

中图分类号: Q968 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2010)01-0082-09

Phylogenetic analysis of *Bemisia tabaci* non-B biotypes in partial areas in China based on 16S rDNA gene

SHEN Yuan¹, DU Yu-Zhou^{1,*}, JIN Gui-Hua², QIU Bao-Li², ZHENG Fu-Shan^{1,2}, REN Shun-Xiang^{2,*}

(1. Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. College of Natural Resources and Environments, South China Agricultural University/Engineering Research Centre of Biological Control, Ministry of Education, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Aim】*Bemisia tabaci* is a species complex with rapid evolutionary modifications. In recent years, its biotypes gained more attention because of its increasing hazards to the agricultural crops. Previously there were few sympatric non-B biotypes in different regions of China except B biotype. The study described herein provides some theoretical basis for its biotype detection and integrated control by identifying its biotypes which currently prevail in China and their relationship with different biotypes from other countries. 【Methods】The biotypes and phylogenetic relationships of 22 different non-B biotype populations collected from six provinces were studied based on 16S rDNA sequences. 【Results】The results revealed that the 22 different populations of non-B *B. tabaci* belong to Q, Nauru and An biotypes. Evolutionary divergence among these biotypes was more than 10%. The relationship between Q and B biotypes was closest, with genetic distances between 2.8% and 4.0%. The genetic distances among different biotypes were significantly higher than within the same biotype, while Q biotype showed the least genetic distance of 0.9% within itself. It is a universal phenomenon that multiple biotypes prevail in the same region. The Nauru biotype was more widely distributed than the other two biotypes. The highest variety of non-B biotypes was detected in Yunnan province. 【Conclusion】The genetic differentiation of *B.*

基金项目: 公益性行业科研专项——粉虱类害虫可持续治理技术与集成示范(200803005); 国家科技支撑计划项目(2006BAD08A08); 江苏省科技攻关项目(BE2005348)

作者简介: 沈媛, 女, 1982 年生, 江苏人, 博士研究生, 研究方向为外来有害生物和植物检疫, E-mail: sy_1202@tom.com

* 通讯作者 Corresponding authors, Tel.: 0514-87971854; E-mail: yzdu@yzu.edu.cn; rensxcn@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2009-09-10; 接受日期 Accepted: 2009-12-20

tabaci is very complicated. The biotypes of *B. tabaci* can be effectively identified using 16S rDNA gene.

Key words: *Bemisia tabaci*; biotype; 16S rDNA; genetic distance; phylogenesis

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 又称甘薯粉虱、棉粉虱, 属同翅目 (Homoptera)、粉虱科 (Aleyrodidae)、小粉虱属 *Bemisia*, 是热带、亚热带及相邻温带地区重要害虫之一 (Mound and Halsey, 1978; De Barro, 1995)。烟粉虱不仅直接刺吸植物营养, 而且可以传播 110 多种植物病毒 (Jones, 2003)。

20 世纪 50 年代, 一些学者发现不同的烟粉虱种群在某些生物学等方面存在差异, 因此推测烟粉虱可能存在不同的生物型。随着对烟粉虱生物型的深入研究, 已至少鉴定出 24 种生物型, 并认为该虫是一个快速进化的复合种 (Brown *et al.*, 1995; Perring, 2001)。美国和澳大利亚研究人员 (Boykin *et al.*, 2007) 基于线粒体 CO I 基因分析了全球烟粉虱的系统进化, 探讨了不同生物型之间的亲缘关系, 认为该复合种主要包含了 12 个遗传群。

我国早在上世纪 40 年代末就已有了烟粉虱的记录 (Chou, 1949), 但一直为次要害虫。直至上世纪 90 年代中期, 烟粉虱相继在国内大暴发。目前在我国造成严重危害的主要是 B 型烟粉虱 (Wu *et al.*, 2002; 罗晨等, 2002; Qiu *et al.*, 2003; 褚栋等, 2005a); 除此之外, 一些非 B 型烟粉虱在过去几年中也陆续被报道, 如 Qiu 等 (2003) 报道了湖南、湖北、广东、海南等不少地区存在本土型烟粉虱; Q 型烟粉虱自 2003 年后相继在我国云南、浙江、辽宁、山东、北京和江苏等地区发生危害 (褚栋等, 2005b; 徐婧等, 2006; 方华等, 2008; 冯正娣等, 2008); 臧连生等 (2005) 在浙江省发现非 B/Q 型烟粉虱; Nauru、An 型烟粉虱在台湾地区广泛分布 (谢佳宏等, 2005); 最新的研究表明我国至少存在 6 种生物型 (B, Q, ZHJ-1, ZHJ-2, ZHJ-3 和 FJ-1) (万方浩等, 2009)。

由于有些非 B 型烟粉虱具有较强的寄主专一性, 其对特定寄主造成危害更是不容忽视。据报道, Q 型烟粉虱已在海外一些地区造成了非常严重的危害 (Muniz, 2000; Muniz and Gloria, 2001; Nomlbela *et al.*, 2001; Rauch and Nauen, 2003); 同时, 不同生物型的抗药性差异为其防治带来了很大困难, 如 Q 型烟粉虱对吡丙醚、吡虫啉等化学杀虫剂容易产生抗性 (Horowitz *et al.*, 2003; Rauch and

Nauen, 2003)。

如果无法确定不同生物型之间的起源和进化关系, 会很难评估新生物型潜在的入侵危害性。当前, 国内已发现多种烟粉虱生物型的发生和共同危害, 而对其种群遗传学和生物学特性的研究是开展防治的基础, 也是世界烟粉虱系统发育关系研究的一部分。本研究以 16S rDNA 基因作为分子标记, 鉴定了我国不同地区烟粉虱地理种群和寄主种群的生物型, 并探讨了各生物型之间的系统进化关系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

实验所用材料采自我国江苏、广东、广西、云南、海南和贵州 6 个省份, 将采集的烟粉虱成虫或高龄若虫直接浸泡于无水乙醇中, -20°C 冰箱保存备用。参考 De Barro 和 Driver (1997) 方法, 利用 RAPD 分子标记技术鉴定剔除 B 型烟粉虱, 留下 22 个非 B 型样本 (表 1) 作为研究对象。

1.2 试验方法

1.2.1 单头烟粉虱基因组 DNA 提取: 挑取单头烟粉虱置于 0.5 mL 离心管中, 加入 30 μL 裂解液 (1% SDS, 500 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 200 mg/mL 蛋白酶 K 溶液) 研磨成匀浆后放入 56°C 恒温水浴锅中温浴 2~3 h; 再放入 95°C 水浴锅中 10 min, 使蛋白酶失活; 短暂离心后直接置于 -20°C 冰箱中保存备用。

1.2.2 引物序列及 PCR 扩增: 引物采用 Simon 等 (1994) 报道的 16S rDNA 通用引物, 引物序列分别为: LR-J-12887: 5'-CCGGTTTGAAGTCAGATCATGT-3', LR-N-13398: 5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3'。扩增产物为 16S rDNA 基因 3'末端的大小为 500 bp 左右的部分序列。反应程序为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 1.5 min, 50°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1 min, 循环 39 次; 循环结束后在 72°C 下延伸 10 min。

1.2.3 扩增产物检测及测序: 扩增产物检测采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测法 (Sambrook *et al.*, 1992), 然后委托广州英杰生命技术公司纯化、测序, 测序仪为 ABI PRISMTM 3730XL 型, 正反链双向测序旨在最大限度地减少测序的错误。

表 1 非 B 型烟粉虱试验样品
Table 1 Samples of *Bemisia tabaci* non-B biotypes used in this study

样本代码 Sample code	采集地点 Sampling location	寄主 Host	采集日期(年/月) Collecting date (year/month)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
JS-1	江苏宿迁 Suqian, Jiangsu	茄子 <i>Solanum melongena</i>	2006/9	FJ712244
JS-2	江苏大丰 Dafeng, Jiangsu	圆叶牵牛 <i>Ipomoea purpurea</i>	2005/11	FJ712245
JS-3	江苏东台 Dongtai, Jiangsu	茄子 <i>Solanum melongena</i>	2006/10	FJ712246
JS-4	江苏海门 Haimen, Jiangsu	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2005/11	FJ712247
GD-1	广东深圳 Shenzhen, Guangdong	变叶木 <i>Codiaeum variegatum</i>	2005/5	FJ712248
GD-2	广东茂名 Maoming, Guangdong	飞机草 <i>Eupatorium odoratum</i>	2005/10	FJ712249
GD-3	广东龙川 Longchuan, Guangdong	大豆 <i>Glycine max</i>	2005/8	FJ712250
GD-4	广东乳源 Ruyuan, Guangdong	甘薯 <i>Dioscorea esculenta</i>	2005/9	FJ712251
GD-5	广东阳江 Yangjiang, Guangdong	红薯 <i>Ipomoea batatas</i>	2005/10	FJ712252
YN-1	云南昆明 Kunming, Yunnan	一品红 <i>Euphorbia pulcherrima</i>	2005/9	FJ712253
YN-2	云南勐海 Menghai, Yunnan	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2005/8	FJ712254
YN-3	云南临沧 Lincang, Yunnan	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2005/8	FJ712255
YN-4	云南昌宁 Changning, Yunnan	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2005/8	FJ712256
YN-5	云南勐仑 Menglun, Yunnan	番薯 <i>Ipomoea batatas</i>	2005/8	FJ712257
YN-6	云南蒙自 Mengzi, Yunnan	番薯 <i>Ipomoea batatas</i>	2006/10	FJ712258
HN-1	海南五指山 Wuzhishan, Hainan	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	2006/7	FJ712259
HN-2	海南吊罗山 Diaoluoshan, Hainan	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2005/5	FJ712260
GZ-1	贵州榕江 Rongjiang, Guizhou	番薯 <i>Ipomoea batatas</i>	2006/8	FJ712261
GX-1	广西大新 Daxin, Guangxi	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	2005/8	FJ712262
GX-2	广西三江 Sanjiang, Guangxi	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	2006/8	FJ712263
GX-3	广西龙胜 Longsheng, Guangxi	番薯 <i>Ipomoea batatas</i>	2006/8	FJ712264
GX-4	广西龙胜 Longsheng, Guangxi	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	2006/8	FJ712265

1.3 数据分析

将扩增得到的各非 B 型烟粉虱的 16S rDNA 序列, 采用 ContigExpress 软件进行正反链序列拼接, 将拼接好的序列保存为 FASTA 格式, 然后在 NCBI 网站上进行序列同源性比较, 采用 Clustalx1.83 软件(Chenna *et al.*, 2003)进行序列比对。通过 BLAST 方法依据同源性比较的结果, 从 GenBank 下载世界不同地区的代表性烟粉虱种群以及温室白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* 种群的 16S rDNA 基因序列作为参考序列(表 2)。比对结果采用 Mega3.0 软件(Kumar *et al.*, 2004)进行序列组成分析, 基于 Kimura's two-parameter(Kimura, 1980)模型计算各分类单元之间的遗传距离、序列碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点和自裔位点等。采用非加权配对算数平均法(UPGMA)构建系统树, 外群为温室白粉虱(AF110723), 编号为 TV-AF110723,

并用 Bootstrap 1 000 次(Felsenstein, 1985)检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果与序列组成分析

实验准备阶段对江苏种群进行了重复测序, 发现种群内均为同一生物型, 因此, 实验所测序列为各种群单头取样, 经 PCR 扩增成功获得了 22 个种群烟粉虱 16S rDNA 基因的部分序列, 保留片段长度为 522 bp。序列组成分析结果显示, 22 个烟粉虱种群的 16S rDNA 基因序列中 A + T (73.7%) 含量远远高于 G + C (26.3%) 含量, 存在明显的 A + T 含量偏向性, 与典型的昆虫线粒体 DNA 碱基组成一致(Liu and Beckenbach, 1992; Simon *et al.*, 1994)。

表 2 从 GenBank 下载的世界各地烟粉虱代表性地理种群 16S rDNA 基因序列
Table 2 16S rDNA gene sequences of the representative geographical populations of
Bemisia tabaci in the world downloaded from GenBank

编号 Code	地理种群来源 Source of geographical population	种群生物型 Population biotype	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Sudan-SC-AF110720	苏丹 Sudan	—	AF110720
USA-A-AF246651	美国 USA	A	AF246651
Australia-B-AF246636	澳洲 Australia	B	AF246636
Brazil-B-AF246637	巴西 Brazil	B	AF246637
USA-B-AF246640	美国佛罗里达 Florida, USA	B	AF246640
Egypt-Q-AF246639	埃及 Egypt	Q	AF246639
Spain-Q-AF246647	西班牙 Spain	Q	AF246647
Australia-An-AF246635	澳洲 Australia	An	AF246635
Hainan-An-AF246642	中国海南 Hainan, China	An	AF246642
Pakistan-An-AF246646	巴基斯坦 Pakistan	An	AF246646
Turkey-An-AF246650	土耳其 Turkey	An	AF246650
India-Nauru-AF246643	印度 India	Nauru	AF246643
Nauru-Nauru-AF246645	瑙鲁 Nauru	Nauru	AF246645

2.2 不同烟粉虱种群的进化分歧研究

根据 Kimura 2-paramter 模型计算出烟粉虱不同地理种群的进化分歧矩阵(表 3)。总体上看,温室白粉虱和不同地理种群烟粉虱的遗传距离均在 30% 以上,首先被区分出来;在烟粉虱内,A 型烟粉虱与其他非 B 型烟粉虱的遗传距离在 27% ~ 30% 之间,为种内差异最大的种群。其余各烟粉虱种群中,JS-1, JS-2, JS-3, JS-4, YN-1 和 YN-2 与已知的两种 Q 型烟粉虱(Egypt-Q-AF246639 和 Spain-Q-AF246647)的序列差异很小(0.0% ~ 0.9%),与其他烟粉虱的遗传距离差异在 3.0% 以上。HN-1, HN-2, GZ-1, GX-2, GX-3 和 GX-4 与印度 Nauru 型烟粉虱序列完全一致。GD-5 和 GD-4 与印度 Nauru 型烟粉虱遗传距离为 0.23%。同时, GD-2, GD-3, GX-1 及 YN-6 种群与巴基斯坦、中国海南及土耳其的 An 型(AF246646, AF246642 和 AF246650)序列非常相近,同源性非常高,达到 99% 以上,小于 An 型的内部差异(7.1%)。

2.3 基于 16S rDNA 基因序列构建系统发育树

22 个非 B 型烟粉虱种群之间的系统进化关系见图 1。从系统进化树可以看出,22 个非 B 型烟粉虱与所引用的 13 个种群明显分为 4 组。其中第 1 组为 GX-3, HN-1, GZ-1, GX-2, HN-2, GX-4, GD-5, GD-4, GD-1, YN-4, YN-3 和 YN-5 与 India-Nauru-AF246643, Sudan-SC-AF110720 和 Nauru-Nauru-AF246645 以 99% 的置信度聚在一起,成为 Nauru 型

烟粉虱的一个分支。第 2 组为 JS-3, YN-1, JS-1, YN-2, JS-2 和 JS-4 与 Egypt-Q-AF246639 和 Spain-Q-AF246647 以 99% 的置信度聚为一分支,这一分支为 Q 型烟粉虱。然后此 Q 型烟粉虱分支与 Brazil-B-AF246637, USA-B-AF246640 和 Australia-B-AF246636 3 个 B 型烟粉虱以 100% 的置信度聚在一起,成为进化树中第 2 组。第 3 组为 GX-1, YN-6, GD-3 和 GD-2 与 Turkey-An-AF246650, Pakistan-An-AF246646, Hainan-An-AF246642 和 Australia-An-AF246635 以 99% 的置信度聚在一起,表明上述几种中国烟粉虱种群为 An 型烟粉虱;最后 USA-A-AF246651A 型烟粉虱单独成为一支,为进化树的第 4 组。可见,所研究的 22 个非 B 型烟粉虱种群分别归属于 An, Nauru 和 Q 型。同时由图 1 可见,同一生物型内部的不同种群之间的关系也相当复杂,如 Nauru 组中还包含 3 个小分支,其中广西、广东、贵州和海南的种群关系较近,与云南种群关系较远。

本研究所检测的 22 个烟粉虱种群采集于中国的江苏、广东、广西、云南、海南和贵州 6 个省。22 个烟粉虱种群中共有 12 个为 Nauru 型,其中广东有 3 个,云南有 3 个,海南有 2 个,贵州 1 个,广西 3 个,占所检测种群的 54.55%; 6 个种群为 Q 型,其中江苏有 4 个,云南 2 个,占所检测种群的 27.27%; 其余 4 个种群为 An 型,其中广东有 2 个,云南 1 个,广西 1 个,占所检测种群的 18.18%。

表3 不同烟粉虱种群基于16S rDNA基因序列的进化分歧

Table 3 Evolutionary divergence of different populations of *Bemisia tabaci* based on 16S rDNA

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]	[36]		
[1]																																						
[2]	0.000																																					
[3]	0.000 0.000																																					
[4]	0.000 0.000 0.000																																					
[5]	0.002 0.002 0.002 0.002																																					
[6]	0.002 0.002 0.002 0.002 0.000																																					
[7]	0.002 0.002 0.002 0.002 0.000 0.000																																					
[8]	0.009 0.009 0.009 0.009 0.007 0.007 0.007																																					
[9]	0.035 0.035 0.035 0.035 0.033 0.033 0.033 0.040																																					
[10]	0.030 0.030 0.030 0.030 0.028 0.028 0.028 0.035 0.005																																					
[11]	0.030 0.030 0.030 0.030 0.028 0.028 0.028 0.035 0.005 0.000																																					
[12]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099																																					
[13]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.000																																					
[14]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.000 0.000																																					
[15]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.000 0.000 0.000																																					
[16]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.000 0.000 0.000 0.000																																					
[17]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.000 0.000 0.000 0.000																																					
[18]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002																																					
[19]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002																																					
[20]	0.110 0.110 0.110 0.110 0.107 0.107 0.107 0.115 0.105 0.099 0.099 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.002																																					
[21]	0.113 0.113 0.113 0.113 0.110 0.110 0.110 0.118 0.102 0.099 0.099 0.057																																					
[22]	0.113 0.113 0.113 0.113 0.110 0.110 0.110 0.118 0.102 0.099 0.099 0.057																																					
[23]	0.124 0.124 0.124 0.124 0.121 0.121 0.121 0.129 0.110 0.108 0.108 0.057																																					
[24]	0.124 0.124 0.124 0.124 0.121 0.121 0.121 0.129 0.110 0.108 0.108 0.057																																					
[25]	0.124 0.124 0.124 0.124 0.121 0.121 0.121 0.129 0.110 0.108 0.108 0.057																																					
[26]	0.129 0.129 0.129 0.129 0.126 0.126 0.126 0.135 0.116 0.113 0.113 0.062																																					
[27]	0.137 0.137 0.137 0.137 0.134 0.134 0.134 0.142 0.123 0.120 0.118																																					
[28]	0.139 0.139 0.139 0.139 0.137 0.137 0.137 0.145 0.126 0.123																																					
[29]	0.142 0.142 0.142 0.142 0.139 0.139 0.139 0.148 0.128 0.126																																					
[30]	0.139 0.139 0.139 0.139 0.137 0.137 0.137 0.145 0.126 0.123																																					
[31]	0.137 0.137 0.137 0.137 0.134 0.134 0.134 0.142 0.123 0.120 0.118																																					
[32]	0.139 0.139 0.139 0.139 0.137 0.137 0.137 0.145 0.126 0.123																																					
[33]	0.137 0.137 0.137 0.137 0.134 0.134 0.134 0.142 0.129 0.126																																					
[34]	0.125 0.125 0.125 0.125 0.123 0.123 0.123 0.131 0.120 0.117																																					
[35]	0.279 0.279 0.279 0.279 0.276 0.276 0.276 0.279 0.283 0.283 0.283 0.289																																					
[36]	0.347 0.347 0.347 0.347 0.344 0.344 0.344 0.355 0.326 0.333 0.333 0.319																																					

[1]: JS-1; [2]: JS-2; [3]: JS-4; [4]: YN-2; [5]: JS-3; [6]: YN-1; [7]: Egypt-Q-AF246639; [8]: Spain-Q-AF246647; [9]: Brazil-B-AF246637; [10]: USA-B-AF246640; [11]: Australia-B-AF246636; [12]: HN-2; [13]: GX-4; [14]: GX-2; [15]: GX-3; [16]: GZ-1; [17]: HN-1; [18]: GD-5; [19]: GD-4; [20]: India-Nauru-AF246643; [21]: GD-1; [22]: Sudan-SC-AF110720; [23]: YN-3; [24]: YN-4; [25]: YN-5; [26]: Nauru-Nauru-AF246645; [27]: GD-2; [28]: Turkey-An-AF246650; [29]: Pakistan-An-AF246646; [30]: Hainan-An-AF246642; [31]: GX-1; [32]: YN-6; [33]: GD-3; [34]: Australia-An-AF246635; [35]: USA-A-AF246651; [36]: Tv-AF110723.

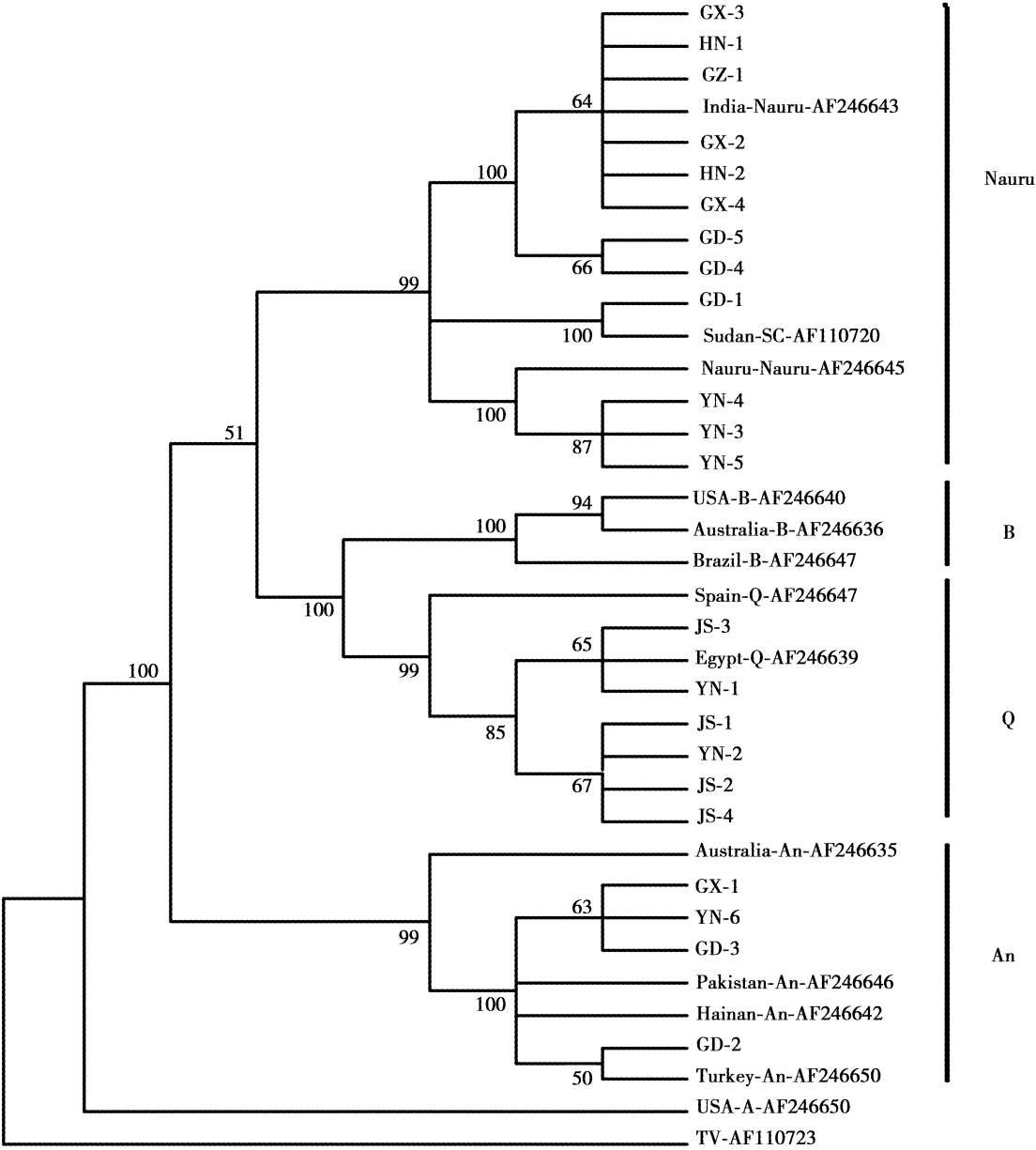


图 1 利用 UPCMA 法构建的非 B 型烟粉虱 16S rDNA 进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of the non-B *Bemisia tabaci* populations based on 16S rDNA

3 讨论

随着分子生物学技术的发展，线粒体基因作为一种快速进化的分子标记，已成为研究生物进化的重要手段 (Avise *et al.*, 1987, 1994; Moritz *et al.*, 1987; Harrison, 1989; Simon, 1991)，mtDNA 序列的结果已成为许多系统学研究的参考标准 (Caterino *et al.*, 2000)。16S 基因是线粒体 DNA (mtDNA) 2 个 rRNA 基因之一，因其具有较强的分析和鉴别能

力，因而在无脊椎动物系统与进化学及种类鉴别中广泛应用，目前已有很多类群利用该基因探讨昆虫的系统发育研究 (Funk, 1999; Gomez-Zurita, 2004; Robillard and Desutter-Grandcolas, 2006; Schutze *et al.*, 2007)。目前，鉴定烟粉虱生物型的分子方法主要包括线粒体细胞色素氧化酶 I (mitochondrial DNA cytochrome oxidase I, CO I)、核糖体 ITS1 (ribosomal DNA internal transcribed spacer 1) 及微卫星 (simple sequence repeat, SSR) 等技术 (Frohlich *et al.*, 1999; De Barro *et al.*, 2000, 2003; Qiu *et al.*,

2003, 2007; De Barro, 2005)。

国内一些学者基于 mtDNA-COI 基因研究发现了一些非 B 型烟粉虱, 如 Cv 型、ZHJ-1 型、ZHJ-2 型等, 笔者也将这些生物型进行比较, 发现 ZHJ-1 型、ZHJ-2 型与 Nauru 型属于一个进化分支(沈媛, 未发表数据)。由于缺乏数据, 未将这些生物型的 16S rDNA 基因进行比较, 但是生物型鉴定结果与其他基因的研究结果较为一致, 可以相互印证。本研究基于 16S rDNA 基因对烟粉虱生物型的鉴定进行了探讨和分析, 旨在丰富烟粉虱生物型的分子鉴定的手段和方法, 同时也可以为烟粉虱的防治提供基础资料。本研究的结果表明基于 16S rDNA 基因也能有效鉴定烟粉虱的生物型。

从分子系统树中可以看出, 所研究的 22 个烟粉虱种群被明显区分为 3 个大的分支, 分别与 Q 型、Nauru 型和 An 型聚在一起, 我们可以初步判定 22 个烟粉虱种群分属 3 个不同的生物型。当然, 利用不同分子标记分析的烟粉虱种群系统进化关系可能略有差异, 如谢佳宏等(2005)利用 16S 基因鉴定台湾烟粉虱生物型的结果表明, 基于 16S rDNA 基因所建的系统树与 mtDNA-COI、rDNA-ITS1 两个基因的研究结果有些不符。其研究中构建的分子系统树显示生物型 A 为单起源, 最早分化出来, 生物型 An 相对于 B、Q 等其他生物型也较早出现。本研究结果与谢佳宏等(2005)的结论一致。其原因可能是 16S rDNA 基因是相对保守的基因, 更适合于上游系统发育树的分析。

遗传距离的分析结果显示, 烟粉虱与外群温室白粉虱的遗传距离最大, 生物型 B 与 Q、Nauru 和 An 3 种生物型的遗传距离分别为 2.8% ~ 4.0%, 10% ~ 11.3% 和 11.7% ~ 12.9%, 表明生物型 Q 与生物型 B 之间的亲缘关系较为接近, 本结果中 Nauru 型、AN 型其内部分别出现了遗传分化较大的亚支系, 其遗传分化分析有待于进一步的数据积累和分析; 生物型 Q 与生物型 Nauru 和生物型 An 的遗传距离分别为 10.7% ~ 13.5% 和 12.5% ~ 14.8%; 生物型 Nauru 和生物型 An 的遗传距离为 10.23% ~ 11.79%。可见不同生物型之间的遗传距离绝大多数在 10% 以上, 具有明显的遗传分化。同时表明生物型 An 与其他几个生物型之间的亲缘关系较远。与系统树的结果一致。遗传距离的分析结果同时显示, 同一生物型内部的亲缘关系远近也存在差异, 其中 Q 型内部差异在 0.91% 以内, Nauru 型在 6.44% 以内, An 型在 7.13% 以内, 这也从另一

个侧面反映了烟粉虱生物型遗传分化的复杂性。

本研究中烟粉虱采集地点距离较远, 涉及地区较多, 生物型分布结果显示, 在除江苏以外的 5 个省份中均检测到生物型 Nauru, 在广东、广西和云南 3 个省份中检测到生物型 An, 在江苏和云南检测到生物型 Q。云南地区同时检测到 3 种非 B 型烟粉虱, 广东和广西检测到 Nauru 和 An 两个生物型, 江苏和海南也分别检测到两种生物型。Muhammad 等(2009)研究也发现, 在广东和云南存在土著种群和 B 型、Q 型共存的现象, 在广东没有采集到 Q 型烟粉虱。可见, 烟粉虱不同生物型的分布是不均匀的, 同时多种生物型共同存在是一种非常普遍的现象。

本研究的目的在于鉴定我国非 B 型烟粉虱的种类和分布及其之间的系统发育关系, 亲缘关系较近的种群往往在抗药性、寄主范围、天敌种类等方面有着一定的共性, 研究结果可为生产上防治烟粉虱提供一定的理论参考。如 Kirk 等(2000)通过研究发现西班牙的烟粉虱种群与美国 B 型烟粉虱亲缘关系相近, 从西班牙采集的桨角蚜小蜂比美国本地种寄生能力强, 在 Texas 州、California 州成功控制了 B 型烟粉虱; 而由于泰国烟粉虱种群与美国种群亲缘关系较远, 从泰国采集的寄生蜂最终没有能够在上述两州建立种群。

烟粉虱不同生物型的危害和扩散能力不一致, 本研究中检测出的 3 种非 B 型烟粉虱中, 生物型 Q 已经在国内外一些地区造成了严重的危害, 比 B 型烟粉虱具有更强的危害性(Muniz, 2000; Muniz and Gloria, 2001; Nombela *et al.*, 2001; 褚栋等, 2005b; 徐婧等, 2006; 付海滨等, 2007)。

虽然本研究采集烟粉虱的地点和样本数量有限, 但是, 结果对于生产实践具有很重要的意义, 在今后的研究中, 必须重视对烟粉虱生物型的监测, 不能忽视已在国内存在的非 B 型烟粉虱的发生, 同时加强检疫工作, 防止其他非 B 型烟粉虱的入侵及扩散, 减少暴发成灾的几率, 避免造成严重的危害。

参 考 文 献 (References)

- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489–522.
- Avice JC, Nelson WS, Sugita H, 1994. A speciation history of “living fossils”: Molecular evolutionary patterns in horseshoe crabs.

- Evolution*, 48(6): 1 986 – 2 001.
- Boykin LM, Shatters RCJr, Rosell RC, McKenzie CL, Bagnall RA, De Barro P, Frohlich DR, 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44(3): 1 306 – 1 319.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC, 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Ann. Rev. Entomol.*, 40: 511 – 534.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH, 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Ann. Rev. Entomol.*, 45: 1 – 54.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD, 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3 497 – 3 500.
- Chou I, 1949. List of whitefly species in China. *J. Chin. Entomol.*, 3: 1 – 18. [周尧, 1949. 中国产粉虱科名录. 中国昆虫学杂志, 3: 1 – 18]
- Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2005a. Sequence analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Sci. Agric. Sin.*, 38(1): 76 – 85. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 朱国仁, 2005a. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学, 38(1): 76 – 85]
- Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, 2005b. Identification for Yunnan Q-biotype *Bemisia tabaci* population. *Chin. Bull. Entomol.*, 42(1): 54 – 56. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 2005b. 云南 Q 型烟粉虱种群的鉴定. 昆虫知识, 42(1): 54 – 56]
- De Barro PJ, 1995. *Bemisia tabaci* biotype B: A review of its biology, distribution and control. *CSIRO Technical Paper*, 36: 58.
- De Barro PJ, 2005. Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 14(12): 3 695 – 3 718.
- De Barro PJ, Driver F, 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.*, 36(2): 149 – 152.
- De Barro PJ, Driver F, Trueman JWH, Curran J, 2000. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 16(1): 29 – 36.
- De Barro PJ, Scott KD, Graham GC, Lange CL, Schutze MK, 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Mol. Ecol. Notes*, 3(1): 40 – 43.
- Fang H, Chu D, Fu HB, Cong B, 2008. Biotype determination and survey of *Bemisia tabaci* in Shenyang International Horticultural Exposition. *J. Shenyang Agric. Univ.*, 39(2): 169 – 173. [方华, 褚栋, 付海滨, 丛斌, 2008. 沈阳世界园艺博览会发现的烟粉虱种群的生物型鉴定. 沈阳农业大学学报, 39(2): 169 – 173]
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783 – 791.
- Feng ZD, Lin FG, Cai CG, 2008. Occurrence and control techniques of *Bemisia tabaci* Q-biotype on leafy vegetables. *Anhui Agric. Sci. Bull.*, 14(19): 179 – 181. [冯正娣, 林付根, 蔡长庚, 2008. Q 型烟粉虱在叶菜类蔬菜上的发生特点与防治技术. 安徽农学通报, 14(19): 179 – 181]
- Frohlich DR, Torres-Jerez I, Bedford ID, Markham PG, Brown JK, 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.*, 8(10): 1 683 – 1 691.
- Fu HB, Chu D, Li JH, Geng QH, Sun WP, 2007. Q-biotype *Bemisia tabaci* population was found in Shenyang International Horticultural Exposition in 2006. *Plant Quarantine*, 11(6): 388. [付海滨, 褚栋, 李俊环, 耿庆华, 孙文鹏, 2007. 2006 年沈阳世界园艺博览会园区发现 Q 型烟粉虱的危害. 植物检疫, 11(6): 388]
- Funk DJ, 1999. Molecular systematics of cytochrome oxidase I and 16S from *Neochlamisus* leaf beetles and the importance of sampling. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1): 67 – 82.
- Gomez-Zurita J, 2004. Molecular systematics and time-scale for the evolution of *Timarcha*, a leaf-beetle genus with a disjunct Holarctic distribution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32(2): 647 – 665.
- Harrison RG, 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.*, 4(1): 6 – 11.
- Horowitz AR, Gorman K, Ross G, Denholm I, 2003. Inheritance of pyriproxyfen resistance in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q biotype). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 54(4): 177 – 186.
- Hsieh CH, Wang CH, Ko CC, 2005. Identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Taiwan based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Formosan Entomol.*, 25(4): 255 – 267. [谢佳宏, 王重雄, 柯俊成, 2005. 台湾地区烟草粉虱 (*Bemisia tabaci*) 生物小种之线粒体 16S rDNA 分子鉴定. 台湾昆虫, 25(4): 255 – 267]
- Jones DR, 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109(3): 195 – 219.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111 – 120.
- Kirk AA, Lacey LA, Brown JK, Ciomperlik MA, Goolsby JA, Vacek DC, Wendel LE, Napompeh B, 2000. Variation in the *Bemisia tabaci* SL: Species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. *Bull. Entomol. Res.*, 90(4): 317 – 327.
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5(2): 150 – 163.
- Liu H, Beckenbach AT, 1992. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among ten orders of insects. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1(1): 41 – 52.
- Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mtDNA COI) gene sequenced for the identification for biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomol. Sin.*, 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]
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 18: 269–292.
- Mound LA, Halsey SH, 1978. Whitefly of the World. British Museum and John Wiley & Sons, London. 278–340.
- Muhammad ZA, Shen Y, Jin GH, Ren SX, Du YZ, Qiu BL, 2009. Population and host plant differentiation of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), in East, South and Southwest China. *Acta Entomol. Sin.*, 52(10): 1 132–1 138.
- Muniz M, 2000. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomol. Exp. Appl.*, 95(1): 63–70.
- Muniz M, Gloria N, 2001. Differential variation in development of the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environ. Entomol.*, 30(4): 720–727.
- Nombela G, Beitia F, Muniz M, 2001. A differential interaction study of *Bemisia tabaci* Q biotype on commercial tomato varieties with or without the *Mi* resistance gene, and comparative host responses with the B biotype. *Ent. Exp. Appl.*, 98(3): 339–344.
- Perring TM, 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.*, 20 (9): 725–737.
- Qiu BL, Coats SA, Ren SX, Dris AM, Xu CX, Brown JK, 2007. Phylogenetic relationships of native and introduced *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) from China and India based on mtCOI DNA COI sequencing and host plant comparisons. *Prog. Nat. Sci.*, 17(6): 645–654.
- Qiu BL, Ren SX, Wen SY, Mandour NS, 2003. Biotypic identification of the populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China using RAPD-PCR. *Acta Entomol. Sin.*, 46(5): 605–608.
- Rauch N, Nauen R, 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 54(4): 165–176.
- Robillard T, Desutter-Grandcolas L, 2006. Phylogeny of the cricket subfamily Eneopterinae (Orthoptera, Grylloidea, Eneopteridae) based on four molecular loci and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 40(3): 643–661.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1992. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 304–314.
- Schutze MK, Yeates DK, Graham GC, Dodson G, 2007. Phylogenetic relationships of antlered flies, *Phytalmia* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae): the evolution of antler shape and mating behaviour. *Aust. J. Entomol.*, 46 (4): 281–293.
- Simon C, 1991. Molecular systematics at the species boundary: Exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals *via* direct sequencing from amplified DNA. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW eds. *Molecular Techniques in Taxonomy*. Springer Verlag, Berlin. 33–72.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651–701.
- Wan FH, Zhang GF, Liu SS, Luo C, Chu D, Zhang YJ, Zang LS, Jiu M, Lu ZC, Cui XH, Zhang LP, Zhang F, Zhang QW, Liu WX, Liang P, Lei ZR, Zhang YJ, 2009. Recent advances on 973: Invasive mechanism and control foundation of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Sci. China, Ser. C Life Sci.*, 39(2): 141–148. [万方浩, 张桂芬, 刘树生, 罗晨, 褚栋, 张友军, 臧连生, 纠敏, 吕志创, 崔旭红, 张丽萍, 张帆, 张青文, 刘万学, 梁沛, 雷仲仁, 张永军, 2009. B 型烟粉虱的入侵机理与控制基础——国家重点基础研究发展计划“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”进展. 中国科学 C 辑: 生命科学, 39(2): 141–148]
- Wu XX, Hu DX, Li ZX, Shen ZR, Li ZX, Shen ZR, 2002. Using RAPD-PCR to distinguish biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China. *Entomol. Sin.*, 9(3): 1–8.
- Xu J, Wang WL, Liu SS, 2006. The occurrence and infestation of *Bemisia tabaci* biotype Q in partial regions of Zhejiang province. *Plant Prot.*, 32(4): 121. [徐婧, 王文丽, 刘树生, 2006. Q 型烟粉虱在浙江局部地区大量发生危害. 植物保护, 32(4): 121]
- 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. Sin.*, 48(5): 742–748. [臧连生, 刘树生, 刘银泉, 陈伟强, 2005. 浙江 B 型与一非 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]

(责任编辑: 袁德成)