

基于基因组特异性 SSR 序列的 实蝇 PCR 鉴定方法*

丁思敏^{1**} 王书平² 贺康¹ 李飞¹ 蒋明星^{1***}

(1. 浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058; 2. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

摘要 【目的】实蝇科昆虫是全球范围内重要的检疫性害虫, 其幼虫取食寄主果实, 引起果实腐烂、变质, 造成巨大经济损失。由于口岸截获多为实蝇卵、幼虫、蛹等非成虫虫态, 需饲养至成虫才能根据形态准确鉴定, 因此快速可靠的分子鉴定技术体系亟需完善。【方法】利用公开发表的实蝇基因组序列, 通过生物信息学方法从 4 种检疫性实蝇即地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*、橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis*、昆士兰实蝇 *Bactrocera tryoni* 中挖掘物种特异性的简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSR), 针对各物种设计含有其特异性简单重复序列的引物, 提取实蝇样品基因组 DNA, 采用常规 PCR 方法优化并筛选各物种特异性引物。【结果】在 4 种实蝇基因组中共发现 20 条物种特异性的 SSR, 基于这些序列设计的 3 对特异性引物能有效区分地中海实蝇、瓜实蝇和橘小实蝇, 扩增片段大小分别为 1 251、1 307、823 bp, 而在其他物种中检测不到条带。【结论】基因组水平的序列分析发现了物种特异性的 SSR, 通过筛选获得物种特异性的 PCR 引物, 可应用于 3 种实蝇的分子鉴定, 为口岸检疫人员快速鉴定区分非成虫状态的实蝇提供了实用性技术。

关键词 实蝇, 简单重复序列, 物种特异性引物, PCR, 检疫

PCR-based identification of fruit-flies using specific SSR sequences

DING Si-Min^{1**} WANG Shu-Ping² HE Kang¹ LI Fei¹ JIANG Ming-Xing^{1***}

(1. Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract 【Objectives】Fruitflies (Diptera, Drosophilidae) are important globally distributed quarantinable pests. They generally lay eggs in fruits and vegetables, and their larvae feed on these after hatching, causing serious economic loss to fruit and vegetable growers. The eggs, larvae, and pupae of fruitflies are frequently discovered in quarantine ports, however, these life-stages are difficult to identify because fruitfly species are traditionally distinguished on the basis of adult morphology. Morphological identification of eggs, larvae, and pupae therefore requires these to be reared to the adult stage, which takes a long time. It is therefore useful to develop rapid and accurate molecular methods that can identify fruitfly eggs, larvae, and pupae. 【Methods】Species specific, simple sequence repeats (SSR) were discovered in the genomes of four quarantined fruit fly species; *Ceratitis capitata*, *Bactrocera cucurbitae*, *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera tryoni*, using a well-designed bioinformatics pipeline. Species-specific primers were designed from these SSRs and screened using genomic DNA extracted from specimens of different fruitfly species as templates. The polymerase chain reaction (PCR) was then used to amplify and detect SSRs in DNA samples obtained from fruitfly eggs, larvae and pupae. 【Results】Twenty species-specific SSRs were obtained from the four quarantined fruitfly species. Three species-specific primers were designed which produced single bands of 1 251, 1 307 and 823 bp, respectively and were confirmed to reliably distinguish *C. capitata*, *B. cucurbitae* and *B. dorsalis*.

*资助项目 Supported projects: 重大/新发农业入侵生物风险评估及防控关键技术研究 (2017YFC1200602); 国家自然科学基金青年基金 (31701785)

**第一作者 First author, E-mail: dingsm@zju.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: mxjiang@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2017-10-23, 接受日期 Accepted: 2018-02-13

[Conclusion] Bioinformatics analysis of genomic sequences allows us to identify species-specific SSR. After the optimization of species-specific primers designed from these SSR sequences, PCR can be used to accurately identify fruitflies. This work provides a theoretical basis and technical support for inspectors to reliably identify fruitfly eggs, larvae and pupae intercepted at ports.

Key words fruitflies, SSR, species-specific primers, PCR, quarantine

实蝇（双翅目实蝇科）是危害果蔬的重要害虫，目前全球已知的实蝇昆虫约有 450 属 4 300 余种（Chvala, 2000），其中许多种类危害严重，导致果蔬质量下降，影响进出口贸易，因此被列为重要检疫性害虫，受到广泛关注（White *et al.*, 1992）。

形态学鉴定和分子鉴定是目前鉴定实蝇的主要方法（李文芬, 2008）。口岸截获的实蝇常为幼期虫态（卵、幼虫、蛹），采用传统的形态学鉴定方法尽管成本较低，但常受到实蝇虫态和饲养周期的限制。分子鉴定方法则能够有效克服形态学鉴定的缺点，特别在鉴别处于幼期虫态、虫体残缺和形态相似的种类时具明显优势（李志红等, 2002；Clarke *et al.*, 2005）。迄今为止，已研发出多种实蝇分子鉴定技术，包括随机扩增多态性 DNA（Random amplification of polymorphic DNA, RAPD）技术、限制性片段长度多态性（Restriction fragment length polymorphism, RFLP）技术、核酸序列分析技术、特异引物 PCR 技术、实时荧光 PCR 技术和基因芯片技术等（李志红等, 2013）。

特异引物 PCR 技术指利用目标物种引物的特异性，以未知物种的 DNA 作为模板，并结合 PCR 扩增反应，即可根据目标片段条带的有无而区分出目标物种与其他物种（黄振等, 2015），该技术已在实蝇种类的鉴定中广泛使用。如基于 mtDNA CO I 基因序列，余道坚等（2006）通过 12 对特异性引物能快速鉴定出 10 种不同虫态的检疫性实蝇；基于 mtDNA CO I 基因的特异性位点，Chua 等（2010）通过 2 对引物准确区分了马来西亚 6 种实蝇害虫。

简单重复序列（Simple sequence repeats, SSR）是重复单元为 1-6 个的寡核苷酸的序列，经多次重复形成的串联重复 DNA 序列，又称微

卫星 DNA（microsatellites DNA）（Hamada *et al.*, 1982）。SSR 由于具有种类多、选择中性、分布广、检测快速方便等特点，已成为一种有效的分子标记而被广泛应用于入侵昆虫种群鉴定、入侵因素等方面的研究（伍祎等, 2007；刘佳妮等, 2008）。

随着大数据时代的到来，多个昆虫的基因组已被测定，充分利用这些基因组数据，通过大规模序列比对分析，可以针对性地发现物种特异性的序列位点，为物种鉴定提供新方法。本研究以基因组序列已知的 4 种检疫性实蝇即地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae*、橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 和昆士兰实蝇 *Bactrocera tryoni* 为对象，利用生物信息学软件，在 4 种实蝇基因组中预测发现其物种特异的 SSR 序列，然后通过特异性 SSR 序列位点设计引物并进行常规 PCR 反应，建立种特异性的鉴定方法。该方法特异性强，为鉴定检疫性实蝇提供新的技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试标本

所采用的实蝇标本由上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心提供，该中心已对 4 种实蝇进行了鉴定分类。

1.2 特异性 SSR 序列获取

从综合性昆虫基因组平台 InsectBase（Yin *et al.*, 2016）（<http://genome.zju.edu.cn>）下载地中海实蝇、瓜实蝇、橘小实蝇、昆士兰实蝇的基因组数据，通过 SciRoKo 3.4（Kofler *et al.*, 2007）软件（默认参数）获取基因组中的 SSR 序列。在搜寻找各物种的特异性序列时，根据碱基互补配对原则和拷贝数起始位置碱基顺序的排列差

异, 将同类 SSR 重复兼并为同一种重复类型, 如单碱基重复类型里 Motif 为 A 和 T 的并为一类, C 和 T 并为一类; 二碱基重复类型里 Motif 为 AT 和 TA 的并为一类, CG 和 GC 的并为一类, AC/GT/CA/TG 并为一类, AG/CT/GA/TC 并为一类; 三碱基重复类型分为 10 类, 分别为 AAT/ATT/ATA/TAT/TAA/TTA, AAC/GTT/ACA/TGT/CAA, AAG/CTT/AGA/TCT/GAA/TTC, ATC/GAT/TCA/TGA/ATG/CAT, ACT/AGT/CTA/TAG/GTA/TAC, ACC/GGT/CCA/TGG/CAC/GTG, AGG/CCT/GGA/TCC/CTC/GAG, ACG/CGT/CGA/TCG/GAC/GTC, AGC/GCT/GCA/TGC/CAG/CTG 和 CCG/CGG/CGC/GCG/GCC/GGC, 以此类推, 四碱基重复类型里 230 种碱基组合被分成 32 种类型; 五碱基重复类型 1 020 种碱基组合被分成 102 种类型; 六碱基重复类型 4 020 种碱基组合被分成 340 种类型。按照以上碱基组合类型编写 Perl 脚本, 提取 4 种实蝇基因组中特异性 SSR 序列。

1.3 引物设计

利用引物设计软件 Primer Premier 5.0, 在基因组中特异性 SSR 位置上下游 2 000 bp 范围内设计特异性引物, 其中 1 条来自特异性 SSR, 每种实蝇至少设计 2 对引物以优化筛选。

1.4 DNA 提取

采用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒 (QIAGEN) 提取实蝇基因组 DNA。将单头实蝇全虫置于冰上预冷的 1.0 mL 玻璃匀浆器中, 加入 180 μ L ATL 缓冲液后充分研磨 2-3 min, 后加入 20 μ L 蛋白酶 K (1 mg/mL, Transgene), 涡旋混匀后置于 56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 以充分裂解组织。加入 200 μ L AL 缓冲液, 56 $^{\circ}$ C 继续孵育 10 min, 然后加入 200 μ L 无水乙醇, 涡旋混匀。将混合物转移至 Minispin 柱子上, 8 000 $\times$ g 离心 5 min 后, 分别用 AW1 和 AW2 缓冲液各清洗 1 次。将柱子开盖室温晾干 1-2 min 后, 加入 200 μ L AE 洗脱缓冲液, 离心收集洗脱的 DNA。利用紫外分光光度计 (Mettler Toledo) 测定 DNA 浓度, 最后加灭菌蒸馏水将样品浓度调至 10 ng/ μ L, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 PCR 扩增反应、电泳及检测

PCR 反应体系: Premix Ex Taq (Takara) 25 μ L, 基因组 DNA 模板 1 μ L, 上下游引物 (10 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$) 各 2 μ L, 加灭菌蒸馏水补齐至 50 μ L。

PCR 扩增条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 57.5-59 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 34 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。扩增反应在 VeritiTM 96 孔美国 ABI 基因扩增仪上进行。

电泳检测: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离检测后, 胶回收连接至 pMD19-T 载体 (Takara) 转化至大肠杆菌细胞中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后挑取单克隆送华大基因完成测序反应, 序列比对利用 DNAMAN 软件完成。

2 结果与分析

2.1 4 种检疫性实蝇特异性 SSR 序列

在地中海实蝇、瓜实蝇、昆士兰实蝇、橘小实蝇基因组中共发现了 20 条特异性 SSR 序列, 均为六碱基重复类型, 所属类别及特异性序列条数详见表 1。其它碱基重复类型均未找到物种特异性 SSR 序列。其中地中海实蝇中有 5 条, Motifs 分别为 GACCTG、GCCCCT、CCCCTG、CCATGC、CATGCC; 瓜实蝇中有 10 条, Motifs 分别为 GATTGG、TACGGA、TGCCTA、GGGCAC、CCATGG、CCCGAT、CATAGG、TAGGCA、ATCCGT、CCCACC; 昆士兰实蝇有 4 条, Motifs 分别为 GGCCTG、GGGTCT、ATCGGG; 橘小实蝇有 1 条, Motifs 为 TCCAGG (表 1)。4 种物种的基因组版本号, 各特异性序列在基因组上的位置、长度和具体的碱基信息详见表 2。其中地中海实蝇中 Motifs 为 GACCTG 的序列最长, 有 128 bp, 但是碱基错配数也最大 (3 个), 其它序列长度均在 18-37 bp 范围内, 且除去地中海实蝇 Motifs 为 CCATGC、瓜实蝇 Motifs 为 ATCCGT、昆士兰实蝇 Motifs 为 GGCCTG 的序列有 1 个碱基错配之外, 其它序列均无错配 (表 2)。

表 1 4 种实蝇特异性 SSR 的 Motif 个数及类别信息
Table 1 Number and category information of species-specific SSRs in these four fruit fly species

物种 Specieses	SSR 类型 SSR types													
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	C1	C2	C3	D1
地中海实蝇 <i>C. capitata</i>	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
瓜实蝇 <i>B. cucurbitae</i>	0	0	0	1	2	1	1	3	1	1	0	0	0	0
昆士兰实蝇 <i>B. tryoni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0
橘小实蝇 <i>B. dorsalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

特异性 SSR 序列的碱基重复单元如下粗体标出。The repeat unit of those SSR motifs marked as follows in bold.

A₁: ACGGGT/CGGGTA/GGGTAC/GGTACG/GTACGG/TACGGG/GCCCAT/CCCATG/**CCATGC/CATGCC**/ATGCCC/TGCCCC

A₂: ACCTGG/CCTGGA/CTGGAC/TGGACC/GGACCT/**GACCTG**

A₃: ACGGGG/CGGGGA/GGGGAC/GGGACG/GGACGG/GACGGG/**GCCCCCT/CCCCCTG**/CCCTGC/CCTGCC/CTGCCC/TGCCCC

B₁: ACCGGT/CCGGTA/CGGTAC/GGTACC/GTACCG/TACCGG/GGCCAT/GCCATG/**CCATGG**/CATGGC/ATGGCC/TGGCCA

B₂: ACGGAT/CGGATA/GGATA/GATACG/ATACGG/**TACGGA**/GCCTAT/CCTATG/CTATGC/TATGCC/ATGCCT/**TGCCTA**

B₃: **ACCCCC/CCCCCA/CCCCAC/CCCAAC/CCACCC/CACCCC/GGGGGT/GGGGTG/GGGTGG/GGTGGG/GTGGGG/TGGGGG**

B₄: **ACGGGC/CGGGCA/GGGCAC/GGCACG/GCACGG/CACGGG/GCCCCG/CCCGTG/CCGTGC/CGTGCC/GTGCCC/TGCCCC**

B₅: AGGCAT/GGCATA/GCATAG/**CATAGG**/ATAGGC/**TAGGCA**/CCGTAT/CGTATC/GTATCC/TATCCG/**ATCCGT**/TCCGTA

B₆: AGGGCT/GGGCTA/GGCTAG/GCTAGG/CTAGGG/TAGGGC/**CCCGAT**/CCGATC/CGATCC/GATCCC/ATCCCG/TCCCGA

B₇: AACCT/ACCCTA/CCCTAA/CTAAC/CTAAC/TAACCC/TGGGAT/GGGATT/GGATTG/**GATTGG**/ATTGGG/TGGGA

C₁: AGACCC/GACCCA/ACCCAG/CCCAGA/CCAGAC/CAGACC/CTGGGT/TGGGTC/**GGGTCT**/GGTCTG/GTCTGG/TCTGGG

C₂: ACCCGG/CCCGGA/CCGGAC/CGGACC/GGACCC/GACCCG/GGGCCT/**GGCCTG**/GCCTGG/CCTGGG/CTGGGC/TGGGCC

C₃: AGCCCT/GCCCTA/CCCTAG/CCTAGC/CTAGCC/TAGCCC/CGGGAT/GGGATC/GGATCG/GATCGG/**ATCGGG**/TCGGGA

D₁: AGGTCC/GGTCCA/GTCCAG/**TCCAGG**/CCAGGT/CAGGTC

2.2 PCR 扩增结果

基于 20 条特异性 SSR 的序列信息, 利用软件设计出 3 对引物 89-F/89-R、03-F/03-R 和 925-F/925-R (表 3)。以上述 4 种实蝇基因组 DNA 为模板, 经过 PCR 反应条件优化后, 扩增产物经电泳检测, 结果如图 1 所示。特异性片段只出现在相应的物种样本中, 而在其他物种样品中对应位置无明显扩增片段, 表明这 3 对引物具有很强的特异性, 能够有效地区分这 3 个物种。

3 讨论

检疫性实蝇种类繁多, 一旦进入非疫区, 其发生范围将迅速扩大, 对果蔬生产和贸易造成严重损失。而在实际应用中, 传统形态学分类鉴定体系不够完善, 存在一定的局限性, 相比之下分子手段则更为简便有效 (李文芬, 2008)。利用特异性引物 PCR 鉴定实蝇种类时, 引物的特

性是保证鉴定结果准确的关键因素 (黄振等, 2015)。目前, 特异性序列多为线粒体 CO I 基因, 其特点是基因两端序列相对保守, 而密码子第 3 位碱基可以自由变异, 在不同物种之间差异较大, 因此常用于区分相近物种 (Sperling *et al.*, 1999; Asokan *et al.*, 2008)。例如, 程晓甜等 (2013) 和黄振等 (2015) 利用该基因序列分别设计出一对特异性引物, 成功鉴定出了枣实蝇 *Carpomyia vesuviana* 和辣椒实蝇 *Bactrocera latifrons*。但是由于其长度较长, 需根据不同研究目的选择不同区域 (Sperling *et al.*, 1999; 王德明和林杨, 2010)。基于不同物种中基因组的 SSR 序列具较高的多态性 (Goldstein and Pollock, 1997), 同时部分实蝇基因组数据已公开发表, 本研究率先利用 SciRoKo 软件预测 SSR, 并允许少量错配, 挖掘出了一些具有实蝇种异性的 SSR 序列, 将其作为目标区域进行引物设计, 得到了特异性很强的引物序列。利用上

表 2 4 种实蝇物种特异性 SSR 序列信息
Table 2 Information of species-specific SSRs in these four fruit fly species

物种 Species	基因组版本 Genome version	重复单元 Motif	起始 Start	终止 End	长度 Length	错配数 Mismatch	位置 Location	序列 Sequence
地中海实蝇 <i>C. capitata</i>	Ccap_1.0	GACCTG	1545940	1546067	128	3	scaffold89	ACCTGGACCTCGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGGCCT GGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGAC CTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTGGACCTAG ACCTGGAC
		GCCCCCT	747649	747667	19	0	scaffold66	GCCCCCTGCCCCCTGCCCCCTG
		CCCCCTG	3292283	3292301	19	0	scaffold3	CCCCCTGCCCCCTGCCCCCTG
		CCATGC	5226317	5226353	37	1	scaffold39	CCATGCCCCATGCCCCATGCCCCATGCCCCATACCCATGCC
		CATGCC	5283063	5283080	18	0	scaffold4	CATGCCCATGCCCATGCC
瓜实蝇 <i>B. cucurbitae</i>	ASM80634v1	GATTGG	4172600	4172623	24	0	scaffold00006	GATTGGGATTGGGATTGGGATTGG
		TACGGA	693158	693176	19	0	scaffold00026	TACGGATACGGATACGGAT
		TGCCTA	2620640	2620658	19	0	scaffold00015	TGCCTATGCCTATGCCTAT
		GGGCAC	801688	801706	19	0	scaffold00047	GGGCACGGGCACGGGCACG
		CCATGG	2095963	2095980	18	0	scaffold00013	CCATGGCCATGGCCATGG
		CCCGAT	126193	126210	18	0	scaffold00246	CCCGATCCCGATCCCGAT
		CATAGG	3963669	3963686	18	0	scaffold00009	CATAGGCATAGGCATAGG
		TAGGCA	5105535	5105554	20	0	scaffold00003	TAGGCATAGGCATAGGCATA
		ATCCGT	491287	491310	24	1	scaffold00124	ATCCGCATCCGTATCCGTATCCGT
		CCCACC	182384	182401	18	0	scaffold00115	CCCACCCCCACCCCCACC
昆士兰实蝇 <i>B. tryoni</i>	GCA_000695345.1	GGCCTG	152137	152160	24	1	Btry235	GGCCTGGGCCTGGGCCTGAGCCTG
		GGGTCT	1110	1127	18	0	Btry32978	GGGTCTGGGTCTGGGTCT
		ATCGGG	16204	16221	18	0	Btry4552	ATCGGGATCGGGATCGGG
橘小实蝇 <i>B. dorsalis</i>	ASM78921v2		30958	30977	20	0	Btry4870	ATCGGGATCGGGATCGGGAT
		TCCAGG	109350	109367	18	0	LOC105231925	TCCAGGTCCAGGTCCAGG

表 3 基于物种异性 SSR 设计特异性引物
Table 3 Species specific primers based on the species specific SSRs

物种 Species	特异性 SSR Specific SSR	特异性引物 (5'-3') Specific primer	退火温度 (°C) Annealing temperature	产物大小 (bp) Product size
地中海实蝇 <i>C. capitata</i>	ACCTGGACCTCGACCTGGA CCTGGACCTGGACCTGGGC CTGGACCTGGACCTGGACCT GGACCTGGACCTGGACCTG GACCTGGACCTGGACCTGG ACCTGGACCTGGACCTGGA CCTAGACCTGGAC	89-F: GGCGAGTGCTGTGAAGTAGAGAT 89-R: TCCAGGTCTAGGTCCAGGTCC	57.5	1 251
瓜实蝇 <i>B. cucurbitae</i>	TAGGCATAGGCATAGGCATA	03-F: TAGGCATAGGCATAGGCATACTAC 03-R: CAATAATGCTGGCGACAATAAAG	59	1 307
橘小实蝇 <i>B. dorsalis</i>	TCCAGGTCCAGGTCCAGG	925-F: TACCACGGATGTGCCAATACC 925-R: TGGACCTGGACCTGGAACC	57.5	823

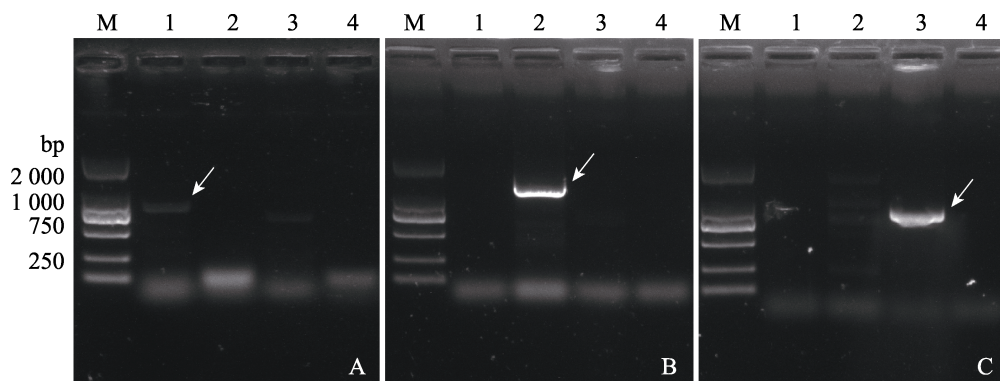


图 1 实蝇物种特异性 SSR 引物的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification with the specific primers based on species-specific SSRs of four closely related fruitflies

A. SSR 特异性引物 89-F/89-R; B. SSR 特异性引物 03-F/03-R; C. SSR 特异性引物 925-F/925-R。

M: DNA 分子量标准 DL 2000; 泳道 1-4: PCR 扩增所用的 4 种实蝇地中海实蝇、瓜实蝇、橘小实蝇和昆士兰实蝇基因组 DNA 模板; 白色箭头: 特异性 PCR 产物。

A. Specific primers 89-F/89-R; B. Specific primers 03-F/03-R; C. Specific primers 925-F/925-R. M: DL 2000 marker; Lane 1-4: Genomic DNA templates of *C. capitata*, *B. cucurbitae*, *B. tryoni* and *B. dorsalis*, respectively; White arrows: Species-specific PCR products.

述方法筛选的 3 对引物 89-F/89-R、03-F/03-R 和 925-F/925-R, 经过 PCR 验证, 仅在相对应的实蝇物种中出现清晰且单一的目标条带, 其它实蝇均无明显条带出现。

本研究设计的 SSR 特异性序列可用于地中海实蝇、瓜实蝇、橘小实蝇的检疫。该方法具有快速简便、特异性强、省时等优点, 能满足口岸检验检疫的需求, 故可作为检疫部门一种新的物种鉴别手段。同时, 本研究也为如何基于生物信息学分析设计特异性引物来鉴定物种提供了新

思路。尤其在生物信息学快速发展、将有越来越多检疫性物种基因组发表的背景下, 基于本研究思路将有望研发出更加多样的口岸检疫及物种鉴定方法。当然, 在实际应用时, 本方法在区分同一物种的不同地理种群或亚种时, 其特异性还需进一步验证。

参考文献 (References)

Asokan R, Kumar NKK, Verghese A, 2008. Molecular identification of fruit flies, *Bactrocera* spp. (Diptera: Tephritidae) using

- mitochondrial cytochrome oxidase I. *Current Science*, 93(12): 1668–1669.
- Cheng XT, Adili S, Zhang W, Wen JB, Li XQ, Chen M, 2013. Species-specific PCR primers for identification of *Carpomyia vesuviana*. *Scientia Silvae Sinicae*, 49(11): 98–102. [程晓甜, 阿地力·沙塔尔, 张伟, 温俊宝, 李新泉, 陈梦, 2013. 枣实蝇特异引物 PCR 鉴定技术. 林业科学, 49(11): 98–102.]
- Chua TH, Chong YV, Lim SH, 2010. Species determination of Malaysian bactrocera pests using pCR-RFLP analyses (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*, 66(4): 379–384.
- Chvala M, 2000. Book review: Fruit fly expert identification system and systematic information database. Myia, Vol. 9. *European Journal of Entomology*, 97(1): 129.
- Clarke AR, Armstrong KF, Carmichael AE, Milne JR, Raghu S, Roderick GK, Yeates DK, 2005. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 50: 293–319.
- Goldstein DB, Pollock DD, 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference. *Journal of Heredity*, 88(5): 335–342.
- Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T, 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(21): 6465–6469.
- Huang Z, Chen SP, Xie J, Guo QX, 2015. Rapid identification of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) by using species-specific PCR technique. *Acta Entomologica Sinica*, 58(4): 460–466. [黄振, 陈韶萍, 谢婧, 郭琼霞, 2015. 应用种特异性 PCR 技术快速鉴定辣椒实蝇. 昆虫学报, 58(4): 460–466.]
- Kofler R, Schlötterer C, Lelley T, 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*, 23(13): 1683–1685.
- Li WF, 2008. Establishment and application of gene chip for *Ceratitidis capitata*, and its related species and *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae). Master thesis. Changsha: Hunan Normal University. [李文芬, 2008. 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. 长沙: 湖南师范大学.]
- Li ZH, Gong P, Chen HJ, Chen NZ, 2002. Research development of molecular biology on Oriental fruit fly. *Plant Quarantine*, 16(3): 165–166. [李志红, 龚鹏, 陈洪俊, 陈乃中, 2002. 桔小实蝇分子生物学研究进展. 植物检疫, 16(3): 165–166.]
- Li ZH, Jiang F, Man XL, Fang Y, Sun ZH, Qin YJ, Wang QL, 2013. Review on invasion origin and invasion mechanism of Tephritidae. *Plant Quarantine*, 27(2): 1–10. [李志红, 姜帆, 马兴莉, 方焱, 孙壮志, 秦誉嘉, 王巧铃, 2013. 实蝇科害虫入侵防控技术研究进展. 植物检疫, 27(2): 1–10.]
- Liu JN, Gui FR, Li ZY, 2008. Applications of SSR molecular markers to studies on insect invasion. *Plant Quarantine*, 34(3): 7–11. [刘佳妮, 桂富荣, 李正跃, 2008. SSR 分子标记技术在入侵昆虫学研究中的运用. 植物保护, 34(3): 7–11.]
- Sperling FAH, Raske AG, Otvos IS, 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among populations and host races of *Lambdina fiscellaria* (Gn.) (Lepidoptera: Geometridae). *Insect Molecular Biology*, 8(1): 97–106.
- Wang DM, Lin Y, 2010. Application of mitochondrial DNA gene order in molecular systematics of insects. *Guangdong Forestry Science and Technology*, 37(6): 188–190. [王德明, 林杨, 2010. 线粒体 DNA 基因序列在昆虫分子系统学研究中的应用. 广东农业科学, 37(6): 188–190.]
- White IM, Elson-Harris MM, Australian Centre for International Agricultural Research, 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Wallingford: CAB International. 513–583.
- Wu W, Li ZH, Kang FF, Yang D, Wu JJ, 2007. Application of microsatellites to population genetics of quarantine fruit flies. *Plant Protection*, 33(4): 1–6. [伍伟, 李志红, 康芬芬, 杨定, 吴佳教, 2007. 微卫星 DNA 标记及其在检疫性实蝇种群遗传学中的应用. 植物保护, 33(4): 1–6.]
- Yu JD, Zhang GM, Chen ZL, Kang L, Yang WD, 2006. Rapid identification of *Bactrocera latifrons* by real-time PCR using SYBR Green chemistry. *Plant Quarantine*, 20(1): 10–14. [余道坚, 章桂明, 陈志霖, 康林, 杨伟东, 2006. SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定辣椒实蝇. 植物检疫, 20(1): 10–14.]
- Yin CL, Shen G, Guo DH, Wang S, Ma X, Xiao H, Liu J, Zhang Z, Liu Y, Zhang Y, 2016. InsectBase: a resource for insect genomes and transcriptomes. *Nucleic Acids Research*, 44(1): 801–807.