

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2019.04.005

我国口岸瓜实蝇监测样本的 SSR 分子标记分析

许佳丹^{1,2}, 王书平^{1*}, 蒋费涛³, 朱雅君¹, 叶 军¹, 李 飞²

¹上海海关动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 201708; ²浙江大学昆虫科学研究所, 浙江 杭州 310058; ³重庆三峡学院环境与化学工程学院, 重庆 404000

摘要:【目的】瓜实蝇是世界性检疫害虫,被列入我国口岸常年监测计划中。本研究以检疫性有害生物瓜实蝇为研究对象,利用不同地理种群瓜实蝇的转录组发现特异性的微卫星 (simple sequence repeats, SSR) 序列,分析我国口岸监测的瓜实蝇样本的遗传多样性。【方法】利用生物信息学方法,对 4 个不同地理来源的瓜实蝇转录组进行分析,发现了特异性的 SSR 序列,并设计特异性引物,选用我国 11 个省市的 49 个瓜实蝇监测样本进行测试及验证,使用 NTsys 和 Popgene 32 软件进行遗传多样性分析。【结果】筛选出 15 对多态性较好的引物,UPGMA 聚类分析显示,新疆、四川和广西种群归为一支,浙江、广东、江苏种群归为一支,上海、云南、海南、天津种群归为一支,北京种群单独聚为一支。【结论】聚类分析结果显示,11 个不同省市的瓜实蝇监测样本间基因分化系数为 0.6712,表明不同口岸的瓜实蝇监测样本间的遗传分化较大,可能具有不同的来源地,可为进一步开发监测样本溯源技术提供理论依据。

关键词: 瓜实蝇; 转录组; 微卫星标记; 遗传多样性

Simple sequence repeats analysis of *Bactrocera cucurbitae* populations from custom ports in China

XU Jiadan^{1,2}, WANG Shuping^{1*}, JIANG Feitao³, ZHU Yajun¹, YE Jun¹, LI Fei²

¹Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Customs, Shanghai 201708, China;

²Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China;

³School of Environmental and Chemical Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China

Abstract: 【Aim】Understanding the spread routes and the origin of quarantine pests is important in international trade. *Bactrocera cucurbitae* is a worldwide quarantine pest and is also included in the Chinese quarantine list. We aimed to study the genetic differences of *B.cucurbitae* populations intercepted at different customs ports in China by simple sequence repeats (SSR) identified from transcriptome data. 【Method】Polymorphic primers were designed based on the SSR obtained from four transcriptomes of *B.cucurbitae* in different regions by bioinformatics methods. Forty-nine *B.cucurbitae* samples from eleven provinces/regions of China were selected for verification, and the NTsys and Popgene 32 softwares were used to analyze their genetic diversity. 【Result】Fifteen pairs of primers with reliable polymorphism were selected. An UPGMA cluster analysis clustered the populations of Xinjiang, Sichuan and Guangxi into one clade, the populations of Zhejiang clustered with the ones of Guangdong and Jiangsu, and the populations of Shanghai clustered with the ones of Yunnan, Hainan; the populations from Beijing formed a separate cluster. 【Conclusion】The genetic differentiation coefficient among populations was 0.6712, indicating that *B.cucurbitae* populations in different regions have varied genetic background, and these populations might have different original sources. These results provide the theory and technique support to identify the origins of quarantine pests.

Key words: *Bactrocera cucurbitae*; transcriptome; microsatellite marker; genetic diversity

瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) 俗称 严重影响蔬菜瓜果的品质和产量 (Nishida & Bess, 针蜂, 幼虫称瓜蛆, 其寄主广泛, 适应性强, 可危害 1950)。世界上很多国家和地区都将瓜实蝇列为重要 120 多种蔬菜和水果 (Christenson & Foote, 1960), 要的检疫性有害生物。为了有效地控制检疫性实

收稿日期 (Received): 2018-09-13 接受日期 (Accepted): 2018-10-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1200602); 上海出入境检验检疫局科技项目 (HK16-010)

作者简介: 许佳丹, 女, 硕士研究生。研究方向: 农业昆虫与害虫防治。E-mail: jiadanxu@foxmail.com

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: wangshuping_2014@126.com

蝇的危害及传播,自 2000 年起,国家质检总局在全国范围内开展实蝇监测工作,对防控检疫性实蝇的传播、蔓延起到了重要作用,也为开展检疫性实蝇的不同地理种群遗传结构研究提供了宝贵材料。

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 具有多态性高、重复性好、共显性、易检测、成本低等优点,因此被开发成为分子标记,广泛应用于亲子鉴定、遗传图谱和基因组结构分析等方面 (Jones *et al.*, 2010)。SSR 标记可应用于昆虫的群体遗传结构与分化、不同生物型的鉴别、天敌昆虫的鉴定、种群间亲缘关系的鉴定等方面 (何恒果, 2008)。随着测序技术的不断发展,转录组测序成为目前研究昆虫系统发育、种群遗传变异分化以及外部形态特征难以区分的近缘种鉴定等的方法之一 (Badouin *et al.*, 2013)。利用转录组测序数据开发 SSR 分子标记包含的遗传信息更丰富,可以提高遗传多样性分析的准确性。罗梅等 (2014) 基于扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley 的研究表明,利用转录组数据开发 SSR 标记是可行的,可应用于物种的遗传多样性分析。李梅梅等 (2018) 利用转录组测序得到的 SSR 序列在粘虫 *Mythimna separata* (Walk-

er) 的 7 个不同地理种群中成功筛选到 7 个具有多态性且能稳定扩增的 SSR 位点。Pascoal & Kilner (2017) 利用基因组及转录组数据开发出 14 对 SSR 多态性引物并进行遗传多样性研究。

通过对瓜实蝇的转录组测序数据筛选 SSR 序列,收集了国内 11 个地区的口岸瓜实蝇监测种群,进行了实验验证及遗传多样性分析,为探索我国瓜实蝇的口岸监测工作提供理论依据和实用技术。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

用于转录组测序的瓜实蝇雌成虫,分别来自广州 (113°E, 23°N) 海关植检实验室长期饲养的瓜实蝇、上海宝山地区 (121°E, 31°N) 监测到的瓜实蝇种群。其他转录组数据下载自美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI), 包括来自美国夏威夷 (SRX689016)、中国台湾 (SRX1041320) 的瓜实蝇种群。

用于实验验证的瓜实蝇监测样本分别来自上海、浙江、江苏、广西、海南、新疆、云南、四川、天津、北京、广东等 11 个地区,共 49 个监测样本 (表 1)。

表 1 瓜实蝇监测样本收集信息
Table 1 Geographic origin of *B. cucurbitae* samples

地区 Region	样本量 Sample size	保存方法 Preservation methods	收集日期 Collection date
新疆乌鲁木齐 Xinjiang Urumqi	3	95%乙醇 Ethanol	2018-09-15
天津新港 Tianjin Xingang	3	干样本 Dry sample	2018-09-25
海南海口 Hainan Haikou	46	干样本 Dry sample	2018-09-09
云南景洪 Yunnan Jinghong	20	干样本 Dry sample	2018-09-11
广西防城港 Guangxi Fangchenggang	8	干样本 Dry sample	2018-09-21
北京昌平 Beijing Changping	7	95%乙醇 Ethanol	2018-09-16
广东广州 Guangdong Guangzhou	10	95%乙醇 Ethanol	2018-09-09
江苏南京 Jiangsu Nanjing	3	干样本 Dry sample	2018-09-15
浙江杭州 Zhejiang Hangzhou	23	干样本 Dry sample	2018-09-07
上海宝山 Shanghai Baoshan	7	干样本 Dry sample	2018-09-18
四川资阳 Sichuan Ziyang	22	95%乙醇 Ethanol	2018-09-20

1.2 总 RNA 的提取与检验

按照 Trizol Reagent 方法提取总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,经 Nanodrop 2000 分光光度计 (IMPLEN, CA, USA) 测定 RNA 的纯度,依据 Qubit RNA Assay Kit 使用说明定量测定 RNA 浓度,并用 Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, USA) 精确检测 RNA 的完整性。

1.3 cDNA 文库构建和测序

RNA 样品检测合格后,在带有 Oligo (dT) 的磁

珠富集 mRNA 中加入 fragmentation buffer,将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板构建测序文库。文库构建完成后,使用 Qubit 2.0、Agilent 2100 和 Q-PCR 方法对文库进行检测,以保证文库质量。最后使用 Illumina 高通量测序平台进行测序。cDNA 文库构建与测序由上海美吉生物科技有限公司协助完成。

1.4 转录组组装

测序得到的原始数据 (raw reads) 经处理去接头、poly-N 和低质量序列后获得高质量的测序数据

(clean data)。在此基础上计算 GC 含量(碱基 G 和 C 的数量总和占总体碱基数的百分比)、Q20(质量值 ≥ 20 的碱基占总碱基的百分比)、Q30(质量值 ≥ 30 的碱基占总碱基的百分比)和重复序列水平,再应用 Trinity 软件对高质量的 clean data 进行拼接、过滤和组装,最终获得高质量的 unigene。

1.5 转录组 SSR 的筛选

利用 SciRoKo 3.4 软件(默认参数)获取瓜实蝇转录组中的 SSR 位点信息(Kofler *et al.*, 2007),根据重复单元碱基个数将 SSR 定义为单核苷酸重复、二核苷酸重复、三核苷酸重复、四核苷酸重复、五核苷酸重复、六核苷酸重复 SSR。用 Excel 软件对不同地理种群瓜实蝇的 SSR 信息进行统计分析。

1.6 DNA 提取、引物筛选设计及 PCR 扩增

采用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒(QIAGEN)提取单头瓜实蝇成虫基因组 DNA。利用 Primer 5.0 对筛选出来的 SSR 序列进行引物设计(Untergasser *et al.*, 2012),筛选出 15 对多态性高的 SSR 引物进行实验(表 2),引物筛选以重复性好、具多态性、扩

增条带清晰稳定为依据。所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL :Premix Taq (Takara) 10 μL ,上下游引物各 1 μL , DNA 模板 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。取 8 μL PCR 产物于 3% 琼脂糖凝胶电泳检测,并在凝胶成像系统下拍照保存。

1.7 数据处理及分析

对聚丙烯酰胺凝胶图谱上每对应物的扩增条带进行分析,在相同的迁移率位置上,有带赋值为 1,无带赋值为 0,形成[0,1]数据矩阵。先采用 NT-edit 软件进行数据的输入和保存,再使用 NTsys 软件和 Popgene 32 (Nei, 1978; Yeh & Boyle, 1997) 软件统计分析基因分化系数、群体总基因的多样性和群体内基因多样性、基因流及遗传相似系数及遗传距离,以非加权类平均法(unweighted class average method,UPGMA)进行聚类分析,构建树状聚类图。

表 2 具有多态性的瓜实蝇 SSR 引物信息
Table 2 SSR primers with polymorphism of *B. cucurbitae*

引物序号 Primer number	SSR 重复序列 Repeat motif	引物序列 Sequence of primer	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$	产物长度 Product size/bp
BC-2-1	(GA) 11	F:ATTGTAATTTTCCACAC R:TCTAACTCACACTCCCT	55	150-200
BC-2-2	(AC) 9	F:TCTCAACCCGATTTCGTT R:GGCACATCTGGTGCCTA	55	100-150
BC-2-3	(GC) 7	F:CGTGCTCCCTCTCTCAG R:AACCAATTGCGTTTTGA	55	600-620
BC-3-1	(AGG) 5	F:CCCGTCCTACACCTAC R:TCTCCTCGACAACCTC	55	150-200
BC-3-2	(ACG) 5	F:CCCGTCCTACACCTAC R:TCTCCTCGACAACCTC	55	150-200
BC-3-3	(ATT) 11	F:ATGAAAAGGAACAACAT R:CTAAAACGAGCTAAGTA	55	100-150
BC-3-4	(ACT) 5	F:ACTTCCCCCATTCCTA R:TTGTCGTTTCGCTTAT	55	150-200
BC-3-5	(TGT) 6	F:AAGGTGTTATTTTGTGA R:GTGCTTAGAGGCTGTTA	55	100-150
BC-3-6	(TCG) 5	F:TGGCACCATCAAACAG R:AGGCGCTACGCAACGA	55	150-200
BC-3-7	(CTC) 6	F:CTGCGATAGTAGTGCTG R:CTCATTGGTGTAATGA	55	100-150
BC-3-8	(CIT) 8	F:GCACGCACATAAAACAC R:ATAGGAACCTGAGGAAT	55	100-150
BC-3-9	(GTA) 6	F:TGGTGCTTGTGTTGGT R:AGTATGCCTGGCTTTT	55	100-150
BC-3-10	(GCT) 6	F:GTGGTGTGCTGTGTAT R:TTTGAAAGCGATTAGTA	55	150-200
BC-3-11	(GGT) 7	F:AGCCCCACACATTTCATC R:TCACTACTGCTCCGCCG	55	150-200
BC-3-12	(GCC) 6	F:ACGAATCATAAGAGTG R:AGTTACGAGCGAGAAC	55	150-200

2 结果与分析

2.1 RNA 提取及质量检测

通过普通 PCR 及 Agilent 2100 分析仪对提取的瓜实蝇总 RNA 质量进行质检评估。结果表明, RNA 质量较好,可以进行后续的上机测序(图 1、2、3)。

2.2 瓜实蝇雌成虫转录组数据组装质量

采用 Illumina 二代测序平台对瓜实蝇(3 个重

复)的转录组进行测序。所有样本 GC 含量均介于 38.88%~42.31%;每个样本 Q20 均大于 94%,Q30 均大于 91%,测序结果准确度较高,可以用于后续分析;利用 Trinity 软件进行组装,得到序列总长度分别为 29462159、20646356、44400736、46515243 bp,片段平均长度分别为 151、126、101、100 bp,平均 GC 含量分别为 42%、41%、40%、39%(表 3)。

2.3 瓜实蝇转录组 SSR 位点及重复类型分析

从表 4、表 5 可知,广州实验室饲养、上海地区监测、中国台湾和美国种群的瓜实蝇转录组的 SSR 位点分别为 16415、25972、16277 和 22719 个,SSR 的出现频率(SSR 数目与总 unigenes 的数目比值)分别为 27.40%、35.05%、27.04%、36.84%。从出现频率来看,美国种群的瓜实蝇转录组 SSR 位点最丰富,其次为上海、广州和台湾种群。

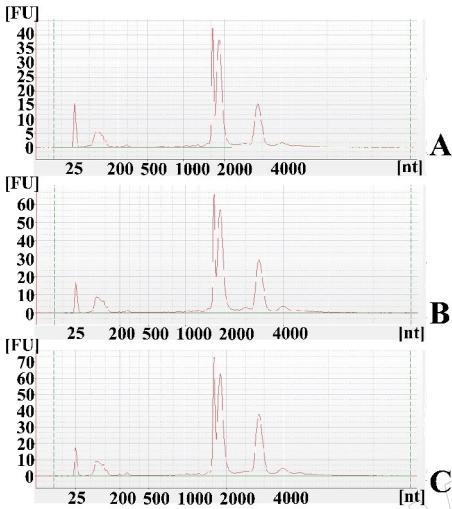


图 1 广州实验室饲养种群总 RNA 检测
Fig.1 Agilent 2100 electrophoresis of total RNA of the *B. cucurbitae* populations from Guangzhou lab
A: 样品 1; B: 样品 2; C: 样品 3。
A: Sample 1; B: Sample 2; C: Sample 3.

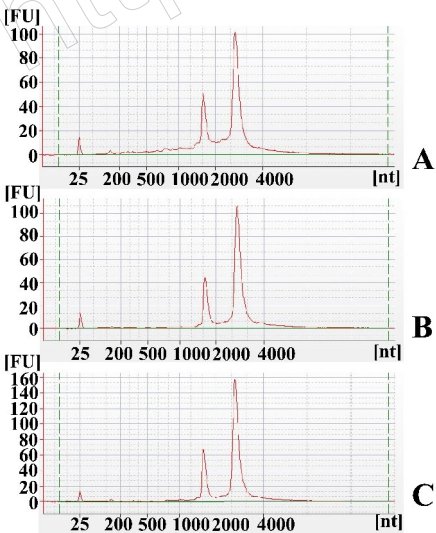


图 2 上海地区监测种群总 RNA 检测
Fig.2 Agilent 2100 electrophoresis of total RNA of the *B.cucurbitae* populations from Shanghai
A: 样品 1; B: 样品 2; C: 样品 3。
A: Sample 1; B: Sample 2; C: Sample 3.

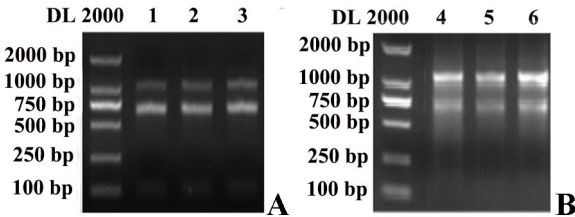


图 3 琼脂糖凝胶电泳检测图
Fig.3 *B. cucurbitae* total RNA samples on agarose gel electrophoresis

A: 广州实验室饲养瓜实蝇样品; B: 上海地区监测瓜实蝇样品。
A: Samples of *B.cucurbitae* kept in Guangzhou lab;
B: Samples of *B.cucurbitae* from Shanghai.

表 3 瓜实蝇不同地理种群转录组
测序数据评估统计

种群 Population	序列总长度 Total sequences/bp	片段长度 Sequence length/bp	GC 含量 GC content/%
广州实验室 Guangzhou lab	29462159	151	42
上海 Shanghai	20646356	126	41
台湾 Taiwan	44400736	101	40
美国 America	46515243	100	39

不同地理种群的瓜实蝇转录组中 SSR 的主要重复类型为三核苷酸重复,广州、上海、台湾和美国种群瓜实蝇的三核苷酸重复类型的 SSR 数量分别占各自总 SSR 数量的 41.23%、32.90%、34.58%、38.12%;其次为四核苷酸重复类型,占各自总 SSR 数量的 21.57%、20.64%、22.94%、22.92%;对广州、台湾和美国种群而言,第三丰富的 SSR 重复类型为二核苷酸重复类型,占各自总 SSR 数量的 11.93%、10.82%、13.67%,而上海种群占比第三的是单核苷酸重复类型,为 17.23%。总体上六核苷酸重复类型占比最少,上海、台湾和美国种群瓜实蝇的六核苷酸重复类型的 SSR 数量分别占各自总 SSR 数量的 7.47%、8.50%、8.06%,广州种群的单核苷酸重复类型占比最少,仅占其总 SSR 数量的 7.48%。

广州、上海、台湾和美国种群的瓜实蝇转录组的不同重复类型 SSR 中,单核苷酸重复类型的平均长度最大,分别为 22.82、30.58、23.75 和 23.82 bp;五核苷酸重复类型的平均长度最小,分别为 17.97、18.55、17.78 和 18.79 bp。广州、上海和台湾种群瓜实蝇转录组的 SSR 位点中,单核苷酸重复类型的平均错配数最大,分别为 0.56、0.62、0.57,美国种群瓜实蝇转录组的 SSR 位点中双核苷酸重复类型的平

均错配数最大,为 0.52。平均错配数最小的是五核苷酸重复,分别为 0.14、0.18、0.12、0.21。

广州、上海、台湾和美国种群的瓜实蝇转录组的不同重复类型 SSR 中,平均距离最长的是三核苷酸重复类型,分别为 112.43、107.32、100.12、106.35 kb;上海、台湾和美国种群的瓜实蝇转录组的不同重复类型 SSR 中平均距离最短的是六核苷酸重复类型,分别为 24.37、22.32、24.8 kb,对于广州种群的瓜实蝇转录组 SSR 而言,平均距离最短的是单核苷

酸重复类型,仅为20.4 kb。

广州、上海、台湾和美国种群的瓜实蝇转录组 SSR 重复单元的重复次数分布最多的是 5 次重复,分别占总 SSR 数量的 25.96%、20.48%、24.16%、22.07%,最少的为 13、14 次重复。广州种群的瓜实蝇转录组 SSR 中特有的重复类型为五核苷酸 15 次重复、六核苷酸 14 次重复。美国种群的瓜实蝇转录组 SSR 中特有的重复类型为六核苷酸 13 次重复。

表 4 不同地理种群瓜实蝇转录组中 SSR 的基本信息

Table 4 SSRs information in transcriptomes of different geographical populations of *B. cucurbitae*

种群 Population	重复类型 Type of repeats	数目 Number/ 个	比例 Percentage/ %	出现频率 Frequency/ %	平均长度 Average length/bp	平均错配数 Average mismatches	平均距离 Average distance/kb
广州实验室 Guangzhou Lab	单核苷酸 Mononucleotide	1228	7.48	2.05	22.82	0.56	20.40
	双核苷酸 Dinucleotide	1958	11.93	3.27	21.23	0.45	32.53
	三核苷酸 Trinucleotide	6768	41.23	11.30	19.87	0.43	112.43
	四核苷酸 Tetranucleotide	3541	21.57	5.91	19.01	0.29	58.82
	五核苷酸 Pentanucleotide	1498	9.13	2.50	17.97	0.14	24.88
	六核苷酸 Hexanucleotide	1422	8.66	2.37	21.98	0.28	23.62
	总计 Total	16415	100.00	27.40	—	—	—
上海 Shanghai	单核苷酸 Mononucleotide	4474	17.23	6.04	30.58	0.62	56.18
	双核苷酸 Dinucleotide	3353	12.91	4.53	21.49	0.49	42.11
	三核苷酸 Trinucleotide	8546	32.90	11.53	20.10	0.44	107.32
	四核苷酸 Tetranucleotide	5361	20.64	7.24	18.86	0.29	67.32
	五核苷酸 Pentanucleotide	2297	8.84	3.10	18.55	0.18	28.85
	六核苷酸 Hexanucleotide	1941	7.47	2.62	22.30	0.28	24.37
	总计 Total	25972	100.00	35.05	—	—	—
台湾 Taiwan	单核苷酸 Mononucleotide	1756	10.79	2.92	23.75	0.57	28.33
	双核苷酸 Dinucleotide	1761	10.82	2.93	20.13	0.37	28.42
	三核苷酸 Trinucleotide	6205	38.12	10.31	20.12	0.44	100.12
	四核苷酸 Tetranucleotide	3734	22.94	6.20	18.94	0.28	60.25
	五核苷酸 Pentanucleotide	1438	8.83	2.39	17.78	0.12	23.20
	六核苷酸 Hexanucleotide	1383	8.50	2.30	22.33	0.31	22.32
	总计 Total	16277	100.00	27.04	—	—	—
美国 America	单核苷酸 Mononucleotide	2511	11.05	4.07	23.82	0.47	33.99
	双核苷酸 Dinucleotide	3106	13.67	5.04	21.46	0.52	42.05
	三核苷酸 Trinucleotide	7856	34.58	12.74	20.19	0.45	106.35
	四核苷酸 Tetranucleotide	5207	22.92	8.44	19.02	0.29	70.49
	五核苷酸 Pentanucleotide	2207	9.71	3.58	18.79	0.21	29.88
	六核苷酸 Hexanucleotide	1832	8.06	2.97	22.53	0.30	24.80
	总计 Total	22719	100.00	36.84	—	—	—

2.4 瓜实蝇不同地理种群监测样本间的系统发育分析

利用 NTsys 软件对 PCR 电泳结果(图 4)进行统计和聚类分析,结果(表 6)显示,遗传一致度在 0.17~1.00 之间,说明瓜实蝇不同地理种群监测样本间存在遗传分化,可能具有不同的来源背景。从图 5 可以看出新疆种群分布于 A 组,四川种群分布于

C 组,浙江种群分布于 D 组,北京、云南、天津、海南种群分布于 E 组,广西种群分布于 B、E 组,上海、江苏和广东种群分布于 D、E 组。其中新疆、四川、北京种群瓜实蝇遗传结构较为单一,同一地区样本聚集在一起。浙江地区监测到的瓜实蝇与上海、广东、江苏部分监测样本聚集成一支,上海、广东监测到的瓜实蝇个体分散在进化树的不同支。

表 5 不同种群瓜实蝇转录组中不同重复数目 SSR 的出现频率
Table 5 Frequency of SSRs with different number of repeats in transcriptomes of *B. cucurbitae* in different populations

种群 Population	重复类型 Type of repeats	重复数目 Number of repeats															总计 Total	比例 Percentage/%
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15			
广州实验室 Guangzhou Lab	单核苷酸 Mononucleotide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	238	990	1228	7.48	
	双核苷酸 Dinucleotide	-	-	-	-	392	426	184	253	191	154	88	79	42	149	1958	11.93	
	三核苷酸 Trinucleotide	-	-	3425	1018	1080	448	330	144	150	53	43	16	21	40	6768	41.23	
	四核苷酸 Tetranucleotide	1080	1254	710	297	94	66	21	9	4	3	-	2	-	1	3541	21.57	
	五核苷酸 Pentanucleotide	1183	224	48	26	11	-	1	1	-	-	-	1	1	2	1498	9.13	
	六核苷酸 Hexanucleotide	1035	283	78	12	4	2	4	3	-	-	-	1	-	-	1422	8.66	
	总计 Total	3298	1761	4261	1353	1581	942	540	410	345	210	131	99	302	1182	16415	100.00	
上海 Shanghai	比例 Percentage/%	20.09	10.73	25.96	8.24	9.63	5.74	3.29	2.50	2.10	1.28	0.80	0.60	1.84	7.20	100.00		
	单核苷酸 Mononucleotide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	4154	4474	17.23	
	双核苷酸 Dinucleotide	-	-	-	-	602	767	360	392	340	235	178	107	69	303	3353	12.91	
	三核苷酸 Trinucleotide	-	-	4104	1269	1542	585	429	229	147	78	51	33	29	50	8546	32.90	
	四核苷酸 Tetranucleotide	1668	2005	986	392	168	65	40	17	7	9	2	1	-	1	5361	20.64	
	五核苷酸 Pentanucleotide	1761	315	146	25	18	7	3	7	3	2	1	1	-	7	2297	8.84	
	六核苷酸 Hexanucleotide	1403	404	82	24	9	9	1	-	1	2	2	-	-	4	1941	7.47	
台湾 Taiwan	总计 Total	4832	2724	5318	1710	2339	1433	833	645	498	326	234	142	418	4519	25972	100.00	
	比例 Percentage/%	18.60	10.49	20.48	6.58	9.01	5.52	3.21	2.48	1.92	1.26	0.90	0.55	1.61	17.40	100.00		
	单核苷酸 Mononucleotide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	227	1529	1756	10.79	
	双核苷酸 Dinucleotide	-	-	-	-	384	402	200	235	159	153	68	47	32	80	1761	10.82	
	三核苷酸 Trinucleotide	-	-	3095	931	981	403	342	131	122	50	50	30	24	46	6205	38.12	
	四核苷酸 Tetranucleotide	1100	1416	711	304	100	57	26	12	-	3	3	2	2	-	3734	22.94	
	五核苷酸 Pentanucleotide	1137	210	54	32	2	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1438	8.83	
美国 America	六核苷酸 Hexanucleotide	1009	258	73	24	6	4	3	2	1	3	-	-	-	-	1383	8.50	
	总计 Total	3246	1884	3933	1291	1473	868	572	380	282	209	121	79	285	1655	16277	100.00	
	比例 Percentage/%	19.94	11.57	24.16	7.93	9.05	5.33	3.51	2.33	1.73	1.28	0.74	0.49	1.75	10.17	100.00		
	单核苷酸 Mononucleotide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	411	2100	2511	11.05	
	双核苷酸 Dinucleotide	-	-	-	-	631	605	333	322	317	241	181	121	87	268	3106	13.67	
	三核苷酸 Trinucleotide	-	-	3832	1092	1420	485	457	167	138	81	69	27	25	63	7856	34.58	
	四核苷酸 Tetranucleotide	1616	1905	957	399	165	84	48	14	7	7	3	-	1	1	5207	22.92	
	五核苷酸 Pentanucleotide	1680	314	115	28	23	9	7	6	9	4	2	2	-	8	2207	9.71	
	六核苷酸 Hexanucleotide	1304	369	111	23	6	7	1	2	1	2	1	-	-	5	1832	8.06	
	总计 Total	4600	2588	5015	1542	2245	1190	846	511	472	335	256	150	524	2445	22719	100.00	
	比例 Percentage/%	20.25	11.39	22.07	6.79	9.88	5.24	3.72	2.25	2.08	1.47	1.13	0.66	2.31	10.76	100.00		

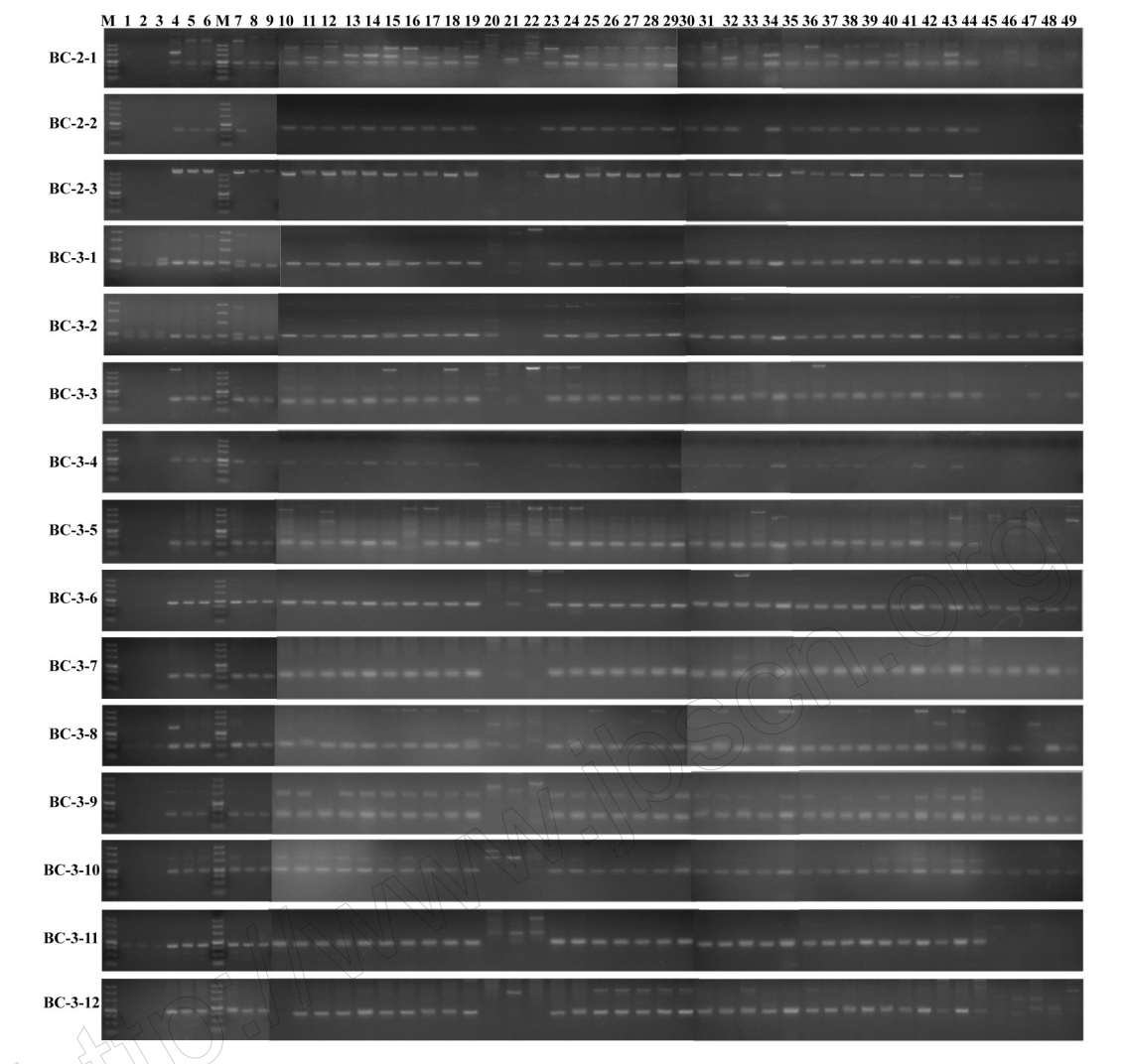


图 4 不同地理种群瓜实蝇监测样本 SSR 引物的 PCR 扩增图

Fig.4 The PCR amplification of *B. cucurbitae* populations from different regions by using 15 pairs of SSR primers
M; 500 bp DNA marker; 1~3; 新疆种群; 4~6; 天津种群; 7~9; 江苏种群; 10~14; 海南种群; 15~19; 云南种群; 20~24; 广西种群; 25~29; 北京种群; 30~34; 广东种群; 35~39; 浙江种群; 40~44; 上海种群; 45~49; 四川种群。
M; 500 bp DNA marker; Line1-3; Xinjiang; 4-6; Tianjin; 7-9; Jiangsu; 10-14; Hainan; 15-19; Yunnan; 20-24; Guangxi; 25-29; Beijing; 30-34; Guangdong; 35-39; Zhejiang; 40-44; Shanghai; 45-49; Sichuan.

2.5 瓜实蝇不同地理种群群体间的系统发育分析

2.5.1 遗传一致度和遗传距离 对 11 个瓜实蝇不同地理种群的监测样本进行遗传一致度和遗传距离的计算,对角线上三角为遗传一致度,下三角为遗传距离。结果(表 6)表明,海南和天津的 Nei's 遗传距离最近,为 0.0210,北京和新疆的 Nei's 遗传距离最远,为 0.8207。遗传一致度范围为 0.4401~0.9792,说明瓜实蝇的不同省市监测样本之间存在一定的基因交流,不同地区间的差异不同。

2.5.2 聚类分析 对 11 个不同省市的瓜实蝇监测样本进行系统发育分析,通过 UPGMA 构建的系统发育树如图 6 所示,新疆、四川和广西种群归为一

支(分支 4),北京种群聚为一支(分支 3),浙江、广东、江苏的种群归为一支(分支 2),上海、云南、海南、天津的种群聚为一支(分支 1)。

2.5.3 Nei's 遗传变异分析 群体遗传分化分析表明,由 Popgene32 软件聚类分析所得到的 11 个省市监测样本间基因分化系数为 0.6712,表明瓜实蝇不同地理种群间遗传分化,在总的变异中,67.12%的变异发生在种群间,32.88%的变异发生在种群内部,瓜实蝇的 49 个监测样本中总遗传多样性和平均遗传多样性分别为 0.2903 和 0.0954,49 个监测样本间的基因流较低,为 0.2449。

表 6 不同地理种群瓜实蝇监测样本中 Nei's 遗传一致度和遗传距离
Table 6 Nei's genetic identity and genetic distance in *B. cucurbitae* populations from different regions

种群 Population	新疆 Xinjiang	天津 Tianjin	海南 Haikou	云南 Yunnan	广西 Guangxi	北京 Beijing	广东 Guangzhou	江苏 Jiangsu	浙江 Hangzhou	上海 Shanghai	四川 Sichuan
新疆 Xinjiang	*	0.4496	0.4914	0.4783	0.7642	0.4401	0.5688	0.6118	0.5887	0.4928	0.8235
天津 Tianjin	0.7994	*	0.9792	0.9622	0.6131	0.9062	0.9083	0.8860	0.8780	0.9221	0.5897
海南 Haikou	0.7105	0.0210	*	0.9515	0.6349	0.8719	0.9114	0.8775	0.8885	0.9292	0.6244
云南 Yunnan	0.7375	0.0385	0.0497	*	0.6411	0.8745	0.9192	0.8924	0.8993	0.9294	0.6296
广西 Guangxi	0.2689	0.4893	0.4542	0.4446	*	0.5048	0.6040	0.6004	0.5808	0.6094	0.7172
北京 Beijing	0.8207	0.0985	0.1371	0.1341	0.6837	*	0.8867	0.8537	0.8628	0.8429	0.5875
广东 Guangzhou	0.5642	0.0962	0.0928	0.0842	0.5042	0.1203	*	0.9577	0.9733	0.9160	0.7200
江苏 Jiangsu	0.4914	0.1211	0.1307	0.1138	0.5101	0.1582	0.0432	*	0.9481	0.8997	0.7605
浙江 Hangzhou	0.5299	0.1302	0.1182	0.1062	0.5434	0.1476	0.0271	0.0533	*	0.9352	0.7344
上海 Shanghai	0.7077	0.0811	0.0735	0.0732	0.4952	0.1710	0.0877	0.1057	0.0670	*	0.6851
四川 Sichuan	0.1942	0.5282	0.4709	0.4627	0.3324	0.5318	0.3285	0.2737	0.3087	0.3781	*

对角线(*) 上三角为遗传一致度,下三角为遗传距离。
Above the diagonal(*) is the Nei's genetic identity and below the diagonal is the genetic distance.

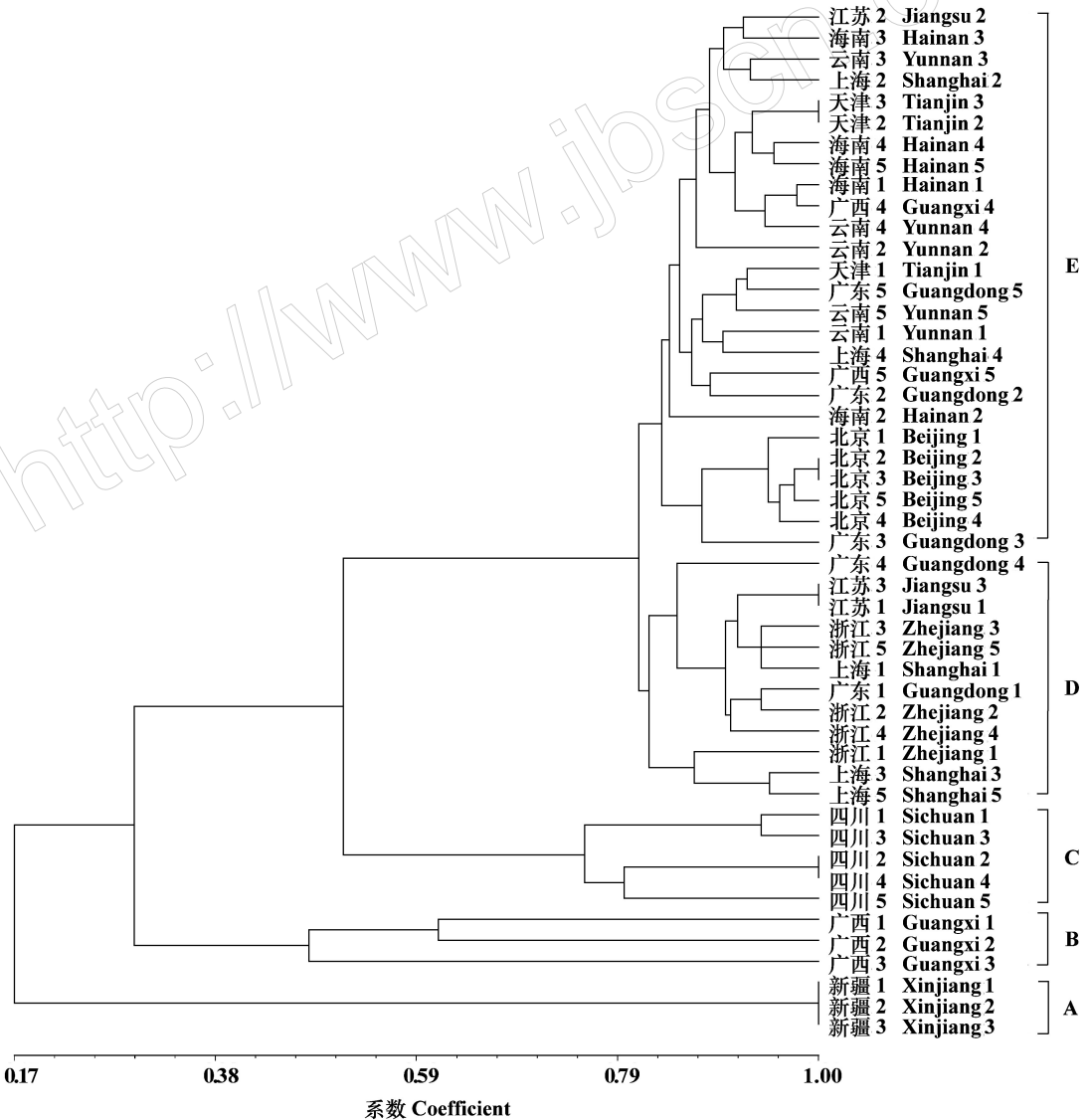


图 5 不同地理种群瓜实蝇监测样本基于 SSR 多态性的聚类分析图
Fig.5 The neighbor-joining tree based on SSR data of *B. cucurbitae* populations from different regions

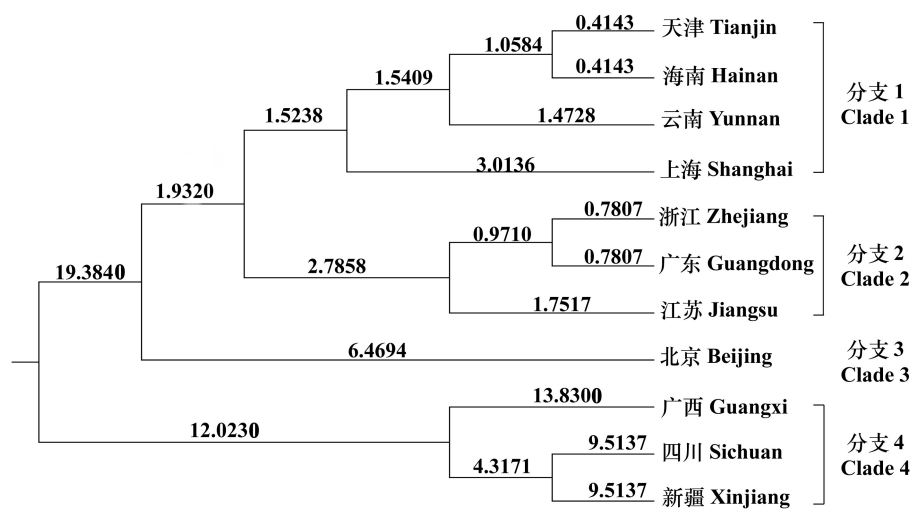


图 6 基于 Nei's 标准遗传距离的不同地理种群瓜实蝇监测样本的聚类图

Fig.6 Dendrogram of *B. cucurbitae* populations from different regions based on Nei's standard genetic distance

3 讨论

随着国际贸易量及出入境人员交流的增加,越来越多新鲜水果和蔬菜等农产品通过口岸出入境,大大增加了危险性有害生物随农产品贸易、旅客携带或邮寄物等方式入境的可能,进而威胁我国农产品生产安全(韦兵等,2017)。在这些有害生物种类中,截获频次最高且最具威胁的是实蝇类害虫,其主要以幼虫危害果实,使受害树大量落果,受害水果商品价值受到严重影响。植物检疫性实蝇以离腹寡毛实蝇属的害虫种类最多,如瓜实蝇等所能造成的危害最严重(李磊等,2018; Mwatawala *et al.*, 2015)。早在 1987 年,日本检疫部门为防止瓜实蝇传入日本地区,禁止从我国进口葫芦科瓜果,适逢新疆哈密瓜 *Cucumis melo* var. *saccharinus* 生长期,经过调研那时仅有南方地区有瓜实蝇分布,后才解除对新疆哈密瓜的进口限制(张遵雄,1988)。2006 年,中方和日方就中国蔬菜输日问题协商时曾再次关注瓜实蝇在我国的分布情况(孔令斌等,2008),因此采用分子生物学方法,利用口岸监测的瓜实蝇样本来研究我国瓜实蝇不同地理种群遗传结构是极有意义的。

本研究发现,瓜实蝇转录组数据的微卫星位点较为丰富,SSR 的出现频率远大于桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* Hendel 转录组(魏丹丹等,2014)、扶桑绵粉蚧转录组及齿缘刺猎蝽 *Scloмина erinacea* Stal 转录组(黎东海和赵萍,2019; 罗梅等,2014),可能与物种遗传信息丰富度、转录组测序质量、SSR 分析软件及其筛选标准有关。不同地理种群的瓜实

蝇转录组中的 SSR 主要重复类型为三核苷酸重复,约占各自总 SSR 数量的 1/3 以上,三核苷酸重复类型更为稳定,符合遗传密码规律,与齿缘刺猎蝽转录组分析一致(黎东海和赵萍,2019)。本研究在筛选多态性 SSR 引物时,考虑到低级单元 SSR 的普遍比高级单元的 SSR 具有更为丰富的多态性(Dreisingacker *et al.*, 2004),结合 SSR 分析数据,从 SSR 的平均长度来看,单核苷酸重复类型的平均长度最大,双核苷酸、三核苷酸次之,但单核苷酸重复类型错配率较高,因此重点设计双核苷酸及三核苷酸重复微卫星引物,以提高多态性引物筛选效率。

从本研究监测样本的聚类结果来看,新疆、四川、北京 3 个地区的瓜实蝇样本同一地区聚集效果较好;浙江的监测样本与上海、江苏、广东的部分样本聚集成一支,可能与浙江和这 3 个地区地理距离较为接近,水果运输较为频繁有关。天津、海南、云南和上海、江苏、广西、广东的部分样本聚集在一起。总体来看,上海、广东、云南的瓜实蝇监测样本遗传多样性最为丰富,上海和广东为我国主要水果进境指定口岸,云南的地理位置特殊,与实蝇高适生区东南亚接壤,瓜实蝇流动性较强。不同地理种群瓜实蝇的种群间系统发育分析显示,基因分化系数为 0.6712,在总的变异中,67.12% 的变异发生在种群间,说明这 11 个省市间的瓜实蝇种群具有不同的遗传背景。聚类分析表明,天津、海南、云南、上海聚为一支,浙江、广东、江苏聚为一支,北京单独聚成一支,广西、四川、新疆聚为一支。这些结果表明,我国不同口岸的瓜实蝇具有不同的来源地,

因此具有不同的遗传背景。也有部分口岸虽然相距较远,但其瓜实蝇具有相似的遗传背景,表明可能具有相同的来源地或者不同来源地的瓜实蝇具有相似的遗传背景。

本研究结果为检疫性外来有害生物监测提供了科学的理论依据和技术指导,对于上海、广东、云南这 3 个瓜实蝇遗传结构较为丰富的地区,需重点监测瓜实蝇动态,对进出境水果及由于边境交流进入的检疫性有害生物需进行严格的实蝇检疫筛查。对于新疆、四川、北京地区瓜实蝇需进行综合防控,减少其对外交流,努力控制实蝇危害范围。由于实蝇具有地理种群差异,后续可增加监测点,扩增实验样本,通过分析种间进化关系,有望对瓜实蝇的来源地进行初步的判断,为国际贸易争端提供谈判和解决依据。

参考文献

何恒果, 2008. 分子标记技术在昆虫种群遗传学研究中的应用. 西华师范大学学报(自然科学版), 29(4): 342-347.

孔令斌, 林伟, 李志红, 万方浩, 王之岭, 黄冠胜, 2008. 基于 CLIMEX 和 DIVA-GIS 的瓜实蝇潜在地理分布预测. 植物保护学报, 35(2): 148-154.

罗梅, 张鹤, 宾淑英, 林进添, 2014. 基于转录组数据高通量发掘扶桑绵粉蚧微卫星引物. 昆虫学报, 57(4): 395-400.

李梅梅, 李伯辽, 仵均祥, 许向利, 2018. 我国粘虫种群的微卫星位点筛选及遗传多样性分析. 昆虫学报, 61(6): 712-729.

李磊, 韩冬银, 牛黎明, 张方平, 陈俊谕, 符悦冠, 2019. 瓜实蝇对 39 种寄主适应度的评估. 环境昆虫学报, 41(5): 1057-1064.

黎东海, 赵萍, 2019. 基于转录组数据的齿缘刺猎蝽微卫星分子标记开发. 昆虫学报, 62(6): 694-702.

韦兵, 张传飞, 曹志玲, 董智凯, 刘娜, 杨可航, 2017. 广东口岸进境旅客携带物截获植物检疫性有害生物疫情分析. 植物检疫, 31(5): 60-63.

魏丹丹, 石俊霞, 张夏瑄, 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.

张遵雄, 1988. 新疆查无瓜实蝇. 植物保护, 14(3): 25.

BADOUIN H, BELKHIR K, GREGSON E, GALINDO J, SUNDSTRÖM L, MARTIN S J, BUTLIN R K, SMADJA C M, 2013. Transcriptome characterisation of the ant *Formica exsecta* with new insights into the evolution of desaturase genes in social hymenoptera. *PLoS ONE*, 8(7): e68200.

CHRISTENSON L D, FOOTE R H, 1960. Biology of fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 5: 171-192.

DREISIGACKER S, ZHANG P, WARBURTON M L, VAN GINKEL M, HOISINGTON D, BOHN M, MELCHINGER A E, 2004. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different megaenvironments. *Crop Science*, 44(2): 381-388.

JONES A G, SMALL C M, PACZOLT K A, 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 10(1): 6-30.

KOFLER R, SCHLÖTTERER C, LELLEY T, 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*, 23(13): 1683-1685.

MWATAWALA M, KUDRA A, MKIGA A, 2015. Preference of *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) for three commercial fruit vegetable hosts in natural and semi natural conditions. *Fruits*, 70(6): 333-339.

NEI M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3): 583-590.

NISHIDA T, BESS H A, 1950. Applied ecology in *B.cucurbitae* control. *Journal of Economic Entomology*, 43(6): 877-883.

PASCOAL S, KILNER R M, 2017. Development and application of 14 microsatellite markers in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides* reveals population genetic differentiation at local spatial scales. *PeerJ*, 5: e3278.

UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH B C, REMM M, ROZEN S G, 2012. Primer3 — new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115.

YEH F C, BOYLE T, 1997. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129: 57.

(责任编辑:郑珊珊 郭莹)