



“十一五”国家重点图书出版规划：生物入侵

生物入侵：检测与监测篇

万方浩 冯 洁 徐 进 等 著

BIOLOGICAL INVASIONS:
DETECTION, SURVEILLANCE AND MONITORING



科学出版社

“十一五”国家重点图书出版规划：生物入侵

Biological Invasions : Detection , Surveillance and Monitoring

生物入侵：检测与监测篇

万方浩 冯 洁 徐 进 等 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在重点论述入侵生物检测监测技术的发展趋势和国际标准、我国主要进境植物及农产品的检疫对象、外来入侵生物普查与监测方法的基础上,以严重威胁与危害我国农林业的 39 种重要入侵物种为对象,根据不同入侵物种的生物学、生态学与行为学的特征与特性,针对性地介绍不同入侵物种的快速检测技术;根据不同入侵物种的扩散与传播途径及方式,重点介绍野外跟踪监测技术;根据不同入侵物种的发生与危害特点,论述不同入侵物种的快速诊断技术平台与跟踪监测体系。这些成果为发展入侵生物的检测技术和野外监测技术提供了强有力的科学依据与技术支撑。

本书既可供从事生物安全领域的专业研究人员、大专院校师生,以及从事动植物检疫和农业、林业的科研人员、行政官员及管理人员参考,也可为广大公众了解生物入侵知识、为政府部门采取生物入侵预防与控制行动提供指导依据。

图书在版编目(CIP)数据

生物入侵:检测与监测篇=Biological Invasions: Detection, Surveillance and Monitoring/万方浩等著. —北京:科学出版社,2011

(“十一五”国家重点图书出版规划:生物入侵)

ISBN 978-7-03-030912-9

I. ①生… II. ①万… III. ①生物-入侵种-研究 ②生物监测-研究
IV. ①Q16 ②X835

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 075957 号

责任编辑:李秀伟 李晶晶 王 静/责任校对:邹慧卿

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

北京天时彩色印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011 年 5 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2011 年 5 月第一次印刷 印张:38 3/4

印数:1—1 000 字数:910 000

定价:158.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

资 助 项 目

国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目——
重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础 (2009CB119200)

“十一五”国家科技支撑计划课题——
入侵物种快速检测与监测技术 (2006BAD08A14)

科技部基础性工作专项——
中国外来入侵物种及其安全性考察 (2006FY111000)

作者简介



万方浩 博士，男，1956 年出生，研究员、博士生导师。主要从事生物入侵、昆虫生态、生物防治研究。

现为中国农业科学院植物保护研究所生物入侵研究室主任。兼任中国植物保护学会副理事长、北京市昆虫学会副理事长、中国昆虫学会及中国生态学会常务理事、中国植物保护学会生物入侵分会主任、华南农业大学丁颖讲座教授、西南大学和湖南农业大学兼职教授。同时出任《生物安全学报》主编（之一），《昆虫学报》副主编，《中国农业科学》、《生物多样性》、《中国生物防治》、《中国农业科技导报》、《环境昆虫学报》、《中国农业生态学报》、《昆虫知识》和《植物保护》等刊物编委。曾任国际生物防治组织亚太地区学会（IOBC/APRS）副主席。

近年来，主要致力于生物入侵的基础与应用研究。已完成的项目主要有科技部“973”计划项目“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”（2002CB111400）（首席科学家）、“十一五”国家科技支撑计划课题“农业入侵物种区域减灾与持续治理技术”（2006BAD08A18）、科技部国际合作项目“紫茎泽兰的控制基础与应用技术研究”（2005DFA31090）、农业部专项“外来入侵物种风险评估、早期预警与综合治理”、国家科技基础条件平台工作面上项目“外来入侵生物风险预警及对生态经济影响评估”（2003DIB3J108）。目前承担的项目主要有“973”计划项目“重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础”（2009CB119200）（首席科学家）、国家自然科学基金重点项目“Q 型烟粉虱优势寄生蜂的竞争性互作及稳定性控制机制”（30930062）、科技部基础性工作专项“中国外来入侵物种及其安全性考察”（2006FY111000）。

在生物入侵方面的主要工作业绩：①提出和构建了我国入侵生物学的学科体系；②丰富与发展了生物入侵研究的理论、技术与方法，如外来种入侵的“前适应性”与“后适应性”机制、入侵物种的“自我增强式化感作用”、“外来生防作用物风险构成的过滤理论体系”、有害生物定量风险评价的技术与方法；③构建了外来入侵物种区域减灾的持续治理技术体系，在豚草、烟粉虱等入侵物种的控制方面取得了显著成就；④在国内外发表有关学术论文 300 余篇，出版著作 10 余部，获得科技成果奖 10 余项。

作者简介



冯洁 博士，女，1965 年出生，研究员、博士生导师。中国农业科学院“杰出人才计划”二级杰出人才。1986 年河北农业大学本科毕业，1989 中国农业科学院硕士研究生毕业，同年到中国农业科学院植物保护研究所工作至今，1997 年获中国农业科学院农学博士学位。1999~2001 年日本农业生物资源研究所博士后。

主要研究方向为外来入侵生物的检测与监测、植物与病原体互作分子机制、抗病转基因植株培育等。主持“十一五”国家科技支撑计划课题“入侵物种快速检测与监测技术”(2006BAD08A14)、“863”计划项目“重要植物检疫性疫病高通量分子检测技术”(2006AA10Z432)及两项国家自然科学基金项目(多肽抗生素在马铃薯抗青枯病中的作用研究, 30270872; 细菌群体猝灭基因在防治番茄青枯病中的作用研究, 30671418); 先后承担国家“973”计划项目子课题“农林危险入侵生物快速检测的分子基础”(2002CB111400)、“重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础”(2009CB119200), 公益性行业(农业)科研专项“小麦白粉病菌和赤霉病菌的群体遗传结构及其时空动态”(nyhyzx07-048)、“梨枯梢病防控技术解决方案与示范”(200803010)以及“农作物病虫害疫情监测”项目(2130108)等。获北京市科学技术奖一等奖 1 项、中国农业科学院科技进步奖一、二等奖 3 项。在国内外专业期刊上发表学术论文 50 余篇, 主编及参编著作 5 部。

作者简介



徐进男，1970年出生，副研究员。1995年毕业于中国农业大学植物保护系，获农学学士学位，同年到中国农业科学院植物保护研究所工作至今。2003年获中国农业科学院农学硕士学位。

主要研究方向为外来入侵生物的检测与风险评估、细菌病原生物学及致病机理、抗病转基因植株培育等。先后承担“十一五”国家科技支撑计划课题“入侵物种快速检测与监测技术”(2006BAD08A14)，“863”计划项目“重要植物检疫性疫病高通量分子检测技术”(2006AA10Z432)，“973”计划项目子课题“农林危险入侵生物快速检测的分子基础”(2002CB1111400)、“重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础”(2009CB119200)，公益性行业(农业)科研专项“梨枯梢病防控技术解决方案与示范”(200803010)以及“农作物病虫害疫情监测”项目(2130108)等。在国内外专业期刊上发表学术论文20余篇，参编著作2部。

《生物入侵：检测与监测篇》著者名单

(以姓氏笔画为序)

- | | |
|-----|---------------------|
| 万方浩 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 马 骏 | 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心 |
| 王 琼 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 王 瑞 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 王源超 | 南京农业大学植物保护学院 |
| 叶 辉 | 云南大学生命科学学院 |
| 申建梅 | 仲恺农业工程学院农学院 |
| 田艳丽 | 南京农业大学植物保护学院 |
| 冯 洁 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 吕志创 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 吕要斌 | 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所 |
| 朱方丽 | 华南农业大学资源环境学院 |
| 任 众 | 南京农业大学植物保护学院 |
| 任顺祥 | 华南农业大学资源环境学院 |
| 刘 艳 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 刘万学 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 刘太国 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 刘全儒 | 北京师范大学生命科学学院 |
| 刘晓飞 | 云南大学生命科学学院 |
| 刘倩倩 | 南京农业大学植物保护学院 |
| 刘海军 | 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心 |
| 李中安 | 中国农业科学院柑桔研究所 |
| 李世访 | 中国农业科学院植物保护研究所 |
| 吴建辉 | 华南农业大学资源环境学院 |
| 邱宝利 | 华南农业大学资源环境学院 |

张 真 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所
张志强 中国农业科学院植物保护研究所
张治军 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所
张桂芬 中国农业科学院植物保护研究所
张润志 中国科学院动物研究所
陆永跃 华南农业大学资源环境学院
陈万权 中国农业科学院植物保护研究所
林进添 仲恺农业工程学院农学院
罗 梅 仲恺农业工程学院农学院
周益林 中国农业科学院植物保护研究所
周常勇 中国农业科学院柑桔研究所
胡白石 南京农业大学植物保护学院
胡学难 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心
侯有明 福建农林大学植物保护学院
贺华良 仲恺农业工程学院农学院
顾渝娟 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心
徐 进 中国农业科学院植物保护研究所
高 利 中国农业科学院植物保护研究所
黄文坤 中国农业科学院植物保护研究所
符悦冠 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所
彭 焕 中国农业科学院植物保护研究所
彭德良 中国农业科学院植物保护研究所
董莎萌 南京农业大学植物保护学院
覃振强 华南农业大学资源环境学院
曾 玲 华南农业大学资源环境学院
谢 明 中国农业科学院植物保护研究所
谢丙炎 中国农业科学院蔬菜花卉研究所
褚 栋 山东省农业科学院高新技术研究中心
翟小伟 中国农业科学院植物保护研究所
魏 辉 福建省农业科学院植物保护研究所

序

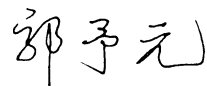
我国是全球受生物入侵影响最大的国家之一。随着全球经济一体化进程的加快，生物入侵现象越来越普遍，所造成的影响愈加严重。生物入侵成为危害我国生物安全、生态安全和国民经济发展的一个十分重要和紧迫的问题，已引起我国各级政府和公众的高度关注，其相关研究也得到了政府相关部门的积极支持。

2003年以来实施的国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”(2002CB111400)，围绕外来入侵物种的科学预警、遗传分化和生态适应等科学问题，采用生态学、分子生物学、信息科学等学科理论、技术与方法，重点开展了农林危险外来入侵物种快速检测的分子基础、种群遗传分化与演变、分子生态适应、种群形成与扩张，以及农林生态系统对危险外来生物入侵的抵御、生物入侵风险和环境经济评估模式与体系、生物入侵的可持续控制策略与途径等研究。2006年立项的国家科技支撑计划重大项目，对农林外来入侵物种的预防预警、检测监测、应急处理和区域减灾等应用技术给予了重点支持。从2007年开始，科技部又立项开展了我国外来入侵物种普查和安全性评估的考察工作。2009年“973”计划项目“重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础”(2009CB119200)进一步聚焦于入侵物种种群形成与发展、入侵物种生态适应性与进化、生态系统响应等方面，并开展深入的入侵机理与机制研究。这些项目覆盖了外来有害生物入侵机制的理论基础、防控的应用技术手段、基础性科学数据的获取以及外来入侵物种的安全性评估等方面内容，在前所未有的深度和广度上展开了对生物入侵的系统性研究，并取得了大量可喜的研究成果，初步形成了我国生物入侵研究的特色和入侵生物学的学科体系，建立了一支涵盖多学科、多层面的稳定的研究队伍。

目前，迫切需要及时掌握国内外入侵生物学理论研究的发展动态和成果，总结预防和控制外来入侵物种的经验、技术和取得的成绩，探讨科学管理外来生物入侵问题的途径，这对于加速提高我国入侵生物学研究水平，有效治理外来入侵物种的危害具有深远的学术意义和重大的应用价值。令人欣慰的是，万方浩博士组织入侵生物学研究与教学第一线的骨干，编写了一套系列丛书——《入侵生物学》、《生物入侵：预警篇》、《生物入侵：检测与监测篇》、《生物入侵：生物防治篇》、《生物入侵：管理篇》、《中国生物入侵研究》等，及时满足了我国从事入侵生物学研究与教学、外来生物入侵监测与控制以及相关管理领域工作者的需要。该丛书不仅跟踪了入侵生物学研究前沿的发展动态，而且总结分析了国内外在对外来入侵物种监测、控制与管理实践中积累的成功经验和教训、方法及技术；不仅介绍了国外最新的研究成果和实践成就，而且凝聚了我国在入侵生物学研究和实践工作中积累的成果。丛书的出版适应了当代入侵生物学发展的需要，

对于高等院校师生、科研院所科技工作者、从事外来入侵物种防控的科研人员以及管理工作具有重要的参考价值。丛书的出版将成为我国入侵生物学学科发展历程中的重要里程碑。

中国工程院院士

Handwritten signature of Gao Yuan in black ink.

2008年2月于北京

2010年8月修改于北京

前言 (I)

随着国际经济一体化进程与国际贸易的飞速发展,生物入侵 (biological invasions) 的问题愈加突出,形势愈加严峻。在大多数国家和地区,入侵物种肆意扩张蔓延,危害不断加剧,新的疫情频繁发生,生物入侵的威胁日益加重。深入了解外来有害生物的入侵过程、行为特征、扩散传播、成灾机制以及掌握有效的防控技术与策略,是预防与控制这些危险性入侵物种、有效提升防控技术水平的前提。但迄今为止,外来物种具备何种特征才能成功扩张与暴发、生态系统具备何种结构与功能才能抵御入侵等重要科学问题,仍远未获得确定的答案。面临国内生物入侵的严峻形势,如何构建有效的防控技术体系以及如何有效地实施防控策略,尚需我们深入探索与研究。

2003年,科技部通过“973”计划立项开展了“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”项目(2002CB111400)。“十一五”期间,科技部通过国家科技支撑计划,在创建农林外来入侵物种的防控技术体系及发展有效的预防预警、检测监测、应急处理和区域减灾等应用技术研究方面给予了重点支持。从2007年开始,科技部专门立项开展我国外来入侵物种普查和安全性评估,第一期工作已在部分沿海地区开展。这些项目的立项与实施显示了国家对生物入侵研究的高度重视。在这些项目的支持下,我国生物入侵研究无论是在理论上还是在技术上,都取得了一些突破性进展和成果。

其一,在入侵机制理论研究方面取得了突破性进展。阐明了B型烟粉虱的非对称型交配互作理论,揭示了粉虱共存系统中的生殖干涉行为和互利共生机制。揭示了紫茎泽兰的化感作用,明确了紫茎泽兰改变土壤微生物群落结构,使其产生偏利作用的入侵机制。解析了松材线虫遗传漂变与遗传多样性的关系,明确了传播扩散路线,揭示了群落与景观特征抵御生物入侵的作用与效应。阐明了大豆疫霉的起源,建立了大豆疫霉近等基因系,验证了大豆疫霉的5个重要基因参与了寄主识别和致病过程,揭示了稻水象甲长距离扩散过程以及局域种群季节性栖境转移途径,解析了其种群扩张的生殖特性。

其二,在风险评估与早期预警技术方面取得了显著成果。发展和完善了入侵物种的“物种系统发育的限制性、生物气候匹配的相似性、后代生存能力的合适性”等风险分析理论;改进了入侵物种适生性风险评估的技术与方法,将GIS与其他技术相结合,对70余种重要入侵物种的适生区进行了定量风险预测,制定了控制预案。建立了近20种危险性入侵物种与潜在入侵物种(特别是植物病害)快速检测的分子基础、技术与方法,开发了多种快速检测与野外监测的试剂盒。

其三,组建了我国外来入侵物种防控的四大技术体系。通过支撑计划的实施,已构建了早期预警与狙击体系、应急控制技术体系、阻断与扑灭技术体系、可持续综合防御与控制体系。

其四,积累了大量的科学数据,奠基了深层次研究平台。建立了紫茎泽兰的cDNA文库与BAC文库等;克隆了烟粉虱、松材线虫与紫茎泽兰的热激蛋白基因、紫茎泽兰

次生代谢/化感物质的相关基因、松材线虫致病基因、传播媒介松墨天牛的气味结合蛋白和化学感受蛋白基因、大豆疫霉的近等基因系等相关基因；组建了紫茎泽兰遗传转化系统；建立了紫茎泽兰生态修复、B型/Q型烟粉虱与非B型烟粉虱种群更替、松材线虫区域控制的野外实验与观测基地。

上述有关研究成果已在 *Science*、*PLoS One* 等国际权威刊物上发表，为我国生物入侵的防控提供了重要的科学理论、方法和技术支撑。同时，近年来国内召开了一系列的专门与生物入侵相关的国际、国内会议，如2004年和2005年，在北京分别举办了“中国外来入侵物种防控策略研讨会”及“APEC外来入侵物种高层论坛”；2007年，在福州举办了“第一届全国生物入侵学术研讨会”；2009年，在广州和福州分别组织了“第五届国际烟粉虱大会”和“首届国际生物入侵大会”。这些研究成果与工作表明，我国生物入侵的研究已步入国际水平，并具备了在这一新型领域与国际一流水平同等对话与交流的能力。这些研究成果与工作对入侵生物学学科的发展具有重要的推动作用。

尽管我国生物入侵研究与国际同步，甚至某些工作走在国际前列，但就入侵生物学学科体系来看，该学科在国际上仍处在初步发展阶段，需要全面构建和深入发展。在吸收消化前人工作的基础上，结合我国生物入侵的研究成果，我们尝试提出了入侵生物学学科体系框架（图1）。

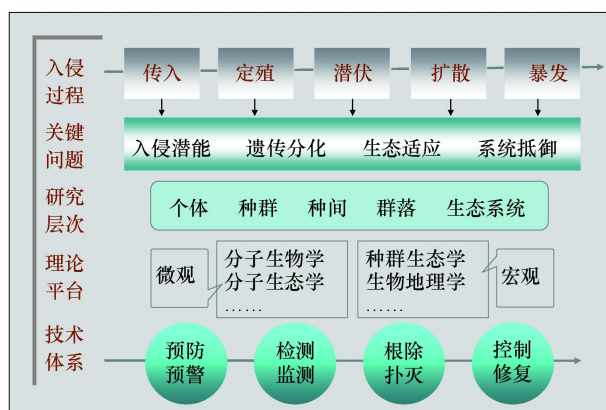


图1 入侵生物学学科体系框架

该学科框架体现了以下几个特点：①生物入侵是一个有序的过程，对处于不同环节中的入侵物种，其所关注的核心科学问题是不同的，研究对象的层次也不一样；②入侵生物学是综合了生物学、生态学、遗传学、信息学等众多学科的理论、技术与方法的交叉学科；③入侵生物学的研究不同于传统意义上的生物学研究，不能只从字面上讨论生物学问题。一是要着重于外来入侵物种的固有特性，二是要关注生态系统的响应与抵御，三是要发展对生物入侵的预防和入侵后果的管理技术。因此，我们认为，入侵生物学（invasion biology）是研究外来物种的入侵性与生态系统的可入侵性，以及外来入侵物种预防与控制的科学，是一门多领域交叉的学科。入侵生物学的范畴主要包括外来有害物种在入侵过程中的传入与种群构建、生存与适应、演变与进化、种间互作的生物内

在特性, 环境响应与系统抵御的外部特征以及外来入侵物种预防与控制的技术基础等。因此, 入侵生物学既着重于研究入侵物种传入至成灾的过程与机制, 又着重于入侵过程中防控技术体系的构建。

为了加速入侵生物学学科的形成与发展, 围绕上述入侵生物学学科构建和发展的思路, 我们组织编写了入侵生物学系列专著, 以期为我国生物入侵的研究和发展提供系统性的理论依据和技术基础支撑。本系列丛书包括《入侵生物学》、《生物入侵: 预警篇》、《生物入侵: 检测与监测篇》、《生物入侵: 生物防治篇》以及《生物入侵: 管理篇》等专著。

《入侵生物学》从个体、种群、群落与生态系统等不同层次, 以外来物种入侵的过程为主线, 围绕外来入侵物种的种群形成与扩张、生态适应性与进化以及生态系统响应与控制基础等科学问题, 着重阐述入侵生物种群的建立与扩散的生态学过程、入侵物种的抗逆生态学特征与表型可塑性、入侵物种与土著种(包括寄主)间的适应性互动与协同进化、入侵物种与媒介及生态位近似种等的协同入侵效应、入侵物种的化感作用与受体响应、入侵物种的迁移扩散模式与生物地理格局、生境空间格局与群落的可入侵性特征及抵御功能等重要理论。

《生物入侵: 预警篇》分为上、下篇。上篇围绕外来入侵物种风险评估与早期预警的科学问题, 主要论述外来入侵物种早期预警体系的构建、入侵物种的数据库与信息共享、入侵物种的适生性风险评估技术与方法、入侵物种的检测监测与口岸处理技术; 下篇着重论述不同入侵物种的适生性风险分析和相应控制预案的制定, 为控制与管理提供决策依据。

《生物入侵: 检测与监测篇》主要介绍外来入侵物种的检测与监测技术的发展趋势、不同生态系统中的跟踪监测体系、国际外来入侵物种的监测技术标准, 以及主要农林外来入侵物种检测与野外跟踪监测的技术与方法。

《生物入侵: 生物防治篇》分为上、下篇。上篇主要论述外来入侵物种传统生物防治的理论及最新技术成果, 详细介绍传统生物防治的原理、方法与技术; 下篇为应用篇, 对 19 种主要入侵杂草和昆虫所开展的生物防治实践成果进行总结, 包括: 生防作用物的筛选与引进、生物和生态学特性、寄主专一性与生态风险、大规模生产技术与工艺流程、应用技术与方法以及控制效能评价等。

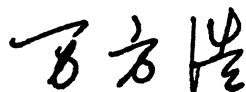
《生物入侵: 管理篇》系统地介绍了国际上入侵物种管理的国际公约、法律法规、紧急预案、发展战略和行动计划; 针对我国情况, 提出了国家需求与能力建设和优先行动计划方案; 系统总结了我国入侵昆虫、入侵植物和入侵植物病原的发生危害现状和研究成果, 提出了生物入侵预防与控制的发展战略和行动计划方案, 介绍了我国近年来在生物入侵管理方面的优先行动及其研究进展; 通过介绍国际农业恐怖生物, 分析我国生物入侵与农业生物恐怖的风险, 并提出风险管理对策。

上述系列专著既考虑了生物入侵的理论问题, 又考虑了预防、控制与管理生物入侵的技术与方法; 同时, 提供了大量的适生性风险评估、应急预案和生物防治的案例, 供生产上所采用或借鉴。

本系列丛书得到了“973”计划项目“农林危险生物入侵机理与控制基础研究”

(2002CB1111400)、 “十一五” 国家科技支撑计划项目“农林重大生物灾害防控技术研究”(2006BAD08A)、 国家科技基础条件平台工作面上项目“外来入侵生物风险预警及对生态经济影响评估”(2003DIB3J108)、 科技部基础性工作专项“中国外来入侵物种及其安全性考察”(2006FY111000)、 科研院所社会公益研究专项“外来危险入侵植物病害监测预警技术体系研究”(2004DIB3J096) 等项目的支持与资助。参与本系列丛书的编写人员是在上述项目实施过程中逐渐培养起来的一支年轻的科研队伍, 其中也有取得了令世人瞩目的科研成果的专家。因此, 本系列丛书不仅是科研队伍集体智慧与劳动的结晶, 而且表明了入侵生物学学科在我国的蓬勃发展。我相信这支科研队伍将会取得更突出的成绩, 为入侵生物学学科的发展和建设作出更大的贡献。

由于时间仓促, 疏漏以及不妥之处在所难免, 恳切读者和同行批评指正, 以期再版时修订和完善。



2008年2月于北京
2010年7月修改于北京

前言 (II)

我国生物入侵的研究在有关部门设立的科技项目的大力支持与推动下,无论是基础理论的研究还是应用技术的发展,近年来都取得了长足的进步与突飞猛进的发展。2000年以来的10年间,我国共发表以生物入侵为主题的主要科技论文2500多篇,是2000年以前20年间共发表170多篇论文的近15倍;与此同时,我国在国际刊物上共发表学术论文600余篇,在国际上排名处于前十位。这些数字一方面说明了我国在生物入侵的基础与应用各个方面都开展了较为深入与系统的研究,部分研究成果达到了国际前沿水平;另一方面体现了我国政府在入侵生物学这一新型学科发展方面给予的支持力度。

2009年科技部又在国家重点基础研究发展计划(“973”计划)中继续设立项目“重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础”(2009CB119200),进一步加强生物入侵的基础与应用研究。有关部门对生物入侵研究的连续投资,使得我国生物入侵的研究在基础理论方面取得了许多富有创造性的新成果,在应用技术方面得到了新的发展。通过这些科学研究项目的支持,我国构建了一批有强势的生物入侵研究平台与基地,造就与稳定了一支从事生物入侵研究的队伍。我国生物入侵研究所取得的成就和积极向上的发展态势,使得我国在国际生物入侵领域占有一席之地。特别是2009年,我国成功举办了“首届国际生物入侵大会”和“第五届国际烟粉虱大会”,这进一步提升了我国在该领域的国际地位与话语权。

本书是“‘十一五’国家重点图书出版规划:生物入侵”系列专著之一,基于“973”计划项目“重要外来物种入侵的生态影响机制与监控基础”(2009CB119200)、“十一五”国家科技支撑计划课题“入侵物种快速检测与监测技术”(2006BAD08A14)与科技部基础性工作专项“中国外来入侵物种及其安全性考察”(2006FY111000)等项目中的研究成果。这些研究成果是所有参与上述项目的科学家和年轻科技人员的集体智慧与劳动结晶。

在本书的组稿、审稿、改稿、核对、核查、校验等工作中,彭露、张海静、王本龙、马林媛、颜培等同学付出了辛勤的劳动,在此深表谢意。

由于系列专著在出版时间上的不同,在力求保持系列专著前言一致性的原则下,需要对原前言中的一些背景描述补充和修正。因此,特对本书的前言再补记于此。

王方浩

2010年7月于北京

目 录

序

前言 (I)

前言 (II)

第一章 入侵生物的检测与诊断：技术与方法	1
第一节 引言	1
第二节 检测技术及应用	2
第三节 检测技术的发展趋势	10
第四节 诊断的网络化	14
参考文献	17
第二章 主要进境植物及农产品的检疫对象及除害处理措施	21
第一节 中国大陆进境植物检疫的监管体系及截获有害生物概况	22
第二节 中国大陆主要进境植物及农产品的检疫对象与处理措施	30
参考文献	51
第三章 入侵生物的调查技术与方法	52
第一节 入侵节肢动物的调查技术与方法	53
第二节 入侵植物病原微生物的调查方法与技术	62
第三节 入侵植物的调查技术与方法	69
参考文献	75
附录 I 调查样本代码及编号方案	76
附录 II 野外调查数据在 PDA 上的录入与远程无线传输的使用说明	78
附录 III 野外考察数码照片的 GPS 坐标化方案	79
附录 IV 外来入侵物种调查系列表	80
第四章 入侵生物检测与监测技术的 EPPO 标准	103
第一节 国外检疫性有害生物检测与监测的技术标准	103
第二节 检疫性有害生物检测与监测技术标准内容	110
参考文献	112
第五章 小麦矮腥黑穗病的检测技术	115
第一节 引言	115
第二节 症状识别	116
第三节 病原及生物学特性	118
第四节 检测方法	120
第五节 生物测定	127
参考文献	128

附录	130
第六章 小麦印度腥黑穗病的检测技术	131
第一节 引言	132
第二节 症状识别	132
第三节 病原及生物学特性	133
第四节 检测方法	134
第五节 形态学鉴定	141
第六节 分子验证与比较	146
参考文献	151
第七章 大豆疫霉病的检测技术	154
第一节 引言	154
第二节 症状识别	155
第三节 病原及生物学特性	156
第四节 检测方法	157
参考文献	164
附录	165
第八章 苜蓿黄萎病的检测技术	167
第一节 引言	167
第二节 症状识别	168
第三节 病原及生物学特性	169
第四节 检测方法	170
参考文献	172
附录	173
第九章 大豆南方茎溃疡病的检测技术	174
第一节 引言	174
第二节 症状识别	175
第三节 病原及生物学特性	176
第四节 检测方法	177
参考文献	183
附录	184
第十章 梨火疫病的检测技术	186
第一节 引言	187
第二节 症状识别	187
第三节 病原及生物学特性	188
第四节 检测方法	188
参考文献	197
附录 I	198
附录 II	200

第十一章 亚洲梨火疫病的检测技术	202
第一节 引言	202
第二节 症状识别	203
第三节 病原及生物学特性	204
第四节 检测方法	205
参考文献	211
附录	212
第十二章 瓜类细菌性果斑病的检测技术	215
第一节 引言	215
第二节 症状识别	216
第三节 病原及生物学特性	217
第四节 检测方法	218
参考文献	222
附录 I	223
附录 II	224
第十三章 香蕉细菌性枯萎病的检测技术	226
第一节 引言	226
第二节 症状识别	227
第三节 病原及生物学特性	229
第四节 检测方法	230
参考文献	237
附录	238
第十四章 玉米细菌性枯萎病的检测技术	240
第一节 引言	240
第二节 症状识别	241
第三节 病原及生物学特性	242
第四节 检测方法	242
参考文献	246
第十五章 番茄细菌性溃疡病的检测技术	247
第一节 引言	247
第二节 症状识别	248
第三节 病原及生物学特性	249
第四节 检测方法	249
参考文献	255
附录	255
第十六章 马铃薯环腐病的检测技术	256
第一节 引言	257
第二节 症状识别	257

第三节 病原及生物学特性·····	258
第四节 检测方法·····	259
参考文献·····	267
附录·····	267
第十七章 木质部难养菌病害的检测技术·····	269
第一节 引言·····	270
第二节 症状识别·····	270
第三节 病原及生物学特性·····	272
第四节 检测方法·····	272
参考文献·····	277
附录·····	278
第十八章 柑橘溃疡病的检测技术·····	280
第一节 引言·····	281
第二节 症状识别·····	281
第三节 病原及生物学特性·····	282
第四节 检测方法·····	282
参考文献·····	287
附录·····	288
第十九章 黄瓜绿斑驳花叶病毒的检测技术·····	289
第一节 引言·····	289
第二节 症状识别·····	290
第三节 病原及生物学特性·····	291
第四节 检测方法·····	292
参考文献·····	300
第二十章 烟草环斑病毒的检测技术·····	301
第一节 引言·····	301
第二节 症状识别·····	302
第三节 病原及生物学特性·····	303
第四节 检测方法·····	303
参考文献·····	309
第二十一章 番茄环斑病毒的检测技术·····	310
第一节 引言·····	310
第二节 症状识别·····	311
第三节 病原及生物学特性·····	311
第四节 检测方法·····	312
参考文献·····	317
第二十二章 李痘病毒的检测技术·····	318
第一节 引言·····	318

第二节	症状识别·····	320
第三节	病原及生物学特性·····	321
第四节	检测方法·····	323
第五节	总结·····	328
参考文献	·····	329
第二十三章	苹果锈果类病毒的检测技术 ·····	331
第一节	引言·····	332
第二节	症状识别·····	333
第三节	病原及生物学特性·····	335
第四节	检测方法·····	336
第五节	总结·····	345
参考文献	·····	346
附录	·····	348
第二十四章	啤酒花矮化类病毒的检测技术 ·····	350
第一节	引言·····	351
第二节	症状识别·····	352
第三节	病原及生物学特性·····	353
第四节	检测方法·····	355
第五节	总结·····	360
参考文献	·····	360
第二十五章	葡萄黄痘类病毒的检测技术 ·····	364
第一节	引言·····	364
第二节	症状识别·····	365
第三节	病原及生物学特性·····	367
第四节	检测方法·····	370
第五节	总结·····	374
参考文献	·····	375
第二十六章	松材线虫的检测与监测技术 ·····	377
第一节	引言·····	377
第二节	症状识别·····	378
第三节	病原及生物学特性·····	379
第四节	检测方法·····	382
第五节	监测方法·····	388
参考文献	·····	394
第二十七章	香蕉穿孔线虫的检测技术 ·····	396
第一节	引言·····	396
第二节	症状识别·····	397
第三节	病原及生物学特性·····	398

第四节	检测方法	398
参考文献		402
第二十八章	马铃薯腐烂茎线虫的检测技术	405
第一节	引言	405
第二节	症状识别	406
第三节	病原及生物学特性	407
第四节	检测方法	408
参考文献		411
第二十九章	马铃薯金线虫和马铃薯白线虫的检测技术	413
第一节	引言	414
第二节	症状识别	414
第三节	病原及生物学特性	415
第四节	检测方法	417
参考文献		427
第三十章	奇特伍德和法拉克斯根结线虫的检测技术	429
第一节	引言	430
第二节	症状识别	430
第三节	病原及生物学特性	431
第四节	检测方法	434
参考文献		437
第三十一章	红棕象甲的监测技术与方法	439
第一节	幼虫危害症状及取食声音的监测	441
第二节	性信息素诱捕	442
第三节	食物诱饵	443
第四节	黑光灯诱捕	444
参考文献		444
第三十二章	红火蚁的监测技术与方法	446
第一节	中国红火蚁发生概况	447
第二节	红火蚁在中国大陆适生区域预测	450
第三节	中国大陆红火蚁入侵和传播扩散规律	451
第四节	红火蚁的监测技术与方法	453
参考文献		463
第三十三章	稻水象甲的监测技术与方法	465
第一节	稻水象甲的危害现状	465
第二节	稻水象甲的鉴别监测方法	466
第三节	稻水象甲监测技术的研究展望	470
参考文献		470

第三十四章 烟粉虱的检测监测技术与方法	471
第一节 烟粉虱的危害现状及其监测存在的问题	471
第二节 烟粉虱与近似种的鉴别技术与方法	472
第三节 烟粉虱不同生物型的检测技术与方法	474
第四节 烟粉虱监测技术的研究展望	477
参考文献	478
第三十五章 红脂大小蠹的监测技术与方法	481
第一节 红脂大小蠹的危害现状	482
第二节 红脂大小蠹的鉴别方法	484
第三节 红脂大小蠹的监测技术与方法	487
参考文献	490
第三十六章 苹果蠹蛾的检测监测技术与方法	492
第一节 苹果蠹蛾检测的形态识别及鉴定方法	494
第二节 苹果蠹蛾的快速分子检测方法——PCR 方法	497
第三节 苹果蠹蛾的监测与检测的抽样和调查方法	500
第四节 苹果蠹蛾的监测技术和方法	502
第五节 苹果蠹蛾发生动态监测的抽样调查的技术和方法	504
参考文献	505
第三十七章 西花蓟马的检测监测技术与方法	507
第一节 西花蓟马的危害现状及其监测存在的问题	507
第二节 西花蓟马形态学鉴别技术与方法	509
第三节 西花蓟马的快速检测技术与方法	511
第四节 西花蓟马野外调查技术	514
参考文献	516
第三十八章 主要实蝇类害虫的检测监测技术与方法	518
第一节 橘小实蝇的监测技术与方法	518
第二节 瓜实蝇的监测技术与方法	522
第三节 番石榴实蝇的系统监测调查及检测技术与方法	526
参考文献	532
第三十九章 螺旋粉虱的检测监测技术与方法	536
第一节 螺旋粉虱的形态鉴别	537
第二节 螺旋粉虱的田间危害监测	538
第三节 螺旋粉虱的监测方法	539
第四节 螺旋粉虱的分子检测技术	541
参考文献	543
第四十章 扶桑绵粉蚧的监测技术与方法	545
第一节 扶桑绵粉蚧的出入境检疫要求	546
第二节 扶桑绵粉蚧的危害与形态识别	547

第三节	扶桑绵粉蚧的监测方法·····	550
参考文献	·····	552
第四十一章	新菠萝灰粉蚧的监测技术与方法 ·····	553
第一节	新菠萝灰粉蚧的形态鉴别·····	554
第二节	新菠萝灰粉蚧的田间危害监测·····	557
第三节	新菠萝灰粉蚧的监测方法·····	559
参考文献	·····	561
第四十二章	刺桐姬小蜂的监测技术与方法 ·····	562
第一节	刺桐姬小蜂的危害现状及分布·····	562
第二节	刺桐姬小蜂的形态特征·····	564
第三节	刺桐姬小蜂的监测方法·····	565
参考文献	·····	567
第四十三章	桉树枝瘿姬小蜂的检测监测技术与方法 ·····	568
第一节	桉树枝瘿姬小蜂的发生危害现状·····	569
第二节	桉树枝瘿姬小蜂的形态特征·····	570
第三节	桉树枝瘿姬小蜂的监测技术与方法·····	572
参考文献	·····	572
附录	中文-拉丁文对照 ·····	574

第一章 入侵生物的检测与诊断：技术与方法

第一节 引言	1
第二节 检测技术及应用	2
第三节 检测技术的发展趋势	10
第四节 诊断的网络化	14
参考文献	17

摘要 本章基于已发展的入侵生物的检测技术，系统地介绍了免疫学的检测方法，如酶联免疫吸附测定技术、免疫胶体金快速诊断技术、免疫荧光检测技术等；重点地介绍了以DNA为基础的快速检测技术，如分子标记技术（RFLP、RAPD、AFLP、SCAR、SSR、ISSR等）以及基于PCR的检测技术（巢式PCR、多重PCR、PCR-ELISA、实时荧光PCR等）；分析了各种检测技术应用的局限性，提出了生物芯片、DNA条形码、电子鼻等技术发展与应用的趋势；论述了入侵生物全球网络化诊断技术的发展与合作前景。

关键词 检测技术；入侵生物；全球网络化诊断

Chapter 1 Detection and Diagnosis for Invasive Alien Species : Technology and Method

Abstract In this chapter, the immunodiagnostic methods of IAS (invasive alien species) are introduced, including methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunosorbent gold staining (IGS) and immunofluorescence techniques. Methods for DNA-based rapid detection approaches are summarized, including genomic techniques (RFLP, RAPD, AFLP, SCAR, SSR, ISSR etc.) and PCR-based approaches (nested PCR, multiplex PCR, PCR-ELISA, real-time fluorescent PCR, and others). The limitations of different detection techniques, prospects of development and applications of biochips, DNA-barcoding, electronic noses, and future development and collaboration of worldwide diagnostic networks of IAS are presented in this review.

Key words detection technologies; IAS; international diagnostic networks

第一节 引言

国际贸易的全球化、气候变化、人员流动的增加、病原菌和载体的进化等因素增

加了农业、林业、草原、实地、淡水与海洋等生态系统中外来入侵生物的扩散与传播。发展快速检测、诊断与监测技术对于阻止和预防入侵生物的扩散与暴发是十分必要的。

在我国，导致农业损失的主要植物病害病原物有 500 余种。我国先后 6 次将这些高风险的病原物分成了不同等级，并对《对外植物检疫名单》进行了调整和修订。第一次，1954 年对外贸易部制定了第一个《输出输入植物检疫对象名单》，共有农业病虫害 30 种。第二次，1966 年农业部修改了植物检疫对象名单，删去了稻矮化病毒、亚麻斑点病、梨园介壳虫等 10 种病虫害，增加了小麦矮腥黑穗病、烟草霜霉病等 14 种病虫害，病虫害对外检疫对象增至 34 种。第三次，1980 年，从原名单中删去棉红虫等 7 种害虫，恢复了玉米细菌性枯萎病和美国白蛾 2 种病虫的检疫地位，又增加了大豆象、橡胶南美叶疫病等 33 种病虫害，病虫害对外检疫对象增至 58 种。第四次，1986 年，对 1980 年的名单又进行了较大的调整和修订，删去了棉枯萎病、橘小实蝇、油橄榄癌肿病等 21 种病虫，在 1980 年新增加的 33 种病虫害种，该次被删掉的就有 16 种。第五次，1992 年根据新颁布的《中华人民共和国进出境动植物检疫法》的规定，农业部对 1986 年的名单又进行了修订，发布了《中华人民共和国进境植物检疫危险性病、虫、杂草名录》，包括 84 种有害生物。第六次，2007 年 5 月，《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》。涵盖有害生物有 435 种。其中，昆虫和软体动物 152 种；真菌 125 种；细菌和植原体 58 种；线虫 20 种；病毒及类病毒 39 种；杂草 41 种。

最近修订的名单大幅度地增加了对外检疫的种类，这对发展快速、有效、精准的检测技术和野外跟踪监测技术提出了更高的要求，特别是对入侵的植物病害病原物的检测与监测。现代快速检测与监测技术融入了生物化学、分子生物学、生物芯片等新的技术与方法，本章就入侵生物的检测与诊断技术进行了简要介绍。

第二节 检测技术及应用

一、免疫学检测方法

免疫学方法以血清学反应为基础，即以抗体与其抗原的专一性识别与结合为基础。抗原主要是能诱导产生抗体的一类物质，如病毒、细菌、真菌等病原物。抗体是指由抗原注射到动物体内诱导产生的、并能与抗原在体外进行特异性反应的一类物质，主要是免疫球蛋白。含有抗体的血清称为抗血清。抗原能与由其诱导产生的抗体发生凝集、沉淀等反应，将病原物作为特异性强的抗原与相应的抗体反应就可实现对病原物的检测和鉴定。

利用放射性、荧光或酶等物质标记抗原或抗体，再利用抗原抗体反应的特异性，使得灵敏度大大提高，同时检测的方法和类型也趋于多样化，主要有酶联免疫吸附测定分析、免疫胶体金分析、放射性标记免疫分析、荧光标记免疫分析、发光免疫分析等快速诊断技术。

1. 酶联免疫吸附测定技术

Voller 和 Clark 等早在 20 世纪 70 年代中期就将酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 应用于植物病毒的检测, 现已形成多种测试方法。常用的方法有 6 种: 直接细胞法、间接细胞法、双抗体夹心法、直接竞争法、酶抗酶法、抗体夹心法, 其应用范围各不相同。ELISA 与传统的血清学技术相比具有明显的优越性, 灵敏度高、特异性强、安全、快速及结果容易观察等优点。此后, 人们对 ELISA 技术在检测速度、精确性以及仪器装备等方面进行了改进, 使之更加趋于完善。除此之外, 其他一些以抗体为基础的检测技术如放射免疫检测、免疫荧光技术、免疫金电镜技术等也可用于植物病害的诊断。

ELISA 形式多种多样, 仅双抗三明治 (double-antibody sandwich, DAS) ELISA 就存在各种形式, 根据不同的需要每种形式又各具特色。在典型的 DAS-ELISA 中, 将特殊的抗体结合固定在固体表面如微孔板上, 加入样品, 未被结合的成分被洗掉, 然后, 通过加入结合有酶 (辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶) 的抗体来检测抗原, 未被结合的成分再次被洗掉。在线性的剂量-反应曲线范围内, 酶和底物反应的颜色与样品中抗原的含量成正比, 颜色深浅可通过自动仪器进行测定, 因此, 这种方法可用于定量检测。

在 DAS-ELISA 的基础上发展起来的间接 ELISA, 应用了一种特殊的非结合酶的检测抗体, 通过另一种能与动物的 Fc (可结晶片段, crystalline fragment) 结合的酶标抗体进行检测, 检测步骤少, 操作方法简便, 并且可供反应的范围很广。利用来自不同动物的抗体如三抗三明治 (triple-antibody sandwich) ELISA 或 F(ab')₂ 片段用于检测植物中的抗原, 是对 DAS-ELISA 方法的又一改进。另外, 抗生物素蛋白-生物素-酶复合物系统的应用, 可减少反应步骤, 并提高检测的灵敏度。

目前各种 ELISA 技术已广泛应用于植物病害的检测及诊断, 特别是在植物病毒及细菌病害的检测中发挥着重要作用, 免疫学检测技术在病原真菌的检测方面发展较快, 已经在疫霉属 *Phytophthora*、腐霉属 *Pythium*、丝核菌属 *Rhizoctonia*、镰刀菌属 *Fusarium* 等许多植物病原真菌检测中得以应用。更多血清学反应试剂盒商品的出现使得快速检测植物病害变得非常简便。

2. 免疫胶体金快速诊断技术

20 世纪 70 年代免疫胶体金标记技术正式诞生。随后免疫胶体金又与固相膜结合发展成为以膜为固相载体的免疫胶体金快速诊断技术, 由于其快速、简便、灵敏、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等优点, 迅速在生物医学领域得到广泛应用, 尤其是临床医学检验方面。免疫胶体金快速诊断技术是当前最快速、最灵敏的免疫检测技术之一 (Kim *et al.*, 2007)。该技术应用于植物病害检测与诊断方面起步较晚, 但发展潜力巨大。

目前应用的形式主要有两种, 一种是侧向横流形式, 又称免疫层析试验 (ICA); 另一种是穿流形式, 又称为免疫渗滤试验 (IFA), 在国内通常简称为滴金免疫渗滤试

验 (DI-FA) (王艺凯等, 2008)。

胶体金免疫渗滤分析 (GIFA) 的原理与操作方法基本与 ELISA 相同, 胶体金免疫层析分析 (GICA) 的原理与 GIFA 相同, 区别在于 GIFA 只是单一的免疫层析条, 不需其他试剂, 只需一步操作即可观察试验结果。检测现场用的一步法免疫胶体金快速诊断技术试剂盒可在田间地头或检查现场直接应用, 无需借助分光光度计判定结果, 一般凭肉眼就可判定, 简便快速, 实用性强。

3. 免疫荧光检测技术

荧光免疫检测法 (immunofluorescence, IF) 利用与荧光染色结合的化学抗体确认或定量组织样品中的抗原的技术, 在欧洲已经得到广泛的应用。在荷兰每年利用 IF 技术对大约 6 万份马铃薯块茎进行青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 的筛选。IF 技术在法国也被用于检测马铃薯环腐病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) 和番茄种子中的细菌性溃疡病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) 的筛查。

疫霉属 (*Phytophthora*) 真菌的游动孢子可以朝着寄主的方向游动, 根据这一特性开发出像信息素类的物质作为诱饵, 它们被寄主根所释放的化学物质所吸引, 根据该原理设计出了 *P. cinnamomi* 和 *P. nicotianae* 病菌的专一性免疫学检测方法, 在土壤中就可检测到这些真菌。

4. 侧流检测法

侧流法 (lateral flow device) 的应用原理是 ELISA 的初期形式, 但以不同类型的滤纸作为黏合反应的固相支持物 (Danks and Barker, 2008)。英国中央科学实验室已开发出侧流方法检验试剂盒, 可在 3min 内一步检测青枯菌, 用于检测 *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* 和梨火疫病病菌 (*Erwinia amylovora*) 的试剂盒也已研制成功。

5. 流式细胞术

流式细胞术 (flow cytometry) 是一项使细胞及微小粒子通过液态传感器的快速定量检测方法, 通过结合到专一性抗体上的荧光染料的多少检测细胞, 还可以对多种细胞进行平行检测。这项技术已被用于检测番茄种子提取液中番茄溃疡病菌、芸薹属植物种子中的甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 及马铃薯青枯菌的检测。

二、以 DNA 为基础的检测技术

PCR (polymerase chain reaction) 技术即聚合酶链反应技术, 是一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法。该技术自从 Mullis 等 (1986) 创立以来, PCR 方法已成为分子生物学及其相关领域的经典试验方法。该方法灵敏、准确、方便、快速, 可在短时间内扩增出数百万个特异 DNA 序列的拷贝。PCR 技术在入侵生物快速检测与监测中的应用前景十分广阔。

(一) 分子标记技术

对入侵生物进行快速检测与监测首先需要寻找入侵生物在 DNA 水平上的特异性基因或差异片段，目前采用的方法主要有 RFLP、RAPD、ITS、AFLP、SCAR、SSR 及 ISSR 技术，下文对上述技术分别进行了介绍与比较。

1. RFLP 分析

限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 于 1974 年由 Grodzicker 等创立，也是出现最早、现在依然普遍使用的 DNA 标记技术。RFLP 是指一个物种的 DNA 被某种特定的限制性内切核酸酶消化所产生的 DNA 片段长度的变异性，这种变异的产生或是由于单个碱基的突变所导致的限制性位点的增加或消失，或是由于 DNA 序列插入、缺失、倒位、易位等变化所引起的结构重排所致。RFLP 分子标记最大的特点是稳定性好。

2. RAPD 分析

随机扩增片段长度多态性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 于 1990 年由 William 等发明，其原理是利用随机序列核苷酸的引物对基因组的 DNA 进行 PCR 扩增。与 RFLP 相比，RAPD 标记有几个特点：广泛性，合成一套引物可以用于不同生物基因组的分析，而 RFLP 标记具有种族特异性，不能被广泛使用；简便性，减少多态性分析的准备工作，如克隆、同位素标记、Southern 印迹、分子杂交；安全性，不使用同位素；无需预先知道基因组 DNA 的序列。

3. ITS 分析

内源转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 首先由 Gonzalez 在 1990 年提出，随后逐步发展成为全新的分子标记。ITS 是核糖体 RNA 基因间的非编码区。其优点在于：具有高拷贝数；同时包含保守与变异序列；能根据保守序列中的变异设定通用引物进行扩增比较。尽管真菌 rRNA 基因是保守的，但其间有足够的变异位点用于鉴别性的扩增，而且其多拷贝性使鉴别性的扩增变得更加灵敏。

利用 ITS 的差异进行 PCR 扩增对病害的诊断有着传统方法无法比拟的优点：可以免去分离物的体外培养；灵敏度高；检测速度快；引物具有通用性。在理论上，任何一个具有 rDNA 重复片段的生物体甚至是一个菌系或者分离物都可以通过利用基因间隔区 (ITS 等) 的变异设计特异性引物 PCR 扩增发现其差别。

4. AFLP 分子标记

扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 是荷兰 Keygene 公司 Zabeau Marc 和 Vos Pieter 于 1993 年创建的一种分子标记技术。该技术不仅具备其他分子标记的特点，还在一定程度上克服了其他分子标记的缺陷，因而一诞生便迅速被应用于动植物遗传分析的各个领域。

AFLP 的基本原理是利用 PCR 技术选择性扩增基因组 DNA 双酶切的限制性片段。基因组 DNA 经限制性内切核酸酶消化后，将一双链 DNA 接头 (adapter) 连接于限制性片段的两端。然后根据接头序列和限制位点邻近区域的碱基序列，设计一系列 3' 端含数个随机变化的选择性碱基的 PCR 引物进行特异性条带扩增，只有那些限制位点的侧翼序列与引物 3' 端选择碱基相匹配的限制片段才得以扩增。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离显示其多态性，当不同基因组 DNA 中突变引起限制位点的数量发生改变或两个限制位点之间的区域内发生碱基插入、片段消失或顺序重排时，谱带显示多态性。

AFLP 技术的优越性：AFLP 技术不仅具备其他分子标记技术所具有的优点，即位点数量无限，呈典型孟德尔方式遗传，无表型、复等位效应，不受环境影响等，此外，还表现出独特的优越特性：标记异常丰富，典型的 AFLP 反应中，利用聚丙烯酰胺凝胶一次可检测到多达 100~150 个扩增产物，而其他标记技术难以比拟；稳定性、重复性好；应用范围非常广泛，可用于任何生物体基因组的遗传分析；与 PCR 技术相结合，能在较短的时间内检测到大量的多态性标记，同时，反应对模板浓度不灵敏，模板需求量也很少。

5. SCAR 标记

Sequence characterized amplified region (SCAR) 标记是由 Paran 和 Michelmore 在 1993 年首先使用的，即是在对多态性 RAPD 产物测序的基础上，设计一对新的引物，特异扩增在遗传上的一个位点。由于 SCAR 标记使用的引物长，退火温度高，因而稳定性好，能将显性 RAPD 标记转化为共显性的 SCAR 标记。随着 SCAR 标记的拓展，SCAR 标记的转化不仅局限于 RAPD 标记，凡 PCR 标记均可转化为 SCAR 标记。

6. SSR 标记

在人类及动物基因组中存在着由 1~4 个碱基对组成的简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)，在不同物种中，这种简单重复序列次数不同，并且在 SSR 两端有一段保守 DNA 序列，通过该序列可以设计一对互补的寡聚核苷酸引物，对 SSR 进行扩增。由于 SSR 重复次数不同从而导致扩增产物长度上产生多态性。扩增产物通过高浓度的琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

7. ISSR 标记

Inter-simple sequence repeat (ISSR) 是一种新型的分子标记，用于 ISSR-PCR 扩增的引物一般为 16~18 个碱基，由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成，从而保证了引物与 SSR 的 5' 端和 3' 端的结合，经 PCR 反应扩增 SSR 之间的 DNA 片段。与 SSR-PCR 相比，用于 ISSR-PCR 引物不必事先对 DNA 进行序列测定，因此有的引物经扩增无产物。ISSR 通常为显性标记，呈孟德尔遗传，有很好的稳定性和多态性，因此，它是一种理想的分子标记，具有很大的应用潜力。

几种分子标记方法的比较见表 1-1。