



# 斑衣蜡蝉若虫寄生蜂地理种群遗传差异 及早期快速检测

辛 蓓, Atif MANZOOR, 曹亮明, 王小艺\*

(中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业和草原局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

**摘要:**【目的】明确不同地理种群斑衣蜡蝉 *Lycorma delicatula* 若虫寄生蜂种群遗传差异, 实现若虫被寄生早期的快速准确检测, 以评估其对斑衣蜡蝉种群的控制作用。【方法】利用 DNA 条形码技术获得不同地理种群斑衣蜡蝉若虫寄生蜂 *COI* 和 28S rDNA 序列, 利用 K2P 模型计算不同地理种群间的遗传距离, 以邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树; 基于 *COI* 序列设计种特异性 PCR(SS-PCR)引物, 利用 SS-PCR 对斑衣蜡蝉若虫 DNA 进行扩增, 测定其体内是否有中华螫蜂 *Dryinus sinicus* 寄生; 利用目测法观察和 PCR 扩增测定寄生蜂对不同采样点斑衣蜡蝉若虫的寄生率。【结果】经鉴定, 不同地理种群斑衣蜡蝉若虫寄生蜂为中华螫蜂, 该寄生蜂 *COI* 序列共检测到 16 个单倍型, 28S rDNA 序列共检测到 4 个单倍型。不同地理种群间中华螫蜂遗传距离在 0.00691 ~ 0.01310 之间。邻接法构建的系统发育树显示不同地理种群中华螫蜂均聚于一枝。基于 *COI* 序列设计的 SS-PCR 引物对中华螫蜂成虫、幼虫均具有良好的扩增效果, 最低检测阈值为 0.000005 ng/ $\mu$ L DNA。利用 SS-PCR 测定中华螫蜂对各采样点斑衣蜡蝉若虫的寄生率为 22.54% ~ 60.00%, 显著高于目测统计的结果(5.63% ~ 36.98%)。【结论】不同中华螫蜂地理种群间遗传差异较小; SS-PCR 引物可用于不同地区中华螫蜂对斑衣蜡蝉早期寄生率的快速检测。

**关键词:** 斑衣蜡蝉; 中华螫蜂; 地理种群; DNA 条形码; 种特异性 PCR; 寄生率

中图分类号: Q969 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)02-0218-11

## Genetic differences among geographical populations and rapid early detection of a nymphal parasitoid of *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae)

XIN Bei, Atif MANZOOR, CAO Liang-Ming, WANG Xiao-Yi\* (Key Laboratory of Forest Protection of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** 【Aim】 This study aims to determine the genetic differences among parasitoids of *Lycorma delicatula* nymphs from different geographical populations, and to rapidly identify the parasitism of parasitoids on *L. delicatula* nymphs at the early parasitization stage so as to evaluate the control effects of parasitoids on *L. delicatula* populations. 【Methods】 The DNA barcoding method was used to sequence *COI* and 28S rDNA genes of parasitoids of *L. delicatula* nymphs from different geographical populations. The genetic distances between the parasitoids from different geographical populations were calculated using K2P model, and a phylogenetic tree was constructed using neighbor-joining (NJ) method. The species-specific PCR (SS-PCR) primers were designed to determine whether *L. delicatula* was parasitized

基金项目: 美国农业部动植物检疫局项目(19-8130-0585-CA); 国家林业和草原局生态保护修复司委托项目

作者简介: 辛蓓, 女, 1990年9月生, 新疆奇台人, 博士研究生, 研究方向为害虫生物防治, E-mail: xin2542@126.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xywang@caf.ac.cn

收稿日期 Received: 2019-09-28; 接受日期 Accepted: 2019-11-26

by *Dryinus sinicus* by amplification of DNA from *L. delicatula* nymphs using SS-PCR method. Visual assessment method and SS-PCR amplification were used to determine the parasitism rates of the parasitoids on *L. delicatula* nymphs from different sampling localities. 【Results】 The parasitoids of *L. delicatula* nymphs were identified as *D. sinicus*. A total of 16 haplotypes and four haplotypes were detected in *COI* and 28S rDNA sequences of *D. sinicus* from different geographical populations, respectively. The genetic distance among *D. sinicus* from different geographical populations was 0.00691 – 0.01310. The phylogenetic tree constructed by NJ method showed that *D. sinicus* samples from different geographical populations were clustered in one branch. SS-PCR primers based on *COI* sequence could produce good amplification results for both adult and larva of *D. sinicus*, with the detection threshold of 0.000005 ng/ $\mu$ L DNA. The parasitism rates of *D. sinicus* on *L. delicatula* nymphs from different sampling localities were 22.54% – 60.00% detected by SS-PCR, significantly higher than those by visual assessment method (5.63% – 36.98%). 【Conclusion】 The genetic differences of *D. sinicus* from different geographical populations are quite low. SS-PCR primers can be used for rapid detection of the early parasitism of *L. delicatula* by *D. sinicus*.

**Key words:** *Lycorma delicatula*; *Dryinus sinicus*; geographical population; DNA barcoding; species-specific PCR; parasitism rate

斑衣蜡蝉 *Lycorma delicatula* 分布于中国、日本、越南、韩国和美国,可危害柿属 *Diospyros* spp.、葡萄属 *Vitis* spp.、猕猴桃 *Actinidia chinensis*、香椿 *Toona sinensis*、臭椿 *Ailanthus altissima* 等 70 余种寄主植物 (Barringer *et al.*, 2015)。斑衣蜡蝉不仅直接吸食寄主植物汁液,造成寄主植物衰弱,还是柿属植物柿疯病的传播媒介 (俎显诗, 1992; 宗学普和黎彦, 2005)。此外,其排泄的蜜露还可以引起煤污病影响寄主植物光合作用 (Barringer *et al.*, 2015)。近年来该害虫对我国葡萄、猕猴桃等产业造成较大损失 (Wang *et al.*, 2018), 还对园林绿化产生不良影响 (EPPO, 2017)。斑衣蜡蝉原产于中国、日本、越南等东南亚国家,2004 年入侵韩国,现已扩散至韩国全境 (Kim *et al.*, 2011); 2014 年传入美国,并迅速蔓延,目前已在美国 4 个州发现且对当地生态环境产生了严重威胁 (Lee *et al.*, 2019)。欧洲和地中海植物保护组织 (EPPO) 于 2017 年对斑衣蜡蝉进行了风险评估,认为该害虫对欧洲具有中等入侵风险,一旦传入将对欧洲的葡萄产业造成严重经济损失 (EPPO, 2017)。斑衣蜡蝉在世界范围内的扩散蔓延不仅增加了我国货物出口的贸易壁垒,同时也增加了检疫成本。

目前斑衣蜡蝉以化学防治为主,不利于保护生物多样性和自然环境 (Leach *et al.*, 2019)。利用天敌进行生物防治是控制斑衣蜡蝉种群密度,阻止柿疯病进一步传播的重要途径之一 (李令军, 2014)。斑衣蜡蝉天敌已报道 4 种寄生蜂和 2 种病原微生物

(周尧, 1946; 闫家河等, 2008; Yang *et al.*, 2015; Liu and Mottern, 2017; Clifton *et al.*, 2019)。目前报道的若虫期天敌为螫蜂属 *Dryinus* 的布氏螫蜂 *D. browni*, 对斑衣蜡蝉具有捕食和寄生双重控制作用, 分布区为北京、山东商河、河南驻马店 (杨集昆, 1994; 闫家河等, 2008; Xu *et al.*, 2013), 而野外调查时发现陕西延安、江苏南京和山东泰安等地也有寄生斑衣蜡蝉若虫的螫蜂属天敌,但尚未确定其种名。目前我国对斑衣蜡蝉若虫期螫蜂属天敌的研究集中于生物学特性及人工繁殖方法等方面,评估其对斑衣蜡蝉若虫寄生率的方法有直接观察法和饲养观察法,即通过观察斑衣蜡蝉翅芽下方是否存在螫蜂卵或幼虫囊包 (图 1: A, B, C), 或者将野外采集到的斑衣蜡蝉在实验室内进行人工饲养至天敌羽化统计寄生率 (董景芳, 1987; 闫家河等, 2008)。但在寄生早期肉眼很难观察到斑衣蜡蝉体表的螫蜂卵,而将斑衣蜡蝉若虫采集带回室内饲养,可能会因为部分斑衣蜡蝉死亡造成统计的寄生率偏低。

本研究分别从北京、山东泰安、河南驻马店和江苏南京采集到斑衣蜡蝉若虫期寄生蜂,其中江苏南京并未采集到成虫样本。为明确不同地理种群斑衣蜡蝉寄生蜂种类以及其地理种群间的遗传差异,开发寄生蜂快速检测方法,准确测定其对斑衣蜡蝉的寄生率,本研究利用 DNA 条形码技术分别对北京、山东泰安、河南驻马店和江苏南京的斑衣蜡蝉若虫寄生蜂种群 *COI* 和 28S rDNA 序列进行比对,基于 *COI* 序列分析各地理种群斑衣蜡蝉若虫寄生蜂的遗



图1 斑衣蜡蝉若虫及其寄生蜂

Fig. 1 *Lycorma delicatula* nymphs and parasitoid

A: 斑衣蜡蝉健康若虫 Healthy nymph of *L. delicatula*; B: 被寄生早期的斑衣蜡蝉若虫(无明显囊包) Parasitized *L. delicatula* nymph at the early stage (without visible thalacium); C: 被寄生晚期的斑衣蜡蝉若虫(囊包明显) Parasitized *L. delicatula* nymph at the late stage (with visible thalacia).

传差异,并根据 *COI* 序列设计种特异性引物用于寄生蜂的快速检测,测定其对斑衣蜡蝉的寄生率,明确该若虫寄生蜂对斑衣蜡蝉的控害作用,为进一步人工利用该天敌防治斑衣蜡蝉提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

**1.1.1** 螯蜂属天敌形态鉴定样本采集:斑衣蜡蝉若虫寄生蜂样本分别采集于北京、山东泰安和河南驻马店(表1),于2019年5月下旬-6月上旬分别在

试验点设置黄板诱捕寄生蜂成虫,选取形态特征完整的雌、雄成虫各3头,浸泡于75%酒精中用于形态鉴定。

**1.1.2** 中华螯蜂不同地理种群遗传差异样本采集:分别于北京、山东泰安、江苏南京和河南驻马店(表1)各地理种群中选取5头囊包明显的斑衣蜡蝉若虫将囊包解剖后获得中华螯蜂幼虫,提取DNA用于中华螯蜂不同地理种遗传分化和种特异性PCR(species-specific PCR, SS-PCR)引物检测效果的测定,在北京试验点选取5头寄生蜂成虫提取DNA作为对照。

表1 斑衣蜡蝉若虫寄生蜂样本信息

Table 1 Sample information of parasitoids of *Lycorma delicatula* nymphs

| 序号<br>No. | 种群代码<br>Population<br>code | 样本数<br>Number of<br>specimens | 采样点<br>Sampling<br>locality | 经纬度<br>Longitude<br>and latitude | 海拔(m)<br>Altitude | 采集时间<br>(年-月-日)<br>Sampling date<br>(year-month-day) | GenBank 登录号<br>GenBank accession number |                        |
|-----------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------|--|---|------------------------|
|           |                            |                               |                             |                                  |                   |  | <i>COI</i>                              | 28S rDNA               |
| 1         | BJ                         | 5                             | 北京<br>Beijing               | 40°0'N,<br>116°14'E              | 70                | 2019-06-11   | MN727864 –<br>MN727868                  | MN741119 –<br>MN741123 |
| 2         | NJ                         | 4                             | 江苏南京<br>Nanjing, Jiangsu    | 32°7'N,<br>118°46'E              | 20                | 2019-06-05   | MN727869 –<br>MN727872                  | MN741124 –<br>MN741127 |
| 3         | ZMD                        | 4                             | 河南驻马店<br>Zhumadian, Henan   | 33°0'N,<br>120°20'E              | 50                | 2019-06-07   | MN727873 –<br>MN727876                  | MN741128 –<br>MN741131 |
| 4         | TA                         | 5                             | 山东泰安<br>Tai'an, Shandong    | 36°10'N,<br>117°9'E              | 120               | 2019-06-09   | MN727877 –<br>MN727881                  | MN741132 –<br>MN741136 |

**1.1.3** SS-PCR 引物特异性检测样本:为测定 SS-PCR 引物对不同虫态中华螯蜂、未被寄生的斑衣蜡蝉若虫和不同地理种群中华螯蜂幼虫的扩增作用,分别采集中华螯蜂幼虫、被中华螯蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫、中华螯蜂成虫和未被寄生的斑衣蜡蝉若虫。

其中,从在北京试验点采集的具明显中华螯蜂囊包的斑衣蜡蝉若虫(图1:C),取其中10头保存于无水酒精中作为被中华螯蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫样本备用;另20头置于50 mL离心管中,提供臭椿新鲜小枝供斑衣蜡蝉取食,放置于25℃、相对湿度65% ±

5%、光周期 12L: 12D 的培养箱中饲养, 每日更换臭椿枝条至寄生蜂幼虫脱囊做茧, 随后分别将茧剖开取出寄生蜂老熟幼虫, 作为中华螫蜂幼虫样本。中华螫蜂成虫为黄板诱集后保存备用。未被寄生的斑衣蜡蝉若虫为北京地区采集到的斑衣蜡蝉卵块放置于相同条件的培养箱中, 待其孵化后收集斑衣蜡蝉若虫, 以确保斑衣蜡蝉若虫未被寄生。上述样品均保存于无水乙醇中用于提取 DNA。

**1.1.4 不同地理种群斑衣蜡蝉若虫寄生率检测样本:** 分别在北京、山东泰安、江苏南京和河南驻马店采集 2-4 龄斑衣蜡蝉若虫, 每个采样点随机选择两个不同的种群, 每个种群 50~100 头, 浸泡于无水乙醇中用于提取 DNA。

## 1.2 斑衣蜡蝉若虫寄生蜂的鉴定

将 1.1.1 节所述的诱集到的斑衣蜡蝉若虫寄生蜂带回实验室内, 利用二氯甲烷溶解其体表粘虫胶后, 整姿制成标本, 在蔡司 Stemi 2000-C 体视显微镜下进行形态学观察, 并利用佳能 70D 照相机拍照, 随后根据其寄主和形态特征进行鉴定, 同时寄送螫蜂分类专家鉴定核实。

## 1.3 DNA 提取

利用 QIAGEN DNeasy® Blood and Tissues Kit 试剂盒分别提取 1.1 节所采集的待测样本总 DNA。随后利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测提取到的 DNA 的质量, 并利用 NanoDrop Spectrophotometer (DS-11 Envivx) 测定 DNA 浓度, 检测合格后保存于 -20℃ 备用。

## 1.4 COI 和 28S rDNA 序列 PCR 扩增和测序

COI 和 28S rDNA 基因 PCR 扩增引物为通用引物。COI 引物 (Folmer *et al.*, 1994), LC01490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'; HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。28S rDNA 引物 (Campbell *et al.*, 1993; Goolsby *et al.*, 2006), D2-3549: 5'-AGTCGTGTGCTTGATAGTGCA G-3'; D2-4068: 5'-TTGGTCCGTGTTCAAGACGGG-3'。PCR 反应体系 (25 μL): GoTaq® Green Master Mix (Promega) 预混液 12.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 1.3 节提取的不同地理种群斑衣蜡蝉若虫寄生蜂 DNA 模板 (25~150 ng/μL) 1 μL, 9.5 μL ddH<sub>2</sub>O。COI 和 28S rDNA 序列的 PCR 反应条件: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 10 s, 54℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 30 s, 重复 35 个循环; 72℃ 最终延伸 5 min。所有 PCR 反应均使用 Biometra TOne 96G (Analytikjena, 德国) 进行。利用 1.2% 琼脂糖凝胶

电泳对 PCR 产物进行检测, 选取目标条带清晰的样品送样至英潍捷基 (上海) 贸易有限公司利用 ABI 3730 测序仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行双向测序。

## 1.5 SS-PCR 中华螫蜂快速鉴定

基于 1.4 节测序结果, 利用 Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) (Koressaar *et al.*, 2018) 和 NCBI Primer Blast 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINKLOC=MultiSensor>) (Ye *et al.*, 2012) 对 COI 序列设计 SS-PCR 特异性引物 (表 2)。随后以 1.3 节提取的中华螫蜂幼虫、被中华螫蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫、中华螫蜂成虫和未被中华螫蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫 DNA 为模板, PCR 反应体系及条件同 1.4 节, 每对引物重复 5 次。利用琼脂糖凝胶电泳对所得 PCR 产物进行检测, 以确定引物的特异性, 并随机选择 10 份 PCR 产物进行测序, 以确定 PCR 产物为目标 COI 序列部分片段。

选择扩增出明显特异性条带的引物用于 SS-PCR 引物种特异性的检验, 并根据引物退火温度设置 PCR 反应体系和条件 (同 1.4 节)。随后将 1.3 节提取的中华螫蜂幼虫 DNA 分别溶解于无核酸酶水和寄主斑衣蜡蝉若虫 DNA (50 ng/μL) 中, 中华螫蜂幼虫 DNA 浓度梯度为 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 和 0.000005 ng/μL, 每个浓度重复 5 次, 测定 SS-PCR 引物对中华螫蜂 DNA 的最低检测阈值。

## 1.6 寄生蜂对斑衣蜡蝉若虫寄生率的测定

肉眼观察各个采样点的斑衣蜡蝉若虫翅芽下是否存在寄生蜂卵或幼虫囊包 (闫家河等, 2008) (图 1: C), 分别记录目测法统计的被寄生斑衣蜡蝉若虫总数和总样本数, 计算目测法斑衣蜡蝉若虫的寄生率。随后以 1.3 节提取的所有肉眼观察过的斑衣蜡蝉若虫单头 DNA 为模板, 利用 SS-PCR 引物进行 PCR (反应体系和条件同 1.4 节), 根据 PCR 产物测序结果确定斑衣蜡蝉若虫是否被寄生, 计算寄生率。寄生率 = 被寄生斑衣蜡蝉若虫总数 / 总样本数 × 100%。

## 1.7 数据分析

利用 BioEdit (v7.2.5) 对 1.4 节双向测序结果进行拼接、校对, 排除假基因的可能后将序列提交至 NCBI, 获得 GenBank 登录号。随后利用 DNAMAN 8 (Lynnon Biosoft, Quebec, 加拿大) 软件检验所得序列能否正确翻译蛋白质以确保序列的正确性, 在 NCBI database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 中利用 BLAST 搜索确定其为螫蜂序列, 以排除其他物种干

表 2 基于中华螫蜂 *COI* 序列的 SS-PCR 引物信息  
Table 2 SS-PCR primer information based on the *COI* sequence of *Dryinus sinicus*

| 引物<br>Primer | 引物序列(5' - 3')<br>Primer sequence | 目的片段长度(bp)<br>Target fragment length |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| DS-54        | TCTCCTCCACCTACAGGATCA            | 191                                  |
| DS-265       | TCCATTATGGGGGCAATAAA             |                                      |
| DS-54        | TCTCCTCCACCTACAGGATCA            | 205                                  |
| DS-279       | TTGCAGGGATTCTCCATT               |                                      |
| DS-360       | CCTGTACCTGCTCCTAATGAAAC          | 251                                  |
| DS-633       | GATCAGGAATATTAGGAACAGCATTAAAG    |                                      |
| DS-269       | AATGGAAGAAATCCCTGCAATATG         | 189                                  |
| DS-481       | GGGTTTGGAAATTGATTACTACCTT        |                                      |
| DS-47        | AATAGGATCTCCTCCACCTACA           | 272                                  |
| DS-340       | GGGTGAACTGTTTATCCTCCTT           |                                      |
| DS-424       | TCCATTATGGGGGCAATAAA             | 192                                  |
| DS-635       | TCTCCTCCACCTACAGGATCA            |                                      |
| DS-313       | TTAGGAGGAGGTACAGGGTGAA           | 308                                  |
| DS-642       | AATAGGATCTCCTCCACCTACAG          |                                      |
| DS-182       | GGGGTTTGGAAATTGATTAGTACC         | 132                                  |
| DS-338       | ACAGTTCACCTGTACCTCCT             |                                      |
| DS-318       | AGGAGGTACAGGGTGAAGTGT            | 98                                   |
| DS-436       | CCCCATAATGGAAGAAAT               |                                      |

扰。使用 MEGA 10.0.6 (Kumar *et al.*, 2018) 对序列进行多重比对。*COI* 和 28S rDNA 序列分别利用 DnaSP 5.1 (Rozas *et al.*, 2010) 计算各序列多态位点数量 (*S*)、单倍型数量 (*H*)、单倍型多样性 (*Hd*)、核苷酸多样性 (*Pi*) 和遗传分化 (*Fst*), 并进行 Tajima's *D* 检验。在 MEGA 10.0.6 中利用 Clustal W 序列校对后, 分析各序列的碱基组成。随后采用 Network 4.1 软件绘制 *COI* 序列单倍型网络图 (Bandelt *et al.*, 1999), 基于 *COI* 序列利用 K2P 模型 (Kimura-2-parameter distance) (Kimura, 1980) 分析各寄生蜂种群间的遗传距离。以柯氏螫蜂 *Dryinus koebelei* (GenBank 登录号: JN306860) 作为外群 (NCBI database; Stahlhut *et al.*, 2013), 利用邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统发育树。

利用 SPSS 20.0 进行数据分析, 不同地理种群中华螫蜂的寄生率和不同检测方法统计的寄生率间的差异显著性利用  $\chi^2$  检验 ( $\alpha = 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 斑衣蜡蝉若虫寄生蜂鉴定

斑衣蜡蝉若虫寄生蜂标本寄给世界螫蜂科权威分类专家意大利图西亚大学 (Tuscia University) Massimo Olmi 教授鉴定为中华螫蜂 *Dryinus sinicus*, Olmi 教授为该蜂的命名者。形态描述及图片可参

考杨集昆 (1994)、何俊华和许再福 (2002) 和 Xu 等 (2013) 文献 (图 2: A), 雌蜂前足螫的大爪上均具亚端齿 (图 2: B), 且其触角第 3 节极长, 约等于第 4 和 5 节触角之和 (图 2: C), 与文献中中华螫蜂的形态特征描述一致, 因此本研究所采集的斑衣蜡蝉若虫寄生蜂为中华螫蜂。

### 2.2 中华螫蜂种群遗传多样性

PCR 扩增得到中华螫蜂种群 643 bp 的 *COI* 序列和 614 bp 的 28S rDNA 序列。其中, *COI* 序列中 A, T, C, G 碱基占比分别为 31.77%, 44.17%, 10.43% 和 31.77%, A + T 含量为 75.94%, 含有保守位点 624 个, 变异位点 19 个, 简约信息位点 7 个, 自裔位点 12 个。28S rDNA 序列中 A, T, C, G 碱基占比分别为 20.82%, 22.22%, 26.50% 和 30.47%, A + T 含量为 43.04%。其中含有保守位点 586 个, 变异位点 28 个, 简约信息位点 16 个, 自裔位点 12 个。

*COI* 序列中共检测到 16 种单倍型, 其中泰安种群 (TA) 中 3 个样本共享单倍型为 H15, 其余单倍型均为样本独有的单倍型 (图 3)。而 28S rDNA 序列中则检测到 4 个单倍型, 北京 (BJ)、驻马店 (ZMD) 和泰安 (TA) 种群中均为 Hap1, 南京种群 (NJ) 则包含 4 个不同的单倍型 (表 3)。*COI* 序列核苷酸多样性 (*Pi*) 最高为南京种群 (NJ) ( $0.0099 \pm 0.0027$ ), 泰安种群 (TA) 最低 ( $0.0018 \pm 0.0000$ ); 28S rDNA 序

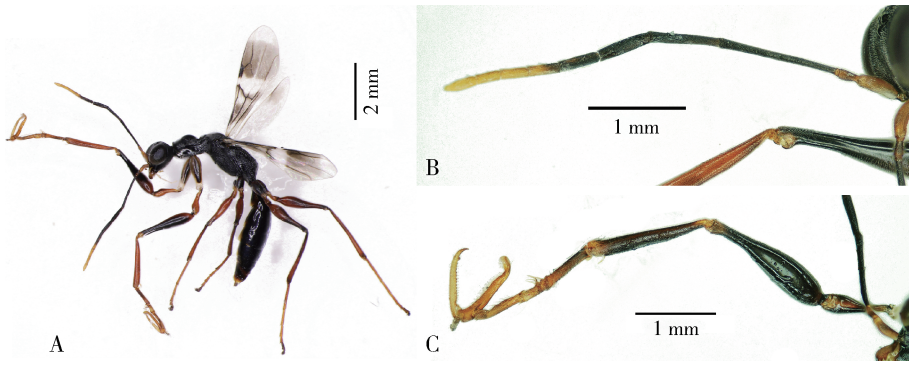
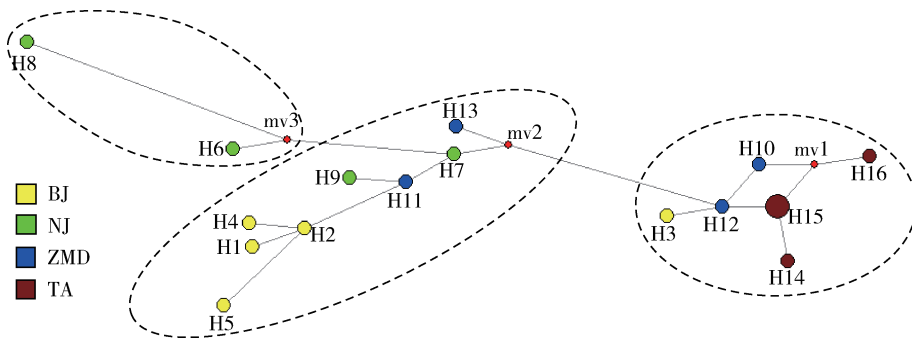


图2 中华螫蜂主要形态特征

Fig. 2 Main morphological characteristics of *Dryinus sinicus*

A: 中华螫蜂雌成虫 *Dryinus sinicus* female adult; B: 雌成虫前足 Propodium of female adult; C: 雌成虫触角 Antenna of female adult.

图3 基于 *COI* 序列的中华螫蜂单倍型中介网络图Fig. 3 Median-joining haplotype network of *Dryinus sinicus* based on *COI* sequence

H1 - H16: 单倍型 Haplotypes; mv1 - mv3: 可能突变的位点 Possible mutation sites.

表3 不同地理种群中华螫蜂单倍型多样性

Table 3 Haplotype diversity of different geographical populations of *Dryinus sinicus*

| 种群代码<br>Population code | 基因<br>Gene | N | H | 单倍型<br>Haplotypes                      | <i>Hd</i>     | <i>Pi</i>       | Tajima's <i>D</i> |
|-------------------------|------------|---|---|--|---------------|-----------------|-------------------|
| BJ                      | <i>COI</i> | 5 | 5 | H1 (1), H2 (1), H3 (1), H4 (1), H5 (1) | 1.000 ± 0.126 | 0.0065 ± 0.0021 | -0.89450          |
|                         | 28S rDNA   | 5 | 1 | Hap1 (5)                               | 0.000 ± 0.000 | 0.0000 ± 0.0000 |                   |
| NJ                      | <i>COI</i> | 4 | 4 | H6 (1), H7 (1), H8 (1), H9 (1)         | 1.000 ± 0.177 | 0.0099 ± 0.0027 | -0.07004          |
|                         | 28S rDNA   | 4 | 4 | Hap1 (1), Hap2 (1), Hap3 (1), Hap4 (1) | 1.000 ± 0.177 | 0.0245 ± 0.0078 | 0.04097           |
| ZMD                     | <i>COI</i> | 4 | 4 | H10 (1), H11 (1), H12 (1), H13 (1)     | 0.700 ± 0.003 | 0.0071 ± 0.0017 | 0.68673           |
|                         | 28S rDNA   | 4 | 1 | Hap1 (4)                               | 0.000 ± 0.000 | 0.0000 ± 0.0000 |                   |
| TA                      | <i>COI</i> | 5 | 3 | H14 (1), H15 (3), H16 (1)              | 0.700 ± 0.218 | 0.0018 ± 0.0000 | -1.0849           |
|                         | 28S rDNA   | 5 | 1 | Hap1 (5)                               | 0.000 ± 0.000 | 0.0000 ± 0.0000 |                   |

种群代码见表1;下同。For population code, see Table 1. The same below. N: 样本数 Number of samples; H: 单倍型总数 Number of haplotypes; *Hd*: 单倍型多样性 Haplotype diversity; *Pi*: 核苷酸多样性 Nucleotide diversity; Tajima's *D*: Tajima's *D* 值 Tajima's *D* value. H1 - H16: *COI* 序列单倍型 Haplotypes based on *COI* sequence; Hap1 - 4: 28S rDNA 序列单倍型 Haplotypes based on 28S rDNA sequence.

列核苷酸多样性最高为南京种群(NJ) ( $0.0245 \pm 0.0078$ )。北京种群(BJ)和南京种群(NJ)的 *COI* 序列的单倍型多样性(*Hd*)高于其他两个种群的,但除南京种群(NJ)外,其他3个种群28S rDNA序列的单倍型多样性均为0。分子多样性指数表明南京种群(NJ)遗传多样性最高。

### 2.3 基于 *COI* 的中华螫蜂遗传距离及遗传分化

利用 K2P 模型计算中华螫蜂不同地理种群间

遗传距离在 0.00691 ~ 0.01310 之间(表4)。驻马店种群(ZMD)和泰安种群(TA)间遗传距离最近(0.00691),泰安种群(TA)与南京种群(NJ)间遗传距离最远(0.01310)。在不同地理种群遗传分化方面,种群间固定系数(*Fst*) 在 0.11111 ~ 0.60983 之间,其中北京种群(BJ)和泰安种群(TA) *Fst* 最高,为 0.60983,表明北京种群和泰安种群间分化程度较高,而南京种群和驻马店种群间 *Fst* 系数最低。

## 2.4 基于 *COI* 序列的不同地理种群中华螫蜂的系统发育分析

NJ 系统发育树表明,本研究所采集的斑衣蜡蝉若虫寄生蜂样本的 *COI* 序列均聚于一枝,而与外群柯氏螫蜂 *COI* 序列分离(图 4),表明所选择的外群 *COI* 序列所属物种与斑衣蜡蝉若虫寄生蜂亲缘关系远,而不同地理种群间斑衣蜡蝉若虫寄生蜂亲缘关系较近,因此本研究所检测斑衣蜡蝉若虫寄生蜂均为同一物种。

表 4 基于 *COI* 序列的中华螫蜂不同地理种群间遗传距离(下三角)和固定系数 *Fst*(上三角)

Table 4 Pairwise genetic distance (below the diagonal) and *Fst* (above the diagonal) among different geographical populations of *Dryinus sinicus* based on *COI* sequence

|     | BJ      | NJ      | ZMD     | TA      |
|-----|---------|---------|---------|---------|
| BJ  |         | 0.22727 | 0.16352 | 0.60983 |
| NJ  | 0.01045 |         | 0.11111 | 0.56364 |
| ZMD | 0.00818 | 0.00959 |         | 0.34815 |
| TA  | 0.01074 | 0.01310 | 0.00691 |         |

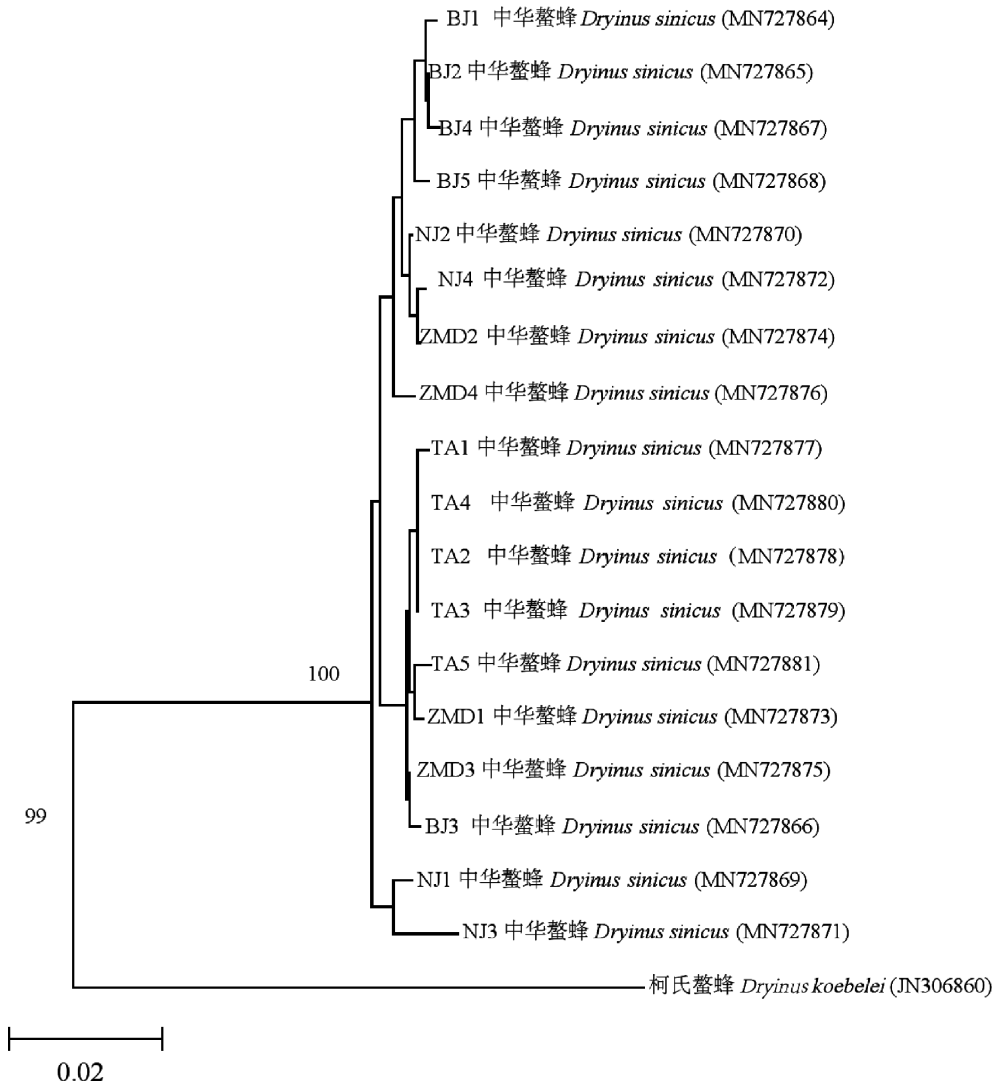


图 4 基于 *COI* 序列用 K2P 模型构建的中华螫蜂不同地理种群样本邻接系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining tree of specimens from different geographical populations of *Dryinus sinicus* using Kimura-2-parameter based on *COI* sequences

括号内代码为 GenBank 登录号;以柯氏螫蜂 *COI* 基因序列为外群。The codes in brackets are GenBank accession no. *COI* gene sequence of *Dryinus koebulei* was used as the outgroup.

## 2.5 应用 SS-PCR 引物对中华螫蜂的快速检测

根据 *COI* 序列设计 10 对 SS-PCR 引物(表 2),并以 1.3 节提取的中华螫蜂幼虫和成虫、未被寄生

的斑衣蜡蝉若虫和被寄生的斑衣蜡蝉若虫 DNA 为模板进行扩增后发现,引物 DS-54/DS-279(表 2)对中华螫蜂幼虫和成虫及被寄生的斑衣蜡蝉若虫均具

有扩增能力,但不能扩增未被中华螫蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫 DNA,且可以成功扩增出各个地理种群中华螫蜂 DNA,表明该引物为中华螫蜂的特异性引物

(图 5)。SS-PCR 最低检测阈值测定表明,DS-54/DS-279 可以扩增出稀释至  $0.000005 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的中华螫蜂 DNA(图 6)。

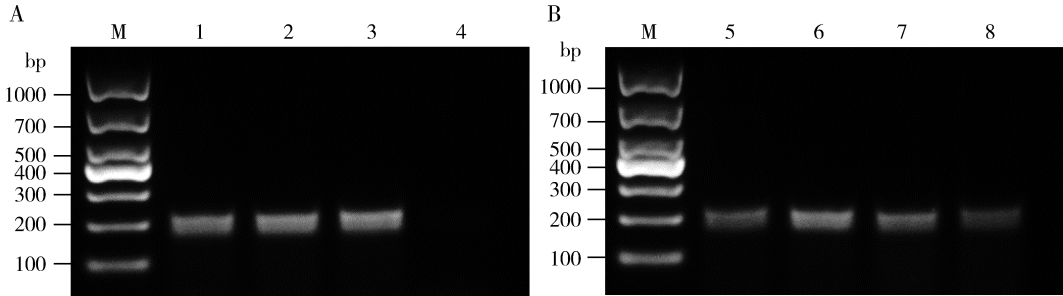


图 5 SS-PCR 引物 DS-54/DS-279 对不同虫态中华螫蜂和斑衣蜡蝉若虫 DNA 的扩增能力

Fig. 5 Amplification pattern of DNA from *Dryinus sinicus* at different developmental stages and *Lycorma delicatula* nymphs by SS-PCR primer DS-54/DS-279

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: 中华螫蜂幼虫 *D. sinicus* larva; 2: 被中华螫蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫 *L. delicatula* nymph parasitized by *D. sinicus*; 3: 中华螫蜂成虫 *D. sinicus* adult; 4: 未被寄生的斑衣蜡蝉若虫 Un-parasitized *L. delicatula* nymph; 5-8: 分别为北京 (BJ)、南京 (NJ)、驻马店 (ZMD)、泰安 (TA) 中华螫蜂种群幼虫 *D. sinicus* larvae of Beijing (BJ), Nanjing (NJ), Zhumadian (ZMD), and Tai'an (TA) populations, respectively.

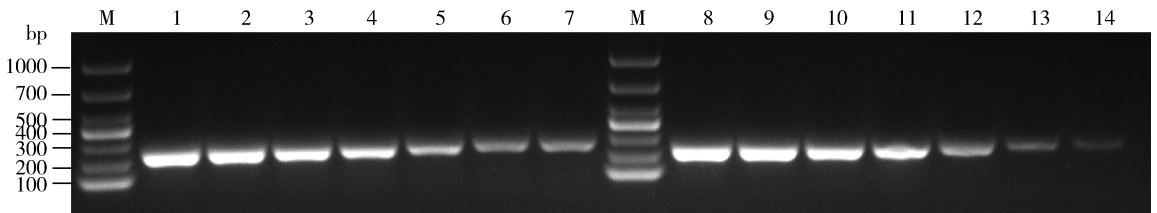


图 6 SS-PCR 引物 DS-54/DS-279 对中华螫蜂 DNA 的最低检测阈值

Fig. 6 The detection threshold for *Dryinus sinicus* DNA using SS-PCR primer DS-54/DS-279

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1-7: 以浓度分别为 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 和  $0.000005 \text{ ng}/\mu\text{L}$  的中华螫蜂 DNA 为模板的 PCR 产物 PCR products using *D. sinicus* DNA at the concentrations of 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 and  $0.000005 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , respectively, as the template; 8-14: 斑衣蜡蝉 DNA ( $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) 分别与 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 和  $0.000005 \text{ ng}/\mu\text{L}$  中华螫蜂 DNA 的混合物为模板的 PCR 产物 PCR products using DNA mixtures of  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  *L. delicatula* DNA mixed with *D. sinicus* DNA at the concentrations of 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 and  $0.000005 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , respectively, as the template.

## 2.6 中华螫蜂对不同采样点斑衣蜡蝉若虫的寄生率

利用 SS-PCR 检测中华螫蜂对斑衣蜡蝉若虫的寄生率,结果表明该寄生蜂对斑衣蜡蝉若虫寄生率较高(图 7),其中驻马店种群的寄生率高达 60.00%,南京种群的寄生率仅为 22.54%,显著低于其他采样点种群的寄生率( $\chi^2 = 14.718$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.002$ )。而利用目测法观察统计的寄生率范围为 5.63%~36.98%,南京种群的寄生率同样显著低于其他采样点种群的寄生率( $\chi^2 = 23.448$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.001$ )。使用 SS-PCR 检测得到的中华螫蜂对各采样点斑衣蜡蝉若虫的寄生率均显著高于使用目测法观察得到的结果,两种方法检测中华螫蜂对北京斑衣蜡蝉若虫的寄生率差异最显著,可达 40.43%

( $\chi^2 = 17.121$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ )。

## 3 结论与讨论

本研究利用 DNA 条形码技术明确了所采集的斑衣蜡蝉若虫期天敌种群间没有显著的遗传差异,为同一种中华螫蜂。并在此基础上根据 *COI* 序列设计了中华螫蜂 SS-PCR 引物,该引物可以成功扩增所有虫态中华螫蜂的种特异性片段,最低检测阈值可达  $0.000005 \text{ ng}/\mu\text{L}$  DNA。利用不同方法对不同地理种群斑衣蜡蝉若虫的中华螫蜂寄生率进行了检测,SS-PCR 检测寄生率的准确度明显优于目测法。

本研究基于 *COI* 序列的遗传差异分析结果显



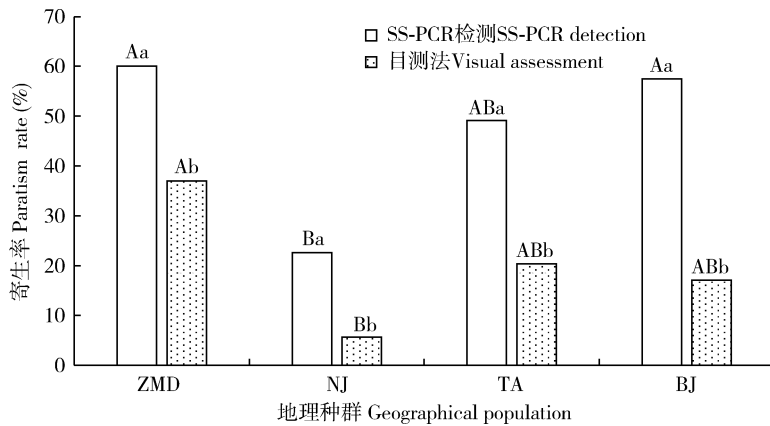


图7 中华螫蜂对不同采样点斑衣蜡蝉若虫的寄生率

Fig. 7 Parasitism rate of *Dryinus sinicus* on *Lycorma delicatula* nymphs sampled from different sampling localities

图中数据为平均值 ± 标准误; 柱上不同大写字母表示同一检测方法所得寄生率在不同采样点间差异显著 ( $\chi^2$  检验,  $\alpha = 0.05$ ), 不同小写字母表示相同采样点的寄生率在不同检测方法间差异显著 ( $\chi^2$  检验,  $\alpha = 0.05$ )。Data in the figure are mean ± SE. Different capital letters above bars indicate significant differences in parasitism rates among different sampling localities using the same detection method ( $\chi^2$  test,  $\alpha = 0.05$ ), while different small letters indicate significant differences in parasitism rates in the same sampling locality analyzed by different detection methods ( $\chi^2$  test,  $\alpha = 0.05$ ).

示中华螫蜂不同地理种群间遗传多样性较低,但在构建系统发育树时由于数据库中螫蜂属序列上传较少,因此以螫蜂科其他昆虫 *COI* 序列作为外群进行分析,中华螫蜂所有地理种群 *COI* 序列均聚为一枝,而与外群柯氏螫蜂 *COI* 序列分离,这表明中华螫蜂与所选外群亲缘关系较远。中华螫蜂种群间遗传距离在 0.00691 ~ 0.01310 之间,Hebert 等(2003)对动物线粒体 *COI* 序列进行分析认为 98% 物种内遗传距离差异为 0 ~ 2.00%,没有出现种下分化,为同一种。寄生斑衣蜡蝉若虫期螫蜂属天敌还有史氏螫蜂 *Dryinus stantoni* (Xu *et al.*, 2013),而本研究所采集的螫蜂属天敌经形态鉴定为中华螫蜂,且不同地理种群的样本之间均没有显著的遗传差异,因此目前采集到的北京、泰安、南京和驻马店种群均为中华螫蜂。这两种斑衣蜡蝉螫蜂属天敌是否为同物异名有待进一步研究。

目前常用的天敌控害作用评价方法除传统的生态学方法外(刘树生, 2004),酶联免疫(ELISA)、同位素标记技术和 SS-PCR 等分子生物学方法在天敌控害作用的评价中应用日益广泛(Zhang *et al.*, 2007)。本研究分别利用直接观察法和 SS-PCR 技术对中华螫蜂对斑衣蜡蝉若虫的寄生率进行了检测,SS-PCR 检测到的寄生率显著高于采用目测法直接观察的结果。这可能是由于在中华螫蜂寄生早期,其卵和囊包较小,不易发现,导致直接观察到的寄生率偏低。若将斑衣蜡蝉带回实验室进行实验室种群饲养观察,同样可能由于斑衣蜡蝉若虫期死亡

导致统计的寄生率偏低。虽然研究认为有些寄生蜂在寄生后可能因寄主免疫导致其后代在寄主体内死亡,特别是内寄生性天敌,SS-PCR 可以用于检测寄生蜂寄生寄主的百分比。将 SS-PCR 与室内人工饲养和传统解剖相结合则能够得到更准确的寄生率(Gariepy *et al.*, 2007)。目前 SS-PCR 广泛应用于茧蜂科(Braconidae)、姬蜂科(Ichneumonidae)、金小蜂科(Pteromalidae)等天敌的检测(Hale *et al.*, 2004; Douhovnikoff *et al.*, 2006; Traugott *et al.*, 2006)。而中华螫蜂作为斑衣蜡蝉若虫的外寄生性天敌,其所受到的寄主免疫较内寄生性天敌低,研究开发中华螫蜂不同发育阶段的快速检测鉴定技术,可以快速、准确检测出中华螫蜂寄生率,并结合室内饲养明确中华螫蜂对斑衣蜡蝉的寄生成功率,可评估其对斑衣蜡蝉的控制作用,为利用中华螫蜂防治斑衣蜡蝉奠定基础。

中华螫蜂在不同采样点的寄生率存在显著差异,驻马店和北京种群的寄生率明显高于南京种群,这可能是由于北京、驻马店和泰安采集的样本均为近自然环境,使用化学农药较少,而南京地区的采集于行道树,为防治斑衣蜡蝉等园林害虫通常会使用化学农药进行防治,导致天敌种群密度降低。此外采用两种方法检测的中华螫蜂对北京斑衣蜡蝉若虫的寄生率差异最大,这可能是由于不同采样点斑衣蜡蝉若虫种群生活史存在一定差异,北京地区的中华螫蜂羽化较晚,使用目测法统计的中华螫蜂寄生率远低于实际寄生率。因此,本研究开发的快速检

测技术可以应用于中华螫蜂寄生早期准确、快速检测。

此外,在往年调查过程中还在陕西延安、甘肃兰州及山东烟台和商河发现螫蜂茧或者被螫蜂寄生的斑衣蜡蝉若虫,这表明中华螫蜂在我国分布范围较广,基本可以覆盖斑衣蜡蝉的分布区。虽然目前斑衣蜡蝉在我国并不属于主要害虫,但其不仅直接影响寄主植物树势,还可以作为媒介昆虫传播柿疫病影响柿树的产量,严重时甚至导致柿树死亡(俎显诗, 1992)。柿疫病在我国广泛分布,其中一些地区发病株率达 70% 以上,河北、山西、河南等区域斑衣蜡蝉危害也十分严重(王祈楷等, 1989; 俎显诗, 1992; 宗学普和黎彦, 2005)。斑衣蜡蝉作为柿疫病的媒介昆虫之一,降低斑衣蜡蝉种群密度可以有效控制柿疫病的传播,避免柿疫病的进一步传播扩散(李令军, 2014)。斑衣蜡蝉排泄的蜜露还会引发煤污病,影响其寄主植物及周围其他植物光合作用(Barringer *et al.*, 2015; EPPO, 2017)。自其入侵至韩国和美国等国家后严重危害葡萄,影响葡萄产业(Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2019)。由于斑衣蜡蝉通常危害经济树种和园林绿化树种,而目前对斑衣蜡蝉通常采取施用大量化学农药进行防治,影响生态环境和人类健康(EPPO, 2017; Lee *et al.*, 2019)。因此,研发中华螫蜂人工繁殖和释放利用技术是斑衣蜡蝉绿色防控的重要手段之一。

**致谢** 本研究螫蜂样本由意大利图西亚大学(Tuscia University) Massimo Olmi 教授鉴定,山东省商河县森林保护站闫家河高级工程师对螫蜂饲养技术给予了指导和帮助,谨致谢忱。

## 参考文献 (References)

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1): 37 – 48.

Barringer LE, Donovall LR, Spichiger SE, Lynch D, Henry D, 2015. The first new world record of *Lycorma delicatula* (Insecta: Hemiptera: Fulgoridae). *Entomol. News*, 125(1): 20 – 23.

Campbell BC, Steffen-Campbell JD, Werren JH, 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.*, 2(4): 225 – 237.

Chou I, 1946. A study on *Lycorma delicatula* White (Fulgoridae, Homoptera). *Entomol. Ars*, 1(2–4): 31 – 54. [周尧, 1946. 斑衣蜡蝉之研究. 昆虫与艺术, 1(2–4): 31 – 54]

Clifton EH, Castrillo LA, Gryganskyi A, Hajek AE, 2019. A pair of

native fungal pathogens drives decline of a new invasive herbivore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116(19): 9178 – 9180.

Dong JF, 1983. The study of biological characteristics of *Dryinus* sp. *Nat. Enemies Insect*, 5(4): 228 – 230. [董景芳, 1983. 斑衣蜡蝉螫蜂生物学特性研究. 天敌昆虫, 5(4): 228 – 230]

Dong JF, 1987. Mass rearing method of *Dryinus* sp. *Henan Sci. Tech.*, (1): 17 – 18. [董景芳, 1987. 斑衣蜡蝉螫蜂饲养方法. 河南科技, (1): 17 – 18]

Douhovnikoff V, Nerney C, Roderick GK, Newton CH, Welter SC, 2006. Isolation of nine microsatellite loci in *Dolichogenidea homoesomae* (Hymenoptera) a parasitoid of the sunflower moth *Homoesoma electellum* (Lepidoptera). *Mol. Ecol. Notes*, 6(1): 96 – 97.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2017. Pest risk analysis for *Lycorma delicatula*. Available at <https://pra.epppo.int/praf/4a1f801f-8a4b-415c-abe4-52f54eb8ef33>.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5): 294 – 299.

Garipey TD, Kuhlmann U, Gillott C, Erlandson M, 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of arthropods. *J. Appl. Entomol.*, 131(4): 225 – 240.

Goolsby JA, De Barro PJ, Makinson JR, Pemberton RW, Hartley DM, Frohlich DR, 2006. Matching the origin of an invasive weed for selection of a herbivore haplotype for a biological control programme. *Mol. Ecol.*, 15(1): 287 – 297.

Hale ML, Acs Z, Stone GN, 2004. Polymorphic microsatellite loci in *Eurytoma brunniventris*, a generalist parasitoid in oak cynipid galls. *Mol. Ecol. Notes*, 4(2): 197 – 199.

He JH, Xu ZF, 2002. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 29. Hymenoptera: Chelonidae. Science Press, Beijing. 267 – 270. [何俊华, 许再福, 2002. 中国动物志, 昆虫纲, 第 29 卷. 膜翅目: 螫蜂科. 北京: 科学出版社. 267 – 270]

Kim JG, Lee EH, Seo YM, Kim NY, 2011. Cyclic behavior of *Lycorma delicatula* (Insecta: Hemiptera: Fulgoridae) on host plants. *J. Insect Behav.*, 24(6): 423 – 435.

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111 – 120.

Koressaar T, Lepamets M, Kaplinski L, Raimo K, Andreson R, Remm M, 2018. Primer3 \_ masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11): 1937 – 1938.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, 35(6): 1547 – 1549.

Leach H, Biddinger DJ, Krawczyk G, Smyers E, Urban JM, 2019. Evaluation of insecticides for control of the spotted lanternfly, *Lycorma delicatula*, (Hemiptera: Fulgoridae), a new pest of fruit in the Northeastern U. S. *Crop Prot.*, 124: <https://doi.org/10.1016/>

- j. *cropro*. 2019. 05. 027.
- Lee DH, Park YL, Leskey TC, 2019. A review of biology and management of *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae), an emerging global invasive species. *J. Asia-Pacific Entomol.*, 22(2): 589–596.
- Li LJ, 2014. Pathogenesis and control techniques of persimmon disease. *Shanxi Fruits*, (3): 52–53. [李令军, 2014. 柿疯病的发病机理与防治技术. *山西果树*, (3): 52–53]
- Liu H, Mottern J, 2017. An old remedy for a new problem? Identification of *Ooencyrtus kuvanae* (Hymenoptera: Encyrtidae), an egg parasitoid of *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) in North America. *J. Insect Sci.*, 17(1): 18.
- Liu SS, 2004. Methods for evaluation of predators and parasitoids in the control of insect pests and strategy for their practical application. *Chin. J. Biol. Control*, 20(1): 1–7. [刘树生, 2004. 天敌动物对害虫控制作用的评估方法及其应用策略. *中国生物防治杂志*, 20(1): 1–7]
- Olmi M, 1998. New Oriental and Neotropic Dryinidae (Hymenoptera: Chrysidoidea). *Frustrula Entomol.*, 20(33): 152–167.
- Rozas JP, Librado JC, Sánchez-DelBarrio X, Rozas R, 2010. DNA sequence polymorphism. Ver. 5.10.1. Universidad de Barcelona. Available at <http://www.ub.edu/dnasp/>.
- Stahlhut JK, Fernández-Triana J, Adamowicz SJ, Buck M, Goulet H, Hebert PDN, Huber JT, Merilo MT, Sheffield CS, Woodcock T, 2013. DNA barcoding reveals diversity of Hymenoptera and the dominance of parasitoids in a sub-arctic environment. *BMC Ecol.*, 13: 2.
- Traugott M, Zangerl P, Juen A, Schallhart N, Piffner L, 2006. Detecting key parasitoids of lepidopteran pests by multiplex PCR. *Biol. Control*, 39(1): 39–46.
- Wang QK, Liu HD, Feng LX, Zu XS, Zhang LW, Zhang JQ, Liu QF, 1989. Studies of persimmon proliferation disease II: etiology. *Acta Phytopathol. Sin.*, 19(1): 7–9. [王祈楷, 刘宏迪, 冯鲁昕, 俎显诗, 张良皖, 张金岐, 刘秋芬, 1989. 柿疯病研究 II: 病原. *植物病理学报*, 19(1): 7–9]
- Wang RR, Liu JJ, Li XY, Liang AP, Bourgoin T, 2018. Relating antennal sensilla diversity and possible species behaviour in the planthopper pest *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoromorpha: Fulgoridae). *PLoS ONE*, 13(3): e0194995.
- Xu Z, Olmi M, He J, 2013. Dryinidae of the Oriental region (Hymenoptera: Chrysidoidea). *Zootaxa*, 3614(1): 1–460.
- Yan JH, Ding SM, Qin XB, Wang FR, Bo LL, 2008. Observation of biological characteristics of *Dryinus browni* Ashmead. *Shandong For. Sci. Tech.*, 38(5): 16–18. [闫家河, 丁世民, 秦绪兵, 王芙蓉, 柏鲁林, 2008. 布氏螯蜂生物学特性观察研究. *山东林业科技*, 38(5): 16–18]
- Yang JK, 1994. The distribution and biological character of *Dryinus lycormae* Yang sp. n. In: Shen XC, Shi ZY eds. *The Fauna and Taxonomy of Insects in Henan* (Vol. 1). China Agricultural Sciencetech Press, Beijing. 37–42. [杨集昆, 1994. 斑衣蜡蝉螯蜂新种及生物学纪要. 见: 申效诚, 时振亚 主编. *河南昆虫分类区系研究*(第1卷). 北京: 中国农业科技出版社. 37–42]
- Yang ZQ, Choi WY, Cao LM, Wang XY, Hou ZR, 2015. A new species of *Anastatus* (Hymenoptera: Eulpeimidae) from China, parasitizing eggs of *Lycorma delicatula* (Homoptera: Fulgoridae). *Zool. Syst.*, 40(3): 290–302.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL, 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.*, 13: 134.
- Zhang GF, Lü ZC, Wan FH, Lövei GL, 2007. Real-time PCR quantification of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) B-biotype remains in predator guts. *Mol. Ecol. Notes*, 7(6): 947–954.
- Zong XP, Li Y, 2005. *Cultivation Techniques of Persimmon*. Golden Shield Press, Beijing. 1–5. [宗学普, 黎彦, 2005. *柿树栽培技术*. 北京: 金盾出版社. 1–5]
- Zu XS, 1992. The study of persimmon disease IV: distribution in China. *Hebei Fruits*, (3): 23–26. [俎显诗, 1992. 柿疯病研究 IV: 国内区域分布. *河北果树*, (3): 23–26]
- Zu XS, Liu QF, Jin LP, 1992. The study of persimmon disease III: vector. *Hebei Fruits*, (2): 31–33. [俎显诗, 刘秋芬, 金立平, 1992. 柿疯病研究 III: 传病介体. *河北果树*, (2): 31–33]

(责任编辑: 马丽萍)