

# 入侵性实蝇鉴定分类方法的研究进展

张鹤<sup>1</sup> 马骏<sup>2</sup> 贺华良<sup>1</sup> 林进添<sup>1</sup>

1.广东省生物入侵预警与控制工程技术研究中心,广州 510225;

2.广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心,广州 510623

**摘要** 系统分类学不但是生物多样性和物种进化的研究主题,对农业害虫管理或其他生物应用领域也具有重要意义。目前,入侵性实蝇的系统分类问题严重阻碍了果蔬产品的市场准入、贸易和检验检疫。为提供最新的分类鉴定信息以及多样化、综合性分类方法,从形态学、细胞学、分子生物学、生化分类鉴定等方面介绍入侵性实蝇近缘种、复合种和隐蔽种鉴定分类方法的研究进展,同时介绍各种鉴定分类方法的改进及新型的分子生物辅助手段,确保入侵性实蝇分类鉴定工作达到快速、高效、准确的效果。

**关键词** 实蝇科;分类鉴定;近缘种;复合种;隐蔽种

**中图分类号** S 186 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0136-09

实蝇科 Tephritidae 昆虫是双翅目最大的类群,超过 450 属 4 300 余种<sup>[1]</sup>,主要发生于热带或亚热带地区,其中危害水果和蔬菜等作物的主要有 4 个属的实蝇害虫,分别是按实蝇属 *Anastrepha*、果实蝇属 *Bactrocera*、小条实蝇属 *Ceratitis*、绕实蝇属 *Rhagoletis*,这些属中包括了形态十分相似的复合种(complex species)或隐蔽种(cryptic species),如南美按实蝇复合种 *A. fraterculus* complex<sup>[2-4]</sup>、桔小实蝇复合种 *B. dorsalis* complex<sup>[5-6]</sup>、苹果实蝇复合种 *R. pomonella* complex<sup>[7]</sup>、非洲水果实蝇复合种 FAR complex<sup>[8]</sup>等。国际上关于复合种的系统分类学,或者复合种的地理分布依然存在巨大争议<sup>[9-10]</sup>,同样这些入侵性实蝇国际分类命名也未能统一,严重阻碍了果蔬产品的市场准入、国际贸易和检验检疫。

系统分类学不但是生物多样性和物种进化的核心研究主题,对于农业害虫管理或其他生物应用领域也具有重要意义<sup>[11]</sup>。首先,系统分类的问题往往聚焦在物种鉴定上,由于亲缘关系密切的物种可能会因地理分布不同、携带寄生病菌不同、寄主差异和季节性物候改变等出现不同程度的遗传分化,而系统分类信息的更新与补充可为害虫管理提供有效指导<sup>[12-14]</sup>。其次,国际植物生物安全也要求分类鉴定

至种阶元,且系统分类需准确解决,避免国际分类上命名不统一,影响农业害虫检疫、农产品贸易等<sup>[15-16]</sup>。

以计算机技术、互联网技术、分子生物技术和化学分析技术为基础,崭新的分类鉴定技术方法层出不穷,一方面为逐步实现快速、高效、准确的分类目标提供了技术保障;另一方面在解决重要农业害虫的复合种或者隐蔽种分类问题上,也促使了由过去单一的传统形态分类向多元化分类鉴定或者综合性分类鉴定发展<sup>[17]</sup>。笔者总结了入侵性实蝇的几大类的分类鉴定方法,旨在提供最新的分类鉴定信息,特别是形态学鉴定的技术改进、生化分类鉴定的发展以及一些新型分子生物辅助手段,以展示分类方法的前沿技术。此外,还介绍了入侵性实蝇复合种或隐蔽种的形态学鉴定、细胞学鉴定、分子生物学鉴定、生化分类鉴定等方法的研究进展,旨在为解决模糊分类问题提供多元化、综合性分类方法。

## 1 形态学鉴定

### 1.1 传统的形态学鉴定

形态学分类法是最基本的昆虫分类方法,昆虫种类的分化与形态结构变化紧密联系,因此昆虫的外部形态、内部结构及各部分大小比例等形态学特

收稿日期:2015-05-31

基金项目:国家自然科学基金项目(31171852)

张鹤,硕士研究生.研究方向:昆虫生理生化与分子生物学. E-mail: zhhe1205@163.com

通信作者:林进添,博士,教授.研究方向:昆虫生理生化与分子生物学. E-mail: linjiantian@163.com

征是昆虫分类的重要依据。目前,入侵性实蝇分类主要依据的形态学特征有:腹部胸部的颜色和形态、翅的斑纹以及翅脉相、产卵器及其他结构的形态特征<sup>[18-19]</sup>。

实蝇科复合种和近缘种的快速鉴定可根据成虫生殖器进行,如根据桔小实蝇 *B. dorsalis* 雄虫的阳茎特征可将其近缘种区分开来<sup>[20]</sup>。翅脉的脉室几何特征也是重要分类依据,通过比较分析桔小实蝇 *B. dorsalis* 的脉室几何形态特征可以将4种复合种区分开来<sup>[21]</sup>;根据南瓜实蝇 *B. tau* complex 的脉室几何形态特征可分为2个生物型<sup>[22]</sup>。综合各部分形态特征进行比较确保了分类的准确性,根据中胸背板、产卵器和翅的特征可把分布于南美地区的南美按实蝇 *A. fraterculus* complex 划分为7个形态型<sup>[23]</sup>,也有研究通过比较其额鬃和眼后鬃非对称特征的差异以区分地理亚种<sup>[24]</sup>。另外,卵壳外部形态特征(包括长度、宽度、锥状、曲率、纹路、卵孔)被认为是未成熟虫体的重要分类依据<sup>[25-26]</sup>,通过这些可塑性的综合分值对南美瓜实蝇17个种进行聚类分析,发现属间种与种内分值出现显著差异,表明基于卵壳外部形态特征的分值可以作为主要的分类鉴定依据<sup>[26]</sup>。

## 1.2 数码化的形态学鉴定

由于实蝇科害虫的种类繁多而且形态相似度高,所以很难通过查阅检索表对入侵性实蝇进行系统鉴定。计算机技术的发展可大大改进这一局面,一方面通过建立全世界的实蝇科种类形态学数据库,可为科研工作者提供全面的参考资料,并加强国际之间的样本交流,自1999年由美国、英国和以色列3个国家的科学家开发的世界实蝇害虫形态鉴定系统(Pest Fruit Flies of the World, [http://delta-intkey.com/ffa/www/\\_wintro.htm](http://delta-intkey.com/ffa/www/_wintro.htm))一直沿用至今,期间不断得到修改和补充,该系统详细记载了世界范围入侵性实蝇的成虫和幼虫的各部位形态特征、图像信息,还可以根据里面的“分类描述语言系统”(description language for taxonomy, DELTA System)对所要鉴定的实蝇进行检索;另一方面,利用形态特征的图像数码化建立快速自动识别系统,得以实现对昆虫高通量自动识别,目前,国内已有关于实蝇科实蝇属数字图像自动识别系统开发的报道,该系统根据翅及中胸背板图像的局部二进制模式特征,结合 Adaboost 迭代算法进行大量实蝇科昆虫

的物种识别,该系统通过测定包括杨桃实蝇 *B. car-ambolae*、瓜实蝇 *B. cucurbitae*、南瓜实蝇 *B. tau* 等8个近缘种的识别率可达到80%<sup>[27]</sup>。

## 2 细胞学鉴定

细胞分类学是根据细胞结构来区别生物有机体的分类学分支学科。主要在显微和亚显微水平研究有机体细胞的染色体形态结构和行为特性,籍以阐明种内、种间关系以及分类群或分类阶元的演化机制。目前,细胞分类学主要是以染色体数目与形态、带型分析、减数分裂行为和性别决定机制为生物分类的特征,并进而研究核型进化和生物系统进化。

染色体的结构和分裂行为作为双翅目昆虫分类方法的一种,可以实现近缘种区分以及亚种分类<sup>[28]</sup>。实蝇科近缘种(种间)可以根据多线染色体带型、联结形式等特征加以区分。如根据多线染色体带型可以区分小南瓜实蝇 *Dacus ciliatus* 和油橄榄果实蝇 *B. oleae*<sup>[29]</sup>,根据染色体的特征可以区分瓜实蝇 *B. cucurbitae* 和地中海实蝇 *C. capitata*<sup>[30]</sup>。也有报道通过比较唾液多线染色体联结形式研究北美樱桃实蝇 *R. cingulata*、核桃绕实蝇 *R. completa* 和樱桃绕实蝇 *R. cerasi* 的同源性差异<sup>[31]</sup>。而复合种分类鉴定可以根据染色体核型、性染色体带型、多线染色体带型和有丝分裂等特性进行,如根据性染色体的长度大小和异染色质区以区分南美按实蝇2个复合种<sup>[3]</sup>,根据有丝分裂染色体的C带不同特点以区分按实蝇属5个复合种<sup>[32]</sup>。还有研究显示多线性染色体的特征可以作为鉴定桔小实蝇复合种的有效细胞学分类工具<sup>[33]</sup>。

## 3 生化分类鉴定

自20世纪70年代以来,同工酶电泳技术和表皮碳氢化合物分析技术不断渗透到分类学的各个领域。由于同工酶电泳操作步骤繁琐以及稳定性差等原因,逐渐被新兴的分子生物学鉴定所取代,而表皮碳氢化合物分析依然获得普遍的认同和使用,因此,这里主要介绍表皮碳氢化合物在昆虫分类中的应用。

应用气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)对表皮碳氢化合物(cuticular hydrocarbons, CHCs)进行分析作为主要的生化分类鉴定方法,被认为是形态学分类和分子

鉴定分类的有效补充。研究表明应用固相微萃取技术(solid phase micro-extraction, SPME)对昆虫表皮化合物收集与溶剂抽提获得相同的结果<sup>[34-37]</sup>,而且具有操作简单、携带方便和价格低廉等优点。由于过去证据显示表皮碳氢化合物分析适合研究物种的近期进化事件<sup>[38-39]</sup>,所以被认为适用于鉴定分析昆虫复合种或隐蔽种<sup>[40-44]</sup>。

在入侵性实蝇的鉴定分类方面, Vanickova 等<sup>[45]</sup>用化学分类鉴定方法研究了南美按实蝇 *A. fraterculus* complex 的隐蔽种, 比较了阿根廷图库曼一实验室南美按实蝇品系不同龄期和性别体表碳氢化合物的差异, 发现羽化后 5 d 内的虫样体表化学成分雌雄基本一致, 而 5 d 后的虫样出现两性差异。随后 Vanickova 等<sup>[46]</sup>利用相同的方法来鉴定 FAR complex 中的 3 个农业害虫 (*C. fasciventris*, *C. anonae* and *C. rosa*), 通过定性定量分析性成熟雌雄虫表皮碳氢化合物, 有 12 种化合物可以作为潜在的化学分类标记来区分这些复合种。值得注意的是, Fischnaller 等<sup>[47]</sup>通过对比 2 种果蝇 *Drosophila subobscura* 和 *D. obscura* 的实验室饲养品系和野生品系的表皮碳氢化合物差异, 发现实验室饲养品系不适于作为分类鉴定。因此, 昆虫体表化合物分类鉴定具有一定的局限性, 比如虫样的龄期、环境温度、性别等影响因素<sup>[46-48]</sup>。但随着化学分类鉴定技术不断进步, 仍将会在昆虫复合种或隐蔽种的分类鉴定中发挥重要作用。

## 4 分子生物学鉴定

自 20 世纪 80 年代 DNA 分子标记技术诞生以来, DNA 分类标记在系统分类学和检验检疫、物种鉴定中发挥了重要作用。随着 PCR 和 DNA 检测技术的快速发展、分子标记种类不断增多, 使得系统分类鉴定和检测技术也朝着准确、灵敏、自动化的方向发展, 同时也能更好地满足亲缘关系密切的实蝇分类的需要。目前, 实蝇科分类鉴定应用较多的有限制性片段长度多态性 RFLP、微卫星技术 SSR、DNA 序列分析和条形码技术。近年来, 也发展了等位基因特异 PCR、环介导等温扩增法 LAMP 以及基因芯片技术 gene chip 用于入侵性实蝇的分类鉴定。

### 4.1 限制性片段长度多态性技术

限制性片段长度多态性技术(restriction frag-

ment length polymorphism, RFLP) 是不同个体 DNA 存在不同的限制性内切酶位点, 酶切处理会产生长度不等的限制性片段, 从而呈现出多态性的现象。该方法既可以应用于近缘种及种内群体的比较, 也应用于远缘物种的比较, 目前主要用于构建基因组连锁图谱及确定物种间的亲缘关系。鉴于线粒体 DNA 基因组相对核基因组结构简单, 适合用 RFLP 方法对线粒体 DNA 酶切分析, 获得清晰的 DNA 指纹图谱。

由于 RFLP 方法具有快速、经济、相对可靠的优点, 实蝇类已广泛采用 RFLP 方法开展分类鉴定。吴佳教等<sup>[49]</sup>应用 PCR-RFLP 技术对我国口岸截获频率较高的 9 种入侵性实蝇进行鉴定研究, 对线粒体 DNA CO II 进行 PCR 扩增, PCR 产物被限制性内切酶 *Mse* I 和 *Dra* I 区分开来。Barr 等<sup>[50]</sup>应用 PCR-RFLP 技术对非洲大陆分布的地中海实蝇近缘种进行鉴定研究, 通过对线粒体 DNA (12S rRNA、16S rRNA、ND6) 进行 PCR 扩增, 然后对 PCR 产物进行酶切, 可以有效区分供试的 25 个近缘种和 2 个物种群。Chua 等<sup>[51]</sup>应用 PCR-RFLP 方法对线粒体 DNA CO I 扩增, 用 3 种限制性内切酶 (*Mse*I、*Rsa*I、*Alu*I) 进行酶切, 可以把 7 种入侵实蝇幼虫鉴定区分。

### 4.2 DNA 序列分析和条形码技术

DNA 序列分析是通过比较不同类群或个体的有关 DNA 序列, 建立 DNA 序列的演化模型, 构建分子系统发育树来推断类群间的系统演化关系, 从而鉴定物种的阶元地位。通常 12S rRNA、16S rRNA 用于系统发育分析的基因, 如 Smith 等<sup>[52]</sup>应用 16S rRNA、12S rRNA、CO II、tRNA<sub>Lys</sub> 和 tRNA<sub>Asp</sub> 基因研究实蝇科 34 个类群的系统发育关系, 明确了寡毛实蝇族(Dacini)16 个种的分类地位。而通常应用线粒体 DNA CO I、CO II 对实蝇科近缘种和复合种、种下亚种与生物型进行识别和鉴定, Ludeña 等<sup>[53]</sup>应用线粒体 DNA CO I、CO II 基因分析了按实蝇 *A. fraterculus* Wiedemann 印第安山脉-厄瓜多尔和新热带区的种群遗传关系以探讨其阶元分类地位。也有研究综合应用线粒体 DNA CO I 和 12S rRNA 对不同实蝇科的近缘种和复合种进行鉴定分析<sup>[54]</sup>。

DNA 条形码技术(DNA barcoding)是通过对动物线粒体 DNA 的细胞色素氧化酶亚基编码基因

CO I 序列进行对比分析,从而对其进行快速识别鉴定。而组建所有生物的 CO I 基因序列数据库是该技术的关键。2003 年加拿大 DNA 条形码中心建立的全球生物 DNA 条形码数据系统(barcode of life data systems, BOLD; <http://www.barcodinglife.com/>),为分类鉴定提供了简易的手段,非形态分类专业人员也可以对某类群物种进行分类鉴定。该系统记载了部分样本的收集信息、形态图像、地理分布等信息,可供免费使用。目前,应用 BOLD 对实蝇科的 DNA 条形码进行搜索,共搜索到 5 个亚科,60 个属,附有样本的条形码共 4 178 个,覆盖了目前所有文献有记载的入侵性实蝇,其中包括复合种 DNA 条形码信息。

虽然 DNA 条形码技术作为高效的鉴定手段被广泛应用,但在实蝇科的复合种研究上存在争议,因为复合种之间可以发生交配繁殖导致基因渗透<sup>[55-56]</sup>,CO I 基因出现多态位点难以区分复合种<sup>[57]</sup>。有报道应用 CO I 基因序列不能把地中海实蝇 *C. capitata* 与其近缘种 *C. caetrata* 鉴定区分开来,需要结合限制性内切酶技术 RFLP 才能区分<sup>[58]</sup>。由于上述的原因,实蝇科的复合种和近缘种鉴定区分需要分 2 个程序进行,首先用 DNA 条形码 CO I 序列进行粗略鉴定,再结合其他方法进行精确鉴定。Khamis 等<sup>[59]</sup>结合形态学方法(翅的几何特征和后腿胫节长度)与 CO I 序列分析方法把入侵果实蝇 *B. invadens* 与番石榴实蝇 *B. correcta*、瓜实蝇 *B. cucurbitae*、桔小实蝇 *B. dorsalis*、斯里兰卡实蝇 *B. kandiensis*、油橄榄果实蝇 *B. oleae*、桃实蝇 *B. zonata* 鉴定区分开来。

#### 4.3 微卫星技术

微卫星 DNA 是均匀分布于真核生物基因组中的短串重复序列,一般由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成,由于重复单位的重复次数在个体间高度变异且数量丰富,所以应用广泛。微卫星锚定 PCR (simple sequence repeat-anchored PCR, SSR-PCR) 是在微卫星重复序列两端设计特异引物,通过 PCR 反应扩增出微卫星片段,来分析微卫星片段的多样性。此外,由微卫星发展起来的标记技术还包括简单重复序列间扩增 (inter-simple sequence repeat, ISSR)、锚定简单重复序列扩增 (anchored simple sequence repeats, ASSR) 等。

微卫星 PCR 的应用集中在研究入侵性实蝇的

种群遗传结构<sup>[60-66]</sup>,而在近缘种、复合种或隐蔽种的分类鉴定方面的研究就相对较少。最近在探讨桔小实蝇 *B. dorsalis* 和木瓜实蝇 *B. papayae* 的系统分类问题上,有学者综合应用形态鉴定(雄虫生殖器和翅形态特征)和微卫星分子标记分析了泰国和马来西亚分布的 2 种实蝇的形态特征和种群遗传数据,发现没有明显的证据证明属于 2 个种,然而过去却被定义为 2 个不同复合种的实蝇<sup>[67]</sup>。随后,一个国际团队基于多方面证据(形态学、分子遗传学、分子系统发生学、细胞遗传学、性适合、化学生态学证据)研究发现,包括桔小实蝇、入侵果实蝇 *B. invadens*、木瓜实蝇等在内的几个果实蝇属重要农林害虫实为一个物种<sup>[68]</sup>,虽然这几个实蝇的分类研究依然存在争议<sup>[21]</sup>,但是为探讨实蝇复合种或隐蔽种带来又一种分子生物学的借鉴。

#### 4.4 等位基因特异 PCR

等位基因特异 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 是根据 SNP (single nucleotide polymorphisms) 位点设计 3' 末端与 SNP 位点碱基互补或错配的特异 PCR 引物,通过凝胶电泳等方法检测 PCR 扩增产物的有或无,从而检测基因型中 SNP 的一种技术。SNP 等位基因特异 PCR 的分子标记具有快速、简便、低成本、可靠、高通量的特点。由于应用 PCR-RFLP 方法却无法区分 *B. papayae* 和 *B. carambolae*,而 Chua 等<sup>[69]</sup>应用 AS-PCR 对 *B. papayae* 与 *B. carambolae*、*B. umbrosa*、*B. cucurbitae*、*B. latifrons*、*B. tau* 就可以进行快速鉴定。因此,即使 PCR-RFLP 方法不能区分鉴定某些实蝇,也可利用等位基因特异 PCR 技术实现鉴定。

#### 4.5 环介导等温扩增法

环介导等温扩增法(loop mediated isothermal amplification, LAMP)是一门新兴的恒温基因扩增技术,具有简单、快速、灵敏度高、低价的特点,其原理是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,利用链置换型 DNA 聚合酶在恒温(60~65 °C)条件下进行扩增反应,可在 30~60 min 完成。与常规 PCR 相比,该方法灵敏度高,比普通 PCR 高 2~5 个数量级;扩增时间短,不需要特殊仪器扩增;操作简单,只需将反应液混合即可,反应结束可用肉眼观察结果。目前已经有报道应用 LAMP 技术实现了对地中海实蝇 *C. capitata* 的鉴定,表明该技术对地

中海实蝇的鉴定是有效、可靠的,值得进一步推广<sup>[70]</sup>。

#### 4.6 基因芯片技术

基因芯片(gene chip)是同时将大量已知序列探针分子固定到固相支持物上,经过标记的若干 DNA 样品序列与芯片特定位点进行杂交配对,检测杂交信号,可同时对生物细胞或组织中大量的基因信息进行解读和分析。其突出特点在于高度并行性、多样性、快速、高效、微型化和自动化<sup>[71]</sup>。基因芯片技术很快引起研究实蝇科分类鉴定科研人员的注意,李文芬等<sup>[72]</sup>选择线粒体 DNA CO II 为分子标记基因,以实蝇科昆虫序列为目标,建立了地中海实蝇 *C. capitata*、芒果小条实蝇 *C. cosyra* 和纳塔尔小条实蝇 *C. rosa* 等生物芯片检测方法。然而,国内外报道应用基因芯片开展实蝇科鉴定的研究还依然稀缺。

#### 4.7 高分辨率熔解曲线分析

高分辨率熔解曲线分析技术(high-resolution melting, HRM)是在实时荧光定量 PCR 基础上发展起来的利用基因扫描进行基因分型的技术。HRM 依据双链核苷酸的热稳定性受序列长度和碱基组成的影响,在一定的温度范围内将 PCR 扩增产物进行逐步变性,期间实时检测熔解过程的荧光信号变化,生成特征曲线。荧光衍生物形成的曲线经归一化和温度平移生成差异峰形图,峰值是 HRM 仪器通过感应解链过程引起的温度的变化(dF/dT)而出现,可以分辨到单个碱基差异引起的熔解变化<sup>[73-74]</sup>。SNP 位点的存在、杂合子与否等都会影响熔解曲线的峰形,因此,HRM 分析能够有效检测核酸间的微小差异而进行基因分型,具有很高的特异性、稳定性和可重复性。HRM 操作简单,不需要对 PCR 产物电泳分型或测序,而且一般的荧光定量 PCR 仪器的检测通量达到 96 个或 384 个样本(如 Roch Lightcycle 系列)。因此,HRM 具有高效率、高分辨率、高通量的优点,也得到了越来越广泛的应用。

目前,实蝇昆虫的 HRM 鉴定方法尚未见报道,但与其亲缘关系密切的昆虫已经采用 HRM 和等位基因 PCR 技术,实现了有效的鉴定区分,如冈比亚按蚊复合种 *Anopheles gambiae* complex、致倦库蚊复合种 *Culex pipiens* complex、丽蝇科昆虫 Caliphoridae<sup>[75]</sup>。可以预知,HRM 技术会进一步丰富

入侵实蝇分子生物学方面的鉴定方法。

## 5 结 语

目前,对入侵性实蝇的分类鉴定仍是一个艰巨的任务,紧密联系着害虫的管理和防控。随着全球化的水果贸易和运输,越来越要求实蝇鉴定分类技术达到快速、稳定、准确的效果,错误的鉴定将给害虫检疫和农业生产带来不可估量的后果,例如,1995 年在埃及没有及时利用有效的植物检疫技术,错把 *B. zonata* 鉴定为 *B. pallidus*,给当地农业生产带来了巨大损失<sup>[76]</sup>。当前全球范围实蝇鉴定主要依赖的是 DNA 条形码技术,该鉴定技术在一定范围内具有快速准确的特点,但实蝇类复合种的存在显著降低了条形码检测技术的准确性<sup>[77]</sup>,在条形码技术的基础上进一步挖掘核酸序列的特征也可实现准确分类鉴定,如 Frey 等分析了一些不能区分实蝇到种水平的 CO I 序列特征,发现根据其中的 SNP 位点排列特征可以区分“操纵分类单元(operational taxonomic units, OTUs)”,可进一步发展实蝇类的鉴定方法<sup>[78]</sup>;同样依赖 CO I 序列存在 SNP 位点的特征,进行熔解曲线分析,实现基因分型、鉴定物种的方法也引起了越来越多的关注,已有报道该方法运用在其他昆虫的鉴定中,也不失为鉴定实蝇类的一个新方法<sup>[79]</sup>。所以在已有的鉴定分类方法的基础上,进一步分析物种保守存在的细微差别,将会不断丰富我们对实蝇类的鉴定分类方法。

基于目前单一形态学特征鉴定物种难以满足科学发展的巨大需求,特别在复合种或隐蔽种的分类鉴定方面,所以有学者提出需要结合细胞学鉴定、分子生物学鉴定、生化鉴定等多种方法解决系统分类学的争议问题。事实上,综合应用多种分类鉴定方法的结果更为准确,并且容易获得国际认可,如上述中基于形态学、分子遗传学、分子系统发生学、细胞遗传学、性适合、化学生态学证据对桔小实蝇复合种进行准确分类鉴定<sup>[68]</sup>,解决了以前在这些物种鉴定分类中存在的争议。

虽然入侵性实蝇的鉴定分类方法呈现出百花齐放的状态,但我们有必要针对每一种实蝇建立一套标准化的检测流程,在确保鉴定准确的情况下减少程序上的冗余。随着计算机技术、显微技术、分子生物学技术和化学分析技术的发展,将会不断地推动着昆虫的鉴定和识别技术前进,从繁琐复杂到简单

快捷,从封闭到开放交流,从粗略到准确无误,从表面观察到深入理解,如形态学鉴定中,网络和计算机技术方便了昆虫分类学家之间的交流;昆虫图像数码化可以显著提高分类鉴定工作效率;DNA条形码不仅可以揭示丰富的生物多样性,又为探讨物种的进化规律和遗传变异提供了大量重要参考数据。相信未来这些技术的发展将推动实蝇类昆虫鉴定朝着标准化、规范化、自动化的方向发展。

### 参 考 文 献

- [1] ALUJ M. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams[J]. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 1999, 28(4): 565-594.
- [2] HERNANDEZ-ORTIZ V, GOMEZ-ANAYA J A, SANCHEZ A, et al. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype[J]. Bull Entomol Res, 2004, 94(6): 487-499.
- [3] SELIVON D, PERONDINI A, MORGANTE J S. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) [J]. Annals of the entomological society of America, 2005(3): 367-381.
- [4] CáCERES C, SEGURA D F, VERA M T, et al. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology[J]. Biological journal of the linnean society, 2009(1): 152-165.
- [5] HANCOCK R A I D. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia[J]. Bulletin of entomological research supplement series, 1994(2): 1-68.
- [6] CLARKE A R, ARMSTRONG K F, Carmichael A E, et al. Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies[J]. Annu Rev Entomol, 2005(50): 293-319.
- [7] PAYNE J A, BERLOCHER S H. Phenological and electrophoretic evidence for a new blueberry-infesting species in the *Rhagoletis pomonella* sibling species complex[J]. Entomologia experimentalist et applicata, 1995(2): 183-187.
- [8] MEYER D. Phylogenetic relationships within the fruit fly genus *Ceratitis* MacLeay (Diptera: Tephritidae), derived from morphological and host plant evidence[J]. Insect systematics and evolution, 2005(4): 459-479.
- [9] DREW R A I, RAGHU S, HALCOOP P. Bridging the morphological and biological species concepts: studies on the *Bactrocera dorsalis* (Hendel) complex (Diptera: Tephritidae; Dacinae) in South-east Asia[J]. Biological journal of the linnean society, 2008(2): 217-226.
- [10] TAN K H, TOKUSHIMA I, ONO H, et al. Comparison of phenylpropanoid volatiles in male rectal pheromone gland after methyl eugenol consumption, and molecular phylogenetic relationship of four global pest fruit fly species: *Bactrocera invadens*, *B. dorsalis*, *B. correcta* and *B. zonata* [J]. Chemoecology, 2011(1): 25-33.
- [11] CRACRAFT J. The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity[J]. Annals of the Missouri botanical garden, 2002(2): 127-144.
- [12] CLARKE A R A A. Seasonal abundance and host use patterns of seven *Bactrocera Macquart* species (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Peninsular Malaysia[J]. The raffles bulletin of zoology, 2001(2): 207-220.
- [13] GARROS C, VAN BORTEL W, TRUNG H D, et al. Review of the minimus complex of *Anopheles*, main malaria vector in Southeast Asia: from taxonomic issues to vector control strategies[J]. Trop Med Int Health, 2006, 11(1): 102-114.
- [14] BARIK T K, SAHU B, SWAIN V. A review on *Anopheles culicifacies*: from bionomics to control with special reference to Indian subcontinent[J]. Acta Trop, 2009, 109(2): 87-97.
- [15] ARMSTRONG K F, CAMERON C M, FRAMPTON E R. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application[J]. Bulletin of entomological research, 1997(2): 111-118.
- [16] BOYKIN L M, ARMSTRONG K F, KUBATKO L, et al. Species delimitation and global biosecurity[J]. Evol Bioinform Online, 2012(8): 1-37.
- [17] DAYRAT B T. Towards integrative taxonomy[J]. Biological journal of the linnean society, 2005(3): 407-415.
- [18] ISMAY J W. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics[J]. Bulletin of entomological research, 1992(3): 433.
- [19] 汪兴鉴. 果实蝇属重要害虫的厘订名录和分亚属及种检索表(双翅目:实蝇科:寡鬃实蝇亚科)[J]. 植物检疫, 1996(2): 95-103.
- [20] IWAIZUMI R. Species and host record of the *Bactrocera dorsalis* Complex (Diptera: Tephritidae) detected by the plant quarantine of Japan[J]. Applied entomology and zoology, 2004(2): 327-333.
- [21] SCHUTZE M K, CLARKE A J A A. Wing shape as a potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) [J]. Bulletin of entomological research, 2012(1): 103-111.
- [22] KITTHAWEE S, RUNGSRI N. Differentiation in wing shape in the *Bactrocera tau* (Walker) complex on a single fruit species of Thailand[J]. Sciencasia, 2011(4): 308-313.
- [23] HERNANDEZ-ORTIZ V, BARTOLUCCI A F, MORALES-VALLES P, et al. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach

- for the recognition of South American morphotypes[J]. *Annals of the entomological society of America*, 2012(2): 305-318.
- [24] SOUZA J M G A, GOUVEIA M, PERONDINI A P, et al. Asymmetry of frontal bristles and postocular setae in species and hybrids of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae)[J]. *Genetics and molecular biology*, 2007(1): 145-151.
- [25] DUTRA V S, RONCHI-TELES B, STECK G J, et al. Description of eggs of *Anastrepha curitis* and *Anastrepha leptozona* (Diptera: Tephritidae) using SEM[J]. *Annals of the entomological society of America*, 2013(1): 13-17.
- [26] FIGUEIREDO J V A, PERONDINI A L P, RUGGIRO E M, et al. External eggshell morphology of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae)[J]. *Acta zoologica*, 2013(2): 125-133.
- [27] 张蕾, 陈小琳, 侯新文, 等. 实蝇科果实蝇属昆虫数字图像自动识别系统的构建和测试[J]. *昆虫学报*, 2011(2): 184-196.
- [28] 冯典兴, 刘广纯. 中国蝇类染色体研究现状与展望[J]. *昆虫知识*, 2009(5): 684-689.
- [29] DROSOPOULOU E, NESTEL D, NAKOU I, et al. Cytogenetic analysis of the *Ethiopian* fruit fly *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Genetica*, 2011, 139(6): 723-732.
- [30] ZACHAROPOULOU A, SAYED W A A, AUGUSTINOS A A, et al. Analysis of mitotic and polytene chromosomes and photographic polytene chromosome maps in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Annals of the entomological society of America*, 2011(2): 306-318.
- [31] DROSOPOULOU E, AUGUSTINOS A A, NAKOU I, et al. Genetic and cytogenetic analysis of the American cherry fruit fly, *Rhagoletis cingulata* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Genetica*, 2011, 139(11/12): 1449-1464.
- [32] SELIVON D, PERONDINI A, ROCHA L S. Systematics, morphology and physiology - karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae)[J]. *Neotropical entomology*, 2005(2): 273-279.
- [33] ZACHAROPOULOU A, AUGUSTINOS A A, SAYED W A, et al. Mitotic and polytene chromosomes analysis of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)[J]. *Genetica*, 2011, 139(1): 79-90.
- [34] MONETI G, DANI F R, PIERACCINI G, et al. Solid-phase microextraction of insect epicuticular hydrocarbons for gas chromatographic/mass spectrometric analysis[J]. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1997(8): 857-862.
- [35] MONNINT, MALOSSE C, PEETERS C. Solid-phase microextraction and cuticular hydrocarbon differences related to reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadriceps*. [J]. *Journal of chemical ecology*, 1998(3): 473-490.
- [36] BLAND J M, OSBRINK W L, CORNELIUS M L, et al. Solid-phase microextraction for the detection of termite cuticular hydrocarbons[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 932(1/2): 119-127.
- [37] TENTSCHER J, BESTMANN H J, HEINZE J. Cuticular compounds of workers and queens in two *Leptothorax* ant species—a comparison of results obtained by solvent extraction, solid sampling, and SPME[J]. *Chemoecology*, 2002(1): 15-21.
- [38] DRESCHER J, BLUTHGEN N, SCHMITT T, et al. Societies drifting apart? Behavioural, genetic and chemical differentiation between supercolonies in the yellow crazy ant *Anoplolepis gracilipes*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13581.
- [39] SEPPA P, HELANTERA H, TRONTTI K, et al. The many ways to delimit species: hairs, genes and surface chemistry[J]. *Myrmecological news*, 2011, 15(3): 31-41.
- [40] PAGE M, NELSON L J, BLOMQUIST G J, et al. Cuticular hydrocarbons as chemotaxonomic characters of pine engraver beetles (*Ips* spp.) in the *grandicollis* subgeneric group[J]. *Journal of chemical ecology*, 1997(4): 1053-1099.
- [41] LUCAS C, FRESNEAU D, KOLMER K, et al. A multidisciplinary approach to discriminating different taxa in the species complex *Pachycondyla villosa* (Formicidae) [J]. *Biological journal of the linnean society*, 2002(2): 249-259.
- [42] AKINO T, TERAYAMA M, WAKAMURA S, et al. Intraspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in *Formica japonica* Motschoulsky (Hymenoptera: Formicidae) [J]. *Zoolog Sci*, 2002, 19(10): 1155-1165.
- [43] SCHLICK-STEINER B C, STEINER F M, MODER K, et al. A multidisciplinary approach reveals cryptic diversity in Western Palearctic *Tetramorium* ants (Hymenoptera: Formicidae)[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 40(1): 259-273.
- [44] MARTIN S J, HELANTERÄ H, DRIJFHOUT F P. Evolution of species-specific cuticular hydrocarbon patterns in *Formica* ants[J]. *Biological journal of the linnean society*, 2008(1): 131-140.
- [45] VANICKOVA L, SVATOS A, KROISS J, et al. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age[J]. *J Chem Ecol*, 2012, 38(9): 1133-1142.
- [46] VANICKOVA L, VIRGILIO M, TOMCALA A, et al. Resolution of three cryptic agricultural pests (*Ceratitisc fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa*, Diptera: Tephritidae) using cuticular hydrocarbon profiling[J]. *Bull Entomol Res*, 2014, 104(5): 631-638.
- [47] FISCHNALLER S, DOWELL F E, LUSSEY A, et al. Non-destructive species identification of *Drosophila obscura* and *D. subobscura* (Diptera) using near-infrared spectroscopy[J]. *Fly (Austin)*, 2012, 6(4): 284-289.
- [48] FRENTIU F D, CHENOWETH S F. Clines in cuticular hydrocarbons in two *Drosophila* species with independent population histories[J]. *Evolution*, 2010, 64(6): 1784-1794.
- [49] 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(1): 2-6.
- [50] BARR N B, COPELAND R S, DE MEYER M, et al. Molecular

- diagnostics of economically important *Ceratitis* fruit fly species (Diptera: Tephritidae) in Africa using PCR and RFLP analyses[J]. Bull Entomol Res, 2006, 96(5): 505-521.
- [51] CHUA T H, SONG B K, CHONG Y V. Development of allele-specific single-nucleotide polymorphism-based polymerase chain reaction markers in cytochrome oxidase I for the differentiation of *Bactrocera papayae* and *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) [J]. J Econ Entomol, 2010, 103(6): 1994-1999.
- [52] SMITH P T, KAMBHAMPATI B A M A. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA supports the monophyly of *Dacini* fruit flies (Diptera: Tephritidae) [J]. Annals of the entomological society of America, 2002(6): 658-664.
- [53] LUDEÑA B, BAYAS R, PINTAUD J C. Phylogenetic relationships of Andean-Ecuadorian populations of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann 1830) (Diptera: Tephritidae) inferred from CO I and COII gene sequences[J]. Annales de la societe entomologique de France, 2010(3): 344-350.
- [54] LIM P E, TAN J, SUANA I W, et al. Distinct genetic lineages of *Bactrocera caudata* (Insecta: Tephritidae) revealed by COI and 16S DNA sequences[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37276.
- [55] IWAIZUMI R, KANEDA M, IWAHASHI O. Correlation of length of Terminalia of males and females among nine species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) and differences among sympatric species of *B. dorsalis* complex[J]. Annals of the entomological society of America, 1997(5): 664-666.
- [56] MCINNIS D O, RENDON P, JANG E, et al. Interspecific mating of introduced, sterile *Bactrocera dorsalis* with wild *B. carambolae* (Diptera: Tephritidae) in suriname: a potential case for cross-species sterile insect technique[J]. Annals of the entomological society of America, 1999(4): 758-765.
- [57] ARMSTRONG K F, BALL S L. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1813-1823.
- [58] BARR N B, ISLAM M S, MEYER M D, et al. Molecular identification of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) using DNA sequences of the COI barcode region[J]. Annals of the entomological society of America, 2012(2): 339-350.
- [59] KHAMIS F M, MASIGA D K, MOHAMED S A, et al. Taxonomic identity of the invasive fruit fly pest, *Bactrocera invadens*: concordance in morphometry and DNA barcoding[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44862.
- [60] DAI S M, LIN C C, CHANG C. Polymorphic microsatellite DNA markers from the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)[J]. Molecular ecology notes, 2004(4): 629-631.
- [61] SHEARMAN D, GILCHRIST A S, CRISAFULLI D, et al. Microsatellite markers for the pest fruit fly, *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae) and other *Bactrocera* species[J]. Molecular ecology notes, 2006(1): 4-7.
- [62] AKETARAWONG N, BONIZZONI M, MALACRIDA A R, et al. Seventeen novel microsatellite markers from an enriched library of the pest species *Bactrocera dorsalis* sensu stricto[J]. Molecular ecology notes, 2006(4): 1138-1140.
- [63] 李伟丰, 杨朗, 唐侃, 等. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析[J]. 昆虫学报, 2007(12): 1255-1262.
- [64] 吴仲真, 李红梅, 宾淑英, 等. 应用微卫星标记分析不同桔小实蝇种群的遗传多样性[J]. 昆虫学报, 2011(2): 149-156.
- [65] SHI W, KERDELHUE C, YE H. Genetic structure and inferences on potential source areas for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) based on mitochondrial and microsatellite markers[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37083.
- [66] WU Z Z, LI H M, BIN S Y, et al. Sequence analysis of mitochondrial ND1 gene can reveal the genetic structure and origin of *Bactrocera dorsalis* s.s.[J]. BMC Evol Biol, 2014, 14(1): 55.
- [67] KROSCHE M N, SCHUTZE M K, ARMSTRONG K F, et al. Piecing together an integrative taxonomic puzzle: microsatellite, wing shape and aedeagus length analyses of *Bactrocera dorsalis* s.l. (Diptera: Tephritidae) find no evidence of multiple lineages in a proposed contact zone along the Thai/Malay Peninsula[J]. Systematic entomology, 2013(1): 2-13.
- [68] SCHUTZE M K, AKETARAWONG N, AMORNSAK W, et al. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoeological data[J]. Systematic entomology, 2015, 40(2): 456-471.
- [69] CHUA T H, CHONG Y V, LIM S H. Species determination of Malaysian *Bactrocera* pests using PCR-RFLP analyses (Diptera: Tephritidae) [J]. Pest management science, 2010(4): 379-384.
- [70] HUANG C G, HSU J C, HAYMER D S, et al. Rapid identification of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Econ Entomol, 2009, 102(3): 1239-1246.
- [71] 滕晓坤, 肖华胜. 基因芯片与高通量 DNA 测序技术前景分析[J]. 中国科学(C辑: 生命科学), 2008(10): 891-899.
- [72] 李文芬, 余道坚, 颜亨梅, 等. 地中海实蝇及其近缘种基因芯片检测研究[J]. 昆虫学报, 2008(1): 61-67.
- [73] TINDALL E A, PETERSEN D C, WOODBRIDGE P, et al. Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments[J]. Hum Mutat, 2009, 30(6): 876-883.
- [74] WU S B, TAVASSOLIAN I, RABIEI G, et al. Mapping SNP-anchored genes using high-resolution melting analysis in almond[J]. Mol Genet Genomics, 2009, 282(3): 273-281.
- [75] MALEWSKI T, DRABER-MONKO A, POMORSKI J, et al. Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis[J]. Int J Legal Med, 2010, 124(4): 277-285.



- [76] VIRGILIO M, WHITE I, DE MEYER M. A set of multi-entry identification keys to African frugivorous flies (Diptera, Tephritidae)[J]. Zookeys, 2014, 428: 97-108.
- [77] JIANG F, JIN Q, LIANG L, et al. Existence of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: a case study in *Bactrocera* spp.[J]. Mol Ecol Resour, 2014, 14(6): 1114-1128.
- [78] FREY J E, GUILLEN L, FREY B, et al. Developing diagnostic SNP panels for the identification of true fruit flies (Diptera: Tephritidae) within the limits of CO I -based species delimitation[J]. BMC Evol Biol, 2013, 13: 106.
- [79] WINDER L, PHILLIPS C, RICHARDS N, et al. Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification[J]. Methods in ecology and evolution, 2011, 2(3): 312-320.

## Research progress in methods for classification and identification of invasive tephritids insects

ZHANG He<sup>1</sup> MA Jun<sup>2</sup> HE Hualiang<sup>1</sup> LIN Jintian<sup>1</sup>

1. *Guangdong Engineering and Technology Research Center for Management of Invasive Alien Species, Guangzhou 510225, China;*

2. *Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China*

**Abstract** Systematics is not only the research topic of biological diversity and species evolution, but also of great significance for agricultural pest management or other biological applications. Currently, systematic issues of invasive tephritids pest hinders market access, trade and quarantine. Here, this review introduced the research progress about methods of classification and identification of invasive tephritids pest, including morphological identification, cytological identification and molecular identification in order to provide new classification and identification information, and multivariant or integrative methods. At the same time, this paper introduced various technical improvement of classification and identification methods and a new method of molecular biology, which ensures fast, efficient and accurate classification and identification of invasive tephritids pest.

**Keywords** Tephritids; classification and identification; related species; complex species; cryptic species

(责任编辑:边书京)