应用 DNA 条形码构建天敌-猎物食物网的方法*

张珂宁[1, 2**] 杨泉峰[1, 2] 欧阳芳[1] 乔 飞[1] 戈 峰[1, 2***]

（1. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100101；
2. 中国科学院大学，生物互作卓越创新中心，北京 100049）

摘 要 定量构建天敌-猎物食物网是有效开展害虫管理的基础。常用的食物网构建方法有单克隆抗体法、肠道内容物的 PCR 检测法、实时荧光定量 PCR 法等。这些方法灵敏度高、特异性强，但只能定性或定量检测天敌对已知猎物物种，即已明确捕食或寄生关系的物种的捕食情况，并不能检测未明确捕食或寄生关系的猎物种类和捕食量。而 DNA 条形码是一段具有物种特异性的 DNA 短片段，能够实现物种的快速鉴定。它最早应用于昆虫分类学，现随着高通量测序技术的发展，基于高通量测序的 DNA 复合条形码技术，对猎物的扩增范围更广，弥补了常规分子方法只能检测已知猎物的缺陷，可实现已知或未知猎物物种的迅速确定，构建相对完整的食物网。为了提高猎物的检测率，完善食物网结构，本文总结了 DNA 条形码在天敌-猎物昆虫食物网构建中的技术路线，介绍了条形码基因的选择原理、通用引物的设计及验证方法、以及高通量测序及数据分析的基本流程，并以一个实例展示了该方法的实现过程，叙述了该方法的优点及目前存在的争议，旨在为研究基于保护和利用天敌昆虫、增强食物网稳定性的害虫生态调控提供理论指导和方法支持。

关键词 DNA 条形码；高通量测序；食物网；天敌昆虫；捕食作用

The use of DNA barcoding in the establishment of predator-prey food webs

ZHANG Ke-Ning[1, 2**] YANG Quan-Feng[1, 2] OUYANG Fang[1] QIAO Fei[1] GE Feng[1, 2***]

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. CAS Center for Excellence in Biotic Interactions, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Quantitative establishment of predator-prey food web is the foundation of effective pest management. Common methods of establishing food webs include usingmonoclonal antibodies, PCR-based gut content analysis and real-time, fluorescent, quantitative PCR. These methods are highly sensitive and species-specific, but can only qualitatively, or quantitatively, detect known prey or host species. DNA barcoding is a system of species identification using short, species-specific DNA sequences that rapidly identify species and that was first used in insect taxonomy. With the development of high-throughput sequencing technology, DNA metabarcoding based on high-throughput sequencing has a wider range of PCR amplification for prey. Unlike conventional molecular methods, this method is not limited to detecting known prey (or host) species, but can rapidly identify both known, and unknown, prey (or host) species, thereby allowing the construction of relatively complete food webs. This paper summarizes the technological roadmap of using the DNA barcode technique to establish a predator-prey food web. It also introduces the selection principles for barcode genes, design and verification methods of universal primers, as well as the basic flow of high-throughput sequencing and data analysis. The application of the method is illustrated with an example. Finally, we describe the advantages of DNA barcoding and summarize the current controversy over the use of this method. The aim of this paper is to provide theoretical guidance and support for research on

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划重点专项（2017YFD0200400）

**第一作者 First author，E-mail：zhangkening@ioz.ac.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：gef@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2020-11-29；接受日期 Accepted：2020-12-23

the ecological regulation and management of pests based on the protection and utilization of their natural enemies, thereby enhancing the stability of food webs.

Key words DNA barcoding; high-throughput sequencing; food webs; predators; predation

在农林生态系统中，由同营养级物种之间的竞争、不同营养级物种之间的捕食或寄生、以及天敌之间的集团内捕食关系构成了较为复杂的天敌-猎物的食物网（Pimm *et al.*，1991）。天敌-猎物食物网的构建可理清主要害虫和天敌之间的相互关系，发现不同天敌之间的集团内捕食关系，由此为保护和利用天敌开展生物控害的害虫生态调控研究提供理论支撑。

传统的食物网构建方法包括：野外直接观察法（Carter and Dixon，1982；Luck *et al.*，1988）、消化道解剖法（Walker *et al.*，1988）、室内捕食功能反应（Harssell and Varley，1969）等。随着分子生物学的发展，食物网的研究方法逐渐趋向多样化，如单克隆抗体法（Hagler and Naranjo，2005；Schmidt *et al.*，2012）、肠道内容物 PCR 检测法（Schmidt *et al.*，2014；Ye *et al.*，2017）、实时荧光定量 PCR 法（Wang *et al.*，2013；Rondoni *et al.*，2014）等。这几种基于天敌肠道内容物的分子检测方法灵敏度高、特异性强，能够有效揭示天敌与已知猎物之间定性、定量的捕食关系。由于这几种方法可检测到的猎物种类有限，不能检测到天敌的未知猎物，因此不能构建相对完整的食物网。

基于物种 DNA 序列的多态性，Hebert 等（2002）提出了 DNA 条形码的概念，即以一段具有特异性的 DNA 短片段作为每个物种所特有的 DNA 标记，进而形成不同物种的鉴定系统，实现物种的迅速鉴定。近几年，随着高通量测序技术的发展，DNA 条形码在此基础上的发展更为迅速，基于二者的 Metabarcoding 技术在食物网的研究中更加深入、广泛（王雪芹等，2013）。结合高通量测序的 DNA 条形码技术，对猎物 DNA 的扩增范围更广，可以检测到除已知猎物外的其它猎物物种，发现生态系统中新的物种关系，从而快速构建相对完整的食物网（Hrcek *et al.*，2011）。同时，依据高通量测序结果中的序列相对读长丰度，还可以定量预测捕食者的食谱宽度、取食量和重叠度（Kartzinel *et al.*，2015）。

在“植物-害虫-天敌”的多营养级关系中，DNA 条形码可以作为一项有利的工具，解析植物、植食性昆虫、天敌之间的相互作用关系。García-Robledo 等（2013）在野外采集了 4 种寄主植物的样本，以植物的叶绿体 rbcL、trnH-psbA 基因、核基因 ITS2 共同构成条形码库，明确了植食性昆虫与植物之间的取食关系。Eitzinger 等（2018）收集了不同海拔高度的狼蛛及其潜在猎物样本，利用两段 mini-bacode 构建了狼蛛的捕食食物网，推测环境变化可能是通过对猎物群落结构的影响来调节天敌的捕食行为。在寄主-初级寄生蜂-次级寄生蜂的食物网体系中，人们往往假定寄生蜂为专性寄生。但实际上很多寄生性天敌为非专性寄生，因此，基于上述假设所构建的食物网通常会漏掉部分未知昆虫。Smith 等（2011）为了明晰寄生性天敌与寄主之间的关系，以 COⅠ为 DNA 条形码重新构建的食物网增加了 41%的结点，进而提高了食物网的准确性。除此之外，天敌之间的相互作用关系对食物网的稳定性和动态性也有重要作用（Thebault and Fontaine，2010）。Wirta 等（2015）利用 DNA 条形码，重新构建了鸟类、蜘蛛、寄生性天敌三者之间及三者与猎物之间完善的食物网。

综上，DNA 条形码既保留了常规分子检测的灵敏度，又增加了猎物检测的范围，弥补了传统分子方法上只能检测已知猎物的不足，从而实现复杂食物网的构建。鉴于 DNA 条形码在天敌-猎物食物网研究中的重要作用，本文简述了运用 DNA 条形码构建昆虫食物网的一般步骤和方法，以一个实例叙述了该方法的原理与应用，并对 DNA 条形码在昆虫生态学中应用的优点及争议进行总结。

1　DNA 条形码构建的技术路线

运用 DNA 条形码构建天敌-猎物食物网通常分为两步：首先要选择条形码基因，从田间取样及公共数据库获得潜在猎物的条形码序列，设计并验证条形码区通用引物；其次需要提取天敌肠道内容物 DNA，利用该条形码通用引物进行高通量测序，并对高通量测序结果进行处理，构建天敌-猎物食物网。同时，田间采集的猎物样本所构建的潜在猎物物种参考库，可以为食物网的正确构建提供参考，技术路线如图 1 所示。

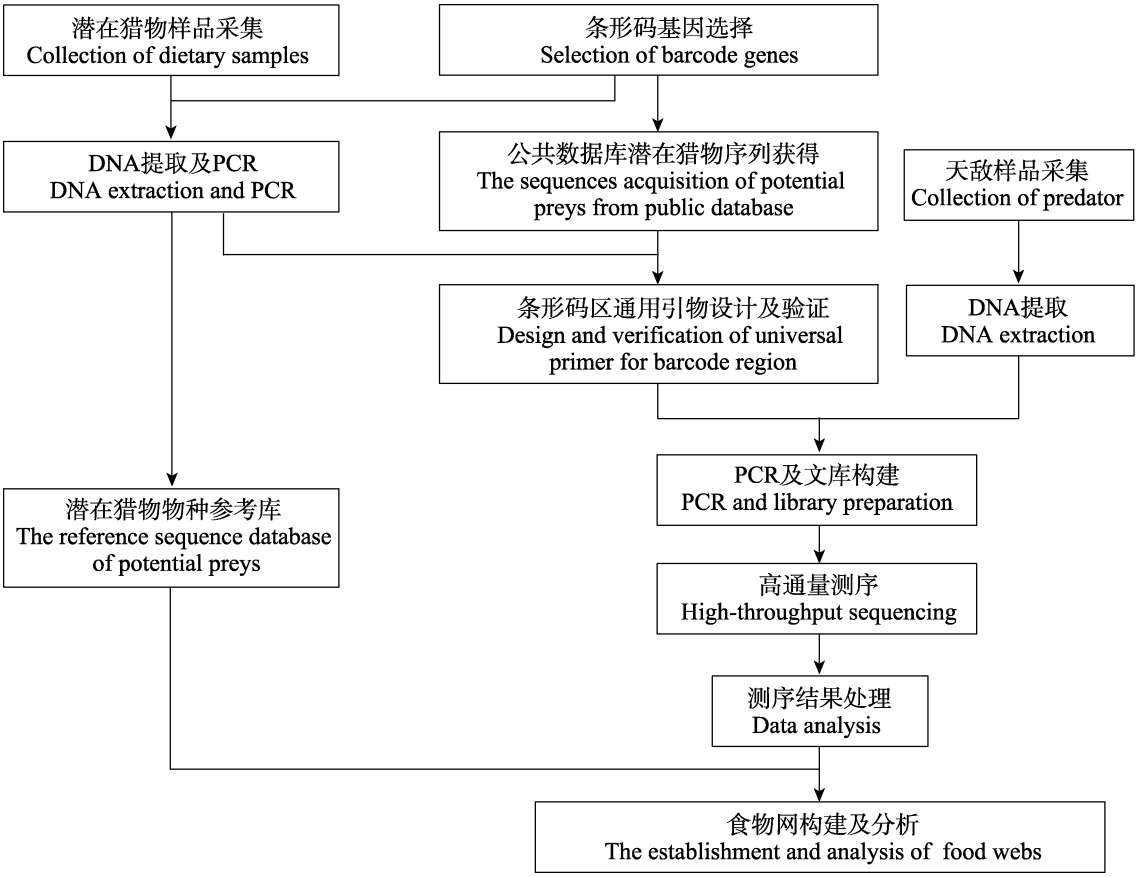

图 1　利用 DNA 条形码构建天敌-猎物食物网的技术路线图

Fig. 1　The technical route of DNA barcoding in the establishment of predator-prey food webs

2　构建的方法与步骤

2.1　样品采集

农林生态系统中存在着大量的广食性天敌，由于其猎物范围广，生态系统中所存在的节肢动物均可视为其潜在猎物。对生态系统中的节肢动物进行取样，可以有效了解杂食性天敌的潜在猎物群落，以便设计条形码区通用引物，并为食物网的构建提供参考。

常用的节肢动物取样方法有扫网法、陷阱法、马氏网法、黄盘法、吸虫器法等（Elliott *et al.*，2006；Reay-Jones，2014；Macfadyen and Muller，2013）。扫网法和吸虫器法可采集到绝大多数植株中上部的节肢动物，而往往会遗漏植株中下部或地表的节肢动物。陷阱法可以诱捕到大部分的地表节肢动物。马氏网对飞行类昆虫诱捕能力较强，同时也可收集到大部分的地表节肢动物等。为尽可能多得采集到不同种的节肢动物，多数研究会采用上述两种或多种方法结合进行取样（Clough *et al.*，2007；Schoenly *et al.*，2010；公维敏等，2015；Mansion-Vaquié *et al.*，2017）。节肢动物样品采集完成后，需保存至 - 20 ℃，

等待进行下一步的分子生物学操作。

天敌可根据物种特性使用相应的方法进行采集，例如使用盆拍法采集狼蛛、目测法采集瓢虫等。采集到的天敌需立刻保存至含无水乙醇的离心管中，低温保存，带回室内后置于 - 20 ℃保存备用。

2.2 条形码基因的选择

不同生物类群的基因进化速率存在差异，不同生物类群所选择的条形码基因也大不相同。在昆虫研究中，CO Ⅰ、16S rRNA、18S rRNA 等基因由于变异速度适宜，种间差异较大等优势，因此，通常都被选作为条形码基因。其中，线粒体 CO Ⅰ（细胞色素氧化酶亚基）基因更是被广泛应用于昆虫分类学（Hebert *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2012）和生态学（Valentini *et al.*, 2008）研究中。

2.3 样品 DNA 提取

分别采用 75%、50%、25%、0%的乙醇溶液对天敌及节肢动物样品洗涤 2 次，单头提取节肢动物总 DNA 及天敌昆虫的肠道内容物 DNA，可采用 CTAB 法或试剂盒法进行总 DNA 的提取，提取完成后进行凝胶电泳检测 DNA 质量，并对 DNA 浓度和纯度进行测定。

2.4 潜在猎物物种参考库构建

选定 DNA 条形码基因后，用该基因的通用引物对提取的节肢动物 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 产物经凝胶回收、连接转化等纯化步骤后进行测序，矫正并整理测序结果，并作系统发育分析。对所有节肢动物的测序结果进行序列比对，获得猎物物种信息，以此作为天敌的潜在猎物物种参考库。

2.5 条形码引物设计及验证

DNA 条形码需要具备物种专一性，即该序列片段内部碱基的排布需要存在物种差异。同时，DNA 条形码又要具备同源性，即不同物种 DNA 条形码区序列的 5′端以及 3′端需具有一定的相似性，能被同一对通用引物扩增出来。因此，DNA 条形码引物设计区域需要满足以下条件：1）具有一定的保守性，可在序列两端使用通用引物；2）引物之间的序列具有一定的特异性，即种间变异明显，能够将不同物种区分开来，同时种内变异较小，能够保持物种的专一性；3）长度较短，能够一个反应测完，且能够满足部分降解的 DNA 的提取和扩增（宁淑萍等，2013）。

除此之外，在食物网研究中，捕食者所取食的猎物基因在其消化道内通常处于半降解状态，DNA 完整性不强。针对这一情况，可设计迷你条形码，在保证其分辨率的基础上，选择 100-200 bp 的小片段作为 mini-barcode 区（Meusnier *et al.*，2008）。

对收集到的潜在猎物条形码基因进行整理对齐，并在公共数据库（NCBI、BOLD 等）下载其他潜在猎物的条形码基因序列。对潜在猎物的基因序列进行多重比对后，根据 DNA 条形码的原则，设计迷你条形码区的通用引物，并对其退火温度进行探索。

以提取的节肢动物 DNA 为模板，利用设计好的迷你条形码区通用引物进行 PCR 扩增，根据凝胶电泳的阳性条带情况，验证该引物的通用性，使其能尽可能全得扩增出生态系统中所采集到的节肢动物 DNA，提高天敌食物网的完整性。

2.6 高通量测序及数据分析

以天敌的肠道内容物 DNA 为模板，在条形码区通用引物的两端加上接头，制备测序文库，使用 Illumina 平台进行测序。

测序原始结果经 fastqc 进行质量检测和过滤，去掉低质量序列后，使用 Flash、Qiime 等进行序列拼接、过滤，删除嵌合体序列。而后进行 OTU 聚类，并在每个 OTU 中选择最长的序列与公共数据库比对，获得物种信息（宋飏和黄原，2016）。计算食物网参数，并采用 R 语言中的“bipartite”包构建其可视化网络。

3 研究实例

为更好地阐述应用 DNA barcoding 构建天敌-猎物食物网的方法，下面以“DNA metabarcoding of spiders, insects, and springtails

for exploring potential linkage between above- and below-ground food webs”这篇文章为例(Toju and Baba，2018)，叙述该方法的具体实现过程和应用该方法解决的科学问题。

蜘蛛是一类活跃在地上、地表的捕食性天敌，研究蜘蛛的捕食行为可以探索地上、地表食物网之间的潜在联系。Toju 和 Baba（2018）以捕食性蜘蛛为研究对象，利用 DNA metabarcoding 的方法构建了蜘蛛的捕食食物网，阐明了蜘蛛在耦合地上、地表食物网中的重要作用。

Toju 和 Baba（2018）首先选择 rRNA 为条形码基因，以 ITS2 为条形码区，从公共数据库中下载了六足总纲和蛛形纲含有 5.8s rRNA 序列。其次，在 5.8s rRNA 区域内设计了通用引物上游，以修改后的 ITS4 通用引物作为条形码区的下游引物。另外根据蛛形纲的序列特征，设计了蛛形纲特异性的阻断引物（图 2）。包括上下游引物在内，条形码区的片段总长约为 350 bp。采用试剂盒法对蜘蛛 DNA 进行提取，在 PCR 反应体系中同时加入含接头的通用引物及少量的阻断引物构建文库，根据阻断引物的用量，共设置了 4 组 PCR 体系。PCR 产物经纯化后进行 Illumina 平台测序。测序结果转换成 FASTQ 格式，使用 Claident 对原始序列进行过滤，去除低质量序列，再以 97%的相似度进行 OTU 聚类。基于 QCauto 和 LCA 算法，对合格 OTU 进行分子鉴定。为探究阻断引物加入量对测序结果的影响，作者将 OTU 矩阵分为 4 个，使用 R 语言中的“vegan”包展现了阻断引物不同用量下的 reads 数与六足总纲/蛛形纲 OTU 之间的关系（图 3）。最后，作者采用 R 语言中的“bipartite”包构建出了蛛形纲与六足总纲之间的营养互作网络（图 4）。

结果发现，蜘蛛的猎物中既有地上的缨翅目、鳞翅目、双翅目、膜翅目、半翅目昆虫，也包括地表的弹尾目等，阐明了蜘蛛的捕食行为连接了地上、地表的生物群落。除此之外，寄生蜂是蜘蛛食物网中的重要组成部分，进而揭示了天敌间的集团内捕食作用。

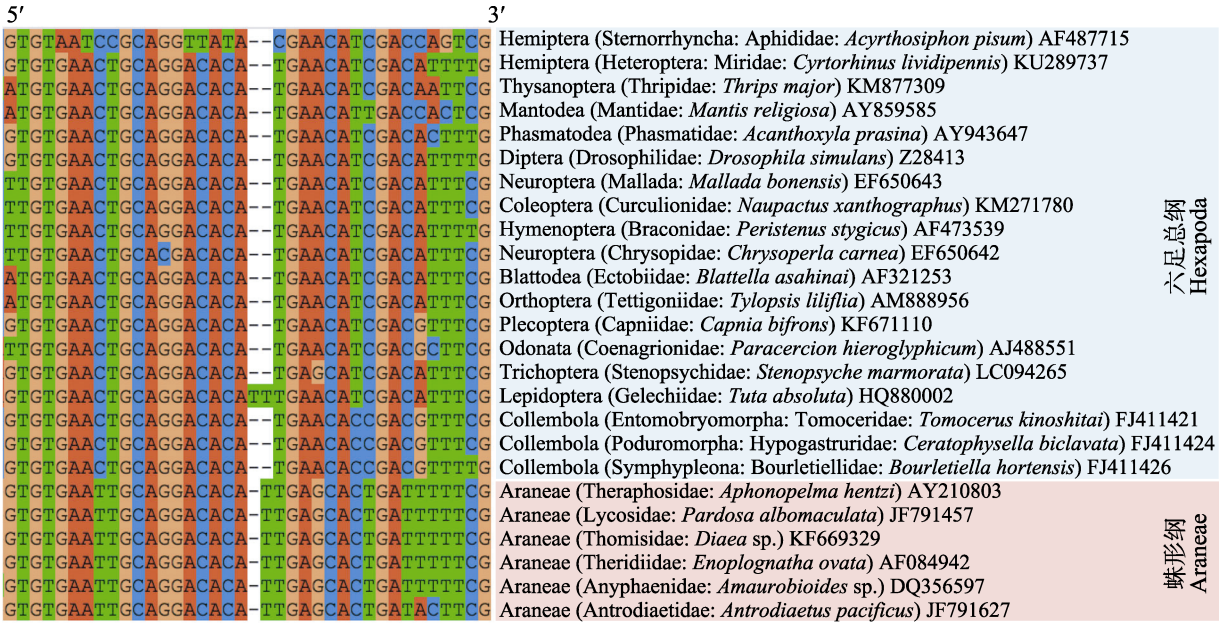

图 2　5.8S rRNA 区域的正向引物位置（该图引自 Toju and Baba，2018）

Fig. 2　Forward primer position within 5.8S rRNA region (This figure is quoted from Toju and Baba, 2018)

在 5.8S rRNA 区域的插入/缺失位点附近，核苷酸序列在除了鳞翅目和胸喙亚目外的六足总纲中是很保守的。在插入/缺失位点设计了六足总纲和蛛形纲的引物以及蛛形纲的特异性阻断引物。

Around the insertion/deletion site within the 5.8S rRNA region, nucleotide sequences are well conserved within Hexapoda except for Lepidoptera and Sternorrhyncha. Hexapoda, and Araneae primers and Araneae-specific blocking primers were developed around the insertion/deletion site.

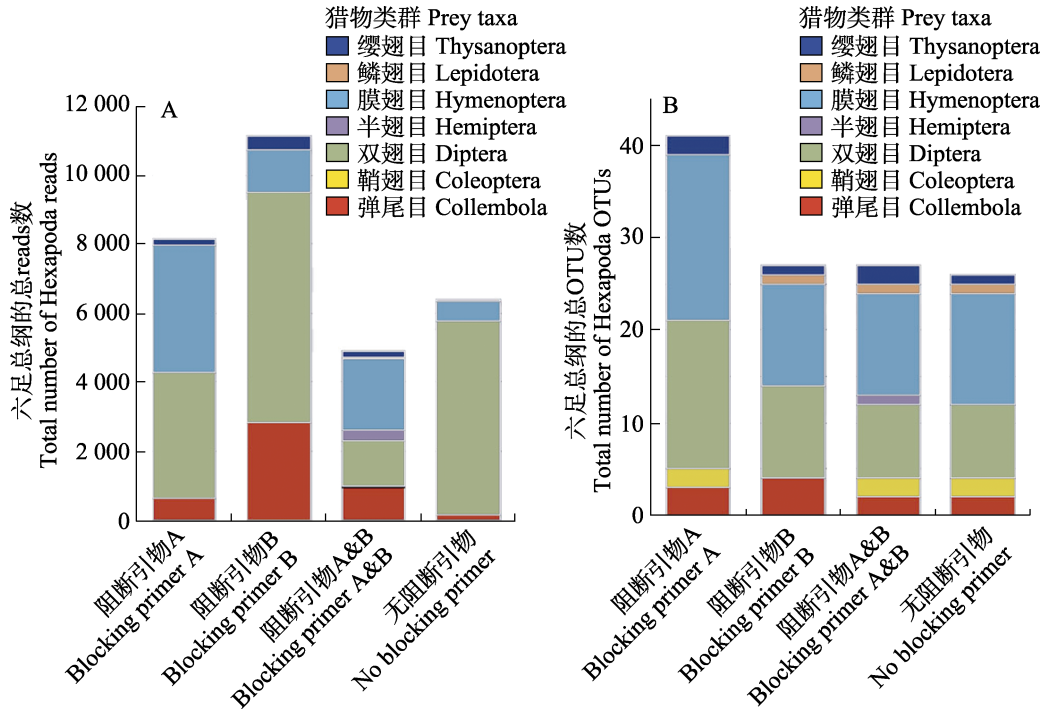

图 3　六足总纲的 reads 数和 OTU 数的分类组成（该图引自 Toju and Baba，2018）

Fig. 3　Taxonomic composition of obtained Hexapoda reads and OTUs
(This figure is quoted from Toju and Baba, 2018)

A. 六足总纲中各目在 4 个 PCR 体系中的 reads 数；B. 六足总纲中各目在 4 个 PCR 体系中的 OTU 数。
A. Taxonomic composition of Hexapoda sequencing reads in the four PCR settings;
B. Taxonomic composition of Hexapoda OTUs in the four PCR settings.

4　优缺点分析

DNA 条形码最初是为了解决分类学上鉴定困难等问题，自 2003 年发展至今，其应用范围越来越广，基于高通量测序的 DNA 条形码技术也逐渐成熟，在昆虫食物网构建中大致具有以下优点：

1）灵敏度高，可实现猎物物种的快速鉴定；2）片段小，可弱化由猎物 DNA 降解而造成可检测到的物种种类减少的问题；3）扩增范围广，可发现食物网中的新种，构建广食性天敌的复杂食物网结构，研究生态系统中的食物资源空间分配等问题。

尽管 DNA 条形码技术已获得主流认可，但仍存在部分争议，主要集中在以下几个方面：

1）条形码的分辨率。在昆虫生态学中，食物网构建主要采用昆虫的线粒体 CO Ⅰ基因进行研究，然而针对 CO Ⅰ基因究竟能否作为条形码，目前仍存在部分争议：

① CO Ⅰ是否对所有物种通用？

前人针对 CO Ⅰ序列能否作为条形码进行了大量研究，最终发现 CO Ⅰ的对物种的分辨率达到 92%以上，然而由于不同物种进化速率不同，CO Ⅰ对鳞翅目和双翅目等具有偏好性，因此，CO Ⅰ在某些物种（如膜翅目）的鉴定上仍存在争议（Kaartinen *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2014）。针对这一问题，也有研究提出，可以采用多条基因组合，共同构成条形码，用于物种鉴定（Pompanon *et al.*，2012）。

②线粒体假基因是否会影响鉴定结果？

线粒体 CO Ⅰ基因转移到细胞核中，会形成线粒体假基因（Nuclear mitochondrial-like sequences，Numts），而 Numts 会作为 CO Ⅰ的旁系同源序列参与反应，进行协同扩增，进而导致鉴定结果的偏差。当 Numts 参与协同扩增时，PCR 产物会出现电泳杂带、测序双峰、背景噪音或模糊等现象（杨倩倩等，2012）。

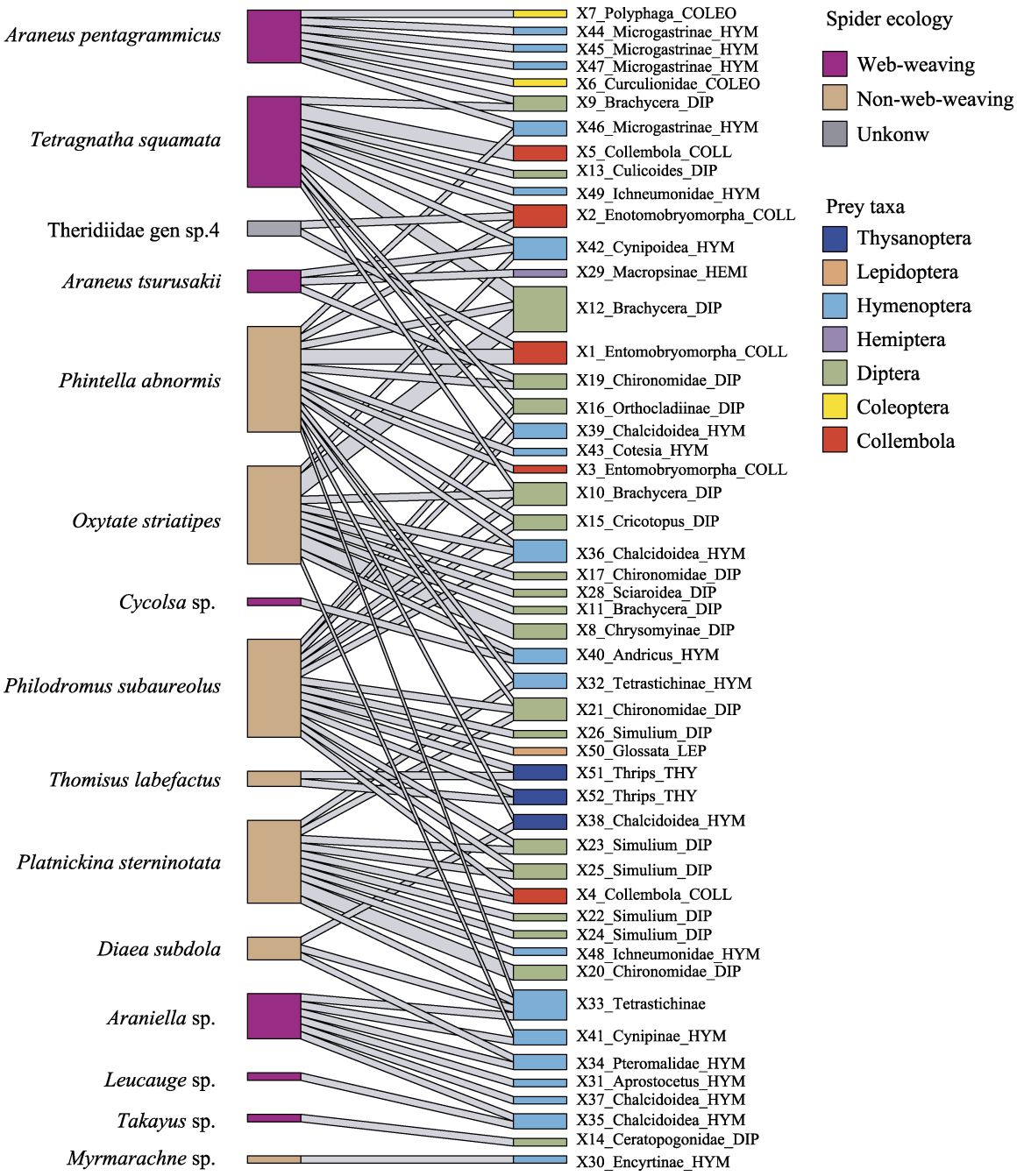

图 4　食物网结构

Fig. 4　Food-web structure

蜘蛛种类(左)与六足总纲 OTU(右)之间的取食关系，由对 4 种 PCR 体系的结果合并而来。结网性蜘蛛与不结网性蜘蛛用不同的颜色来表示。连线的粗细表示研究每种蜘蛛和六足总纲的捕食关系时使用蜘蛛样品的数目。每种猎物进行分子鉴定时的最低分类等级为 OTU，后接目水平的缩写。矩形的大小表示样本的数量。COLL，弹尾目；COLEO，鞘翅目；DIP，双翅目；HEMI，半翅目；LEPI，鳞翅目；THY，缨翅目（该图引自 Toju and Baba；2018）。

Spider species (left) are linked to the Hexapoda OTUs (right) detected. The results of all the four PCR settings are combined. Web-weaving and non-web-weaving spiders are indicated by color. The thickness of the link represents the number of spider samples from which a focal spider- Hexapoda association was observed. The lowest taxonomic rank indicated by the automatic molecular identification is shown for each prey OTU, followed by the abbreviation of order-level taxonomy. Box size represents the number of samples. COLL, Collembola; COLEO, Coleoptera; DIP, Diptera; HEMI, Hemiptera; HYM, Hymenoptera; LEPI, Lepidoptera; THY, Thysanoptera (This figure is quoted from Toju and Baba, 2018).

③其他因素

胞内共生菌 Wolbachia（Xiao *et al.*，2012）、线粒体异质性（Rubinoff *et al.*，2006）、地域分化（Li *et al.*，2015）等原因都可能影响 COⅠ作为 DNA 条形码的准确性。

2）猎物 PCR 的扩增效率。在 PCR 过程中，由于天敌的 DNA 浓度过高，拥有极低浓度的猎物 DNA 扩增可能会受到竞争性抑制，进而导致其扩增效率低下，这也是目前该方法的争议点之一。基于此，有研究在 PCR 过程中，设计了针对天敌的阻断引物，即天敌的特异性引物，能够在反应初始迅速结合天敌 DNA，抑制通用引物对天敌自身序列的扩增。然而在实际应用中，阻断引物的的效果有时微乎其微（Gomez-Polo *et al.*，2015a，2015b）。然而阻断引物可能对其他物种，尤其是天敌的近缘种也有阻断作用，基于此，有研究提出了，在不使用阻断引物的前提下，也能够读取足够的猎物序列，完成复杂的食物网结构（Piñol *et al.*，2013）。

3）条形码通用性的可靠度。由于食物降解等原因，通常选用 200 bp 以内的短片段作为 mini-barcode，该区域的通用性通常决定了扩增出的物种数量，若通用性过低，则扩增出的猎物种类较少，食物网构建也会产生一定的偏差，因此 mini-barcode 通用性程度也是目前食物网构建过程中的一大争议。

4）现有的数据库内容不够完善。尽管 NCBI 和 BOLD 等公共数据库可以作为条形码的参考依据，但是进行条形码研究的物种并不是 100%，因而会出现序列匹配不到物种的情况。

5）不能用于区分同类捕食、腐食性取食以及次级捕食（即检测不到猎物的猎物的 DNA）。

参考文献 (References)

Carter MC, Dixon AFG, 1982. Habitat quality and the foraging behaviour of coccinellid larvae. *Journal of Animal Ecology*, 51(3): 865–878.

Clarke LJ, Soubrier J, Weyrich LS, Cooper A, 2014. Environmental metabarcodes for insects: In silico PCR reveals potential for taxonomic bias. *Molecular Ecology Resources*, 14(6): 1160–1170.

Clough Y, Holzschuh A, Gabriel D, Purtauf T, Kleijn D, Kruess A, Steffan-Dewenter I, Tscharntke T, 2007. Alpha and beta diversity of arthropods and plants in organically and conventionally managed wheat fields. *Journal of Applied Ecology*, 44(4): 804–812.

Eitzinger B, Abrego N, Gravel D, Huotari T, Vesterinen EJ, Roslin T, 2018. Assessing changes in arthropod predator-prey interactions through DNA-based gut content analysis-variable environment, stable diet. *Molecular Ecology*, 28(2): 266–280.

Elliott NC, Tao FL, Fuentes-Granados R, Giles KL, Elliott DT, Greenstone MH, Shufran KA, Royer TA, 2006. D-vac sampling for predatory arthropods in winter wheat. *Biological Control*, 38(3): 325–330.

García-Robledo C, Erickson DL, Staines CL, Erwin TL, Kress WJ, 2013. Tropical plant-herbivore networks: Reconstructing species interactions using DNA barcode. *PLoS ONE*, 8(1): e52967.

Gomez-Polo P, Alomar O, Castañé C, Lundgren JG, Piñol J, Agustí N, 2015a. Molecular assessment of predation by hoverflies (Diptera: Syrphidae) in Mediterranean lettuce crops. *Pest Management Science*, 71(9): 1219–1227.

Gomez-Polo P, Alomar O, Castañé C, Aznar-Fernández T, Lundgren JG, Piñol J, Agustí N, 2015b. Understanding trophic interactions of *Orius* spp. (*Hemiptera: Anthocoridae*) in lettuce crops by molecular methods. *Pest Management Science*, 72(2): 272–279.

Gong WM, Zhang L, Wang S, Liu ZQ, 2015. Population dynamics and community structure of predatory insects in wheat fields. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 52(6): 1444–1450. [公维敏, 张龙, 王珊, 刘志琦, 2015. 麦田捕食性昆虫群落、结构与动态研究. 应用昆虫学报, 52(6): 1444–1450.]

Hagler JR, Naranjo SE, 2005. Use of a gut content ELISA to detect whitefly predator feeding activity after field exposure to different insecticide treatments. *Biocontrol Science and Technology*, 15(4): 321–339.

Harssell MP, Varley GC, 1969. New inductive population model for insect parasites and its bearing on biological control. *Nature*, 223(5211): 1133–1136.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2002. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl.): S96–S99.

Hrcek J, Miller SE, Quicke DLJ, Smith MA, 2011. Molecular detection of trophic links in a complex insect host-parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources*, 11(5): 786–794.

Kaartinen R, Stone GN, Hearn J, Lohse K, Roslin T, 2010. Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological Entomology*, 35(5): 623–638.

Kartzinel TR, Chen PA, Coverdale TC, Erickson DL, Kress WJ, Kuzmina ML, Rubenstein DI, Wang W, Pringle RM, 2015. DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African

large herbivores. *PNAS*, 112(26): 8019–8024.

Li XJ, Huang Y, Lei FM, 2015. Comparative mitochondrial genomics and phylogenetic relationships of the Crossoptilon species (Phasianidae, Galliformes). *BMC Genomics*, 16(1): 42.

Luck RF, Shepard BM, Kenmore PE, 1988. Experimental methods for evaluating arthropod natural enemies. *Annual Review of Entomology*, 33: 367–391.

Macfadyen S, Muller W, 2013. Edges in agricultural landscapes: Species interactions and movement of natural enemies. *PLoS ONE*, 8(3): e59659.

Mansion-Vaquié A, Ferrante M, Cook SM, Pell JK, Lövei GL, 2017. Manipulating field margins to increase predation intensity in fields of winter wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Applied Entomology*, 141(8): 600–611.

Meusnier I, Singer GA, Landry JF, Hickey DA, Hebert PDN, Hajibabaei M, 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity. *BMC Genomics*, 9: 214–217.

Ning SP, Yan HF, Hao G, Ge XJ, 2008. Current advances of DNA barcoding study in plants. *Biodiversity Science*, 16(5): 417–425. [宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 葛学军, 2008. 植物 DNA 条形码研究进展. 生物多样性, 16 (5): 417–425.]

Pimm SL, Lawton JH, Cohen JE, 1991. Food web patterns and their consequences, *Nature*, 350(6320): 669–674.

Piñol J, San Andrés V, Clare EL, Mir G, Symondson WOC, 2013. A pragmatic approach to the analysis of diets of generalist predators: The use of next-generation sequencing with no blocking probes. *Molecular Ecology Resources*, 14(1): 18–26.

Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P, 2012. Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8): 1931–1950.

Reay-Jones FPF, 2014. Spatial distribution of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) in wheat. *Journal of Insect Science*, 14(98): 1–22.

Rondoni G, Athey KJ, Harwood JD, Conti E, Ricci C, Obrycki JJ, 2014. Development and application of molecular gut-content analysis to detect aphid and coccinellid predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Italy, *Insect Science*, 12(6): 719–730.

Rubinoff D, Cameron S, Will K, 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for "barcoding" identification. *Journal of Heredity*, 97(6): 581–594.

Schmidt JM, Barney SK, Williams MA, Bessin RT, Coolong TW, Harwood JD, 2014. Predator-prey trophic relationships in response to organic management practices. *Molecular Ecology*, 23(15): 3777–3789.

Schmidt JM, Harwood JD, Rypstra AL, 2012. Foraging activity of a dominant epigeal predator: Molecular evidence for the effect of prey density on consumption. *Oikos*, 121(11): 1715–1724.

Schoenly KG, Cohen JE, Heong KL, Litsinger JA, Barrion AT, Arida GS, 2010. Fallowing did not disrupt invertebrate fauna in Philippine low-pesticide irrigated rice fields. *Journal of Applied Ecology*, 47(3): 593–602.

Smith MA, Eveleigh ES, McCann KS, Merilo MT, McCarthy PC, Van Rooyen KI, 2011. Barcoding a quantified food web: Crypsis, concepts, ecology and hypotheses. *PLoS ONE*, 6(7): e14424.

Song Y, Huang Y, 2016. The application of DNA metabarcoding in the study of soil animal diversity in Taibai Mountain. *Acta Ecologica Sinica*, 36(14): 4531–4539. [宋飚, 黄原, 2016. DNA 符合条形码在太白山土壤动物多样性研究中的应用. 生态学报, 35(14): 4531–4539.]

Thebault E, Fontaine C, 2010. Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks. *Science*, 329(5993): 853–856.

Toju H, Baba YG, 2018. DNA metabarcoding of spiders, insects, and springtails for exploring potential linkage between above- and below-ground food webs. *Zoological Letters*, 4: 4.

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2): 110–117.

Walker ED, Olds EJ, Merritt RW, 1988. Gut content analysis of mosquito larvae (Diptera：Culicidae) using DAPI stain and epifluorescence microscopy. *Journal of Medical Entomology*, 25(6): 551–554.

Wang GH, Wang XQ, Qiao F, Zhu ZR, Cheng JA, 2013. Development and preliminary application of a triplex real-time polymerase chain reaction assay for evaluating predation on three planthoppers in a rice ecosystem. *Molecular Ecology Resources*, 13(5): 811–819.

Wang XQ, Wang GH, Qiao F, Gao KQ, Zhu ZR, Cheng JA, 2017. Progress on high-throughput sequencing and its applications in food web analysis. *Acta Ecologica Sinica*, 37(8): 2530–2539. [王雪芹, 王光华, 乔飞, 高其康, Heong KH, 祝增荣, 程家安, 2017. 高通量测序及其在食物网解析中的应用进展. 生态学报, 37(8): 2530–2539.]

Wirta HK, Vesterinen EJ, Hambäck PA, Weingartner E, Rasmussen C, Reneerkens J, Schmidt NM, Gilg O, Roslin T, 2015. Exposing the structure of an Arctic food web. *Ecology and Evolution*, 5(17): 3842–3856.

Xiao JH, Wang NX, Murphy RW, Cook J, Jia LY, Huang DW, 2012. Wolbachia infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. *Evolution*, 66(6): 1907–1916.

Yang QQ, Li ZH, Wu Y, Liu LJ, 2012. Advance and application of mtDNA COI barcodes on insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1687–1695. [杨倩倩, 李志红, 伍祎, 柳丽君, 2012. 线粒体 CO Ⅰ基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用. 应用昆虫学报, 49(6): 1687–1695.]

Ye ZP, Vollhardt IMG, Girtler S, Wallinger C, Tomanovic Z, Traugott M, 2017. An effective molecular approach for assessing cereal aphid-parasitoid-endosymbiont networks. *Scientific Reports*, 7: 3138.

Yu DW, Ji YQ, Emerson BC, Wang XY, Ye CX, Yang CY, Ding ZL, 2012. Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4): 613–623.