

# 烟蚜茧蜂基因组中微卫星分布特点及分子标记开发

李冰艳<sup>1</sup> 冯增贝<sup>1</sup> 张玉洁<sup>2</sup> 杨海林<sup>3</sup> 李虎<sup>1</sup> 彩万志<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学植物保护学院昆虫学系, 北京 100193; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 3. 云南省烟草公司玉溪市分公司, 玉溪 653100)

**摘要:** 为明确寄生性天敌烟蚜茧蜂 *Aphidius gifuensis* 基因组中的微卫星分布特点并开发其分子标记, 基于烟蚜茧蜂基因组草图, 利用生物信息学方法分析其微卫星的分布特点并开发微卫星位点, 采用 PCR 技术对获得的位点进行验证, 获得高分辨率的分子标记位点。结果表明, 烟蚜茧蜂基因组中共有 360 199 个微卫星, 平均分布密度为 1 787.93 个/Mb, 单碱基微卫星数量最多, 占微卫星总数的 81.46%, 其中片段短于 20 bp 的微卫星居多, 而数量最多的是单碱基(A)<sub>n</sub>, 其次是二碱基的(AT)<sub>n</sub> 和(AC)<sub>n</sub>, 以及三碱基的(AAT)<sub>n</sub> 和(ATC)<sub>n</sub>。选取设计的 45 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 其中有 21 对引物能稳定扩增出清晰的条带。基于烟蚜茧蜂山东泰安种群 24 个个体的遗传多样性检测结果显示, 筛选出的 21 个微卫星位点的平均观测杂合度、期望杂合度和多态性信息含量分别为 0.48、0.57 和 0.50, 其中位点 S6 的多态性最低, 多态性信息含量为 0.04, 另有 4 个位点 S12、S20、S29 和 S35 显著偏离哈迪-温伯格平衡。结合 PCR 验证结果和遗传多样性分析结果筛选和开发出 16 个烟蚜茧蜂的有效微卫星位点, 可作为有效的分子标记用于烟蚜茧蜂种群遗传学研究。

**关键词:** 烟蚜茧蜂; 微卫星; 分布特点; 多态性

## Characterization of the distribution of microsatellites in the genome of the parasitoid *Aphidius gifuensis* and development of molecular markers

Li Bingyan<sup>1</sup> Feng Zengbei<sup>1</sup> Zhang Yujie<sup>2</sup> Yang Hailin<sup>3</sup> Li Hu<sup>1</sup> Cai Wanzhi<sup>1\*</sup>

(1. Department of Entomology, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China;  
2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing  
100097, China; 3. Yuxi Branch of Yunnan Tobacco Company, Yuxi 653100, Yunnan Province, China)

**Abstract:** To explore the characteristics of microsatellites (also known as simple sequence repeats, SSRs) and develop molecular loci in the genome of endoparasitoid *Aphidius gifuensis*, an important parasitoid enemy, this study utilized bioinformatic methods to analyze the distribution features and develop microsatellite loci based on the draft genome. Using polymerase chain reaction (PCR), developed microsatellite loci were verified and loci with high definition remained. The results showed that 360 199 microsatellites were identified, with an average density of 1 787.93 microsatellites per Mb. Mononucleotide microsatellites were the most among all different types, occupying 81.46%. Microsatellites with the length shorter than 20 bp accounted for the most abundant type. Among these microsatellites, (A)<sub>n</sub> was the most abundant type, followed by (AT)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub>, (AAT)<sub>n</sub> and (ATC)<sub>n</sub>. Forty-five primers were designed, 21 of which could amplify definite bands in all samples. Twenty-four individuals from a population collected from Taian, in Shandong were chose to explore the polymorphism. The mean observed heterozygosity ( $H_o$ ), expected heterozygosity ( $H_e$ ) and polymorphic information content (PIC) were

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项(110201801023[LS-02])

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: caiwz@cau.edu.cn

收稿日期: 2020-06-29

0.48, 0.57 and 0.50, respectively. The PIC value of S6 was smaller (0.04), and S12, S20, S29, S35 were significantly deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium. In this study, 16 microsatellite loci for *A. gifuensis* were developed, providing the potential molecular markers for further population genetic studies of this species.

**Key words:** *Aphidius gifuensis*; microsatellites; distribution characteristics; polymorphism

烟蚜茧蜂 *Aphidius gifuensis* 属膜翅目茧蜂科蚜茧蜂亚科, 是重要的内寄生性天敌昆虫, 可寄生桃蚜 *Myzus persicae*、萝卜蚜 *Lipaphis erysimi*、麦长管蚜 *Sitobion avenae*、棉蚜 *Aphis gossypii* 和麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 等蚜虫(毕章宝和季正端, 1993; Sun et al., 2017)。烟蚜茧蜂作为桃蚜(亦称烟蚜)的一种优势寄生蜂(赵万源等, 1980; 陈家骅等, 1991; 翟颖妍等, 2017), 已被广泛应用于烟蚜的田间生物防治, 在田间人工释放后的自然寄生率可达 20%~60%(谢应强等, 2020), 在一定程度上减少了化学农药的使用量, 对生态环境的保护起到了积极作用。目前, 在我国主要烟草种植区如云南、四川、湖南、吉林和黑龙江等省均实现了烟蚜茧蜂的规模化扩繁及推广应用。但随着室内扩繁代数的增加, 烟蚜茧蜂种群逐渐开始衰退, 具体表现为体型变小、寿命缩短和寄生能力下降等(谢应强等, 2020), 种群的衰退可能与其遗传多样性的丧失紧密相关。目前, 国内在烟蚜茧蜂生物学、生态学特征及释放利用等方面开展了一系列研究, 但是有关其种群遗传多样性现状和种群遗传结构特征等研究鲜有报道。而选择适合的多态性分子标记, 可以更好地探究种群遗传多样性、追溯物种起源等(王永模和沈佐锐, 2006; 孙荆涛等, 2012; 段辛乐等, 2015)。

微卫星分子标记又称为简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)或短串联重复序列(short tandem repeat, STR), 是由1~6个核苷酸串联重复而形成的核苷酸序列(Edwards et al., 1991), 其侧翼序列相对保守, 广泛存在于真核生物基因组中, 在基因调控与表达以及蛋白质功能等方面发挥着重要作用(Tautz, 1989)。由于微卫星具有高度保守、共显性遗传、多态性高、易于检测、重复性高、对DNA模板质量要求低等优点(Selkoe & Toonen, 2006; 何琳和王群, 2010; 孙荆涛等, 2012), 成为发展较快的一类分子标记, 被广泛应用于昆虫的种群遗传学(李琪, 2006; 房冰等, 2017)、遗传图谱构建(张正义等, 2018)、群体演化(Cao et al., 2016a)和遗传育种(郭琪等, 2015; 冯晓婷等, 2020)等。二代测序技术的快速发展, 提高了昆虫基因组序列信息的获取效率, 直

接利用基因组序列进行搜索, 可以快速获得更多有效的微卫星位点, 简化了试验流程(宁馨等, 2020)。

目前, NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中有1 057种昆虫共28 124个微卫星位点被公布, 如埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、中华按蚊 *Anopheles sinensis*、家蚕 *Bombyx mori*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和黄尾熊蜂 *Bombus terrestris* 等。然而尚未见关于烟蚜茧蜂微卫星分子标记的报道。本研究基于烟蚜茧蜂基因组草图, 对其基因组中微卫星位点的分布特征进行分析, 并开发一套有效的微卫星位点标记, 以为烟蚜茧蜂的种群遗传学等研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

数据来源: 烟蚜茧蜂基因组草图由本研究团队完成测序和组装, 基因组大小为 156.9 Mb, contig N50 为 3.93 Mb, 将作为参考基因组用于探究烟蚜茧蜂基因组中微卫星特征及微卫星分子标记的开发。

供试虫源: 2018年从我国黑龙江省牡丹江市、山东省泰安市、浙江省嘉兴市和绍兴市、广东省梅州市、贵州省毕节市和云南省红河市7个市收集到烟蚜茧蜂成虫样本共7份, 按采集地划分种群并分别命名为 HLMD、SDTA、ZJJX、ZJSX、GDMZ、GZBJ 和 YNHE, 每个种群收集样本量达50头, 置于无水乙醇中在-80℃冻存备用。通过前期形态学鉴定从各种群中选取二倍体的雌性个体用于微卫星位点的验证。

试剂和仪器: 天根血液/细胞/组织/基因组DNA提取试剂盒(DP304), 北京天根生化科技有限公司; EmeraldAmp Max PCR Master Mix, 日本 TaKaRa 公司; 其余试剂均为国产分析纯。TissueLyser-32 组织研磨仪, 上海净信实业发展有限公司; Centrifuge 5424 台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; S1000 Thermal Cycler PCR 扩增仪、PowerPac 琼脂糖凝胶电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; C150 凝胶成像系统, 美国 Azure Biosystems 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 烟蚜茧蜂基因组中微卫星特征及位点鉴定

利用 MSDB (microsatellite search and building

database) 2.4.3 对烟蚜茧蜂基因组中的微卫星进行搜索和统计,包括微卫星组成类型及重复次数、序列长度、在基因组中分布的频率及密度。其中,参数设置为2个微卫星间距最小为200 bp,1~6个碱基的重复次数分别设为10、5、5、5、5、5。此外,以10 bp为单元统计不同长度下烟蚜茧蜂微卫星的数量。采用MSDB 2.4.3在烟蚜茧蜂基因组的2条互补链上进行搜索,其微卫星序列也是成对反向互补的,根据反向互补原则可将重复单元进行合并归类再统计,如单碱基的A和T归为一类,G和C归为一类。同时,根据MSDB 2.4.3检索结果比较烟蚜茧蜂不同长度微卫星的数量,以10 bp为单元进行统计。

### 1.2.2 微卫星引物的设计及筛选

使用QDD 3软件(Meglécz et al., 2010)搜索烟蚜茧蜂基因组中的微卫星位点并进行引物设计。引物设计的标准包括:(1)目标微卫星位点以3个或4个碱基为重复单元;(2)重复次数在7次以上;(3)引物距离目标片段应该在10 bp以上,引物长度在18~24 bp之间,最好是20 bp,而且上下游引物长度差异不能超过4 bp;(4)退火温度在56~64℃之间,最佳退火温度为59℃;(5)产物大小在100~400 bp之间。本研究所有微卫星引物均由生工生物工程(上海)有限公司进行合成。

从供试7个烟蚜茧蜂地理种群中分别取1头雌成虫置于离心管中,充分研磨后,利用天根血液/细胞/组织/基因组DNA提取试剂盒参照说明书提取基因组DNA,于-20℃保存备用。利用设计合成的上下游引物对烟蚜茧蜂基因组DNA进行PCR扩增。10 μL扩增体系:PCR Master Mix 5.0 μL、上下游引物各0.25 μL、DNA模板0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O补足10 μL。扩增条件:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,56℃退火45 s,72℃延伸45 s,35个循环;最终72℃再延伸7 min。扩增产物利用1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,筛选出能稳定扩增并得到清晰条带的引物用于后续试验。

### 1.2.3 微卫星位点的多态性检测

利用1.2.2筛选出的微卫星引物对山东泰安种群的24头二倍体雌成虫个体进行群体多态性检测。采用1.2.2方法分别提取24头雌成虫个体的基因组DNA,于-20℃保存备用。通常微卫星引物需添加荧光标记FAM、HEX或ROX,即将荧光染料填加至引物5'端,合成荧光引物。为节约成本,通常引入1条通用引物Tail-C(Schuelke, 2000; Blakett et al., 2012),在Tail-C的5'端加入荧光染料标记,获得带荧光标

记的通用引物。PCR扩增时,微卫星正向引物5'端与Tail-C相连,从而引入荧光标记,反向引物不做修饰。通用引物Tail-C序列:5'-CAGGACCAAGGCTA-CCGTG-3'。10 μL PCR扩增体系:2×Taq PCR MasterMix 5.0 μL、上游引物0.08 μL、下游引物0.16 μL、带荧光标记通用引物0.32 μL、DNA模板0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O补充至10 μL。扩增条件:94℃预变性2 min;94℃变性30 s,56℃退火45 s,72℃延伸45 s,35个循环;最终72℃再延伸7 min。

为节约时间和成本,根据扩增片段大小和荧光标记颜色进行混合上样检测,提高检测效率,实现高通量分型。分别取3种颜色荧光标记FAM、HEX和ROX的PCR产物2 μL混合,混合样品委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行毛细管电泳荧光检测,获得微卫星位点的条带信息,并利用GeneMapper 3.2软件确定等位基因片段大小及基因型信息。

### 1.2.4 微卫星位点的遗传多样性分析

基于1.2.3获得的微卫星位点等位基因信息,利用FreeNA软件(Chapuis & Estoup, 2007)计算位点的无效等位基因频率(null allele frequency,  $N_a$ ),应用GenAIEx 6.502软件(Smouse et al., 2015)计算微卫星位点的平均等位基因数(average number of allele,  $N$ )、期望杂合度(expected heterozygosity,  $H_e$ )、观测杂合度(observed heterozygosity,  $H_o$ )、哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检验 $P$ 值和多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)等遗传多样性参数,分析烟蚜茧蜂基因组中的有效微卫星位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟蚜茧蜂基因组中微卫星位点的分布特征

烟蚜茧蜂基因组中共搜索到360 199个微卫星,平均分布密度为1 787.93个/Mb;按碱基类型构成不同进行分类,共包含2种单碱基、4种二碱基、10种三碱基、24种四碱基、17种五碱基及29种六碱基微卫星,其数量及分布密度由高到低为单碱基>二碱基>三碱基>四碱基>五碱基>六碱基(表1)。单碱基微卫星的数量最多,为293 428个,占微卫星总数的81.46%,平均分布密度为1 869.76个/Mb;六碱基微卫星的数量最少,仅107个,占微卫星总数的0.03%。而单碱基中(A)<sub>n</sub>最多,为292 454个;除单碱基重复外,二碱基中(AT)<sub>n</sub>(30 611个)和(AC)<sub>n</sub>(5 306个)、三碱基中(AAT)<sub>n</sub>(12 711个)和(ATC)<sub>n</sub>(5 256个)较多(图1)。

表1 烟蚜茧蜂基因组微卫星统计

Table 1 Statistics of microsatellites in *Aphidius gifuensis* genome

碱基重复单元 Nucleotide	微卫星数量 Total count	序列长度 Length/bp	平均长度 Average length/bp	分布密度 Density/(个/Mb)	占比 Ratio/%
单碱基 Mono-nucleotide	293 428	3 633 495	12.38	1 869.76	81.46
二碱基 Di-nucleotide	39 600	457 078	11.54	252.34	10.99
三碱基 Tri-nucleotide	24 276	527 862	21.74	154.69	6.74
四碱基 Tetra-nucleotide	2 635	71 028	26.96	16.79	0.73
五碱基 Penta-nucleotide	153	6 580	43.01	0.97	0.04
六碱基 Hexa-nucleotide	107	5 568	52.04	0.68	0.03

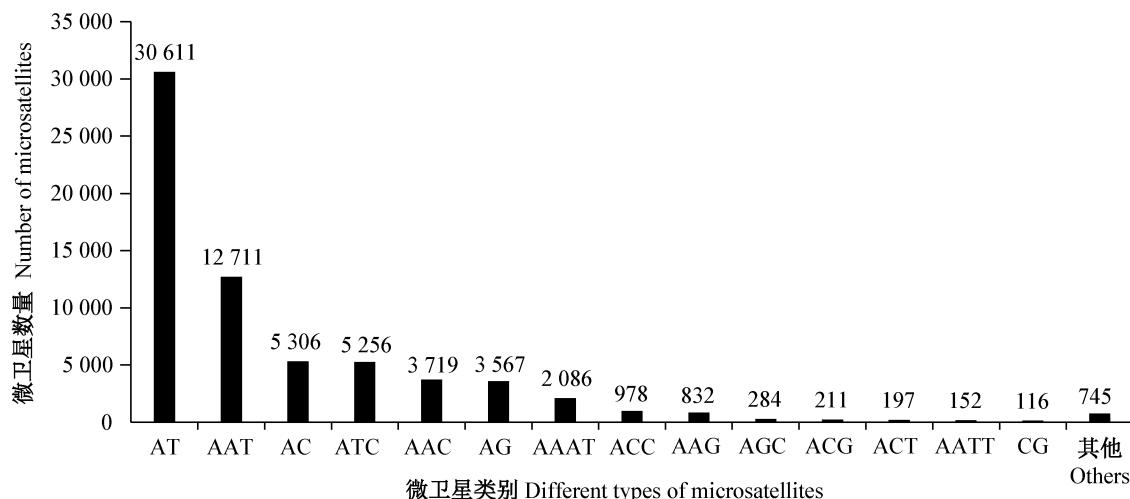


图1 烟蚜茧蜂基因组中不同类型微卫星的数量分布

Fig. 1 The quantitative distribution of different types of microsatellites in *Aphidius gifuensis* genome

以10 bp为单元统计不同长度的微卫星数目, 长度在20 bp以下的微卫星数量最多, 共347 309个, 占总微卫星数量的96.42%, 以单碱基、二碱基和三碱基微卫星为主; 20~30 bp长度的微卫星有10 660个, 占微卫星总数的2.96%; 其他长度的微卫星数量较少(图2)。

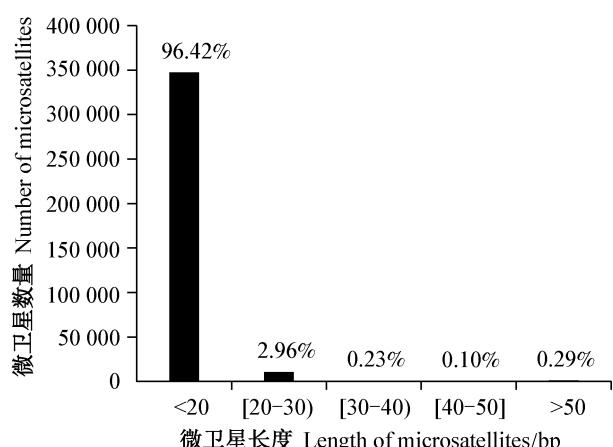


图2 烟蚜茧蜂基因组中不同长度微卫星的数量分布

Fig. 2 The quantitative distribution of different lengths of microsatellites in *Aphidius gifuensis* genome

## 2.2 微卫星引物设计及位点筛选

根据引物筛选标准, 初步获得906个备选微卫星位点及其引物序列, 其中包含20个四碱基重复位点(2.2%)和886个三碱基重复位点(97.8%)。从中随机选择45对引物进行PCR扩增, 依据能够稳定扩增且扩增产物条带清晰的筛选标准, 最终保留了21对微卫星引物, 扩增片段长度在100~307 bp之间(表2)。

## 2.3 微卫星位点的遗传多样性

对烟蚜茧蜂种群的21个微卫星位点进行基因型分析, 共检测到96个等位基因, 每个位点的等位基因数变化范围为2~8个, 平均每个位点的等位基因数为4.57个, 且均具有多态性(表3)。各位点的多态性信息含量在0.04~0.75之间, 平均值为0.50; 其中位点S6的多态性信息含量最低, 为0.04; 各位点的期望杂合度和观测杂合度的变化范围分别为0.05~0.81和0.05~0.89, 平均分别为0.57和0.48(表3)。微卫星位点的无效等位基因频率变化范围在0.00~0.23之间; 其中, S12、S20、S29、S35这4个微卫星位点显著偏离哈迪-温伯格平衡。

表2 烟蚜茧蜂21个微卫星位点的引物信息

Table 2 Primer information of 21 microsatellite loci developed for *Aphidius gifuensis*

位点 Locus	引物序列(5'-3') Sequence of primer (5'-3')	重复单元 Repeat motif	片段长度 Size/bp
S1	F: AGGCATGAATAACAGTGAATCAACA R: TGTCTGAGCTTCATCATCCAA	(TCA) <sub>7</sub>	100
S3	F: ACGTGATAATTCTTGAGCCGG R: TACCACGCCACCTGGATTAG	(TGA) <sub>7</sub>	114
S5	F: GCCAGGTCATCATCGTCGTA R: ACACGACCGGTTGTTCATCG	(TGT) <sub>9</sub>	200
S6	F: CTTACTGGAAGTGGCCTCGA R: TCTGATTGTCATGCTGCCG	(AAC) <sub>7</sub>	204
S8	F: CTCTCAGATGGTGGTGTGA R: GGCAGACGAACCTCCCAGAAT	(ATT) <sub>7</sub>	272
S10	F: GTATATCCGGCGGGCGTT R: GAAGATCGATCCGGCATTGCG	(AGT) <sub>10</sub>	131
S12	F: GCACTGATATTCTTGCAATGCC R: TAACCTGCACCCACATGGAT	(CAT) <sub>9</sub>	136
S13	F: ACCTGAATGAGCACCACT R: GGACCACCAATGAATAATATGGCA	(TAT) <sub>7</sub>	147
S15	F: CATCTTGTGTTGGAACAGGC R: TCCGTTGTCGTCATGGTAA	(GTG) <sub>8</sub>	175
S18	F: TCTGCTTGACTATCAGCACCA R: TGGGTACAAGAGTAACCGTTCA	(CAT) <sub>7</sub>	193
S20	F: AAAGATGGAGCCAAGGCCAGA R: ACTCCGGGTGGATAATCGTC	(CGA) <sub>7</sub>	254
S29	F: ACTTGGGACAGCCAAGTCTT R: CCAGGGTTGGCTTGATAATCAA	(ATT) <sub>7</sub>	150
S30	F: TTGACGAGTTCTTCAGTTGGC R: GTTGCTATCAAGATGGTTGGGT	(TGA) <sub>7</sub>	190
S35	F: ACCAAGATCTCCAGACGGA R: TTGCTGGAGGTGAGTTGTCC	(GAT) <sub>7</sub>	143
S36	F: ACGCTTGAGTGATAAAATCTGGG R: GGCTGGACCTGTTCACTTT	(CAA) <sub>7</sub>	144
S38	F: GGCATCATCAACATCATCACCA R: GCTGGAAATATAACACCAACGA	(CAA) <sub>8</sub>	178
S39	F: CGACAGACGTGACAACGTAA R: ACACCTCTGAAGATGGTGTGTT	(AAC) <sub>7</sub>	184
S40	F: AGTGTGATCGTCATTGTGGG R: ACGTGGTTGATAATCAAGTGCT	(AAT) <sub>8</sub>	186
S41	F: AAACATCTGTTCTGGCGACA R: AATTAAAGTGAAGCAAAGGGTGGT	(ATC) <sub>8</sub>	190
S42	F: TCGTGTGATTGAGTGGATTAGA R: TCCTCTGTGCTGTCTGTGG	(AAT) <sub>7</sub>	261
S44	F: TCATCGTTTACCATCATCAGGT R: TGCACTCATTACCAAGTGA	(AAC) <sub>7</sub>	307

### 3 讨论

微卫星作为目前应用最广泛的第二代分子标记,具有高度保守、共显性遗传和多态性高等优点(何琳和王群,2010)。传统的微卫星位点及引物开发方法,如文库法、磁珠富集法和省略筛选法等,成本高,费时费力;而基于PCR技术的微卫星分离方法则局限于小规模位点的开发(何琳和王群,2010)。随着高

通量测序技术的不断发展,开发微卫星标记的新方法不断涌现(Gymrek et al., 2012; Fungtammasan et al., 2015; Li et al., 2017),其中基于基因组信息开发微卫星位点的方法得到了广泛应用(杨艾琳等,2019),实现了高效、便捷地开发大量微卫星位点,进行物种群遗传特征、物种溯源和亲缘关系鉴定等研究(王永模和沈佐锐,2006; 孙荆涛等,2012)。本研究基于烟蚜茧蜂基因组全序列探究其微卫星特

征,并进行微卫星位点的开发;结合微卫星位点的等位基因数、多态性信息含量、观测杂合度、期望杂合

度、哈迪-温伯格平衡及无效等位基因频率等参数探究位点多态性,筛选有效的微卫星位点。

表3 烟蚜茧蜂21个微卫星位点的遗传多样性信息

Table 3 Genetic diversity among 21 microsatellite loci developed for *Aphidius gifuensis*

位点 Locus	等位基因数 Allele number	期望杂合度 Expected heterozygosity	观测杂合度 Observed heterozygosity	哈迪-温伯格平衡检验P值 <i>P</i> -value of Hardy-Weinberg equilibrium	无效等位基因频率 Null allele frequency	多态性信息含量 Polymorphism information content
S1	4	0.65	0.62	0.15	0.04	0.57
S3	4	0.59	0.53	0.17	0.02	0.52
S5	6	0.76	0.50	0.06	0.14	0.69
S6	2	0.05	0.05	0.91	0.00	0.04
S8	4	0.56	0.45	0.80	0.05	0.44
S10	4	0.35	0.39	0.98	0.00	0.32
S12	7	0.79	0.89	0.01*	0.00	0.74
S13	2	0.30	0.27	0.67	0.03	0.25
S15	5	0.75	0.78	0.15	0.00	0.68
S18	5	0.62	0.64	0.89	0.00	0.55
S20	5	0.66	0.37	0.00*	0.17	0.59
S29	5	0.63	0.26	0.00*	0.23	0.55
S30	6	0.71	0.81	0.87	0.00	0.65
S35	4	0.35	0.11	0.00*	0.19	0.32
S36	3	0.52	0.37	0.37	0.09	0.40
S38	7	0.81	0.67	0.69	0.06	0.75
S39	8	0.78	0.67	0.94	0.06	0.73
S40	5	0.70	0.67	0.78	0.00	0.62
S41	4	0.45	0.33	0.13	0.04	0.39
S42	3	0.50	0.42	0.79	0.04	0.39
S44	3	0.42	0.35	0.79	0.05	0.34
平均数	4.57	0.57	0.48	0.49	0.06	0.50
Average						

\*: 显著偏离哈迪-温伯格平衡( $P<0.05$ )。\*: Significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P<0.05$ ).

本研究结果显示,烟蚜茧蜂的基因组中微卫星特征表现为单碱基的微卫星数量最多,占微卫星总数的81.46%。不同昆虫的不同类别微卫星组成均有差异,如西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Cao et al., 2016b)、中华按蚊(王小婷等,2016)、家蚕(甘丽萍等,2018)等昆虫基因组中的单碱基微卫星最多;意大利蜜蜂基因组中以二碱基微卫星最为丰富(魏朝明等,2007);德国小蠊 *Blattella germanica* 基因组中以三碱基微卫星为主(王晨等,2015)。不同昆虫基因组中微卫星的不同碱基类型多以单碱基、二碱基或三碱基为主(王小婷等,2016; Ding et al., 2017)。而且,烟蚜茧蜂微卫星的长度以20 bp以下为主。微卫星的长度通常与其自身功能相关,较长的微卫星(>20 bp)变异速率快、位点多态性高;短于20 bp的微卫星通常比较稳定,更适合作为分子标记用于遗传学研究(Haar & Schlötterer, 2000)。多态性信息含量是种群遗传研究中衡量微卫星位点多态性最常用的指标之一。当  $PIC>0.50$  时,该位点为高

多态性位点;  $0.25<PIC\leq 0.5$  时,为中多态性位点; $PIC\leq 0.25$  时,为低多态性位点(Botstein et al., 1980)。本研究开发获得的21个微卫星位点中,有12个位点的多态性信息含量大于0.5,属于高多态位点;8个为中多态性位点;S6的多态性信息含量小于0.25,属于低多态性位点。中高多态性位点可作为有效的分子标记。

无效等位基因的产生可能是由于引物侧翼序列变异或大片段等位基因的缺失等原因所致,位点目的条带的丢失导致种群纯合子的比例升高,使得杂合度降低,位点偏离哈迪-温伯格平衡,从而影响种群遗传多样性的分析结果(文亚峰等,2013)。本研究开发的微卫星位点中,S29的无效等位基因频率为0.23,可能是导致该位点观测杂合度偏低且显著偏离哈迪-温伯格平衡的原因之一。此外,位点S12、S20、S35也显著偏离哈迪-温伯格平衡,可能是因为位点的杂合度较低,但由于分析所用种群单一,无法确定具体原因,需进一步增加种群进行分析。

本研究初步筛选的21个微卫星位点中,除去5个低多态性或无效微卫星位点,最终共获得16个有效的微卫星位点,可作为分子标记用于烟蚜茧蜂的种群遗传学研究。

### 参考文献 (References)

- Bi ZB, Ji ZD. 1993. Bionomics of *Aphidius gifuensis* Ashmead I: developmental stages and morphology of larval stage. Journal of Hebei Agricultural University, 16(2): 1–8 (in Chinese) [毕章宝, 季正端. 1993. 烟蚜茧蜂 *Aphidius gifuensis* Ashmead 生物学研究 I: 发育过程和幼期形态. 河北农业大学学报, 16(2): 1–8]
- Blacket MJ, Robin C, Good RT, Lee SF, Miller AD. 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments: an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. Molecular Ecology Resources, 12(3): 456–463
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. The American Journal of Human Genetics, 32 (3): 314–331
- Cao LJ, Li ZM, Wang ZH, Zhu L, Gong YJ, Chen M, Wei SJ. 2016b. Bulk development and stringent selection of microsatellite markers in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. Scientific Reports, 6: 26512
- Cao LJ, Wei SJ, Hoffmann AA, Wen JB, Chen M. 2016a. Rapid genetic structuring of populations of the invasive fall webworm in relation to spatial expansion and control campaigns. Diversity and Distributions, 22(12): 1276–1287
- Chapuis MP, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution, 24(3): 621–631
- Chen JH, Guan BB, Zhang YZ. 1991. The population dynamics of *Myzus persicae*. China Tobacco, (3): 18–20 (in Chinese) [陈家骅, 官宝斌, 张玉珍. 1991. 烟蚜的天敌种群消长初步研究. 中国烟草, (3): 18–20]
- Ding SM, Wang SP, He K, Jiang MX, Li F. 2017. Large-scale analysis reveals that the genome features of simple sequence repeats are generally conserved at the family level in insects. BMC Genomics, 18(1): 848
- Duan XL, Qian XF, Peng X, Zuo YY, Liu GM, Chen MH. 2015. Amplifying stability and genetic diversity of microsatellite loci in different *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) populations in China. Journal of Plant Protection, 42(3): 297–303 (in Chinese) [段辛乐, 乔宪凤, 彭雄, 左亚运, 刘高鸣, 陈茂华. 2015. 我国禾谷缢管蚜微卫星位点扩增稳定性及遗传多样性. 植物保护学报, 42 (3): 297–303]
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. The American Journal of Human Genetics, 49(4): 746–756
- Fang B, Duan XL, Zhang YL, Yang ZQ, Chen MH. 2017. Microsatellite development and genetic diversity analysis of apple buprestid *Agrilus mali* Matsumura. Journal of Plant Protection, 44(4): 559–566 (in Chinese) [房冰, 段辛乐, 张彦龙, 杨忠岐, 陈茂华. 2017. 苹果小吉丁虫微卫星开发及其种群遗传结构分析. 植物保护学报, 44(4): 559–566]
- Feng XT, Zhang GN, Xue XP, Wang XY, Zhou YF, Fang DA, Xu DP. 2020. Current germplasm situation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) candidate parent and parent from hatchery in the lower reaches of Changjiang River based on SSR markers. Journal of Fishery Sciences of China, 27(5): 589–597 (in Chinese) [冯晓婷, 张桂宁, 薛向平, 王邢燕, 周彦锋, 方弟安, 徐东坡. 2020. 基于 SSR 标记对长江下游原良种场鳙亲本和后备亲本种质资源现状分析. 中国水产科学, 27(5): 589–597]
- Fungtammasan A, Ananda G, Hile SE, Su MSW, Sun C, Harris R, Medvedev P, Eckert K, Makova KD. 2015. Accurate typing of short tandem repeats from genome-wide sequencing data and its applications. Genome Research, 25(5): 736–749
- Gan LP, Tan S, Qi WH, Shi RJ. 2018. Distribution regularities and bioinformatics analysis of microsatellite in the whole genomes of silkworm, *Bombyx mori*. Genomics and Applied Biology, 37 (10): 4278–4288 (in Chinese) [甘丽萍, 谭爽, 戚文华, 石汝杰. 2018. 家蚕全基因组微卫星分布规律及其生物信息学分析. 基因组学与应用生物学, 37(10): 4278–4288]
- Guo Q, Guo DL, Guo LL, Zhang L, Hou XG. 2015. Application of simple sequence repeat molecular markers in the study of tree peony. Chinese Bulletin of Botany, 50(5): 652–664 (in Chinese) [郭琪, 郭大龙, 郭丽丽, 张琳, 侯小改. 2015. SSR 分子标记在牡丹亲缘关系研究中的应用与研究进展. 植物学报, 50(5): 652–664]
- Gymrek M, Golan D, Rosset S, Erlich Y. 2012. lobSTR: a short tandem repeat profiler for personal genomes. Genome Research, 22(6): 1154–1162
- Haar B, Schlötterer C. 2000. Long microsatellite alleles in *Drosophila melanogaster* have a downward mutation bias and short persistence times, which cause their genome-wide under representation. Genetics, 155(3): 1213–1220
- He L, Wang Q. 2010. Review on the PCR-based SSR markers isolation methods. Genomics and Applied Biology, 29(4): 775–782 (in Chinese) [何琳, 王群. 2010. 基于 PCR 的 SSR 标记分离方法综述. 基因组学与应用生物学, 29(4): 775–782]
- Li L, Fang ZW, Zhou JF, Chen H, Hu ZF, Gao LF, Chen LH, Ren S, Ma HY, Lu L, et al. 2017. An accurate and efficient method for large-scale SSR genotyping and applications. Nucleic Acids Research, 45(10): e88
- Li Q. 2006. Development of microsatellite DNA markers and their applications in genetic studies in marine mollusks. Journal of Fishery Sciences of China, 13(3): 168–175 (in Chinese) [李琪. 2006. 海洋贝类微卫星 DNA 标记的开发及其在遗传学研究中的应用. 中国水产科学, 13(3): 168–175]
- Meglécz E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malusa T, Pech N, Martin JF. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. Bioinformatics, 26(3): 403–404
- Ning X, Jiang XL, Deng M, Xu GB. 2020. Development of microsat-

- lite primers of *Quercus championii* with RAD-seq data. Bulletin of Botanical Research, 40(4): 629–634 (in Chinese) [宁馨, 姜小龙, 邓敏, 徐刚标. 2020. 基于简化基因组数据开发岭南青冈微卫星引物. 植物研究, 40(4): 629–634]
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18(2): 233–234
- Selkoe KA, Toonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9(5): 615–629
- Smouse PE, Whitehead MR, Peakall R. 2015. An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation. Molecular Ecology Resources, 15(6): 1375–1384
- Sun HZ, Wang XD, Chen YG, Wang HT, Li SJ, Song YQ. 2017. Wheat and barley as banker plant in the mass production of *Aphidius gifuensis* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) parasitizing *Schizaphis graminum* Rondani (Homoptera: Aphididae). Journal of Plant Diseases and Protection, 124(3): 305–311
- Sun JT, Yang XM, Ge C, Hong XY. 2012. The application of microsatellite markers in insect molecular ecology. Journal of Nanjing Agricultural University, 35(5): 103–112 (in Chinese) [孙荆涛, 杨现明, 葛成, 洪晓月. 2012. 微卫星分子标记在昆虫分子生态学研究上的应用. 南京农业大学学报, 35(5): 103–112]
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 17(16): 6463–6471
- Wang C, Du LM, Li P, Yang MY, Li WJ, Shen YM, Zhang XY, Yue BS. 2015. Distribution patterns of microsatellites in the genome of the German cockroach (*Blattella germanica*). Acta Entomologica Sinica, 58(10): 1037–1045 (in Chinese) [王晨, 杜联明, 李鹏, 杨茗羽, 李午皎, 沈咏梅, 张修月, 岳碧松. 2015. 德国小蠊全基因组中微卫星分布规律. 昆虫学报, 58(10): 1037–1045]
- Wang XT, Zhang YJ, He X, Mei T, Chen B. 2016. Identification, characteristics and distribution of microsatellites in the whole genome of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). Acta Entomologica Sinica, 59(10): 1058–1068 (in Chinese) [王小婷, 张玉娟, 何秀, 梅婷, 陈斌. 2016. 中华按蚊全基因组微卫星的鉴定、特征及分布规律. 昆虫学报, 59(10): 1058–1068]
- Wang YM, Shen ZR. 2006. Microsatellite DNA and their application in insect population genetics. Biotechnology Bulletin, (S1): 221–224 (in Chinese) [王永模, 沈佐锐. 2006. 微卫星遗传标记及其在昆虫种群遗传学中的应用. 生物技术通报, (S1): 221–224]
- Wei CM, Kong GY, Lian ZM, Liu H, Fan YW, Zhang H. 2007. Abundance and distribution of microsatellites in the entire *Apis mellifera* genome. Chinese Bulletin of Entomology, 44(4): 501–504 (in Chinese) [魏朝明, 孔光耀, 廉振民, 刘慧, 范永文, 张慧. 2007. 蜜蜂全基因组中微卫星的丰度及其分布. 昆虫知识, 44(4): 501–504]
- Wen YF, Kentaro U, Han WJ, Saneyoshi U, Xie WD, Xu GB, Yoshihiko T. 2013. Null alleles in microsatellite marker. Biodiversity Science, 21(1): 117–126 (in Chinese) [文亚峰, Kentaro U, 韩文军, Saneyoshi U, 谢伟东, 徐刚标, Yoshihiko T. 2013. 微卫星标记中的无效等位基因. 生物多样性, 21(1): 117–126]
- Xie YQ, Zhang HZ, Li YY, Kong L, Xiang M, Yang HL, Zhang LM, Ai HM, Zhang LS. 2020. Population degradation rule of *Aphidius gifuensis* (Hymenoptera: Aphidiidae). Chinese Journal of Biological Control, 36(2): 163–168 (in Chinese) [谢应强, 张洪志, 李玉艳, 孔琳, 向梅, 杨红利, 张立猛, 艾洪木, 张礼生. 2020. 烟蚜茧蜂的种群退化规律. 中国生物防治学报, 36(2): 163–168]
- Yang AL, Xie JJ, Shen FJ, Zhang WP, Hou R, Zhang Z, Zhang L. 2019. Twenty-five microsatellite loci of *Ailurus fulgens* identified by genome survey. Sichuan Journal of Zoology, 38(1): 56–61 (in Chinese) [杨艾琳, 谢军金, 沈富军, 张文平, 侯蓉, 张志, 张亮. 2019. 通过二代测序技术开发25个小熊猫的微卫星位点. 四川动物, 38(1): 56–61]
- Zhai YY, Zhang JT, Zhang Q, An DR, Cheng JL. 2017. Research on range of parasitic aphids of *Aphidius gifuensis* Ashmead. Modern Agricultural Science and Technology, (17): 97–98 (in Chinese) [翟颖妍, 张家韬, 张强, 安德荣, 成巨龙. 2017. 烟蚜茧蜂寄生蚜虫种类范围研究. 现代农业科技, (17): 97–98]
- Zhang ZY, Xing XM, Hu PF, Liu SX, Dong YM, Ju GC. 2018. Microsatellite markers and their application in animal genetic relationship identification. Genomics and Applied Biology, 37(4): 1406–1412 (in Chinese) [张正义, 邢秀梅, 胡鹏飞, 刘松啸, 董依萌, 鞠贵春. 2018. 微卫星标记及其在动物亲缘关系鉴定中的应用. 基因组学与应用生物学, 37(4): 1406–1412]
- Zhao WY, Ding CP, Dong DZ, Wang YZ, Zhang WL. 1980. The bionomics of *Aphidius gifuensis* Ashmead and its utilization for the control of tobacco aphid *Myzus persicae* Sulzer. Zoological Research, 1(3): 405–415 (in Chinese) [赵万源, 丁垂平, 董大志, 王云珍, 张文莲. 1980. 烟蚜茧蜂生物学及其应用研究. 动物学研究, 1(3): 405–415]

(责任编辑:李美娟)