

# 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

刘慎思<sup>1,2</sup>, 张桂芬<sup>2</sup>, 武强<sup>2</sup>, 张爱兵<sup>3</sup>, 王进军<sup>1</sup>, 万方浩<sup>2,\*</sup>

(1. 西南大学植物保护学院, 昆虫学及害虫控制工程重庆市市级重点实验室, 重庆 400716;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

3. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

**摘要:** 实蝇类害虫多为国内外检疫对象, 其鉴定识别方法主要依据成虫的外部形态特征, 而传统的形态学识别法对口岸经常截获的幼体及残缺的虫体, 则无能为力。本研究以桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的幼体(卵、幼虫、蛹)以及成虫残体(足、翅、头部、胸部、腹部)为对象, 利用 DNA 条形码技术, 构建实蝇类害虫快速鉴定技术体系, 并以其他 4 种常见实蝇(包括番石榴实蝇 *B. correcta*、瓜实蝇 *B. cucurbitae*、南亚果实蝇 *B. tau*、柑桔大实蝇 *B. minax*)为对象对该技术体系进行应用验证。结果显示, 桔小实蝇幼体以及成虫残体的碱基序列与数据库中靶标种 CO I 基因碱基序列的一致性为 99.51%~99.84%, 其他 4 种实蝇相应序列与数据库中靶标种 CO I 基因序列的一致性分别为 100%, 100%, 99.81%~99.83% 和 100%; 以邻接法(NJ 法)构建系统发育树, 靶标种实蝇均与数据库中对应种实蝇聚为一支, 且置信度均为 100%。以 K2-P 模型计算种内及种间遗传距离得出, 5 种实蝇的种间遗传距离为 0.0597~0.2363, 平均为 0.1693; 种内遗传距离为 0.0000~0.0041, 平均为 0.0019。这些结果表明, 基于 DNA 条形码的物种识别技术完全可用于口岸截获的实蝇类害虫幼体及残体的准确鉴定。

**关键词:** 桔小实蝇; DNA 条形码; 实蝇类; 幼体; 成虫残体; 线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因; 种类识别

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2012)03-0336-08

## Establishment and application of DNA barcoding technology for identification of the immatures and adult debris of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

LIU Shen-Si<sup>1,2</sup>, ZHANG Gui-Fen<sup>2</sup>, WU Qiang<sup>2</sup>, ZHANG Ai-Bing<sup>3</sup>, WANG Jin-Jun<sup>1</sup>, WAN Fang-Hao<sup>2,\*</sup> (1. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**Abstract:** Many species in the family Tephritidae are quarantine pests worldwide. Usually, identification of the tephritid fruit flies is mainly based on external morphological characteristics of adults. In this research, the immatures (including egg, larva and pupa) and adult debris (including leg, wing, head, thorax and abdomen) of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) were used to develop a rapid identification technique for tephritid fruit flies based on DNA barcoding technology. The other four tephritid fruit fly species, *i. e.*, *B. correcta*, *B. cucurbitae*, *B. tau* and *B. minax*, were used to verify the feasibility of the fruit fly identification technique developed. The results showed that the nucleotide sequence identity of the partial CO I gene between the immatures or adult debris of *B. dorsalis* and the target gene from GenBank database is 99.51%–99.84%, while between other four tephritid fruit fly species and the target gene from GenBank database it is 100%, 100%, 99.81%–99.83% and 100%, respectively. Neighbor-joining tree was established based on the analysis of CO I gene sequences. The target species and the corresponding species in the database cluster in the same branches. All bootstrap values of the

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2009CB119200); 公益性行业(农业)科研专项(200903047); “十一五”国家科技支撑计划重大项目(2006BAD08A18)

作者简介: 刘慎思, 女, 1987 年生, 湖南湘阴县人, 硕士研究生, 从事入侵生物学研究, E-mail: liushensi\_cici@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wanfh@mail.caas.net.cn

收稿日期 Received: 2011-12-23; 接受日期 Accepted: 2012-02-12

original divergence within one species are 100%. The intra- and inter-species genetic distances were calculated with MEGA version 5.0 software using the Kimera 2-Parameter model. The intra-species genetic distances are 0.0000 – 0.0041, with an average of 0.0019. The interspecies genetic distances are 0.0597 – 0.2363, with an average of 0.1693. There is no overlap between intra- and inter-species genetic distances. The results indicated that the developed DNA barcoding identification techniques based on the partial CO I gene can provide a rapid and accurate method for identification of immatures or adult debris of tephritid fruit fly species.

**Key words:** *Bactrocera dorsalis*; DNA barcoding; fruit fly; immature; adult debris; mtDNA CO I gene; identification

实蝇(fruit flies)类昆虫属双翅目(Diptera),实蝇科(Tephritidae),遍布全世界的热带、亚热带和温带地区,种类多,寄主范围广,危害严重(Hardy, 1969; Norrbom *et al.*, 1999)。实蝇类昆虫的多数种类为水果、蔬菜、花卉等重要经济作物害虫,成虫产卵于寄主植物果皮,幼虫在果实内取食为害,致使被害果实腐烂、脱落(汪兴鉴, 1995)。近年来,随着国际贸易活动的日趋频繁及其复杂化,实蝇类害虫传播扩散的机率越来越大,直接威胁着果蔬种植业和农业生产安全,成为影响世界水果、坚果、蔬菜、花卉等进出口贸易中重要的检疫问题,因此,实蝇的准确识别与快速鉴定受到世界各国的高度重视。

长期以来,实蝇类害虫的口岸检疫鉴定工作主要以完整的成虫的外部形态特征为依据(梁广勤等, 2008),幼体(包括卵、幼虫、蛹)由于形态不稳定或特征不明显不能用于种类鉴定,而残体更是无法用于种类识别。如桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 的口岸检疫鉴定,主要依赖其成虫头部颜面的斑纹、胸部背板的鬃序、前翅的带纹、中足胫节以及外生殖器等的形态特征(梁广勤, 1985),而口岸截获的往往是幼虫、卵或蛹,亦或有头、胸、足、翅等残体的发现;对于幼体一般是将其进行室内饲养,待成虫羽化后再行鉴定(崔俊霞等, 2006);而对于残体则无法进行准确识别。同时,传统形态学鉴定方法耗时长,并且需要由专门从事实蝇分类的人员完成,在口岸检疫时受到限制。因此,研究快速鉴定新方法,特别是实蝇卵、幼虫、蛹等幼体以及成虫残体的快速鉴定方法,是防止实蝇类害虫入侵我国的首要条件。目前,分子标记技术发展迅速,如扩增片段长度多态性技术(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、限制性片段长度多态性技术(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、实时荧光定量 PCR 技

术、芯片技术、核酸测序技术等。分子诊断技术因其不受虫态或龄期限制、且对于残缺的标本也可进行快速准确鉴定,正逐步应用到实蝇的检测鉴定中,并取得一定成效。如 Kakouli-Duarte 等(2001)采用 AFLP 技术对地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedemann)和纳塔尔小条实蝇 *C. rosa* (Walker)进行了准确区分;Yu 等(2005)以 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术对菲律宾实蝇 *B. philippinensis* Drew & Hancock 和芒果实蝇 *B. occipitalis* (Bezzi)进行了快速鉴定;张亮和张智英(2007)通过 RAPD 技术构建了南亚果实蝇 *B. tau* (Walker)、黑漆实蝇 *B. scutellaris* (Bezzi)、具条实蝇 *B. scutellata* (Hendel)、瓜实蝇 *B. cucurbitae* (Coquillett)、桔小实蝇 *B. dorsalis* (Hendel)和番石榴实蝇 *B. correcta* (Bezzi)等 6 种实蝇的指纹图谱;李文芬等(2008)应用生物芯片检测法对地中海实蝇、非洲芒果实蝇 *C. cosyra* (Walker)和纳塔尔小条实蝇等进行了准确识别。然而,上述鉴定技术多以成虫为检测对象且各具优缺点,尚无法全面满足快速、准确、高通量、低成本检验检疫进境危害性有害生物的需求。如 RFLP 技术和 RAPD 技术具有 DNA 需求量少、多态性丰富、对基因组的覆盖范围比较广等优点;但是, RFLP 技术操作繁琐、多态性检出率低,而 RAPD 技术的稳定性较差、对试验条件敏感、可信度不高等,因此限制了其广泛应用。尽管 AFLP 技术很好地弥补了上述两种方法的不足,但对样本 DNA 的质量要求较高,且所需设备的费用较为昂贵。而基因芯片技术虽然可以满足高通量的需求,但也存在技术成本较高、操作过程较为复杂等问题。上述分子标记技术虽能有效地鉴定幼体和残体,但有关其实际应用的研究很少,且主要集中于对幼体的识别(崔俊霞等, 2006; Buahom 等, 2011),而有关对口岸经常截获的成虫残体的研究鲜见报道。

DNA 条形码(DNA barcoding)技术由加拿大动

物学家 Hebert 等 (2003) 提出, 是通过对线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (mtDNA CO I) 5'端一段长度约为 650 bp 的标准基因片段进行测序和序列分析, 进而在 DNA 水平上成功地区分物种, 目前已成为生物分类学研究的新方向 (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2006; Floyd *et al.*, 2010)。mtDNA 一般为母系遗传、相对保守、无内含子、不包含重复序列、进化速率比较快 (是核基因进化速率的 2~9 倍)、较少发生插入和缺失现象 (Lin and Danforth, 2004); 而且由于 mtDNA 为多拷贝, 具有很高的灵敏度, 对于 DNA 降解不敏感, 因此更有利于种类鉴定, 目前 mtDNA CO I 基因已成为生物分类学研究中应用最多的分子标记之一, 在很大程度上促进了生物分类学研究的发展, 并已广泛应用于昆虫的种类鉴定以及发现隐存种。如埃塞俄比亚学者利用 CO I 分子标记技术对发生在甘蔗上的夜蛾属幼虫进行了鉴定 (Assefa *et al.*, 2007); Hebert 等 (2004) 通过该技术证明哥斯达黎加的弄蝶 *Astrartes fulgerator* 包含至少 10 隐存种。此外, Shufran 等 (2011) 的研究表明, DNA 条形码技术可以准确鉴定不同发育阶段以及不同形态的麦蚜 (cereal aphids), 而该技术对卵的准确识别完全可以

替代传统的形态学鉴定法。

本研究围绕实蝇类害虫的卵、幼虫、蛹等极易随果品及蔬菜花卉贸易传播, 成虫残体时常被截获, 而难以快速准确鉴定的问题, 以常见实蝇类害虫的幼体 (卵、幼虫、蛹) 以及成虫残体 (头部、胸部、腹部、足、翅) 为靶标, 采用 DNA 条形码技术, 从口岸快速检疫检验和准确识别的角度, 研究实蝇类害虫幼体及成虫残体的快速分子检测鉴定技术。旨在为有效阻止实蝇类害虫侵入, 以及局部发生物种的进一步传播扩散, 维护国际贸易信誉提供技术支撑。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试实蝇

研究中所使用的 5 种果实蝇属害虫 [桔小实蝇、番石榴实蝇、瓜实蝇、南亚果实蝇和柑桔大实蝇 *B. minax* (Enderlein)] 信息如表 1 所示, 标本放入含有 99% 酒精的离心管中, 4℃ 保存备用。以地中海实蝇和非洲芒果实蝇作为外群, 并同时从 GenBank 中调用上述 7 种实蝇的 CO I 基因片段 (表 2) 进行比对分析。

表 1 供试实蝇标本信息  
Table 1 Fruit fly species used in the present study

| 种类<br>Species                      | 来源<br>Origin                      | 虫态/成虫残体<br>Development stage/adult debris  | 采集地点<br>Locality             | 采集日期 (年/月)<br>Collecting date<br>(year/month) | 采集者<br>Collector   |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------|---|--------------------|
| 桔小实蝇<br><i>Bactrocera dorsalis</i> | 人工饲养<br>Artificial rearing        | 卵、幼虫 (3 龄)、蛹/头、胸、腹、足、翅<br>Egg, larva (3rd instar), pupa/head, thorax, abdomen, leg, wing | 北京海淀<br>Haidian, Beijing     | 2010/10                                       | 武强<br>WU Qiang     |
| 番石榴实蝇<br><i>B. correcta</i>        | 诱捕<br>Trapping                    | 幼虫 (3 龄)/头部<br>Larva (3rd instar)/ head  | 云南建水<br>Jianshui, Yunnan     | 2007/01                                       | 肖春<br>XIAO Chun    |
| 瓜实蝇<br><i>B. cucurbitae</i>        | 番石榴<br><i>Psidium guajava</i>     | 卵/胸部、足<br>Egg/thorax, leg  | 广东广州<br>Guangzhou, Guangdong | 2008/11                                       | 吴佳教<br>WU Jia-Jiao |
| 南亚果实蝇<br><i>B. tau</i>             | 番茄<br><i>Solanum lycopersicum</i> | 蛹/腹部<br>Pupa/abdomen   | 广东广州<br>Guangzhou, Guangdong | 2008/11                                       | 吴佳教<br>WU Jia-Jiao |
| 柑桔大实蝇<br><i>B. minax</i>           | 柑桔<br><i>Citrus reticulata</i>    | 幼虫 (3 龄)/翅<br>Larva (3rd instar)/wing  | 重庆北碚<br>Beibei, Chongqing    | 2008/07                                       | 刘怀<br>LIU Huai     |

### 1.2 DNA 提取

供试实蝇总 DNA 提取参照罗晨等 (2002) DNA 提取方法, 并稍加改进。取实蝇类害虫的单头 3 龄幼虫 (中部, 1/10 体长)、蛹 (1/10 体长)、单粒卵,

以及成虫的头部 (1/3 头长)、胸部 (1/10 胸长)、腹部 (中部, 1/10 腹长)、足、翅等组织置于滴有 20  $\mu$ L 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, 20 mmol/L NaCl, pH 8.0) 的

表 2 调用的 GenBank 数据库中 7 种实蝇  
CO I 基因片段相关信息

Table 2 The CO I gene information of seven species of *Bactrocera* from GenBank database

| 物种<br>Species                   | GenBank 登录号<br>GenBank accession no. |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| 桔小实蝇 <i>Bactrocera dorsalis</i> | DQ116269                             |
| 番石榴实蝇 <i>B. correcta</i>        | DQ116264                             |
| 瓜实蝇 <i>B. cucurbitae</i>        | DQ154102                             |
| 南亚果实蝇 <i>B. tau</i>             | GQ154160                             |
| 柑桔大实蝇 <i>B. minax</i>           | HM776033                             |
| 地中海实蝇 <i>Ceratitis capitata</i> | DQ116368                             |
| 非洲芒果实蝇 <i>C. cosyra</i>         | AY788421                             |

parafilm 膜上, 以 PCR 管底部作为匀浆器进行充分研磨, 匀浆液移入 1.5 mL 离心管; 然后以 200  $\mu$ L 缓冲液分 4 次冲洗匀浆器、合并混匀; 加入 6  $\mu$ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 充分混匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h (中途混匀 3 次); 加入 220  $\mu$ L 氯仿/异戊醇 (v: v = 24:1), 轻柔混匀后, 冰浴 30 min; 然后 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 加入 440  $\mu$ L 预冷无水乙醇, 轻柔混匀后于 -40 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 小心弃去上清液。加入 440  $\mu$ L 预冷 75% 乙醇洗涤, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 小心弃去上清液; 然后将离心管倒扣于洁净滤纸上, 自然干燥。每管加入 30  $\mu$ L 超纯水, 充分溶解后于 -40 $^{\circ}$ C 保存备用。每种虫态及成虫残体分别取 3 头进行 DNA 提取。

### 1.3 PCR 扩增及电泳检测

以桔小实蝇的单头 3 龄幼虫 (中部, 1/10 体长)、蛹 (1/10 体长)、单粒卵, 以及成虫的头部 (1/3 头长)、胸部 (1/10 胸长)、腹部 (中部, 1/10 腹长)、足、翅的 DNA 为模板, 以 DNA 条形码通用型引物 LCO1490/HCO2198 (上游引物 LCO1490 碱基序列为 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3', 下游引物 HCO2198 碱基序列为 5'-TAAACTTCAGG GTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) (上海生工生物工程技术有限公司协助合成) 进行 PCR 扩增。反应体系为 25  $\mu$ L, 其中超纯水 9.5  $\mu$ L、2  $\times$  EasyTaq PCR SuperMix 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 上游引物和下游引物各 0.5  $\mu$ L、DNA 模板 2  $\mu$ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 48 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增反应在 ABI-9700 基因扩增仪上进

行, 取 4  $\mu$ L PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上以 80 V 电泳分离 45 min, 然后以 Gel-Doc Universal Hood II 型凝胶成像系统 (Bio-Rad Laboratories) 分析电泳结果。每种虫态及成虫残体分别测定 3 头; 即不同虫态测定 9 头, 不同残体测定 15 头, 共计检测 24 头。同时, 以其他常见 4 种实蝇的幼体及成虫残体 (包括番石榴实蝇 3 龄幼虫和成虫头部, 瓜实蝇卵及成虫胸部和足, 南亚果实蝇蛹和成虫腹部, 以及柑桔大实蝇 3 龄幼虫和成虫翅) 的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增及电泳检测; 单头/单粒测定, 每种虫态或成虫残体分别检测 3 头; 即不同虫态测定 12 头, 不同残体测定 15 头, 共计检测 27 头。

### 1.4 PCR 产物纯化、测序及序列比对和分析

随机取 1 头经电泳检测的桔小实蝇幼体和成虫残体 (共计 8 头) DNA 以及其他常见 4 种实蝇幼体和成虫残体 (共计 9 头, 即, 番石榴实蝇 2 头、瓜实蝇 3 头、南亚果实蝇 2 头、柑桔大实蝇 2 头) DNA 的 PCR 扩增产物进行纯化和测序 (由北京三博远志生物技术有限责任公司协助完成), 获得的序列以序列阅读软件 Chromas 1.0 读序并进行人工校阅, 以确保序列的高质量。然后, 用 Bioedit 7.0 对序列进行整合处理, 以 ClustalW Multiple Alignment 进行对齐处理; 并利用 NCBI、BOLD 等公认数据库, 对所获得的高质量 CO I 序列与已登录的桔小实蝇碱基序列进行同源性比对, 用 MEGA 5.0 软件以 Kimura 双参数模型计算 (Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2011) 种内及种间遗传距离。然后, 利用 MEGA 5.0 软件中的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 与数据库中现有的靶标实蝇种类的 CO I 序列一同构建系统进化树, 并以地中海实蝇和非洲芒果实蝇 (表 2) 为外围种群, 对各分支置信度 (bootstrap) 进行 1 000 次以上的重复检验。最后, 根据同源性分析数据和所构建的系统进化树, 确定鉴定结果。

## 2 结果

### 2.1 实蝇类幼体及成虫残体 DNA PCR 扩增结果

以桔小实蝇不同幼体以及成虫残体 DNA 为模板, 以 DNA 条形码通用型引物 LCO1490/HCO2198 进行 PCR 扩增, 电泳检测结果显示, 无论是单头蛹、幼虫还是单粒卵以及成虫的头部、胸部、腹部, 还是成虫的足和膜质的翅, 均能扩增出清晰的靶标条带 (图 1)。

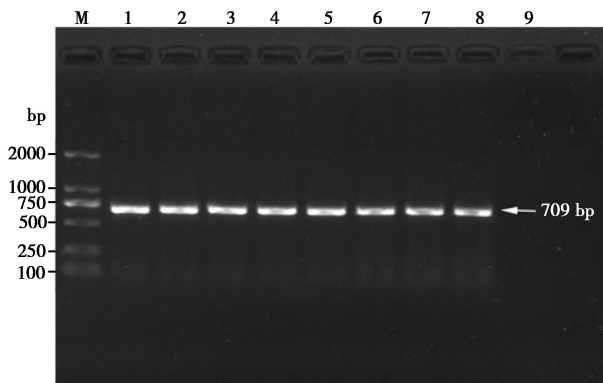


图1 DNA条形码通用型引物 LCO1490/HCO2198 对桔小实蝇不同虫态以及成虫残体 CO I 基因扩增结果电泳检测图

Fig. 1 Amplification pattern of the CO I gene in different development stages and adult debris of *Bactrocera dorsalis* using the universal DNA barcoding primers LCO1490/HCO2198 M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1: 头部 Head; 2: 胸部 Thorax; 3: 腹部 Abdomen; 4: 足 Leg; 5: 翅 Wing; 6: 卵 Egg; 7: 幼虫 Larva; 8: 蛹 Pupa; 9: 阴性对照 (模板为水) Negative control (ultra pure water as the template).

当以常见的其他 4 种实蝇的幼体(卵、幼虫、蛹)以及成虫残体(头部、胸部、腹部、足、翅)DNA 为模板,以 DNA 条形码通用型引物 LCO1490/HCO2198 进行 PCR 扩增时,每一种类的幼体及成虫残体亦可扩增出清晰的靶标片段(图 2),为基于 DNA 条形码的实蝇类害虫鉴定技术研究提供了物质保障。

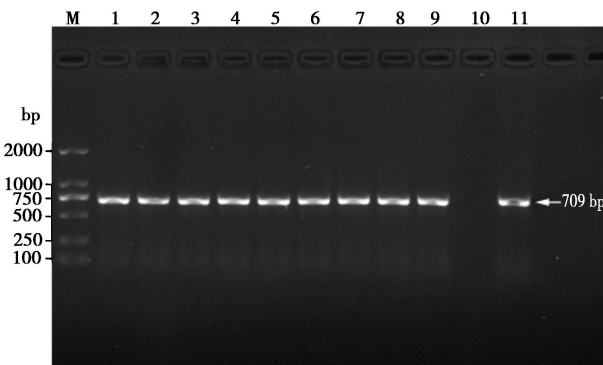


图2 DNA条形码通用型引物 LCO1490/HCO2198 对其他 4 种实蝇幼体以及成虫残体 CO I 基因扩增结果电泳检测图

Fig. 2 Amplification pattern of the CO I gene in immatures and adult debris of the other four *Bactrocera* species M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1-2: 番石榴实蝇幼虫和成虫头部 Larval and adult head of *B. correcta*; 3-5: 瓜实蝇卵和成虫胸部及足 Egg and adult thorax and leg of *B. cucurbitae*; 6-7: 南亚果实蝇蛹和成虫腹部 Pupal and adult abdomen of *B. tau*; 8-9: 柑桔大实蝇幼虫和成虫前翅 Larval and adult wing of *B. minax*; 10: 阴性对照 (模板为水) Negative control (ultra pure water as the template); 11: 阳性对照 (桔小实蝇幼虫) Positive control (*B. dorsalis* larva).

## 2.2 序列测定、同源性分析及系统进化树构建

随机取 3 头中 1 头经电泳检测的桔小实蝇幼体和成虫残体(共计 8 头),以及其他常见 4 种实蝇幼体和成虫残体(共计 9 头,其中,番石榴实蝇 2 头、瓜实蝇 3 头、南亚果实蝇 2 头、柑桔大实蝇 2 头)PCR 扩增产物进行测序,然后以 Bioedit 7.0 进行序列整合处理,以 ClustalW Multiple Alignment 进行对齐处理,结果显示,处理后的靶标片段大小为 648 bp。之后,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桔小实蝇 CO I 序列进行比对分析,结果表明,本研究中桔小实蝇卵、幼虫、蛹以及成虫头部、胸部、腹部、足和翅的 CO I 序列与数据库中已知靶标种的基因序列的同源性为 99.51%~99.84%;调用数据库中现有的桔小实蝇靶标基因片段碱基序列(表 2),与本研究中所得到的 8 条 CO I 基因序列以邻接法(NJ 法)构建系统发育树,结果显示,均与桔小实蝇聚为一支,且置信度为 100%,完全可用于桔小实蝇幼体和成虫残体的识别鉴定(图 3)。番石榴实蝇、瓜实蝇、南亚果实蝇、柑桔大实蝇等幼体及成虫残体的 CO I 基因序列与 NCBI 和 BOLD 生命条形码数据库中已知的 4 种实蝇的 CO I 序列的一致性分别为 100%, 100%, 99.81%~99.83% 和 100%;调用数据库中 4 种实蝇的靶标基因片段的碱基序列(表 2),采用 NJ 法构建系统发育树,并对各分支置信度(bootstrap)进行 1 000 次以上的重复检验。显示,分别与靶标种聚为一支,且置信度均为 100%(图 3),可以对实蝇类害虫的幼体和成虫残体进行准确识别。

## 2.3 种内与种间遗传距离

以 Kimura 2-parameter (K2-P) 为系统进化树模型计算 5 种实蝇的种内和种间遗传距离,结果显示,5 种实蝇的种间遗传距离为 0.0597~0.2363,平均为 0.1693;其中,瓜实蝇与南亚果实蝇的亲缘关系最近,种间遗传距离为 0.0597;而桔小实蝇与柑桔大实蝇的亲缘关系最远,种间遗传距离为 0.2363。5 种实蝇的种内遗传距离为 0.0000~0.0041,平均为 0.0019;其中桔小实蝇的种内遗传距离最大,为 0.0041(表 3)。

## 3 结论与讨论

本研究以桔小实蝇的卵、幼虫、蛹以及成虫的

表 3 5 种实蝇种内与种间遗传距离

Table 3 Intra- and inter-species genetic distances of the five fruit fly species

| 物种<br>Species                      | 桔小实蝇<br><i>B. dorsalis</i> | 番石榴实蝇<br><i>B. correcta</i> | 瓜实蝇<br><i>B. cucurbitae</i> | 南亚果实蝇<br><i>B. tau</i> | 柑桔大实蝇<br><i>B. minax</i> | 种内遗传距离<br>Inter-species genetic distance |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------|--|
| 桔小实蝇<br><i>Bactrocera dorsalis</i> | -                          |                             |                             |                        |                          | 0.0041                                   |
| 番石榴实蝇<br><i>B. correcta</i>        | 0.0919                     | -                           |                             |                        |                          | 0.0017                                   |
| 瓜实蝇<br><i>B. cucurbitae</i>        | 0.1725                     | 0.1834                      | -                           |                        |                          | 0.0011                                   |
| 南亚果实<br><i>B. tau</i>              | 0.1660                     | 0.1791                      | 0.0597                      | -                      |                          | 0.0033                                   |
| 柑桔大实蝇<br><i>B. minax</i>           | 0.2363                     | 0.2070                      | 0.2006                      | 0.1962                 | -                        | 0.0000                                   |

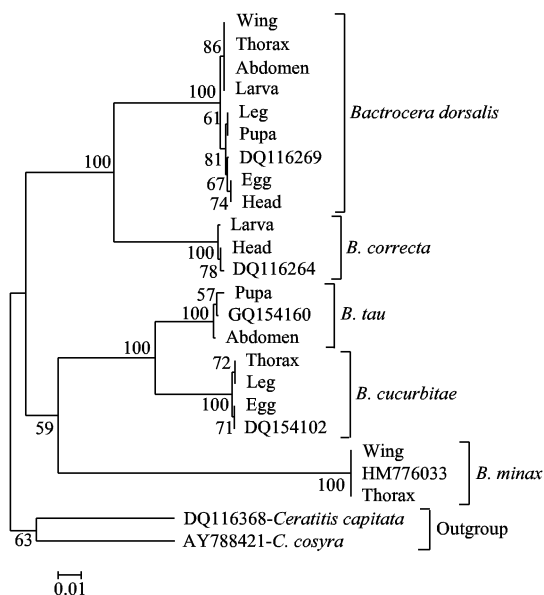


图 3 邻接法构建的 5 种实蝇不同虫态以及不同组织的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on the analysis of CO I gene sequences from different development stages and adult debris of five fruit fly species

图中分支上数值为 1 000 次自展检验置信度；标尺示遗传距离。The number on the branch indicates bootstrap values for 1 000 replicates. Scale bar represents genetic distance.

头部、胸部、腹部、足、翅等为靶标，采用 DNA 条形码技术，构建了实蝇类害虫幼体和成虫残体的快速分子检测技术体系，并以番石榴实蝇、瓜实蝇、南亚果实蝇、柑桔大实蝇的幼体和成虫残体进行应用验证。数据库比对结果显示，待测样本的 CO I 序列与数据库中已知靶标种的基因序列的同源性为

99.51%~100%；5 种实蝇的种间遗传为 0.0597~0.2363，平均为 0.1693；种内遗传距离为 0.0000~0.0041，平均为 0.0019(表 2)，种间遗传距离为种内遗传距离的 89.1 倍。表明基于 DNA 条形码的物种识别技术不仅可以准确识别实蝇类害虫的幼体，而且对成虫残体包括膜质的翅以及骨化程度较高的足亦能准确鉴定，完全可用于实蝇类害虫的口岸检验检疫工作。此外，我们在上述 5 种实蝇 DNA 提取过程中发现，幼虫、蛹以及成虫的头部、胸部、腹部等组织，DNA 的提取较为容易，且 CO I 基因的扩增成功率高；而卵(长约 1 mm)、翅以及足，由于 DNA 含量相对较少，提取时必须充分研磨，以确保获取高质量的 DNA 以及较高的 DNA 得率。尽管，本研究中以 NJ 法构建系统发育树时，每种实蝇的序列数目有限(2~8 条)，代表性略显不足，但 5 种实蝇均分别与数据库中的靶标种聚为一支，且置信度均为 100%(图 3)，可以准确鉴别实蝇类害虫的幼体和成虫残体。同时，还为构建拥有自主知识产权的 DNA 条形码序列数据库奠定了基础。

DNA 条形码技术不受虫态以及标本完整性的限制，CO I 序列一经获得，即可在 NCBI 或者 BOLD 数据库中进行同源性比对，进而快速准确地鉴定物种，弥补了传统形态学方法鉴定的不足。2011 年，实蝇类害虫 DNA 条形码鉴定系统初步建立，尽管目前尚未公开使用(Li *et al.*, 2011)。然而，DNA 条形码技术对桔小实蝇复合种中个别种的识别不甚理想，如本研究在数据库比对时发现，桔小实蝇与同属桔小实蝇复合种的木瓜实蝇、杨桃实

蝇、菲律宾实蝇的同源性很高,达 99.23%~99.69%;余道坚(2005)的研究也显示,桔小实蝇、木瓜实蝇、菲律宾实蝇、杨桃实蝇的 CO I 基因序列(664 bp,位于 CO I 基因 3'端,与本研究的靶标序列无重叠区域)的同源性较高,为 98.6%~99.4%,种间差异仅为 0.6%~1.4%,低于 DNA 条形码有效性的检验标准,即种间差异应大于 2% (Hebert *et al.*, 2003)。桔小实蝇复合种是一个重要的实蝇类群(Hardy, 1969; Drew and Hancock, 1994; Clarke *et al.*, 2005),其中的所有种类均为我国进境植物检疫性有害生物,尽管 DNA 条形码技术对该复合种中的桔小实蝇、木瓜实蝇、菲律宾实蝇、杨桃实蝇、芒果实蝇等 5 种实蝇的鉴别不甚理想,但通过联合应用 PCR-RLFP 法、SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术等亦可有效地区分部分复合种(Yu *et al.*, 2005; Chua *et al.*, 2010)。如 Yu 等(2005)以 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术成功区分复合种中的菲律宾实蝇和芒果实蝇;Chua 等(2010)采用基于 CO I 基因的 PCR-RLFP 技术成功地区分了杨桃实蝇 *B. carambolae* Drew & Hancock 和木瓜实蝇 *B. papayae* Drew & Hancock;进而,使桔小实蝇复合种的有效识别得以实现。

### 参考文献 (References)

- Assefa Y, Mitchell A, Conlong DE, Moyal P, 2007. DNA identification of *Busseola* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Ethiopian sugarcane. *African Entomology*, 15: 375–379.
- Buahom N, Li ZH, Wu JJ, Liu JQ, 2011. Molecular identification of fruit fly larvae from Thailand based on DNA barcoding. *Plant Quarantine*, 25(1): 49–52. [ Buahom N, 李志红, 吴佳教, 刘佳琪, 2011. 基于 DNA 条形码技术的泰国番石榴中实蝇幼虫分子鉴定研究. *植物检疫*, 25(1): 49–52 ]
- Chua TH, Chong YV, Lim SH, 2010. Species determination of Malaysian *Bactrocera* pests using PCR-RFLP analyses (Diptera: Tephritidae). *Pest Management Science*, 66: 379–384.
- 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.
- Cui JX, Xu Y, Wen WG, Chen XF, Zhang TX, 2006. Rapid quarantine and identification of *Bactrocera dorsalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 43(5): 731–733. [ 崔俊霞, 徐瑛, 闻伟刚, 陈先锋, 张同心, 2006. 桔小实蝇快速检疫鉴定方法. *昆虫知识*, 43(5): 731–733 ]
- Drew RAI, Hancock DL, 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bulletin of Entomological Research*, Suppl. 2: 1–68.
- Floyd R, Lima J, deWaard J, Humble L, Hanner R, 2010. Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions*, 12, 2947–2954
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Hardy DE, 1969. Taxonomy and distribution of the oriental fruit fly and related species (Tephritidae: Diptera). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 20: 395–428.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of Royal Society of London B*, 270: 313–321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41): 14812–14817.
- Kakouli-Duarte T, Casey D, Burnell A, 2001. Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *Ceratitid capitata* and *Ceratitid rosa* (Diptera: Tephritidae) using amplified fragment length polymorphism. *Journal of Economic Entomology*, 94: 989–997.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111–120.
- Li WF, Yu DJ, Yan HM, Li JG, Xu L, Ren LF, 2008. The gene chip detection technique for the Mediterranean fly, *Ceratitid capitata*, and its related species (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(1): 61–67. [ 李文芬, 余道坚, 颜亨梅, 李建光, 徐浪, 任鲁风, 2008. 地中海实蝇及其近缘种基因芯片检测研究. *昆虫学报*, 51(1): 61–67 ]
- Li ZM, Li ZH, Wang FX, Lin W, Wu JJ, 2011. TBIS: A web-based expert system for identification of tephritid fruit flies in China based on DNA barcode. *Computer and Computing Technologies in Agriculture IV*, 346: 563–571.
- Liang GQ, 1985. Features of the oriental fruit fly and its habits. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, (1): 7–15. [ 梁广勤, 1985. 桔小实蝇形态特征及其生活习性. *江西农业大学学报*, (1): 7–15 ]
- Liang GQ, Liang F, Zhao JP, Hu XN, Wu JJ, 2008. Overview of the study on fruit flies quarantine in China. *Journal of Environmental Entomology*, 30(4): 361–369. [ 梁广勤, 梁帆, 赵菊鹏, 胡学难, 吴佳教, 2008. 中国实蝇检疫研究概况. *环境昆虫学报*, 30(4): 361–369 ]
- Lin CP, Danforth BN, 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined data sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 686–702.
- Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt CO I) gene sequences

- for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 759–763. [罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 胡敦孝, 张芝利, 2002. 利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. *昆虫学报*, 45(6): 759–763]
- Norrbom AL, Zucchi RA, Hernández-Ortiz V, 1999. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotripanini) based on morphology. In: Aluja M, Norrbom AL eds. *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 299–342.
- Shufran KA, Puterka GJ, 2011. DNA barcoding to identify all life stages of holocyclic cereal aphids (Hemiptera: Aphididae) on wheat and other poaceae. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(1): 39–42.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Wang XJ, 1995. Introduction to the important fruit flies (Diptera: Tephritidae) harmful to fruits and vegetables. *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]
- Yu DJ, Chen ZL, Zhang RJ, Yin WY, 2005. Real-time qualitative PCR for the inspection and identification of *Bactrocera philippinensis* and *Bactrocera occipitalis* (Diptera: Tephritidae) using SYBR green assay. *Raffles Bulletin of Zoology*, 53: 73–78.
- Yu DJ, 2005. Study on Rapid Identification of Quarantine Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) Based on Molecular Techniques. PhD Dissertation, Graduate School of Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing. [余道坚, 2005. 检疫性实蝇分子生物学快速鉴定技术的研究. 北京: 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所博士学位论文]
- 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]

(责任编辑: 袁德成)