

基于 RAPD 和 SRAP 分子标记的 柑桔大实蝇种群多态性及其亲缘关系研究^①

刘浩强¹, 张云飞², 李鸿筠¹, 冉春¹,
胡军华¹, 姚廷山¹, 王进军², 赵志模²

1. 中国农业科学院 柑桔研究所/西南大学 柑桔研究所, 400712; 2. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715

摘要: 目的: 利用 RAPD(Random Amplified polymorphic DNA)和 SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism)分子标记技术, 研究来自重庆、湖北、四川和陕西 4 省市 10 个地理种群柑桔大实蝇的亲缘关系. 方法: 利用 10 条 RAPD 引物和 5 对 SRAP 引物对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的基因组 DNA 进行扩增, 统计多态性谱带, 然后运用 DPS 统计分析软件进行遗传多态性及聚类分析. 结果: 10 条 RAPD 引物扩增产生 152 条清晰稳定的谱带, 其中多态性谱带 132 条, 多态性谱带的比例为 86.84%; 不同地理种群间的遗传距离在 0.250 0~0.625 0 之间, 10 个地理种群的柑桔大实蝇被划分为 4 个大类群. 5 对 SRAP 引物扩增共获得 66 条重复性好的清晰谱带, 其中多态性谱带 60 条, 多态性谱带比例为 90.91%, 不同地理种群间的遗传距离在 0.200 0~0.789 5 之间, 10 个地理种群的柑桔大实蝇被分为 5 个大的类群. 将 RAPD 和 SRAP 两种标记的数据整合, 聚类结果显示, 10 个地理种群的柑桔大实蝇被划分为 6 个大类群. 结论: 柑桔大实蝇不同地理种群间具有丰富的遗传多样性, 两种方法结合分析更能准确地反映不同地理种群间的亲缘关系.

关键词: 柑桔大实蝇; 地理种群; DNA 多态性; 随机扩增多态性; 相关序列扩增多态性

中图分类号: S436.661.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0049-08

柑桔是世界第一大水果, 年产量超过 1 亿 t, 约占世界水果总产量的四分之一. 改革开放以来, 中国柑桔业迅猛发展, 柑桔业已成为中国南方广大地区、贫困山区和三峡库区农村经济支柱产业之一, 在农村产业结构调整、农民脱贫致富、城乡人民就业和生态环境改善中发挥了重要作用. 柑桔大实蝇 *Bactrocera (Tetradacus) minax* (Enderlein) 俗称“柑蛆”, 又名桔大实蝇、柑桔大果蝇, 被害果称“蛆果”、“柑蛆”, 是国际国内植物检疫性有害生物^[1]. 传统的柑桔大实蝇鉴定方法一直是以形态学为主要依据, 但该方法在幼虫期不能准确快速地检测与鉴定出柑桔大实蝇. 为了能够快速、准确地检测和监测柑桔大实蝇, 搞清楚不同地理种群之间的遗传关系, 近年来迅速发展的 DNA 分子标记技术为柑桔大实蝇的系统鉴定和亲缘关系分析提供了新的方法.

① 收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 公益性行业科研专项(201203034); “十二五”国家科技支撑项目(2012BAD19B06); 重庆市自然科学基金项目(CSTC2011jjA80025).

作者简介: 刘浩强(1978-), 男, 重庆北碚人, 硕士, 助研, 主要从事柑桔害虫综合防治研究.

RAPD(Random Amplified poloyomorphic DNA)作为显性分子标记^[2-3],具有操作简单、快速,成本较低,对 DNA 的纯度要求不高等特点,在种属特异性鉴定等方面被广泛地应用.而 SRAP(Sequence-Related Amplified Polymorphism)标记是基于 DNA 分子标记技术的不同特点基础上发展起来的新的分子标记技术^[4-5],其引物设计简单,尤其是正向引物的 CCGG 和反向引物的 AATT 核心序列对基因的 ORF 进行扩增,显著提高了扩增结果与表型 / 基因型的相关性.扩增产物因不同物种、不同基因型的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性. SRAP 标记在物种种群遗传结构及亲缘关系分析中得到了广泛的应用^[6-8].本研究选用了 RAPD 和 SRAP 两种分子标记,对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的遗传多态性及其亲缘关系进行分析,探讨 RAPD 或 SRAP 单标记与 RAPD 和 SRAP 双标记对柑桔大实蝇品种的分子标记多态性和聚类的差异,从分子水平为大实蝇不同地理种群的鉴定及疫情监测提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 材 料

供试柑桔大实蝇采自我国发生柑桔大实蝇的 10 个不同地理种群,所采集的样品(成虫、幼虫)浸泡在无水乙醇中,置于-20℃保存.种群的采集点和种群采集个数等信息见表 1.

表 1 供试柑桔大实蝇样本采集地点和日期

来	源	采集时间	采集虫态(数量)
重庆	奉节(朱衣镇)	2011. 11	成虫(20 头)
	武隆(县城)	2010. 10	成虫(30 头)
	巫山(铜鼓镇)	2011. 11	成虫(10 头)
	万州果园	2011. 11	成虫(5 头)
湖北	宜都(红花套镇)	2010. 11	幼虫(10 头)
	当阳(半月镇)	2009. 11	幼虫(10 头)
湖南	湖南怀化(安江县)	2009. 11	幼虫(10 头)
四川	宣汉(南坝镇)	2010. 11	幼虫(15 头)
	江邛(县城)	2010. 11	幼虫(30 头)
陕西	汉中(城固县果园)	2009. 11	成虫(50 头)

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

柑桔大实蝇基因组 DNA 的制备,取柑桔大实蝇虫体,采用 CTAB 法^[9-10]提取基因组 DNA,经琼脂凝胶电泳及紫外分光光度计(UV762 双光束紫外可见分光光度计)检测后,稀释至约 20 ng/μL 备用.

1.2.2 RAPD 分析

RAPD 随机引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.引物编号及序列见表 2. 25 μL PCR 反应体系含 1×PCR Buffer 2.0 μL、1.5 mmol/μL MgCl₂ 1.5 μL, 500 μmol/L dNTPs 1.5 μL, 0.5 μmol/L 上游和下游引物各 1.0 μL, 1 U Taq 酶 0.4 μL, 20 ng/μL DNA 模板 1.0 μL, 补水至 25 μL. 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 60 s, 38℃ 60 s, 72℃ 90 s, 共 32 次循环; 72℃ 延伸 10 min. 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(缓冲液为 1×TBE, 4 V/cm 电泳), 溴化乙锭(EB)染色, 用 Tanon, 2500 凝胶成像系统观察、拍照.

1.2.3 SRAP 分析

SRAP 所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成. PCR 反应体系除采用 SRAP 引物外, 其

余同“1.2.2”扩增程序: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 40 s, 63 ℃ 40 s, 72 ℃ 60 s; 循环 15 次, 每次循环退火温度降低 0.5 ℃; 94 ℃ 40 s, 55.5 ℃ 40 s, 72 ℃ 60 s, 循环 25 次; 72 ℃ 延伸 10 min. PCR 扩增产物检测、拍照同“1.2.2”.

表 2 RAPD 标记引物序列

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
01	ACGCCAGAGG	S125	CGGAATTCCC
02	GAGCGAGGCT	S283	ACAGCCTGCT
03	CAGGGGTGGA	Y01	GCTGCATCTC
04	GGTCTGGTTG	Y06	AAGGCTCACC
S75	GACGGATCAG	Y18	GCTGAGTCAG

1.2.4 数据处理

根据琼脂糖凝胶电泳图谱结果, 每一条 DNA 谱带均为一个分子标记, 并代表一个引物结合位点. 有带计为“1”, 无带计为“0”, 强带和弱带均计为“1”, 组成“0—1”数据矩阵. 采用 DPS 软件, 按 Nei 的方法计算相似系数(genetic similarities)和遗传距离(genetic distance D), 采用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析, 绘制 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的聚类图^[9—13].

2 结果与分析

2.1 引物筛选

筛选出重复性好、谱带清晰、多态性扩增产物条带数较多的 RAPD 引物, 再经过二次筛选获得多态性好的 7 条引物用于本实验.

经过筛选, 获得 5 对扩增条带丰富、清晰、重复性好的 SRAP 引物, 用于 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的多态性扩增, SRAP 引物编号及序列见表 3.

表 3 SRAP 标记引物序列

引物名称	正向引物(5'-3')	引物名称	反向引物(5'-3')
me3F	TGAGTCCAAACCGGAAT	em1R	GACTGCGTACGAATTAAT
me4F	TGAGTCCAAACCGGACC	em2R	GACTGCGTACGAATTTGC
me9F	TTCAGGGTGGCCGGATG	em3R	GACTGCGTACGAATTGAC
me10F	TGGGGACAACCCGGCTT	em10R	GACTGCGTACGAATTCAG
me12F	GGTGAACGCTCCGAAG	em11R	GACTGCGTACGAATTCCA

2.2 RAPD 分析

利用筛选获得的重复性好的 7 条 RAPD 引物(1,2,3,4,S75,Y06 和 Y18)对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇进行扩增, 共获得 152 条谱带, 片段大小在 100~2 000 bp 之间, 平均每个引物扩增出 10.9 条, 最少的扩增出 3 条, 最多的扩增出 16 条, 其中多态性片段有 132 条, 多态位点比例为 86.84%. 引物 01 和 03 扩增结果见图 1.

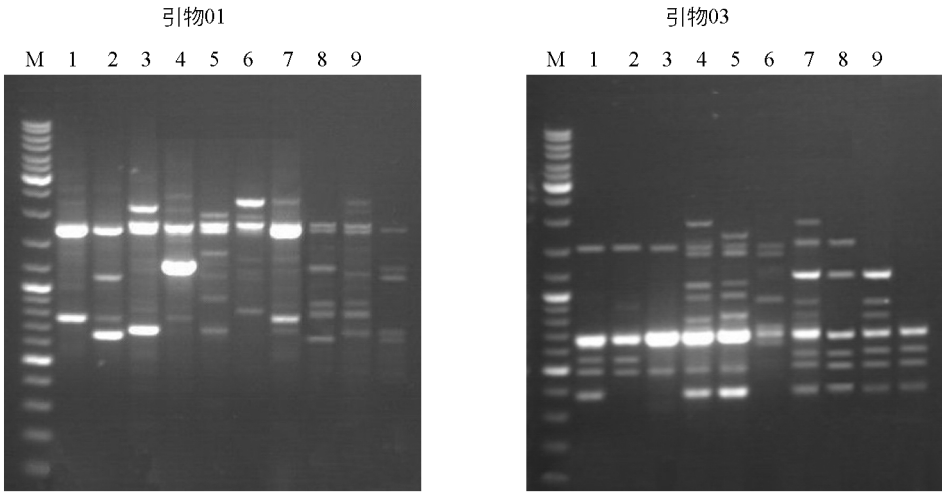
根据条带赋值情况, 利用 DPS 统计分析软件, 按照 Nei 的方法计算出遗传距离(表 4), 并按类平均法(UPGMA)进行聚类分析, 作系统聚类图. 由表 4 可以看出, 10 个地理种群柑桔大实蝇的遗传距离在 0.250 0~0.625 0 之间, 其中重庆奉节和重庆武隆之间的遗传距离最小(0.250 0), 四川宣汉和湖北当阳之间的遗传距离最大(0.625 0). 聚类结果如图 1 所示, 若以遗传距离 0.43 为界点, 可把 10 个地理种群柑桔大实蝇划分为 4 大主要类群, 其中当阳单独分为一个类群, 重庆巫山、重庆万州和湖北宜都划分

为一个类群(图 2).

表 4 基于 RAPD 结果的 10 个不同地理种群柑桔大实蝇种群内与种群间的遗传距离变异范围

地区编号	重庆奉节	重庆武隆	重庆巫山	重庆万州	湖北宜都	湖北当阳	湖南怀化	四川宣汉	四川江邨	陕西汉中
重庆奉节	1.000 0	0.750 0	0.553 2	0.555 6	0.528 3	0.383 0	0.582 6	0.666 7	0.541 7	0.590 9
重庆武隆	0.250 0	1.000 0	0.511 6	0.440 0	0.449 0	0.418 4	0.480 0	0.585 4	0.454 5	0.600 0
重庆巫山	0.446 8	0.488 4	1.000 0	0.631 6	0.678 6	0.520 0	0.561 4	0.583 3	0.470 6	0.595 7
重庆万州	0.444 4	0.560 0	0.368 4	1.000 0	0.698 4	0.526 3	0.625 0	0.581 8	0.448 3	0.518 5
湖北宜都	0.471 7	0.551 0	0.321 4	0.301 6	1.000 0	0.500 0	0.476 2	0.555 6	0.491 2	0.566 0
湖北当阳	0.617 0	0.581 4	0.480 0	0.473 7	0.500 0	1.000 0	0.526 3	0.375 0	0.470 6	0.383 0
湖南怀化	0.407 4	0.520 0	0.438 6	0.375 0	0.523 8	0.473 7	1.000 0	0.581 8	0.655 2	0.555 6
四川宣汉	0.333 3	0.414 6	0.416 7	0.418 2	0.444 4	0.625 0	0.418 2	1.000 0	0.489 8	0.577 8
四川江邨	0.458 3	0.545 5	0.529 4	0.551 7	0.508 8	0.529 4	0.344 8	0.510 2	1.000 0	0.441 7
陕西汉中	0.409 1	0.400 0	0.404 3	0.481 5	0.434 0	0.617 0	0.444 4	0.422 2	0.458 3	1.000 0

注：遗传距离(%) (下三角)和相似系数(%) (上三角).



M: 2 000 bp 相对分子质量标准; 1—10: 表示不同种群, 同表 1.

图 1 引物 01 和 03 对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇 RAPD 扩增图谱

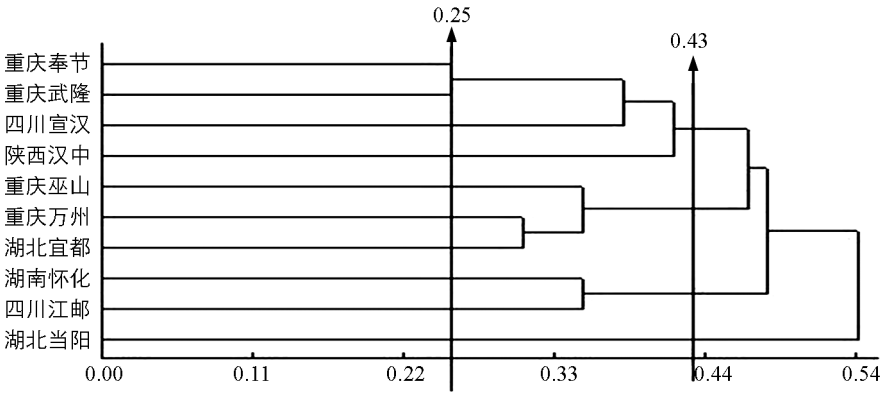
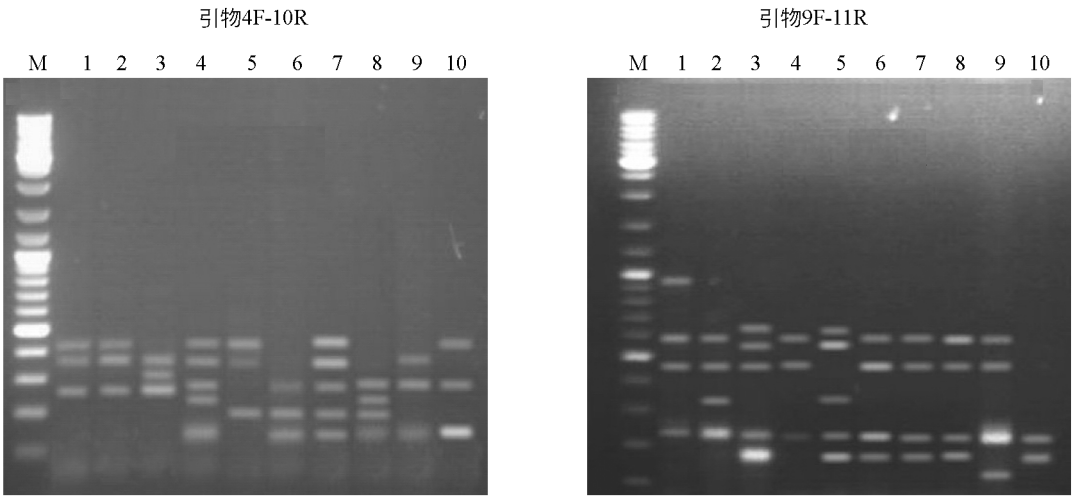


图 2 基于 RAPD 结果构建的 10 个地理种群柑桔大实蝇的 UPGMA 聚类分析

2.3 SRAP 分析

5 对引物组合对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇样品扩增产生的片段为 66 条, 最少引物对的扩增出 1

条, 最多的扩增出了 8 条, 平均为 2.64 条, 片段大小在 100~2 000 bp 之间, 引物 4F-10R 和 9F-11R 扩增图见图 3, 其中多态性片段 60 条、多态位点比例为 90.91%. 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的遗传距离在 0.200 0~0.789 5 之间, 湖北当阳和四川宣汉之间的遗传距离最小, 为 0.200 0, 四川江卣和湖北宜都之间的遗传距离最大, 为 0.789 5(表 5). 聚类结果显示, 若以遗传距离 0.43 为界点, 可把 10 个地理种群柑桔大实蝇划分为 5 大主要类群, 重庆巫山和湖北宜都被划分到一个类群(图 4).



M: 2 000 bp 相对分子质量标准; 1—10: 表示不同种群, 同表 1.

图 3 引物 4F-10R 和 9F-11R 对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇 SRAP 扩增图谱

表 5 基于 SRAP 结果的 10 个不同地理种群柑桔大实蝇种群内与种群间的遗传距离变异范围

地区编号	重庆奉节	重庆武隆	重庆巫山	重庆万州	湖北宜都	湖北当阳	湖南怀化	四川宣汉	四川江卣	陕西汉中
重庆奉节	1.000 0	0.608 7	0.347 8	0.476 2	0.272 7	0.315 8	0.500 0	0.454 5	0.521 7	0.400 0
重庆武隆	0.391 3	1.000 0	0.500 0	0.666 7	0.526 3	0.375 0	0.571 4	0.526 3	0.700 0	0.588 2
重庆巫山	0.652 2	0.500 0	1.000 0	0.444 4	0.631 6	0.750 0	0.476 2	0.421 1	0.500 0	0.470 6
重庆万州	0.523 8	0.333 3	0.555 6	1.000 0	0.352 9	0.571 4	0.736 8	0.588 2	0.555 6	0.533 3
湖北宜都	0.727 3	0.473 7	0.368 4	0.647 1	1.000 0	0.266 7	0.500 0	0.333 3	0.210 5	0.500 0
湖北当阳	0.684 2	0.625 0	0.625 0	0.428 6	0.733 3	1.000 0	0.705 9	0.800 0	0.500 0	0.461 5
湖南怀化	0.500 0	0.428 6	0.523 8	0.263 2	0.500 0	0.294 1	1.000 0	0.600 0	0.476 2	0.555 6
四川宣汉	0.545 5	0.473 7	0.578 9	0.411 8	0.666 7	0.200 0	0.400 0	1.000 0	0.631 6	0.625 0
四川江卣	0.478 3	0.300 0	0.500 0	0.444 4	0.789 5	0.500 0	0.523 8	0.368 4	1.000 0	0.470 6
陕西汉中	0.600 0	0.411 8	0.529 4	0.466 7	0.500 0	0.538 5	0.444 4	0.375 0	0.529 4	1.000 0

注: 遗传距离(%)(下三角)和相似系数(%)(上三角).

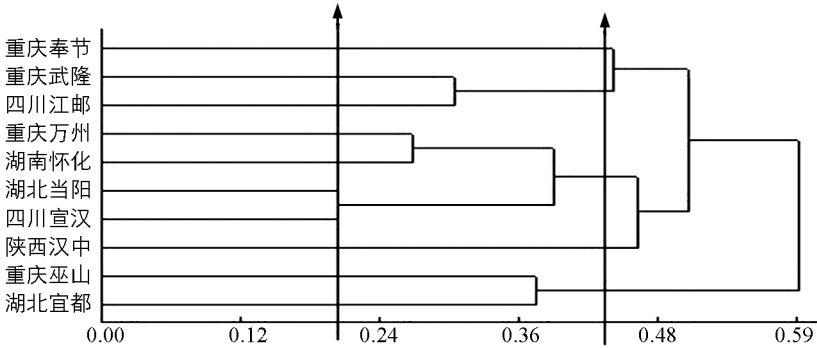


图 4 基于 SRAP 结果构建的 10 个地理种群柑桔大实蝇的 UPGMA 聚类分析

2.4 RAPD 和 SRAP 聚类结果的比较与结合分析

将 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的 152 条 RAPD 扩增条带和 66 条 SRAP 扩增条带相结合, 计算遗传距离(表 6)并作系统聚类图. 由表 6 可以看出, 10 个地理种群柑桔大实蝇的遗传距离在 0.301 6~0.636 4 之间, 其中重庆奉节和重庆武隆之间的遗传距离最小(0.301 6), 结果和 RAPD 聚类结果相似, 重庆奉节和湖北当阳之间的遗传距离最大(0.636 4). 若以遗传距离 0.43 为界点, 可把 10 个地理种群柑桔大实蝇划分为 6 大主要类群, 类群多于 RAPD 和 SRAP 单独分析得到的类群, 而其中湖北当阳单独分为一个类群, 重庆巫山和湖北宜都被划分到另一个类群(图 5).

表 6 基于 RAPD 和 SRAP 结果的 10 个不同地理种群柑桔大实蝇种群内与种群间的遗传距离变异范围

地区编号	重庆奉节	重庆武隆	重庆巫山	重庆万州	湖北宜都	湖北当阳	湖南怀化	四川宣汉	四川江邨	陕西汉中
重庆奉节	1.000 0	0.698 4	0.485 7	0.533 3	0.453 3	0.363 6	0.564 1	0.597 0	0.535 2	0.531 2
重庆武隆	0.301 6	1.000 0	0.507 9	0.500 0	0.470 6	0.406 8	0.507 0	0.566 7	0.531 2	0.596 5
重庆巫山	0.514 3	0.492 1	1.000 0	0.586 7	0.666 7	0.484 8	0.538 5	0.537 3	0.478 9	0.562 5
重庆万州	0.466 7	0.500 0	0.413 3	1.000 0	0.625 0	0.535 2	0.650 6	0.583 3	0.473 3	0.521 7
湖北宜都	0.546 7	0.529 4	0.333 3	0.375 0	1.000 0	0.450 7	0.481 9	0.500 0	0.421 1	0.550 7
湖北当阳	0.636 4	0.593 2	0.515 2	0.464 8	0.549 3	1.000 0	0.567 6	0.476 2	0.477 6	0.400 0
湖南怀化	0.435 9	0.493 0	0.461 5	0.349 4	0.518 1	0.432 4	1.000 0	0.586 7	0.607 6	0.555 6
四川宣汉	0.403 0	0.433 3	0.462 7	0.416 7	0.500 0	0.523 8	0.413 3	1.000 0	0.529 4	0.580 2
四川江邨	0.464 8	0.468 8	0.521 1	0.526 3	0.578 9	0.522 4	0.392 4	0.470 6	1.000 0	0.523 1
陕西汉中	0.468 8	0.403 5	0.437 5	0.478 3	0.449 3	0.600 0	0.444 4	0.409 8	0.476 9	1.000 0

注: 遗传距离(%) (下三角) 和相似系数(%) (上三角).

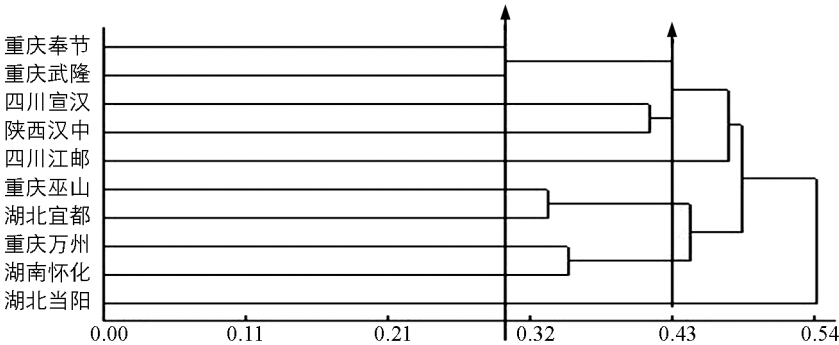


图 5 基于 RAPD 和 SRAP 结果构建的 10 个地理种群柑桔大实蝇的 UPGMA 聚类分析

3 结论与讨论

本研究中利用 RAPD 和 SRAP 两种分子标记对 10 个不同地理种群的柑桔大实蝇进行多态性分析, 结果发现 SRAP 标记在不同大实蝇种群中的多态性比 RAPD 标记高, 二者分别为 90.91% 和 86.84%, 这与前人在家蚕和棉花、红麻及蔷薇属上的研究结果相符^[14-15]. 由于 RAPD 和 SRAP 两种分子标记的原理不同^[16-24], 两种标记方法对 10 个不同地理种群柑桔大实蝇的遗传距离分析和聚类结果存在差异. RAPD 分析中重庆奉节和重庆武隆种群之间的遗传距离最小(0.250 0), SRAP 分析中湖北当阳和和四川宣汉种群之间的遗传距离最小(0.200 0). SRAP 和 RAPD 双标记数据整合后的分析结果与 RAPD 分析结果相似, 同样是重庆奉节和重庆武隆种群之间的遗传距离最小(0.301 6), 与 RAPD 聚类结果类似. 但遗传距离 0.301 6>0.250 0, 说明双标记数据结合分析能从更远的遗传距离上, 把重庆奉节和重庆武隆的种群划分开来, 但 3 个聚类图若以遗传距离 0.43 为界点, SRAP 和 RAPD 两者的数据整合后进行聚类分析可把 10 个不同地理种群柑桔大实蝇划分为 6 个大的类群, 比

RAPD 和 SRAP 单独分析划分得更详细, 其中湖北当阳地区亦被单独划分出来, 结果与 RAPD 分析结果相似. 并且在 3 种分析方法中, RAPD 分析中湖北宜都、重庆巫山和重庆万州 3 个地理种群的大实蝇被划分为一个类群, 而 SRAP 和双标记结合分析法中湖北宜都和重庆巫山 2 个地区的大实蝇被划分为一个大的类群, 说明重庆巫山和湖北宜都 2 个地区大实蝇的遗传相似性最大, 分析原因可能是重庆巫山和湖北宜都同属于三峡走廊, 种群交流频繁, 遗传较为稳定所致. 以上结果说明双标记结合分析更能真实准确地反映不同地理种群柑桔大实蝇之间的遗传关系. 双标记结合聚类分析结果与 RAPD 聚类分析结果更相符, 推测与 RPAD 标记所获得的片段多于 SRAP 片段数有关. 此外, 由于柑桔大实蝇是一种迁飞能力极强的昆虫, 容易在不同地区互相扩散, 导致了不同的种群间互相杂交, 使其遗传背景高度杂合, 因此更多的信息还有待于更深入地探索研究.

本研究利用 RAPD 和 SRAP 两种分子标记技术对柑桔大实蝇 10 个不同地理种群的亲缘关系及其遗传距离进行了初步分析, 结果表明不同柑桔大实蝇种群间的亲缘关系相距较远, 这不仅为大实蝇不同地理种群的分子检测和传统的大实蝇分类提供了重要的参考依据, 而且也为我国柑桔大实蝇扩散传播以及危害发生的监测等方面提供一定的理论依据.

参考文献:

[1] 伊 森. 柑桔病虫害防治手册 [M]. 北京: 金盾出版社, 2001: 5.

[2] WELSH J, MCCLELLAND M. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 10(18): 7213—7218.

[3] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Useful as Genetic Markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531—6534.

[4] 韩双艳, 郭 勇. AFLP 在分子生物学研究中的应用 [J]. 生物技术通报, 2001, 2: 22—24.

[5] 李 斌. 家蚕分子连锁图谱的构建和低分子量热激蛋白基因的克隆与特异表达 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2001.

[6] 潘兆娥, 王希文, 孙君灵. 中棉所 48 的 SSR 数字指纹图谱的构建 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(7): 31—35.

[7] 程宝山, 万志兵, 洪德林. 35 个梗稻品种 SSR 指纹图谱的构建及遗传相似性分析 [J]. 南京农业大学学报: 自然科学版, 2007, 30(3): 1—8.

[8] 李雪莲, 王尚德, 刘佳琴, 等. 部分两用桃品种(系)指纹图谱的建立 [J]. 西北植物学报, 2010, 30(3): 505—511.

[9] 温景辉, 申海林, 邹利人, 等. 20 份葡萄种质亲缘关系的 SSR 分析 [J]. 果树学报, 2011, 28(5): 782—786.

[10] 张俊环, 王玉柱, 孙浩元, 等. 不同用途杏品种群的 AFLP 分析 [J]. 果树学报, 2011, 28(4): 610—616.

[11] 刘 韬, 车建美, 黄素芳, 等. 福建省主要杨桃品种遗传多样性分析 [J]. 果树学报, 2011, 28(3): 448—452.

[12] 赵丽华, 李名扬, 王先磊, 等. 石榴种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 果树学报, 2011, 28(1): 66—71.

[13] 姚廷山, 胡军华, 唐科志, 等. 利用 REP-PCR 技术研究我国 9 省柑橘溃疡病菌遗传多样性 [J]. 果树学报, 2010, 27(5): 819—822.

[14] 郑海燕, 栗建光, 戴志刚, 等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3499—3510.

[15] 夏庆友, 周泽扬, 鲁 成. 家蚕不同地理品种分子系统学研究 [J]. 昆虫学报, 1998, 41(1): 33—40.

[16] 李 竞, 房守敏, 刘文明. 标记在中国野桑蚕和家蚕的遗传多态性分析中的应用 [J]. 蚕业科学, 2005, 31(3): 251—25.

[17] 夏庆友, 周泽扬, 鲁 成. 家蚕的扩增条件, 重复性及遗传模型研究 [J]. 蚕业科学, 1996, 22(1): 20—25.

[18] 洪靖君, 段家龙. RAPD 分子标记及其在我国蚕业研究上的应用 [J]. 中国蚕业, 2001, 22(3): 57—59.

[19] 沈 利, 黄勇平. 微卫星标记技术及其在蚕业研究中的应用前景 [J]. 蚕业科学, 2004, 30(4): 399—404.

[20] 陈向明, 郑国生, 孟 丽. 玫瑰、月季、蔷薇等蔷薇属植物 RAPD 分析 [J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 78—80.

[21] 沈 利, 李木旺, 李明辉. 家蚕微卫星标记的筛选及其在遗传多样性分析中的应用 [J]. 蚕业科学, 2004, 30(3): 230—236.

[22] MUTLU N, BOYACI F H, GOCMEN M. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR Markers Linked with a Fusarium wilt Resistance Gene in Eggplant [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117(8): 1303—1312.

- [23] MULLIS K B. Specific Emzymatic Amplification of DNA in Ritro; the Polymerase Chain Reaction [J]. Cold Spring Harbor Symp Quant Boil, 1986, 51: 263—273.
- [24] 姜 振, 蔡明文, 徐世清. 基于 RAPD 和 SSR 分子标记的家蚕部分实用品种多态性及其亲缘关系分析 [J]. 蚕业科学, 2010, 36(1): 0517—0164.

DNA Polymorphism and Genetic Relationship of *Bactrocera (Tetradacus) minax* (Enderlein) Populations Based on RAPD and SRAP Molecular Markers

LIU Hao-qiang¹, ZHANG Yun-fei², LI Hong-jun¹, RAN Chun¹,
HU Jun-hua¹, YAO Ting-shan¹, WANG Jin-jun², ZHAO Zhi-mo²

1. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Citrus Research Institute,
Southwest University, Chongqing 400712, China;

2. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: Objective: Two molecular marker techniques, RAPD (random amplified poloyomorphic DNA) and SRAP (sequence-related aAmplified polymorphism), were used to investigate the genetic relationship among 10 geographic populations of *Bactrocera (Tetradacus) minax* (Enderlein) from Chongqing, Hu-bei, Sichuan and Shaanxi. Methods: Ten RAPD primers and five pairs of SRAP primers were used to amplify the genomic DNA of 10 different geographic populations of *B. (Tetradacus) minax* (Enderlein), and polymorphic bands were counted. Then the DPS (data processing system) software was used to obtain the information of genetic polymorphism and clustering. Result: One hundred and fifty-two clear and stable bands were amplified by PCR with the 10 RAPD primers, of which 132 were polymorphic, the proportion of polymorphic bands being 86.84%. The genetic distance among the 10 different geographic populations ranged from 0.250 0 to 0.625 0. The 10 different geographic populations were clustered into four groups. Meanwhile, 66 clear and repeatable bands were obtained by PCR with the 5 pairs of SRAP primers, of which 60 were polymorphic, the proportion of polymorphic bands being 90.91%. The genetic distance among the 10 different geographic populations ranged from 0.200 0 to 0.789 5. Clustering analysis divided the 10 different geographic populations into five groups. However, integration of the RAPD data and the SRAP data clustered the 10 different geographic populations into six groups. Conclusion: There is abundant genetic polymorphism among different geographic populations of *B. (Tetradacus) minax* (Enderlein). The clustering result based on both RAPD and SRAP data can more accurately reflect the genetic relationship between the different geographic populations.

Key words: *Bactrocera (Tetradacus) minax* (Enderlein); geographic population; DNA poloyomorphism; RAPD; SRAP

