玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *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】** 玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *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缨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缨小蜂至成虫。根据玉米叶蝉缨翅缨小蜂成虫的体色、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 *ITS*2 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缨小蜂。获得了该寄生蜂 *CO Ⅰ*和 *ITS*2 的部分序列，相似比对、遗传距离和分子进化树结果表明，玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *CO Ⅰ*和 *ITS*2 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】** 获得的玉米缨翅缨小蜂的 *CO Ⅰ*和 *ITS*2 基因序列可作为玉米叶蝉缨翅缨小蜂的 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 玉米叶蝉缨翅缨小蜂；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, Typhlocybinae), 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 *ITS*2 genes after PCR amplification and sequencing. **[Results]** Multiple sequence alignments, genetic distance and phylogenetic analyses indicate that although *A. dmitrievi CO Ⅰ* and *ITS*2 are highly homologous to those of other *Anagrus* species listed in the NCBI databases, there are some clearly distinguishable differences. **[Conclusion]** *CO Ⅰ* and *ITS*2 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; *ITS*2 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 longifrangiata*（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 *ITS*1、*ITS*2、*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 *ITS*1、*ITS*2、*CO Ⅰ* 等基因均适合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 *ITS*2 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有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缨小蜂。

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、ddH_2O 43 μL。3）在光学显微镜下，挑取完整样本个体，用 ddH_2O 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、ddH_2O 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。*ITS*2 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
CO Ⅰ	C1-J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTARTTCC	（Chris，1994；Hua *et al.*，2018）
	C1-N-2191	CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC	
*ITS*2	58SF	GTGAATTCTGTGAACTGCAGGACACATGAAC	（Chris，1994；Zhu and Livy, 2002）
	*ITS*2R	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*、*ITS*2 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-Jioning，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 *ITS*2（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。

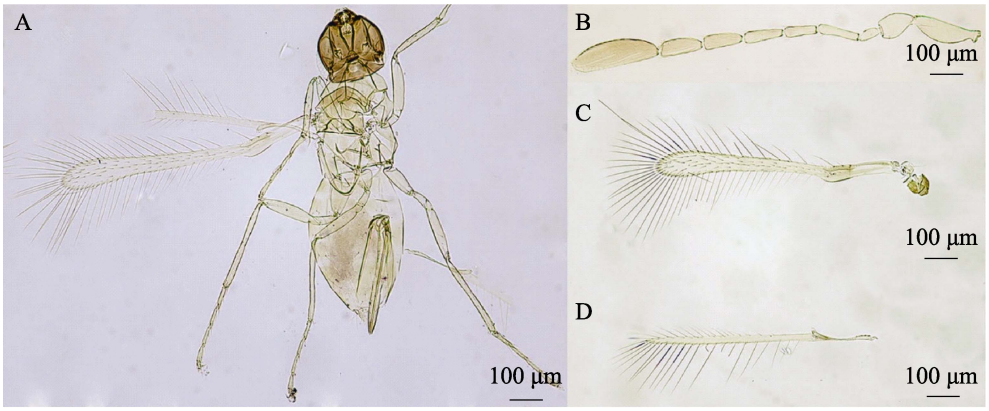

图 1 雌性玉米叶蝉缨翅缨小蜂形态图

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.

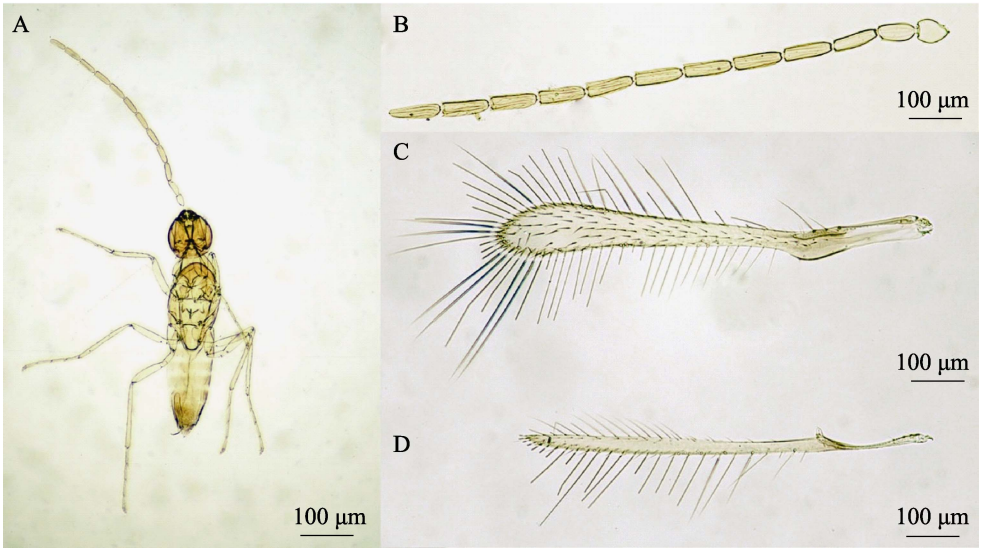

图 2　雄性玉米叶蝉缨翅缨小蜂形态图

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.

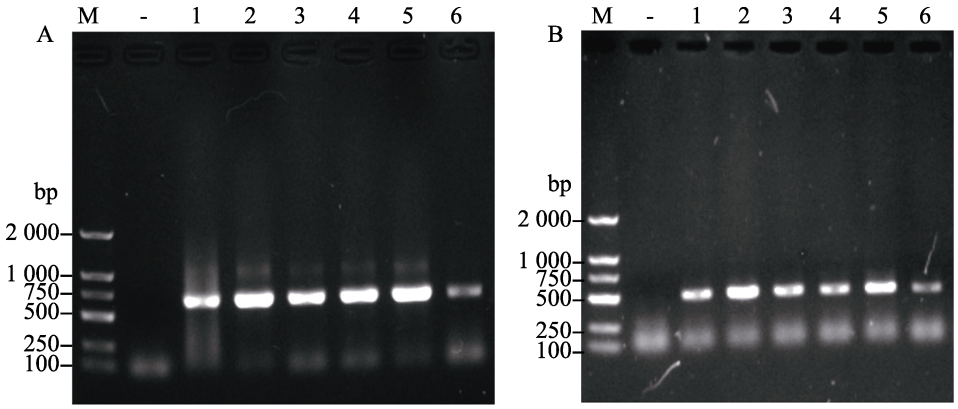

图 3　PCR 扩增 *ITS2* 和 *CO Ⅰ* 片段的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3　Agarose gel electrophoresis of *ITS2* and *CO Ⅰ* fragments amplified by PCR

A. 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

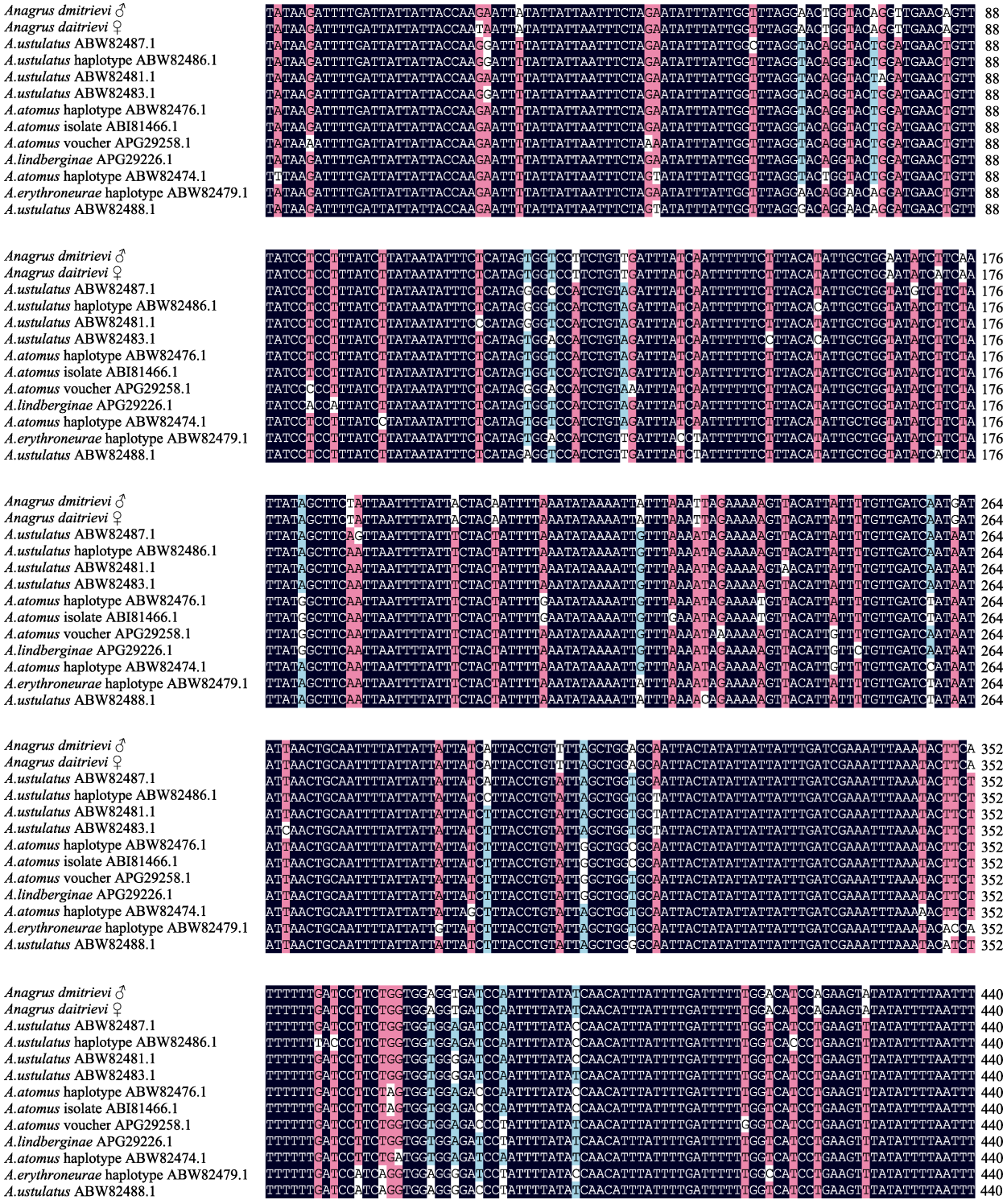

图 4　雌雄玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *Anagrus dmitrievi CO Ⅰ*基因与 GenBank 中相似序列的比对

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.

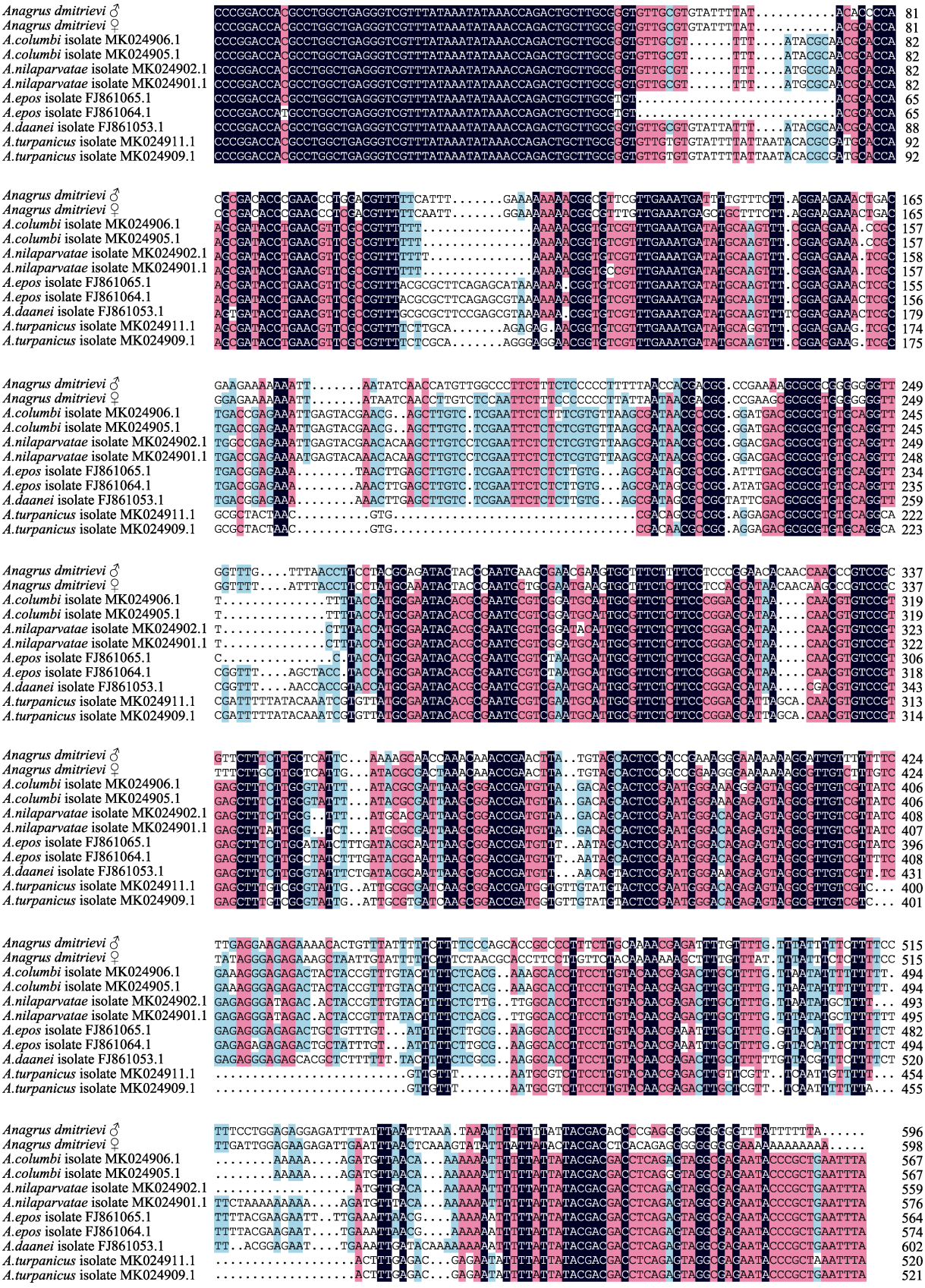

图 5　雌雄玉米叶蝉缨翅缨小蜂 *Anagrus dmitrievi ITS*2 基因与 GenBank 中相似序列的比对

Fig. 5　Multiple sequence alignment of *ITS*2 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 *A.dmitrievi* male	*COⅠ*	492	0.66	75.7	24.3
	*ITS*2	636	0.95	57.6	42.4
玉米叶蝉缨翅缨小蜂雌性 *A.dmitrievi* female	*COⅠ*	492	0.68	75.4	24.6
	*ITS*2	636	0.83	57.4	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 *COⅠ*、*ITS*2 基因序列分析表明，所得序列均能在分子水平上玉对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 *COⅠ*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 *COⅠ*序列与相关序列的进化分歧矩阵（表 4）。基于 *COⅠ* 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 *COⅠ*基因序列。

表 4 不同缨翅缨小蜂种类基于 *COⅠ*序列的进化分歧

Table 4 Genetic differences of different *Anagrus* species based on *COⅠ* 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	0.145	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. virlai* isolate MK024822.1.[6] *A. incarnatus* isolate MK024811.1.[7] *A. virlaiisolate* 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缨小蜂 *A. dmitrievi* 雄性和雌性成虫样本的 *CO Ⅰ*、*ITS*2 序列在 NCBI 中进行比对，结合数据库中与该虫成虫 *CO Ⅰ*、*ITS*2 序列相似性较高的缨翅缨小蜂属序列（图 4，图 5），用 ClustalX1.83 软件进行比对，用 MEGA7.0 构建缨翅缨小蜂部分属种 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 *ITS*2 序列；与同属 *A. virlai*、*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。

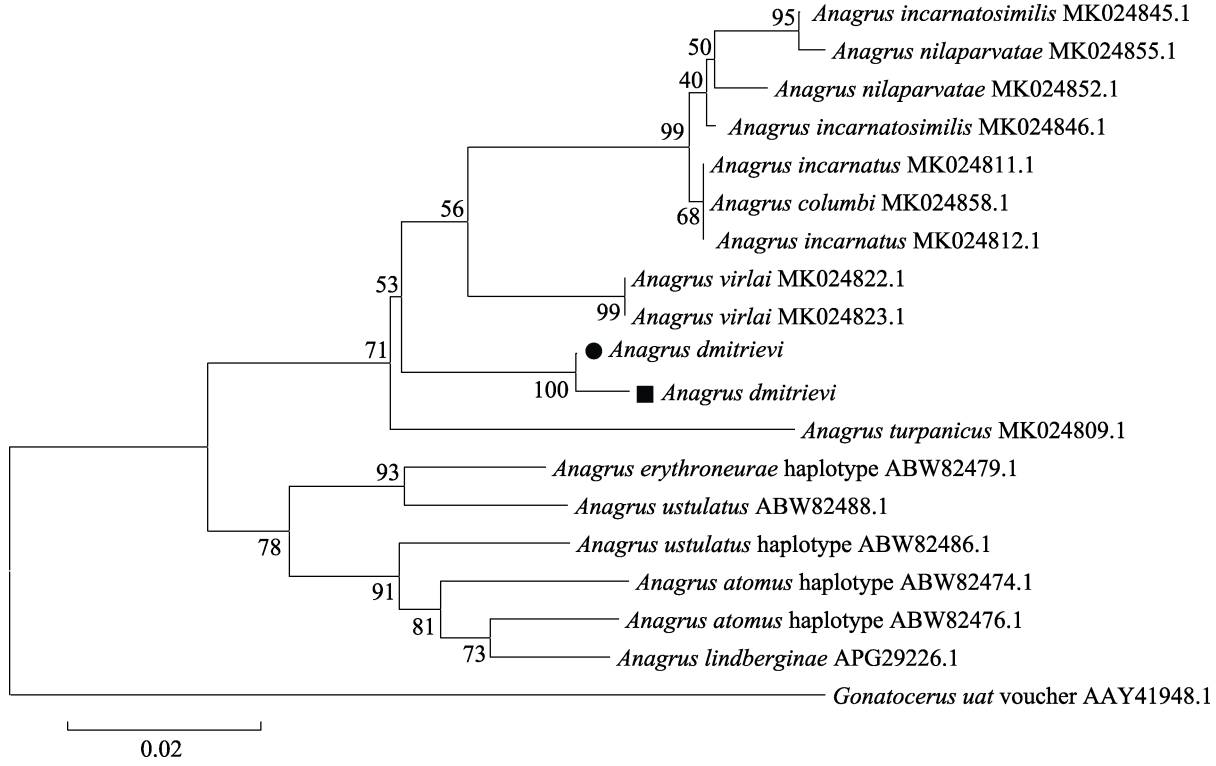

图 6　基于 *CO Ⅰ* 基因构建的 NJ 树

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

●表示玉米缨翅缨小蜂雌性；■表示玉米缨翅缨小蜂雄性；*Anagrus nilaparvatae*：稻虱缨小蜂；*Anagrus columbi*：哥伦布缨翅缨小蜂；*Anagrus turpanicus*：吐鲁番缨翅缨小蜂；*Anagrus atomus*：原缨翅缨小蜂；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-Jioning 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）

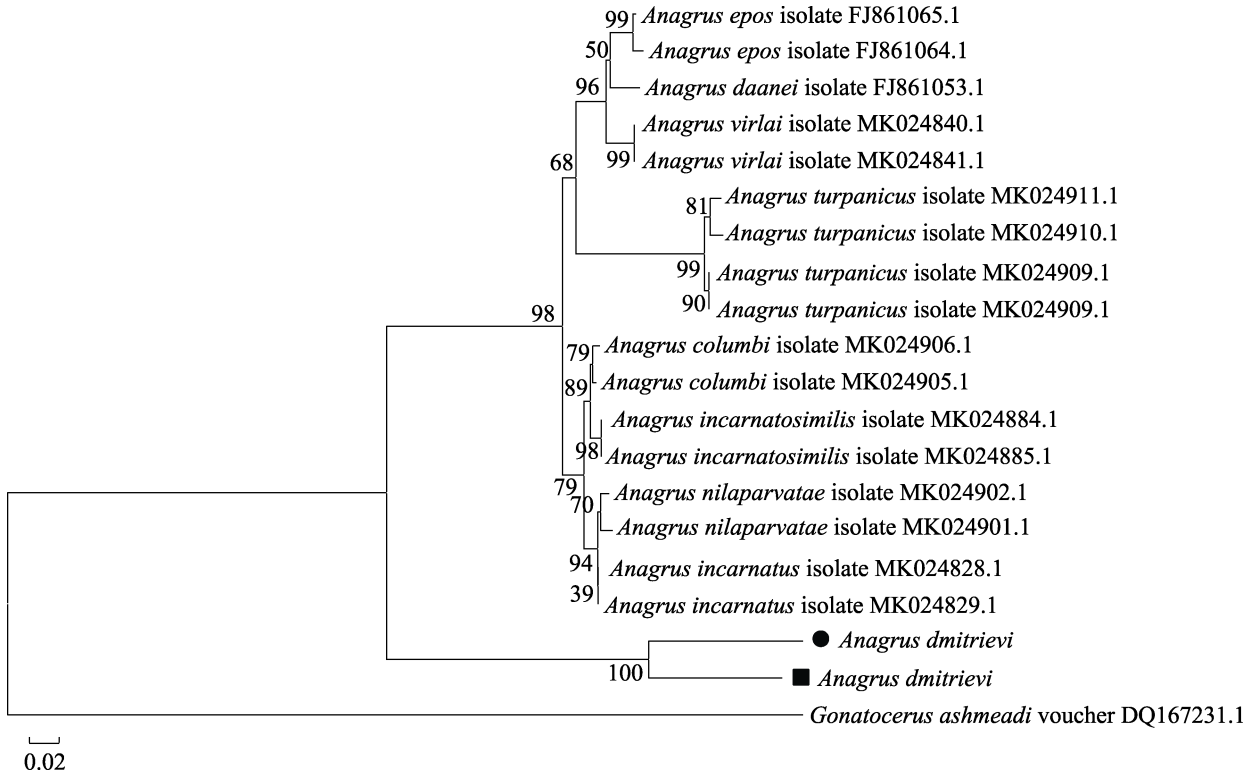

图 7　基于 *ITS*2 基因构建 NJ 树

Fig. 7　Construction of *ITS*2 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。

无损伤提取 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，利用无损伤提取 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伤提取 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、*ITS*2 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。*ITS*2 序列可能由于核基因本身的特性，导致了 *ITS*2 遗传距离和进化树分析的比对困难且

聚类不明，在其他相关缨翅缨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 *ITS*2 基因序列有更强的对玉米叶蝉缨翅缨小蜂的鉴定能力。

本研究获得了该虫的 *ITS*2、*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缨小蜂快速鉴定的 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. 双斑长跗萤叶甲研究进展. 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 (*ITS*1 and *ITS*2) 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. 无损伤提取 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 filed 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.