

烟粉虱 B 型与 Q 型种群遗传多样性的 AFLP 分析*

刘国霞^{1 2 **} 褚 栋^{1 2} 高长生^{1 2 3}

(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;

3. 青岛农业大学农学与植物保护学院 青岛 266109)

Analysis of genetic diversity of *Bemisia tabaci* biotypes B and Q using AFLP. LIU Guo-Xia^{1 2 **}, CHU Dong^{1 2}, GAO Chang-Sheng^{1 2 3} (1. High-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, 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, Huanghuaihai, Ministry of Agriculture, the People's Republic of China, Jinan 250100, China; 3. Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Shandong 266109, China)

Abstract *Bemisia tabaci* (Gennadius) is a species complex comprised of many biotypes. Biotype Q is replacing biotype B to become the predominant biotype in parts of China. The comparison of genetic diversity between biotypes B and Q is important to comprehend the genetic basis of the two biotypes' competition. The AFLP method was used to study the population genetic diversity of the Q1, Q2 and B biotype. The results show that the genetic diversity of biotype Q is higher than that of B, and that of Q1 similar to that of Q2. Finally, the characteristics of AFLP and SSR are discussed.

Key words *Bemisia tabaci*, genetic diversity, AFLP

摘 要 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是由多种生物型或物种组成的复合种。Q 型烟粉虱在我国部分地区正在取代 B 型烟粉虱成为优势生物型。烟粉虱 Q 型与 B 型遗传多样性比较研究为解析这 2 种生物型入侵的遗传学基础具有重要的意义。本文利用 AFLP 技术研究了 Q 型(包括 Q1 型、Q2 型)、B 型烟粉虱种群的遗传多样性。结果表明:Q 型烟粉虱遗传多样性高于 B 型烟粉虱;Q1 型烟粉虱各项遗传多样性指数均接近于 Q2 型。最后探讨了 AFLP 与 SSR 分子标记的各自特点。

关键词 烟粉虱, 遗传多样性, AFLP

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 是一种世界性分布的农业害虫, 它可取食植物汁液、分泌蜜露影响光合作用, 传播 110 多种植物病毒, 给蔬菜、花卉和棉花等造成严重的经济损失^[1]。目前, 烟粉虱被认为是一个由多种生物型或物种组成的复合种^[2, 3], 其中烟粉虱 B 型和 Q 型是分布较广、入侵性较强的 2 种生物型, 受到人们的普遍重视^[3]。

20 世纪 90 年代中期, 烟粉虱在我国广东、上海等地发生严重。随后的研究表明, 在我国多个省市发生的烟粉虱是 B 型烟粉虱^[4-6]。而

Q 型烟粉虱于 2003 年首次在云南被发现, 随后在北京、河南、浙江、山东等地发现^[7, 8]。近几年对山东省烟粉虱生物型调查发现, 在部分地区 Q 型正取代 B 型成为烟粉虱的优势生物型^[9]。物种的遗传多样性水平不仅为适应环境变化提供了更多的遗传学基础, 而且在种群、

* 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: 2010-01-15, 修回日期: 2010-08-03

群落和生态系统水平都有重要的生态学影响^[10]。因此,烟粉虱 Q 型与 B 型的遗传多样性比较研究为解析这 2 种生物型入侵的遗传学基础具有重要的意义。Q 型烟粉虱原产于地中海地区,系统发育分析可分为 Q1 和 Q2 两个分支,Q1 型主要分布在地中海大部分国家,而 Q2 型仅分布在以色列、塞浦路斯等少数几个国家^[11]。褚栋等^[12]及 Chu 等^[13]分别利用 RAPD、ISSR 分析表明:Q 型烟粉虱种群的遗传多样性高于 B 型烟粉虱。Chu 等^[11]利用 mtCOI 多样性分析表明,Q1 型烟粉虱比 Q2 型烟粉虱具有更多的多样性,这可能是不同遗传类型的遗传学特性。这与作者利用 SSR 分析以色列的 Q2 型烟粉虱多样性低于来自西班牙、云南的 Q1 型的结果是一致的(另文发表)。

作者利用 SSR 方法研究表明山东省 Q 型(Q1 型)烟粉虱入侵种群与塞浦路斯 Q2 型种群的遗传多样性高于 B 型,且塞浦路斯 Q2 型种群多样性低于 Q1 型(另文发表)。为了进一步验证上述结果,本研究利用 AFLP 技术对上述山东省的 Q1 型种群、塞浦路斯 Q2 型以及 B 型的遗传多样性进行了分析。扩增片段长度多态性(AFLP)技术具有多态性产率高、分辨率高、可靠性好等优点^[14,15]。本研究对于揭示不同烟粉虱生物型的遗传学特性及其影响因素具有重要意义。同时,通过 AFLP 与 SSR 所得遗传多样性结果的比较,分析了 2 种分子标记的不同优势。

1 材料与方法

1.1 烟粉虱样品

试验用 Q 型烟粉虱样品分别来自山东省寿光、德州、济南和塞浦路斯,山东种群采取 5 点取样法采集烟粉虱成虫,塞浦路斯种群是英国洛桑农业试验站的 Ian Denholm 博士提供。利用 mtCOI 分子标记鉴定生物型,寿光、德州的 4 个种群为 Q1 型,塞浦路斯种群为 Q2 型,济南种群为 B 型,具体信息见表 1。样品均用 95% 无水乙醇 -20℃ 保存。每个种群随机取 5 头烟粉虱进行遗传多样性分析。

表 1 烟粉虱采集时间、地点及生物型

种群编号	地点	寄主	时间	生物型
SGQ	寿光	茄子	2008	Q1
SGM	寿光	棉花	2008	Q1
DZQ	德州	茄子	2008	Q1
DZM	德州	棉花	2008	Q1
JNB	济南	棉花	2005	B
CYP	塞浦路斯	棉花	2006	Q2

1.2 DNA 提取

单头烟粉虱 DNA 提取参照褚栋等^[16]和安瑞生等^[17]的方法。取单头烟粉虱置于 0.5 mL 离心管中,加入 20 μL 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 25 mmol/L NaCl; 25 mmol/L EDTA; 1% SDS),用封口枪头捣碎,加 40 μL 裂解液冲洗枪头,混匀;55℃ 过夜;取出后加 60 μL 3 mol/L 醋酸钾,混匀,冰上放置 2 h;12 000 r/m 离心 10 min,将上清液转移到一个新的 0.5 mL 离心管中,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,放于 -20℃ 2 h 以上;12 000 r/m 离心 15 min,去掉上清液,沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次,室温干燥,最后加入 15 μL ddH₂O 溶解 DNA。用微型紫外分析仪测定 DNA 浓度及纯度。

1.3 AFLP 试验过程

1.3.1 酶切连接 在 0.5 mL 离心管中加入模板 DNA 7 μL,10 × Reaction buffer 2.5 μL, *Eco*RI 接头(5 pmol/L)和 *Mse*I 接头(50 pmol/L)各 1 μL, *Eco*RI 4U, *Mse*I 4U,10mmol/L ATP 2.5 μL, T4 Ligase 3U,补充 ddH₂O 至 25 μL。混匀后离心 30 s,37℃ 温浴 5 h,4℃ 过夜。

1.3.2 预扩增 反应体系为 25 μL,取酶切连接产物 2 μL,加入 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTP 1 μL, *Eco*RI 引物 E01 0.5 μL, *Mse*I 引物 M02 0.5 μL, *Taq* 酶 1U。反应程序,94℃ 2 min,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 80 s,循环 30 次;72℃ 5 min。

1.3.3 选择性扩增 取部分预扩增产物用 ddH₂O 稀释 20 倍,从中取 2 μL 作为选择性扩增的模板,反应体系 25 μL,包括 *Eco*RI 引物(5 ng/μL)1 μL,荧光标记的 *Mse*I 引物(30 ng/μL)1 μL,其余试剂与预扩增反应相

同。按下列参数进行 PCR 反应:94 ℃ 30 s , 65 ℃ 30 s ,72 ℃ 80 s ,此后每循环退火温度降低 0.7 ℃ ,共 12 个循环;然后 94 ℃ 30 s ,55 ℃ 30 s ,72 ℃ 80 s ,23 个循环。反应产物用 ABI377 测序仪进行检测。

1.4 数据处理

用 GenScan3.1 软件和 Binthere 软件分析处理胶图,得到样品条带分布表,转换成 0、1 矩阵。利用 POPGEN32 软件分析遗传多样性参数。

2 结果与分析

2.1 AFLP 选择性扩增结果

经筛选共得到 5 对多态性较好的引物组合(表 2),利用这 5 对引物对 6 个试验种群 30 个烟粉虱样品进行 AFLP 分析共得到 389 条扩增带,平均每对引物组合扩增到 77.8 条。其中 E-AGG/M-CTA、E-ACT/M-CTC 扩增条带数较多,扩增条带数最多的是 E-AGG/M-CTA,为 122 条,扩增条带数最少的是 E-AGC/M-CAC,只有 32 条。

表 2 AFLP 试验使用的接头及引物序列

接头及扩增引物	序列
接头	
EcoR I 接头 1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
EcoRI 接头 2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
MseI 接头 1	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
MseI 接头 2	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
预扩增引物	
E01	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
M02	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
选择性扩增引物	
E-AAC/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
E-ACA/M-CAT	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
E-AGC/M-CAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
E-ACT/M-CTC	5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
E-AGG/M-CTA	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'

2.2 烟粉虱种群遗传多样性分析

利用 POPGEN32 软件对 AFLP 数据进行分析得到各种群的遗传多样性指数,见表 3。从表 3 可见 6 个烟粉虱种群遗传多样性差异较大,多态性位点百分率 P 最低的是济南棉花 B 型种群,为 38.56,最高的是塞浦路斯 Q2 型种群,为 57.58; $Nei's$ 基因多样性指数 H 、Shannon's 信息指数 I 由高到低依次是:寿光茄子种群 > 寿光棉花种群 > 塞浦路斯棉花种群 > 德州棉花种群 > 德州茄子种群 > 济南棉花种群。从表 3 中可以看到 4 个 Q1 型种群各项遗传多样性指数均接近 Q2 型的塞浦路斯种群,而 Q 型(包括 Q1 型与 Q2 型)种群大于 B 型种群。Q1 型种群中,寿光 2 个种群多样性较高,德州 2 个种群较低,以德州茄子种群多样性最低。

用于 AFLP 试验的寿光和德州 Q1 型种群、塞浦路斯 Q2 型种群与 SSR 所得遗传多样性指数比较(表 4)表明:相对于利用 SSR 分析遗传多样性的结果,AFLP 方法得到的各项遗传多样性指数均低于 SSR 方法得到的数值。Q2 型遗传多样性利用 SSR 分析时低于 Q1 型($Nei's$ 基因多样性指数分别为 0.38 和 0.48),但 AFLP 分析却与 Q1 型相似($Nei's$ 基因多样性指数均为 0.18)。

3 讨论

本研究利用 AFLP 分析发现山东省的 4 个 Q1 型烟粉虱种群的遗传多样性接近于塞浦路斯 Q2 型烟粉虱,这与利用 SSR 分析结果(另文发表)稍有不同,利用 SSR 方法研究表明山东省 Q1 型烟粉虱入侵种群高于塞浦路斯 Q2 型种群。造成结果差异的原因可能来自多种因素。首先,AFLP 样品数量(5 头/种群)较 SSR 试验样品(15 头/种群)数量少。其次,可能是 SSR 较 AFLP 方法的信息含量高^[18,19]。但是 AFLP 的优点是不需要预先知道样品的遗传背景,而且一次 PCR 得到的多态性片段多,多态性检测效率高^[19],因此在没有 SSR 位点引物的时候,也是一个较好的选择。

表 3 利用 AFLP 方法分析的各种群遗传多样性指数

种群 编号	多态性位点 百分率(<i>P</i>)	观测等位基 因数(<i>N_a</i>)	有效等位基 因数(<i>N_e</i>)	Nei's 基因多样 性指数(<i>H</i>)	Shannon's 信息 指数(<i>I</i>)
SGQ	54.2	1.542	1.319	0.188	0.283
SGM	56.0	1.560	1.304	0.184	0.280
DZQ	49.8	1.498	1.264	0.160	0.246
DZM	53.9	1.539	1.294	0.176	0.269
CYP-Q2	57.5	1.575	1.287	0.177	0.273
JN-B	38.5	1.385	1.201	0.120	0.189

表 4 AFLP 与 SSR 方法分析各生物型遗传多样性指数的比较

生物型	试验方法	观测等位基因数(<i>N_a</i>)	有效等位基因数(<i>N_e</i>)	Nei's 基因多样性指数(<i>H</i>)
Q1	AFLP	1.55	1.30	0.18
	SSR	3.67	2.32	0.48
Q2	AFLP	1.58	1.29	0.18
	SSR	2.67	2.04	0.38

利用 AFLP 对烟粉虱种群进行遗传多样性分析,结果显示 Q 型种群遗传多样性均较高(平均 $I=0.270$),而 B 型种群多样性相对较低($I=0.189$)。这与前人利用 RAPD、ISSR 分子标记研究结果一致^[12,13]。较高的遗传多样性水平可能为 Q 型烟粉虱对多种农药产生抗性提供了遗传学基础,这也可能是在我国部分地区 Q 型替代 B 型成为优势生物型的原因之一。

参 考 文 献

1 Jones D. R. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 2003 **109**: 195 ~ 219.

2 Perring T. M. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection* 2001 **20**: 725 ~ 737.

3 De Barro P. J. ,Liu S. S. ,Boykin L. M. Species status of *Bemisia tabaci*. *Annu. Rev. Entomol.* ,2010 **55** ,In press.

4 罗晨,姚远,王戎疆,等.利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. *昆虫学报* 2002 **45**(6): 759 ~ 763.

5 Wu X. X. ,Hu D. X. ,Li Z. X. ,et al. Using RAPD-PCR to distinguish biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China. *Entomologia Sinica* ,2002 **9** (3): 1 ~ 8.

6 Qiu B. L. ,Ren S. X. ,Wen S. Y. ,et al. Biotype identification of the populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China using RAPD-PCR. *Acta Entomologica Sinica* 2003 **46**(5): 605 ~ 608.

7 Chu D. ,Zhang Y. J. ,Brown J. K. ,et al. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) from the Mediterranean region into China on ornamental crops. *Fla. Entomol.* 2006 **89**: 168 ~ 174.

8 徐婧,王文丽,刘树生. Q 型烟粉虱在浙江局部地区大量发生危害. *植物保护* 2006 **32**: 121.

9 Chu D. ,Jiang T. ,Liu G. X. ,et al. Biotype status and distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Shandong Province of China based on mitochondrial DNA markers. *Environ. Entomol.* 2007 **36**(5): 1 290 ~ 1 295.

10 Hughes A. R. ,Inouye B. D. ,Johnson M. T. J. ,et al. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* , 2008 **11**: 609 ~ 623.

11 Chu D. ,Wan F. H. ,Tao Y. L. ,et al. Genetic differentiation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q based on mitochondrial DNA markers. *Insect Science* 2008 **15**: 115 ~ 123.

12 褚栋,陈国发,徐宝云,等.烟粉虱 B 型和 Q 型群体遗传结构的 RAPD 分析. *昆虫学报* 2007 **50**(3): 264 ~ 270.

13 Chu D. ,Wan F. H. ,Xu B. Y. ,et al. Comparative analysis of population genetic structure in *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes B and Q based on ISSR marker. *Agricultural Sciences in China*. 2008 **7**(11): 101 ~ 105.

14 张民照,康乐. AFLP 标记的特点及其在昆虫学研究中的应用. *昆虫学报* 2002 **45**(4): 538 ~ 543.

15 张书芬,傅廷栋,马朝芝,等. 3 种分子标记分析油菜品种间的多态性效率比较. *中国油料作物学报* ,2005 **27**(2): 19 ~ 23.

16 褚栋,张友军,丛斌,等. 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* 2005 **38** (1): 76 ~ 85.

17 安瑞生,谭声江,陈晓峰. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进. *昆虫知识* 2002 **49**(4): 311 ~ 312.

18 房守敏,余泉友,李斌,等. 家蚕 RAPD、AFLP 和 SSR 标记的研究及比较分析. *中国农业科学* 2007 **40**(12): 2 926 ~ 2 930.

19 袁力行,傅骏骅,Warburton M. ,等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究. *遗传学报* 2000 **27**(8): 725 ~ 733.