

烟粉虱传毒相关蛋白基因的克隆及其表达量分析*

刘馨** 闫文茜 张友军 吴青君 谢文 王少丽***

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要 【目的】烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是一种世界性的入侵性害虫, 其传播的番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 给我国番茄生产造成巨大经济损失。为了阐明烟粉虱传播双生病毒的机理, 本文拟研究明确 B 和 Q 烟粉虱体内传毒相关蛋白 *GroEL* 基因及其表达量。【方法】采用特异性引物克隆了 B 和 Q 烟粉虱内共生菌编码的传毒相关蛋白 *GroEL* 基因, 并进行序列分析; 并利用荧光定量 PCR 技术检测两种生物型及其获取双生病毒前后该基因的相对表达量。【结果】烟粉虱内共生菌 *Hamiltonella* 编码的 *GroEL* 基因全长为 1 668 bp, 编码 555 个氨基酸; B、Q 烟粉虱该基因的核苷酸序列相似性为 99.94%, 氨基酸同源性为 99.82%; 带毒烟粉虱中 *GroEL* 基因的表达量显著高于未带毒的对应生物型烟粉虱; 无论带毒与否, Q 烟粉虱该基因的表达量均显著高于 B ($P < 0.05$)。【结论】烟粉虱携带 TYLCV 后可诱导 *GroEL* 的表达量升高, B 和 Q 烟粉虱中 *GroEL* 基因及其表达量均存在差异, 这可能是 B 和 Q 烟粉虱传毒效率存在显著差异的原因之一。

关键词 烟粉虱, 番茄黄化曲叶病毒, 传毒相关蛋白, 荧光定量 PCR

Cloning and relative expression of a virus-transmission related gene in *Bemisia tabaci* (Gennadius)

LIU Xin** YAN Wen-Qian ZHANG You-Jun WU Qing-Jun XIE Wen WANG Shao-Li***

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract 【Objectives】The sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius), is one of the most invasive insect pests in the world. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), transmitted by *B. tabaci*, has caused great losses to tomato production in China. In order to illustrate the mechanism of TYLCV transmission by *B. tabaci*, we studied the virus transmission-related gene (*GroEL*) and its expression in the *B. tabaci* B and Q. 【Methods】The virus transmission-related gene, *GroEL*, encoded by the *Hamiltonella* endosymbiont of the *B. tabaci* B and Q, was cloned using specific primers and the resultant sequences were analyzed. The relative expressions of *GroEL* were measured using the qRT-PCR technique in *B. tabaci* that had fed on both healthy and viruliferous tomato plants. 【Results】The results showed that the *GroEL* gene was 1 668 bp in full length, encoding 555 amino acids. There was 99.94% nucleotide sequence similarity and 99.82% amino acid homology in *GroEL* genes between the *B. tabaci* B and Q. *GroEL* expressions in viruliferous *B. tabaci* were significantly higher than in corresponding uninfected whiteflies. Also *GroEL* expression in the *B. tabaci* Q was proved to be significantly higher than B ($P < 0.05$), regardless of whether the insects concerned were viruliferous or not. 【Conclusion】*GroEL* expression was

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31171857); 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (201303019) 和农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

**第一作者 First author, E-mail: liuxin415@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangshaoli@caas.cn

收稿日期 Received: 2015-01-09, 接受日期 Accepted: 2015-01-19

significantly higher in viruliferous whiteflies. Obvious differences in *GroEL* expression were exhibited between the *B. tabaci* B and Q, which might be one of reasons for their significant difference in efficiency of virus transmission.

Key words *Bemisia tabaci*, tomato yellow leaf curl virus, virus-transmission related protein, qRT-PCR

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是重要的入侵性害虫, 被列入全球 100 种最危险入侵物种。该虫寄主植物广泛, 通过成虫和若虫刺吸植物汁液、分泌蜜露造成煤污病以及传播植物病毒病等方式进行为害 (Jones, 2003; De Barro *et al.*, 2011), 常年使农作物减产 50%~60%, 严重时甚至绝收。种下分化研究发现, 烟粉虱实际上是由形态上不可区分、生物学特性方面存在显著差异的 30 余种生物型 (Biotype) 或遗传种群 (Genetic group) 组成的复合种害虫 (Boykin *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013)。杂交试验进一步将这些烟粉虱不同生物型命名为隐种 (Cryptic species) 或姊妹种 (Sibling species) (De Barro *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007, 2012; Boykin, 2014)。在烟粉虱众多生物型中, B 生物型 (隐种 MEAM1, 本文简称 B 烟粉虱) 和 Q 生物型 (隐种 MED, 以下简称 Q 烟粉虱) 是入侵性最强、危害最大的两种生物型或姊妹种害虫, 被认为是“超级害虫”。

20 世纪中后期, 入侵性烟粉虱在我国华北、华南一些省市暴发, 后被证实为 B 烟粉虱 (罗晨等, 2002)。Q 烟粉虱则于 2003 年在云南昆明地区首次被发现 (Zhang *et al.*, 2005), 之后逐渐扩散蔓延。近年来, 研究发现 Q 烟粉虱已基本取代 B 烟粉虱成为了我国绝大部分地区主要危害种群 (Chu *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2011)。而在 Q 烟粉虱替代 B 烟粉虱过程中, 也伴随了烟粉虱传播的番茄黄化曲叶病毒 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 的暴发流行。据农业部门统计, 仅 2008、2009 和 2010 的 3 年时间, 由烟粉虱传播的番茄黄化曲叶病毒病给我国农业生产造成的损失即超过 100 亿元人民币。B 和 Q 烟粉虱对 TYLCV 的传毒特性研究证实, TYLCV 在我国的暴发流行与 Q 烟粉虱替代 B 烟粉虱密切相关 (Pan *et al.*, 2012; 2013; Liu *et al.*, 2013)。

烟粉虱在带毒植物上取食时, 通过口针在韧皮部吸取汁液获得 TYLCV 病毒粒子, 病毒再进入食道和过滤腔 (Morin *et al.*, 1999; 2000)。病毒在传毒昆虫体内循环时, 有一类昆虫内共生菌编码的小分子伴侣蛋白——GroEL 被证明对病毒起到一定的保护作用 (Hogenhout *et al.*, 1998, 2000; Gottlieb *et al.*, 2010; Morin *et al.*, 2000)。在以前文献中, 在烟粉虱获毒之前用 GroEL 抗血清饲喂烟粉虱, 则处理组烟粉虱的传毒效率平均下降八成以上。分子生物学方法检测发现病毒 DNA 在烟粉虱体内大量减少, 说明其中有绝大部分的病毒都已经在烟粉虱体内被降解掉, 这表明该蛋白在病毒被烟粉虱传播的过程中对其起到了重要的保护作用 (Morin *et al.*, 1999, 2000)。进一步研究表明, 由烟粉虱共生菌 *Hamiltonella* 分泌的 GroEL 在 TYLCV 传播过程中发挥关键作用 (Sánchez-Campos *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2004; Gottlieb *et al.*, 2010)。Morin 等 (2010) 对烟粉虱内共生菌 *Hamiltonella*、*Portiera*、*Rickettsia* 进行克隆, 并进行双杂交及免疫沉淀 PCR (IC-PCR) 等, 表明只有由 *Hamiltonella* 编码的 GroEL 蛋白可与番茄黄化曲叶病毒 (TYLCV) 外壳蛋白发生相互作用, 而 *Portiera*、*Rickettsia* 编码的 GroEL 虽然与其同源性高达 60% 以上, 但却不能与 TYLCV-CP 发生互作。在以色列, 烟粉虱 B 能够传播 TYLCV, 而 Q 则很少传播, 原因就是次生共生菌 *Hamiltonella* 仅在烟粉虱 B 中存在, 而在烟粉虱 Q 中则检测不到 (Gottlieb *et al.*, 2010)。然而, *Hamiltonella* 在中国的烟粉虱 B 和 Q 中均以较高的比率存在 (Chu *et al.*, 2011), 所以中国烟粉虱 B 和 Q 均可以传播 TYLCV, 只是传播效率存在差异 (Pan *et al.*, 2012), 再次证明只有烟粉虱次生内共生菌 *Hamiltonella* 编码的 GroEL 才是在烟粉虱传播 TYLCV 过程中起重要作用的主要

蛋白质 (Gottlieb *et al.*, 2010)。因此, 我国烟粉虱 B 和 Q 中由 *Hamiltonella* 分泌的 GroEL 可能存在某些差异。而以前的研究表明, 内共生菌产生的 GroEL 蛋白对病毒传播的促进机制可能是与病毒结合形成的病毒-蛋白复合体在病毒的运输过程中起作用, 保护双生病毒顺利通过烟粉虱血淋巴到达唾液腺而免遭降解, 或是通过相似的运转机制来保证病毒在其介体昆虫中能完整的保存下来 (Morin *et al.*, 1999, 2000; Gottlieb *et al.*, 2010)。

我国 B、Q 烟粉虱对 TYLCV 传播效率不同 (Pan *et al.*, 2012), 由此我们推测烟粉虱传毒相关蛋白 GroEL 基因的表达可能存在差异。因此, 本研究首先克隆了烟粉虱 B 和 Q 中传毒相关蛋白 GroEL 基因并进行序列分析, 再采用 qRT-PCR 技术研究 GroEL 在烟粉虱带毒前后的表达量。研究结果对于进一步阐明烟粉虱传播 TYLCV 的机制补充资料, 也为预防和治理烟粉虱及其传播的番茄黄化曲叶病毒病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 烟粉虱试虫、病毒及植物培养

B 烟粉虱于 2004 年 10 月采自中国农业科学院蔬菜花卉研究所北圃场甘蓝田, 经分子鉴定为 B 烟粉虱 (罗晨等, 2002)。Q 烟粉虱于 2009 年 6 月采自北京中蔬大森林花卉市场所售一品红上, 经鉴定为 Q 烟粉虱 (Shatters *et al.*, 2009), B 和 Q 烟粉虱均在温室无虫番茄 (中杂 12 号) 苗上进行继代饲养。温室饲养条件: 温度 (26 ± 1) , 相对湿度 65%, 光周期为 L:D=16:8。

选取生长到 2~3 片真叶的无病、无虫、长势较为一致的番茄植株, 经 TYLCV 分离物 DNA-A 侵染的农杆菌克隆 (由浙江大学生物技术研究所周雪平教授实验室构建并惠赠) 介导注射接种病毒于植株韧皮部, 接种后番茄植株置于温室无虫笼中继续培养。注射接种 25~30 d 后, 选择具有明显发病症状的植株, PCR 检测确定其携带有 TYLCV 病毒 (Ghanim *et al.*, 2007), 作为供试植物。带毒和不带毒的番茄植株均在上述条件的

温室中培养。

1.2 主要试剂

昆虫基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒均购自北京百泰克生物技术有限公司; Taq 酶、cDNA 合成试剂盒 (PrimeScript® RT reagent Kit) 购自北京六合通经贸有限公司 (Takara); Trizol 试剂、荧光定量试剂盒 (SYBR® Green Real-time PCR Master Mix) 和 DNA 分子量 Marker 均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.3 试验处理

在干净无虫无农药的养虫笼中放置一棵有明显发病症状并经 PCR 验证的感病番茄苗 (约为注射病毒 30 d 左右), 选取高度基本相同的两片叶片用微虫笼分别接入之前一直维持在无毒无虫番茄苗上的试验用 B、Q 烟粉虱种群的初羽化成虫 (羽化时间不超过 8 h); 同时, 分别取相同数量的初羽化 B、Q 烟粉虱成虫作为非感毒的对照组。接虫 72 h 后, 各试验处理中分别收集 100 头烟粉虱成虫 (雌雄比例相同), 于液氮中迅速冻死后存于 -80 °C 冰箱中备用。共设置 9 个生物学重复。

1.4 烟粉虱总 RNA 提取及反转录

每个试验处理吸取烟粉虱成虫 100 头, 采用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 在 Nanodrop-2000 上检测 RNA 的浓度。取 1.0 µg 烟粉虱的总 RNA 利用 PrimeScript® RT reagent Kit 反转录合成 cDNA, 具体操作方法按照产品说明书进行, 并采用 DNase 去除了基因组 DNA。反转录产品迅速保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.5 烟粉虱内共生菌 GroEL 基因克隆与测序

根据已发表的西班牙 Q 烟粉虱次生内共生菌 *Hamiltonella* 编码的 GroEL 基因序列 (Gottlieb *et al.*, 2010), 利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 上游引物和下游引物分别为: GroEL-F (5'-ATGGCAGCTAAAGACTTAAAA

TT-3') 和 *GroEL*-R (5'-CATCATACCATTCAT TCCGCC-3'), 用于扩增 B、Q 烟粉虱内共生菌的 *GroEL* 基因全长序列。反应体系为: *GroEL*-F 和 *GroEL*-R 各取 0.5 μ L, cDNA 模板为 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 为 0.2 μ L, 10 $\times$ Buffer (Mg²⁺plus) 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5 μ L, 最后加水至总体积为 25 μ L。扩增程序为: 首先在 94 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min, 之后进行 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 扩增 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min), 最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。反应结束后, 取 5 μ L PCR 产物, 以 1.3% 琼脂糖凝胶上样检测, Biorad 凝胶成像仪上观察结果。

将琼脂糖凝胶中符合目的基因预期大小的 DNA 片段位置的胶块切下, 采用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒进行回收纯化, 克隆进 pEASY-T1 连接载体中, 转化 TOP10 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 下培养过夜, 根据蓝白斑进行阳性克隆筛选, 阳性的菌液送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。对所得到的 B、Q 烟粉虱内共生菌 *GroEL* 基因全长进行序列分析, 并通过在 NCBI 上的 BLAST 进行同源性搜索, 用 DNAMAN 软件进行多序列同源性比对。

1.6 烟粉虱内共生菌 *GroEL* 的定量表达

根据扩增得到的 *GroEL* 的基因全长, 应用 Primer Premier 5.0 软件, 设计了用于扩增目的基因 *GroEL* 的定量 PCR 引物。上游引物 Groq-F: 5'-CATTCGCCCATTCAC-3', 下游引物 Groq-R: 5'-CACGTTCTGCATTGCAATAT-3'。以烟粉虱 β -actin 基因 (Lv and Wan, 2011) 作为内参基因, 上游引物 actin-F: 5'-CGCTGCCTC CACCTCATT-3' 和下游引物 actin-R: 5'-ACC GCAAGATTCCATACC-3'。荧光定量具体操作参照天根生化 (北京) 有限公司的荧光定量试剂盒说明书, 以反转录获得的 cDNA 稀释 2 倍作为模版, 在 ABI7500 进行基因 mRNA 水平表达量分析。反应体系: SYBR Green Real-time PCR Master Mix (2 $\times$) 11.25 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 加入 ddH₂O 补足到 25 μ L。

扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后进行 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s (收集荧光信号); 每个处理重复 3 次, PCR 反应结束后进行熔解曲线分析。

1.7 数据处理

烟粉虱内共生菌 *GroEL* 基因的相对表达量的差异性研究均采用目的基因的 Ct 值经内参基因 (β -actin) 均一化处理之后比较其阈值的方法对其相对表达量进行分析, 即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 (Livak and Schmittgen, 2001), 并将得到的数据用于单因素方差分析后得到显著性分析结果。单因素方差分析所用软件为 SPSS17.0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)。

2 结果与分析

2.1 *GroEL* 基因的克隆与序列分析

特异性引物对 *GroEL*-F 和 *GroEL*-R 扩增烟粉虱的 cDNA, 扩增结果见图 1。由电泳结果显示, 扩增产物条带单一, 约为 1 600 bp, 与预期条带大小一致。

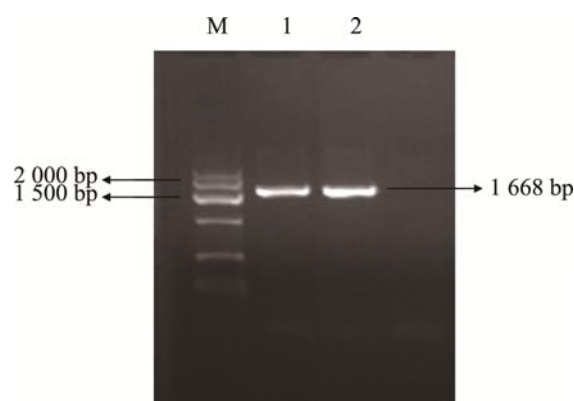


图 1 烟粉虱内共生菌 *GroEL* 全长序列扩增
Fig. 1 Amplification of *GroEL* from *Bemisia tabaci*

M: Marker VII; 1: B 烟粉虱; 2: Q 烟粉虱。

M: Marker VII; 1: *B. tabaci* B; 2: *B. tabaci* Q.

扩增产物测序结果表明烟粉虱次生内共生菌 *GroEL* 基因的全长为 1 668 bp, 共编码 555 个氨基酸。

BLAST 分析显示, B、Q 烟粉虱次生内共生菌编码的 *GroEL* 基因与 GenBank 上发布的西班牙种群 Q 烟粉虱次生内共生菌 *Hamiltonella* 所编码的 *GroEL* 基因 (AF130421) 的同源性达到 99.96%, 而与另外两个内共生菌 *Portiera* (EU435142) 和 *Rickettsia* (EU435143) 编码的 *GroEL* 基因的同源性仅为 64.69% 和 62.65%, 因此可确定本研究克隆到的序列是由中国烟粉虱 B、Q 种群次生内共生菌 *Hamiltonella* 所编码的。B 烟粉虱和 Q 烟粉虱之间核苷酸序列同源性为 99.82%, B 和 Q 烟粉虱之间核苷酸序列的第 791 位存在差异 (T→C), 该核苷酸位点的差异导致了烟粉虱 B 和 Q 之间在氨基酸水平上存在一个位点差异, 即 264 位 (V→A) (图 2)。

2.2 B、Q 烟粉虱 *GroEL* 基因表达量差异

对于 B 烟粉虱, 感毒烟粉虱体内 *GroEL* 基因的表达量为非感毒烟粉虱体内该基因表达量的 2.27 倍, 感染 TYLCV 的 Q 烟粉虱体内 *GroEL* 基因的表达量为非感毒种群的 2.20 倍, 差异均达显著水平 ($P<0.05$)。同时, 在感染病毒和非感毒条件下, Q 烟粉虱体内 *GroEL* 基因表达量均高于对应的 B 烟粉虱, 其中感毒条件下二者间差异不显著, Q 为 B 的 1.28 倍; 非感毒条件下, 二者之间差异显著 ($P<0.05$), Q 烟粉虱为 B 烟粉虱的 1.66 倍 (图 3)。

3 讨论

病毒结构相对简单, 容易被外源酶破坏, 因此, 病毒被昆虫获取后在昆虫体内循环过程中, 必须有一种保护性机制来保证病毒正常传播而不被降解。参与烟粉虱传毒过程的次生内共生菌主要包括 *Hamiltonella* 和 *Rickettsia* (Gottlieb *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2013; Kliot *et al.*, 2014)。而 *GroEL* 蛋白是一种由烟粉虱和蚜虫等媒介昆虫体内共生菌编码的与传毒密切相关的蛋白质 (Hogenhout *et al.*, 1998), *GroEL* 蛋白在昆虫传播病毒过程中, 起到保护病毒粒子通过昆虫血淋巴而不被降解的作用 (Hogenhout *et al.*, 1998; Gottlieb *et al.*, 2010)。本研究克隆了烟粉虱 B

和 Q 体内的 *GroEL* 基因的序列全长, 同已发表的以色列烟粉虱次生内共生菌 *Hamiltonella* 编码的 *GroEL* 基因 AF130421 序列进行比对, 本研究克隆的 B 和 Q 烟粉虱 *GroEL* 基因序列与其核苷酸的同源性为 99.96%, 属于典型的 Hsp60 家族分子伴侣 *GroEL* 基因 (Akad *et al.*, 2004)。由此表明, 中国烟粉虱 B 和 Q 体内均含有次生内共生菌 *Hamiltonella* 编码的 *GroEL* 蛋白。而烟粉虱 B 和 Q 之间, 在核酸水平上第 790 位核苷酸的 T→C 的差异导致了二者在氨基酸序列上的差异 (Ala→Val)。丙氨酸和缬氨酸属于不同的氨基酸家族, 其氨基酸自身空间结构和极性不同, 这一个氨基酸水平上的差异是否会对该蛋白质的空间结构产生影响, 进而导致 B 和 Q 烟粉虱体内该蛋白空间构象的差异及其与病毒外壳蛋白的亲力的不同, 尚有待于进一步研究。

对烟粉虱 *B. tabaci* 和豌豆长管蚜 *Acyrtosiphon pisum* 的研究表明, 内共生菌分泌的蛋白 *GroEL* 可与其所传播的病毒粒子相结合 (Gottlieb *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2010)。而本研究中的结果显示, 无论是 B 还是 Q 烟粉虱, 其体内 *GroEL* 基因的表达量均受到 TYLCV 的诱导, 即在烟粉虱获取病毒后, 其 *GroEL* 基因表达量明显或者显著高于其对应的未带毒烟粉虱的表达量。这表明, 烟粉虱获取病毒后可能诱导了烟粉虱体内传毒相关蛋白 *GroEL* 的表达, 从而可能形成一种类似协同效应的调节机制, 在双生病毒通过烟粉虱血淋巴到达唾液腺的过程中起到保护作用, 保证病毒在运输过程中免于被降解, 进而保证了病毒的高效传播。这与以前研究结果相似, 特别是烟粉虱获取病毒 TYLCV 后, 从生长发育习性 (Pan *et al.*, 2013)、取食习性 (Liu *et al.*, 2013) 上均表现为一种相互适应和提高, 进而促进了病毒的快速传播。但在桃蚜 *Myzus persicae* 相关研究中, 多个桃蚜种群均可以作为马铃薯卷叶病毒 (Potato leaf roll virus, PLRV) 的传播介体, 但是它们种群内却很少含有次生共生菌 (Bouvaine *et al.*, 2011), 表明桃蚜传播该病毒过程中对病毒的保护机制与烟粉虱之间存在一定的差异; 还有研究表明 *GroEL* 与大麦黄矮病毒 (Barley

B	MAAKDLKFGNDARKKMLKGVNLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSYGAPSITKDGVSVAREI	60
Q	-----	60
Hamiltonella	-----	60
Portiera	---qir-se---tr-vr---a-d---t-----e-f---t-----k---	60
Rickettsia	-t-li-h-sk---eq-e-id---d-----lieq-f---k-----t-ks-	60
B	ELEDKFENMGAQMVKVEVASKANDAAGDGTATVLAQSIVTEGLKAVAAGMNPMDLKRG	120
Q	-----	120
Hamiltonella	-----	120
Portiera	-k-----ta-v-----a-n-i-qins-rs-----	120
Rickettsia	-k--ir-a---ll-sa-t-aev-----ralar--n-l---y-----m	120
B	DKAVEAAVEELKIISKPKDSKEIAQVGTISANADAKVGKLISDAMKRVTNEGVI	180
Q	-----	180
Hamiltonella	-----	180
Portiera	---il-s---i-kl-vk-t-rs-----g-sni-q-aks-ek-gkk---d-s	180
Rickettsia	-l--ntvl--v-ka--kidsqe-----s-g-kei-ek-ak--ee-gk-----	180
B	SGLEDDLIVVEGMQFDRGYLSPYFINKQESSIEFDNPYILLVDKKISNIRDMLSILEV	240
Q	-----	240
Hamiltonella	-----	240
Portiera	r-f-e-e-----i---vtn-nmtv-les---i-----el-hl--n	240
Rickettsia	knfsf-ve-k-m-----vtns-kmva-le-----fe--l--l-el-hl--n	240
B	AKEGKPLLI AEDVEGEALATLVNTMRGIVKVS AVKAPGFGDRRKEMLDIAVLTHGHV	300
Q	-----	300
Hamiltonella	-----	300
Portiera	--s---m---i-d-----n-----a-a-----a---l-i-gst-	300
Rickettsia	vqssr-----rl--gl--a-----a-me--i--n-el	300
B	ISEETGDSLEKATKENLGNARVVITKDATTIIDGAGEKSKIEARIQNIKKQIENATSDY	360
Q	-----	360
Hamiltonella	-----	360
Portiera	--d-i-lni--v-ik---r-itms-en-----serd--s-vkq-r---et---	360
Rickettsia	-t-dl-mk--nvslks--h---t-s-en-v-v--s-d-kn--e-vlq--sh-aet---	360
B	DKEKLQERVAKLSSGGVAVIKVGAPTEIAMKEKKARVEDALQATRAAVEEGVPPGGGVALI	420
Q	-----	420
Hamiltonella	-----	420
Portiera	-----a-e-----hs-----a--t---	420
Rickettsia	-----l-----l--ga-vev-r-d-----a-----a--t-l	420
B	RVASKIANSSSLKGDNEDQNVGIRVALRAMESPLRQIVVNAGEEASVIANKIKENKGN	480
Q	-----	480
Hamiltonella	-----	480
Portiera	-iln-lq-..--n---th-ki-k-f-a-----n-----i-v-gv-..--	476
Rickettsia	hasqalk-..--v-k--qa-elvie-lkd-ik---e---ngg-vvg-ll-h-dk--f	477
B	GYNAQTEAYGDMIEMGILDPTKVTRSALQYAASIAGLMITTECMVTDLPKEEKASDMGAG	540
Q	-----	540
Hamiltonella	-----	540
Portiera	---vs-gef--l-n-v---a---tv-s-g-g-mi---a-ia-hqd-nnkmphtsd	536
Rickettsia	-f---dmq-v---ka--i--a-v-t---d---v-s-i---tliv-e-edkenpmpmr-	537
B	GMGGIGGMGMNGMM	555
Q	-----	555
Hamiltonella	-----	555
Portiera	-vn-mrs.....	543
Rickettsia	---m-----df..	550

图 2 烟粉虱次生共生菌 *GroEL* 氨基酸序列分析Fig. 2 Sequence comparisons of amino acids of *GroEL* gene from *Bemisia tabaci*

B, Q, Hamiltonella, Portiera 和 Rickettsia 分别为 B 和 Q (本研究中克隆序列) *GroEL* 及 GenBank 上获取的由 *Hamiltonella* (AF130421)、*Portiera* (EU435142) 和 *Rickettsia* (EU435143) 编码的 *GroEL* 序列。方框标注处为烟粉虱 B 和 Q 之间的氨基酸差异处, “---”表示氨基酸一致。

B, Q, Hamiltonella, Portiera and Rickettsia indicate *GroEL* sequences from *B. tabaci* B and Q (this present study), and 3 *GroEL* sequences from *Hamiltonella* (AF130421), *Portiera* (EU435142), and *Rickettsia* (EU435143) obtained from GenBank. The boxes show the different amino acids between *B. tabaci* B and Q, and “---” indicates exactly the same amino acid among the 5 sequences.

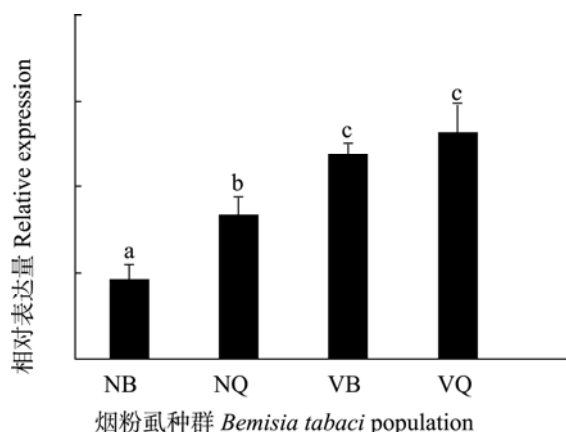


图 3 B 和 Q 烟粉虱 GroEL 基因相对表达量

Fig. 3 Quantitative gene expression of GroEL from *Bemisia tabaci* B and Q

NB: 非带毒 B 烟粉虱; NQ: 非带毒 Q 烟粉虱; VB: 在感毒植株上取食 72 h 后的 B 烟粉虱; VQ: 在感毒植株上取食 72 h 后的 Q 烟粉虱。

NB: Nonviruliferous *B. tabaci* B; NQ: Nonviruliferous *B. tabaci* Q; VB: Viruliferous *B. tabaci* B after rearing on the virus-infected tomato for 72 h; VQ: Viruliferous *B. tabaci* Q after rearing on the virus-infected tomato for 72 h.

yellow dwarf virus, BYDV) 之间的相互作用并未在蚜虫体内病毒传播过程中起到关键作用 (Bouvaine *et al.*, 2011), 但类似的研究及结论在烟粉虱中尚未见报道。

本研究表明, 在烟粉虱感毒和非感毒两种状态下, Q 烟粉虱体内 GroEL 蛋白的表达量均显著高于 B 烟粉虱 (图 3), 说明 GroEL 蛋白与 Q 烟粉虱获取的病毒的结合量高于 B 烟粉虱, 而烟粉虱 Q 和 B 体内 GroEL 蛋白氨基酸序列的差异也可能是这种表达量差异出现的原因, 但需要进一步研究证实。已经证明, 我国烟粉虱 Q 的传毒效率显著高于 B, 而且在不同获毒时间内 (6~72 h), Q 烟粉虱对 TYLCV 的捕获量均显著高于 B 烟粉虱 (Pan *et al.*, 2012), 由此推测 Q 烟粉虱其体内传毒相关蛋白 GroEL 的高表达也可能是我国 B 和 Q 烟粉虱的传毒效率存在显著差异的原因之一。

参考文献 (References)

Akad F, Dotan N, Czosnek N, 2004. Trapping of Tomato yellow leaf

curl virus (TYLCV) and other plant viruses with a GroEL homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*. *Archives of Virology*, 149(8): 1481–1497.

Bouvaine S, Boonham N, Douglas AE, 2011. Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *Journal of General Virology*, 92(6): 1467–1474.

Boykin LM, 2014. *Bemisia tabaci* nomenclature: Lessons learned. *Pest Management Science*, 70(10): 1454–1459.

Boykin LM, Bell CD, Evans G, Small I, De Barro PJ, 2013. Is agriculture driving the diversification of the *Bemisia tabaci* species complex (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae)? Dating, diversification and biogeographic evidence revealed. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1): 228–238.

Chu D, Gao CS, De Barro P, Zhang YJ, Wan FH, Khan IA, 2011. Further insights into the strange role of bacterial endosymbionts in whitefly, *Bemisia tabaci*: Comparison of secondary symbionts from biotypes B and Q in China. *Bulletin of Entomological Research*, 101(4): 477–486.

Chu D, Jiang T, Liu GX, Jiang DF, Tao YL, Fa ZX, Zhou HX, Bi YP, 2007. Biotype status and distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Shandong province of China based on mitochondrial DNA markers. *Environmental Entomology*, 36(5): 1290–1295.

De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1–19.

Ghanim M, Sobol I, Ghanim M, Czosnek H, 2007. Horizontal transmission of begomoviruses between *Bemisia tabaci* biotypes. *Arthropod-Plant Interactions*, 1(3): 195–204.

Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Skaljac M, Brumin M, Sobol I, Czosnek H, Vavre F, Fleury F, Ghanim M, 2010. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *Journal of Virology*, 84(18): 9310–9317.

Hogenhout SA, van der Wilk F, Verbeek M, Goldbach RW, van den Heuvel JF, 1998. Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *Journal of Virology*, 72(1): 358–365.

Hogenhout SA, van der Wilk F, Verbeek M, Goldbach RW, van den Heuvel JF, 2000. Identifying the determinants in the equatorial domain of *Buchnera* GroEL implicated in binding potato leafroll virus. *Journal of Virology*, 74(10): 4541–4548.

Jiang YX, de Blas C, Bedford ID, Nombela G, Muniz M, 2004. Effects of *Bemisia tabaci* biotype on the transmission of tomato

- yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV-ES) between tomato common weeds. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2(1): 115–119.
- Jones DR, 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology*, 109(3): 195–219.
- Kliot A, Cilia M, Czosnek H, Ghanim M, 2014. Implication of the bacterial endosymbiont *Rickettsia* spp. in interactions of the whitefly *Bemisia tabaci* with tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Virology*, 88(10): 5652–5660.
- Lee W, Park J, Lee GS, Lee S, Akimoto SI, 2013. Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species. *PLoS ONE*, 8(5): e63817.
- Liu BM, Preisser EL, Chu D, Pan HP, Xie W, Wang SL, Wu QJ, Zhou XG, Zhang YJ, 2013. Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and tomato yellow curl leaf virus. *Journal of Virology*, 87(9): 4929–4937.
- Liu SS, Colvin J, De Barro PJ, 2012. Species concepts as applied to the whitefly *Bemisia tabaci* systematics: how many species are there? *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 176–186.
- Liu SS, De Barro PJ, Xu J, Luan JB, Zang LS, Ruan YM, Wan FH, 2007. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science*, 318(5857): 1769–1772.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402–408.
- Lv ZC, Wan FH, 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Experimental Biology*, 214(5): 764–769.
- Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt CO I) gene sequences for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 759–763. [罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 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.]
- Morin S, Ghanim M, Sobol I, Czosnek H, 2000. The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 276(2): 404–416.
- Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, vanden Heuvel JFJM, 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 256(1): 75–84.
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA, 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology*, 55: 247–266.
- Pan HP, Chu D, Ge DQ, Wang SL, W QJ, Xie W, Jiao XG, Liu BM, Yang X, Yang NN, Su Q, Xu BY, Zhang YJ, 2011. Further spread of and domination by *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q on field crops in China. *Journal of Economic Entomology*, 104(3): 978–985.
- Pan HP, Chu D, Yan WQ, Su Q, Liu BM, Wang SL, Wu QJ, Xie W, Jiao XG, Li RM, Yang NN, Yang X, Xu BY, Brown JK, Zhou XG, Zhang YJ, 2012. Rapid spread of tomato yellow leaf curl virus in China is aided differentially by two invasive whiteflies. *PLoS ONE*, 7(4): e34817.
- Pan HP, Chu D, Liu BM, Shi XB, Guo LT, Xie W, Carriere Y, Li XC, Zhang YJ, 2013. Differential effects of an exotic plant virus on its two closely related vectors. *Scientific Reports*, 3: 2230.
- Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Came-Ro R, Soria C, Díaz JA, Moriones E, 1999. Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytopathology*, 89(11): 1038–1043.
- Shatters Jr. RG, Powell CA, Boykin LM, Liansheng H, McKenzie CL, 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal of Economic Entomology*, 102(2): 750–758.
- Su Q, Pan HP, Liu BM, Chu D, Xie W, Wu QJ, Wang SL, Xu BY, Zhang YJ, 2013. Insect symbiont facilitates vector acquisition, retention, and transmission of plant virus. *Scientific Reports*, 3: 1367.
- 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. *Journal of Applied Entomology*, 129(3): 121–128.