地中海实蝇幼虫分子鉴定*

叶 军[1**] 周国梁[1] 易建平[1] 吴家教[2] 阮长浩[3] 梁 帆[2] 郑建中[1] 王文兵[3]
(1. 上海出入境检验检疫局 上海 200135; 2 广东出入境检验检疫局 广州 510623; 3 江苏大学生命科学院 镇江 212013)

Molecular identification for larvae of *Ceratitis capitata*. YE Jun[1**], ZHOU Guo-Liang[1], YI Jian-Ping[1], WU Jia-Jiao[2], RUAN Chang-Hao[3], LIANG Fan[2], ZHENG Jian-Zhong[1], WANG Wen-Bing[3] (1. *Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, Shanghai 200135, China; 2. *Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau*, Guangzhou 510623, China, 3. *School of Life Science, Jiangsu University*, Zhenjiang 212013, China)

Abstract The internal transcribed spacer (ITS) region and mitochondrial gene, including the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COⅠ) gene, COⅡ, COⅢ and NADH dehydrogenase (ubiquinone) chain 5(ND5), of larvae(PU-1) intercepted in tablegrape imported from Peru in Mar., 2006, were amplified and sequenced with primers designed from *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (AF189691, AJ242872) and *Bactrocera oleae* (AY210702, AY210703). The ITS region(DQ490237), COⅠ (DQ456861), COⅡ(DQ456862), COⅢ(DQ456863) and ND5 (DQ456864) gene sequence were obtained and analyzed with the homologous sequence of related species in GenBank. The result showed that the similarity of ITS is 95.16%(1633/1716) between PU-1 and *C. capitata* AF189691, The similarity of COⅠ, COⅡ, COⅢ and ND5 gene sequence are 100%(1475/1475), 99.9%(686/687), 99.5%(785/789), 99.8(563/564) between PU-1 and *C. capitata* CCA242872, respectively. The molecular phylogenetic relationship of 22 species of Tephritidae based on COⅠ gene sequences showed that PU-1, *C. capitata* CCA242872, DQ011888, DQ006887, AY788415 and *C. caeteate* AY788414 are in the same clade. The larvae(PU-1) was identified as C. capitata with the analysis of sequence and phylogenetic relationship.

Key words *Ceratitis capitata*, larvae, phylogenetic relationship, identification

摘 要 通过对从秘鲁进口的葡萄中截获实蝇类幼虫进行ITS区和线粒体COⅠ,COⅡ,COⅢ、ND5基因序列的扩增和测序,并与GenBank中对应的序列进行比对,结果表明,截获样品ITS区序列和地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedemann)同源性为95.16%(其中ITS1为99.52%, ITS2为86.2%),线粒体COⅠ,COⅡ,COⅢ,ND5基因序列和地中海实蝇 *C. capitata* 同源性为100%,99.9%,99.5%,99.8%;基于COⅠ序列构建的系统发育树中,幼虫样品和地中海实蝇最为接近。根据序列分析和系统发育关系分析的结果,将截获的实蝇类幼虫鉴定为地中海实蝇 *C. capitata*。

关键词 地中海实蝇, 幼虫, 序列分析, 系统发育关系, 鉴定

地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedemann)属双翅目Diptera、实蝇科Tephritidae、蜡实蝇属 *Ceratitis*,是一种对水果和蔬菜极具破坏性的危险性有害生物,它几乎可危害所有对人类有价值的水果作物,其成虫在寄主果实的表皮下产卵,幼虫孵化后钻蛀入寄主果实内取食、生长,造成果实腐烂,使之不能食用而失去经济价值[1~4]。该虫对水果种植业具有毁灭性的损害,曾经使地中海地区一些国家种植的核果受害率高达100%[5]。其防治费用相当可观,1986~1991年,6年时间内美国共进行了10多次大规模的根除行动,耗资达1.5亿美元[6]。因此,针对地中海实蝇这一高度危险性有害生物,许多国家制订了十分严格的检疫法规,由此给地中海实蝇分布国家的水果以及农产品出口贸易

* 上海市重大科技攻关项目(03DZ19315和04DZ05002)及国家质检总局科技专项(2004IK046)。

** E-mail: yej@shciq.gov.cn

收稿日期: 2006-04-21, 修回日期: 2006-10-18, 接受日期: 2007-04-02

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

设置了很大的技术贸易障碍。地中海实蝇不仅可以在经济上造成不可估量的巨大经济损失，而且对出口贸易造成极其深远的不良影响。

目前，实蝇类害虫的种的鉴定主要依据成虫的形态特征，而卵、幼虫、蛹由于其特征差异小，且有些特征在其不同的发育时期不够稳定，因此依据形态学鉴定方法很难保证鉴定的准确度[7]。即使地中海实蝇的幼虫能依据形态学进行鉴定[5]，但很大程度上依赖鉴定人员丰富的鉴定经验，这就制约了不同地区相关工作的进一步开展。在口岸检疫工作中，通常要将幼虫培养到成虫再进行鉴定，整个检疫鉴定过程时间长达数周[8]，无法适应实际工作需要。

分子生物学技术在昆虫领域的应用主要集中在系统演化及分类鉴定两方面。昆虫系统进化的研究，探索了昆虫属、种间的关系，从分子水平找出其种间特异性差异，从而为昆虫的分类鉴定奠定基础。而通过昆虫分类鉴定和系统进化的研究，可以为昆虫发育早期虫态的鉴定提供必要的研究方法。Taylor 等利用 PCR-RFLP 技术可以鉴定保存在酒精中的或针插的从卵到成虫各发育阶段的嗜人锥蝇样品，方法快速，在 24 h 内即可完成[9]。吴佳教等也利用 PCR-RFLP 技术快速鉴定我国南方常见的 6 种寡毛实蝇 *Bactrocera*[10]。李正西和沈佐锐利用 rDNA-ITS2 序列探讨了赤眼蜂属 *Trichogramma* 不同种分子鉴定的可行性[11]。

为了能够准确及时对截获的实蝇幼虫进行鉴定，我们尝试了应用分子生物学方法对秘鲁进口葡萄中截获的实蝇幼虫进行鉴定和初步研究。试验中扩增了幼虫样品 mtDNA 部分基因序列和 ITS 区序，将样品序列与 GenBank 中相近物种序列进行同源性比对，通过序列分析的方法对截获的实蝇幼虫进行鉴定。以期开拓快速准确的地中海实蝇幼虫鉴定方法，同时也可为探索截获地中海实蝇的来源地提供遗传学证据。

1　材料和方法

1.1　供试实蝇材料

供试实蝇幼虫样品来源于上海出入境检验检疫局 2006 年 3 月在秘鲁进口葡萄中截获的虫样，样品浸泡于无水乙醇并置于－20 ℃冰箱中储存，编号为 PU-1。

1.2　DNA 提取

取截获的实蝇幼虫 1 条放入研钵，加入液氮，磨成粉末状，用 DNeasy® Tissue Kit（Qiagen 公司）提取样品 DNA。

1.3　引物设计

根据 GenBank 中地中海实蝇 *C. capitata* AF189691，AJ242872 和油橄榄实蝇 *Bactrocera oleae* AY210702，AY210703 等实蝇的 ITS 和 mtDNA 序列，分别设计了扩增 ITS 区（CF1/CR1，CF6/CR5）、COⅠ（FCO2/RCO4）、COⅡ（F1/F4）、COⅢ（F32/F35）和 ND5（F13/R12）的引物，引物由上海生工合成（表 1）。

表 1　试验用引物

引物	核苷酸序列 5′-3′	位置	产物(bp)
FCO2[a]	gatagattta cagt ctatcgcc	1 487 ~ 1 508[c]	1 618[e]
RCO4[b]	ggagcttaaatccattgcac	3 085 ~ 3 104[c]	
F1[a]	atggcagattagtgcaatgg	3 074 ~ 3 093[c]	841[e]
F4[b]	aggtggtttaagagaccaatac	3 893 ~ 3 914[c]	
F32[a]	aaccttagctgttcgattagc	4 596 ~ 4 616[c]	1 195[e]
F35[b]	ccacattcaaatggagaac	5 772 ~ 5 790[c]	
F13[a]	acatcttcagtgttatgctc	6 409 ~ 6 428[c]	616[e]
R12[b]	tctactgggttaacagtttg	7 006 ~ 7 025[c]	
CF1[a]	ccgaacttgattatttagagg	19 ~ 39[d]	990[f]
CR1[b]	tgttcatgtgtcctgcag	991 ~ 1 008[d]	
CF6[a]	atgggtcgatgaagaac	947 ~ 963[d]	877[f]
CR5[b]	attccatacactgcatctcac	1 803 ~ 1 823[d]	

a. 正义引物，b. 反义引物，c. 在 CCA242872 中的引物位置，d. 在 AF189691 中的引物位置，e. CCA242872 中的片断扩增长度，f. AF189691 中的片断扩增长度。

1.4　PCR 扩增

PCR 反应体系总体积为 30 μL，包含：10 mmol/L Tris-HCl；50 mmol/L KCl；2.5 mmol/L $MgCl_2$；dATP，dGTP，dCTP，dTTP 浓度各为 250 μmol/L；引物浓度各为 100 nmol/L；1 μL 模板 DNA；1 U Taq DNA 聚合酶（上海生工）。PCR 反应循环参数：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min 30 s，40 个循环；72 ℃ 10 min。

1.5　扩增产物分析

取 10 μL PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 1×

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

TAE 缓冲液中电泳，EB 染色，用凝胶分析成像系统（BIO-RAD 公司）观察并记录 PCR 产物电泳条带。

1.6 序列测定和分析

PCR 产物用 DNA Fragment Purification Kit (TaKaRa 公司)纯化，纯化产物由上海生工公司双向测序。测序结果进行剪接核实后登录 GenBank，测序获得的序列用软件 DNAStar 与 GenBank 中相关种类实蝇序列进行同源性分析，并构建相关种类的系统发育树。

2 结果与分析

PCR 扩增产物测序后获得实蝇幼虫 COⅠ，COⅡ，COⅢ，ND5 和 ITS 序列，GenBank 登录号分别为：DQ456861，DQ456862，DQ456863，DQ456864 和 DQ 490237，每段序列分别在 GenBank 中 BLAST 分析，线粒体基因 COⅠ，COⅡ，COⅢ和 ND5 序列都和地中海实蝇 *C. capitata* CCA242872 的相应的线粒体基因序列最为接近；COⅠ，COⅡ，COⅢ和 ND5 序列和相应基因序列的同源性分别是 100%（1 475/1 475），99.9%（686/687），99.5%（785/789），99.8（563/564）。ITS 序列也和地中海实蝇 *C. capitata* AF189691 序列最为接近，同源性为 95.16%（1 633/1 716），其中 ITS1 和 ITS2 的同源性分别为 99.52%（827/831）和 86.2%（431/500）。

GenBank 中已登录的实蝇类线粒体序列中以 COⅠ序列居多，以 COⅠ序列为分析区域，利用 DNAstar 中 MegAlign 软件，采用 Clustal V 方法构建地中海实蝇及其近似种实蝇的系统进化发育树（图 1）。从图中可见截获幼虫样品和地中海实蝇 *C. capitata* 以及 *C. caeteate* 同属一个类群组中，与 *C. capitata* 更为接近。实蝇幼虫样品 COⅠ序列 PU-1 DQ456861 与地中海实蝇 CCA242872，DQ011888，DQ006887，AY788415，*C. caeteate* AY788414 的 COⅠ序列同源性分别是：100%，95.4%，100%，99.7%和 99.1%。

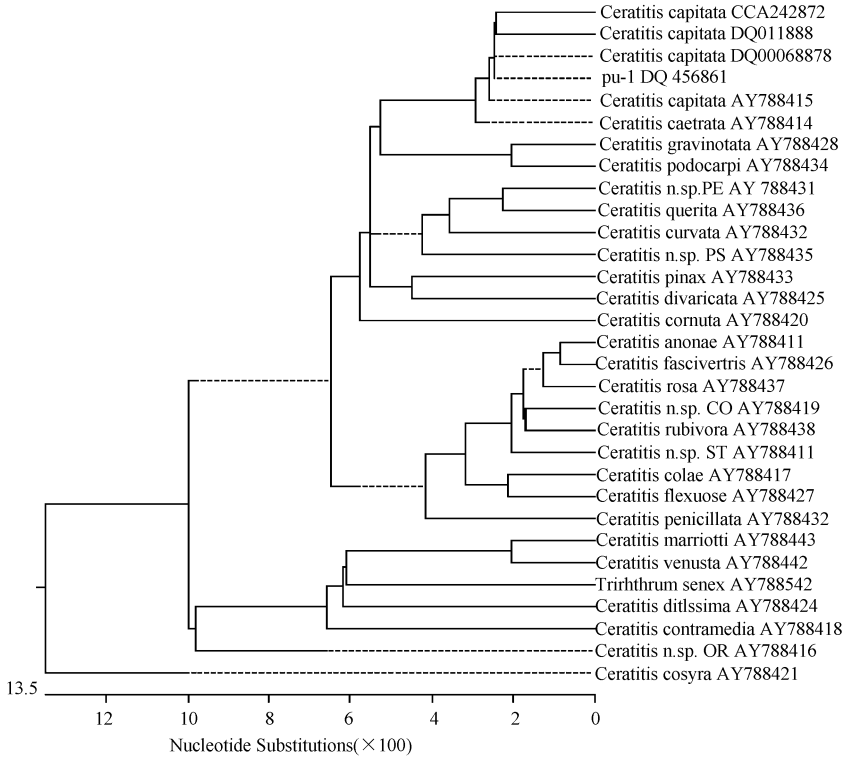

图 1 基于 COⅠ序列构建的地中海实蝇及其近似种系统发育树

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

实蝇幼虫样品 COⅠ序列 DQ456861 和 COⅡ序列 DQ456862 分别与 GenBank 中南美按实蝇 *Anastrepha fraterculus*(COⅠ:DQ116203, COⅡ:DQ116549)的序列比对并进行 Sequence distance 分析,发现 PU-1 与按实蝇的相似性仅为 83%和 84%。

根据上述的序列分析结果,将截获的实蝇幼虫 PU-1 鉴定为地中海实蝇 *C. capitata*。

3 讨论

20 世纪 80 年代 PCR 技术的产生和发展加速了分子生物技术在生物学等研究领域的广泛应用。用分子生物技术研究昆虫遗传进化和系统发育开始于 20 世纪 80 年代末,此后得到了迅猛发展。其中研究焦点之一是:通过对昆虫遗传物质的研究,探讨不同分类阶元上的昆虫类群之间的系统发育、进化机制和种群遗传变异及分化等[12~14]。mtDNA 序列是目前应用最为广泛的遗传物质之一,mtDNA 是一个封闭的环状双链,大小为 15.4~16.3 kb,其变异速率高于保守的核基因。昆虫 mtDNA 的各个基因已被广泛用于昆虫系统发育关系分析、种群进化、种群遗传变异和分化、近缘种鉴别和种下分类单元鉴定等方面[15~17],除了 mtDNA 以外,昆虫系统学研究中还涉及编码核核糖体 RNA 基因 rDNA 中的转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)基因[18]。

由于实蝇类昆虫种类繁多,比如,亚太地区的离腹寡毛实蝇属 *Bactrocera* 就有 32 个亚属,500 种之多[19],部分种之间的形态特征十分相近,难以区分,甚至有些种类如橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 被认为是由 52 个姐妹种组成的复合种[20];另一方面,我们在对橘小实蝇 COⅡ序列的研究中发现,同一种类不同地理来源的种群之间存在的序列差异不亚于相近种之间的差异(未发表)。这些都给分子生物学方法鉴定种类带来了不小的难度。为了确保鉴定的准确性,试验中分析了 COⅠ,COⅡ,COⅢ,ND5 和 ITS 等多段序列和地中海实蝇相应序列之间的差异,分析结果均表明截获的幼虫与地中海实蝇最为接近。

在分析 COⅠ序列的过程中,我们注意到幼虫样品的 COⅠ序列和一个地中海实蝇 DQ011888 的相似性只有 95.4%(726/761),而和 *C. caeteate* AY788414 的同源性达 99.1%(754/761)(由于我们没有该物种的标本及详细的参考资料,有待今后进一步研究。但幼虫样品 PU-1 和另外一个地中海实蝇 DQ011888 的同源性达到 100%。此外其它线粒体基因序列和 ITS 序列的同源性分离结果都表明幼虫样品和地中海实蝇的更为接近。

在测序得到的 ITS 区的序列中,ITS1 与 *C. capitata* AF189691 的同源性为 99.52%(827/831),与 GenBank 中其它 *C. capitata* 的 ITS1 的同源性也在 99.5%左右,但是,ITS2 与 *C. capitata* AF189691 的同源性仅为 86.2%(431/500),由于 GenBank 上发布的 *C. capitata* ITS2 序列很少,不能进一步了解这种差异是否是地中海实蝇来源地不同而产生的。

不同线粒体基因序列之间,COⅢ的变异速度比其它选用的基因要快。通过 PU-1 DQ456861 与地中海实蝇 CCA242872 COⅢ序列的比对,在 4 个碱基差异中,2 个是第三碱基变化,没有影响氨基酸的组成,而另外 2 个则是第一碱基差异,所编码的氨基酸发生变化,都是甘氨酸(Gly)变异成精氨酸(Arg)。据此可以考虑利用 COⅢ基因进行种间分类和幼虫鉴别。但是 GenBank 中登录的实蝇 COⅢ序列比较少,如果要进行种及种下分类单元的鉴定,需要测定更多种类实蝇的 COⅡ基因序列,试验中我们已经测定并分析了 15 种实蝇的 COⅢ序列(另文报道),对今后的实蝇类幼虫的鉴定提供了更多的参考。此外,在线粒体基因组中,NADH 脱氢酶基因是一个快速进化的单位,其进化速度要高于其它线粒体基因[21,22],对于利用该基因是否能为鉴定地中海实蝇来源地提供遗传学证据,在以后的试验中将进一步研究。

参 考 文 献

1 陈乃中. 植物检疫, 1998, **12**(5): 298.
2 Ye H. *Entomol. Sin.*, 2001, **8**(2): 175~182.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

3 Soutnwood T. R. E. *J. Animal Ecol.*, 1976, **45**: 949.
4 汪兴鉴. 植物检疫, 1995, **9**(1): 20~30.
5 梁广勤, 姚文国. 地中海实蝇. 中国农业出版社, 1998. 11~17.
6 黄原, 袁锋, 顾晓军. 昆虫知识, 1996, **33**(5): 306~310.
7 魏晓棠, 权洁霞, 张艺兵, 陈长法, 邵秀玲, 等. 检验检疫科学, 2003, **13**(2): 19~20.
8 朱振华, 叶辉, 张智英. 昆虫学报, 2005, **48**(3): 386~390.
9 Taylor D. B., Szalanski A. L. *Med. Vet Entomol.*, 1996, **10**(1): 63~70.
10 吴佳教, 梁帆, 胡学难, 赵菊鹏, 梁广勤, 等. 江西农业大学学报, 2004, **26**(5): 770~773.
11 李正西. 沈佐锐. 昆虫学报, 2002, **45**(5): 559~566.
12 王备新, 杨莲芳. 昆虫知识, 2002, **39**(2): 88~92.
13 徐庆刚, 花保祯. 西北农林科技大学学报, 2001, **29**: 79~83.
14 陈复生 付承玉 汪泰初. 安徽农业科学, 2003, **31**(4): 596~598, 601.
15 成新跃, 周红章, 张广学. 动物分类学报, 2000, **25**(2): 121~133.
16 Clary D. O., Wolstenholme D. R. *J. Mol. Evol.*, 1985, 22: 252~271.
17 Wells J. D., Sperling F. A. H. *J. Med. Emomo l.*, 1999, 36: 222~226.
18 刘殿锋, 蒋国芳. 动物分类学报, 2005, **30**(3): 484~492.
19 梁广勤 杨国海 梁帆, 司徒保禄, 梁小丹, 等. 亚太地区寡毛实蝇. 广东科技出版社, 1996.
20 Drew R. A. I., Hancock D. L. The *Bactrocera dosarlis* Complex of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) In Asia. Wallingford CAB Interntional, 1994, 11~13, 17~20, 31~33, 48~50, 52~54.
21 Russo C. A. M, Takezaki N. Nei M. *Mol. Biol Evol.*, 1996, 13(3): 525~536.
22 Zardoya R., Meter A. *Mol. Biol Evol.* 1996, **13**(7): 933~942.

烟粉虱对寄主的选择行为*

安新城[1,2**] 任顺祥[1***]

(1. 华南农业大学资源环境学院 广州 510642; 2 广东省昆虫研究所 广州 510260)

Host selection behavior of *Bemisia tabaci*. AN Xin-Cheng[1,2**], REN Shun-Xiang[1***] (1. *College of Environment and Resources, South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China; 2. *Guangdong Entomological Institute*, Guangzhou 510260, China)

Abstract The host selective behavion for whitefly *Bemisia tabaci Bemisia tabaci* (Gennadius) was studied primarily. The results showed that whitefly recognized plant materials by broad-spectrum volatile odor, and were induced by green in the further step. With the difference of whitefly staying on adaptive and non-adaptive host plants, it showed that whitefly made last decision by host evaluation with stylet-probing and gradually realized host preference, so there is a short time lag existing host choice. Generally, whitefly's host selection is an integrated decision-making evolved sense of olfaction, vision and palate, which gradually locate adaptive host by the cues of odor of plant, color and host quality, so there is obvious flexibility in the process of whitefly's host selection.

Key words *Bemisia tabaci*, host plant, selective behavior

摘 要 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) 成虫对寄主植物选择行为的实验结果表明, 烟粉虱是通过植物广谱的绿色气体识别植物材料, 并进一步受到绿色的诱导。通过烟粉虱在适宜与非适宜寄主植物上滞留时间的差异, 可以看出烟粉虱是通过口针刺探的寄主评估过程逐渐实现寄主偏好性的, 存在一个短的时滞。综合来看, 烟粉虱的寄主选择是通过嗅觉、视觉和味觉共同参与的一个决策过程, 以寄主植物的气味、颜色和质量为线索, 逐步定位到适宜的寄主植物上, 因此在寄主选择过程中存在很大的可塑性。

关键词 烟粉虱, 寄主植物, 选择行为

---

* 国家973 项目(2006CB102005)。

** E-mail: antfly2000@163.com

*** 通讯作者, E-mail: rensxcn@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-01, 修回日期: 2006-10-24, 接受日期: 2006-11-02

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n