

玉米叶蝉缨翅小蜂 *Anagrus dmitrievi* (膜翅目, 缨小蜂科) DNA 条形码研究*

努日耶·木合太尔^{1,2**} 陈光辉^{1,2,3} 彭杰^{1,2} 高滨^{1,2}
张晓东^{1,2} 席欧彦^{1,2} 朱丽得孜·艾山^{1,2} 胡红英^{1,2***}

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046; 3. 喀什海关技术中心, 喀什 844000)

摘要 【目的】玉米叶蝉缨翅小蜂 *Anagrus dmitrievi* Triapitsyn & Hu 是玉米三点斑叶蝉 *Zyginidia eremita* Zachvatkin 卵期的重要寄生性天敌, 在玉米三点斑叶蝉生物防治中具有广阔的应用前景。由于该寄生蜂个体微小, 通过传统昆虫分类方法难以将其与同类卵寄生蜂准确分类。因此, 本研究旨在为玉米叶蝉缨翅小蜂的快速准确鉴定提供技术支持。【方法】在室内, 采集玉米三点斑叶蝉卵饲养玉米叶蝉缨翅小蜂至成虫。根据玉米叶蝉缨翅小蜂成虫的体色、触角、翅等形态特征对标本进行鉴定, 并利用无损伤法提取样本基因组 DNA, 通过 PCR 扩增和测序对 *CO I* 和 *ITS2* 基因进行 DNA 条形码分子标记试验。

【结果】形态学鉴定结果表明饲养获得的寄生蜂标本为玉米叶蝉缨翅小蜂。获得了该寄生蜂 *CO I* 和 *ITS2* 的部分序列, 相似比对、遗传距离和分子进化树结果表明, 玉米叶蝉缨翅小蜂 *CO I* 和 *ITS2* 序列分别与 NCBI 数据库中的同属其他种的相关基因有较高相似性, 但存在一定遗传差异, 可明显区分。

【结论】获得的玉米叶蝉缨翅小蜂的 *CO I* 和 *ITS2* 基因序列可作为玉米叶蝉缨翅小蜂的 DNA 条形码, 为后续该寄生蜂的快速准确鉴定提供了分子数据。

关键词 玉米叶蝉缨翅小蜂; 无损伤提取 DNA 法; DNA 条形码; *CO I* 基因; *ITS2* 基因

DNA barcoding of *Anagrus dmitrievi* (Hymenoptera, Mymaridae)

Nuriye·Muhetaier^{1,2**} CHEN Guang-Hui^{1,2,3} PENG Jie^{1,2} GAO Bin^{1,2}
ZHANG Xiao-Dong^{1,2} XI Ou-Yan^{1,2} Julidezi·Aishan^{1,2} HU Hong-Ying^{1,2***}

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046, China; 3. Kashi Customs Technology Center, Kashi 844000, China)

Abstract 【Objectives】To provide a convenient and efficient way of identifying *Anagrus dmitrievi* Triapitsyn & Hu, a small parasitic wasp with potential as a biological control for the corn pest *Zyginidia eremita* Zachvatkin (Hemiptera, Cicadellidae, Typhlocybae), that is difficult to identify on the basis of morphological features. 【Methods】Eggs of *Z. eremita* were collected and hatched in a laboratory to obtain adult *A. dmitrievi* which were then identified according to morphological characters such as body color, antennae and wings. Genomic DNA was extracted from the adult wasps using a non-damaging DNA extraction method, and DNA barcoding tests performed on the *CO I* and *ITS2* genes after PCR amplification and sequencing. 【Results】Multiple sequence alignments, genetic distance and phylogenetic analyses indicate that although *A. dmitrievi* *CO I* and *ITS2* are highly homologous to those of other *Anagrus* species listed in the NCBI databases, there are some clearly distinguishable differences. 【Conclusion】*CO I* and *ITS2* gene sequences were obtained from male and female *A. dmitrievi* are sufficiently distinctive to provide a foundation for the development of a molecular rapid identification system for this small, parasitic wasp.

Key words *Anagrus dmitrievi*; non-damage DNA extraction; DNA barcoding; *CO I* genes; *ITS2* genes

*资助项目 Supported projects: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2011211A004); 国家自然科学基金项目 (31360523)

**第一作者 First author, E-mail: 849262649@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hooHYI-69@163.com

收稿日期 Received: 2020-05-21; 接受日期 Accepted: 2020-07-15

玉米三点斑叶蝉 *Zyginidia eremita* (Zachvatkin) 隶属于半翅目 Hemiptera 叶蝉科 Cicadellidae。该虫是新疆近几年发生严重的一种玉米害虫,主要为害玉米 *Zea mays* Linn, 其次为害小麦 *Triticum aestivum* L.、水稻 *Oryza sativa* L.、果园、农田内外的早熟禾 *Poa annua* L.、狗尾草 *Setaria viridis* (L.) Beauv.等(于江南等, 1995)。由于该害虫具有活动扩散能力强、成虫寿命长和产卵期长等特点, 且其寄主植物玉米植株高大、遮蔽性强, 因此对其防治较为困难(曲丽红等, 2000; 张继俊等, 2013)。

缨小蜂科 Mymaridae 为叶蝉类害虫的主要寄生蜂, 隶属于膜翅目小蜂总科 Chalcidoidea(曹文秋等, 2017)。国内外很多学者对该科寄生蜂的寄生物学和生物防治进行了研究, 如 Oliveira 和 Lopes(2000)研究鉴定出 *Anagrus breviphragma* Soyka 和 *Oligosita* sp. 2 种寄生蜂对巴西玉米田中的玉米大叶蝉 *Dalbulus maidis* (DeLong 和 Wolcott) 的寄生率较高, 是重要害虫天敌。Virla 等(2013)研究阿根廷玉米叶蝉 *Dalbulus maidis* 时发现, 卵寄生蜂短骨缨小蜂 *Anagrus breviphragma* Soyka、*Anagrus flaveolus* Waterhouse、多线缨小蜂 *Polynema* sp.、赤眼蜂科的 *Pseudoligosita longifragiata* (Viggiani)对玉米叶蝉都有较高的寄生率。伊龙等(2013)调查东疆玉米地自然寄生蜂资源小蜂包括缨小蜂科、赤眼蜂科、姬小蜂科等共计 10 科, 为保护利用自然天敌防治玉米叶蝉类害虫提供了基础数据。

玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *Anagrus dmitrievi* 隶属于缨小蜂科缨翅缨小蜂属 *Anagrus* Haliday。该卵寄生蜂个体微小, 是玉米三点斑叶蝉卵期的重要寄生性天敌(Li et al., 2018), 在玉米三点斑叶蝉生物防治中具有广阔的应用前景。但是, 由于该种寄生蜂体型微小, 传统形态分类方法难以与其同属的其他种类进行快速区分。因此, 需要一种便捷、准确的玉米叶蝉缨翅缨小蜂的鉴定技术。

DNA 条形码(DNA Barcoding)技术由分类学家 Paul Hebert 在 21 世纪初首次提出(Hebert et al., 2003a, 2003b), 以 DNA 序列为对象, 具有准确度高、简便快速等优点, 已被广泛应用于

各物种的分类学鉴定, 能够弥补形态学鉴定的一些不足(肖金花等, 2004; 韦健红等, 2010; 陈光辉等, 2016, 2018; 席欧彦等, 2016)。相比于传统的形态学鉴定, DNA 条形码技术不受物种发育阶段、性别及个体完整性、鉴定者形态经验的影响; 同时具有操作便捷、易于标准化、通用性和准确性高等优点, 可以一次性快速鉴定大量样本(杨倩倩等, 2018)。该技术以特定的基因片段(兼具保守性和变异性)核酸信息为依据, 例如 *ITS1*、*ITS2*、*CO I* 等基因。Hebert 等(2003b)对动物界 11 门 13 320 种的 *CO I* 基因序列进行比较, 发现超过 98% 的物种间的遗传距离大于 2%, 而种内遗传距离多小于 1%, 很少超过 2%, 能够广泛用于动物分类。现有的研究数据表明绝大多数物种的 *CO I* 序列表现出相对较低的种内遗传差异及相对较高的种间遗传差异(Folmer et al., 1994; Hajibabaei et al., 2006)。研究表明 *ITS1*、*ITS2*、*CO I* 等基因均适物种及其种群的研究(黄华平等, 2006)。昆虫种类繁多, 近似物种鉴定困难, DNA 条形码技术在昆虫分类中已得到广泛应用, 截至 2018 年 5 月, BOLD 数据库已经有超过 400 万涉及昆虫的条形码记录, 超过整个动物界的 70% 以上, 包括了 183 513 个具体物种, 其中已公开的有 137 048 种。在传统分类学发展的基础上, 系统分类学和生物技术的有机结合势必带动生命科学的多元化发展, DNA 条形码技术快速准确的鉴定物种将成为昆虫分类学研究的重要方向(魏明峰和张振旺, 2019)。

本研究结合玉米叶蝉缨翅缨的形态学特征, 通过无损伤 DNA 提取法提取基因组 DNA, 利用 PCR 扩增和测序获得该小蜂 *ITS2* 和 *CO I* 基因的 DNA 序列, 为玉米叶蝉缨翅缨小蜂的分类鉴定提供分子数据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

体视显微镜(SMZ745)、双目体式镜(江南 SE2200)、Motic 解剖镜、梯度 PCR 仪(美国 ABI 赛

默飞世尔 VeritiFast)、高速低温离心机(BECKMAN COULTER TM Allegra TM X-22R Centrifuge)、电泳仪(北京六一 DYY-7C)、水平电泳槽(北京六一 DYCP-31C)、凝胶成像仪(Bio-Rad Molecular Imager Gel Doc XR+凝胶成像系统)、振荡器(IKA MS3 digital)、恒温水浴锅等。

1.2 供试虫源

样本采集时间: 2019 年 7 月; 采集地: 新疆农业科学院综合试验场玉米地; 采集类型: 疑似被寄生的玉米三点斑叶蝉卵。样本置于玻璃试管中带回实验室, 将玻璃管口用透气纱布封口, 并放在人工气候箱中培养, 人工气候箱设置: 温度(25±1)℃, 光照 14 L : 10 D, 湿度 35%±3%。每天检查寄生蜂的羽化情况。羽化的寄生蜂保存于含无水乙醇的离心管中, 并放置于冰箱 - 20℃保存。以此获得本研究所需标本玉米叶蝉缨翅小蜂。

1.3 玻片标本的制作及观察

1) 清洗: 将无损伤提取 DNA 后的标本用无水乙醇清洗 3 遍, 每次 5-10 min。2) 解离: 10% 氢氧化钾, 50℃加热条件下进行。3) 清洗: 用无水乙醇清洗 5 遍。4) 脱水: 清洗好的标本移入木馏油中 20 min。5) 整姿和制片: 脱水后标本放到丁香油中, 在体式显微镜下将标本从丁香油中取出, 放在载玻片上, 再滴一滴中性树胶, 经整姿后即可封片。将标本一侧的触角, 翅, 足解剖下来, 按顺序放好。6) 封片: 45℃烘干 3-4 d, 用加拿大树胶封片。7) 标本观察测量及拍照: 本研究中制作的玻片标本均在 Nikon SMZ25 生物显微镜下观察并拍照测量。

1.4 基因组 DNA 提取和基因片段 PCR 扩增、回收及测序

1.4.1 基因组 DNA 的提取 DNA 无损伤提取方法参照王琦等(2015)。1) 将待测昆虫标本整体浸入无水乙醇中, 并置于 - 20℃的冰箱中保存至少 2 h。2) 制备 50 μL 体系的缓冲液: 10×PCR Buffer 5 μL、0.45% NP-40 0.25 μL、0.45% Tween-20 0.25 μL、0.6 mg/mL Protein K 1.5 μL、ddH₂O 43 μL。3) 在光学显微镜下, 挑取完整样本个体, 用 ddH₂O 清洗后, 转移至新的离心管中, 加入已经配制好的 50 μL 反应体系。4) 将离心管放入 50℃恒温水浴锅中, 孵育 1 h。5) - 20℃冷抽提, 静置近 17 h。6) 95℃水浴, 热激 10 min。7) 将提取完成的 DNA 模板放置在 - 20℃的冰箱中待用。

1.4.2 基因片段 PCR 扩增、回收及测序 片段扩增引物由 BGI 华大基因公司合成, 具体引物序列及参考文献如表 1 所示。扩增体系总体积为 20 μL, 包括 2×PCR Master Mix 10 μL、上下游引物各 0.5 μL (10 μmol·L⁻¹)、DNA 模板 5 μL、ddH₂O 补足至 20 μL。*CO I* 基因的反应程序为: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 50 s, 58-50℃(每 5 个循环降 2℃)退火 50 s, 72℃延伸 50 s, 之后 94℃变性 50 s, 50℃退火 50 s、72℃延伸 50 s, 循环 15 次, 循环结束后 72℃延伸 10 min。*ITS2* 基因的反应程序: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 50 s、59℃退 50 s、72℃延伸 50 s, 循环 35 次, 循环结束后 72℃延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖 (Spanish) 凝胶电泳检测。在电泳中检测到目标片段后采用 PCR 产物纯化试剂盒 Cycle-Pure Kit (100) (Omega

表 1 PCR 扩增引物设计及其参考文献
Table 1 PCR primer design and its reference

扩增区域 Amplification region	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	参考文献 References
<i>CO I</i>	C1-J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTARTTCC	(Chris, 1994; Hua et al., 2018)
	C1-N-2191	CCCGGTAAAATTTAAATATAAACTTC	
<i>ITS2</i>	58SF	GTGAATTCTGTGAAGTGCAGGACACATGAAC	(Chris, 1994; Zhu and Livy, 2002)
	ITS2R	AGTCTCGCCTGCTCTGAGGT	

Bio-Tek 公司)回收 PCR 产物,每样收集 50 μL ,委托生工生物工程(上海)有限公司用双脱氧法进行测序。

1.5 序列数据处理及分子系统树构建

测序获得的基因序列用 Dnastar Package 中的 SeqMan 软件进行序列峰图查看和拼接匹配校正,并保存为 FASTA 格式。在 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行相似性比较,确认所得序列为缨翅缨小蜂的 *CO I*、*ITS2* 基因。联合从 GenBank 中选用的相似序列,用 ClustalX1.83 软件进行比对。用分子进化遗传分析软件 MEGA 7.0 分析各物种间 DNA 序列差异,计算核苷酸使用频率。基于 Kimura-2-Parameter 模型,用邻接(Neighbour-Joining, NJ)法构建分子系统树,5 000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平(Bootstrap confidence level, BCL)。

2 结果与分析

2.1 形态学分类鉴定

雌性:体长 0.4-0.63 mm;头淡黄褐色,单眼和复眼淡红色;触角柄节、梗节和第 1 索节淡褐色,其余索节褐色,足淡黄褐色,翅面透明(图 1: A)。触角柄节长为宽的 3.5-3.86 倍,具纵褶,柄节是梗节的 1.7-1.8 倍,第 1 索节椭圆形,略

长为梗节的 1/2,第 2 索节略长于其后各节,第 3 索节至第 6 索节等长(图 1: B)。各索节感受器的数量如下: F4 (0-1 支), F5 (1-2 支), F6 (2 支);棒节长为宽的 3.0-3.3 倍,具 5 条感受器。前翅长为宽的 9.0-9.1 倍,最长缘脉为翅宽的 2.8-3.0 倍,翅面具 2-4 纤毛(图 1: C);后翅长为宽的 24-27 倍,最长缘脉为翅宽的 6.0-6.5 倍,翅面具不完整的毛列(图 1: D)。产卵管着生于第 3 腹节,相当于前足胫节 2.1-2.4 倍。产卵器端部略微突出,其突出部分占产卵管长的 0.06-0.15 倍。产卵管外瓣两侧各具 3 支长毛。

雄性:体长 0.46-0.59 mm(图 2: A);除了触角(图 2: B)和外生殖器官以外,大部分形态特征与雌性标本大致相同。但体色比雌性略深,尤其是腹部淡褐色至褐色;前翅(图 2: C)长为宽的 7.3-8.2 倍。

2.2 玉米缨翅缨小蜂 *CO I* 和 *ITS2* 片段的 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应,经过 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测(图 3),从图 3 可以看出,条带与预期 *CO I* 预期大小(500 bp 左右)和 *ITS2*(700 bp 左右)片段相符,条带较为清晰。电泳检测呈单一明亮条带的 PCR 扩增产物直接送公司测序,检测呈杂带的 PCR 产物回收后送公司测序。

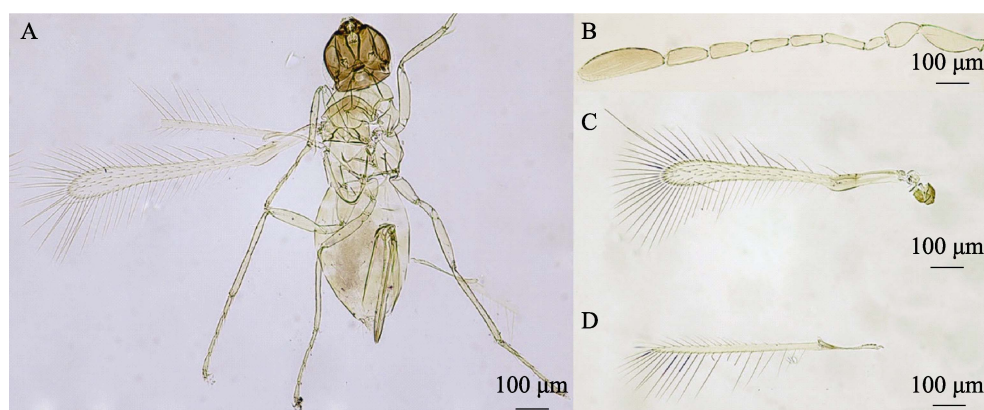


图 1 雌性玉米叶蝉缨翅缨小蜂形态图

Fig. 1 Morphology of female *Anagrus dmitrievi*

A. 整体; B. 触角; C. 前翅; D. 后翅。

A. Body; B. Antennae; C. Fore wing; D. Hind wing.

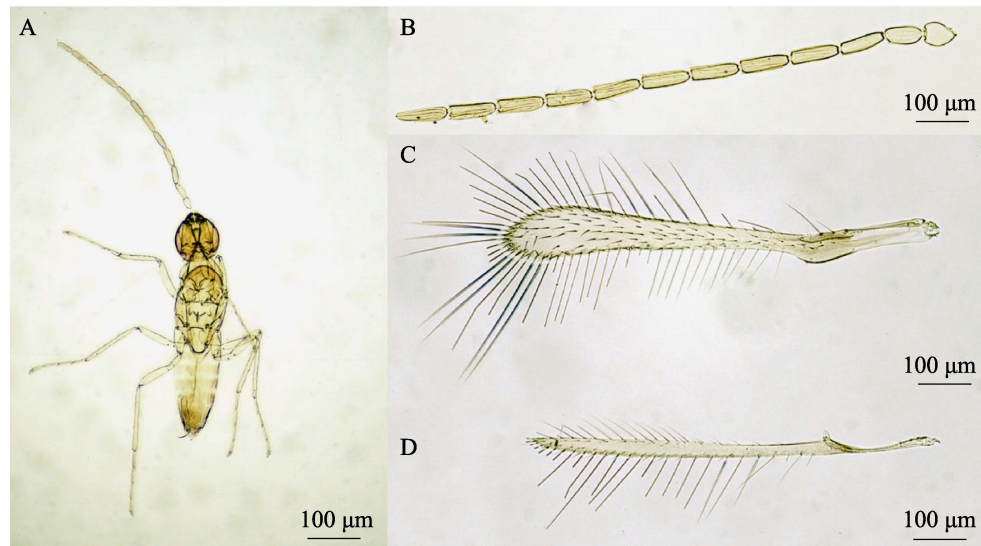
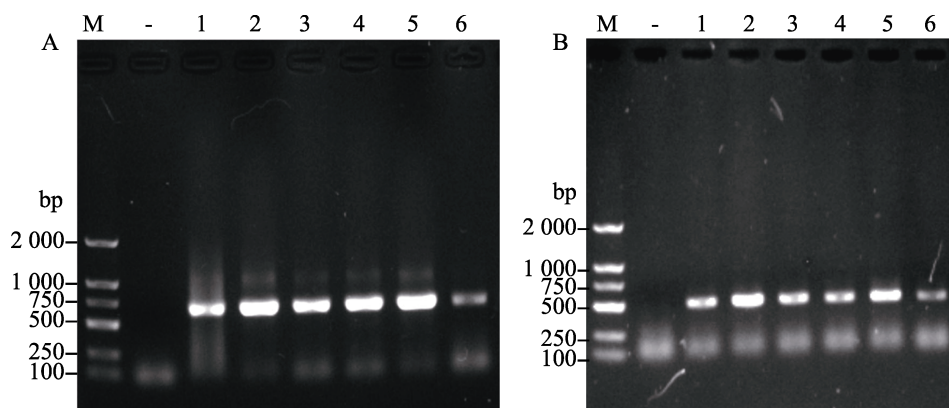


图 2 雄性玉米叶蝉缨翅缨小蜂形态图

Fig.2 Morphology of male *Anagrus dmitrievi*

A. 整体; B. 触角; C. 前翅; D. 后翅。

A. Body; B. Antennae; C. Fore wing; D. Hind wing.

图 3 PCR 扩增 *ITS2* 和 *CO I* 片段的琼脂糖凝胶电泳图Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of *ITS2* and *CO I* fragments amplified by PCRA. PCR 扩增 *ITS2* 片段; B. PCR 扩增 *CO I* 片段。M: 2000 DNA marker; -: 阴性对照; 1-6: 实验组。A. PCR amplification of *ITS2* fragment; B. PCR amplification of *CO I* fragment;

M: 2000 DNA marker; -: Negative control; 1-6 experimental group.

2.3 玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *CO I* 和 *ITS2* 序列分析

2.3.1 玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *CO I* 和 *ITS2* 序列碱基含量分析 将所测序列进行拼接校对, 扩增序列 *ITS2*, *CO I* 的序列分析如表 3 所示。在 NCBI 中进行比对, 结果显示测序所得序列与数据库中已知缨翅缨小蜂属的 *CO I* (图 4)、*ITS2* (图 5) 基因有较高的相似性, 因此可以确定所得序列为缨翅缨小蜂 *COI*、*ITS2* 基因序列; 为提高相似性

及分析方便, 将非保守区域去除, 仅以表 3 中的序列长度进行分析。

通过 MEGA7.0 软件测定分析了玉米叶蝉缨翅缨小蜂雄性和雌性 *CO I*、*ITS2* 基因碱基序列。序列分析结果显示, 所有位点中 AT 和 GC 碱基平均含量如表 3 所示, 其中雄性和雌性 *CO I* 与 *ITS2* 基因 AT 含量均较高, AT 含量分别为 75.7%、75.4%, 明显高于 GC 含量, 表现明显的 AT 碱基偏嗜, 且 A 与 T 含量相当, 说明两个基因序

<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>Anagrus daitrievi</i> ♀	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. ustulatus</i> ABW82487.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. ustulatus</i> haplotype ABW82486.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. ustulatus</i> ABW82481.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. ustulatus</i> ABW82483.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82476.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. atomus</i> isolate ABI81466.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. atomus</i> voucher APG29258.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. lindberginae</i> APG29226.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82474.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. erythroneurae</i> haplotype ABW82479.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>A. ustulatus</i> ABW82488.1	TATAACATTTTGATTATTATTACCAAGAAATTTATTATTAATTTCTAGAAATATTATGCTTTAGGAACCTGGACAGCTTGAACAGTT	88
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>Anagrus daitrievi</i> ♀	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. ustulatus</i> ABW82487.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. ustulatus</i> haplotype ABW82486.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. ustulatus</i> ABW82481.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. ustulatus</i> ABW82483.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82476.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. atomus</i> isolate ABI81466.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. atomus</i> voucher APG29258.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. lindberginae</i> APG29226.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82474.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. erythroneurae</i> haplotype ABW82479.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>A. ustulatus</i> ABW82488.1	TATCCGCCCTTTATCTTATAATATTTTCATAGAGGGCCCTCTGTTGATTTATCAATTTTTCCTTTACATATTGCTGGATATCTCTCA	176
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>Anagrus daitrievi</i> ♀	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. ustulatus</i> ABW82487.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. ustulatus</i> haplotype ABW82486.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. ustulatus</i> ABW82481.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. ustulatus</i> ABW82483.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82476.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. atomus</i> isolate ABI81466.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. atomus</i> voucher APG29258.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. lindberginae</i> APG29226.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82474.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. erythroneurae</i> haplotype ABW82479.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>A. ustulatus</i> ABW82488.1	TTATAGCTTCATTAATTTTATTTACTACAAATTTTAAATATAAAATTTTAAATTAAGAAAAGTTACATTTTGTGTGATCAATAT	264
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>Anagrus daitrievi</i> ♀	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. ustulatus</i> ABW82487.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. ustulatus</i> haplotype ABW82486.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. ustulatus</i> ABW82481.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. ustulatus</i> ABW82483.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82476.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. atomus</i> isolate ABI81466.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. atomus</i> voucher APG29258.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. lindberginae</i> APG29226.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82474.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. erythroneurae</i> haplotype ABW82479.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>A. ustulatus</i> ABW82488.1	ATTAAGCTGCAATTTTATTTATTTATCTTACCTGTTTACCTGGGCGAATTACTATATTTATTTGATCGAAATTTAAATACCTCT	352
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>Anagrus daitrievi</i> ♀	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. ustulatus</i> ABW82487.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. ustulatus</i> haplotype ABW82486.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. ustulatus</i> ABW82481.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. ustulatus</i> ABW82483.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82476.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. atomus</i> isolate ABI81466.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. atomus</i> voucher APG29258.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. lindberginae</i> APG29226.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. atomus</i> haplotype ABW82474.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. erythroneurae</i> haplotype ABW82479.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440
<i>A. ustulatus</i> ABW82488.1	TTTTTTTCAATCCCTCTGCTGGAGGCGATCCAAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTTGGCATTCCGAGAGTTATATTTTAATTT	440

图 4 雌雄玉米叶蝉缨翅小蜂 *Anagrus dmitrievi* CO I 基因与 GenBank 中相似序列的比对Fig. 4 Multiple sequence alignment of CO I gene from male and female *Anagrus dmitrievi* with GenBank

黑色背景表示碱基一致性为 100%，红色背景表示 75% ≤ 碱基一致性 < 100%，

蓝色背景表示 50% ≤ 碱基一致性 < 75%。图 5 同。

Black background indicates 100% base consistency; red background indicates 75% ≤ base consistency < 100%;

blue background indicates 50% ≤ base consistency < 75%. The same as Fig. 5.

<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTTAT		ACACGCCA	81
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♀	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ACGACCCA	81
<i>A.columbi</i> isolate MK024906.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.columbi</i> isolate MK024905.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024902.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024901.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.epos</i> isolate FJ861065.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.epos</i> isolate FJ861064.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.daanei</i> isolate FJ861053.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.turpanicus</i> isolate MK024911.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>A.turpanicus</i> isolate MK024909.1	CCCGGACCA	CGCCTGGCTGAGGGTCGTTTATAAATAAACCAGACTGCTTGC	GGTGTTCGGTGTATTTAT		ATACGCAACGCCA	82
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	CGCGAACCCGGAACCCGACGCTTTTCATTT		GAAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTTTGTTCTT		AGGAAGAACTGAC	165
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♀	CGCGAACCCGGAACCCGACGCTTTTCATTT		GAAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGTTCTT		AGGAAGAACTGAC	165
<i>A.columbi</i> isolate MK024906.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.columbi</i> isolate MK024905.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024902.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024901.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.epos</i> isolate FJ861065.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.epos</i> isolate FJ861064.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.daanei</i> isolate FJ861053.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.turpanicus</i> isolate MK024911.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>A.turpanicus</i> isolate MK024909.1	AGCGAACCTGACGCTTCGCGCTTTT		PAAPAAACCGCGCTTCGTTGAAATGATTCGCTTT		GGAGGAAA	165
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	GAGGAAAGAAATTT		AATATCAACATGTGGCCCTTCCTCTCCCTTTTAAACCGAGCG		CCGAAAGGCGCGGGGGGTT	249
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♀	GAGGAAAGAAATTT		AATATCAACATGTGGCCCTTCCTCTCCCTTTTAAACCGAGCG		CCGAAAGGCGCGGGGGGTT	249
<i>A.columbi</i> isolate MK024906.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.columbi</i> isolate MK024905.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024902.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024901.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.epos</i> isolate FJ861065.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.epos</i> isolate FJ861064.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.daanei</i> isolate FJ861053.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.turpanicus</i> isolate MK024911.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.turpanicus</i> isolate MK024909.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♂	GGTTTG		TTTAACTTCTTACGAGTACTACCGAATGACGAGGAGGCTTCTTCTTCTTCCCTCCCGGAAACCAACCAACCGCTCCCG		337	
<i>Anagrus dmitrievi</i> ♀	GGTTTG		TTTAACTTCTTACGAGTACTACCGAATGACGAGGAGGCTTCTTCTTCTTCCCGGAAACCAACCAACCGCTCCCG		337	
<i>A.columbi</i> isolate MK024906.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.columbi</i> isolate MK024905.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024902.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.nilaparvatae</i> isolate MK024901.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAACCGCG	249
<i>A.epos</i> isolate FJ861065.1	TGACGGAGAAATGAGTACGAGC		AGCTTGTG		TCGAAATCTCTTCGTTTAAAGCCATAAC	

图 5 雌雄玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *Anagrus dmitrievi* ITS2 基因与 GenBank 中相似序列的比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of ITS2 gene from male and female *Anagrus dmitrievi* with GenBank

表 3 核苷酸使用频率统计
Table 3 Nucleotide usage frequency statistics

材料名称 Material name	基因名 Gene name	片段长度 (bp) Fragment length	A/T 含量比 A/T content ratio	AT 含量 (%) AT content	GC 含量 (%) GC content
玉米叶蝉缨翅缨小蜂雄性 <i>A.dmitrievi</i> male	<i>CO I</i> <i>ITS2</i>	492 636	0.66 0.95	75.7 57.6	24.3 42.4
玉米叶蝉缨翅缨小蜂雌性 <i>A.dmitrievi</i> female	<i>CO I</i> <i>ITS2</i>	492 636	0.68 0.83	75.4 57.4	24.6 42.6

列存在明显的碱基组成偏向性。通过对玉米叶蝉缨翅缨小蜂雄性和雌性 *CO I*、*ITS2* 基因序列分析表明, 所得序列均能在分子水平上对玉米叶蝉缨翅缨小蜂进行检测分析。

2.3.2 玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *CO I* 遗传距离 利用 MEGA7.0 软件以 Kimura-2-Parameter 模型计算玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *CO I* 序列与相关序列

的进化分歧矩阵(表 4)。基于 *CO I* 序列的进化分歧矩阵可以看出, 玉米叶蝉缨翅缨小蜂雌性和雄性之间的遗传距离为 0.5%, 与同属不同种之间的遗传距离均为 7%-9%之间, 与同科其他属种之间的距离均在 12%以上, 能明显区分开来, 可以确定获得序列为玉米叶蝉缨翅缨小蜂的 *CO I* 基因序列。

表 4 不同缨翅缨小蜂种类基于 *CO I* 序列的进化分歧
Table 4 Genetic differences of different *Anagrus* species based on *CO I* sequences

[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]
[1]																	
[2]	0.006																
[3]	0.046	0.052															
[4]	0.046	0.052	0.000														
[5]	0.046	0.052	0.043	0.043													
[6]	0.046	0.052	0.000	0.000	0.043												
[7]	0.046	0.052	0.043	0.043	0.000	0.043											
[8]	0.049	0.055	0.003	0.003	0.040	0.003	0.040										
[9]	0.055	0.061	0.014	0.014	0.043	0.014	0.043	0.011									
[10]	0.058	0.064	0.011	0.011	0.049	0.011	0.049	0.008	0.014								
[11]	0.061	0.067	0.014	0.014	0.052	0.014	0.052	0.011	0.017	0.003							
[12]	0.067	0.074	0.074	0.074	0.055	0.074	0.055	0.077	0.086	0.086	0.089						
[13]	0.074	0.080	0.086	0.086	0.074	0.086	0.074	0.083	0.086	0.093	0.096	0.102					
[14]	0.077	0.083	0.096	0.096	0.086	0.096	0.086	0.099	0.102	0.108	0.112	0.102	0.058				
[15]	0.077	0.083	0.086	0.086	0.074	0.086	0.074	0.089	0.092	0.099	0.102	0.105	0.064	0.040			
[16]	0.077	0.083	0.096	0.096	0.089	0.096	0.089	0.099	0.099	0.109	0.112	0.102	0.064	0.040	0.043		
[17]	0.077	0.083	0.096	0.096	0.083	0.096	0.083	0.099	0.102	0.102	0.105	0.105	0.061	0.026	0.037	0.034	
[18]	0.080	0.080	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.089	0.089	0.099	0.102	0.105	0.031	0.055	0.061	0.058	0.061
[19]	0.146	0.146	0.157	0.157	0.153	0.157	0.153	0.160	0.164	0.171	0.167	0.146	0.149	0.142	0.145	0.142	0.143

[1] 雌 *A. dmitrievi*. Female *A. dmitrievi*. [2] 雄 *A. dmitrievi*. Male *A. dmitrievi*. [3] *A. columbi*_isolate MK024858.1. [4] *A. incarnates* isolate MK024812.1. [5] *A. virilai* isolate MK024822.1. [6] *A. incarnatus* isolate MK024811.1. [7] *A. virilai* isolate MK024823.1. [8] *A. incarnatosimilis* isolate MK024846.1. [9] *A. nilaparvatae* isolate MK024852.1. [10] *A. incarnatosimilis* isolate MK024845.1. [11] *A. nilaparvatae* isolate MK024855.1. [12] *A. turpanicus*_isolate MK024809.1. [13] *A. erythroneurae* haplotype ABW82479. [14] *A. atomus* haplotype ABW82476. [15] *A. ustulatus* haplotype ABW82486. [16] *A. atomus* haplotype ABW82474. [17] *A. lindberginae* APG29226. [18] *A. ustulatus* ABW82488. [19] *Gonatocerus uat* voucher AAY41948.

2.3.3 系统进化树 将获得的玉米叶蝉缨翅小蜂 *A. dmitrievi* 雄性和雌性成虫样本的 *CO I*、*ITS2* 序列在 NCBI 中进行比对, 结合数据库中与该虫成虫 *CO I*、*ITS2* 序列相似性较高的缨翅小蜂属序列 (图 4, 图 5), 用 ClustalX1.83 软件进行比对, 用 MEGA7.0 构建缨翅小蜂部分属种 NJ 树, 得到如图 6、图 7 样进化树。从 NJ 树

(图 6) 可以看出, 本实验雌雄样本 *A. dmitrievi* 以很高置信值聚在一起, 显示两者为同种, 该序列被确定为 *A. dmitrievi* 的 *CO I* 和 *ITS2* 序列; 与同属 *A. virilai*、*A. incarnatus*、*A. columbi*、*A. nilaparvatae*、*A. turpanicus* 以较高置信值聚在一起, 显示具有较近的亲缘关系, 但在遗传上有一定的差距。

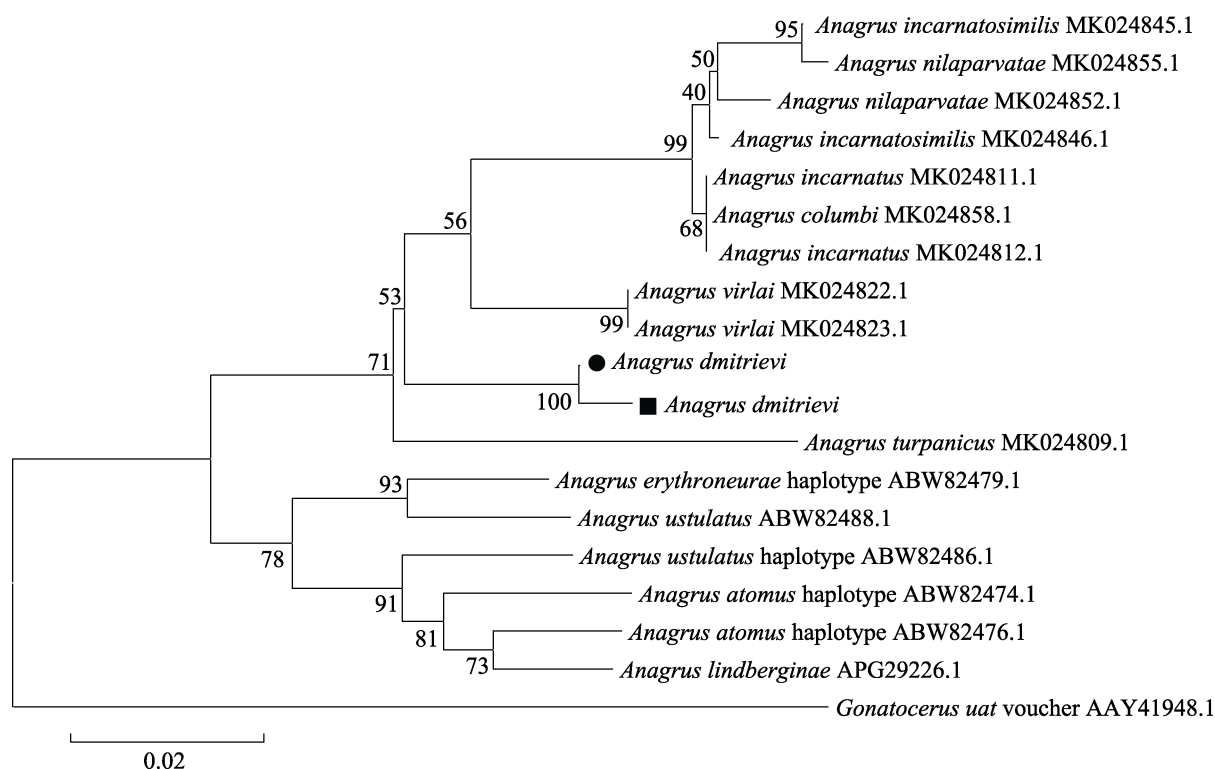


图 6 基于 *CO I* 基因构建的 NJ 树

Fig. 6 Construction of *CO I* sequence based NJ tree

●表示玉米缨翅小蜂雌性; ■表示玉米缨翅小蜂雄性; *Anagrus nilaparvatae*: 稻虱缨小蜂; *Anagrus columbi*: 哥伦布缨翅小蜂; *Anagrus turpanicus*: 吐鲁番缨翅小蜂; *Anagrus atomus*: 原缨翅小蜂; 进化树运用 MEGA5.0 软件的邻接法构建, bootstrap 值是 5 000 次重复。图 7 同。

● indicates female *A. dmitrievi*; ■ indicates male *A. dmitrievi*; Phylogenetic tree was constructed by Neighbour-Joining method using of MEGA5.0 software. The bootstrap value was derived with 5 000 repetitions. The same as Fig. 7.

3 讨论与结论

DNA 条形码技术在昆虫分类工作中被广泛应用。当传统的分类学受到阻碍时, DNA 技术能够发挥其优势, 弥补了传统昆虫鉴定方法的不足, 为传统分类提供分子特征数据, 实现昆虫快速准确鉴定。同时, 形态鉴定是分子鉴定的基础。

形态学鉴定对标本质量、数量要求较高, 并对形态学专业基础知识要求较高等; 虽然形态学鉴定在实际应用中存在诸多局限, 但脱离了形态分类, DNA 条形码技术将无法进行, 即形态分类的大致类群是设计和检索扩增 DNA 条形码序列引物的基础 (Hua *et al.*, 2018); 利用传统分类学特征 (外在形态特征、如形状、大小、颜色等)

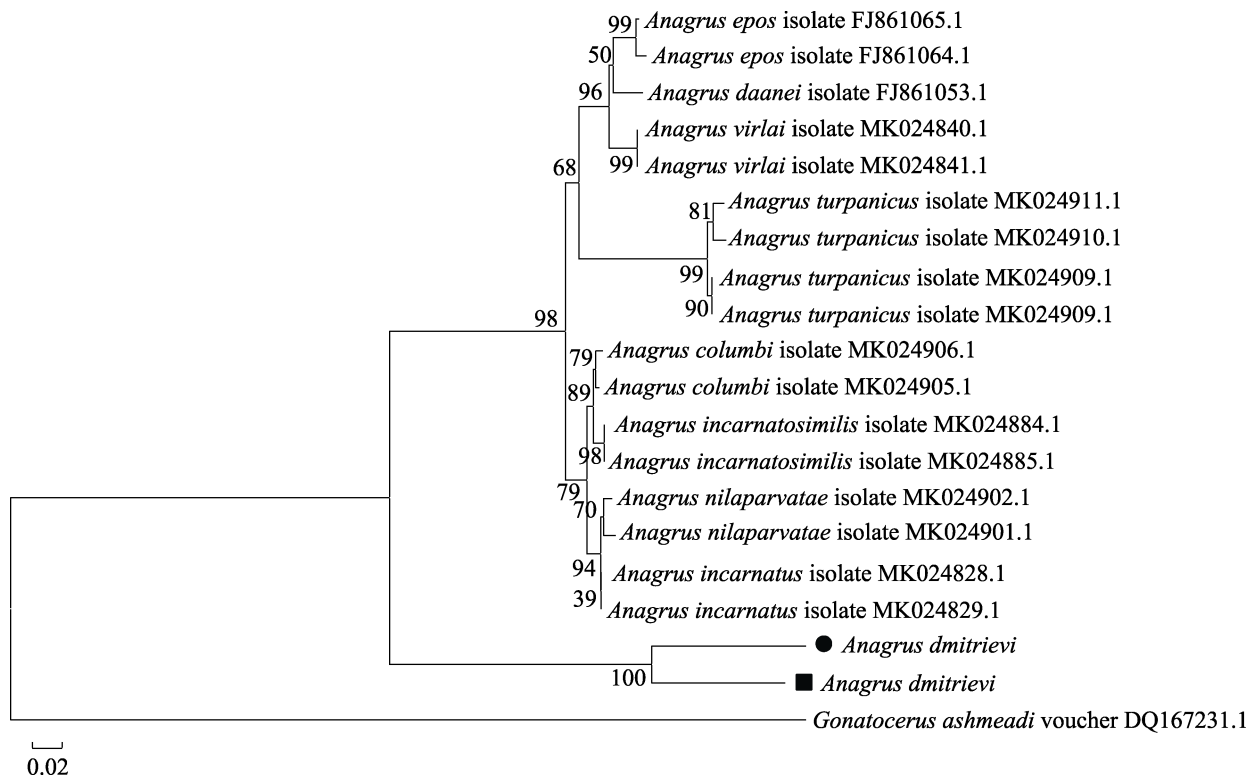


图 7 基于 ITS2 基因构建 NJ 树

Fig. 7 Construction of ITS2 sequence based NJ tree

对物种进行初步鉴定后, 再结合 DNA 条形码鉴定是更加高效准确的鉴定方法。

无损提取 DNA 法提取单头微小昆虫样本为分子鉴定提供有力的形态特征保证。目前, 充分研磨样品是核酸提取通用做法, 严重破坏了样品的组织形态及结构, 使得极少数的珍贵标本无法作为完整个体继续保存, 影响准确分类鉴定工作; 研磨样本存在费时费力、人为污染、职业风险、环境污染等问题 (王琦等, 2015)。除此, 不同个体的基因存在单核苷酸多态性 (SNP) (张继俊等, 2013), 以此为确保标本完整的个体及较高的单倍型, 利用无损提取 DNA 法提取单头昆虫准确鉴定显得更为重要。已有报道利用该法提取单头棉蚜 *Aphis gossypii* Glover、棉叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval、白粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* Westwood、禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* Linnaeus、麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* Rondani、绿盲蝽 *Apolygus lucorum* Meyer-Dür、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner、小地老虎 *Agrotis ypsilon* Rottemberg、

棉蓟马 *Thrips flavus* Schrank 等昆虫 DNA (王琦等, 2015)。本研究首次利用无损提取 DNA 法提取玉米缨翅缨小蜂 DNA, 且可用于 PCR 扩增的模板。

本研究根据玉米缨翅缨小蜂具有的形态特征, 确定样本寄生蜂为玉米缨翅缨小蜂 *A. dmitrievi*; 该种形态鉴定经小蜂权威分类专家复核验证。玉米叶蝉缨翅缨小蜂属于 *Anagrus* 亚属的 *incarnatus* 种群 (Chiappini *et al.*, 1996)。外部形态与同属 *A. columbi* Perkins、*A. fisheri* Donev、*A. nilaparvatae* Pang and Wang、*A. turpanicus* Triapitsyn and Hu、*A. virlai* Triapitsyn 等种类极为相似 (Triapitsyn *et al.*, 2018)。本研究利用 *CO I*、*ITS2* 基因序列对雌雄玉米叶蝉缨翅缨小蜂进行物种鉴定, 种内进化分歧为 0.5%, 种间进化分歧为 7%-9%; *CO I* 基因的 NJ 树分析结果表明, 玉米叶蝉缨翅缨小蜂与上述同属异种以较高置信值聚在一起, 说明具有较近的亲缘关系。*ITS2* 序列可能由于核基因本身的特性, 导致了 *ITS2* 遗传距离和进化树分析的比对困难且

聚类不明,在其他相关缨翅小蜂分类鉴定研究中也出现了同样的结果 (Gallego and Galián, 2001; Triapitsyn *et al.*, 2018), 因此说明 *CO I* 基因序列较 *ITS2* 基因序列有更强的对玉米叶蝉缨翅小蜂的鉴定能力。

本研究获得了该虫的 *ITS2*、*CO I* 基因序列, 序列比对和 NJ 树分析表明这些基因序列都可作为玉米叶蝉缨翅小蜂快速鉴定的 DNA 条形码, 能够实现该虫的快速准确鉴定, 为后续研究人员提供数据比对参考序列, 以生化防治为基础的综合防治提供生防物种数据支持。

参考文献 (References)

- Cao WQ, Lin SY, Wang YQ, Fan WL, Hu HY, 2017. A survey of population dynamics of leafhopper, *Arboridia kakogawana* (Matsumura) and parasitoids of vineyard in Turpan. *Journal of Environmental Entomology*, 39 (2): 396–404. [曹文秋, 林思雨, 王雨晴, 范文林, 胡红英, 2017. 吐鲁番葡萄园葡萄阿小叶蝉发生规律及寄生蜂资源调查. 环境昆虫学报, 39(2): 396–404.]
- Chen GH, Li Y, Liu D, Li FJ, Abuduaini A, Hu HY, 2018. DNA barcoding of *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Journal of Applied Entomology*, 55(3): 454–463. [陈光辉, 李焱, 刘东, 李凤姐, 阿依努尔·阿卜杜艾尼, 胡红英, 2018. 玉米象 *Sitophilus zeamais* DNA 条形码研究. 应用昆虫学报, 55(3): 454–463.]
- Chen GH, Yin W, Li Q, Hu HY, 2016. Research progress on *Monolepta hieroglyphica* (Motschulsky). *China Plant Protection*, 36(10): 19–26. [陈光辉, 尹弯, 李勤, 胡红英, 2016. 双斑长跗蜚叶甲研究进展. 中国植保导刊, 36(10): 19–26.]
- Chiappini E, Triapitsyn SV, Donev A, 1996. Key to the Holarctic species of *Anagrus* Haliday (Hymenoptera: Mymaridae) with a review of the Nearctic and Palaearctic (other than European) species and descriptions of new taxa. *Journal of Natural History*, 30(4): 551–595.
- Chris S, Francesco F, Andrew B, Bernie C, Hong L, Paul F, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651–701.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Gallego D, Galián J, 2001. The internal transcribed spacers (*ITS1* and *ITS2*) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. *Insect Molecular Biology*, 10(5): 415–420.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4): 968–971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR, 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences*, B(Suppl.) 270: S96–S99 (2003) .
- Hua HQ, Zhao ZY, Zhang Y, Hu J, Zhang F, Li YX, 2018. Inter-and intra-specific differentiation of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) species using PCR-RFLP targeting *COI*. *Journal of Economic Entomology*, 111(4): 1860–1867.
- Huang HP, Yang LY, Wang GF, Huang JS, 2006. The application of rDNA and mtDNA in insect phylogeny and fauna. *Journal of Agricultural University of South China*, 12 (4): 45–49. [黄华平, 杨腊英, 王国芬, 黄俊生, 2006. rDNA 和 mtDNA 在昆虫系统发育与区系研究中的应用. 华南热带农业大学学报, 12(4): 45–49.]
- Li Q, Hu H, Triapitsyn SV, Yi L, Lu J, 2018. *Anagrus dmitrievi* sp. n. (Hymenoptera, Mymaridae), an egg parasitoid of *Zyginidia eremita* (Hemiptera, Cicadellidae), a pest of maize in Xinjiang, China. *ZooKeys*, 736: 43–57.
- Oliveira CMD, Lopes JRS, 2000. Egg parasitoids of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), in Piracicaba. *Revista de agricultura*, 75(2): 263–270.
- Qu LH, Zhao ZL, Ma YY, Wang SB, Yu JN, Ma DY, 2000. Investigation on occurrence factors of *Zyginidia eremita*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, (S1): 22. [曲丽红, 赵珠莲, 马玉英, 王嵩柏, 于江南, 马德英, 2000. 玉米三点斑叶蝉发生因素调查. 新疆农业科学, (S1): 22.]
- Triapitsyn SV, Rugman-Jones PF, Tretiakov PS, Shih HT, Huang SH, 2018. New synonymies in the *Anagrus incarnatus* Haliday ‘species complex’ (Hymenoptera: Mymaridae) including a common parasitoid of economically important planthopper (Hemiptera: Delphacidae) pests of rice in Asia. *Journal of Natural History*, 52(43/44): 2795–2822.
- Virla EG, Gustavo MR, Erica LA, 2013. Egg parasitoids of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis*, in the southernmost area of its

- distribution range. *Journal of Insect Science*, 13(10): 1–7.
- Wang Q, Zhao M, Ma H, Wang HY, Xue C, Sui J, Dong HZ, 2015. Non-damaging DNA extraction method and its application in insect DNA barcoding. National Cotton Youth Academic Symposium. Shihezi. 49–51. [王琦, 赵鸣, 马慧, 王红艳, 薛超, 隋洁, 董合忠, 2015. 无损提取 DNA 方法及在昆虫 DNA 条形码技术中的应用. 全国棉花青年学术研讨会. 石河子. 49–51.]
- Wei JH, Wu WR, Yu LW, Lin XH, Li W, 2010. Application of DNA barcoding in biological taxonomy. *Journal of Guangdong Pharmaceutical College*, 26(4): 430–433. [韦健红, 吴文如, 喻良文, 林小桦, 李薇, 2010. DNA 条形码技术在生物分类中的应用. 广东药学院学报, 26(4): 430–433.]
- Wei MF, Zhang ZW, 2019. Research progress of DNA barcoding in insect taxonomy. *Journal of Agricultural Sciences*, 9(4): 79–83. [魏明峰, 张振旺, 2019. DNA 条形码技术在昆虫分类学中的研究进展. 农学学报, 9(4): 79–83.]
- Xi OY, Li X, Zheng F, Duan XC, Tang XL, Hu HY, 2016. DNA barcoding of *Agelastica alni orientalis* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Xinjiang Agricultural Sciences*, 53(2): 309–316. [席欧彦, 李晓, 郑飞, 段新晨, 唐秀丽, 胡红英, 2016. 杨树萤叶甲 DNA 条形码研究. 新疆农业科学, 53(2): 309–316.]
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy. *Current Zoology*, 50(5): 852–855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学的新动向-DNA 条形码编码. 动物学报, 50(5): 852–855.]
- Yang QQ, Liu SW, Yu XP, 2018. Research progress on DNA barcoding analysis methods. *Journal of Applied Ecology*, 29(3): 1006–1014. [杨倩倩, 刘苏汶, 俞晓平, 2018. DNA 条形码分析方法研究进展. 应用生态学报, 29(3): 1006–1014.]
- Yi L, Aishan Z, Li Q, Wang C, Hu HY, 2013. Resources investigation of leafhoppers and their egg parasitoid in maize field in Eastern Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 50(2): 325–333. [伊龙, 朱丽得孜·艾山, 李勤, 王朝, 胡红英, 2013. 新疆东疆玉米地叶蝉及其卵寄生蜂资源调查. 新疆农业科学, 50(2): 325–333.]
- Yu JN, Chen Y, Wei JH, Qu LH, Chai Y, Ren L, 1995. Study on the occurrence and control of *Zyginidia eremita*. *Journal of Bayi Agricultural College*, (1): 48–51. [于江南, 陈燕, 魏建华, 曲丽红, 柴燕, 任玲, 1995. 玉米三点斑叶蝉发生及防治的研究. 八一农学院学报, (1): 48–51.]
- Zhang JJ, Liu XL, Peng XH, Cai LM, 2013. Discussion on the evolution of main corn diseases and insect pests in Bozhou and their prevention and control strategies. *China Plant Protection*, 33(8): 30–33. [张继俊, 刘新兰, 彭新华, 才丽曼, 2013. 博州玉米主要病虫害发生演变情况及其防控对策探讨. 中国植保导刊, 33(8): 30–33.]
- Zhu YC, Livy W, 2002. Detecting the egg parasitoid *Anaphes iole* (Hymenoptera: Mymaridae) in tarnished plant bug (Heteroptera: Miridae) eggs by using a molecular approach. *Annals of the Entomological Society of America*, 95(3): 359–365.