

海南地区螺旋粉虱种群 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 基因的序列及系统发育分析

于卫卫¹, 杨文晏¹, 杜予州^{1,*}, 李伟东²

(1. 扬州大学园艺与植物保护学院, 扬州大学应用昆虫研究所, 江苏扬州 225009;

2. 海南出入境检验检疫局, 海口 570311)

摘要: 螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* Russell 在海南是一种重要的农林害虫。本研究对海南地区不同螺旋粉虱种群的 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 基因片段进行了测定并对其系统发育进行了分析。mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 的序列比较发现, 海南 16 个县市螺旋粉虱种群的 mtDNA-COI 序列基本一致, 只有文昌番石榴 *Psidium guajava* 种群的序列发生变异, 在 476 bp 位点的碱基 C 突变为碱基 T。不同螺旋粉虱种群的 rDNA-ITS1 序列也无差异。基于 mtDNA-COI 序列的不同螺旋粉虱种群的系统发育树表明, 已传入我国海南地区的螺旋粉虱未发生明显的遗传分化; 研究还发现海南的螺旋粉虱种群与台湾的种群遗传距离最近, 表明海南地区的螺旋粉虱可能由台湾传入的。基于 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 序列构建的不同粉虱种群的系统发育树表明, 粉虱科分为复孔粉虱亚科 (Aleurodicinae) 和粉虱亚科 (Aleyrodinae), 这一结果与其他研究结果一致。

关键词: 螺旋粉虱; mtDNA-COI; rDNA-ITS1; 系统树; 遗传分化; 变异

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)11-1324-11

Sequence and phylogenetic analyses of mtDNA-COI and rDNA-ITS1 genes in populations of *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Hainan, southern China

YU Wei-Wei¹, YANG Wen-Yan¹, DU Yu-Zhou^{1,*}, LI Wei-Dong² (1. College of Horticulture and Plant Protection, Institute of Applied Entomology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China; 2. Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou 570311, China)

Abstract: The spiraling whitefly (SWF), *Aleurodicus dispersus* Russell, is an important agricultural and forest pest in Hainan province, southern China. In this study, we sequenced and analyzed the gene sequences of mtDNA-COI and rDNA-ITS1 genes within *A. dispersus* populations from 16 districts in Hainan. The results showed that mtDNA-COI gene sequences of the spiraling whitefly populations from different regions of Hainan were identical, except Wenchang sample coming from *Psidium guajava* carrying one variable position (C→T) at position 476 bp in mtDNA-COI gene. Analyses of the rDNA-ITS1 gene showed that the ITS1 sequences of all the *A. dispersus* populations were consistent. The phylogeny trees of *A. dispersus* populations based on mtDNA-COI gene showed that fairly low genetic variation existed among the different populations sampled in various locations. Taiwan population and Hainan population had a fairly closed relationship according to the phylogenetic trees, suggesting that the invaded *A. dispersus* in Hainan likely originated from Taiwan. Aleyrodidae could be divided into two subfamilies, *i. e.*, Aleurodicinae and Aleyrodinae, according to the phylogenetic trees of different whitefly species based on mtDNA-COI and rDNA-ITS1 gene sequences, which is consistent with the results of former studies.

Key words: *Aleurodicus dispersus*; mtDNA-COI; rDNA-ITS1; phylogenetic tree; genetic differentiation; variation

螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* Russell 隶属半翅目 (Hemiptera), 胸喙亚目 (Sternorrhyncha), 粉虱科

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201103026, 200803023)

作者简介: 于卫卫, 女, 1986年生, 山东德州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学与外来生物入侵, E-mail: yuweiwei1997@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yzdu@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-07-16; 接受日期 Accepted: 2013-10-31

(Aleyrodidae), 复孔粉虱亚科 (Aleurodicinae), 复孔粉虱属 *Aleurodicus*, 主要分布于热带、亚热带地区, 包括西印度群岛、南美、太平洋群岛、非洲、印度及东南亚等地, 是一种重要的农林害虫 (Mani and Krishnamoorthy, 1999)。有学者认为该虫起源于中美洲和加勒比海一带, 但这一观点被虞国跃 (2011) 否定, 他认为加勒比海并不是原产地, 而是一个入侵地。1905 年该虫在西印度群岛的马提尼克岛的番石榴 *Psidium guajava* 上首次被发现, 1965 被记述为新种 (Russell, 1965), 现已传播蔓延到世界许多地区 (CABI, 1993; Neuenschwander, 1994; 温宏治等, 1994; Lambkin, 1999; Ramani *et al.*, 2002; 钟宝珠等, 2009; 于卫卫等, 2013)。我国于 1988 年在台湾省高雄市大寮乡首次发现螺旋粉虱危害番石榴 (温宏治等, 1994; 1997), 2006 年 4 月在海南省陵水县发现该虫 (虞国跃等, 2007)。除了台湾和海南, 福建、广东、广西等省份也是螺旋粉虱适生区 (沈文君和万方浩, 2007), 但这一结论仍需进一步的验证。目前已知螺旋粉虱的寄主植物 109 科 743 种, 我国已记录寄主植物 81 科 284 种 (虞国跃, 2011)。在我国海南, 行道树以印度紫檀 *Pterocarpus indicus* 和榄仁树 *Terminalia catappa* 受害最为严重, 果树以番石榴和番荔枝 *Annona squamosa* 受害最为严重 (韩冬银等, 2008; 曹凤勤等, 2010)。目前, 国内对螺旋粉虱的研究主要集中在形态、分布寄主、生物学特性以及抗药性等方面。温宏治等 (1994, 1997) 对台湾螺旋粉虱的寄主范围、空间分布、生物防治、作物产量损失与虫口密度关系以及时序动态等方面进行了研究; 徐岩 (1999) 综述了螺旋粉虱的研究进展, 并发出螺旋粉虱传入的预警; 钱景泰 (2002) 对螺旋粉虱生物学特性及生物防治进行研究; 虞国跃等 (2007) 于 2006 年 4 月在海南省陵水县椰林镇首次发现了螺旋粉虱, 并记录了寄主和分布范围; 沈文君和万方浩 (2007) 对螺旋粉虱在中国的适生区进行了预测; 宋早芹 (2011) 描述了螺旋粉虱的环境扫描电镜微型结构。由此可见, 对于螺旋粉虱的遗传分化和系统发育的研究是少之又少。

种群是生物生存繁衍的基本单元 (史刚荣, 2001), 在自然选择和其他随机因素的影响下, 种群会失去某些原有变异。种群的分化是潜在的遗传差异, 为进一步的分化提供遗传多样性的基础。研究种群内遗传变异、种群间遗传分化, 不仅对了解物种进化趋势及种群动态规律具有重要的实际价值

和理论意义, 而且对生物资源的管理与持续利用、有害生物的治理也有重要指导作用。昆虫之所以可以发生物种分化是因为它们具有高度发达的神经和运动系统、世代周期短、体形小等内部条件, 以及不同的地理条件、环境条件和寄主植物等外部原因 (Matthews, 1976)。研究种群分化的方法主要有形态学特征, 粉虱科的分类在亚科的水平上依据于成虫和第 4 龄若虫 (蛹壳) 的特征, 而在属和种的水平上则主要利用 4 龄若虫 (蛹壳) 的特征, 还有生物学特性、生理生化特征、分子标记等。用于种下系统发育分析的分子标记基因主要有线粒体 DNA、核糖体 DNA、微卫星 DNA 等。线粒体 COI (mtDNA COI) 是线粒体氧化呼吸链的重要组成, 它是研究种间、种内亲缘关系的最有用分子标记之一, 沈媛 (2007) 和王莉萍等 (2007) 分别利用 mtDNA-COI 对我国不同地区的烟粉虱和斑潜蝇种群进行了分析。ITS1 位于核糖体 18S 和 5.8S rRNA 基因的编码区之间, 序列具有进化速率快, 高度拷贝, 且拷贝间的序列基本一致, 并且容易直接进行 PCR 的扩增和测序等特点, 所以 ITS 的序列信息可以提供比较丰富的变异位点和信息位点, 而且较适合种间、亚种或种群水平上的系统发生研究 (毛增辉, 2010)。

为了认识海南地区螺旋粉虱遗传分化和系统发育, 本研究对海南地区的不同螺旋粉虱种群的 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 基因序列进行了测定和分析并构建了系统树, 研究结果可为海南地区螺旋粉虱的遗传分化和入侵机制提供理论依据。

1 材料及方法

1.1 供试虫源

2009 年 8-9 月, 对海南省 16 个县市的 12 种寄主植物上的螺旋粉虱进行调查采集, 将采集的螺旋粉虱浸泡在无水酒精中, 然后置于 -20°C 的冰箱中保存备用。实验材料的采集地、寄主、采集时间以及编号见表 1。

1.2 单头螺旋粉虱 DNA 的提取

挑取单头螺旋粉虱置于 0.5 mL 离心管中, 加入 30 μL 裂解液 (1% SDS, 500 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 200 mg/mL 蛋白酶 K 溶液) 研磨成匀浆后放入 56°C 恒温水浴锅中温浴 2~3 h; 再放入 95°C 水浴锅中放置 10 min, 使蛋白酶失活; 短暂离心后取出上清, 直接置于 -20°C 冰箱中保存备用。

表 1 海南地区螺旋粉虱标本采集信息
Table 1 Collection data of *Aleurodicus dispersus* specimens from Hainan in this study

采样地点 Locality	经纬度 Longitude and latitude	寄主植物 Host plants	采样时间 Collecting time	样品代码 Codes
儋州那大 Nada, Danzhou	19.5°N, 109.6°E	羊蹄甲 <i>Bauhinia blakeana</i>	2009.08.21	Danzhou YTJ
乐东佛罗 Foluo, Ledong	18.6°N, 108.7°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.08.23	Ledong FSL
陵水祖空 Zukong, Lingshui	18.4°N, 109.9°E	榄仁 <i>Terminalis catappa</i>	2009.08.24	Lingshui LR
陵水英州 Yingzhou, Lingshui	18.4°N, 109.9°E	榕树 <i>Ficus microcarpa</i>	2009.08.24	Lingshui RS
三亚海棠湾 Haitangwan, Sanya	18.3°N, 109.7°E	枸杞 <i>Lycium chinense</i>	2009.08.24	Sanya GQ
三亚海棠湾 Haitangwan, Sanya	18.3°N, 109.7°E	羊蹄甲 <i>Bauhinia blakeana</i>	2009.08.24	Sanya YTJ
三亚海棠湾 Haitangwan, Sanya	18.3°N, 109.7°E	木瓜 <i>Chaenomelis fructus</i>	2009.08.24	Sanya MG
三亚保港 Baogang, Sanya	18.4°N, 109.1°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.23	Sanya YDZT
三亚天涯 Tianya, Sanya	18.3°N, 109.3°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.08.23	Sanya FSL
五指山 Wuzhishan	18.8°N, 109.5°E	未知 Unknown	2009.08.29	Wuzhishan WZ
万宁兴隆 Xinglong, Wanning	18.8°N, 110.4°E	椰子 <i>Cocos nucifera</i>	2009.08.24	Wanning YZ
琼海加积 Jiayi, Qionghai	19.2°N, 110.5°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.25	Qionghai YDZT
琼海加积 Jiayi, Qionghai	19.2°N, 110.5°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.08.25	Qionghai FSL
琼海加积 Jiayi, Qionghai	19.2°N, 110.5°E	木瓜 <i>Chaenomelis fructus</i>	2009.08.25	Qionghai MG
屯昌 Tunchang	19.4°N, 110.1°E	木瓜 <i>Chaenomelis fructus</i>	2009.08.25	Tunchang MG
屯昌 Tunchang	19.4°N, 110.1°E	辣椒 <i>Capsicum annum</i>	2009.08.25	Tunchang LJ
屯昌 Tunchang	19.4°N, 110.1°E	茄子 <i>Solanum melongena</i>	2009.08.25	Tunchang QZ
屯昌 Tunchang	19.4°N, 110.1°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.25	Tunchang YDZT
琼中乌石 Wushi, Qiongzong	19.1°N, 109.9°E	榄仁 <i>Terminalis catappa</i>	2009.08.25	Qiongzong LR
琼中乌石 Wushi, Qiongzong	19.1°N, 109.9°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.08.25	Qiongzong FSL
琼中乌石 Wushi, Qiongzong	19.1°N, 109.9°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.25	Qiongzong YDZT
琼中营根 Yinggen, Qiongzong	19.0°N, 109.8°E	豆科植物 Leguminosae	2009.08.29	Qiongzong DK
保亭毛岸 Mao'an, Baoting	18.7°N, 109.6°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.08.29	Baoting FSL
保亭毛岸 Mao'an, Baoting	18.7°N, 109.6°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.30	Baoting YDZT
白沙白沙 Baisha, Baisha	19.2°N, 109.4°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.31	Baisha YDZT
白沙牙叉 Yacha, Baisha	19.2°N, 109.4°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.08.31	Baisha FSL
澄迈瑞溪 Ruixi, Chengmai	19.7°N, 110.1°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.09.17	Chengmai FSL
澄迈永发 Yongfa, Chengmai	19.7°N, 110.2°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.09.17	Chengmai YDZT
临高和舍 Heshe, Lingao	19.6°N, 109.7°E	榄仁 <i>Terminalis catappa</i>	2009.09.17	Lingao LR
定安雷鸣 Leiming, Ding'an	19.6°N, 110.3°E	榄仁 <i>Terminalis catappa</i>	2009.09.19	Ding'an LR
定安龙门 Longmen, Ding'an	19.4°N, 110.3°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.08.25	Ding'an YDZT
海口甲子 Jiazi, Haikou	19.6°N, 110.9°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.09.19	Haikou YDZT
文昌蓬莱 Penglai, Wenchang	19.5°N, 110.5°E	印度紫檀 <i>Pterocarpus indicus</i>	2009.09.19	Wenchang YDZT
文昌锦山 Jinshan, Wenchang	20.0°N, 110.7°E	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	2009.09.20	Wenchang FSL

1.3 PCR 扩增及检测

本实验用于扩增目的片段的引物见表 2。PCR 反应体系均为 50 μ L: 10 mmol/L 10 \times buffer 5 μ L、2.5 mmol/L MgCl₂ 3 μ L、0.25 mmol/L 每种 dNTP

2 μ L、上下游引物 20 μ mol/L 各 2 μ L、5 μ g 模板 DNA 2 μ L、Taq 聚合酶 2.5 U, 其余用 ddH₂O 补充。mtDNA-COI 基因的 PCR 反应程序为: 首先 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1.5 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1.5 min,

表 2 PCR 扩增引物及目的片段
Table 2 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences	引物用途 Use of primers	参考文献 References
LC01490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	mtDNA-COI 扩增	Folmer <i>et al.</i> , 1994
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Amplification of mtDNA-COI	
TW81	GTTTCGGTAGGTGAACCTGC	rDNA-ITS1 扩增	Brust <i>et al.</i> , 1998;
5.8R	ATCCGCGAGCCGAGTGATCC	Amplification of rDNA-ITS1	De Barro <i>et al.</i> , 2000

72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。rDNA-ITS1 基因的 PCR 反应程序为: 首先 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 75 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min (Folmer *et al.*, 1994), 反应产物置于 4℃ 冰箱保存。PCR 扩增产物在含有 0.5 μg/mL EB 的 1% 琼脂糖胶上进行电泳检测。电泳结束后, 将凝胶置于紫外分析仪上观察, 标识每条扩增带的分子量大小, 并用凝胶成像仪拍照后记录结果。

1.4 扩增产物测序及序列分析

检测后的 PCR 产物直接测序, 测序工作由北京中美泰和生物技术有限公司测序, 为确保测序结果的准确性, 均在 ABI PRISMTM 3730XL DNA 自动测序仪上进行双向测序。获得测序结果后, 首先采用 ContigExpress 软件并结合测序峰值图对每个样品得到的正反两向序列进行拼接校对, 得到基因的完整序列, 确保序列准确无误后将其保存为文本格式的文件。然后利用网络同源序列搜索引擎 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 对 GenBank 中的同源序列进行比较, 确定为所需要的目的基因后, 提交测序结果获得序列在 GenBank 中的登录号。最后使用 Clustal X 1.83 (Chenna *et al.*, 2003) 进行序列联配 (sequence alignment), 比对结果保存为 CLUSTAL, PHYLIP 及 NEXUS 3 种文件 (当同一种群存在相同序列时, 则只选取其中一条), 以备后续分析使用。用 MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007) 软件, 根据 Kimura 2-paramter 模型计算出不同种群螺旋粉虱的进化分歧矩阵, 采用邻接法 (NJ) 构建系统树, 系统树各分支置信度 (bootstrap) 均进行 1 000 次的重复检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果检测

螺旋粉虱 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 基因序列

特异性条带的电泳检测结果见图 1 和 2, mtDNA-COI 基因目的条带约为 720 bp, rDNA-ITS1 基因目的条带约为 650 bp, 每条序列进行正反链拼接校对后, mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 基因序列长度分别为 712 bp 和 633 bp。

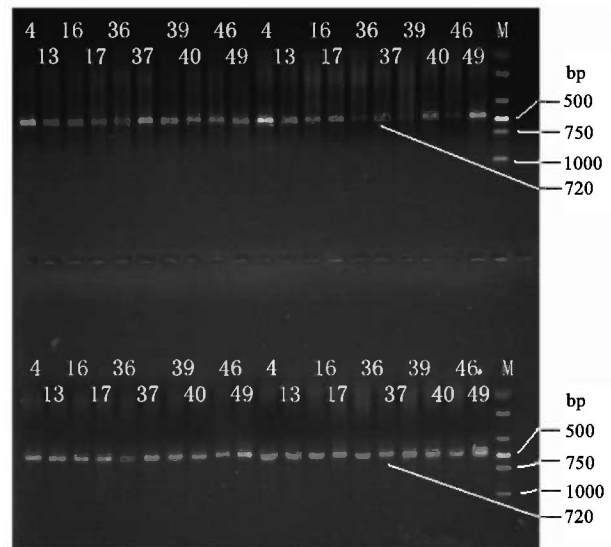


图 1 螺旋粉虱 mtDNA-COI 片段的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR products of mtDNA-COI from *Aleurodicus dispersus*

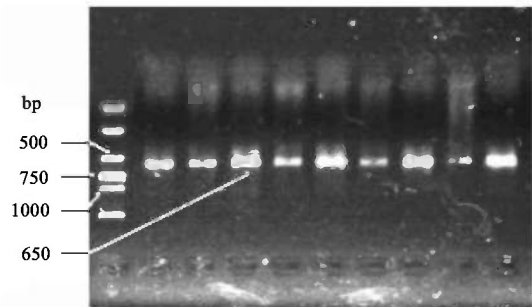


图 2 螺旋粉虱 rDNA-ITS1 片段的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR products of rDNA-ITS1 from *Aleurodicus dispersus*

2.2 不同种群 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 序列差异和组成分析

每个种群各选择 10 个样本进行测序, 测序结

果发现各个种群样本的序列一致(除文昌番石榴种群),所以选取一条进行分析。mtDNA-COI 序列比对结果发现,海南地区不同螺旋粉虱种群的序列基本一致,只有文昌番石榴种群发生基因突变,在 476 bp 位点发生碱基 C 突变为碱基 T,而其他不同地区、不同寄主未发现基因突变(图 3),所以,mtDNA-COI 序列分析时仅挑两条序列进行分析(文昌番石榴种群 GenBank 登录号 KC822647 和陵水种群 GenBank 登录号 KC822648,选择陵水种群是因为 2006 年首次在该地区发现螺旋粉虱的危害)。所有种群的 rDNA-ITS1 基因序列完全一致,多重序列比对后未发现变异位点,所以 rDNA-ITS1 序列分析时仅挑一条序列(GenBank 登录号 KC822649)进行分析(图 4)。

螺旋粉虱种群以及外种群 mtDNA-COI 序列分析发现,不同粉虱 mtDNA-COI 基因序列组成,序列中 AT 含量远高于 GC 含量,具有明显的 AT 偏向性(图 5)。印度种群(India)的 AT 含量最高(76.6%),其他 5 个螺旋粉虱种群(TW, HN37, HN38, HNLS 和 HNFSL)有极为相似的 AT 含量

(74%),螺旋粉虱的近缘种 *Aleurodicus dugesii* 的 A + T 含量(75.6%)也在 75% 以上。其他 4 个外群的 AT 含量均低于 70% (Dc 69.1%, AP 60.9%, SP 69.8% 和 Bt 68.7%)。由此可以说明,复孔粉虱亚科粉虱的 AT 含量要高于粉虱亚科粉虱的 AT 含量。由图 6 可以发现,海南螺旋粉虱的第 3 位点 AT 含量(85.1%)大于第 1 位点(69.3%)和第 2 位点 AT 含量(67.2%),第 3 位点表现明显的 AT 偏向性,这与氨基酸密码子第 3 位点的摆动假说一致,其他粉虱种群 mtDNA-COI 的碱基组成也呈现这一特点。

螺旋粉虱种群以及外种群 rDNA-ITS1 序列分析发现(图 7),不同粉虱 rDNA-ITS1 基因序列 GC 含量远远高于 AT 含量,表现出非常强的 GC 含量偏向性。海南地区螺旋粉虱的 ITS1 序列碱基组成和烟粉虱相近(均为 GC 74%, AT 26%,白粉虱 GC 72%, AT 28%),碱基 A、C 的含量(分别为 16% 和 40%)略高于烟粉虱(分别为 14% 和 37%)和白粉虱(分别为 15% 和 38%)的含量。

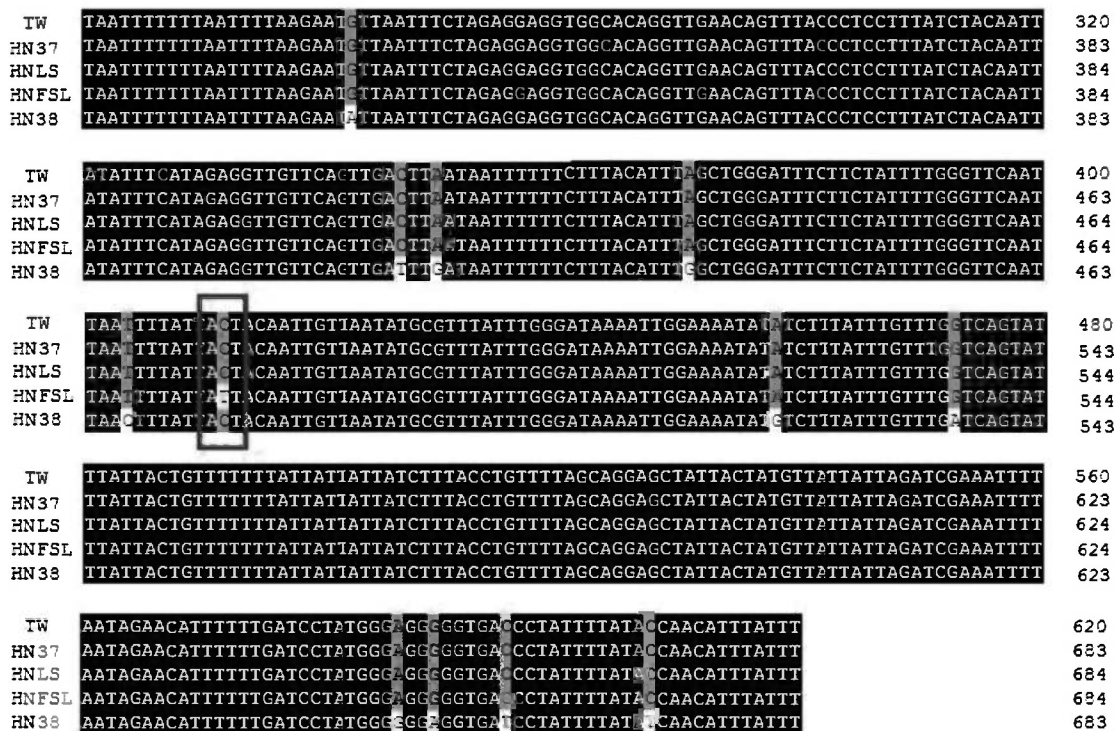


图 3 不同螺旋粉虱种群 mtDNA-COI 部分序列比对

Fig. 3 Partial sequence alignment of mtDNA-COI gene from different populations of *Aleurodicus dispersus*

序列来源及其 GenBank 登录号 Origin of sequences and their GenBank accession numbers : TW: 台湾 Taiwan population (AY764031); HN37: 海南种群 Hainan population (EU581837); HN38: 海南种群 Hainan population (EU581838); HNFSL: 海南种群 Hainan population (KC822647); HNLS: 海南种群 Hainan population (KC822648).

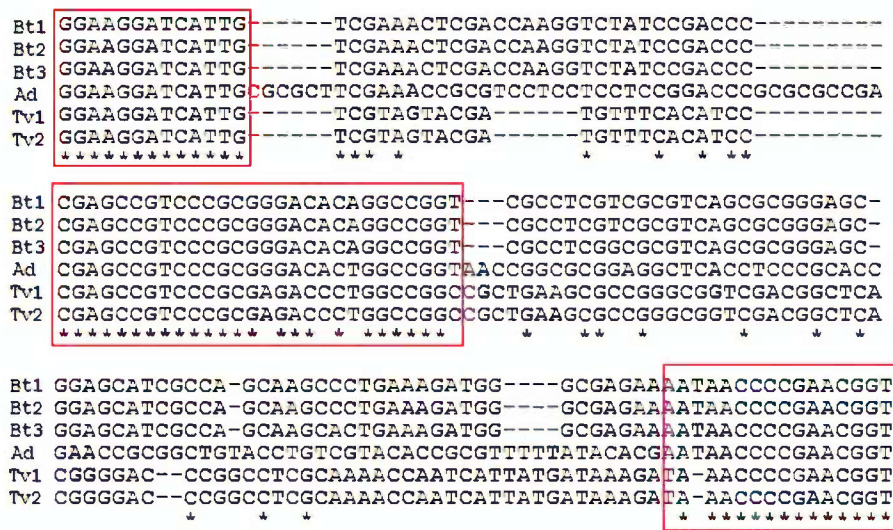


图 4 不同粉虱种群 rDNA-ITS1 部分序列比对

Fig. 4 Partial sequence alignment of rDNA-ITS1 gene from different whitefly populations

序列来源及其 GenBank 登录号 Origin of sequences and their GenBank accession numbers : Ad: 螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* (KC822649); Bt1: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (JQ995281); Bt2: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (JQ995261); Bt3: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (JQ995263); Tv1: 温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (JQ995234); Tv2: 温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (JQ995235).

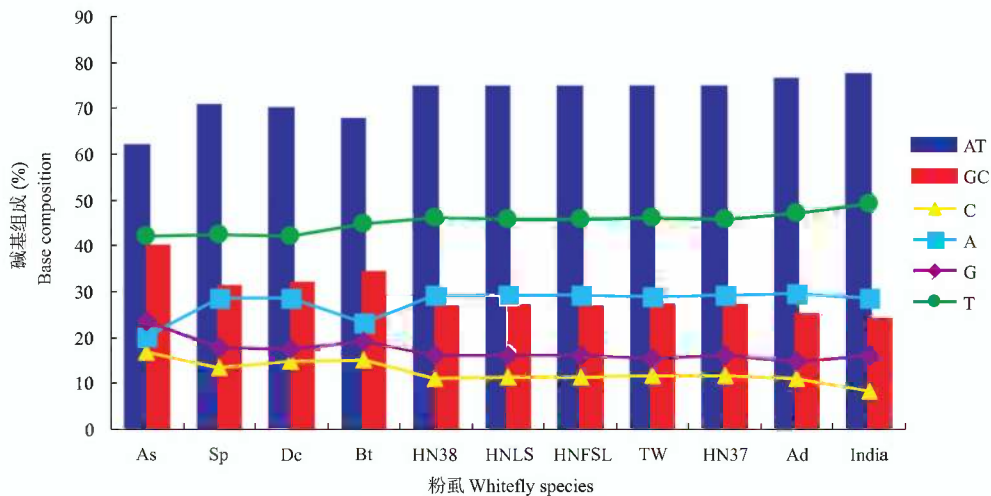


图 5 不同粉虱 mtDNA-COI 序列碱基含量

Fig. 5 Base composition of mtDNA-COI gene of different whitefly populations

序列来源及其 GenBank 登录号 Origin of sequences and their GenBank accession numbers : As: 柑桔刺粉虱 *Aleurocanthus spiniferus*; Sp: 树粉虱 *Siphoninus phillyreae*; Dc: 桔黄粉虱 *Dialeurodes citri*; Bt: 烟粉虱 *Bemisia tabaci*; HN38: 海南种群 Hainan population (EU581838); HNLS: 海南种群 Hainan population (KC822648); HNFSL: 海南种群 Hainan population (KC822647); TW: 台湾种群 Taiwan population (AY764031); HN37: 海南种群 Hainan population (EU581837); Ad: 巨伯粉虱 *Aleurodicus dugesii*; India: 印度种群 India population (AJ748380).

2.3 氨基酸组成与密码子使用频率分析

在 MEGA4.0 软件中选择使用无脊椎动物线粒体密码表, 对不同粉虱种群的密码子使用频率进行统计, 计算出各种群 mtDNA-COI 基因编码区的氨基酸组成及密码子使用频率。

不同粉虱线粒体 COI 基因的氨基酸组成分析结果见表 3。海南地区螺旋粉虱种群 COI 基因 712

bp 序列共编码 204 个氨基酸。5 个不同种群螺旋粉虱氨基酸组成基本一致, 均由 19 种氨基酸组成, 不含丙氨酸(Ala), 其中半胱氨酸(Cys) (1.0%) 和丝氨酸(Ser) (1.0%) 含量最少, 编码氨基酸最多的是亮氨酸(Leu) (27%) 和苯丙氨酸(Phe) (13%)。螺旋粉虱种群 COI 基因在氨基酸组成上具有一定偏向性, 其 A + T 含量在密码子的 1, 2 和 3 位及整

表3 不同粉虱种群 mtDNA-COI 基因序列氨基酸组成

Table 3 The amino acid composition of COI gene sequences among different populations of whitefly

代码 Code	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met
As	1.5	6.1	1.5	2.0	11.6	7.1	2.0	3.5	0.5	23.2	3.5
Dc	0.5	3.7	2.1	5.3	11.1	3.2	0.5	2.6	1.1	24.7	6.3
Sp	0.5	1.6	3.7	8.6	15.0	1.1	2.1	5.4	1.1	18.7	5.4
Bt	2.0	2.5	2.0	2.5	10.2	5.6	1.0	5.1	1.5	27.4	4.6
Ad	1.4	3.2	4.1	4.6	14.6	1.4	0.9	8.6	4.1	21.8	3.6
India	0.0	5.0	4.2	4.2	14.2	3.3	1.3	7.1	2.5	24.6	6.7
TW	0.0	1.2	1.7	4.6	12.6	2.3	1.7	5.8	1.2	27.6	5.8
HN37	0.5	1.0	2.5	5.9	13.2	2.5	2.0	5.9	1.5	26.0	5.9
HN38	0.0	1.0	2.9	4.9	13.7	3.4	1.5	5.9	1.5	26.0	5.9
HNFSL	0.0	1.0	2.5	5.9	13.2	2.9	1.5	5.9	1.5	26.5	5.9
HNLS	0.0	1.0	2.5	5.9	13.2	2.9	1.5	5.9	1.5	26.5	5.9
代码 Code	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr	总计 Total	
As	2.0	3.5	2.0	1.5	6.1	1.5	2.0	11.6	7.1	198	
Dc	2.6	3.7	4.2	0.5	3.7	2.1	5.3	11.1	3.2	190	
Sp	2.7	0.5	4.3	0.5	1.6	3.7	8.6	15.0	1.1	187	
Bt	1.5	0.5	2.5	2.0	2.5	2.0	2.5	10.2	5.6	197	
Ad	4.1	1.4	3.2	1.4	3.2	4.1	4.6	14.6	1.4	220	
India	3.3	0.0	1.7	0.0	5.0	4.2	4.2	14.2	3.3	240	
TW	5.2	1.7	2.3	0.0	1.2	1.7	4.6	12.6	2.3	174	
HN37	4.4	2.0	2.9	0.5	1.0	2.5	5.9	13.2	2.5	204	
HN38	3.9	1.0	2.9	0.0	1.0	2.9	4.9	13.7	3.4	204	
HNFSL	4.4	1.5	2.9	0.0	1.0	2.5	5.9	13.2	2.9	204	
HNLS	4.4	1.5	2.9	0.0	1.0	2.5	5.9	13.2	2.9	204	

体水平都远高于 GC 含量(图 6), 具有明显的 AT 碱基偏向性, 这一点与线粒体基因组具有高 AT 偏向性的特征是一致的; 其中 AT 含量在第 3 位密码子处都是最高的(85.1%), 这与线粒体具有 GC→AT 突变压, 以及密码子第 3 位点存在的高变异率规律是十分相符的。螺旋粉虱不同种群间 COI 基因的变异位点多数发生在密码子的第 3 位点, 但是都没有导致氨基酸的变异。

相对同义密码子使用频率(relative synonymous codon usage, RSCU)是用来对同义密码子的使用频率进行评价的参考值, 反映出密码子在所编码的氨基酸的同义密码子中出现的频率, 使用公式 $RSCU = X_i/\bar{X}$ 来计算。当 RSCU 值大于 1 时, 表示该密码子出现的频率高于期望值, 而小于 1 时表示该密码子出现的频率低于期望值(齐斌等, 2009)。在所有的氨基酸密码子中, 使用频率最高的是 UUU (20.8)。螺旋粉虱线粒体基因组中蛋白编码基因的密码子使用存在着强烈的密码子使用偏向性, NNU 和 NNA 密码子 RSCU 基本都大于 1, 在每种蛋白质组成中

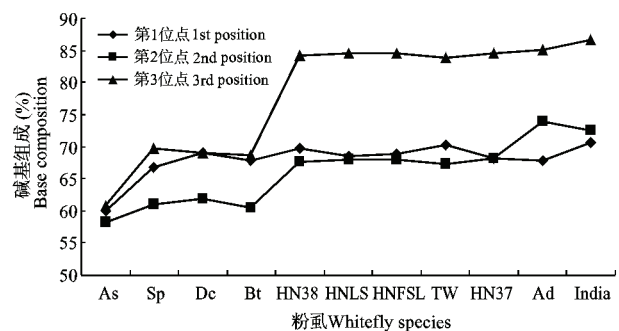


图6 不同粉虱 mtDNA-COI 基因序列不同位点的 AT 含量
Fig. 6 AT composition in different positions of mtDNA-COI gene sequence origin of sequences and their GenBank accession numbers: As: 柑桔刺粉虱 *Aleurocanthus spiniferus*; Sp: 树粉虱 *Siphoninus phillyreae*; Dc: 桔黄粉虱 *Dialeurodes citri*; Bt: 烟粉虱 *Bemisia tabaci*; HN38: 海南种群 Hainan population (EU581838); HNLS: 海南种群 Hainan population (KC822648); HNFSL: 海南种群 Hainan population (KC822647); TW: 台湾种群 Taiwan population (AY764031); HN37: 海南种群 Hainan population (EU581837); Ad: 巨伯粉虱 *Aleurodicus dugesii*; India: 印度种群 India population (AJ748380).

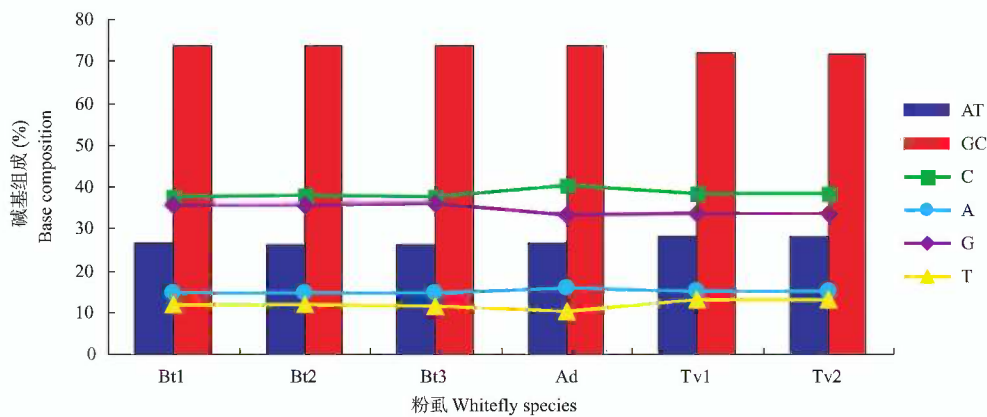


图7 不同粉虱 rDNA-ITS1 序列碱基含量

Fig. 7 Base composition of rDNA-ITS1 gene of different whitefly populations

序列来源及其 GenBank 登录号 Origin of sequences and their GenBank accession numbers; Ad: 螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* (KC822649); Bt1: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (JQ995281); Bt2: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (JQ995261); Bt3: 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (JQ995263); Tv1: 温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (JQ995234); Tv2: 温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (JQ995235).

占绝对主导地位, 相反 NNC 和 NNG 密码子 RSCU 则普遍偏低。NNU 和 NNA 密码子使用的偏向性与蛋白质编码基因的密码子的第 3 位的 A + T 偏向性表现出正相关性, 螺旋粉虱的密码子第 3 位点 A + T 含量高达(85.1%)。

2.4 系统发育树的构建

采用 MEGA4.0 软件通过邻接法(NJ)根据不同粉虱种群 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 序列构建系统树(图 8 ~ 10), 系统树上各分枝上的数值为经 1 000 次 bootstrap 后的置信度。

由图 8 系统进化树可以发现, 除文昌番石榴种群, 海南地区不同螺旋粉虱种群因 mtDNA-COI 基因序列无差异而聚为一支(置信度 60), 台湾种群与海南种群亲缘关系极为相近(置信度 100), 这说明螺旋粉虱的台湾种群与海南种群遗传距离非常近, 即海南地区的螺旋粉虱可能是由台湾传入的, 但这并不是说海南地区的螺旋粉虱就一定是由台湾传入的, 因为螺旋粉虱遗传较为保守, 并且研究中缺少我国周边如东南亚的螺旋粉虱种群。基于 mtDNA-COI 基因构建的不同粉虱种群的系统树(图 9)也进一步说明, 台湾种群与海南种群在进化关系上较近(置信度 98), 而与印度种群亲缘关系较远(置信度 100), 不同螺旋粉虱种群与近缘种 *Aleurodicus dugesii* 有较近的亲缘关系, 而其他粉虱外群 *Bemisia tabaci*, *Aleurocanthus spiniferus*, *Siphoninus phillyreae* 和 *Dialeurodes citri* 则聚为一支(置信度 78)。由图 10 可知, 烟粉虱 *B. tabaci* 与白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* 亲缘关系较近(置信

度均为 100), 它们与螺旋粉虱的亲缘关系都较远。*A. dugesii* 与螺旋粉虱同属复孔粉虱亚科(Aleurodicinae), 其他粉虱则属于粉虱亚科(Aleyrodinae) (Thao and Baumann, 2004a, 2004b), 这与本研究结果一致。

3 结论与讨论

3.1 文昌种群的突变问题

所有的种群中只有文昌的番石榴种群存在变异位点, 为了进一步验证其准确性, 随后的实验中又增加了该种群的重复次数, 最后发现该种群还存在未变异的个体, 即约在 476 bp 位点未发生碱基 C 突变为碱基 T, 变异率约为 60%。进一步检测寄主为印度紫檀的种群均未发现突变位点, 所以海南文昌番石榴种群变异可能为随机变异, 而与不同地理位置和寄主等原因可能无直接联系, 但为了更深入研究, 还应增加不同种群的数量和每个种群重复的次数。

3.2 mtDNA-COI 基因序列组成以及氨基酸密码子

5 个螺旋粉虱种群(1 个台湾种群, 4 个海南种群)的 AT 含量(74.0%)与近缘种 *Aleurodicus dugesii* 的 AT 含量(75.6%)相近, 其他 4 个外群的 AT 含量则均低于 70% (*Dialeurodes citri*, 69.1%; *Aleurocanthus spiniferus*, 60.9%; *Siphoninus phillyreae*, 69.8% 和 *Bemisia tabaci*, 68.7%)。就每个氨基酸密码子来看, 螺旋粉虱和 *A. dugesii* 的第 1, 2 和 3 位

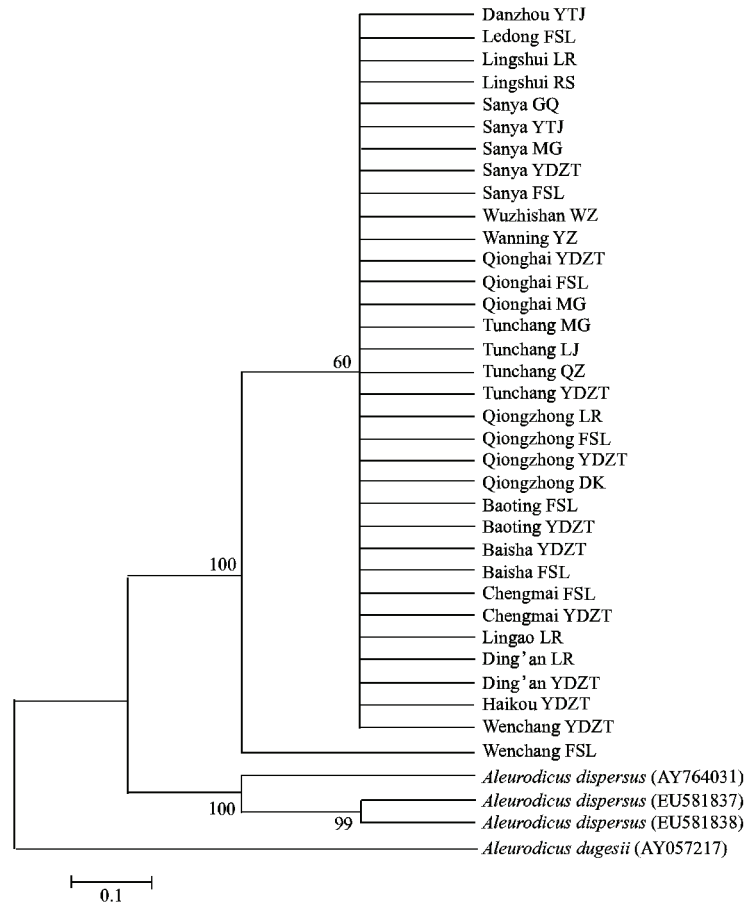


图 8 基于 mtDNA-COI 基因构建的不同螺旋粉虱种群的系统树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of mtDNA-COI from *Aleurodicus dispersus* populations

样品代码同表 1。Sample codes were shown in Table 1. 分支点上的数值为 1 000 次 bootstrap 后的置信度; 图 9 和图 10 同。Numerals on the node are the bootstrap values of 1 000 replications. The same for Figs. 9 and 10.

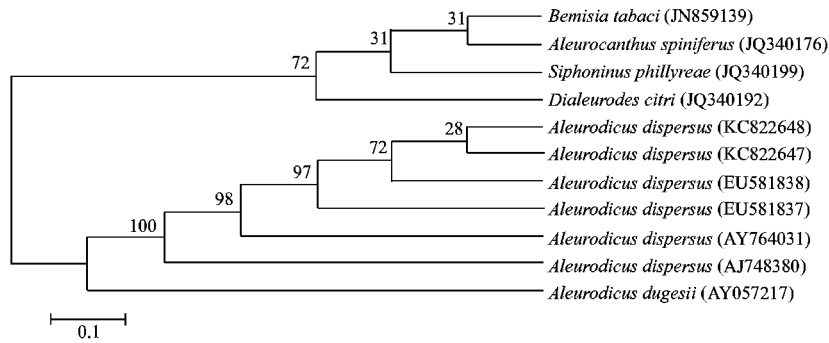


图 9 基于 mtDNA-COI 基因构建的不同粉虱种群的系统树

Fig. 9 Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of mtDNA-COI from whitefly populations

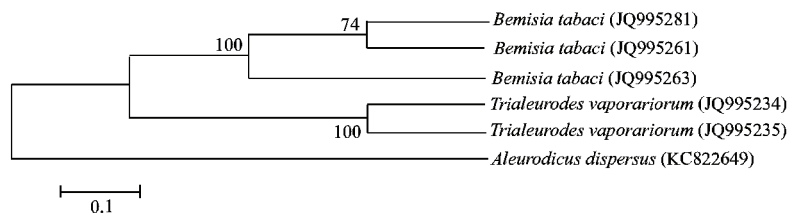


图 10 基于 rDNA-ITS1 基因构建的不同粉虱种群的系统树

Fig. 10 Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of rDNA-ITS1 from whitefly populations

点 A + T 含量分别为 68.9% 和 67.9%, 7.9% 和 74.0%, 84.6% 和 85.1%, 均大于其他粉虱 3 个位点的 AT 含量。所有粉虱种群第 3 位点均表现明显的 AT 偏向性, 这与氨基酸密码子第 3 位点的摆动假说一致。

就密码子使用频率来看, 使用频率最高的是 UUU (20.8)。螺旋粉虱线粒体基因组中蛋白编码基因的密码子使用存在着强烈的密码子使用偏向性, NNU 和 NNA 密码子 RSCU 基本都大于 1, 在每种蛋白质组成中占绝对主导地位, 相反 NNC 和 NNG 密码子 RSCU 则普遍偏低。NNU 和 NNA 密码子使用的偏向性与蛋白质编码基因的密码子的第 3 位的 A + T 偏向性表现出正相关性。

3.3 rDNA-ITS1 基因序列

本研究样品序列的测序主要采用 PCR 产物直接测序法, 并且对产物进行双向测序以增加测序结果的准确性。部分样品采用了克隆测序法, 并且将特殊种群的样品进行多个阳性克隆测序。结果发现特殊种群同一个体不同拷贝间 rDNA-ITS1 序列遗传距离非常小, 因此, 可忽略同一个体不同拷贝之间的差异, 选择其中一条序列进行系统进化分析, 这种做法在其他昆虫序列分析中已有相关报道 (Zheng, 2006)。

在不同螺旋粉虱种群序列变异分析中, 发现序列长度比较保守, 未发现变异位点, 这可能与螺旋粉虱传入时间短以及海南独特的地理位置有关, 还可能与地点的采集和实验重复次数有关。因此, 作者认为该基因不适合用于螺旋粉虱的种群遗传分化的研究。螺旋粉虱 rDNA-ITS1 与烟粉虱和白粉虱的 rDNA-ITS1 比较发现有 3 个保守区。从建立的系统发育树来看, 螺旋粉虱的系统发育一致, 烟粉虱与白粉虱的亲缘关系较近, 但两者与螺旋粉虱的亲缘关系较远。

3.4 不同螺旋粉虱种群的系统研究

基于 mtDNA-COI 和 rDNA-ITS1 基因构建的系统树的研究结果表明, 台湾种群与海南种群的遗传距离很小, 这可以表明海南地区的螺旋粉虱既有可能是由台湾传入, 这与台湾和海南首次发现入侵时间 (台湾为 1988 年, 海南为 2006 年) 的先后顺序相符。通过系统树还发现, *A. dugesii* 与螺旋粉虱在进化关系上较近, 可以聚为一支, 而两者与其他粉虱外群的亲缘关系较远, 这与 Thao 和 Baumann (2004a, 2004b) 将粉虱分为复孔粉虱亚科 (Aleurodinae) (*A. dugesii* 与螺旋粉虱等) 和粉虱

亚科 (Aleyrodinae) (*Bemisia tabaci* 等) 一致。

海南省全岛的螺旋粉虱种群只有文昌的番石榴种群发生变异, 而其他寄主、其他地理位置 (甚至是在海南首次发现螺旋粉虱的陵水) 均未发现变异, 造成这一结果的原因, 除了采集样品地点时间以及实验过程中的重复次数这些因素外, 还与螺旋粉虱在海南暴发的年限 (2006 - 2010 年, 仅仅 4 年) 短有一定的联系。我们应该进一步补充实验数据, 或者采用其他分子方法, 如微卫星等, 来研究海南省螺旋粉虱种群的系统发育, 进而研究螺旋粉虱在海南的传播路线和入侵机制, 这为更好地防治螺旋粉虱提供理论依据, 同时也为中国其他省份如福建、广东、广西等适生区 (沈文君和万方浩, 2007) 预防和监测螺旋粉虱提供建议和意见。

参考文献 (References)

- Brust RA, Ballard JWO, Driver F, Hartley DM, Galway NJ, Curran J, 1998. Molecular systematics, morphological analysis, and hybrid crossing identify a third taxon, *Aedes (Halaedes) wardandensis* sp. nov., of the *Aedes (Halaedes) australis* species-group (Diptera: Culicidae). *Canadian Journal of Zoology*, 76: 1236 - 1246.
- CABI, 1993. *Aleurodicus dispersus* Russell. Distribution Maps of Pests. Series A, Map No. 476.
- Cao FQ, Liu WX, Chen P, Hao HH, Cheng LS, 2010. Survey on the host plants and population dynamics of *Aleurodicus dispersus* Russell in Lingshui county of Hainan Island. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 38(6): 2996 - 2999. [曹凤勤, 刘万学, 陈攀, 郝慧华, 程立生, 2010. 海南陵水县螺旋粉虱寄主植物及发生动态研究. *安徽农业科学*, 38(6): 2996 - 2999]
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD, 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3497 - 3500.
- De Barrop J, Driver F, Trueman JWH, Curran J, 2000. Phylogenetic relationships of world populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) using ribosomal ITS1. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1): 29 - 36.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294 - 299.
- Han DY, Liu K, Chen W, Fan ZW, Peng ZQ, Huang WR, Yu GY, Zhang GL, Fu YG, 2008. Distribution and host plants of the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, in Hainan. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 765 - 770. [韩冬银, 刘奎, 陈伟, 范志伟, 彭正强, 黄武仁, 虞国跃, 张国良, 符悦冠, 2008. 螺旋粉虱在海南的分布与寄主植物种类调查. *昆虫知识*, 45(5): 765 - 770]
- Lambkin TA, 1999. A host list for *Aleurodicus dispersus* Russell (Hemiptera: Aleyrodidae) in Australia. *Australian Journal of*

- Entomology*, 38: 373–376.
- Mani M, Krishinamoorthy A, 1999. Natural enemies and host plants of spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae) in Bangalore, Karnataka. *Association for Advancement of Entomology (India)*, 24: 75–80.
- Mao ZH, 2010. Complete Mitochondrial Genome, rDNA ITS-1 Sequence Evidenced Population Differentiation and Phylogeography of *Pieris rapae* Linnaeus. MSc Thesis, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui. [毛增辉, 2010. 菜粉蝶线粒体基因组全序列及其不同地理居群的 mtDNA ITS1 序列的比较分析. 安徽芜湖: 安徽师范大学硕士学位论文]
- Matthews EG, 1976. *Insect Ecology*. University of Queensland Press, Brisbane.
- Neuenschwander P, 1994. Spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, a recent invader and new cassava pest. *African Crop Science Journal*, 2(4): 419–421.
- Qi B, Zhao JJ, Gao L, Zhu P, 2009. Analysis on the preference of synonymous codon in VP1 nucleotide sequence of the EV71 based on RSCU method. *Chinese Journal of Virology*, 25(6): 467–475. [齐斌, 赵静静, 高雷, 朱平, 2009. 基于 RSCU 方法的 EV71 病毒 VP1 核酸序列的同义密码子的偏好性分析. 病毒学报, 25(6): 467–475]
- Qian JT, Zhou LY, Zhang SZ, 2002. Occurrence and biological control of *Aleurodicus dispersus*. *Formosan Entomology, Special Publication*, 3: 93–109. [钱景泰, 周梁镒, 张淑贞, 2002. 螺旋粉虱之发生与生物防治. 台湾昆虫特刊, 3: 93–109]
- Ramani S, Poorani J, Bhumannavar BS, 2002. Spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, in India. *Biocontrol News and Information*, 23: 55–62.
- Russell LM, 1965. A new species of *Aleurodicus* Douglas and two close relatives (Homoptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, 48(1): 47–55.
- Shen WJ, Wan FH, 2007. Analysis of potential distributive areas for *Aleurodicus dispersus* in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3): 367–371. [沈文君, 万方浩, 2007. 入侵害虫螺旋粉虱及其在我国的适生区预测. 昆虫知识, 44(3): 367–371]
- Shen Y, 2007. Studies on Biotypes of *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) in Vegestigated Areas of China. MSc Thesis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu. [沈媛, 2007. 中国部分地区烟粉虱生物型研究. 江苏扬州: 扬州大学硕士学位论文]
- Shi GR, 2001. Population – a worthy biological level. *Biology Teaching*, 26(1): 29–30. [史刚荣, 2001. 种群——一个值得重视的生物层次. 生物学教学, 26(1): 29–30]
- Song ZQ, Yu WW, Du YZ, 2011. The ultrastructure of the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 32(1): 92–94. [宋早芹, 于卫卫, 杜予州, 2011. 螺旋粉虱超微结构的研究. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 32(1): 92–94]
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596–1599.
- Thao MLL, Baumann P, 2004a. Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Current Microbiology*, 8: 140–144.
- Thao MLL, Baumann P, 2004b. Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3401–3406.
- Wang LP, Du YZ, He YT, Lu YJ, Lu ZQ, 2007. Sequence analysis and comparison of rDNA-ITS1 of geographical populations of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) from China and closely related species. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 597–603. [王莉萍, 杜予州, 何娅婷, 陆亚娟, 陆自强, 2007. 不同地理种群美洲斑潜蝇及近缘种的 rDNA-ITS1 序列分析和比较. 昆虫学报, 50(6): 597–603]
- Wen HC, Hsu TC, Chen CN, 1994. Supplementary description and host plants of the spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell. *Chinese Journal of Entomology*, 14(2): 147–161. [温宏治, 许洞庆, 陈秋南, 1994. 螺旋粉虱之形态补述及寄主植物. 中华昆虫, 14(2): 147–161]
- Wen HC, Hsu TC, Chen CN, 1997. Review on the spiralling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell. *Plant Protection Bulletin (Taipei)*, 39(2): 139–149. [温宏治, 许洞庆, 陈秋男, 1997. 螺旋粉虱之综述. 植保会刊, 39(2): 139–149]
- Xu Y, 1999. An alert for the invasion of spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*. *Plant Quarantine*, 13(4): 232–236. [徐岩, 1999. 警惕螺旋粉虱传入中国. 植物检疫, 13(4): 232–236]
- Yu GY, 2011. Spiraling Whitefly (*Aleurodicus dispersus* Russell) and Its Natural Insect Enemies. Science Press, Beijing. [虞国跃, 2011. 螺旋粉虱及其天敌昆虫. 北京: 科学出版社]
- Yu GY, Zhang GL, Peng ZQ, Liu K, Fu YG, 2007. The spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, invaded Hainan Island of China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3): 428–431. [虞国跃, 张国良, 彭正强, 刘奎, 符悦冠, 2007. 螺旋粉虱入侵我国海南. 昆虫知识, 44(3): 428–431]
- Yu WW, Du YZ, Li WD, 2013. Detection and phylogenetic analysis of three secondary endosymbionts in populations of *Aleurodicus dispersus* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Hainan, southern China. *Acta Entomologica Sinica*, 56(1): 18–28. [于卫卫, 杜予州, 李伟东, 2013. 海南地区螺旋粉虱三类次级内共生菌的检测及系统发育分析. 昆虫学报, 56(1): 18–28]
- Zheng XL, 2006. Molecular phylogenetic analysis reveals at least five genetic races of *Bemisia tabaci* in China. *Phytoparasitica*, 34(5): 431–440.
- Zhong BZ, Lv CJ, Ma ZL, Peng ZQ, Qin WQ, Wang Z, Li H, 2009. Advances in occurrence and integrated control of *Aleurodicus dispersus*. *Subtropical Agriculture Research*, 5(3): 173–175. [钟宝珠, 吕朝军, 马子龙, 彭正强, 覃伟权, 王智, 李洪, 2009. 螺旋粉虱发生及综合防治研究进展. 亚热带农业研究, 5(3): 173–175]

(责任编辑: 袁德成)