

截形叶螨分子鉴定技术的建立及其应用^{*}

王少丽^{**} 戴宇婷 张友军 吴青君 谢文 唐小凤

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要 叶螨体型微小,田间种群变异较大,传统的形态鉴定方法耗时长,技术难以掌握。为了寻找截形叶螨 *Tetranychus truncatus* Ehara 的快速分子鉴定技术,本研究筛选 RAPD 扩增条带中截形叶螨的特异性引物,并由此转化为稳定的 SCAR 标记。结果表明,由引物 OPB-04 扩增截形叶螨出现了一条 717 bp 的特异性条带 (GenBank 登录号为 JF816665),基于此片段设计了一对特异性的 SCAR 引物 (Tt-303F 和 Tt-303R),优化 PCR 扩增条件和程序,从截形叶螨的不同发育阶段中均可成功扩增出一条特异性的 303 bp 的 DNA 条带,而在其它近似叶螨种类中未扩增到该条带,且该 SCAR 引物对在北京地区茄子和菜豆寄主上采集的截形叶螨田间种群上也成功得到了验证。

关键词 截形叶螨, RAPD, SCAR 标记, 快速鉴定

Establishment and application of molecular identification techniques for the spider mite, *Tetranychus truncatus*

WANG Shao-Li^{**} DAI Yu-Ting ZHANG You-Jun WU Qing-Jun

XIE Wen TANG Xiao-Feng

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Spider mites are very tiny animals which frequently display morphological variation between populations. Traditional identification methods take a long time to apply and their key characteristics are difficult to grasp. In order to find a rapid molecular identification method for the spider mite, *Tetranychus truncatus* Ehara, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was used to obtain specific bands and the SCAR marker. One prominent and specific fragment of 717 bp was screened and sequenced (GenBank accession number JF816665) using the OPB-04 primer. A pair of SCAR primers (Tt-303F and Tt-303R) specific to *T. truncatus* were designed on the basis of the sequencing results of the 717 bp band. After optimization for the amplification procedure, these primers were used to successfully obtain a 303 bp band from all developmental stages of *T. truncatus*. This band was not found in other related species. The two SCAR primers were also shown to be effective in monitoring *T. truncatus* populations collected on eggplant and bean crops in Beijing.

Key words *Tetranychus truncatus*, RAPD, SCAR marker, rapid identification

叶螨种类多,食性杂,危害重,常造成叶片干枯脱落,甚至整株死亡。同时叶螨体型微小,成螨体长仅半毫米左右,且不同种类之间形态相似,肉眼难以识别其种类。传统的叶螨种类鉴定方法是根据叶螨雄性外生殖器的形态特征来进行,然而叶螨属偏雌性比,田间采集的试虫中绝大多数都是雌性叶螨。因此,在传统分类中,为了鉴定叶螨的组成和种类,许多田间采集的叶螨试虫都必须在室内饲养到下一代,获得其雄性个体,然后把雄

性个体的外生殖器做成切片,在烘箱内烘干之后置于显微镜下观察,结合活体雌雄成螨体色进行鉴定 (Ehara, 1999)。这样的鉴定方法耗时较长,且研究发现不同地理区域内同种叶螨的外生殖器形态特征也存在较大变异 (程立生, 1998),且叶螨体色也会跟随寄主植物或者生长发育的条件不同而存在差异,分类专业人员遇到难以界定的种类时,尚需教科书进行比对,因此这种形态鉴定方法对于非分类专业研究者来说困难重重,而叶螨种

^{*} 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103020)。

^{**}通讯作者, E-mail: wangshl@caas.net.cn

收稿日期: 2012-12-06, 接受日期: 2012-12-28

类鉴定技术的困难和滞后也已经严重阻碍了叶螨基础研究的快速发展及科学高效的田间防治。

随着分子生物技术的发展及其广泛应用, DNA 条码 (DNA barcoding) 越来越多地被应用来解决种类鉴定问题 (Hebert *et al.*, 2003, 2004; 张媛等, 2011; 黄蓬英等, 2012)。很多研究者由于其 mtCOI 基因的母系遗传及多态性的特性而采用该基因进行研究, 多数是采用扩增测序 mtCOI 序列或者 ITS2 序列并与其它已登录在 GenBank 上的该基因序列构建系统进化树, 分析样本与已知序列之间的同源性和亲缘关系的远近, 进而推断出其所属种类 (Ben-David *et al.*, 2007; Hinomoto *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011)。但存在问题是有某些种类的序列在 GenBank 中未有登录, 这样部分物种就得不到有效的聚类, 无法进一步准确分析; 更有甚者, 由于叶螨种类的鉴别困难, 部分已经登录在 GenBank 上的特定叶螨的序列存在错误 (de Mendonça *et al.*, 2011); 加之系统发育树构建及聚类分析需要标本在 PCR 扩增之后, 经过回收、克隆等程序之后进行序列测定, 这样会耗费大量时间和人力物力财力等。PCR 扩增结合限制性内切酶, 依据获得的片段长短来建立种间差异图 (Ma *et al.*, 2009; Rugman-Jones *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2010) 相对简单, 但此方法尚需两个步骤, 且酶切结果易受到其它因素影响而出现酶切不开或者由于扩增错配导致的酶切位点改变等现象。Osakabe 等 (2008) 利用限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, 简称 RFLP) 技术对日本已知叶螨属的 13 个种类进行分子鉴定, 但是其操作过程复杂, 而且不方便共享数据资料。近几年新发展起来的定量 PCR 分子鉴定技术对不同种的鉴定快速、灵敏且精确度高 (Xian *et al.*, 2007) 而得到广泛应用, 但其费用相对昂贵。而基于随机扩增多态性 (random amplification of polymorphic DNA, 简称 RAPD) 基础上转化出来的序列特异性扩区 (sequence characterized amplified region, 简称 SCAR) 标记具有操作简便、灵敏度高、成本低、可用于样品大规模检测等优点, 而得到广泛应用, 如粉虱类害虫 (刘循等, 2009; 张桂芬等, 2010) 及西花蓟马 (孟祥钦等, 2010) 等种类的快速鉴别上均成功建立了 SCAR 标记及其鉴定技术。

截形叶螨 *Tetranychus truncatus* Ehara 寄主植物种类较多, 蔬菜田和玉米田间常与朱砂叶螨 *T.*

cinnabarinus、二斑叶螨 *T. urticae* 等不同种类混合发生 (洪晓月, 2012), 是玉米、蔬菜等重要农作物生产上的重大害螨。本研究通过对不同叶螨种类的 RAPD 扩增, 找出截形叶螨的特异性扩增条带, 进而转化为稳定的 SCAR 标记, 并采用建立的 SCAR 标记对 2009—2011 年度采自田间常见蔬菜上的叶螨样品进行检测鉴定。研究结果可为快速鉴定截形叶螨提供一种简单易操作的方法, 同时对于田间该螨的针对性防治具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试叶螨

本研究中截形叶螨试虫由福建农业科学院植物保护研究所张艳璇研究员提供, 已经过形态学鉴定, 室内采用无虫“碧丰”菜豆苗于温度 (26 ± 1) °C、相对湿度为 80% 的人工气候培养箱中饲养至今。对照种有 5 种: 朱砂叶螨、二斑叶螨由南京农业大学提供, 室内采用显微镜下观察雌性外生殖器形态特征而鉴定; 山楂叶螨 *T. viennensis* 由山东省农业科学院果树研究所孙瑞红研究员提供; 土耳其斯坦叶螨 *T. turkestanii* 由石河子大学提供; 柑橘全爪螨 *Panonychus citri* 于 2012 年 5 月采集于重庆市北碚柑橘果园。

另外, 在北京市海淀区分别采集了茄子 (采集于 2009 年 9 月和 2011 年 6 月)、菜豆 (采集于 2010 年 3 月和 2011 年 4 月) 和甘蓝 (2010 年 4 月) 上的叶螨种群, 采集后即放于 70% 的酒精中, 然后置于 -20°C 冰箱中保存待用。采集标本送交日本茨城大学著名叶螨分类专家 Tetsuo Gotoh 教授进行传统形态学鉴定, 结果为茄子、菜豆上叶螨为截形叶螨, 甘蓝上叶螨为二斑叶螨。这些田间种群低温保存用于对本研究所建立的截形叶螨 SCAR 引物进行准确性验证。

1.2 供试试剂

本试验中随机扩增引物采用 Operon 公司的 RAPD 通用引物系列, 采用 OPA、OPB、OPC 系列, 每个系列包含 20 条引物。叶螨基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化系统购自北京百泰克生物技术有限公司; 克隆载体 EZ-TTM Fast Ligation Kit 购自 GenStar 公司, 携带氨苄青霉素抗性基因 (Amp); DH5 α 感受态细胞购自 GenStar 公司; 2 × Es Taq MasterMix 购自北京康为科技有限公司。

氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG、DNA Marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖为加拿大进口分装;引物合成委托上海英俊生物工程公司进行。PCR 扩增产物的序列测定委托北京诺赛和擎科生物工程有限公司进行。

1.3 基因组 DNA 提取

单头雌成螨的基因组 DNA 提取方法采用北京百泰克有限公司的 DNA 提取试剂盒(溶液型),方法参照试剂盒说明书进行。将单头叶螨置于滴有 20 μL 裂解液中的 Parafilm 膜上,以 0.2 mL 的 PCR 管底部作为匀浆器充分研磨,用另 40 μL 裂解液清洗匀浆器 2 次,合并混匀;然后以微量移液器移入 1.5 mL 离心管;加入蛋白酶 K 2 μL ,混匀后,55℃ 条件下水浴 4 h;短暂电动离心后,加入 RNase 2.5 μL ,置于 37℃ 烘箱,15 ~30 min;取出后晾至室温,加入蛋白沉淀液 25 μL ,漩涡振荡器上高速震荡 25 s;冰浴 5 min 沉淀蛋白;室温 13 000 r/min 离心 5 min;小心吸取上清液到另一个新管中(不要吸入沉淀),加入等体积的异丙醇,颠倒混匀 30 次;室温 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 70% 乙醇漂洗 DNA 沉淀,室温 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清;加入 1 mL 无水乙醇漂洗 DNA 沉淀,室温 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清;加入 20 μL DNA 溶解液,于 65℃ 下水浴 60 min,放于 -20℃ 保存待用。采用紫外分光光度仪检测基因组 DNA,浓度为 0.8 ~1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.6 ~1.8 范围内,表明样品纯度高,无蛋白污染,可用于下一步的 PCR 反应。

1.4 RAPD 扩增

RAPD 扩增反应设为 20 μL 体系。其中,2 $\times$ Es Taq MasterMix(含 ES TaqE 5U/ μL)为 10 μL ,DNA 为 1.5 μL ,RAPD 引物(10 nmol)为 3 μL ,ddH₂O 为 5.5 μL 。PCR 反应于 S1000 PCR 扩增仪上进行。PCR 扩增程序为:94℃ 进行 4 min 预变性;94℃ 1 min,37℃ 45 s,72℃ 1 min 35 s,共进行 30 个循环,之后在 72℃ 下延伸 10 min,最后保存于 4℃ 条件下。扩增反应结束后,取样 6 μL ,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结束后于自动凝胶成像系统上照相检测。

1.5 特异性扩增产物回收克隆和测序

在琼脂糖凝胶上回收截形叶螨的特异性扩增条带,采用 DNA 纯化试剂盒(百泰克产品,北京)

进行纯化,之后把该纯化片段连接到克隆载体(GenStar 公司产品)上,转化到 TOP10 感受态细胞,37℃ 下倒置培养过夜(8 h)。第 2 天,挑取白色阳性克隆至 10 μL 无菌水中混合均匀,取 1 μL 作为 PCR 模板,采用通用引物 M13 进行菌体 PCR 扩增来鉴定重组子。鉴定后的阳性克隆菌液加入 LB 液体培养基中 37℃ 过夜振荡培养,采用质粒提取试剂盒提取质粒,阳性质粒采用特异性引物扩增再次验证后,同时送北京诺赛生物工程有限公司和北京擎科生物工程有限公司进行测定。

1.6 SCAR 引物设计及 PCR 扩增条件的优化

基于特异性片段的测序结果,采用 Primer 5 软件设计一对基因特异性 SCAR 引物(Tt-F 和 Tt-R)。SCAR 特异性扩增的反应体系设定为 20 μL ,其中 2 $\times$ ES MasterMix 为 10 μL ,上游引物和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)分别为 1 μL ,DNA 模板为 1 μL ,ddH₂O 为 7 μL 。反应程序如下:94℃ 预变性 3 min,之后进行 35 个循环(94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min),最后 72℃ 延伸 10 min。预期扩增片段大小为 303 bp。扩增产物的检测方法同 1.4 所述。

1.7 SCAR 标记的扩增特异性和稳定性检验

采用截形叶螨、二斑叶螨、朱砂叶螨、山楂叶螨、柑橘全爪螨及土耳其斯坦叶螨为试虫,通过上述 SCAR 扩增程序来验证其对截形叶螨的扩增特异性。

采用室内截形叶螨的不同个体及其不同发育阶段验证该引物重复性和稳定性。并对已经过形态鉴定确认的采集于北京市海淀区部分田间的茄子、菜豆和甘蓝上的田间叶螨种群进行特异性扩增检验。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增及 SCAR 标记筛选

RAPD 引物对不同叶螨种类的扩增中,发现随机引物 OPB-04(GGA CTG GAG T)对截形叶螨表现出很强的特异性扩增,一条大约 710 bp 的 DNA 条带在截形叶螨不同个体中稳定出现,且该特异性条带很亮,而在朱砂叶螨中未出现,在二斑叶螨虽然也有此条带,但经过多次扩增验证后发现,该条带在二斑叶螨中扩增亮度明显低于截形叶螨,因此拟选择此条带进行 SCAR 标记筛选,见图 1。

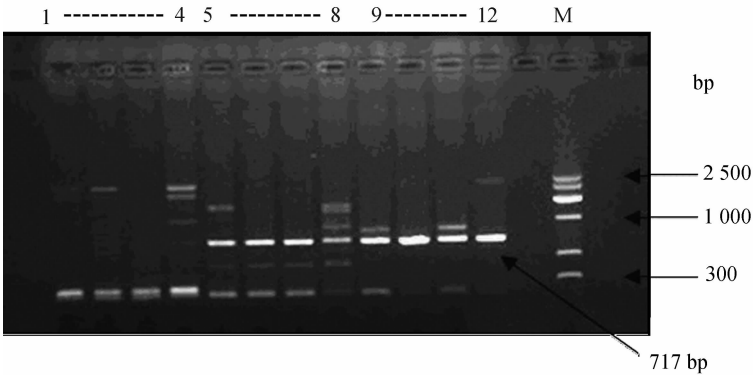


图 1 随机引物 OPB-04 对 3 种叶螨的 PCR 扩增

Fig.1 RAPD amplification for the 3 spider mites using the random primer OPB-04

M: DNA 分子量标准 marker VII;1~4: 朱砂叶螨;5~8: 二斑叶螨;9~12: 截形叶螨;箭头所指的 717 bp 为截形叶螨的特异性条带。本研究中每种粉虱类害虫共检测 24 头个体,本图中各种群仅显示 4 头。

M: DNA molecular marker VII;1-4: *Tetranychus cinnabarinus*;5-8: *T. urticae*;9-12: *T. truncatus*;the arrow showing the 717 bp indicates the specific band in *T. truncatus* population. 24 individuals were detected for each species of spider mite in this study and only 4 individuals of various species were showed in this figure.

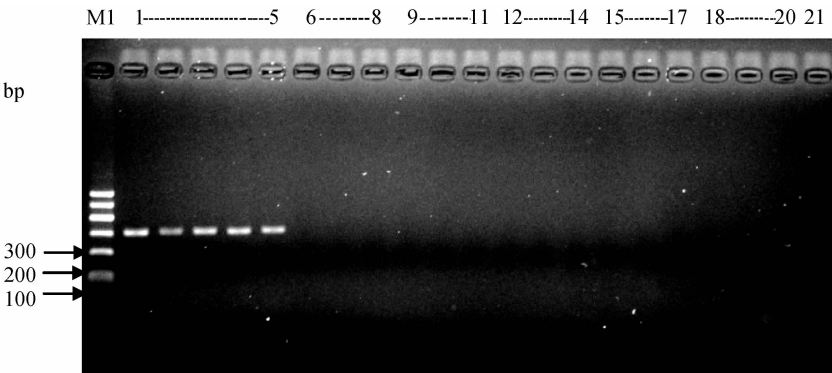


图 2 SCAR 引物对截形叶螨及近缘叶螨种类的 PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification results of *Tetranychus truncatus* and the related species using SCAR primers

M1: 分子量标准 marker I;1~5: 截形叶螨;6~8: 朱砂叶螨;9~11: 二斑叶螨;12~14: 山楂叶螨;15~17: 土耳其斯坦叶螨;18~20: 柑橘全爪螨;21: 空白对照。

M1: molecular marker marker I;1~5: *T. truncatus*;6~8: *T. cinnabarinus*;9~11: *T. urticae*;12~14: *T. viennensis*;15~17: *T. turkestan*;18~20: *Panonychus citri*;21: negative control.

将截形叶螨的特异性序列进行回收、克隆后进行序列测定。结果表明截形叶螨的特异性扩增片段长度为 717 bp,GenBank 登录号为 JF816665。该基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,未发现任何和该基因片段具有较高相似性的序列,说明该片段特异性很强。根据该测序结果,设计 1 对 SCAR 引物,上游和下游引物序列分别是:Tt-303F (5'-GCA TGT AAG TCC CAA ATC-3')和 Tt-303R (5'-ATA AAT GGA CAG GCG ATA-3'),预期扩增

片段大小为 303 bp。

2.2 SCAR 引物特异性和灵敏度检验

采用我们设计的特异性 SCAR 引物对截形叶螨种群进行 PCR 扩增,同时以其它叶螨种类作为对照种群,发现仅在截形叶螨种群中出现一条 303 bp 的特异性条带,而在对照种朱砂叶螨、二斑叶螨、山楂叶螨、土耳其斯坦叶螨和柑橘全爪螨中均未出现任何条带,见图 2,说明该特异性引物对于

截形叶螨具有很强的种的特异性。同时把截形叶螨中出现的 303 bp 条带回收克隆和测序,结果与由 RAPD 扩增得到条带中的一段序列完全一致。

采集该截形叶螨种群的不同发育阶段,即卵、幼螨、若螨、雄成螨和雌成螨,采用上述设计的特

异性引物对及其扩增程序进行 PCR 扩增,发现从截形叶螨的不同发育阶段中均可稳定扩增出一条约 303 bp 的 DNA 条带,而以无菌水为扩增模板的阴性对照中未出现任何条带,见图 3。

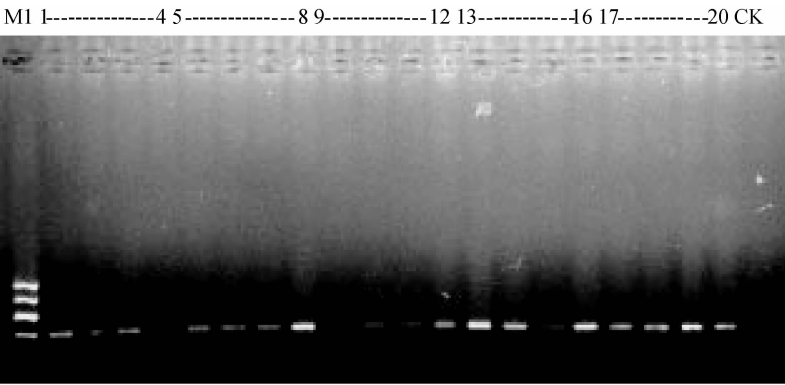


图 3 SCAR 引物对截形叶螨不同发育阶段的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification for the different developmental stages of *Tetranychus truncatus* using SCAR primers
M1:分子量标准 M1;泳道 1~4、5~8、9~12、13~16、17~20 分别代表截形叶螨的卵、幼螨、若螨、雄成螨、雌成螨的 PCR 扩增结果,CK 为阴性对照。
M1;molecular marker M1;lane 1-4, lane 5-8, lane 9-12, lane 13-16, lane 17-20 indicate the PCR amplification results from egg, larva, nymph, male adult and female adult, individually. CK indicates the negative control.

2.3 SCAR 引物对田间叶螨种群的验证

连续于 2009—2011 年在北京海淀区不同蔬菜寄主上采集田间叶螨种群,形态学鉴定已确认茄子和菜豆上为截形叶螨,甘蓝上为二斑叶螨,采

用上述设计的 SCAR 引物进行检测,结果见图 4。从图 4 可以看出,采集于茄子、菜豆上的叶螨种群均可扩增出 303 bp 的特异性条带,而在甘蓝上叶螨样品中未见任何条带,阴性对照 CK 中无带。说

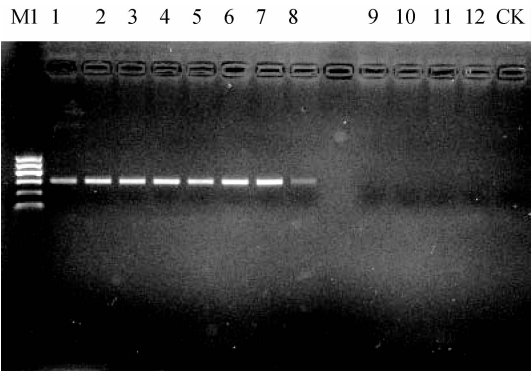


图 4 截形叶螨引物对田间不同蔬菜寄主上叶螨种群的 PCR 扩增

Fig.4 SCAR amplification of the spider mites on different vegetable hosts in the field
M1:分子量标准 marker I;1~4:茄子上的叶螨种群;5~8:菜豆上的叶螨种群;
9~12:甘蓝上的叶螨种群;CK:空白对照。
M;molecular marker I;1-4: spider mite population in the ornamental eggplants;
5-8: spider mite population in the bean;9-12: spider mite population in the cabbage;CK: negative control.

明所建立的 SCAR 标记对采自田间的截形叶螨也具有很强的扩增特异性,可用于田间叶螨种群的检测。

3 讨论

叶螨体型微小,危害严重,传统的叶螨鉴定方法比较困难,随着分子鉴定技术的日益发展,成为微型害虫鉴定的必然发展趋势,且是传统形态鉴定方法的有力补充。由 RAPD 扩增出的特异性条带转化而来的 SCAR 标记是一种十分稳定的分子标记,在应用上具有操作简便快捷,结果可靠稳定性高且价格低廉等特点 (Gupta *et al.*, 2010; Kiran *et al.*, 2010; Cirillo *et al.*, 2012)。近年来该项技术不断被应用于农业重要害虫种的特异性检测中 (孟祥钦等, 2010; 张桂芬等, 2010; Kang *et al.*, 2012; Zhao and Wu, 2012)。

本研究采用 RAPD 扩增筛选到一条在截形叶螨体内特异性很强的 DNA 片段,虽然二斑叶螨中同时也扩增得到一条亮度稍弱、大小一致的 DNA 条带,但后来经过克隆、测序之后发现截形叶螨和二斑叶螨中该条带序列完全不同。基于截形叶螨的该片段序列设计一对特异性的 SCAR 引物,优化获得最佳的 PCR 扩增条件,可从截形叶螨的基因组 DNA 中直接扩增出一条特异性很强的、单一的 DNA 条带,而在与截形叶螨同域同期发生为害的二斑叶螨和朱砂叶螨体内未扩增到该条带,其它近似害螨种类中也未出现此特异性扩增,显示该 SCAR 引物特异性很强 (图 2),且该引物对适用于截形叶螨任何发育阶段的快速检测 (图 3),且可以检测到 pg 级别的 DNA 模板,说明检测灵敏度很高 (数据未示)。此方法与传统鉴定方法相比,简便快速,省时省力,田间采集样本后即可进行室内鉴定,一天之内可以得出结果,且对分类专业和非分类专业人士来说,该技术易于被掌握,是一种快速、准确鉴定截形叶螨种类的方法。但是,由于叶螨种类繁多,在本研究中尚有许多种类未曾涉及,因此,对该引物对的特异性尚需要收集更多的害螨种类开展进一步的验证。

叶螨寄主广泛,为害蔬菜、棉花、果树、玉米、花卉等很多重要农作物和园艺作物,且叶螨不同种类在田间常混合发生,对药剂的耐性及抗药性发展速度差异较大 (Van Leeuwen *et al.*, 2010),优势种类常随不同年份和季节发生变化 (Shibao

et al., 2008; Gotoh and Mori, 2011)。鉴于快速识别技术的缺乏,多数研究者直接将田间害螨统称为红蜘蛛或者叶螨 (陈晓娟等, 2011),但是对于其优势种类并不了解,有的研究者则认为我国蔬菜上叶螨种类主要为朱砂叶螨 (王少丽等, 2010; 蒋月丽等, 2011)。但是,采用本研究建立的 SCAR 标记对于不同年份采集自北京海淀区的茄子、菜豆和甘蓝寄主上的叶螨进行分子鉴定,发现茄子和菜豆上的叶螨均为截形叶螨,而甘蓝上的叶螨不是 (实为二斑叶螨),与室内形态鉴定结果完全一致。此结果说明:第一,本研究所建立的 SCAR 标记对于田间种群依然具有检测可行性;第二,不同蔬菜寄主上叶螨种类不同,截形叶螨和二斑叶螨在北京地区常见蔬菜田里分布相对普遍,不应该简单认为蔬菜上的“红色蜘蛛”即为朱砂叶螨。因此,建立叶螨的快速鉴定技术不仅有助于进一步研究叶螨对不同寄主的选择性和适合度及其生态学和生理学基础,而且对叶螨不同种类的针对性化学防治具有极其重要的意义。

致谢:感谢蔬菜有害生物控制与优质栽培北京市重点实验室对本研究工作的支持。

参考文献 (References)

- Ben-David T, Melamed S, Gerson U, Morin S, 2007. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 41 (3):169–181.
- Cirillo A, Del Gaudio S, Di Bernardo G, Galano G, Galderisi U, Cipollaro M, 2012. A new SCAR marker potentially useful to distinguish Italian cattle breeds. *Food Chem.*, 130(1):172–176.
- de Mendonça RS, Navia D, Diniz IR, Auger P, Navajas M, 2011. A critical review on some closely related species of Tetranychus sensu stricto (Acari: Tetranychidae) in the public DNA sequences databases. *Exp. Appl. Acarol.*, 55 (1):1–23.
- Ehara S, 1999. Revision of the spider mite family Tetranychus of Japan (Acari, Prostigmata). *Species Diversity*, 4(1):63–141.
- Gotoh T, Mori K, 2011. Determination of seasonal changes of spider mite (Acari: Tetranychidae) densities and species composition on kudzu vine and soybean (Fabaceae) in Japan with the use of phosphoglucomutase zymograms.

- Zoosymposia*, 6:72 – 81.
- Gupta VK, Sharma R, Jindal V, Dilawari VK, 2010. SCAR marker for identification of host plant specific in whitefly, *Bemisia tabaci*(Genn.). *India J. Biotech.*, 9(4):360 – 366.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London Ser. B-Biol. Sci.*, 270:313 – 321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 101(41):14812 – 14817.
- Hinamoto N, Tran DP, Pham AT, Le TBN, Tajima R, Ohashi K, Osakabe M, Takafuji A, 2007. Identification of spider mites (Acari:Tetranychidae) by DNA sequences: a case study in Northern Vietnam. *Int. J. Acarol.*, 33(1):53 – 60.
- Jeong G, Kim H, Choi Y, 2010. Molecular identification of two *Trichogramma* species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13:41 – 44.
- Kang SY, Kim YH, Lee HJ, Kim BJ, Lim KJ, Lee SH, 2012. One-step identification of B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* based on intron variation of carboxylesterase 2. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, doi:10.1016/j.aspen.
- Kiran U, Khan S, Mirza KJ, Ram M, Abdin MZ, 2010. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*, 81(8):969 – 976.
- Liu QL, Cai JF, Chang YF, Gu Y, Guo YD, Wang XH, Weng JF, Zhong M, Wang X, Yang L, Wu KL, Lan LM, Wang JF, Chen YQ, 2011. Identification of forensically important blow fly species (Diptera:Calliphoridae) in China by mitochondrial cytochrome oxidase I gene differentiation. *Insect Sci.*, 18(5):554 – 564.
- Ma WH, Li XC, Timothy JD, Lei CL, Wang M, Benjamin AD, Robert LN, 2009. Utility of mtCOI polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in differentiating between Q and B whitefly *Bemisia tabaci* biotypes. *Insect Sci.*, 16(2):107 – 114.
- Osakabe M, Kotsubo Y, Tajima R, Hinamoto N, 2008. Restriction fragment length polymorphism catalog for molecular identification of Japanese *Tetranychus* spider mites (Acari:Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.*, 101(4):1167 – 1175.
- Rugman-Jones PF, Morse JG, Stouthamer R, 2009. Rapid molecular identification of armored scale insects (Hemiptera:Diaspididae) on Mexican ‘Hass’ avocado. *J. Econ. Entomol.*, 102(5):1948 – 1953.
- Shibao M, Ehara S, Hosomi A, Tanaka H, 2008. Seasonal fluctuation in population density of phytoseiid mites and the yellow tea thrips, *Scirtothrips dorsalis* Hood (Thysanoptera: Thripidae) on grape, and predation of the thrips by *Euseius sojaensis* (Ehara) (Acari:Phytoseiidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 52:215 – 223.
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010. Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8):563 – 572.
- Xian F, Chen NZ, Ma J, Zhu SF, Hu XN, 2007. Molecular identification of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Dipt., Agromyzidae) based on real-time PCR. *J. Appl. Entomol.*, 131(8):548 – 552.
- Zhao YE, Wu LP, 2012. RAPD-SCAR marker and genetic relationship analysis of three *Demodex* species (Acari: Demodicidae). *Parasitol. Res.*, 110(6):2395 – 2402.
- 陈晓娟, 何树林, 杨运忠, 2011. 茄子对红蜘蛛的抗螨性鉴定及方法研究. 西南农业学报, 24(4):1327 – 1330.
- 程立生, 1998. 中国朱砂叶螨各地理种群形态变异研究. 热带作物学报, 19(1):83 – 86.
- 洪晓月, 2012. 农业螨类学. 北京:中国农业出版社. 1 – 301.
- 黄蓬英, 廖富荣, 林玲玲, 洪钦阳, 李雯琳, 林石明, 2012. 米尔顿姬小蜂 rDNA ITS1 和 ITS2 的序列分析及其分子鉴定. 应用昆虫学报, 49(2):448 – 453.
- 蒋月丽, 武予清, 段云, 高新国, 2011. 释放东亚小花蝽对大棚辣椒上几种害虫的防治效果. 中国生物防治学报, 27(3):414 – 417.
- 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.
- 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.
- 王少丽, 张友军, 秦悦, 朱国仁, 2010. 北京地区朱砂叶螨在蔬菜集约化栽培下的种群动态. 昆虫知识, 47(1):931 – 934.
- 张桂芬, 吴霞, 郭建英, 刘万学, 彭正强, 万方浩, 2010. 螺旋粉虱 SCAR 标记的建立及应用. 植物保护学报, 37(5):385 – 390.
- 张媛, 郭晓华, 刘广纯, 张卓, 2011. DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用. 应用昆虫学报, 48(2):410 – 416.