

重大潜在入侵害虫番茄潜叶蛾的 SS-COI 快速检测技术

张桂芬^{1,2}, 刘万学^{1,2}, 郭建洋^{1,2}, 张毅波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:【背景】番茄潜叶蛾是源自南美洲的一种最具毁灭性的世界性入侵害虫,其适生区范围广,且与其他潜叶类昆虫难以准确、快速识别。【方法】以田间常见的其他 6 种潜叶类害虫为对照,采用基于 mtDNA COI 基因的种特异性 SS-COI 方法,研究番茄潜叶蛾快速分子检测技术。【结果】种特异性检测结果显示,SS-COI 引物只对番茄潜叶蛾 mtDNA 具有扩增能力,对美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、三叶草斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇、桃潜叶蛾等其他潜叶类害虫不具有扩增效果。该引物不仅对成虫和单粒卵具有很好的扩增效能,对单根触角、头部、胸部、腹部以及翅和足等成虫残体亦具有同样的扩增能力,其最低检出阈值为 $312.5 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。【结论与意义】该方法在有效防范番茄潜叶蛾侵入我国,保障农业生产安全和生态环境安全中意义重大。

关键词: 番茄潜叶蛾; 潜在入侵生物; 种特异性 SS-COI 引物; 分子检测; 快速鉴定

Species-specific COI primers for rapid identification of *Tuta absoluta* (Meyrick), a significant, potential alien species

Gui-fen ZHANG^{1,2}, Wan-xue LIU^{1,2}, Jian-yang GUO^{1,2}, Yi-bo ZHANG¹, 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: 【Background】The tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick), native to South America, is one of the most devastating and invasive pest species worldwide. Morphological identification of *T. absoluta* is limited by small size, the high degree of similarity and polymorphism. 【Method】In this study, a method was described for the development of DNA marker for identification of *T. absoluta*. One pair of species-specific PCR primers (SS-COI) based on a fragment of known mitochondrial DNA cytochrome oxidase I (mtDNA COI) sequence was designed for *T. absoluta*. The specificity of the primer pair was validated using six other leafminer species, including *Liriomyza sativae* Blanchard, *L. huidobrensis* (Blanchard), *L. trifolii* (Brugges), *L. chinensis* (Kato), *Phytomyza horticola* Goureau and *Lyonetia clerkella* L., all of them commonly occurring in China. 【Result】All *T. absoluta* specimens were detected, and no cross reactions with other leafminer species were observed. The method was tested on single egg and adult debris (including antenna, head, thorax, abdomen, wing, leg) of *T. absoluta*, and proved to be applicable. Even at the concentration of $312.5 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA, the target fragment could be detected in all replicates. 【Conclusion and significance】The technique developed here should be useful in quarantine at ports of entry and in guarantee the safety of agricultural production and ecological environment in China.

Key words: *Tuta absoluta*; potential invasive species; species-specific SS-COI marker; molecular detection; rapid identification

番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick), 又名番茄麦蛾, 是鳞翅目麦蛾科的一种重要害虫。番茄潜叶蛾起源于南美洲, 1917 年首次在秘鲁的万卡约发现并被描述, 20 世纪中叶开始在南美洲蔓延。该虫于

1955 年从秘鲁传播到智利南部的圣地亚哥, 1964 年从智利扩散到阿根廷的门多萨省, 15 年后在巴西的巴拉那州莫雷蒂斯县发现。目前, 番茄潜叶蛾已在南美洲的阿根廷、玻利维亚、巴西、智利、哥伦比

收稿日期 (Received): 2013-02-23 接受日期 (Accepted): 2013-05-01

基金项目: 国家“973”计划项目 (2009CB119200); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103026)

作者简介: 张桂芬, 女, 研究员。研究方向: 入侵生物学。E-mail: guifenzhang3@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: wanfanghao@caas.cn

亚、厄瓜多尔、巴拉圭、秘鲁、乌拉圭、委内瑞拉等国大面积发生危害,是当地番茄的毁灭性害虫之一 (Cifuentes *et al.*, 2011; EPPO, 2005)。2004 年欧洲和地中海植物保护组织将其列为 A1 类检疫性有害生物;然而,随着国际贸易往来的日趋频繁,2006 年底在西班牙东部卡斯特利翁的一间温室中发现了番茄潜叶蛾的危害 (Desneux *et al.*, 2010);之后,很快便在摩洛哥、突尼斯、芬兰等 20 多个国家发现,近期又在希腊、埃及、约旦和伊拉克东北部发现其危害,使番茄生产遭受了严重打击,堪称世界番茄和马铃薯产业的大敌 (Cifuentes *et al.*, 2011; CIP, 1996; Desneux *et al.*, 2010; EPPO, 2005; Roditakis *et al.*, 2010)。番茄潜叶蛾在欧盟各国的快速传播蔓延,主要是由于番茄果实及其种苗在欧洲各国的随意调运。因此,美国农业部动植物健康检验局针对番茄潜叶蛾制定了严格的检疫条例及详细的操作程序,严禁从疫区国家进口番茄及茄子果实以及茄属、曼陀罗属、烟草属和番茄属种苗,不得使用盛装过上述物品的包装箱等,以严防番茄潜叶蛾的传入 (USDA-APHIS, 2012)。

番茄潜叶蛾以茄科的番茄为主要寄主植物,也可受害茄子、马铃薯、青椒、人参果、烟草等经济作物,龙葵、银叶葵、拟刺茄、皂味茄等非栽培茄科植物,以及多刺曼陀罗、曼陀罗、光烟草等天然茄科植物;有报道称,番茄潜叶蛾还可受害茄科的灯笼果和豆科的豇豆,以及茄科枸杞属和锦葵科锦葵属的植物等。番茄潜叶蛾可在寄主植物的整个生长期进行为害,露地及保护地番茄均可严重受害 (Balzan & Moonen, 2012; Desneux *et al.*, 2010; EPPO, 2005)。如若防控不及时,番茄减产可达 80% ~ 90%,甚至绝收;番茄产业遭受的经济损失达 50% ~ 100%。番茄潜叶蛾为小型蛾类昆虫,成虫主要将卵产于叶片背面或正面,以及芽、嫩茎或绿色果实上;幼虫孵化后潜入叶片、茎秆或果实内取食为害,老熟幼虫主要在土壤中化蛹,也可在叶片表面或潜道内化蛹 (Desneux *et al.*, 2010; EPPO, 2005; Toševski *et al.*, 2011; USDA-APHIS, 2012)。在南非,除番茄潜叶蛾以外,斑潜蝇属昆虫也是番茄上的重要害虫 (Leite *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2005)。

物种特异性 PCR (species-specific PCR, SS-PCR) 检测技术具有谱带单一的特点 (张桂芬等,

2012);而线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 为多拷贝,在等量样品中更容易被放大和使用 (Lin & Danforth, 2004)。因此,基于 mtDNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因 (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 的 SS-COI 技术在入侵害虫检测监测中已逐渐得到应用 (张桂芬等, 2012; Zhang *et al.*, 2011)。本研究采用 SS-COI 技术与方法,从检测阻截的角度,研究番茄潜叶蛾快速检测技术;同时,以我国常见的美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard、南美斑潜蝇 *L. huidobrensis* (Blanchard)、三叶草斑潜蝇 *L. trifolii* (Burgess)、葱斑潜蝇 *L. chinensis* (Kato)、豌豆潜叶蝇 *Phytomyza horticola* Goureau、桃潜叶蛾 *Lyonetia clerkella* L. 等 6 种潜叶类害虫为参照进行种特异性检验,以梯度稀释的单头成虫 DNA 及其卵和成虫残体 DNA 为模板进行灵敏性检验,以期为番茄潜叶蛾的快速检测与准确识别提供依据,为有效防范番茄潜叶蛾入侵我国提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

番茄潜叶蛾由西班牙农业与食品技术研究所 (IRTA) 赠送,室内饲养种群,寄主植物为番茄;美洲斑潜蝇饲养于中国农业科学院植物保护研究所南区温室,寄主植物为菜豆;南美斑潜蝇采自云南省昆明市呈贡县蔬菜生产基地,寄主植物为芹菜;三叶草斑潜蝇由华南农业大学资源环境学院昆虫生态研究室赠送,寄主植物为番茄;豌豆潜叶蝇采自中国农业科学院院内花园,寄主植物为二月兰;葱斑潜蝇和桃潜叶蛾采自中国农业科学院廊坊科研中试基地,寄主植物分别为大葱和桃树。

1.2 DNA 提取

潜叶类害虫 DNA 的提取参照 Toševski *et al.* (2011) 和张桂芬等 (2012) 的方法,并稍加改进。分别取单头番茄潜叶蛾、美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、三叶草斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇、桃潜叶蛾等潜叶类害虫成虫,放入 1.5 mL 离心管中,加入液氮后以玻璃研磨棒充分研磨,然后以 220 μL 缓冲液 (50 mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol $\cdot$ L⁻¹ EDTA, 1% SDS, 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ NaCl, pH 8.0) 分 2 次清洗研磨棒。充分混匀后,加入 5 μL 蛋白酶 K (20 mg $\cdot$ mL⁻¹), 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h (中途混匀 1 次);然后,沸水浴 8 min,

加入 220 μL 氯仿/异戊醇($v:v=24:1$)抽提液,轻柔混匀数十次后,冰上放置 30 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液约 400 μL 移入另一离心管,加入 800 μL 预冷的无水乙醇,轻轻混匀,待出现少量絮状沉淀后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,小心弃去上清液。加入 500 μL 预冷的 75% 乙醇洗涤,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,小心弃去上清液;然后将离心管倒扣于洁净滤纸上,自然干燥 30 min 后每管加入 100 μL 超纯水,充分溶解后于 -30 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 番茄潜叶蛾 SS-COI 引物的设计

从数据库中调用已知的番茄潜叶蛾 mtDNA COI 基因序列 (GenBank 登录号为 JN417242.1; Toševski *et al.*, 2011),运用软件 Primer Premier 5 将番茄潜叶蛾与美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、三叶斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇、桃潜叶蛾等的 COI 序列进行比对分析 (Scheffer *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011)。选取变异位点较多的区段,并根据该区段的碱基序列设计 1 对番茄潜叶蛾特异性引物 TAZJCE1/TAZJCF1,上游引物碱基序列为 AGAATCGTAGAAAATGGAGCAGGTA,下游引物碱基序列为 CTGGCAATGATAAAAGAAGGAG(上海生物工程技术有限公司协助合成),引物扩增片段大小为 256 bp。

1.4 SS-COI 引物的种特异性检测

分别以单头美洲斑潜蝇、南美斑潜蝇、三叶草斑潜蝇、葱斑潜蝇、豌豆潜叶蝇以及桃潜叶蛾 DNA 为模板,番茄潜叶蛾为阳性对照,检验番茄潜叶蛾特异片段扩增引物 TAZJCE1/TAZJCF1 的种特异性。反应体系为 25 μL ,包含 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL 、dNTP (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、*Taq* 聚合酶 (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL (美国 NEB 公司)、上游引物和下游引物 (10 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL 、模板 DNA 2.0 μL 、超纯水 18.75 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增反应在 ABI-9700 PCR 基因扩增仪上运行。取 5 μL PCR 扩增产物在 1.0% (质量) 琼脂糖 (amresco) 凝胶上以 90 V 电泳 (Bio-Rad PowerPac Basic) 分离 45 min,然后以 GelDoc Univer-

sal Hood II 型凝胶成像系统 (Bio-Rad Laboratories) 分析电泳结果。每个种类分别检测 10 头。

1.5 SS-COI 引物对卵及成虫残体的扩增效果以及最低检出阈值的测定

分别以提取的番茄潜叶蛾的卵以及成虫残体 [包括单根触角、头部、胸部 (1/2 胸长)、腹部 (1/5 腹长)、前翅、后翅、前足、中足、后足] 的 DNA 作为模板,对靶标片段扩增效果进行检验,卵或成虫残体分别检测 8 粒 (卵) 或 8 头 (成虫残体)。此外,取单头雌性成虫原模板 DNA 溶液 2 μL (80 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 以 2 倍递减梯度稀释至 4.88 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,然后以不同浓度的 DNA 为模板 (即 80 $\times 10^3$ 、40 $\times 10^3$ 、20 $\times 10^3$ 、10 $\times 10^3$ 、5.0 $\times 10^3$ 、2.5 $\times 10^3$ 、1.25 $\times 10^3$ 、625.0、312.5、156.25、78.125、39.06、19.53、9.76 和 4.88 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,相当于 1/50、1/100、1/200、1/400、1/800、1/1600、1/3200、1/6400、1/12800、1/25600、1/51200、1/102400、1/204800、1/409600、1/819200 头雌性成虫) 测定最低检出阈值,共测验 10 头。

2 结果与分析

2.1 番茄潜叶蛾 SS-COI 引物的种特异性

以番茄潜叶蛾及其他潜叶类昆虫的 DNA 为模板,以所设计的特异性引物 TAZJCE1/TAZJCF1 进行 PCR 扩增。检测结果显示,该引物只对番茄潜叶蛾具有扩增能力,对其他种类的潜叶类害虫不具有扩增效果,表明该引物为番茄潜叶蛾的特异性引物 (图 1)。

2.2 SS-COI 引物对卵及成虫残体的扩增效果

以番茄潜叶蛾的卵及成虫残体 DNA 为模板,以特异性引物 TAZJCE1/TAZJCF1 进行 PCR 扩增。电泳检测结果显示,无论是单粒卵、成虫的单根触角、头部、胸部、腹部,还是成虫的足和膜质的翅,均能扩增出清晰的靶标条带 (图 2)。

2.3 SS-COI 引物对番茄潜叶蛾的检出阈值

当将单头雌性成虫的 DNA 模板进行递减梯度稀释至 312.5 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (相当于 1/12800 头) 时,所有的个体均能扩增出特异性的靶标片段;当稀释为 156.25 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,尚有 50% 的个体可扩增出清晰的条带 (图 3)。

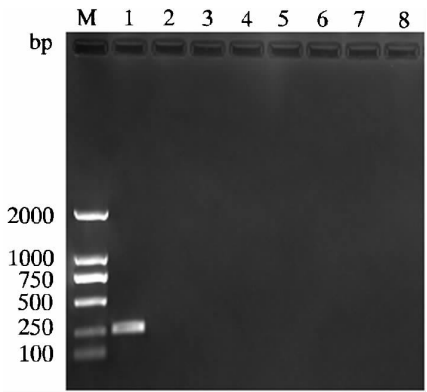


图1 SS-COI 引物 TAZJCE1/TAZJCF1 对番茄潜叶蛾及其他潜叶类害虫的扩增结果

Fig.1 Amplification pattern of mitochondrial DNA of *Tuta absoluta* and its related leafminer species using SS-COI primers TAZJCE1/TAZJCF1
M:DNA 分子质量标准;1:番茄潜叶蛾;2:美洲斑潜蝇;3:南美斑潜蝇;4:三叶草斑潜蝇;5:葱斑潜蝇;6:豌豆潜叶蝇;7:桃潜叶蛾;8:阴性对照(模板为水)。
M: DNA ladder marker; Lines 1: *T. absoluta*; 2: *Liriomyza sativae*; 3: *L. huidobrensis*; 4: *L. trifolii*; 5: *L. chinensis*; 6: *Phytomyza horticola*; 7: *Lyonetia clerkella*; 8: Negative control, using ultra pure water as the template.

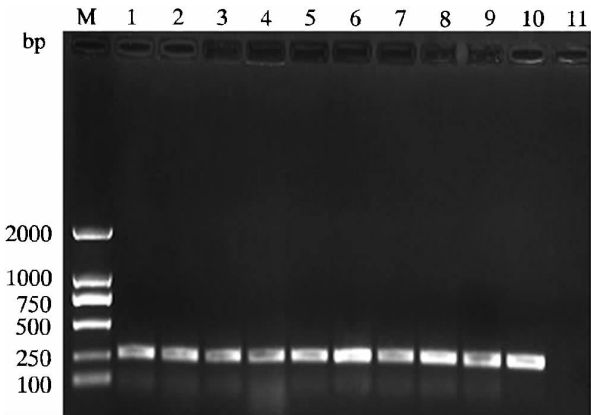


图2 SS-COI 引物 TAZJCE1/TAZJCF1 对番茄潜叶蛾卵及成虫残体的扩增结果

Fig.2 Amplification pattern of mitochondrial DNA from egg and adult debris of *Tuta absoluta* using SS-COI primers TAZJCE1/TAZJCF1
M:DNA 分子质量标准;1:卵;2:触角;3:头部;4:胸部;5:腹部;6:前翅;7:后翅;8:前足;9:中足;10:后足;11:阴性对照(模板为水)。
M: DNA ladder marker; Lines 1: Egg; 2: Antenna; 3: Head; 4: Thorax; 5: Abdomen; 6: Forewing; 7: Hindwing; 8: Foreleg; 9: Midleg; 10: Hindleg; 11: Negative control, using ultra pure water as the template.

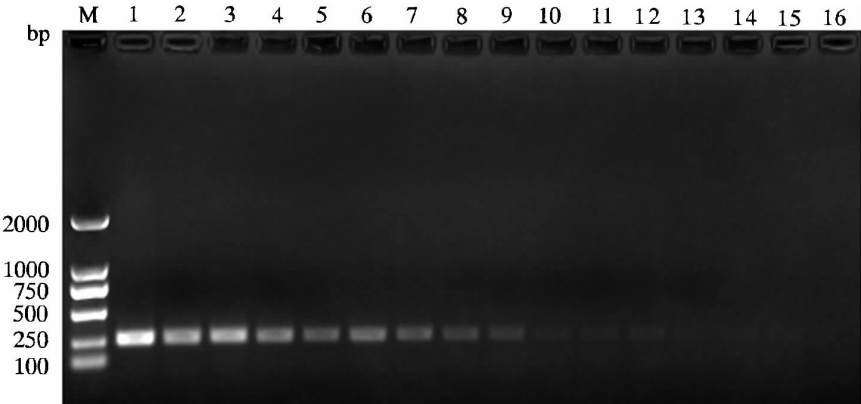


图3 SS-COI 引物 TAZJCE1/TAZJCF1 对番茄潜叶蛾的最低检出量

Fig.3 The detection efficiency for *Tuta absoluta* diluted female adult mitochondrial DNA using SS-COI primers TAZJCE1/TAZJCF1
M:DNA 分子质量标准;1~15:80×10³、40×10³、20×10³、10×10³、5.0×10³、2.5×10³、1.25×10³、625.0、312.5、156.25、78.125、39.06、19.53、9.76 和 4.88 pg·μL⁻¹,相当于 1/50、1/100、1/200、1/400、1/800、1/1600、1/3200、1/6400、1/12800、1/25600、1/51200、1/102400、1/204800、1/409600、1/819200 头雌性成虫;16:水(阴性对照)。
M: DNA ladder marker; Lines 1~15: Dilutions of 80×10³, 40×10³, 20×10³, 10×10³, 5.0×10³, 2.5×10³, 1.25×10³, 625.0, 312.5, 156.25, 78.125, 39.06, 19.53, 9.76, 4.88 pg·μL⁻¹, equal to 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600, 1/51200, 1/102400, 1/204800, 1/409600 and 1/819200 of a whole female adult of *T. absoluta*, respectively; 16: Negative control, using ultra pure water as the template.

3 讨论

番茄潜叶蛾为寡食性害虫,以幼虫在茄科植物的叶片、顶芽、嫩茎、花蕾、萼片、幼果等部位潜食或蛀食为害,严重影响茄科蔬菜、烟草及观赏植物的产量和质量,蛀食幼果形成的孔洞极易招致次生病原体寄生,导致幼果大量腐烂,若防控不及时或措施不得当,会造成严重减产甚至绝收(Desneux *et al.*, 2010; EPPO, 2005; Toševski *et al.*, 2011; USDA-APHIS, 2012)。番茄潜叶蛾常以卵或藏匿在寄主植物组织中的幼龄幼虫,以及土壤中的蛹随番茄果实、茄科植物或观赏植物种苗远距离传播扩散。我国目前虽尚没有番茄潜叶蛾发生的报道,但该虫在许多国家危害严重,且适生区范围广泛(Desneux *et al.*, 2010; Povolny, 1975),进一步传播扩散趋势明显。因此,快速、准确鉴定番茄潜叶蛾是有效防止其侵入我国、保障农业生产安全和生态安全的必要前提,而以往的比较形态学鉴定法无法满足快速鉴定和有效阻截的基本需求。本研究采用的 SS-COI 分子标记技术特异性强,可以区分番茄潜叶蛾与其他常见的潜叶类害虫。此外,该技术灵敏度高,不仅可以检测番茄潜叶蛾的单粒卵,还可检测单根触角、头部、胸部、腹部以及膜质的翅和角质化程度较高的足等成虫残体;当以梯度稀释的成虫 DNA 为模板进行 PCR 扩增时,其最低检测阈值为 $312.5 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,相当于 1/12800 头雌性成虫。对靶标序列的测序及 GenBank 比对结果显示,该片段与番茄潜叶蛾的同源性为 100% (Bettaïbi *et al.*, 2012; Toševski *et al.*, 2011),而与其他昆虫的同源性均低于 92% (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。这表明该检测技术可用于口岸农产品国际贸易中番茄潜叶蛾的检测。

目前,已有多种分子标记技术用于潜叶类害虫的种类鉴定,如 RAPD (random amplification of polymorphic DNA) 技术 (邱一中等, 2000; Çöl *et al.*, 2006)、RFLP (restriction fragment length polymorphism) 技术 (陈萍等, 2002; Scheffer *et al.*, 2001)、多重 PCR 技术 (Miura *et al.*, 2004) 以及 DNA 条形码技术 (Scheffer *et al.*, 2006) 等曾用于斑潜蝇属害虫的鉴定研究,且均取得了较好的效果。但上述方法各有优缺点,或对环境因子的变化较为敏感如 RAPD 技术,或操作繁琐且 DNA 需求量比较大如 RFLP 技术,或需要对 PCR 产物进行回收、纯化、测

序及序列比对分析等如 DNA 条形码技术。SS-COI 技术由 COI 标记技术转化而来,具有重现性好、检测灵敏度高,且谱带单一等诸多优点,因此适宜于大规模快速检测分析 (张桂芬等, 2012)。

致谢: 海南大学环境与植物保护学院的江雅琴同学协助完成部分试验,特表感谢!

参考文献

- 陈萍, 温硕洋, 曾玲. 2002. PCR-RFLP 技术应用于鉴定美洲斑潜蝇和番茄斑潜蝇的初步研究. 武夷科学, 18: 60–64.
- 邱一中, 吴文哲, 萧旭峰, 石正人. 2000. RAPD-PCR 在六种斑潜蝇 (*Liriomyza* spp.) (双翅目: 潜蝇科) 快速鉴定技术之应用. 中华昆虫, 20(4): 293–309.
- 张桂芬, 刘万学, 郭建英, 吕志创, 万方浩, 申香菊. 2012. 美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究. 生物安全学报, 21(1): 74–78.
- Balzan M V and Moonen A C. 2012. Management strategies for the control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) damage in open-field cultivations of processing tomato in Tuscany (Italy). *OEPP/EPPO Bulletin*, 42: 217–225.
- Bettaïbi A, Mezghani-Khemakhem M, Bouktila D, Makni H and Makni M. 2012. Genetic Analysis of Tunisian Populations of the Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), Inferred from Mitochondrial Markers. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/380746935?report=genbank&log\\$=nucltop&blastrank=2&RID=HSP03C0T01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/380746935?report=genbank&log$=nucltop&blastrank=2&RID=HSP03C0T01R).
- Cifuentes D, Chynoweth R and Bielza P. 2011. Genetic study of Mediterranean and South American populations of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Povolny, 1994) (Lepidoptera: Gelechiidae) using ribosomal and mitochondrial markers. *Pest Management Science*, 67: 1155–1162.
- CIP (The International Potato Center). 1996. *Major Potato Diseases, Insects, and Nematodes*. 3rd ed. Centro Internacional de la Papa, Lima, Peru.
- Çöl B, Tonguç A, Özgül O, Civelek H S and Kaya B. 2006. The use of RAPD-PCR analysis in characterization of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880), *Liriomyza congesta* (Becker 1903), *Agromyza apfelbecki* Strobl, 1902 and *Chromatomyia horticola* (Goureau, 1851) species collected from Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 30: 243–253.
- Desneux N, Wajnberg E and Tabone E. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83: 197–215.

- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2005. *Tuta absoluta*. Data sheets on quarantine pests. *OEPP/EPPO Bulletin*, 35: 434 – 435.
- Leite G L D, Picanço M and Jham G N. 2004. Intensity of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae) attacks on *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves. *Ciência e Agrotecnologia*, 28: 42 – 48.
- Lin C P and Danforth B N. 2004. How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 686 – 702.
- Miranda M M M, Picanço M C, Zanuncio J C, Bacci L and da Silva É M. 2005. Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. *Ciência Rural*, 35: 204 – 208.
- Miura K, Tagami Y, Ohtaishi M and Iwasaki A. 2004. Application of molecular techniques to distinguish *Liriomyza trifolii* from *L. sativae* (Diptera: Agromyzidae) on tomato cultivation in Japan. *Journal of Economic Entomology*, 97: 964 – 969.
- Povolny D. 1975. On three neotropical species of *Gnorimoschemini* (Lepidoptera, Gelechiidae) mining Solanaceae. *Acta Universitatis Agriculturae*, 23: 379 – 393.
- Roditakis E, Papachristos D and Roditakis N E. 2010. Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece. *OEPP/EPPO Bulletin*, 40: 163 – 166.
- Scheffer S J, Wijesekara A, Visser D and Hallett R H. 2001. Polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism method to distinguish *Liriomyza huidobrensis* from *L. langei* (Diptera: Agromyzidae) applied to three recent leafminer invasions. *Journal of Economic Entomology*, 94: 1177 – 1182.
- Scheffer S J, Lewis M L and Joshi R C. 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 204 – 210.
- Toševski I, Jović J, Mitrović M, Cvrković T, Krstić and Krnjajić S. 2011. *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera, Gelechiidae): a new pest of tomato in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine (Belgrade)*, 26: 197 – 204.
- USDA-APHIS (United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service). 2012. *Surveillance Protocol for the Tomato Leaf Miner, Tuta absoluta, for NAPPO Member Countries*. http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/plantexports/downloads/Tuta_absoluta_surveillanceprotocol_08-06-2012-e.pdf.
- Wang S Y, Lei Z R and Wang H H. 2011. The complete mitochondrial genome of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Molecular Biology Reports*, 38: 687 – 692.
- Zhang G F, Meng X Q, Min L, Qiao W N and Wan F H. 2011. Rapid diagnosis of the invasive species, *Frankliniella occidentalis* (Pergande): a species-specific COI marker. *Journal of Applied Entomology*, doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01661.x.

(责任编辑:彭露)

