

基于种特异引物(SS-COI)快速鉴定锈红果实蝇

黄振^{1,2}, 郭琼霞^{3*}, 侯有明^{1*}

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

摘要 [目的]开展不受虫态限制的实蝇快速鉴定技术研究。[方法]基于 mtDNA COI 基因序列, 筛选设计了一对能够准确鉴定锈红果实蝇的种特异性引物 XF29 和 XR293, 选用锈红果实蝇作为阳性对照, 颜带实蝇 *B. cilifer* (Hendel)、瘤胫实蝇 *B. tuberculata* (Bezzi) 等 19 种实蝇作为阴性对照, 进行 PCR 扩增和电泳检测。[结果]仅阳性种锈红果实蝇在约 265 bp 的位置扩增出一条清晰且单一的条带, 其余实蝇均未出现任何条带。[结论]采用 SS-PCR 技术, 基于 mtDNA COI 基因序列筛选设计的特异引物种特异性和稳定性强, 可为进出境果蔬检疫、疫情早期预警和有效监测防治提供快速鉴定的依据。

关键词 锈红果实蝇; SS-PCR 技术; COI 基因; 种特异性引物; 分子鉴定

中图分类号 S433 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)21-0164-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.21.040



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Rapid Identification of *Bactrocera rubigina* by Species-specific Primers (SS-COI)

HUANG Zhen^{1,2}, GUO Qiong-xia³, HOU You-ming¹ (1. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Fuzhou Changle Airport Customs, Fuzhou, Fujian 350209; 3. Fuzhou Customs Technology Center, Fuzhou, Fujian 350001)

Abstract [Objective] To study the rapid identification technology of *Bactrocera rubigina*. [Method] Based on mtDNA COI gene sequence, a pair of species-specific primers XF29 and XR293 were screened and designed, which could accurately identify *Bactrocera rubigina*. *Bactrocera rubigina* was selected as positive control, and 19 fruit flies such as *B. cilifer* and *B. tuberculata* were selected as negative control for PCR amplification and electrophoresis detection. [Result] Only the positive fruit fly rust red fruit fly amplified a clear and single band at about 265 bp, and none of the other fruit flies showed any band. [Conclusion] Using SS-PCR technology, the specific primers designed based on mtDNA COI gene sequence screening have strong species specificity and stability, which can provide rapid identification basis for entry and exit fruit and vegetable quarantine, early warning of epidemic situation and effective monitoring and control.

Key words *Bactrocera rubigina*; SS-PCR; COI; Species specific primers; Molecular identification

锈红果实蝇(*Bactrocera rubigina* (Wang & Zhao))是一种重要的检疫性害虫, 属双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae)果实蝇属(*Bactrocera*)。我国于1999年在深圳罗湖口岸首次被截获^[1], 目前主要分布在老挝^[2]、不丹^[3]、越南^[4]、孟加拉^[5]以及中国的海南^[6-7]、广东^[6]、广西^[6,8]、云南^[9]等地。锈红果实蝇是具有重要经济意义的果蔬害虫, 寄主多, 危害大, 主要危害辣椒、轮叶木姜子^[10]等果蔬。其幼虫在果内取食危害, 且随寄主果实或包装物等进行远距离传播, 而传统单靠成虫鉴定实蝇的方法, 难以适应现有口岸高通量、快进快出的检疫鉴定需求, 故此开展不受虫态限制的实蝇快速鉴定技术研究, 对适应和提升口岸对实蝇的快速鉴定具有现实意义, 也是快速通关、早期预警和防止传入传播的基本要求的重要手段。

随着现代分子生物学技术的发展, 采用分子鉴定昆虫种类的方法可以解决不受虫态限制的种类鉴定问题^[11-12]。mtDNA COI——线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因序列结构相对保守, 而种间的变异较大, 序列的差异程度可以将特定种类区分开, 所以线粒体基因序列被应用于实蝇近缘种系统发育研究也越来越多^[13-14]。笔者应用 mtDNA COI 基因序列, 筛选设计种特异性引物、快速鉴定锈红果实蝇的方法, 为解决口岸进境果蔬检疫截获的、疫情调查监测中发现的疑

似锈红果实蝇不同虫态的鉴定提供依据^[15]。

1 材料与方法

1.1 供试虫源 供试实蝇种类有锈红果实蝇 *B. rubigina* (Wang & Zhao)、桔小实蝇 *B. dorsalis* (Hendel)、番石榴实蝇 *B. correcta* (Bezzi)、杨桃实蝇 *B. carambolae* Drew & Hancock、辣椒实蝇 *B. latifrons* (Hendel)、瓜实蝇 *B. cucurbitae* (Coquillett)、南瓜实蝇 *B. tau* (Walker)、颜带实蝇 *B. cilifer* (Hendel)、瘤胫实蝇 *B. tuberculata* (Bezzi)、瑞丽果实蝇 *B. ruiensis* Wang, Long et Zhang, sp. nov.、滇寡鬃实蝇 *B. modica* (Hardy)、黑膝实蝇 *B. scutellaris* (Bezzi)、近黑颜实蝇 *B. parater* (Zhao & Lin)、黑颜实蝇 *B. diaphora* Coquillett、具条实蝇 *B. scutellata* (Hendel)、腿端黑实蝇 *B. atrifemur* Drew & Hancock、枣实蝇 *Carpomya vesuviana* Costa、何氏华实蝇 *B. hochii* (Zia)、五指山实蝇 *B. wuzhishana* Lin et Yang, sp. nov.、瓜棍腹实蝇 *Dacus longicornis* Wiedemann 20 种实蝇。虫样来自口岸进境果蔬检疫截获、中国边境监测调查的检疫性实蝇种类。其中包括 *Bactrocera*、*Carpomya*、*Dacus* 3 个实蝇属 *Bactrocera*、*Zeugodacus*、*Sinodacus*、*Asiadacus* 4 个果实蝇亚属。用于分子生物学鉴定试验的实蝇标本, 采用乙醇浸泡并放置冰箱保存。

1.2 DNA 的提取和 DNA 质量检测

1.2.1 DNA 的提取。 选用 OMEGA E. Z. N. A. TM Insect DNA Kit 试剂盒法, 取整只实蝇或实蝇幼虫、蛹或成虫的翅膀、腿的部分组织, 放置于 2 mL 离心管中, 加入适量液氮后进行充分研磨, 并按照试剂盒的操作步骤进行基因组 DNA 的提取。

基金项目 福建省自然科学基金项目(2011J01066, 2012J01061)。

作者简介 黄振(1985—), 男, 福建莆田人, 农艺师, 博士, 从事农业昆虫与害虫防治研究。*通信作者: 郭琼霞, 研究员, 从事杂草分类和植物检疫研究; 侯有明, 研究员, 博士, 从事昆虫生态研究。

收稿日期 2021-03-14

1.2.2 DNA 质量检测。设置反应体系和反应条件,采用上游引物 LCO1490 (碱基序列为 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3') 和下游引物 HCO2198 (碱基序列为 5'-TAACCTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') 的 1 对通用引物对 20 种供试实蝇虫样提取的基因组 DNA 进行质量检测,在定量梯度 PCR 仪上进行 PCR 反应,凝胶成像,查看目标片段,拍摄记录质量检测结果。

1.2.3 引物的设计。利用通用引物 LCO1490 和 HCO2198 对提取的锈红果实蝇的 DNA 进行扩增并测序,测序由上海英潍捷基贸易有限公司进行,扩增锈红果实蝇的核酸序列: 5'-TTTTATTTTCGGAGCCTGAGCAGGAATAGTAGAACTTCGCTTAGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGACACCCTGGAGCACTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAACCTGTAACAGCTCATGCCTTTGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCTATCA-TAATTTGCTGGATTTCGAAATGACTTGTTCCTTAATATTAGGGCCCCCGACATAGCATTTCACGAATAAATAATATAAGATTTTACTATTGCTCCTTCTCTCACGCTTCTATTAGTAAGAA-GTCTAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTATCCTCCGCTATCATCTGTATTGCTCACGGAGGAGCTTCAGT-TGACCTAGCAATTTCTCTTTCACCTTAGCAGGTATTTCCCTCAATTTTAGGAGCGGTTAATTTTATTACAACAGTAATTAATAT-ACGATCAACAGGAATTTCAATTCGATCGAATACCTTTATTCGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTCTTTTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAACTTAAACACTTCCTTTTTTGGACCCTG-3'。

通过数据库(NCBI)查找锈红果实蝇在 NCBI 数据库已登录公布的序列,并进行比较分析,下载选定登录号 KF659744 的 FASTA 格式,利用 Primer-Premier 5.0 人工设计引物和利用 Oligo 6.44 对引物进行比较分析和评价,再利用 NCBI 数据库中提供的 Primer-BLAST 程序检查同源序列,筛选目标实蝇的种特异性引物。

1.2.4 引物的种特异性测试。选用锈红果实蝇为阳性对照,其余 19 种实蝇为阴性对照,验证试验所设计引物的种特异性。SS-PCR 在定量梯度 PCR 仪上进行,反应体系:2× EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL,引物各 1.0 μL,取 DNA 模板各 2.0 μL,加 ddH₂O 至总体积 25.0 μL;反应条件为 94 °C/5 min,94 °C/40 s,52 °C/30 s,72 °C/1 min,30 个循环,最后延伸 7 min;分别提取 5 μL PCR 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 30 min(120 V),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。

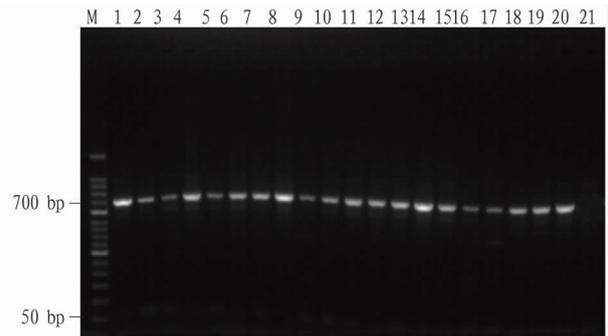
1.2.5 引物的灵敏度测试。采用核酸蛋白分析仪测试提取的锈红果实蝇 DNA 模板的浓度。将锈红果实蝇 DNA 模板按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 倍梯度稀释,然后使用种特异性引物 XF29 和 XR293 进行 PCR 扩增,来验证该检测方法的灵敏度。

1.2.6 应用与验证。利用口岸截获和我国边境监测的锈红果实蝇(已饲养到成虫并经过形态鉴定)的卵、幼虫、蛹和成虫的部分组织提取的 DNA 为模板,使用种特异性引物 XF29

和 XR293 进行 PCR 扩增,采用 SS-PCR 快速鉴定锈红果实蝇的方法来进行检测试验,应用与验证该方法的稳定性与准确性。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测结果 利用通用引物 LCO1490 和 HCO2198 对提取的 20 种实蝇 DNA 模板进行 PCR 扩增,结果表明,该 20 种实蝇 DNA 均能扩增出一条单一且清晰长度约 700 bp 的目标条带(图 1)。



注:M:50 bp DNA Ladder,1.锈红果实蝇 *B. rubigina*,2.桔小实蝇 *B. dorsalis*,3.番石榴实蝇 *B. correcta*,4.杨桃实蝇 *B. carambolae*,5.辣椒实蝇 *B. latifrons*,6.瓜实蝇 *B. cucurbitae*,7.南瓜实蝇 *B. tau*,8.颜带实蝇 *B. cilifer*,9.瘤胫实蝇 *B. tuberculata*,10.瑞丽果实蝇 *B. ruihensis*,11.滇寡鬃实蝇 *B. modica*,12.黑膝实蝇 *B. scutellaris*,13.近黑颜实蝇 *B. parater*,14.黑颜实蝇 *B. diaphora*,15.具条实蝇 *B. scutellata*,16.腿端黑实蝇 *B. atrifemur*,17.枣实蝇 *Carpomya vesuviana*,18.何氏华实蝇 *B. hochii*,19.五指山实蝇 *B. wuzhishana*,20.瓜棍腹实蝇 *Dacus longicornis*,21.空白对照 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

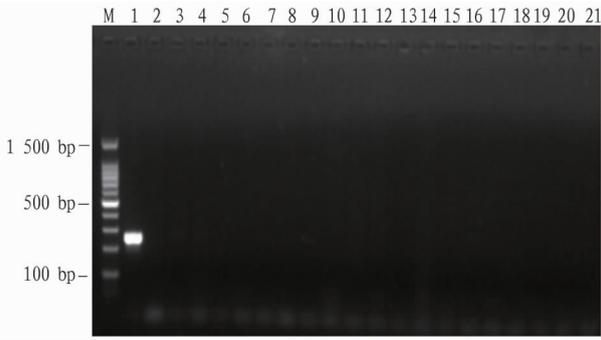
Fig.1 The quality inspection results of extracted fruit fly DNA templates by using universal primers of LCO1490 and HCO2198

2.2 引物的选择 通过筛选最终选择的种特异性引物 XF29 和 XR293,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物 XF29 序列为 5'-GTAGGAACCTTCGCTTAGAATTTAG-3';XR293 序列为 5'-GACTTCTTACTAATAGAAGCGTGA-3'。

2.3 引物的种特异性 通过引物的种特异性测试,结果显示仅锈红果实蝇约在 265 bp 扩增出有一条清晰且单一的条带,其他试蝇种类均未出现任何条带。该引物的种特异性试验重复 3 次,结果均一致,表明该试验筛选设计的种特异性引物 XF29 和 XR293 鉴定锈红果实蝇具有较强的特异性及稳定性(图 2)。

将试验所得到的 PCR 产物送到英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序,将所得到的序列提交 NCBI 数据库进行 BLAST,结果表明该段序列与数据库中的锈红果实蝇序列具 100% 的一致性。

2.4 引物的灵敏度 采用核酸蛋白分析仪测试提取的锈红果实蝇 DNA 模板的浓度为 9.419 ng/μL。通过取 3 种不同浓度的 DNA 模板进行测定,结果表明,随着 DNA 模板浓度

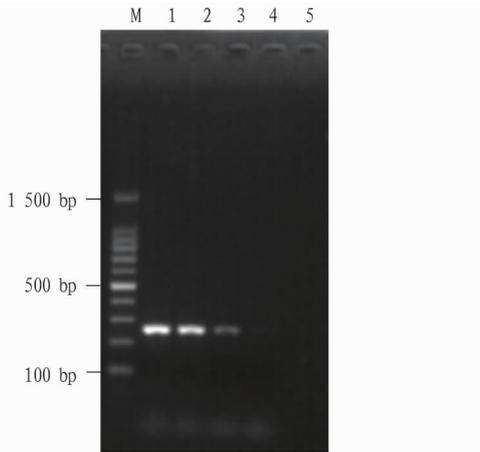


注: M. 100 bp DNA Ladder, 1. 锈红果实蝇 *B. rubigina*, 2. 桔小实蝇 *B. dorsalis*, 3. 番石榴实蝇 *B. correcta*, 4. 杨桃实蝇 *B. carambolae*, 5. 辣椒实蝇 *B. latifrons*, 6. 瓜实蝇 *B. cucurbitae*, 7. 南瓜实蝇 *B. tau*, 8. 颜带实蝇 *B. cilifer*, 9. 瘤胫实蝇 *B. tuberculata*, 10. 瑞丽果实蝇 *B. ruihensis*, 11. 滇寡鬃实蝇 *B. modica*, 12. 黑膝实蝇 *B. scutellaris*, 13. 近黑颜实蝇 *B. parater*, 14. 黑颜实蝇 *B. diaphora*, 15. 具条实蝇 *B. scutellata*, 16. 腿端黑实蝇 *B. atrifemur*, 17. 枣实蝇 *Carpomya vesuviana*, 18. 何氏华实蝇 *B. hochii*, 19. 五指山实蝇 *B. wuzhishana*, 20. 瓜棍腹实蝇 *Dacus longicornis*, 21. 空白对照 dd H₂O

图2 引物 XF29 和 XR293 的种特异性验证

Fig. 2 The species specific verification of the primers XF29 and XR293

的降低,扩增出的条带逐渐减弱,在浓度稀释至 10^{-2} 倍后仍可见明显的条带,说明引物 XF29 和 XR293 具有较高的灵敏度(图3)。



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

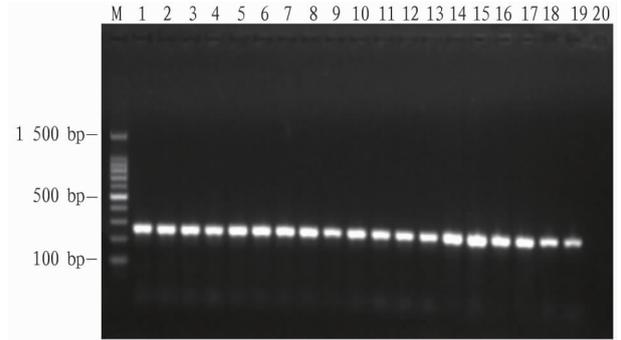
图3 引物 XF29 和 XR293 的灵敏度验证

Fig. 3 The sensitivity verification of the primers XF29 and XR293

2.5 应用与验证 通过对 19 种锈红果实蝇卵、幼虫、蛹和成虫的部分组织虫样的 DNA 模板进行种特异性测试验证,均显示出目标条带,结果表明分子生物学鉴定结果与形态学鉴定结果一致,该方法具有较好的稳定性,可以应用于锈红果实蝇的实际鉴定工作(图4)。

3 结论与讨论

实蝇科昆虫的种类多,分布广,危害大^[16],部分种属对果蔬生产具有重要的经济意义,尤其是在果蔬的进出境贸易



注: M. 100 bp DNA Ladder, 1~19. 锈红果实蝇 *B. rubigina*, 20. 空白对照 dd H₂O

图4 SS-PCR 快速鉴定锈红果实蝇的应用与验证

Fig. 4 The application and verification of SS-PCR for rapid identification of *B. rubigina*

中,疫情复杂,截获实蝇的种类多,且均为不同虫态的卵、幼虫和蛹,由于实蝇科的卵、幼虫和蛹形态极其相似,难以鉴别,若饲养到成虫后,根据成虫的形态特征进行分类鉴定,周期长,饲养条件受限,费时耗力,难以满足进口果蔬的快速通关和果蔬的早期预警,所以获得更多实蝇科昆虫物种的线粒体基因组序列,开展不受虫态限制的实蝇快速鉴定技术研究,显得极为迫切。

该研究基于 mtDNA COI 基因序列,并结合 NCBI 中已公开的部分实蝇的 COI 基因序列设计种特异性引物,以 20 种具有重要经济意义的实蝇作对照,测试并建立了锈红果实蝇的种特异性引物快速鉴定方法,以满足口岸进出境高通量、及时、快速、准确检疫鉴定实蝇物种的需求^[17-18]。该方法也为有效防止锈红果实蝇的入侵和局部发生以及物种的进一步传播扩散、保护果蔬的农业生产安全、维护国家对外贸易信誉等提供了技术支持^[19]。

该试验所建立的 SS-PCR 快速鉴定锈红果实蝇的方法,可以在 8 h 之内完成锈红果实蝇的物种鉴定,该方法具有快速简便、可操作性强、特异性和灵敏度高等优点,能够满足口岸快速通关、早期预警等检疫的要求。

参考文献

- [1] 王伍,麦梅妹,何天亮,等. 罗湖区口岸在旅检中截获锈红果实蝇[J]. 植物检疫, 1999, 13(5): 280.
- [2] 邓裕亮,李志红,白永华,等. 老挝中北部地区果实蝇属 (*Bactrocera*) 害虫种类初步调查[J]. 植物检疫, 2010, 24(1): 52-53.
- [3] DREW R A I, ROMIG M C, DORJI C. Records of Dacine fruit flies and new species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae) in Bhutan[J]. The raffles bulletin of zoology, 2007, 55(1): 1-21.
- [4] THUY N N, DUC H T, VU N H. Preliminary results on a fruit fly investigation in the South of Vietnam[R]. Preface 11 Opening Address 12, 2000: 153-157.
- [5] LEBLANC L, HOSSAIN M A, KHAN S A, et al. Additions to the fruit fly fauna (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of Bangladesh, with a key to the species[J]. Proceedings of the Hawaiian entomological society, 2014, 46: 31-40.
- [6] LIANG G Q, HANCOCK D L, XU W, et al. Notes on the Dacinae of southern China (Diptera: Tephritidae)[J]. Australian journal of entomology, 1993, 32(2): 137-140.
- [7] LIN M G, YANG Z J, WANG X J, et al. A taxonomic study of the subfamily Dacinae (Diptera: Tephritidae) from Hainan, China[J]. Acta entomologica sinica, 2006, 49(2): 310-314.

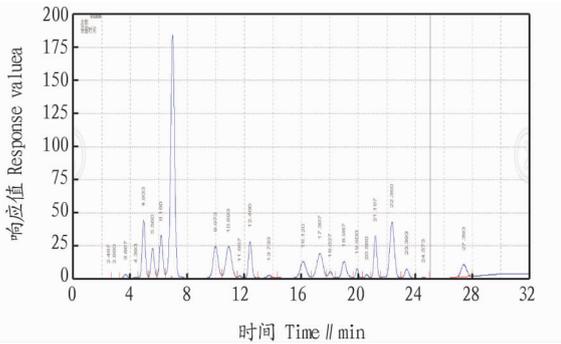


图6 2号酱油样品VIS1整体色谱图

Fig. 6 VIS1 overall chromatogram of No. 2 soy sauce sample

氨基酸自动分析仪可实现羟脯氨酸与其他氨基酸完全洗脱分离,保留时间与酱油中的其他氨基酸不重叠,同时也能测定和分析酱油中其他水解氨基酸。该方法准确,对比其他方法前处理过程更为简便,自动化程度高,无须专人观察仪器的运转情况,灵敏度高,精确度高,变异系数小,能避免氨基酸衍生物的多样性,能够快速测定羟脯氨酸的含量。该方法具有良好的线性关系、精密度以及回收率。但是氨基酸自动分析仪成本较高,维护费用较为昂贵,会限制中小型企业及基层实验室的使用。

在酱油的生产过程中,如严格按照强制性国家标准 GB/T 2717—2003《酱油卫生标准》^[15]和 GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》^[16]的规定执行,则不存在食品超标、微生物污染等的安全性问题。但是非法商贩会使用水解蛋白制造酱油,所以对此类酱油的鉴别是十分必要的。目前市面上的酱油仅从检测氨基酸态氮是否达到了国家标准来衡量酱油的品质,要对其来源进行鉴定,可以对酱油的氨基酸组分进行分析,进一步地确定酱油是否掺假。

在检测掺假的过程中不能单一用羟脯氨酸检测标准,这样不具有可靠性。而是需要结合酱油中含氯化物、氨基酸组成成分分析、羟脯氨酸含量、香味成分指纹图谱、铵盐含量

分析、过氧化值等方面的分析,形成一个联合特征指标标准的鉴别体系。同时要打击酱油掺伪日益严重的现象,不仅需要有关检测方法的不断改进,还需有关政府部门加大执法力度,加强对生产厂家的监管,严惩不法商贩,才能有效地解决人为添加皮革水解物造成的酱油安全性问题^[17]。

参考文献

- [1] 曲云龙. 酱油掺假检测技术的研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2017(5): 86.
- [2] 浦军强. 对酱油中添加动物水解蛋白的鉴定方法[J]. 中国调味品, 2010, 35(3): 100-101, 117.
- [3] 彭亚锋, 周耀斌, 薛峰, 等. 比色法测定酱油中羟脯氨酸含量的探讨[J]. 中国调味品, 2010, 35(2): 100-101.
- [4] 蓝蔚青, 王川, 李燕, 等. 猪皮中羟脯氨酸含量的测定[J]. 中国食物与营养, 2006(10): 38-40.
- [5] 戴绚丽, 范立英, 任艳. 对二甲氨基苯甲醛分光光度法测定奶粉中 L-羟脯氨酸含量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 313-314, 318.
- [6] 赵天珍, 袁秀金, 谭贵良, 等. 比色法快速测定奶粉和含乳饮料中游离 L-羟脯氨酸[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12): 111-113.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 肉与肉制品 羟脯氨酸含量测定: GB/T 9695. 23—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [8] 曾暖茜, 王洪健, 周兴起, 等. 氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(7): 719-721.
- [9] 张秀尧, 梁晓蓉, 蔡欣欣. 氨基酸自动分析仪检测乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(10): 2305-2306.
- [10] 冯志强, 许根叶, 黄永连, 等. 氨基酸自动分析仪测定胶原蛋白保健品中羟脯氨酸的含量[J]. 食品工业, 2014, 35(5): 248-250.
- [11] 姜涛, 冯永建, 何学超, 等. 氨基酸自动分析仪快速分析方法的研究[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(7): 1159-1163.
- [12] 王海轩, 谷瑞增, 金振涛, 等. 胶原蛋白水解物中 L-羟脯氨酸两种检测方法对比分析[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(22): 119-122.
- [13] 冯志强, 周芳梅, 黄永连, 等. 全自动氨基酸分析仪鉴别不同种类酱油中氨基酸的分析研究[J]. 中国食品添加剂, 2013(5): 198-205.
- [14] 宗雯雯, 冷云伟, 葛冬梅, 等. 几种酱油中氨基酸组分分析与比较[J]. 食品与机械, 2008, 24(4): 105-107.
- [15] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 酱油卫生标准: GB/T 2717—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [17] 徐伟丽, 单毓娟, 张兰威, 等. 酱油掺假检测技术的研究进展[J]. 中国调味品, 2013, 38(11): 103-106, 112.
- [8] 姚卫民. 河池市瓜、果实蝇监测情况初报[J]. 广西植保, 2006, 19(1): 9-11.
- [9] 陈旭, 刘晓飞, 叶辉. 云南主要有害实蝇种类及区划[J]. 生态学报, 2010, 30(3): 717-725.
- [10] 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: 1-479.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] JAMNONGLUK W, BAIMAI V, KITTAAPONG P. Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene[J]. *Genetica*, 2003, 119: 19-25.
- [14] JAMNONGLUK W, BAIMAI V, KITTAAPONG P. Molecular phylogeny of tephritid fruit flies in the *Bactrocera tau* complex using the mitochondrial COI sequences[J]. *Genome*, 2003, 46(1): 112-118.
- [15] 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.
- [16] 黄振, 郭琼霞, 陈韶萍. 基于 mt DNA Co I 设计种特异性引物快速鉴定具条实蝇[J]. 福建林业科技, 2020, 47(2): 20-25.
- [17] 黄振, 郭琼霞, 陈韶萍. 应用 SS-PCR 技术设计种特异性引物快速鉴定瓜实蝇[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(6): 83-86, 96.
- [18] 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.
- [19] 殷玉生, 张帆, 安榆林. 基于线粒体 COI 基因鉴定大小蠹属昆虫[J]. 福建林业科技, 2014, 41(1): 63-67, 120.

(上接第 166 页)