

mtCOI PCR-RFLP 技术鉴别中国入侵型和土著型烟粉虱种群的有效性分析*

周新改¹ 刘美刚² 杨小红³ 林克剑⁴ 马伟华^{1**} 王沫¹

(1. 湖北省昆虫资源利用与害虫可持续治理重点实验室 华中农业大学 武汉 430070;

2. 湖北省仙桃市植物保护站 仙桃 433000; 3. 湖北省潜江市植物保护站 潜江 433104;

4. 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100193)

摘 要 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是世界范围内最重要的入侵生物之一, 准确地鉴别烟粉虱入侵生物型和土著生物型具有十分重要的现实意义。*mtCOI* PCR-RFLP 技术具有快速、高效的特点, 是当前应用最广泛的烟粉虱生物型鉴定技术, 但是, 不同限制性内切酶为基础的 *mtCOI* PCR-RFLP 技术在鉴别我国烟粉虱种群中的有效性仍不明。本文比较了已报导的 5 种 *mtCOI* PCR-RFLP 技术在鉴别中国烟粉虱种群入侵生物型和土著生物型 (B 型、Q 型、ZHJ1 型、ZHJ2 型、ZHJ3 型) 的有效性。结果表明, 内切酶 *AluI* 不能区分 B 型和 ZHJ2 型烟粉虱; 内切酶 *TaqI* 不能准确区分 ZHJ3 型和 Q 型烟粉虱个体; 而内切酶 *VspI* 不仅不能准确区分 ZHJ1 型和 Q 型烟粉虱个体, 也不能准确区分 B 型和 ZHJ2 型烟粉虱; 内切酶 *MseI* 和 *Tru9I* 则不能有效鉴别上述 5 种烟粉虱生物型, 因此不适宜推广使用。

关键词 烟粉虱, 生物型, 限制性内切酶, *mtCOI* PCR-RFLP

Utility of *mtCOI* PCR-RFLP in differentiating invasive and local whitefly biotypes of China

ZHOU Xin-Gai¹ LIU Mei-Gang² YANG Xiao-Hong³ LIN Ke-Jian⁴

MA Wei-Hua^{1**} WANG Mo¹

(1. Hubei Insect Resources Utilization and Sustainable Pest Management Key Laboratory,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Xiantao Plant Protection Station, Xiantao 433000, China;

3. Qianjiang Plant Protection Station, Qianjiang 433104, China; 4. Institute of Plant Protection,

China Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China)

Abstract *Bemisia tabaci* (Gennadius) is one of the most important invasive pests in China. The *mtCOI* PCR-RFLP technique is currently widely used to identify different whitefly biotypes worldwide. In this paper, we compared the utility and efficiency of five commonly reported *mtCOI* based PCR-RFLP techniques in differentiating invasive and local *B. tabaci* biotypes (B, Q, ZHJ1, ZHJ2 and ZHJ3) in China. Our results show that the *AluI* enzyme fails to differentiate between the B and ZHJ2 biotypes, the *TaqI* enzyme cannot effectively differentiate between the ZHJ3 and Q biotypes, the *VspI* enzyme is not effective in differentiating between either the B and ZHJ2 biotypes or the Q and ZHJ1 biotypes, and the *MseI* and *Tru9I* enzymes are completely unable to identify any of the five biotypes found in China.

Key words *Bemisia tabaci*, biotype, endonuclease, *mtCOI* PCR-RFLP

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 属于同翅目粉虱科, 是一种重要的世界性害虫 (褚栋等, 2004; 刘树生等, 2005; 万方浩等, 2009)。烟粉虱

生物型种类繁多, 传统的形态学和生物化学的方法不能达到在较大地域范围内及时、快速地检测入侵型烟粉虱 (Q 型和 B 型) 种群的登陆和分布等

* 资助项目: 国家自然科学基金 (30800131)。

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

收稿日期: 2011-10-25, 接受日期: 2011-11-08

目的,因此,烟粉虱生物型分子鉴定技术应运而生,这包括:非特异性酯酶同工酶电泳图谱比较 (Brown *et al.*, 1995)、线粒体细胞色素氧化酶 I (mitochondrial cytochrome oxidase I, *mtCOI*) 基因和核糖体 DNA 内部转录间隔子 I (internal transcribed spacer I, *ITS1*) 的序列测定及系统发生分析 (De Barro *et al.*, 2000; Khasdan *et al.*, 2005)、生物型特异性 DNA 片断分析 (如 AFLP, amplified fragment-length polymorphism) (Zhang *et al.*, 2005)、RAPD-PCR (random amplification of polymorphic DNA-polymerase Chain reaction) (De Barro and Driver, 2005)、微卫星 (microsatellites) 标记 (De Barro *et al.*, 2003)、序列特异扩增区域 (sequence characterized amplified region, SCAR) (Ko *et al.*, 2007) 以及以 *mtCOI* 和钠离子通道基因为基础的 PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism, 例如: CAPS, cleaved amplified polymorphic sequences) (Bosco *et al.*, 2006)。其中,以 *mtCOI* 基因片段序列为基础的 PCR-RFLP 技术应用最广,已被国内外广泛用于鉴别 Q 型、B 型和土著生物型烟粉虱。

mtCOI PCR-RFLP 技术是指在 PCR 克隆 *mtCOI* 基因特定区域的基础上,应用特定的 DNA 限制性内切酶与 PCR 产物反应,由于不同烟粉虱生物型 *mtCOI* 基因特定区域内内切酶识别位点的分布状况不同这一特性,所以不同生物型酶切产物的凝胶电泳图谱不同,从而达到鉴别不同生物型的目的。至今,已报导的应用于 *mtCOI* PCR-RFLP 技术鉴别烟粉虱生物型的 DNA 限制性内切酶主要有 5 种: *AluI*、*TaqI*、*Tru9I*、*MseI* 和 *VspI* (Khasdan *et al.*, 2005; Bosco *et al.*, 2006)。为验证上述 5 种内切酶为基础的 *mtCOI* PCR-RFLP 技术是否适用于鉴别中国 Q 型、B 型、ZHJ1 型、ZHJ2 型和 ZHJ3 型烟粉虱,本文分析了湖北省本地烟粉虱种群和 GenBank 数据库中中国地区烟粉虱种群 *mtCOI* 基因序列内不同内切酶位点多态性,并讨论了 *mtCOI* PCR-RFLP 技术在鉴别入侵生物型和土著生物型烟粉虱时的适用性。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试烟粉虱地理种群分别于 2008 和 2009 年采自湖北武汉、随州、武穴、孝感和荆州地区 (表

1),成虫采回后于室内养虫笼 (25 cm × 25 cm × 50 cm) 隔离饲养,每品系随机选取 5 ~ 10 头雌性成虫用来提取单头 DNA。室内饲养寄主为鄂棉 23,养虫室饲养条件为: (26 ± 2) °C, RH 60%, 光暗比 L:D = 16:8。

1.2 单头烟粉虱 DNA 提取

参照 Frohlich 等 (1999) 和罗晨等 (2002) 的方法:从单头烟粉虱雌成虫个体中提取总 DNA,即将 1 只烟粉虱个体置于滴有 20 μL 碱裂解液 [50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0)、20 mmol · L⁻¹ NaCl、1 mmol · L⁻¹ EDTA、1% SDS] 的石蜡封口膜上;用 0.2 mL 的 PCR 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,向管中加入 1 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K,充分混匀后置于 60 °C 水浴锅中 2 h;随后每管加入 179 μL 的 ddH₂O,100 °C 下水浴 5 min;取 100 μL 提取液,加入 2 倍体积的预冷无水乙醇,冰浴 2 h;12 000 r/min 离心 20 min, DNA 沉淀在室温下晾干;每管加入 20 μL 缓冲液 (TE, pH 8.0),溶解后即可用于 PCR 反应。

1.3 PCR 扩增及测序

所用引物 C1 - J - 2195 (5' TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAAGT3'), tRNA - 1576 (5' TATA AATCTTAAACTGCA3') (Frohlich *et al.*, 1999), 扩增产物大小约为 800 bp。PCR 反应系统体积为 50 μL, 含 2.5 U Taq 酶, 2 μL C1 - J - 2195 (10 μmol · L⁻¹), 2 μL tRNA - 1576 (10 μmol · L⁻¹), 模板 DNA 为 2 μL。反应体系于 94 °C 预变性 5 min 后,进行 35 个如下循环:94 °C 变性 1 min;50 °C 退火 1 min;72 °C 延伸 1 min。循环结束后 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应产物被直接用来测序。

1.4 适用性分析

通过克隆测序得到的 41 条湖北烟粉虱种群 *mtCOI* 基因序列 (表 1) 和 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载的 95 条 *mtCOI* 基因序列 (表 2, 这些序列分别来自于中国 B 型、Q 型、ZHJ1 型、ZHJ2 型和 ZHJ3 型烟粉虱) 被一起用来做比对分析 (Vector NTI 10.0)。得到的比对序列用来搜索不同内切酶 (*AluI*-AGCT、*TaqI*-TCGA、*Tru9I*-TTAA、*MseI*-TTAA 和 *VspI*-ATTAAT) 的识别位点位置,进一步分析各生物型内是否存在位点差异性。

此外,依据识别位点位置,推测酶切产物凝胶电泳后的 DNA 片段大小,并绘制凝胶照片模式图。最后,依据不同生物型间电泳照片模式图的相似程度(酶切片段大小相差大于 50 bp 为可视性差异),判断该内切酶在鉴别不同生物型时的适用性。

2 结果与分析

2.1 *AluI* 内切酶的适用性

比对序列中 *AluI* 内切酶识别位点分别存在于 202、217、296、387、524、610、613、753 和 794 bp(图 1:A)。其中,753 bp 位点在比对序列中出现频率最高,存在于除 ZHJ3 型烟粉虱外的所有生物型中;其次依次为 202 bp 位点(Q 型、B 型和 ZHJ1 型)、217 bp 位点(Q 型、ZHJ1 和 ZHJ2)、296 bp 位点和 387 bp 位点(QI 型和 ZHJ1 型)、794 bp 位点(Q 型和 B 型)、524 bp 位点和 613 bp 位点(Q 型)、610 bp 位点(ZHJ1 型)(图 1:A)。此外,ZHJ3 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 基因片段中没有检索到 *AluI* 内切酶识别位点(图 1:A)。

依据位点多态性,Q 型烟粉虱可分为 4 个亚类:Q type I、II、III 和 IV,根据各亚类型多态性特点,将所有检测个体标注为不同亚类型(表 1,2),并分别计算各亚类型个体数占总检测的同生物型个体的比例,得到各亚类型所占比例依次为:91.2%、1.5%、3.0% 和 4.4%(图 1:A);而所有检测的 B 型、ZHJ1 型、ZHJ2 型和 ZHJ3 型烟粉虱的相同生物型个体间不存在位点差异(图 1:A)。

依据 *AluI* 的识别位点位置,可以推测出 Q type I 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段经酶切后将在凝胶上显现出大小 ~150 bp、~200 bp 和 ~400 bp 的 3 个片段;Q type II 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段经酶切后显现出大小 ~200 bp 和 ~500 bp 的 2 个片段;Q type III 型烟粉虱个体的 PCR 产物经酶切后将显示大小 ~200 bp 和 ~350 bp 的 2 个片段;Q type IV 型烟粉虱个体的 PCR 产物经酶切后可显示出大小 ~150 bp、~200 bp 和 ~300 bp 的 3 个片段;而 B 型烟粉虱个体的酶切图谱则为 ~200 bp 和 ~500 bp 的 2 个片段;ZHJ1 型、ZHJ2 型及 ZHJ3 型个体的酶切图谱分别为 ~150 bp 和 ~200 bp 的 2 个片段、~200 bp 和 ~500 bp 的 2 个片段及 ~800 bp 的 1 个片段(表 3)。由此可以看出,应用 *AluI* 内切酶时,B 型、ZHJ2 型及 4.4% Q

型烟粉虱个体具有相同的酶切图谱。

2.2 *TaqI* 内切酶识别位点多态性

TaqI 内切酶在比对序列中的识别位点较少,分别位于 198、387、610 和 613 bp(图 1:B)。识别位点中,198 bp 位点存在于 Q 型和 B 型烟粉虱中;387 bp 位点只存在于 Q 型和 ZHJ1 型烟粉虱中;613 bp 位点只存在于 Q 型和 B 型烟粉虱中;而 610 bp 位点仅存在于 ZHJ3 型个体中(图 1:B)。此外,ZHJ2 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 基因片段中没有检索到 *TaqI* 内切酶识别位点(图 1:B)。

同样,Q 型烟粉虱个体间存在酶切位点多态性,可分为 3 个亚类:Q type I、II 和 III,根据各亚类型多态性特点,将所有检测个体标注为不同亚类型(表 1,2),并分别计算各亚类型个体数占总检测的同生物型个体的比例,得到各亚类型所占比例依次为:97.0%、1.5% 和 1.5%(图 1:B);而所有 B 型、ZHJ1 型、ZHJ2 型和 ZHJ3 型的相同生物型个体间不存在位点差异(图 1:B)。

根据 *TaqI* 的识别位点位置,Q type I 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段经酶切后将在凝胶上显现出大小 ~200 bp 和 ~600 bp 的 2 个片段;Q type II 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段经酶切后显现出大小 ~200 bp 和 ~400 bp 的 2 个片段;Q type III 型烟粉虱个体的 PCR 产物经酶切后将显示出大小 ~400 bp 的 1 个片段;而 B 型烟粉虱个体的酶切图谱则为 ~200 bp 和 ~400 bp 的 2 个片段;ZHJ1 型、ZHJ2 型及 ZHJ3 型个体的酶切图谱分别为 ~400 bp 的 1 个片段、~800 bp 1 个片段及 ~200 bp 和 ~600 bp 的 2 个片段(表 3)。由此可见,在应用 *TaqI* 内切酶时,B 型和 1.5% Q 型烟粉虱个体具有相同的酶切图谱;ZHJ1 型和 1.5% Q 型烟粉虱个体具有相同的酶切图谱;而 ZHJ3 型和 97.0% Q 型烟粉虱个体具有相同的酶切图谱。

2.3 *MseI*/*Tru9I* 内切酶识别位点多态性

内切酶 *MseI* 和 *Tru9I* 具有相同的识别序列(TTAA)。比对序列中,内切酶 *MseI* 和 *Tru9I* 的识别位点较多,分别存在于 65、248、291、356、494、506、512、566、677 和 786 bp(图 1:C)。其中,248 bp 位点、356 bp 位点、566 bp 位点和 786 bp 位点在比对序列中的出现频率最高,存在于所有烟粉虱生物型中;其次依次为 506 bp 位点(Q 型、B 型、ZHJ1 型和 ZHJ2 型)、65 bp 位点(Q 型、ZHJ2 型和

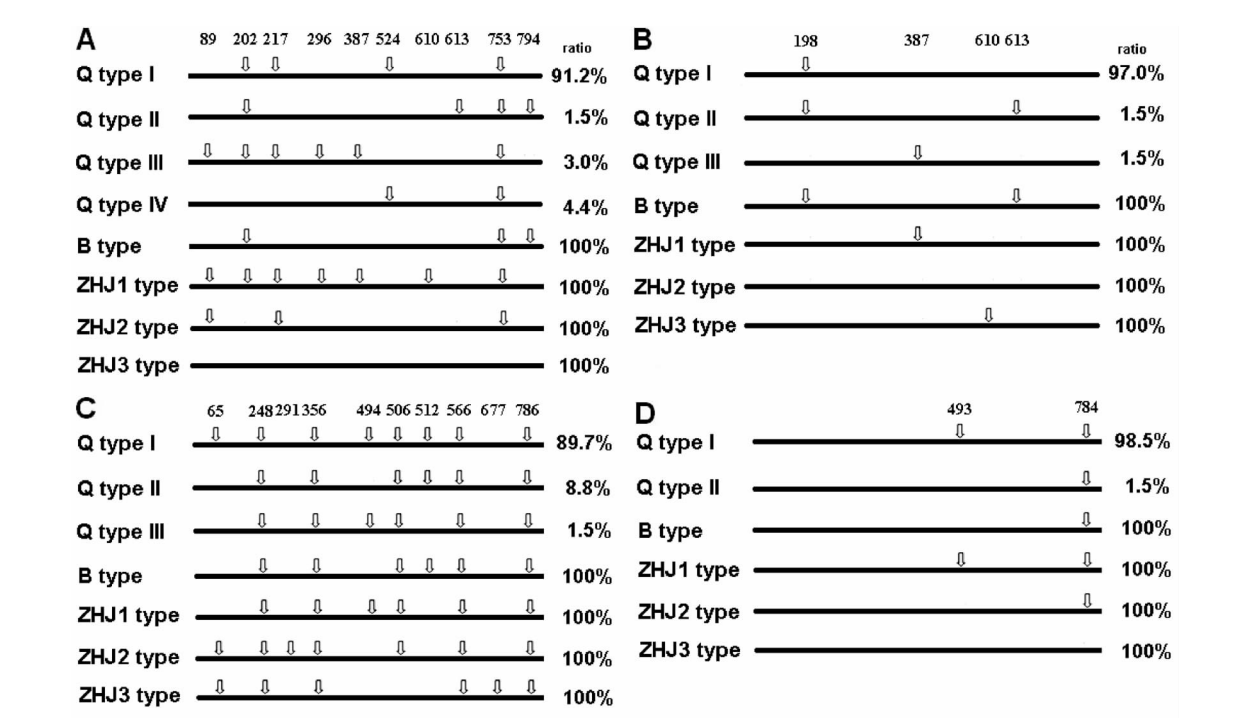


图 1 内切酶识别位点多态性及酶切图谱多态性

Fig.1 Schematic diagram of the different enzymes polymorphic types of *mtCOI* gene

黑色横条代表 *mtCOI* 基因片段,左边为生物型类型及

亚类型,右边为各亚类型所占比例。内切酶识别位点以箭头表示,识别位点位置为上方数字表示。

The different enzymes polymorphic types of *mtCOI* gene amplicons are presented as filled boxes, with their classification, expected ratios of each type are shown in the left and in the right, respectively. The enzymes sites and their estimated rough positions within each *mtCOI* gene amplicon are indicated by arrows above the boxes and numbers above the boxes.

A. *AluI*; B. *TaqI*; C. *MseI/Tru9I*; D. *VspI*.

ZHJ3 型)、494 bp 位点(Q 型和 ZHJ1 型)、512 bp 位点(Q 型和 B 型)、291 bp 位点(ZHJ2 型)、677 bp 位点(ZHJ3 型)(图 1:C)。

5 种生物型中,仍然仅有 Q 型烟粉虱个体间存在识别位点多态性,可分为 3 个亚类:Q type

I、II 和 III,根据各亚类型多态性特点,将所有检测个体标注为不同亚类型(表 1,2),并分别计算各亚类型个体数占总检测的同生物型个体的比例,得到各亚类型所占比例依次为:89.7%、8.8%和 1.5%(图 1:C)。

表 1 湖北本地烟粉虱地理种群生物型酶切类型

Table 1 The eight strains of *Bemisia tabaci* collected from Hubei, China and their classification

品系 Strain	采集地 Collection	寄主 Host	生物型 Biotype	样本数 Sample	查询码 Accession no.	<i>AluI</i>	<i>MseI/Tru9I</i>	<i>VspI</i>	<i>TaqI</i>
WHgh08	武汉	棉花	B	9	HM597872—80	I	I	I	I
WHgh09	武汉	棉花	B	8	HM597881—88	I	I	I	I
WHfield	武汉	棉花	Q	5	HM597867—71	I	I	I	I
XGfield	孝感	棉花	Q	5	HM597862—66	I	I	I	I
SZfield	随州	棉花	Q	5	HM597852—56	I	I	I	I
JZfield	荆州	棉花	Q	5	HM597847—51	I	I	I	I
WXfield	武穴	棉花	Q	5	HM597857—61	I, V	I	I	I, III
WXfield	武穴	棉花	ZHJ1	4	HM626150—53	I	I	I	I

按照内切酶 *MseI* 和 *Tru9I* 的识别位点位置, Q type III 型烟粉虱个体的酶切图谱为大小 ~150 bp 和 ~220 bp 的 2 个片段; ZHJ3 型个体的酶切图谱为 ~150 bp 和 ~210 bp 的 2 个片段; 而其它生物型类别的烟粉虱个体的 *mtCOI* 酶切图谱则都为 ~150 bp 和 ~250 bp 的 2 个片段(表 3)。因此, 应用 *MseI/Tru9I* 内切酶时, 5 种生物型间的酶切电泳图谱都非常近似。

2.4 *VspI* 内切酶识别位点多态性

比对序列中, *VspI* 内切酶识别位点最少, 只出现在 493 bp 和 784 bp 2 个位置(图 1:D)。493 bp 位点存在于 Q 型和 ZHJ1 型烟粉虱中; 而 784 bp 位点存在于 Q 型、B 型、ZHJ1 型和 ZHJ2 型个体中(图 1:D)。此外, ZHJ3 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 基因片段中没有检索到 *VspI* 内切酶识别位点(图 1:D)。

Q 型烟粉虱可依位点多态性分为 2 个亚类: Q type I 和 II, 根据各亚类型多态性特点, 将所有检

测个体标注为不同亚类型(表 1, 2), 并分别计算各亚类型个体数占总检测的同生物型个体的比例, 得到各亚类型所占比例依次为 98.5% 和 1.5%(图 1:D); 而所有 B 型、ZHJ1 型、ZHJ2 型和 ZHJ3 型的相同生物型个体间不存在位点差异(图 1:D)。

依据内切酶 *VspI* 的识别位点位置, Q type I 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段酶切图谱为大小 ~300 bp 和 ~500 bp 的 2 个片段; Q type II 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段经酶切后显现出大小 ~750 bp 的 1 个片段; 而 B 型烟粉虱个体的酶切图谱则为 ~750 bp 的 1 个片段; ZHJ1 型、ZHJ2 型及 ZHJ3 型个体的酶切图谱分别为 ~300 bp 和 ~500 bp 的 2 个片段、~750 bp 的 1 个片段及 ~800 bp 的 1 个片段(表 3)。上述说明, 在应用 *VspI* 内切酶时, B 型、ZHJ2 型和 1.5% Q 型烟粉虱个体具有相同的酶切图谱; ZHJ1 型和 98.5% Q 型烟粉虱个体具有相同的酶切图谱。

表 2 中国烟粉虱地理种群 *mtCOI* PCR-RFLP 酶切类型

Table 2 Geographic origins and enzymes types of *Bemisia tabaci* strains retrieved from GeneBank

号码 Code	生物型 Biotype	起源地 Collection	查询码 Accession no.	<i>AluI</i>	<i>MseI/Tru9I</i>	<i>VspI</i>	<i>TaqI</i>
1	B	湖北	EU376994	I	I	I	I
2	B	湖北	EU376993	I	I	I	I
3	B	湖北	EU376990	I	I	I	I
4	B	湖北	EU376989	I	I	I	I
5	B	湖北	EU255285	I	I	I	I
6	B	湖北	EU255281	I	I	I	I
7	B	湖北	EU000311	I	I	I	I
8	B	湖北	EF667473	I	I	I	I
9	B	广东	EF566761	I	I	I	I
10	B	湖北	EF566759	I	I	I	I
11	B	湖北	EF566758	I	I	I	I
12	B	湖北	EF566757	I	I	I	I
13	B	山西	EF566756	I	I	I	I
14	B	北京	EF566755	I	I	I	I
15	B	北京	EF566754	I	I	I	I
16	B	北京	EF566753	I	I	I	I
17	B	广东	AY686070	I	I	I	I
18	B	广东	AY686071	I	I	I	I
19	B	江西	AY686073	I	I	I	I
20	B	广西	AY686074	I	I	I	I
21	B	上海	AY686076	I	I	I	I
22	B	广东	AY686077	I	I	I	I

续表 2

号码 Code	生物型 Biotype	起源地 Collection	查询码 Accession no.	<i>AluI</i>	<i>MseI/Tru9I</i>	<i>VspI</i>	<i>TaqI</i>
23	B	云南	AY686078	I	I	I	I
24	B	山东	AY686079	I	I	I	I
25	B	台湾	AY686080	I	I	I	I
26	B	山西	AY686081	I	I	I	I
27	B	新疆	AY686082	I	I	I	I
28	B	陕西	AY686084	I	I	I	I
29	B	广东	AY686086	I	I	I	I
30	B	江苏	AY686087	I	I	I	I
31	B	河南	AY686090	I	I	I	I
32	B	香港	AY686069	I	I	I	I
33	B	广东	AY686068	I	I	I	I
34	B	安徽	AY686067	I	I	I	I
35	B	杭州	AY686066	I	I	I	I
36	B	北京	AY686065	I	I	I	I
37	B	广州	AY686063	I	I	I	I
38	B	福建	AY686062	I	I	I	I
39	B	浙江	AJ867555	I	I	I	I
40	B	海南	AY611642	I	I	I	I
41	B	浙江	GQ332577	I	I	I	I
42	Q	湖北	EU376996	I	I	I	I
43	Q	湖北	EU376995	II	I	I	I
44	Q	湖北	EU376988	I	I	I	I
45	Q	湖北	EU376987	I	I	I	I
46	Q	湖北	EU376986	I	I	I	I
47	Q	湖北	EU376985	I	I	I	I
48	Q	湖北	EU376984	I	I	I	I
49	Q	湖北	EU376983	I	I	I	I
50	Q	湖北	EU376982	I	I	I	I
51	Q	湖北	EU376981	I	I	I	I
52	Q	湖北	EU376980	I	I	I	I
53	Q	湖北	EU376979	I	I	I	I
54	Q	湖北	EU376978	I	I	I	I
55	Q	湖北	EU376977	I	I	I	I
56	Q	湖北	EU376976	I	I	I	I
57	Q	湖北	EU376975	I	I	I	I
58	Q	湖北	EU255284	I	I	I	I
59	Q	湖北	EU255283	I	I	I	I
60	Q	湖北	EU255282	I	I	I	I
61	Q	湖北	EU255280	I	I	I	I
62	Q	湖北	EU255279	I	I	I	I
63	Q	湖北	EU255278	I	I	I	I
64	Q	湖北	EU000321	III	II	I	I
65	Q	湖北	EU000320	I	II	I	I
66	Q	湖北	EU000319	I	II	I	I
67	Q	湖北	EU000318	I	II	I	I

续表 2

号码 Code	生物型 Biotype	起源地 Collection	查询码 Accession no.	<i>AluI</i>	<i>MseI/Tru9I</i>	<i>VspI</i>	<i>TaqI</i>
68	Q	湖北	EU000315	I	II	I	I
69	Q	湖北	EU000314	I	I	I	I
70	Q	湖北	EU000313	I	I	I	I
71	Q	湖北	EU000312	III	II	II	II
72	Q	湖北	EF694112	I	I	I	I
73	Q	湖北	EF694111	I	I	I	I
74	Q	湖北	EF694110	I	I	I	I
75	Q	湖北	EF694109	I	I	I	I
76	Q	湖北	EF694108	I	I	I	I
77	Q	湖北	EF694107	I	I	I	I
78	Q	湖北	EF694106	I	I	I	I
79	Q	湖北	EF694105	I	I	I	I
80	Q	湖北	EF694104	I	I	I	I
81	Q	湖北	EF667477	IV	I	I	I
82	Q	湖北	EF667476	I	I	I	I
83	Q	湖北	EF667474	I	I	I	I
84	Q	河北	EF608148	IV	I	I	I
85	Q	湖北	EF566760	IV	I	I	I
86	Q	浙江	DQ473394	I	I	I	I
87	Q	重庆	AY686091	I	I	I	I
88	Q	湖北	AY686089	I	I	I	I
89	Q	广东	AY686083	I	I	I	I
90	ZHJ1	浙江	DQ309074	I	I	I	I
91	ZHJ1	浙江	DQ309075	I	I	I	I
92	ZHJ1	浙江	DQ309076	I	I	I	I
93	ZHJ2	浙江	DQ309077	I	I	I	I
94	ZHJ3	浙江	DQ309078	I	I	I	I
95	ZHJ3	浙江	GQ303180	I	I	I	I

2.5 同时使用 2 种内切酶鉴别烟粉虱生物型

为弥补单独使用上述内切酶在鉴别烟粉虱生物型过程中可能出现的不准确性,本文分析了同时使用 2 种内切酶鉴别不同烟粉虱生物型的可能性。由于单独使用 *AluI* 和 *MseI* 已经产生很多小片段,因此这 2 种酶与其它酶混用前景微妙,而相比之下, *TaqI* 和 *VspI* 本身产生的片段不多,因此本文仅就后 2 种酶的混用结果进行了分析。结果表明,比对序列中, *TaqI* 和 *VspI* 混用后, Q type I 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段酶切图谱为大小 ~150 bp、~200 bp 和 ~400 bp 的 3 个片段; Q type II 型烟粉虱个体的 *mtCOI* 片段经酶切后显现出大小 ~200 bp 和 ~300 bp 的 2 个片段; Q type III 型烟粉虱个体的 PCR 产物经酶切后将显示出大小 ~100

bp、~300 bp 和 ~400 bp 的 3 个片段;而 B 型烟粉虱个体的酶切图谱则为 ~150 bp、~200 bp 和 ~400 bp 的 3 个片段,与 Q type I 型烟粉虱个体相同; ZHJ1 型个体的酶切图谱分别为 100 bp、~300 bp 和 ~400 bp 的 3 个片段,与 Q type III 型烟粉虱个体相同; ZHJ2 型个体的酶切图谱为 ~750 bp 1 个片段; ZHJ3 型个体的酶切图谱为 ~200 bp 和 ~600 bp 的 2 个片段(表 3)。上述说明,在应用 *TaqI* 和 *VspI* 内切酶组合无法鉴别 B 型和 Q type I 型烟粉虱个体,及 ZHJ1 型和 Q type III 型烟粉虱个体。

3 讨论

烟粉虱是一个进化很快的复合种,至 2005

年,世界范围内共报导了至少有 26 种烟粉虱生物型(万方浩等,2009)。大多数烟粉虱生物型往往分布在特定的地理区域内,而 B 型和 Q 型烟粉虱却已成为世界范围内最重要的入侵物种之一,且其寄主谱扩张能力明显强于其它生物型(De Barro *et al.*, 2006)。B 型和 Q 型烟粉虱在过去的 20 年中于世界范围内迅速扩散,并成为热带和亚热带地区的主要害虫之一。不仅如此,在许多国家和地区,入侵的 B 型和 Q 型烟粉虱逐步取代土著烟粉虱种群,而成为优势种(De Barro *et al.*, 2006)。因此,明确烟粉虱地理种群的生物型组成,是制定合理有效防治措施的重要前提。*mtCOI* PCR-RFLP 技术是当前应用最广泛的烟粉虱生物型的分子鉴定技术,已被国内外普遍采用作为快速鉴定/鉴别不同烟粉虱生物型,尤其是鉴别土著生物型和入侵生物型烟粉虱的核心技术。

本研究表明, *AluI*-*mtCOI* PCR-RFLP 技术能有效鉴别中国 ZHJ1 型、ZHJ3 型和 95.6% 的 Q 型烟粉虱个体,却不能区分 B 型和 ZHJ2 型烟粉虱;应用 *TaqI*-*mtCOI* PCR-RFLP 技术能有效鉴别中国 ZHJ1 型、ZHJ2 型和 B 型烟粉虱个体,却不能区分 ZHJ3 型和 97.0% 的 Q 型烟粉虱个体;而 *VspI*-*mtCOI* PCR-RFLP 技术不仅不能鉴别 ZHJ1 型和 98.5% 的 Q 型烟粉虱个体,也不能区分 B 型和 ZHJ2 型烟粉虱;内切酶 *MseI* 和 *Tru9I* 则不能有效鉴别上述 5 种烟粉虱生物型。

虽然应用 *mtCOI* 基因序列分析技术鉴定烟粉虱生物型可以得到更准确的信息,但是这项技术耗时耗力,因此, *mtCOI* PCR-RFLP 技术仍然是快速同时鉴定大量烟粉虱样品生物型的首选方法。然而,各内切酶及组合在鉴别中国土著型和入侵性烟粉虱种群生物型过程中表现出一定的或然性,因此可以考虑分别采用 2 种或 2 种以上的内切酶的方法来提高生物型鉴定的准确率。例如:内切酶 *VspI* 虽不能鉴别 ZHJ1 型和 Q 型烟粉虱,但是可以鉴别 B 型和 Q 型烟粉虱,而内切酶 *AluI* 则可以较高效的鉴别 ZHJ1 型和 Q 型烟粉虱,因此,同时应用上述 2 种或以上内切酶对相同样品进行分析,便可达到取长补短的效果。

最近的研究证明,与 B 型烟粉虱相比, Q 型烟粉虱可以适应的寄主谱范围更广,具有更强的寄主适应能力(Lida *et al.*, 2009),并已成为当前我国大部分地区烟粉虱地理种群中的优势种群

表 3 不同内切酶处理后的片段多态性

Table 3 Expected profiles of the different enzymes polymorphic types of *mtCOI* gene

内切酶 Enzymes	生物型及亚型 Biotype	片段大小 (bp) Band size
<i>AluI</i>	Q type I	150,200,300
	Q type II	150,200,400
	Q type III	200,350
	Q type IV	200,500
	B	200,500
	ZHJ1	150,200
	ZHJ2	200,500
	ZHJ3	800
	Q type I	200,600
	Q type II	200,400
<i>TaqI</i>	Q type III	400
	B	200,400
	ZHJ1	400
	ZHJ2	800
	ZHJ3	200,600
<i>MseI/Tru9I</i>	Q type I	150,220
	Q type II	150,250
	Q type III	150,250
	B	150,250
	ZHJ1	150,250
	ZHJ2	150,250
	ZHJ3	150,210
<i>VspI</i>	Q type I	300,500
	Q type II	750
	B	750
	ZHJ1	300,500
	ZHJ2	750
	ZHJ3	800
<i>TaqI + VspI</i>	Q type I	150,200,400
	Q type II	150,200,400
	Q type III	200,300
	B	100,300,400
	ZHJ1	100,300,400
	ZHJ2	750
	ZHJ3	200,600

(Teng *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2011)。由表 1 和表 2 可知,中国烟粉虱种群中,仅有 Q 型烟粉虱存在生物型亚类的特点,这从一个侧面说明 Q 型烟粉虱本身具有相对于其它生物型更高的遗传变异性,以适应多种多样的外界环境压力。

总之,与 *mtCOI* 基因片段序列分析相比,PCR-

RFLP 技术虽然具有快速、高效的特点,但其在鉴别/鉴定中国入侵型和土著型烟粉虱生物型的准确性值得注意。此外,虽然上述 *mtCOI* PCR-RFLP 技术都具有一些缺点,但是,如果分别应用 2 种及 2 种以上的内切酶则可以获得更为精确的结果。

致谢:感谢华中农业大学植物科学技术学院王小平教授对本文所作的修改及对研究内容提出的宝贵意见。

参考文献 (References)

- Bosco D, Loria A, Sartor C, Cenis JL, 2006. PCR-RFLP Identification of *Bemisia tabaci* biotypes in the Mediterranean Basin. *Phytoparasitica*, 34 (3):243—251.
- Brown JK, Coats 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.*, 33:205—214.
- De Barro PJ, Bourne A, Khan SA, Brancatini VAL, 2006. Host plant and biotype density interactions-their role in the establishment of the invasive B biotype of *Bemisia tabaci*. *Biol. Invasions*, 8:287—294.
- De Barro PJ, Driver F, Trueman JWH, Curran J, 2000. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal *ITS1*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 16 (1):29—36.
- De Barro PJ, Driver F, 1997. Use of RAPD-PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Ecol.*, 36:149—152.
- De Barro PJ, Scott KD, Graham GC, Lange CL, Curran J, 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Mol. Ecol. Notes*, 3:40—43.
- Frohlich DR, Torres-Jerez II, Bedford ID, Markham PG, Brown JK, 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.*, 8 (10):1683—1691.
- Iida H, Kitamura T, Honda K, 2009. Comparison of egg-hatching rate, survival rate and development time of the immature stage between B-and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) on various agricultural crops. *Appl. Entomol. Zool.*, 44 (2):267—273.
- Khasdan V, Levin I, Rosner A, Morin S, Kontsedalov S, Maslennin L, Horowitz AR, 2005. DNA markers for identifying biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and studying population dynamics. *Bull. Entomol. Res.*, 95:605—613.
- Ko CC, Hung YC, Wang CH, 2007. Sequence characterized amplified region markers for identifying biotypes of *Bemisia tabaci* (Hem., Aleyrodidae). *J. Appl. Entomol.*, 131 (8):542—547.
- Rao Q, Luo C, Zhang H, Guo X, Devine GJ, 2011. Distribution and dynamics of *Bemisia tabaci* invasive biotypes in central China. *Bull. Entomol. Res.*, 101 (1):81—88.
- Teng X, Wan FH, Chu D, 2010. *Bemisia tabaci* biotype Q dominates other biotypes across China. *Florida Entomol.*, 93 (3):363—368.
- Zhang LP, Zhang YJ, Zhang WJ, Wu QJ, Xu BY, Chu D, 2005. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. *J. Appl. Entomol.*, 129:121—128.
- 褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君. 2004. 世界性重要害虫 B 型烟粉虱的入侵机制. *昆虫学报*, 47 (3):400—406.
- 刘树生, 张友军, 罗晨. 2005. 烟粉虱 // 万方浩, 郑小波, 郭建英主编. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京:科学出版社. 69—128.
- 罗晨, 姚远, 王戎疆, 闫凤鸣, 胡敦孝, 张芝利, 2002. 利用 mtDNA *COI* 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. *昆虫学报*, 45 (6):759—763.
- 万方浩, 张桂芬, 刘树生, 罗晨, 褚栋, 张友军, 臧连生, 纠敏, 吕志创, 崔旭红, 张丽萍, 张帆, 张青文, 刘万学, 梁沛, 雷仲仁, 张永军, 2009. B 型烟粉虱的入侵机理与控制基础——国家重点基础研究发展计划“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”进展. *中国科学 C 辑:生命科学*, 39 (2):141—148.