

# 解旋恒温基因扩增技术在螨虫鉴定中的应用前景

魏晓棠<sup>1\*</sup>, 林超<sup>1</sup>, 朱研研<sup>2</sup>, 胡东青<sup>2</sup>

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002; 2. 青岛出入境检验检疫局, 青岛 266001)

**摘要:** 螨虫种类多, 分布广, 危害多样, 已成为人们关注的对象。随着进出口植物、植物产品和食品的增加, 其携带螨虫的风险越来越高, 许多国家把螨虫作为检疫对象设置技术壁垒。由于螨虫体型微小, 形态鉴定比较困难, 一直是口岸检疫的一大难点。随着现代分子技术的发展, 迫切需要建立快速、灵敏、准确的螨类检测方法。解旋酶恒温基因扩增技术(HDA)是一种简便、快速、高效、灵敏度高的体外恒温基因扩增技术。该技术依靠DNA解旋酶解开双链DNA、单链DNA结合蛋白(SSB)维持单链状态、DNA聚合酶催化靶片段的扩增。HDA不需要昂贵的仪器设备, 适用于基层实验室。HAD能扩增微生物基因组DNA、病原菌DNA、质粒DNA和cDNA等, 从其灵敏性、准确性和可操作性几方面来看, 该方法适用于螨虫鉴定。

**关键词:** 解旋恒温基因扩增; 螨虫; 鉴定

## Application prospect of helicase-dependent isothermal DNA amplification in identification of mites

WEI Xiao-Tang<sup>1\*</sup>, LIN Chao<sup>1</sup>, ZHU Yan-Yan<sup>2</sup>, HU Dong-Qing<sup>2</sup>

(1. Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;  
2. Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China)

**ABSTRACT:** The mite has become the focus of attention because of a large number of species, wide distribution and various hazards. The risk of carrying mites is getting higher and higher, with the increase of import and export of plants, plant products and food. Many countries have set up technical barriers by taking mites as quarantine pests. It is very difficult to identify the tiny mites by their morphological characteristics, so mite identification is one of the difficulties in quarantine. With the development of modern molecular technology, there is an urgent need to establish a rapid, sensitive, and accurate detection method of the mites in the quarantine work. The helicase-dependent amplification is a simple, rapid, efficient and sensitive isothermal gene amplification technology *in vitro*. It utilizes the action of helicases to separate double-stranded DNA, the single-stranded DNA-binding protein to maintain the single-stranded state and DNA polymerases to synthesize target fragments. The method does not require expensive equipments, and is very suitable for primary laboratory. It is reported that HDA can be used for the amplifications of microbial genomic DNA, microbial DNA, plasmid DNA and complementary DNA. From the sensitivity, accuracy and operability, HAD technology is suitable for the identification of the mites.

**KEY WORDS:** helicase dependent amplification; mites; identification

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2012IK282、2010IK275、2009IK254)

**Fund:** Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2012IK282, 2010IK275, 2009IK254)

\*通讯作者: 魏晓棠, 高级农艺师, 主要研究方向昆虫学。E-mail: weixiaotang2001@63.com

\*Corresponding author: Wei Xiao-Tang, Senior Agronomist, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: weixiaotang2001@63.com

## 1 引言

螨虫是蛛形纲蜱螨目的一类体型微小的动物,大小一般都在0.5 mm左右,有些小到0.1 mm,有时肉眼难以直接看到。螨虫种类多,分布广,遍及各种土壤、水体、生物体及贮藏物中。据估计,全世界螨类超过50万种,已有记载的达5万余种,分属于284个科<sup>[1]</sup>。由于螨虫中的害螨危害多样,已成为了人们关注的对象,例如危害植物的各种叶螨,危害食品的各种粉螨等<sup>[2-4]</sup>。近年来,进出口植物及食品中螨虫的检疫也已成为出入境检疫的重要方面。

目前螨虫在分类鉴定上主要以成螨的外部形态为依据。螨虫由于体型微小、形态学特征有限和物种间高度相似的特征等,使其物种鉴定非常困难,其分类问题一直是许多分类研究者公认的难题<sup>[5]</sup>。在检验检疫系统,对螨虫的研究很少,螨虫鉴定一直是进出口植物及食品检验检疫中的一大难点。

## 2 现代分子生物学技术在螨类鉴定中的应用

目前,螨类鉴定仍以传统的形态学鉴定为主,随着现代分子生物学技术的发展,当形态学鉴定遇到困难时,利用特定DNA片段进行物种鉴定,也成为螨虫分类的一个重要手段。据文献报道,分子标记技术RAPD(随机扩增多态性DNA)<sup>[6]</sup>、AFLP(扩增片段长度多态性)<sup>[7]</sup>、SSR(微卫星DNA)<sup>[7]</sup>等以及DNA条形码技术<sup>[8-10]</sup>等已广泛应用于螨虫分类及系统发育分析。例如Ros<sup>[8]</sup>、Ben-David<sup>[9]</sup>等利用线粒体COI基因进行叶螨科分类的研究,李国庆等<sup>[5]</sup>基于核糖体28S rRNA对叶螨的鉴定及其系统发育进行了分析;Rodrigues等<sup>[6]</sup>利用RAPD技术和COI序列分析2种方法分析紫红短须螨*Brevipalpus phoenicis*的多态性。Carew等<sup>[7]</sup>用AFLP和微卫星标记2种方法分析了3种危害葡萄瘿螨的分类地位及群体遗传结构。以上的序列分析及分子标记技术均基于PCR的基础上完成,众所周知,PCR扩增技术存在着扩增时间长,费用昂贵,难于在基层实验室推广应用等缺陷。基于这种情况,近年来,一种解旋酶恒温扩增(HAD)新技术,由于操作简单、反应灵敏、无需特殊仪器、便于普及应用等优点受到广泛的关注<sup>[10-12]</sup>。

## 3 解旋恒温基因扩增技术

解旋恒温基因扩增技术(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HAD),是由美国New England Biolabs的研究人员模拟动物体内DNA的复制发明的一种新的体外恒温基因扩增技术<sup>[10-13]</sup>。

### 3.1 解旋恒温基因扩增技术的原理

HDA技术模拟体内DNA在恒温下进行复制的自然过程,在恒温条件下利用生物复制系统的关键组分实现

DNA的体外扩增,主要是利用解旋酶在恒温下解开DNA双链,同时以DNA单链结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein, SSB)稳定解开的单链为引物提供结合模板,然后由DNA聚合酶催化合成互补链。新合成的双链在解旋酶的作用下又解成单链,并作为下一轮合成的模板进入循环扩增反应,最终实现靶序列的指数式增长<sup>[14]</sup>。

目前HAD反应体系中使用的解旋酶主要是大肠杆菌UvrD解旋酶<sup>[15,16]</sup>,它是一种对粘性末端或平末端DNA双链都起作用的解旋酶;所使用的单链结合蛋白主要是T4噬菌体基因32蛋白或RB49噬菌体基因32蛋白;所使用的DNA聚合酶主要是缺失3'-5'外切酶活性的DNA聚合酶I Klenow片段或热稳定的*Bst* DNA聚合酶,该酶具有耐高温性、高反应进行性、极好的条带均一性及高准确性等特点<sup>[17]</sup>。

### 3.2 解旋恒温基因扩增技术的反应体系和操作过程

HAD反应体系包括混合物A和混合物B,前者由模板、引物、缓冲液和ddH<sub>2</sub>O组成,后者由大肠杆菌UvrD解旋酶、SSB(T4基因32蛋白或RB49基因32蛋白)、MutL、DNA聚合酶、dNTP和缓冲液按比例配制<sup>[18]</sup>。

HAD操作过程分为两步法和一步法两种方式。两步法是指把反应分两步进行:第一步是将混合物A置95℃水浴中2 min;然后于64℃水浴中退火3 min;第二步是加入同体积的混合物B于62~65℃反应70~90 min,最后加入终止反应液结束反应。一步法的操作过程比较简单,因为混合物A在95℃中水浴仅起加快反应速度的作用,所以可以省略此步,直接将混合物A、B混合后置于65℃扩增即可。但一步法HAD的扩增产物比两步法降低40%~60%,扩增敏感性是两步法的1/10<sup>[14,19]</sup>,因此在进行螨类鉴定时建议采用两步法进行HAD等温扩增。

### 3.3 与其他基因扩增技术的比较

目前在物种鉴定及系统发育分析方面常用的基因扩增技术主要是PCR及其他恒温扩增技术(如SDA、LAMP、NASBA等),但这些方法都存在一些缺陷。PCR方法需要通过变性-退火-延伸过程的多次循环实现,扩增时间长、需要PCR仪等精密昂贵的仪器、常引起非特异性扩增等<sup>[20]</sup>。SDA(strand displacement amplification,链替代扩增)和LAMP(loop-mediated isothermal amplification,环介导恒温扩增)是目前已经使用很成熟的恒温扩增技术,但其扩增均需热变性和4条引物<sup>[21-23]</sup>;SDA靠一组限制酶消化和转换成达到扩增目的,同时还需经修饰过的dNTP作底物<sup>[24]</sup>,由于其靶序列准备的复杂性限制了其应用范围,转录介导的扩增需要三种酶来完成恒温扩增,反应复杂性也限制了其使用范围。LAMP技术<sup>[22]</sup>对识别靶序列要求极高,因为这段基因长度限制在200 bp左右,从中设计的四条引物T<sub>m</sub>互有差别<sup>[25]</sup>。NASBA(nucleic acid sequence based

amplification, 依赖核酸序列的扩增)虽然由一对引物介导, 但其扩增结果特异性不高, 实验内外误差相对较大<sup>[26-29]</sup>。

与以上方法相比, HAD 是利用 DNA 解旋酶解开双链并完成扩增, 可以在同一温度下进行, 反应时间缩短, 不需热变性, 仅需合成 2 条引物、一个水浴锅和极少的试剂费用即可完成绝大多数 PCR 检测的过程<sup>[11]</sup>。因此该技术具有操作简单、结果快速准确、反应灵敏、无需特殊仪器等优点。其缺点是, 该技术作为一种新的恒温基因扩增方法, 目前尚处于初期阶段, 还没有广泛用于基因扩增和有害生物检测。

### 3.4 解旋恒温基因扩增技术目前的应用

HDA 目前已成功用于微生物的检测, 如王建广等<sup>[30-32]</sup>利用 HAD 技术检测单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌、志贺菌等, 石琰璟等<sup>[33]</sup>利用 HAD 技术检测副溶血弧菌; 梁炜等<sup>[34]</sup>基于 HAD 建立了超级细菌耐药基因 NDM-1 检测方法。在医学方面, 该技术也有成功的应用案例, 如马丽敏等<sup>[35]</sup>利用该技术快速检测麻疹病毒核酸。研究表明, HDA 法能够扩增微生物基因组 DNA、病原菌 DNA、质粒 DNA 和 cDNA、甚至完整的环状质粒<sup>[36]</sup>, 现用的 UvrD 系统扩增可达 100 多万倍, 能从血样中检出病原基因, 因此该技术完全可以作为诊断工具, 为临床诊断作出巨大的贡献<sup>[11]</sup>, 目前已有 HAD 应用于腹泻性梭状芽胞杆菌方面的报道<sup>[37]</sup>。

## 4 解旋恒温基因扩增技术在螨类鉴定中的应用展望

我国是进出口大国, 随着进出口植物、植物产品以及食品的增加, 其携带螨虫的风险越来越高。食品中的螨虫是人类很重要的过敏源, 能引起各种过敏反应, 植物中的螨虫主要吸食植物汁液, 影响光合作用, 严重时使植物叶片脱落, 植株死亡。因此世界许多国家把螨虫作为检疫性生物设置技术壁垒<sup>[38-41]</sup>。鉴于这种现状及螨虫形态鉴定比较困难的状况, 迫切需要建立快速、灵敏、准确的检测方法。虽然 DNA 条码技术是目前进行物种鉴定的一种很好的分子技术, 但研究表明, 它在螨类鉴定中的应用并不十分理想。例如基于 28S 基因序列无法将二斑叶螨 *Tetranychus urticae*、截形叶螨 *T.truncatus*、土耳其斯坦叶螨 *T.turkestani* 进行区分。而且, 在利用线粒体基因进行螨类鉴定时, 还需要考虑到胞内共生菌的问题<sup>[42-44]</sup>。螨虫个体微小, 提取的核酸量少, 若利用 HDA 技术, 因其反应采用去除了 5'-3' 外切酶活性的 BstDNA 聚合酶, 该酶兼具耐高温性、高反应进行性、极好的条带均一性及高准确性等特点, 克服了 PCR 采用 TaqDNA 聚合酶的不足, 使操作不易引起非特异性扩增, 同时有高度的敏感性; 而且 HAD 引物设计简单, 不需要热变性即可完成扩增反应<sup>[45]</sup>。以此推断, HAD 技术在螨类鉴定中将会有很好的效果。

## 参考文献

- [1] 雷强军. 螨虫及其对植物组织培养的危害与防治[J]. 中国园艺文摘, 2012, 9: 187-188.
- [2] Lei J. Study on the growth characters and cultivation techniques for the 'Sijimi Longan' [J]. Chin Horticult Abstracts, 2012, 9: 187-188.
- [3] 吴福安, 王兴科, 余茂德, 等. 桑园害虫朱砂叶螨的研究进展[J]. 蚕业科学, 2006, 32(3): 386-390.
- [4] Wu FA, Wang XK, Yu MD, et al. Review of the research on carmine spider Mite *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval [J]. Canye Kexue, 2006, 32(3): 386-390.
- [5] 孟和生, 王开运, 姜兴印, 等. 二斑叶螨发生危害特点及防治对策[J]. 昆虫知识, 2001, 38(1): 52-54.
- [6] Meng HS, Wang KY, Jiang XY, et al. Occurrence characteristics of *Tetranychus urticae* and its control methods [J]. Entomol Knowl, 2001, 38(1): 52-54.
- [7] Wang HY, Li CP. Composition and diversity of acaroids mites (Acari: Astigmata) community in stored food [J]. J Trop Dis Parasitol, 2005, 3(3): 139-142.
- [8] 李国庆, 于明志, 洪晓月. 基于核糖体 28SrRNA 对叶螨的鉴定及其系统发育分析[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(5): 49-54.
- [9] Li GQ, Yu MZ, Hong XY. Identification and phylogenetic analysis of rRNA ribosomal 28s based on leaf mites [J]. J Nanjing Agric Univ, 2010, 33(5): 49-54.
- [10] Rodrigues JCV, Gallo-Meagher M, Ochoa R, et al. Mitochondrial DNA and RAPD polymorphisms in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) [J]. Exp Appl Acarol, 2010, 34: 275-290.
- [11] Carew ME, Goodisman MAD, Hoffmann AA. Species status and population genetic structure of grape vine eriophyoid mites [J]. Entomol Exp Appl, 2004, 111(2): 87-96.
- [12] Hebert PDN, Ratnasingham S, De Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit divergences among closely related species [J]. Proc R Soc Lond B, 2003, 270: s96-s99.
- [13] Ben-David T, Melamed S, Gerson U, et al. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae) [J]. Exp Appl Acarol, 2007, 41: 169-181.
- [14] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase dependent isothermal DNA amplification [J]. EMBO Rep, 2004, 5(8): 795-800.
- [15] 刘洵, 程天印, 常小斌, 等. 赖解旋酶恒温基因扩增技术的原理、应用和展望[J]. 长沙大学学报, 2007, 21(2): 29-31.
- [16] Liu X, Cheng TY, Chang XB, et al. Theory, application and outlook of helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. J Changsha Univ, 2007, 21(2): 29-31.
- [17] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [18] Peng T. Nucleic acid isothermal amplification and application [M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [19] 陈庆山, 刘春燕, 刘迎雪, 等. 核酸体外扩增技术[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(5): 10-14.
- [20] Chen QS, Liu Y, Liu YX, et al. *In vitro* amplification of nucleic acids [J]. China Biotechnol, 2004, 24(5): 10-14.
- [21] Myriam V, Yan Xu, Kong HM. Helicase dependent Isothermal DNA amplification [J]. EMBO Rep, 2004, 5(8): 795-800.
- [22] Collins R, McCarthy TV. Purification and characterization of *Thermus thermophilus* UvrD [J]. Extremophiles, 2003, 7(1): 35-41.
- [23] Bird LE, Brannigan JA, Subramanya HS. Characterisation of *Bacillus stearothermophilus* PcrA heicase: evidence against an active rolling mechanism [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(11): 2686-2693.
- [24] Hall MC, Jordan JR, Matson SW. Evidence for a physical interaction

- between the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair proteins MutL and UvrD [J]. *Embo J*, 1998, 17(5): 1535-1541.
- [18] An L, Tang W, Ranalli TA, *et al.* Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase dependent amplification [J]. *J Biohelix*, 2005, 280(32): 28592-28958.
- [19] Bao Q, Tian Y. A Complete sequence of the *Ttengcon gensis* genome [J]. *Genome Res*, 2002, 12(5): 689-700.
- [20] Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, *et al.* Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop mediated isothermal amplification [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 5023-5028.
- [21] Emery S, Bodrug S, Richardson B, *et al.* Evaluation of performance of the Gen-Probe human immunodeficiency virus type 1 viral load assay using primary subtype A, C, and D isolates from Kenya [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(7): 2688-2695.
- [22] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acid Res*, 2000, 28(12): E63 I-VII.
- [23] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27(3): 224-243.
- [24] Walker GT, Fraisor MS, Schram JL. Strand displacement amplification an isothermal, in vitro DNA amplification technique [J]. *Nucleic Acids Researc*, 1992, 20(7): 1691-1694.
- [25] Mechanic LE, Frankel BA, Matson SW. *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49): 38337-38346.
- [26] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification [J]. *Nature*, 1991, 350(7): 91-92.
- [27] 马保华, 李贺, 吕平, 等. 依赖核酸序列的扩增技术在动物病原微生物检测中的应用[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(4): 110-112.  
Ma BH, Li H, Lu P, *et al.* Application of NASBA in the detection of animal pathogenic microorganism [J]. *Prog Vet Med*, 2007, 28(4): 110-112.
- [28] 刘乐庭, 刘爽, 封燕芸, 等. NASBA, 一种新型禽流感病毒检测方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(11): 91-94.  
Liu LT, Liu SH, Feng YY, *et al.* NASBA, a new detection method of avian influenza virus [J]. *China Biotechnol*, 2005, 25(11): 91-94.
- [29] 汪琳, 罗英, 周琦, 等. 核酸恒温扩增技术研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2001, 22(2): 296-302.  
Wang L, Luo Y, Zhou Q, *et al.* Research progress of nucleic acid isothermal amplification technology [J]. *Biol Technol Commun*, 2005, 25(11): 91-94.
- [30] 王建广, 雷质文, 石琰璟, 等. 单核发细胞增生李斯特氏菌依赖解旋酶 DNA 恒温扩增检测方法的建立[J]. *中国预防兽医学报*. 2011, 33(2):130-132.  
Wang JG, Lei ZW, Shi YJ, *et al.* Establishment of the helicase-dependent isothermal DNA amplification method of detecting *Listeria monocytogenes* [J]. *Chin J Prevent*, 2011, 33(2): 130-132.
- [31] 王建广, 姜英辉, 雷质文, 等. 应用依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术检测沙门氏菌的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(12): 3289-3291.  
Wang JG, Jiang Y H, Lei ZH W, *et al.* Study on detection of *Salmonella* with helicase-dependent isothermal DNA amplification technology [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(12): 3289-3291.
- [32] 刘洵, 程天印, 王晓君. 应用解旋恒温基因扩增技术检测沙门氏菌[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(4): 450-453.  
Liu X, Cheng TY, Wang XI. Detection of *Salmonella* with helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2007, 33(4): 450-453.
- [33] 石琰璟, 王建广, 房保海, 等. 应用依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术检测副溶血性弧菌[J]. *青岛科技大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(1):42-45.  
Shi YJ, Wang JG, Fang BH, *et al.* Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* by helicase-dependent Isothermal DNA amplification technology[J]. *J Qingdao Univ Sci Technol(Nat Sci Edit)*, 2011, 32(1): 42-45.
- [34] 梁炜, 张京宣, 张云霞, 等. 基于HAD的超级细菌而药基因NDM-1检测方法的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2011, 2(3): 152-157.  
Liang W, Zhang JX, Zhang YX, *et al.* Establishment of detecting method of NDM-1 gene by the helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. *J Food Saf Qual*, 2011, 2(3): 152-157.
- [35] 马丽敏, 卢亦愚, 徐昌平, 等. 依赖解旋酶恒温扩增技术快速检测麻疹病毒核酸[J]. *中国疫苗和免疫*, 2012, 18(6): 493-495.  
Ma LM, Lu YY, Xu CP, *et al.* Quick detection of Measles Virus by helicase-dependent isothermal deoxyribonucleic acid amplification assay [J]. *Chin Vaccines Immuniz*, 2012, 18(6): 493-495.
- [36] Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, *et al.* Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. *Mol Cell Probes*, 1992, 6: 271-279.
- [37] Chow WHA, McCloskey C, Tong Yanhong, *et al.* Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile* [J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(5): 1-7.
- [38] 《中国砂梨出口美国植物检疫要求》[Z], 2013.  
Chinese sand pear export America plant quarantine requirements [Z], 2013.
- [39] 《中国苹果、梨出口南非植物检疫要求议定书》[Z], 2007.  
Chinese apple export to South Africa phytosanitary requirements of the protocol [Z], 2007.
- [40] 《澳大利亚柑橘输华检疫议定书》[Z], 2005.  
Australia citrus Chinese quarantine protocol [Z], 2005.
- [41] 《西班牙柑橘进境植物检疫要求》[Z], 2006.  
The Spanish entry plant quarantine requirements of Citrus [Z], 2006.
- [42] Navajas M, Boursot P. Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270: S124-S127.
- [43] Ros VID, Breeuwer JAJ. Spider mite(Acari: Tetranychidae)mitochondrial COI phylogeny reviewed: Host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding [J]. *Exp Appl Aearol*, 2007, 42: 239-262.
- [44] Xie L, Miao H, Hong XY. The two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch and the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduva)in China mixed in their *Wolbachia* phylogenetic tree [J]. *Zootaxa*, 2006, 1165: 33-46.
- [45] Hall MC, Jordan JR, Matson SW. Evidence for a physical interaction between the *Escherichia coli* methyl directed mismatch repair proteins MutL and UvrD [J]. *Embo J*, 1998, 17(5): 1535-1541.

(责任编辑: 白洪健)

## 作者简介



魏晓棠, 高级农艺师, 主要研究方向为昆虫学。

E-mail: weixiaotang2001@63.com