

赤眼蜂科及缨小蜂科系统分类与生物学特征研究方法

Systematic Identification and Biological Characteristic Research Method of Trichogrammatidae and Mymaridae

康宁, 努日耶·木合太尔, 胡红英*, 朱丽得孜·艾山

生命科学与技术学院, 新疆大学, 乌鲁木齐, 新疆

*通讯作者邮箱: hoohyi-69@163.com

引用格式: 康宁, 努日耶·木合太尔, 胡红英, 朱丽得孜·艾山. (2021). 赤眼蜂科及缨小蜂科系统分类与生物学特征研究方法. Bio-101 e1010614. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010614.

How to cite: Kang, N., Nuriye·Muhetaier, Hu, H. Y. and Zhulidezi·Aishan. (2021). Systematic Identification and Biological Characteristic Research Method of Trichogrammatidae and Mymaridae. Bio-101 e1010614. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010614. (in Chinese)

摘要: 赤眼蜂和缨小蜂是农林害虫常见的两类重要卵寄生蜂, 它们具有资源丰富、分布广泛、对害虫种群控制作用显著等特点, 在害虫的生物防治中占有重要地位。标本的标准采集及制作方法是保证其分类学研究的必要条件, 本文根据新疆大学昆虫研究室对赤眼蜂及缨小蜂多年的研究经验, 介绍了实验用赤眼蜂和缨小蜂标本的采集制作、生物学特征、DNA 条形码的获取等基本研究方法。

关键词: 赤眼蜂, 缨小蜂, DNA 条形码, 形态分类, 寄生生物学

研究背景:

赤眼蜂和缨小蜂科昆虫是生物防治研究领域中使用非常广泛的两类卵寄生性昆虫, 尤其是赤眼蜂科中松毛虫赤眼蜂 (*Trichogramma dendrolimi*), 螟黄赤眼蜂 (*Trichogramma chilonis* Ishii) 以及暗黑赤眼蜂 (*Trichogramma pinto* Voegelé) 等赤眼蜂属 *Trichogramma* 昆虫已实现人工扩繁且有效地应用于害虫的生物防治中。由于这两类昆虫体型微小, 仅靠形态分类难以对近缘种、隐存种等进行准确的分类鉴定, 同时有关其分子水平的研究也较少。本文主要介绍 DNA 无损提取法在赤眼蜂和缨小蜂 DNA 条形码研究中的应用, 并总结了室内研究缨小蜂生物学特征的方法。

材料与试剂

一、标本采集与制作

1. 封口袋
2. 2 ml 冻存管
3. 橡皮筋
4. 滤纸
5. 吸管
6. 脱脂棉
7. 保鲜膜
8. 15%蜂蜜水
9. 无水乙醇，分析纯 500 ml (天津永晟精细化工有限公司等)
10. 5%氢氧化钾，分析纯 500 g (天津市盛奥化学试剂有限公司等)
11. 木榴油，20 ml (湖北泰辰健瑞药业有限公司等)
12. 丁香油，100 ml (国药集团化学试剂有限公司等)
13. 中性树胶，100 g (中国上海标本模型厂等)
14. 加拿大树胶，100 ml (Chemsworth, 印度 CAS8007-47-4)
15. 昆虫胶
16. 樟脑丸

二、DNA 提取

1. Tween-20
2. DNA 分子量标准 (100-2,000 bp)
3. NP-40
4. Taq DNA 聚合酶
5. Master mix Taq 酶 DNA 聚合酶
6. DNA marker
7. 蛋白酶 K (Omega 公司等)
8. PCR 回收试剂盒 (Omega 公司等)
9. 琼脂糖

10. 引物合成及测序均由上海生工完成
11. 电泳缓冲液

仪器设备

一、玻片标本采集与制作

1. 捕虫网
2. 马氏网
3. 收集瓶
4. 记号笔
5. 冷冻干燥盒
6. 95 mm 玻璃培养皿
7. 200 × 40 mm 玻璃试管
8. 200 目尼龙纱网
9. 解剖针
10. 镊子
11. 20 × 20 mm 盖玻片, 厚 0.13-0.17 mm (上海工业玻璃四厂等)
12. 25.4 × 76.2 mm 载玻片, 厚 1-1.2 mm (帆船牌等)
13. 三角片
14. 1-5 号昆虫针
15. 标本盒
16. 体视显微镜 (Nikon SMZ 745T)
17. 生物显微镜 (Nikon Ni-E)
18. 台式烘箱 (303-0 型)

二、DNA 提取

1. 梯度 PCR 仪 (美国 ABI 等)
2. 高速低温离心机 (Beckman 等)
3. 电泳仪 (北京六一等)
4. 水平电泳槽 (北京六一等)

5. 凝胶成像仪 (Bio-Rad 等)
6. 振荡器 (IKA 等)
7. 恒温水浴锅 (江苏金怡仪器科技有限公司等)
8. 小型台离心机 (上海安亭科学仪器厂等)

三、生物学特征及形态鉴定研究

1. 光照培养箱 (江南仪器制造厂等)
2. 体视显微镜 (Nikon 等)
3. 光学显微镜+DS-U3 成像系统 (Nikon 等)

实验步骤

一、标本的采集

1. 网扫: 沿选择的样线, 采用"Z"字形扫网, 网口尽量贴近所采集的植被, 采集时间为 30 min 左右为宜, 将采集的标本装入封口袋或收集瓶中, 并用酒精浸没标本, 避免将小蜂与体型较大的昆虫 (如蝗虫、步甲、象甲、叶甲等) 共同放置, 以防其在挣扎过程中损坏小蜂。
2. 马氏网诱集: 将马氏网按照要求安装在适宜的生境中, 收集瓶中加入 2/3 以上的化学纯或分析纯酒精, 每隔 10-15 d 更换一次收集瓶。
3. 黄盘诱集: 在所选的生境中按照 5 点取样法放置黄盘, 并在黄盘内放入 2/3 的洗洁精水 (洗洁精:水 = 0.1), 2-5 h 后当天收集黄盘内的标本。
4. 寄主采集: 采集寄主害虫的幼虫、带有卵块的植物枝叶或害虫在植物上所造的虫瘿。野外条件下, 采用黑箱饲养方法, 密封纸箱边及角落缝隙, 防止漏光以及害虫和寄生蜂钻出, 用毛笔刷将植物枝条及虫瘿表面疑似其他昆虫的卵或幼虫刷净, 放入箱内后密封纸箱。最后在纸箱四个侧面固定若干指形管, 并防止接口处有漏光现象。将黑箱放在有光的地方, 每天观察、收集并记录指形管中的害虫或寄生蜂。



图 1. 标本采集及饲养方法 (马氏网, 黑箱饲养, 试管饲养)

二、标本的制作

1. 酒精浸置标本制作: 将采集的标本, 带回实验内依次经粗筛、细筛过滤, 收集过滤液, 在体视显微镜下挑选出滤液中的各种卵寄生蜂, 然后根据检索表对挑取的卵寄生蜂鉴定到属, 并将标本按科、或按属装入小型玻璃管中, 倒入无水乙醇并置于 -20°C 冰箱保存。
2. 玻片标本制作: 包括清洗、解离、清洗、脱水、整姿和制片、封片等步骤。
 - a. 清洗: 将挑拣好的赤眼蜂或缨小蜂标本放入小皿中, 用无水乙醇清洗 3 遍, 每次 5-10 min。
 - b. 解离: 将清洗好的标本放入 5% KOH 中, 在 50°C 恒温加热板上解离, 每隔半小时观察标本的体色变化, 直到标本的肌肉和体内组织完全解离, 身体变得透明。
 - c. 清洗: 解离后的标本再次用无水乙醇清洗 5 遍, 每次 5-10 min。
 - d. 脱水: 将清洗好的标本移入木榴油中脱水, 脱水时间因标本的大小而不同, 通常为 20-30 min, 时间过短会有水分残留, 过长则会导致标本皱缩。
 - e. 整姿和制片: 将脱水后的标本放入丁香油中以备制片。制作玻片标本时, 在体视显微镜下, 首先将标本从丁香油中取出, 放在载玻片上。用滤纸吸取多余的

丁香油，再滴一小滴中性树脂，用极细的解剖针将昆虫进行整姿，并将标本一侧的触角、翅、足解剖下来，按顺序放好。

- f. 封片：解剖好的标本放在 45 °C 恒温培养箱中，待稍微烘干后盖上盖玻片并用加拿大树胶封片；每天在体视显微镜下检视玻片，若发现标本位置侧移，需进行修片处理，烘干时间为 3-4 d。之后将标本放入玻片标本盒，以备观察和鉴定。

3. 针插标本制作

由于卵寄生蜂个体微小，制作针插标本时需将标本整姿后粘贴在三角片上。酒精浸制标本需先经二氧化碳临界点干燥仪脱去酒精，具体步骤：打开仪器及气阀，液体二氧化碳置换乙醇，20-60 min；升温升压达到二氧化碳临界点，维持 4 min；保持温度和压力并缓慢放出二氧化碳，大约持续 30 min。制作针插标本时，首先将标本放置在滤纸上进行整姿，待酒精完全蒸发后，用昆虫针或大头针蘸取昆虫胶，涂在三角形卡纸的尖端，将标本中胸侧板位置固定在胶上，标本的中轴线与纸卡平面呈 45-80 ° 的角度，再进行第二次整姿，使触角前伸，翅平展在身体两侧，摆正足的姿势，使标本的重要鉴别特征都能被观察到。再用昆虫针插入三角片，三角片距离昆虫针顶端 0.8 cm，在三角片标本下方附上地点、时间、经纬度和海拔高度等采集信息后，保存于放有樟脑丸（防止被食腐类昆虫蛀空）的昆虫标本盒中。

4. 标本测量及形态鉴定（赤眼蜂、缨小蜂共同测量范围）

体长：从头部额区到腹部末端的长度，不包括触角和产卵管突出部分。

头高：从头顶到下颚基部的距离。

头宽：两复眼外缘间的距离。

复眼长度：复眼上缘至下缘间的距离（前面观）。

触角各节长度：从一节的基部到下一节的基部间的距离（侧面观）。

胸部长度：从前胸基部到并胸腹节端部之间的长度。

翅长：从翅基部到翅最外缘间的距离。

翅宽：翅面最宽处的长度。

翅脉长度：从亚缘脉基部到痣脉端部间的距离。

缘毛长度：翅臀角上最长的缘毛长度。

足各节长度：从一节的基部到下一节的基部间的距离。

腹柄节长度：并胸腹节端部到柄后腹基部间的距离。

腹柄节宽：腹柄节最宽处的长度 (背面观)。

腹部 (柄后腹) 长度：腹部 (柄后腹) 基部到端部间的距离,不包括产卵管突出部分。

产卵管长度：产卵管基部到端部的距离。

产卵管突出部分长度：腹部(柄后腹)端部到产卵管端部的距离。

阳基长度：阳基基部到端部(阳基侧瓣端部)的距离。

阳茎长度：阳茎内突端部到阳茎端部间的距离。

根据形态特征及以上测量信息利用检索表进行检索。

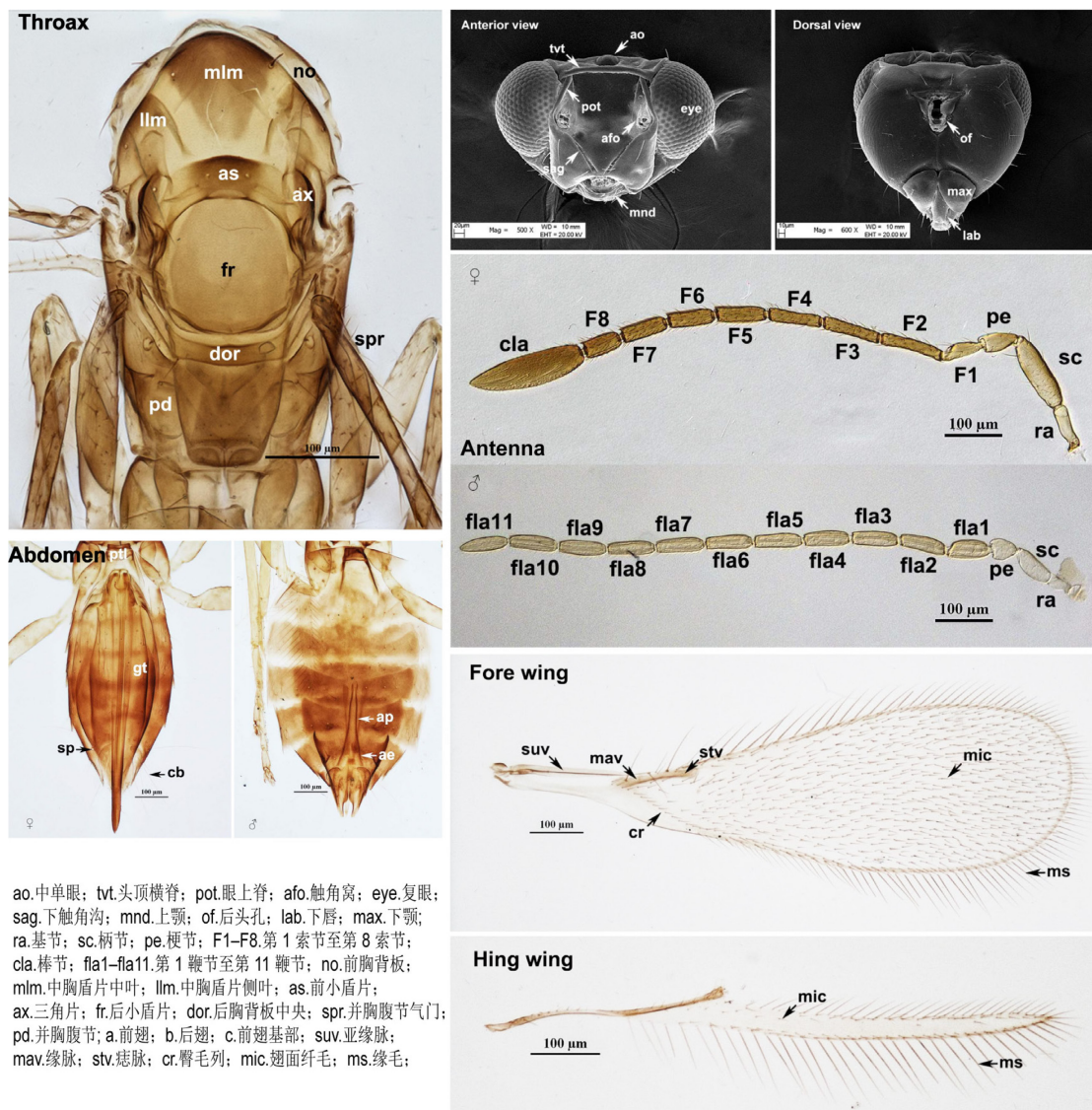


图 2. 小蜂各部位形态特征说明 (以柄翅缨小蜂族为例) (朱丽得孜·艾山, 2016)

三、基因组 DNA 的提取

1. 制备 50 μ l 体系的裂解缓冲液 (表 1)。
2. 在体视显微镜下, 挑取完整个体, 用 ddH₂O 清洗后, 转移至新的离心管中, 加入已经配制好的 50 μ l 裂解液。
3. 将离心管放入 50 °C 恒温水浴锅中, 孵育 1 h。
4. 在 -20 °C 下进行冷抽提, 放置 17 h 左右。
5. 在 95 °C 中水浴, 热激 10 min。提取完成的 DNA 模板放置在 -20 °C 下冷藏待用。

表 1. 裂解缓冲液的配方

试剂	加入量 (μ l)
1x PCR 缓冲液	5
蛋白酶 K (0.6 mg/ml)	1.5
NP-40 (0.45%)	0.25
Tween-20 (0.45%)	0.25
ddH ₂ O	43

四、PCR 反应

1. 本研究利用昆虫 mtDNA-COI 和 ITS2 相应基因片段进行扩增反应, 片段扩增引物由北京华大基因公司合成 (表 2)。
2. 具体反应体系及反应条件如表 3 和表 4 所示, 扩增反应结束后, 将 PCR 特异性扩增产物在含有 0.5 μ g/ml TAE 的 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 上样量为 3 μ l, 电压 150 V, 电泳缓冲液为 0.5x TAE, Marker (2,000 bp) 标识每条扩增条带的分子量大小, 并用凝胶成像仪拍照记录结果。
3. 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 Bio-Tek 公司) 回收纯化的 PCR 产物, 每个样本收集 50 μ l, 委托生工生物工程 (上海) 有限公司用双脱氧法进行测序。

表 2. 赤眼蜂和缨小蜂 COI 和 ITS2 的引物序列

扩增区域	引物名称	引物序列
------	------	------

Amplification region	Primer name	Primer sequence
COI	C1-J-1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTARTTCC
	C1-N-2191	CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC
	CAS5p8sFc	TGAACATCGACATTTYGAACGCACAT
ITS2	CAS28Sb1D	TTCTTTTCCTCCSCTTAYTRATATGCT TAA

表 3. PCR 扩增 ITS2 和 COI 的片段的反应体系

试剂	加入量 (总体系 20 μ l)
2x Premix Taq 酶	10 μ l
正向引物	0.5 μ l (10 μ mol/L)
反向引物	0.5 μ l (10 μ mol/L)
DNA	4 μ l
ddH ₂ O	补足至 20 μ l

表 4. PCR 扩增 ITS2 和 COI 的片段的反应条件

实验步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 °C	5 min	
变性	94 °C	50 s	
退火	50 °C	50 s	35 cycles
延伸	72 °C	50 s	
总延伸	72 °C	10 min	

五、生物学特性研究方法

1. 寄主害虫饲养

将采集的虫瘿及寄主害虫幼虫或卵分组置于光照培养箱内进行饲养。用透气的保鲜膜或纱网封口，标注每个试管及培养皿，置于培养箱中进行饲养（设置不同的温度梯度），并在其中放入浸湿的脱脂棉块或将棉块包住寄主植物端部保持湿度。若寄主害虫虫态发生变化需记录、测量并拍照，确定害虫的不同龄期。野外调查结合室内观察确定害虫的发生规律，制作其生活史表。

野外采集的虫瘿置于解剖镜下，用镊子和解剖针由外向内逐次剥离虫瘿苞片，观察每一苞片上是否有虫卵、幼虫等，置于 Nikon SMZ 25 全自动数码双目体式显微镜下拍照，确定寄生蜂的寄生方式以及各虫态的特征，同时记录未被寄生和已被寄生的寄主害虫数量。

2. 寄生蜂生物学

通常已被寄生的害虫常表现出行动迟缓，将已被寄生的寄主害虫放入玻璃试管中单独分组饲养，若出现寄生蜂成虫引至新的试管并用 15% 蜂蜜水饲喂，仔细观察记录被寄生害虫中羽化出的寄生蜂数量、各虫态特征、羽化时间、羽化行为和死亡时间，在显微镜下对寄生蜂进行分类鉴定并确定雌雄比例。

结果与分析

1. 寄主害虫生物学特征：根据野外调查结合室内观测的数据，制作害虫的生活史表，同时根据形态差异划分寄主害虫的不同龄期，根据解剖观察确定寄生蜂的寄生方式及主要寄生龄期，描述其羽化和交配行为。
2. 寄生蜂生物学特征：对不同温度下的寄生蜂的寿命进行统计，根据记录的数据计算其寄生率及羽化率。

$$\text{寄生蜂自然寄生率} = \frac{\text{被寄生的卵、若虫或寄主害虫数}}{\text{寄主卵、若虫或害虫总数}} \times 100\%$$

$$\text{不同温度下的羽化率} = \frac{\text{羽化的小蜂数}}{\text{被寄生的寄主害虫总数}} \times 100\%$$

3. 基因序列比对和分析：

- a. 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。
- b. 将拼接好的序列在 NCBI 的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行同源性搜索 (一般同源性应大于 80%)，以确保所获序列为赤眼蜂科或缨小蜂科的 COI 和 ITS2 基因序列。
- c. 对于方向不一致的序列要找其反向互补链，使之与 GenBank 中已有序列的方向一致。联合从 GenBank 中选用的相似序列，用 DNAMAN4.0 软件进行比对。

基因的碱基组成和替换运用 MEGA 7.0 软件进行计算。

4. 基于 COI 基因和 ITS2 基因的系统进化树构建:

经过比对分析后的赤眼蜂科与缨小蜂科的 COI 基因和 ITS2 基因及 NCBI 数据库中获得的基因序列, 通过遗传分析软件 MEGA 7.0 分析各物种内及种间 DNA 序列差异, 计算核苷酸使用频率及遗传距离。基于 Kimura-2-Parameter 模型, 采用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建赤眼蜂科和缨小蜂科的 ML 系统进化树, 1,000 次循环估计系统树中节点的自举置信水平 (Bootstrap Confidence Level, BCL), 并根据膜翅目内的系统发育关系, 选取蚜小蜂 (*Encarsia formosa*) 作为外群。

致谢

感谢胡红英, 朱丽得孜老师对于本实验研究对象赤眼蜂及缨小蜂标本的形态鉴定, 感谢国家自然科学基金项目 (U1170305, 31360523) 的支持。

参考文献

1. 胡红英. (2003). [新疆赤眼蜂科及缨小蜂科分类研究 \(膜翅目: 小蜂总科\)](#). 博士学位论文. 福建农林大学.
2. 董福祥, 胡红英. (2014). 南疆农田赤眼蜂科资源调查及分类研究. 新疆大学.
3. 朱丽得孜·艾山. (2016). 中国柄翅缨小蜂族 *Gonatocerini* (膜翅目: 缨小蜂科) 分类研究. 新疆大学.
4. 努日耶·木合太尔. (2020). DNA 条形码在新疆北部农田赤眼蜂科和缨小蜂科 (膜翅目: 小蜂总科) 分类研究中的应用. 新疆大学.