

B 和 Q 型烟粉虱种群竞争与抗药性的关系^{*}

武淑文 王震宇 吴益东^{**}

(南京农业大学植物保护学院昆虫学系 农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室 南京 210095)

Competition between the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* and its relevance to insecticide resistance.

WU Shu-Wen, WANG Zhen-Yu, WU Yi-Dong^{**} (College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects (Ministry of Agriculture of China), Nanjing 210095, China)

Abstract The insecticide resistance of specimens of a mixed population of the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) collected in Hangzhou, Zhejiang Province, was monitored for several generations. When the population was reared on cotton without insecticides for 10 generations, the proportion of B-type to Q-type individuals in the F₀ population was similar, however the B-type completely replaced the Q-type in the F₁₀ population. Resistance to imidacloprid, abamectin and fipronil in the F₁₀ population was significantly reduced compared with the F₀ population, but resistance to α -cypermethrin was similar between the F₀ and F₁₀ populations. These results indicate that the B-type is competitively superior to the Q-type in the absence of insecticide selection pressure under laboratory conditions. However, the Q-type is competitively superior in field conditions where neonicotinoids are widely used, presumably because it has greater potential to develop resistance to neonicotinoids than the B-type.

Key words *Bemisia tabaci*, biotype, population competition

摘 要 在室内用棉花植株饲养情况下,对采自浙江杭州的烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) B 型和 Q 型混合种群的生物型组成以及抗药性水平进行了多代的监测。在室内饲养的 F₀ 代,两种生物型比例相当;在 F₁₀ 代, Q 型已经完全被 B 型所取代。与 F₀ 代相比, F₁₀ 代烟粉虱种群对吡虫啉、阿维菌素和氟虫腈的抗性水平明显下降,而对 α -氯氰聚酯的抗性保持稳定。该研究表明:在没有杀虫剂选择压力的室内条件下, B 型比 Q 型更具生存优势。然而在烟碱类杀虫剂广泛使用的田间条件下,烟粉虱 Q 型因比 B 型对烟碱类杀虫剂具有更强的抗性而获得竞争优势。

关键词 烟粉虱,生物型,种群竞争

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 广泛分布于除南极洲以外的 90 多个国家,是一种杂食性害虫,其寄主植物超过 600 余种,包括棉花、多种蔬菜以及多种观赏植物和花卉^[1,2]。烟粉虱为害方式多样,不仅可以直接吸取植物汁液、分泌蜜露,还可以传播多种植物病毒,给农业生产带来了严重的危害^[3,4]。烟粉虱是一个处于快速进化中的复合种,包括多个生物型。到目前为止,世界范围内已报道的生物型有 26 种,其中 B 型 (biotype B) 和 Q 型 (biotype Q) 是传播最广、为害最严重的两个生物型^[5,6]。B 型烟粉虱被世界自然保护联盟列为全球最具危害性

的 100 种入侵物种之一^[7]。19 世纪 90 年代, B 型烟粉虱随着观赏植物的国际贸易入侵到我国,种群迅速扩大,并且在多个地区暴发成灾^[8]。Zhang 等 (2005) 对我国 11 个省的烟粉虱生物型进行了监测,发现大部分地区烟粉虱的生物型均为 B 型, Q 型仅在云南和北京存在^[9]。而在此期间, Q 型烟粉虱逐渐从其发源地伊比利亚半岛扩散到德国、摩洛哥、美国、中

^{*} 资助项目: 973 课题 (2006CB102003)。

^{**} 通讯作者, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期: 2010-07-12, 修回日期: 2010-08-11

美洲以及中国等地^[10,11],并在一些地区取代了 B 型烟粉虱。虽然 Q 型烟粉虱的迅速扩散并且成功取代其他生物型的例子已有多篇报道,但是对于其取代机制的研究还较少^[12,13]。

杀虫剂的筛选作用可能是不同生物型烟粉虱种群取代的一个重要原因。20 世纪 90 年代以来,新烟碱类杀虫剂(包括吡虫啉等)被广泛用于田间烟粉虱的防治,在连续多年过量使用该类杀虫剂后,我国烟粉虱的生物型组成也发生了较大的变化。笔者于 2008 年至 2009 年对中国多个地区的烟粉虱生物型进行了监测,发现大部分地区的烟粉虱生物型为 Q 型,B 型已经很难找到(数据未发表)。采自以色列棉田对吡丙醚高抗的烟粉虱品系用新烟碱类杀虫剂筛选后,其对吡丙醚的抗性可以得到维持,并且 Q 型在种群中占优势;而在不用任何药剂筛选的情况下,经过 20 代连续饲养,其对吡丙醚的抗性几乎消失,B 型在种群中占优势^[14]。该研究表明,Q 型在新烟碱类杀虫剂和吡丙醚的选择压力下具有生存优势。

本文以采自浙江省杭州市的 B 型和 Q 型烟粉虱混合种群为材料,在不施用任何杀虫剂情况下,以两种生物型均适合生存的棉花为寄主植物,连续多代监测了种群生物型的变化,初步分析了杀虫剂的筛选作用与烟粉虱 B/Q 生物型替代的相关性。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

烟粉虱混合生物型种群(HZ-QB):2009 年 8 月采自浙江省杭州市郊蔬菜基地辣椒上,初始种群数量 1 000 头左右(B 型:Q 型 $\approx$ 1:1)。

烟粉虱敏感品系(NJ-B):2002 年 7 月采自南京农业大学卫岗校区试验温室内,一直在温室不接触药剂饲养多代。

烟粉虱敏感品系(SUD-S):由德国 Bayer Cropscience 公司 Dr. Ralf Nauen 惠赠。

所有烟粉虱品系均在温室内养虫笼内(170 cm $\times$ 170 cm $\times$ 90 cm)用无虫棉苗饲养,棉花品种为泗棉 8 号(常规棉),每笼放置 4 株 4

~5 叶期的棉苗,并于每代烟粉虱成虫期进行更换。温室温度保持在 25~35℃。

1.2 供试杀虫剂

70% 吡虫啉 WDG(浙江海正化工股份有限公司),25% 噻虫嗪 WP(先正达作物保护有限公司),5% α -氯氰聚酯 EC(广东省蔬菜杀虫剂研究中心),2.5% 多杀菌素 SC(陶氏益农公司),2% 阿维菌素 EC(广东省蔬菜杀虫剂研究中心),5% 氟虫腈 EC(广东省蔬菜杀虫剂研究中心)。

1.3 单头烟粉虱 DNA 提取以及生物型鉴定

1.3.1 单头烟粉虱 DNA 提取 在混合生物型烟粉虱种群(HZ-QB)F₀、F₂、F₄、F₆、F₈、F₁₀代(2009 年 8 月至 2010 年 5 月)对其生物型组成进行监测。分别选取棉苗顶部、中部以及下部叶片上的成虫(不分雌雄)各 10 头进行测定。

烟粉虱 DNA 提取参考王利华^[15]的方法,稍加改动。取烟粉虱雌成虫 1 头,置于滴有 20 μ L 碱裂解液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),20 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1% SDS)的封口膜上,用 0.2 mL 的离心管底部将烟粉虱充分研磨匀浆,将匀浆液吸入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中并向管中加入 2 μ L 0.02 mg/L 的蛋白酶 K,充分混匀后,65℃ 水浴 1 h。每管加入 178 μ L 的双蒸水,100℃ 水浴 5 min,灭活蛋白酶 K。取 100 μ L 提取液,加入 200 μ L 预冷的无水乙醇,冰浴 2 h,10 000 g 离心 20 min,倒出上清液,室温晾干 DNA 沉淀。每管中加入 20 μ L 缓冲液(pH 8.0)溶解 DNA,用作 PCR 反应的模板。

1.3.2 种群生物型鉴定 烟粉虱生物型鉴定采用 mtDNA CO I 序列分析法,引物设计参考 Simon 等(1994)的文献^[16],序列如下:C1-J-2195:5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3'; L2-N-3014: 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCA-TATTA-3'。25 μ L 的 PCR 反应体系中包含 12.5 μ L 2 $\times$ Long Master Mix,各 1 μ L 上下游引物(10 μ mol/L),5 μ L DNA 模板以及 5.5 μ L 灭菌水。PCR 扩增条件为:94℃ 变性 3 min,然后进行 30 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,扩增产物为CO I 基因3'末端的部分序列,大小为800 bp 左右。PCR 纯化产物送至上海 Life technology 公司双向测序,测序结果用 GeneDoc 专业软件进行比对分析。

1.4 抗药性测定(浸叶法)

生物测定参考 Morin 和 Williamson^[17] (2002)的方法并稍加改动。首先将新鲜棉花叶片打成直径为3.5 cm 的圆片,在系列浓度药液中浸渍20 s 后自然晾干。将晾干后的叶片正面向下铺在直径为3.5 cm 塑料培养皿中(培养皿内预先倒入1%的琼脂)。将25头烟粉虱雌成虫接到棉叶上,盖上盖子,1 h 后检查接入的雌成虫的状况,若已死亡则不计入接入虫数中。检查完毕后将培养皿倒置于27℃、RH 60%的培养箱中,48 h 后检查死亡率。每个浓度设3个重复。采用死亡率机率值分析法计算毒力回归线和致死中浓度 LC_{50} (mg/L)。

2 结果与分析

2.1 种群生物型组成的鉴定

将PCR 纯化产物双向测序,得到约800 bp 序列。取其中650 bp 与 GenBank 中登录的烟粉虱 mtDNA CO I 序列进行比较,发现杭州种群可分为两个进化支,其中一支与美国 Arizona B 型 (GenBank 登录号:AY057123) 比较,仅相差一个碱基,同源率为99.8%,为同一生物型。另一个进化支与西班牙 Q 型 (GenBank 登录号:AY587513) 比较,有5个碱基的差异,同源率为99.2%,为同一生物型。在测定的30头烟粉虱中,只存在B型和Q型两种生物型。

2.2 混合种群生物型比例组成的变化规律

在2009年8月(F_0)利用 mtDNA CO I 序列分析法对混合种群中随机选取的30头烟粉虱成虫(不分雌雄)进行测定,结果表明所测定的30头中16头为Q型,14头为B型,比例接近,Q型个体占到53%左右。在随后的测定中发现, F_2 、 F_4 和 F_6 代中Q和B型所占比例相差不大;到 F_8 代,B型个体数量明显增加,达到73% (22/30);而在 F_{10} 代,所检测30头个体均

为B型(图1)。

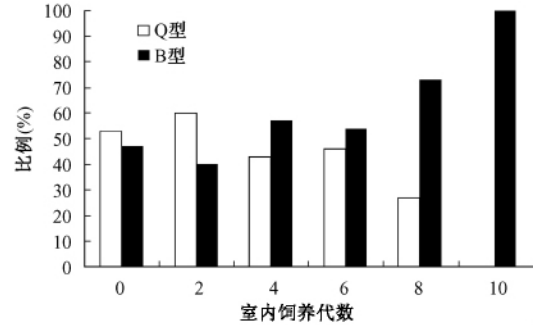


图1 烟粉虱混合种群生物型变化规律

2.3 抗药性水平的变化

在2009年8月(F_0)测定了种群抗药性,此后又在 F_{10} 对其抗性进行了测定(表1)。经过10代室内饲养后,烟粉虱种群对吡虫啉抗性下降的幅度最大(由1 100倍降至575倍);对阿维菌素和氟虫腈的敏感性也有明显下降(以 LC_{50} 的95%置信限是否重叠为判断标准);而对 α -氯氰菊酯的抗性没有明显变化。

3 讨论

Perring (1995)^[18]和 McKenzie 等(2002)^[19]认为,大多数竞争性取代是由多个机制引起的,而B型烟粉虱的竞争取代机制包括资源利用竞争和干扰竞争。刘金燕等(2008)将其中涉及的主要因素归纳为:生态位竞争、寄主适应能力的差异、非对称交配互动、逆境适应能力(如高温等)的差异、杀虫剂敏感性的差异以及与双生病毒互作6个方面^[20]。

本文所设定的竞争取代实验采用棉花这种对于B型和Q型烟粉虱适应性相近的植物为寄主,保证棉花无任何其他昆虫以及植物病毒侵染,采用密封养虫笼,在温度较为恒定的试验温室内饲养,所以可以排除寄主植物适应性不同、传播病毒能力差异、生态位差异以及逆境适应能力等因素的影响,将生物型竞争取代的影响因素限定到了一个较小的范围之内。作者的研究结果表明,在没有杀虫剂选择压力的条件下,B型烟粉虱具备更高的生存优势,而且伴随着Q型烟粉虱的消失,种群的抗药性明显下

降;这表明 Q 型个体天然比 B 型个体具有较高的抗药性,这种较高的抗药性可能是 Q 型烟粉虱在入侵我国之前就具有的,并为 Q 型烟粉虱

在用药过度的田间条件下生存提供极为有利的选择优势。

表 1 混合种群 F₀ 和 F₁₀ 代对代表性杀虫剂的抗性水平

杀虫剂	品系	斜率	致死中浓度(95%置信限)(mg/L)	抗性倍数
吡虫啉	NJ-B	2.34 ± 0.21	0.99 (0.83 – 1.17)	
	HZ-QB-F ₀	2.32 ± 0.25	1 117.46 (753.05 – 2640.71)	1 100
	HZ-QB-F ₁₀	1.02 ± 0.11	570.01 (495.05 – 621.25)	575
α-氯氰菊酯	SUD-S	1.14 ± 0.18	1.04 (0.65 – 1.69)	
	HZ-QB-F ₀	1.96 ± 0.22	631.56 (443.85 – 1071.45)	610
	HZ-QB-F ₁₀	2.25 ± 0.35	695.15 (601.55 – 755.45)	668
阿维菌素	NJ-B	2.64 ± 0.44	0.13 (0.09 – 0.17)	
	HZ-QB-F ₀	2.96 ± 0.25	0.36 (0.31 – 0.41)	2.7
	HZ-QB-F ₁₀	1.04 ± 0.17	0.19 (0.10 – 0.25)	1.5
氟虫腈	NJ-B	2.10 ± 0.37	1.91 (1.36 – 2.64)	
	HZ-QB-F ₀	2.01 ± 0.17	15.88 (11.67 – 21.51)	8
	HZ-QB-F ₁₀	2.27 ± 0.25	11.05 (10.49 – 11.45)	5.8

在田间条件下,Q 型烟粉虱对 B 型的取代可能存在多个因素。许多研究结果都表明,不同生物型烟粉虱对寄主植物适应能力有较大的差异。Muniz(2000)报道,与 B 型烟粉虱相比,Q 型在某些杂草上有更强的生殖力、更快的发育速度,产卵量、化蛹率以及羽化率也明显高于 B 型^[21]。Nombela 等(2001)报道 Q 型烟粉虱在番茄上的为害力明显强于 B 型^[22]。同样,不同生物型的烟粉虱对于高温等的逆境适应能力也有一定的差异。最近的一项研究表明,在 25℃ 条件下,两种生物型烟粉虱的基因表达情况存在较大的差异,B 型中的耐热基因以及与耐受胁迫相关的基因明显低于 Q 型,而且,当把 B 型烟粉虱置于 40℃ 条件下,其各个基因表达会有迅速增高^[23]。这表明,在常温条件下,Q 型烟粉虱的许多与耐受不良环境相关的基因已经表达,所以比 B 型更容易适应新的环境^[23]。此外,抗药性的差异可能也是 Q 型烟粉虱取代 B 型的主要原因之一,烟粉虱不同生物型间的抗药性差异明显。有报道表明,与 B 型相比,Q 型烟粉虱对生长调节剂吡丙醚的抗药性更高,对新烟碱类杀虫剂吡虫啉的抗性更稳定^[24,25]。

对于非对称交配互作对竞争取代的影响,在 B 型烟粉虱对土著烟粉虱的竞争性取代中

研究较多。研究表明,无论是在适宜 B 型烟粉虱生存的寄主植物上还是在不利于其生存的寄主植物上,B 型烟粉虱都可以成功取代土著烟粉虱^[26]。但在 B 型和 Q 型的相互作用中,是否也存在非对称交配现象需要进一步研究。

综上所述,可以假设田间存在以下的过程:对杀虫剂具有天然高抗性的 Q 型烟粉虱在成功入侵我国生态系统后,过量施用杀虫剂的田间条件为其生存提供了竞争优势,所以 Q 型得以迅速扩散,甚至排挤掉 B 型。在室内停止施用杀虫剂后,B 型烟粉虱的竞争优势更为明显,可以完全取代 Q 型。当然这个过程还存在许多影响因素,需要进行进一步深入的研究。特定杀虫剂的筛选作用可能在田间 Q 型烟粉虱对 B 型的取代中起到了重要的作用。

参 考 文 献

1 Olivera M. R. V. ,Henneberry T. J. ,Anderson P. History , current status ,and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 2001 **20**(9) :709 ~ 723.

2 Liu S. S. ,De Barro P. J. ,Xu J. ,et al. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science* 2007 **318**(5 857) :1 769 ~ 1 772.

3 Bedford I. D. ,Briddon R. W. ,Brown J. K. , et al. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different

- geographic regions. *Ann. Appl. Biol.*, 1994, **125**: 311 ~ 325.
- 4 Schuster D. J. , Mueller T. F. , Kring J. B. , *et al.* Relationship of the sweet potato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. *Hortscience*, 1990, **25**: 1 618 ~ 1 620.
 - 5 Simon B. , Genis J. L. , Demichelis S. , *et al.* Survey of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Italy with the description of a new biotype (T) from *Euphorbia characias*. *Bull. Entomol. Res.*, 2003, **93**: 259 ~ 264.
 - 6 Delatte H. , Reynaud B. , Granier M. , *et al.* A new silverleaf-inducing biotype M of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. *Bull. Entomol. Res.*, 2005, **95**: 29 ~ 35.
 - 7 刘树生. 非对称交配互作驱动 B 型烟粉虱的广泛入侵及对土著烟粉虱的取代. 中国基础科学, 2008, **2**: 20 ~ 21.
 - 8 罗晨, 姚远, 王戎疆, 等. 利用 mtDNA CO I 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报, 2002, **45**(6): 759 ~ 763.
 - 9 Zhang L. P. , Zhang Y. J. , Zhang W. J. , *et al.* Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *J. Appl. Entomol.*, 2005, **129**: 121 ~ 128.
 - 10 Nauen R. , Denholm I. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2005, **58**: 200 ~ 215.
 - 11 Martinez-Carrillo J. L. , Brown J. K. First report of the Q biotype of *Bemisia tabaci* in southern Sonora , Mexico. *Phytoparasitica*, 2007, **35**: 282 ~ 284.
 - 12 Pascual S. , Callejas C. Intra- and interspecific competition between biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Spain. *Bull. Entomol. Res.*, 2004, **94**: 369 ~ 375.
 - 13 Brown J. K. The *Bemisia tabaci* complex: Genetic and phenotypic variation and relevance to TYLCV-vector interactions. In: Czosnek H. (ed.). Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management , Molecular Biology , Breeding for Resistance. Dordrecht , The Netherlands: Springer, 2007. 25 ~ 56.
 - 14 Horowitz A. R. , Kontsedalov S. , Khasdan V. , *et al.* Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2005, **58**: 216 ~ 225.
 - 15 王利华. 烟粉虱对高效氯氰菊酯和阿维菌素抗性的生化和分子机理. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2007.
 - 16 Simon C. , Frati F. , Beckenbach A. , *et al.* Evolution , weighting , and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1994, **87**: 651 ~ 701.
 - 17 Morin S. , Williamson M. S. Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**: 1 781 ~ 1 791.
 - 18 Perring T. M. Biological differences of two species of *Bemisia* that contribute to adaptive advantage. In: Gerling D. , Mayer R. T. (eds.). *Bemisia* 1995: Taxonomy , Biology , Damage Control and Management. Andover , Hants , UK: Intercept Ltd. , 1995. 3 ~ 15.
 - 19 McKenzie C. L. , Shatters R. G. J. , Doostda R. H. , *et al.* Effect of geminivirus infection and *Bemisia* infestation on accumulation of pathogenesis related proteins in tomato. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2002, **49**: 203 ~ 214.
 - 20 刘金燕, 张桂芬, 万方浩, 等. 烟粉虱种内及种间竞争取代机制. 生物多样性, 2008, **16**(3): 214 ~ 224.
 - 21 Muniz M. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomol. Exp. Appl.*, 2000, **95**(1): 63 ~ 70.
 - 22 Nombela G. , Beitia F. , Muniz M. 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. *Entomol. Exp. Appl.*, 2001, **98**: 339 ~ 344.
 - 23 Mahadav A. , Kontsedalov S. , Czosnek H. , *et al.* Thermotolerance and gene expression following heat stress in the whitefly *Bemisia tabaci* B and Q biotypes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2009, **39**: 668 ~ 676.
 - 24 Nauen R. , Stumpf N. , Elbert A. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci*. *Pest Manag. Sci.*, 2002, **58**: 868 ~ 875.
 - 25 Rauch N. , Nauen R. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2003, **54**: 165 ~ 176.
 - 26 林克克. B 型烟粉虱与 ZHJ2 型土著烟粉虱在菜豆上的竞争取代. 硕士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2009.