

桔小实蝇5个地理种群的SSR遗传多态性分析

姚廷山,胡军华,李鸿筠,冉春,刘浩强,雷慧德,肖田

(中国农业科学院柑桔研究所/国家柑桔工程技术研究中心,重庆400712)

摘要:桔小实蝇 *Bactrocera (Bactrocera) dorsalis* (Hendel) 是一种为害多种水果、瓜类、茄类蔬菜的检疫性害虫,食性杂、寄主范围广,直接威胁水果和蔬菜的安全生产。运用改进的CTAB法提取单头实蝇的基因组DNA,形态鉴定及特异性引物BD1/BD2 PCR鉴定桔小实蝇,用7对微卫星标记(SSR)引物对来自中国福建、海南、广东、云南和四川5省的桔小实蝇种群间的遗传关系进行初步分析,DPS聚类分析结果显示,福建桔小实蝇与其他几个地区的桔小实蝇的差异性较大,达到0.86,另外4省之间遗传距离较近。

关键词:微卫星标记;桔小实蝇;地理种群;种群遗传

中图分类号:S3

文献标志码:A

论文编号:2009-2121

Microsatellite Markers for Genetic Polymorphism in Five Geographic Population of the *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

Yao Tingshan, Hu Junhua, Li Hongjun, Ran Chun, Liu Haoqiang, Lei Huide, Xiao Tian

(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

National Engineering Research Center for Citrus, Chongqing 400712)

Abstract: The fruits flies *Bactrocera (Bactrocera) dorsalis* (Hendel) is one of the major economically important and quarantine insects in Asia. Genomic DNA of the sampled populations came from Fujian, Hainan, Guangdong, Yunnan and Sichuan, was extracted from thoracic tissue of individual adult flies by CTAB method and amplified with the polymerase chain reaction. By using microsatellite markers (SSR), the fingerprint of five geographic population was investigated. With good reproducibility and high polymorphic, seven microsatellite primers were utilized in this study to assess the genetic polymorphism of orient fruit fly primarily. The results indicated that genetic differentiation exists among the five populations.

Key words: microsatellite marker; *Bactrocera dorsalis* (Hendel); geographical population; genetic differentiation

0 引言

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 又名东方果实蝇,果蛆,黄苍蝇,属双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae),果实蝇属 *Bactrocera*, 是国际国内重要的检疫性害虫,可为害番石榴、芒果等46个科250多种果树、蔬菜和花卉,是东南亚和太平洋地区果树和蔬菜的致命害虫^[1]。主要分布于亚洲、南太平洋热带和暖热带地区及夏威夷群岛,中国主要分布在湖南、广东、广西、海

南、福建、四川、云南、贵州、台湾9个省区。

中国对桔小实蝇种群遗传结构的研究较少,2004年,Dai^[2]等开发6个桔小实蝇微卫星位点对台湾6个地方的桔小实蝇进行了分析。同年,施伟等^[3]对云南瑞丽、景洪、化念、元江、河口的桔小实蝇进行了遗传分化问题的初步研究。2006年,康芬芬等^[4]用6对微卫星引物对中国3省及邻国越南桔小实蝇种群间的遗传关系进行了初步分析。2007年,李伟丰等^[5]用9对微卫星

基金项目:农业部科研院所社会公益研究专项“柑桔危险性病虫害的监测和预报关键技术研究”(2005DIA4J053);公益性行业(农业)科研专项“柑桔模式化栽培与贮藏技术研究”(nyhyzx07-023)重庆市科技攻关计划项目“柑桔危险性病虫害高通量分子监测与预警技术研发”(CSTC,2007AA1024-4);国家科技支撑计划项目“长江柑桔橙汁加工关键技术与产业化开发”(2007BAD47B04)。

第一作者简介:姚廷山,男,1980年出生,江苏连云港人,助理研究员,硕士,主要从事植物保护的研究工作,通信地址:400712 重庆市北碚区 中国农业科学院柑桔研究所植保室, Tel: 023-68349005, E-mail: yts103xt@126.com。

收稿日期:2009-10-15, **修回日期:**2009-11-17。

引物对中国 9 省, 越南及泰国桔小实蝇进行了微卫星多态性分析。

该研究应用微卫星分子标记技术, 对桔小实蝇 5 个地理种群间的遗传多态性进行分析, 研究发现福建的桔小实蝇与其他 4 个省份的桔小实蝇遗传距离较远。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试桔小实蝇成虫样品分别来自广东、云南、福建、海南、四川 5 个省份, 所有样品经 95% 乙醇浸泡, 4℃ 保存。

1.2 形态及 PCR 鉴定

形态鉴定是对采自各省的实蝇样品在解剖镜下进行头部、胸部、腹部及产卵管进行观察, 并记录。PCR 鉴定选用桔小实蝇的特异性引物序列 BD1/BD2^[6], 5'-CGACGACTCCTCGTCAATACGTGGG-3' (BD1); 5'-CGTCACCGAACGATTTACCACGAAC-3' (BD2), 其预期的 PCR 扩增产物大小为 224 bp, 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.3 基因组 DNA 的提取

应用改良的 CTAB 法^[7-8]抽提实蝇的基因组 DNA: 在 65℃ 水浴之前加蛋白酶 K 至 0.2mg/mL, 用酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1 抽提 1 次, 然后再用氯仿: 异戊醇=24: 1 抽提 1 次, 70% 预冷乙醇洗 2 次, 再用预冷的无水乙醇洗 1 次^[5]。提取前将单头实蝇除去腹部, 用灭菌去离子水清洗 2 次, 晾干, -20℃ 冷冻备用。

1.4 SSR 扩增体系的建立及检测

1.4.1 引物筛选 通过搜索 NCBI 数据库以及参阅相关文献^[9-10], 通过试验筛选, 选取 7 对重复性及稳定性皆较好的 SSR 引物进行此研究, 引物见表 1。

1.4.2 PCR 扩增 扩增体系为 25 μL, 其中 ddH₂O 19.80 μL, 10×buffer 2.5 μL, dNTPs (10 mM) 0.5 μL, Mg²⁺ (25

表 1 引物序列

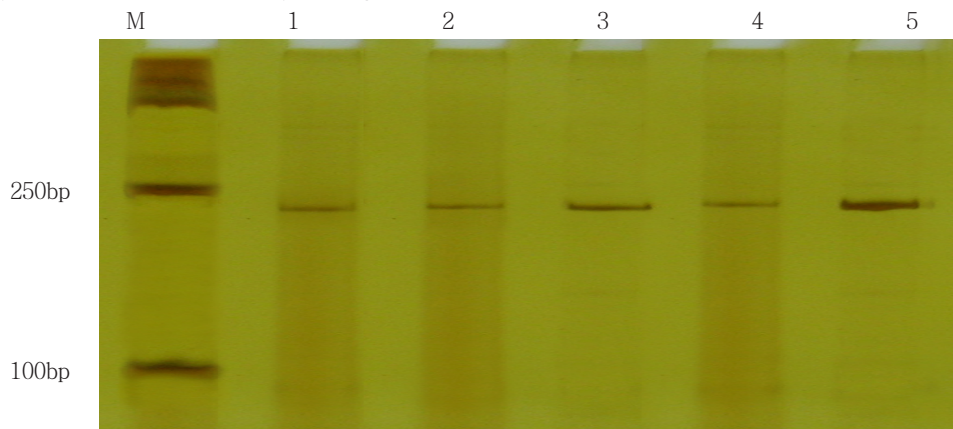
编号		长度	序列
SY02	F	20	GCATGCATGTGACAAGGAGA
	R	22	CCATGTACAGCCGAGGTAAATG
SY04	F	21	GGAAAATGTGCTGGACTAAGC
	R	21	ACTACGCCATTCTTCCTTCAG
SY09	F	19	ACAAATGGCGTGCGCATGTC
	R	21	TGTGCGCTAACAAATCTAACGC
SY12	F	20	TGCATGTCTCGTTCTAAGGC
	R	22	TGAAGTGTTCGCGATAGCACAG
SY23	F	22	CTTGATTGCACCGCGCTTACCC
	R	23	CTCATGCACTACGCGGCCATTTCG
SY27	F	23	ATCAGCATGACGATCAGAGTTGA
	R	23	TGTACAGTTGCCGTGGACAATGC
SY33	F	20	CGATCCAATTTCCGAATAAC
	R	20	CAATTGCCAGCAATAAGTGG

mM) 0.5 μL, 上下游引物 (20 μmol/L) 各 0.5 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL 模板 DNA (约 40 ng/μL) 0.5 μL。

扩增条件: 94℃ 5min, 94℃ 1min, 52℃ 45s, 72℃ 1min 30s, 循环 35 次; 最后 72℃ 7min, 4℃ 保存。所有的引物由 Invitrogen 公司合成。

1.4.3 电泳检测 扩增后每反应样品加 6×loading buffer 3.5 μL, 混匀, 取 4 μL 在 10% 非变性聚丙烯酰胺 (PAGE) 胶中电泳 2 h, 电压 150 V, 银染。照相记录电泳结果。

1.4.4 UPGMA 法聚类分析 SSR 扩增产物指纹谱带的有无, 分别用 2 个数码代替, 即有带的为“1”, 无带的为“0”, 制成 Excel 文档用于聚类分析, 使用 DPS 8.01 软件的非加权平均数聚类法 (Unweighted pair group meth-



M: DL2000; 1 福建; 2 海南; 3 广东; 4 云南; 5 四川

图 1 5 省实蝇的 PCR 检测

od with arithmetic mean,UPGMA)对桔小实蝇5个地理种群进行聚类分析,构建系统树状图谱。

2 结果与分析

2.1 形态鉴定及PCR检测

通过形态鉴定,选用的桔小实蝇样品具有区别于其它近缘种的特征:头部具有颜面斑1对,黑色,圆形;胸部缝后具狭长侧纵条1对,后足胫节暗褐色,中胫节有一红褐色端距;腹部第3至第5背板有“T”形纹,第2背板前缘具有一黑狭带,与第3节有栉毛;翅前缘脉狭长,不超过R脉;产卵管基节棕黄色,与第5背板等长,针突末端尖锐。通过PCR扩增检测,选用的各省份桔

小实蝇样品皆在224bp处具有特异性条带。

2.2 图谱及聚类分析

筛选出7对扩增带型清晰、多态性好的SSR引物,编号分别为SY02、SY04、SY09、SY12、SY23、SY27及SY33。用7对引物将5个不同地理种群的桔小实蝇进行PCR扩增,各实蝇的谱带集中在100~750 bp之间,共产生19条多态性条带。应用DPS 8.01软件对来自中国5省桔小实蝇的SSR结果进行聚类分析,结果表明,海南与广东的桔小实蝇之间遗传距离最近,福建与其余4省之间的遗传距离最远,达0.86(图2)。

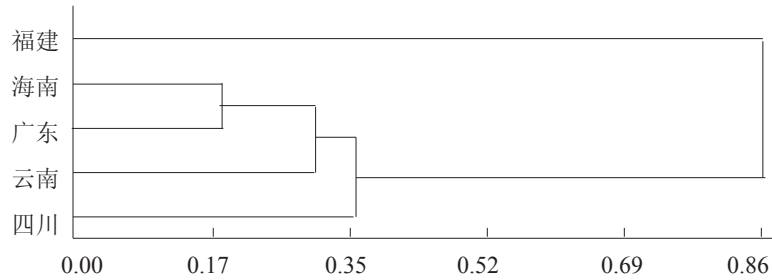


图2 5种果实蝇的聚类分析

3 讨论

本研究聚类分析结果表明,5个桔小实蝇地理种群间具有一定的遗传差异,不同地理种群间的基因交流与地理距离间呈现一定的相关性,如海南与广东桔小实蝇之间的遗传距离最近,并且海南、广东、云南、四川4省的桔小实蝇遗传距离也较近,这与康芬芬及李伟丰等^[5]的研究结果比较相符。福建省桔小实蝇与其他4省的桔小实蝇样品遗传距离最远,与前人的研究有出入,分析原因,可能是采集的样品为人为携带远距离传播的桔小实蝇,或是因为该研究所采用的引物与前人有所不同所致。

桔小实蝇是世界性检疫害虫,对其种群遗传结构进行研究,并进一步掌握其传播路线及传播趋势,对保护水果生产、促进果品出口等具有重要意义。对桔小实蝇地理种群的进一步研究,要求研究者扩大采样点规模,增加种群个体数目,进一步丰富地理种群,才能有代表性的、全面的分析种群之间的遗传关系,找出其扩散路线及趋势,为桔小实蝇的准确防治及进出口提供一定依据。

参考文献

[1] 黄可辉. 检获检疫性害虫—桔小实蝇[J]. 华东昆虫学报, 1994, 3(2): 104-107.

[2] Dai SM, LIN CC, Huang C. Polymorphic microsatellite DNA markers from the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4: 629-631.

[3] 施伟, 叶辉. 云南桔小实蝇五个地理种群的遗传分化研究[J]. 昆虫学报, 2004, 47(3): 384-388.

[4] 康芬芬, 李志红. 利用微卫星标记初步分析桔小实蝇4个地理种群的遗传多态性. 昆虫知识, 2006, 43: 371-373.

[5] 李伟丰, 杨朗, 唐侃, 等. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析[J]. 昆虫学报, 2007, 50(12): 1255-1262.

[6] 催俊霞, 徐瑛, 闻伟刚, 等. 桔小实蝇快速检疫鉴定方法[J]. 昆虫知识, 2006, 43(5): 731-733.

[7] Boyce T M., Zwick M E., Aquado C F. Mitochondrial DNA in the pine weevil: size structure and heterophasmy[J]. *Genetics*, 1989, 123: 825-836.

[8] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 等. 提取植物和微生物DNA的SDS-CTAB改进法. 北京林业大学学报, 1997, 19(3): 100-103.

[9] Kosel S, Graeber M B. Use of neuropathological tissue fox molecular genetic studies: parameters affecting DNA extraction and polymerase chain reaction[J]. *Acta Neuropathology (Berl)*, 1994, 88(1): 19-25.

[10] Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Osir, E. O., et al. Comparative analysis of microsatellite loci in four fruit fly species of the genus *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae) [J]. *Bulletin of Entomological Research*. 2003, 93: 1-10.