

微卫星位点在 Q 型烟粉虱入侵种群中的多态性分析^{*}

刘国霞^{1 2 **} 褚 栋^{1 2 ***}

(1. 山东省农业科学院高新技术研究中心, 山东省作物与畜禽品种改良生物技术重点实验室 济南 250100;

2. 农业部黄淮海作物遗传改良与生物技术重点开放实验室 济南 250100)

摘 要 近年来烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) Q 型入侵我国并在部分地区取代 B 型成为了烟粉虱优势生物型。外来物种的入侵过程及农药使用等因素可影响种群的遗传多样性水平及其遗传结构。本研究分析了 4 个微卫星位点在 Q 型烟粉虱入侵种群的多态信息含量 (PIC), 并在此基础上进行了遗传多样性分析。结果表明这些微卫星位点在 Q 型烟粉虱入侵种群中具有中度或高度多态性, 说明微卫星位点能有效分析 Q 型入侵种群的遗传多态性。本研究为利用微卫星标记研究 Q 型入侵种群的遗传结构奠定了基础。

关键词 Q 型烟粉虱, 多态性, 微卫星标记

Polymorphisms of microsatellite loci within invasive populations of *Bemisia tabaci* biotype Q

LIU Guo-Xia^{1 2 **} CHU Dong^{1 2 ***}

(1. High-tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, and Key Laboratory for Genetic Improvement of Crop

Animal and Poultry of Shandong Province, Jinan 250100, China; 2. Key Laboratory of Crop Genetic Improvement

and Biotechnology, Huanghaihai, Ministry of Agriculture, the People's Republic of China, Jinan 250100, China)

Abstract During the past several years, the *Bemisia tabaci* (Gennadius) Q-biotype has invaded China and become the predominant biotype by replacing the previously established B-biotype in some areas. *B. tabaci*'s genetic polymorphism could be influenced by the invasion process and pesticides used. The polymorphism information content (PIC) of 4 microsatellite loci in Q-biotype populations from Shandong Province was assessed and used to determine the genetic diversity of these populations. The results show that all 4 loci were moderately or highly polymorphic indicating that these loci are informative for determining the genetic diversity of invasive Q-biotype populations. These results provide a foundation for determining the utility of microsatellite markers in the invasive Q-biotype.

Key words *Bemisia tabaci* biotype Q, polymorphism, microsatellite marker

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是一种多食性农业害虫, 它可通过吸取植物汁液、分泌蜜露影响光合作用及传播植物病毒等方式危害 500 多种寄主植物 (Oliveira *et al.*, 2001)。许多研究表明, 烟粉虱由多种具有明显遗传分化的生物型或物种组成 (Brown *et al.*, 1995; Perring, 2001)。其中, B 型和 Q 型烟粉虱由于较强的入侵性, 在世界范围内广泛分布。20 世纪 90 年代在我国许多个

省市发现了 B 型烟粉虱的危害 (罗晨等, 2002; Wu *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003)。自 2003 年在云南首次发现 Q 型烟粉虱以来 (褚栋等, 2005), 在许多地区又相继发现了 Q 型烟粉虱的危害 (Chu *et al.*, 2006; 2007)。目前, B 型烟粉虱分布于我国大部分地区, Q 型烟粉虱主要在长江流域, 在部分地区烟粉虱 Q 型逐渐取代 B 型成为优势生物型 (万方浩等, 2009)。这可能跟 Q 型烟粉虱抗药性

* 资助项目: 山东省农科院青年基金项目 (2005YQ032)、山东省自然科学基金 (Q2006B05)、农业部公益性行业科研专项 (200803005)。

*** 通讯作者, E-mail: girlgx@sina.com

收稿日期: 2010-02-05, 接受日期: 2010-03-23

强 (Elbert and Nauen, 2000; Nauen *et al.*, 2002; Rauch and Nauen, 2003; Horowitz *et al.*, 2005)、对某些寄主适应性强有关 (Muniz, 2000; Muniz and Nombela, 2001)。利用 RAPD (Moya *et al.*, 2001; 褚栋等, 2007)、ISSR (Chu *et al.*, 2008) 等分子标记研究发现 Q 型烟粉虱种群遗传多样性高于 B 型, 可能为 Q 型适应环境变化提供了更多的遗传基础。而对其群体遗传结构等研究则需要多态性更高的分子标记。微卫星又称为简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR), 通常由 2~4 个核苷酸重复序列串联而成。SSR 标记由于具有对 DNA 质量要求低、多态性信息含量高、重复性好等优点, 被认为是研究群体遗传变异最好的标记之一 (褚栋等, 2006)。目前为止已经开发了至少 35 个烟粉虱 SSR 引物 (Tsagkarakou and Roditakis, 2003; De Barro *et al.*, 2003; Delatte *et al.*, 2006; Tsagkarakou *et al.*, 2007), 为利用 SSR 标记研究烟粉虱遗传变异提供了基础。SSR 标记可以揭示 ITS1 标记所不能反映的更详尽的烟粉虱遗传结构 (De Barro *et al.*, 2005)。

入侵物种在传入过程中一般都会经历瓶颈效

应而使遗传多样性降低;同时,研究发现农药的筛选作用影响烟粉虱微卫星位点的多态信息含量 (PIC), 如噻虫嗪使 B 型烟粉虱室内种群 PIC 降低并影响遗传多样性 (褚栋等, 2008a)。因此,有必要对入侵昆虫 Q 型烟粉虱种群微卫星标记的多态性及其有效性开展相关研究。

本研究利用微卫星标记研究了 Q 型烟粉虱入侵种群的 PIC, 在此基础上利用这些微卫星位点进一步分析了 Q 型烟粉虱种群的等位基因频率、遗传多样性, 这方面的研究为微卫星位点在 Q 型烟粉虱入侵种群遗传结构中的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

烟粉虱样品分别采自淄博、寿光、聊城的田间棉花、茄子共 6 个种群。样品采集地、生物型、寄主、试验个体数量以及采集时间见表 1。利用线粒体 DNA COI (mtCOI) (褚栋等, 2005) 方法鉴定了生物型。烟粉虱样品浸泡于 70% 乙醇中, 放于 -20℃ 保存。

表 1 烟粉虱采集地点、生物型、寄主以及采集时间

Table 1 The place, biotype, host plant and time of *Bemisia tabaci* samples

种群编号 Population code	地点 Place	寄主植物 Host plant	采集时间 Collection time	生物型 Biotype	试虫数量 (头) Sample number
SGQ	寿光洛城 Luocheng, Shouguang	茄子 Eggplant	2007-9	Q	15
SGM	寿光王望镇 Wangwang, Shouguang	棉花 Cotton	2007-8	Q	15
LCM	聊城高唐 Gaotang, Liaocheng	棉花 Cotton	2007-7	Q	14
LCQ	聊城高唐 Gaotang, Liaocheng	茄子 Eggplant	2007-7	Q	12
ZBM	淄博临淄 Linzi, Zibo	棉花 Cotton	2007-7	Q	15
ZBQ-B	淄博临淄 Linzi, Zibo	茄子 Eggplant	2006-9	B	10

1.2 单头烟粉虱 DNA 提取及微卫星标记

烟粉虱 DNA 提取方法参照褚栋等 (2005)。每个种群随机取 10~15 头烟粉虱雌虫进行实验。所用引物参考 De Barro 等 (2003), 从中选出扩增较好的 4 对引物 (BEM06、BEM11、BEM18、BEM25) 用于 SSR 分析。PCR 反应体系 20 μ L, 含 2 μ L 反应缓冲液, 1 U Taq 酶, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 上下游引物各 0.2 μ M, 模板 DNA 为 3 μ L, 用 ddH₂O 定容至 20 μ L。在

Eppendorf PCR 仪上进行反应, 条件为 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电压 1 200 V, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE。电泳结束后银染显影统计结果。

1.3 数据统计分析

用 POPGEN1.32 和 CERVUS2.0 (Marshall *et al.*, 1998) 软件计算每个种群的等位基因频率、多态信息含量 (PIC)、观察杂合度 (*H_o*)、期望杂合

度 (H_e)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 信息指数 (I) 等多样性指数。

2 结果与分析

2.1 微卫星扩增及群体多态信息含量分析

本研究用 4 对 SSR 引物对 6 个种群共 81 个烟粉虱个体进行了遗传多样性检测,每对引物扩增的等位基因数为 3~4 个,除 BEM11 扩增到 3 个等位基因外,其余 3 个引物均扩增到 4 个等位基因。在各种群间 4 个位点的多态信息含量有较大

差异(表 2)。在 Q 型种群中 BEM06 多态信息含量最高 ($PIC > 0.5$),为高度多态性;BEM11 和 BEM25 的 PIC 分别在 0.428~0.477 和 0.369~0.656 之间,为中度多态性;除在淄博棉花种群中 BEM18 位点的 PIC 较低为 0.239 之外,其余 4 个 Q 种群均在 0.401~0.646 之间。从 5 个 Q 种群总体来看,除 BEM11 外,其余 3 个位点的 PIC 均大 0.5,都是高度多态性位点。而 B 型种群 4 个位点为中度或低度多态性,均低于 Q 型。

表 2 不同位点的多态信息含量

Table 2 The polymorphism information content (PIC) of different locus

位点 Locus	SGQ	SGM	LCM	LCQ	ZBM	总 Q 型 Total Q	ZBQ-B
BEM06	0.833	0.810	0.854	0.790	0.850	0.851	0.362
BEM11	0.428	0.441	0.442	0.441	0.477	0.451	0.030
BEM18	0.472	0.527	0.401	0.646	0.239	0.590	0.125
BEM25	0.369	0.374	0.656	0.646	0.477	0.639	0.240

2.2 等位基因频率分析

Q 型烟粉虱不同种群在 4 个位点上等位基因组成与频率均有差异(表 3),BEM06 位点除聊城茄子种群只含有 2 个等位基因外,其余 4 个种群均有 3 个等位基因;多数 Q 型种群在 BEM11 位点含有 2 个等位基因,分布频率差别不大;寿光茄子

和棉花种群在 BEM18 和 BEM25 位点分别只含有 2 个等位基因(A、B),而其他 3 个 Q 种群分别含有 2 个等位基因(C、D)和 4 个(A、B、C、D)或 3 个(A、B、C)等位基因。相对于 Q 型,B 型种群含有的等位基因数更少。

表 3 不同烟粉虱种群的等位基因频率

Table 3 Allele frequencies in different population of *Bemisia tabaci*

位点 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency					
		SGQ	SGM	LCM	LCQ	ZBM	ZBQ-B
BEM06	A	0	0	0	0	0	1.000
	B	0.133	0.067	0.214	0.182	0.200	0
	C	0.733	0.800	0.643	0.818	0.667	0
	D	0.133	0.133	0.143	0	0.133	0
BEM11	A	0	0	0	0.091	0	0.438
	B	0.462	0.600	0.321	0.591	0.583	0.563
	C	0.538	0.400	0.679	0.318	0.417	0
BEM18	A	0.500	0.536	0	0	0	0
	B	0.500	0.464	0	0	0	0
	C	0	0	0.464	0.500	0.286	1.000
	D	0	0	0.536	0.500	0.714	0
BEM25	A	0.500	0.633	0.227	0.600	0.750	0
	B	0.500	0.367	0.545	0.200	0.214	0.125
	C	0	0	0.091	0.100	0.036	0.625
	D	0	0	0.136	0.100	0	0.250

2.3 群体遗传变异分析

利用 POPGEN1.32 软件计算了各种群的遗传多样性指数(表 4)。Q 型种群的有效等位基因数 N_e 、Shannon 信息指数 I 、期望杂合度 H_e 分别在

1.81 ~ 2.12、0.70 ~ 0.84、0.46 ~ 0.54 之间,而 B 型的多样性指数均小于 Q 型,依次为 1.52、0.39 和 0.27。5 个 Q 型种群的多态信息含量 PIC 都大于 0.51,而 B 型为 0.37。

表 4 烟粉虱各种群的遗传多样性指数

Table 4 Polymorphism index in *Bemisia tabaci* populations

种群 Population	PIC	N_a	N_e	I	H_o	H_e
SGQ	0.525	2.25	1.930	0.709	0.562	0.498
SGM	0.538	2.25	1.822	0.662	0.498	0.462
LCM	0.588	2.75	2.127	0.841	0.165	0.540
LCQ	0.631	2.75	1.996	0.787	0.072	0.505
ZBM	0.511	2.50	1.816	0.700	0.214	0.472
ZBQ-B	0.373	1.75	1.525	0.396	0.156	0.272

注: PIC 多态信息含量; N_a 观察等位基因数; N_e 有效等位基因数; I Shannon 信息指数; H_o 观察杂合度; H_e 期望杂合度。
 PIC , polymorphism information content; N_a , observed number of alleles; N_e , effective number of alleles; I , Shannon's information index; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity.

3 讨论

入侵种群遗传结构研究对于揭示入侵种的入侵来源、传播途径、传播模式及遗传变化等具有重要的意义(褚栋等, 2008b), 而多态性的分子标记是种群遗传结构研究的基础。本研究初步探讨了微卫星标记在 Q 型烟粉虱种群中的多态性。多态信息含量 PIC 是衡量标记多态性的重要指标, Botstein 等(1980)认为, $PIC > 0.5$ 时是高度多态性位点, 在 0.25 ~ 0.5 之间为中度多态, 低于 0.25 为低度多态。根据各位点在烟粉虱种群中的 PIC 值, 本研究所用的 4 个位点在 Q 型种群中均为高度多态性或中度多态性位点, 说明这几个位点在 Q 型种群中的变异程度较高, 适于 Q 型种群的遗传变异研究。

本研究主要目的是探讨微卫星标记能否用于 Q 型烟粉虱种群遗传结构分析, 将来可以以此为基础, 使用更多的微卫星位点研究更多 Q 型烟粉虱种群来揭示其入侵过程、灾变机制和制定有效控制措施提供理论依据。Shannon 信息指数 I 、期望杂合度 H_e 均为表征种群遗传多样性的重要参数。从这几个参数的比较分析发现, Q 型烟粉虱遗传多样性水平高于 B 型, 与利用 RAPD (Moya *et al.*, 2001; 褚栋等, 2007)、ISSR (Chu *et al.*, 2008) 等方法研究结果一致。结果进一步证实利用上述 SSR 标记可以有效研究 Q 型烟粉虱入侵种

群的遗传变异, 为进一步利用更多的 SSR 引物来研究 Q 型烟粉虱入侵种群的遗传结构提供了依据。

参考文献 (References)

- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32(3):314—331.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC, 1995. The sweet potato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annu. Rev. Entomol.*, 40:511—534.
- 褚栋, 陈国发, 徐宝云, 吴青君, 张友军, 2007. 烟粉虱 B 型和 Q 型群体遗传结构的 RAPD 分析. *昆虫学报*, 50(3):264—270.
- Chu D, Jiang T, Liu GX, Jiang DF, Tao YL, Fan 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. *Environ. Entomol.*, 36(5):1290—1295.
- Chu D, Wan FH, Xu BY, Wu QJ, Zhang YJ, 2008. Comparative analysis of population genetic structure in *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes B and Q based on ISSR marker. *Agricultural Sciences in China*, 7(11):101—105.
- 褚栋, 徐宝云, 吴青君, 万方浩, 肖建峰, 朱国仁, 张友军, 2008a. 施用噻虫嗪可降低 B 型烟粉虱群体的遗传多样性. *昆虫学报*, 51(2):150—154.

- Chu D ,Zhang YJ ,Brown JK ,Cong B ,Xu BY ,Wu QJ ,Zhu GR ,2006. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) from the Mediterranean region into China on ornamental crops. *Fla. Entomol.* ,89 (2) : 168—174.
- 褚栋 张友军 丛斌 姜蕴萍 2006. 微卫星分子标记在入侵生物学中的应用进展. 山东农业大学学报 37(2) :309—312.
- 褚栋 张友军 丛斌 徐宝云 吴青君 朱国仁 2005. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学 38(1) :76—85.
- 褚栋 张友军 万方浩 2008b. 烟粉虱生物型的监测及其遗传结构研究. 昆虫知识 45(3) :353—356.
- De Barro PJ , 2005. Genetic structure of whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite markers. *Mol. Ecol.* ,14(12) :3695—3718.
- De Barro PJ ,Scott KD ,Graham GC ,Lange CL ,Schutze MK , 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Mol. Ecol. Notes* ,3 (1) :40—43.
- Delatte H ,David P ,Granier M ,Lett JM ,Goldbach R ,Peterschmitt M ,Reynaud B ,2006. Microsatellites reveal extensive geographical , ecological and genetic contacts between invasive and indigenous whitefly biotypes in an insular environment. *Genet. Res.* 87(2) :109—124.
- Elbert A ,Nauen R ,2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Manag. Sci.* , 56(1) :60—64.
- Horowitz AR ,Kontsedalov S ,Khasdan V ,Ishaaya I ,2005. Biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58(4) :216—225.
- 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.
- Marshall TC ,Slate J ,Kruuk LEB ,Pemberton JM , 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* ,7 (6) :639—655.
- Moya A ,Guirao P ,Cifuentes D ,Beitia F ,Cenis JL , 2001. Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA — polymerase chain reaction. *Mol. Ecol.* ,10(4) :891—897.
- Muniz M ,2000. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomol. Exp. Appl.* ,95 (1) :63—70.
- Muniz M ,Nombela G , 2001. Differential variation in development of the B- and Q-biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on sweetpepper at constant temperatures. *Environ. Entomol.* ,30(4) :720—727.
- Nauen R ,Stumpf N ,Elbert A ,2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.* 58(9) :868—875.
- Oliveira MRV ,Henneberry TJ ,Anderson P ,2001. History , current status , and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Prot.* 20(9) :709—723.
- Perring TM ,2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.* 20(9) :725—737.
- Qiu BL ,Ren SX ,Wen SY ,Nasser SM ,2003. Biotype identification of the populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China using RAPD-PCR. *Acta Entomol. Sin.* ,46(5) :605—608.
- Rauch N ,Nauen R 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* , 54(4) :165—176.
- Tsagkarakou A , Roditakis N , 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Mol. Ecol. Notes* ,3 (3) :196—198.
- Tsagkarakou A ,Tsigenopoulos CS ,Gorman K ,Lagnel J , Bedford ID ,2007. Biotype status and genetic polymorphism of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Greece: mitochondrial DNA and microsatellites. *Bull. Entomol. Res.* 97(1) :29—40.
- 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.
- Wu XX ,Hu DX ,Li ZX ,Shen ZR ,2002. Using RAPD-PCR to distinguish biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) in China. *Entomol. Sin.* 9(3) :1—8.