

西花蓟马检测鉴定技术研究进展

张桂芬^{1,2*}, 孟祥钦^{1*}, 万方浩^{1,2}

¹ 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;

² 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心, 北京 100081

摘要: 西花蓟马是一种世界性的入侵害虫, 2003 年首次在北京发现, 目前仅在我国局部地区发生。其危害严重, 潜在适生区广, 且具有进一步扩散蔓延的趋势。快速准确的检测鉴定技术是防止其进一步扩散蔓延, 保障我国农业生产健康发展的必要前提。综合相关报道, 用于西花蓟马的检测鉴定技术包括传统的形态学特征鉴定法、由此衍生的计算机软件识别法, 以及分子检测技术, 如 RAPD-PCR 法、DNA 序列分析法、PCR-RFLP 法、SCAR 分子标记技术、实时荧光定量 PCR 检测技术以及蛋白质分析技术等。其中, 基因芯片和 DNA 条形码技术作为新兴的物种鉴定手段, 在西花蓟马等入侵物种的检测鉴定中具有广阔的应用前景。

关键词: 西花蓟马; 形态学鉴定; 分子检测; 基因芯片; DNA 条形码

Advances in identification techniques of the western flower thrips,
Frankliniella occidentalis (Pergande)

Gui-fen ZHANG^{1,2*}, Xiang-qin MENG^{1*}, Fang-hao WAN^{1,2}

¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; ² Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China

Abstract: The western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), a globally invasive species, was first reported in Beijing in 2003; it currently occurs only in a few areas in China. Considering its devastating effects, a rapid and simple method for the identification of this species would facilitate decision-making regarding plant stock movements, help in preventing its introduction and spread to non-infested areas. There are several methods in use to identify *F. occidentalis*, including morphological identification, computer-assisted identification by using compact disc read-only memory (CD-ROM) or artificial neural networks (ANN). Molecular identification methods based on RAPD analysis, COI gene sequencing, RFLP associated with COI, *cyt b*, ITS-1 and ITS-2 genes as well as protein-based analysis including Mab-ELISA and SDS-PAGE have been developed. Recently, species-specific primers based on genomic DNA (SCAR marker) or mtDNA COI, as well as real-time quantitative PCR-assisted by SCAR or COI markers have become available. New identification methods derived from gene chip and DNA barcoding are in development. Of the available methods, techniques utilising gene chips and DNA barcoding are expected to give more stable and reliable results and will be the most practical methods in identification of the western flower thrips and other alien species.

Key words: western flower thrips; morphological identification; molecular detection; gene chips; DNA barcoding

西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande) 是缨翅目 (Thysanoptera) 蓟马科 (Thripidae) 花蓟马属的一种昆虫, 为美国和加拿大西部洛基山脉常见的一种重要害虫, 最早记载于 1895 年 (Beshear, 1983)。近 30 年来, 随着全球经济一体化进程的加

快和国际贸易活动的日趋频繁, 西花蓟马迅速传播扩散, 已经在北美、欧洲、亚洲、南美、非洲和大洋洲的许多国家建立种群, 并暴发成灾 (Kirk & Terry, 2003)。为此, 我国农业部于 1996 年将西花蓟马列为进境植物检疫潜在的危险性害虫。目前已命名

收稿日期: 2011-01-20 接受日期: 2011-02-10
基金项目: 国家“973”计划项目 (2009CB119200); 国家科技支撑计划项目 (2006BAD08A14); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200803025); 国家自然科学基金项目 (30971967)
通讯作者 (Author for correspondence): 万方浩, E-mail: wanfh@mail.caas.net.cn
* 同等贡献作者 (The two authors contributed equally to this work)

的蓟马种类有 5500 余种 (Mound & Morris, 2004), 其中, 我国的蓟马种类约 300 种, 分属 104 属 (韩运发, 1997; 张友军等, 2003; 魏书军等, 2010)。其入侵我国的历史较短, 2000 年在昆明国际花卉节参展的缅甸盆景上被首次截获 (蒋小龙等, 2001); 2003 年在北京温室的辣椒上被发现 (张友军等, 2003); 之后在云南 (徐家菊和韦丽莉, 2005)、山东 (郑长英等, 2007) 等地陆续发生危害。

西花蓟马为多食性害虫, 可以在包括菊科、葫芦科、茄科、豆科、十字花科等在内的 60 多个科 500 多种植物上取食为害 (Yudin *et al.*, 1986; Moritz, 2002)。西花蓟马的危害方式主要有 2 种: (1) 产卵为害或以锉吸式口器取食为害, 不仅降低产量, 使花卉丧失观赏价值, 而且严重影响果实的品质 (Robb & Parrella, 1989; Cockfield *et al.*, 2007); (2) 传播植物病毒, 如番茄斑萎病毒 (tomato spotted wilt virus, TSWV) (Gardener *et al.*, 1935)、凤仙斑点坏死病毒 (impatiens necrotic spot virus, INSV) (Dean-gelis *et al.*, 1993; Wijkamp & Peters, 1993)、花生环斑病毒 (groundnut ringspot virus, GRSV)、番茄褪绿斑点病毒 (tomato chlorotic spot virus, TCSV) (Wijkamp *et al.*, 1995) 以及菊花茎坏死病毒 (chrysanthemum stem necrosis virus, CSNV) (Bezzara *et al.*, 1999) 等, 使病毒病大流行, 造成植物严重减产甚至绝收 (Jones, 2005)。西花蓟马适生区广泛 (程俊峰等, 2006; 陈洪俊等, 2007 年), 易造成严重的经济损失。目前仅在我国局部地区发生危害 (张友军等, 2003、2004; 徐家菊和韦丽莉, 2005; 郑长英等, 2007), 但具有进一步扩散蔓延的趋势, 快速准确的检测鉴定技术是有效遏制其进一步发生危害的首要条件。因此, 本文概述了西花蓟马检测鉴定技术研究进展。

1 传统的形态学鉴定法

传统的形态学鉴定法直观且成本低, 因此在西花蓟马的识别中发挥了巨大作用。如雷仲仁等 (2004) 根据单眼鬃和复眼后最长鬃的长度比较、后胸盾片感觉器的有无、腹部第 8 节背板后缘梳毛是否完整和寄主植物范围等, 将西花蓟马与其近缘种花蓟马 *F. intonsa* (Trybom) 和禾花蓟马 *F. tenuicornis* (Uzel) 进行了区分。张维球和曾玲 (2004) 编制了鉴定检索表, 用于区分我国报道的棉花蓟马 *F. gos-*

sypii (Shirak)、花蓟马、百合花蓟马 *F. lilivora* Kurosawa、柳花蓟马 *F. saliscis* Moulton、禾花蓟马、威廉斯花蓟马 *F. williamsi* Hood、茭笋花蓟马 *F. zizaniophila* Han et Zhang, 其中, 棉花蓟马、百合花蓟马、柳花蓟马、威廉斯花蓟马仅记录于台湾。刘宁等 (2005) 采用鉴定检索表区分西花蓟马和 3 种温室蓟马 [烟蓟马 *Thrips tabaci* L.、花蓟马、佛罗里达花蓟马 *F. bispinosa* (Morgan)]。

西花蓟马个体微小, 与其他种类的蓟马形态相似, 在鉴别时需要专业人员将成虫制成玻片标本, 并借助显微镜方可明确其种类 (Fedor *et al.*, 2008)。然而, 形态学特征的掌握与熟练应用, 即使对专门从事蓟马分类的人员而言亦非易事 (Gaston & May, 1992), 加之形态学鉴定方法对成虫前的虫态 (包括卵、若虫、前蛹、蛹) 以及残缺的标本无能为力, 因此限制了该方法的广泛应用。但是, 与分子生物技术的结合与应用, 促进了传统分类学的快速发展 (Charles & Godfray, 2002)。

2 分子检测鉴定技术

西花蓟马的分子检测鉴定技术主要是根据西花蓟马和其他种类蓟马的靶标 DNA 序列或蛋白质的差异进行区分 (表 1)。该技术不受虫态或龄期的限制, 且对于残缺的标本也可进行鉴别。与传统的形态学鉴定法相比, 分子检测技术结果稳定、灵敏度高、重现性好且简便易行, 只需对相关人员进行简单的培训即可完成操作 (Darling & Blum, 2007)。目前已有多种分子标记技术用于蓟马的鉴定, 主要包括随机多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记技术、DNA 序列分析法 (DNA sequencing)、限制片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 标记技术、特征序列扩增区域 (sequence characterized amplified regions, SCAR) 标记技术和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR) 检测技术以及蛋白质分析技术 [包括单克隆抗体—酶联免疫吸附剂 (monoclonal antibodies enzyme-linked immunosorbent assay, Mab-ELISA) 检测法和十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 法] 等。

表 1 用于蓟马鉴别的分子检测技术
Table 1 Molecular techniques for identification of thrips species

检测技术 Techniques	靶标序列 Target region	靶标昆虫 Target species	参考文献 References
DNA 序列分析法 DNA sequencing	mtDNA COI	包括西花蓟马在内的 9 种蓟马 Nine thrips species including <i>F. occidentalis</i> 西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Timm <i>et al.</i> ,2008 游中华等,2007 Brunner <i>et al.</i> ,2002
PCR-RFLP	rDNA ITS-2	包括西花蓟马在内的 9 种蓟马 Nine thrips species including <i>F. occidentalis</i>	Toda & Komazaki,2002
		硬蓟马属 <i>Scirtothrips</i> 新绢蓟马属 <i>Neohydatothrips</i> 西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Rugman <i>et al.</i> ,2006 Moritz <i>et al.</i> ,2000
	rDNA ITS-1,2	美棘蓟马 <i>Echinothrips americanus</i> Morgan 西花蓟马 <i>F. occidentalis</i> 、花蓟马 <i>F. intonsa</i>	Mainali <i>et al.</i> ,2008 Bayar <i>et al.</i> ,2002
		6 种蓟马 Six thrips species 西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Cenis & Beitia,1994
PCR-RFLP; RAPD	mtDNA <i>cytb</i>	西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	孟祥钦等,2010
RAPD	核酸基因组 Genomics	烟蓟马 <i>T. tabaci</i> 、棕榈蓟马 <i>T. palmi</i> 西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Asokan <i>et al.</i> ,2007 周力兵等,2007
SCAR	核酸基因组 Genomics	棕榈蓟马 <i>T. palmi</i>	Walsh <i>et al.</i> ,2005
SSP	mtDNA COI	棕榈蓟马 <i>T. palmi</i> 西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Kox <i>et al.</i> ,2005 Huang <i>et al.</i> ,2010
qPCR	核酸基因组 Genomics	西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Banks <i>et al.</i> ,1998
Mab-ELISA	蛋白质 Protein	西花蓟马 <i>F. occidentalis</i>	Reboredo <i>et al.</i> ,2003
SDS-PAGE	蛋白质 Protein		

2.1 RAPD 标记技术

RAPD 技术以基因组 DNA 为靶标,通过选用一系列的简并引物进行 PCR 扩增及电泳检测得到丰富的带型,然后在比较不同物种带型间差异的基础上进行种类识别。如 Bayar *et al.* (2002) 针对 6 种蓟马以 15 条 RAPD 引物获得了 103 条片段。其中,引物 OPB06 可用于鉴别花蓟马、豌豆蓟马 *Kakothrips robustus* (Uzel)、间纹蓟马 *Aeolothrips intermedius* Bagnall、*Odontothrips confuses* Priesner、烟蓟马和 *Thrips dilatatus* Uzel;引物 OPD05 可区分豌豆蓟马、间纹蓟马、*O. confusus* 和烟蓟马;引物 NO11 和 OPQ14 可有效地区分间纹蓟马和花蓟马;而引物 OPA08 可用于鉴别间纹蓟马的雌性和雄性。RAPD 检测技术简便易行,成本低;但稳定性差,检测结果易受 DNA 质量、PCR 试剂、仪器等因素的影响,因此已逐渐被 SCAR 标记技术取代 (Chakrabarti *et al.* ,2006)。

2.2 DNA 序列分析法

昆虫的线粒体基因组 DNA 分子比较小,为 15.4 ~ 16.3 kb,含有 3 个细胞色素氧化酶亚基基因 I、II、III (mitochondria cytochrome oxidase subunits I, II, III; mtDNA CO I, mtDNA CO II, mtDNA CO III) (Flook *et al.* ,1995),为多拷贝,结构和组织简单且高度保守,母系遗传,缺乏重组,DNA 突变率

高,进化速率比核 DNA 快,检测灵敏度高 (Hoelzel, 1991; Hoy,1994)。因此,在蓟马类昆虫的分子检测鉴定中得到了广泛应用 (Brunner *et al.* ,2002; Kox *et al.* ,2005; 游中华等,2007; Mainali *et al.* , 2008; Timm *et al.* ,2008)。如游中华等(2007)利用 Brunner *et al.* (2002)设计的简并引物 mtD-7.2F 和 mtD-9.2R 扩增出包括西花蓟马在内的 9 种蓟马的 COI 基因片段(433 bp),然后通过对 PCR 产物的直接测序及序列分析,准确地鉴别不同虫态的西花蓟马。此外,线粒体 DNA 序列分析法所获得的大量的序列信息和一系列的通用引物 (Timm *et al.* , 2008),可用于以后的研究。如 Brunner *et al.* (2002)根据所选蓟马 mtDNA COI 基因的碱基序列设计的 1 对简并引物 (mtD-7.2F 和 mtD-9.2R),曾被许多研究人员采用 (Asokan *et al.* ,2007; 游中华等,2007; 周力兵等,2007)。尽管 mtDNA 序列分析法需要对 PCR 扩增产物进行测序及序列分析,但鉴定人员只需具有基本的分子生物学知识和技能,接受简单的培训后便可熟练应用。

2.3 PCR-RFLP 标记技术

PCR-RFLP 技术将 PCR 技术与 RFLP 技术相结合,通过选取一对引物扩增靶标序列,然后筛选合适的限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切,根据酶切图谱计算类群之间的遗传距离,并构建系统发育

树,或者直接根据酶切图谱判断是否为靶标类群。RFLP 技术可用于鉴别分类地位十分相近的物种,具有快速、灵敏、简便、稳定等特性(Mainali *et al.*, 2008)。PCR-RFLP 技术选用的靶标序列通常为核糖体 DNA 的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。其中,ITS 以高拷贝的串联形式存在,进化程度适中(Tautz *et al.*, 1988);而昆虫的 mtDNA 较小,基因结构较清楚,用限制性内切酶切割后可直接进行分析(Flook *et al.*, 1995)。如 Mainali *et al.* (2008) 针对西花蓟马和花蓟马细胞色素 b 基因(*cytb*)的 434 bp 片段,选用限制性内切酶 *Dde* I 进行酶切,然后通过电泳图谱上的不同带型区分 2 种蓟马。Rugman *et al.* (2006) 以 ITS-1 和 ITS-2 为靶标,用限制性内切酶 *Sac* II 或 *PspOM* I 进行酶切,有效地区分 7 种硬蓟马属的蓟马。Moritz *et al.* (2000) 以 5 种内切酶消化西花蓟马和美棘蓟马 *Echinothrips americanus* Motgan 的 ITS-1 和 ITS-2 片段,通过所产生的不同带型,成功地将 2 种蓟马区分开。Toda & Komazaki (2002) 通过对包括西花蓟马在内的 9 种蓟马的 ITS-2 序列分析,得到适于扩增蓟马 ITS 片段的特异性引物,并从 82 种限制性内切酶中筛选出 2 种内切酶用于鉴别日本果树上常见的 9 种蓟马的成虫和若虫。Brunner *et al.* (2002) 根据 mtDNA COI 扩增产物(433 bp),结合测序和扩增产物 RFLP 分析,从 12 种限制性内切酶中筛选出 2 种内切酶,构建了系统发育树,有效区分了西花蓟马、烟蓟马和棕榈蓟马等。

PCR-RFLP 技术需要筛选合适的限制性内切酶,且酶切条件要求严格,因此,寻找合适的酶将西花蓟马与其他众多常见种类的蓟马区分开,存在一定的难度;此外,PCR-RFLP 后期的酶切反应及凝胶电泳,增加了 PCR 产物被污染的机会(Walsh *et al.*, 2005)。DNA 序列分析法与 PCR-RFLP 技术往往联合使用,在得到序列信息的基础上根据软件预测限制内切酶的酶切位点,进而筛选合适的酶,以减少筛选酶的工作量(Brunner *et al.*, 2002; Toda & Komazaki, 2002)。

2.4 SCAR 标记技术

SCAR 分子标记检测技术,是在 RAPD-PCR 基础上扩增特异性产物的技术。SCAR 标记技术包括 3 个步骤:(1)在对靶标昆虫 DNA 序列信息未知的情

况下,通过合适的简并引物进行 RAPD-PCR 扩增与分析,得到靶标昆虫区别于其他昆虫的特异性条带;(2)对该特异性条带进行回收、克隆、测序,并根据片段两端的碱基序列设计特异性引物;(3)通过 PCR 扩增及电泳检测,鉴别靶标昆虫(黎裕等,1999)。该方法的优点是省却了大量的测序工作且无需对 PCR 产物进行 RFLP 分析,工作周期短,检测成本低,一旦获得特异引物就可用于大量的检测样本,因此在检测鉴定领域已有广泛应用。如孟祥钦等(2010)采用 SCAR 技术设计了 1 对引物 FOMF/FOMR,该对引物只对西花蓟马具有扩增能力,对田间常见的其他 41 种蓟马不具有扩增效果;该对引物不仅对不同虫态的西花蓟马具有扩增能力,而且还可检测寄主植物组织中是否有西花蓟马卵的存在。

此外,亦有一些研究与此技术相仿,即针对序列信息已知的 DNA 片段设计种特异性引物,然后通过种特异性 PCR (species-specific PCR, SSP) 扩增,进而鉴定蓟马种类。如 Asokan *et al.* (2007) 以棕榈蓟马和烟蓟马为对象,根据 Brunner *et al.* (2002) 设计的针对 mtDNA 的引物扩增出约 500 bp 的片段,然后分别将 2 个片段进行克隆和再次测序,根据测序结果及其序列差异设计种特异性引物各 1 对(2RAf/5RAr 和 1RAf/5RAr),分别对烟蓟马(298 bp)和棕榈蓟马(390 bp)进行扩增,进而达到种类鉴别的目的。周力兵等(2007)利用 Brunner *et al.* (2002) 设计的简并引物扩增出 6 种蓟马的 mtDNA COI 基因片段(450 bp),然后针对西花蓟马片段设计种特异性引物 F. OL1/F. OR 和 F. OL2/F. OR,快速简便地将西花蓟马的成虫、若虫、蛹与其他 5 种蓟马区分开。SSP 技术是有选择地针对在遗传进化中易于区分的靶标基因设计特异性引物,进而达到检测鉴定物种的目的。该技术的关键在于靶标种特异性引物的设计;同时,为了避免所设计的引物与同域发生的近缘种产生交叉扩增,种内与种间核酸的差异亦应一并考虑(Darling & Blum, 2007; 周力兵等, 2007)。

2.5 qPCR 检测技术

qPCR 技术是在常规 PCR 体系中加入荧光染料或带有荧光染料标记的探针,荧光信号随靶标 DNA 的扩增而增强,通过检测荧光信号判断目的 DNA 的数量,进而鉴定标本是否为靶标物种(Kox *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2005; Huang *et al.*,

2010)。与普通 PCR 相比,qPCR 检测采用独特的全封闭反应管及光电传导系统,无需对 PCR 产物进行后处理,通过光电传导直接检测 PCR 扩增过程中荧光信号的变化并据此获得定量结果,实现了实时、在线定量检测的目的;同时,qPCR 技术灵敏度更高,可以更加快捷、高通量地检测样品(Heid *et al.*, 2009)。如 Walsh *et al.* (2005)通过对棕榈蓟马、烟蓟马和西花蓟马基因组 DNA 进行 RAPD-PCR 扩增和产物克隆,以含有插入序列的质粒合成 DIG 标记探针,然后将每个探针与棕榈蓟马及其他 21 种蓟马基因组 DNA 进行多重置换扩增反应(multiple displacement amplification reactions)和分子杂交,根据筛选到的棕榈蓟马特异性引物和相应的克隆设计 TaqMan 探针,并建立了 qPCR 检测体系。Huang *et al.* (2010)根据西花蓟马、花蓟马和梳缺花蓟马 *F. schultzei* (Trybom) 已知的 RNA 基因序列设计了 2 套西花蓟马特异性引物和探针,建立了西花蓟马 qPCR 检测体系,有效地将西花蓟马与其他常见的 6 种蓟马(花蓟马、梳缺花蓟马、烟蓟马、茶黄硬蓟马 *Scirtothrips dorsalis*、*Caliothrips fasciopenis*、*Tubulifera*) 区分开,并对若虫具有同样的检测效果,完全可用于口岸检疫。

2.6 蛋白质分析技术

2.6.1 Mab-ELISA 检测法 ELISA 是以免疫学反应为基础,将抗原、抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用相结合的一种灵敏性很高的检测技术。通常,抗原、抗体反应在固相载体-96 孔酶标板孔中进行,每加入一种试剂孵育后,可通过洗涤的方法去除多余的反应物,从而保证试验结果的特异性与稳定性。单克隆抗体由免疫细胞与癌细胞融合后的杂交细胞(亦称杂种瘤)产生,只与特定的抗原决定簇结合,因此与其他近缘物种产生交叉反应的机率很低(Symondson, 2002),完全可用于物种识别。如 Banks *et al.* (1998)以棕榈蓟马、烟蓟马、西花蓟马、桃蚜 *Myzus persicae* (Sulzer)、线斑潜蝇 *Liriomyza strigata* (Meigen)、番茄斑潜蝇 *L. bryoniae* (Kaltenbach) 等 6 种昆虫为对象,筛选出了可以准确鉴定棕榈蓟马的单克隆抗体及检测方法。然而,Mab 制备周期长,条件要求苛刻,生产成本昂贵;ELISA 检测方法需时较长,即使技术娴熟,完成整个检测过程至少也需要 1.5 d。

2.6.2 SDS-PAGE 检测法 SDS-PAGE 法也是一种

以蛋白质为靶标的检测技术。通常,在对靶标生物蛋白质进行电泳,得到蛋白电泳图谱的基础上,根据其差异条带鉴定靶标生物。该技术具有灵敏度高、电泳图谱清晰、种内差异小的优点。如 Reboredo *et al.* (2003)以温室蓟马 *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché)、西花蓟马和烟蓟马为靶标进行 SDS-PAGE 检测,得到了可用于鉴定温室蓟马的特异性带型。然而,该技术稳定性较差,易受操作过程中诸多因素的影响,且当检测的物种较多时带型复杂。因此,目前已很少单独用于物种鉴定研究。

3 基于计算机软件的鉴定方法

随着信息技术的快速发展,电脑辅助的分类学技术应运而生。目前,电脑辅助的分类学应用主要有 2 类。(1)交互多路存储分类软件。为分布式,在 CD-ROM(compact disc read-only memory)上几乎为完全自动的识别系统。如 Moritz *et al.* (2000)根据形态学特征编制了一套可以鉴别缨翅目昆虫的软件——Thrips ID,该软件将缨翅目昆虫的形态学特征与分子信息相结合,并以数据库的形式进行储存。对于蓟马成虫,查询者只需根据标本的形态特征回答软件中的问题,即可确定其种类;对于成虫前的各个虫态,可以采用 RFLP 技术并根据所提供的 ITS-RFLP 酶切图谱进行种类鉴别。此方法不仅降低了错误鉴定的可能性,而且不受标本虫态和完整性的限制。(2)人工智能神经网络(artificial neural networks, ANN)。类似于人类大脑结构,能够根据样品的特征进行学习并概括出观测到的样品模型。与许多传统的统计模型相比,ANN 为非线性,且未对模型或数据的统计分布式做前提假设,因此可用于所有多元数据集转换的电子图片的模式识别(Do *et al.*, 1999)。如 Fedor *et al.* (2008)研究出了可半自动化识别 4 属 18 种蓟马的 ANN,通过输入形态学特征不仅可以识别不同的种类,而且可以同时识别成虫的雌雄性,准确率达 97%。

基于计算机软件的鉴定方法将形态学特征与分子生物学技术和数学模型进行有机地结合,有助于非蓟马分类人员快速准确地鉴定西花蓟马。然而,该方法仍然要求操作人员掌握蓟马类昆虫的形态学特征,且需要借助分子生物学技术才能识别幼体和残缺标本。

4 展望

步入 21 世纪以来,国际交流和经济活动日趋

频繁,越来越多的外来物种进入我国,其传入数量之大、传播速度之快、经济危害之严重已远远超出了人们的想象(杨瑞等,2009),显然,常规的分子检测技术已无法满足高通量检测的需求。DNA 条形码(DNA barcoding)是一种以 mtDNA COI 基因前部长度约 650 bp 的序列作为物种内在标签,进而实现快速、准确和自动化地对物种进行鉴定和分类的新型系统(Hebert & Gregory,2005)。由于其操作快速、简便,近几年已受到广泛关注并成为一项辅助物种鉴定的新手段。COI 基因相对容易扩增,较少发生插入、缺失现象(Waugh,2007),具有种内变异速率相对较小、种间相对较大(Hebert *et al.*,2003a、2003b)等优势。因此,目前已成为动物界常用的分子标记技术,并已显示出其在物种鉴定方面的巨大作用(Ekrem,2007;Frézal & Leblois,2008)。

基因芯片是新近崛起的生物技术,具有可以同时识别数以万计靶标的潜力(Naeole & Haymer,2003),目前已用于医学诊断中病毒和细菌(Striebel *et al.*,2003;朱晓光等,2007)、致病真菌(黄爱华等,2007)、人体寄生虫(张媛等,2007)的检测以及水产食品中常见病原微生物的鉴定(高爽等,2007)和植物病原真菌及其他病原物的识别研究(Lievens *et al.*,2005;Szemes *et al.*,2005)。李文芬等(2008)以双翅目实蝇科昆虫为靶标,针对 mtDNA COI 基因建立了我国进境植物检疫害虫地中海实蝇 *Ceratitis capitata* (Wiedemann)、芒果小条实蝇 *C. cosyra* (Walker)和纳塔尔小条实蝇 *C. rosa* Karsch 的生物芯片检测方法,为我国进口果蔬中检疫性实蝇的快速筛查和种类鉴定提供了技术保障。冯毅等(2009)以西花蓟马、花蓟马、禾花蓟马等 3 种花蓟马属昆虫的 9 个样本的 COI 基因片段序列为材料,以 12 种 *motif* 基因序列为靶标,制作虚拟基因芯片。检测结果显示,所设计的虚拟基因芯片能准确鉴定 3 种花蓟马,为实体基因芯片制作奠定了基础。

与传统的形态学鉴定技术相比,目前得以广泛应用的分子检测技术结果更加稳定可靠,但难以满足高通量检测的需求。基因芯片和 DNA 条形码编码技术作为新兴的物种鉴定手段,在分子检测领域具有广阔的应用前景,且必将在有害生物检验检疫中发挥巨大作用。

参考文献

- 陈洪俊,刘海军,李镇宇,马晓光. 2007. 西花蓟马在我国的潜在分布区预测. 植物检疫,21(3):160-164.
- 程俊峰,万方浩,郭建英. 2006. 入侵昆虫西花蓟马的潜在适生区分析. 昆虫学报,49(3):438-446.
- 冯毅,王莉,白云峰,王洁,冯纪年. 2009. 基于 COI 序列快速鉴定花蓟马的 DNA 条形码芯片初探. 生物技术通报,(8):170-173.
- 高爽,谢明杰,金大智,曹际娟. 2007. 运用基因芯片技术建立检测水产食品中常见病原微生物方法的研究. 生物技术通讯,18(1):72-76.
- 韩运发. 1997. 中国经济昆虫志. 第五十五册:缨翅目. 北京:科学出版社.
- 黄爱华,李君文,湛志强,金敏,王新为. 2007. 基因芯片技术检测鉴定临床常见致病真菌的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志,27(2):180-185.
- 蒋小龙,白松,肖枢,杨碧. 2001. 为中国昆明国际花卉节把关服务. 植物检疫,15(2):115-117.
- 雷仲仁,问锦增,王音. 2004. 危险性外来入侵害虫——西花蓟马的鉴别、危害及防治. 植物保护,30(3):63-66.
- 黎裕,贾继增,王天宇. 1999. 分子标记的种类及其发展. 生物技术通报,15(4):19-22.
- 李文芬,余道坚,颜亨梅,李建光,徐浪,任鲁风. 2008. 地中海实蝇及其近缘种基因芯片检测研究. 昆虫学报,51(1):61-67.
- 刘宁,任立,张润志,郑建秋,王福祥. 2005. 西花蓟马的鉴别及其与近缘种的区别. 昆虫知识,42(3):345-348.
- 孟祥钦,闵亮,万方浩,周忠实,王文凯,张桂芬. 2010. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术. 昆虫学报,53(3):323-330.
- 魏书军,马吉德,石宝才,宫亚军,刘静,康总江,陈学新,路虹. 2010. 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,53(6):715-720.
- 徐家菊,韦丽莉. 2005. 临沧市新发现外来有害生物——西花蓟马. 植物检疫,19(5):294-295.
- 杨瑞,万方浩,郭建英,谢明,钟良平. 2009. 中国生物入侵现状与发展趋势//万方浩,郭建英,张峰. 中国生物入侵研究. 北京:科学出版社,10-24.
- 游中华,路虹,张宪省,冯纪年,石宝才,宫亚军,黄大卫. 2007. 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,50(7):720-726.
- 张维球,曾玲. 2004. 4 种花蓟马的鉴别. 植物检疫,18(3):149-152.
- 张友军,吴青君,徐宝云,朱国仁. 2003. 危险性外来入侵生物——西花蓟马在北京发生危害. 植物保护,29(4):58-59.
- 张友军,张治军,徐宝云,吴青君,朱国仁. 2004. 外来入侵害虫——西花蓟马的发生、为害与防治. 中国蔬菜,18(5):50-51.

- 张媛,童睿,郑秋月,谢明杰,曹际娟. 2007. 运用基因芯片技术检测三种寄生虫方法的研究. *中国卫生检验杂志*, 17 (12): 2168 - 2170.
- 郑长英,刘云虹,张乃芹,赵希丽. 2007. 山东省发现外来入侵有害生物——西花蓟马. *青岛农业大学学报:自然科学版*, 24(3): 172 - 174.
- 周力兵,刘忠善,李春艳,丁元明. 2007. PCR 法鉴定西花蓟马. *植物检疫*, 21(2): 78 - 81.
- 朱晓光,杨银辉,康晓平,刘洪,胡玉洋,曾海攀,祝庆余. 2007. 13 种虫媒病毒基因芯片检测方法的建立. *解放军医学杂志*, 32(8): 832 - 835.
- Asokan R, Kumar K N K, Kumar V and Ranganath H R. 2007. 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). *Bulletin of Entomological Research*, 97: 461 - 470.
- Banks J N, Collins D W, Rizvi R H, Northway B J and Danks C. 1998. Production and characterization of monoclonal antibodies against the EU-listed pest *Thrips palmi*. *Food and Agricultural Immunology*, 10: 281 - 290.
- Bayar K, Torjek O, Kiss E, Gyulai G and Heszky L. 2002. Intra- and interspecific molecular polymorphism of thrips species. *Acta Biologica Hungarica*, 53: 317 - 324.
- Beshear R J J. 1983. New records of thrips in Georgia (Thysanoptera, Terebrantia, Tubulifera). *Journal of Georgia Entomological Society*, 18: 342 - 344.
- Bezzara I C, De Resende R O, Pozzer L, Nagata T, Kormelink R and De Avila A C. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology*, 89: 823 - 830.
- Brunner P C, Fleming C and Frey J E. 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agricultural and Forest Entomology*, 4: 127 - 136.
- Cenis J L and Beitia F. 1994. Aplicacion de la tecnica RAPD-PCR (adn polimorfico amplificado alazar) a la identificacion de insectos. *Investigación Agraria: Producción y protección vegetales*, 9: 289 - 297.
- Chakrabarti S K, Pattanayak D, Sarkar D, Chimote V P and Naik P S. 2006. Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biologia Plantarum*, 50: 531 - 536.
- Charles H and Godfray J. 2002. Challenges for taxonomy. *Nature*, 417: 17 - 19.
- Cockfield S D, Beers E H and Zack R S. 2007. Phenology of western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) on plant species in and near apple orchards in Washington State. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 104: 35 - 44.
- Darling J A and Blum M J. 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biological Invasions*, 9: 751 - 765.
- Deangelis J D, Sether D M and Rossignol P A. 1993. Survival, development and reproduction in western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) exposed to impatiens necrotic spot virus. *Environmental Entomology*, 22: 1308 - 1312.
- Do M T, Harp J M and Norris K C. 1999. A test of a pattern recognition system for identification of spiders. *Bulletin of Entomological Research*, 89: 217 - 224.
- Ekrem T. 2007. A taxonomic revision of the genus *Stempellinella* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Natural History*, 41: 1367 - 1465.
- Fedor P, Malenovsky I, Vanhara J, Sierka W and Havel J. 2008. Thrips (Thysanoptera) identification using artificial neural networks. *Bulletin of Entomological Research*, 98: 437 - 447.
- Flook P K, Rowell C H F and Gellissen G. 1995. The sequence, organization and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 928 - 941.
- Frézal L and Leblois R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection Genetics and Evolution*, 8: 727 - 736.
- Gardener M C, Tompkins C M and Whipple O C. 1935. Spotted wilt of truck crops and ornamental plants. *Phytopathology*, 25: 17.
- Gaston K J and May R M. 1992. Taxonomy of taxonomists. *Nature*, 356: 281.
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L and De Waard J R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270: 313 - 321.
- Hebert P D N, Ratnasingham S and De Waard J R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270: S96 - S99.
- Hebert P D N and Gregory T R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 841 - 844.
- Heid C A, Stevens J, Livak K J and Williams P M. 2009. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986 - 994.
- Hoelzel A R. 1991. Analysis of regional mitochondrial DNA variation in the killer whale: implications for conservation//

- Hoelzel A R. *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. UK: Cambridge; Report to the International Whaling Commission, 225 – 233.
- Hoy M A . 1994. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principals and Applications*. San Diego, California: Academic Press.
- Huang K S, Lee S E, Yeh Y, Shen G S, Mei E and Chang C M. 2010. Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine. *Biology Letters*, 6:555 – 557.
- Jones D R. 2005. Plant viruses transmitted by thrips. *European Journal of Plant Pathology*, 113:119 – 157.
- Kirk W D J and Terry L I. 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5:301 – 310.
- Kox L F F , van den Beld H E, Zijlstra C and Vierbergen G. 2005. Real-time PCR assay for the identification of *Thrips palmi*. *EPPO Bulletin*, 35:141 – 148.
- Lievens B , Brouwer M, Vanachter A C R C, Lévesque C A, Cammue B P A and Thomma B P H J. 2005. Quantitative assessment of phytopathogenic fungi in various substrates using a DNA microarray. *Environmental Microbiology*, 7:1698 – 1710.
- Mainali B P, Shrestha S, Lim U T and Kim Y. 2008. Molecular markers of two sympatric species of the genus *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11:45 – 48.
- Moritz G, Delker C, Paulsen M, Mound L A and Burgermeister W. 2000. Modern methods for identification of Thysanoptera. *EPPO Bulletin*, 30:591 – 593.
- Moritz G . 2002. The biology of thrips is not the biology of their adults: a developmental view // Marullo R, Mound L A. Thrips and Tospoviruses. *Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera*. Italy: Reggio Calabria, 259 – 267.
- Mound L A and Morris D C. 2004. Thysanoptera phylogeny—the morphological background. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 39:101 – 113.
- Naeole C K M and Haymer D S. 2003. Use of oligonucleotide arrays for molecular taxonomic studies of closely related species in the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) complex. *Molecular Ecology Notes*, 3:662 – 665.
- Reboredo M, De Morentin I M, Moriyon I and Jordana R. 2003. A methodology for thrips larvae identification using protein profiles obtained by SDS-PAGE. *BioControl*, 48:395 – 406.
- Robb L K and Parrella P M. 1989. Western flower thrips, a serious pest of floricultural crops // Parker L B, Skinner M, Lewis T. Towards Understanding Thysanoptera. *International Conference on Thrips*. Vermont, 343 – 358.
- Rugman J P F, Mark S H, Laurence A M and Richard S. 2006. Molecular identification key for pest species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology*, 99:1813 – 1819.
- Striebel H M , Birch H E, Egerer R and Foldes P Z. 2003. Virus diagnostics on microarrays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4:401 – 415.
- Symondson W O C. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11:627 – 641.
- Szemes M , Bonants P, De Weerd M, Baner J, Landegren U and Schoen C D. 2005. Diagnostic application of padlock probes- multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. *Nucleic Acids Research*, 33(8):e70.
- Tautz D , Hancock J M, Webb D A, Tautz C and Dover G A. 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, 5:366 – 376.
- Timm A E , Stiller M and Frey J E. 2008. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) in southern Africa. *African Entomology*, 16(1):68 – 75.
- Toda S and Komazaki S. 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS2 region. *Bulletin of Entomological Research*, 92:359 – 363.
- Walsh K, Boonham N, Barker I and Collins D W. 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysan. , Thripidae). *Journal of Applied Entomology*, 129:272 – 279.
- Waugh J. 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29:188 – 197.
- Wijkamp I and Peters D. 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*, 83:986 – 991.
- Wijkamp I , Almaraz N, Goldbach R and Peters D. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, 85:1069 – 1074.
- Yudin L S , Cho J J and Mitchew W C. 1986. Host range of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), with special reference to *Leucaena glauca*. *Environmental Entomology*, 15:1292 – 1295.