

重庆市 26 个南亚果实蝇种群 mtDNA 16S rRNA 基因部分序列及其系统进化^{*}

王泽乐^{1,2} 刘映红^{1**} 刘 洪² 张昌伦³ 王梓英¹

(1. 西南大学植物保护学院 重庆市昆虫学及害虫控制工程重点实验室 重庆 400715;

2. 重庆市农业技术推广总站 重庆 400020; 3. 重庆市沙坪坝区植保植检站 重庆 400030)

Partial sequences on mtDNA 16S rRNA and phylogeny in 26 populations of *Bactrocera tau* in Chongqing.
WANG Ze-Le¹, LIU Ying-Hong^{1**}, LIU Hong², ZHANG Chang-Lun³, WANG Zi-Ying¹ (1. *Chongqing Key Laboratory of Entomology & Insect Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China*; 2. *Chongqing Agriculture Technique Extension Station, Chongqing 400020, China*; 3. *Plant Protection and Quarantine Station of Shapingba, Chongqing 400030, China*)

Abstract Approximately 350 base pairs of mitochondrial 16S rRNA gene from 26 populations of *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae) in Chongqing were sequenced. Of these sequences, means of A, T, C and G were 35.0%, 41.3%, 7.2% and 16.5%. Furthermore, 342 conserved sites, 5 variable sites, 2 parsimony information sites and 2 singleton sites were revealed in 351bp sequences. A total of transition and transversion among mtDNA 16S rRNA gene were 136 and 50 respectively. The molecular phylogenetic trees reconstructed by MEGA2.1 software methods suggested that there is consistent evolutionary relationship among the 21 populations. The genetic differences existed among another 5 population was very small.

Key words *Bactrocera tau*, population, mtDNA, 16S rRNA, phylogeny

摘 要 对重庆市 26 个南亚果实蝇 *Bactrocera* (*Zeugodacus*) *tau* (Walker) 种群线粒体 16S rRNA 基因进行测序, 获得长约 350 bp 片段的序列。对获得的序列分析表明, A, T, C, G 平均含量分别为 35.0%, 41.3%, 7.2%, 16.5%, 其中保守位点数 342 个, 变异位点数 5 个, 简约信息位点 2 个, 自裔位点 2 个, 所有碱基转换总数为 136, 替换总数为 50。利用 MEGA2.1 软件重建系统发生树, 发现其中 21 个南亚果实蝇种群未出现分化, 另外有 5 个南亚果实蝇种群出现了分化, 但遗传分化程度小。

关键词 南亚果实蝇, 种群, 线粒体基因, 16S rRNA, 系统进化

南亚果实蝇 *Bactrocera* (*Zeugodacus*) *tau* (Walker) 隶属双翅目 Diptera、实蝇科 Tephritidae、果实蝇属 *Bactrocera*, 主要危害南瓜、丝瓜、苦瓜、黄瓜、冬瓜、柑橘、柚、西瓜、木瓜、番茄、茄子、辣椒、番石榴、芒果等, 是蔬菜和果树上的一种重要检疫性害虫^[1,2]。

目前, 对南亚果实蝇的鉴定主要是基于其成虫的形态特征, 国内还尚无学者对该类实蝇种下分化特征进行研究, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 可以通过现代分子技术获得物种特定遗传标记的大量数据, 从而对其种下分化进行研究。本研究利用 mtDNA 16S rRNA 基因

部分序列对 26 个南亚果实蝇种群进行了研究, 建立系统进化树, 为其种下分化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试样品

本研究所用的南亚果实蝇种群均来自重庆市 26 个区县 2005 年 4 月~10 月所诱集的标本, 见表 1。所有标本用无水乙醇浸泡, 4℃保存。

* 教育部博士点基金资助项目 (2005216)。

** 通讯作者, E-mail: yhliu@swu.cn

表 1 供试实蝇种类南亚果实蝇、采集时间及地点

实蝇种群代号	采集地点	采集时间(年. 月)
Wulongny	武隆	2005 5
Changshny	长寿	2005 5
Chengkny	城口	2005 6
Kaixianny	开县	2005 7
Wushanny	巫山	2005 6
Fengjieny	奉节	2005 5
Yongchny	永川	2005 7
Bananny	巴南	2005 8
Wanzhny	万州	2005 6
Yunyny	云阳	2005 8
Xiushanny	秀山	2005 6
Hechny	合川	2005 7
Yubeiny	渝北	2005 4
Jiulpony	九龙坡	2005 7
Nanchny	南川	2005 6
Wuxiny	巫溪	2005 9
Tonglny	铜梁	2005 9
Beibeiny	北碚	2005 4
Youyangny	酉阳	2005 8
Zhongxny	忠县	2005 6
Jiangjny	江津	2005 8
Qianjny	黔江	2005 7
Liangpny	梁平	2005 5
Jiangbny	江北	2005 6
Dianjny	垫江	2005 7
Fulingny	涪陵	2005. 10

1.2 总 DNA 提取

本实验选用南亚果实蝇成虫(约 1 g)为实验材料,参考田英芳等^[3]、刘运强等^[4]和赵中明等^[5]的苯酚/氯仿法并加以改动。实蝇总 DNA 溶于 25 μL 双蒸水中,−20℃保存备用。

1.3 PCR 扩增及序列测定

扩增的目的片段为 mtDNA 16S rRNA 基因中片段长度为 350 bp 的一段序列。扩增引物参考 Muraji 等^[6]提供的引物,其序列和长度见表 2。引物由上海生工生物有限公司合成。

PCR 反应的总体积为 50 μL,其中含有 9 μL 10×buffer, 4 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 1.5 μL dNTP, 引物(10 pmol/L)各 4 μL, 0.5 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/μL), 5 μL 模板 DNA, 其余用 ddH₂O 补充至 50 μL。扩增条件为 94℃预变性 3 min, 接着进行 35 个热循环: 94℃变性 45 S, 56℃退火 60 S, 72℃延伸 90 S, 循环完成后在 72℃充分延伸

10 min, 在 4℃下保存。每次 PCR 扩增均设不含模板的阴性对照和 ddH₂O 空白对照。PCR 粗产物的纯化及测序委托上海生工生物有限公司完成。测序反应均在 ABI100-377 测序仪上进行。

1.4 DNA 序列数据处理

序列分析采用 Clustal X1.81 进行比对。利用 MEGA2.1 分析各种群间线粒体 12S rRNA 基因的遗传距离和转换颠换值,用 Kimura-2-Parameter 双参数模型分析,并计算出各种群的遗传距离,用邻近法(neighbor-joining method, NJ 法),非加权配对算术平均法(unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA),最小进化法(minimum evolution, ME),最简约法(maximum parsimony, MP)重建系统发生树,系统发生树中结点的自举检验置信度以 1 000 次重复计算估计(图 1,图 2)。

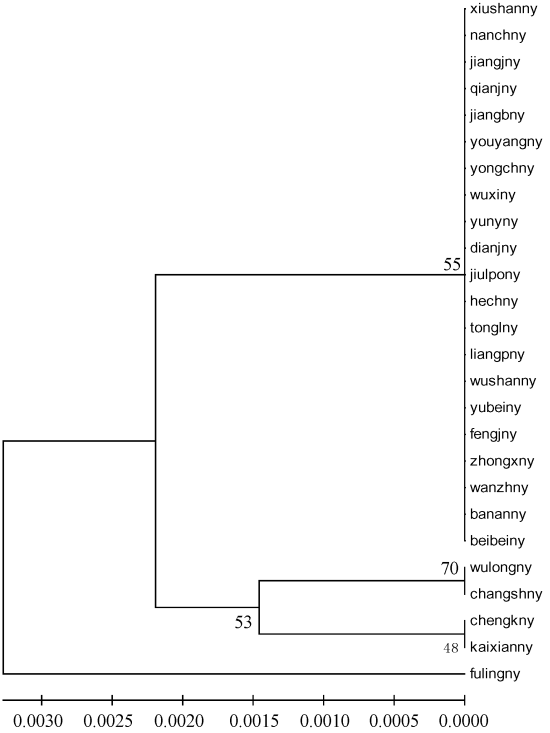


图 1 重庆市 26 个区县南亚果实蝇 UPGMA 树(MEGA2.1)

表 2 引物序列及长度

引物	序列	目的片段	长度
F ₁	5'-ATCCAACATCGAGGTGCGAAAC-3'	350 bp	22 bp
R ₁	5'-GGCTGCTATGAACGGTGGACGAG-3'		24 bp

2 结果与分析

2.1 基因组总 DNA 的提取

本实验所用的标本均用存放于 4℃ 的无水乙醇浸泡的标本,选用的组织为去翅和足的实际蝇成虫(约 1g)。在 DNA 提取过程中未专门去除 RNA,提取的总 DNA 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2 PCR 扩增结果

利用 F1/R1 引物对提取的总 DNA 进行 PCR 扩增。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行电泳,电泳结果均可看到 1 条清晰的特异性扩增

产物,大小约为 350 bp 左右。双向测序结果经过人工校正后,在 NCBI 中利用 BLASTn 进行相似性搜索后,确认所得序列为实蝇科线粒体 16S rRNA 基因部分序列,其片段长度为 346 bp。所测南亚果实蝇的 16S rRNA 基因序列与 Genbank 数据库中的南亚果实蝇(AB048746)的同源性超过了 98%。

2.3 重庆市 26 个区县南亚果实蝇 16S rRNA 基因序列比较

重庆市 26 个区县南亚果实蝇 16S rRNA 基因序列比较如图 3(包括 Gap)所示。

从图 3 中可以看出,巫山和奉节南亚果实蝇种群在 16S rRNA 基因片段 42 bp 处、43 bp 处分别都缺失了 1 个 T 碱基、1 个 A 碱基,南川南亚果实蝇种群在 16S rRNA 基因片段 145 bp 处和 205 bp 处分别插入了 1 个 A 碱基,奉节南亚

表 3 重庆市 26 个南亚果实蝇种群 mtDNA 16S rRNA 基因序列转换/颠换数(对角线上)及遗传距离百分比(对角线下)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1		0/0	1/0	1/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/2
2	0.00		1/0	1/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/2
3	0.30	0.30		0/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/2
4	0.60	0.30	0.00		1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/2
5	0.60	0.60	0.30	0.30		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
6	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00		1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
7	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
8	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
9	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
10	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
11	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
12	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
13	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
14	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
15	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
16	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
17	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
18	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
19	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
20	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
21	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/0	0/2
22	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/0	0/2
23	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/0	0/2
24	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/0	0/2
25	0.60	0.60	0.30	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0/2
26	1.20	1.20	0.90	0.90	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60

wulongny (346)	1	60
changshny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
chengkny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
kaixianny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
wushanny (344)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
fengjny (345)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
yongchny (347)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
bananny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
wanzhny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
yunyny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
xiushanny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
hechny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
yubeiny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
jiulpony (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
nanchny (349)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
wuxiny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
tonglny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
beibeiny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
youyangny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
zhongxny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
jiangjny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
qianjny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
liangpny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
jiangbny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
dianjny (346)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	
fulingny (347)	GGCTGGTATGAACGGTTGGACGAGGTATAAGCTGTTTCATATAAAATTTATAATAGAAATTT	

wulongny	61	120
changshny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
chengkny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
kaixianny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
wushanny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
fengjny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
yongchny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
bananny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
wanzhny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
yunyny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
xiushanny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
hechny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
yubeiny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
jiulpony	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
nanchny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
wuxiny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
tonglny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
beibeiny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
youyangny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
zhongxny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
jiangjny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
qianjny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
liangpny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
jiangbny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
dianjny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	
fulingny	TATATTTTGTAGCAAAAAGCTAAAATATTATTAAAAGACGAGAGACCCCTATAAATCTTTA	

wulongny	121	180
changshny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
chengkny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
kaixianny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
wushanny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
fengjny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
yongchny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
bananny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
wanzhny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
yunyny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
xiushanny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
hechny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
yubeiny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
jiulpony	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
nanchny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
wuxiny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
tonglny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
beibeiny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
youyangny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
zhongxny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
jiangjny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
qianjny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
liangpny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
jiangbny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
dianjny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	
fulingny	TATTTTTTTTATTAAATTTTTT-GGCTTTATTTTATTTTATAATAGAAAATATTTTG	

图 2 重庆市 26 个区县南亚果实蝇 NJ 树(MEGA2 1)

wulongny	181	240
changshny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
chengkny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
kaixianny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
wushanny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
fengjny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
yongchny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
bananny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
wanzhny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
yunyny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
xiushanny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
hechny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
yubeiny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
jiulpony	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
nanchny	TTAGGGGTGATGTTAAATTTAATAGAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
wuxiny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
tonglny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
beiibeiny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
yoyuangny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
zhongxny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
jiangjny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
qianjny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
liangpny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
jiangbny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
dianjny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
fulingny	TT-GGGGTGATGTTAAATTTAAT-GAACTTTTAAATTATAAAAAATCATTAAATTATGAG	
	*** *****	
wulongny	241	300
changshny	TTACTGATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
chengkny	TTACTGATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
kaixianny	TTACTGATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
wushanny	TTACTGATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
fengjny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
yongchny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
bananny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
wanzhny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
yunyny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
xiushanny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
hechny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
yubeiny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
jiulpony	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
nanchny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
wuxiny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
tonglny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
beiibeiny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
yoyuangny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
zhongxny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
jiangjny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
qianjny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
liangpny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
jiangbny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
dianjny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
fulingny	TTATGTATCCATTAGTAGTGATTATAGATTAAAGTTACTTTAGGGATACACGCGTAATTT	
	*** *****	
wulongny	301	351
changshny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
chengkny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
kaixianny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
wushanny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
fengjny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
yongchny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
bananny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
wanzhny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
yunyny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
xiushanny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
hechny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
yubeiny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
jiulpony	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
nanchny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
wuxiny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
tonglny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
beiibeiny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
yoyuangny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
zhongxny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
jiangjny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
qianjny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
liangpny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
jiangbny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
dianjny	TT-TTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
fulingny	TTATTGGAGAG-TTCATATCGATAAAAAAGTTTGGGACCTCGATGTTGGAT	
	*** *****	

图 3 重庆市 26 个区县南亚果实蝇 16S rRNA 基因序列比较图

果实蝇种群在 16S rRNA 基因片段 312 bp 处插入了 1 个 G 碱基,永川南亚果实蝇种群在 16S rRNA 基因片段 312 bp 处插入了 1 个 A 碱基,涪陵南亚果实蝇种群在 16S rRNA 基因片段 303 bp 处插入了 1 个 A 碱基。

2.4 南亚果实蝇 16S rRNA 基因碱基转换/颠换数及遗传分析

整个南亚果实蝇 16S rRNA 部分序列片段中,A+T 含量较高,G+C 含量较低,A,T,C,G 平均含量分别为 35.0%,41.3%,7.2%,16.5%,所有碱基转换总数为 136,替换总数为 50,转换/颠换平均值为 2.72,转换数高于颠换数。遗传距离在不同南亚果实蝇间最大是 1.2%,最小是 0.00%,即序列相同,其中有 21 个区县南亚果实蝇 16S rRNA 基因序列没有差异。所有序列的平均遗传距离为 0.2%。

经 MEGA2.1 软件对各序列进行分析,南亚果实蝇 16S rRNA 基因序列碱基的置换和序列遗传距离百分比如表 3 所示。所测序列经 Clustal X 1.81 软件比对共 351 bp(含引物和 Gap),其中保守位点数(C: Conserved sites)342 个,变异位点数(V: Variable sites)5 个,简约信息位点(Pi: Parsimony Information sites)2 个,自裔位点(S: Singleton sites)2 个。

3 系统发育关系

16S rRNA 基因大约由 1 500 个核苷酸组成,其进化速率要快于细胞核 DNA 编码的核糖体 RNA,常用于 300 Ma 以内分歧类群的系统学研究^[7]。16S rRNA 基因有几个显著的特点受得研究者青睐:一是该基因存在于所有昆虫体内;二是该基因具有高度的保守性和特异性^[8];三是该基因序列有足够长,包含大约 50 个左右的功能域。因此,16S rRNA 基因在许多领域中都被用来研究系统发育关系。

从 26 个南亚果实蝇种群 mtDNA 16S rRNA

基因序列构建的系统发育树分析发现,所构建的系统树大致分为 3 支。从系统发育树可以看出,城口、开县的南亚果实蝇种群聚在一起,并未出现分化;武隆、长寿的南亚果实蝇种群聚在一起,并未出现分化,同时与城口、开县的南亚果实蝇种群有着较近的亲缘关系,但这 4 个种群较其余种群的遗传距离有差异,尽管存在如此的差异性,但其遗传距离不超过 0.006。在 UPGMA 树中,涪陵南亚果实蝇种合群 mtDNA 16S rRNA 基因序列与其与区县分为了不同的一支,这表明涪陵的南亚果实蝇种群已有一定程度的分化,但分化程度较低,遗传距离也仅有 0.012。通过以上分析发现,重庆市 26 个南亚果实蝇种群虽然部分种群有一定的遗传距离,但从总体上来看这 26 个南亚果实蝇种群还未出现分化现象。

致谢 本研究标本的鉴定得到中国科学院动物研究所汪兴鉴先生、重庆西南大学植物保护学院朱文炳先生、陈力教授的指导,同时本试验地开展得到了重庆市农技推广总站植物检疫科的大力支持,谨此致谢!

参 考 文 献

- 1 汪兴鉴. 植物检疫, 1995, 9(1): 20~30.
- 2 汪兴鉴. 植物检疫, 1995, 9(2): 84~90.
- 3 田英芳, 黄刚, 郑哲民, 魏朝明. 陕西师范大学学报(自然科学版), 1999, 27(4): 82~84.
- 4 刘运强, 廖顺尧, 鲁成, 周泽扬. 蚕学通讯, 2000, 20(3): 5~8.
- 5 赵中明, 陆剑, 戴灼华. 动物学报, 2001, 47(6): 625~631.
- 6 Muraji M., Nakahara S. *Appl. Entomol. Zool.*, 2002, 37(3): 437~446.
- 7 黄原. 分子系统学: 原理、方法及应用. 北京: 中国农业出版社, 1998. 70~72.
- 8 Hugsman E., Wachter R. *Nucléic Acid Res.*, 1986, 14(suppl.): 73.