



瓜果上主要实蝇类害虫 PCR-RFLP 分子鉴定技术的建立及应用*

吴明月^{1,2**} 王文璐^{1,2} 王少丽^{1,2} 张友军^{1,2} 谢文^{1,2***}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 三亚 572024)

摘要 【目的】建立一种针对实蝇幼虫快速鉴定的技术方法, 并应用该技术以明确我国瓜果上主要实蝇类害虫的优势种。【方法】以我国瓜果蔬菜上危害最为严重的瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)、南亚果实蝇 *Bactrocera tau* Walker 和橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 为对象, 基于 3 种实蝇种间存在线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 因子 (mtCO I) 基因的序列差异, 利用 3 种限制性内切酶 *Sap* I、*Bsm* I 和 *Sac* I 酶切识别这些差异序列的特异性酶切位点, 根据酶切后 mtCO I 基因片段大小不同, 对 3 种实蝇进行快速的鉴定识别, 并进一步应用此技术对来自我国 7 省 11 市的 7 种瓜菜和 2 种水果上的 21 份实蝇幼虫样本进行鉴定。【结果】通过单独或组合酶切的方式建立了一套针对瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇的 PCR-RFLP 快速分子鉴定技术, 并将此方法应用于田间监测。田间鉴定结果表明, 湖北、湖南、浙江等地区危害瓜菜的实蝇主要是南亚果实蝇, 广东、广西、海南等地区瓜菜上的实蝇种类主要是瓜实蝇, 且瓜实蝇和南亚果实蝇存在寄主重叠现象, 云南危害火龙果和芒果等水果上的实蝇主要是橘小实蝇。【结论】本研究建立的瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇的识别鉴定方法, 因不受虫体、虫态的影响, 且具有低成本、高效、快速、重复性好的特点, 适用于田间瓜果上实蝇样本的快速诊断检测。依据田间鉴定结果, 预测近年来瓜实蝇可能有逐渐向北扩散的趋势。

关键词 瓜实蝇; 南亚果实蝇; 橘小实蝇; 线粒体; 分子鉴定; 限制性内切酶

Establishment and application of PCR-RFLP molecular identification techniques for fruit fly pests of melon and fruit

WU Ming-Yue^{1,2**} WANG Wen-Lu^{1,2} WANG Shao-Li^{1,2} ZHANG You-Jun^{1,2} XIE Wen^{1,2***}

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. National Research Institute of Breeding in Hainan, CAAS, Sanya 572024, China)

Abstract 【Objectives】A method for rapid identification of fruit flies was developed and applied to identify the dominant species of these in China. 【Methods】Differences in the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I factor (mtCO I) gene sequences of three fruit fly species; *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), *Bactrocera tau* Walker and *Bactrocera dorsalis* (Hendel), and differences in mtCO I gene fragment size after enzyme digestion (*Sap* I, *Bsm* I and *Sac* I), allowed these three species of fruit flies to be rapidly identified. This technique was further applied to the identification of 21 fruit fly larvae samples from 7 kinds of vegetable and 2 kinds of fruit crops from 7 provinces and 11 cities in China. 【Results】Identification methodology based on PCR-RFLP was successfully established and used to identify sample of fruit fly larvae collected in the field. The results show that the main fruit fly pest of melons and vegetables in the Hubei, Hunan and Zhejiang regions is *B. tau*;

*资助项目 Supported projects: 国家现代西甜瓜产业技术体系 (CARS-25); 三亚崖州湾科技城管理局 2020 年度科技计划项目 (SKJC-2020-02-012); 中国农业科学院科技创新工程 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

**第一作者 First author, E-mail: wumingyuecaas2021@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: xiewen@caas.cn

收稿日期 Received: 2021-03-18; 接受日期 Accepted: 2021-05-07

whereas in Guangdong, Guangxi and Hainan the main fruit flies are *B. cucurbitae*, with some *B. tau* and *B. cucurbitae*. The main fruit fly pest of pitaya and mango crops in Yunnan is *B. dorsalis*. **[Conclusion]** The PCR-RFLP method developed for the identification of *B. cucurbitae*, *B. tau* and *B. dorsalis* is not affected by the developmental stage of fruit flies, and is relatively inexpensive, efficient, fast and repeatable. It is especially suitable, therefore, for identifying fruit fly larvae. Using this method to identify samples of larvae from different provinces and cities suggests that *B. cucurbitae* may be gradually spreading northwards.

Key words *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett); *Bactrocera tau* Walker; *Bactrocera dorsalis* (Hendel); mitochondrion; molecular identification; restriction endonuclease

实蝇隶属于双翅目 Diptera 实蝇科 Tephritidae, 是危害瓜果蔬菜等经济作物的一类重要害虫, 近年来给我国瓜果蔬菜等农产品带来严重损失。实蝇种类繁多, 涵盖至少 500 个属 4 500 余种, 其中约 250 种实蝇能对农业生产造成直接损失 (姜帆, 2015; 敖国富等, 2019)。该虫雌成虫喜产卵于瓜果表皮下, 卵在果内部孵化, 幼虫于果内蛀蚀果肉, 使果实腐烂、脱落、变质等, 造成损失 (汪兴鉴, 1995)。近年来, 瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)、南亚果实蝇 *Bactrocera tau* Walker 和橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel) 逐渐成为我国瓜果蔬菜上的 3 种最主要实蝇类害虫 (马兴莉等, 2013, 毛红彦等, 2020)。3 种实蝇的为害症状相似, 幼虫难以区分, 局部地域混合发生, 给实蝇的监测预报带来严峻挑战 (吴佳教等, 2004; 许恒瑜等, 2015; Reyard *et al.*, 2021)。不同种类的实蝇对颜色趋向性、趋化性、温度耐受性、产卵及寄主选择性等方面存在明显差异 (何超等, 2019; Huang *et al.*, 2020), 故在田间防治过程中, 不同种类实蝇的防治措施存在差异。因此, 快速、准确地鉴定田间实蝇害虫种类, 是实蝇类害虫防治过程中的关键技术之一。

传统上, 实蝇类害虫的种类鉴定主要依赖于形态学方法, 依据成虫腹部、胸部的颜色和形态、翅的斑纹以及翅脉相、产卵器等形态特征进行分类 (黄振, 2010), 而对于实蝇卵、幼虫和蛹鉴定, 则需要将其饲养至成虫才能准确鉴定实蝇种类, 这种鉴定方法不仅周期长, 且受虫体和虫态的限制 (张鹤等, 2016; Daisuque and KohIchi, 2020)。近年来, 实蝇类害虫种类的识别鉴定方法层出不穷, 伴随着分子生物学技术的飞速发展, 越来越多的分子生物学技术被应用于实蝇类

害虫分类鉴定中, 实蝇的识别鉴定技术也朝着快速、简便、精准的方向发展, 以其与传统形态学鉴定方法互补或弥补其不足 (陈韶萍等, 2014)。目前限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR)、聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术、随机扩增多态性 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术和环介导等温扩增法 (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) 等技术在实蝇类害虫分类鉴定中已取得了一系列进展 (余道坚等, 2004; 吴佳教等, 2005; Chua *et al.*, 2010; 余德亿等, 2011; Onah *et al.*, 2015; Sabahi *et al.*, 2018)。例如, 对于国内瓜果上危害严重的瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), 国内已有学者应用特异性 PCR (species-specific PCR, SS-PCR)、LAMP 等方法对其进行快速鉴定 (钟勇等, 2019; 黄振等, 2020); Chua 等 (2010) 利用 PCR-RFLP 技术成功区分橘小实蝇近缘种复合种杨桃实蝇 *B. carambolae* 和木瓜实蝇 *B. papayae*; 王辉等 (2009) 应用 *cyt-b*, 16S rRNA, *Co II* 等多个分子标记基因对云南邵通地区的南亚果实蝇及其近缘种进行区分, 并确定二者为同一物种。各种鉴定技术和方法都存在一定的优点和缺陷, 而在实践过程中, 如何依据鉴定技术的原理、特性及研究对象选用适宜的鉴定技术来识别实蝇类害虫种类, 这些都关系到鉴定的准确性以及鉴定周期长短等问题。如 DNA 条形码技术、LAMP 技术等虽不受虫体虫态影响, 但结果易出现假阳性; 相比单一的鉴定技术, PCR-RFLP 技术既具有普通 PCR 技术操作简便、易重复等特点, 也具有 RFLP 的快速、经济、结果相对可靠、结果

简明易分析和适用于近缘种、远缘种及种内群体的比较等特点,并被广泛应用于实蝇识别鉴定中(陈韶萍等,2014)。

尽管前人已经将 PCR-RFLP 技术广泛应用于实蝇鉴定中,但其在操作过程中存在针对不同实蝇需要多对引物配合使用,酶切耗时较长,所选限制性内切酶酶切后结果电泳条带过多,不易区分。因此,本研究针对目前国内南方瓜果蔬菜上发生危害最为严重的瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇的幼虫难以区分鉴定的问题,提出一种不受虫态和虫体限制,操作简单的快速鉴定实蝇的 3 种方法,并运用此法对我国南方部分地区不同寄主上的实蝇种类进行鉴定,以明确我国南方不同地区危害瓜果蔬菜的主要实蝇种类及优势种群,为瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇快速区分与监测提供借鉴,为田间精准防治实蝇类害虫提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究所用的实蝇标本由华南农业大学植物保护学院何余容教授提供。供试实蝇田间样品分别采自我国南方 7 省 11 市 7 种瓜菜和 2 种水果上,所有样品的采集地点、时间及寄主植物等详细信息见表 1。田间样本的采集方法如下:一是在田间悬挂黄板或实蝇诱捕装置诱捕成虫;二是收集受害瓜果。将受害果实剖开,并从中挑出卵、幼虫和蛹等,样本均浸泡于 75%酒精中,置于 -20℃ 冰箱保存。

1.2 供试试剂

KAPA Express Extract DNA Extraction kit (kk7103)(北京普凯瑞生物科技有限公司); 2×Taq PCR 预混试剂 II (KT211)(天根生化科技(北京)有限公司); DNA Marker II 分子量标准(天根生化科技(北京)有限公司); ddH₂O; 限制性内切酶 *Sap* I (R0569S)(北京百灵克生物科技有限公司); 限制性内切酶 *Bsm* I (R0134S)(北京百灵克生物科技有限公司); 限制性内切酶 *Sac* I (R3156S)(北京百灵克生

物科技有限公司); 琼脂糖(北京擎科); 其它实验室常用化学试剂(分析纯)均为市售。引物(上游 LCO1490; 下游 HCO2198, 序列见下文),均由北京擎科生物技术公司进行合成。

1.3 供试器材

1.5 mL 离心管, 研磨珠, PCR 仪(Bio-Rad S1000), 离心机(Eppendorf 5417R), 水浴锅(北京六一制造厂), 电泳仪和凝胶成像系统(Bio-Rad), 恒温箱和高压灭菌锅(SanYo), 预冷组织研磨仪(上海净信科技), 移液器(Eppendorf), 超纯水仪(ZMQ55VOTI Mini Q)。

1.4 实蝇总 DNA 的提取

参照 De Barro 和 Driver (1997) 及 Frohlich (1999) 等烟粉虱总 DNA 提取方法提取实蝇总 DNA, 并略作改动。采用 KAPA Express Extract DNA Extraction kit 试剂盒法提取 DNA, 具体步骤: 选择供试实蝇标本或样品备用, 选用的瓜实蝇、南亚果实蝇、橘小实蝇以及田间样本检测的实蝇个体数均为 30 只。挑取供试实蝇中的单头成虫、幼虫和蛹, 用 ddH₂O 清洗, 用滤纸吸干虫体表面水分后, 放入 1.5 mL 的离心管中, 加入一粒直径 2 mm 的研磨珠和 60 μL 的 DNA 提取混合液(混合液反应体系为: 1 U/μL KAPA Quick Extract Enzyme 1 μL, 10 X KAPA Quick Extract Buffer 6 μL, 加 ddH₂O 至总体积 60 μL), 放入预冷的组织研磨仪中研磨(70 Hz, 60-90 s), 研磨后 8 000 r·min⁻¹ 短暂离心 1 min, 将上清液转入 PCR 管中, 放入 PCR 仪中进行酶促反应, 反应条件为: 75℃ 蛋白酶裂解 10 min, 95℃ 灭活酶 5 min。最后将得到的 DNA 样品作为分析鉴定实蝇种类的 PCR 模板, 置于 -20℃ 冰箱长期保存备用。

1.5 DNA 质量检测

利用通用型引物 LCO1490 和 HCO2198 来检测提取的实蝇样本 DNA 质量, 以实蝇样本 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应, 反应体系为: 上下游引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, 2×Easy Taq PCR super mix(天根生化科技有限公司) 12.5 μL,

表 1 试实蝇样品信息
Table 1 Sample information of field fruit flies in this study

采集地点 Collecting locations	寄主植物 Host plants	采样时间 (年.月) Collecting time (year. month)	虫态 Developmental stage
湖南长沙春华镇 Chunhua town, Changsha, Hunan	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	2020.07	幼虫 Larva
湖南长沙春华镇 Chunhua town, Changsha, Hunan	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	2020.07	幼虫 Larva
湖南长沙春华镇 Chunhua town, Changsha, Hunan	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	2020.07	幼虫 Larva
广东广州化银林村 Huayinlin village, Guangzhou, Guangdong	丝瓜 <i>Luffa cylindrica</i>	2020.07	幼虫 Larva
广东广州大丰基地 Dafeng base in Guangzhou, Guangdong	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	2020.07	幼虫 Larva
广东广州大丰基地 Dafeng base in Guangzhou, Guangdong	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	2020.07	幼虫 Larva
海南三亚 Sanya, Hainan	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	2020.07	成虫 Adult
海南三亚 Sanya, Hainan	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	2020.11	成虫/幼虫 Adult/Larva
浙江金华 Jinhua, Zhejiang	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	2020.07	幼虫 Larva
浙江丽水 Lishui, Zhejiang	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	2020.08	幼虫 Larva
云南 Yunnan	芒果 <i>Mangifera indica</i>	2020.08	成虫 Adult
云南 Yunnan	火龙果 <i>Hylocereus undatus</i> 'Foo-Lon'	2020.08	幼虫 Larva
湖北武汉 Wuhan, Hubei	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	2020.08	蛹/幼虫 Pupa/Larva
湖北武汉 Wuhan, Hubei	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	2020.08	幼虫 Larva
湖北武汉新洲 Xinzhou, Wuhan, Hubei	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	2020.08	幼虫 Larva
湖北武汉新洲 Xinzhou, Wuhan, Hubei	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i> Duch	2020.08	成虫/幼虫 Adult/Larva
湖北鄂州 Ezhou, Hubei	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	2020.08	蛹/幼虫 Pupa/Larva
广西农业科学院 Guangxi Academy of Agricultural Sciences	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	2020.07	蛹/幼虫 Pupa/Larva
广西来宾市兴宾区 Xingbin district, Laibin city, Guangxi	香瓜 <i>Cucumis melo</i>	2020.08	蛹/幼虫 Pupa/Larva
广西来宾市兴宾区 Xingbin district, Laibin city, Guangxi	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	2020.08	幼虫 Larva
广西百色市田阳区 Tianyang district, Baise city, Guangxi	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	2020.08	蛹/幼虫 Pupa/Larva

加 ddH₂O 至总体积 25 μ L; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。分别取 5 μ L PCR 产物在含有核酸染料的 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳上电泳 25 min(150 V), 使用 DNA Marker II 分子量标准为参考。利用凝胶成像分析仪检测是否扩增出预期大小的目标片段, 拍摄并记录结果。通用型引物 LCO1490 和 HCO2198 的序列分别为:

LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGA-TATTG-3'

HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAA-AAAATCA-3'

1.6 PCR 产物测序及序列比对和分析

随机挑选经电泳检测的瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇标本各 20 只 (共计 60 只) 的 PCR 产物分别进行纯化、测序, 然后以 Bioedit 7.0 进行序列整合处理, 以 ClustalX 2.1 Multiple Alignment 进行对齐处理, 最后与 NCBI (<http://www.Ncbi.nlm.Nih.Gov>) 和 BOLD (<http://www.Barcodinglife.com>) 生命条形码数据库中已知的瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇 CO I 序列进行比对分析。

1.7 限制性内切酶筛选

根据上述标本测序结果, 分别取瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇各 20 条序列共 60 条序列, 用 NDAMAN 对每条序列进行限制性酶切位点分析, 并绘制限制性酶切模式图谱, 进行模拟电泳图分析, 筛选酶切位点单一的特异性限制性内切酶。

1.8 酶切反应

将扩增得到的 CO I 基因片段分别用 *Sap* I (酶切位点 GCTCTTCN/), *Bsm* I (酶切位点 GAATGCN/), *Sac* I (酶切位点 GAGCT/C) 3 种不同的限制性内切酶进行酶切, 酶切体系: 10 $\times$ Buffer 1 μ L, 限制性内切酶 0.1 μ L, PCR 产物 3 μ L, 加 ddH₂O 补齐至总体积 10 μ L; *Sap* I 和 *Sac* I 在 37 $^{\circ}$ C 条件下酶切 1.5 h, *Bsm* I 在

65 $^{\circ}$ C 条件下酶切 1.5 h, 酶切后利用凝胶电泳图谱来分析酶切产物片段大小, 进而区分实蝇种类。

1.9 田间实蝇样品的鉴定

田间实蝇样本鉴定根据不同地区不同寄主对每份样品随机挑选 30 只, 采用建立的 PCR-RFLP 鉴定方法进行鉴定, 并分别从每个经电泳检测鉴定后的样品中随机挑选出 5 个样品 DNA 扩增的 PCR 产物进行纯化、测序验证该方法的稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果

对提取的实蝇 DNA 质量进行检测, 结果表明, 3 种实蝇 DNA 均能扩增出一条清晰单一的目标条带, 长度 700 bp (图 1)。

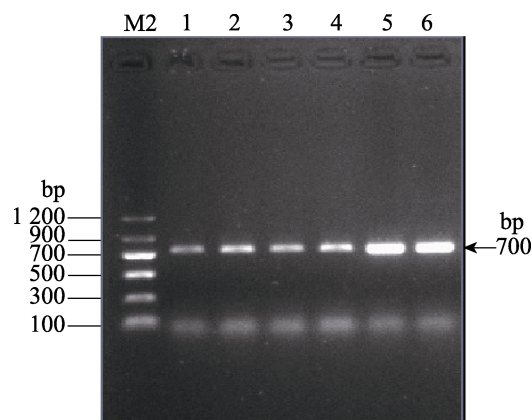


图 1 3 种实蝇 DNA 质量检测电泳图

Fig. 1 DNA electrophoresis images of three fruit flies

M2: DNA 分子量标准 II; 1, 2: 瓜实蝇;

3, 4: 南亚果实蝇; 5, 6: 橘小实蝇。下同。

M2: DNA ladder maker II; 1, 2: *Bactrocera cucurbitae*;

3, 4: *Bactrocera tau*; 5, 6: *Bactrocera dorsalis*.

The same below.

2.2 PCR 产物测序及序列比对和分析

对提取的实蝇 DNA 扩增的 PCR 产物进行测序、整理、比对分析, 结果显示, 瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇的片段大小分别为 679、672 和 682 bp。所得片段与 NCBI (<http://www.Ncbi>.

Nlm.Nih.gov)和BOLD(<http://www.Barcodinglife.com>)生命条形码数据库中已知的对应的同种实蝇的CO I序列进行比对分析,结果表明3种实蝇与库中同种实蝇的同源性都在99%以上。

2.3 限制性内切酶筛选结果

根据限制性酶切位点及酶切模式图谱分析

结果,筛选出3种限制性内切酶用于区分瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇3种实蝇,分别为Sap I(酶切位点GCTCTTCN/),Bsm I(酶切位点GAATGCN/),Sac I(酶切位点GAGCT/C)。根据酶切模式图谱分析,得知不同种实蝇被不同限制性内切酶酶切后所得的DNA片段大小不同(表2)。

表2 3种实蝇mtCO I序列的酶切情况

Table 2 Results of enzyme digestion of mtCO I sequences of three fruit flies

实蝇种类 Species of fruit fly	酶切片段大小 (bp) Digested fragment size (bp)		
	Sap I GCTCTTCN/	Bsm I GAATGCN/	Sac I GAGCT/C
瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i> (Coquillett)	~550, ~150	~450, ~250	~700
南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i> Walker	~550, ~150	~700	~700
橘小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i> (Hendel)	~700	~700	~450, ~250

2.4 限制性内切酶酶切结果

依据限制性酶酶切位点及酶切模式图谱分析,结果显示一种限制性内切酶不能将3种实蝇同时区分开(表2)。根据限制性内切酶筛选结果,继而分别采用限制性内切酶Sap I、Bsm I和Sac I对瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇3种标本实蝇DNA扩增的PCR产物进行酶切,结果表明Sap I可将3种实蝇分为2类,分别呈现出

两种不同类型的电泳图谱,第一类是瓜实蝇和南亚果实蝇,酶切后特征条带约为550 bp和150 bp的两条带,第二类是橘小实蝇不能被Sap I酶切,特征条带显示约为700 bp左右(图2);Bsm I可将瓜实蝇酶切开,酶切后特征条带约为450 bp和250 bp的两条带,而南亚果实蝇和橘小实蝇因没有Bsm I酶切位点,不能被酶切开,特征条带约为700 bp左右的一条亮带(图3)。图3表明,Bsm I可将瓜实蝇和南亚果实蝇区分开;

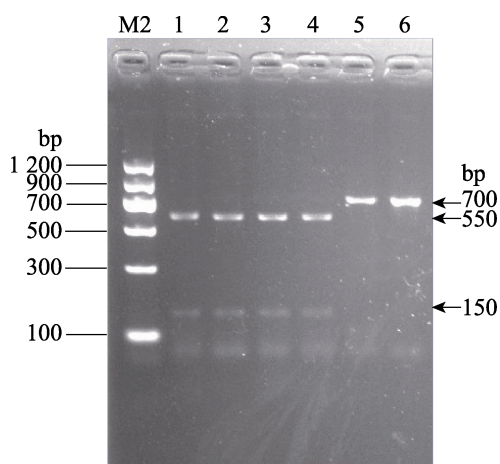


图2 Sap I酶切不同实蝇的mtCO I
PCR产物后琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 mtCO I PCR-RFLP pattern of three fruit flies with Sap I digestion

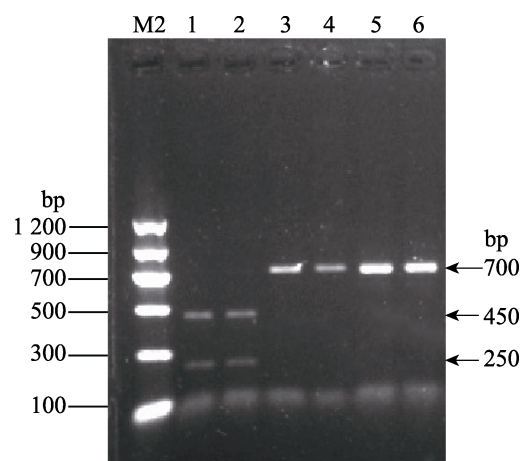


图3 Bsm I酶切不同实蝇的mtCO I
PCR产物后琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3 mtCO I PCR-RFLP pattern of three fruit flies with Bsm I digestion

Sac I 可将橘小实蝇酶切开, 酶切后特征条带约为 450 bp 和 250 bp 的两条带, 而瓜实蝇和南亚果实蝇不能被 *Sac* I 酶切, 特征条带约为 700 bp 左右的一条亮带 (图 4)。

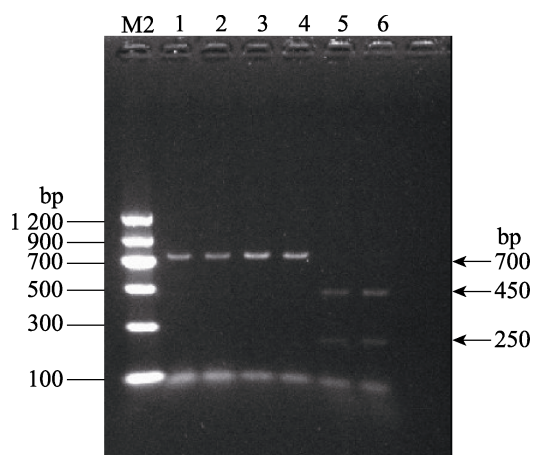


图 4 *Sac* I 酶切不同实蝇的 mtCO I PCR 产物后琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 4 mtCO I PCR-RFLP pattern of three fruit flies with *Sac* I digestion

2.5 PCR-RFLP 鉴定方法的建立

根据以上结果, 建立一套快速区分瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇的 PCR-RFLP 鉴定方法。

具体鉴定流程见图 5。对于田间瓜菜上发生的未知实蝇幼虫提取的 DNA, 首先采用通用型引物 LCO1490 和 HCO2198 进行 PCR 扩增, 然后利用限制性内切酶 *Sap* I 酶切, 并根据 *Sap* I 酶切的电泳图谱结果选择下一步酶切所需的限制性内切酶; 若可被 *Sap* I 酶切开, 则采用限制性内切酶 *Bsm* I 进行进一步酶切鉴定, 若可被 *Bsm* I 酶切开, 为瓜实蝇, 若不能被酶切则为南亚果实蝇; 若不能被 *Sap* I 酶切开, 则采用 *Sac* I 对橘小实蝇进行进一步验证, 若可被 *Sac* I 酶切开则为橘小实蝇。

2.6 田间实蝇的鉴定结果

根据上述建立的 PCR-RFLP 鉴定方法, 对采集回来的田间实蝇样品进行鉴定。鉴定结果表明 (表 3), 2020 年采自湖南长沙的黄瓜、甜瓜、西瓜, 浙江金华和丽水的苦瓜, 广西百色市的苦瓜, 湖北武汉的苦瓜和黄瓜, 以及新洲区的西瓜和湖北鄂州甜瓜上发生危害的实蝇种类是南亚果实蝇; 广东广州的丝瓜、黄瓜、苦瓜, 海南三亚市的苦瓜和西瓜, 广西南宁的苦瓜上造成严重危害的是瓜实蝇; 广西来宾市的香瓜和西瓜, 湖北武汉新洲的南瓜上造成危害的实蝇, 是南亚果

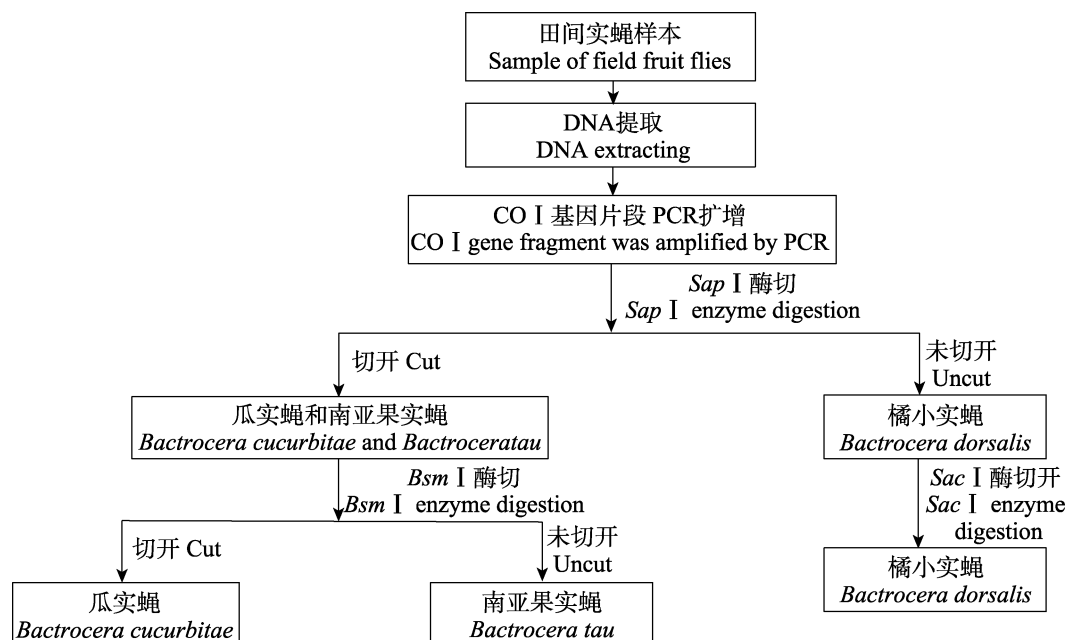


图 5 田间未知实蝇种类鉴定简易流程图

Fig. 5 Simple flowchart of identification of unknown fruit flies in the field

表 3 田间实蝇鉴定结果
Table 3 Identification results of field fruit flies

采集地点 Collecting locations	寄主植物 Host plants	鉴定结果 Identification result	采集地点 Collecting locations	寄主植物 Host plants	鉴定结果 Identification result
湖南长沙春华镇 Chunhua town, Changsha, Hunan	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>	云南 Yunnan	火龙果 <i>Hylocereus undatus</i> ‘Foo-Lon’	橘小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>
湖南长沙春华镇 Chunhua town, Changsha, Hunan	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>
湖南长沙春华镇 Chunhua town, Changsha, Hunan	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>	湖北武汉 Wuhan, Hubei	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>
广东广州化银林村 huayinlin village, Guangzhou, Guangdong	丝瓜 <i>Luffa cylindrica</i>	瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i>	湖北武汉新洲 Xinzhou, Wuhan, Hubei	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>
广东广州大丰基地 Dafeng base in Guangzhou, Guangdong	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i>	湖北武汉新洲 Xinzhou, Wuhan, Hubei	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i> Duch	30%南亚果实蝇, 70%瓜实蝇 30% <i>Bactrocera tau</i> , 70% <i>Bactrocera cucurbitae</i>
广东广州大丰基地 Dafeng base in Guangzhou, Guangdong	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i>	湖北鄂州 Ezhou, Hubei	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>
海南三亚 Sanya, Hainan	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i>	广西农科院 Guangxi Academy of Agricultural Sciences	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i>
海南三亚 Sanya, Hainan	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	瓜实蝇 <i>Bactrocera cucurbitae</i>	广西来宾市兴宾区 Xingbin district, Laibin city, Guangxi	香瓜 <i>Cucumis melo</i>	6%南亚果实蝇, 94%瓜实蝇 6% <i>Bactrocera tau</i> , 94% <i>Bactrocera cucurbitae</i>
浙江金华 Jinhua, Zhejiang	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>	广西来宾市兴宾区 Xingbin district, Laibin city, Guangxi	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	57%南亚果实蝇, 43%瓜实蝇 57% <i>Bactrocera tau</i> , 43% <i>Bactrocera cucurbitae</i>
浙江丽水 Lishui, Zhejiang	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>	广西百色市田阳区 Tianyang district, Baise city, Guangxi	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	南亚果实蝇 <i>Bactrocera tau</i>
云南 Yunnan	芒果 <i>Mangifera indica</i>	橘小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i>			

实蝇和瓜实蝇混合发生, 其中湖北武汉新洲南瓜和广西来宾市香瓜上造成严重危害的实蝇优势种为瓜实蝇, 分别占总发生量的 70%和 94%。广西来宾市西瓜上实蝇优势种为南亚果实蝇, 占比为 57%。云南的火龙果和芒果上实蝇种类主要是橘小实蝇。湖南、湖北、浙江瓜菜上发生为害的实蝇主要是南亚果实蝇, 广西、广东、海南瓜菜

上发生危害的实蝇主要是瓜实蝇。

3 讨论

关于实蝇种类的分子鉴定技术, 已进行大量的研究报道。例如, 瓜实蝇、橘小实蝇、具条实蝇 *Zeugodacus scutellatus*、三点棍腹实蝇 *Dacus trimacula*、桔小实蝇幼虫及成虫残体的 DNA 条

形码识别技术(姜帆等 2011; 刘慎思等, 2012; 龚秀泽等, 2014; 赵岩等, 2019); 6 种果实蝇属常见实蝇的指纹图谱 RAPD 技术(张亮和张智英, 2007); 地中海实蝇、瓜实蝇和橘小实蝇基于 SSR 序列的特异性引物 PCR 技术(丁思敏等, 2018); 地中海果蝇和甜瓜果蝇等的 LAMP 技术(Huang *et al.*, 2009; Sabahi *et al.*, 2018); 地中海实蝇和纳塔耳实蝇 *Ceratitis rosa* 的 AFLP 技术(Kakouli *et al.*, 2001); 地中海实蝇及其近缘种、桔小实蝇及复合种的基因芯片鉴定技术等(李文芬, 2008)。这些分子鉴定技术尽管方便快捷, 但也有一定的局限性。DNA 条形码技术的实验结果易出现假阳性, 对物种的界定没有统一标准(刘慎思, 2012); RAPD 技术 PCR 体系及反应条件难以掌控, 易受模板 DNA、Taq DNA 聚合酶等因素的干扰, 导致有些条带特别是较弱的条带出现缺失(陈韶萍等, 2014); SSR 技术与 RAPD 法一样, 其反应条件也易受到各种因素影响, 不同物种间保守性较差, 引物筛选过程复杂, 不利于田间大量检测未知样本(陈韶萍等, 2014); LAMP 法由于灵敏度高, 一旦开盖容易形成气溶胶污染, 假阳性问题比较严重, 引物设计要求比较高(王泽乐等, 2006; Huang *et al.*, 2009); AFLP 分析成本高、对样本 DNA 质量要求较高, 从银染色凝胶中扩增 AFLP 片段较困难(陈韶萍等, 2014); 基因芯片技术引物和探针的设计与筛选过程复杂, 选择适宜分子标记基因较困难(刘慎思, 2012; 陈韶萍等, 2014); RFLP 酶切位点的具多态性, 限制性内切酶特异性要求高(陈韶萍等, 2014)。

随着分子生物学技术的发展, 基于聚合酶链式反应扩增 DNA 片段的限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP 技术)作为实蝇类害虫分子鉴定技术之一, 早已被前人广泛研究。例如, 早在 2002 年日本学者就利用 PCR-RFLP 技术对亚太地区常见的 18 种实蝇进行了分离鉴定(Muraji and Nakahara, 2002); Shigehito 等(2008)利用 PCR-RFLP 技术检测橘小实蝇种群之间遗传变异。但是日本学者利用 PCR-RFLP 技术鉴定实蝇时需要限制性内切酶较多(2 μ L)、总反应体系

较大(10 mL)、成本相对较高、酶切时间较长(2 h)、凝胶电泳时间过长(2 h)、酶切后电泳图谱特征条带较多不易查看结果(Muraji and Nakahara, 2002)。国内学者吴佳教等(2004)借助 2 种引物以及 2 种限制性内切酶 *MES* I 和 *DRA* I, 通过 PCR-RFLP 方法鉴定了桔小实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、条具实蝇、锈实蝇和木姜子实蝇 6 种检疫性实蝇。但是其需采用两对引物同时进行扩增, 两种酶均需对 PCR 产物进行酶切鉴定, 增加了检测时的工作量, 且酶切反应耗时较长(2-3 h)。基于此, 本研究针对国内瓜果蔬菜上发生危害最为严重的瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇的幼虫难以区分鉴定的问题, 建立了一套不受虫体和虫态限制, 操作简单、快速的 PCR-RFLP 快速分子鉴定技术, 并运用此法对我国南方部分地区不同寄主上的实蝇种类进行鉴定。

通过筛选特异性高的限制性内切酶, 优化酶切体系及反应条件, 减少鉴定周期, 建立一种低成本的、不受虫体虫态限制, 能够快速、高效、准确识别我国瓜果上最主要 3 种实蝇危害种(瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇)的 PCR-RFLP 分子鉴定技术, 在一定程度上弥补前人研究的不足。本研究建立的 PCR-RFLP 技术首先酶切时所需限制性内切酶量少(0.1 μ L), 酶切总反应体系小(10 μ L), 从一定程度上降低了成本; 其次对 DNA 提取方法、酶切时间和凝胶电泳时间等进行了优化, DNA 提取 20 min, 酶切时间 1.5 h, 凝胶电泳时间 25 min, 鉴定所需时间较短, 可快速对样本进行鉴定; 此外聚合酶链反应扩增 DNA 片段采用通用引物对, 提高了扩增效率, 酶切后特征条带为两条带, 结果简单易区分, 可用于大量检测田间未知实蝇样本。但是该方法也存在缺陷, 首先, 本研究方法只能用来同时鉴定瓜实蝇、南亚果实蝇和橘小实蝇。其次, 对于未知样本需要进行逐步酶切鉴定, 一方面鉴定程序仍不够简便, 另一方面增加了酶的用量, 提高了鉴定成本; 最后, 若酶切时 DNA 浓度较高, 可能存在 PCR 产物未酶切完现象, 继而出现 PCR 产物的 mtDNA *CO* I 基因片段对鉴定结果造成

干扰。

本文建立的 PCR-RFLP 技术对我国南方部分地区不同寄主上的实蝇种类进行鉴定。从寄主植物来看,田间鉴定结果表明为害黄瓜、苦瓜、西瓜、甜瓜、丝瓜等瓜类蔬菜的既有瓜实蝇,又有南亚果实蝇,这一现象符合吴佳教等(2004)曾提到瓜实蝇和南亚果实蝇存在寄主重叠的现象。其次,从地理位置来看,危害湖北、湖南、浙江等地区瓜菜的实蝇主要是南亚果实蝇;危害广东、广西、海南等地区瓜菜的实蝇主要是瓜实蝇,云南地区危害火龙果和芒果等的实蝇主要是橘小实蝇。据报道,早在2008年孔令斌等(2008)就基于 CLIM-EX 和 DIVA-GIS 软件研究了瓜实蝇的潜在地理分布,结果表明我国 34.7°-18.1°N, 97.5°-122.6°E 范围内的 19 个省(市、自治区)是瓜实蝇的潜在地理分布区,其中广东、广西、海南、福建南部、云南南部、台湾西部、四川盆地、江西、湖南、贵州、重庆、上海、四川、云南、福建、浙江、江苏、安徽、湖北、陕西、河南、甘肃局部地区为中低度适生区。本研究中广东、广西、海南地区鉴定结果与孔令斌等(2008)及刘勇等(2019)研究的结果一致。此外,本研究田间实蝇鉴定结果显示湖北武汉新洲的南瓜上造成危害的实蝇,是南亚果实蝇和瓜实蝇混合发生,实蝇优势种为瓜实蝇(约占总发生量的 70%)。因此,推测近年来瓜实蝇有逐渐向中低度适生区扩散的趋势,这与毛红彦等(2019)研究的结果相同。研究表明在 2014-2017 年在河南最南边的信阳地区均有瓜实蝇发生,2015 年和 2016 年分别于河南中部地区的郑州和东部地区的商丘首次诱集到瓜实蝇,但直至 2018 年在河南最北部的安阳也没有发现瓜实蝇(毛红彦等,2019)。因此,推测瓜实蝇有逐渐向北扩散的趋势,建议北方瓜菜种植区应加强对瓜实蝇的监测检疫工作,尤其是“南果北输”的检疫工作,以便及时发现虫情,尽早采取相关防治措施,消灭虫源,以控制其蔓延。

参考文献 (References)

Ao GF, Lin J, Liu XX, Ji QE, 2019. Advances in research on insecticide resistance in the Tephritidae. *Chinese Journal of*

Applied Entomology, 56(3): 401-415. [敖国富, 林嘉, 刘旭祥, 季清娥, 2019. 实蝇害虫抗药性研究进展. 应用昆虫学报, 56(3): 401-415.]

Chen SP, Huang Z, Guo QX, Liu CM, 2014. The research progress of the molecular identification of fruit fly. *Journal of Biosafety*, 23(3): 151-155. [陈韶萍, 黄振, 郭琼霞, 刘长明, 2014. 实蝇类害虫分子鉴定研究进展. 生物安全学报, 23(3): 151-155.]

Chua TH, Chong YV, Lim SH, 2010. Species determination of *Malaysian bactrocera* pests using PCR-RFLP analyses (Diptera: Tephritidae). *Pest Manag. Sci.*, 66(4): 379-384.

Daisuque K, KohIchi T, 2020. Simple and on site DNA purification for LAMP reaction applicable to non-adult tephritid fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.*, 144(9): 824-829.

De Barro PJ, Driver F, 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.*, 36(2): 149-152.

Ding SM, Wang SP, He K, Li F, Jiang MX, 2018. PCR-based identification of fruit-flies using specific SSR sequences. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55 (3): 759-765. [丁思敏, 王书平, 贺康, 李飞, 蒋明星, 2018. 基于基因组特异性 SSR 序列的实蝇 PCR 鉴定方法. 应用昆虫学报, 55 (3): 759-765.]

Gong XZ, Nopparat B, Lu HL, Li ZH, Zhang JC, 2014. Research on using DNA barcode technology to identify the intercepted *Bactrocera Cucurbitae* larvae. *Plant Quarantine*, 28(1): 57-60. [龚秀泽, Buahom Nopparat, 卢厚林, 李志红, 张君潮, 2014. 利用 DNA 条形码技术对截获瓜实蝇幼虫的鉴定研究. 植物检疫, 28(1): 57-60.]

Frohlich DR, Torres-Jerez I, Bedford ID, Markham PG, Brown JK, 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Mol. Ecol.*, 8(10): 1683-1691.

He C, Kong Q, Yuan SY, Shen DR, Xie K, Wang ZM, 2019. Oviposition preference and offspring performance of *Bactrocera tau* and *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) on six host fruits. *Journal of Environmental Entomology*, 41(2): 316-322. [何超, 孔琼, 袁盛勇, 沈登荣, 谢昆, 王传铭, 2019. 6 种寄主果实对南瓜实蝇和瓜实蝇产卵选择及其子代发育的影响. 环境昆虫学报, 41(2): 316-322.]

Huang CG, Hsu JC, Haymer DS, Lin GC, Wu WJ, 2009. Rapid identification of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Economic Entomology*, 102(3): 1239-1246.

Huang Y, Gu X, Peng X, Tao M, Chen G, Zhang X, 2020. Effect of short-term high-temperatures on the growth, development and reproduction in the fruit fly, *Bactrocera tau* (Diptera:

- Tephritidae). *Sci. Rep.*, 10(1): 6418.
- Huang Z, 2010. Morphological identification, artificial diet, suitability analysis and prediction, qualitative and quantitative risk analysis of important *Bactrocera* species. Master dissertation. Hainan: Hainan University. [黄振, 2010. 果实蝇属重要种的鉴定、人工饲料筛选、适生性预测和风险分析. 硕士学位论文. 海南: 海南大学.]
- Huang Z, Guo QX, Chen SP, 2020. Rapid identification of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Coquillett) by using species-specific PCR technique. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 48(6): 83–86, 96. [黄振, 郭琼霞, 陈韶萍, 2020. 应用 SS-PCR 技术设计种特异性引物快速鉴定瓜实蝇. *安徽农业科学*, 48(6): 83–86, 96.]
- Jiang F, 2015. Technique system for molecular identification of quarantine fruit flies in china. Doctoral dissertation. Beijing: China Agricultural University. [姜帆, 2015. 我国检疫性实蝇分子鉴定技术体系的研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学.]
- Jiang F, Liu JQ, Li ZH, Wu JJ, Zhao S, 2011. Molecular identification of fruit fly larvae by DNA barcodes. *Plant Protection*, 37(4): 150–153. [姜帆, 刘佳琪, 李志红, 吴佳教, 赵朔, 2011. 基于 DNA 条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究. *植物保护*, 37(4): 150–153.]
- Kakouli DT, Casey DG, Burnell AM, 2001. Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae) using amplified fragment-length polymorphism. *Journal of Economic Entomology*, 94(4): 989–997.
- Kong LB, Lin W, Li ZH, Wan FH, Wang ZL, Huang GS, 2008. Predication of potential geographic distribution of melon fruit fly based on CLIMEX and DIVA-GIS. *Journal of Plant Protection*, 35(2): 149–154. [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): 149–154.]
- Li WF, 2008. Establishment and Application of gene chip for *Ceratitis capitata*, and its related species and *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae). Master dissertation. Hunan: Hunan Normal University. [李文芬, 2018. 地中海实蝇及其近缘种和桔小实蝇复合种基因芯片的研制及应用. 硕士学位论文. 湖南: 湖南师范大学.]
- Liu SS, Zhang GF, Wu Q, Zhang AB, Wang JJ, Wan FH, 2012. Establishment and application of DNA barcoding technology for identification of the immatures and adult debris of *Bactrocera dorsalis*(Hendel)(Diptera:Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 336–343. [刘慎思, 张桂芬, 武强, 张爱兵, 王进军, 万方浩, 2012. 桔小实蝇幼体及成虫残体 DNA 条形码识别技术的建立与应用. *昆虫学报*, 55(3): 336–343.]
- Liu SS, 2012. Identification of major Tephritid fruit fly pests basad on DNA barcoding. Master dissertation. Sichuan: Southwest University. [刘慎思, 2012. DNA 条形码技术在主要实蝇类害虫识别中的应用. 四川: 西南大学.]
- Liu Y, Huang WK, Wu QX, Wang S, Huang GS, Ye QH, Luo F, Wang SL, Kong XY, 2019. Studies on identification of dominant species of fruit flies on cucurbitplants and effects of different trapping treatments in Sanya. *China Cucurbits and Vegetables*, 32(12): 27–30. [刘勇, 黄伟康, 吴乾兴, 王爽, 黄国宋, 叶其宏, 罗丰, 王少丽, 孔祥义, 2019. 三亚瓜类作物上实蝇优势种类鉴别及不同诱捕处理的效果. *中国瓜菜*, 32(12): 27–30.]
- Ma XL, Li ZH, Hu XN, Wu JJ, 2013. The assessment of the economic losses caused by *Bactrocera dorsalis*, *B. cucurbitae* and *B. tau* to Guangdong province. *Plant Quarantine*, 27(3): 50–56. [马兴莉, 李志红, 胡学难, 吴佳教, 2013. 橘小实蝇、瓜实蝇和南亚果实蝇对广东省造成的经济损失评估. *植物检疫*, 27(3): 50–56.]
- Mao HY, Ding HF, Jiao YJ, Huang H, Han SP, 2020. The monitoring of population dynamics of *Zeugodacus tau* in Henan from 2013 to 2017. *Plant Quarantine*, 34(1): 82–84. [毛红彦, 丁华锋, 焦永吉, 黄华, 韩世平, 2020. 2013—2017 年河南省南亚果实蝇种群动态监测. *植物检疫*, 34 (1): 82–84.]
- Mao HY, Zhao Y, Ding HF, Jiao YJ, Sun GQ, Lu CX, Han SP, 2019. Monitoring on the population dynamics of major fruit flies in Henan province. *China Plant Protection*, 39(11): 77–83. [毛红彦, 赵岩, 丁华锋, 焦永吉, 孙国强, 陆春显, 韩世平, 2019. 河南省重要实蝇的种群动态监测. *中国植保导刊*, 39(11): 77–83.]
- Muraji M, Nakahara S, 2002. Discrimination among pest species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA. *Appl. Entomol. Zool.*, 37(3): 437–446.
- Onah IE, Eyo JE, Taylor D, 2015. Molecular identification of tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) infesting sweet oranges in Nsukka agro-ecological zone, Nigeria, based on PCR-RFLP of COI gene and DNA barcoding. *Afr. Entomol.*, 23(2): 342–347.
- Reyard M, Casper N, Gerald C, Frank C, 2021. Overview of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in Africa: From invasion, bio-ecology to sustainable management. *Crop Prot.*, 141: 105492.
- Sabahi S, Fekrat L, Zakiaghl M, Moravej GH, 2018. Loop-mediated isothermal amplification combined with PCR for rapid identification of the ethiopian fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Neotrop. Entomol.*, 47(1): 96–105.
- Shigehito N, Yoshikazu K, Masahiko M, 2008. Genetic variations

- among and within populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), detected by PCR-RFLP of the mitochondrial control region. *Applied Entomology and Zoology*, 43(3): 457–465.
- Wang H, Zhou LB, Li Q, 2009. Identification on the suspicious species of *Bactrocera tau* by molecular biological method. *Plant Quarantine*, 23(4): 17–19. [王辉, 周力兵, 李强, 2009. 应用分子生物学技术鉴定南亚果实蝇存疑种. 植物检疫, 23(4): 17–19.]
- Wang XJ, 1995. *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) pest of impartment fruit and vegetable. *Plant Quarantine*, 9(1): 20–30. [汪兴鉴, 1995. 重要果蔬类有害实蝇概论(双翅目: 实蝇科). 植物检疫, 9(1): 20–30.]
- Wang ZL, Liu YH, Li XZ, Liu MS, Pei MY, 2006. Application of molecular biological techniques in insect phylogeny of the family Tephritidae. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(5): 603–607. [王泽乐, 刘映红, 李小珍, 刘明圣, 裴明玉, 2006. 分子生物学技术在双翅目实蝇科昆虫系统发育研究中的应用. 昆虫知识, 43(5): 603–607.]
- Wu JJ, Hu XN, Zhao JP, Liang F, Liang GQ, 2005. Rapid identification among 9 species of quarantine fruit flies (Diptera: Tephritidae) by PCR-RFLP. *Plant Quarantine*, 19(1): 2–6. [吴佳教, 胡学难, 赵菊鹏, 梁帆, 梁广勤, 2005. 9 种检疫性实蝇 PCR-RFLP 快速鉴定研究. 植物检疫, 19(1): 2–6.]
- Wu JJ, Liang F, Hu XN, Zhao JP, Liang GQ, 2004. A study on quick discrimination among 6 species of fruit flies (Tephritidae: *Bactrocera*) in south china based on PCR-RFLP. *Journal of Jiangxi Agricultural University (Natural Sciences Edition)*, 26(5): 770–773. [吴佳教, 梁帆, 胡学难, 赵菊鹏, 梁广勤, 2004. 我国南方常见的 6 种寡毛实蝇 PCR-RFLP 快速鉴定研究. 江西农业大学学报(自然科学版), 26(5): 770–773.]
- Xu HY, He YB, Zhan RL, Zhao YL, Li GP, Chang JM, 2015. Overview of fruit fly (Diptera: Tephritidae) in south China. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 35(3): 62–69, 76. [许恒瑜, 何衍彪, 詹儒林, 赵艳龙, 李国平, 常金梅, 2015. 我国南方实蝇类害虫概述. 热带农业科学, 35(3): 62–69, 76.]
- Yu DJ, Deng ZP, Cheng ZL, Jiao Y, Zhang GM, Kang L, Yang WD, Jin XZ, 2004. Method of the polymerase chain reaction for quarantine and identification of *Bactrocera correcta*. *Plant Quarantine*, 18(2): 73–76. [余道坚, 邓中平, 陈志舜, 焦懿, 章桂明, 康林, 杨伟东, 金显忠, 2004. PCR 法检疫鉴定番石榴实蝇. 植物检疫, 18(2): 73–76.]
- Yu DY, Yao JA, Hu JF, Huang P, Fang DL, Chen F, 2011. Genomic DNA extraction of three kinds of fruit flies and their ISSR-PCR reaction system establishment. *Journal of Agronomy*, 1(5): 22–28. [余德亿, 姚锦爱, 胡进锋, 黄鹏, 方大琳, 陈峰, 2011. 3 种实蝇基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 反应体系的建立. 农学学报, 1(5): 22–28.]
- Zhang H, Ma J, He HL, Lin JT, 2016. Research progress in methods for classification and identification of invasive tephritids insects. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 35(4): 136–144. [张鹤, 马骏, 贺华良, 林进添, 2016. 入侵性实蝇鉴定分类方法的研究进展. 华中农业大学学报, 35(4): 136–144.]
- Zhang L, Zhang ZY, 2007. Random amplified polymorphic DNA identification of six *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) species in Yunnan province of southwest China. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(5): 1165–1168. [张亮, 张智英, 2007. 云南六种实蝇的 RAPD 快速鉴定. 应用生态学报, 18(5): 1165–1168.]
- Zhao Y, Han SQ, Ding HF, Mao HY, Wang Z, Liu JP, Zhang JY, Li ZH, 2019. Molecular identification of important fruit flies collected in summer in Henan province by DNA barcoding. *China Plant Protection*, 39(5): 11–14. [赵岩, 韩世平, 丁华锋, 毛红彦, 王震, 刘建平, 张金勇, 李志红, 2019. 基于 DNA 条形码技术的河南省夏季重要实蝇害虫分子鉴定. 中国植保导刊, 39(5): 11–14.]
- Zhong Y, Huang SP, Li YR, Ma FH, Liang K, Lan YW, He CW, 2019. Establishment of a visual LAMP for the rapid detection of *Bactrocera cucurbitae* (Zeugodacus). *Plant Quarantine*, 33(1): 35–38. [钟勇, 黄素萍, 李秉然, 马福欢, 梁琨, 蓝翊文, 何成伟, 2019. 瓜实蝇可视化 LAMP 快速分子检测方法. 植物检疫, 33(1): 35–38.]