湖北省烟粉虱生物型鉴定*

陈 冲 马 娟 王欣茹 覃春华 李建洪**

(华中农业大学植物科学技术学院 武汉 430070)

摘 要 本研究利用 mtDNA COI 基因片段作标记,通过序列分析对湖北省烟粉虱 *Bemisa tabaci* (Gennadius)生物型进行了鉴定。结果表明当阳、仙桃、天门、监利、宜昌和武汉 6 个地理种群烟粉虱的 720 bp COI 基因序列的同源性高达 100%,且该 6 个地理种群烟粉虱与 USA-Q 型烟粉虱、湖北 Q 型烟粉虱的同源性也高达 100%。枣阳地区烟粉虱与 Israel-B 型烟粉虱、我国浙江 B 型烟粉虱、我国湖北 B 型烟粉虱的同源性为 100%。由此可见当阳、仙桃、天门、监利、宜昌和武汉 6 个地区烟粉虱生物型属于 Q 型,仅枣阳地区烟粉虱属于 B 型。

关键词 烟粉虱,生物型,基因序列,同源性

The identification of biotypes of *Bemisia tabaci* in Hubei Province

CHEN Chong MA Juan WANG Xin-Ru QIN Chun-Hua LI Jian-Hong**

(College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract Mitochondrial cytochrome oxidase I (mtDNA COI) gene sequences were utilized to identify biotypes of *Bemisa tabaci* (Gennadius) in Hubei Province. Of the 720 bp COI sequences examined, those from populations in Dangyang, Xiantao, Tianmen, Jianli, Yichang and Wuhan had as much as 100% similarity. COI sequences of *B. tabaci* from these six sites were also 100% similar to those of the Q biotype from the USA and Hubei Province. COI sequences of specimens of a *B. tabaci* population from Zaoyang were 100% similar to specimens of the B biotype from Israel, Zhejiang and Hubei Province. I conclude that *B. tabaci* from Dangyang, Xiantao, Tianmen, Jianli, Yichang and Wuhan are of the Q biotype where those from Zaoyang are the B biotype.

Key words *Bemisia tabaci*, biotype, gene sequence, homology

烟粉虱 *Bemisa tabaci* (Gennadius)属同翅目 Homoptera,粉虱科 Aleyrodidae,小粉虱属 *Bemisia*,起源热带和亚热带地区,已在亚洲、欧洲、非洲、中北美、南美等 90 多个国家和地区广泛分布并成为主要的农业害虫(Brown *et al.*,1995)。烟粉虱为多食性害虫,寄主十分广泛,随着研究的深入和烟粉虱的扩散危害,烟粉虱的寄主植物不断增加,而且烟粉虱还具有繁殖力强、抗药性强、存活力强、传播病毒广泛,导致其危害成为全球性的严重问题,并造成了严重的经济损失。

我国烟粉虱最早记载于 20 世纪 40 年代(周尧,1949),近年来,烟粉虱在我国迅速扩展蔓延,广泛分布于我国 22 个省(直辖市、自治区)(罗晨等,2002;邱宝利等,2003;褚栋等,2005)。其中以 B 型烟粉虱危害最重,但近几年的研究发现,自 2003 年首次在云南昆明发现 Q 型烟粉虱以来,2004 年相继在北京、河南郑州、浙江等地区发现 Q 型烟粉虱(褚栋等,2005;徐婧等,2006)。

线粒体 DNA(mt DNA)等被广泛用来研究昆虫的系统发育关系,研究证实线粒体细胞色素氧化酶 I(COI)基因的差异能有效反映烟粉虱的生物型及其地理模式(Frohlich *et al.*,1999; Kirk *et al.*,2000)。因此本研究利用 mtDNA COI 分子标记技术对湖北省烟粉虱生物型进行了鉴定,旨在了解湖北省烟粉虱的生物型及其地理分布情况,另外由于烟粉虱生物型与抗药性有关,因此本研究对于烟粉虱的综合治理和抗性治理也具有一定的指导意义。

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200903033)。

** 通讯作者,E-mail:jianhl@mail.hzau.edu.cn

收稿日期:2010-04-12,接受日期:2010-07-09

1　材料与方法

1.1　采集时间与地点

烟粉虱地理种群于 2008 年或 2009 年采自武汉、宜昌、当阳、枣阳、天门、监利和仙桃,每点选取 10 头烟粉虱成虫用于生物型鉴定(表 1)。

1.2　试验方法

1.2.1　单头烟粉虱总 DNA 的提取　参照周志湘等(2007)等氯仿/异戊醇抽提法进行单头烟粉虱总 DNA 的提取。

表 1　烟粉虱样品来源

Table1　Sources of *B. tabaci*

采集地点 Collection location	种群代码 Population code	寄主植物 Host plant	采集虫态 Stage	采集时间 Collection date
武汉武昌区	WH	露地棉花	成虫	2008.9
宜昌猇亭区	YC	大棚茄子	成虫	2008.10
当阳朱湾村	DY	露地黄瓜	成虫	2008.9
枣阳张湾村	ZY	露地茄子	成虫	2008.9
天门薛熊滩村	TM	露地棉花	成虫	2009.9
仙桃杨岗村	XT	露地茄子	成虫	2008.9
监利汪桥镇莲台村	JL	露地棉花	成虫	2009.9

1.2.2　PCR 反应　PCR 扩增所用引物为通用引物,上游引物 C1-J-2195 (5′-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT3′),下游引物 L2-N-3014 (5′-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3′) (Simon *et al.*,1994)。扩增产物为 mtDNA COI 基因 3′末端的大小为 840 bp 左右的部分序列。PCR 反应体系,其中 10 × PCR Buffer(Mg^{2+} Plus) 3.0 μL、dNTP Mixture (10mmol/L) 1.0 μL、Taq 酶 (5U/μL) 0.5 μL、引物 C1-J-2195 (20 μmol/L) 1.0 μL、引物 L2-N-3014 (20 μmol/L) 1.0 μL、模板 DNA 2.0 μL、加 ddH_2O 至 30.0 μL。PCR 反应体系于 94 ℃变性 3 min,然后进行 36 个循环:94 ℃变性 1 min;50 ℃退火 1 min;72 ℃延伸 1 min,然后再 72 ℃延伸 5 min。所用 PCR 仪型号,BIONEER A-2040,韩国。反应产物置于 4 ℃冰箱保存。

1.2.3　电泳检测及测序　用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物及其分子量大小,电泳缓冲液为 0.5 × TAE,电压为 80V。电泳结束,EB 染色后于凝胶成像仪(Tanon1600R,上海天能科技有限公司)观察。然后委托北京六合华大基因科技股份有限公司进行双向测序。

1.3　数据分析

(1)测序结果,首先采用 ContigExpress 软件并结合测序峰值图对每个样品得到的正反两向序列进行拼接校对,得到烟粉虱 mtDNA COI 基因的完整序列。然后利用 BLAST 与 GenBank 中的同源序列进行比较,确定为所需要的目的基因序列。

(2)运用 MEGA3.1 软件,以非洲小粉虱 *Bemisia afer* 为外群,根据 Kimura2-paramter 模型计算烟粉虱不同地理种群的进化分歧矩阵,使用加权配对法(UPGMA)作系统聚类分析,并用 Bootstrap 1 000次检验分子系统树各分支置信度。

2　结果与分析

2.1　mtDNA COI 基因 PCR 产物扩增检测结果

经过对烟粉虱 mtDNA COI 基因的扩增表明,PCR 产物大小约为 840 bp,与预计中的产物大小相近,无非特异性条带的产生,电泳图见图 1。

2.2　生物型分析

通过 BLAST 方法从 GenBank 选择下载世界代表性地理种群烟粉虱的 mtDNA COI 基因序列(表 2)。用 Clustal X 多序列对位排列程序将本实验所得到的湖北地区烟粉虱不同地理种群和世界各地代表性地理种群烟粉虱的 mtDNA COI 基因序列进行对位排列,从中截取 720 bp 并保存。

从表 3 可以看出,非洲小粉虱和不同种群烟粉虱的遗传距离均在 20% 以上,首先和烟粉虱种群区分开来。当阳、仙桃、天门、监利、宜昌和武汉 6 个地理种群烟粉虱 COI 基因序列的同源性高达 100%,且该 6 个地理种群烟粉虱与 USA-Q 型烟粉

虱、湖北 Q 型烟粉虱的同源性也高达 100%，而与 Spain-Q 型烟粉虱、浙江 Q 型烟粉虱的同源性为 99.9%，720 个碱基中仅有 1 个碱基差异；枣阳地区烟粉虱与 Israel-B 型烟粉虱、浙江 B 型烟粉虱、湖北 B 型烟粉虱的同源性为 100%，而与 USA-B 型烟粉虱的同源性为 95.9%。

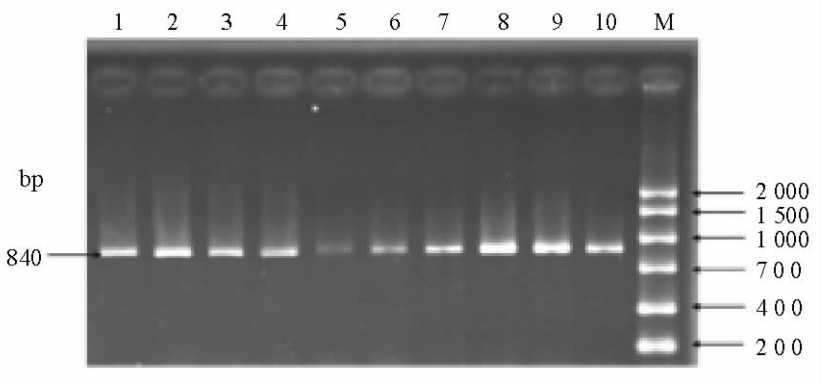


图 1 烟粉虱 mtDNA COI 基因 PCR 产物扩增带

Fig. 1 PCR band of mtDNA COI of *B. tabaci*

M: DL2000 DNA Marker; 1 号泳道-10 号泳道分别为随机取样的烟粉虱样品的 mtDNA COI 基因 PCR 产物扩增带，分别依次为武汉-05 号，宜昌-01 号，当阳-03 号，枣阳-08 号，天门-02 号，仙桃-07 号，监利-04 号，宜昌-06 号，枣阳-10 号，武汉-09 号。

Lane 1 to Lane 10 are the PCR band of mtDNA COI of *B. tabaci* randomly, in turn were Lane 1: WH-05, Lane 2: YC-01, Lane 3: DY-03, Lane 4: ZY-08, Lane 5: TM-02, Lane 6: XT-07, Lane 7: JL-04, Lane 8: YC-06, Lane 9: ZY-10, Lane 10: WH-09.

表 2 世界代表性地理种群烟粉虱 mtDNA COI 基因序列

Table 2 The sequences of mtDNA COI of *B. tabaci* typical populations

地理种群 Geographical location	登录号 Access No.	生物型 Biotype	编号 Acronym
Spain	DQ365874	Q	Spain-Q_DQ365874
USA	EF080823	Q	USA-Q_EF080823
China HuBei	EU376987	Q	China-HuB-Q_EU376987
China ZheJiang	GQ139500	Q	China-ZJ-Q_GQ139500
Israel	EU760719	B	Israel-B_EU760719
USA	EU099430	B	USA-B_EU099430
China ZheJiang	AJ867555	B	China-ZJ-B_AJ867555
China HuBei	EU376994	B	China-HuB-B_EU376994
China JiangSu	AY686088	NB	China-JS-NB_AY686088
China HuBei	AY686089	NB	China-HuB-NB_AY686089
China XinJiang	AJ784260	–	China-XJ-B. afer_AJ784260

由此可见，湖北当阳、仙桃、天门、监利、宜昌和武汉 6 个地区烟粉虱生物型属于 Q 型，仅枣阳地区烟粉虱属于 B 型。

3 讨论

本研究通过 mtDNA COI 基因序列分析鉴定了湖北省 7 个代表性地区烟粉虱的生物型。结果表明：当阳、仙桃、天门、监利、宜昌和武汉 6 个地区烟粉虱生物型属于 Q 型，枣阳地区烟粉虱属于 B 型。近几年的研究发现，Q 型烟粉虱也存在从其起源地伊比利亚半岛逐渐向世界各地区扩展蔓延的趋势。2003 年，我国首次在云南昆明一品红上发现了 Q 型烟粉虱，2004 年又相继在北京海淀区、河南郑州发现 Q 型烟粉虱（褚栋等，2005；徐婧等，2006）。Q 型烟粉虱在一些蔬菜作物上的危害比 B 型更大、更严重，在一些杂草上 Q 型也比 B 型

优势更高(Khasdan *et al.*,2005)。在西班牙的东南部,由于新烟碱类农药的广泛使用,Q 型烟粉虱并未被生殖力更强的 B 型烟粉虱所取代,发生反而有增加的趋势。B 型和 Q 型烟粉虱有不同的抗药性水平,据报道昆虫生长调节剂类、新烟碱类农药的使用能够影响两个种群的比例(Muniz and Gloria,2001),且 Q 型具有高抗药性水平,能够造成巨大经济损失(Muniz,2000)。

表 3　不同烟粉虱地理种群基于 mtDNA COI 基因序列的进化分歧

Table 3　Evolutionary divergence of different *B. tabaci* population based on mtDNA CO I nucleotide

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
[1] DY																		
[2] XT	0.000																	
[3] TM	0.000	0.000																
[4] JL	0.000	0.000	0.000															
[5] YC	0.000	0.000	0.000	0.000														
[6] WH	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
[7] Spain-Q_DQ365874	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001												
[8] USA-Q_EF080823	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001											
[9] China-HuB-Q_EU376987	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000										
[10] China-ZJ-Q_GQ139500	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.001									
[11] ZY	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.055								
[12] Israel-B_EU760719	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.055	0.000							
[13] USA-B_EU099430	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.096	0.094	0.094	0.096	0.041	0.041						
[14] China-ZJ-B_AJ867555	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.055	0.000	0.000	0.041					
[15] China-HuB-B_EU376994	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.055	0.000	0.000	0.041	0.000				
[16] China-JS-NB_AY686088	0.148	0.148	0.148	0.148	0.148	0.148	0.148	0.148	0.148	0.150	0.129	0.129	0.168	0.129	0.129			
[17] China-HuB-NB_AY686089	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.174	0.176	0.167	0.167	0.213	0.167	0.142		
[18] China-XJ-B. afer_AJ784260	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.247	0.249	0.253	0.253	0.300	0.253	0.253	0.269	0.264	

因此,加强对湖北地区烟粉虱抗药性及其生物型的监控,研究其综合治理措施非常迫切。通过系统聚类树分析发现,本研究选取湖北 7 个地区烟粉虱的生物型,其中 6 个地区烟粉虱为 Q 型,仅枣阳地区为 B 型,这与以上研究结果一致的,湖北地区 Q 型烟粉虱很可能为外来入侵害虫,其发源地应该与中国其他地区的 Q 型烟粉虱一致。湖北地区的 Q 型烟粉虱可能通过寄主植物的国际贸易等途径,从发生 Q 型的其它地区传入后扩散。为了防止这些烟粉虱生物型的扩散蔓延,对其寄主植物进行严格检疫十分必要。

参考文献(References)

Brown JK,Costa S,Bedford ID,Markham PG,Bird J,Frohlich DR,1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly,*Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera:Aleyrodidae). *Biochem. Genet.*,(3):205—214.

褚栋,毕玉平,张友军,娄蕴萍,2005. 烟粉虱生物型研究进展. 生态学报,25(12):3398—3405.

Frohlich DR,Tomes JI,Bedford ID,Markham PG,Brown JK,1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*,8(10):1683—1691.

Khasdan V,Levin I,Rosner A,Morin S,Kontsedalov S,Maslenin L,Horowitz AR,2005. DNA markers for identifying Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and studying population dynamic. *Bull. Entomol. Res.*,(95):605—613.

Kirk AA,Lacey LA,Brown JK,Ciomperlik MA,Goolsby JA,Vacek DC,Wendel LE,Napompeth B,2000. Variation in the *Bemisia tabaci* species complex (Hemiptera:Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. *Bull. Entomol. Res.*,(90):317—327.

罗晨,姚远,王戎疆,闫凤鸣,胡敦孝,张芝利,2002. 利用 mtDNA CO I 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报,45(6):59—763.

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 B2 and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweet pepper at constant temperatures. *Environ. Entomol.*, 30(4): 720—727.

邱宝利,任顺祥,肖燕,温硕洋,Mandour NS,2003. 国内烟粉虱 B 生物型的分布及其控制措施研究. 华东昆虫学报, 12(2): 27—31.

Simon C, Frati F, Bechenbach 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): 651—701.

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,3(4): 121.

周尧,1949. 中国粉虱名录. 中国昆虫学杂志,3(4): 1—18.

周志湘,万方浩,张桂芬,陈斌,2007. 烟粉虱基因组 DNA 快速提取方法. 植物保护,33(5): 131—133.