



薛延韬, 张毅波, 张焱, 等. 烟粉虱及其优势寄生蜂内共生菌的种类及系统发育分析 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (4): 741 - 751.

烟粉虱及其优势寄生蜂内共生菌的种类及系统发育分析

薛延韬^{1,2}, 张毅波², 张焱^{1,2}, 张桂芬², 刘怀¹, 万方浩^{2*}, 葛金燕³

(1. 西南大学植物保护学院, 昆虫及害虫控制工程重庆市重点实验室, 重庆 400715;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 3. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128)

摘要: 为了研究入侵我国的 2 个主要烟粉虱隐种 *Bemisia tabaci* MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂 (浅黄恩蚜小蜂 *Encarsia sophia*、丽蚜小蜂 *E. formosa*、海氏桨角蚜小蜂 *Eretmocerus hayati*) 体内感染内共生菌的种类丰度, 并进一步探讨其系统发育关系, 本文利用分子生物学手段对昆虫体内细菌的 16S rRNA 基因序列进行扩增、测序和分析, 并采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 分别构建优势内共生菌的系统发育树。结果表明, 烟粉虱 2 个隐种内共生菌的种类丰度大于其 3 种优势寄生蜂, 3 种优势寄生蜂中丽蚜小蜂内共生菌的种类丰度最高; 同源性分析发现烟粉虱和寄生蜂所携带的 *Rickettsia* 基因同源性达到 99%, 属于 *Rickettsia bellii* 种, 进一步的进化树分析也发现所研究物种的 *Rickettsia* 和 *Hamiltonella* 均可各自聚为同一进化分支。烟粉虱及其优势寄生蜂体内含有种类丰富的内共生菌, 其中优势内共生菌 *Rickettsia* 和 *Hamiltonella* 各自亲缘关系很近, 说明内共生菌在烟粉虱和寄生蜂间可能进行水平传播。

关键词: 烟粉虱; 寄生蜂; 内共生菌; 16S rRNA; 系统发育

中图分类号: Q968; S476+.3

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2017) 04-0741-11

Diversity and phylogenetic affiliation of endosymbionts from *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and its dominant parasitoids

XUE Yan-Tao^{1,2}, ZHANG Yi-Bo², ZHANG Yan^{1,2}, ZHANG Gui-Fen², LIU Huai¹, WAN Fang-Hao^{2*}, GE Jin-Yan³ (1. Chongqing Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Plant Protection Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To determine the diversity and phylogenetic affiliation of endosymbionts harboured by two mainly invasive cryptic species *Bemisia tabaci* MEAM1 and MED and its three dominant parasitoids (*Encarsia sophia*, *En. formosa*, *Eretmocerus hayati*), the 16S rRNA gene sequences of the endosymbionts was cloned, sequenced and analyzed using molecular biology methods. Phylogenetic trees based on the sequences of the dominant endosymbionts were constructed with Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML). The results showed that the symbiotic diversity of *B. tabaci* MEAM1 and MED was greater than those of the three dominant parasitoids. Among three dominant parasitoids, the diversity of

基金项目: 国家重点研发专项 (2016YFC1202100); 中国博士后基金面上基金 (2015M570183); 泰山学者项目; 国家国际科技合作专项资助 (2015DFG32300)

作者简介: 薛延韬, 男, 1992 年生, 硕士研究生, 研究方向为入侵生物学, E-mail: yantao_xue@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wanfanghao@caas.cn

收稿日期 Received: 2017-07-17; 接受日期 Accepted: 2017-07-31

endosymbionts in *En. formosa* was the highest. In the homology analysis, the *Rickettsia* in the five insect species had 99% similarity, and all belonged to *Rickettsia bellii* group. The phylogenetic trees showed that the *Rickettsia* in the five insect species were clustered together, and the *Hamiltonella* showed similar results. It suggested that *B. tabaci* and its three dominant parasitoids contained a variety of endosymbionts, and the dominant endosymbionts *Rickettsia* in the five insect species have a close genetic relationship, which is conformed to the *Hamiltonella*, indicating that the endosymbionts could occur horizontal transmission between *B. tabaci* and parasitoids.

Key words: *Bemisia tabaci*; parasitoids; endosymbionts; 16S rRNA; phylogenetic

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 属于半翅目 Hemiptera, 粉虱科 Aleyrodidae, 是一种典型的高度多食性的刺吸式害虫, 同时也是一种世界性的入侵害虫, 其可通过直接取食植物韧皮部汁液、传播 110 多种植物病毒以及分泌蜜露诱发霉污病等方式为害作物, 每年可导致数十亿美元的经济损失 (Brown *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2016)。烟粉虱是一个独特的、复杂的复合种, 由至少 36 个形态上难以区分的隐种组成 (Boykin *et al.*, 2007; De Barro *et al.*, 2010; Dinsdale *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Firdaus *et al.*, 2013)。其中, “中东-小亚细亚 1” 隐种 (Middle East-Asia Minor 1, 简称 MEAM 1, 以前称之为 “B 型”) 和 “地中海” 隐种 (Mediterranean, 简称 MED, 以前称之为 “Q 型”) 是世界范围内的 2 个主要入侵烟粉虱隐种 (Tay *et al.*, 2012), 在过去的 30 多年里, 在全世界造成了巨大的农业损失 (Dalton *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015)。

在我国, 烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种是分布最广泛、为害最严重的 2 个入侵隐种 (Pan *et al.*, 2011)。MEAM1 隐种于 20 世纪 90 年代中后期传入, 并且很快地取代了本地种, 而 MED 隐种于 2003 年第一次在我国云南昆明发现 (Chu *et al.*, 2006)。之后, MED 隐种逐渐取代 MEAM1 隐种成为我国田间的主要发生种 (Chu *et al.*, 2010; Teng *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011)。MEAM1 隐种具有较强的入侵能力和竞争力, 而 MED 隐种具有较强的抗药性 (Horowitz *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2004; Dennehy *et al.*, 2010)。随着化学农药的大范围使用, 烟粉虱的抗药性也逐渐增强。为了避免进入农药使用量增加和抗药性增强的恶性循环, 利用生防作用物开展烟粉虱生物防治成为了当前的研究热点。生防作用物中, 寄生性天敌又是最重要的组成部分。烟粉虱的寄生性天敌主要分布

于恩蚜小蜂属 *Encarsia* 和桨角蚜小蜂属 *Eretmocerus*, 其中应用较为广泛的优势寄生蜂有丽蚜小蜂 *Encarsia formosa*, 浅黄恩蚜小蜂 *Encarsia sophia* 以及海氏桨角蚜小蜂 *Eretmocerus hayati* 3 种。

烟粉虱体内携带有种类丰富的内共生菌, 目前已报道有 8 种/属 (Shan *et al.*, 2016)。不同烟粉虱隐种所携带的次生内共生菌 (Secondary endosymbiont) 种类不同, 包括 “*Candidatus Hamiltonella defense*” (Zchori-Fein *et al.*, 2002), “*Candidatus Wolbachia sp.*” (Nirgianaki *et al.*, 2003), *Arsenophonus sp.* (Zchori-Fein *et al.*, 2002), “*Candidatus Fritschea bemisiae*” (Everett *et al.*, 2005), “*Candidatus Cardinium hertigii*” (Weeks *et al.*, 2003), *Rickettsia sp.* (Gottlieb *et al.*, 2006) 和 “*Candidatus Hemipteriphilus asiaticus*” (Bing *et al.*, 2013)。但是, 它们都携带有相同的且能够为其提供维持生命活动所必需的营养物质的初生内共生菌 (Primary endosymbiont) “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” (Sloan *et al.*, 2012)。近年来, 越来越多的研究表明, 烟粉虱体内内共生菌在其种群扩散和入侵方面发挥了重要作用。比如, 有研究发现双重感染 *Rickettsia-Arsenophonus* 或 *Wolbachia-Arsenophonus* 的烟粉虱 MED 隐种比只感染 *Arsenophonus* 的烟粉虱 MED 隐种对啮虫脘、噻虫嗪、吡虫啉和螺甲螨酯的敏感性较高 (Ghanim *et al.*, 2009), 表明内共生菌可能与烟粉虱的抗药性相关。Brumin 等 (2011) 发现在以色列的烟粉虱 MEAM1 隐种种群中, 热激情况下分布于类菌体外部的 *Rickettsia* 会降低, 而处于类菌体内部的 *Portiera* 和 *Hamiltonella* 几乎不受影响; 而 Shan 等 (2014) 发现在中国的烟粉虱 MEAM1 隐种种群中, 在高温处理下处于类菌体内部的 *Portiera* 和 *Hamiltonella* 均降低, 而分散的 *Rickettsia* 几乎不受影响, 这表明内共生菌可能与烟粉虱的耐热性相关。因此, 以次生内共生菌作为对象来研究烟粉

虱的生物学特性、入侵能力及对隐种间取代的影响成为了当前的热点 (Chu *et al.*, 2011; Himler *et al.*, 2011)。

除了烟粉虱外, 许多研究也围绕共生菌在烟粉虱的优势寄生蜂中的传播和功能展开。Chiel 等 (2009) 研究表明 *Rickettsia* 在寄生蜂 *Eretmocerus emiratus* 和 *Eretmocerus eremicus* 体内没有进入卵母细胞, 仅局部存在于卵泡细胞, 所以 *Rickettsia* 无法在这两种寄生蜂体内进行垂直传播, 在寄生蜂 *Encarsia pergandiella* 体内也只是短暂存在于消化道中, 并在化蛹前排出体外; 同时, 水平传播实验的结果则表示寄生蜂通过与感染 *Rickettsia* 的烟粉虱接触后能够普遍获菌, 但是一旦离开含菌粉虱, 寄生蜂的感菌率又会急剧下降 (Ma *et al.*, 2004)。烟粉虱与寄生性天敌之间大多都是专性寄生, 对于烟粉虱及其寄生蜂共同携带的内共生菌种类和系统发育的研究, 将有助于更加明确内共生菌在烟粉虱和寄生蜂之间的传播方式, 以期为深入研究寄生蜂对烟粉虱的防控提供理论基础。

为了明确入侵我国的 2 个主要烟粉虱隐种 *Bemisia tabaci* MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂 (浅黄恩蚜小蜂 *En. Sophia*、丽蚜小蜂 *En. formosa*、海氏浆角蚜小蜂 *Er. hayati*) 体内感染内共生菌的种类和丰度, 并探讨其系统发育关系, 本文采用分子生物学手段, 通过克隆扩增出昆虫体内细菌的 16S rRNA 基因序列, 连接转化后, 经基因测序明确内共生菌的种类和丰度, 并利用生物信息学的相关方法进行基因同源性分析, 进一步对优势内共生菌开展系统发育分析。研究结果能够明确烟粉虱和寄生蜂体内感染内共生菌的种类和丰度, 以及内共生菌在“烟粉虱-寄生蜂”种群间可能的传播途径, 为今后烟粉虱及其优势寄生蜂内共生菌的深入研究提供参考, 也有助于研究人员进一步理解内共生菌在“粉虱-寄生性天敌”互动中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试昆虫

烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种种群采自河北省廊坊市中国农业科学院植物保护研究所廊坊中试基地, 不同隐种通过线粒体细胞色素氧化酶 I 基因 (mtDNA-CO I) 进行检测鉴定后, 分别用笼罩

单独饲养, 并定期通过 RAPD-PCR 进行检测; 3 种寄生蜂分别为海氏浆角蚜小蜂、浅黄恩蚜小蜂和丽蚜小蜂, 其中海氏浆角蚜小蜂和浅黄恩蚜小蜂种群于 2008 年从美国德克萨斯农工大学引入, 丽蚜小蜂种群采集地与烟粉虱相同, 三者均以烟粉虱为寄主用笼罩单独饲养。上述种群自采集或引入后, 长期饲养于中国农业科学院植物保护研究所生物入侵研究室的温室中, 气候条件为温度 26°C - 28°C、相对湿度 65% ± 5%、光周期 14 L: 10 D。

1.1.2 供试植物

烟粉虱使用棉花 *Gossypium* 进行饲养, 品种为“中棉 6 号”, 由中国农业科学院植物保护研究所廊坊农药厂提供。棉花种子种植于含营养土 (组成: 草木灰/蛭石为 1:1) 的塑料花盆 (规格: 上口径 10 cm × 10 cm, 高约 9 cm) 中, 每盆 2 - 3 粒种子, 放置在 120 目纱网的大型养虫笼 (规格: 60 cm × 40 cm × 60 cm) 于温室中, 待株高大于 20 cm 且至少有 2 片真叶时即可使用。培养条件与供试昆虫相同, 供试植物不接触任何农药。

1.2 实验方法

1.2.1 烟粉虱 DNA 的提取

用组织基因组 DNA 提取试剂盒提取烟粉虱的 DNA。所用试剂盒 (TIANamp Genomic DNA Kit) 由天根生化有限公司生产。取 20 头烟粉虱于灭菌的 1.5 mL 离心管中, 放入 -20°C 冰箱冷冻 5 - 8 min, 加液氮研磨后, 按照试剂盒说明书进行操作, 最后将得到的烟粉虱 DNA 提取液置于 1.5 mL 离心管中, 短暂低速离心, -20°C 保存备用。

1.2.2 寄生蜂 DNA 的提取

用裂解液法提取 3 种优势寄生蜂的 DNA。研磨方法与烟粉虱 DNA 提取相同, 之后加入 50 μL 的裂解液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl; 0.45% Tween 20; 0.45% NP40; 0.2% Gelatin; 60 μg/mL Proteinase K); 将带有匀浆液的离心管置于 65°C 金属浴 30 min、96°C 金属浴 10 min; 短暂低速离心, 即得到寄生蜂 DNA 提取液, -20°C 保存备用。

1.2.3 细菌 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增

分别以所获得的烟粉虱和寄生蜂的总 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg *et al.*, 1991) 进行 PCR 扩增。扩增反应体系 (25 μL) 包括: 总 DNA 模板 2.0 μL、10 ×

Buffer 2.0 μL 、dNTPs 2.5 μL 、双向引物各 1.0 μL 、Taq 聚合酶 0.2 μL ，加 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 反应程序如下：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min，共 30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 7 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。对于每种 DNA 样品，均设置 3 个重复的 PCR 反应；对于每次 PCR 反应，均设置含目的片段的烟粉虱或寄生蜂 DNA 和 ddH₂O 分别作为阳性和阴性对照。扩增反应在 ABI-9700 PCR 基因扩增仪上进行。扩增完成后将 3 个重复的 PCR 产物合并一起，用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带，以 GelDoc Universal Hood II 型凝胶成像系统分析结果，扩增片段大小约为 1500 bp。

1.2.4 PCR 产物的纯化、连接、转化及测序

使用 DNA 凝胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收 PCR 产物。所用试剂盒 (AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒) 由康宁生命科学有限公司提供。所有操作按照试剂盒说明书进行。纯化所得 PCR 产物连接到 PEASY-T3 载体中，将其转入 Trans-T1 感受态细胞；每个物种选取 40 个有效菌落进行验证，将其中正确的转化子送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.3 数据分析

1.3.1 内共生菌的种类分析

利用 Bioedit 7.2.6 软件 (Hall, 1999) 对测序所得的 16S rRNA 基因序列进行拼接并辅以人工矫正等处理后，在 NCBI 上进行 BLAST 同源性比对分析，以同源性在 99% - 100% 为标准，对内共生菌的种类进行鉴定，并分别对各内共生菌的数量进行统计，同时记录比对时各序列同源性最高的序列信息；在 Ribosomal Database Project (RDP) 上对共生菌 16S rRNA 基因序列进行 Classifier 归类 (Wang *et al.*, 2007)。

1.3.2 系统发育分析

基于 1.3.1 的分析结果，进一步对烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂感染的优势内共生菌进行系统发育分析。以 Bioedit 7.2.6 软件读取序列，对每条序列进行人工碱基读取和反复校对；采用 DAMBE 6.4.79 软件 (Xia, 2017) 对核苷酸替代饱和性进行分析；选取 NCBI 中已报道的不同宿主携带的上述优势内共生菌及隶属于同属不同群组的多条 16S rRNA 基因序列作为参考序列，并选取外群 (Outgroup)，结合本研究测序获得的 5 个物种携带的优势内共生菌 16S rRNA 基

因序列，利用 Clustal W 程序对序列进行多重序列比对，并辅以人工校对；应用 Mega 7.0.26 (Kumar *et al.*, 2016) 软件以双参数模型 (Kimura 2-parameter, K2-P)，采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 分别构建系统发育树，系统发育树分支的置信度采用自展法 (Bootstrap analysis, BP)，重复检测 1000 次。

2 结果与分析

2.1 烟粉虱 MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂内共生菌的种类丰度分析

对测序所得的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂内共生菌 16S rRNA 基因序列的同源性比对表明，这 5 个物种感染内共生菌的种类丰度有明显的差异 (表 1)。烟粉虱 2 个隐种均携带 *Portiera*、*Hamiltonella* 和 *Rickettsia*，其内共生菌的种类丰度要大于 3 种优势寄生蜂；3 种优势寄生蜂中以丽蚜小蜂内共生菌的种类丰度最高，其携带有 *Rickettsia*、*Hamiltonella* 和 *Wolbachia*，另外 2 种寄生蜂则只含有 *Rickettsia*；5 个不同物种均携带 *Rickettsia*，海氏浆角蚜小蜂 *Rickettsia* 的种类丰度显著高于其他物种。

内共生菌 16S rRNA 基因序列同源性比对中相似度最高的序列信息及 Classifier 归类结果见表 2。烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂体感染有 *Portiera*、*Hamiltonella*、*Rickettsia* 和 *Wolbachia* 4 种内共生菌，均隶属于变形菌门 Proteobacteria，其中 *Rickettsia* 属于 α -变形细菌纲 (α -Proteobacteria)，*Portiera*、*Hamiltonella* 和 *Wolbachia* 则属于 γ -变形细菌纲 (γ -Proteobacteria)，每一条序列与 NCBI 基因库中比对的序列的相似度均达到 99%。

2.2 烟粉虱 MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂的优势内共生菌的系统发育分析

由 2.1 结果可知，烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂共同感染的内共生菌有 *Rickettsia* 和 *Hamiltonella* 2 种，为其优势内共生菌。烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂均携带有 *Rickettsia*，携带 *Hamiltonella* 的有烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及 3 种优势寄生蜂中的丽蚜小蜂。下面分别对 2 种优势内共生菌进行系统发育分析。

表 1 烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂内共生菌的种类丰度

Table 1 The diversity of endosymbionts among *B. tabaci* MEAM1, MED and its three dominant parasitoids

物种 Species	有效序列个数 No. of effective sequences	比对结果个数 No. of BLAST results				
		<i>Portiera</i>	<i>Hamiltonella</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Wolbachia</i>	Others
<i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	34	15	10	9	—	—
<i>Bemisia tabaci</i> MED	33	8	14	11	—	—
<i>Encasia sophia</i>	30	—	—	8	—	22
<i>Eretmocerus hayati</i>	28	—	—	25	—	3
<i>Encasia formosa</i>	30	—	4	2	23	1

注: 1. Others 为比对结果不属于已报道的 8 种/属内共生菌; 2. “—” 表示不含有某种菌。Note: 1. The BLAST results not belonging to the eight species of endosymbiosis that have been reported count in the others; 2. The sign “—” indicates free for one bacterium.

表 2 烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂内共生菌 16S rRNA 基因序列比对信息及分类地位

Table 2 Information of homologous sequence and taxonomic status of endosymbionts 16S rRNA gene sequences from *B. tabaci* MEAM1, MED and its three dominant parasitoids

物种 Species	序列长度 (bp) Sequence length	同源性最高的序列信息 Information of the most homologous sequence		相似度 (%) Identity	分类地位 Taxonomic status
		细菌名称 Name of bacteria	登录号 Accession		
		<i>Bemisia tabaci</i> MEAM1			
<i>Bemisia tabaci</i> MED					
<i>Eretmocerus hayati</i>	1500	<i>Rickettsia</i>	NR074484	99	变形菌门 Proteobacteria α-变形细菌纲 α-Proteobacteria
<i>Encasia formosa</i>					
<i>Encasia sophia</i>					
<i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	1500	<i>Hamiltonella</i>	AY296733	99	
<i>Bemisia tabaci</i> MED					
<i>Encasia formosa</i>	1500	<i>Hamiltonella</i>	GQ184561	99	变形菌门 Proteobacteria γ-变形细菌纲 γ-Proteobacteria
<i>Bemisia tabaci</i> MEAM1	1500	<i>Portiera</i>	CP007563	99	
<i>Bemisia tabaci</i> MED					
<i>Encasia formosa</i>	1500	<i>Wolbachia</i>	GU124506	99	

2.2.1 优势内共生菌 *Rickettsia* 系统发育树的构建

在 NCBI 数据库中选择 *Rickettsia* 属的 28 个 16S rRNA 同源基因序列作为参考序列, 以纤毛虫 *Diophrys appendiculata* 的 *Rickettsia* 16S rRNA 基因作为外群, 结合本研究测序获得的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂的 *Rickettsia* 16S rRNA 基因序列, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统发育树, 结果分别如图 1 和图 2 所示。

采用 NJ 法对 *Rickettsia* 构建的系统发育树 (图 1) 中, 本研究中的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂的 *Rickettsia* 与数据库中以色列的烟粉虱 MEAM1 隐种和日本的烟粉虱 MED 隐种的 *Rickettsia* 首先聚为一支, 然后再与豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*、叶蝉 *Empoasca papayae*、叶螨 *Tetranychus urticae*、盲蝽象 *Macrolophus pygmaeus*、烟盲蝽 *Nesidiocoris tenuis* 及寄生蜂 *Pnigalio soemius* 的 *Rickettsia* 和 *Rickettsia bellii* 聚为一大支, 而与纤

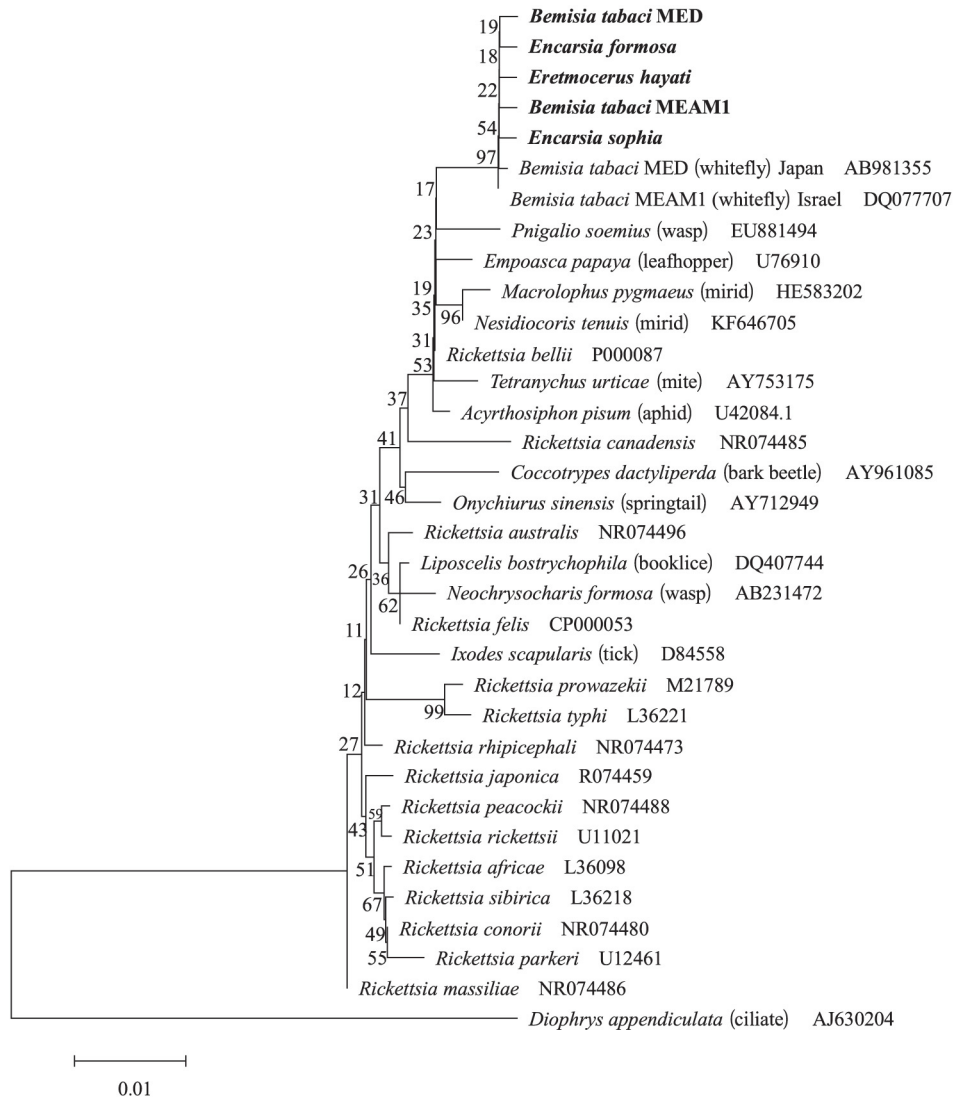


图1 邻接法构建的烟粉虱 MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂 *Rickettsia* 的系统发育树 (包含参考序列和外群)

Fig. 1 Neighbor-Joining tree based on the analysis of *Rickettsia* from *B. tabaci* MEAM1, MED and its three dominant parasitoids (including the reference sequences and outgroup)

毛虫 *D. appendiculata* 的 *Rickettsia* 亲缘关系最远。采用 ML 法对 *Rickettsia* 构建的系统发育树 (图 2) 表现出与 NJ 法类似的结果。

2.2.2 优势内共生菌 *Hamiltonella* 系统发育树的构建

在 NCBI 数据库中选取 *Hamiltonella* 属的 20 个 16S rRNA 同源基因序列作为参考序列, 以水生拉恩氏菌 *Rahnella aquatilis* 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 *Yersinia enterocolitica* 的 16S rRNA 基因作为外群, 结合本研究测序获得的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及丽蚜小蜂 *En. formosa* 的 *Hamiltonella* 16S rRNA 基因序列, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统

发育树, 结果分别如图 3 和图 4 所示。

采用 NJ 法对 *Hamiltonella* 构建的系统发育树 (图 3) 中, 本研究中的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及丽蚜小蜂 *En. formosa* 的 *Hamiltonella* 与数据库中中国的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及以色列的烟粉虱 MEAM1 隐种的 *Hamiltonella* 聚为一小支, 然后与美国的烟粉虱 MEAM1 隐种的 *Hamiltonella* 聚为一大支; 而与其他物种的 *Hamiltonella* 均未在同一分支; 与水生拉恩氏菌 *R. aquatilis* 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 *Y. enterocolitica* 亲缘关系最远。采用 ML 法对 *Hamiltonella* 构建的系统发育树 (图 4) 表现出与 NJ 法类似的结果。



图2 最大似然法构建的烟粉虱 MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂 *Rickettsia* 的系统发育树 (包含参考序列和外群)

Fig. 2 Maximum Likelihood based on the analysis of *Rickettsia* from *B. tabaci* MEAM1, MED and its three dominant parasitoids (including the reference sequences and outgroup)

3 结论与讨论

在本研究中, 烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种感染的 *Hamiltonella* 含量均最高, 这与以前的报道相一致。目前, *Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 已成为烟粉虱的优势次生内共生菌。但是, Chu 等 (2011) 研究表明, 除了 *Hamiltonella* 和 *Rickettsia* 外, 这两种烟粉虱隐种还会感染有 *Wolbachia*、*Arsenophonus*

和 *Cardinium*。由于内共生菌在烟粉虱体内是不固定的, 因此, 生物和非生物环境等因素都会对内共生菌产生影响, 它们可以直接作用于内共生菌, 或者间接影响宿主, 从而导致昆虫胞内共生菌与宿主之间关系的不稳定性 (Cass *et al.*, 2015)。例如, 共生菌 *Wolbachia* 在澳大利亚黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 种群中的感染率比较稳定 (Hoffmann *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1998); 共生菌 *Serratia* 可保护蚜虫抵抗热激 (Russell

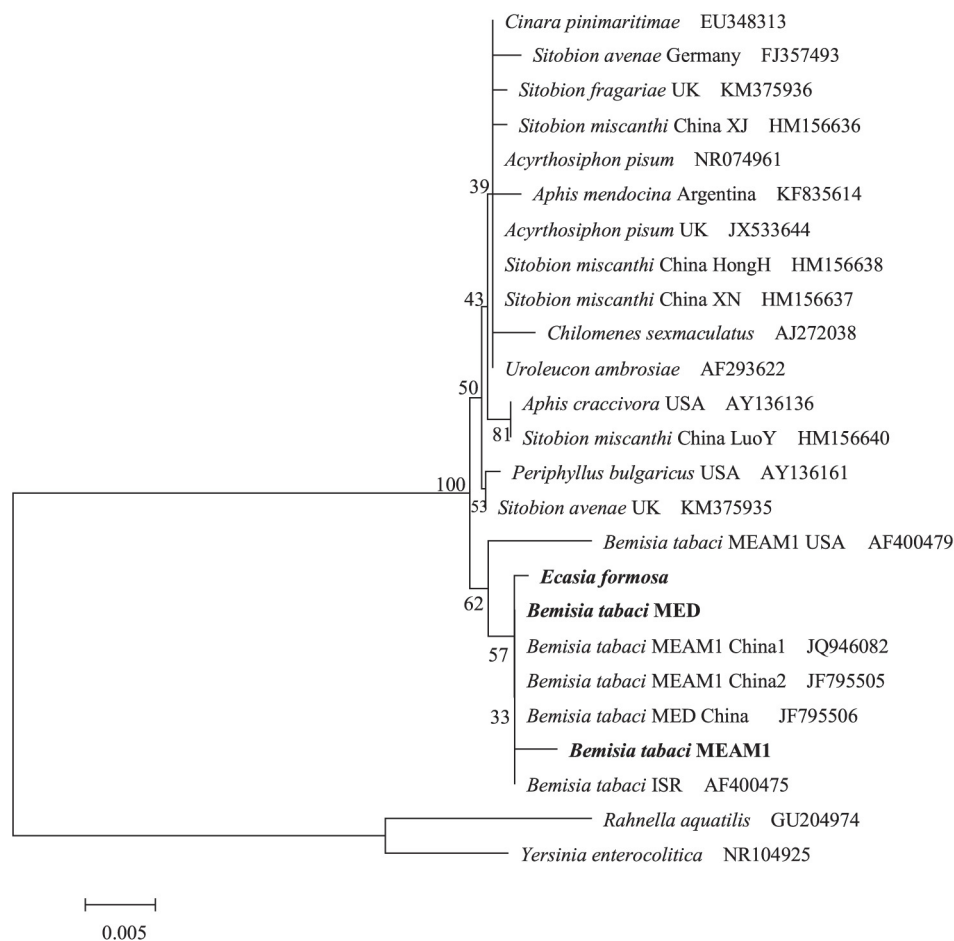


图3 邻接法构建的烟粉虱 MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂 *Hamiltonella* 的系统发育树 (包含参考序列和外群)

Fig. 3 Neighbor-Joining tree based on the analysis of *Hamiltonella* from *B. tabaci* MEAM1, MED and its three dominant parasitoids (including the reference sequences and outgroup)

et al., 2006), 并与蚜虫分布在干旱地区有关 (Henry *et al.*, 2013); 共生菌 *Cardinium* 在库蠓 *Culicoides* 中的感染率与地中海地区地面的温度有关 (Morag *et al.*, 2012); 在日本, 感染共生菌 *Regiella* 能够影响豌豆蚜 *A. pisum* 宿主的专化性 (Tsuchida *et al.*, 2004); 在美国, *Rickettsia* 的感染频率在不同地区之间存在差异: 在西南部的棉花种植区感染频率特别高, 而在圣华金河谷和德克萨斯州的东南以及南部的部分地区处于中间感染水平 (Cass *et al.*, 2015); 同样, Shan 等 (2014) 对我国田间采集到的烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种检测发现, MEAM1 隐种携带有初生内共生菌 *Portiera* 及 2 种次生内共生菌 *Hamiltonella* 和 *Rickettsia*, 而 MED 隐种则携带 *Portiera* 和 *Hamiltonella*。这些结果都表明, 昆虫体内内共生菌的存在与变化受多种因素的影响。

准确鉴定烟粉虱及其寄生蜂携带的内共生菌种类并对其进行系统发育分析, 对于研究内共生菌与宿主间的互作关系意义重大。本研究中, 通过对昆虫内共生菌 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 同源性比对和 Classifier 归类, 得到了内共生菌鉴定和分类相同的结果; 在以 *Rickettsia* 或 *Hamiltonella* 的 16S rRNA 基因序列为靶标对两者进行系统发育分析时, 无论是邻接法还是最大似然法, 烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种及其 3 种优势寄生蜂的 *Rickettsia* 或 *Hamiltonella* 均聚为一支, 且就烟粉虱及其寄生蜂而言可形成独立的进化支, 其聚类结果也符合 BLAST 同源性比对和 Classifier 归类结果。这说明内共生菌的 16S rRNA 基因可用于对其进行鉴定和分类分析。

无论是烟粉虱还是寄生蜂的内共生菌均属于变形菌门的 α -变形细菌纲或 γ -变形细菌纲。已有

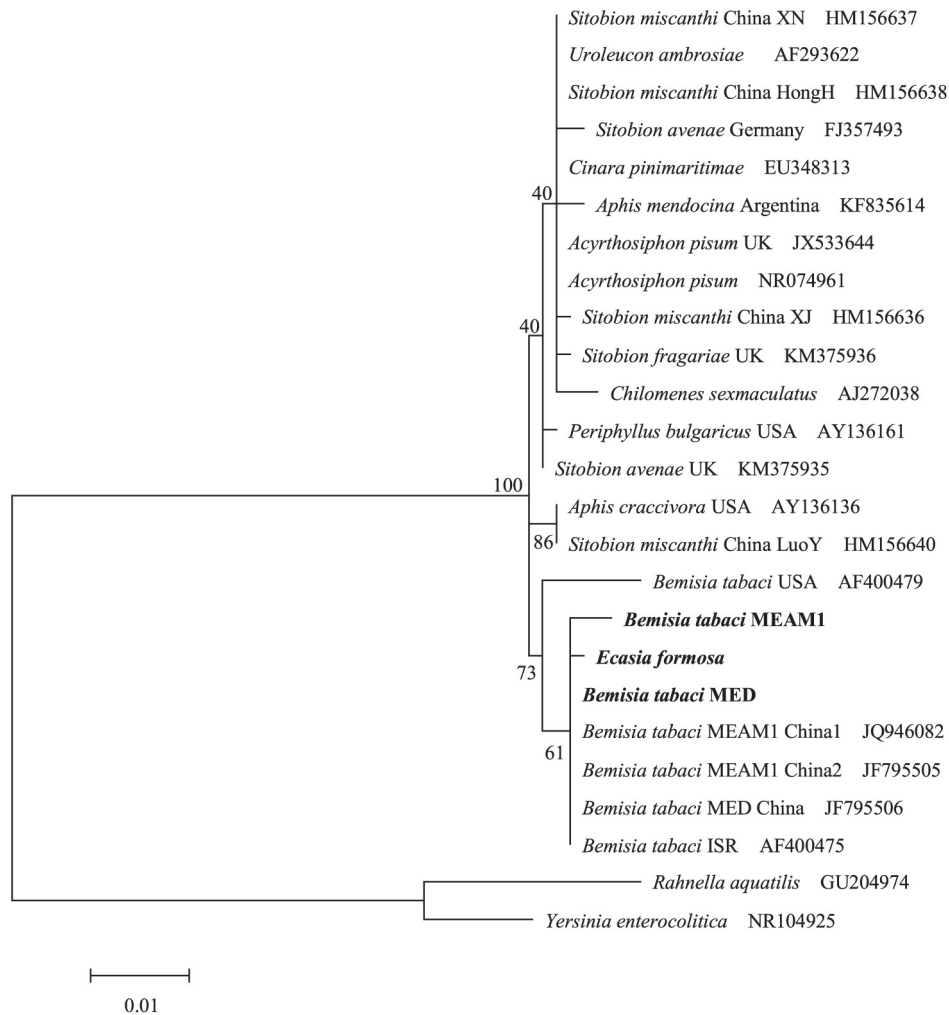


图4 最大似然法构建的烟粉虱 MEAM1 和 MED 及其 3 种优势寄生蜂 *Hamiltonella* 的系统发育树 (包含参考序列和外群)

Fig. 4 Maximum Likelihood based on the analysis of *Hamiltonella* from *B. tabaci* MEAM1, MED and its three dominant parasitoids (including the reference sequences and outgroup)

研究表明, *Rickettsia* 可分为 4 个分支, 即 *bellii* group、transitional group、spotted fever group 和 typhus group, 而本研究中烟粉虱和寄生蜂携带的 *Rickettsia* 16s rRNA 基因序列均聚为一支, 属于 *Rickettsia bellii* group, 与其他取食植物韧皮部汁液类的刺吸式昆虫如蚜虫和叶蝉的 *Rickettsia* 也有较近的亲缘关系 (Brumin *et al.*, 2012)。此外, 除了 MEAM1 和 MED 隐种外, *Rickettsia* 在烟粉虱 Asia II 3 (即“ZHJ1 型”)、Asia II 7 (即“Cv 型”)、Indian Ocean (即“MS 型”) 和 China 1 (即“ZHJ3 型”) 等隐种上均有报道 (Bing *et al.*, 2013)。对于 *Hamiltonella* 而言, 本研究中烟粉虱和寄生蜂的 *Hamiltonella* 16s rRNA 基因序列同其他 4 个烟粉虱种群均聚为一支, 说明烟粉虱感染的

Hamiltonella 具有较近的亲缘关系。这说明, 刺吸式昆虫烟粉虱及其优势寄生蜂所携带的 *Rickettsia* 和 *Hamiltonella* 在“烟粉虱-寄生蜂”间可能存在水平传播, 同时也进一步说明, 内共生菌在不同宿主昆虫之间进行相互感染和传播的可能性很大。

在烟粉虱中, *Rickettsia* 的分布呈现多样性 (Gottlieb *et al.*, 2006), 而其他内共生菌都存在于宿主的菌胞中。有研究表明, *Rickettsia* 一般随卵母细胞进行垂直传播, 而进一步研究发现, 在烟粉虱成虫的中肠中聚集有大量的 *Rickettsia*, 其可能是在卵母细胞和卵细胞发育后期进入肠组织 (Brumin *et al.*, 2012)。对于内共生菌在宿主体内的分布和传播, 还有待进一步研究。

本研究中所用的烟粉虱种群都携带有 *Portiera*、

Hamiltonella 和 *Rickettsia* , 其寄生蜂都携带有 *Rickettsia* , 部分携带有 *Hamiltonella* 或 *Wolbachia* , 而宿主体内内共生菌的存在受多种因素的影响, 不同种群携带的内共生菌种类丰度存在一定差异, 对于本研究讨论的 *Rickettsia* 和 *Hamiltonella* 以外的其他内共生菌的鉴定及系统发育情况, 还有待于进一步对其他种群进行研究。此外, 本研究选取细菌 16s rRNA 基因进行测序, 其存在于所有细菌的基因组中, 具有高度的保守性, 但是相对于其他技术方法, 如宏基因组测序而言, 仍存在一定的局限性。例如, 16s rRNA 基因测序得到的序列很多鉴定不到种水平, 而宏基因组测序能鉴定微生物到种水平甚至菌株水平。

寄生蜂对于烟粉虱具有较大的控害效果和防治潜力, 对寄生蜂和烟粉虱共同感染的内共生菌的种类及系统发育研究, 不仅有助于进一步明确内共生菌对于宿主的重要作用及其在“烟粉虱-寄生蜂”间可能存在水平传播途径, 还可为深入研究内共生菌在“烟粉虱-寄生蜂”间的互作关系提供一定参考。

参考文献 (References)

- Bing XL, Yang J, Zchori-Fein E, et al. Characterization of a newly discovered symbiont in the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (2): 569–575.
- Boykin LM, Shatters RG, Rosell RC, et al. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44 (3): 1306–1319.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex [J]. *Annual Review of Entomology*, 1995, 40 (1): 511–534.
- Brumin M, Kontsedalov S, Ghanim M. *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype [J]. *Insect Science*, 2011, 18 (1): 57–66.
- Brumin M, Levy M, Ghanim M. Transovarial transmission of *Rickettsia* spp. and organ-specific infection of the whitefly *Bemisia tabaci* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (16): 5565–5574.
- Cass BN, Yallouz R, Bondy EC, et al. Dynamics of the endosymbiont *Rickettsia* in an insect pest [J]. *Microbial Ecology*, 2015, 70 (1): 287–297.
- Chiel E, Inbar M, Mozes-Daube N, et al. Assessments of fitness effects by the facultative symbiont *Rickettsia* in the sweetpotato whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2009, 102 (3): 413–418.
- Chu D, Gao CS, De Barro P, et al. Further insights into the strange role of bacterial endosymbionts in whitefly, *Bemisia tabaci*: Comparison of secondary symbionts from biotypes B and Q in China [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2011, 101 (4): 477–486.
- Chu D, Wan FH, Zhang YJ, et al. Change in the biotype composition of *Bemisia tabaci* in Shandong Province of China from 2005 to 2008 [J]. *Environmental Entomology*, 2010, 39 (3): 1028–1036.
- Chu D, Zhang YJ, Brown JK, et al. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the Mediterranean region into China on ornamental crops [J]. *Florida Entomologist*, 2006, 89 (2): 168–174.
- Dalton R. Whitefly infestations: The Christmas invasion [J]. *Nature*, 2006, 443 (7114): 898–900.
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, et al. *Bemisia tabaci*: A statement of species status [J]. *Annual Review of Entomology*, 2010, 56 (1): 1–19.
- Dennehy TJ, Degain BA, Harpold VS, et al. Extraordinary resistance to insecticides reveals exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* in the new world [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2010, 103 (6): 2174–2186.
- Dinsdale A, Cook L, Riginos C, et al. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to identify species level genetic boundaries [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2010, 103 (2): 196–208.
- Everett KD, Thao M, Horn M, et al. Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: Endosymbionts ‘*Candidatus Fritschea bemisiae*’ strain Falk and ‘*Candidatus Fritschea eriococci*’ strain Elm [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55 (4): 1581–1587.
- Firdaus S, Vosman B, Hidayati N, et al. The *Bemisia tabaci* species complex: Additions from different parts of the world [J]. *Insect Science*, 2013, 20 (6): 723–733.
- Ghanim M, Kontsedalov S. Susceptibility to insecticides in the Q biotype of *Bemisia tabaci* is correlated with bacterial symbiont densities [J]. *Pest Management Science*, 2009, 65 (9): 939–942.
- Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, et al. Identification and localization of a *Rickettsia* sp. in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (5): 3646–3652.
- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41 (41): 95–98.
- Henry LM, Peccoud J, Simon J, et al. Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches [J]. *Current Biology*, 2013, 23 (17): 1713–1717.
- Himler AG, Adachi-Hagimori T, Bergen JE, et al. Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias [J]. *Science*, 2011, 332 (6026): 254–256.
- Hoffmann AA, Clancy DJ, Merton E. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 1994, 136 (3): 993–999.

- Hoffmann AA, Hercus M, Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 1998, 148 (1): 221 – 231.
- Horowitz AR, Gorman K, Ross G, et al. Inheritance of pyriproxyfen resistance in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Q Biotype) [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2003, 54 (4): 177 – 186.
- Jones DR. Plant viruses transmitted by whiteflies [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2003, 109 (3): 195 – 219.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33 (7): 1870 – 1874.
- Liu SS, Colvin J, De Barro PJ. Species concepts as applied to the whitefly *Bemisia tabaci* systematics: How many species are there? [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, 11 (2): 176 – 186.
- Ma CS, Hau B, Poehling HM. Effects of pattern and timing of high temperature exposure on reproduction of the rose grain aphid, *Metopolophium dirhodum* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2004, 110 (1): 65 – 71.
- Morag N, Klement E, Saroya Y, et al. Prevalence of the symbiont *Cardinium* in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vector species is associated with land surface temperature [J]. *FASEB Journal*, 2012, 26 (10): 4025 – 4034.
- Nirgianaki A, Banks GK, Frohlich DR, et al. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci* [J]. *Current Microbiology*, 2003, 47 (2): 93 – 101.
- Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P. History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci* [J]. *Crop Protection*, 2001, 20 (9): 709 – 723.
- Pan HP, Chu D, Ge DQ, et al. Further spread of and domination by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q on field crops in China [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2011, 104 (3): 978 – 985.
- Pascual S, Callejas C. Intra – and interspecific competition between biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Spain [J]. *Bulletin of Entomological Research*, 2004, 94 (4): 369 – 375.
- Russell JA, Moran NA. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures [J]. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences*, 2006, 273 (1586): 603 – 610.
- Shan HW, Lu YH, Bing XL, et al. Differential responses of the whitefly *Bemisia tabaci* symbionts to unfavorable low and high temperatures [J]. *Microbial Ecology*, 2014, 68 (3): 472 – 482.
- Shan HW, Zhang CR, Yan TT, et al. Temporal changes of symbiont density and host fitness after rifampicin treatment in a whitefly of the *Bemisia tabaci* species complex [J]. *Insect Science*, 2016, 23 (2): 200 – 214.
- Sloan DB, Moran NA. Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies [J]. *Biology Letters*, 2012, 8 (6): 986 – 989.
- Tay WT, Evans GA, Boykin LM, et al. Will the real *Bemisia tabaci* please stand up? [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (11): 50550.
- Teng X, Wan FH, Chu D. *Bemisia tabaci* biotype Q dominates other biotypes across China [J]. *Florida Entomologist*. 2010, 93 (3): 363 – 368.
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T. Host plant specialization governed by facultative symbiont [J]. *Science*, 2004, 303 (5666): 1989.
- Wan FH, Yang NW. Invasion and management of agricultural alien insects in China [J]. *Annual Review of Entomology*, 2016, 61 (1): 77 – 98.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (16): 5261 – 5267.
- Weeks AR, Velten R, Stouthamer R. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Science*, 2003, 270 (1526): 1857 – 1865.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (2): 697 – 703.
- Xia X. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics and molecular evolution [J]. *Journal of Heredity*, 2017, 108 (4): 431 – 437.
- Zchori-Fein E, Brown J. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2002, 95 (6): 711 – 718.
- Zhang CR, Shan HW, Xiao N, et al. Differential temporal changes of primary and secondary bacterial symbionts and whitefly host fitness following antibiotic treatments [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15898.