

检疫性实蝇快速鉴定方法研究进展

王文祥¹, 于飞², 章柱¹, 林晓红¹

(1. 广州机场出入境检验检疫局, 广州 510470; 2. 惠州出入境检验检疫局, 惠州 516001)

摘要 为适应口岸检疫的需要, 检疫性实蝇的快速鉴定方法不断发展。本文全面综述了检疫性实蝇电泳、限制性片段长度多态性、随机扩增多态性 DNA 和核酸序列分析等鉴定方法的进展, 并对各种鉴定方法进行了对比, 强调了准确选择分子标记的重要性, 旨在为建立有效的检疫性实蝇快速鉴定方法提供基本思路。

关键词 检疫性实蝇; 快速鉴定; 分子标记

中图分类号: S 41-33 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2010.02.008

Advances in rapid identification methods for the quarantined fruit flies

Wang Wenxiang¹, Yu Fei², Zhang Zhu¹, Lin Xiaohong¹

(1. Guangzhou Airport Exit and Entry Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510470, China;

2. Huizhou Exit and Entry Inspection and Quarantine Bureau, Huizhou 516001, China)

Abstract The fast identification methods are developed to shorten the time for identification of the quarantined fruit flies. This review describes the development of the fast identification methods, including electrophoresis, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and nucleic acid sequences analysis for the quarantined fruit fly. These methods were compared and the suitable molecular markers are offered to provide basic ideas for rapid identification of the quarantined fruit flies.

Key words quarantined fruit fly; fast identification; molecular markers

实蝇属双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae), 其幼虫主要为害果实使受害树大量落果, 受害果商品价值受到严重影响造成巨大经济损失, 其中植物检疫性实蝇是实蝇的主要类群之一, 在国际贸易中具有重要经济意义^[1]。检疫性实蝇主要分布在果实蝇属(*Bactrocera*)、寡鬃实蝇属(*Dacus*)、小条实蝇属(*Ceratitis*)、按实蝇属(*Anastrepha*)和绕实蝇属(*Rhagoletis*) 5 个属, 其中果实蝇属是最具经济意义的实蝇类群^[2-3]。

1 检疫性实蝇快速鉴定的意义

在水果国际贸易中许多检疫性实蝇发生国家与未发生国家有频繁的贸易往来, 这必将使检疫性实蝇入侵扩散的风险大大增加^[4], 严重威胁世界水果生产安全。在不断变化的新形势下需要采取有效的措施和手段保护目前稳定的水果生产状况, 这就要求植物检疫工作在《实施卫生和动植物检疫措施的协议》(SPS)框架下, 通过可靠的实蝇鉴定来识别外

来物种并阻止其侵入蔓延, 避免自然生态环境和农业生产受到不可逆影响及重大经济损失。在防止检疫性实蝇入侵工作中, 植物检疫作为传统的植物保护措施往往起到事半功倍的作用, 实验室检测作为其重要环节要求对截获的实蝇进行准确而快速的种类鉴定, 鉴定周期的长短决定了开展下一步应急快速反应、预警测报和防治效果。口岸植物检疫实验室面对大量实蝇的幼虫和蛹通常将其饲养至成虫虫态才可进行准确的形态学鉴定, 这一过程往往需要 20~30 d, 显然, 过长的鉴定周期不利于水果国际贸易顺利发展。因此, 各国科研工作者为突破这一束缚进行了积极而迫切的探求, 从分子生物学角度进行深入研究取得了一系列令人瞩目而卓有成效的科研成果。本文将检疫性实蝇的快速鉴定方法进行对比和分析, 探讨方法的研究思路和优缺点, 强调了准确选择分子标记的重要性, 旨在为建立有效的检疫性实蝇快速鉴定方法提供基本思路。

2 快速鉴定方法

快速鉴定方法通常是指与传统形态学鉴定相区别的用于检疫性实蝇种类鉴定的分子生物学方法,它具有检测周期短、对样品质量和数量要求低和结果准确可靠等特点。分子生物学的迅猛发展为丰富和充实检疫性实蝇鉴定方法提供了必要条件,其研究成果在检疫性实蝇快速鉴定中得到了广泛应用和实践,目前主要包括电泳、限制性片段长度多态性、随机扩增多态性 DNA 和核酸序列分析鉴定技术。

2.1 电泳技术

电泳技术中同工酶电泳应用研究较为广泛,它是以生物分类和系统进化为理论基础,利用分子生物学、生物化学和群体遗传学的手段和方法,根据不同物种之间酶和蛋白质特征基因位点和等位基因的不同来研究昆虫的分类和进化^[5-7]。在实蝇种属快速鉴定中同工酶电泳技术首先得到了应用,Berlacher 采用 6 种酯酶同工酶电泳技术成功鉴定了绕实蝇属的不同种实蝇,并建立了电泳酶谱检索表^[8],Drew 和 Hardy 进一步将染色体组型与同工酶电泳技术结合起来以区分橘小实蝇和达尔文实蝇幼虫^[9],梁广勤等采用此方法鉴定橘小实蝇、芒果实蝇、番石榴实蝇、南瓜实蝇和瓜实蝇 5 种 3 龄实蝇幼虫并验证了应用效果^[10]。杨国海等对芒果实蝇、番石榴实蝇、南瓜实蝇和瓜实蝇 4 种实蝇幼虫单独用酯酶同工酶电泳进行快速鉴定^[11],获得较好的结果,Saelee 等也通过电泳分析异型酶多态性甄别了不同寄主饲喂的 7 种南瓜实蝇复合种^[12]。詹开瑞等还首次采用 PCR 结合变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术分析橘小实蝇及其 6 种近缘种的线粒体 CO II 和 16s rDNA 基因序列,根据不同实蝇的电泳谱图可以确定种间特异性^[13]。电泳技术虽具有突变检出率高、操作简便且费用低廉等优势,但其结果重现性差且样品酶还易受昆虫发育阶段和保存条件的影响,因而在检疫性实蝇快速鉴定应用中不断推陈出新,其他分子生物学技术和方法逐渐取代了常规电泳检测方法。

2.2 限制性片段长度多态性技术

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)是较早发展起来的分子标记技术之一,它是根据不同种生物的线粒体

DNA(mtDNA)限制酶切位点数目和位置差异来分析比较被限制性内切酶切割的 DNA 片段序列^[14],该技术广泛应用于检疫性实蝇的快速鉴定研究中,其方法具有快速、经济、结果可靠的优势。Masahiko 等以 mtDNA 1.6 kb 片段作为分子标记利用 PCR-RFLP 技术分析成功鉴定了橘小实蝇等 18 种果实蝇属实蝇^[15]。吴佳教等应用 PCR-RFLP 技术设计两种引物对橘小实蝇、锈实蝇、瓜实蝇、南瓜实蝇、具条实蝇和木姜子实蝇 6 种果实蝇 mtDNA 进行扩增,其 PCR 扩增片断大小分别约为 350 bp 和 450 bp,以限制性内切酶 MSE I 和 DRA I 对扩增产物酶切后得到的酶切位点可区分供试实蝇^[16]。吴佳教等运用 PCR-RFLP 技术对口岸截获频率较高的地中海实蝇、橘小实蝇、番石榴实蝇和辣椒实蝇等 9 种检疫性实蝇 mtDNA 的 PCR 扩增片段进行酶切,得到的酶切位点可清晰地区分供试实蝇^[17]。Barr 等通过 PCR-RFLP 技术分析线粒体 12S rRNA、16S rRNA 和 NADH 脱氢酶亚基 6 基因区分小条实蝇属 25 种实蝇也达到了良好效果^[18]。林丽莉等利用 4 组引物对供试实蝇的 CO II 和 ITS1 基因进行 PCR 扩增,借助 Mnl I、Mse I、Ase I、Dra I 和 Ssp I 5 种限制性内切酶对扩增产物酶切后可把蜜柑大实蝇与橘大实蝇分开,其方法不受目标实蝇食物源、地理来源和标本保存条件的影响^[19]。PCR-RFLP 实蝇快速鉴定方法具有较好的应用效果,但也存在着一定局限性,如它是否能对检疫性实蝇复合种进行鉴定分析还有待论证,不同的染色方法(放射性物质标记或 EB 染色)所得 DNA 片段多态性结果有差异,所得 DNA 片段内序列变异不能分析等,这些不确定性表明 PCR-RFLP 方法还有待进一步深入研究才能得到更广泛的应用。

2.3 随机扩增多态性 DNA 技术

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是近年来涌现的新技术之一,其标记突破了表达型标记的局限性,DNA 序列差异决定了 RAPD 能够快速、容易地提供遗传变异的信息,具有信息含量高、不同层次和类群之间广泛可比等优越性^[20]。Baruffi 等利用 RAPD 和多位点酶电泳对非洲 6 个野生和 5 个室内地中海实蝇种群的基因多样性进行了分析,使用 4 对引物扩增出 174 条多态性片段,在 26 个酶切位点获得 74 个等位基因,为不同地理种群地中海实蝇的分子生物学

鉴定奠定了基础^[21]。张红梅等以 31 种随机引物对 4 种实蝇的基因组进行 RAPD 扩增,筛选出的 S126 引物可将南瓜实蝇和具条实蝇,具条实蝇和三点棍腹实蝇两两分开,但不能区分南瓜实蝇和三点棍腹实蝇^[22]。张亮等通过 RAPD 技术构建果实蝇属的南瓜实蝇、黑漆实蝇、具条实蝇、瓜实蝇、橘小实蝇和番石榴实蝇 6 种实蝇的指纹图谱,在 131 个引物中筛选出 5 个重复性好、多态性高的引物并扩增出 302 条谱带,其中 111 条谱带具有遗传多态性,扩增谱带的聚类分析和传统分类结果基本一致,由此表明 5 种引物均可用于 6 种实蝇的分类鉴定^[23]。在鉴定方法的建立过程中,Atienzar 和 Jha 分析后指出 RAPD 存在的重复性和序列同源性问题使其广泛应用受到了限制,需要不断优化实验条件增强其结果可重复性和扩增稳定性^[24],相信随着实验技术的不断成熟与完善,RAPD 用于检疫性实蝇快速鉴定的应用研究也将继续深入和发展。

2.4 核酸序列分析技术

核酸序列分析在昆虫基因研究和系统发育中是最为常用的手段之一,它通过测定昆虫 DNA 和 RNA 序列比较不同种属昆虫类群个体的同源序列,来推断不同昆虫类群之间的演化关系,建立符合自然发育的分子系统谱系^[25]。在检疫性实蝇快速鉴定研究过程中,通过比对不同地理类群和种属检疫性实蝇的特定分子标记基因可以准确、便捷地得出鉴定结果,在口岸实验室实际应用中具有现实意义。目前研究较多的分子标记基因主要有核糖体 DNA (rDNA)、mtDNA 和微卫星 DNA 等,检疫性实蝇的分子鉴定可选择其中之一或多种标记基因作为研究对象^[26-27]。其中 mtDNA 序列是目前检疫性实蝇快速鉴定应用最为广泛的遗传物质之一,它是一个大小为 1514~1613 kb 的封闭环状双链,由于其变异速率高于保守的核基因,因此,mtDNA 的各个基因被广泛用于昆虫系统发育关系分析、种群进化、种群遗传变异和分化、近缘种鉴别和种下分类单元鉴定等方面^[28-31]。Baliraine 等以地中海实蝇 23 个微卫星 DNA 作为分子标记比较分析了纳塔尔实蝇、*C. fusciventris* 和非洲芒果实蝇,明确了其分子标记在鉴定、分析 4 种实蝇种群地理来源和风险评估研究中的可行性^[32]。唐侃采用微卫星位点扩增情况 0/1 的组合进行实蝇鉴定,只需 4 次或 6 对微卫星引物 1 次 PCR 扩增即可将地中海实蝇、橘小实蝇、南瓜

实蝇、瓜实蝇、锈实蝇和油橄榄实蝇等 4 亚属 9 种实蝇区分开来^[33]。叶军等对从秘鲁进口的葡萄中截获实蝇幼虫进行 ITS 区和线粒体 CO I、CO II、CO III、ND5 基因序列的扩增和测序,与 GenBank 中对应的序列进行比对后结果表明截获样品 ITS 区序列和地中海实蝇相似性为 95.16% (其中 ITS1 为 99.52%,ITS2 为 86.2%),线粒体 CO I、CO II、CO III、ND5 基因序列和地中海实蝇相似性分别为 100%、99.9%、99.5%、99.8%,基于 CO I 序列构建的系统发育树中幼虫样品和地中海实蝇最为接近,因此,序列分析和系统发育关系分析的结果均表明截获的实蝇类幼虫为地中海实蝇^[34]。余道坚采用 SYBR Green 染料实时荧光 PCR 技术建立了地中海实蝇等 10 种检疫性实蝇的快速鉴定方法,据此建立的检疫性实蝇基因片段库为实蝇分子生物学鉴定和分子系统发育等研究提供了重要参考^[35]。利用这一技术建立的辣椒实蝇快速检测方法其检测限达 1 pg,最适模板 DNA 浓度为 1~20 ng,幼虫、成虫和蛹 3 种不同虫态的辣椒实蝇溶解曲线分析和琼脂糖凝胶电泳结果均一致^[36]。以此鉴定技术制定并公布的地中海实蝇卵、幼虫、蛹和成虫出入境检验检疫行业标准标志着地中海实蝇常规和 SYBR Green 实时荧光 PCR 鉴定方法已成熟并将逐步推广使用,并印证了检疫性实蝇快速鉴定方法的可行性^[37]。

Smith 和 Bush 利用 mtDNA CO II 基因和 tRNA 亮氨酸至 CO II 之间基因对 28 个绕实蝇属种群及 6 个近缘种群进行序列分析,结果表明目前定义的绕实蝇种群由 5 个地理种群组成^[38]。Jamnon-gluk 等对南瓜实蝇复合种的 mtDNA CO I 基因经克隆测序,以橘小实蝇种群对应基因作为对照分析明确一段 639 bp 突变区域序列差异百分率为 19%~29%,并将此复合种群划分为 4 个分化单元^[39]。Jeomhee 等对南瓜实蝇亚洲种群的 mtDNA CO I 基因、核延长因子 1 α 、微管蛋白 β 1 和 β 3 序列进行比对分析发现,高度遗传分化的韩国和日本两地南瓜实蝇都不是外来入侵种^[40]。施伟和叶辉对云南橘小实蝇 5 个地理种群的 mtDNA CO I 基因进行扩增测序,在 5 个种群中具有 27 个多态位点和 23 种单倍型,分析认为地理种群间存在一定程度的遗传分化应与地理隔离有关^[41]。朱振华等经过对橘小实蝇和瓜实蝇等 6 种实蝇线粒体细胞色素 b(mtDNA

Cyt b) 基因中 420 bp 片段进行序列分析, 得到 38 种单倍型和 116 个变异位点, 不同种实蝇间 mtDNA Cyt b 序列存在差异, 其碱基替换数为 13~37, 遗传距离在 0.059 24~0.191 33 之间, 而同种实蝇不同个体之间差异较小, 适于将 mtDNA Cyt b 基因作为这 6 种实蝇鉴定的分子标记基因^[42]。崔俊霞等采用 PCR 技术从截获的可疑橘小实蝇幼虫和蛹样本中均扩增得到 224 bp 的特异性条带, 经测序比较发现扩增产物序列与橘小实蝇目的基因序列完全相同, 由此证明可疑样本为橘小实蝇的幼虫和蛹, 其余幼虫和蛹羽化后经形态鉴定也验证了此方法的准确性^[43]。

在检疫性实蝇快速鉴定方法研究过程中, 如何从实蝇众多基因中选择高效且遗传信息丰富的基因作为快速鉴定分子标记基因一直得到重视和研究, 但还没有文献进行不同分子标记基因尤其是研究较为成熟的 mtDNA 分子标记基因之间效率、稳定性和准确性的比较, 这就为选择最佳分子标记基因的深入研究增加了难度。Muraji 和 Nakahara 以 1.6 kb 线粒体片段基因分析了 19 种果实蝇属实蝇的系统进化关系, 除对果实蝇属复合种不能较好区分外, 其他均可以确定分类地位^[44]。Smith 等通过线粒体 16S rRNA 和 CO II + tRNA_{Lys} + tRNA_{Asp} 基因构建进化树分析了 24 种果实蝇属实蝇的系统进化关系, 表明线粒体基因作为重要分子标记基因对果实蝇属的分类和进化研究具有积极作用^[45]。通过筛选检疫性实蝇基因数据库中的 mtDNA CO I 和 Cyt b 基因充分发挥了快速鉴定的优势, 但标记基因之间的系统比较与分析还有待进一步研究。此外, 由于实蝇复合种的复杂性, 使用不同分子标记基因也可能产生不同的结果。Virgilio 等分别利用 mtDNA CO I、NADH 脱氢酶亚基 6 和 ITS1 分子标记基因系统分析 *C. fasciventris* 复合种的来源, 以最大似然法构建的系统发育树说明复合种来自黑羽小条实蝇和纳塔尔小条实蝇的不同地理种群, 得到互不相同的结论^[46]。因此, 选择不同的分子标记基因对不同种属的检疫性实蝇快速鉴定效率和结果可能存在一定影响, 恰当的分子标记基因以及进行必要的验证在快速鉴定中尤其显得重要。

3 展望

分子生物学技术与手段的发展为实现检疫性实

蝇快速鉴定带来了良好契机, 但在研究过程中也发现快速鉴定方法存在一定程度的不足或缺陷, 阻碍了快速鉴定的推广应用。有学者指出目前口岸实验室仍然要以常规形态鉴定为主, 即形态学鉴定在检疫性实蝇鉴定中起主导作用, 分子生物学鉴定技术应作为极好的补充^[47-48]。在实践中每一种实验技术和方法都有其优势和缺陷, 只有仔细研究并在实际运用中注意取长补短才能发挥最大的作用。伴随着分子生物学及相关学科的飞速发展与突破, 例如基因芯片等新技术层出不穷并取得应用, 建立和推广检疫性实蝇的一系列快速鉴定方法必将成为全球性趋势。基因芯片是近年发展起来的新型高通量检测技术, 它是将核酸片段作为识别分子, 按预先设置的排列固定于特定的固相支持载体的表面形成微点阵, 利用反向固相杂交技术, 将标记的样品分子与微点阵上的核酸探针杂交来实现杂交反应, 通过特殊的检测系统来高通量分析检测样品中多个基因的表达状况或特定基因分子^[49]。基因芯片检测技术成熟后很快就被应用到检疫性实蝇快速鉴定的研究中, 李文芬等采用 mtDNA CO I 分子标记基因筛选获得通用引物 P3 和 P5 并设计地中海实蝇及其近缘种芯片检测探针 8 条, 其中特异性检测探针可十分准确地将不同虫态和地理种群的地中海实蝇、非洲芒果实蝇和纳塔尔实蝇区分和鉴定^[50]。类似设计的 4 条橘小实蝇特异性探针可准确鉴定橘小实蝇、杨桃实蝇、木瓜实蝇、菲律宾实蝇和芒果实蝇, 依据这一技术建立的地中海实蝇及其近缘种和橘小实蝇复合种芯片为检疫性实蝇快速鉴定提供了新的有效技术平台^[51]。

相信随着植物检疫与分子生物学之间的学科交叉、融合和发展, 以电泳、限制性片段长度多态性、随机扩增多态性 DNA、核酸序列分析和基因芯片为鉴定核心技术的检疫性实蝇快速鉴定方法必然得到不断完善和进步。可以预见建立以高通量检测为平台的快速鉴定技术已成为今后研究的主要方向, 检疫性实蝇由传统形态学鉴定逐渐过渡到微量、快速和准确的分子生物学鉴定已成为可能。

参考文献

- [1] 汪兴鉴. 重要果蔬类有害实蝇概论(双翅目: 实蝇科)[J]. 植物检疫, 1995(1): 20-30.
- [2] White I M, Elson-Harris M M. Fruit flies of economic signifi-

- cance: their identification and bionomics[M]. CAB International, Australia Wallingford, 1992.
- [3] 汪兴鉴. 五个重要果蝇类有害实蝇属的鉴定[J]. 植物检疫, 1995, 9(2):84-90.
 - [4] 姚文国, 陈洪俊. 地中海实蝇与植物检疫[J]. 昆虫学报, 2000, 43(5):191-194.
 - [5] 齐宝瑛, 郑哲民. 昆虫学研究中同工酶电泳及 PCR-RAPD 技术的应用[J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学汉文版), 2002, 31(3):61-70.
 - [6] 白海艳, 史丽, 铁军. 同工酶电泳技术在昆虫分类学研究中的应用[J]. 晋东南师范专科学校学报, 2004, (5):36-39.
 - [7] 彭统序. 同工酶在昆虫分类和进化研究中的意义[J]. 昆虫知识, 1986(4):37-41.
 - [8] Berlocher S H. An electrophoretic key for distinguishing species of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) as larvae, pupae or adults[J]. Ann Entomol Soc Amer, 1980, 73:131-137.
 - [9] Drew R A I, Hardy D E. *Dacus (Bactrocera) opiliae* a new sibling species of the *Dorsalis* complex of fruit flies from Northern Australia (Diptera: Tephritidae)[J]. J Aust Entomol Soc, 1981, 20:131-137.
 - [10] 梁广勤, 杨国海, 梁帆, 等. 利用染色体和同工酶技术鉴定寡鬃实蝇幼虫[J]. 植物检疫, 1994, 8(1):4-9.
 - [11] 杨国海, 梁广勤, 林双, 等. 4 种寡毛实蝇属(*Dacus*)幼虫酯酶同工酶的研究[J]. 江西农业大学学报, 1992, 14(1):82-85.
 - [12] Saelee A, Tigvattanant S, Baimai V. Allozyme electrophoretic evidence for a complex of species within the *Bactrocera tau* group (Diptera: Tephritidae) in Thailand[J]. Songklanakarin J Sci Technol, 2006, 28(2):249-259.
 - [13] 詹开瑞, 赵士熙, 陈宇航, 等. PCR 结合 DGGE 技术快速鉴定橘小实蝇及其近缘种[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2007, 36(3):274-278.
 - [14] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. AM J Hum Genet, 1980, 32(3):314-331.
 - [15] Masahkio M, Shigehito N. Discrimination among pest species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA[J]. Appl Entomol Zool, 2002, 37(3):437-446.
 - [16] 吴佳教, 梁帆, 胡学难. 我国南方常见的 6 种寡毛实蝇 PCR-RFLP 快速鉴定研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(5):770-773.
 - [17] 吴佳教, 胡学难, 赵菊鹏, 等. 9 种检疫性实蝇 PCR-RFLP 快速鉴定研究[J]. 植物检疫, 2005, 19(1):2-6.
 - [18] Barr N B, Copeland R S, De Meyer M, et al. Molecular diagnostics of economically important *Ceratitidis* fruit fly species (Diptera: Tephritidae) in Africa using PCR and RFLP analyses[J]. Bull Entomol Res, 2006, 96(5):505-521.
 - [19] 林丽莉, 吴佳教, 曾玲, 等. 两种大实蝇的 PCR-RFLP 快速鉴定方法[J]. 昆虫知识, 2007, 44(4):588-592.
 - [20] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22):6531-6535.
 - [21] Baruffi L, Damiani G, Guglielmino C R, et al. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data[J]. Heredity, 1995, 74(4):425-437.
 - [22] 张红梅, 潘亚勤, 魏迪功, 等. 陕西省常见四种实蝇的 RAPD 研究初报[J]. 昆虫分类学报, 2004, 26(1):59-63.
 - [23] 张亮, 张智英. 云南六种实蝇的 RAPD 快速鉴定[J]. 应用生态学报, 2007, 18(5):1165-1168.
 - [24] Atienzar F A, Jha A N. The The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review[J]. Mutat Res, 2006, 613(2-3):76-102.
 - [25] Hillis D A, Larson A, Davis S K, et al. Molecular Systematic. Nucleic acids III: sequencing[M]. Sinauer Associates, Sunderland, 1990:318-370.
 - [26] 余道坚, 邓中平, 陈志彝, 等. 昆虫分子标记基因和序列及应用[J]. 植物检疫, 2003, 17(3):156-159.
 - [27] 刘殿锋, 蒋国芳. 核基因序列在昆虫分子系统学上的应用[J]. 动物分类学报, 2005, 30(3):484-492.
 - [28] 成新跃, 周红章, 张广学. 分子生物学技术在昆虫系统学研究中的应用[J]. 动物分类学报, 2000, 25(2):121-133.
 - [29] Clary D O, Wolstenholme D R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code[J]. J Mol Evol, 1985, 22(3):252-271.
 - [30] Wells J D, Sperling F A H. Molecular Phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae)[J]. J Med Entomol, 1999, 36(3):222-226.
 - [31] 徐庆刚, 花保桢. 线粒体 DNA 在昆虫系统学研究中的应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(增刊):79-83.
 - [32] Baliraine F N, Bonizzoni M, Osir E O, et al. Comparative analysis of microsatellite loci in four fruit fly species of the genus *Ceratitidis* (Diptera: Tephritidae)[J]. Bull Entomol Res, 2003, 93(1):1-10.
 - [33] 唐侃. 利用微卫星标记鉴定寡毛实蝇属幼虫及利用线粒体序列分析中国桔小实蝇种群结构的研究[D]. 南宁:广西师范大学生命科学学院, 2006.
 - [34] 叶军, 周国梁, 易建平, 等. 地中海实蝇幼虫分子鉴定[J]. 昆虫知识, 2007, 44(4):562-566.
 - [35] 余道坚. 检疫性实蝇分子生物学快速鉴定技术的研究[D]. 上海:中国科学院研究生院, 2005.
 - [36] 余道坚, 章桂明, 陈志彝, 等. SYBR Green 实时荧光 PCR 快速鉴定辣椒实蝇[J]. 植物检疫, 2006, 1:14-18.
 - [37] 杨伟东, 余道坚, 胡学难, 等. 地中海实蝇检疫鉴定方法[R]. 北京:中国标准出版社, 2007.