

应用 SS-PCR 技术设计种特异性引物快速鉴定瓜实蝇

黄振^{1,2}, 郭琼霞^{3*}, 陈韶萍^{2,3}

(1. 福州长乐机场海关, 福建福州 350209; 2. 福建农林大学植物保护学院, 福建福州 350002; 3. 福州海关技术中心, 福建福州 350001)

摘要 [目的] 为了促进果蔬进出口贸易和快速通关, 防止瓜实蝇 [*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)] 进一步传入扩散, 迫切需要开展适合实蝇快速鉴定技术的研究。[方法] 应用 SS-PCR 技术, 基于 mtDNA COI 序列, 设计了 1 对能够准确鉴定瓜实蝇的种特异性引物 GF85 和 GR531。选用瓜实蝇作为阳性对照, 南瓜实蝇 [*B. tau* (Walker)]、具条实蝇 [*B. scutellata* (Hendel)] 等其他 19 种待测实蝇作为阴性对照, 提取供试虫样基因组 DNA, 并进行 PCR 扩增和电泳检测。[结果] 仅虫样瓜实蝇能在约 447 bp 位置扩增出一条清晰且单一的条带, 其余的虫样未出现条带。[结论] 将该试验建立的 SS-PCR 鉴定方法应用于实际进出境果蔬截获和疫情监测的虫样的鉴定, 并得到验证, 表明该方法具特异性、稳定性强, 可在实际的实蝇鉴定工作中应用。

关键词 瓜实蝇; mtDNA COI; 种特异性引物; SS-PCR; 快速鉴定

中图分类号 S433 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)06-0083-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.06.024



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Rapid Identification of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) by Using Species-specific PCR Technique

HUANG Zhen^{1,2}, GUO Qiong-xia³, CHEN Shao-ping^{2,3} (1. Fuzhou Changle Airport Customs, Fuzhou, Fujian 350209; 2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 3. Fuzhou Customs Technology Center, Fuzhou, Fujian 350001)

Abstract [Objective] In order to promote the import and export trade of fruits and vegetables and rapid customs clearance, prevent further damage from *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), there is an urgent need to develop a rapid identification technology suitable for the fly. [Method] A pair of primers, GF85 and GR531, was designed and synthesized based on the mtDNA CO I sequence. *B. cucurbitae* (Coquillett) was chosen as the positive control and other 19 species of fruit flies including *B. tau* (Walker), *B. scutellata* (Hendel) and so on were used as the negative controls, for the PCR amplification and gel electrophoresis. [Result] Clear and single 447 bp band was amplified only in *B. cucurbitae* (Coquillett), but not in the other 19 fruit flies. [Conclusion] The SS-PCR identification method established in this experiment has been applied and verified in inspection and quarantine, indicating that this method has high species specificity and can be applied in infestation monitoring and quarantine surveillance of fruit flies in ports.

Key words *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett); mtDNA COI; Species-specific primers; Species-specific PCR (SS-PCR); Rapid identification

瓜实蝇 [*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)] 是我国进境果蔬中的重要检疫性害虫, 隶属于双翅目 (Diptera) 实蝇科 (Tephritidae) 果实蝇属 (*Bactrocera*)。1913 年, 瓜实蝇在印度被 Bezzi 首次报道, 目前分布于亚洲的巴基斯坦、尼泊尔、斯里兰卡、菲律宾、中国以及其他东南亚国家和地区, 非洲的喀麦隆、埃及、肯尼亚、毛里求斯、坦桑尼亚等国家, 大洋洲的澳大利亚、新几内亚、马里亚纳群岛和夏威夷群岛、所罗门群岛、罗塔、关岛群岛、瑙鲁以及南太平洋岛屿和美国南部^[1]。在中国, 主要分布在西南、华南、华东的部分地区以及台湾、香港等地区^[2]。瓜实蝇寄主范围很广, 主要有番石榴、桃、无花果、甜瓜、西瓜、辣椒、菜豆、苦瓜、南瓜和番茄等葫芦科和茄科等植物, 为害种类超过 120 种^[3]。

近年来, 由于国际贸易日渐频繁, 合作领域不断拓宽, 进境果蔬种类、数量不断增加, 给瓜实蝇的进一步传入带来了潜在危险^[4-5], 而在进境果蔬中截获到的实蝇均为幼虫、卵或蛹, 从外观形态往往难以对其进行正确的种类识别。为了促进果蔬进出境贸易, 加快口岸通关速度, 以及疫情监测中实蝇虫样的快速鉴定, 亟需开展实蝇的快速鉴定识别技术。

应用 SS-PCR 分子生物学技术快速鉴定害虫种类, 不仅能解决传统的形态学分类方法难以解决的问题, 而且不受

卵、幼虫、蛹等不同虫态和虫体组织的影响。近年来, 分子生物学技术被广泛运用于昆虫的鉴定中^[6-7]。目前, 线粒体 DNA mtDNA CO I 被越来越多地应用于实蝇近缘种的系统发育研究中^[8-9]。

为了实现对口岸截获的疑似瓜实蝇的卵、蛹、幼虫、成虫及虫体组织的准确鉴定, 笔者基于 SS-PCR (species-specific PCR) 技术, 拟筛选设计种特异引物快速鉴定瓜实蝇的方法, 应用于口岸的实际检疫和疫情监测。

1 材料与方法

1.1 供试虫样 供试实蝇虫样: 瓜实蝇 [*B. cucurbitae* (Coquillett)]、南瓜实蝇 [*B. tau* (Walker)]、具条实蝇 [*B. scutellata* (Hendel)]、番石榴实蝇 [*B. correcta* (Bezzi)]、颜带实蝇 [*B. cilifer* (Hendel)]、橘小实蝇 [*B. dorsalis* (Hendel)]、锈实蝇 [*B. rubigina* (Wang & Zhao)]、杨桃实蝇 (*B. carambolae* Drew & Hancock)、辣椒实蝇 [*B. latifrons* (Hendel)]、腿端黑实蝇 (*B. atrifemur* Drew & Hancock)、黑颜实蝇 (*B. diaphora* Coquillett)、近黑颜实蝇 [*B. parater* (Zhao & Lin)]、黑膝实蝇 [*B. scutellaris* (Bezzi)]、瑞丽果实蝇 (*B. ruiliensis* Wang, Long et Zhang, sp. nov.)、滇寡孳实蝇 [*B. modica* (Hardy)]、瘤胫实蝇 [*B. tuberculata* (Bezzi)]、枣实蝇 (*Carpomya vesuviana* Costa)、何氏华实蝇 [*B. hochii* (Zia)]、瓜棍腹实蝇 (*Dacus longicornis* Wiedemann)、五指山实蝇 (*B. wuzhishana* Lin et Yang, sp. nov.) 等, 包括 *Bactrocera*、*Carpomya*、*Dacus* 3 个属以及果实蝇属的 4 个亚属: *Bactrocera*、*Zeugodacus*、*Asiadacu*、*Sinodacuss* 共 20 个

基金项目 福建省自然科学基金项目 (2011J01066、2012J01061); 福建出入境检验检疫局科技项目 (FK2010-27、FK2011-56)。

作者简介 黄振 (1985—), 男, 福建莆田人, 高级农艺师, 在读博士, 从事农业昆虫与害虫防治研究。* 通信作者, 研究员, 从事植物检疫研究。

收稿日期 2019-09-13

实蝇种类,供试实蝇均来自口岸进境果蔬截获和我国边境监测,供试实蝇采用 75%乙醇浸泡,放置冰箱备用。

1.2 研究方法^[7]

1.2.1 DNA 提取和质量检测。

1.2.1.1 DNA 提取。选用 20 种实蝇的不同虫态:蛹、幼虫、成虫,或其成虫的虫体组织部分(1 条腿或 1 片翅膀)作为供试虫样,按照 OMEGA E.Z.N.ATM Insect DNA Kit 试剂盒说明书的步骤进行操作,提取待测样品的基因组 DNA。

1.2.1.2 DNA 质量检测。利用 1 对通用引物 LCO1490:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3', HCO2198:5'-TA-AACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3',对提取的供试实蝇虫样的 DNA 质量进行检测,选取定量梯度 PCR 仪进行 PCR 反应,产物在含 DNA 染色剂的 1.5%琼脂糖凝胶多功能电泳仪上电泳,采用凝胶成像分析仪检测扩增出的大小和目标片段,拍摄记录扩增结果。

1.2.2 引物设计。应用 NCBI 数据库查找瓜实蝇已经公布并登录序列,并与已知其他种类的 mtDNA CO I 基因序列进行比较分析,选定登录号为 KF660048 的 CO I 基因序列,利用 NCBI 数据库中提供的 BLAST 程序检查同源序列,最终选定设计瓜实蝇特异性引物所用到的实蝇种类及其登录号(表 1)。

表 1 设计瓜实蝇特异性引物所用到的实蝇种类及相应的登录号
Table 1 The species of fruit flies and the accession No. for designing specific primers of *B.cucurbitae*

序号 No.	实蝇名称 Name of the fruit fly	登录号 Accession No.
1	瓜实蝇	KF660048.1
2	南瓜实蝇	KF660161.1
3	普通果实蝇	KM505013.1
4	何华氏实蝇	KF659867.1
5	颜带实蝇	KJ753902.1
6	具条实蝇	KF660091.1
7	橘小实蝇	KF998678.1
8	杨桃实蝇	KF998587.1

下载表中 8 种实蝇序列的 FASTA 格式,进行序列比对,根据 SNP 位点,利用 Primer-Premier 5.0 进行人工设计引物,并采用 Oligo 6.44 对引物进行评定及用 NCBI 数据库中提供的程序 Primer-BLAST 检查同源序列,进行引物设计。

1.2.3 引物种特异性与灵敏度测试。

1.2.3.1 引物种特异性测试。选取瓜实蝇为阳性对照,其余的 19 种供试实蝇虫样作为阴性对照,设计反应体系和反应条件,应用凝胶成像分析仪检查是否扩增出目标片段,检测所设计的瓜实蝇特异片段扩增引物的种特异性^[10]。

1.2.3.2 引物灵敏度测试。采用核酸蛋白分析仪对提取的瓜实蝇 DNA 模板的浓度进行测试检验靶标片段扩增效果。将瓜实蝇的 DNA 模板,按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 倍 3 种梯度的浓度稀释,再用种特异性引物 GF85 和 GR531 进行 PCR 扩增,检测最低阈值,验证该检测方法特异性引物的灵敏度。

1.2.4 方法与验证。采用 SS-PCR 快速鉴定方法,鉴定瓜实蝇样品(均为福州口岸进境果蔬中截获并饲养至成虫,经专家进行复合鉴定为瓜实蝇)共 21 批,选取其幼虫、蛹、成虫或成虫组的足、翅作为虫样,提取基因组 DNA 作为模板,应用瓜实蝇种特异性引物 GF85 和 GR531 进行 PCR 扩增,检验该试验方法的准确性和稳定性。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果 利用 LCO1490 和 HCO2198 通用引物对提取的 20 种实蝇虫样基因组 DNA 模板进行 PCR 扩增,结果表明供试的所有实蝇种类的 DNA 均能在长度约 700 bp 位置扩增出一条清晰且明显的目标条带(图 1)。

2.2 种特异性引物的选择 利用 Bioedit 对已下载的 KF660048.1、KF660161.1、KM505013.1、KF659867.1、KJ753902.1、KF660091.1、KF998678.1、KF998587.1 这 8 种实蝇的 mtDNA CO I 基因序列进行 ClustalW 多重比对,通过 NCBI 数据库提供的 Primer-BLAST 程序检查同源序列进行筛选,最终选择 1 对种特异性引物,为 GF'85 和 GR'531。选择英潍捷基(上海)贸易有限公司进行引物合成,序列分别为 GF'85:5'-TCATCGTAACAGCTCATGCAT-3' 和 GR'531:5'-CTCCG-GCTAATACAGGTAGAGA-3'。

将 GF'85 和 GR'531 利用 NCBI 数据库提供的 Primer-BLAST 程序检查同源序列,最终将正向引物 GF'85 的第 8 个碱基 A 颠换成 T,第 11 个碱基 A 转换成 G,第 17 个碱基 T 颠换成 A,反向引物 GR'531 的第 2 个碱基 T 转换成 C,第 3、4 个碱基 C 转换成 T,确定出引物 GF85 和 GR531(图 2)。

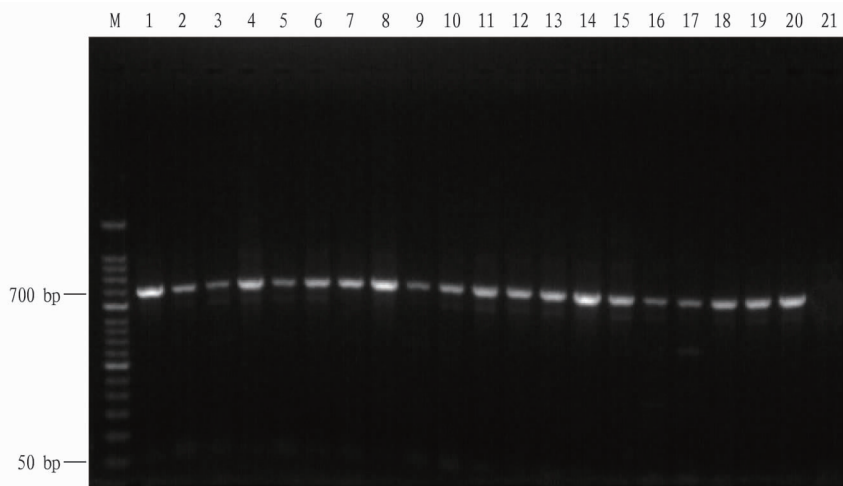
2.3 引物种特异性与灵敏度

2.3.1 引物种特异性。通过对选择的 GF85 和 GR531 种特异性引物进行扩增,结果表明只有阳性对照瓜实蝇在约 447 bp 的位置扩增出了一条清晰且明显透明的条带,其余 19 种供试的实蝇均未见任何目标条带,试验重复 3 次结果一致,结果表明设计的 GF85 和 GR531 种特异性引物有较强的特异性和稳定性(图 3)。

将试验所获得的 PCR 产物通过英潍捷基(上海)贸易有限公司测序,将结果提交 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,试验表明该段序列与数据库中的瓜实蝇序列完全一致。

2.3.2 引物灵敏度。采用核酸蛋白分析仪对提取的瓜实蝇 DNA 模板的浓度进行测试,浓度为 21.62 ng/μL。取 DNA 模板的不同浓度测定最低检出阈值,结果表明模板浓度降低,扩增出的条带呈逐渐变淡的趋势,稀释至 10⁻¹ 倍后,仍可见有明显条带,表明该方法具有较高的灵敏度(图 4)。

2.4 方法与验证 采用 SS-PCR 快速鉴定瓜实蝇的方法,鉴定从福建口岸进境的水果中截获的瓜实蝇虫样 21 份,均能扩增出目标条带(图 5),结果表明该试验鉴定结果与形态学的鉴定结果一致,所以应用 SS-PCR 技术设计种特异性引物快速鉴定瓜实蝇方法具有较好的稳定性,能够在检疫鉴定工作中准确鉴定出瓜实蝇,并可作为口岸进出境果蔬检疫和实蝇疫情监测鉴定工作的重要依据。

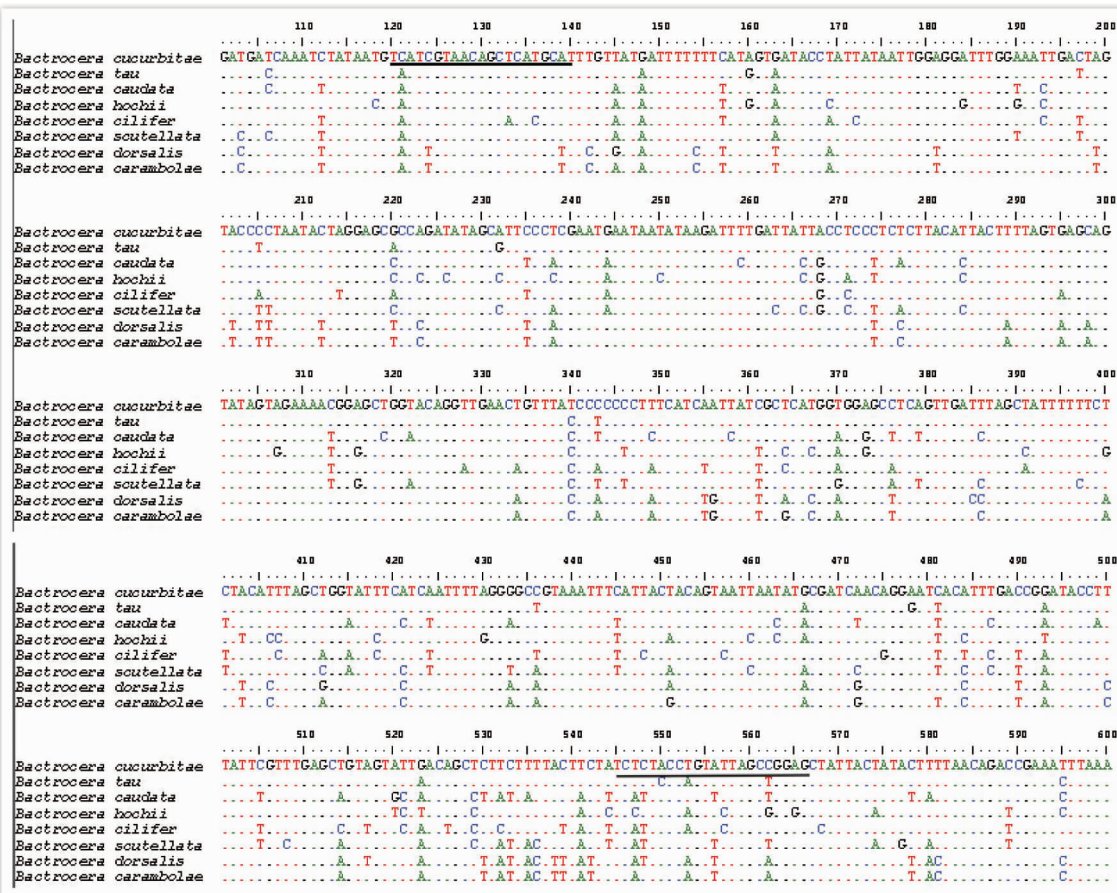


注: M. 50 bp DNA Ladder; 1. 南瓜实蝇; 2. 具条实蝇; 3. 番石榴实蝇; 4. 颜带实蝇; 5. 橘小实蝇; 6. 瓜实蝇; 7. 锈实蝇; 8. 杨桃实蝇; 9. 辣椒实蝇; 10. 腿端黑实蝇; 11. 黑颜实蝇; 12. 近黑颜实蝇; 13. 黑膝实蝇; 14. 瑞丽果实蝇; 15. 滇寡鬃实蝇; 16. 瘤胚实蝇; 17. 枣实蝇; 18. 何氏华实蝇; 19. 瓜棍腹实蝇; 20. 五指山实蝇; 21. 空白对照 (dd H₂O)

Note: M. 50 bp DNA Ladder; 1. *B. tau* (Walker); 2. *B. scutellata* (Hendel); 3. *B. correcta* (Bezzi); 4. *B. cilifer* (Hendel); 5. *B. dorsalis* (Hendel); 6. *B. cucurbitae* (Coquillett); 7. *B. rubigina* (Wang & Zhao); 8. *B. carambolae* Drew & Hancock; 9. *B. latifrons* (Hendel); 10. *B. atrifemur* Drew & Hancock; 11. *B. diaphora* Coquillett; 12. *B. parater* (Zhao & Lin); 13. *B. scutellaris* (Bezzi); 14. *B. ruihensis* Wang, Long et Zhang, sp. nov.; 15. *B. modica* (Hardy); 16. *B. tuberculata* (Bezzi); 17. *Carpomya vesuviana* Costa; 18. *B. hochii* (Zia); 19. *Dacus longicornis* Wiedemann; 20. *B. wuzhishana* Lin et Yang, sp. nov.; 21. Blank control (dd H₂O)

图 1 利用通用型引物 LCO1490 和 HCO2198 对提取的实蝇 DNA 模板进行质量检测的结果

Fig.1 The quality inspection results by using universal primers of LCO1490 and HCO2198 on the extraction of fruit flies' DNA templates

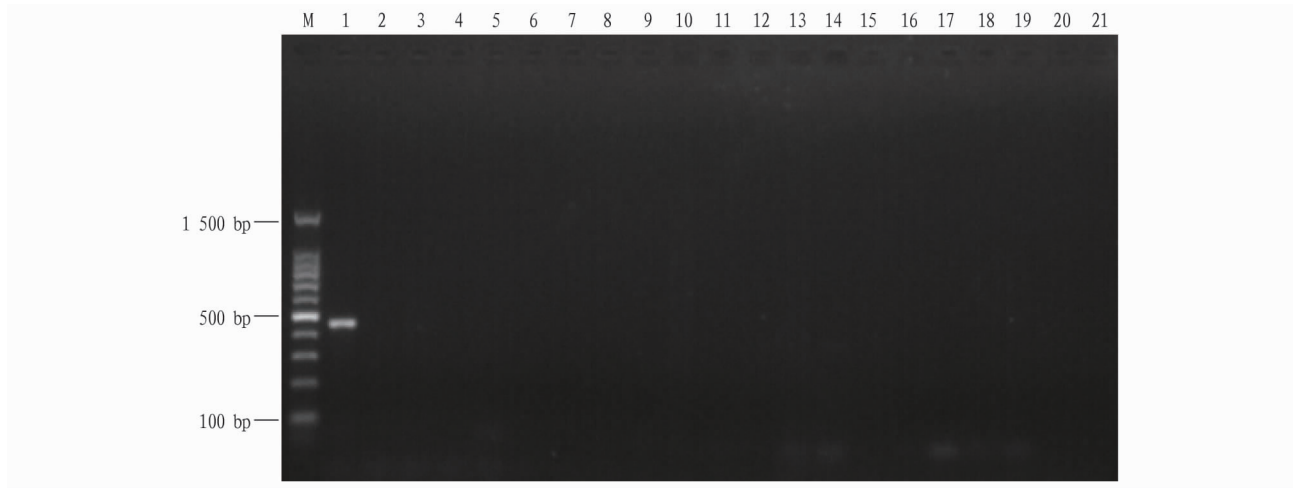


注: 其中种特异性引物 GF' 85 和 GR' 531 的序列位置用横线划出

Note: The sequence positions where the species specific primers GF' 85 and GR' 531 were draw with horizontal line

图 2 8 种果实蝇 ClustalW 多重比对的部分结果

Fig.2 Part of ClustalW multiple comparison of 8 fruit flies

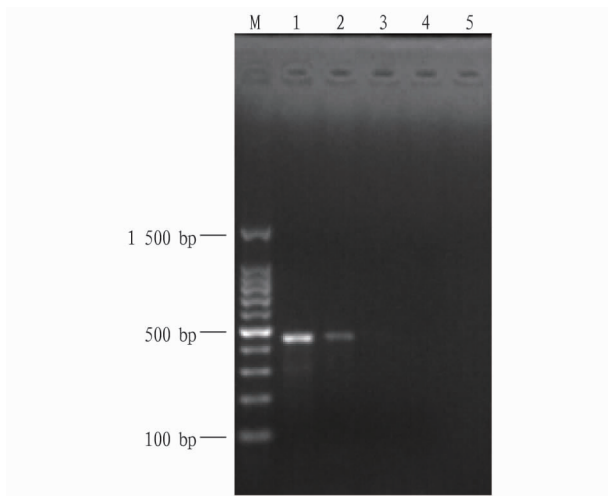


注:M.100 bp DNA Ladder;1.瓜实蝇;2.南瓜实蝇;3.具条实蝇;4.番石榴实蝇;5.颜带实蝇;6.橘小实蝇;7.锈实蝇;8.杨桃实蝇;9.辣椒实蝇;10.腿端黑实蝇;11.黑颜实蝇;12.近黑颜实蝇;13.黑膝实蝇;14.瑞丽果实蝇;15.滇寡鬃实蝇;16.瘤胫实蝇;17.枣实蝇;18.何氏华实蝇;19.瓜棍腹实蝇;20.五指山实蝇;21.空白对照(dd H₂O)

Note:M.100 bp DNA Ladder;1.*B. cucurbitae* (Coquillett);2.*B. tau* (Walker);3.*B. scutellata* (Hendel);4.*B. correcta* (Bezzi);5.*B. cilifer* (Hendel);6.*B. dorsalis* (Hendel);7.*B. rubigina* (Wang & Zhao);8.*B. carambolae* Drew & Hancock;9.*B. latifrons* (Hendel);10.*B. atrifemur* Drew & Hancock;11.*B. diaphora* Coquillett;12.*B. parater* (Zhao & Lin);13.*B. scutellaris* (Bezzi);14.*B. ruihensis* Wang, Long et Zhang, sp. nov.;15.*B. modica* (Hardy);16.*B. tuberculata* (Bezzi);17.*Carpomya vesuviana* Costa;18.*B. hochii* (Zia);19.*Dacus longicornis* Wiedemann;20.*B. wuzhishana* Lin et Yang, sp.nov.;21.Blank control(dd H₂O)

图3 引物 GF85 和 GR531 的种特异性验证

Fig.3 The species specific verification of the primers GF85 and GR531



注:M.100 bp DNA Ladder;1 为 10^0 ;2 为 10^{-1} ;3 为 10^{-2} ;4 为 10^{-3} ;5 为空白对照(dd H₂O)

注:M.100 bp DNA Ladder;1 was 10^0 ;2 was 10^{-1} ;3 was 10^{-2} ;4 was 10^{-3} ;5 was blank control(dd H₂O)

图4 引物 GF85 和 GR531 的灵敏度验证

Fig.4 The sensitivity verification of the primers GF85 and GR531

3 讨论

3.1 实蝇的快速鉴定是困扰口岸检疫人员的突出问题 实蝇类害虫种类的快速鉴定是检验检疫的重要工作,也是困扰口岸检疫人员的突出问题。实蝇类害虫是果蔬的重要害虫,在口岸进境的果蔬中经常被截获到的多为其卵、幼虫、蛹。目前传统果实蝇属昆虫的识别主要以成虫的形态特征为重要鉴定依据,成虫前各个时期的虫态(卵、幼虫、蛹)的鉴定特

征不稳定或不明显,无法进行快速鉴定,直接影响果蔬进出口贸易和快速通关。

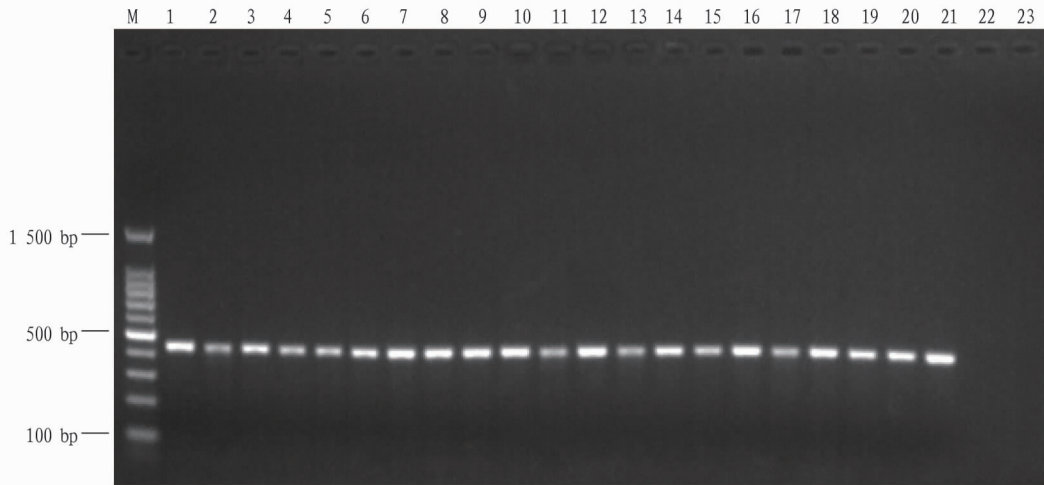
3.2 引物的特异性是快速准确鉴定种类的关键 以分子生物学技术进行检疫性害虫种类鉴定的研究开发不受昆虫发育时期、残体的影响。昆虫分子的快速鉴定研究、发展与应用为检疫害虫的及时鉴定提供了快捷而准确的途径,有效促进果蔬贸易快速通关,防止检疫性实蝇传入以及进一步传播扩散的前提。张长禹^[9]利用3种分子标记对瓜实蝇、柑橘大实蝇、南瓜实蝇、橘小实蝇、具条实蝇这5种实蝇的分子系统发育进行分析与分子快速鉴定研究,但因为分子标记技术对环境因子变化较为敏感,扩增产物的可重复性相对较差,结果的可靠性低,因此目前已较少使用。该试验建立的 SS-PCR 技术由 CO I 标记技术转化而来,具有重现性强、谱带单一等优点,适宜于大规模快速检测分析。该试验选用 mtDNA CO I 作为标记基因^[10],选择与瓜实蝇序列较为一致的8种实蝇的同源序列,设计了能快速鉴定出瓜实蝇的特异性引物。采用该试验设计的引物 GF85 和 GR531 对供试的20种实蝇进行 PCR 扩增,仅瓜实蝇能扩增出一条长度约 447 bp 的单一且清晰的目标条带,其余的实蝇种类均无一条带出现,同时,通过对截获的瓜实蝇的幼虫、蛹和饲养的成虫以及部分虫样的验证,其均与成虫形态分类结果一致,GF85 和 GR531 引物能特异地鉴定出瓜实蝇。该试验所设计的引物的特异性试验表明尽管截获的是卵、幼虫、蛹或是残体,只要能提取到微量 DNA,就能快速准确地鉴定到种。所以,SS-PCR 检测鉴定方法的灵敏度至关重要。

(下转第96页)

- [2] 黄文荣,刘政,朱培,等.长兴县森林资源现状分析与高质量发展对策探讨[J].华东森林经理,2019,33(2):17-20.
- [3] BAFFETTA F,CORONA P,FATTORINI L.Design-based diagnostics for *k*-NN estimators of forest resources [J].Canadian journal of forest research, 2011, 41(1): 59-72.
- [4] 冯继广,王景升,姚帅臣,等.基于因子分析的森林资源质量综合评价[J].中南林业科技大学学报,2017,37(1):27-32,42.
- [5] WANG X C, WANG S D, DAI L M.Estimating and mapping forest biomass in northeast China using joint forest resources inventory and remote sensing data [J].Journal of forest research, 2018,29(3):797-811.
- [6] MAKOU DJOU A, LEVANG P,TIEGUHONG J C.The role of forest resources in income inequality in Cameroon [J].Forest, trees and livelihoods, 2017, 26(4):271-285.
- [7] 刘燕,刘佳,支玲.国有林场森林资源管理条件评价:以福建省将乐国有林场为例[J].中南林业科技大学学报,2015,35(8):115-121.

- [8] 赵春燕,李际平,王国华,等.森林资源动态变化的时空拓扑分析[J].西北林学院学报,2010,25(2):216-220.
- [9] 马勇,王华,吴怀理,等.昆明市林地及林木资源消涨动态研究[J].西南林业大学学报,2017,37(4):183-187.
- [10] 周书宇,杨雪.贵州省观山湖区森林资源动态分析[J].安徽农业科学, 2019,47(13):97-99,122.
- [11] 林宇,胡欢甜,邱岭军,等.滨海沙地3种人工林表层土壤微生物量及其影响因素[J].东北林业大学学报,2017,45(5):85-90.
- [12] 刘丹萍,何中声,刘昌营.长汀县森林资源动态及驱动因素分析[J].福建林业科技,2017,44(1):96-98,135.
- [13] 王韧.福鼎森林资源的现状与可持续发展对策[J].福建林业科技, 2002,29(4):68-71.
- [14] 庄玉芬.晋江市森林城市建设现状及规划探讨[J].福建林业,2012(3):24-26.

(上接第86页)



注:M.100 bp DNA Ladder;1-21.瓜实蝇;22.南瓜实蝇;23.空白对照(dd H₂O)

Note:M.100 bp DNA Ladder;1-21.*B.cucurbitae*;22.*B.tau*;23.Blank control(dd H₂O)

图5 SS-PCR快速鉴定瓜实蝇的应用与验证

Fig.5 The application and verification of SS-PCR for rapid identification of *B.cucurbitae*

3.3 SS-PCR 方法可用于瓜实蝇的特异鉴定 试验所建立的 SS-PCR 鉴定瓜实蝇的方法具有快速简便、特异性高、灵敏度高优点,能检测到的 DNA 模板浓度可低至 2.162 ng/L。同时,该 SS-PCR 检测鉴定方法在实际检疫工作中也得到应用和验证。此外,SS-PCR 分析技术操作简便快捷,缩短了通关时间,提高了工作效率。因此,该技术方法可用于瓜实蝇的特异鉴定,并在害虫检疫与检测监测中具有重要应用价值。

参考文献

- [1] PRABHAKAR C S,MEHTA P K,SOOD P,et al.Population genetic structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase (*COI*) gene sequences[J].Genetica, 2012, 140(1/2/3): 83-91.
- [2] 梁广勤,杨国海,梁帆,等.亚太地区寡毛实蝇[M].广州:广东科技出版

- 社,1996:222-223.
- [3] 欧剑峰,黄鸿,吴华,等.瓜实蝇国内研究概况[J].长江蔬菜,2008(13): 33-37.
- [4] 黄振,黄可辉.检疫性害虫——瓜实蝇在中国的适生性研究[J].武夷科学,2013,29(1):177-181.
- [5] 黄振.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[D].海口:海南大学,2010.
- [6] 陈韶萍,黄振,郭琼霞,等.实蝇类害虫分子鉴定研究进展[J].生物安全学报,2014,23(3):151-155.
- [7] 黄可辉,郭琼霞,虞赞,等.分子标记法在昆虫学研究中的应用[J].华东昆虫学报, 2005, 14(2): 109-114.
- [8] JAMNONGLUK W, BAIMAI V,KITTAYAPONG P.Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene[J].Genetica,2003,119:19-25.
- [9] 张长禹.五种实蝇的分子系统发育分析与分子快速鉴定研究[D].武汉:华中农业大学,2007.
- [10] 黄振,陈韶萍,谢婧,等.应用种特异性 PCR 技术快速鉴定辣椒实蝇[J].昆虫学报,2015,58(4):460-466.