

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2017.04.003

入侵害虫栲粉虱的种特异性 SS-COI 检测技术

张桂芬^{1,2*}, 王玉生¹, 洗晓青^{1,2}, 万方浩^{1,2}, 邵嘉文³

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 100193; ³青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东 青岛 266109

摘要: 【目的】栲粉虱是新近入侵中国大陆的一种危险性果树和园林植物害虫, 针对其体型微小, 与近缘种粉虱形态相仿, 很难快速准确区分的问题, 以田间常见的 11 种/隐种粉虱为参考, 采用基于 mtDNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I, mtDNA COI) 基因的物种特异性 (species-specific COI, SS-COI) PCR 法, 研究栲粉虱快速分子检测鉴定技术。【方法】利用 mtDNA COI 基因通用型引物对 LCO-1490/HCO-2198 获得栲粉虱和其他常见粉虱的 COI 基因序列, 根据测序结果设计栲粉虱特异性 SS-COI 引物 1 对 (SPZWC1/SPZWC1), 之后确定其对目的片段的扩增长度, 并对该引物对的物种特异性和检测灵敏性进行检验。【结果】引物对 SPZWC1/SPZWC1 扩增片段的长度为 426 bp。物种特异性检验结果显示, 该对引物只对栲粉虱的 mtDNA COI 基因具有扩增效果, 对我国常见的其他种类的粉虱包括 5 种烟粉虱隐种 (Asia I、Asia II 1、Asia II 3、MED、MEAM1 隐种) 以及桑粉虱、螺旋粉虱、黑刺粉虱、柑橘粉虱、双钩巢粉虱和温室粉虱等不具有交叉反应和扩增能力。灵敏性检验结果显示, 该对引物不仅对不同性别、不同采集地的成虫具有良好的扩增效能, 对 2~4 龄若虫以及单粒卵和初孵若虫亦具有同样的扩增效力, 其最低检测阈值为 75.1 pg · μL⁻¹ (相当于 1/10240 头雌性成虫)。【结论】该技术体系可用于栲粉虱的快速准确鉴定及其检测和监测, 对有效阻截其进一步传播扩散具有重要作用。

关键词: 栲粉虱; 种特异性引物; 检测阈值; 快速鉴定; 分子检测; 监测

Species-specific COI primers for rapid identification of an exotic whitefly, *Siphoninus phillyreae* (Haliday)

ZHANG Guifen^{1,2*}, WANG Yusheng¹, XIAN Xiaoqing^{1,2}, WAN Fanghao^{1,2}, SHAO Jiawen³

¹State Key Laboratory for 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 100193, China; ³College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: 【Aim】The ash whitefly *Siphoninus phillyreae* (Haliday), is one of the most important pests infesting fruit trees and ornamental plants worldwide. It is a recent invader to China. Morphological identification of this whitefly is complicated by its small size, high degree of similarity to related whitefly species and polymorphism. In the present study, a species-specific identification technique based on mitochondrial DNA cytochrome C oxidase subunit I (mtDNA COI) gene sequence (namely SS-COI marker) was developed for the rapid identification of *S. phillyreae*. 【Method】The fragments of mtDNA COI gene of *S. phillyreae* and 11 other related whitefly species or cryptic species were amplified and sequenced using COI gene universal primers LCO-1490/HCO-2198. One pair of species-specific COI (SS-COI) primers, SPZWC1 and SPZWC1 was designed. The length of target fragment amplified by this SS-COI primer pair was identified and its specificity and sensitivity tested using various life stages and sexes of 11 whitefly species collected from two geographic locations. 【Result】The primer pair amplified a 426 bp long fragment. The primer pair proved species-specific as it gave no cross-reactions against any of the 11 other whitefly species tested; five cryptic species of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Asia I, Asia II 1, Asia II 3, MED and MEAM1), *Bemisia myricae* Kuwana, *Aleurodicus disperses* (Russell), *Aleurocanthus spiniferus* Quaintance, *Dialeurodes citri* (Ashmead), *Paraleurodes pseudonaranjiae* Martin and *Trialeurodes vap-*

收稿日期 (Received): 2017-07-11 接受日期 (Accepted): 2017-09-11

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1200600、2016YFC1200600); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303019、201103026); 农业部“一带一路”948 项目 (2016-X48)

作者简介: 张桂芬, 女, 研究员, 博士。研究方向: 入侵生物预防与控制

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: guifenzhang3@163.com

orarium (Westwood). All *S. phillyreae* specimens were successfully identified. Sensitivity test demonstrated that the successful amplification could be obtained with $75.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ template DNA, equal to 1/10240 of a whole female *S. phillyreae* adult. 【Conclusion】 The SS-COI method developed here provides a rapid, simple and reliable molecular technique for the identification and monitoring of *S. phillyreae*, which would be benefit in intercepting and blocking the further spreading of this new invasive whitefly species.

Key words: *Siphoninus phillyreae*; SS-COI primers; detection threshold; rapid identification; molecular detection; monitoring

栲粉虱 *Siphoninus phillyreae* (Haliday), 属半翅目粉虱科虹管粉虱属, 是一种世界性检疫性害虫 (Martin, 1987), 2002 年我国台湾将其列为重要的防疫检疫性害虫 (柯俊成和许洞庆, 2004), 2006 年中国国家质量监督检验检疫总局将其列为需要关注的进境检疫性有害生物 (详见国质检动 [2006] 31 号文件)。栲粉虱为多食性害虫, 寄主植物多达 11 科 28 属 60 多种/变种, 且以果树和园林植物为主, 如蔷薇科、石榴科、芸香科、鼠李科、豆科、夹竹桃科、紫葳科、木兰科、木犀科、茜草科及千屈菜科等, 尤其嗜好蔷薇科和木犀科的植物 (Dooley, 2009; Stocks & Hodges, 2000)。其中, 受害较为严重的果树植物有蔷薇科的桃、杏、苹果、梨、山楂、木瓜, 石榴科的石榴, 以及芸香科的金橘、橘子、橙子、柠檬等; 园林植物受害较重的有蔷薇科的樱花、海棠、榆叶梅, 木犀科的栲树、女贞、丁香, 紫葳科的楸树, 千屈菜科的紫薇, 茜草科的风箱树, 以及木兰科的郁金香树等 (Byrne, 1991; Martin *et al.*, 2000)。在非洲北部、地中海地区以及南美洲和欧洲等地区, 栲粉虱还可以危害重要的油料兼果用植物——油橄榄 *Olea europaea* L. (Gómez-del-Campo *et al.*, 2010; Nguyen & Hamon, 2014)。栲粉虱原产于欧洲、地中海和非洲北部地区, 寄主范围广, 适生能力强 (Paula *et al.*, 1995), 极易随植物苗木的贸易活动进行远距离传播扩散, 一旦在新入侵区域成功定殖, 就会导致数百万美元的经济损失 (Tom *et al.*, 1992)。目前, 栲粉虱已扩散至北美洲的美国、墨西哥, 南美洲的秘鲁、委内瑞拉, 以及亚洲的以色列、叙利亚、印度、巴基斯坦、日本等多个国家和地区 (洗晓青等, 2015; CABI, 2014)。

粉虱类害虫是我国入侵事件发生最为频繁的外来入侵生物类群之一, 自 2003 年发现烟粉虱 MED 隐种 *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Q 型) 入侵以来 (褚栋等, 2005), 已先后有螺旋粉虱 *Aleurodicus disperses* (Russell) (虞国跃等, 2007)、双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjiae* Martin (虞国跃等,

2010)、小巢粉虱 *Paraleyrodes minei* Iaccarino (虞国跃等, 2014; 朱文静和符悦冠, 2013)、甘蓝粉虱 *Aleyrodes proletella* (L.) (张桂芬等, 2014) 等多种粉虱类害虫入侵中国大陆, 同时, 园林和果树重大害虫栲粉虱也不请自来 (洗晓青等, 2015), 对我国果树以及园林绿化产业构成了严重威胁。通常, 粉虱类害虫的鉴定主要依据拟蛹的外部形态特征, 或雄性成虫的外生殖器特征, 如双钩巢粉虱 (虞国跃等, 2010; Martin, 2001)。然而, 栲粉虱个体微小, 成虫体长 0.80~1.10 mm, 含翅体长约为 1.40 mm (Stocks & Hodges, 2000), 且与其他粉虱类昆虫间的形态非常相似。因此, 未经过专业训练的非粉虱分类人员很难对其进行准确鉴定。为此, 本研究拟以线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial DNA cytochrome c oxidase submit I, mtDNA COI) 基因为靶标, 建立靶向栲粉虱的种特异性 (species-specific COI, SS-COI) PCR 检测技术体系, 以期有效阻截栲粉虱的进一步传播扩散, 实时监测其种群扩张趋势及对其有效防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

栲粉虱采自上海闵行区 and 江苏南京玄武区, 寄主植物均为石榴树。本研究涉及到的其他种/隐种粉虱共计 11 种: 烟粉虱 MED 隐种 (Q 型)、MEAM1 隐种 (B 型) 以及温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) 均饲养在中国农业科学院植物保护研究所温室, 寄主植物分别为番茄和棉花; 烟粉虱 Asia I 隐种和 Asia II 1 隐种 (ZHJ-2 型) 由浙江大学赠送, Asia II 3 隐种 (ZHJ-1 型) 由华南农业大学赠送; 桑粉虱 *Bemisia myricae* Kuwana 和柑橘粉虱 *Dialeurodes citri* (Ashmead) 均采自中国农业科学院院内花园, 寄主植物分别为紫椴果桑树和月季; 螺旋粉虱和双钩巢粉虱均采自海南省海口市, 寄主植物分别为番石榴和小叶榕; 黑刺粉虱 *Aleurocanthus spiniferus* (Quaintance) 采自湖北省荆州市, 寄主植物为柑橘。

1.2 DNA 提取

以榕粉虱以及其他 11 种/隐种粉虱为靶标,参照李小凤等(2014)的方法,提取单头粉虱总 DNA。提取的 DNA 以 40 μL 超纯水复溶,以超微量分光光度计(NanoPhotometerTM P330, Implen, Munich, Germany)测定浓度,-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 粉虱类昆虫 COI 基因序列的 PCR 扩增

以榕粉虱以及其他 11 种/隐种粉虱 DNA 为模板,以 mtDNA COI 基因的通用型引物对 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')和 HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')进行扩增,片段长度约为 700 bp (Folmer *et al.*, 1994)。PCR 反应体系为 30 μL ,其中,10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL ,dNTPs (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μL ,上游引物和下游引物(5 pmol \cdot L⁻¹)分别为 0.5 μL ,Taq DNA 聚合酶(2.5 U \cdot μL^{-1} ,北京全式金生物技术有限公司) 0.4 μL ,模板 DNA 1.0 μL ,以 24.6 μL 超纯水补齐。扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;35 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 扩增反应在基因扩增仪(ABI-9700)上运行。取 4 μL PCR 产物在含有 GoldView 的 1.0% (*w/v*) 琼脂糖凝胶上以 90 V 电泳(Bio-Rad Power-Pac Basic)分离 45 min 后,检测电泳结果。

1.4 榕粉虱的种特异性 SS-COI 引物对的设计

将 1.3 中检测合格的 PCR 产物进行双向测序(北京三博远志生物技术有限公司),然后根据测序结果以软件 Oligo 6.0 设计 1 对靶向榕粉虱 COI 基因的种特异性 SS-COI 引物对,并命名为 SPZWCF1/SPZWCR1。上游引物 SPZWCF1 的碱基序列为 5'-AAGAGAATTAAGTAATAGAGGG-3',下游引物 SPZWCR1 的碱基序列为 5'-GATTCAAATCTTAT-ACCCAATAGT-3';引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5 榕粉虱 SS-COI 引物对的特异性检验

分别以单头不同隐种的烟粉虱(包括 Asia I、Asia II 1、Asia II 3、MED 和 MEAM1 隐种)以及桑粉虱、螺旋粉虱、黑刺粉虱、柑橘粉虱、双钩巢粉虱和温室粉虱的 DNA 为模板,以榕粉虱为阳性对照,验证榕粉虱特异片段扩增引物对 SPZWCF1/SPZWCR1 的物种特异性。反应体系为 25 μL ,其

中,10 \times Buffer 2.5 μL ,dNTPs 0.2 μL ,上游引物和下游引物分别为 0.2 μL ,Taq DNA 聚合酶 0.2 μL ,模板 DNA 1.0 μL ,以 20.7 μL 超纯水补齐。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;30 个循环:94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物的检测方法同 1.3。每种/隐种粉虱各检测 8 头。

1.6 榕粉虱 SS-COI 引物对的灵敏性检测

以不同性别(单头雌性成虫和雄性成虫)、不同虫态(单粒卵,单头 1、2、3、4 龄若虫和拟蛹)和不同采集地(上海和江苏)的榕粉虱 DNA,以及 2 倍递减稀释(19.2 $\times 10^3$ 、9.6 $\times 10^3$ 、4.8 $\times 10^3$ 、2.4 $\times 10^3$ 、1.2 $\times 10^3$ 、0.6 $\times 10^3$ 、0.3 $\times 10^3$ 、150.2、75.1、37.55、18.78、9.39、4.69、2.35 和 1.17 pg \cdot μL^{-1} ,相当于 1/40、1/80、1/160、1/320、1/640、1/1280、1/2560、1/5120、1/10240、1/20480、1/40960、1/81920、1/163840、1/327680 和 1/655360 头)的单头成虫(雌性)DNA 为模板,进行灵敏性检测。每个性别、每个虫态、每个地区以及每个浓度各检测 8 头。

2 结果与分析

2.1 粉虱类害虫 COI 基因碱基序列扩增及种特异性标记分析

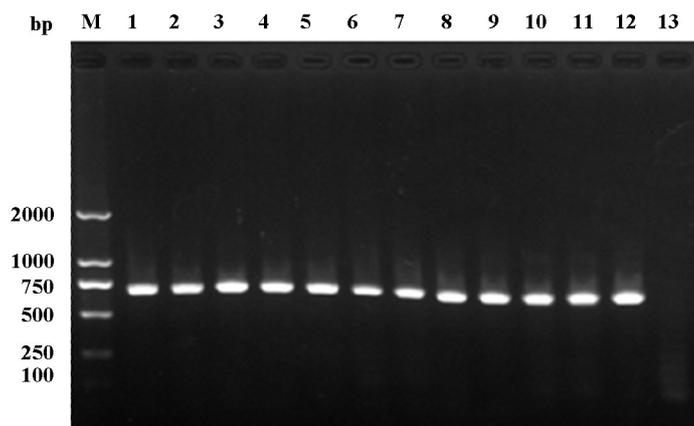
电泳检测结果表明,12 种/隐种粉虱都能扩增出一条清晰明亮的目的片段(图 1)。将电泳检验合格的 PCR 产物进行双向测序,结果表明该片段的长度大约为 710 bp(榕粉虱 GenBank 登录号为 HFS.2012.201199.5.1)。根据碱基序列测定结果设计榕粉虱特异性 SS-COI 引物 1 对(SPZWCF1/SPZWCR1),其扩增片段的大小为 426 bp。

2.2 榕粉虱 SS-COI 引物的种特异性验证

电泳检测结果表明,种特异性引物 SPZWCF1/SPZWCR1 只对榕粉虱具有扩增效果,对其他田间常见的 11 种/隐种粉虱不具有扩增能力,说明该对引物为榕粉虱的特异性引物(图 2)。

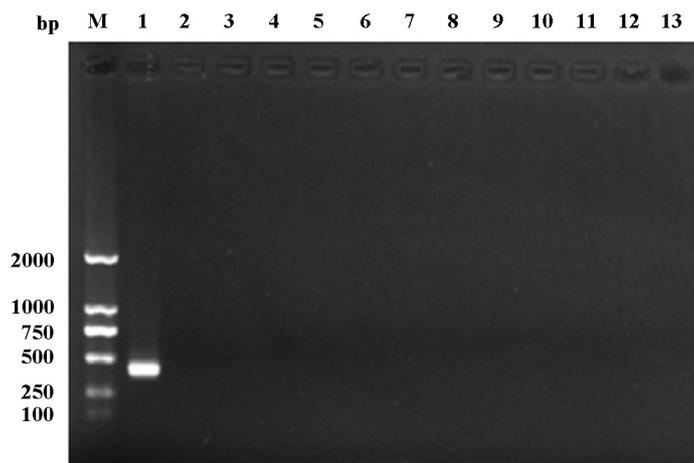
2.3 种特异性 SS-COI 引物对不同性别、虫态和地域榕粉虱的扩增效果

以不同性别、虫态以及采自 2 个地域的榕粉虱 DNA 为模板,采用种特异性引物对 SPZWCF1/SPZWCR1 进行 PCR 扩增。检测结果表明,不同性别、不同虫态以及 2 个地域的榕粉虱均能扩增出 426 bp 的特异性片段(图 3)。



M: 标准 DNA 分子质量; 1-13: 栲粉虱、烟粉虱 Asia I 隐种、烟粉虱 Asia II 1 隐种、烟粉虱 Asia II 3 隐种、烟粉虱 MED 隐种、烟粉虱 MEAM1 隐种、桑粉虱、螺旋粉虱、黑刺粉虱、柑橘粉虱、双钩巢粉虱、温室粉虱、阴性对照(模板为水)。
M: DNA marker; Line 1-13: *Siphoninus phillyreae*, *Bemisia tabaci* Asia I, *B. tabaci* Asia II 1, *B. tabaci* Asia II 3, *B. tabaci* MED, *B. tabaci* MEAM1, *B. myricae*, *Aleurodicus disperses*, *Aleurocanthus spiniferus*, *Dialeurodes citri*, *Paraleyrodes pseudonaranjiae*, *Trialeurodes vaporariorum*, negative control (using ultra-pure water as the template).

图 1 COI 基因通用型引物 LCO1490/HCO2198 对栲粉虱及其他 11 种/隐种田间常见粉虱 DNA 的扩增效果
Fig.1 PCR amplification of mitochondrial DNA of *S. phillyreae* and 11 other whitefly species or cryptic species common in the field using a pair of universal primer pair LCO1490/HCO2198 target to COI gene



M: 标准 DNA 分子质量; 1-13: 栲粉虱、烟粉虱 Asia I 隐种、烟粉虱 Asia II 1 隐种、烟粉虱 Asia II 3 隐种、烟粉虱 MED 隐种、烟粉虱 MEAM1 隐种、桑粉虱、螺旋粉虱、黑刺粉虱、柑橘粉虱、双钩巢粉虱、温室粉虱、阴性对照(模板为水)。
M: DNA marker; Line 1-13: *Siphoninus phillyreae*, *Bemisia tabaci* Asia I, *B. tabaci* Asia II 1, *B. tabaci* Asia II 3, *B. tabaci* MED, *B. tabaci* MEAM1, *B. myricae*, *Aleurodicus disperses*, *Aleurocanthus spiniferus*, *Dialeurodes citri*, *Paraleyrodes pseudonaranjiae*, *Trialeurodes vaporariorum*, negative control (using ultra-pure water as the template).

图 2 种特异性 SS-COI 引物 SPZWCF1/SPZWCRI 对栲粉虱以及其他 11 种/隐种田间常见粉虱类害虫的扩增效果
Fig.2 Amplification pattern of mitochondrial DNA of *S. phillyreae* and 11 other whitefly species or cryptic species using the species-specific SS-COI primer pair SPZWCF1/SPZWCRI

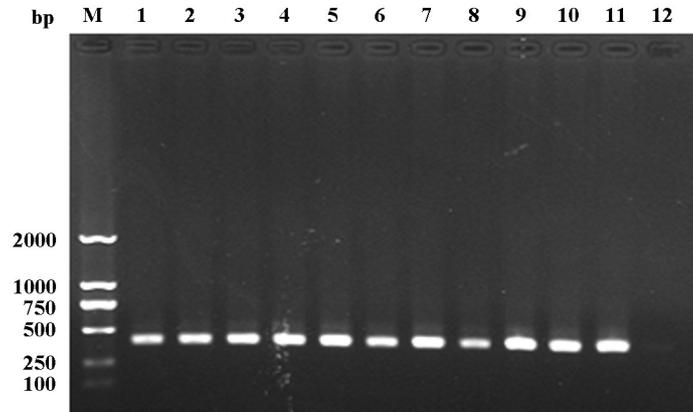
2.4 栲粉虱特异性 SS-COI 引物的检测阈值

将单头栲粉虱成虫(雌性)的 DNA 模板以 2 倍递减稀释,检测结果显示,所有的个体都可以扩增出特异性的目的条带。当浓度为 $2.35 \sim 37.55 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,依然有 20%~50% 的个体能扩增出较弱的目的片段(图 4),表明该引物对的灵敏性较高,检测阈值大约为 $75.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (即 1/10240 头成虫)。

3 讨论

我国是遭受外来入侵生物危害最为严重的国家之一。栲粉虱于 2002 年首次在中国台湾发生危害(柯俊成和许洞庆,2004);2010 年在上海被发现为害蔷薇科的梨树,2 年后又被发现其为害石榴科的石榴树、木犀科的桂花树等(史苹香,2012;洗晓青等,2015);2015 年笔者又在江苏省发现其踪迹。

目前,栲粉虱只在我国局部区域发生危害,一旦进 产业以及饮料行业等造成巨大经济损失。
一步传播扩散,必将对我国的园林绿化行业、水果

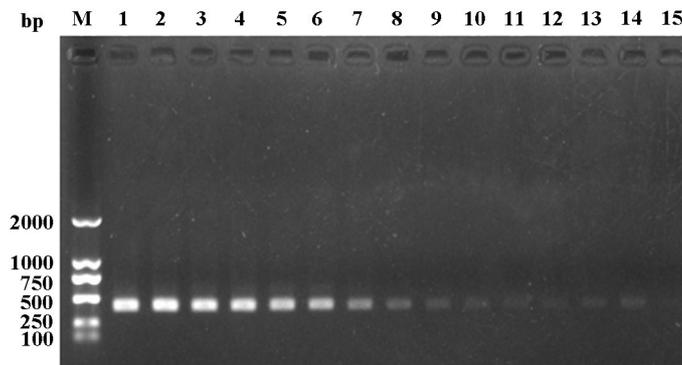


M: 标准 DNA 分子质量; 1-12: 1 龄若虫、2 龄若虫、3 龄若虫、4 龄若虫、拟蛹、雄性成虫、雌性成虫、卵、雌性成虫(上海)、雄性成虫(南京)、雌性成虫(南京)、阴性对照(模板为水)。

M; DNA marker; Line 1-12: 1st instar nymph, 2nd instar nymph, 3rd instar nymph, 4th instar nymph, red-eyed nymph, male adult, female adult, egg, female adult collected in Shanghai, male adult collected in Nanjing, female adult collected in Nanjing, negative control (using ultra-pure water as the template).

图 3 种特异性 SS-COI 引物 SPZWCF1/SPZWCR1 对不同虫态、不同性别和 2 个地域栲粉虱的 PCR 扩增效果

Fig.3 Amplification pattern of mitochondrial DNA from different developmental stages, sexes and adults collected in two locations of *S. phillyreae* using the SS-COI primer pair SPZWCF1/SPZWCR1



M: 标准 DNA 分子质量; 1-15 分别为 19.2×10^3 、 9.6×10^3 、 4.8×10^3 、 2.4×10^3 、 1.2×10^3 、 0.6×10^3 、 0.3×10^3 、150.2、75.1、37.55、18.78、9.39、4.69、2.35、1.17 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (即 1/40、1/80、1/160、1/320、1/640、1/1280、1/2560、1/5120、1/10240、1/20480、1/40960、1/81920、1/163840、1/327680 和 1/655360 头雌性成虫)。

M; DNA marker; Line 1-15 represent dilution series: 19.2×10^3 , 9.6×10^3 , 4.8×10^3 , 2.4×10^3 , 1.2×10^3 , 0.6×10^3 , 0.3×10^3 , 150.2, 75.1, 37.55, 18.78, 9.39, 4.69, 2.35, 1.17 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, equal to 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, 1/10240, 1/20480, 1/40960, 1/81920, 1/163840, 1/327680 and 1/655360 of a whole female adult, respectively.

图 4 种特异性 SS-COI 引物 SPZWCF1/SPZWCR1 对栲粉虱线粒体 DNA 的检测阈值

Fig.4 Detection threshold for diluted mitochondrial DNA samples of female adults of *S. phillyreae* using SS-COI primer pair SPZWCF1/SPZWCR1

本研究采用基于 mtDNA COI 基因的物种特异性 SS-COI 标记方法,研发出了靶向栲粉虱的特异性引物对 SPZWCF1/SPZWCR1 及其快速检测技术。该对引物只对栲粉虱的目的基因片段具有扩增能力,对田间常见的其他 11 种/隐种粉虱(包括烟粉虱 Asia I 隐种、Asia II 1 隐种、Asia II 3 隐种、MED 隐种和 MEAM1 隐种,以及桑粉虱、螺旋粉虱、

黑刺粉虱、柑橘粉虱、双钩巢粉虱和温室粉虱)不具有扩增效果。同时,该技术体系具有比较高的灵敏度,不仅对栲粉虱成虫(包括雌性和雄性)、2~4 龄若虫和拟蛹具有好的扩增效果,对单粒卵和初孵若虫亦具有同样的扩增能力,其检测阈值约为 $75.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,相当于 1/10240 头雌性成虫。进一步的数据同源比对分析结果表明,没有任何一种近缘种粉虱

或其他昆虫的 DNA 序列与榕粉虱特有的 426 bp 片段完全一致(碱基序列一致性 $\leq 82\%$),表明该检测技术体系可以用于口岸园林植物及果树苗木等国际贸易活动的检验检疫,以及国内地区间种苗的调运检疫及其种群扩张趋势的监测。

基于 mtDNA COI 基因的序列测定以及据此发展起来的物种特异性 SS-COI 标记技术,是目前用于鉴定外来入侵粉虱类害虫的最为常用的方法之一。如罗晨等(2002)和 Qiu *et al.* (2009)以 COI 基因 3'端为靶标,采用 DNA 序列测定法成功鉴定了 B 型(MEAM1 隐种)、Q 型(MED 隐种)和 Cv 型(Asia II 7 隐种)烟粉虱;Ovalle *et al.* (2014)以 COI 基因 5'端序列为靶标,鉴定了在哥伦比亚发生的 9 种重要的粉虱科害虫[包括螺旋粉虱、*Aleuronudus melzeri* Bondar、丝绒粉虱 *Aleurothrixus floccosus* Maskell、*Aleurotrachelus socialis* Bondar、辣椒粉虱 *Aleurotrachelus trachoides* Back、烟粉虱、*Lecanoides floccissimus* Martin、温室粉虱和木瓜粉虱 *Trialeurodes variabilis* (Quaintance)等],并表明研究结果对上述粉虱类害虫捕食性天敌的保护利用意义非凡;李小凤等(2014)则分别以 COI 基因 5'端和 3'端为靶标,对包括烟粉虱 MED 隐种、双钩巢粉虱、螺旋粉虱等入侵种在内的我国田间常见的 16 种粉虱进行了分子鉴定,并指出 5'端序列更适用于基于 DNA 条形码技术的物种鉴定;陈苗苗等(2015)和张桂芬等(2013)基于 COI 基因序列,采用 SS-COI 标记技术,分别建立了入侵种甘蓝粉虱和双钩巢粉虱的快速检测技术体系。

准确、快速、高效的物种鉴定方法对实时掌控榕粉虱在我国的扩张动态,制定行之有效的靶向性防控策略具有重要指导意义。本研究研发建立的榕粉虱特异性 SS-COI 引物对 SPZWCF1/SPZWCRI1 及其快速检测技术体系,弥补了基于外部形态特征鉴定法的不足,不仅准确性高、灵敏度强,而且操作简便、快捷有效,在榕粉虱种群扩张趋势实时监测和有效阻截与防控中将发挥重要作用。然而需要注意的是,粉虱类害虫种类比较多,其中有些常见种类在本研究中并未涉及,如分布于欧洲可对柑橘造成危害的 *Siphoninus immaculatus* (Heeger)。因此,该对 SS-PCR 引物的特异性还需要进一步考证。

致谢: 浙江大学昆虫科学研究所刘银泉教授提供烟粉虱 Asia I 隐种和 Asia II 1 隐种标本,华南农业大学资源环境学院邱宝利教授提供烟粉虱 Asia II 3 隐种标本,特表感谢。

参考文献

- 陈苗苗,郭荣,张金良,万方浩,杨锦,张桂芬,2015. 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*, 58(5): 579-586.
- 褚栋,张友军,丛斌,徐宝云,吴青君,2005. 云南 Q 型烟粉虱种群的鉴定. *昆虫知识*, 42(1): 54-56.
- 柯俊成,许洞庆,2004. 防检疫重要粉虱类害虫之简介//植物重要防疫检疫害虫诊断鉴定研习会(四). 台北:台湾大学.
- 李小凤,田虎,张金良,张桂芬,陈苗苗,万方浩,2014. 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*, 57(4): 466-476.
- 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.
- 史萃香,2012. 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.
- 洗晓青,宋文进,万方浩,张桂芬,2015. 警惕新入侵昆虫榕粉虱[*Siphoninus phillyreae* (Haliday)]在中国大陆扩散. *植物保护*, 41(6): 33-37.
- 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,彭正强,温海波,符悦冠,2014. 外来种小巢粉虱 *Paraleyrodes minei* 的识别及寄主植物. *环境昆虫学报*, 36(3): 455-458.
- 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.
- 张桂芬,郭建洋,王瑞,杨婷,李小凤,郭建英,曹凤勤,张金良,万方浩,2013. 双钩巢粉虱的种特异性 SS-COI 检测技术. *生物安全学报*, 22(3): 157-162.
- 张桂芬,洗晓青,张金良,李小凤,马德英,万方浩,2014. 甘蓝粉虱入侵中国大陆. *生物安全学报*, 23(1): 66-70.
- 朱文静,符悦冠,2013. 海南岛粉虱科昆虫种类及中国四新纪录种记述(半翅目,胸喙亚目). *动物分类学报*, 38(3): 647-656.
- BYRNE D N, 1991. The ash whitefly as a pest of *Citrus*. *Citrus Report*: 16. (1991-01)[2017-09-08]. <http://hdl.handle>.

- net/10150/215752.
- CABI, 2014. Invasive species compendium, *Siphoninus phillyreae* (Haliday) datasheet. (2014-09-24)[2017-09-08]. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/51036>.
- DOOLEY J W III, 2009. *Whitefly fauna of Clark County, Nevada*. Master's Theses. San Jose: San Jose State University. [2017-09-08]. http://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/3982.
- FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, VRIJENHOEK R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- GÓMEZ-DEL-CAMPO M, MORALES-SILLERO A, VITA SERMAN F, ROUSSEAUX M C, SEARLES P S, 2010. Olive growing in the arid valleys of Northwest Argentina (Provinces of Catamarca, La Rioja and San Juan). *Olive*, 114: 23-45.
- MARTIN J H, 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera: Aleyrodidae). *Tropical Pest Management*, 33(4): 298-322.
- MARTIN J H, 2001. Description of an invasive new species of *Neotropical aleurodicine* (Homoptera: Aleyrodidae) — a case of complete or partial misidentification. *Bulletin of Entomological Research*, 91(2): 101-107.
- MARTIN J H, MIFSUD D, RAPISARDA C, 2000. The whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. *Bulletin of Entomological Research*, 90(5): 407-448.
- NGUYEN R, HAMON A B, 2014. Ash whitefly, *Siphoninus phillyreae* (Haliday) (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae: Aleyrodinae). (2014-12)[2017-07-07]. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN30400.pdf>.
- OVALLE T M, PARSA S, HERNANDEZ M P, LOPEZ-LAVALLE L A B, 2014. Reliable molecular identification of nine tropical whitefly species. *Ecology and Evolution*, 4(19): 3778-3787.
- PAULA M L, TIMOTHY D P, THOMAS S B, 1995. Biology of *Siphoninus phillyreae* (Haliday) (Homoptera: Aleyrodidae) and its relationship to temperature. *Environmental Entomology*, 24(2): 380-386.
- QIU B L, CHEN Y P, LIU L, PENG W L, LI X X, AHMED M Z, MATHUR V, DU Y Z, REN S X, 2009. Identification of three major *Bemisia tabaci* biotypes in China based on morphological and DNA polymorphisms. *Progress in Natural Science*, 19(6): 713-718.
- STOCKS I C, HODGES G, 2000. Ash whitefly, *Siphoninus phillyreae* (Haliday), a new exotic whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) in Central Florida, and *Encarsia inaron*, its parasitoid (Hymenoptera: Aphelinidae). (2000-08)[2017-07-10]. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/orn/ash_whitefly.htm.
- TOM S B, TIMOTHY D P, JULI R G, BEZARK L G, BALL J C, 1992. Biological control of ash whitefly: a success in progress. *California Agriculture*, 46(1): 26-28.

(责任编辑: 杨郁霞)