



# Formosan Entomologist

Journal Homepage: [entsocjournal.yabee.com.tw](http://entsocjournal.yabee.com.tw)

## Studies on the Secondary Endosymbionts of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Taiwan 【Research report】

### 臺灣地區煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 族群內共生菌之初探 【研究報告】

Yung-Chang Hung, Chiun-Cheng Ko\*, and Chung-Hsiung Wang  
洪永昌、柯俊成\*、王重雄

\*通訊作者E-mail: [✉ kocc2501@ntu.edu.tw](mailto:kocc2501@ntu.edu.tw)

Received: 2005/08/19 Accepted: 2005/10/20 Available online: 2005/09/01

#### Abstract

The 16S ribosomal DNA (rDNA) of the secondary endosymbiont and *Wolbachia*-specific gene, *wsp* (cell surface protein of *Wolbachia*), were amplified and sequenced. Based on the occurrence of 16S rDNA and *wsp* by PCR, more than 55% and 38% of examined *B. tabaci* populations ( $n = 202$ ) harbored secondary endosymbiont and *Wolbachia*, respectively. Molecular phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences showed that the secondary endosymbiont was located in the  $\gamma$ -3 clade of a subdivision of the Proteobacteria. *Wsp* gene sequences revealed that the *Wolbachia* found in *B. tabaci* populations of Taiwan belong to group B and subgroup Con/Rug. The results also showed that the carrying/infection rate of secondary endosymbiont/*Wolbachia* might be related to the biotype of *B. tabaci*.

#### 摘要

本研究對於臺灣地區所採集之202筆煙草粉蝨族群，利用PCR反應對於煙草粉蝨二級內共生菌之16S rDNA 及 *Wolbachia* 之表面蛋白基因 (*Wolbachia* surface protein, *wsp*) 的增幅，以進行內共生菌的偵測；結果顯示，臺灣地區55.4%的煙草粉蝨族群受二級內共生菌的感染，38.1%的族群受 *Wolbachia* 的感染，再經由類緣關係分析，感染臺灣地區煙草粉蝨之二級內共生菌皆為 Proteobacteria  $\gamma$ -3 亞綱的種類，而 *Wolbachia* 則屬於B群的 Con/Rug 亞群的種類。由各生物小種感染之比例顯示，此二類內共生菌之分布與生物小種有較密切的相關，然而影響其分布的因去仍需後續的研究以進一步釐清。

**Key words:** Aleyrodidae, *Bemisia tabaci*, secondary endosymbionts, biotype, Taiwan

**關鍵詞:** 粉蝨科、煙草粉蝨、二級內共生菌、生物小種、臺灣

Full Text: [PDF \(0.76 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

## 臺灣地區煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 族群內共生菌之初探

洪永昌 柯俊成\* 王重雄 國立台灣大學昆蟲學系 台北市大安區羅斯福路四段一號

### 摘要

本研究對於臺灣地區所採集之 202 筆煙草粉蝨族群，利用 PCR 反應對於煙草粉蝨二級內共生菌之 16S rDNA 及 *Wolbachia* 之表面蛋白基因 (*Wolbachia* surface protein, *wsp*) 的增幅，以進行內共生菌的偵測；結果顯示，臺灣地區 55.4% 的煙草粉蝨族群受二級內共生菌的感染，38.1% 的族群受 *Wolbachia* 的感染，再經由類緣關係分析，感染臺灣地區煙草粉蝨之二級內共生菌皆為 Proteobacteria  $\gamma$ -3 亞綱的種類，而 *Wolbachia* 則屬於 B 群的 Con/Rug 亞群的種類。由各生物小種感染之比例顯示，此二類內共生菌之分布與生物小種有較密切的相關，然而影響其分布的因素仍需後續的研究以進一步釐清。

**關鍵詞：**粉蝨科、煙草粉蝨、二級內共生菌、生物小種、臺灣。

### 前言

昆蟲與微生物的共生現象 (symbiosis) 是一種普遍存在的現象，在自然界中，共生現象廣泛分布於生物體內，例如粒線體及葉綠體的存在，即是內共生現象的演化結果，且內共生現象在生物的演化上亦扮演重要的角色 (Wernegreen, 2004)。

根據內共生菌在昆蟲體內的生活形式，可分為三類，初級內共生菌 (primary endosymbionts)：此類內共生菌與昆蟲間具有密切的關係，是昆蟲存活所必需，而此類內共生菌亦依賴寄主而存活；二級內共生菌 (secondary endosymbionts)：此類內共生菌

的存在並不影響寄主昆蟲的存活，因此昆蟲或有或無對昆蟲的存活並不造成直接的影響；生殖性寄生 (reproductive parasitism)：此類內共生菌利用操控寄主的生殖現象來達到傳播的目的，與初級內共生菌相似的是，只要被生殖性寄生的內共生菌所寄生，則寄主昆蟲通常無法脫離此內共生菌的掌控，然而與初級內共生菌不同的是，生殖性寄生的內共生菌並非昆蟲生存所必需的，而此特徵又與二級內共生菌相似，因此將生殖性寄生的內共生菌可視為獨立的一類內共生菌 (Wernegreen, 2004)。

生殖性寄生的微生物中，最常見的是 *Wolbachia*，其為立克次體 (Rickettsia)，最早為於尖音家蚊 (*Culex pipiens*) 的生殖細胞

\*論文聯繫人  
e-mail: kocc2501@ntu.edu.tw

中發現，並命名為 *Wolbachia pipientis* (Tsai *et al.*, 2002)。此類內共生菌透過卵的細胞質傳遞並調控其寄主之生殖現象，以達到增加寄主之雌性子代受感染的機率。所引發的生殖現象包括細胞質不相容 (cytoplasmic incompatibility)、孤雌生殖 (parthenogenesis) 及子代雌性化 (feminization)。

依據內共生之 *Wolbachia ftz* 基因遺傳結構，可將其分為 A-F 等六群 (group)，其中 A 及 B 群之寄主範圍為大部分的節肢動物，C 及 D 群之寄主範圍為血絲蟲 (filarial nematodes)，E 群為彈尾目昆蟲 (springtails)，F 群則為白蟻 (termites) (Lo *et al.*, 2002)。其中，A 及 B 群之 *Wolbachia* 依其遺傳結構可再細分為多個亞群 (subgroup)，例如寄生於果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 之 *Wolbachia* 屬於 A 群的 Mel 亞群，寄生於 *Tribolium confusum* 之 *Wolbachia* 屬於 B 群的 Con 亞群，其亞群之命名主要以首次發現之寄主昆蟲種名而定 (Zhou *et al.*, 1998)。

目前 *Wolbachia* 之偵測常以 PCR 進行，所選取之目標區域為 16S rDNA、*ftz*、*wsp* 等序列 (Zhou *et al.*, 1998; ven Merr *et al.*, 1999)。其中 *wsp* 為 *Wolbachia* 表面蛋白 (surface protein) 基因，一般認為此基因在 *Wolbachia* 所發現的基因中，其演化速率較快 (Zhou *et al.*, 1998; ven Merr *et al.*, 1999)，且利用此基因的增幅可準確的偵測受 *Wolbachia* 感染的寄主，目前已廣泛的應用於 *Wolbachia* 偵測中 (Zhou *et al.*, 1998; ven Merr *et al.*, 1999; Werren and Windsor, 2000; Nirgianaki *et al.*, 2003)。

*Wolbachia* 廣泛分布於自然界中，研究指出，在巴拿馬及英國估計有 16~22% 的昆蟲種類受 *Wolbachia* 感染；北美昆蟲受感染的

比例亦高達 19.3% (Werren and Windsor, 2000)。近年煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) 的研究亦顯示，不論新世界區或舊世界區，皆有煙草粉蝨受 *Wolbachia* 感染的記錄 (Zchori-Fein and Brown, 2002; Nirgianaki *et al.*, 2003)，且可在某些受感染的族群中引發細胞質不相容性的生殖現象 (Zchori-Fein and Brown, 2002)。

二級共生菌在昆蟲體內是隨機出現，不似初級內共生菌般為昆蟲生存所必需 (Zchori-Fein and Brown, 2002)，因此不一定每隻昆蟲個體皆具有二級內共生菌，正因如此二級內共生菌的研究不如初級內共生菌詳細。二級內共生菌除了具有垂直傳播的特性外，在不同個體及物種間的水平傳遞亦被證明 (Chen and Purcell, 1997)。於蚜蟲，目前已知的二級內共生菌可分為 5 大類，R-type、T-type、U-type、S-type 與 *Spiroplasma* sp.。其中豌豆蚜 (*Acyrtosiphon pisum*) 之 T-type 與煙草粉蝨二級內共生菌經 16S rDNA 序列比對發現，兩者相似度高達 98%，因而此類煙草粉蝨族群之二級內共生菌亦描述為 T-type 二級內生菌，而二者的分歧時間估計於 17~34 百萬年前 (Darby *et al.*, 2001)。

二級內共生菌對於煙草粉蝨的影響迄今未有詳細的研究 (Zchori-Fein and Brown, 2002)；蚜蟲的研究指出，在高溫的生存條件下，具 R-type 二級內共生菌的蚜蟲個體，可具有較正常的生殖行為 (Montllor *et al.*, 2002)；另外，具有 T-type 的蚜蟲個體，則可在受寄生蜂 (*Aphidius ervi*) 攻擊後，使寄生蜂幼蟲發育率降低，進而提高蚜蟲的存活率 (Oliver *et al.*, 2003)。

本研究期望透過煙草粉蝨二級內共生菌之 16S rDNA 區域及 *Wolbachia* 之表面蛋白基因的增幅，偵測臺灣地區煙草粉蝨受此二

種內共生菌感染情況，進而探討影響煙草粉蝨二級內共生菌與 *Wolbachia* 分布之可能因素；並將所得之 DNA 分子資料進行類緣關係樹的分析，以了解臺灣地區煙草粉蝨二級內共生菌及 *Wolbachia* 與其他昆蟲體內共生菌之類緣關係。

## 材料與方法

### 一、粉蝨標本之採集與保存

根據本實驗室所採集之臺灣地區粉蝨標本（包括臺灣本島及離島），保存於 95% 酒精中，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃保存，待利用粉蝨蛹殼形態進行種類鑑定，確定為煙草粉蝨 (*B. tabaci*) 後，再利用粒線體 COI 序列進行煙草粉蝨生物小種之鑑定 (Hsien, 2004)，以進行後續實驗。

### 二、粉蝨基因組 DNA 之萃取

將供試粉蝨成蟲自酒精中取出，利用二次蒸餾水洗去蟲體上之酒精，取一隻蟲體置於 1.5 ml 離心管中，根據 De Barro and Driver (1997) 之方法，加入 10  $\mu\text{l}$  lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.4, 0.45% Tween 20, 0.2% gelatin, 0.45% NP40, 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proteinase K)，以研磨棒將蟲體磨碎，再次加入 15  $\mu\text{l}$  lysis buffer 並混合均勻，以  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 30 分鐘後，冷卻至室溫並離心將溶液集中，以  $100^{\circ}\text{C}$  水浴 10 分鐘，冷卻至室溫後，加入 25  $\mu\text{l}$  之二次蒸餾水，即完成煙草粉蝨 DNA 之萃取，並將其置於  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍櫃中保存待用。

### 三、煙草粉蝨內共生菌 (endosymbionts) 之偵測

#### (一) 二級內共生菌 (secondary endosymbionts)

針對臺灣地區之煙草粉蝨族群，進行二級內共生菌的偵測。於每個族群中選取 2 隻成蟲，若族群成蟲有限則取 1 隻成蟲，分別進行基因組的萃取。根據 Darby *et al.* (2001) 所使用之引子組 PABSF (5'-AGCGCAGTTTACTGAGTTCA-3') / PABSR (5'-ACGGGCAGTGTGTACAAGACC-3')，其可增幅出約 1,250 bp 之煙草粉蝨二級內共生菌 16S rDNA 部分片段。PCR 反應條件為  $94^{\circ}\text{C}$  / 5 分鐘，然後進行 35 個循環之  $94^{\circ}\text{C}$  / 1 分鐘、 $55^{\circ}\text{C}$  / 1 分鐘、 $72^{\circ}\text{C}$  / 1 分鐘，最後再經  $72^{\circ}\text{C}$  / 5 分鐘完成反應，PCR 產物以 1.5% 的瓊脂電泳膠片進行電泳檢視，並將產物委由明欣生物科技公司進行定序，所得 DNA 序列以連結至 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站，以 BLAST 功能進行核苷酸序列比對，以確定所增幅的片段為煙草粉蝨二級內共生菌 16S rDNA，可用來進行二級內共生菌之偵測。

#### (二) *Wolbachia*

針對臺灣地區全面採集之煙草粉蝨族群，進行 *Wolbachia* 之偵測。於每個族群中選取 2 隻成蟲，若族群成蟲有限則取 1 隻成蟲，分別進行基因組的萃取。根據 Zhou *et al.* (1998) 所使用之引子組 *wsp81F* (5'-TGGTTCGAATAAGTGATGAAGAAAC-3') / *wsp691F* (5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3')，其可增幅出約 600 bp *wsp* 基因片段。PCR 反應條件為  $94^{\circ}\text{C}$  / 5 分鐘，然後進行 35 個循環之  $94^{\circ}\text{C}$  / 1 分鐘、 $55^{\circ}\text{C}$  / 1 分鐘、 $72^{\circ}\text{C}$  / 1 分鐘，最後再經  $72^{\circ}\text{C}$  / 5 分鐘完成反應，PCR 產物以 1.5% 的瓊脂電泳膠片進行電泳檢視，並將產物委由明欣生物科技公司進行定序，所得 DNA 序列以連結至 NCBI 網站，以 BLAST 功能進行核苷酸序列比對，以確定所增幅的片段為 *wsp* 基因片

段，可用來進行共生菌 *Wolbachia* 之偵測。

### (三) 類緣關係樹 (phylogenetic tree) 之重建

將定序所得之序列資料以 Clustal X 軟體進行核苷酸序列排序，再以 GeneDoc 軟體進行序列的校正，最後以 MEGA3 程式進行類緣關係樹的重建；樹的重建根據 Neighbor-joining (NJ) 方法，選擇 Kimura 2-parameter model 為核苷酸替換模式進行類緣關係樹的分析，並進行 Bootstrap 檢驗 1000 次，檢視類緣關係樹之可信度，並以 Cladogram 為類緣關係樹之表式方式，觀測物種間之相對親緣關係。

## 結 果

### 一、二級內共生菌

#### (一) 分布情形

臺灣地區 202 個煙草粉蝨族群中共測試了 356 隻煙草粉蝨個體。根據 Darby *et al.* (2001) 所使用之引子組 PABSF/PABSR，進行煙草粉蝨二級內共生菌 16S rDNA 的增幅，可增幅出一段約 1,300 bp 之片段 (圖一 A)。將所增幅出來的 PCR 產物純化並定序，結果顯示本實驗所增幅出來的 DNA 片段和 GenBank 上之煙草粉蝨二級內共生菌 16S rDNA 相似度高達 99%，確定此引子組可正確的用以偵測煙草粉蝨族群之二級內共生菌。偵測結果顯示，若以族群為單位，202 個族群中，共有 112 個族群偵測到二級內共生菌，比例為 55.4%，其中 B 生物小種感染率為 82.2%；Nauru 生物小種為 9.7%；AN 生物小種所測試的 11 個族群，則皆未偵測到二級內共生菌。以個體為單位而言，356 個受試個體中，共 202 個個體偵測到二級內共生菌，比例為 56.7%，B 生物小種為 82.3%；Nauru 生物小種為 10.3% (表一)。

以煙草粉蝨之寄主植物視其感染率，其中感染的比例最高者為茄科 90.7% (39/43)，其次為十字花科 71.4% (5/7) 及葫蘆科 64.7% (11/17)；而豆科、紫蘇科、楊梅科、蕁麻科及爵床科為寄主植物之煙草粉蝨族群則未偵測到二級內共生菌。以地理區而言，臺灣地區北部煙草粉蝨族群感染比例為 50.0% (8/16)、中部 45.5% (10/22)、南部 56.9% (58/102)、東部為 72.2% (5/18) 及各離島 52.3% (23/44)。

#### (二) 序列分析

臺灣地區煙草粉蝨之二級內共生菌中，共定序出 8 筆序列，而經序列比對，平均序列長度為 1,259bp，G+C% 為 54%，序列間之核苷酸相似度最高為 100%，最低為 94.86%。

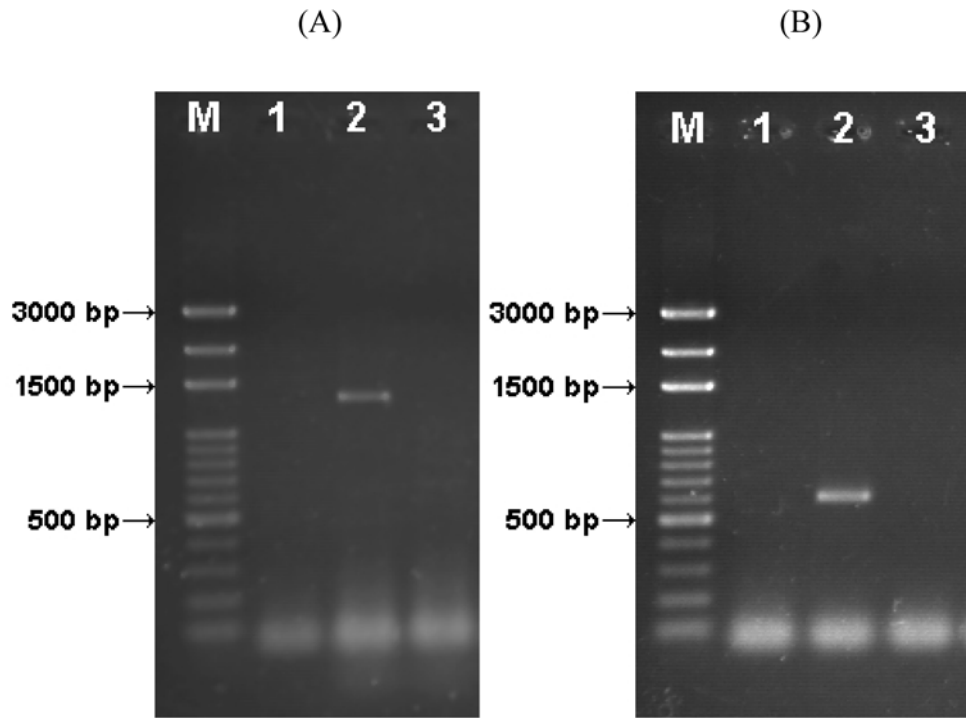
#### (三) 類緣關係樹

將上述所得之臺灣地區二級內共生菌 16S rDNA 序列，與自 GenBank 下載之相關序列進行類緣關係的分析，其中以格蘭氏陽性之 *Streptomyces coelicolor* (Y00411) 與 Proteobacteria  $\delta$  亞綱之 *Desulfovibrio desulfuricans* (M34113) 為外群，利用 Neighbor-joining (NJ) 方法進行類緣關係樹的重建 (圖二)。

結果顯示，臺灣、美國、墨西哥等地區之煙草粉蝨二級內共生菌以及蚜蟲之初級和二級內共生菌皆屬於 Proteobacteria  $\gamma$ -3 亞綱的種類，其中臺灣地區之煙草粉蝨二級內共生菌和美國、墨西哥之煙草粉蝨二級內共生菌類緣關係最近，其次為蚜蟲之二級內共生菌，蚜蟲之初級內共生菌次之。接下來較相近的種類為屬於 Proteobacteria  $\gamma$  亞綱之煙草粉蝨初級內共生菌，其次為 Proteobacteria  $\alpha$  亞綱及  $\beta$  亞綱之其他種類。

### 二、*Wolbachia*

#### (一) 分布情形



圖一 (A) 以引子組 PABSF/PABSR (PABSF: AGCGCAGTTTACTGAGTTCA; PABSR: ACGGGCAGTGTGTACA AGACC) 對煙草粉蝨之二級內共生菌 16S rDNA 進行偵測。M: Bio100 DNA Ladder™; Lane 1: 水 (對照); Lane 2: 具二級共生菌之煙草粉蝨 (TABTB118); Lane 3: 不具二級內共生菌之煙草粉蝨 (TABTNa54)。(B) 以引子組 *wsp81F/wsp691R* (*wsp81F*: TGGTCGAATAAGTGATGAAGAAAC; *wsp691R*: AAAAATTAACGC TACTCCA) 對 *Wolbachia* 進行偵測。M: Bio100 DNA Ladder™; Lane 1: 水 (對照); Lane 2: 具 *Wolbachia* 共生之煙草粉蝨 (TABTNa60); Lane3: 不具 *Wolbachia* 共生之煙草粉蝨 (TABTB116)。

Fig. 1. (A) Detection of 16S rDNA from secondary endosymbionts of *Bemisia tabaci* by using primer set PABSF/PABSR (PABSF: AGCGCAGTTTACTGAGTTCA; PABSR: ACGGGCAGTGTGTACAAGACC). M: Bio100 DNA Ladder™; Lane 1: water (control); Lane 2: *Bemisia tabaci* (TABTB118); Lane3: *Bemisia tabaci* (TABTNa54). (B) Detection of *Wolbachia* by using primer set *wsp81F/wsp691R* (*wsp81F*: TGGTCGAATAAGTGATGAAGAAAC; *wsp691R*: AAAAATTAACGC TACTCCA). M: Bio100 DNA Ladder™; Lane 1: water (control); Lane 2: *Bemisia tabaci* (TABTNa60); Lane3: *Bemisia tabaci* (TABTB116).

根據 Zhou *et al.* (1998) 所使用之引子組 *wsp81/wsp691* 進行 *wsp* 基因之增幅，其可增幅出一段約 650bp 之片段 (圖一 B)。將所增幅出來的 PCR 產物純化並定序，結果顯示本實驗所增幅出來的 DNA 片段和 GenBank 上之煙草粉蝨體內 *Wolbachia* 之 *wsp* 基因序列相似度高達 99%，確定此引子組可用以偵測煙草粉蝨內共生之 *Wolbachia*。

偵測結果顯示，若以族群為單位，202 個族群中，共有 77 個族群偵測到 *Wolbachia*，其感染比例為 38.1%，其中 B 生物小種為 19.4% (25/129)；Nauru 生物小種為 69.4% (43/62)；AN 生物小種為 81.8% (9/11)。以個體為單位而言，偵測結果顯示在 356 個受試個體中，共 124 個個體偵測到 *Wolbachia* 比例為 34.8%，B 生物小種為 17.7% (41/232)，

表一 臺灣地區煙草粉蝨族群受二級內共生菌及 *Wolbachia* 感染之比例

Table 1. The infective ratio of secondary endosymbiont and *Wolbachia* in *Bemisia tabaci* populations of Taiwan

	Secondary endosymbiont		<i>Wolbachia</i>	
	population	individual	population	individual
biotype B	82.2% (106/129)	82.3% (191/232)	19.4% (25/129)	17.7% (41/232)
biotype Nauru	9.7% (6/62)	10.3% (11/107)	69.4% (43/62)	63.6% (68/107)
biotype AN	0% (0/11)	0% (0/17)	81.8% (9/11)	88.2% (15/17)
total	55.4% (112/202)	56.7% (202/356)	38.1% (77/202)	34.8% (124/356)

Nauru 生物小種為 63.8% (68/107)，AN 生物小種為 88.2% (15/17) (表一)。

就煙草粉蝨之寄主植物觀察 *Wolbachia* 之感染率，其中馬齒莧科、蕁麻科及爵床科之煙草粉蝨族群感染比例皆為 100%，其次為桑科 72.7% (8/11)、唇形科 66.7% (2/3) 及菊科 53.7% (22/41)；紫蘇科及楊梅科植物則未偵測到 *Wolbachia*。就地理區而言，臺灣地區北部煙草粉蝨族群受感染比例為 43.8% (7/16)、中部 45.5% (10/22)、南部 45.5% (42/102)、東部為 27.8% (5/18) 及各離島 29.5% (13/44)。

總計煙草粉蝨受 *Wolbachia* 與二級內共生菌感染結果，煙草粉蝨受二者同時感染的族群比例為 11.9% (24/202)，而受二級內共生菌感染而未受 *Wolbachia* 感染的比例為 44.1% (89/202)，反之受 *Wolbachia* 感染而未為受二級內共生菌感染的比例為 26.7% (54/202)；兩者比未感染的比例為 17.82% (36/202)。

#### (二) 序列分析

臺灣地區煙草粉蝨體內共生 *Wolbachia* 之 *wsp* 基因，共定序出 18 筆序列，經序列比對後，序列平均長度為 555 bp，A+T% 為 63.41%，序列間之核苷酸相似度最高為 100%，最低為 97.5%。

#### (三) 類緣關係樹

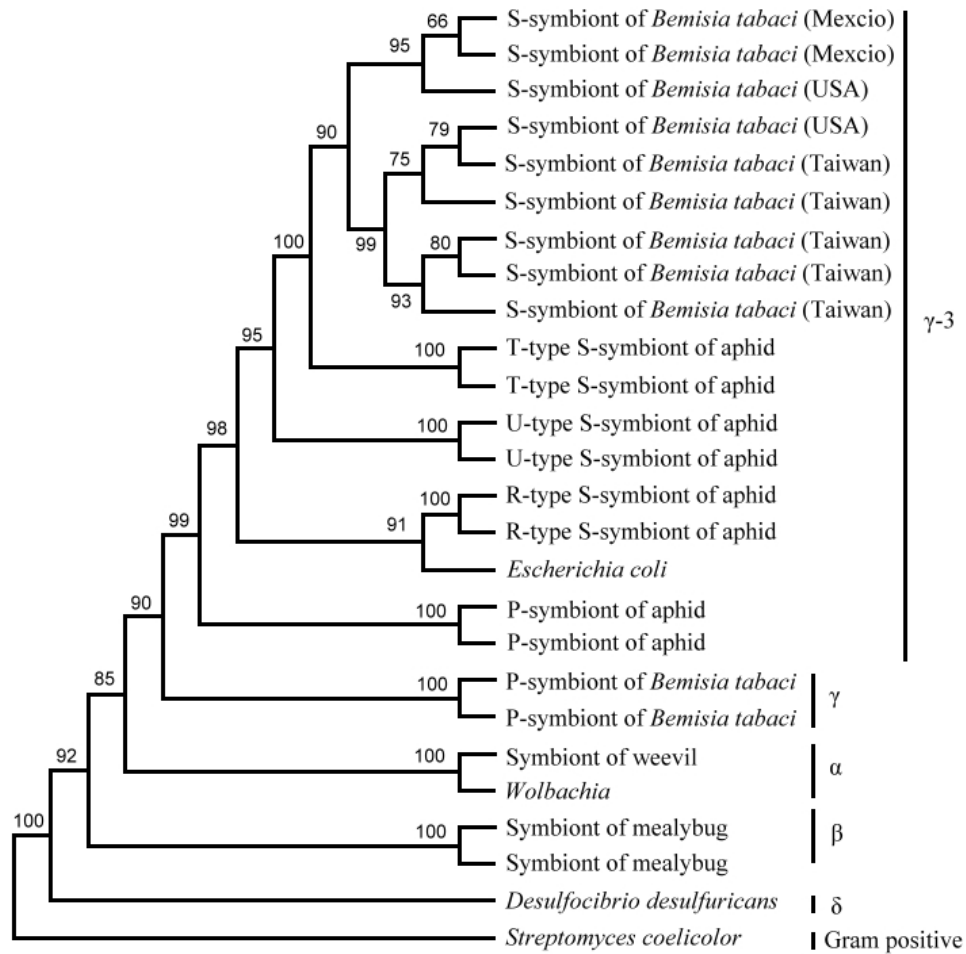
將所得之臺灣地區 *wsp* 基因序列，與根據 Nirgianaki *et al.* (2003) 自 GenBank 下載 *Wolbachia* A 及 B 群 (group) 之 *wsp* 基因序列進行分析；利用 Neighbor-joining (NJ) 方法進行類緣關係樹的重建 (圖三)。結果顯示，*Wolbachia* B 群歸於一群，而 A 群則自成一類，臺灣地區之煙草粉蝨體內共生 *Wolbachia* 則歸屬於 B 群之內；其中臺灣地區族群偵測到之 *Wolbachia* 皆為 Con/Rug 亞群。

## 討 論

### 一、二級內共生菌

#### (一) 分布情形

臺灣地區 55.4% 的煙草粉蝨族群受二級內共生菌感染，其他煙草粉蝨族群則未偵測到感染，此結果顯示二級內共生菌並非煙草粉蝨生存所必需；蚜蟲相關研究指出，二級內共生菌的存在可能具寄主生存的好處，例如提高對熱的忍耐力 (Chen *et al.* 2000; Montllor *et al.*, 2002) 及抵抗其他寄生性天敵 (Oliver *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004) 等，而有關二級內共生菌對於煙草粉蝨的影響則未有研究 (Zchori-Fein and Brown, 2002)。根據 Zchori-Fein and Brown (2002) 調查全球



圖二 利用煙草粉蝨二級內共生菌之 16S rDNA 序列，加入 Proteobacteria 各亞綱內共生菌與格蘭氏陽性之 *Streptomyces coelicolor* (外群) 16S rDNA，以鄰近法進行分析，共進行 1000 次 bootstrap 檢測，所得之親緣關係樹。P：初級內共生菌；S：二級內共生菌

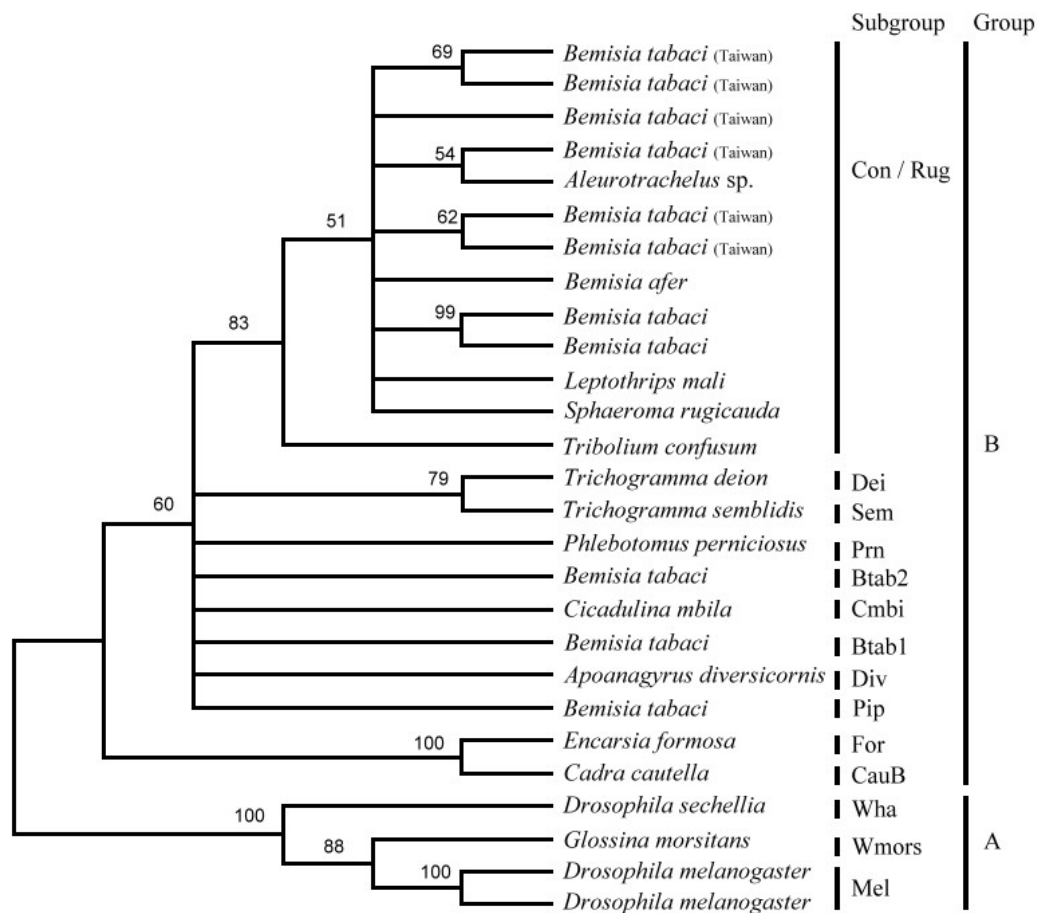
Fig. 2. Phylogenetic tree of the secondary endosymbionts of *Bemisia tabaci*. The 16S rDNA sequences of the secondary endosymbionts, representatives of the Proteobacteria, and gram-positive bacteria (as outgroup) were analyzed by neighbor-joining method. The bootstrap values obtained with 1,000 resamplings are shown at the nodes. P: primary endosymbiont; S: secondary endosymbiont.

20 個煙草粉蝨族群中，14 個族群受二級內共生菌感染，比例達 70%，相較之下臺灣地區之煙草粉蝨感染二級內共生菌的比例較低 (55.4%)，而產生差異的原因，可能與偵測的範圍不同所致。另有研究指出，以 PCR 進行二級內共生菌的偵測雖然是較為簡便的方法，但

在偵測上仍有盲點存在，沒有 PCR 產物增幅，不能代表沒有二級內共生菌的存在，且不能排除還有未發現的其他二級內共生菌種類 (Sandström *et al.*, 2001; Tsuchida *et al.*, 2002; Zchori-Fein and Brown, 2002)。

根據對於日本地區豌豆蚜 (*A. pisum*) 體





圖三 利用 *Wolbachia* 之 *wsp* 基因以鄰近法進行分析，共進行 1000 次 bootstrap 檢測，所得之親緣關係樹。  
 Fig. 3. Phylogenetic tree of *Wolbachia* based on *wsp* gene sequences. The tree has been constructed by neighbor-joining method. The bootstrap values obtained with 1,000 resamplings are shown at the nodes.

內二級內共生菌所作的研究指出，二級內共生菌的分布與組成主要與地理區相關，其中 U-type 的蚜蟲二級內共生菌又與特定的寄主植物種類有著高度的相關性 (Tsuchida *et al.*, 2002)，而迄今仍未有研究指出煙草粉蝨二級內共生菌之分布受何種因素影響；由本研究之結果可以看出，臺灣地區之煙草粉蝨族群二級內共生菌分布可能和生物小種有較密切的相關，其中 B 生物小種受感染的比例高達 82.2% (106/129)，Nauru 生物小種為 9.7%，而 AN 生物小種則未偵測到受感染。利用卡

方統計分析顯示，B 生物小種與 non-B 生物小種 (Nauru 及 AN) 間的二級內共生菌感染比例具有顯著的差異 ( $p < 0.001$ )。由此推測，二級內共生菌對於不同的生物小種可能存在著適存性。而就煙草粉蝨之寄主植物種類與地理區而言，二級內共生菌的分布，並無明確的相關性。因此未來仍需透過全面的採集，以及進一步的分析才能更清楚煙草粉蝨二級內共生菌的分布與何種因素有關。

#### (二) 序列分析

本研究定序的 8 筆煙草粉蝨二級內共生

菌序列，其平均序列長度為 1,259 bp，核苷酸 G+C% 為 54.2%，與文獻所記載相似 (Darby *et al.*, 2001; Zchori-Fein and Brown, 2002; Tan *et al.*, 2004)。煙草粉蝨二級內共生菌 16S rDNA 之 G+C% 與自由生活的細菌 16S rDNA 接近，這也許說明了煙草粉蝨二級內共生菌並未與煙草粉蝨形成如同初級內共生菌與煙草粉蝨般的緊密共生關係，可能在垂直傳播的進程中遺失，或經由水平傳播而受感染，對於寄主生存沒有絕對的影響 (Moran and Telang, 1998; Tan *et al.*, 2004)。

### (三) 類緣關係樹

類緣關係樹分析顯示，臺灣地區煙草粉蝨族群二級內共生菌為 Proteobacteria  $\gamma$ -3 亞綱的種類，與文獻相符，然而其分類地位仍有待進一步的研究 (Zchori-Fein and Brown, 2002; Tan *et al.*, 2004)。臺灣地區煙草粉蝨二級內共生菌 16S rDNA 與來自美國聖誕紅族群 B 生物小種二級內共生菌位於同一分支類緣關係接近。

## 二、*Wolbachia*

### (一) 分布情形

*Wolbachia* 是一種普遍寄生於昆蟲、甲殼動物及線蟲等動物體內細胞的內共生菌，而節肢動物感染 *Wolbachia* 的情況極為常見，估計約有 76% 的節肢動物遭受感染 (Jeyaprakash and Hoy, 2000; Tsai *et al.*, 2002)。

臺灣地區煙草粉蝨族群受 *Wolbachia* 感染的比例為 38.1%，根據 Nirgianaki *et al.* (2003) 調查世界各地煙草粉蝨族群的結果顯示，煙草粉蝨受 *Wolbachia* 感染的比例為 28.2% (11/39)，其中 B 生物小種的感染率為 7.7% (1/13)，non-B 生物小種為 38.5%。利用

卡方統計分析顯示，B 生物小種與 non-B 生物小種 (Nauru 及 AN) 間的 *Wolbachia* 感染比例具有顯著的差異 ( $p < 0.001$ )；此外 Zchori-Fein and Brown (2002) 指出，煙草粉蝨受 *Wolbachia* 感染的比例為 35% (7/20)。本研究結果與國外學者的研究皆顯示，煙草粉蝨 B 生物小種受感染的比例偏低，推論煙草粉蝨 B 生物小種不易受 *Wolbachia* 感染，可能與其生物特性有關，然而此推論仍需進一步的研究。

臺灣地區偵測的結果也發現，在同一個族群中，並非所有的個體皆感染 *Wolbachia*；此現象與 Turelli and Hoffmann (1991) 研究美國的果蠅 (*Drosophila simulans*) 受 *Wolbachia* 感染的研究相似，此研究指出未受感染的果蠅可在高度感染的族群中持續數年之久，推測可能是在傳播過程中遺失或由未受感染族群遷移至受感染族群中的子代個體 (Turelli *et al.*, 1992)。

Hoshizaki and Shimada (1995) 研究斑飛蝨 (*Laodelphax striatellus*) 族群受 *Wolbachia* 感染的比例發現，在日本其受感染比例隨著緯度的降低而增加 (8~93%)。臺灣地區之煙草粉蝨族群體內 *Wolbachia*，在臺灣北部、中部及南部的感染比例分別為 43.8%、45.5% 及 41.2%，而臺灣東部及離島地區則分別為 27.8% 及 29.5%，此結果顯示，*Wolbachia* 的分布可能受地理區域的影響，於東部及離島地區分布較少，而此結果也與採集區域有著相當大的關係，離島及東部地區在採集數量上就較其他地區少，因此可能間接造成分布的差異。就寄主植物種類而言，則與二級內共生菌相同，無明確的相關性。因此全面採集臺灣地區之煙草粉蝨族群，仍是必需的，尤其以偏遠地區以及 AN 生物小種的採集數量仍有增加的需要；由此可進一步釐清煙草粉蝨

內共生菌之分布與組成所受影響之因素。

## (二) 序列分析

本研究定序的 18 筆煙草粉蝨二級內共生菌中，其平均序列長度為 555 bp，A+T% 為 63.41%，與文獻所記載相似 (Zhou *et al.*, 1998; Nirgianaki *et al.*, 2003)。

## (三) 類緣關係樹

*Wolbachia* 屬於 Proteobacteria  $\alpha$  亞綱的種類 (Tsai *et al.*, 2002)；已知大部分節肢動物感染的 *Wolbachia* 依其遺傳結構可分為 A 及 B 兩群，而每一群又可分為多個亞群 (Tsai *et al.*, 2002)。Nirgianaki *et al.* (2003) 利用 *wsp* 序列進一步的將 *Wolbachia* B 群再細分成 20 個亞群。

本研究將 *wsp* 基因序列利用鄰近法 (NJ) 所構建之類緣關係樹的結果顯示，由分枝頂端可分為主要的 2 群，分別為 A 及 B 群，而臺灣地區煙草粉蝨感染之 *Wolbachia* 屬於 B 群，與文獻所得之結果相符 (Zhou *et al.*, 1998)。根據 Zhou *et al.* (1998) 之分類依據，若 *wsp* 基因序列差異達 2.5% 以上則應分屬於不同亞群；而臺灣地區煙草粉蝨感染之 *Wolbachia*，其 *wsp* 基因序列相似度於 97.5 ~ 100% 之間，因此臺灣地區所偵測到之 *Wolbachia* 應屬於同一亞群，即 Con/Rug 亞群；此外 Zhou *et al.* (1998) 亦指出，不同亞群 *wsp* 基因序列長度會有差異，如 Pip 亞群的煙草粉蝨其 *wsp* 基因序列長度為 558 bp、Con/Rug 亞群為 555 bp、Cmbi 亞群為 552 bp、Btab1 與 Btab2 為 546 bp，而本研究所得之 *wsp* 序列平均長度為 555 bp，屬於 Con/Rug 亞群，與其所描述相符。

## 誌 謝

本研究承蒙臺大昆蟲所謝佳宏、劉中琪、

葉信廷於實驗技術及標本採集上的教導與幫忙，使本研究得以順利完成。此外，感謝臺大昆蟲病理室的各位研究生、文化大學生物系林裕智與黃建彰在實驗上的協助。本研究承行政院農委會動植物防疫檢疫局委託計畫 93 農科-1.9.1-檢-B2(4) 及 94 農科-13.3.1-檢-B2(5) 經費補助，謹致謝忱。

## 引用文獻

- Chen, C. H., and A. H. Purcell. 1997. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Curr. Microbiol.* 34: 220-225.
- Chen, D. Q., C. B. Montllor, and A. H. Purcell. 2000. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomol. Exp. Appl.* 95: 315-323.
- Darby, A. C., L. M. Birkle, S. L. Turner, and A. E. Douglas. 2001. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 43-50.
- De Barro, P. J., and F. Driver. 1997. Use of RAPD to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.* 36: 149-152.
- Ferrari, J., A. C. Darby, T. J. Daniell, H. C. J. Godfray, and A. E. Douglas. 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecol.*

- Entomol. 29: 60-65.
- Hsien, C. H.** 2004. Phylogenetic studies on the populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Taiwan. Graduate Institute of Entomology NTU, Master's Thesis (in Chinese).
- Hoshizaki, S., and T. Shimada.** 1995. PCR-based detection of *Wolbachia*, cytoplasmic incompatibility microorganisms, infected in natural populations of *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae) in central Japan: has the distribution of *Wolbachia* spread recently? Insect Mol. Biol. 4: 237-243.
- Jeyaprakash, A., and H. A. Hoy.** 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequence found in 76% of sixty-three arthropod species. Insect Mol. Biol. 9: 393-405.
- Lo, N., C. Maurizio, S. Emanuela, B. Chiara, and B. Claudio.** 2002. How many *Wolbachia* supergroups exists? Mol. Biol. Evol. 19: 341-346.
- Montllor, C. B., A. Maxmen, and A. H. Purcell.** 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphid *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. Ecol. Entomol. 27: 189-195.
- Moran, N. A., and A. Telang.** 1998. Bacteriocyte-associated symbionts of insects. Bioscience 48: 295-304.
- Nirgianaki, A., G. K. Bank, D. R. Frohlich, Z. Veneti, H. R. Braig, T. A. Miller, I. D. Bedford, P. G. Markham, C. Savakis, and K. Bourtzis.** 2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. Curr. Microbiol. 47: 93-101.
- Oliver, K. M., J. A. Russell, N. A. Moran, and M. S. Hunter.** 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 1803-1807.
- Sandström, J. P., J. A. Russell, J. P. White, and N. A. Moran.** 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. Mol. Ecol. 10: 217-228.
- Tan, Z. J., B. Y. Xie, Q. M. Xiao, Y. H. Yang, and L. X. Feng.** 2004. Study on the molecular difference of endosymbionts from *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Acta Agriculturae Nucleatae Sinica 18: 237-240 (in Chinese).
- Tsai, K. H., W. J. Wu, and W. J. Chen.** 2002. Biological characteristics of the endosymbiont *Wolbachia*. Formosan Entomol. 22: 1-18 (in Chinese).
- Tsuchida, T., R. Koga, H. Shibao, T. Matsumoto, and T. Fukatsu.** 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Mol. Ecol. 11: 2123-2135.
- Turelli, M., and A. A. Hoffmann.** 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor California *Drosophila*. Nature 353: 440-442.
- Turelli, M., and A. A. Hoffmann, and S. W. Mckechnie.** 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA

- variation in nature *Drosophila simulans* population. *Genetics* 132: 713-723.
- van Merr, M. M. M., J. Witteveldt, and R. Stouthamer.** 1999. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the *wsp* gene. *Insect Mol. Biol.* 8: 399-408.
- Wernegreen, J. J.** 2004. Endosymbiosis: Lessons in conflict resolution. *PLOS Biol.* 2: 307-311.
- Werren, J. H., and D. M. Windsor.** 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1277-1285.
- Zchori-Fein, E., and J. K. Brown.** 2002. Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ecol. Popul. Biol.* 95: 711-718.
- Zhou, W., F. Rousset, and S. O'Neill.** 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 509-515.

收件日期：2005年8月19日

接受日期：2005年10月20日

# Studies on the Secondary Endosymbionts of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in Taiwan

Yung-Chang Hung, Chiun-Cheng Ko\*, and Chung-Hsiung Wang

Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan

## ABSTRACT

The 16S ribosomal DNA (rDNA) of the secondary endosymbiont and *Wolbachia*-specific gene, *wsp* (cell surface protein of *Wolbachia*), were amplified and sequenced. Based on the occurrence of 16S rDNA and *wsp* by PCR, more than 55% and 38% of examined *B. tabaci* populations (n = 202) harbored secondary endosymbiont and *Wolbachia*, respectively. Molecular phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences showed that the secondary endosymbiont was located in the  $\gamma$ -3 clade of a subdivision of the Proteobacteria. *Wsp* gene sequences revealed that the *Wolbachia* found in *B. tabaci* populations of Taiwan belong to group B and subgroup Con/Rug. The results also showed that the carrying/infection rate of secondary endosymbiont/*Wolbachia* might be related to the biotype of *B. tabaci*.

**Key words:** Aleyrodidae, *Bemisia tabaci*, secondary endosymbionts, biotype, Taiwan