

赤眼蜂分子鉴定技术研究

李正西, 沈佐锐*

(中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

摘要: 通过对 6 种常见赤眼蜂, 即松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura、玉米螟赤眼蜂 *T. ostrinae* Pang et Chen、螟黄赤眼蜂 *T. chilonis* Ishii、广赤眼蜂 *T. evanescens* Westwood、甘蓝夜蛾赤眼蜂 *T. brassicae* Bezdenko 及食胚赤眼蜂 *T. embryophagum* (Hartig) 之核糖体核糖核酸基因第二内部转录区 (rDNA-ITS2) 的克隆测序, 调用 GenBank 中同源序列, 对不同蜂种的 rDNA-ITS2 序列进行了多重排比和聚类, 探讨了 rDNA-ITS2 用于赤眼蜂属不同种系统进化关系分析及赤眼蜂分子鉴定的可行性。为了考察 rDNA-ITS2 在赤眼蜂种下水平鉴定上的可能性, 作者收集了我国常见的松毛虫赤眼蜂 6 个地理种群 (黑龙江亚布力、吉林长春、吉林仁和、陕西长安、江苏徐州、广东广州), 采用相同方法测定了它们的 rDNA-ITS2 序列。序列分析结果表明, 赤眼蜂种下阶元 ITS2 序列非常保守, 而种间存在明显的遗传差异。通过外群比较发现, rDNA-ITS2 只适合于赤眼蜂种一级的分子鉴定。

关键词: 赤眼蜂属; 尤氏赤眼蜂属; rDNA-ITS2; 分子鉴定; 分子系统学

中图分类号: S476.3 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 05-0559-08

Application of rDNA-ITS2 sequences to the molecular identification of *Trichogramma* spp.

LI Zheng-Xi, SHEN Zuo-Rui* (Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The second internal transcribed spacers (ITS2) of six *Trichogramma* species, i.e. *T. dendrolimi* Matsumura, *T. ostrinae* Pang et Chen, *T. chilonis* Ishii, *T. evanescens* Westwood, *T. brassicae* Bezdenko and *T. embryophagum* (Hartig) were cloned and sequenced, and the homological sequences available in GenBank retrieved for DNA alignment and clustering. The feasibility of the application of ITS2 sequences to the phylogenetic reconstruction and molecular identification of different *Trichogramma* species was then evaluated. Meanwhile, six geographical populations of *T. dendrolimi*, i.e., populations collected from Yabuli in Heilongjiang (YBL), Changchun in Jilin (JL), Renhe in Jilin (RH), Chang'an in Shaanxi (CHA), Xuzhou in Jiangsu (XZ) and Guangzhou in Guangdong (GZ), were used to determine ITS2 divergence between subspecies populations. Alignment of sequenced ITS2s showed that they were highly conserved within intraspecific taxa but that significant genetic distances existed between interspecific taxa. Comparison and analysis of an outgroup led to the clear conclusion that ITS2 is suitable only for species-level identification.

Key words: *Trichogramma*; *Uscana*; rDNA-ITS2; molecular identification; molecular systematics

我国赤眼蜂大量生产和应用已具有一定规模, 并仍保持相当大的应用面积, 但作为重要的天敌昆虫, 赤眼蜂的应用基础和基础研究还急待加强, 如: 赤眼蜂种类确认的快速简易的方法; 赤眼蜂产品的生产监测、工序监测和田间监控; 蜂种优良品系的选育等。

目前, 分子生物学技术应用于赤眼蜂种类鉴定和系统进化研究已经起步。赤眼蜂是广泛应用于田间鳞翅目害虫生物防治的卵寄生蜂, 但由于该蜂个

体微小、缺乏足够的形态学鉴定特征, 赤眼蜂的鉴定一直非常困难 (Pinto and Stouthamer, 1994), 至今一些种分类地位仍然存疑, 如: 螟黄赤眼蜂 *T. chilonis* 与拟澳洲赤眼蜂 *T. confusum*, 以及甘蓝夜蛾赤眼蜂 *T. brassicae* 与广赤眼蜂 *T. evanescens* 等 (庞雄飞, 1999)。不同的研究者曾经采用不同的方法澄清赤眼蜂的分类问题, 如: 雄性外生殖器的形态比较 (Nagarkatti and Nagaraja, 1971, 1977), 同位酶分析 (主要是酯酶电泳) (Pintureau, 1993) 和生

第一作者简介: 李正西, 男, 1964 年 7 月生, 博士, 讲师, 研究方向为分子生态学, E-mail: zdi@cau.edu.cn

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2002-01-16; 接受日期 Accepted: 2002-04-18

殖亲合性研究（主要是杂交实验）（Pinto *et al.*, 1991）。然而有关赤眼蜂的分类仍存在许多争议，而且目前的方法常常耗时费力，非分类专家很难胜任。近来，采用 PCR 技术扩增 DNA 已成为研究赤眼蜂的分类鉴定和系统进化问题的重要方法（Landry *et al.*, 1993），同时核糖体核糖核酸基因（rDNA）也作为重要的分子靶标用于比较近缘种间的系统发生关系（Pinto and Stouthamer, 1997）。rDNA 在所有生物中广泛存在，包含几个区段（基因和间隔区），其中不同的区段进化速率不同，因此可分别用来对不同分类阶元作系统进化研究。在种及种下阶元，第一和第二内部转录区（ITS1 和 ITS2）曾被用作许多类群的分类工具，如：真菌（Carbone and Kohn, 1993）、植物（Hsiao *et al.*, 1994）和动物（Campbell *et al.*, 1993）。ITS rDNA 测序及酶切分析被认为是非常有前途的赤眼蜂种群分型鉴别的手段（Schilthuizen and Stouthamer, 1997; van Kan *et al.*, 1996）。

本研究的目标是通过赤眼蜂不同种和不同地理种群 ITS2 的克隆测序和分析，探讨 ITS2 作为靶标区段在进一步开发赤眼蜂快速简易分子鉴定方法上的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

研究中使用的 6 种赤眼蜂，即松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi* Matsumura、玉米螟赤眼蜂 *T. ostrinae* Pang et Chen、螟黄赤眼蜂 *T. chilonis* Ishii、广赤眼蜂 *T. evanescens* Westwood、甘蓝夜蛾赤眼蜂 *T. brassicae* Bezdenko 由北京市农林科学院生物防治科研中试基地王素琴提供，其中前 3 种为生产种群，后 2 种为原种；食胚赤眼蜂 *T. embryophagum* (Hartig) 由中国农业科学院植物保护研究所王振营提供，该蜂由联邦德国农林生物研究中心生物防治研究所 Hassan 博士惠赠。研究中使用的松毛虫赤眼蜂的 6 个地理种群由北京市农林科学院生物防治科研中试基地张帆和王兵提供，分别采自我国 6 个不同地区：黑龙江亚布力（YBL）、吉林长春（JL）、吉林仁和（RH）、陕西长安（CHA）、江苏徐州（XZ）、广东广州（GZ）。赤眼蜂饲养及样品处理参照李正西和沈佐锐（2001）的方法。

1.2 主要生化试剂及 DNA 提取方法

DNA 提取方法参照李正西和沈佐锐（2001）方

法。T 载体试剂盒 pGEM® -T Vector System I、DNA 快速纯化试剂盒 Wizard PCR Preps DNA Purification System 及内切酶 *Bst* ZI 为 Promega 公司产品；Taq 酶为 GIBCOBRL®（巴西）产品；自动测序和引物合成委托上海生物工程公司完成；亚克隆受体菌为 *E. coli* DH5α；蛋白酶 K 和 dNTP 混合液为 MBI 公司产品。

1.3 PCR 扩增及电泳

根据李正西和沈佐锐（2001）的方法，总反应体积 50 μL：40.2 μL 超纯水、5 μL 10× buffer，0.8 μL 10 mmol/L dNTP 混合液，25 μmol/L 正反引物各 1.2 μL，1 μL 模板 DNA，0.6 μL Taq 酶（5 u/μL）。扩增 ITS2 区段的引物为：forward-ITSN2 5'-TTC TCG CAT CGA TGA AGA ACG-3' 和 reverse-ITSB 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。PCR 循环程序为：95℃变性 3 min，接着进行 32 个循环：94℃变性 1 min、50℃退火 1 min、72℃延伸 2 min，最后 72℃延伸 7 min，置 4℃保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖（Spain）凝胶电泳分离，溴化乙锭（EB）染色，λDNA *Eco* RI / *Hind* III 分子量标准参照物。

1.4 克隆及测序

电泳后，将 PCR 产物仔细割下，分别置于 1.5 μL 离心管，采用 DNA 快速纯化试剂盒（Wizard®）回收 PCR 产物，每样收集 25 μL。亚克隆连接反应、热激转化和蓝白斑筛选都参考萨姆布鲁克等（1993）方法。阳性克隆鉴定时，先纯化质粒，再用内切酶 *Bst* ZI（*Eco*52 I）进行酶切鉴定。将阳性克隆转接摇菌 8 h，取 400 μL 加 25% 消毒甘油冷冻后交上海生物工程公司自动测序。为了确保测序的准确性，本研究分别对含有同一赤眼蜂个体 DNA 插入片段的多个阳性克隆进行了测序。

1.5 序列分析

将所测得的 ITS2 序列在 GenBank 中作 BLAST 搜索，利用核酸序列分析软件 DNAMAN® version 4.0（Lynnon BioSoft, Copyright 1994 - 98）对序列进行排序剪裁，并将完整 ITS2 序列提交 GenBank 注册。取自 GenBank 的参照序列及其登录号分别为：*T. sibericum* (U74606)，*T. deion* (AF082823)，*T. oleae* (U74601)，*T. platneri* (U74602)，*T. pretiosum* (U74604)，*T. brevicapillum* (U74673)，*T. cordubensis* (U74675)，*T. kaykai* (U76228)，*T. nubilale* (U74600)，*T. pratti* (AF082817)，*T. sathon* (AF082815)，*T. bourarachae* (AF043626)，*T. pin-toi* (AF043622)，*T. turkestanica* (AF043615)。系统

进化分析所采用的序列代表赤眼蜂属不同种及松毛虫赤眼蜂的 6 个不同地理种群。不同的“单模标本”(haplotypes) 由于其 ITS2 序列基本相同, 分析时只选用其中一条序列用作系统进化分析。外群采用已在 GenBank 中注册了的尤氏赤眼蜂属的 *Uscana semifumipennis* (USU74608)。系统进化树的构建采用软件 MEGA version 2.1 (Kumar *et al.*, 1993)。进化距离计算分别选用各种常用的数学模型 (Nei and Kumar, 2000), 如: Tamura-Nei 模型 (Tamura and Nei, 1993)、Kimura 2-parameter 模型 (Kimura, 1980) 及 Jukes-Cantor 模型 (Jukes and Cantor, 1969) 等; 建树方法采用常用的 UPMGA 和 Neighbor-Joining (NJ) 方法, 并分别根据最小进化 (ME: minimum evolution) 和最大简约 (MP: maximum parsimony) 两种假定建树, 最后运用 Bootstrap 1 000 次对进化树进行检验。

2 结果和讨论

2.1 赤眼蜂 ITS2 序列

6 种赤眼蜂及松毛虫赤眼蜂 6 个地理种群 ITS2 全序列已在 GenBank 中注册, 登录号见表 1。

2.2 基于 rDNA-ITS2 的赤眼蜂系统进化分析

基于赤眼蜂属不同种、松毛虫赤眼蜂不同地理种群及外群 ITS2 排序图 (图 1), 根据 Tamura-Nei 模型 (Tamura and Nei, 1993) 计算出不同赤眼蜂种及地理种群的进化分歧矩阵 (表 2)。最后采用 UPGMA 算法推定出赤眼蜂属 18 种和松毛虫赤眼蜂 6 个地理种群 (尤氏赤眼蜂作外群) 的分子系统进化树 (图 3) (1 000 次 Bootstrap 重复, 假定碱基转换和颠换具有相等权重)。

表 1 赤眼蜂及其地理种群 rDNA-ITS2 全序列在 GenBank 中的登录号

赤眼蜂种名 (含品系)	登录号
Species and strains	GenBank accession numbers
松毛虫赤眼蜂 <i>T. dendrolimi</i>	
长安种群 <i>T. dendrolimi</i> CHA	AF453554
广州种群 <i>T. dendrolimi</i> GZ	AF453555 – AF453557
长春种群 <i>T. dendrolimi</i> JL	AF453558
仁和种群 <i>T. dendrolimi</i> RH	AF453559
徐州种群 <i>T. dendrolimi</i> XZ	AF453560
亚布力种群 <i>T. dendrolimi</i> YBL	AF453561
玉米螟赤眼蜂 <i>T. ostriniae</i>	AF250559
螟黄赤眼蜂 <i>T. chilonis</i>	AF422845
广赤眼蜂 <i>T. evanescens</i>	AF453563 – AF453565
甘蓝夜蛾赤眼蜂 <i>T. brassicae</i>	AF453566 – AF453567
食胚赤眼蜂 <i>T. embryophagum</i>	AF453562

TDUA	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCACTGCA-	---	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TCTGTCTCTC	TGTC-GTCTG	TGTGTCTCTC	CTCTCTTCA	120		
TGGZ	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCACTGCCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TCTGTCTCTC	TGTCGTCTG	TGTGTCTCTC	CTCTCTTCA	120		
TDJL	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCACTGCCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TCTGTCTCT-	--	CTGTCTG	CTGTGTGATC	CTCTCTTCA	120	
TDRH	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCACTGCA-	----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TCTGTCTCT-	--	CTGTCTG	TGTGTGATC	CTCTCTTCA	120	
TDXZ	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCACTGCA-	----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TCTGTCTCTC	CTGTCTG-	--	TGTGTCTC	CTCTCTTCA	120	
TDYBL	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCACTGCA-	----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TCTGTCTCTC	TGTGTCT-	--	TGTGTCTC	CTCTCTTCA	120	
TBGR	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-CTCTA	TCTCTCTT-	-----	-A-CTCTT-C	TTT------	120		
TBOLR	---	GTTC	ATAAAAATA	ACCGACTGC	TCTCTTTTAC	TTTTTGTANA	AAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCTGCGCG	CTTTTTTGT	AAAGAAAAAG	NONNTTTT	GTGCGTCAA			120	
TBREV	CACCAAGTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTCTCT-	-----	CGC	TAAGA	G	A--GAGAGA	GAGC	GTGGA	TCTGGGCGT	CGTCTGCGC	ACCGAATCTC	G	CGC	120
TCDF	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT--CTC	TATCTCTA-	--CGGCTCT	TT-C-----	-----		120	
TCORD	CGCA- GTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTCTCT-	-----	CTC	TCTCTCTCTT	GCAAGAGAG	AGCA	GAGAG	--CGTGTATC	TGGGCGTCT	T--CTCTAT	TCTTAAT-		120	
TDEION	-----	GTTC	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTCTC-	-----	-----	-----	-----	TCTC	T-----	CTGCG	AAGAGA-----	-----		120	
TECN	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-CTCTA	TCTCTATCG	CGGCGGCGG	CG	CTCTTC	TCTATTGCT	120	
TEWGER	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TATCTCTCTA	CTCTCTCTTC	AAG-TGTATA	G-CAGTGCA		120	
TKAY	-----	GTTC	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCT-	-----	-----	ATCT-----	C	TC	--TCTC	TCTCTCAGCA	GAGA-----	GA	GAGAGAGACT	GAGAGAGCT	120
TNUB	ACAA- GTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TGCGGCA-	-----	---	CGCGCGG	CTCTACCTC	TATG-AAAGG	AGAGTCTCTC	TGCGGCGCA	GCGTTC-----	ATCTGGGCG			120	
TOCA	GG-GTCTTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	CTCTGGGCG	TGCT-GTCTC	TATCTCTG-	--GCG-CG	CT-CTCTT-C	TCTATTGCA		120	
TOLE	ACAA- GTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGCG	A-----	A	GAGAGAGCT	120	
TPLAT	ATCATAGTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-CTC--	--TATC	TC	TTTATACTT	T--CTCTCTC	GTCTCTC--	120	
TPRAT	-----	GTTC	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TG--TCTC	TATCTCTG	TCTCTCTCTC	TGCTCTCTC	TCTCTCTC	120	
TPRBT	ACAA- GTTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	T-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGCG	A-----	A	GAGAGAGCT	120	
TSATL	-----	GTTC	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTCTC-	-----	-----	-----	-----	CTCTC	TATCTCTC	TGCTCTCTG	AAGAGAGAA	GAGAGAGCA		120	
TSIB	CA-G--TTT	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-CTC	TATCTCTG-	--AGGCTCT	CT-CTCTT-C	TCTATTGCA		120	
TIURK	-----	GTTC	ATAAAAACA	ACCGACTGC	TCTCTGCA-	-----	---	AGA	GAGAGCGTG	ATCTGGGCG	TGCT-CTCTA	TCTCTCTC	-----	TA	TA-CTCTT-C	TTT------	120

USCANA	CCCA--GTTT ATAACAAA ACCAGATGC TTGACCAGA ATTATTTATT ---ATCTCTG GTC-GAAAGC -GAACCACTG AGCGTTCGTC GA--GATTA AAGAGAGATC GC-AGGCCAA 120
TDCHA	GAGTGTGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG- ----- TCAGACGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----ATG ATG ---A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TDGZ	GAGTGTGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG- ----- TCAGACGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----ATG ATG--- A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TDJL	GAGTGTAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC A-G----- TCAGACGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----ATG ATG-----A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TDRH	GAGTGTAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCA- ---G----- TCAGACGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----ATG ATG-----A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TDXZ	GAGTGTAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG- ----- TCMAAACGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----ATG ATG--- A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TBYBL	GAGTGTAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAG- ----- TCMAAACGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA- ATG ATG--- A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TBGR	---GAG AGCGC-A----- GGA----- GCAGTGTGA TACGT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----AAG ATG-----A ATT--CGT-- --TCGTCTAG 240
TBOLR	GCAAGACCCA AGAATCAAA GATCGAAAGC ATACCGGACA ATCTGAAA GAGCTTGCT CCGCGAAGC AGATCAAGT GTCTCTCGC ATTTTCACG ATCAATATC GATGCTCTAG 240
TBREV	GCCTTTGAC- -GTCG CTTTAAACA TTA----- GCAA----- -G- AAACCAAAA AAA-----G ATG----- ATTC-- GTCTCTAG 240
TCDF	-----G AGACT-GTCG CAG----- GCA----- GTG-TG--A TACGT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----TTG ATG-----A ATT--CGT-- --TCGTCTAG 240
TCORD	-CTCTCTCG CCAACTGT-- -A----- GCAGTGTGA TACGT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA GAA----AAG ATG-----A ATTC--GT TCCTCTAG 240
TDEION	-----AGA GAGAGCTTG ATCTGGCGC TC----- TGTCGC-TA TCTCT-TGCT -GCTCTCT- -----CAGG AGA-----GTA GTA-----T A GCA-GT-- GTCTCTAG- 240
TECN	-AGAG-AGAG AGTGC-GCGA GACT-GT-GC GTA----- GCAGTGTGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----AAG ATG -A ATT--CGT-- --TCGTCTAG 240
TEMBER	GCACGTCCGC TTAACGAAA CGCAGAAAA AAG----- ATGAATTGC TTCTG-CTAG -CTCGCA- GCGCGTTAC CGC---TTG GAG-----A GTTCTGT-- GGTGCTCTAG 240
TKAY	TGATCTGGC GCTCTGTCT CTCT-ACCAC CCA----- CCACACTA TCTCT-TGCT -GCTCTG AGAGG-GAGT ATA---GCA GAG-----T CTGCTGT GTCTCTAG 240
TNDB	TGCTCTCTCA CTCACTCACT CGTTGAGAG GAG----- AGACAGA CAGCT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----AAG ATG-----A ATTCTGT-- --TCGTCTAG 240
TOCN	-AGTTTAGAG AGACT-GTAG CAG ---AGT----- GTGATGT-A TACGT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----AAG ATG-----A ATT--CGT-- --TCGTCTAG 240
TOLE	TGATCTGGC GCTCTGTCT GGCACAGCAG ----- -A-CAC-TA TCTCT-TGCT --CTCTCA -GAGT ATA---GCA GTG---T GTCTGTCT-- GTCTCTAG- 240
TPLAT	-----GAGCAGCAG AGAAGTGTGT ATA----- GCAGTGTGA TACGT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA GAA----AAG ATG-----A ATTC--GT-- --TCGTCTAG 240
TPRAT	TCTCTCGCT TTCTTCTCT TCCCGACTAG TAG----- GCGAGA-AG AGAG-AGAA -GAGAAGA- -----GAAA AGA---GAG AAG-----A GAGTATAG-- CAGTGTGA- 240
TPRET	TGATCTGGC GCTCTGTCT GGCACA-CAC ----- -AACAC-CG TCTCT-TGCT --CTCTCA- -GAGT ATA---GCA GTG---T GTCTGTGT GC TGCGA-- 240
TSATH	GAGAGAGAGA GAGAGCTTG ATCTGGCGC TCG----- TGTCAC-TA TCTCT-TGCT -GCTCTCT- -----CAGA GTA---GTA GTA-----T A-GCA-GT- GTCTG A- 240
TSIB	-AGTTTAGAG AGACT-GTAG CCA ----- CCA----- GTG-TG--A TACGT-CGCC --TCAAACG- AAACCAAGA AAA----AAG ATG-----A ATT--CGT-- --TCGTCTAG 240
TTURK	-----GA AGTGT-ATA- ---GC AGT----- GTGATATGA TACGT-CGCC --TCAAACG- GACACCAAGA CAA----AAG ATG-----A ATT--CGT-- --TCGTCTAG 240
USCANA	GCTCGCTTGC TCTTCGTTT CTCTC-CTCG CTGCGCTCG CTGAAATAA CGTCTGCGC TAACA--CCT AGCCCGGAC AAGTCGAAAG AGCGGAGCA AT---GAGC ATAAAAAGA 240
TDCHA	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--TT---CG -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT-CTGC- 360
TDGZ	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--TT---CG -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT-CTGC- 360
TDJL	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--TT---CG -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT-CTGC- 360
TDRH	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--TT---CG -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT-CTGC- 360
TDXZ	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--TT---CG -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT-CTGC- 360
TBYBL	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--TT---CG -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT-CTGC- 360
TBGR	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--CT-CGCC----- -TGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCTG-- 360
TBOLR	C-TGGCGCG- GCGCGACT CTCTTGAGA ATGACATCA TCCACCGCA CTGTGCTG TGCTGTGAA TTCCGATG TGCT-CTGC AGTCCGGAG CTC-TTTCG 360
TBREV	C-TGGCGCG- GCGCGC-AC CACTTGAGA G-A----- -TTCG-CGCC TGAGATTT-----CA TTTCAGA--- -CGTCTG GATCTCGA TTG-TGTC 360
TCDF	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--G-----CG AGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCGA 360
TCORD	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--G-----CG AGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCGA 360
TDEION	CAGCTCGCT -CAAACGAAA CGCA AGAGA A--AAGATGA ATAG CGTT CGTCTGCTG -CGCGCG CG--C-TTA CGCTTGAG AGTACTCG TGCT--AAA 360
TECN	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--G-----CG AGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCG-- 360
TEMBER	G CAGAGA GACACTTAG CACTCTGTCT T CGCTCT CTGA GCTT GCGCGCGCG GCGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT CTGA 360
TKAY	CAGCTCGCT -CAAACGAT TGCA-AGAGA A--AAGAGA ----- ATC--CGTT CGTCTGCTG -CGCGCG CG--CGCTTA CGCTTGAG AGTACTCG TGCGTTAA 360
TNDB	C-TGGCGCG- -CGCGCG-T CTTACCGCA G--GTGAGA ----- GTCCT-CGTT CGC----- -CGAGAG CTTCCGATG TCTCTGTCG CGTC--GAGT--CGCGA 360
TOCN	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--G-----CG AGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCG-- 360
TOLE	CAGCTCGCT -CAAACGAAA CGCA-AGAGA A--AAGATGA ATAG-CGTT CGTCTGCTG -CGCGCG CG--C-TTA CGCTTGAG AGTACTCG TGCT--AAA 360
TPLAT	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGG -GTG-CT----- CTGCG -TGTAAGCG -CGAGA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTT CTGC 360
TPRAT	CAGCTCGCT -CAAACGAAA AGCA-AGAGA A--AAGATGA ----- ATT--CGTT CGTCTGCTG -CGAGCG CG--C-TTA CGCTTGAG AGTACTCG TGCT--AGA 360
TPRET	CAGCTCGCT -CAAACGAAA CGCA-AGAGA A--AAGATGA ----- ATAG-CGTT CGTCTGCTG -CGCGCG CG--C-TTA CGCTTGAG AGTACTCG TGCT--AAA 360
TSATH	CAGCTCGCT -CAAACGAAA CGCA-AGAGA A--AAGATGA ----- ATAG-CGTT CGTCTGCTG -CGCGCG CG--C-TTA CGCTTGAG AGTACTCG TGCT--AAA 360
TSIB	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--G-----CG AGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCG-- 360
TTURK	C-TGGCGCG- -CGCGCTTAC CGCTTGAGA ---GTA--- -CTCG--CT-CGCC----- -CGAGTA CTTCCGATG TCTCTGTCG AGTCCGGAG CTTCTCG 360
USCANA	CAGCTCTGA ATGAGATA CACTT -CGAACCCA -CAGCTGA GAGAGCG -GCGC-TCTGATA ACTTGCTG T--CG AGTCTGAG CTTCTCTG 360

TDCHA -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCT -- ----CTTAA 480

TDGZ -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCT -- ----CTTAA 480

TDJL -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCT----CTTAA 480

TDRH -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCT----CTTAA 480

TDXZ -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCT----CTTAA 480

TDYBL -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCT----CTTAA 480

TBGR AC TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCTTTT TT-TAAAGC AGACACAC 480

TBOUR AGCGGACCGA CXTCTAGAAC GATTG--GCT CXTCCAGAG TTGATTAGCG GCGCGGAATG CGTGTGTCTT GGTGTGATCG GATGCTGTGA ATATCATGCT GCACTGTGAC TTGCTGTCTT 480

TBREV GTCCAGTCCG TGAGCTCTTT GCGAG-AGCG GACCGACGAG TCTTGACGAA TTGAGGCTTG TCCATGCTG TG-TGATTGA AGCGCGCGC GC----- 480

TDNF CACGA-CTAC TGTGTGAGTC GAGCACAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCTTTGT -----TGT 480

TDORD -----CTAC TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TTATGGA AGCGCGCGC -CGTGAT-- GTATATGCTT ATATGCTG- 480

TDEION AGCGGCG-- GAGTACTTCC GATGCTCTCG CTTTGTGAGT CCGGA-GCT TGTGTGTCTG TCGAGCAGCG GA-CGGAT-T GTCACTTAAC GATCAGGCTC GTTCATGATT -CG-GTACAC 480

TECN -----AC TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCTGTGG TC T CTT TTGT-TTAA 480

TEMBER -----C TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TAATGA AGCGCGCGC GTTTTACAC GAACACAC GCACACAC 480

TKAY AGCGGCGCGC GAGTACTTCC GATGCTCTCG CGT-CGAGT- CCGGA-GCT TGTGTGTCTG TCGAGCAGCG GA-C-GAC-T GCACTTACAC GATCAGGCTC GTTCATGATT AG-GTACAT 480

TNUB -----GCTTC TCTTT--TG GA-CGAGCG GACCGATTC- TCAGTACA-- ----CGAG ATCA----C GA-TCTTTG GCGCGCGC A- - -C ACACACAC ACAGCT---- 480

TDEN -AGCT-TCAC TGT-----C GAGC-CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TCATTGA AGCGCGCGC GCGGCTTTAC GAACACAC GCACACAC 480

TOLE AGCGGCG-- GAGTACTTCC GATGCTCTCG CTTTGTGAGT- CCGGA-GCT TGTGTGTCTG TCGAGCAGCG GA-CGGA-C GTCACTTACAC GATCAGGCTC GTTCATGATT -CG-GTACAC 480

TPLAT -----C- TGTGTGAG-- ----CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TTACTGA AGCGCGCGC GCGGCTCT-T ATACTGTAT GTATGTGA- 480

TPRAT AGCGGCG-- GAGTACTTCC GATGCTCTCG CGT-CGAGT- CCGGA-GCT TGTGTGTCTG TCGAGCAGCG GA-CGAGCT GTGCTGTGAC GATCAGGCTC GTTCATGATT -CG-GTCA- 480

TPRET AGCGGCG - GAGTACTTCC GATGCTCTCG CTTTGTGAGT- CCGGA-GCT TGTGTGTCTG TCGAGCAGCG GA-CGAC-T GTCACTTACAC GATCAGGCTC GTTCATGATT CG GTACAC 480

TSATH AGCGGCG - GAGTACTTCC GATGCTCTCG CTTTGTGAGT- CCGGA-GCT TGTGTGTCTG TCGAGCAGCG GA-CGAA-T GTCACTTAAC GATCAGGCTC GTTCATGATT -CG-GTACAC 480

TSIB AC----TAC TGT-----C GAGC-CAGCG GACCGACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCAT GATC GG-TAATGA AGCGCGCGC GCGGCTTTAC GCACACGAC GCACACTGCT 480

TTURK -----AC TGTGTGAG-- ----CAGCG GAGTACGT- CTAGCACAGC ATCAGGCTCG TCCATGATTC GG-TAATGA AGCGCGCGC -ATCACTTTT - - -ACA----- 480

USCANA AATGCGTGG-- --AAAAAGCG GACCGACGTC C-TTACCTCG TTGATGCG-A ATAGGCTGCG TCGGTGATAC SATCTCTGA CTTCGTGATT GTATTTCTC AAAAC-TTC GTTGTGTCT 480

TDCHA TCAACG-----GCGG----- -GCTAGCT-- CGAA--A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TDGZ TCGACG-----GCGG----- -GCTAGCT-- CGAA-----A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TDJL TCGACG-----GCGG----- -GCTAGCT-- CGAA--A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TDRH TCGACG-- -- --GCGG----- -GCTAGCT-- CGAA-----A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TDXZ TCGACG-----GCGG----- -GCTAGCT-- CGAA--A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TDYBL TCGACG-----GCGG----- -GCTAGCT-- CGAA-----A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TBGR CGTGTGTGC- GCTTTATTA AGA-AAAATG GCTAGCTCGA A-----TTT TTGCTGTG-- --A-CGAG TC-----TTT TTCTCGAT 568

TBOUR TCTGTCTTGC GACGCT-TCG CCAACAGCGC GTCAACCGC GTCTCTTTT CGTCACTTTT TTAATCCAA CGATCTTGA TTCTCGAT 568

TBREV ----AGGGC TAGC- TCG TACAACCAAA ATT----- -CTGATTCT T- -- --TTGG--CG-- -----TT TTCTCGAT 568

TDNF TGGG-----GTTGTATCA -ACAACA GCAGCAGC- AGCAAAATGG CTAGCTCGAA CGAA--GAA CGAGTCTCTT TTCTCGAT 568

TDORD ----- --TATAT-A T--ATAATG GCTAGCTCGA ATTT----- TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TDEION TA-GAAAG-C--GCGCG-CG CG-CGTATT -TTTATAA- -ATAATG-GC CAGCTCGAAC AACA--AC-- -GAGTCTTTT TTCTCGAT 568

TECN CGAAGC-AA- AGTAGGT- --A-ACGAGC GCTAGCTCGA AGCT--TTT TTGCTGAA-- --A-CGAG TC-----TTT --CTCGAT 568

TEMBER TGTGTGTC-- --TGTGTG TGTGTGTG-- -TGTAAT GCTAGCT- -CGATC--A TTGG--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TKAY TGTGAAAGC -GCGCG-CG GCGCGCGCG -TTTATCAT TATGCTGTGG CAGCTCGAAT AAGC--G-AA CGAGTCTTTT TTCTCGAT 568

TNUB ----- --TTGG TGT-- -TG GCTAGCTCG- --TACATTA CA -CGGA- -----AA TGA-TCTTTT TTCTCGAT 568

TDEN -GCACACACT CTTTGTCTG TGTGTCTCT CTTTGTAGCT ATCAAAATGG CTAGCTCGAA GTTG--TGAA CGAGTCTTTT TTCTCGAT 568

TOLE TA-GAAAGC -GCGCG-CG CG-----CTA -TTTAT-- AGCT--G-GC TAGCTCGAAC AACA--AC-- -GAGTCTTTT TTCTCGAT 568

TPLAT ----- --CTGTTA A -CAAAAG CTAAGCTCG ATCT----- CT-G--TGAA TGAATCTTTT TTCTCGAT 568

TPRAT TA-GAAAGC -GCGCG-CG CGGA-----TTAT-- --TG-GC CAGCTCGAGC GACA--AT -GAGTCTTTT TTCTCGAT 568

TPRET TA-GAAAGC -GCGCG-CG CTTCTGTCTA -TTTATAT AGCTTG-GC TAGCTCGAAC AACA--ACAA CGATCTTTT TTCTCGAT 568

TSATH TA-GAAAGC -GCGCG-CG CG-CGCTA -TTTATAG- --TAATG-GC CAGCTCGAAC AACA--AC-- -GA-TCTTTT TTCTCGAT 568

TSIB TGTGTGTGTC TGTGTGTG TATCAAAATG GCTAGCTCGA AGCTCTCTG TTAAAT-GCA GCTG--AA CGAGTCTTTC TTCTCGAT 568

TTURK ----- --TTGG TGT-- -TG GCTAGCTCGA A-----TTT TTG-CTGA-- --A-CGAG TC-----TTT --CTCGAT 568

USCANA CTTGTCTTT CTTGTGTG- CATTCGCGTG ATGAATAAA TTTTGTGATG AGGACTCAG AGCAGC-AAA CAA--TGGA TCGCGAA 568

图1 赤眼蜂属不同种及地理种群(外群: 尤氏赤眼蜂) ITS2 排序图

Fig. 1 ITS2 alignment of different *Trichogramma* species and populations (outgroup: *Uscana semifumipennis*)

“-”表示核苷酸缺失 A dash indicates absence

表 2 不同赤眼蜂种及地理种群基于 ITS2 序列的进化分歧 (Tamura-Nei 模型)
Table 2 Evolutionary divergence of different *Trichogramma* species and populations based on ITS2 sequences (Tamura-Nei model)

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]
[1]	—																								
[2]	0.002	—																							
[3]	0.010	0.007	—																						
[4]	0.007	0.005	0.002	—																					
[5]	0.012	0.010	0.007	0.007	—																				
[6]	0.010	0.007	0.007	0.007	0.002	—																			
[7]	0.162	0.162	0.168	0.165	0.158	0.158	—																		
[8]	0.657	0.657	0.647	0.649	0.668	0.668	0.747	—																	
[9]	0.462	0.462	0.481	0.475	0.446	0.453	0.484	0.905	—																
[10]	0.174	0.171	0.178	0.171	0.158	0.158	0.149	0.726	0.530	—															
[11]	0.299	0.299	0.303	0.298	0.295	0.290	0.258	0.970	0.541	0.290	—														
[12]	0.956	0.956	0.949	0.956	0.962	0.962	1.049	1.166	0.932	1.059	1.268	—													
[13]	0.178	0.181	0.171	0.172	0.162	0.166	0.115	0.782	0.516	0.180	0.292	1.198	—												
[14]	0.333	0.329	0.314	0.310	0.313	0.317	0.428	0.967	0.837	0.390	0.626	1.053	0.520	—											
[15]	0.980	0.981	0.970	0.964	0.965	0.965	1.007	1.116	0.982	1.010	1.240	0.162	1.168	1.046	—										
[16]	0.465	0.465	0.472	0.467	0.464	0.458	0.416	0.885	0.673	0.484	0.484	0.918	0.520	0.740	0.913	—									
[17]	0.159	0.159	0.154	0.158	0.147	0.147	0.191	0.789	0.530	0.103	0.349	1.043	0.198	0.368	1.031	0.487	—								
[18]	1.090	1.090	1.101	1.098	1.082	1.082	1.154	1.202	0.915	1.190	1.260	0.106	1.314	1.123	0.112	0.898	1.196	—							
[19]	0.168	0.168	0.180	0.174	0.160	0.156	0.169	0.712	0.503	0.189	0.233	1.108	0.218	0.428	1.091	0.472	0.241	1.168	—						
[20]	0.821	0.821	0.850	0.828	0.839	0.829	0.857	1.035	0.962	0.855	1.173	0.248	0.984	0.897	0.340	0.954	0.881	0.257	0.879	—					
[21]	1.047	1.047	1.056	1.054	1.039	1.039	1.193	1.230	0.922	1.201	1.246	0.122	1.309	1.073	0.123	0.915	1.222	0.020	1.170	0.262	—				
[22]	0.927	0.927	0.943	0.949	0.929	0.919	1.052	1.166	0.946	1.058	1.218	0.025	1.213	1.038	0.199	0.963	1.081	0.113	1.058	0.314	0.126	—			
[23]	0.193	0.193	0.188	0.189	0.174	0.174	0.180	0.808	0.500	0.146	0.300	1.132	0.217	0.446	1.050	0.491	0.145	1.130	0.208	0.879	1.131	1.147	—		
[24]	0.168	0.168	0.174	0.171	0.162	0.162	0.061	0.683	0.490	0.174	0.270	0.974	0.127	0.397	0.995	0.453	0.167	1.041	0.170	0.789	1.066	0.973	0.147	—	
[25]	1.144	1.144	1.129	1.140	1.118	1.117	1.366	1.235	1.317	1.153	1.050	1.312	1.406	1.166	1.211	1.311	1.216	1.388	1.191	1.607	1.393	1.314	1.252	1.084	—

[1] *T. dendrolimi* CHA; [2] *T. dendrolimi* GZ; [3] *T. dendrolimi* JL; [4] *T. dendrolimi* RH; [5] *T. dendrolimi* XZ; [6] *T. dendrolimi* YBL; [7] *T. brassicae*; [8] *T. bouraruchae*; [9] *T. brevicapillum*; [10] *T. chilonis*; [11] *T. cordubensis*; [12] *T. deion*; [13] *T. evanescens*; [14] *T. embryophagum*; [15] *T. kaykai*; [16] *T. nubilale*; [17] *T. ostrinae*; [18] *T. oleae*; [19] *T. plataneri*; [20] *T. prati*; [21] *T. pretiosum*; [22] *T. satton*; [23] *T. sibiricum*; [24] *T. turkestanica*; [25] *Uscana* sp.

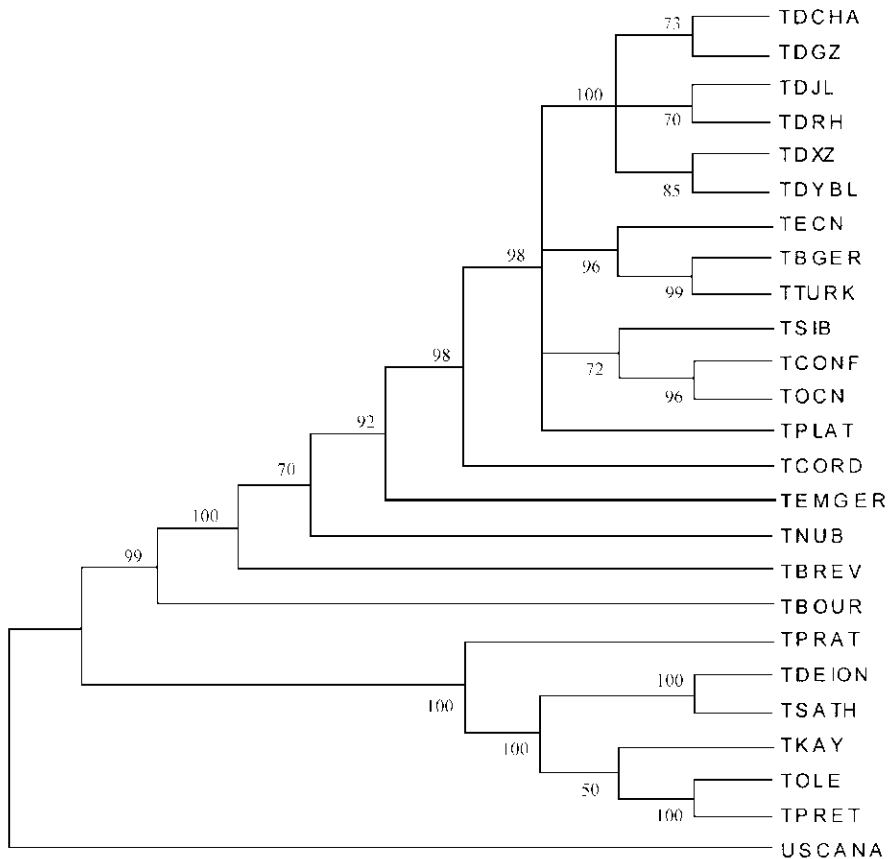


图2 采用MEGA的UPGMA算法推定的赤眼蜂分子系统进化树(尤氏赤眼蜂属作外群,进化距离采用Tamura-Nei模型计算)
Fig. 2 UPGMA tree of *Trichogramma* spp. (outgroup: *Uscana semifumipennis*) obtained by Tamura-Nei model of MEGA. 1 000 bootstrap replicates. Transitions and transversions are equally weighted.

TDCHA = *T. dendrolimi* CHA; TDGZ = *T. dendrolimi* GZ; TDJL = *T. dendrolimi* JL; TDRH = *T. dendrolimi* RH; TDZX = *T. dendrolimi* XZ;
TDYBL = *T. dendrolimi* YBL; TBGER = *T. brassicae*; TBOUR = *T. bourarachae*; TBREV = *T. brevicapillum*; TCONF = *T. confusum*;
TCORD = *T. cordubensis*; TDEION = *T. deion*; TECN = *T. evanescens*; TEMGER = *T. embryophagum*; TKAY = *T. kaykai*; TNUB = *T. nubilale*;
TOCN = *T. ostrinae*; TOLE = *T. oleae*; TPLAT = *T. platneri*; TPRAT = *T. pratti*; TPRET = *T. pretiosum*; TSATH = *T. sathon*;
TSIB = *T. sibericum*; TTURK = *T. turkestanica*; USCANA = *Uscana* sp.

2.3 讨论

为构建赤眼蜂快速鉴定和检测的技术方法,本研究通过克隆测序,获得了国内外多种赤眼蜂及我国松毛虫赤眼蜂6个地理种群的ITS2全序列(所测定的16条序列均被GenBank收录),评价了rDNA-ITS2序列在赤眼蜂属不同种系统进化研究中的作用,探讨了ITS2序列在属间、种间和种内(同种不同地理种群间)的遗传差异。考虑到不同的建树方法以及不同的进化距离计算模型具有不同的假定,本研究分别采用了目前常用的各种算法进行进化距离计算和建树(本文只列出Tamura-Nei距离和UPGMA方法所获得的经过1 000次Bootstrap重复检验的进化树),结果发现不同的算法获得的进化树基本相同,即将目标类群聚类成11个进化支:(1)

尤氏赤眼蜂;(2)松毛虫赤眼蜂的6个地理种群;(3) *T. bourarachae*; (4) *T. brevicapillum*; (5) *T. nubilale*; (6) *T. embryophagum*; (7) *T. cordubensis*; (8) *T. platneri*; (9) *T. evanescens*, *T. brassicae*, *T. turkestanica*; (10) *T. sibericum*, *T. confusum*, *T. ostrinae*; (11) *T. pratti*, *T. deion*, *T. sathon*, *T. kaykai*, *T. oleae*, *T. pretiosum*。本研究将来自不同属的种类作外群,而将同一种的不同地理种群作种级标准,与其它赤眼蜂属不同种类同时进行聚类,作者认为该聚类结果将能较好地反映赤眼蜂属不同种之间的系统进化关系。从进化树可以看出,ITS2不能将后三群区分开,说明同一群内的种类缘系较近。若能采用多种不同分子标记,并弄清不同赤眼蜂种类的来源,将有助于阐明目标类

群之间的亲缘关系及生物地理学关系。

从 ITS2 排序图和进化距离数据矩阵表可以看出,同一种(松毛虫赤眼蜂)的不同地理种群的 ITS2 序列相当保守(进化距离小于 2%)。这表明若要根据 ITS2 序列鉴别种下阶元是不可行的。赤眼蜂属不同种类之间的进化分歧变动范围较大,但至少在 15% 以上。因此 ITS2 序列可以作为赤眼蜂种一级水平分类的重要靶标,因为我们可以同时利用 ITS2 序列在赤眼蜂种下阶元的保守性和赤眼蜂种间的序列差异设计蜂种特异引物,并通过 PCR 扩增,最终实现对赤眼蜂种的快速鉴定和检测。

传统的系统发育分析主要依赖于物种的生物学特性、生物形态及生物地理信息等,但物种间可供比较的形态学性状是有限的,同时由于进化趋同,不同物种可能表现出相同的形态特征,因此近年来分子标记技术已成为物种鉴定的重要辅助工具。然而,在物种鉴定和不同种类间的系统进化关系分析中,采用何种分子标记以及何种分析方法需要谨慎对待。真核细胞 rDNA 有几十甚至数千个拷贝,它同时具有多变区和保守区,能够分别反映早期及近期进化事件,较适合于系统发育分析。

致谢 本研究承蒙北京市农林科学院生物防治科研中试基地王素琴、张帆、王兵提供大部分赤眼蜂虫源和样品,福建农林大学生物防治研究所林乃铨教授鉴定部分赤眼蜂样品,中国农业科学院植物保护研究所及联邦德国农林生物研究中心生物防治研究所 Hassan 博士提供食胚赤眼蜂虫源,特表谢忱!

参 考 文 献 (References)

Campbell B C, Steffen-Campbell J D, Werren J H, 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.*, 2: 225–237.

Carbone I, Kohn L, 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*, 85: 15–427.

Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H, Jensen K B, 1994. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome*, 37: 112–120.

Jukes T H, Cantor C R, 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro H N ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press. 21–132.

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111–120.

Kumar S, Tamura K, Nei M, 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genet-

ics Analysis. Pennsylvania State University, University Park, PA.

Landry B S, Dextraze L, Boivin G, 1993. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control program of phytophagous insects. *Genome*, 36: 580–587.

Li Z X, Shen Z R, 2001. rDNA-ITS2 sequencing and species-specific primer designing for *Trichogramma*. *Chinese J. Biol. Contr.*, 17 (2): 75–80. [李正西, 沈佐锐, 2001. 赤眼蜂 rDNA-ITS2 克隆测序及蜂种特异引物设计. 中国生物防治, 17 (2): 75–80]

Nagarkatti S, Nagaraja H, 1971. Redescription of some known species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), showing the importance of the male genitalia as a diagnostic character. *Bull. Entomol. Res.*, 61: 13–21.

Nagarkatti S, Nagaraja H, 1977. Biosystematics of Trichogrammatoidea species. *Annu. Rev. Entomol.*, 22: 157–176.

Nei M, Kumar S, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.

Pang X F, 1999. Reassessment on taxonomic status of some species of *Trichogramma*. *Proceedings of National Symposium on Trichogramma*. Changchun. [庞雄飞, 1999. 赤眼蜂属一些种名的商榷. 全国赤眼蜂学术讨论会论文集. 长春]

Pinto J D, Stouthamer R, 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: Wajnberg E, Hassan S A eds. *Biological Control with Egg Parasitoids*. England: CAB Intl. 1–36.

Pinto J D, Stouthamer R, Platner G R, Oatman E R, 1991. Variation in reproductive compatibility in *Trichogramma* and its taxonomic significance (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 84: 37–46.

Pinto J D, Stouthamer R, Platner G R, 1997. A new cryptic species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) from the Mojave desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 99: 238–247.

Pintureau B, 1993. Enzymatic analysis of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Europe. *Entomophaga*, 38: 411–431.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T M eds. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. CSH Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. [J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社. 1993]

Schilthuisen M, Stouthamer R, 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 264: 361–366.

Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512–526.

van Kan F J P M, Silva I M M S, Schilthuisen M, Pinto J D, Stouthamer R, 1996. Use of DNA-based methods for the identification of minute wasps of the genus *Trichogramma*. *Proc. Exper. Appl. Entomol.*, 7: 233–237.