应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2017, 54(4): 683−689. DOI: 10.7679/j.issn.2095−1353.2017.084

技术与方法

绿盲蝽体内寄主植物 DNA 提取方法的优化*

王 倩[1,2] 包伟方[2] 吴月坤[2] 杨益众[1**] 陆宴辉[2**]

（1. 扬州大学园艺与植物保护学院，扬州 225009；
2. 植物病虫害生物学国家重点实验室，中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘 要 【目的】 优化绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 体内植物 DNA 提取方法，为绿盲蝽寄主利用习性研究发展 DNA 分子追踪技术。**【方法】** 首先分别利用 CTAB 法、两种试剂盒法提取绿盲蝽中肠内 DNA 样本，比较分析其中的棉花 DNA 检出率。其次，利用 1%~1.5%的次氯酸钠溶液漂洗绿盲蝽成虫，比较不同漂洗处理对绿盲蝽体表植物 DNA 的清除效率以及对体内棉花 DNA 检出率。**【结果】** 不同提取方法对绿盲蝽中肠内棉花 DNA 检出率存在显著影响，其中 CTAB 法提取的中肠样本中棉花 DNA 的检出率最高。将绿盲蝽成虫在 1%~1.5 %次氯酸钠中漂洗 5 s，可清除成虫体表的植物 DNA 污染，且不破坏体内的棉花 DNA；漂洗 30 s 后，体内棉花 DNA 检出率明显降低。**【结论】** 本研究证实了利用整头绿盲蝽成虫代替其中肠提取的绿盲蝽 DNA 样本的可行性，并明确了成虫体内植物 DNA 高效提取的方法，为进一步利用 DNA 分子追踪技术研究绿盲蝽田间寄主选择与取食行为奠定了重要基础。

关键词 绿盲蝽，植物 DNA 提取，CTAB 法，体表 DNA 污染

An improved method for extracting host plant DNA from *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

WANG Qian[1,2] BAO Wei-Fang[2] WU Yue-Kun[2] YANG Yi-Zhong[1**] LU Yan-Hui[2**]

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract [Objectives] To develop an improved method of extracting host plant DNA from *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) in order to facilitate the use of DNA-based technology to explore patterns of host plant utilization by this mirid bug in the field. **[Methods]** We used a CTAB-based method and two commercial DNA extraction kits to extract cotton DNA from the gut of *A. lucorum* and compared the detection rates of cotton DNA among these three extraction methods. Secondly, we compared the effect of washing *A. lucorum* adults in a 1%-1.5% sodium hypochlorite solution for different periods of time on removing plant DNA contamination from the body surface, and on the detection rates of cotton plant DNA within the body. **[Results]** The CTAB-based DNA extraction protocol achieved significantly higher detection rates of cotton plant DNA than the two commercial kits. Washing in 1%-1.5% sodium hypochlorite for 5s successfully removed plant DNA contamination from the body surface of *A. lucorum* but did not destroy internal cotton plant DNA. The detection rate of cotton plant DNA did, however, decrease significantly after washing for 30 s. **[Conclusion]** This study established a feasible method to remove external plant DNA contamination from the body surface of *A. lucorum* and confirmed that DNA can be extracted from the entire body of adult *A. lucorum* instead of just the gut. It provides an important foundation for the use of DNA-based technology to track the feeding behavior of *A. lucorum*.

Key words *Apolygus lucorum*, plant DNA extraction, CTAB-based method, DNA contaminations

---

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31621064）

**共同通讯作者 Co-corresponding authors，E-mail：yzyang@yzu.edu.cn; yhlu@ippcaas.cn

收稿日期 Received：2017-03-14，接受日期 Accepted：2017-04-10

随着植物 DNA 条形码（DNA barcoding）技术的发展（Chase *et al.*，2005），DNA 分子追踪技术逐步被应用于植食性昆虫的食物谱、寄主取食选择以及昆虫与寄主植物协同进化等诸多领域（Jurado-Rivera *et al.*，2009；García-Robledo *et al.*，2013；Traugott *et al.*，2013；王倩等，2016）。利用位于叶绿体 tRNA 基因（cpDNA）的 *trn*T-F 区（Yamada *et al.*，1986；Taberlet *et al.*，1991，2007；Borsch *et al.*，2003；Hereward and Walter，2012）或者核糖体 DNA（rDNA）的转录间隔区（ITS）（Chiou *et al.*，2007；Pumarino *et al.*，2011）设计通用或特异引物，建立诊断 PCR、多重 PCR 反应体系，特异地扩增昆虫体内残留的寄主植物 DNA，能将被昆虫取食的植物鉴定到科或种（Chen *et al.*，2010；Wallinger *et al.*，2012）。该技术不仅克服取食行为观察、中肠解剖及内含物形态鉴定等传统方法的诸多限制，有助于研究活动比较隐蔽的昆虫种类的寄主取食行为。金针虫是一类多食性地下害虫，主要咀嚼取食植物根系，利用传统研究方法难以准确阐明其取食行为以及寄主范围。通过 DNA 分子追踪技术，Staudacher 等（2011）阐明了黯金针虫 *Agriotes obscurus* 的地下取食行为。随后，Wallinger 等（2014）评估了该金针虫对不同植物的取食选择，发现偏好取食车前属以及菊科植物，而不喜欢伞形科。

昆虫体内寄主植物 DNA 检出率一般与其在昆虫中肠内的消化时间呈负相关关系（Pumarino *et al.*，2011；Staudacher *et al.*，2011）。如何快速有效地获得高质量的 DNA 样本，成为进行后续分子鉴定的关键。粪便是常用的检测样本，通常是多种物质的混合物，不仅包括少量降解的靶标植物 DNA，还含有一些抑制 PCR 反应的细菌微生物，将可能明显降低样品 DNA 的扩增效率（Deuter *et al.*，1995；Monteiro *et al.*，1997）。解剖提取昆虫中肠组织，能够减少昆虫本身 DNA 的含量，从而获得更多的高质量植物 DNA。但对于体型偏小的昆虫来说，中肠解剖过程繁琐，同时难免引入外源 DNA 污染。因此，清除昆虫体表 DNA 污染、利用整头试虫提取 DNA，成为小型昆虫体内植物 DNA 提取的简洁替代方案（Jurado-Rivera *et al.*，2009；Remén *et al.*，2010；Greenstone *et al.*，2012；Wallinger *et al.*，2013）。

绿盲蝽 *Apolygus lucorum*（Mayer-Dür）是一类杂食性的刺吸式害虫，寄主植物范围广，迁飞扩散能力强（Lu *et al.*，2010a，2012）。随着农业产业结构调整以及高毒化学农药禁用，绿盲蝽种群数量急剧上升、已成为我国棉田的一种主要害虫，并波及棉区枣树、葡萄、樱桃以及茶树等其他多种经济作物（Lu *et al.*，2010b）。为了深入研究绿盲蝽对不同寄主植物的选择取食行为，本文重点研究适用于绿盲蝽体内植物 DNA 提取以及体表植物 DNA 清除的方法，发展优化绿盲蝽取食行为的 DNA 分子追踪技术。

1 材料与方法

1.1 供试植物与虫源

试验选用的棉花品种为“石远 321”，种植于中国农业科学院植物保护研究所河北廊坊科研中试基地试验田，进行常规管理，全生育期不使用任何化学农药。出苗后 5~6 周，选取新鲜叶片，用于后续试验。

供试绿盲蝽为室内种群，利用鲜嫩的玉米棒 *Zea mays* L.和四季豆豆荚 *Phaseolus vulgaris* L. 作为食物，饲养方法参照陆宴辉等（2008）；养虫室温度为（25±1）℃、湿度 60%~70%、光照 16 L∶8 D。取 2 日龄绿盲蝽成虫单头放入无核酸酶的 1.5 mL 离心管中，饥饿处理 36 h，期间仅提供沾有无核酸水的湿润棉球。随后将一张干净的棉叶放置于培养皿（直径 2.6 cm，高 10 cm）中，培养皿底部放有 0.5 cm 厚的 5%琼脂，用以叶片保湿。在每张叶片上接入 1 头经饥饿处理的绿盲蝽成虫，每隔 10 min 观察确认成虫取食行为。3 h 之后，将绿盲蝽成虫移至新的 1.5 mL 离心管中，随后用液氮立即冻死，在－80℃下贮存备用。

1.2 棉花 DNA 提取方法的筛选

试验选取了目前使用较为普遍的 3 种植物 DNA 提取方法：CTAB 法、两种试剂盒法。CTAB

法中，DNA 提取方法参见 Wallinger 等（2013）；其余两种方法分别利用 DNeasy Tissue Kit（QIAGEN，Hilden，Germany）、新型植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型；天根生化有限公司），DNA 提取参照各自说明书进行。

将绿盲蝽成虫置于灭菌的培养皿上，用解剖针固定其腹部最后一节，用镊子拉其前胸背板，缓慢取出中肠并放于生理盐水中清洗，随后置于干净的 1.5 mL 离心管中，储存于－80℃冰箱备用。为避免污染，每取一头绿盲蝽中肠，将镊子用酒精冲洗并置于酒精灯上灼烧 5 s。利用上述 3 种提取方法分别提取绿盲蝽中肠内棉花 DNA，每个处理设 3 个生物学重复，每个重复包含 10 头试虫；设置两个阴性对照，用无核酸酶的水替代。此外，还设置阳性对照组，分别利用 3 种方法直接提取新鲜棉叶中的 DNA 样本，每种方法设提取 30 个棉叶样本。

棉花的特异性引物为 F: 5′-GTTGAAGAAA-GAATCGAATAGAATAG-3′和 R: 5′-ATAGACA GCAAACGGGCTTT-3′。25 μL 的 PCR 反应体系如下：2 μL dNTP Mixture（2.5 mmol/L），0.25 μL EasyTaq，2.5 μL 10×EasyTaq Buffer，0.75 μL Primer-F，0.75 μL Primer-R，DNA 模板 4 μL，ddH_2O 14.75 μL。

PCR 反应按照以下的反应条件进行：预变性 94℃，4 min；变性 94℃ 30 s；退火 57℃ 30 s；延伸 72℃ 1 min；35 个循环后再延伸 72℃ 10 min；4℃保存。PCR 产物经电泳分析，电泳电压 180 V，凝胶浓度为 2%，随后放于核酸凝胶成像仪下观察。每组 PCR 同时设置两个阴性对照（ddH_2O）和两个阳性对照（棉花 DNA 模板），分别用于确定有无 DNA 样品的交叉污染和 PCR 反应的是否成功扩增。

1.3　绿盲蝽体表 DNA 污染清除方法的筛选

为了排除绿盲蝽体表可能的植物 DNA 污染，发展利用整头成虫提取体内植物 DNA 的方法。试验设置了 3 个处理：饥饿处理但体表沾有棉花 DNA 的绿盲蝽成虫、取食棉花且体表沾有棉花 DNA 的成虫、取食棉花且体表沾有绿豆 DNA 的成虫。试验前将绿盲蝽饥饿处理 36 h，利用通用引物 Primerc B49317：5′-CGAAATC-GGTAGACGCTACG-3′（Taberlet *et al.*，1991）和 *trn*L 110R：5′-GATTTGGCTCAGGATTGCC-C-3′（Borsch *et al.*，2003）进行扩增，确认饥饿效果同时排除其他外源植物 DNA 污染。将 30 头饥饿处理 36 h 后的绿盲蝽成虫，单头置于 1.5 mL 离心管中，迅速用液氮冻死。将其他饥饿处理后的绿盲蝽成虫置于棉花嫩叶上进行取食，3 h 后单头置于 1.5 mL 离心管中，迅速用液氮冻死。将棉花和绿豆的嫩叶分别碾碎，平铺在培养皿中，将已冻死的单头绿盲蝽成虫放置在碾碎的嫩叶上翻滚 3 次，人为地将棉花或绿豆 DNA 涂于成虫体表，并将成虫转移至新的 1.5 mL 离心管中，在－80℃贮存备用。

DNA 提取前，利用 1%~1.5%次氯酸钠清洗绿盲蝽成虫体表，设 0（未漂洗）、5、30、60 s 4 个清洗时间，随后用 1.2 中筛选出的灵敏度较高的提取方法提取整头试虫的 DNA，进行 PCR 检测。DNA 提取时，每个处理各设置 3 个重复，每个生物学重复包含 10 头试虫；同时设置两个阴性对照。

PCR 扩增体系中，棉花特异性引物同 1.2，绿豆特异性引物为 F:5′-ATGTCAATACCGACA-ACAATGAA-3′和 R:5′-AAATCCAAATTCCAA TTTAGTTG-3′。25 μL 的 PCR 反应体系如下：2 μL dNTP Mixture（2.5 mmol/L），0.25 μL EasyTaq，2.5 μL 10×EasyTaq Buffer，Primer-F/R 各 0.75 μL，DNA 模板 4 μL，ddH_2O 14.75 μL。PCR 反应按照以下的反应条件进行：预变性 94℃，4 min；变性 94℃ 30 s；退火 57℃ 30 s；延伸 72℃ 1 min；35 个循环后再延伸 72℃ 10 min；4℃保存。PCR 产物经电泳分析，电泳电压 180 V，凝胶浓度为 2%，随后放于核酸凝胶成像仪下观察。每组 PCR 设置两个阴性对照（ddH_2O）和两个阳性对照（棉花或绿豆 DNA 模板），用分别于排除 DNA 样品的交叉污染和确定 PCR 反应的成功扩增。

1.4　数据分析

不同处理之间棉花或者绿豆 DNA 检出率的

比较分析，使用 SAS9.3 软件进行单因素方差分析（One-way ANOVA）。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取方法对绿盲蝽中肠内棉花 DNA 检出率的影响

利用 3 种方法分别提取新鲜棉叶的 DNA，棉花 DNA 检出率无显著差异（F=0.33，df=2，6，P=0.7290）。这些方法用于提取绿盲蝽中肠中的 DNA，棉花 DNA 检出率存在显著差异（F=23.06，df=2，6，P=0.0015）。利用 CTAB 法提取，绿盲蝽中肠内棉花 DNA 的检出率最高，达 73%；利用 Qiagen 以及 TIANGEN 试剂盒提取，棉花 DNA 检出率分别为 33%和 13%（图 1）。

2.2 虫体漂洗时间对绿盲蝽体内棉花 DNA 的检出率的影响

利用通用引物进行 PCR 扩增分析发现，饥饿处理 36 h 后绿盲蝽成虫体内未能扩增出任何植物 DNA，表明饥饿处理 36 h 可以使得绿盲蝽中肠中植物全部消化。饥饿处理的绿盲蝽成虫但体表沾有棉花 DNA，漂洗前整头试虫提取的样本中棉花 DNA 的检出率为 100%，漂洗 5 s 后便不能检出棉花 DNA 残留（表 1）。对于既取食棉花同时体表又沾有棉花 DNA 的成虫，体内棉花 DNA 的检出率随着漂洗时间的增加而显著降低（F=63.97，df=3,8，P<0.0001），漂洗 30 s 后绿盲蝽体内棉花 DNA 的检出率较未漂洗或瓢虫 5 s 的显著下降。此外，对于既取食棉花同时体表又沾有绿豆 DNA 的成虫，漂洗 5 s 或更长时间后绿盲蝽体表绿豆 DNA 污染可全部去除，但体内

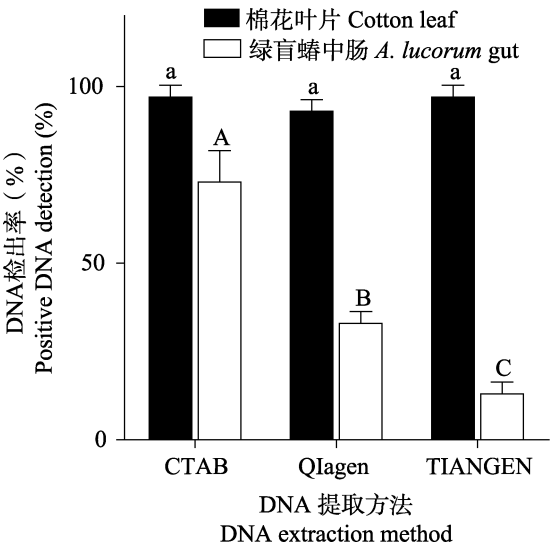

图 1 3 种方法提取的棉花叶片和绿盲蝽中肠 DNA 样本中棉花 DNA 的检出率

Fig. 1 The positive detection (%) of cotton plant DNA in the DNA samples extracted from cotton leaf and *Apolygus lucorum* gut using three different methods

表 1 绿盲蝽虫体经不同时间漂洗处理后体内棉花 DNA 的检出率

Table 1 The positive detection (%) of cotton plant DNA in *Apolygus lucorum* adults being washed with different periods

植物 DNA 检出率（%） Positive detection of plant DNA	1%~1.5% 次氯酸钠漂洗时间（s） Washing times in 1%–1.5% sodium hypochlorite (s)	不同处理 Different treatments		
		饥饿处理但体表沾有棉花 DNA adults of starvation treatment stained with cotton DNA	取食棉花同时体表沾有棉花 DNA Cotton-fed adults stained with cotton DNA	取食棉花及体表沾有绿豆 DNA Cotton-fed adults stained with mungbean DNA
棉花 Cotton	0	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	96.67 ± 3.33 a
	5	0 b	96.67 ± 3.33 a	93.33 ± 3.33 a
	30	0 b	26.67 ± 6.67 b	43.33 ± 3.33 b
	60	0 b	6.67 ± 3.33 b	13.67 ± 3.18 b
绿豆 Mungbean	0	/	/	100.00 ± 0.00 a
	5	/	/	0 b
	30	/	/	0 b
	60	/	/	0 b

棉花 DNA 的检出率同样随着漂洗时间的延长而逐步降低（F=41.34, df=3, 8, P<0.0001），漂洗 30 s 后与未漂洗、漂洗 5 s 的绿盲蝽体内棉花 DNA 的检出率差异显著（表 1）。

3　讨论

阐明多食性害虫的取食特性与寄主范围，对其综合防治有着重要意义。此前研究大多采用直接观察危害状或分析其中肠内含物的形态特征来鉴定其寄主植物种类，这不仅费时费力同时还极易产生假阳性（Parker and Howard，2001；Wallinger *et al.*，2014）。DNA 分子追踪技术能够为植食性昆虫与寄主植物之间的营养关系研究提供直接证据（张小曼和张爱，2017）。本研究以多食性的绿盲蝽为对象，分析比较了 3 种 DNA 提取方法对后续分子鉴定中寄主植物棉花检出率的影响；随后通过不同漂洗处理的比较分析，优化建立了一套适用于绿盲蝽分子鉴定的寄主植物 DNA 提取方法。

利用 DNA 分子追踪技术研究昆虫的取食行为，首先要求能够获得高质量的寄主植物 DNA 样本。不同于直接提取新鲜植物 DNA，被昆虫取食摄入的寄主植物组织在昆虫的消化道内会有不同程度的消化，因此筛选高灵敏度的 DNA 提取方法显得尤为重要。Wallinger 等（2013）利用 CTAB 法提取金针虫体内植物 DNA，结果表明消化 72 h 后，仍能在体内检测到植物 DNA。在研究马铃薯半翅木虱 *Bactericera cockerelli* 的寄主偏好取食习性时，同样利用了 CTAB 法进行植物 DNA 的提取与扩增分析（Cooper *et al.*, 2016）。QIAGEN 组织试剂盒也常被用于昆虫体内植物 DNA 样本的提取（Miller *et al.*, 2006；Matheson *et al.*, 2008）。Pumariño 等（2011）利用 QIAGEN 试剂盒提取的棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、斑潜蝇 *Tuta absoluta* 以及盲蝽 *Macrolophus pygmaeus* 的中肠 DNA 样本，成功扩增出了番茄的 DNA 并以此分析了番茄在此 3 种昆虫中肠内的消化速率。Hereward 和 Walter（2012）在鉴定杂食性盲蝽 *Creontiades dilutus* 的寄主植物种类时同样采用了 QIAGEN 组织试剂盒。本文分别利用 CTAB 法、QIAGEN 以及新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取了绿盲蝽中肠 DNA，并利用 PCR 扩增分析棉花 DNA 的检出率。结果表明：CTAB 法较于其他两种试剂盒，绿盲蝽中肠内棉花 DNA 的检出率最高（图 1）。利用同样的 PCR 体系分别扩增此 3 种方法直接提取的新鲜棉花组织时，发现不同方法之间棉花 DNA 的检出率没有明显差异（图 1）。这表明，棉花组织经过绿盲蝽中肠消化后，残存的 DNA 较适合于利用 CTAB 法提取。其原因：一方面可能由于 CTAB 法提取的绿盲蝽中肠样本中棉花 DNA 的含量相比于其他两种方法要高；另一方面可能 QIAGEN 以及新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取的绿盲蝽中肠 DNA 样本中含有抑制 PCR 反应速率的影响因子。Oehm 等（2011）曾发现，在对微量匀浆的粪便 DNA 进行提取时，相比于其他 3 种硅胶基质 DNA 提取试剂盒，CTAB 法提取的粪便中靶标样本的检出率明显偏高。这与我们的研究结果类似，表明 CTAB 法对于微量 DNA 提取的回收率高。

解剖提取小型昆虫的中肠组织，过程繁琐，且容易引入外源 DNA 的污染。Remén 等（2010）和 Greenstone 等（2012）的研究表明，在提取 DNA 之前用 1%~1.5%的次氯酸钠洗去昆虫体表的 DNA 污染，将大大减少试验结果假阳性出现的可能，从而使得利用整头昆虫样本提取 DNA 同样能够进行其中肠内含物的分子鉴定。Wallinger 等（2013）利用 1%~1.5%次氯酸钠漂洗金针虫 *Elateridae leach*，设置了 30 s~12 min 的不同漂洗时间，发现漂洗 30 s 能够洗去金针虫体表潜在的 DNA 污染，但并不破坏体内植物 DNA。与金针虫相比，绿盲蝽体表较为柔软，次氯酸钠具有一定腐蚀性，长时间漂洗将影响体内的植物 DNA。因此在本研究中，我们缩短了 1%~1.5%的次氯酸钠漂洗时间，设置为 0~60 s 不同时间长度。我们同时设置了饥饿处理组与取食棉花处理组，并让该两种处理的试虫体表都沾有棉花 DNA。此前，利用 *trn*L-F 的植物通用引物 PCR 扩增结

果证实，饥饿处理后 36 h，绿盲蝽中肠内未发现任何植物 DNA 残留。随后，对比饥饿处理以及取食棉花的处理组发现，用 1%~1.5%的次氯酸钠溶液漂洗 5 s 可以清除绿盲蝽体表的棉花 DNA 污染，漂洗 30 s 后体内棉花 DNA 的检出率开始明显下降，表明被绿盲蝽取食摄入到中肠内的棉花 DNA 已经被严重破坏。因此，利用 1%~1.5%的次氯酸钠漂洗 5 s 即可适用于绿盲蝽成虫体内棉花 DNA 的分子鉴定。与此同时，取食棉花以及体表沾有绿豆 DNA 污染的处理组检出结果表明，1%~1.5%的次氯酸钠漂洗 5 s 同样能够去除体表绿豆 DNA 的污染，且不影响其中肠内的棉花 DNA 的检出。进而说明先利用 1%~1.5%的次氯酸钠漂洗绿盲蝽成虫 5 s，再利用整头试虫提取绿盲蝽体内的 DNA，可以代替绿盲蝽中肠中 DNA 样本，直接应用于绿盲蝽取食行为的 DNA 分子追踪研究。

田间昆虫个体采集时，植物 DNA 等容易会附着在昆虫体表，造成昆虫样本的 DNA 污染（King *et al.*，2008）。与此同时，绿盲蝽成虫的田间飞行扩散能力强，田间寄主转移行为频繁，同样会导致体表容易残留不同植物的 DNA。本研究结果有效解决了广泛存在的绿盲蝽体表 DNA 污染问题，极大地方便田间绿盲蝽的取样以及室内样本的处理检测，有助于促进利用 DNA 分子追踪技术阐明绿盲蝽田间的取食偏好行为以及与寄主植物互作的食物关系。

参考文献 (References)

Borsch T, Hilu KW, Quandt D, Wilde V, Neinhuis C, Barthlott W, 2003. Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolution Biology,* 16(4): 558–576.

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haida N, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of Theroyal Society B-biological Sciences,* B360(1462): 1889–1895.

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE,* 5(1): e58613.

Chiou SJ, Yen JH, Fang CL, Chen HL, Lin TY, 2007. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta Medica,* 73(13): 1421–1426.

Cooper WR, Horton DR, Unruh TR, Garczynski SF, 2016. Gut content analysis of a phloem-feeding insect, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Environment Entomology,* 45(4): 938–944.

Deuter R, Pietsch S, Hertel S, Müller O, 1995. A method for preparation of fecal DNA suitable for PCR. *Nucleic Acids Resources*, 23(18): 3800–3801.

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

Greenstone MH, Weber DC, Coudron TA, Payton ME, Hu JS, 2012. Removing external DNA contamination from arthropod predators destined for molecular gut-content analysis. *Molecular Ecology Resources,* 12(3): 464–469.

Hereward JP, Walter GH, 2012. Molecular interrogation of the feeding behaviour of field captured individual insects for interpretation of multiple host plant use. *PLoS ONE,* 7(9): e44435.

Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CA, Petitpierre E, Gomez-Zurita J, 2009. DNA barcoding insect-host plant associations. *Proceeddings of the Royal Society B-Biological Sciences,* 276(1657): 639–648.

King RA, Read DS, Traugott M, Symondson WOC, 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology,* 17(4): 947–963.

Lu YH, Wu KM, Cai XM, Liu YQ, 2008. A rearing method for mirids using the green bean *Phaseolus vulgaris* in the laboratory. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(3): 215–219. [陆宴辉, 吴孔明, 蔡晓明, 刘仰青, 2008. 利用四季豆饲养盲蝽的方法. 植物保护学报, 35(3): 215–219.]

Lu YH, Jiao ZB, Wu KM, 2012. Early season host plants of *Apolygus lucorum* (Heteroptera: Miridae) in northern China. *Journal of Economic Entomology,* 105(5): 1603–1611.

Lu YH, Wu KM, Wyckhuys KAG, Guo YY, 2010a. Overwintering hosts of *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae) in northern China. *Crop Protection,* 29(9): 1026–1033.

Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Xia B, Li P, Feng HQ, 2010b. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science,* 328(5982): 1151–1154.

Matheson C, Muller G, Junnila A, Vernon K, Hausmann A, Miller M, 2008. A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. *Organisms Divers and Evolution,* 7(4): 294–303.

Miller MA, Muller GC, Kravchenko VD, Junnila A, Vernon KK, Matheson CD, 2006. DNA-based identification of Lepidoptera larvae and plant meals from their gut contents. *Russian Entomological Journal,* 15(4): 427–432.

Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. *Journal of Clinical Microbiogy,* 35(4): 995–998.

Oehm J, Juen A, Nagiller K, Neuhauser S, Traugott M, 2011. Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Molecular Ecology Resources,* 11(4): 620–628.

Parker WE, Howard JJ, 2001. The biology and management of wireworms (*Agriotes* spp.) on potato with particular reference to the UK. *Agricultural and Forest Entomology,* 3(2): 85–98.

Pumarino L, Alomar O, Agusti N, 2011. Development of specific ITS markers for plant DNA identification within herbivorous insects. *Bulletin of Entomological Research,* 101(3): 271–276.

Remén C, Krüger M, Cassel-Lundhagen A, 2010. Successful analysis of gut contents in fungal-feeding oribatid mites by combining body-surface washing and PCR. *Soil Biology and Biochemistry,* 42(11): 1952–1957.

Staudacher K, Wallinger C, Schallhart N, Traugott M, 2011. Detecting ingested plant DNA in soil-living insect larvae. *Soil Biology and Biochemistry,* 43(2): 346–350.

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, 2007. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research,* 35(3): e14.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J, 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology,* 17(5): 1105–1109.

Traugott M, Kamenova S, Ruess L, Seeber J, Plantegenest M, 2013. Empirically characterising trophic networks. *Advances in Ecological Research,* 49: 177–224.

Wallinger C, Juen A, Staudacher K, Schallhart N, Mitterrutzner E, Steiner EM, 2012. Rapid plant identification using species- and group-specific primers targeting chloroplast DNA. *PLoS ONE*, 7(1): e29473.

Wallinger C, Staudacher K, Schallhart N, Mitterrutzner E, Steiner EM, Juen A, 2014. How generalist herbivores exploit belowground plant diversity in temperate grasslands. *Molecular Ecology,* 23(15): 3826–3837.

Wallinger C, Staudacher K, Schallhart N, Peter E, Dresch P, Juen A, 2013. The effect of plant identity and the level of plant decay on molecular gut content analysis in a herbivorous soil insect. *Molecular Ecology Resources*, 13(1): 75–83.

Wang Q, Bao WF, Zeng J, Yang YZ, Lu YH, 2016. Tracking the trophic relationship between herbivorous insects and host plants by DNA based technology. *Acta Entomologica Sinica*, 59(4): 472–480. [王倩, 包伟方, 曾娟, 杨益众, 陆宴辉, 2016. 昆虫与寄主植物营养关系的 DNA 分子追踪. 昆虫学报, 59(4): 472–480.]

Yamada K, Shinozaki K, Sugiura M, 1986. DNA sequences of tobacco chloroplast genes for tRNASer (GGA), tRNAThr (UGU), tRNALeu (UAA), tRNAPhe (GAA): the tRNALeu gene contains a 503 bp intron. *Plant Molecular Biology,* 6(3): 193–199.

Zhang XM, Zhang AB, 2017. DNA barcoding and its application in the identification of diets of insect herbivores. *Acta Entomologica Sinica*, 60(1): 104–119. [张小曼, 张爱兵, 2017. DNA 条形码及其在植食性昆虫食性鉴定中的应用. 昆虫学报, 60(1): 104–119.]