

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2013.03.002

双钩巢粉虱的种特异性 SS-COI 检测技术

张桂芬^{1,2}, 郭建洋^{1,2}, 王 瑞^{1,2}, 杨 婷¹, 李小凤¹, 郭建英^{1,2}, 曹凤勤³, 张金良⁴, 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;

³海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228;

⁴北京市植物保护站, 北京 100029

摘要:【背景】双钩巢粉虱是近年在我国南方新发现的一种入侵害虫,其寄主范围广,危害严重,进一步扩散蔓延趋势明显。【方法】针对粉虱类害虫体型微小、形态相似、难以准确快速识别的问题,以双钩巢粉虱为靶标,以我国常见的其他 8 种/隐种粉虱为参照,采用基于 mtDNA COI 基因的种特异性 SS-COI 方法,研究其快速分子检测技术。利用 COI 通用型引物 LCO-1490/HCO-2198 获得双钩巢粉虱及其他常见粉虱的 COI 序列,根据测序结果设计特异性 SS-COI 引物 1 对 (PPZYF1/PPZYR1),其扩增片段大小为 233 bp。【结果】种特异性检验结果显示,该引物只对双钩巢粉虱的 COI 基因具有扩增能力,对其他种/隐种粉虱,包括烟粉虱的不同隐种 (MEAM1 隐种、MED 隐种、Asia II 3 隐种和 Asia II 1 隐种)以及温室粉虱、柑橘粉虱、黑刺粉虱、螺旋粉虱等不具有扩增效果。该引物不仅对不同性别的成虫具有良好的扩增能力,对 1~4 龄若虫和单粒卵亦具有同样的扩增效能,其最低检测阈值为 1/40960 头雌性成虫。【结论与意义】本检测技术对口岸检疫以及观赏植物、果树及其种苗调运中的害虫检测、监测意义重大。

关键词: 双钩巢粉虱; 种特异性 SS-COI 引物; 快速鉴定; 分子检测

Species-specific COI primers to assist the molecular identification of the invasive whitefly, *Paraleyrodes pseudonaranjæ*

Gui-fen ZHANG^{1,2}, Jian-yang GUO^{1,2}, Rui WANG^{1,2}, Ting YANG¹, Xiao-feng LI¹, Jian-ying GUO^{1,2},
Feng-qin CAO³, Jin-liang ZHANG⁴, Fang-hao WAN^{1,2*}

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

³College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

⁴Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China

Abstract: 【Background】*Paraleyrodes pseudonaranjæ* Martin, a new invasive species in southern China, is a worldwide pest, causing serious damage to a wide range of host plants. Further spread of this whitefly species in China is expected. Most of whitefly species are small in size and similar in morphology, which makes them hard to be identified quickly. 【Method】In the present study, we developed DNA markers to rapidly identify *P. pseudonaranjæ*. The fragments of mitochondrial DNA cytochrome oxidase I (mtDNA COI) gene of *P. pseudonaranjæ* and six other whitefly species were amplified (using COI gene 5' end universal primers LCO-1490/HCO-2198) and sequenced. A pair of *P. pseudonaranjæ* species-specific COI (SS-COI) primers (PPZYF1/PPZYR1) were developed. The target fragment amplified by the SS-COI primers PPZYF1/PPZYR1 was 233 bp long. 【Result】The species specificity of the primer pair was validated using eight other whitefly species, including different cryptic species of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (MEAM1, MED, Asia II 3 and Asia II 1) as well as *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Dialeurodes citri* (Ashmead), *Aleurocanthus spiniferus* (Quaintance) and *Aleurodicus dispersus* (Russell), all of them common in China. All *P. pseudonaranjæ* specimens were detected, and no cross reactions with other whitefly species were obtained. The method was tested on single male and female adult, single red-eyed nymph, single 2nd- and 3rd-instar nymph, and even single egg and newly emerged nymph, and proved to be applicable for all of these life stages. When the dilution was 1/40960 of a whole female adult of *P. pseudonaranjæ*, the 233 bp DNA fragment could be identified for all re-

peats. 【Conclusion and significance】The technique would be useful in quarantine at ports of entry and in pest detection and monitoring during transportation of ornamental plants, fruits and seedlings.

Key words: *Paraleyrodes pseudonaranjiae*; SS-COI marker; rapid identification; molecular detection

双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjiae* Martin 是半翅目 Hemiptera 粉虱科 Aleyrodidae 巢粉虱属 *Paraleyrodes* 的一种重要害虫,原产于南美洲。双钩巢粉虱于 20 世纪 40 年代发现于美国的佛罗里达,之后,在夏威夷(1976 年)、百慕大(1989 年)、我国香港(1996 年)以及波多黎各(2007 年)等地发生危害。近年又在我国海南、广东和广西(2007 年)等地发现其踪迹(罗雪桃等,2009;虞国跃等,2010),是继 20 世纪 90 年代中后期在上海发现烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius) AEAM1 隐种(即 B 生物型)(刘树生,2012;刘银泉和刘树生,2012;罗晨等,2002),2003 年在北京、河南郑州、云南昆明发现烟粉虱 MED 隐种(即 Q 生物型)(刘树生,2012;刘银泉和刘树生,2012;Chu *et al.*, 2006),以及 2006 年在海南发现螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* Russell(虞国跃等,2007)之后的又一入侵性粉虱类害虫。

双钩巢粉虱为多食性害虫,其寄主植物涉及 30 科 49 属 63 种,其中新记录的寄主植物有 15 种,尤以椰子、槟榔、番石榴、柑橘以及番荔枝等受害最为严重,且其寄主植物的种类有明显增加的趋势(虞国跃等,2010;朱文静等,2010;Evans,2008;Martin,2001)。双钩巢粉虱以成虫和若虫群居于叶片背面刺吸寄主叶片的汁液,使寄主植物直接受害;同时,可分泌大量的蜜露,诱发煤烟病的发生,从而影响寄主植物的光合作用、呼吸作用和蒸腾作用,使叶片变形、褪绿,甚至萎蔫脱落,明显降低产品的产量和质量;此外,成虫和若虫能够分泌大量白色蜡粉、蜡丝,严重影响花卉及园林植物的观赏价值(朱文静等,2010)。

粉虱类昆虫的种类识别一般是根据拟蛹的形态特征,而双钩巢粉虱则是以其雄性成虫的外生殖器为主要鉴定依据(虞国跃等,2010;Martin,2001)。然而,双钩巢粉虱体型微小,雄性成虫体长 0.88~1.22 mm,雌性成虫体长 0.86~1.21 mm(虞国跃等,2010;Martin,2001),且与其他种粉虱间的形态极其相似。因此,未经专门培训的非粉虱类分类人员很难对其进行准确识别与鉴定;对其卵和若虫,则更是无所适从。为此,本试验采用基于线粒

体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I, mtDNA COI)的种特异性(species-specific COI, SS-COI) PCR 技术,研究双钩巢粉虱快速检测方法,以期有效阻截双钩巢粉虱在我国的进一步传播扩散提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

双钩巢粉虱由海南大学环境与植物保护学院协助采集,采集地点为海南省乐东县,寄主植物为番荔枝;不同隐种的烟粉虱(MEAM1 隐种、MED 隐种、Asia II 3 隐种和 Asia II 1 隐种)和温室粉虱分别饲养于中国农业科学院植物保护研究所南区温室,寄主植物为番茄;柑橘粉虱采自重庆市北碚区西南大学植物保护学院网室,寄主植物为柑橘;黑刺粉虱采自湖南省郴州市北湖区华塘镇,寄主植物为柑橘;螺旋粉虱采自中国热带农业科学院环境保护与植物保护研究所院内,寄主植物为印度紫檀。

1.2 DNA 提取

粉虱类害虫 DNA 的提取参照 Shatters *et al.* (2009)的方法并稍加改动。取单头粉虱成虫置于滴有 20 μL DNA 提取缓冲液($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% SDS, pH 8.0)的 Parafilm 膜上,用 0.2 mL 的 PCR 管底部作为匀浆器将其充分研磨,匀浆液用微量移液器移入 1.5 mL 离心管;用 200 μL 提取缓冲液分 2 次冲洗匀浆器,移入同一离心管,混匀,加入 5 μL 蛋白酶 K($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),充分混匀后于 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,加入 440 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 15 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 20 min 后每管加入 20 μL 超纯水,充分溶解后于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 粉虱类昆虫 COI 基因 5'端序列的扩增

以双钩巢粉虱以及其他 6 种/隐种(包括烟粉虱 MED 隐种和 Asia II 3 隐种、温室粉虱以及柑橘粉虱、黑刺粉虱和螺旋粉虱)常见的粉虱类害虫的 DNA 为模板,采用 mtDNA COI 通用型引物 LCO-1490/HCO-2198(Folmer *et al.*, 1994)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL ,其中,模板 DNA 2 μL , 10 $\times$ Buffer 2.5 μL (含 Mg^{2+}), dNTPs 0.5 μL (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),上游引物和下游引物各 0.5 μL (5 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$),Taq DNA 聚合酶(北京全式金生物技术有限公司,2.5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.25 μL ,超纯水 18.75 μL 。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;40 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 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 3 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 Power-Pac Basic)分离 45 min,然后以 GelDoc Universal Hood II 型凝胶成像系统(Bio-Rad Laboratories)分析电泳检测结果。

1.4 双钩巢粉虱特异性 SS-COI 引物的设计

将 1.3 中经电泳检测验证合格的 PCR 产物进行双向测序(由北京三博远志生物技术有限公司协助完成),根据测序结果,运用软件 Oligo 6.0 设计双钩巢粉虱特异性 SS-COI 引物 1 对(PPZYF1/PPZYR1)。上游引物 PPZYF1 的碱基序列为 5'-TA-AAGGAAGTAATCAATTTCCAAATCCC-3',下游引物 PPZYR1 的碱基序列为 5'-GGTCAACAAATCATA-AAGATATTGGGT-3'(由上海生工生物工程技术服务有限公司协助合成)。

1.5 双钩巢粉虱 SS-COI 引物的种特异性检测

分别以单头不同隐种的烟粉虱(MEAM1 隐种、MED 隐种、Asia II 3 隐种和 Asia II 1 隐种)、温室粉虱以及柑橘粉虱、黑刺粉虱和螺旋粉虱的 DNA 为模板,以双钩巢粉虱为阳性对照,检验双钩巢粉虱特异片段扩增引物 PPZYF1/PPZYR1 的种特异性。反应体系为 20 μL ,其中,10 $\times$ PCR buffer(含 Mg^{2+})2.0 μL 、dNTPs(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)0.4 μL 、Taq 聚合酶(2.5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.15 μL 、上游引物和下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL 、模板 DNA 1.0 μL 、超纯水 15.45 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s;最后

72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物的检测方法同 1.3。每个种类分别检测 10 头。

1.6 双钩巢粉虱 SS-COI 引物的灵敏性检测

以不同性别(单头雌性成虫、雄性成虫)和不同虫态[单粒卵,单头 1 龄若虫、2 龄若虫、3 龄若虫、4 龄若虫(拟蛹)]的双钩巢粉虱 DNA,以及 2 倍递减梯度稀释(1/320、1/640、1/1280、1/2560、1/5120、1/10240、1/20480、1/40960、1/81920 头)的单头雌性成虫 DNA 为模板,进行灵敏性检验。每种性别、虫态及每个梯度分别测定 10 头。

2 结果与分析

2.1 粉虱类昆虫 COI 基因 5'端序列的扩增结果及 SS-COI 标记分析

电泳检测结果显示,7 种/隐种粉虱均能扩增出一条清晰的靶标片段(图 1);将经电泳检测验证合格的 PCR 产物进行双向测序,结果显示,该片段的大小约为 680 bp;双钩巢粉虱 GenBank 登录号:KF595126。根据测序结果设计双钩巢粉虱特异性 SS-COI 引物 1 对(PPZYF1/PPZYR1),其扩增片段的大小为 233 bp。

2.2 双钩巢粉虱 SS-COI 引物的种特异性检验结果

电泳检测结果显示,种特异性引物 PPZYF1/PPZYR1 只对双钩巢粉虱具有扩增能力,对其他 8 种/隐种的粉虱不具有扩增效果,表明该引物为双钩巢粉虱的特异性引物(图 2)。

2.3 SS-COI 引物对双钩巢粉虱不同性别和虫态的扩增效果

以不同性别和不同虫态的双钩巢粉虱 DNA 为模板,采用 SS-COI 引物 PPZYF1/PPZYR1 进行 PCR 扩增。检测结果显示,不同性别、不同虫态的双钩巢粉虱均能稳定地扩增出 233 bp 的特异性片段(图 3)。

2.4 SS-COI 引物对双钩巢粉虱检测阈值的测定结果

当将单头雌性成虫的 DNA 模板以 2 倍递减梯度稀释至 1/40960 头时,所有的个体均可扩增出特异性的靶标片段;当稀释至 1/81920 头时,仍有 50% 的个体可以扩增出微弱的靶标片段(图 4)。这表明该引物具有较高的灵敏性,其检测阈值为 1/40960 头雌性成虫。

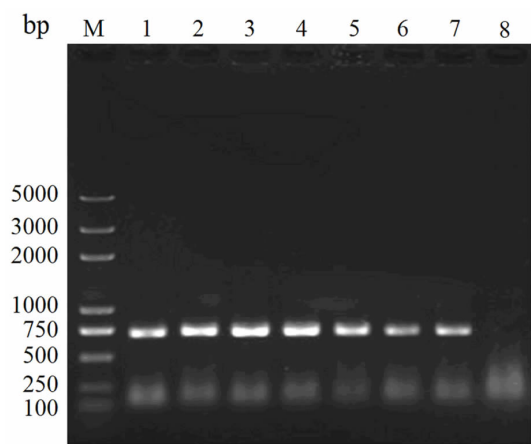


图 1 COI 基因 5'端序列通用型引物 LCO-1490/HCO-2198 对双钩巢粉虱及其他 6 种/隐种田间常见粉虱的扩增结果

Fig. 1 Agarose gel showing the polymerase chain reaction amplification of *P. pseudonaranjiae* and its related whitefly species or cryptic species using COI gene 5' end universal primers LCO-1490/HCO-2198

M: *Trans2K* 加 DNA 分子质量标准; 1: 双钩巢粉虱; 2: 烟粉虱 Asia II 3 隐种; 3: 烟粉虱 MED 隐种; 4: 温室粉虱; 5: 黑刺粉虱; 6: 柑橘粉虱; 7: 螺旋粉虱; 8: 阴性对照 (模板为超纯水)。

M: *Trans2K* plus DNA marker; 1: *P. pseudonaranjiae*; 2: *Bemisia tabaci* cryptic species Asia II 3; 3: *B. tabaci* cryptic species MED; 4: *Trialetrodes vaporariorum*; 5: *Aleurocanthus spiniferus*; 6: *Dialeurodes citri*; 7: *Aleurodicus dispersus*; 8: Negative control, using ultra pure water as the template.

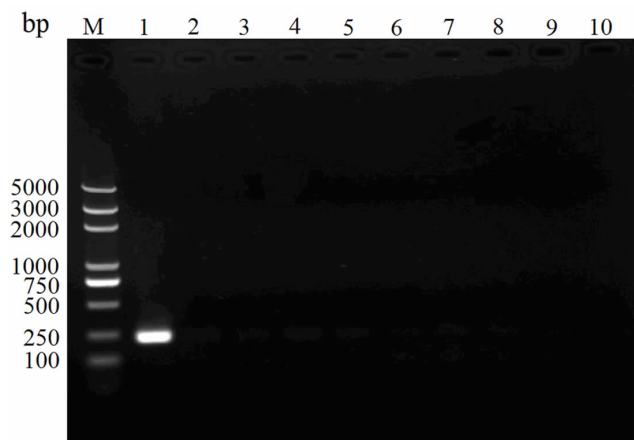


图 2 SS-COI 引物 PPZYF1/PPZYR1 对双钩巢粉虱及其他 8 种/隐种粉虱的扩增效果

Fig. 2 Amplification pattern of mitochondrial DNA of *P. pseudonaranjiae* and its related whitefly species or cryptic species using the species-specific SS-COI primers PPZYF1/PPZYR1

M: *Trans2K* 加 DNA 分子质量标准; 1: 双钩巢粉虱; 2: 烟粉虱 Asia II 3 隐种; 3: 烟粉虱 Asia II 1 隐种; 4: 烟粉虱 MEAM1 隐种; 5: 烟粉虱 MED 隐种; 6: 温室粉虱; 7: 黑刺粉虱; 8: 柑橘粉虱; 9: 螺旋粉虱; 10: 阴性对照 (模板为超纯水)。

M: *Trans2K* plus DNA marker; 1: *P. pseudonaranjiae*; 2: *Bemisia tabaci* cryptic species Asia II 3; 3: *B. tabaci* cryptic species Asia II 1; 4: *B. tabaci* cryptic species MEAM1; 5: *B. tabaci* cryptic species MED; 6: *Trialetrodes vaporariorum*; 7: *Aleurocanthus spiniferus*; 8: *Dialeurodes citri*; 9: *Aleurodicus dispersus*; 10: Negative control, using ultra pure water as the template.

3 讨论

粉虱类昆虫是重要的害虫类群,由于其个体微小、行踪隐蔽,且幼期营固定生活,极易随寄主植物及其苗木的远距离运输而传播扩散。传统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 SS-COI 标记技术,研发出双钩巢粉虱快速检测方法。该技术体系特异性强,可以将双钩巢粉虱与我国其他 8 种/隐种常见的粉虱类昆虫区

分开。同时,该检测技术具有较高的灵敏性,不仅可检测单头成虫、2~3 龄若虫和拟蛹(4 龄若虫),还可检测单粒卵和初孵若虫;当以梯度稀释的单头雌性成虫的 DNA 为模板时,其检测阈值为 1/40960 头。此外,数据库同源性比对分析结果显示,没有任何一种其他种类的粉虱或昆虫的 DNA 序列与双钩巢粉虱特有的 233 bp 片段一致,表明该 SS-COI 检测技术完全可用于口岸以及园林植物、果树及其种苗调运中双钩巢粉虱的检测及其扩张趋势的监测。

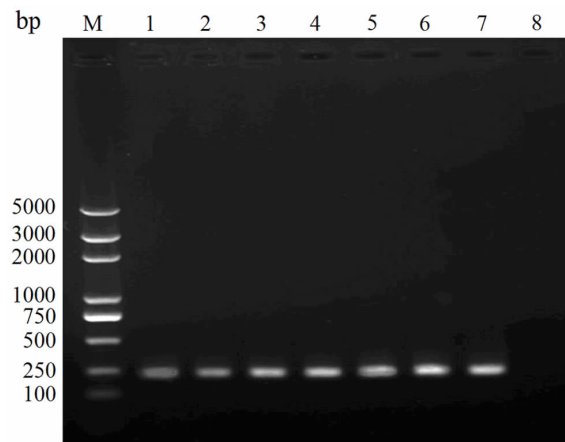


图 3 SS-COI 引物 PPZYF1/PPZYR1 对双钩巢粉虱不同虫态和性别的扩增效果
Fig. 3 Amplification pattern of mitochondrial DNA from different developmental stages and sexes of *P. pseudonaranjiae* using SS-COI primers PPZYF1/PPZYR1

M: *Trans*2K 加 DNA 分子质量标准; 1:单粒卵; 2:1 龄若虫; 3:2 龄若虫; 4:3 龄若虫; 5:4 龄若虫(拟蛹); 6:雄性成虫; 7:雌性成虫; 8:阴性对照(超纯水)。

M: *Trans*2K plus DNA marker; 1: One egg; 2: 1st instar nymph; 3: 2nd instar nymph; 4: 3rd instar nymph; 5: 4th instar nymph (red-eyed nymph); 6: Male adult; 7: Female adult; 8: Negative control, using ultra pure water as the template.

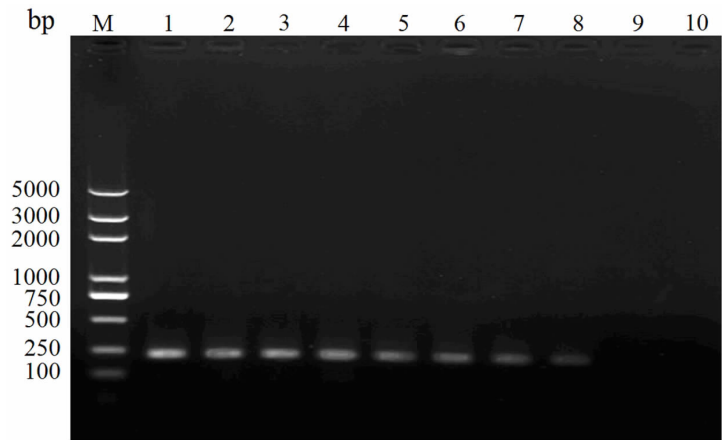


图 4 SS-COI 引物 PPZYF1/PPZYR1 对双钩巢粉虱检测阈值的测定

Fig. 4 The detection efficiency for diluted samples of *P. pseudonaranjiae* female adult mitochondrial DNA using SS-COI primers PPZYF1/PPZYR1

M: *Trans*2K 加 DNA 分子质量标准; 1~9 分别为 1/320、1/640、1/1280、1/2560、1/5120、1/10240、1/20480、1/40960、1/81920 头雌性成虫; 10: 阴性对照(超纯水)。

M: *Trans*2K plus DNA marker; 1~9: Dilutions of 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, 1/10240, 1/20480, 1/40960 and 1/81920 of a whole female adult of *P. pseudonaranjiae*, respectively; 10: Negative control, using ultra pure water as the template.

目前,已有多种分子标记技术用于粉虱类害虫种类或烟粉虱生物型/隐种的鉴别。例如,RAPD (random amplified polymorphic DNA,随机扩增多态性 DNA)标记技术曾被用于快速区分烟粉虱的隐种(De Barro & Driver,1997; De Barro *et al.*,1998; Qiu *et al.*,2003)以及螺旋粉虱和 *Lecanoides floccissimus* Martin(Callejas *et al.*,2005);COI 和 ITS1 (internal transcribed spacer 1,内转录间隔区 1)标记技术可成功用于鉴定烟粉虱的隐种(罗晨等,2002; Li & Hu,2005)。然而,RAPD 标记技术的稳定性较

差;COI 和 ITS1 标记技术需要对 PCR 产物进行回收、纯化、测序及序列比对,耗时长且成本稍高。由 RAPD 转化而来的 SCAR (sequence characterized amplified region,特征序列扩增区域)标记技术,因具有操作简便、结果稳定可靠、重现性强且谱带单一等诸多优点,已被用于粉虱类害虫包括烟粉虱 MEAM1 隐种、Asia II 3 隐种和 Asia II 1 隐种(臧连生等,2006)以及黑刺粉虱(刘循等,2009)和螺旋粉虱(张桂芬等,2010)等的快速检测分析。种特异性 SS-COI 检测技术正如烟粉虱隐种特异性(bio-

type-specific mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, BS-COI) 检测技术(Shatters *et al.*, 2009) 一样,是在 mtDNA COI 基因序列分析基础上发展起来的一种特异性引物标记技术,其优势与 SCAR 标记技术相当,同样适宜于大规模检测分析(张桂芬等, 2012; Bucklin *et al.*, 1999; Vestheim *et al.*, 2005; Wang & Guo, 2008)。然而,由于粉虱类昆虫的种类比较多,本研究未涉及的种类还有很多,因此该对 SS-COI 引物的特异性尚有待进一步测定。

参考文献

- 刘树生. 2012. 烟粉虱是一个物种复合体. 中国生物防治学报, 28(4): 466.
- 刘循, 万方浩, 张桂芬. 2009. 可用于黑刺粉虱快速鉴定的 SCAR 分子标记技术. 昆虫学报, 52(8): 895–900.
- 刘银泉, 刘树生. 2012. 烟粉虱的分类地位及在中国的分布. 生物安全学报, 21(4): 247–255.
- 罗晨, 姚远, 王戎疆, 阎凤鸣, 张芝利, 胡敦孝. 2002. 利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报, 45(6): 759–763.
- 罗雪桃, 吴洪基, 王春, 邱宝利. 2009. 广州橘园发现庞达巢粉虱. 植物检疫, 23(5): 34–36.
- 虞国跃, 符悦冠, 贤振华. 2010. 海南、广西发现外来双钩巢粉虱. 环境昆虫学报, 32(2): 275–279.
- 虞国跃, 张国良, 彭正强, 刘奎, 符悦冠. 2007. 螺旋粉虱入侵我国海南. 昆虫知识, 44(3): 428–431.
- 臧连生, 江彤, 徐婧, 刘树生, 张友军. 2006. 烟粉虱 B 型及二个非 B 型种群的 SCAR 分子标记. 农业生物技术学报, 14(2): 208–212.
- 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.
- 张桂芬, 吴霞, 郭建英, 刘万学, 彭正强, 万方浩. 2010. 螺旋粉虱 SCAR 标记的建立与应用. 植物保护学报, 37(5): 387–390.
- 朱文静, 韩冬银, 张方平, 牛黎明, 马子龙, 符悦冠. 2010. 外来害虫双钩巢粉虱在海南的发生及温度对其发育的影响. 昆虫知识, 47(6): 1134–1140.
- Bucklin A, Guarnieri M, Hill R S, Bentley A M and Kaartvedt S. 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia*, 401: 239–254.
- Callejas C, Velasco A, Gobbi A, Beitia F and Ochando M D. 2005. Fast discrimination (RAPD-PCR) of the species forming the pest complex *Aleurodicus dispersus*-*Lecanoideus floccissimus* (Hom; Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology*, 129: 382–385.
- Chu D, Zhang Y J, Brown J K, Cong B, Xu B Y, Wu Q J and Zhu G R. 2006. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the Mediterranean region into China on ornamental crops. *Florida Entomologist*, 89: 168–174.
- De Barro P J and Driver F. 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Australian Journal of Entomology*, 36: 149–152.
- De Barro P J, Liebrechts W and Carver M. 1998. The distribution and identity of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in member countries of the Secretariat of the Pacific Community. *Australian Journal of Entomology*, 37: 214–218.
- Evans G A. 2008. *The Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the World and Their Host Plants and Natural Enemies*. http://www.sel.barc.usda.gov/591/1WF/whitefly_catalog.Htm.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294–299.
- Li Z X and Hu D X. 2005. Rapid identification of B biotype of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) based on analysis of internally transcribed spacer 1 sequence. *Insect Science*, 12: 421–427.
- Martin J H. 2001. Description of an invasive new species of *Neotropical aleurodicine* whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae)—a case of complete or partial misidentification. *Bulletin of Entomological Research*, 91: 101–107.
- Qiu B L, Ren S X, Wen S Y and Mandour N S. 2003. Biotype identification of the populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China using RAPD-PCR. *Acta Entomologica Sinica*, 46: 605–608.
- Shatters R G Jr, Powell C A, Boykin L M, He L S and McKenzie C L. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal of Economic Entomology*, 102: 750–758.
- Vestheim H, Edvardsen B and Kaartvedt S. 2005. Assessing feeding of a carnivorous copepod using species-specific PCR. *Marine Biology*, 147: 381–385.
- Wang H and Guo X. 2008. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR. *Journal of Shellfish Research*, 27: 481–487.

