

# 烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的变异与系统发生

谭周进<sup>1,2</sup> 谢丙炎<sup>1\*</sup> 肖启明<sup>2</sup> 杨宇红<sup>1</sup> 冯兰香<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

(<sup>2</sup> 湖南农业大学植物保护学院 长沙 410128)

**摘 要** 对 5 年连续饲养在不同种寄主植物上的 B 型烟粉虱北京种群的内共生菌 16S rDNA 基因进行了 PCR 扩增和测序。结合已知序列,构建了不同寄主植物烟粉虱初生内共生菌约 1000bp 的 16S rDNA 及次生内共生菌约 1250bp 的 16S rDNA 的分子系统树。结果表明,中国北京不同寄主植物的 B 型烟粉虱内共生菌及世界其它地区烟粉虱内共生菌可能是同一种的不同生态型,内共生菌在其宿主分化后进行了选择,之后与其宿主长期共同进化、共同适应,为宿主对不同生境的适应提供了一定的基础。

**关键词** 内共生菌 烟粉虱 系统发育 分子进化

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)04-0436-04

烟粉虱(*Bemisia tabaci*)是一种重要的传毒昆虫,为双联体病毒属(*Geminivirus*)的特定介体<sup>[1]</sup>,除能传播 WFT 联体病毒等多种植物病毒外,还能够传播植物细菌病和真菌病<sup>[2]</sup>。已报道的生物型多达 27 种<sup>△</sup>。其中 B 型在我国属于入侵生物型,入侵不到 10 年已分布于广东、广西、海南、福建、云南等 18 个以上省市<sup>[3]</sup>。烟粉虱寄主植物广泛,有 74 科 500 余种<sup>[4]</sup>。因此,研究入侵后种群的演化机制对烟粉虱的控制具有重要意义。通过一种进化分枝学(Cladistics)技术,原核细胞的 16S rDNA 序列和真核生物的 18S rDNA 碱基序列已广泛用于测定不同生物之间的进化关系<sup>[5]</sup>。16S rDNA 为原核生物的系统发生提供了有价值的遗传信息<sup>[6]</sup>。几乎所有昆虫都有内共生菌,与昆虫一起协同进化。烟粉虱的内共生菌分为初生内共生菌(Primary endosymbiont)与次生内共生菌(Secondary endosymbiont)<sup>[7]</sup>。研究表明,同翅目中内共生菌 16S rDNA 的系统进化树可以反应寄主的进化关系<sup>[8]</sup>。烟粉虱不同生物型的 18S rDNA 与内共生菌的 16S rDNA 也是同步进化的<sup>[9]</sup>。研究表明,不同种类、生物型、地理型的昆虫中内共生菌的 16S rDNA 及 *groEL* 基因与蛋白质序列具有很高的同源性,但是产生了适应性的不同<sup>[10]</sup>。为了探索烟粉虱寄主多样性、分布广泛性、传播病毒多样性的原因及其控制对策,我们开展了

烟粉虱内共生菌保守基因的变异研究,本文报道不同寄主来源烟粉虱内共生菌 16S rDNA 基因的变异及系统发生。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试烟粉虱为 B 型成虫,分别采自 5 年连续饲养在中国农业科学研究院蔬菜花卉研究所温室的黄瓜(*Cucumis sativus* cucumber)、番茄(*Lycopersicon esculentum* tomato)、烟草(*Nicotiana tabacum* tobacco)、一品红(*Euphorbia pulcherrima* poinsettia)、牵牛花(*Ipomoea purpurea* morning glory)、辣椒(*Capsicum annuum* capsicum)、甘蓝(*Brassica oleracea* cabbage)等植物上。PCR 扩增试剂(dNTPs, *Taq* 酶)、DNA 快速回收试剂盒主要购自清华大学天为时代科技有限公司、Beeco 等公司。

### 1.2 烟粉虱内共生菌模板 DNA 的提取

DNA 提取采用改进的 SDS 裂解法<sup>[11]</sup>。将 100 头冰冻的烟粉虱用无菌双蒸水快速洗涤 2 次,于 200 $\mu$ L TE buffer 中匀浆,5000r/min 离心 3min 后,收集沉淀,加入 500 $\mu$ L 裂解 buffer(0.1mol/L NaCl、0.1mol/L EDTA、1%SDS、0.1%蛋白酶 K)于 65 $^{\circ}$ C 水浴中裂解 60min,冰上放置 5min 后,5000r/min 短时离心,上清液分别用等体积的酚:氯仿(1:1)抽提 3

基金项目:国家 973 项目(2002CB111400);农业部农作物病虫害生物防治资源研究与利用重点开放实验室开放基金(LOBCR-2003-01)

\* 通讯作者。Tel 86-10-62146130; E-mail: xieby@mail.caas.net.cn

作者简介:谭周进(1971-),男,湖南省涟源人,博士,研究方向为昆虫传毒分子生态学。Tel 86-731-4618169; E-mail: tanzhijin@sohu.com

收稿日期:2003-12-04,修回日期:2004-03-29

△ 吴杏霞.B 型烟粉虱在我国的发生、分布及分子鉴定.中国农业大学博士论文,2002,56-12.

次、氯仿抽提 1 次,冷无水乙醇沉淀 DNA ,70%乙醇洗涤,晾干或风干,加无菌双蒸水在 4℃溶解,紫外法测定 DNA 的浓度与质量。

1.3 PCR 克隆引物的设计和合成

烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的扩增引物参照文献[ 10 ]设计,其序列为:28F :5'-TGCAAGTCGAGCG-GCATCAT-3' ,1098R :5'-AAAGTTCCCGCCTTATGCGT-3'用于扩增初生内共生菌约 1000bp 的产物,92F :5'-TGAGTAAAGTCTGGGAATCTGG-3' ,1343R :5'-CCCGG-GAACGTATTCACCGTAG-3'用于扩增次生内共生菌 1250bp 的产物。引物由上海 Sangon 公司合成。

1.4 PCR 扩增

烟粉虱内共生菌 16S rDNA PCR 参照文献[ 10 ],在 25μL 体系中进行,10mmol/L Tris-HCl( pH 8.3 ),5μg 模板 DNA ,每种引物各 1μmol/L、每种 dNTPs 0.1mmol/L、MgCl<sub>2</sub> 2.5mmol/L ~ 3.0mmol/L、KCl

50mmol/L、Taq 酶 2.5U。初生内共生菌 PCR 反应参数为:95℃ 1min ,60℃ 1min ,72℃ 1min ,5 个循环;接着 95℃ 1min ,58℃ 1min ,72℃ 1min ,25 个循环,72℃ 10min。次生内共生菌 PCR 反应参数为:95℃ 1min ,58℃ 1min ,72℃ 1min ,30 个循环,72℃ 10min。

1.5 PCR 产物序列的测定

将 16S rDNA PCR 产物用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,回收产物进行 PCR 重扩,然后直接送 PCR 产物到上海博亚生物技术有限责任公司测序[ 测序仪为 ABI PRISM 377-96 ,测序试剂为 BigDye terminator v2.0 ]。测序结果直接送 GenBank 进行登记。

1.6 DNA 序列分析

从 GenBank 中下载相关序列,与所测序列一起进行分析。分子系统树的建立所用序列的基本情况如表 1。

表 1 烟粉虱的寄主、内共生菌 16S rDNA 在 GenBank 中的登录号

Table 1 Host plant of Bemisia tabaci , associations with various endosymbionts , and accession numbers of 16S rDNA sequences deposited in GenBank			
Host plant	16S rDNA from primary endosymbiont	16S rDNA from secondary endosymbiont	Site of Bemisia tabaci collection
<i>C. sativus</i> cucumber	AY429619	AY371187	Peking , China
<i>L. esculentum</i> tomato	AY429620	-	Peking , China
<i>N. tabacum</i> tobacco	AY371188	AY429614	Peking , China
<i>E. pulcherrima</i> poinsettia	AY429621	AY429615	Peking , China
<i>I. purpurea</i> morning glory	AY429622	AY429616	Peking , China
<i>C. annuum</i> capsicum	AY429624	AY429617	Peking , China
<i>B. oleracea</i> cabbage	AY429623	AY429618	Peking , China
<i>G. hirsutum</i> cotton	AF400453 <sup>[ 11 ]</sup>	AF400472 <sup>[ 11 ]</sup>	CA , USA
<i>C. sativus</i> cucumber	AF400455 <sup>[ 11 ]</sup>	AF400473 <sup>[ 11 ]</sup>	Sinaloa , Mexico
<i>V. vinifera</i> grape	AF400456 <sup>[ 11 ]</sup>	-	SP , Brazil
<i>Euphorbia</i> spp.	AF400458 <sup>[ 11 ]</sup>	-	Israel
<i>J. gossypifolia</i>	AF400459 <sup>[ 11 ]</sup>	AF400476 <sup>[ 11 ]</sup>	Puerto Rico , USA
<i>M. esculenta</i> cassava	AF400460 <sup>[ 11 ]</sup>	-	Kenya
<i>G. hirsutum</i> cotton	-	AF400470 <sup>[ 11 ]</sup>	Phx , AZ , USA
<i>P. pulcherrima</i> poinsettia	AF400452 <sup>[ 11 ]</sup>	AF400471 <sup>[ 11 ]</sup>	Tucson , AZ , USA

用 Clustral W 排列 DNA 同源序列( Alignment ),用 MEGA2.1( 2001 X Molecular Evolutionary Genetics Analysis ,Version2.1 )软件计算遗传距离,并用 ME ( Minimum evolution )法、UPGMA tree 法聚类分析构建分子系统树。自举法( Bootstrap )为 1025 次检测 ( Replication )。

2 结果和分析

2.1 烟粉虱内共生菌的系统进化地位

根据 16S rDNA 的同源性比较,烟粉虱的初生内共生菌属于 *Proteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Oceanospirillales*、*Halomonadaceae*、*Zymobacter* group。

2003 年 6 月 Paul Baumann ( University of California , Davis ) 将 *Bemisia tabaci* 的初生内共生菌定名为 “ *Candidatus Portiera aleyrodidarum* ” ( 未发表 ), 已在 GenBank 中正式使用。烟粉虱的次生内共生菌属于 *Proteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Enterobacteriales*、*Enterobacteriaceae*。

## 2.2 初生内共生菌 16S rDNA 系统进化树及其分析

初生内共生菌生活在昆虫的特定细胞中, 与昆虫几乎同时发生, 协同进化<sup>[12]</sup>。从图 1 可知, 北京地区不同寄主来源烟粉虱中的初生内共生菌亲缘关系非常接近, 但还是存在一定的变异, 说明初生内共生菌为烟粉虱适应不同的宿主提供了一定的分子基础。我国北京地区的烟粉虱初生内共生菌与来自其他国家的烟粉虱初生内共生菌分别归为不同的分支, 这说明烟粉虱在进入我国北京之后, 发生了适应性的变异。

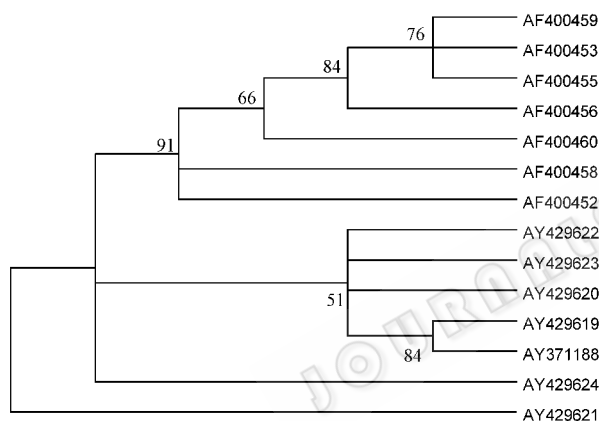


图 1 烟粉虱初生内共生菌 16S rDNA 的分子系统树

Fig.1 Phylogenetic evolution tree of primary endosymbionts in *Bemisia tabaci* based on partial 16S rDNA sequences

The tree was constructed by minimum evolution procedure in the software package MEGA2.1 (2001). The length and bootstrap confidence values of each branch are indicated above and below the branch, respectively.

## 2.3 次生内共生菌 16S rDNA 系统进化树及其分析

从图 2 可知, 北京地区来自黄瓜上的烟粉虱次生内共生菌与牵牛花上的烟粉虱次生内共生菌首先分化开来, 而其他 4 种寄主植物上烟粉虱的内共生菌则单独列为另一个支系, 并与美国一品红的烟粉虱次生内共生菌之间的遗传距离更为接近。

## 3 讨论

经过分子系统树分析可知, 烟粉虱内共生菌都属于 *Gammaproteobacteria*, 来自于共同的直系祖先, 初生内共生菌已经命名为 *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, 次生内共生菌的具体分类地位还有待于进

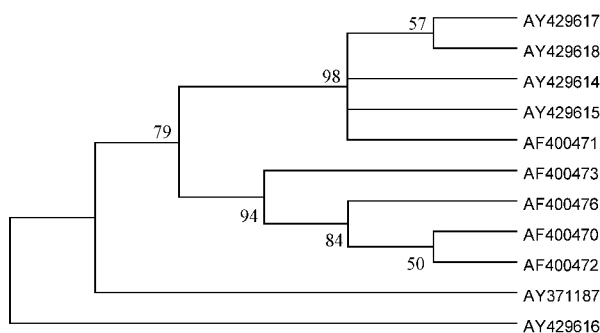


图 2 烟粉虱次生内共生菌 16S rDNA 的分子系统树

Fig.2 Phylogenetic evolution tree of secondary endosymbionts in *Bemisia tabaci* based on partial 16S rDNA sequences

The tree was constructed by UPGMA tree procedure in the software package MEGA2.1 (2001). The length and bootstrap confidence values of each branch are indicated above and below the branch, respectively.

一步研究。中国北京地区烟粉虱内共生菌与美国、墨西哥等国家来源的烟粉虱内共生菌之间的遗传距离很相近, 说明烟粉虱的两类内共生菌分别是两个单源发生的分类群, 随后在烟粉虱体内传播, 为了适应不同的生态环境, 产生了一定程度的适应性变异。初生内共生菌的垂直传播<sup>[12]</sup>, 次生内共生菌可能的水平传播<sup>[13]</sup>, 都会被烟粉虱在入侵蔓延的过程中携带, 随后为烟粉虱适应不同的生境提供必要的分子与物质基础。来自美国一品红 (AF400471) 与来自中国一品红 (AY429615) 上烟粉虱的次生内共生菌亲缘关系也很接近, 分别处于同一分支, 这为烟粉虱借助一品红等花卉及其它经济作物苗木迅速扩散<sup>[14]</sup>, 以及我国 B 型烟粉虱可能由一品红携带进入提供了一定的证据<sup>[15,16]</sup>。同时也表明, 在研究烟粉虱遗传分化的过程中, 选择样品时要同时考虑地理位置与寄主植物等各类生态因素, 对我们得出更为科学的结论很有帮助。

烟粉虱的内共生菌与肠道细菌亲缘关系很近, 可以推测内共生菌可能最初是寄生在体内, 继而与宿主协同进化, 形成共生关系。初生内共生菌 16S rDNA 富含 (A + T) % (G + C) % 为 47.7%, 更能够说明其与宿主起源的一致性, 而次生内共生菌 16S rDNA 富含 (G + C) % (为 53.4%), 与自由生活的细菌 16S rDNA 接近。通过物理、化学方法消除或抑制内共生菌、分子生物学方法改造内共生菌等手段, 都有可能防治病虫害。因此, 研究内共生菌的起源及系统进化, 特别是相关功能基因的系统进化, 对于解决这方面存在的问题无疑具有重大的理论意义和实践意义。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Stonora J , Hartb P , Gunther M , et al . Tomato leaf curl geminivirus in Australia : occurrence , detection , sequence diversity and host range . *Plant Pathology* 2003 , **52** ( 3 ) : 379 – 389 .
- [ 2 ] Zeidan M , Czosnek H . Acquisition and transmission of *Agrobacterium* by the whitefly *Bemisia tabaci* . *Molecular Plant-Microbe Interactions* , 1994 , **7** ( 6 ) : 792 – 798 .
- [ 3 ] 李大建 , 阎凤鸣 . 烟粉虱的发生为害趋势 . 植保技术与推广 , 2001 , **21** ( 1 ) : 20 .
- [ 4 ] 邱宝利 , 任顺祥 , 孙同兴 , 等 . 广州地区烟粉虱寄主植物调查初报 . 华南农业大学学报 , 2001 , **22** ( 4 ) : 43 – 47 .
- [ 5 ] Madigan M , Martink J , Parker J . Brock Biology of Microorganisms . 9<sup>th</sup> ed . New Jersey : Prentice Hall Press 2000 .
- [ 6 ] Woese C R . Bacterial evolution . *Microbiol Rev* , 1987 , **51** ( 2 ) : 221 – 271 .
- [ 7 ] Costa H S , Westcot D M , Ullman D E , et al . Morphological variation in *Bemisia tabaci* endosymbionts . *Protoplasma* , 1995 , **189** : 194 – 202 .
- [ 8 ] Munson M A , Baumann P , Clark M A , et al . Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families . *J Bacteri* , 1991 , **173** ( 20 ) : 6321 – 6324 .
- [ 9 ] Campbell B C . Congruent evolution between whiteflies ( homoptera : aleyrodidae ) and their bacterial endosymbionts based on respective 18S and 16S rDNAs . *Curr Microbiol* , 1993 , **26** : 129 – 132 .
- [ 10 ] Zchori-fein E , Brown J K . Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* ( Gennadius ) ( Hemiptera : Aleyrodidae ) . *Entomological Society of America* , 2002 , **95** ( 6 ) : 711 – 718 .
- [ 11 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . 分子克隆实验指南 . 金冬雁 , 黎孟枫等 , 译 . 第二版 . 北京 : 科学出版社 , 2002 : 25 – 26 .
- [ 12 ] Houk E J , Griffiths G W . Intracellular symbionts of the Homoptera . *Annu Rev Entomol* , 1980 , **25** : 161 – 187 .
- [ 13 ] Sandstrom J P , Russel J A , White J P , et al . Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts in insects . *Mol Ecol* , 2001 , **10** : 217 – 228 .
- [ 14 ] Brown J K , Frohlich D R , Rosell R C . The sweetpotato/silverleaf whiteflies : biotypes of *Bemisia tabaci* ( Genn . ) , or a species complex ? *Ann Rev Entomology* , 1995 , **40** : 511 – 534 .
- [ 15 ] 陈连根 . 烟粉虱在园林植物上危害及其形态变异 . 上海农学院学报 , 1997 , **15** ( 3 ) : 186 – 189 , 208 .
- [ 16 ] 赵 莉 , 张 荣 , 肖 艳 , 等 . 危害棉花的重要害虫烟粉虱在新疆发现 . 新疆农业科学 , 2000 , **37** ( 1 ) : 27 – 28 .

## Phylogenetic Relationships and Evolution of Endosymbionts in *Bemisia tabaci* Based on Partial 16S rDNA Sequences

TAN Zhou-Jin<sup>1 2</sup> XIE Bing-Yan<sup>1\*</sup> XIAO Qi-Ming<sup>2</sup> YANG Yu-Hong<sup>1</sup> FENG Lan-Xiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Vegetable and Flower , Chinese Academy of Agricultural Science , Beijing 100081 , China )

(<sup>2</sup> College of Plant Protection , Hunan Agricultural University , Changsha 410128 , China )

**Abstract** : Endosymbionts evolve with insects and benefit from each other . Endosymbiont affects the growth , fertilizing and transmitting disease of insect . In order to understand the control methods and evolution mechanism of *Bemisia tabaci* , cloning and sequencing of 16S rDNA of endosymbionts in *Bemisia tabaci* long-term living on different host plants in Peking were conducted . Molecular phylogenetic trees , including about 1000bp 16S rDNA of primary endosymbionts in *Bemisia tabaci* and about 1250bp 16S rDNA of secondary endosymbionts in *Bemisia tabaci* , were reconstructed . The results showed that primary endosymbionts in *Bemisia tabaci* were *Proteobacteria* , *Gammaproteobacteria* , *Oceanospirillales* , *Halomonadaceae* , *Zymobacter* group , *Candidatus Portiera aleyrodidarum* , and secondary endosymbionts in *Bemisia tabaci* were *Proteobacteria* , *Gammaproteobacteria* , *Enterobacteriales* , *Enterobacteriaceae* . The endosymbionts from *Bemisia tabaci* of different host plants and other countries might belong to different ecological types of one species . The conclusion could be drawn that there are independent acquisition of various endosymbionts in *Bemisia tabaci* from different host plants , and endosymbionts play important roles on *Bemisia tabaci* accommodation with different environment .

**Key words** : Endosymbiont , *Bemisia tabaci* , Phylogenetic relationship , Molecular evolution

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( 2002CB111400 ) ; Key Laboratory for Biocontrol of Ministry of Agriculture , P . R . China ( LOBCR-2003-01 )

\* Corresponding author . Tel : 86-10-62146130 ; E-mail : xieby@mail . caas . net . cn

Received date : 12-04-2003