



评述

中国知名大学及科研院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

DNA 条形码技术在农林入侵害虫鉴定与溯源研究中的应用

王玉生, 万方浩, 张桂芬*

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

* 联系人, E-mail: guifenzhang3@163.com

收稿日期: 2015-01-04; 接受日期: 2016-02-25; 网络版发表日期: 2016-05-25

公益性行业(农业)科研专项(批准号: 201103026)、环保公益性行业科研专项(批准号: 201409061)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB119200)和国家自然科学基金(批准号: 31572067)资助

摘要 快速准确识别鉴定昆虫的方法在植物检疫中具有重要意义. 长期以来, 基于形态特征的入侵害虫鉴定研究由于经常遇到诸如幼期(包括卵、幼虫/若虫、蛹/前蛹/拟蛹), 隐存种、复合种以及样本受损等情况, 致使物种的快速准确鉴定陷入举步维艰的境地. DNA 条形码技术的发展为上述问题的解决提供了新契机, 已成为昆虫分类鉴定、植物及其产品的产地检疫和调运检疫以及出入境检验检疫中备受关注的一种新兴技术. 本文以重大农林害虫类群介壳虫类、蓟马类、粉虱类和实蝇类等为例, 简要介绍 DNA 条形码技术在农林入侵害虫鉴定和溯源研究中的应用, 并对 DNA 条形码技术的进一步完善进行了探讨和展望.

关键词 入侵害虫, DNA 条形码技术, 线粒体 *COI* 基因, 物种鉴定, 溯源研究

随着全球经济一体化的飞速发展, 生物入侵已成为危及国家经济安全、生态安全、国际贸易与政治利益的重大科学问题, 而我国是生物入侵形势最为严峻的国家之一, 外来有害生物几乎遍布所有类型的生态系统. 入侵我国的外来生物种类繁多, 截至 2014 年, 入侵中国大陆的外来种已达 560 种, 其中入侵昆虫已达 125 种, 而在农林生态系统中暴发成灾的就有 92 种^[1]. 外来入侵生物给我国造成的经济损失每年高达 1198 亿元, 对农林业生态系统的危害尤其严重^[1-3]. 而更加令人担忧的是, 危险性外来生物濒临国门, 新的疫情不断突发. 据国家质量监督检验检疫

总局统计, 2015 年的前 8 个月, 中国出入境检验检疫机构平均每月截获的各种进境有害生物就有 2123 种, 超过 7 万次; 其中, 检疫性有害生物 150 种、6660 次, 检疫性昆虫 76 种、2999 次.

快速准确的物种识别与鉴定是外来有害生物检测监测、阻截控制和根除扑灭, 保障农林业生产安全和生态环境安全的必要前提; 同时, 也是深入开展外来物种生物学、生态学研究和综合防控技术研究的基础^[4]. 然而, 由于截获到的外来害虫通常是未成熟虫态(如卵、幼虫/若虫、蛹/前蛹/拟蛹)或成虫残体等, 加之很多外来昆虫存在隐存种、复合种, 使传统形态学

引用格式: 王玉生, 万方浩, 张桂芬. DNA 条形码技术在农林入侵害虫鉴定与溯源研究中的应用. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 596-612
Wang Y S, Wan F H, Zhang G F. Application of DNA barcode technique in identifying and tracing invasive pest insects in agriculture and forestry. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 596-612, doi: 10.1360/N052016-00165

鉴定方法面临巨大的挑战^[5]. 同时, 专业从事形态学鉴定研究的技术人才严重匮乏, 更是直接影响了鉴定工作的准确性和时效性. 目前, 我国正在逐步推进“一带一路”战略, 而作为严防重大有害生物传播扩散第一道防线的检验检疫工作亟待加强和改进, 显然, 研发更为高效、简便易行的物种鉴定新方法迫在眉睫, 而基于分子生物学和生物信息学的 DNA 条形码技术提供了一个全新且高效的选择. 有关 DNA 条形码技术在昆虫中的研究与应用, 杨倩倩等人^[6]于 2012 年即针对 DNA 条形码技术在发现和描述隐种、种类分子鉴定以及系统发育等方面进行了综述; 之后, 李志红等人^[7,8]又对线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, mtDNA COI) 基因序列分析技术在实蝇类害虫的分子鉴定、种群遗传结构分析和入侵来源等方面的研究进行了概述. 本文就 DNA 条形码技术在常见农林重大入侵昆虫类群(包括介壳虫类、粉虱类、实蝇类、蓟马类等)的种类鉴定、分子溯源等研究中的应用进行了概括, 以期对入侵害虫的快速鉴定与有效监测和控制提供参考, 并服务于“一带一路”区域农业的绿色生产与健康发展, 保障粮食安全和生态安全.

1 DNA 条形码技术概况

2003 年, 加拿大 Guelph 大学的动物学家 Hebert 博士提出, 通过比较物种间 mtDNA COI 基因中的一段特定区域来对生物进行种类鉴定, 并称其为 DNA 条形码(DNA barcoding)^[9,10]. 自此以后, 国际生命条形码计划(the international barcode of life project, iBOL)、生命条形码联盟(consortium for the barcode of life, CBOL)、生命条形码数据系统(barcode of life data system, BOLD)等相继成立, 旨在未来 20 年, 建立完整的 DNA 条形码系统^[11]. 截至 2015 年 9 月 13 日, BOLD 数据库已收录昆虫纲约 403.41 万条样本记录, 312.19 万份样本的条形码记录和 16.24 万个物种的条形码记录(<http://www.barcodinglife.com/>).

通常, DNA 条形码技术的流程主要包括样品获得、DNA 提取、PCR 扩增、序列测定、序列比对及分析、重建系统发育等步骤^[9,10,12]. 目前, 已在昆虫纲 31 个目的种类鉴定中得到广泛应用, 包括物种多样性比较高的鳞翅目^[13-15]、膜翅目^[16]、双翅目^[17,18]、鞘翅目^[19]和半翅目^[20]等. 应用 DNA 条形码技术鉴定物

种不受物种的发育状态、性别以及标本完整性的限制^[21,22], 而且还是发现新种和隐存种^[13,23]、明确寄生关系^[16,24]、解析食物链结构^[25,26]等的重要方法和手段. 而在此基础上发展起来的种特异性 COI(species-specific COI, SS-COI)分子标记技术, 具有重现性好、谱带单一, 适宜于大规模快速检验检疫分析^[27,28]等诸多优点, 愈加得到广泛应用.

2 DNA 条形码技术在重大农林入侵害虫研究中的应用

我国是遭受生物入侵最为严重的国家之一, 对我国的农林业生产造成了巨大损失^[1,3,29]. 而潜在入侵生物风险管理最基础的工作就是物种识别, 入侵物种的识别鉴定不仅要求快速准确, 而且还得经济有效^[30]. DNA 条形码作为一种简便、快速、高效、准确的物种鉴定手段, 已逐渐成为检测监测入侵物种的一种有效工具. 目前, 很多国家将 DNA 条形码应用于外来入侵物种的识别鉴定^[31-33]. BOLD 也构建了针对农林害虫的专门的条形码数据库 INBIPS (international network for barcoding invasive and pest species, <http://barcoding.si.edu/INBIPS.htm>); 与此同时, 我国入侵昆虫的 DNA 条形码研究也迅速发展, 蓟马类、实蝇类、介壳虫类以及粉虱类等研究取得了相当进展, 并构建了中国主要外来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统(<http://www.chinaiaas.cn/lxxPart/DNA-code.aspx>), 为检疫性害虫的快速检测和实时监测提供了远程鉴定平台.

2.1 在介壳虫类昆虫研究中的应用

介壳虫是半翅目(Hemiptera), 蚧总科(Coccoidea)昆虫的统称, 据 ScaleNet 估计有 48 科 1144 属约 7812 种介壳虫(<http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/classif.htm>), 而且多为农林业中发生普遍、为害严重的经济害虫^[34]. 我国大陆已发现有 16 科 249 属 830 余种, 其中能够造成危害的有 13 科 84 属 211 种^[35]. 介壳虫类昆虫具有多形、多态、适应性强等特点. 近年来, 湿地松粉蚧(*Oracella acuta* (Lobdell))^[36]、扶桑绵粉蚧(*Phenacoccus solenopsis* Tinsley)^[37]、美地绵粉蚧(*Ph. madeirensis* Green)^[38]、新菠萝灰粉蚧(*Dysmicoccus neobrevipes* Beardsley)^[39]、无花果蜡蚧(*Ceroplastes rusci* (Linnaeus))^[40]、七角星蜡蚧(*C. stellifera*

(Westwood)^[41]、木瓜秀粉蚧(*Paracoccus marginatus* Williams & Granara de Willink)^[42]等相继入侵我国,对我国农林业生产造成了巨大危害.此外大洋臀纹粉蚧(*Planococcus minor* (Maskell))、南洋臀纹粉蚧(*Pl. lilacius* Cockerell)^[43]、葡萄绵粉蚧(*Pl. ficus* (Signoret))^[44]、木薯绵粉蚧(*Ph. manihoti* Matile-Ferrero)^[45]等重大检疫性介壳虫类害虫濒临国门.显然,快速准确的识别鉴定是有效预防和阻止介壳虫类害虫入侵我国首要解决的前提.

基于 DNA 条形码技术的介壳虫类昆虫的系统发育和分子鉴定技术,由于不受雌雄性别、样本完整程度以及发育阶段的限制,并且具有简便、快速、高通量等特点,而逐渐得到广泛应用^[46-49].其中以粉蚧科(Pseudococcidae)、盾蚧科(Diaspididae)和蜡蚧科(Coccidae)居多.例如, Gullan 等人^[50]通过扩增线粒体 *COI* 基因及核基因 28S/EF-1 α 序列及其比对分析,并结合外部形态特征命名了一种新的粉蚧(*Ferrisia gilli* (Gullan)); Saccaggi 等人^[51]通过对 *COI* 基因序列的分析,成功地将葡萄绵粉蚧、柑橘臀纹粉蚧(*Pl. citri* (Risso)) 和长尾粉蚧(*Pseudococcus longispinus* (Targioni-Tozzetti)) 区别开来; Rung 等人^[52]则将柑橘臀纹粉蚧与其近缘种大洋臀纹粉蚧进行了区分. Park 等人^[49]通过重新设计通用性较高的 *COI* 引物验证了 *COI* 基因在盾蚧科和粉蚧科昆虫物种鉴定中的准确性和实用性,并揭示了其 DNA 条形码序列核苷酸组成的特性和进化关系.田虎^[53]构建了包含 8 科 29 属 40 种介壳虫 437 条条形码序列的介壳虫类 DNA 条形码识别系统,还发展了基于 *COI* 基因的扶桑绵粉蚧 SS-*COI* 快速检测技术^[54].何衍彪等人^[55]发现,与 18S/28S 相比 mtDNA *COI* 序列变异率相对较高,可作为臀纹粉蚧属(*Planococcus*) 3 种粉蚧(大洋臀纹粉蚧、柑橘臀纹粉蚧、葡萄绵粉蚧)分子鉴定的依据,且寻找到了稳定的鉴别位点. Deng 等人^[56]对比了 *COI* 基因与 28S 基因序列在鉴定蜡蚧科种类的有效性,同样发现 *COI* 基因更适用于同属不同种类介壳虫的鉴定;随后, Sethusa 等人^[57]和 Wang 等人^[58]的研究则发现,使用 18S/28S 等核基因作为 *COI* 基因的辅助鉴定基因,能增加同源序列之间的可比性,通过联合分析能大大提高条形码鉴定物种的准确性和成功率.至此, DNA 条形码技术在国内外交壳虫种类鉴定中得到了广泛应用^[59-66],并且基于 *COI* 基因序列分析开发了菠萝洁粉蚧(*Dy. brevipes* (Cockerell))、柑橘臀纹

粉蚧、暗色粉蚧(*Ps. viburni* (Signoret))、葡萄绵粉蚧、扶桑绵粉蚧^[59]、康氏粉蚧(*Ps. comstocki* (Kuwana))^[48]、无花果蜡蚧^[67]、*Melanaspis glomerata* (Green)^[65]等的种特异性 PCR 检测方法.值得关注的是, Beltrà 等人^[68]联合 *COI*, 28S 及内共生菌对 *Delottococcus* 属的 9 种粉蚧进行了准确鉴定,同时对其体内的寄生蜂进行了检测,并提出利用长索跳小蜂属(*Anagyrus*)的一种寄生蜂对入侵西班牙的灰粉蚧(*De. aberiae* (De Lotto))进行生物防治.

毋庸置疑, DNA 条形码技术在介壳虫类害虫的识别鉴定中发挥了巨大作用.同样,该技术在介壳虫类昆虫的系统发育和进化分析,发现和揭示隐存种和复合种,解析入侵种来源和传播扩散途径等方面亦意义非凡.例如, Gullan 等人^[69]利用 *COI* 基因并联合延伸因子 EF-1 α 及 28S rDNA 基因序列分析,推测双条拂粉蚧(*F. virgate* (Cockerell))可能存在复合种现象,并建议结合形态特征应将其分为几个亚种.此外, DNA 条形码技术还可用于同一物种不同地理种群的遗传分化研究.例如,褚栋等人^[70]以及陈哲等人^[71]的研究发现,扶桑绵粉蚧存在 2 个进化支系,入侵我国的扶桑绵粉蚧仅为其中的一个谱系. Zhao 等人^[72]、Ahmed 等人^[73]和 Wu 等人^[74]对我国其他地区 and 国外部分种群的分析验证了先前的推测,并表明我国不同地理种群的扶桑绵粉蚧其遗传差异较小;中国、印度、巴基斯坦和美国加州的种群构成一个支系,美国佛罗里达州的种群为另一支系.此外, He 等人^[75]还探讨了菠萝洁粉蚧种群的遗传多样性,发现我国的菠萝洁粉蚧存在 3 种单倍型,其中海南万宁种群可能是其中的一个隐存谱系,而大陆单倍型与菲律宾种群相近;推测我国 20 世纪初从东南亚大量引进种植菠萝(*Ananas comosus*)可能无意使菠萝洁粉蚧借机入侵大陆,为入侵害虫菠萝洁粉蚧的溯源提供了依据.

2.2 在实蝇类害虫研究中的应用

实蝇科(Tephritidae)是双翅目(Diptera)中最大的类群之一,分布广泛,种类繁多,寄主范围广,危害严重;现已描述的实蝇种类约 500 属 4500 种,绝大多数种类是果蔬作物害虫,其中具有重要经济意义的达 250 余种^[7].近年来,随着国际贸易活动的日趋频繁,实蝇类害虫传播扩散的机率越来越大,已成为世界水果、蔬菜、花卉等进出口贸易中面临的重要检疫

问题,特别是地中海实蝇(*Ceratitis capitata* (Wiedemann))、橘小实蝇(*Bactrocera dorsalis* (Hendel))、瓜实蝇(*B. cucurbitae* (Coquillett))、枣实蝇(*Carpomya vesuviana* Costa)等。因此,实蝇类害虫的快速准确鉴定受到世界各国的高度重视,而有关实蝇类害虫的DNA条形码技术研究也取得了相当进展。2006年,生命条形码联盟发起了实蝇条形码计划(Tephritid barcode initiative, TBI),该计划拟获得实蝇科约50%昆虫的DNA条形码,并用于实蝇鉴定等方面的研究^[76,77]。截至2015年9月13日,BOLD数据库共收录了979种,11359条实蝇标本记录,具有条形码序列的标本达845种,8803个个体,其中已公开444种,6330条序列信息。

Armstrong和Ball^[78]采用COI基因对新西兰口岸多年截获的实蝇标本进行研究发现,条形码的鉴定结果与之前采用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术的鉴定结果基本一致,且能将RFLP技术未能鉴定的种进行属、种确认,显示了DNA条形码技术在入侵物种鉴定中的巨大潜力。Van Houdt等人^[76]针对长时间保存的馆藏标本其DNA条形码区段通用型引物扩增效率较低的问题,开发出了基于重叠微型条形码(mini barcodes)的扩增方法,得到了658 bp的DNA条形码标准序列,为馆藏标本条形码区段的扩增提供了参考。Virgilio等人^[79]的研究发现,COI, ND6等线粒体基因以及ITS1, period等核基因,均无法区分小条实蝇属(*Ceratitis*)的*C. fasciventris* (Bezzi)、黑羽小条实蝇(*C. anonae* Graham)、纳塔尔小条实蝇(*C. rosa* Karsch)复合种,并推测*C. fasciventris*这一形态种可能为隐种复合体。显然,由于实蝇科存在同物异名、隐存种和复合种等现象,故而在一定程度上影响了条形码鉴定物种的效力。Barr等人^[77]的研究则发现,基于COI基因的遗传距离、单倍型网络图和序列特征等分析,均不能将地中海实蝇(*C. capitata* (Weidemann))与其近缘种*C. caetrata* Munro进行有效区分,但能有效地鉴别非洲地区其他种类的实蝇。而Blacket等人^[80]的研究则发现,细胞核线粒体numt1假基因对利用mtDNA COI条形码鉴定昆士兰果实蝇(*B. tryoni* (Froggatt))具有干扰扩增的作用,并为此设计了1对仅针对mtDNA COI基因条形码区段的通用型引物;同时,他们的研究还发现在现有物种体系

下,COI基因序列无法区分昆士兰果实蝇复合种,但与其他线粒体基因相比,逐渐扩大的COI基因序列数据库将会使鉴定结果更加可靠。Khamis等人^[81]通过形态指标分析,确证了条形码对不同地理种群入侵果实蝇(*B. invadens* Drew, Tsuruta & White)的鉴定结果;同时系统发育分析表明,入侵果实蝇与橘小实蝇复合种的亲缘关系非常近。与此同时,进一步的深入研究推测,橘小实蝇复合种可能存在同物异名现象,并为此开展了大量的遗传分化和系统发育研究。例如,Schutze等人^[82,83]和Boykin等人^[84]联合应用COI基因与ND4, CAD(carbamoyl-phosphate synthetase), period, ITS1, ITS2等分子标记或形态学特征,通过系统发育重建和单倍型网络分析等,对现行的橘小实蝇复合种分类提出了挑战;并在形态学、分子遗传学、细胞遗传学、化学生态学和生物学等多学科证据的基础上对橘小实蝇复合种的分类进行了重新界定,将橘小实蝇、入侵果实蝇、木瓜果实蝇(*B. papaya* Drew & Hancock)和菲律宾果实蝇(*B. philippinensis* Drew & Hancock)确定为同一物种^[85]。然而,大多数实蝇复合体的物种界定尚不明晰。此外,条形码序列数据库的覆盖度,即是否存在相当数量的来自近缘物种的序列,能否完全覆盖种内、种间差异等,也极大程度地影响了条形码鉴定的可靠性。例如,Virgilio等人^[86]利用在非洲地区收集的602条实蝇COI基因序列,评估了数据不完备时条形码数据库的鉴定效果,表明条形码技术对数据库中已含有充分序列的物种能进行准确的鉴定,但并非适用于非洲所有实蝇种类的鉴定,并提出误检概率与遗传距离阈值的对应关系。Smit等人^[87]在对欧洲地区的实蝇进行研究时,也发现了类似的问题。

与此同时,我国相关学者也广泛开展了实蝇类害虫条形码技术的研究。例如,梁亮等人^[88]以25种果实蝇、155条COI基因序列为靶标,通过遗传距离和系统发育分析,证实了基于COI基因的条形码技术在除橘小实蝇复合种以外的果实蝇属大多数物种鉴定中的有效性;进一步的亲缘关系分析推测,泰国果实蝇(*B. thailandica* Drew & Hancock)和瑞丽果实蝇(*B. ruiensis* Wang, Long et Zhang, sp. nov.)可能是同物异名。Li等人^[89]构建了包括150种实蝇400条COI基因序列以及物种形态和地理分布信息等的实蝇条形码鉴定系统,基本实现了国内外常见实蝇的

快速鉴定. 刘慎思等人^[90]则将 *COI* 基因条形码应用于实蝇类害虫幼体及残体的鉴定, 提高了口岸检验检疫效率. 同时, 该团队还以口岸经常截获的 21 种重要经济性实蝇为靶标, 证实 DNA 条形码适用于实蝇的物种鉴定, 并提出应以 1.54% 的遗传分化水平作为实蝇物种的界定阈值; 而且, DNA 条形码技术目前尚无法有效地区分橘小实蝇复合种^[91]; 并在此基础上, 构建了能准确鉴定 5 属 185 种实蝇类害虫的条形码数据库^[92]. Jiang 等人^[93]通过遗传距离、序列特征和系统发育重建等方法对果实蝇属 73 种实蝇的 1426 条 DNA 条形码序列进行分析时发现, 复合种的存在大大降低了 DNA 条形码对实蝇的鉴定准确性; 如果将复合种视为同一物种或去除复合种, DNA 条形码的鉴定成功率接近 100%; 并进而构建了包含 6 属 181 种 2252 条 *COI* 基因序列的检疫性实蝇条形码库^[94]. 同时, 在条形码序列分析的基础上, 还研发出了 27 种检疫性实蝇的 SS-PCR^[95,96]技术、TaqMan MGB 实时荧光 PCR 技术以及集成流路芯片鉴定技术, 基本形成了较为完善的检疫性实蝇的分子鉴定技术体系. 此外, 采用 *COI* 基因序列比对及系统发育分析, 分别对广西苦瓜(*Momordica charantia* L.)中的瓜实蝇幼虫和南亚果实蝇(*B. tau* (Walker))幼虫^[97]、采自泰国的番石榴实蝇(*B. correcta* (Bezzi))幼虫^[18]、采自布迪隆的入侵果实蝇^[98]、进境越南西瓜(*Citrullus lanatus*)中截获的瓜实蝇幼虫^[99]及芒果(*Mangifera indica* L.)上的入侵果实蝇幼虫和非洲芒果实蝇(*C. cosyra* Walker)幼虫^[100]等检疫截获标本进行了鉴定, 表明基于 *COI* 基因的条形码技术是一种实用、高效且可靠的实蝇鉴定方法.

另外采用 *COI* 条形码区段, 通过分析入侵实蝇的不同地理种群以及不同生态系统的种群遗传结构和系统发育进化, 还能揭示外来实蝇的入侵来源、扩散路径和扩张趋势, 而与靶标物种特异性快速鉴定技术的结合, 对入侵生物的防控与监测更是意义重大. 其中, 橘小实蝇和瓜实蝇^[101~103]、番石榴果实蝇^[104,105]、南亚果实蝇^[106]、油橄榄实蝇(*B. oleae* Gmelin)^[107,108]、桃果实蝇(*B. zonata* (Saunders))^[109]、辣椒实蝇(*B. latifrons* (Hendel))^[110]等的相关研究已有陆续报道. 例如, 对橘小实蝇的系统研究显示, 该实蝇从东南亚地区传入我国并进而向北扩张, 同时对其入侵路径以及各区域的起源进行了预测^[111~114].

2.3 在粉虱类害虫研究中的应用

粉虱属半翅目(Hemiptera), 粉虱科(Aleyrodidae), 其个体微小, 种类繁多, 分布广泛, 据估计全世界有 161 属 1550 余种粉虱^[115], 我国报道的粉虱有 31 属 170 多种^[116]. 近年来, 粉虱入侵我国的事件频频发生, 如 2003 年烟粉虱(*Bemisia tabaci* (Gennadius)) MED 隐种^[117]、2006 年螺旋粉虱(*Aleurodicus disperses* Russell)^[118]、2007 年双钩巢粉虱(*Paraleyrodies pseudonaranjiae* Martin)^[119]、2010 年栲粉虱(*Siphoninus phillyreae* (Haliday))^[120]、2012 年甘蓝粉虱(*Aleyrodes proletella* (Linnaeus))^[121]等相继入侵我国, 给我国的农林业生产造成了巨大损失和潜在威胁^[29].

然而, 仅依靠传统的基于形态学的物种识别方法已经不能满足对粉虱进行快速准确鉴定的需求, 特别是由众多隐种组成的烟粉虱复合种. 研究表明, 进行烟粉虱隐种鉴定以及遗传分化研究的最有效的方法就是基于 *COI* 基因的条形码技术. 例如, Thomas 和 Ramamurthy^[122]的比较研究分析发现, *COI* 基因的 3'端与 5'端和 ITS 相比能更准确地鉴别烟粉虱的不同隐种. 国内, 罗晨等人^[123]利用 *COI* 基因将采自北京、广东、陕西、新疆等 4 个区域的 5 个烟粉虱种群鉴定为烟粉虱 MEAM1 隐种; 褚栋等人^[117]通过 *COI* 基因序列分析, 首次报道了烟粉虱 MED 隐种入侵我国. 此后, 陆续有学者采用 *COI* 条形码对我国不同区域的烟粉虱种群进行了鉴定^[124~130], 明确了我国烟粉虱隐种的分布状况以及隐种多样性, 并通过系统发育分析揭示了超级害虫烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种的入侵来源及其传播扩散途径. 同时研究发现, 基于 mtDNA *COI* 基因的条形码能有效地鉴别烟粉虱的不同遗传支系或单倍型^[131,132]; 进一步的研究显示, 2004 年之前, 烟粉虱 MEAM1 隐种为我国的主要粉虱类群, 并已在我国的大部分地区暴发成灾^[133]; 2003 年, MED 隐种入侵我国并迅速定殖扩散^[134], 逐步取代 MEAM1 隐种^[134~136]. 此外, Chu 等人^[137]、滕希^[138]、Ahmed 等人^[139]、许丽丽等人^[131]和陈苗苗^[132], 采用基于 *COI* 基因的序列分析技术对来自不同国家的烟粉虱 MED 隐种进行系统发育分析, 推测中国、西班牙、韩国、葡萄牙、日本、危地马拉的烟粉虱 MED 隐种均来自西地中海地区, 并形成了 Q1 分支, Q1 分支传至美国、亚洲和南美洲; 来自东地中海以色列、塞浦路斯等地区的 MED 隐种形成 Q2 分支, 并

入侵美国的佛罗里达州和加利福尼亚州^[140]; Q1 和 Q2 分支 *COI* 基因的单倍型明显不同^[141]. 此外, Chu 等人^[141]的分析还发现, 原产地的 MED 隐种其 Q1 分支具有丰富的线粒体单倍型, 而我国的 MED 隐种其 *COI* 基因的遗传多样性明显低于原产地种群. 据此推测, 我国的烟粉虱 MED 隐种在入侵过程中经历了严重的瓶颈效应和奠基者效应. 然而, 微卫星标记分析发现, 入侵种群的核基因多样性并没有明显减少, 并由此推测较高的核基因多样性在 MED 隐种成功入侵中具有重要作用^[141].

mtDNA *COI* 基因不仅可用于烟粉虱隐种的鉴定, 在其系统发育研究中亦占有重要地位. 例如, Boykin 等人^[142]、Dinsdale 等人^[143]、De Barro 和 Ahmed^[140]相继采用贝叶斯法、遗传距离法、单倍型网络图等, 分析探讨了基于 *COI* 基因的烟粉虱系统进化和隐种的存在. Dinsdale 等人^[143]则提出以大于或等于 3.5% 的遗传分化水平作为烟粉虱隐种的划定界限, 并指出烟粉虱至少存在 24 个隐种; 此后, 其他烟粉虱隐种相继被报道^[136,144,145]; 然而, 也有研究认为 3.5% 的遗传分化界定需要提高至 4%^[146]. 现今, 已报道的烟粉虱隐种已多达 36 个^[145].

目前, 基于 *COI* 基因的其他粉虱类害虫的 DNA 条形码鉴定技术研究也取得了一定进展. 例如, Malumphy 等人^[147]利用 *COI* 基因序列比对并结合形态学鉴定, 成功地将蜡粉虱属的桂花粉虱(*Trialeurodes lauri* Signoret)和蓖麻粉虱(*Tr. ricini* Misra)进行了区分. Ovalle 等人^[148]利用 DNA 条形码准确鉴定了 9 种粉虱, 并在 *COI* 基因序列分析的基础上研发了其 RFLP 检测技术, 该技术不仅可以鉴定粉虱的种类, 还可用于天敌昆虫控害效果的检测评价. 于卫卫^[149]以上海地区的 17 种粉虱为对象, 研究其 DNA 条形码鉴定技术, 表明 mtDNA *COI* 基因可用于粉虱类昆虫的物种识别鉴定. 李小凤等人^[150]以我国常见粉虱为靶标的研究发现, *COI* 基因序列的 5'端较 3'端更适用于粉虱类害虫的物种识别鉴定研究, 并构建了包括 22 属 62 种粉虱(共 4464 条 DNA 序列)的国内首个粉虱类昆虫 DNA 条形码数据库^[151]. 截至 2015 年 9 月 13 日, BOLD 数据库共收录粉虱 101 种、5991 条标本记录, 具有条形码序列的粉虱达 82 种、4532 个个体, 其中已公开序列信息(3155 条)的粉虱有 47 种.

此外, Dickey 等人^[152]利用 DNA 条形码对入侵佛

罗里达州的无花果粉虱(*Singhiella simplex* Singh)、秋葵粉虱(*Aleurod. rugioperculatus* Martin)、庞达巢粉虱(*Paral. bondari* Peracchi)等 3 种粉虱进行了准确鉴定. 另外, 基于 mtDNA *COI* 的 DNA 条形码技术在黑刺粉虱(*Aleurocanthus spiniferus* (Quaintanca))^[153]、螺旋粉虱^[154]、双沟巢粉虱^[155]等的分子鉴定中也常有应用; 并且, 人们基于 *COI* 基因序列分析分别研发出了螺旋粉虱^[156,157]、双钩巢粉虱^[28]、甘蓝粉虱^[158]等的种特异性 SS-*COI* 快速检测技术. 此外, 在粉虱遗传分化方面, Maruthi 等人^[159]和 Chu 等人^[160]的研究均表明, 非洲小粉虱(*B. afer* (Priesner & Hosny))种内存在明显分化, 可能为隐种复合体; Maruthi 等人^[159]还开发了其种特异性检测方法. 而对温室粉虱(*Tr. vaporariorum* (Westwood))不同地理种群的研究发现, 由于其入侵来源单一或者内共生菌对线粒体遗传的影响^[161], 温室粉虱的 *COI* 基因变异较小, 不存在隐种现象^[161~163].

2.4 在蓟马类昆虫研究中的应用

缨翅目(Thysanoptera)昆虫统称蓟马, 目前有记载的蓟马约 5500 种^[164]. 蓟马个体微小、食性杂、寄主范围广、适生性强、繁殖率高、危害严重且初期不易被发现^[164], 因此极易随国际贸易往来传播扩散, 广泛入侵, 如棕榈蓟马(*Thrips palmi* (Karny))、西花蓟马(*Frankliniella occidentalis* (Pergande))等^[165,166].

自 2003 年 Hebert 提出 DNA 条形码概念以来, 国内外基于 *COI* 基因的蓟马类昆虫条形码技术研究的报道逐渐增多. 例如, Asokan 等人^[167]利用 *COI* 序列分析将烟蓟马(*Th. tabaci* (Lindeman))和棕榈蓟马进行了有效区分, 并研发了针对这两种蓟马的特异性引物和检测鉴定方法. Glover 等人^[168]通过对棕榈蓟马、烟蓟马、黄蓟马(*Th. flavus* Schrank)、豆黄蓟马(*Th. nigropilosus* (Uzel))、西花蓟马的研究显示, *COI* 基因与 *COII* 和 *COIII* 基因以及 *ITS-2* 和 *H3* 基因相比较, 由于其具有足够的变异, 更适用于蓟马以及其他昆虫类群的物种鉴定. 魏书军等人^[169]通过将未知种蓟马的 *COI* 基因序列与 BOLD 数据库中的 38 种蓟马的 *COI* 基因序列进行比对分析, 确定该种蓟马为美洲棘蓟马(*Echinothrips americanus* Morgan), 一种新入侵我国的外来蓟马类害虫; 同时, 证实了基于 *COI* 基因的条形码技术在鉴定未知种蓟马中的有效性. 游中华等人^[170]和黄华^[171]也利用基于 *COI* 基因的条形码

技术对 10 种危害芒果的蓟马进行了鉴定,并分析了种间遗传分化及亲缘关系,发现不同寄主植物的茶黄硬蓟马(*Th. setotus* Moulton)已具有一定程度的遗传分化. 张利娟等人^[172]利用 *COI* 基因研究了云南榕母管蓟马(*Gynairothrips uzeli* Zimmerman)不同地理种群的遗传关系,发现各地理种群间已有明显的遗传分化. Macharia 等人^[173]通过对肯尼亚番茄上蓟马的鉴定研究,发现番茄蓟马(*Ceratothripoides brunneus* Bagnall)、西花蓟马、烟蓟马(孤雌产雄品系)为该国的优势蓟马种类. Tyagi 等人^[174]的鉴定则确认, *Th. parvispinus* (Karny)已入侵印度. 而基于 SS-*COI* 技术对不同地理种群和虫态的西花蓟马^[175]和烟蓟马^[176]的检测鉴定研究,也常见报道. 此外, DNA 条形码技术在蓟马种类鉴定中亦得到了广泛应用^[177-179]. 例如, 乔玮娜等人^[180]对我国常见的 25 种蓟马的 *COI* 基因序列进行了分析,表明基于 *COI* 基因的条形码技术完全可用于蓟马的快速准确鉴别;同时整合团队现有研究和数据库已有的数据和信息,构建了蓟马类昆虫 DNA 条形码识别系统,该系统收录了 133 种蓟马共计 1671 条 *COI* 基因序列信息^[181],初步实现了蓟马类害虫的远程鉴定和实时监测.

在蓟马系统发育和遗传进化方面, DNA 条形码也取得了广泛应用. Buckman 等人^[182]将 *COI* 基因与 *18S*, *28S*, *Histone 3*, *Tubulin-alpha 1* 基因相结合,以 9 科 70 属 99 种缨翅目昆虫为靶标,基于最大简约法、最大似然法和贝叶斯法,探讨了其分类系统. 武晓云等人^[183]通过对 *COI* 基因和 ITS2 序列的比较分析,发现与 ITS2 较大的变异相比, *COI* 基因更适用于西花蓟马的遗传分析. Brunner 和 Frey^[184]联合 DNA 条形码与微卫星标记对美国西部的西花蓟马种群进行遗传结构分析,发现在起源地西花蓟马种群已发生了明显分化,且存在株系或隐存种现象,进而推测,该分化是由环境差异造成的,与形态无关,并据此将其分为温室品系和羽扇豆品系. 而 Rugman-Jones 等人^[185]的研究,也发现了类似的现象. Mirnezhad 等人^[186]则利用 DNA 条形码鉴定发现,采自荷兰的所有西花蓟马种群均为温室品系. 而国内对西花蓟马种群遗传结构的研究表明,我国的西花蓟马亦存在两个分支,其遗传距离为 3.3%,表明温室品系和羽扇豆品系均已入侵我国^[183,187,188];广泛入侵我国的温室品系可能

存在多个入侵来源,或是同一来源的多次入侵,或是多个来源的多次入侵^[188]. 入侵我国的西花蓟马其种群的遗传多样性低于原产地,而且在其种群快速扩张过程中存在桥头堡效应和遗传瓶颈现象(genetic bottleneck)^[187]. 同时, Kobayashi 和 Hasegawa^[189]利用基于 *COI* 基因的条形码技术对烟蓟马进行分析,发现烟蓟马具有不同的亚种或隐存种,并将其分为孤雌产雄(arrhenotoky)和孤雌产雌(thelytoky)两个分支,与之前 Brunner 等^[190]及 Toda 和 Murai^[191]的研究结果一致. 烟蓟马还存在寄主植物适应性和传播番茄斑萎病毒能力的分化^[190,192,193]. 此外, Nault 等人^[194]研究发现,田间采集的 565 头烟蓟马个体中存在有 8 种 *COI* 基因单倍型,且均为孤雌产雌支系;利用 DNA 条形码技术,明确了不同单倍型的烟蓟马在田间的种群动态. Sogo 等人^[195]的研究则发现,基于 *COI* 基因的序列进化分析由于将少部分孤雌产雄个体归入了孤雌产雌分支,因此建议最好结合其他的分子标记方法进行进一步的分析研究. 另外,以棕榈蓟马^[196]、豆带巢针蓟马(*Caliothrips fasciatus* (Pergande))^[197]、芒果茶黄蓟马(*Scirtothrips dorsalis* Hood)^[196,198,199]等为靶标的研究也发现了隐存种现象. 而 *COI* 基因结合核基因的研究还发现,芒果茶黄蓟马存在 9 个隐种和 2 个形态上可以鉴别的种,其中 South Asia 1 具有高度的入侵性, South Asia 2 和 East Asia 1 则尚处于全球入侵的初始阶段,而其他种则为本地种^[200]. 与此同时, Rebijith 等人^[201]利用 DNA 条形码对 151 种蓟马的 *COI* 基因序列的分析发现,其种内遗传距离小于 7.9%,种间遗传距离为 8.7%~31.2%,亦验证了上述蓟马的隐存种现象,同时也进一步证实了 DNA 条形码技术在蓟马隐种发现中的作用.

2.5 在其他重大农林入侵害虫研究中的应用

与此同时,基于 *COI* 基因的 DNA 条形码技术在其他重大农林入侵害虫的种类鉴定和系统发育研究中同样亦得到了广泛应用. 例如,针对重大检疫性害虫苹果蠹蛾(*Cydia pomonella* (L)), Firlej 等人^[202]和李腾等人^[203]验证了 DNA 条形码技术在幼虫鉴定中的有效性,基于 *COI* 基因研发出了苹果蠹蛾种特异性 PCR 检测技术^[204]和荧光定量 PCR 检测技术^[205]. 此外, Meraner 等人^[206]通过联合应用 *COI* 基因和线粒体

ND5 及控制区序列分析,发现中欧地区的苹果蠹蛾存在两个支系,并推测更新世的冰川作用可能是导致地理隔离的主要原因.而董昆^[207]、李亦松^[208]和 Li 等人^[209]通过与国外苹果蠹蛾种群线粒体 *COI* 等基因的比较分析发现,我国疫区的苹果蠹蛾遗传变异度较低,尚无明显的地理分布格局,推测我国的苹果蠹蛾来源于欧洲,具有自西向东扩张的趋势,其中甘肃的苹果蠹蛾可能由新疆传入,而黑龙江的种群可能为多重入侵.针对重大危险性害虫红火蚁(*Solenopsis invicta* Buren),何晓芳等人^[210]通过对国内 13 个种群的研究发现,入侵我国的红火蚁存在 3 种单倍型,其中香港地区的红火蚁种群多样性最丰富,其来源地可能是阿根廷或南美洲.之后,陈岩等人^[211]以 *COI* 基因为靶标,构建了包括红火蚁在内的火蚁属部分种类 DNA 条形码鉴定系统.徐浪等人^[212]则基于 *COI* 基因的序列分析,开发了红火蚁的荧光定量 PCR 检测技术.此外,Armstrong^[213]利用 DNA 条形码技术完成了对不同体色美国白蛾(*Hyphantria cunea* Drury)幼虫的鉴定.

3 展望

近年来,基于 *COI* 基因的 DNA 条形码鉴定技术发展迅猛,极大地促进了外来物种的鉴定及其分子系统学研究的发展,为重大农林入侵害虫的检测监测提供了一种快速准确的方法,也为探究外来入侵昆虫的分类地位、入侵来源、扩散途径,揭示其入侵机制,提供了一种强有力的技术手段.然而,基于 *COI* 基因的单基因条形码技术亦受到部分专家的质疑,而且不可避免地存在一定的局限性.因此,要充分认识到 DNA 条形码不应完全脱离经典的形态学研究方法,应正确定位 DNA 条形码在物种识别鉴定中的地位 and 作用,并将其与形态学、生态学等特征有机地结合,互为补充,更好地服务于入侵昆虫学的相关研究.因而,发展无损伤 DNA 提取技术具有非常重要的现实意义.同时,联合应用扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)等技术和 DNA 条形码,减少形态学鉴定对 DNA 提取的影响,进而实现形态学鉴定与分子生物学鉴定的完美结合,亦不失为一种两全之策^[214].

就基于 *COI* 基因的 DNA 条形码而言,由于入侵

昆虫相关类群的种类繁多,且具有丰富的遗传变异,而大量的同源序列对 DNA 条形码鉴定物种的有效性又至关重要,因此应继续扩大 DNA 条形码数据库对种内和种间遗传变异的覆盖度;在扩充 *COI* 基因序列数据的同时还应增补物种的形态、分布、危害等生物学信息,以增加其检测鉴定的可靠性.而针对通用型引物对部分物种扩增的有效性不高以及 *numt* 假基因的干扰问题^[80,215],则应在大量序列分析的基础上设计基因特异性更高^[80]、物种通用性更强^[216,217]的引物,实现对更多物种的条形码鉴定.针对长久保存的馆藏标本发展的 mini-barcode 技术,尚有待进一步深化研究^[76,218].此外,基于进化树、遗传距离以及序列特征值等的序列分析方法的创新,对提高条形码鉴定的成功率和准确度亦十分必要^[219-222].

其次,对于存在杂交和基因渗透的类群、新分化的物种、演化速度比较慢的物种,以及存在隐存种或复合种的类群,基于 *COI* 基因的 DNA 条形码鉴定技术仍存在些许不足^[223,224].因此,必须突破单一分子标记的局限性,将线粒体基因与核基因等分子标记联合应用,以实现入侵物种的有效鉴定^[84].基于线粒体基因组甚至全基因组的遗传变异位点分析^[225,226],同样有助于挖掘有效的物种鉴定的分子标记.针对隐存种和复合种,需要结合形态学、遗传学、行为学等多学科证据开展进一步研究,明确物种的界定标准.同时还应注意的是,大多数种类的昆虫具有共生菌,而内共生菌的存在亦会导致 mtDNA 序列的种内遗传距离的变化,进而显著影响基于 *COI* 基因的 DNA 条形码物种鉴定的准确性;因此,将内共生菌基因与条形码技术综合分析,必将有助于从更深层次揭示昆虫的遗传进化和系统发育^[68,227,228].

此外,还要充分发挥 RFLP 技术、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分手标记^[229]、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[230]、荧光定量 PCR 技术、微卫星标记^[187]、基因芯片技术^[94]等其他分子手段在昆虫鉴定中的作用.诚然,系统化、规模化和标准化的昆虫物种鉴定手段的形成与完善,必将在外来入侵物种预警和监控中发挥巨大的作用,并为“一带一路”区域农业绿色生产与健康发展,以及国家粮食安全与生态安全提供强有力的保障.

参考文献

- 1 Wan F H, Yang N W. Invasion and management of agricultural alien insects in China. *Annu Rev Entomol*, 2016, 61: 77–98
- 2 万方浩, 郑小波, 郭建英. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 北京: 科学出版社, 2005. 11–23
- 3 张亚平. 我国生物入侵现状与对策. *中国科学院院刊*, 2009, 24: 411–413
- 4 Mora C, Tittensor D P, Adl S, et al. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol*, 2011, 9: e1001127
- 5 Brown J K, Frohlich D R, Rossell R C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu Rev Entomol*, 1995, 40: 511–534
- 6 杨倩倩, 李志红, 伍伟, 等. 线粒体 *COI* 基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用. *应用昆虫学报*, 2012, 49: 1687–1695
- 7 李志红, Buahom Nopparat, 胡俊韬, 等. 实蝇科害虫入侵来源与入侵机制研究进展. *植物检疫*, 2013, 27: 1–12
- 8 李志红, 姜帆, 马兴莉, 等. 实蝇科害虫入侵防控技术研究进展. *植物检疫*, 2013, 27: 1–10
- 9 Hebert P D N, Cywinska A, Ball L, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Roy Soc B-Biol Sci*, 2003, 270: 313–321
- 10 Hebert P D N, Ratnasingham S, DeWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc Roy Soc B-Biol Sci*, 2003, 270: S96–S99
- 11 Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes*, 2007, 7: 355–364
- 12 Hajibabaei M, Natalia J R D, Ratnasingham S, et al. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos T R Soc B*, 2005, 360: 1959–1967
- 13 Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 14812–14817
- 14 Hajibabaei M, Janzen D H, Bums J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 968–971
- 15 Silva-Brandão K L, Lyra M L, Freitas A V L. Barcoding Lepidoptera: current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotrop Entomol*, 2009, 38: 441–451
- 16 Smith M A, Rodriguez J J, Whitfield J B, et al. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12359–12364
- 17 Scheffer S J, Lewis M L, Joshi R C. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Ann Entomol Soc Am*, 2006, 99: 204–210
- 18 Buahom Nopparat, 李志红, 吴佳教, 等. 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*, 2011, 25: 49–52
- 19 Cardoso A, Vogler A P. DNA taxonomy, phylogeny and pleistocene diversification of the *Cicindela* hybrid species group (Coleoptera: Cicindelidae). *Mol Ecol*, 2005, 4: 3531–3546
- 20 Favret C, Voegtlin D J. Speciation by host-switching in pinyon *Cinara* (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 32: 139–151
- 21 Schindel D E, Miller S E. DNA barcoding, a useful tool for taxonomists. *Nature*, 2005, 435: 17
- 22 Chandni P K, Doerder F P, Jason C, et al. Barcoding Tetrahymena: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I (cox-1) barcode. *Protist*, 2010, 162: 2–13
- 23 Pauls S U, Blahnik R J, Zhou X, et al. DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in *Chilean Smicridea* (Smicridea) (Trichoptera: Hydropsychidae). *J N Am Benthol Soc*, 2010, 29: 1058–1074
- 24 Smith M A, Wood D M, Janzen D H, et al. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 4967–4972
- 25 Clare E L, Fraser E E, Braid H E, et al. Species on the menu of a generalist predator, the eastern red bat (*Lasiurus borealis*): using a molecular approach to detect arthropod prey. *Mol Ecol*, 2009, 18: 2532–2542
- 26 张桂芬, 吕志创, 万方浩. 捕食性天敌昆虫控害作用定量评价方法. *应用昆虫学报*, 2014, 51: 299–301
- 27 Vestheim H, Edvardsen B, Kaartvedt S. Assessing feeding of a carnivorous copepod using species-specific PCR. *Mar Biol*, 2005, 147: 381–385
- 28 张桂芬, 郭建洋, 王瑞, 等. 双钩巢粉虱的种特异性 SS-COI 检测技术. *生物安全学报*, 2013, 22: 157–162
- 29 万方浩, 侯有明, 蒋明星. 入侵生物学. 北京: 科学出版社, 2015. 2–5
- 30 Darling J A, Blum M J. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol Invasions*, 2007, 9: 751–765
- 31 Davis G A, Havill N P, Adelman Z N, et al. DNA barcodes and molecular diagnostics to distinguish an introduced and native *Laricobius*

- (Coleoptera: Derodontidae) species in eastern North America. *Biol Control*, 2011, 58: 53–59
- 32 Nagoshi R N, Brambila J, Meagher R L. Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm Spodoptera species in Florida. *J Insect Sci*, 2011, 11: 154
 - 33 Valdez-Moreno M, Quintal-Lizama C, Gómez-Lozano R, et al. Monitoring an alien invasion: DNA barcoding and the identification of lionfish and their prey on coral reefs of the Mexican Caribbean. *PLoS One*, 2012, 7: e36636
 - 34 Miller D R, Miller G L, Hodges G S, et al. Introduced scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of the United States and their impact on U.S. agriculture. *P Entomol Soc Wash*, 2005, 107: 123–158
 - 35 武三安. 中国大陆有害蚧虫名录及组成成分分析(半翅目: 蚧总科). *北京林业大学学报*, 2009, 4: 55–63
 - 36 赵春亮. 广东省发现湿地松粉蚧. *江西林业科技*, 1992, 5: 48
 - 37 武三安, 张润志. 威胁棉花生产的外来入侵新害虫——扶桑绵粉蚧. *昆虫知识*, 2009, 46: 159–162
 - 38 武三安, 南楠, 吕渊. 中国大陆一新入侵种——美地绵粉蚧. *昆虫分类学报*, 2010, 32: 8–12
 - 39 覃振强, 吴建辉, 任顺祥, 等. 外来入侵害虫新菠萝灰粉蚧在中国的风险性分析. *中国农业科学*, 2010, 43: 626–633
 - 40 李海斌, 武三安. 外来入侵新害虫——无花果蜡蚧. *应用昆虫学报*, 2013, 50: 1295–1300
 - 41 邓鋈, 李海斌, 王戎勃, 等. 我国大陆一新入侵种: 七角星蜡蚧(半翅目: 蚧总科: 蚧科). *应用昆虫学报*, 2014, 51: 278–282
 - 42 张江涛, 武三安. 中国大陆一新入侵种——木瓜秀粉蚧. *环境昆虫学报*, 2015, 37: 441–447
 - 43 徐浪, 余道坚, 焦懿, 等. 大洋臀纹粉蚧和南洋臀纹粉蚧 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法. *植物检疫*, 2010, 24: 24–28
 - 44 付海滨, 曲辉, 李惠萍, 等. 警惕危险性害虫——葡萄粉蚧入侵我国. *环境昆虫学报*, 2010, 32: 283–286
 - 45 武三安, 王艳平. 警惕木薯绵粉蚧入侵我国. *环境昆虫学报*, 2011, 33: 122–125
 - 46 Malausa T, Fenis A, Warot S, et al. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). *J Appl Entomol*, 2009, 135: 142–155
 - 47 Ashfaq M, Noor A R, Mansoor S. DNA-based characterization of an invasive mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) species damaging cotton in Pakistan. *Appl Entomol Zool*, 2010, 45: 395–404
 - 48 Hosseini R, Hajizadeh J. Molecular identification of three of the most important mealybug species (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae) on ornamental plants in Guilan Province, Iran. *Zootaxa*, 2011, 3009: 46–54
 - 49 Park D S, Suh S J, Hebert P D N, et al. DNA barcodes for two scale insect families, mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and armored scales (Hemiptera: Diaspididae). *Bull Entomol Res*, 2011, 101: 429–434
 - 50 Gullan P J, Downie D A, Steffan S A. A new pest species of the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae) from the United States. *Ann Entomol Soc Am*, 2003, 96: 723–737
 - 51 Saccaggi D L, Krüger K, Pietersen G. A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). *Bull Entomol Res*, 2008, 98: 27–33
 - 52 Rung A, Scheffer S J, Evans G, et al. Molecular identification of two closely related species of mealybugs of the genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Ann Entomol Soc Am*, 2008, 101: 525–532
 - 53 田虎. 介壳虫类昆虫 DNA 条形码识别技术研究. 硕士学位论文, 北京: 中国农业科学院, 2013
 - 54 田虎, 李小凤, 万方浩, 等. 利用种特异性 *COI* 引物(SS-COI)鉴别扶桑绵粉蚧. *昆虫学报*, 2013, 56: 689–696
 - 55 何衍彪, 万宣伍, 詹儒林. 基于 DNA 序列的 12 种粉蚧亲缘关系分析. *热带作物学报*, 2011, 32: 2324–2330
 - 56 Deng J, Yu F, Zhang T X, et al. DNA barcoding of six Cero-plastes species (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) from China. *Mol Ecol Resour*, 2012, 12: 791–796
 - 57 Sethusa M T, Millar I M, Yessoufou K, et al. DNA barcode efficacy for the identification of economically important scale insects (Hemiptera: Coccoidea) in South Africa. *Afr Entomol*, 2014, 22: 257–266
 - 58 Wang X B, Deng J, Zhang J T, et al. DNA barcoding of common soft scales (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) in China. *Bull Entomol Res*, 2015, 105: 545–554
 - 59 Pieterse W, Muller D L, Jansen van Vuuren B. A molecular identification approach for five species of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) on citrus fruit exported from South Africa. *Afr Entomol*, 2010, 18: 23–28
 - 60 Beltrà A, Soto A, Malausa T. Molecular and morphological characterisation of Pseudococcidae surveyed on crops and ornamental plants in Spain. *Bull Entomol Res*, 2012, 102: 165–172
 - 61 Correa M C G, Germain J F, Malausa T, et al. Molecular and morphological characterization of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Chilean vineyards. *Bull Entomol Res*, 2012, 102: 524–530
 - 62 徐浪, 余道坚, 焦懿, 等. 新菠萝灰粉蚧及其近似种的 DNA 条形码鉴定. *植物检疫*, 2013, 27: 66–69
 - 63 Pacheco da Silva V C, Bertin A, Blin A, et al. Molecular and morphological identification of mealybug species (Hemiptera:

- Pseudococcidae) in Brazilian vineyards. PLoS One, 2014, 9: e103267
- 64 Wu F, Liu Z, Shen H, et al. Morphological and molecular identification of *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Yunnan, China. Fla Entomol, 2014, 97: 1469–1473
- 65 Ramasubramanian T, Ramaraju K, Nirmala R. *COI* gene-based species diagnostic kit for sugarcane scale insect, *Melanaspis glomerata* (Green) (Homoptera: Diaspididae). Sugar Tech, 2015, doi: 10.1007/s12355-015-0394-x
- 66 顾渝娟, 刘海军, 梁帆, 等. 一种重要的有害生物——木瓜粉蚧. 植物检疫, 2015, 29: 57–60
- 67 Deng J, Wang X B, Yu F, et al. Rapid diagnosis of the invasive wax scale, *Ceroplastes rusci* Linnaeus (Hemiptera: Coccoidea: Coccidae) using nested PCR. J Appl Entomol, 2015, 139: 314–319
- 68 Beltrà A, Addison P, Ávalos J A, et al. Guiding classical biological control of an invasive mealybug using integrative taxonomy. PLoS One, 2015, 10: e0128685
- 69 Gullan P J, Kaydan M B, Hardy N B. Molecular phylogeny and species recognition in the mealybug genus *Ferrisia* Fullaway (Hemiptera: Pseudococcidae). Syst Entomol, 2010, 35: 329–339
- 70 褚栋, 刘国霞, 付海滨, 等. 线粒体细胞色素氧化酶 I (mtCOI) 序列分析揭示扶桑绵粉蚧复合种存在隐存谱系. 昆虫学报, 2009, 52: 1261–1265
- 71 陈哲, 张姜, 傅杭飞, 等. 基于形态特征和线粒体 *COI* 基因探讨扶桑绵粉蚧物种的有效性并记述一体色变异型扶桑绵粉蚧. 生物多样性, 2012, 20: 443–450
- 72 Zhao J, Watson G W, Sun Y, et al. Phenotypic variation and identification of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) in China. Zootaxa, 2014, 3802: 109–121
- 73 Ahmed M Z, Ma J, Qiu B L, et al. Genetic record for a recent invasion of *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Asia. Environ Entomol, 2015, 44: 907–918
- 74 Wu F Z, Ma J, Hu X N, et al. Homology difference analysis of invasive mealybug species *Phenacoccus solenopsis* Tinsley in Southern China with *COI* gene sequence variability. Bull Entomol Res, 2015, 105: 32–39
- 75 He Y B, Wan X W, Liu Y H, et al. Mitochondrial COI from *Dysmicoccus brevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae) suggests cryptic lineage and pinpoints the source of the introduction to China. Fla Entomol, 2012, 95: 183–191
- 76 Van Houdt J K J, Breman F C, Virgilio M, et al. Recovering full DNA barcodes from natural history collections of Tephritid fruitflies (Tephritidae, Diptera) using mini barcodes. Mol Ecol Resour, 2010, 10: 459–465
- 77 Barr N B, Islam M S, DeMeyer M, et al. Molecular identification of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) using DNA sequences of the COI barcode region. Ann Entomol Soc Am, 2012, 105: 339–350
- 78 Armstrong K F, Ball S L. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. Philos T R Soc B, 2005, 360: 1813–1823
- 79 Virgilio M, Backeljau T, Barr N, et al. Molecular evaluation of nominal species in the *Ceratitis fasciventris*, *C. ananæ*, *C. rosa* complex (Diptera: Tephritidae). Mol Phylogenet Evol, 2008, 48: 270–280
- 80 Blacket M J, Semeraro L, Malipatil M B. Barcoding Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*): impediments and improvements. Mol Ecol Resour, 2012, 12: 428–436
- 81 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. PLoS One, 2012, 7: e44862
- 82 Schutze M K, Krosch M N, Armstrong K F, et al. Population structure of *Bactrocera dorsalis* s.s., *B. papayae* and *B. philippinensis* (Diptera: Tephritidae) in southeast Asia: evidence for a single species hypothesis using mitochondrial DNA and wing-shape data. BMC Evol Biol, 2012, 12: 130
- 83 Schutze M K, Mahmood K, Pavasovic A, et al. One and the same: integrative taxonomic evidence that *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) is the same species as the Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. Syst Entomol, 2015, 40: 472–486
- 84 Boykin L M, Schutze M K, Krosch M N, et al. Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. J Appl Entomol, 2014, 138: 235–253
- 85 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. Syst Entomol, 2015, 40: 456–471
- 86 Virgilio M, Jordaens K, Breman F C, et al. Identifying insects with incomplete DNA barcode libraries, African fruit flies (Diptera: Tephritidae) as a test case. PLoS One, 2012, 7: e31581
- 87 Smit J, Reijnen B, Stokvis F. Half of the European fruit fly species barcoded (Diptera, Tephritidae); a feasibility test for molecular identification. ZooKeys, 2013: 279–305

- 88 梁亮, 江威, 余慧, 等. 中国果实蝇属种类的 DNA 条形码鉴定(双翅目, 实蝇科). 动物分类学报, 2011, 36: 925–932
- 89 Li Z M, Li Z H, Wang F X, et al. TBIS: a web-based expert system for identification of terphritid fruit flies in China based on DNA barcode. In: Li D, Liu Y, Chen Y, Eds. Computer and Computing Technologies in Agriculture IV—Proceedings of 4th IFIP TC 12 Conference (CCTA2010) Part III. Berlin: Springer, 2011. 563–571
- 90 刘慎思, 张桂芬, 武强, 等. 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. 昆虫学报, 2012, 55: 336–343
- 91 刘慎思, 张桂芬, 万方浩. 基于 mtDNA *COI* 基因的离腹寡毛实蝇属常见种的条形码识别和系统发育分析. 昆虫学报, 2014, 57: 331–339
- 92 刘慎思. DNA 条形码技术在主要实蝇类害虫识别中的应用. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学, 2012
- 93 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. Mol Ecol Resour, 2014, 14: 1114–1128
- 94 姜帆. 我国检疫性实蝇分子鉴定技术体系的研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2015
- 95 Jiang F, Li Z H, Deng Y L, et al. Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. Bull Entomol Res, 2013, 103: 363–371
- 96 Jiang F, Li Z H, Wu J J, et al. A rapid diagnostic tool for two species of *Tetracus* (Diptera: Tephritidae: Bactrocera) based on species-specific PCR. J Appl Entomol, 2014, 138: 418–422
- 97 姜帆, 刘佳琪, 李志红. 基于 DNA 条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究. 植物保护, 2011, 37: 150–153
- 98 Liu L, Liu J, Wang Q, et al. Identification of *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) from Burundi, based on morphological characteristics and DNA barcode. Afr J Biotechnol, 2011, 10: 13623–13630
- 99 龚秀泽, Buahom Nopparat, 卢厚林, 等. 利用 DNA 条形码技术对截获瓜实蝇幼虫的鉴定研究. 植物检疫, 2014, 28: 57–60
- 100 王书平, 朱雅君, 葛畅, 等. 旅检截留芒果上两种实蝇的分子鉴定. 植物检疫, 2015, 29: 66–69
- 101 Hu J, Zhang J L, Nardi F, et al. Population genetic structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), from China and Southeast Asia. Genetica, 2008, 134: 319–324
- 102 Prabhakar C S, Mehta P K, Sood P, et al. Population genetic structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase (*COI*) gene sequences. Genetica, 2012, 140: 83–91
- 103 Wu Y, McPherson B A, Wu J J, et al. Genetic relationship of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA. Insect Sci, 2012, 19: 195–204
- 104 Buahom Nopparat. 世界主要分布区番石榴果实蝇种群遗传结构研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2014
- 105 Kunprom C, Sopaladawan P N, Pramual P. Population genetics and demographic history of guava fruit fly *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) in northeastern Thailand. Eur J Entomol, 2015, 112: 227–234
- 106 Prabhakar C S, Sood P, Mehta P K, et al. Population genetic structure of the pumpkin fruit fly, *Bactrocera tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae) in Himachal Pradesh, India. Biochem Syst Ecol, 2013, 51: 291–296
- 107 Nardi F, Carapelli A, Dallai R, et al. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Mol Ecol, 2005, 14: 2729–2738
- 108 Matallanas B, Lantero E, M'Saad M, et al. Genetic polymorphism at the cytochrome oxidase I gene in mediterranean populations of *Bactrocera Oleae* (Diptera: Tephritidae). J Appl Entomol, 2013, 137: 624–630
- 109 Abd-El-Samie E M, El Fiky Z A. Molecular phylogeny and identification of the peach fruit fly, *Bactrocera zonata*, established in Egypt. J Insect Sci, 2011, 11: article 177
- 110 Meeyen K, Nanork Sopaladawan P, Pramual P. Population structure, population history and DNA barcoding of fruit fly *Bactrocera latifrons* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). Entomol Sci, 2014, 17: 219–230
- 111 Wan XW, Nardi F, Zhang B, et al. The Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in China: origin and gradual inland range expansion associated with population growth. PLoS One, 2011, 6: e25238
- 112 Wan XW, Liu YH, Zhang B. Invasion history of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in the Pacific-Asia region: two main invasion routes. PLoS One, 2012, 7: e36176
- 113 Li Y, Wu Y, Chen H, et al. Population structure and colonization of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in China, inferred from mtDNA *COI* sequences. J Appl Entomol, 2012, 136: 241–251
- 114 Shi W, Kerdelhué C, Ye H. Genetic structure and inferences on potential source areas for *Bactrocera dorsalis* (Hendel) based on mitochondrial and microsatellite markers. PLoS One, 2012, 7: e37083
- 115 Martin J H, Mound L A. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). Zootaxa, 2007, 1492: 1–84
- 116 阎凤鸣, 李大建. 粉虱分类的基本概况和我国常见种的识别. 北京农业科学, 2000, 18: 20–30

- 117 褚栋, 张友军, 丛斌, 等. 烟粉虱不同地理种群的 *mtCOI* 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学, 2005, 38: 76–85
- 118 虞国跃, 张国良, 彭正强, 等. 螺旋粉虱入侵我国海南. 昆虫知识, 2007, 44: 428–431
- 119 虞国跃, 符悦冠, 贤振华. 海南、广西发现外来双钩巢粉虱. 环境昆虫学报, 2010, 32: 275–279
- 120 洗晓青, 宋文进, 万方浩, 等. 警惕新入侵昆虫栉粉虱 *Siphoninus phillyreae* (Haliday) 在中国大陆扩散. 植物保护, 2015, 41: 33–37
- 121 张桂芬, 洗晓青, 张金良, 等. 甘蓝粉虱入侵中国大陆. 生物安全学报, 2014, 23: 66–70
- 122 Thomas A, Ramamurthy V V. Multiple gene markers to understand genetic diversity in the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) species complex. Fla Entomol, 2014, 97: 1451–1457
- 123 罗晨, 姚远, 王戎疆, 等. 利用 *mtCOI* 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报, 2002, 45: 759–763
- 124 陈冲, 马娟, 王欣茹, 等. 湖北省烟粉虱生物型鉴定. 应用昆虫学报, 2011, 48: 22–26
- 125 段晓东, 马丽娟, 姚正培, 等. 新疆地区烟粉虱类群 *mtDNA COI* 基因序列分析. 生物安全学报, 2011, 20: 50–55
- 126 沈媛, 杜予州, 任顺祥, 等. 江苏地区烟粉虱生物型演替研究初报. 应用昆虫学报, 2011, 48: 16–21
- 127 王少丽, 张友军, 李如美, 等. 北京和湖南烟粉虱生物型及其抗药性监测. 应用昆虫学报, 2011, 48: 27–31
- 128 谭永安, 肖留斌, 孙洋, 等. 江苏烟粉虱生物型鉴定与危害程度分析. 环境昆虫学报, 2012, 34: 277–282
- 129 曹骞, 李晶, 买热木古丽·克依木, 等. 新疆地区烟粉虱生物型的区域分布及其携带的番茄黄化曲叶病毒检测. 昆虫学报, 2013, 56: 652–664
- 130 李洪冉, 刘馨, 刘小龙, 等. 田间系统调查表明山东省农区烟粉虱优势种为 Q 隐种. 昆虫学报, 2015, 58: 811–816
- 131 许丽丽, 蔡力, 沈伟江, 等. 中国部分地区烟粉虱生物型种类及系统发育关系分析. 应用生态学报, 2014, 25: 1137–1144
- 132 陈苗苗. 基于 *mtDNA COI* 与 *rDNA ITS1* 双基因的烟粉虱隐种鉴定及 MED 和 MEAM1 隐种的种群遗传结构分析. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2015
- 133 Chu D, Jiang T, Liu G X, et al. Biotype status and distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in Shandong Province of China based on mitochondrial DNA markers. Environ Entomol, 2007, 36: 1290–1295
- 134 Guo X J, Rao Q, Zhang F, et al. Diversity and genetic differentiation of the whitefly *Bemisia tabaci* species complex in China based on *mtCOI* and *cDNA-AFLP* analysis. J Integr Agr, 2012, 11: 206–214
- 135 Wang Z, Yan H, Yang Y, et al. Biotype and insecticide resistance status of the whitefly *Bemisia tabaci* from China. Pest Manag Sci, 2010, 66: 1360–1366
- 136 Hu J, De Barro P, Zhao H, et al. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. PLoS One, 2011, 6: e16061
- 137 Chu D, Wan F H, Tao Y L, et al. Genetic differentiation of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q based on mitochondrial DNA markers. Insect Sci, 2008, 15: 115–123
- 138 滕希. Q 型烟粉虱在中国的发生现状及其基于 *mtCOI* 序列的系统发育分析. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2009
- 139 Ahmed M Z, Shatters R G, Ren S X, et al. Genetic distinctions among the Mediterranean and Chinese populations of *Bemisia tabaci* Q biotype and their endosymbiont *Wolbachia* populations. J Appl Entomol, 2009, 133: 733–741
- 140 De Barro P, Ahmed M Z. Genetic networking of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex reveals pattern of biological invasions. PLoS One, 2011, 6: e25579
- 141 Chu D, Gao C S, De Barro P, et al. Investigation of the genetic diversity of an invasive whitefly (*Bemisia tabaci*) in China using both mitochondrial and nuclear DNA markers. Bull Entomol Res, 2011, 101: 467–475
- 142 Boykin L M, Shatters Jr R G, Rosell R C, et al. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial *COI* DNA sequences. Mol Phylogenet Evol, 2007, 44: 1306–1319
- 143 Dinsdale A, Cook L, Riginos C, et al. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. Ann Entomol Soc Am, 2010, 103: 196–208
- 144 Alemandri V, De Barro P, Bejerman N, et al. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. J Econ Entomol, 2012, 105: 48–53
- 145 Firdaus S, Vosman B, Hidayati N, et al. The *Bemisia tabaci* species complex: additions from different parts of the world. Insect Sci, 2013, 20: 723–733
- 146 Lee W, Park J, Lee G S, et al. Taxonomic status of the *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and reassessment of the number of its constituent species. PLoS One, 2013, 8: e63817
- 147 Malumphy C, Suarez M B, Glover R, et al. Morphological and molecular evidence supporting the validity of *Trialeurodes lauri* and *T. ricini* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae). Eur J Entomol, 2007, 104: 295–301
- 148 Ovalle T M, Parsa S, Hernández M P, et al. Reliable molecular identification of nine tropical whitefly species. Ecol Evol, 2014, 4:

3778–3787

- 149 于卫卫. 上海粉虱种类及烟粉虱生物型分子鉴定. 硕士学位论文. 南昌: 江西农业大学, 2012
- 150 李小凤, 田虎, 张金良, 等. 基于 *COI* 基因 5'端与 3'端序列田间常见粉虱的分子鉴定. 昆虫学报, 2014, 57: 466–476
- 151 李小凤. 我国常见粉虱种类 DNA 条形码鉴定及其在入侵生物学中的应用. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2014
- 152 Dickey A M, Stocks I C, Smith T, et al. DNA barcode development for three recent exotic whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) invaders in Florida. *Fla Entomol*, 2015, 98: 473–478
- 153 胡雅辉, 任顺祥, 肖伏莲. 湖南黑刺粉虱不同寄主植物种群和不同地理种群的 *COI* 基因分化. 环境昆虫学报, 2012, 34: 128–134
- 154 于卫卫, 杨文晏, 杜予州, 等. 海南地区螺旋粉虱种群 mtDNA-*COI* 和 rDNA-*ITS1* 基因的序列及系统发育分析. 昆虫学报, 2013, 56: 1324–1334
- 155 柴建萍, 江秀均, 倪婧, 等. 云南蚕区新入侵桑树害虫双钩巢粉虱的初步鉴定. 蚕业科学, 2015, 41: 603–607
- 156 张桂芬, 吴霞, 郭建英, 等. 螺旋粉虱 SCAR 标记的建立与应用. 植物保护学报, 2010, 37: 385–390
- 157 李伟东, 刘福秀, 韩玉春. 螺旋粉虱的分子检测方法. 植物检疫, 2012, 26: 9–13
- 158 陈苗苗, 郭荣, 张金良, 等. 基于种特异性 *COI* 标记的新入侵种甘蓝粉虱快速鉴定技术. 昆虫学报, 2015, 58: 579–586
- 159 Maruthi M N, Rekha A R, Sseruwagi P, et al. Mitochondrial DNA variability and development of a PCR diagnostic test for populations of the whitefly *Bemisia afer* (Priesner and Hosny). *Mol Biotechnol*, 2007, 35: 31–40
- 160 Chu D, Liu G X, Wan F H, et al. Phylogenetic analysis and rapid identification of the whitefly, *Bemisia afer*, in China. *J Insect Sci*, 2010, 10: 1–9
- 161 Prijić M, Škaljac M, Drobnjaković T, et al. Genetic variation of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae), among populations from Serbia and neighbouring countries, as inferred from *COI* sequence variability. *Bull Entomol Res*, 2014, 104: 357–366
- 162 Roopa H K, Kumar N K K, Asokan R, et al. Phylogenetic analysis of *Trialeurodes* spp. (Hemiptera: Aleyrodidae) from India based on differences in mitochondrial and nuclear DNA. *Fla Entomol*, 2012, 95: 1086–1094
- 163 Kapantaidaki D E, Ovčarenko I, Fytro N, et al. Low levels of mitochondrial DNA and symbiont diversity in the worldwide agricultural pest, the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *J Hered*, 2015, 106: 80–92
- 164 Morse J G, Hoddle S. Invasion biology of thrips. *Annu Rev Entomol*, 2006, 51: 67–89
- 165 Kirk W D J, Terry L I. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agr Forest Entomol*, 2003, 5: 301–310
- 166 Walsh K, Boonham N, Barker I, et al. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysan., Thripidae). *J Appl Entomol*, 2005, 129: 272–279
- 167 Asokan R, Krishna Kumar N K, Kumar V, et al. Molecular differences in the mitochondrial cytochrome oxidase I (*mtCOI*) gene and development of a species-specific marker for onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, and melon thrips, *T. palmi* Karny (Thysanoptera: Thripidae), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae). *Bull Entomol Res*, 2007, 97: 461–470
- 168 Glover R H, Collins D W, Walsh K, et al. Assessment of loci for DNA barcoding in the genus Thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Mol Ecol Resour*, 2010, 10: 51–59
- 169 魏书军, 马吉德, 石宝才, 等. 我国新入侵外来害虫美洲棘蓟马的外部形态和分子鉴定. 昆虫学报, 2010, 53: 715–720
- 170 游中华, 路虹, 张宪省, 等. 入侵害虫西花蓟马及其他 8 种常见蓟马的分子鉴定. 昆虫学报, 2007, 50: 720–726
- 171 黄华. 海南岛芒果蓟马种类调查及基于 mtDNA *COI* 基因的系统发育的研究. 硕士学位论文. 海南: 海南大学, 2010
- 172 张利娟, 沈登荣, 孙跃先, 等. 基于 mtDNA *COI* 基因序列的云南榕母管蓟马不同地理种群的遗传分化分析. 昆虫学报, 2012, 55: 199–207
- 173 Macharia I, Backhouse D, Skilton R, et al. Diversity of thrips species and vectors of tomato spotted wilt virus in tomato production systems in Kenya. *J Econ Entomol*, 2015, 108: 20–28
- 174 Tyagi K, Kumar V, Singha D, et al. Morphological and DNA barcoding evidence for invasive pest thrips, *Thrips parvispinus* (Thripidae: Thysanoptera), newly recorded from India. *J Insect Sci*, 2015, 15: 105
- 175 Zhang G F, Meng X Q, Min L, et al. Rapid diagnosis of the invasive species, *Frankliniella occidentalis* (Pergande): a species-specific *COI* marker. *J Appl Entomol*, 2012, 136: 410–420
- 176 严丹侃, 汤云霞, 贺子义, 等. 南京地区西花蓟马发生调查及其分子检测. 南京农业大学学报, 2010, 33: 59–63
- 177 Timm A E, Stiller M, Frey J E. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) in southern Africa. *Afr Entomol*, 2008, 16: 68–75
- 178 Kadirvel P, Srinivasan R, Hsu Y C, et al. Application of cytochrome oxidase I sequences for phylogenetic analysis and identification of

- thrips species occurring on vegetable crops. J Econ Entomol, 2013, 106: 408–418
- 179 黄丽莉, 阙海勇, 车飞. 茶园茶黄蓟马及其近似种的 DNA 条形码鉴定. 植物检疫, 2014, 28: 68–72
- 180 乔玮娜, 万方浩, 张爱兵, 等. DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用. 昆虫学报, 2012, 55: 344–356
- 181 乔玮娜. DNA 条形码技术在我国常见蓟马种类识别及西花蓟马传播扩散趋势分析中的应用. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2012
- 182 Buckman R S, Mound L A, Whiting M F. Phylogeny of thrips (Insecta: Thysanoptera) based on five molecular loci. Syst Entomol, 2013, 38: 123–133
- 183 武晓云, 程晓非, 张仲凯, 等. 西花蓟马(*Frankliniella occidentalis*) rDNA ITS2 和 COI 基因 5'末端序列的克隆与比较分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 41: 355–364
- 184 Brunner P C, Frey J E. Habitat-specific population structure in native western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Insecta, Thysanoptera). J Evol Biol, 2010, 23: 797–804
- 185 Rugman-Jones P F, Hoddle M S, Stouthamer R. Nuclear-mitochondrial barcoding exposes the global pest western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) as two sympatric cryptic species in its native California. J Econ Entomol, 2010, 103: 877–886
- 186 Mirnezhad M, Schidlo N, Klinkhamer P G L, et al. Variation in genetics and performance of Dutch western flower thrips populations. J Econ Entomol, 2012, 105: 1816–1824
- 187 Yang X M, Sun J T, Xue X F, et al. Invasion genetics of the western flower thrips in China: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. PLoS One, 2012, 7: e34567
- 188 张桂芬, 乔玮娜, 古君伶, 等. 我国西花蓟马线粒体 DNA-COI 基因变异及群体遗传结构分析. 生物安全学报, 2014, 23: 196–209
- 189 Kobayashi K, Hasegawa E. Discrimination of reproductive forms of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) by PCR with sequence specific primers. J Econ Entomol, 2012, 105: 555–559
- 190 Brunner P C, Chatzivassiliou E K, Katis N I, et al. Host-associated genetic differentiation in *Thrips tabaci* (Insecta; Thysanoptera), as determined from mtDNA sequence data. Heredity, 2004, 93: 364–370
- 191 Toda S, Murai T. Phylogenetic analysis based on mitochondrial COI gene sequences in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) in relation to reproductive forms and geographic distribution. Appl Entomol Zool, 2007, 42: 309–316
- 192 Jacobson A L, Booth W, Vargo E L, et al. *Thrips tabaci* population genetic structure and polyploidy in relation to competency as a vector of *Tomato spotted wilt virus*. PLoS One, 2013, 8: e54484
- 193 Fekrat L, Manzari S, Shishehbor P. Morphometric and molecular variation in *Thrips tabaci* Lindeman (Thysanoptera: Thripidae) populations on onion and tobacco in Iran. J Agr Sci Tech-Iran, 2014, 16: 1505–1516
- 194 Nault B A, Kain W C, Wang P. Seasonal changes in *Thrips tabaci* population structure in two cultivated hosts. PLoS One, 2014, 9: e101791
- 195 Sogo K, Miura K, Aizawa M, et al. Genetic structure in relation to reproduction mode in *Thrips tabaci* (Insecta: Thysanoptera). Appl Entomol Zool, 2015, 50: 73–77
- 196 Rebijith K B, Asokan R, Kumar N K K, et al. Development of species-specific markers and molecular differences in mtDNA of *Thrips palmi* Karny and *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thripidae: Thysanoptera), vectors of tospoviruses (Bunyaviridae) in India. Entomol News, 2012, 122: 201–213
- 197 Rugman-Jones P F, Hoddle M S, Amrich R, et al. Phylogeographic structure, outbreeding depression, and reluctant virgin oviposition in the bean thrips, *Caliothrips fasciatus* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), in California. Bull Entomol Res, 2012, 102: 698–709
- 198 Hoddle M S, Heraty J M, Rugman-Jones P F, et al. Relationships among species of Scirtothrips (Thysanoptera: Thripidae, Thripinae) using molecular and morphological data. Ann Entomol Soc Am, 2008, 101: 491–500
- 199 Toda S, Hirose T, Kakiuchi K, et al. Occurrence of a novel strain of *Scirtothrips dorsalis* (Thysanoptera: Thripidae) in Japan and development of its molecular diagnostics. Appl Entomol Zool, 2014, 49: 231–239
- 200 Dickey A M, Kumar V, Hoddle M S, et al. The *Scirtothrips dorsalis* species complex: endemism and invasion in a global pest. PLoS One, 2015, 10: e0123747
- 201 Rebijith K B, Asokan R, Krishna V, et al. DNA barcoding and elucidation of cryptic diversity in thrips (Thysanoptera). Fla Entomol, 2014, 97: 1328–1347
- 202 Firlej A, L  gar   J P, Landry J F, et al. DNA barcoding: an innovative tool to identify internal lepidopterans in apples. IOBC-WPRS B, 2013, 91: 269–271
- 203 李腾, 蔡波, 宋文, 等. 苹果蠹蛾幼虫的形态与分子鉴定. 植物检疫, 2013, 27: 58–61
- 204 Amano T, Higo Y. A convenient diagnostic polymerase chain reaction method for identifying codling moth *Cydia pomonella*

- (Lepidoptera: Tortricidae) among tortricid pests in cherries imported from western North America. *Appl Entomol Zool*, 2015, 50: 549–553
- 205 白桦, 魏晓棠, 梁炜, 等. 实时荧光 PCR 快速检测苹果蠹蛾. *植物检疫*, 2011, 25: 48–51
- 206 Meraner A, Brandstätter A, Thaler R, et al. Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: I. Ancient clade splitting revealed by mitochondrial haplotype markers. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 48: 825–837
- 207 董昆. 基于 *COI* 基因的苹果蠹蛾地理种群遗传差异分析及幼虫快速分子鉴定. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010
- 208 李亦松. 基于线粒体基因对苹果蠹蛾和梨小食心虫不同地理种群遗传结构的研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2015
- 209 Li Y, Duan X, Qiao X, et al. Mitochondrial DNA revealed the extent of genetic diversity and invasion origin of populations from two separate invaded areas of a newly invasive pest, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) in China. *Bull Entomol Res*, 2015, 105: 485–496
- 210 何晓芳, 陆永跃, 张维球, 等. 入侵我国红火蚁的三种单倍型. *昆虫学报*, 2006, 49: 1046–1049
- 211 陈岩, 张秋娥, 宋曼曼. 火蚁属部分种类 DNA 条码技术研究初探. *植物检疫*, 2011, 25: 8–11
- 212 徐浪, 余道坚, 陈志舜, 等. 实时荧光 PCR 方法快速检测 3 种重要火蚁. *植物检疫*, 2013, 27: 65–68
- 213 Armstrong K. DNA barcoding: a new module in New Zealand's plant biosecurity diagnostic toolbox. *EPPO B*, 2010, 40: 91–100
- 214 Kumar V, Seal D R, Osborne L S, et al. Coupling scanning electron microscopy with DNA barcoding: a novel approach for thrips identification. *Appl Entomol Zool*, 2014, 49: 403–409
- 215 Song H, Buhay J E, Whiting M F, et al. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13486–13491
- 216 Park D S, Suh S J, Oh H W, et al. Recovery of the mitochondrial *COI* barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*, 2010, 11: 423
- 217 Sharma P, Kobayashi T. Are “universal” DNA primers really universal? *J Appl Genet*, 2014, 55: 485–496
- 218 Summerbell R C, Lévesque C A, Seifert K A, et al. Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philos T R Soc B*, 2005, 360: 1897–1903
- 219 Zhang A B, Sikes D S, Muster C, et al. Inferring species membership using DNA sequences with back-propagation neural networks. *Syst Biol*, 2008, 57: 202–215
- 220 Zhang A B, Feng J, Ward R D, et al. A new method for species identification via protein-coding and non-coding DNA barcodes by combining machine learning with bioinformatic methods. *PLoS One*, 2012, 7: e30986
- 221 Zhang A B, Muster C, Liang H B, et al. A fuzzy-set-theory-based approach to analyse species membership in DNA barcoding. *Mol Ecol*, 2012, 21: 1848–1863
- 222 Porter T M, Gibson J F, Shokralla S, et al. Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14: 929–942
- 223 Dayrat B. Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc*, 2005, 85: 407–415
- 224 Schlick-Steiner B C, Steiner F M, Seifert B, et al. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annu Rev Entomol*, 2010, 55: 421–438
- 225 Song N, Liang A P, Bu C P. A molecular phylogeny of Hemiptera inferred from mitochondrial genome sequences. *PLoS One*, 2012, 7: e48778
- 226 Cameron S L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annu Rev Entomol*, 2014, 59: 95–117
- 227 Andersen J C, Wu J, Gruwell M E, et al. A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 57: 992–1003
- 228 Chen R, Jiang L Y, Liu L, et al. The *gnd* gene of Buchnera as a new, effective DNA barcode for aphid identification. *Syst Entomol*, 2013, 38: 615–625
- 229 Frey J E, Guillén L, Frey B, et al. Developing diagnostic SNP panels for the identification of true fruit flies (Diptera: Tephritidae) within the limits of *COI*-based species delimitation. *BMC Evol Biol*, 2013, 13: 106
- 230 Hsieh C H, Wang H Y, Chen Y F, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of biotypes B and Q of the globally invasive pest *Bemisia tabaci*, and studying population dynamics. *Pest Manag Sci*, 2012, 68: 1206–1213

Application of DNA Barcode Technique in Identifying and Tracing Invasive Pest Insects in Agriculture and Forestry

WANG YuSheng, WAN FangHao & ZHANG GuiFen

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

It is imperative to establish rapid and reliable methods to identify invasive pest insects in plant quarantine. Identification of invasive insects based on morphological characteristics often encounters a variety of complex situations, including immature stages (e.g., egg, larva/nymph, prepupa, and pupa/subnymph), cryptic species, species complex and damaged sample or debris. All of these situations will limit the rapid and accurate identification of the exotic species. DNA barcoding based on mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I (mtDNA *COI*) gene has provided a new opportunity for addressing these challenges. It has become one of the emerging techniques in phylogenetic analysis, entry-exit inspection and quarantine as well as in quarantine of plants in the production place and during transportation of products. In the present study, the applications of DNA barcode technique in identifying and tracing invasive insect species in agriculture and forestry were introduced using scale insects, thrips, fruit flies and whiteflies as case studies. Finally, the ways for further improvement of the DNA barcode techniques were proposed and discussed.

invasive insects, DNA barcode technique, mtDNA *COI*, species identification, traceability

doi: 10.1360/N052016-00165