

## 我国烟粉虱自然种群中存在广泛的 *Wolbachia* 感染现象

郭晓鹏, 李正西\*

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

**摘要:** *Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物生殖组织中的细胞质遗传的一类共生菌, 可以引起宿主生殖行为的改变。烟粉虱是重要的农业害虫, 已有的研究表明烟粉虱中存在 *Wolbachia* 的感染, 但所检测到的感染率不高, 并且迄今在烟粉虱中所检出的 *Wolbachia* 均属于 B 组群。该研究从我国河北、新疆、北京、山东、浙江、广西、海南、广州和福建采集到 18 个烟粉虱地理种群, 首先基于 ITS1 rDNA 克隆测序鉴定了烟粉虱的生物型, 然后采用自行设计的 *Wolbachia* 16S rDNA 及 *wsp* 基因的专用引物对所采集到的烟粉虱种群进行了分子检测。结果表明几乎所有的烟粉虱自然种群中都存在 *Wolbachia* 感染, 同时还发现 B/Q 生物型烟粉虱中主要感染 A 组群 *Wolbachia*, 而非 B/Q 生物型烟粉虱中存在大量的超感染现象。该研究显示烟粉虱自然种群中 *Wolbachia* 的感染率比预想的要高得多, 而分子检测方法的灵敏度可能是影响 *Wolbachia* 感染率研究的关键因素之一。

**关键词:** 烟粉虱; *Wolbachia*; rDNA; *wsp*; 分子鉴定

**中图分类号:** Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2008)01-0063-05

*Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物生殖组织中的一类细胞质遗传的共生菌, 又称立克次氏体, 属于变形菌纲(Proteobacteria)的  $\alpha$  亚群。它们可以通过多种不同机制引起宿主生殖行为的改变, 包括细胞质不亲和、诱导孤雌生殖、雌性化和雄性致死<sup>[1,2]</sup>。大多数立克次氏体无法在寄主体外培养, 因此很难用传统的微生物学方法对其进行研究。随着分子生物学技术的发展, 特别是 PCR 技术的应用, 对 *Wolbachia* 的检测及鉴别有了新的进展。然而, 已有研究表明分子检测方法的灵敏度可以影响 *Wolbachia* 感染率的估计。例如: Jeyaprakash 等<sup>[3]</sup>采用 Long PCR 技术基于 *wsp* 基因在 63 种节肢动物中发现有 73%感染了 *Wolbachia*, 比预期的感染率要高得多<sup>[4]</sup>。另外, 基于 *Wolbachia* *ftsZ* 和 *wsp* (*Wolbachia* surface protein)基因的特异引物在应用中并不可靠, 如 Turelli 等<sup>[5]</sup>在采用标准的 *ftsZ* 和 *wsp* 引物检测二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 个体内的 *Wolbachia* 时常出现假阴性的结果, 而实际上二斑叶螨已知存在 *Wolbachia* 的感染<sup>[6]</sup>。

烟粉虱是由许多不同生物型组成的复合种群<sup>[7-9]</sup>, 其中 B 型烟粉虱具有寄主范围广、传毒能力强等特点, 现已传入许多国家并成为烟粉虱的主要致害类型, 给农业生产以及观赏园艺和花卉造成了严重的经济损失。目前, 国内外关于烟粉虱 *Wolbachia* 的研究主要是利用 PCR 技术, 基于 *Wolbachia* 16S rDNA 和 *wsp* 等基因序列设计引物, 对不同烟粉虱种群中的 *Wolbachia* 进行分子检测。Zchori-Fein 等<sup>[10]</sup>采用 PCR 技术检测了世界上不同代表性寄主植物和不同地理区域的烟粉虱内共生菌 *Wolbachia* 的 16S rDNA, 发现至少有 33%的烟粉虱种群感染了 *Wolbachia*。Nirgianaki<sup>[11]</sup>使用 *Wolbachia* 16S rDNA 和 *wsp* 特异引物对各地烟粉虱自然种群中的 *Wolbachia* 进行了检测, 结果发现在所检测的烟粉虱类群中有 43%感染了 *Wolbachia*, 其中 B 型烟粉虱中未检测到 *Wolbachia*。Ruan and Liu<sup>[12]</sup>对浙江省的 B 型和非 B 型烟粉虱种群的共生菌 *Wolbachia* 进行了检测, 研究显示仅能在非 B 型(ZHJ\_1)烟粉虱种群的个体中通过 PCR 扩增出 *Wolbachia* 16S rDNA

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571218)

\*通讯作者。Tel: +86-10-62732539; Fax: +86-10-62733608; E-mail: zxli@cau.edu.cn

作者简介: 郭晓鹏(1981-), 女, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态学及分子进化。E-mail: sun\_gxp@126.com

收稿日期: 2007-06-12; 修回日期: 2007-09-17

的特异性片段, 而 B 型烟粉虱种群未检测到 *Wolbachia*。此外, 褚栋等<sup>[13]</sup>采集了世界各地的 24 个烟粉虱种群, 使用 *Wolbachia wsp* 基因的一对通用引物(81F / 691R)检测烟粉虱种群中 *Wolbachia* 的感染情况, 结果发现在 24 个烟粉虱种群中所有 B 型烟粉虱和 Q 型烟粉虱以及从广东省广州地区和巴基斯坦采集的非 B/Q 型烟粉虱种群中均没有检测到 *Wolbachia* 的存在, 而仅在我国浙江省的非 B/Q 型烟粉虱中检测到了 *Wolbachia* 的感染。综上所述, 迄今检测到 *Wolbachia* 感染的烟粉虱种群大多属于非 B/Q 型烟粉虱, 并且所检测出的都属于 B 组 *Wolbachia*, 而 B/Q 型烟粉虱种群中目前尚未检测到 *Wolbachia*。

本研究从我国河北、新疆、北京、山东、浙江、广西、海南、广州和福建采集到 18 个烟粉虱代表性

地理种群, 首先基于 rDNA-ITS1 克隆测序鉴定了烟粉虱的生物型, 然后采用自行设计的 *Wolbachia* 16S rDNA 及 *wsp* 基因的专用引物对所采集到的烟粉虱种群进行了分子检测, 结果发现烟粉虱自然种群中存在广泛的 *Wolbachia* 感染现象。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验虫源:** 本研究所采用的烟粉虱分别采自河北、北京、新疆、山东、海南、浙江、广州、广西、福建等地, 其中河北省各地不同寄主植物上的烟粉虱样品采集于 2006 年 7~8 月间, 而其它样品于 2001~2004 年间采集(表 1)。采集新鲜烟粉虱成虫置无水乙醇浸泡于离心管中, 于 -20℃ 保存备用。样品在使用前进行分子鉴定<sup>[14]</sup>。

表 1 样品来源及其相关信息  
Table 1 Origins and related information of the samples

Code	Location	Host plant	Collection time	GenBank acc. No.	16S-based infection*
CZSm	Cangzhou, Hebei	<i>Solanum melongena</i>	2006.08	EF547515	16/16 A
-	Cangzhou, Hebei	<i>Cucurbita moschata</i>	2006.08	-	19/19 A
HSHa	Hengshui, Hebei	<i>Helianthus annuus</i>	2007.07	EF547521	4/4 A
HSCs	Hengshui, Hebei	<i>Cucumis sativus</i>	2006.07	EF547520	8/8 A
-	Hengshui, Hebei	<i>Acalypha australis</i>	2006.07	-	4/4 A
-	Hengshui, Hebei	<i>Gossypium herbaceum</i>	2006.07	-	4/4 A
-	Hengshui, Hebei	<i>Cucurbita pepo</i>	2006.07	-	4/4 A
XTCs	Xingtai, Hebei	<i>Cucumis sativus</i>	2006.08	EF547519	5/5 A
-	Xingtai, Hebei	<i>Gossypium herbaceum</i>	2007.08	-	5/5 A
BDCm	Baoding, Hebei	<i>Cucurbita moschata</i>	2006.08	EF547531	4/5 A
BJIb	Beijing	<i>Ipomoea batatas</i>	2003.07	AF509592	8/8 A
XJEp	Shihezi, Xingjiang	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	2001.01	AY764383	5/5 A
SDLe	Qingzhou, Shandong	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2003.07	AF509594	8/8 A
HNNt	Sanya, Hainan	<i>Nicotiana tabacum</i>	2002.07	AY764374	5/5 A
ZJGh	Hangzhou, Zhejiang	<i>Gossypium herbaceum</i>	2004.07	AY854060	5/5 B+A
GXCm	Nanning, Guangxi	<i>Cucurbita moschata</i>	2001.09	AF509593	4/20 B+A
GDCv	Guangzhou, Guangdong	<i>Codiaeum variegatum</i>	2003.07	AY764369	5/5 B+A
FJIb	Fuzhou, Fujian	<i>Ipomoea batatas</i>	2003.07	AF509595	5/5 B+A

\* positive / individual detected and *Wolbachia* supergroup infected.

**1.1.2 引物:** 本研究所使用的引物请见表 2。

表 2 研究中所用引物  
Table 2 Primers used in this study

Name of primer	Sequence (5'→3')
<i>wsp</i> 81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC
<i>wsp</i> 691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA
<i>wsp</i> 360R	GCTGCACCAACACCAACACC
TW81F	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC
Bt5.8r	ATCCGCGAGCCGAGTGATCC
16S315f	GCATGAGTGAAGAAGGCC
16S628r	AGATAGACGCCTTCGCCA

**1.1.3 主要仪器和试剂:** 本研究中所使用的 PCR 热循环仪为杭州博日科技有限公司生产的 LITTLE GENIUS(小精灵)基因扩增仪。所使用的化学试剂均为分子生物学级别。Taq 酶购自北京天根生化科技公司; 所有内切酶为 Fermentas Life Sciences 产品; Proteinase K 为美国 Merk 公司产品; 核酸提取、琼脂糖电泳及聚丙烯酰胺凝胶电泳所使用的试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。所有引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

## 1.2 总 DNA 提取

将单头烟粉虱样品置 0.2 mL 离心管, 加入 20 $\mu$ L 抽提液(10mmol/L Tris-HCL, pH 8.4, 50 mmol/L KCl, 0.45% Tween-20, 0.45% NP-40 和 100  $\mu$ g/mL proteinase K), 用微型研杵将样品磨碎, 置 65  $^{\circ}$ C 水浴 30min, 然后于 98  $^{\circ}$ C 处理 10min, 即获得总 DNA。

## 1.3 基于 *Wolbachia wsp* 基因的分子检测

本研究首先采用 *Wolbachia wsp* 基因的标准引物 (*wsp81F/wsp691R*)<sup>[15]</sup> 检测烟粉虱个体中 *Wolbachia* 的感染情况, 但遗憾的是没有 PCR 产物。这促使我们设计了新的 *wsp* 反向引物 *wsp360R*。该引物与通用的正向引物 *wsp81F* 配对, 预期产物为 360bp。PCR 反应的基本组分类似于 16S 的分子检测。PCR 热循环采用退火温度递减法: 95  $^{\circ}$ C 预变性 4min, 接着进行 2 个循环(94 $^{\circ}$ C 1 min, 62  $^{\circ}$ C 1min, 72  $^{\circ}$ C 1min), 然后进行 20 个循环(94  $^{\circ}$ C 45s, 42  $^{\circ}$ C 45s, 72  $^{\circ}$ C 45s), 共 40 个循环, 最后于 72  $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 1%琼脂糖(1 $\times$  TAE)电泳检测。

## 1.4 烟粉虱 ITS1 PCR 扩增及克隆测序

基本方法参照文献[16], 简单概括如下: 正反向引物分别为: TW81F 和 Bt5.8r<sup>[17]</sup>。PCR 反应总体积 25 $\mu$ L, 包括 2.5 $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 0.3 $\mu$ L *Taq* 酶 (2.5 U/ $\mu$ L), 2.5 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mM), 2.0 $\mu$ L dNTPs(2.5 mM each), 引物各 0.5  $\mu$ L (25 $\mu$ M), DNA 模板 2.0 $\mu$ L, 二甲基亚砜(DMSO) 1.75  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12.95 $\mu$ L。PCR 热循环程序为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1min, 57  $^{\circ}$ C 1 min 15 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物用 1%琼脂糖(1 $\times$ TAE)电泳检测, 回收 DNA 并克隆测序。

## 1.5 基于 *Wolbachia 16S rDNA* 的分子检测

基本方法参照文献[18], 概括如下: 正反向引物分别为 16S315f 和 16S628r。PCR 反应总体积为 25 $\mu$ L, 基本组分类似于烟粉虱 ITS1 PCR 扩增, 但不加 DMSO。PCR 热循环程序: 95  $^{\circ}$ C 3min, 94  $^{\circ}$ C 35 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物用 1%琼脂糖(1  $\times$  TAE)电泳检测。

## 1.6 *Wolbachia 16S rDNA* 酶切分析及 PAGE 分型

PCR 产物经琼脂糖电泳检测后, 进行限制性内切酶分析<sup>[18]</sup>。酶切产物先用 1.5%琼脂糖(1  $\times$  TBE)检测, 再用 8%变性(尿素)聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)分型<sup>[19]</sup>。

## 1.7 分子系统发育分析

将自测序列(表 1)及参考序列进行多重比对 (ClustalW, MEGA v.3.1)<sup>[20]</sup>, 以烟粉虱近缘种 *Lipaleyrodes atriplex*(GenBank acc.no.AF213988)为

外群, 构建邻接法(NJ)、最小进化法(ME)和最大简约法(MP)系统进化树。

## 2 结果和分析

### 2.1 基于 *Wolbachia wsp* 基因的分子检测结果

采用自行设计的 *wsp360R* 与通用引物 *wsp81F* 配对检测了所有烟粉虱种群, 结果从浙江棉花、福建地瓜和广州变叶木 3 个烟粉虱种群中扩增出了预期 PCR 产物, 经克隆测序证实为 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段(GenBank 登录号: 浙江棉花, EF394930; 福建地瓜, EF394936; 广州变叶木, EF394937)。采用引物 *wsp360R* / *wsp81F* 不能在其它烟粉虱种群中扩增出预期 PCR 产物。

### 2.2 烟粉虱自然种群分子系统发育关系

烟粉虱不同地理种群经分子鉴定<sup>[14]</sup>, 结果表明河北省的 10 个种群、北京地瓜、新疆一品红、山东番茄和海南烟草种群为 B 生物型, 而浙江棉花、广西南瓜、广州变叶木和福建地瓜种群为非 B 生物型。选取河北省 5 个地理种群(沧州、衡水向日葵、衡水黄瓜、邢台和保定)及其它 8 个地理种群进行 ITS1 克隆测序, 共获得 13 条代表性 ITS1 序列(表 1), 分别代表 13 个烟粉虱地理种群(每一种群各随机选取 3 头成虫测序, 发现来自同一种群内不同个体的 ITS1 序列一致)。将这些序列与参考序列进行分子进化分析发现: 不同的建树方法获得的进化树相似, 都能将烟粉虱 B 生物型聚为单独的一支(Bootstrap score = 70%, 1000 replications)(图 1), 而非 B 生物型

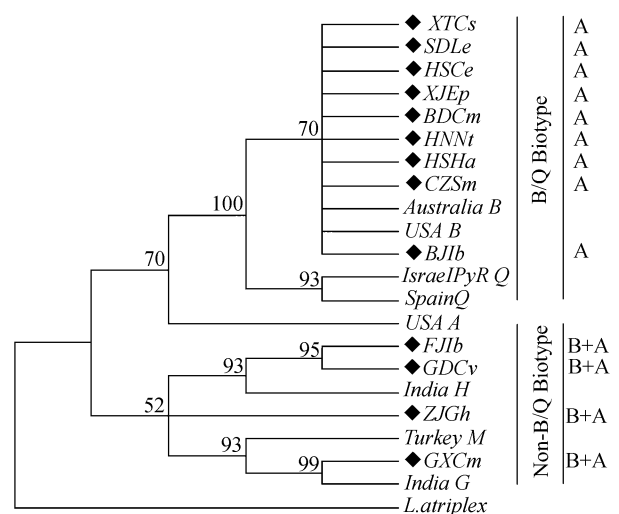


图 1 烟粉虱自然种群基于 ITS1 序列的分子进化树(NJ 树, Kimura 2-parameter 模型)

Fig. 1 Phylogenetic tree of *B. tabaci* natural populations based on ITS1-rDNA sequences (NJ tree, Kimura 2-paramter model). Diamonds indicate ITS1 sequenced in this study. GenBank acc.nos. IsraelPyRQ, AY854059; USAA, AF216066; USAB, AF216069; TurkeyM, AF216062; AustraliaB, AF215991; IndiaH, AF216022; IndiaG, AF216019; SpainQ, AJ315795.

组群包含了许多不同的生物型,其相互之间的关系较为复杂。从进化树还可见:Q生物型与B生物型接近(Bootstrap score = 100%),此处称之为‘Q/B生物型组群’,以与‘非Q/B生物型组群’相区别。

### 2.3 基于 *Wolbachia* 16S rDNA 的分子检测结果

基于 *Wolbachia* 16S 特异的引物 16S315f / 16628r,通过 PCR 检测烟粉虱自然种群中 *Wolbachia* 的感染情况,结果发现几乎所有检测过的烟粉虱个体样品中都能产生所预期的 PCR 产物(314bp),该产物被克隆测序证实来自 *Wolbachia*(GenBank acc. no. DQ278884, DQ278885)。将 PCR 产物进一步采用限制性内切酶 *Nhe*I 和 *Vsp*I 进行酶切分析,不仅可鉴别烟粉虱是否感染 *Wolbachia*,而且能区分所感染的 *Wolbachia* 组群<sup>[18]</sup>。由于 *Nhe*I 既存在于 A 组 *Wolbachia* 中,也存在于 B 组 *Wolbachia*,而 *Vsp*I 只存在于 B 组 *Wolbachia* 中,因此酶切产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分型后,A 组 *Wolbachia* 将产生 2 个条带(196/118),而 B 组 *Wolbachia* 产生 4 条带(118, 94, 56, 46 bp),但 A+B 超感染可产生 5 个条带(196, 118, 94, 56, 46 bp)(图 2)。通过 PCR-RFLP 技术对烟粉虱自然种群进行分析,结果表明在所有被检测的烟粉虱种群中都有 *Wolbachia* 的感染,而且除了广西南瓜种群外,几乎所有检测过的烟粉虱个体样品中都有 *Wolbachia* 的感染(表 1)。值得指出的是, *Wolbachia* 的感染与烟粉虱的生物型具有密切的相关性,即 B 生物型烟粉虱只感染 A 组 *Wolbachia*,而非 B 生物型烟粉虱种群普遍存在 *Wolbachia* 超感染现象,并且当非 B 生物型烟粉虱在少数情况下呈现单感染时,只感染 B 组 *Wolbachia*(图 1)。

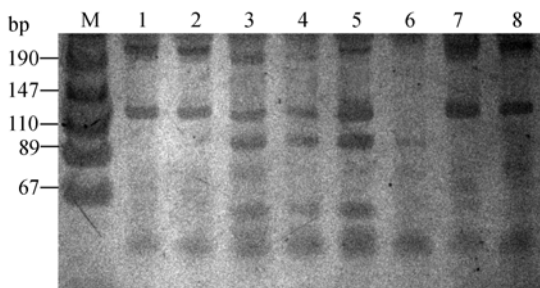


图 2 烟粉虱 *Wolbachia* 16S rDNA PCR-RFLP 分析图谱 (*Nhe*I/*Vsp*I, 8% PAGE, 尿素)

Fig. 2 PCR-RFLP analysis of *Wolbachia* 16S rDNA in *B. tabaci* (*Nhe*I/*Vsp*I, 8% PAGE, Urea). M: Molecular weight standard; 1. XTCs; 2. CZSm; 3. GDCv; 4. FJlb; 5. ZJGh; 6. GXcm; 7. HSCs; 8. HSHa.

## 3 讨论

有关烟粉虱感染 *Wolbachia* 的研究,国外报道<sup>[10,11]</sup>的感染率不高(< 43%),而我国已有的研究<sup>[12,13]</sup>也表

明仅能在非 B/Q 型烟粉虱中检测到 *Wolbachia* 的感染,其感染率更低(2/24=8.3%)。本文基于 *Wolbachia* 16S 特异引物(16S315f/16S628r),配合 RFLP 及 PAGE 分型的研究结果显示 *Wolbachia* 在所检测的 18 个烟粉虱种群中均有感染,而且除了广西南瓜种群外,几乎所有检测过的烟粉虱个体样品中都有 *Wolbachia* 的感染(感染率=100%)。所检测的烟粉虱种群覆盖我国各地,具有相当的代表性,因此我们认为我国烟粉虱自然种群中存在广泛的 *Wolbachia* 感染现象。

分子检测的灵敏度对于 *Wolbachia* 感染率研究的影响,国外研究者曾经有过探讨。例如,采用 Long PCR 技术<sup>[3]</sup>并利用 *wsp* 标准引物(*wsp*81F / *wsp*691R)发现在 63 种节肢动物中有 73%感染了 *Wolbachia*,比预期的感染率(16%)要高得多<sup>[4]</sup>。实际上,褚栋等<sup>[13]</sup>曾使用 *wsp* 标准引物并采用 Long PCR 技术检测了来自世界各地的 24 个烟粉虱种群,结果只在其中 2 个烟粉虱种群中检测到了 *Wolbachia*。本研究之初也曾采用 *Wolbachia* *wsp* 标准引物对烟粉虱个体样品进行了检测,但没有检测到任何阳性结果。接下来,我们才又自行设计了新的 *wsp* 反向引物(*wsp*360R)。采用引物 *wsp*81F / *wsp*360R 检测烟粉虱个体样品发现浙江棉花、福建地瓜和广州变叶木 3 个烟粉虱种群中有 *Wolbachia* 的感染。克隆测序(EF394930, EF394936, EF394937)及分子进化分析(数据未显)表明上述 3 个烟粉虱种群所感染的 *Wolbachia* 都属于 B 组群。必须指出上述 3 个烟粉虱种群都属于非 B/Q 型烟粉虱,因此这一研究结果与已有的报道吻合<sup>[12,13]</sup>。有趣的是,若按烟粉虱种群样本数(18)和检测阳性数(3)推算,则感染率为 16.7%,正好符合预期<sup>[4]</sup>。

与基于 *Wolbachia* *wsp* 的引物相比,基于 *Wolbachia* 16S 的引物似乎要灵敏得多。后者不仅能在非 B/Q 型烟粉虱中检测到了 *Wolbachia*,而且在 B/Q 型烟粉虱中检测到了 100%的 *Wolbachia* 感染率。克隆测序及分子进化分析证实感染 B/Q 型烟粉虱的 *Wolbachia* 属于 A 组群,而非 B/Q 型烟粉虱主要是 *Wolbachia* 超感染,即单个烟粉虱个体中同时感染了 A 组群和 B 组群 *Wolbachia*(图 1)。本研究的结果表明基于 *Wolbachia* 16S 特异引物并配合 RFLP 及 PAGE 分型是检测烟粉虱 *Wolbachia* 非常灵敏、有效和可靠的方法。因此,16S rDNA 作为多拷贝基因与单拷贝的 *wsp* 基因相比,在节肢动物等微小生物个体内共生菌分子检测方面具有优越性。

烟粉虱作为复合种群,包含了许多不同的生物

型, 并正经历着快速的种群分化。*Wolbachia* 在烟粉虱种群中广泛分布并且与烟粉虱的生物型密切相关, 其对于烟粉虱的种群分化乃至物种形成到底发挥了何种作用, 将需要进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. *Wolbachia pipitensis*: microbial manipulator of reproduction. *Ann Rev Microbiol*, 1999, 53: 71–102.
- [2] Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, 1997, 42:587–609.
- [3] Jeyaprakash A, Hoy MA. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplifications: *wsp* sequences found in 76% of 63 arthropod species. *Insect Mol Biol*, 2000, 9: 393–405.
- [4] Werren JH, Windsor D. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc R Soc Lond B*, 2000, 267: 1277–1285.
- [5] Turelli M, Hoffman AA. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, 1995, 140: 1319–1338.
- [6] Johanowicz DJ, Hoy MA. *Wolbachia* in a predator-prey system: 16S ribosomal DNA analysis of two phytoseiids (Acari: Phytoseiidae) and their prey (Acari: Tetranychidae). *Annu Entomol Soc Am*, 1996, 89: 435–441.
- [7] Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Ann Rev Entomol*, 1995, 40: 511–534.
- [8] Perring TM. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot*, 2001, 20: 725–737.
- [9] 褚栋, 刘国霞, 陶云荔. 烟粉虱复合种内共生菌多样性及其生物学意义. *昆虫学报*(Acta Entomologica Sinica), 2006, 49(4): 687–694.
- [10] Zchori-Fein E, Brown JK. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann Entomol Soc Am*, 2002, 95: 711–718.
- [11] Nirgianaki A, Banks GK, Frohlich DR, et al. *Wolbachia* infections of the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiol*, 2003, 47: 93–101.
- [12] 阮永明, 刘树生. 浙江 B 型与非 B 型(China\_ZHJ\_1)烟粉虱种群共生细菌的检测及系统发育分析. *昆虫学报*(Acta Entomologica Sinica), 2005, 48(6): 859–865.
- [13] 褚栋, 丛斌等. 不同生物型烟粉虱体内 *Wolbachia* 共生菌的检测及其系统树分析. *昆虫学报*(Acta Entomologica Sinica), 2005, 48(4): 518–525.
- [14] Li ZX, Hu DX, Song Y, et al. Molecular differentiation of B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) based on internally transcribed spacer 1 sequence. *European J Entomol*, 2005, 102(2): 293–297.
- [15] Zhou W, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc R Soc Lond B*, 1998, 265: 509–515.
- [16] Li ZX. Molecular phylogenetic analysis reveals at least five genetic races of *Bemisia tabaci* in China. *Phytoparasitica*, 2006, 34(5): 431–440.
- [17] De Barro PJ, Driver F, Trueman JH, et al. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Mol Phyl Evol*, 2000, 16: 29–36.
- [18] Li ZX. Prevalence of *Wolbachia* infection in *Bemisia tabaci*. *Current Microbiol*, 2007, 54: 467–471.
- [19] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150–163.

## *Wolbachia* extensively harbored by *Bemisia tabaci* in China

Xiaopeng Guo, Zhengxi Li\*

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** *Wolbachia* are a group of maternally inherited bacteria harbored by a variety of arthropods and can manipulate the reproductivity of their hosts. Eighteen populations of whiteflies were collected from Hebei, Xinjiang, Beijing, Shandong, Zhejiang, Guangxi, Hainan, Guangzhou and Fujian provinces, China. These whiteflies were molecularly identified using internal transcribed spacer 1 ITS1 rDNA sequences. They were then detected for *Wolbachia* infection using *Wolbachia*-specific primers designed based on 16S rDNA and *wsp* gene sequences. The results showed that almost all populations were detected positive for *Wolbachia* infection. Whiteflies of B / Q group mainly carried *Wolbachia* belonging to supergroup A, while non- B / Q whiteflies were commonly detected for *Wolbachia* superinfection. This study indicated that the infection rate of *Wolbachia* in natural populations of *B. tabaci* might be much higher than expected, and the threshold of detection methods may be one of the key factors influencing detection of *Wolbachia* infection.

**Keywords:** *Bemisia tabaci*; *Wolbachia*; ribosomal DNA; *wsp*; molecular identification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571218)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-62732539; Fax: +86-10-62733608; E-mail: zxli@cau.edu.cn

Received: 21 June 2007 / Revised: 17 September 2007