

基于微卫星分子标记的中国瓜实蝇 不同地理种群遗传分化分析

张亚楠^{1,2}, 牛黎明¹, 周世豪², 龚治¹, 李磊¹,
张方平¹, 韩冬银¹, 符悦冠^{1,*}

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口 571101;

2. 海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要:【目的】瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* 是一种重要入侵害虫, 寄主广, 危害性大。本研究旨在揭示中国瓜实蝇种群分化和遗传变异情况。【方法】利用 9 个多态性微卫星位点作为分子标记对中国 7 个主要分布省份的 21 个地区共 190 头瓜实蝇样本进行遗传多样性分析。【结果】21 个瓜实蝇地理种群多态位点百分率平均为 97.08%, Shannon 氏多样性指数 I 平均值为 0.8841, 种群间遗传分化系数 F_{ST} = 0.12806, 说明已发生一定程度的遗传分化。UPGMA 聚类分析显示, 海南(不含三沙)、广东、广西、云南和海南三沙的瓜实蝇种群聚为一支, 福建、江西和四川的瓜实蝇种群各自聚为一支。【结论】中国的瓜实蝇种群已发生一定程度的遗传分化, 但积累的变异程度有限。

关键词: 瓜实蝇; 地理种群; 微卫星分子标记; 遗传多样性; 遗传分化

中图分类号: Q963 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)05-0613-07

Analysis of genetic differentiation of different geographical populations of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in China based on microsatellite molecular markers

ZHANG Ya-Nan^{1,2}, NIU Li-Ming¹, ZHOU Shi-Hao², GONG Zhi¹, LI Lei¹, ZHANG Fang-Ping¹, HAN Dong-Yin¹, FU Yue-Guan^{1,*} (1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: 【Aim】The melon fly, *Bactrocera cucurbitae* is an important invasive pest with wide host range, causing serious harm. This study aims to explore its population differentiation and genetic variation in China. 【Methods】The genetic diversity of a total of 190 individuals collected from 21 regions of 7 provinces in China was analyzed using nine polymorphic microsatellite loci as the molecular markers. 【Results】For the 21 geographical populations of *B. cucurbitae*, the average percentage of polymorphic loci was 97.08%, Shannon's diversity index (I) was 0.8841, and the genetic differentiation coefficient among populations (F_{ST}) was 0.12806, suggesting that genetic differentiation occurs among the 21 geographical populations. The UPGMA cluster analysis showed that the populations of Hainan (excluding Sansha), Guangdong, Guangxi, Yunnan and Sansha of Hainan were clustered into one clade, while the populations of Fujian, Jiangxi and Sichuan clustered into separate clades, respectively. 【Conclusion】A certain degree of genetic differentiation has occurred among the melon fly populations in China, but the

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2015BAD08B03); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042017014)

作者简介: 张亚楠, 女, 1992年3月生, 河南商丘人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: honeyzyn@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: fygcatas@163.com

收稿日期 Received: 2017-10-30; 接受日期 Accepted: 2018-02-02

accumulated variability is limited.

Key words: *Bactrocera cucurbitae*; geographical population; microsatellite molecular markers; genetic diversity; genetic differentiation

瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* 属双翅目 (Diptera) 实蝇科 (Tephritidae), 是一种重要入侵害虫, 起源于印度 (Virgilio *et al.*, 2010), 现已广泛分布于热带和亚热带国家和地区, 在我国广泛分布于南方省区 (张亚楠等, 2017)。瓜实蝇寄主范围很广, 为害南瓜、苦瓜、丝瓜、柑橘和芒果等 100 多种水果和蔬菜, 可造成高达 30% ~ 100% 的损失 (Chandra *et al.*, 2012)。

微卫星又称简单重复序列 (van Oppen *et al.*, 2000), 通常以 2 ~ 6 个碱基为核心序列, 如 (TG)_n, (AAT)_n 和 (CATA)_n 等, 广泛分布于真核生物基因组中 (刘佳妮等, 2008), 每隔 10 ~ 50 kb 就存在 1 个微卫星位点 (伍祎等, 2007)。微卫星标记除了遵循孟德尔遗传定律外, 作为一种分子标记还具有以下几个特点: 丰富性、共显性、通用性、高多态性。在昆虫学研究中主要用于鉴定、遗传进化、遗传图谱绘制、系统发生和生物遗传多样性等研究领域 (魏丹丹等, 2014)。

对瓜实蝇不同国家 (地区) 地理种群的遗传多样性已有一些研究。Wu 等 (2011) 利用 12 对微卫

星引物对来自中国、印度尼西亚、泰国和缅甸 4 个国家 11 个地理种群的 219 头瓜实蝇进行研究, 发现 11 个种群的瓜实蝇可划分为 3 个群组。Virgilio 等 (2010) 分析了来自世界各地的 25 个分布地区的瓜实蝇, 结果表明瓜实蝇可分为 5 个主要群组, 分别是非洲大陆、留尼汪、中亚、东亚及夏威夷群组。我国对国内不同地区瓜实蝇的种群遗传分化研究还比较少。本研究通过微卫星分子标记分析了中国南方 7 省 21 个地区瓜实蝇种群的遗传多样性, 以期明确瓜实蝇的种群遗传结构, 为制定瓜实蝇区域性防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

瓜实蝇实验样本均为成虫, 部分由相关省区出入境检验检疫局提供, 部分通过利用诱剂进行田间诱集。所有样本经形态鉴定无误后保存备用。保存方法: 干样本 -80℃ 保存, 诱集标本采回后用酒精浸泡于 -20℃ 冰箱保存。瓜实蝇的采集信息见表 1。

表 1 瓜实蝇地理种群标本采集信息

Table 1 Collection data of geographical populations of *Bactrocera cucurbitae*

编号 No.	省份 Province	地区 Region	纬度 Latitude	经度 Longitude	试虫数量 Number of flies tested	采集时间 (年. 月) Collecting date (year. month)	保存方法 Preservation methods
1-1	海南 Hainan	三亚 Sanya	18°15'N	109°30'E	6	2015.07	95% 乙醇 Ethanol
1-2		儋州 Danzhou	19°31'N	109°34'E	6	2015.07	95% 乙醇 Ethanol
1-3		文昌 Wenchang	19°32'N	110°47'E	6	2015.07	95% 乙醇 Ethanol
1-4		海口 Haikou	20°02'N	110°11'E	6	2015.07	95% 乙醇 Ethanol
2-1	广东 Guangdong	广州 Guangzhou	23°07'N	113°15'E	8	2015.08	95% 乙醇 Ethanol
2-2		雷州 Leizhou	20°55'N	110°05'E	8	2015.08	95% 乙醇 Ethanol
2-3		潮州 Chaozhou	23°39'N	116°37'E	5	2015.08	95% 乙醇 Ethanol
3-1	云南 Yunnan	昆明 Kunming	24°52'N	102°49'E	6	2015.09	干样本 Dry sample
3-2		瑞丽 Ruili	25°03'N	102°42'E	6	2015.09	干样本 Dry sample
3-3		怒江 Nujiang	25°49'N	98°51'E	5	2015.09	干样本 Dry sample
3-4		元江 Yuanjiang	23°34'N	102°0'E	6	2015.09	干样本 Dry sample
3-5		勐腊 Mengla	21°27'N	101°33'E	6	2015.09	干样本 Dry sample
3-6		保山 Baoshan	22°31'N	103°57'E	6	2016.11	95% 乙醇 Ethanol
3-7		德宏 Dehong	24°0'N	97°51'E	6	2016.11	95% 乙醇 Ethanol
4-1	广西 Guangxi	南宁 Nanning	22°49'N	108°21'E	8	2015.11	95% 乙醇 Ethanol
4-2		柳州 Liuzhou	24°19'N	109°24'E	8	2015.11	95% 乙醇 Ethanol
4-3		凭祥 Pingxiang	22°05'N	106°45'E	8	2015.11	95% 乙醇 Ethanol
5-1	江西 Jiangxi	南昌 Nanchang	28°41'N	115°51'E	20	2016.11	95% 乙醇 Ethanol
6-1	四川 Sichuan	攀枝花 Panzhihua	26°35'N	101°43'E	12	2016.11	95% 乙醇 Ethanol
7-1	福建 Fujian	福州 Fuzhou	26°04'N	119°17'E	24	2017.07	干样本 Dry sample
8-1	海南 Hainan	三沙永兴岛 Yongxingdao, Sansha	16°49'N	112°20'E	24	2017.07	干样本 Dry sample

1.2 基因组 DNA 提取

采用美国 Omega Bio-Tek 的 Insect DNA Kit 提取试剂盒推荐的方法提取单头瓜实蝇成虫基因组 DNA,并用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳、微量紫外分光光度计测量提取 DNA 的质量和浓度。选取条带完整、 A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0 之间,浓度大于 50 ng/ μL 的样品送去上海派森诺生物技术有限公司进行微卫星检测。

1.3 引物筛选和 PCR 扩增

根据伍祎等(2007)筛选出的 12 对瓜实蝇多态性微卫星引物,每对引物的上游引物均用 3 种不同的荧光染料 (FAM, HEX 和 TAMRA) 进行标记,筛选出 9 对多态性高的微卫星引物(表 2)进行实验。PCR 反应体系为 20 μL : 2 \times EcoTaq PCR SuperMix(北

京全式金生物技术有限公司) 10 μL ,上下游引物各 1 μL , DNA 1 μL ,加 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 基因分型与信息读取

PCR 产物经 ABI3700 自动测序仪(Thermo, 美国)进行毛细管电泳,对瓜实蝇个体分型得到的结果用 GeneMarker 分析软件进行个体微卫星基因型判定。在特定区域内,主峰只有一个即为纯合子,主峰两个为杂合子。如果出现连续或杂乱超过两条的波峰、波峰高度低于主峰高度的一半和不在判定区域内的,为保证准确性舍去此类位点。在读数过程中,波峰应读取整数并根据核心序列的重复倍数读取更准确的数据。

表 2 微卫星位点引物序列

Table 2 Primer sequences of microsatellite loci

位点 Locus	重复基序 Repeat motif	引物序列(5' - 3') Primer sequences	产物长度(bp) Product size	等位基因数 N_a	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e
BeuA2.5	(GT) ₈	F: FAM-TTTCGTTTTCCTGCCAGAGTT R: CAATGCAGCAAATTCACCTAC	101 - 110	6	0.4580	0.5332
BeuB4.3	(TG) ₇	F: TAMRA-CTCGCCGTAATAGCCTGT R: GGGTCGTAATTCGGTTG	122 - 134	7	0.3667	0.4620
BeuB5.2	(TG) ₇	F: FAM-CCAAAACCAATCAGCAGC R: AAACATACGCACGCAACT	125 - 135	7	0.5167	0.5661
BeuC3.3	(GT) ₆ GCG(GT) ₃	F: FAM-TGTITTTGATTGCTCGT R: CACTGGAAAGTGAAATGAAGG	173 - 191	15	0.6239	0.7000
BeuE3.4	(CTG) ₇	F: HEX-CGTTGTTTCGCAGTTGATGT R: GAGGCGGTCAAGTCCATAA	99 - 108	3	0.3417	0.3763
BeuF1.6	(CA) ₆ CG(CA) ₃	F: HEX-GCGATCCAATTTCCGAATAAC R: CAATGCCAGCAATAAGTGG	165 - 182	15	0.4667	0.8553
BeuE4.2	(CAA) ₇ (CAG) ₄	F: HEX-CTGAGCGCTTAAATAAATTTCCG R: GCCCACTTGTGCTGTTGT	94 - 103	4	0.605	0.5956
BeuF3.2	(TA) ₃ (GT) ₈	F: TAMRA-GGGAGAGTCCACTGAAGGTG R: CTTCCACGCAACAGCAAAC	107 - 115	5	0.3551	0.4372
BeuG3.4	(GCA) ₇	F: HEX-GGATGAAGTCGCAAAGGAAG R: TCAGCTTGTGTCCTGCTC	164 - 177	13	0.6750	0.7850

1.5 数据处理

把读取的数据整理到 Excel 中,用 Microsatellite Toolkit 进行宏分析,然后用 CONVERT131 软件转化格式,以便后续分析。

利用 Popgene 3.1 软件计算 9 个位点的平均等位基因数以及每个种群的有效等位基因 (N_e)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、近交系数 (inbreeding coefficient, F_{IS}) 及不同省份各种群之间的遗传距

离。根据遗传距离进行非加权组平均法 (unweighted pair group method with arithmetic means, UPGMA) 聚类分析 (Kumar *et al.*, 2004)。利用 MEGA 软件构建种群间的 UPGMA 聚类图。

利用 Arlequin3.52 软件包中的分子变异分析软件 (AMOVA) 计算瓜实蝇各种群间和种群内的分子遗传变异分布以及各种群间的遗传分化系数 (F_{ST}) 和基因流 (Nm), 种群间的基因流通过公式 $Nm = (1 - F_{ST}) / 4F_{ST}$ 间接推算 (李伟丰等, 2007)。

2 结果

2.1 微卫星位点分析

使用 9 对微卫星引物对 21 个瓜实蝇地理种群 190 头瓜实蝇样本进行基因分型检测,单头瓜实蝇个体毛细管电泳的基因分型位点如图 1 所示。通过软件分析每个位点的固定指数 F_{IT} , F_{IS} 和 F_{ST} 来检验种群的遗传分化, F 统计分析结果见表 3。9 个微卫星位点中,BcuF1.6 位点拥有最多的等位基因数,为

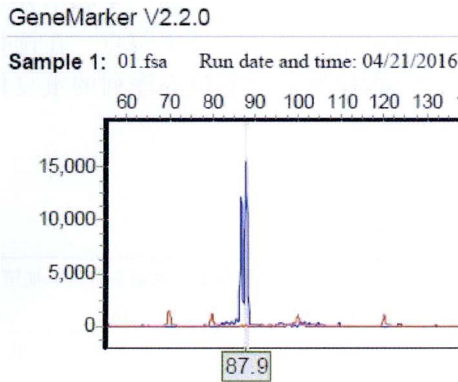


图 1 瓜实蝇个体微卫星位点 BcuA2.5 毛细管电泳分型结果

Fig. 1 Capillary electrophoresis typing results of microsatellite locus BcuA2.5 of *Bactrocera cucuribitae* individuals

X 轴代表 PCR 产物及内标的碱基数, Y 轴代表相对荧光强度。一个主峰代表纯合子,两个主峰代表杂合子。The X axis represents the number of bases of the PCR product and the internal standard, and the Y axis represents the relative fluorescence intensity. One main peak represents homozygote and the two main peaks represent heterozygote.

表 3 瓜实蝇地理种群中微卫星位点 F 统计量

Table 3 F -statistics of microsatellites in geographical populations of *Bactrocera cucuribitae*

位点 Locus	近交系数 F_{IS}	种群内 近交系数 F_{IT}	种群间分化 系数 F_{ST}	基因流 Nm
BcuA2.5	-0.0207	0.1333	0.1509	1.4071
BcuB4.3	0.5402	0.7164	0.3832	0.4024
BcuB5.2	-0.313	-0.0542	0.1971	1.0181
BcuC3.3	-0.0304	0.1597	0.1844	1.1054
BcuE3.4	0.0286	0.2024	0.179	1.1467
BcuF1.6	0.3271	0.4453	0.1757	1.1732
BcuE4.2	-0.0794	0.0913	0.1581	1.3315
BcuF3.2	-0.0746	0.0302	0.0975	2.3137
BcuG3.4	-0.2077	-0.1025	0.0871	2.6216
平均值 Mean	0.0193	0.2004	0.1846	1.1039

9 个;BcuE3.4 位点的等位基因数最少,为 2 个。平均每个微卫星位点的等位基因数为 6 个。说明瓜实蝇微卫星的等位基因分布较丰富,可以用于种群差异性分析。

对于整个瓜实蝇地理种群而言,种群间的分化系数 F_{ST} 从位点 S12 的 0.0871 到位于 S2 的 0.3832,平均值为 0.1846,当 $0.15 < F_{ST} \leq 0.25$ 时,种群发生明显分化(康芬芬等, 2006)。根据公式 $Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$ 计算种群间基因流 Nm 的范围,从位点 S2 的 0.4024 到位于 S12 的 2.6216,平均值 $Nm = 1.1039$, $Nm > 1$,遗传漂变造成的分化不占主导因素,各种群间的基因交流较频繁。

2.2 瓜实蝇地理种群的遗传多样性

9 对微卫星引物在 21 个瓜实蝇地理种群中共检测到 54 个等位基因。等位基因数的变化范围是 2.2222 ~ 3.8889,有效等位基因数的变化范围是 1.5212 ~ 2.8938。其中,广东雷州种群等位基因数最多,为 3.8889,有效等位基因数为 2.6663;云南怒江种群等位基因数和有效等位基因数最少,分别为 2.2222 和 1.5212。种群的 Nei's 期望杂合度 H 在 0.2689 ~ 0.5964 之间,平均值为 0.5037。Shannon 氏多样性指数 I 在 0.4689 ~ 1.0874 之间,平均值为 0.8841。

21 个地理种群的观测杂合度 H_o 在 0.2483 ~ 0.6667 之间,其中福建福州种群最低,云南勐腊种群最高。期望杂合度 H_e 在 0.2988 ~ 0.6361 之间,其中福建福州种群最低,广西柳州和凭祥种群最高。表 4 所示信息可以看出,广东雷州种群遗传多样性最高,云南怒江种群遗传多样性最低。

2.3 瓜实蝇地理种群遗传变异的分布

AMOVA 可以对种群遗传结构变异进行分层次分析从而检测遗传变异的分布情况。AMOVA 分析结果显示, F_{ST} 在各基因位点上差异不显著。瓜实蝇 87.194% 的微卫星遗传变异分布于地理种群内部,12.806% 的遗传变异存在于种群之间(表 5),显然瓜实蝇种群间已经发生了一定程度的遗传分化 ($F_{ST} = 0.12806$, $P = 0.0000$)。

2.4 瓜实蝇省份间种群的遗传分化

根据 Nei's 遗传距离 (D) 和遗传一致性 (I) 可以分析不同地理种群间遗传关系的亲疏(李伟丰等, 2007)。不同地区间瓜实蝇的遗传一致性在 0.6223 ~ 0.9696 之间,说明种群之间基因交流较为频繁。遗传距离在 0.0309 ~ 0.4744 之间,不同地区间瓜实蝇种群差异性不同(表 6)。

表 4 瓜实蝇 21 个地理种群个体的遗传变异统计

Table 4 Genetic variation among individuals of 21 geographical populations of *Bactrocera cucuribitae*

种群 Population	等位 基因数 <i>N_a</i>	有效等位 基因数 <i>N_e</i>	Shannon 氏 多样性指数 <i>I</i>	观测 杂合度 <i>H_o</i>	期望 杂合度 <i>H_e</i>	Nei's 期望 杂合度 <i>H</i>	多态位 点数 <i>N</i>	多态位点 百分率 (%) <i>P</i>
海南三亚 Sanya, Hainan	3.2222	2.2260	0.8964	0.5222	0.5576	0.5107	9	100
海南儋州 Danzhou, Hainan	3.1111	2.4252	0.8998	0.6204	0.5655	0.5143	8	88.89
海南文昌 Wenchang, Hainan	3.5556	2.7357	1.0150	0.5407	0.6047	0.5540	9	100
海南海口 Haikou, Hainan	3.5556	2.7306	1.0379	0.6000	0.6287	0.5757	9	100
广东广州 Guangzhou, Guangdong	2.2889	2.1185	0.8372	0.5278	0.5417	0.5078	9	100
广东雷州 Leizhou, Guangdong	3.8889	2.6663	1.0557	0.5397	0.6193	0.5798	9	100
广东潮州 Chaozhou, Guangdong	3.1111	2.3939	0.8801	0.5111	0.5556	0.5000	8	88.89
云南昆明 Kunming, Yunnan	2.7778	1.9055	0.7325	0.5000	0.4670	0.4261	8	88.89
云南瑞丽 Ruili, Yunnan	3.0000	1.8870	0.7635	0.5037	0.4730	0.4328	9	100
云南怒江 Nujiang, Yunnan	2.2222	1.5212	0.4689	0.3333	0.2988	0.2689	7	77.78
云南元江 Yuanjiang, Yunnan	3.0000	2.1084	0.8347	0.5556	0.5387	0.4938	9	100
云南勐腊 Mengla, Yunnan	3.4444	2.4141	0.9597	0.6667	0.5909	0.5417	9	100
云南保山 Baoshan, Yunnan	3.2222	2.4971	0.9673	0.5000	0.6044	0.5540	9	100
云南德宏 Dehong, Yunnan	3.2222	2.2535	0.8697	0.4444	0.5236	0.4799	9	100
广西南宁 Nanning, Guangxi	3.2222	2.5001	0.9806	0.4960	0.6334	0.5697	9	100
广西柳州 Liuzhou, Guangxi	3.7778	2.8938	1.0874	0.6111	0.6361	0.5964	9	100
广西凭祥 Pingxiang, Guangxi	3.7778	2.8138	1.0789	0.5417	0.6361	0.5964	9	100
江西南昌 Nanchang, Jiangxi	3.8889	2.1866	0.8983	0.3904	0.5250	0.5118	9	100
四川攀枝花 Panzhihua, Sichuan	3.2222	2.0372	0.8132	0.4032	0.4829	0.4626	9	100
福建福州 Fuzhou, Fujian	2.4444	1.7408	0.5956	0.2483	0.3751	0.3672	7	77.78
海南三沙永兴岛 Yongxingdao, Sansha, Hainan	3.1111	2.3612	0.8935	0.4120	0.5454	0.5340	9	100
平均值 Mean	3.1936	2.3055	0.8841	0.4985	0.5430	0.5037	8.74	97.08

表 5 瓜实蝇 21 个地理种群 AMOVA 分子变异分析

Table 5 AMOVA analysis of molecular variance of 21 geographical populations of *Bactrocera cucuribitae*

变异来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	变异组成 Variation components	变异百分比 Percentage of variation
种群间 Among populations	137.855	0.364	12.806
种群内 Within populations	900.405	1.700	87.194
总计 Total	1 038.26	2.064	
固定指数 Fixation index		F_{ST} : 0.12806	$P=0.0000$

表 6 7 个省份及三沙永兴岛瓜实蝇种群中 Nei's 遗传一致性 (*I*) 和遗传距离 (*D*)Table 6 Nei's genetic identity (*I*) and genetic distance (*D*) in *Bactrocera cucuribitae* populations from seven provinces and Yongxingdao, Sansha

种群 Population	海南(不含三沙) Hainan (excluding Sansha)	广东 Guangdong	云南 Yunnan	广西 Guangxi	江西 Jiangxi	四川 Sichuan	福建 Fujian	海南三沙 Sansha, Hainan
海南(不含三沙) Hainan (excluding Sansha)	****	0.8886	0.9582	0.9696	0.6223	0.7684	0.7162	0.8495
广东 Guangdong	0.1181	****	0.8808	0.9071	0.6313	0.7113	0.7348	0.8481
云南 Yunnan	0.0427	0.1269	****	0.9427	0.7174	0.8466	0.7739	0.8445
广西 Guangxi	0.0309	0.0975	0.0591	****	0.6453	0.7361	0.7552	0.8700
江西 Jiangxi	0.4744	0.4600	0.3321	0.4381	****	0.7865	0.7024	0.6958
四川 Sichuan	0.2635	0.3406	0.1666	0.3063	0.2402	****	0.7576	0.7470
福建 Fujian	0.3337	0.3082	0.2563	0.2808	0.3533	0.2776	****	0.8186
海南三沙 Sansha, Hainan	0.1631	0.1647	0.1690	0.1393	0.3627	0.2917	0.2001	****

对角线上三角为遗传一致性 (*I*), 下三角为遗传距离 (*D*)。Genetic identity (*I*) is above the diagonal, while genetic distance (*D*) is below the diagonal.

基于不同省份瓜实蝇种群间遗传距离数据(表6),用UPGMA建立的系统发育树如图2所示。从图中可以看出,海南(不含三沙)、广东、广西、云南

和海南三沙的瓜实蝇种群聚为一支(Clade1),福建、江西、四川的瓜实蝇种群各自聚为一支(Clade2, Clade3和Clade4)。

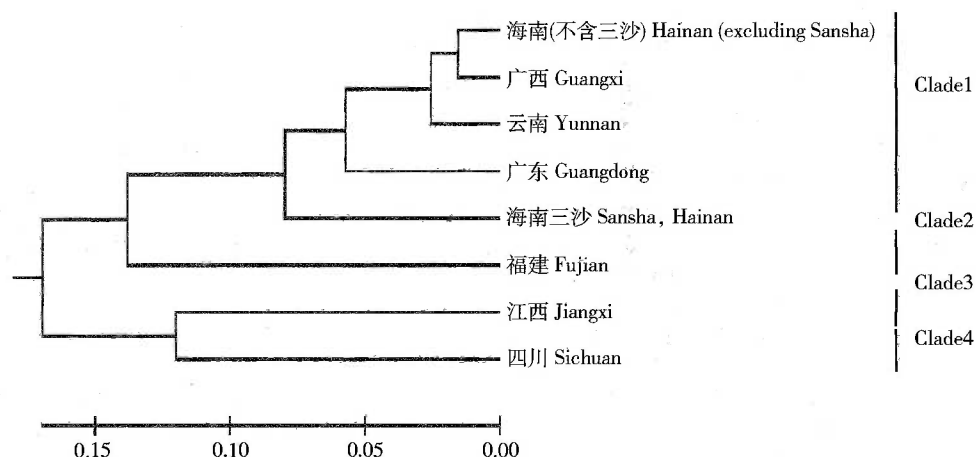


图2 基于Nei's标准遗传距离的7个省份及三沙永兴岛瓜实蝇种群的UPGMA聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of *Bactrocera cucurbitae* populations from seven provinces and Yongxingdao, Sansha based on Nei's standard genetic distance

3 讨论

3.1 微卫星位点的选择

微卫星的突变速率在不同物种、同一物种的不同位点甚至在同一位点的不同等位基因间都存在着较大的差异。因此,微卫星具有高度的遗传多态性(刘佳妮等,2008),可作为有效的遗传标记用于种群遗传多样性和系统发生关系的分析(万宣伍等,2010)。本研究在伍祎等(2007)的12对瓜实蝇多态性微卫星引物的基础上再次筛选,其中9个微卫星位点都表现出高多态性,每个微卫星位点等位基因数的范围是2~9个,平均等位基因数多达6个,大部分种群的多态位点百分率 P 达100%,适合微卫星分析。

3.2 瓜实蝇种群的遗传多样性

遗传多样性一般是指种内的遗传差异水平,它反映一个物种适应环境的能力(吴仲真等,2011)。21个地理种群瓜实蝇的观测杂合度 H_o 在0.2483~0.6667之间,期望杂合度 H_e 在0.2988~0.6361之间,遗传一致性在0.6223~0.9696之间,基因多样性指数Nei's期望杂合度 H 平均值为0.5037,Shannon氏多样性指数 I 平均值为0.8841,说明瓜实蝇地理种群的遗传多样性较高。

3.3 瓜实蝇种群间发生了一定的遗传分化

种群间的遗传分化系数 $F_{ST} = 0.12806$ ($P <$

0.001)(表5), $0.05 < F_{ST} \leq 0.15$,瓜实蝇种群处于中等分化水平。12.806%的遗传变异存在于种群之间,这表明瓜实蝇21个地理种群间已经发生了一定程度的遗传分化。聚类分析表明广东、广西、云南和海南种群聚为一支,福建、江西和四川种群各自单独聚为一支,这可能与气候、地理环境等因素有关。

笔者之前利用线粒体CO I基因对我国7个省份21个地区瓜实蝇种群进行分析,发现瓜实蝇种群遗传分化程度很低(张亚楠等,2017)。本研究利用微卫星分子标记分析了瓜实蝇种群的遗传多样性,发现其有一定的遗传分化。瓜实蝇种群较高的核遗传多样性(微卫星)和较低的线粒体遗传变异(CO I),可能是因为不同个体间微卫星差异较大,而CO I基因积累变异所需的时间较长,因此推测瓜实蝇在中国是一个年轻的物种,入侵定殖时间较短,积累的变异程度有限。

本研究利用微卫星分子标记进行了瓜实蝇的遗传多样性检测研究。检测样本来源基本覆盖了我国瓜实蝇的高适生区,但对于中低度适生区的瓜实蝇种群尚没有进行深入研究,在有些省区,获得的不同地理种群数量尚少。为更好地了解我国瓜实蝇的遗传分化格局,尚待进一步扩大样品的收集范围、增加不同地理种群数量进行检测分析。

参考文献 (References)

Chandra SP, Pawan KMPS, Sunil KS, 2012. Population genetic

- structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase (COI) gene sequences. *Genetica*, 140(1-3): 83-91.
- Kang FF, Li ZH, Yang D, Wu JJ, Liang GQ, 2006. Microsatellite markers for genetic polymorphism in four geographic populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(3): 371-373. [康芬芬, 李志红, 杨定, 吴佳教, 梁广勤, 2006. 利用微卫星标记初步分析橘小实蝇 4 个地理种群的遗传多态性. *昆虫知识*, 43(3): 371-373]
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, 5(2): 150-163.
- Li WF, Yang L, Tang K, Zeng L, Liang GW, 2007. Microsatellite polymorphism of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) populations in China. *Acta Entomol. Sin.*, 50(12): 1255-1262. [李伟丰, 杨朗, 唐侃, 曾玲, 梁广文, 2007. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析. *昆虫学报*, 50(12): 1255-1262]
- Liu JN, Gui FR, Li ZY, 2008. Applications of SSR molecular markers to studies on insect invasion. *Plant Prot.*, 34(3): 7-11. [刘佳妮, 桂富荣, 李正跃, 2008. SSR 分子标记技术在入侵昆虫学研究中的运用. *植物保护*, 34(3): 7-11]
- van Oppen MJH, Rico C, Turner GF, Hewitt MF, 2000. Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi Cichlids. *Mol. Biol. Evol.*, 17(4): 489-498.
- Virgilio M, Delatte H, Backeljau T, Demeyer M, 2010. Macrogeographic population structuring in the cosmopolitan agricultural pest *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol.*, 19(13): 2713-2724.
- Wan XW, Liu YH, Zhang B, Zhou HD, 2010. Genetic differentiation among populations of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Chongqing based on microsatellite markers. *Sci. Agric. Sin.*, 34(13): 2688-2696. [万宣伍, 刘映红, 张彬, 周浩东, 2010. 基于微卫星分子标记的重庆地区桔小实蝇遗传分化研究. *中国农业科学*, 34(13): 2688-2696]
- Wei DD, Shi JX, Zhang XX, Chen SC, Wei D, Wang JJ, 2014. Analysis of microsatellite loci from *Bactrocera dorsalis* based on transcriptome dataset. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 25(6): 1799-1805. [魏丹丹, 石俊霞, 张夏璋, 陈世春, 魏冬, 王进军, 2014. 基于转录组数据的桔小实蝇微卫星位点信息分析. *应用生态学报*, 25(6): 1799-1805]
- Wu Y, Li YL, Raul RA, Bruce AM, Wu JJ, Li ZH, 2011. Microsatellite markers reveal population structure and low gene flow among collections of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) in Asia. *J. Econ. Entomol.*, 104(3): 1065-1074.
- Wu Y, Li ZH, Kang FF, Yang D, Wu JJ, 2007. Application of microsatellites to population genetics of quarantine fruit flies. *Plant Prot.*, 33(4): 1-6. [伍祎, 李志红, 康芬芬, 杨定, 吴佳教, 2007. 微卫星 DNA 标记及其在检疫性实蝇种群遗传学中的应用. *植物保护*, 33(4): 1-6]
- Wu Y, Li ZH, Wu JJ, 2009. Polymorphic microsatellite markers in the melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Mol. Ecol.*, 2(20): 1-3.
- Wu ZZ, Li HM, Bin SY, Shen JM, He HL, Luo M, Ma J, Lin JT, 2011. Analysis of genetic diversity of different populations of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) using microsatellite markers. *Acta Entomol. Sin.*, 54(2): 149-156. [吴仲真, 李红梅, 宾淑英, 申建梅, 贺华良, 罗梅, 马骏, 林进添, 2011. 应用微卫星标记分析不同桔小实蝇种群的遗传多样性. *昆虫学报*, 54(2): 149-156]
- Zhang YN, Gong Z, Niu LM, Li L, Zhang FP, Han DY, Fu YG, 2017. Geographical population genetic differentiation analysis of melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) based on CO I gene sequences. *Chin. J. Trop. Crops*, 38(5): 926-931. [张亚楠, 龚治, 牛黎明, 李磊, 张方平, 韩冬银, 符悦冠, 2017. 基于 CO I 基因片段的瓜实蝇遗传多样性分析. *热带作物学报*, 38(5): 926-931]

(责任编辑: 马丽萍)