



安仕博, 陈旭, 戴鹏, 侯洋旻, 臧连生. 基于微卫星引物鉴别不同地理种群玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (2): 414–421.

基于微卫星引物鉴别不同地理种群玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂

安仕博¹, 陈旭², 戴鹏¹, 侯洋旻¹, 臧连生^{1, 2*}

(1. 吉林农业大学生物防治研究所, 长春 130118; 2. 贵州大学绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 不同地理种群的赤眼蜂在遗传、生理和生态适应性等方面均表现出不同程度的分化。为探究不同地理种群的玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostrinae* 和螟黄赤眼蜂 *Trichogramma chilonis* 在基因型上的差异并进行准确鉴定, 本研究筛选了可用以区分不同地理种群玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂的微卫星引物。结果表明: 从已报道的 10 对微卫星引物中, 筛选出 2 对引物 (序列号: KT834825, KT834827) 可以区分玉米螟赤眼蜂中的黑龙江地理种群与吉林和辽宁两个地理种群; 并筛选出 2 对引物 (序列号: KT834822, KT834825) 可以区分黑龙江、贵州和广东 3 个不同地理种群的螟黄赤眼蜂。该结果进一步证实赤眼蜂不同地理种群间可能存在明显的基因型差异, 研究结果为精准鉴别玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂不同地理种群, 以及进一步探寻优势种群的高效繁育与应用技术奠定了理论基础。

关键词: 玉米螟赤眼蜂; 螟黄赤眼蜂; 微卫星标记; 地理种群; 引物筛选

中图分类号: Q968.1; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 02-0414-08

Identification of different geographical populations of *Trichogramma ostrinae* and *Trichogramma chilonis* based on microsatellite primers

AN Shi-Bo¹, CHEN Xu², DAI Peng¹, HOU Yang-Yang¹, ZANG Lian-Sheng^{1, 2*} (1. Institute of Biological Control, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory of Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Different geographical populations of *Trichogramma* parasitoids have differentiation in genetic, physiological and ecological adaptability aspects. In order to explore the genotypic differences and accurate identification of different geographical populations of *Trichogramma ostrinae* and *Trichogramma chilonis*, microsatellite primers were screened to distinguish them. The results showed that: Two pairs of primers (sequence number: KT834825, KT834827) were selected from 10 pairs of microsatellite primers, which could distinguish Heilongjiang population and Jilin (or Liaoning) populations of *T. ostrinae*; and two pairs of primers (sequence number: KT834822, KT834825) could distinguish the three geographical population of *T. chilonis* from Heilongjiang, Guizhou and Guangdong Provinces. The results further confirmed that there may be significant genotypic differences among different geographical populations of *Trichogramma*. The results provided a theoretical foundation for accurate identification of different geographical populations of *T. ostrinae* and *T. chilonis*, and further exploration of efficient breeding and application technology of dominant populations.

Key words: *Trichogramma ostrinae*; *Trichogramma chilonis*; SSR marker; geographic population; primer screening

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0300105); 国家自然科学基金 (31901946)

作者简介: 安仕博, 男, 1996 年生, 吉林延吉人, 硕士研究生, 研究方向为害虫生物防治, E-mail: 550216230@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 臧连生, 博士, 研究员, 研究方向为害虫生物防治, E-mail: lsz0415@163.com

收稿日期 Received: 2021-01-24; 接受日期 Accepted: 2021-05-17

赤眼蜂 *Trichogramma* spp. 属膜翅目小蜂总科赤眼蜂科,是现代农林害虫生物防治上应用范围最广、防治效果最好的天敌昆虫 (Smith, 1996)。目前已被广泛应用于玉米 *Zea mays* L.、水稻 *Oryza sativa* L.、果蔬等多种农林害虫的防控,并且表现出很好的生物防治潜能 (何晓芳等, 2005; 张俊杰等, 2015; Zang *et al.*, 2021)。赤眼蜂属种类繁多,已报道有 200 余种,其寄主范围广泛,对鳞翅目农林害虫的防治效果尤为显著 (邱益三, 1978; 李丽英, 1984; Pinto, 1999)。其中,玉米螟赤眼蜂 *Trichogramma ostrinae* 和螟黄赤眼蜂 *Trichogramma chilonis* 作为寄生亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 卵的优势蜂种,是影响玉米螟种群消长的重要天敌因素 (张荆等, 1990; 袁佳等, 2011)。目前,在我国东北地区,每年约有 550 万 ha 的玉米田使用玉米螟赤眼蜂、螟黄赤眼蜂和其他赤眼蜂蜂种来防治亚洲玉米螟 (Wang *et al.*, 2014)。

赤眼蜂种类和品系的选择是影响其田间防效的重要因素 (王振营和周大荣, 1995; Hassan *et al.*, 2004; Chailleux *et al.*, 2012),其不同地理种群间生物学和生态适应性常存在较大差异,且具有丰富的遗传多态性。为有效开发利用优势种群、监测田间种群、避免赤眼蜂人工繁育中的蜂种混杂以及追踪并评估其田间释放后的防控效果,赤眼蜂的鉴定无疑是至关重要的 (Stouthamer, 2006)。赤眼蜂的鉴定方法主要包括形态学鉴定和分子生物学鉴定。由于体型小,且近似种间形态十分相近,这些因素给赤眼蜂的鉴定,尤其对于种内的不同地理种群的区分带来困难。因此,目前赤眼蜂不同地理种群的区分,主要靠分子手段来实现 (严智超等, 2020)。

由于赤眼蜂基因组基因数目庞大,进行全面的序列分析很难实现,需要利用 DNA 分子标记,对基因组中个别特征基因片段进行重点研究,因此选择合适的分子标记片段是赤眼蜂分子鉴定及地理种群鉴别中关键所在。目前在昆虫系统学研究中采用的 DNA 分子标记有微卫星 DNA、核糖体 DNA 和线粒体 DNA (余道坚等, 2003)。微卫星 (Simple sequence repeat, SSR), 又称简单重复序列,是以 1~6 bp 核苷酸为重复单位的特殊序列。近年来,随着分子标记技术的不断发展,由于 SSR 在基因组中表现出高度的长度多态性和丰富的信息含量,以及杂合性高、侧翼基因保守且操作简单等特点,被应用于赤眼蜂分子鉴定研究中 (代

金霞, 2005; 瞿陆峰等, 2010; 柳莹等, 2014), 如 Lü and Han (2016) 发现松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura 的 26 个多态性微卫星标记,用于分析松毛虫赤眼蜂的遗传变异, Pizzol 等 (2005) 利用 SSR 分子标记区分突尼斯和法国不同地理种群的卷蛾赤眼蜂 *Trichogramma cacoeciae* Maechal。本研究基于微卫星标记技术,筛选出能够快速区分不同地理种群玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂的微卫星引物,为赤眼蜂种类和品系的选择提供高效检测手段和有力依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2018 年在黑龙江省、吉林省、辽宁省、广东省和贵州省等地的玉米田中采集被寄生的玉米螟卵块,待寄生的赤眼蜂羽化后根据雄性外生殖器特征鉴定 (庞雄飞, 1985),共采集到 3 种不同地理种群的玉米螟赤眼蜂和 3 种不同地理种群的螟黄赤眼蜂,分别是黑龙江玉米螟赤眼蜂 (HLJ-To)、吉林玉米螟赤眼蜂 (JL-To)、辽宁玉米螟赤眼蜂 (LN-To)、贵州螟黄赤眼蜂 (GZ-Tc)、黑龙江螟黄赤眼蜂 (HLJ-Tc) 和广东螟黄赤眼蜂 (GD-Tc)。将采集到的蜂种在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 $70\% \pm 5\%$ 的条件下,以紫外光照射 30 min 杀胚处理过的新鲜米蛾 *Corcyra cephalonica* Stainton 卵作为中间寄主连续繁育 3 代,后转接玉米螟卵繁育 1 代进行复壮。

1.2 主要试剂和仪器

无菌水、CTAB 试剂、核酸助沉剂、蛋白酶 K、氯仿、异戊醇、无水乙醇、TE 缓冲液、DNA Marker、丙烯酰胺、二甲丙烯酰胺和 TBE 缓冲液等试剂均采购于上海生工生物工程有限公司,所用 SSR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

所用仪器有组织细胞破碎仪 (杰灵 TP-24)、高速低温离心机 (Eppendorf 5430R)、干式恒温器 (杭州瑞诚 DH100-4)、PCR 仪 (Eppendorf 6333)、电泳仪 (BIO-RAD 1645070)、垂直电泳槽 (北京君意 JY-JX5L)、超微量核酸蛋白测定仪 (德国耶拿 ScanDrop2)、水平摇床 (北京六一 WD-9405D) 和胶片观察灯 (北京六一 WD-9406)。

1.3 试验方法

1.3.1 赤眼蜂 DNA 的提取

参照 CTAB 法 (Doyle and Doyle, 1987) 提取

赤眼蜂 DNA，并进行改进，选取各地理种群赤眼蜂的成蜂，将单头赤眼蜂放入 1.5 mL 离心管中，加入 100 μ L 2% CTAB 溶液和适量研磨珠，放入研磨机中进行研磨 (speed: 3, time: 50 s)，取出后每个离心管中加入 2.5 μ L 蛋白酶 K，55 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。水浴完成后加入 100 μ L 氯仿异戊醇 (氯仿:异戊醇 = 24:1) 充分混匀，4 $^{\circ}$ C 离心 10 min，取出后抽取上清液 80 μ L，加入 160 μ L 无水乙醇和 2.5 μ L 核酸助沉剂，置于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 2 h，取出后 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，弃掉上清液，金属浴烤干后加入 30 μ L TE 缓冲液进行溶解，使用 ScanDrop2 检测 DNA 浓度和纯度，并于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.2 SSR 引物的筛选

本研究所采用的微卫星引物均从玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂的近缘物种松毛虫赤眼蜂 *Trichogramma dendrolimi* Matsumura (Lü and Han, 2016) 开发的引物中进行选取，从中筛选出 10 对引物分别对玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂 DNA 样本

进行 PCR 扩增，引物序列详见表 1。

1.3.3 PCR 反应

PCR 反应体系为 25 μ L: 提取的各地理种群赤眼蜂的 DNA 1 μ L，上下游引物各 0.5 μ L，2 \times Taq MasterMix 12.5 μ L，无菌水 10.5 μ L。PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，54 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s，共 35 个循环，72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增后，产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶法，将胶板固定在电泳槽中，缓慢加入 1 \times TBE 至没过胶面，用移液器分别吸取 0.5 μ L 样品加入点样孔中。在 500 V/20 A 恒压条件下电泳 60 ~ 90 min，银染显影 3 ~ 5 min 后拍照，用 Gene Mapper v4.0 (Applied Biosystems, CA, USA) 软件对图像进行处理和分析，得到各地理种群赤眼蜂微卫星各位点片段的大小和位置，筛选条带明显、清晰且可以区分各地理种群赤眼蜂的微卫星位点及引物。

表 1 微卫星位点及引物特征

Table 1 Characterization of microsatellites and primers

引物编号 Primer number	位点 Locus	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	重复单元 Repeat motif	序列号 Accession number
1	TD 1	F: AAGGCTGGCAACAAAAAG R: CCAGATCGCAAATAACATC	(ACG) ₅ (CGA) ₄	KT834820
2	TD 2	F: TGAGGTACTCGCTGACTTGC R: TCTCCTTGCCTTGCTTCG	(TA) ₆	KT834821
3	TD 3	F: CCGAAGTTCGTTTTTAGCAATC R: AACTCGGCGGGGATTTTCTTAC	(TCG) ₉	KT834822
4	TD 4	F: TAAGGCAGAGCTTGTAACTGGC R: GATACGCTGCTGTATGTTGGC	(GAC) ₈	KT834823
5	TD 5	F: ACTTCATTAATCGCATCGG R: CCTGTAATCTTGTCTCTCTC	(AGGA) ₄	KT834824
6	TD 6	F: GACCTCGTGCTTTTTCTCTCTT R: CAATGTCGTTGTGTCTGTGTT	(TGC) ₇	KT834825
7	TD 7	F: CAGGAATATCACAGGCTTACCATC R: AGAGTGTACAGCGAGAGCGAAC	(CGT) ₄ ... (CGT) ₃	KT834826
8	TD 8	F: AAGTGCAACTCCCGACGTACATAG R: CAGAGGCACCGATAAACTATCAAC	(GCT) ₄	KT834827
9	TD 9	F: GCATATACAGACACACATACATTGG R: GCGGCTCGTTTATCTTGACTT	(CA) ₆ (CG) ₅	KT834828
10	TD 10	F: TATAGCTCTTGCTCGTCAGTGG R: CGAATTTTCTTTCTCGCTCTCTC	(CGAC) ₄	KT834829

1.3.4 数据分析

使用软件 GenAlEx version 6.5 对等位基因数 (Number of Allele, N_a)、有效等位基因数 (Effective Number of Allele, N_e)、观测杂合度 (Observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (Expected heterozygosity, H_e) 及多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC) 进行分析 (Peakall & Smouse, 2012); 并用 GenAlEx version 6.5 和软件 CREATE 将数据转换为其它软件后续分析所需的数据格式; 基因多样性 (Gene diversity, H_s) 使用软件 FSTAT Version 2.9.3.2 (Li *et al.*, 2010) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 玉米螟赤眼蜂 3 个地理种群的引物筛选

以玉米螟赤眼蜂 DNA 为模板, 利用优化后的反应程序进行 SSR-PCR 引物 1~10 的筛选。根据扩增结果, 淘汰扩增缺失条带 (引物 2、7 和 9)、扩增效果不稳定 (引物 1 和 5) 以及条带位置相同 (引物 3、4 和 10), 其中引物 6 和引物 8 都可以稳定扩增出明显且清晰的特异性条带; 在 3 种玉米螟赤眼蜂中, JL-To 与 LN-To 之间无法区分, HLJ-To 与其余两种可利用引物 6 和引物 8 进行区分 (图 1)。

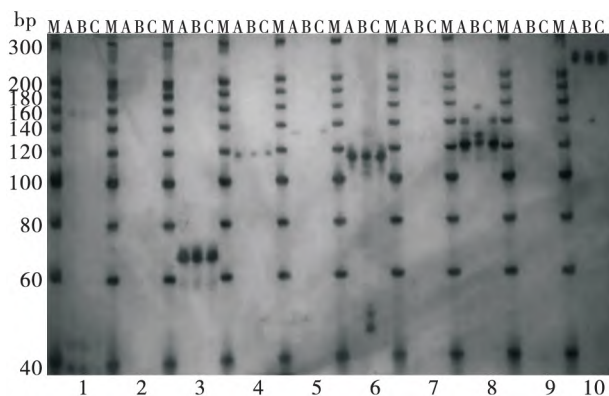


图 1 玉米螟赤眼蜂 3 个地理种群的引物筛选结果

Fig. 1 Results of primer screening of three geographical populations of *Trichogramma ostrinae*

注: 每 4 条泳道对应 1 对引物的扩增结果, 4 条泳道分别对应 Marker (M)、JL-To (A)、HLJ-To (B) 和 LN-To (C)。Note: Every four lanes corresponded to the amplification results of one pair of primers, and the four lanes corresponded to Marker (M), JL-To (A), HLJ-To (B) and LN-To (C), respectively.

2.2 螟黄赤眼蜂 3 个地理种群的引物筛选

以螟黄赤眼蜂 DNA 为模板, 利用优化后的反应程序进行 SSR-PCR 引物 1~10 的筛选。根据扩增结果, 淘汰扩增缺失条带 (引物 2)、扩增效果不稳定 (引物 1 和引物 9) 以及条带位置相同 (引物 4、5、6、7 和 10), 引物 3 和引物 8 都可以稳定扩增出明显且清晰的特异性条带; 在 3 个地理种群的螟黄赤眼蜂中, HLJ-Tc 与 GZ-Tc 和 GD-Tc 之间可以用引物 3 区分; GZ-Tc 与 GD-Tc 和 HLJ-Tc 之间可以用引物 8 区分 (图 2)。

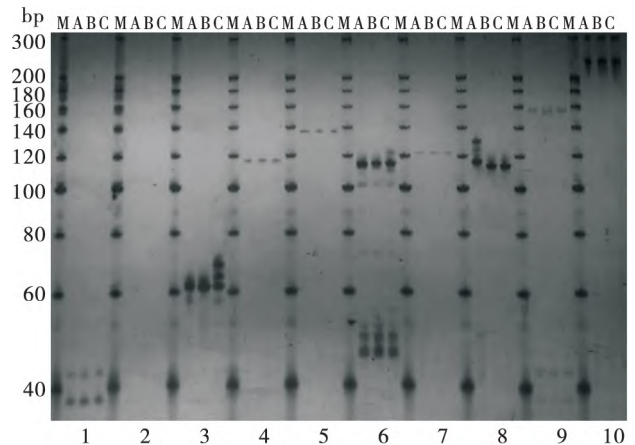


图 2 螟黄赤眼蜂 3 个地理种群的引物筛选结果

Fig. 2 Results of primer screening of three geographical populations of *Trichogramma chilonis*

注: 每 4 条泳道对应 1 对引物的扩增结果, 4 条泳道分别对应 Marker (M)、GZ-Tc (A)、GD-Tc (B) 和 HLJ-Tc (C)。Note: Every four lanes corresponded to the amplification results of one pair of primers, and the four lanes corresponded to Marker (M), GZ-Tc (A), GD-Tc (B) and HLJ-Tc (C), respectively.

2.3 赤眼蜂 4 个微卫星位点的遗传多样性及多态性信息含量分析

赤眼蜂 6 个不同地理种群中能够稳定扩增的 4 个微卫星位点的遗传多样性及多态信息含量见表 2。4 个微卫星位点 TD3、TD6、TD8 和 TD10 的多态信息含量 (PIC) 分别为 0.141~0.746。其中 TD8 和 TD10 位点的 PIC 值分别为 0.746 和 0.703, 均大于 0.5, 均具有较高的多态性; 位点 TD3 位点的 PIC 值为 0.477, 表现为中等多态性, 而在 TD6 位点的 PIC 值仅为 0.141, 为低度多态性; 4 个位点平均 PIC 为 0.517, 整体表现为中等多态性。能够稳定扩增的 4 个微卫星位点的平均等位基因数

(N_a) 为 1.5 个, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.5 个, 等位基因丰富度 (A_r) 为 1.5 个, 平均观测杂合度 (H_o) 为 0.5, 平均期望杂合度 (H_e) 为 0.25。

表 2 赤眼蜂 4 个微卫星位点的多态性特征
Table 2 Characterization of 4 microsatellite loci of *Trichogramma*

位点 Locus	等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	等位基因 丰富度 A_r	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	基因 多样性 HS	多态信息 含量 PIC
TD3	1.167	1.167	1.167	0.167	0.083	0.083	0.477
TD6	1.167	1.167	1.167	0.167	0.083	0.083	0.141
TD8	1.667	1.667	1.667	0.667	0.333	0.333	0.746
TD10	2.000	2.000	2.000	1.000	0.500	0.500	0.703
Mean	1.500	1.500	1.500	0.500	0.250	0.250	0.517

2.4 退火温度对玉米螟赤眼蜂不同地理种群微卫星鉴定结果的影响

利用引物 6 和引物 8 按照上述反应程序, 分别对玉米螟赤眼蜂 3 个地理种群的 DNA 模板进行扩增, 并将退火温度分别设为 51℃、53℃、55℃、57℃和 59℃。检测结果表明 (每条泳道上方的数字代表退火温度), 退火温度对引物 6 的 PCR 结果影响较大, 当退火温度超过 55℃时, HLJ-To 会出现明显的条带缺失, 无法与其它两个地理种群进行区分; 退火温度对引物 8 的 PCR 结果影响不大, 玉米螟赤眼蜂 3 个地理种群均能在 51~59℃的条件下扩增出明显的特异性条带 (图 3)。

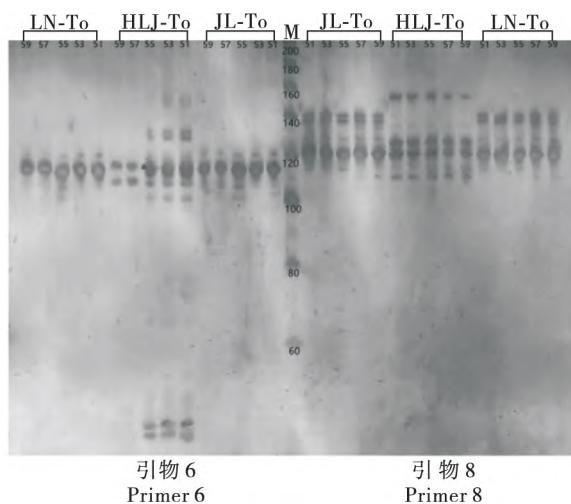


图 3 退火温度对玉米螟赤眼蜂 3 个地理种群微卫星鉴定结果的影响

Fig. 3 Effects of annealing temperature on microsatellite detection of three populations of *Trichogramma ostriniae*

2.5 退火温度对螟黄赤眼蜂不同地理种群微卫星鉴定结果的影响

利用引物 3 和引物 8 按照上述反应程序, 分别对螟黄赤眼蜂 3 个地理种群的 DNA 模板进行扩增, 并将退火温度分别设为 51℃、53℃、55℃、57℃和 59℃。检测结果表明 (每条泳道上方的数字代表退火温度), 退火温度对各引物的 PCR 结果影响不大, 3 个地理种群的螟黄赤眼蜂均能在 51~59℃的条件下扩增出明显的特异性条带, 但是在 55℃时差异最明显 (图 4)。

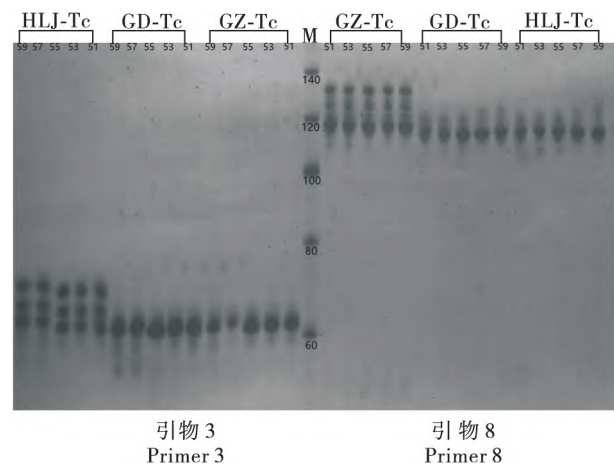


图 4 退火温度对螟黄赤眼蜂 3 个地理种群微卫星鉴定结果的影响

Fig. 4 Effects of annealing temperature on microsatellite detection of three populations of *Trichogramma chilonis*

2.6 基于筛选微卫星引物对不同地理种群玉米螟赤眼蜂的鉴定结果

选取 3 个地理种群的玉米螟赤眼蜂成蜂各 5 头, 按照 1.3 中提到的方法提取 DNA, 分别利用

引物 6 和引物 8 进行扩增, 以鉴定不同地理种群的玉米螟赤眼蜂。结果表明 (每 5 条泳道代表 1 个地理种群), 图中引物 6 和引物 8 可以明确的区分出 HLJ-To 和 JL-To 以及 LN-To 之间存在的基因型差异, 但 JL-To 和 LN-To 之间暂时无法区分 (图 5)。

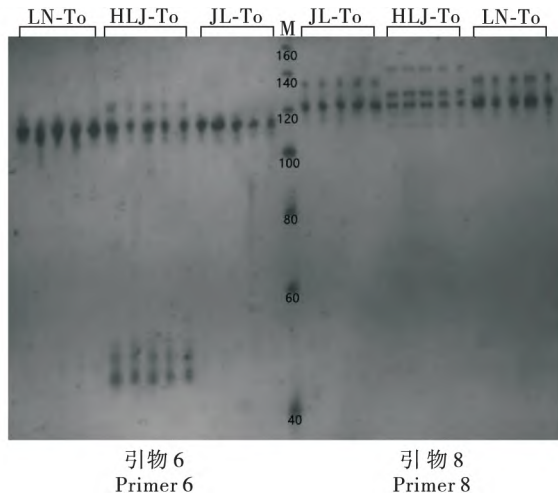


图 5 基于筛选微卫星引物对不同地理种群玉米螟赤眼蜂的鉴定结果

Fig. 5 Identification of *Trichogramma ostrinae* from different geographical populations based on microsatellite primers

2.7 基于筛选微卫星引物对不同地理种群螟黄赤眼蜂的鉴定结果

选取 3 个地理种群的螟黄赤眼蜂成蜂各 5 头, 按照 1.3 中提到的方法提取 DNA, 分别用引物 3 和引物 8 进行扩增, 以鉴定不同地理种群的螟黄赤眼蜂。结果表明 (每 5 条泳道代表 1 个地理种群), 引物 3 可以明确的区分出 HLJ-Tc 和 GZ-Tc 以及 GD-Tc 之间存在基因型差异, 引物 8 可以明确的区分 GZ-Tc 和 GD-Tc 以及 HLJ-Tc 之间存在基因型差异 (图 6)。

3 结论与讨论

物种对于环境的适应能力主要取决于其遗传的多样性。遗传分化越丰富, 对于环境的适应能力越强; 反之, 遗传分化越单一, 适应能力和生存潜力越弱 (祖元刚, 1999)。本研究利用微卫星分子标记, 筛选了可以用于区分不同地理种群的玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂微卫星引物, 并发现本研究涉及的不同地理种群的玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂存在基因型的差异。

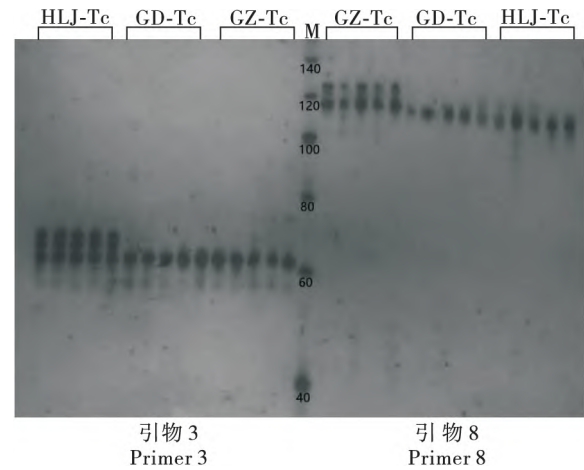


图 6 基于筛选微卫星引物对不同地理种群螟黄赤眼蜂的鉴定结果

Fig. 6 Identification of *Trichogramma chilonis* from different geographical populations based on screened microsatellite primers

虽然微卫星位点的侧翼区序列在种内具有高度的保守型, 但在研究中发现, 由于微卫星位点侧翼序列突变或位点缺失、环境因素或 PCR 反应条件变化的影响, 即使是相同物种的微卫星引物也会出现扩增失败的情况 (Paetkau and Strobeck, 1995; Ravel *et al.*, 2002; 门秋雷等, 2012)。本研究从已报道的 10 种微卫星引物中, 选出 4 对可以扩增出稳定条带的微卫星引物 TD3、TD6、TD8 和 TD10 (序列号: KT834822, KT834825, KT834827, KT834829), 但由于 6 个种群在 TD10 位点下扩增的条带均相同, 不适用于区分不同地理种群。杂合度是衡量微卫星位点遗传多样性的重要指标, 两者与微卫星位点的遗传多样性呈正相关。期望杂合度则能够反映出不同遗传结构之间的变异程度, 一般将杂合度高于 0.1 的位点称为多态位点。本研究中 TD8 位点的期望杂合度为 0.333, 具有较高的多态性和丰富的遗传多样性。而位点 TD3 和 TD6 的期望杂合度为 0.083, 为低多态性位点。多态信息含量 (PIC) 是衡量微卫星多态性的重要指标, 当 $PIC > 0.5$ 时, 该微卫星位点为高度多态性位点 (Botstein *et al.*, 1980)。微卫星位点的 PIC 与该位点的可用性及使用效率相关, PIC 越高, 种群中该微卫星位点的杂合子比例越高, 能够提供的遗传信息就越多。本研究中, 除了 TD6 位点以外, TD3 和 TD8 位点均具有中等到较高的多态性, 能为赤眼蜂遗传多样性研究提供充分的遗传信息。最终筛选出 2 对引物 (序列号: KT834825, KT834827) 可以区分 HLJ-To 与 JL-To 和 LN-To,

但 JL-To 与 LN-To 之间无法区分, 初步说明这两个地理种群之间的遗传分化程度可能很低; 同时也筛选出 2 对引物 (序列号: KT834822, KT834825) 可以区分 GZ-Tc、GD-Tc 和 HLJ-Tc 3 个种群。这说明几种不同地理种群赤眼蜂间存在一定的基因型差异, 可能与地理距离有关。

因赤眼蜂飞行能力弱, 所以区域之间的基因交流程度低, 且不同地理种群之间可能发生与寄主之间的协同进化, 从而形成不同程度的遗传差异性 (李宝娟, 1992)。但本研究涉及的不同地理种群的赤眼蜂之间遗传分化程度与地理距离的相关性还需要进一步的实验验证。本研究也发现不同退火温度对于筛选出的引物的扩增效率影响不大, 说明筛选出的引物对于退火温度要求不高, 特异性较强, 但在利用引物 6 进一步鉴定和其它试验中, 建议使用退火温度为 55℃, 以获得最优的结果。

不同来源的寄生蜂由于受到环境因素的影响, 其寄生能力、羽化率以及雌雄比等生物学特性之间往往存在较大的差异, 从而影响对靶标害虫的防治效果 (Hassan, 1989; 董贝等, 2012)。在实际生产中, 利用柞蚕卵作为繁育寄主可以有利于赤眼蜂的工厂化繁育, 提高生产效率, 同时降低成本。有研究表明, 由于柞蚕卵卵壳较为坚硬, 大多数的玉米螟赤眼蜂都无法寄生柞蚕卵, 但有些地理种群的玉米螟赤眼蜂能够寄生柞蚕卵, 只是无法成功羽化 (Hassan *et al.*, 2004; 李树英等, 2013)。最近的研究发现, 玉米螟赤眼蜂和其它种类的赤眼蜂共寄生柞蚕卵可以帮助玉米螟赤眼蜂羽化出蜂, 例如, 与松毛虫赤眼蜂共寄生柞蚕卵可以让玉米螟赤眼蜂利用松毛虫赤眼蜂的羽化孔完成出蜂 (田春雨等, 2019); 而与螟黄赤眼蜂共寄生可以让玉米螟赤眼蜂利用螟黄赤眼蜂的羽化孔完成出蜂 (Iqbal *et al.*, 2020)。这为今后高效繁育和利用玉米螟赤眼蜂提供了可能性和新的思路, 但不同地理种群的玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂之间的共寄生和辅助羽化的现象是否存在差异尚需进一步研究。

本研究筛选出的微卫星引物可以用于区分不同地理种群的玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂的基因型差异, 为精准鉴别玉米螟赤眼蜂和螟黄赤眼蜂不同地理种群奠定了基础, 同时也为进一步探寻优势种群的高效繁育与应用技术提供了理论依据。

参考文献 (References)

- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32 (3): 314 - 331.
- Chailleux A, Desneux N, Seguret J, *et al.* Assessing European egg parasitoids as a mean of controlling the invasive South American tomato pinworm *Tuta absoluta* [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (10): e48068. DOI: 10.1371/journal.pone.0048068.
- Dai JX. Microsatellite DNA marker technology and its application [J]. *Agricultural Science Research*, 2005, 26 (1): 67 - 70. [代金霞. 微卫星 DNA 标记技术及其应用 [J]. 农业科学研究, 2005, 26 (1): 67 - 70]
- Dong B, Wang SQ, Li ZX. Construction and application of population specific molecular markers for *Trichogramma ostrinia* [J]. *Journal of Applied Entomology*, 2012, 49 (5): 1210 - 1218. [董贝, 王素琴, 李正西. 玉米螟赤眼蜂种群特异分子标记构建及其应用 [J]. 应用昆虫学报, 2012, 49 (5): 1210 - 1218]
- Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem. Bull.*, 1987, 19: 11 - 15.
- Hassan SA, Lisicsinsky H, Zhang GR. The oak-silkworm egg *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Anthelidae) as a mass rearing host for parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2004, 14 (3): 269 - 279.
- Hassan SA. Selection of suitable *Trichogramma* to control the moth *Cydia pomonella* and the summer fruit tortrix moth *Adoxophyes orana*, *Pandemis heparana* [J]. *Entomophaga*, 1989, 34 (1): 19 - 27.
- He XF, Wen SY, Pang XF. Advances in phylogeny of *Trichogramma* [J]. *Insect Knowledge*, 2005, 42 (1): 22 - 27. [何晓芳, 温硕洋, 庞雄飞. 赤眼蜂属系统进化研究进展 [J]. 昆虫知识, 2005, 42 (1): 22 - 27]
- Iqbal A, Hou YY, Chen YM, *et al.* Impact of *Trichogramma* parasitoid age on the outcome of multiparasitism in the factitious host eggs of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* [J]. *Journal of Pest Science*, 2020, 93 (4): 1347 - 1357.
- Li BJ. A preliminary study on esterase isozymes among different populations of *Trichogramma dendrolimi* [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 1992, 18 (3): 61 - 63. [李宝娟. 松毛虫赤眼蜂不同种群间酯酶同工酶研究初报 [J]. 浙江农业大学学报, 1992, 18 (3): 61 - 63]
- Li HF, Song WT, Shu JT, *et al.* Genetic diversity and population structure of 10 Chinese indigenous egg-type duck breeds assessed by microsatellite polymorphism [J]. *Journal of Genetics*, 2010, 89 (1): 65 - 72.
- Li LY. New progress in research and application of *Trichogramma* [J]. *Insect Knowledge*, 1984, 5: 237 - 241. [李丽英. 赤眼蜂研究应用新进展 [J]. 昆虫知识, 1984, 5: 237 - 241]
- Li SY, Wang XY, Zhang B. The comprehensive utilization of *Antheraea pernyi* (1) - the technology of using *Antheraea pernyi* eggs to breed *Trichogramma* to prevent and control *Ostrinia furnacalis* [J].

- Chinese Silkworm Industry*, 2013, 34 (1): 93–96. [李树英, 王学英, 张波. 柞蚕综合利用 (I) — 利用柞蚕卵繁殖赤眼蜂防治玉米螟的技术 [J]. 中国蚕业, 2013, 34 (1): 93–96]
- Liu GQ. Study on the intra egg competition of dominant *Trichogramma* of *Ostrinia furnacalis* (Guenée) based on microsatellite markers [D]. Changchun: Jilin Agricultural University Master Thesis, 2019. [柳冠群. 基于微卫星标记的亚洲玉米螟优势赤眼蜂卵内竞争研究 [D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2019]
- Liu Y, Tang YZ, Gao L. Research Progress on evolutionary characteristics of microsatellite DNA [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33 (6): 1391–1400. [柳莹, 唐永政, 高丽. 微卫星 DNA 进化特征研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33 (6): 1391–1400]
- Lü X, Han SC. Isolation and characterization of 26 polymorphic microsatellite markers for the parasitoid wasp *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2016, 26 (7): 1–11.
- Men QL, Chen MH, Zhang YL, et al. Amplifying stability and genetic diversity of microsatellite loci in codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) populations in China [J]. *Journal of Plant Protection*, 2012, 39 (4): 341–346. [门秋雷, 陈茂华, 张雅林, 等. 中国疫区内苹果蠹蛾微卫星位点的扩增稳定性及遗传多样性 [J]. 植物保护学报, 2012, 39 (4): 341–346]
- Paetkau D, Strobeck C. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears [J]. *Molecular Ecology*, 1995, 4 (4): 519–520.
- Pang XF. A list of *Trichogramma* in China [J]. *Natural Enemies of Insects*, 1985, 7 (1): 44–52. [庞雄飞. 中国赤眼蜂属名录 [J]. 昆虫天敌, 1985, 7 (1): 44–52]
- Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research – an update [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28 (19): 2537–9.
- Pinto JD. Systematics of the North American species of *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) [J]. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 1999, 22: 1–287.
- Pizzol J, Khouldia O, Ferran A, et al. A single molecular marker to distinguish between strains of *Trichogramma cacoeciae* [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2005, 15: 527–531.
- Qiu YS. On the use of *Trichogramma* to control pests [J]. *Insect Knowledge*, 1978, 3: 85–88. [邱益三. 关于利用赤眼蜂防治害虫的问题 [J]. 昆虫知识, 1978, 3: 85–88]
- Qu LF, Pan WR, Zeng YZ. Microsatellite DNA marker and its application [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2010, 31 (4): 6–8. [瞿陆峰, 潘伟荣, 曾养志. 微卫星 DNA 标记及其应用 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31 (4): 6–8]
- Ravel S, Hervé JP, Diarrassouba S, et al. Microsatellite markers for population genetic studies in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire: Evidence for a microgeographic genetic differentiation of mosquitoes from Bouaké. [J]. *Acta Tropica*, 2002, 82 (1): 39–49.
- Smith SM. Biological control with *Trichogramma*: Advances, successes, and potential of their use [J]. *Annual Review of Entomology*, 1996, 41: 375–406.
- Stouthamer R. Molecular methods for the identification of biological control agents at the species and strain level. In: Bigler F, Babendreier D, Kuhlmann U, eds. *Environmental Impact of Invertebrates for Biological Control of Arthropods* [C]. UK: Cromwell Press, 2006: 187–201.
- Tian CY, Hou YY, Zang LS, et al. Breeding of *Trichogramma ostrinae* by parasitizing *Antheraea pernyi* eggs with *Trichogramma dendrolimi* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46 (2): 451–457. [田春雨, 侯洋阳, 臧连生, 等. 利用松毛虫赤眼蜂共寄生柞蚕卵繁育玉米螟赤眼蜂 [J]. 植物保护学报, 2019, 46 (2): 451–457]
- Wang ZY, He KL, Zhang F, et al. Mass rearing and release of *Trichogramma* for biological control of insect pests of corn in China [J]. *Biological Control*, 2014, 68: 136–144.
- Wang ZY, Zhou DR. Comparison of parasitism selectivity of several *Trichogramma* strains to *Ostrinia furnacalis* eggs [J]. *Plant Protection*, 1995, 21 (6): 39–42. [王振营, 周大荣. 几种赤眼蜂品系对欧洲玉米螟卵寄生选择性比较 [J]. 植物保护, 1995, 21 (6): 39–42]
- Yan ZC, Hua HQ, Li YX. Advances in molecular identification of *Trichogramma* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2020, 42 (1): 13–21. [严智超, 华海清, 李元喜. 赤眼蜂分子鉴定研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (1): 13–21]
- Yu DJ, Deng ZP, Chen ZL, et al. Insect molecular marker gene and its sequence and application [J]. *Plant Quarantine*, 2003, 17 (3): 156–159. [余道坚, 邓中平, 陈志彝, 等. 昆虫分子标记基因和序列及应用 [J]. 植物检疫, 2003, 17 (3): 156–159]
- Yuan J, Wang ZY, He KL, et al. mtDNA gene sequence analysis and genetic differentiation of *Trichogramma ostrinae* in different geographical populations [J]. *China Journal of Biological Control*, 2011, 27 (1): 16–21. [袁佳, 王振营, 何康来, 等. 玉米螟赤眼蜂不同地理种群 mtDNA 基因序列分析及遗传分化研究 [J]. 中国生物防治学报, 2011, 27 (1): 16–21]
- Zang LS, Wang S, Zhang F, et al. Biological control with *Trichogramma* in China: History, present status and perspectives [J]. *Annual Review of Entomology*, 2021, 66: 463–484.
- Zhang J, Wang JL, Cong B, et al. Investigation of *Trichogramma* species and dominant species of *Ostrinia furnacalis* in China [J]. *Biological Control Bulletin*, 1990, 6 (2): 49–53. [张荆, 王金玲, 丛斌, 等. 我国亚洲玉米螟赤眼蜂种类及优势种的调查研究 [J]. 生物防治通报, 1990, 6 (2): 49–53]
- Zhang JJ, Ruan CC, Zang LS, et al. Improvement of *Trichogramma* industrial breeding technology and application status of controlling agricultural pests in China [J]. *China Journal of Biological Control*, 2015, 31 (5): 638–646. [张俊杰, 阮长春, 臧连生, 等. 我国赤眼蜂工厂化繁育技术改进及防治农业害虫应用现状 [J]. 中国生物防治学报, 2015, 31 (5): 638–646]
- Zu YG. Theory, Method and Application of Molecular Ecology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999: 152–158. [祖元刚. 分子生态学理论、方法和应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 152–158]