

基于CO1、CytB及28S基因的西藏圆柏大瘿小蜂分子系统发育研究

徐磊^{1*}, 赵建燕², 赵塘颀³, 熊忠平⁴, 潘涌智⁴, 吴培福^{4#}

¹西藏自治区林业调查规划研究院, 西藏 拉萨

²昆明市东川区林业局, 云南 昆明

³文山州林业科学研究所, 云南 文山

⁴西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明

收稿日期: 2022年12月8日; 录用日期: 2022年12月29日; 发布日期: 2023年1月9日

摘 要

圆柏大瘿小蜂*Megastigmus sabinae*是西藏自治区昌都市大果圆柏的主要种实害虫, 对该树种的自然更新和育种等工作造成了严重的危害, 为此本研究对圆柏大瘿小蜂CO1、CytB及28S基因的部分序列进行了测序分析, 以期为该害虫的防治和鉴定提供理论基础。结果表明: 圆柏大瘿小蜂CO1和CytB基因具有昆虫线粒体基因的核苷酸组成特征, 而28S基因偏向使用碱基G和C, 与线粒体基因形成了对比。CO1、CytB和28S基因碱基的使用频率存在偏向性。圆柏大瘿小蜂与*M. bipunctatus*、*M. amicornum*等有较近的遗传进化距离。三种基因的转换率明显大于颠换率, 而不同基因间, 其转换和颠换的具体模式存在差异性。大瘿小蜂线粒体CO1和CytB基因密码子使用具有节肢动物样的偏向性。进化分析表明, 圆柏大瘿小蜂与*M. bipunctatus*有很近的进化关系。该研究结果为圆柏大瘿小蜂的综合防治提供了理论依据。

关键词

圆柏大瘿小蜂, CO1基因, CytB基因, 28S基因, 测序分析

The Study on the Molecular Phylogeny of *Megastigmus sabinae* from Tibet Based on CO1, CytB and 28S Genes

Lei Xu^{1*}, Jianyan Zhao², Tangjie Zhao³, Zhongping Xiong⁴, Yongzhi Pan⁴, Peifu Wu^{4#}

¹Forest Inventory and Planning Institute of Tibet Autonomous, Lhasa Tibet

²Forestry Bureau of Dongchuan, Kunming Yunnan

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 徐磊, 赵建燕, 赵塘颀, 熊忠平, 潘涌智, 吴培福. 基于 CO1、CytB 及 28S 基因的西藏圆柏大瘿小蜂分子系统发育研究[J]. 林业世界, 2023, 12(1): 13-20. DOI: 10.12677/wj.2023.121003

³Wenshan Forestry Research Institute, Wenshan Yunnan⁴Yunnan Provincial Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Controlling, Southwest Forestry University, Kunming YunnanReceived: Dec. 8th, 2022; accepted: Dec. 29th, 2022; published: Jan. 9th, 2023

Abstract

Megastigmus sabinae is a major Seed Pest of *Sabina vulgaris* at Changdu area in Tibet Autonomous Region, which has caused serious damage to the natural regeneration and breeding of this species. In this study, the partial sequences of *CO1*, *Cytb* and *28S* genes of this specie were sequenced and analyzed in order to provide a theoretical basis for the control and identification of this pest. The results showed that: The genes *CO1* and *CytB* of *M. sabinae* had composition features of mitochondrial genes of arthropods, while the gene *28S* had usage bias to nucleotide G and C comparing to the mitochondrial genes. *M. sabinae* had closer distance with *M. bipunctatus*, *M. amicorum*, etc. The conversion ratios of three genes were obviously larger than that of transition, and among the individual gene, the patterns of conversion and transition displayed divergence. The codon usage of mitochondrial genes *CO1* and *CytB* of *M. sabinae* showed bias as that of arthropods. The phylogenetic analysis showed that *M. sabinae* had the very closer relationship with *M. bipunctatus*. The results in this study will provide the theoretical evidence for comprehensive control of *M. sabinae*.

Keywords

M. sabinae, *CO1* Gene, *CytB* Gene, *28S* Gene, Sequencing and Analysis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

圆柏大瘿小蜂(*Megastigmus sabinae* Xu et He)是典型的寡食性种实害虫,分布于甘肃、青藏高原东北部干旱和半干旱地区,主要为害祁连圆柏(*Sabina przewalskii* Kom.) [1] [2],此外,还可对大果圆柏(*S. tibetica*)、方枝圆柏(*S. saltuaria*)、塔枝圆柏(*S. komarovii*)和细枝圆柏(*S. convallium*)造成危害[3],其幼虫蛀食球果胚乳,致使圆柏种实枯瘪,不能发芽,进而造成圆柏种子质量和产量下降[4]。圆柏具有耐寒、耐旱和耐贫瘠的优势[5],是高原山地造林及生态环境建设中不可缺失的树种,对水土保持、涵养水源和维持生态平衡具有重要意义。圆柏大瘿小蜂的危害使圆柏天然林的自我更新明显下降,严重制约了圆柏育苗工作。李秉新等报道,祁连圆柏种子的严重危害率可达 41.64%,最重可达 60%~70% [4] [5]。由此可见,对圆柏大瘿小蜂进行系统研究是防控该害虫的重要前提。

目前,国内外对圆柏大瘿小蜂的研究主要集中于其防治[6] [7] [8]、空间分布格局[4] [5]、生活习性[8]及羽化期预测[3]等方面,仍未见到有关分子生物学方面的报道,为此本研究基于以下几方面原因对圆柏大瘿小蜂 *CO1*、*CytB* 及 *28S* 基因的部分序列进行了测序分析: 1) 目前全球报道的食植群类大瘿小蜂有 60 多种,虽然认为多数种类对寄主有强的专一性,但某些种类存在多寄主寄生现象,而分子生物学研究有助于该物种的分类鉴定; 2) 大瘿小蜂幼虫期长,在种子内隐蔽生活,分子生物学研究有助于大瘿小蜂幼虫的快速鉴定; 3) 大瘿小蜂分子生物学研究有助于大瘿小蜂食植群的系统进化分析。

2. 材料与方法

2.1. 试虫来源

圆柏大痣小蜂标本由潘涌智教授于 2017 年 5 月采自昌都市加桑卡乡, 并经潘涌智教授和法国专家 Roques Alain 鉴定。鉴定标本置于 95%酒精, 并保存于 -20°C 备用。

2.2. 试验方法

2.2.1. 圆柏大痣小蜂基因组 DNA 提取与纯化

采用单头试虫, 按照 Qiagen 基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明提取 DNA, 并配置 1%琼脂凝胶来检测基因组 DNA 的完整性。具体操作流程和步骤如下: 1) 将单头保存的大痣小蜂移至吸水纸上, 使酒精充分挥发, 并用吸水纸吸干虫体上的水分; 2) 去除虫体膜性翅膀, 并置于无菌 1.5 mL 离心管内; 3) 将虫体置于液氮中 10 s, 用研磨棒充分研磨虫体, 直至虫体呈粉状; 4) 向离心管内加入 180 μL Buffer ATL, 而后在涡旋混合器上涡旋混合, 使缓冲液与研磨组织充分接触; 5) 向离心管内加入 20 μL 蛋白酶 K (浓度为 20 mg/mL), 而后在涡旋混合器上涡旋充分混合, 使蛋白酶 K 与组织碎片充分接触; 6) 在恒温水浴摇床中, 将组织 56°C 震荡消化 3~4 h, 摇床转速为 100 rpm/min, 期间每隔 30 min 手动轻轻晃匀组织, 使组织悬浮, 并观察消化程度; 7) 待组织消化呈絮状时, 取出离心管并在涡旋混合器上涡旋震荡 15 s; 8) 加入 200 μL Buffer AL, 旋涡充分混匀, 在 65°C 恒温水浴摇床内孵育 10 min, 再加入 200 μL 无水乙醇, 旋涡充分混匀; 9) 组装吸附柱和收集管, 将上述离心管内的上清液移入吸附柱中, 在冷冻离心机上 8000 rpm 离心 1 min; 10) 弃去收集管内废液, 将吸附柱重新置于收集管中, 加入 500 μL Buffer AW1, 在冷冻离心机上 8000 rpm 离心 1 min; 11) 弃去收集管内废液, 将吸附柱重新置于收集管中, 加入 500 μL Buffer AW2, 在冷冻离心机上 8000 rpm 离心 1 min; 12) 弃去收集管内废液, 将吸附柱重新置于收集管中, 在冷冻离心机上 14,000 rpm 离心 3 min, 充分去除吸附柱上的残留液体; 13) 将吸附柱置于新的无菌收集管上, 加入预先在 65°C 预热的 50 μL 洗脱液 AE, 室温放置 2 min, 而后在冷冻离心机中 13,000 rpm 离心 2 min; 14) 将收集管内的液体转移至无菌离心管内, 做标记, -20°C 保存, 作为模板备用。

2.2.2. 引物设计及 PCR 扩增

本研究所用引物序列及退火温度见表 1。PCR 反应总体系为 50 μL , 具体成分如下: DNA 模板 2 μL ; 上游引物(20 pmol/ μL)1 μL ; 下游引物(20 pmol/ μL) 1 μL ; $10\times$ PCR 缓冲液(含 Mg^{2+}) 5 μL ; Taq DNA Polymerase (5 U/ μL) 0.5 μL ; dNTP Mixture (10 nM/ μL) 0.5 μL ; 补足 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 循环程序为: 94°C 预变性 4 min, 30 循环扩增(94°C 变性 1 min, 相应引物退火温度退火 50 s, 72°C 延伸 1 min), 最后 72°C 总延伸 6 min。配置 1%琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, 并利用 DNA 回收试剂盒(BioTeke)纯化产物。

Table 1. Primers used in this study

表 1. 实验所用引物

基因名称	产物大小(bp)	退火温度($^{\circ}\text{C}$)	引物序列(5'→3')
COI	640	47	F: AGTTATATATTTTATTTTGGTATATGWTC
			R: AAATAAATGTTGATATAAAATTGGA
CytB	716	48	F: GATGATGAAATTTTGGATC
			R: ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT
28S	999	57	F: ACCCGCTGAATTTAAGCATAT
			R: TAGTTCACCATCTTTCGGGTC

2.2.3. PCR 产物克隆测序

将纯化产物与 PMD-18T 载体连接, 导入 DH5 α 感受态细胞, 并经蓝白斑筛选, 选择阳性克隆送往上海捷瑞生物工程有限公司进行测序。

2.2.4. 序列分析

采用 Nucleotide BLAST 程序分析测序结果的准确性; 利用测序峰图分析测序结果的质量; 采用 Lasergene 中 GeneQuest 程序来分析序列核苷酸组成; 采用 Clustal W 程序进行序列比对分析; 利用 DnaSP V5 软件分析密码子偏向性; 采用 MEGA V6.06 软件分析进化距离、转化率、颠换率, 并构建系统发育树 (NJ 树和 ML 树), Bootstrap 值为 1000。所用统计模型为 GTR 模型, 位点进化速率统计采用 G + I 模型。

在 GenBank 数据库中, 3 种基因所对应的物种类别、物种数量及基因大小存在明显差异, 为此在进化分析时, 对数据库内的参考序列数据进行了筛选, 最终确定了 21 个物种的参考序列, 具体如下: *M. aculeatus* (JQ756596、JQ756668、KU984687)、*M. amicum* (KJ535737、AY898663、AY900453)、*M. atedius* (KU496776、AY898690、AY900479)、*M. atlanticus* (KF531836、AY898669、KU984689)、*M. bipunctatus* (KJ535738、AY898664、AY900454)、*M. borriesi* (KF531852、AY898681、AY900470)、*M. cryptomeriae* (KF531841、AY898699、AY900486)、*M. hoffmeyer* (KF531845、AY898695、KU984693)、*M. lasiocarpae* (KF531853、AY898671、AY900460)、*M. milleri* (KJ535739、AY898672、AY900461)、*M. pictus* (KF531847、AY898696、AY900481)、*M. pinsapinis* (KF531855、AY898675、AY900473)、*M. pinus* (KF531850、AY898674、AY900463)、*M. rafni* (KF531846、AY898677、AY900467)、*M. rosae* (KF531840、AY898701、AY900487)、*M. spermotrophus* (KF531844、AY898692、AY900482)、*M. suspectus* (KF531856、AY898688、AY900477)、*M. thyoides* (KF531851、AY898667、AY900458)、*M. tsugae* (KF531849、AY898682、AY900471)。括号中代码分别为 CO1、CytB 和 28S 基因的登录号。经序列比对和大小对齐后, CO1 基因的最终比对大小为 372 bp, CytB 基因为 695 bp, 28S 基因为 923 bp。

3. 结果与分析

3.1. 基因扩增与克隆测序

经 PCR 扩增测序, 所测 CO1 基因大小为 639 bp, CytB 基因为 767 bp, 28S 基因为 998 bp, 与设计结果相符。BLAST 比对表明, 所测序列均与大痣小蜂属的物种序列有很高的相似性, 说明本研究成功扩增了圆柏大痣小蜂三种基因的序列。

3.2. 圆柏大痣小蜂三种基因的核苷酸组成分析

圆柏大痣小蜂 CO1 基因的碱基组成具有节肢动物线粒体 DNA 的碱基组成特征, 即 A 和 T 含量高, 而 G 和 C 含量较低。其中, A 碱基占 29.11%, T 为 45.07%, A + T 占 74.18%。

圆柏大痣小蜂 CytB 基因的碱基组成亦具有节肢动物线粒体 DNA 的碱基组成特征, 其中 A 占 35.72%, T 占 41.72%, A + T 占 77.44%。

圆柏大痣小蜂 28S 基因的碱基组成与 CO1 和 CytB 基因存在明显的差异, 即 G、C 碱基的使用频率较高。其中, A 占 20.54%, T 占 21.74%, A + T 占 42.28%, G + C 占 57.72%。

3.3. 圆柏大痣小蜂三种基因的进化信号

3.3.1. 基于 CO1 基因的进化信号特征

圆柏大痣小蜂 CO1 基因与 *M. amicum* 和 *M. atlanticus* 有较近的进化距离(分别为 0.062 ± 0.013 、 0.062)

± 0.015), 而与 *M. suspectus* 有最远的进化距离(0.119 ± 0.013)。

圆柏大瘿小蜂 *CO1* 基因碱基 A 和 G 间的转换率最高, G→A 的转换率为 32.65%, A→G 的转换率为 14.60%。碱基 A 和 T 间的颠换率最高, A→T 的颠换率为 15.34%, T→A 的颠换率为 9.63% (表 2)。

Table 2. Base substitution characteristics of *CO1* gene of *M. sabinae*
表 2. 大瘿小蜂 *CO1* 基因的碱基替代特征

	A	T	C	G
A	—	15.34	1.95	14.60
T	9.63	—	2.87	1.85
C	4.15	9.74	—	0.30
G	32.65	6.60	0.31	—

3.3.2. 基于 *CytB* 基因的进化信号特征

圆柏大瘿小蜂 *CytB* 基因与 *M. bipunctatus*、*M. amicorum* 有较近的进化距离(分别为 0.050 ± 0.012 、 0.051 ± 0.011), 而与 *M. rosae*、*M. atedius* 和 *M. spermotrophus* 有较远的进化距离(分别为 0.111 ± 0.011 、 0.108 ± 0.011 、 0.107 ± 0.011)。

圆柏大瘿小蜂 *CytB* 基因中, 碱基 C 和 T 间的转换率最高, C→T 的转换率为 57.62%, T→C 的转换率为 16.83%。碱基 A 和 T 间的颠换率最高, A→T 的颠换率为 5.96%, T→A 的颠换率为 5.07% (表 3)。

Table 3. Base substitution characteristics of *CytB* gene of *M. sabinae*
表 3. 大瘿小蜂 *CytB* 基因的碱基替代特征

	A	T	C	G
A	—	5.96	0.72	2.36
T	5.07	—	16.83	0.09
C	2.11	57.62	—	0.37
G	8.04	0.38	0.44	—

3.3.3. 基于 *28S* 基因的进化信号特征

圆柏大瘿小蜂 *28S* 基因与 *M. bipunctatus*、*M. atlanticus*、*M. amicorum* 有较近的进化距离(分别为 0.003 ± 0.005 、 0.004 ± 0.004 、 0.005 ± 0.004), 而与 *M. rosae*、*M. lasiocarpae* 和 *M. cryptomeriae* 有较远的进化距离(分别为 0.023 ± 0.004 、 0.023 ± 0.004 、 0.022 ± 0.005)。

圆柏大瘿小蜂 *28S* 基因中, 碱基 C 和 T 间的转换率最高, T→C 的转换率为 16.88%, C→T 的转换率为 13.46%。碱基 A 和 C 间的颠换率最高, A→C 的颠换率为 8.93%, C→A 的颠换率为 6.70% (表 4)。

Table 4. Base substitution characteristics of *28S* gene of *M. sabinae*
表 4. 大瘿小蜂 *28S* 基因的碱基替代特征

	A	T	C	G
A	—	7.00	8.93	16.22
T	6.59	—	16.88	4.68
C	6.70	13.46	—	3.39
G	10.19	3.12	2.84	—

3.4. 圆柏大痣小蜂蛋白编码基因的密码子使用偏向性

3.4.1. 圆柏大痣小蜂 *CO1* 基因的密码子使用偏向性

圆柏大痣小蜂 *CO1* 基因不使用如下密码子: UUC(F)、CUC(L)、CUA(L)、CUG(L)、AUC(I)、AUG(M)、GUC(V)、GUG(V)、UCG(S)、CCC(P)、CCG(P)、ACC(T)、ACG(T)、GCC(A)、GCG(A)、UAC(Y)、CAC(H)、CAG(Q)、AAC(N)、GAC(D)、GAG(E)、UGU(C)、UGC(C)、UGG(W)、CGC(R)、CGA(R)、CGG(R)、AGC(S)、AGG(S)和 GGC(G)。

圆柏大痣小蜂 *CO1* 基因的有效密码子数(ENC)为 32.072, 与 *M. atlanticus* (31.126)相近; 密码子使用指数(CBI)为 0.831, 与 *M. lasiocarpae* (0.839)和 *M. pinsapinis* (0.837)相近; 密码子第三位 GC 含量(GC_{3s})值为 6.45, 与 *M. spermotrophus* 和 *M. thyoides* 相等。

3.4.2. 圆柏大痣小蜂 *CytB* 基因的密码子使用偏向性

圆柏大痣小蜂 *CytB* 基因不使用如下密码子: UUG(L)、CUC(L)、CUG(L)、AUG(M)、GUC(V)、GUG(V)、UCC(S)、UCG(S)、CCC(P)、CCG(P)、ACG(T)、GCC(A)、GCG(A)、UAC(Y)、CAG(Q)、AAG(K)、GAC(D)、GAG(E)、UGC(C)、CGU(R)、CGC(R)、CGG(R)、AGC(S)、AGG(S)和 GGC(G)。

圆柏大痣小蜂 *CytB* 基因的 ENC 为 27.385, 与 *M. aculeatus* (27.35)相近; CBI 为 0.817, 与 *M. suspectus* (0.806)相近; GC_{3s} 值为 5.63, 与 *M. atedius* 和 *M. pinsapinis* 相等。

3.5. 圆柏大痣小蜂 *CO1*、*CytB* 和 *28S* 基因对进化的贡献

基于 *CO1*、*CytB* 和 *28S* 基因与其它大痣小蜂间的遗传距离及 *CO1* 和 *CytB* 基因的转换率和颠换率可以看出, 三种基因在大痣小蜂属中具有很高的保守性, 均可反映大痣小蜂不同种间的进化关系, 但 *28S* 基因与其它种间的进化距离更近, 说明核基因 *28S* 具有更高的保守性。

3.6. 系统发育分析

本研究将 *CO1*、*CytB* 和 *28S* 基因的序列进行联合, 而后做了 NJ 树和 ML 树。NJ 树和 ML 树均得到了一致的结果(图 1)。圆柏大痣小蜂与 *M. bipunctatus* 有很近的进化关系, 与 *M. bipunctatus*、*M. atlanticus* 和 *M. amicum* 在一个大分支上。

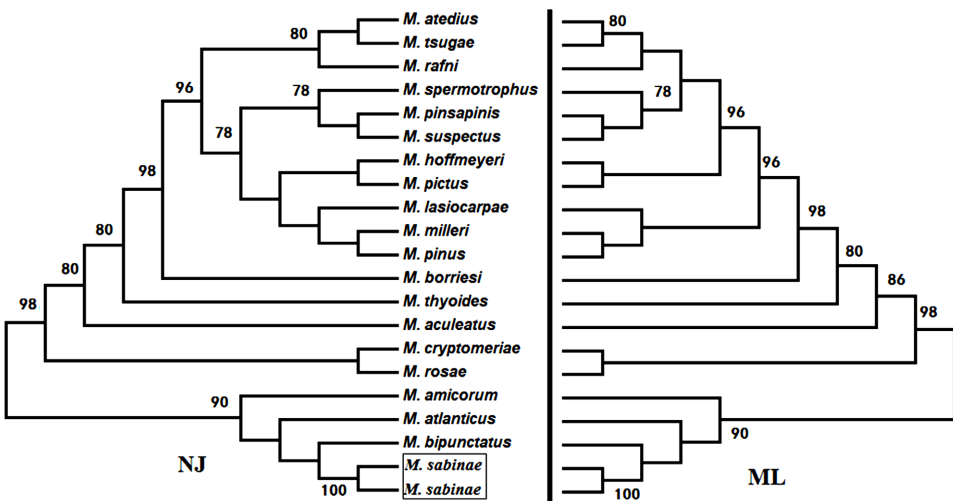


Figure 1. Phylogenetic analysis based on three genes of *M. sabinae*

图 1. 基于 3 种基因的系统进化分析

4. 讨论与结论

4.1. 圆柏大痣小蜂 3 种基因的扩增测序

本研究中, 3 种基因的扩增大小与相应引物设计的预期扩增大小一致, 且 Blast 比对后, 所测序列与大痣小蜂属其他物种的序列具有较高的相似性, 说明本研究成功扩增了圆柏大痣小蜂 3 种基因的序列。据国内外文献查阅表明, 目前仍未见圆柏大痣小蜂 *CO1*、*CytB* 及 *28S* 基因的测序报道, 故本研究首次报道了这些基因的测序分析。

4.2. 圆柏大痣小蜂 3 种基因的核苷酸组成

国内外研究表明, 昆虫线粒体基因中含有较高的 A 碱基和 T 碱基, 而 G 或 C 碱基的含量相对较低[9] [10] [11] [12]。本研究中, *CO1* 和 *CytB* 基因属于线粒体基因, 且其碱基组成也具有相似的特征, 说明本次所测序列就是圆柏大痣小蜂的基因序列。

28S 基因属于核基因, 其碱基组成和使用特征与线粒体基因有明显差异, 即该基因中 G 和 C 碱基的含量较高。线粒体的遗传进化独立于核基因组, 且在基因转录表达过程中, 线粒体基因与核基因使用不同的转录系统, 因而, 线粒体基因尽量避免使用核基因使用率较高的碱基, 从而在胞内形成互相协调与统一的稳定模式[9] [10] [11] [12], 这与生物体的长期进行相关。

4.3. 圆柏大痣小蜂蛋白编码基因密码子使用的偏向性

与以往的研究报道一致, 在本研究中圆柏大痣小蜂蛋白编码基因亦存在明显的密码子使用偏向性[9] [10] [11] [12], 即蛋白编码基因避免使用第三位碱基为 G 或 C 的密码子, 这也印证了 GC_{3s} 的分析结果。如上述结果所示, 圆柏大痣小蜂 *CO1* 和 *CytB* 基因中未使用的绝大部分密码子均具有这些特征。研究认为, 线粒体密码子使用的偏向性可能是动物机体长期正向选择进化的结果。核基因在转录表达过程中, 使用的 tRNA 与线粒体基因间存在协调或竞争关系, 因此, 线粒体基因所使用的 tRNA 与核基因间存在明显的差异, 从而导致密码子使用的偏向性。从氨基酸使用频率来看(结果未展示), 圆柏大痣小蜂 *CO1* 和 *CytB* 蛋白中, 亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)和丝氨酸(Ser)的使用频率较高(特别是亮氨酸)。不同氨基酸所对应的编码密码子数量存在明显差异。亮氨酸、丝氨酸和苯丙氨酸分别有 6、8 和 4 个编码密码子, 可见圆柏大痣小蜂使用频率较高的氨基酸具有多反义密码子 tRNA 特性, 这在一定程度上揭示了核基因和线粒体基因间多反义密码子 tRNA 使用分配的不同。

4.4. 系统进化分析

以往研究表明, 线粒体不同基因在进化速率上存在差异, *CO1*、*CytB* 等基因的进化速率符合中性进化的模式[9] [10] [11] [12], 但 *L-rRNA*、*S-rRNA* 等基因的进化速率要比 *CO1*、*CytB* 等基因快, 由此可见, 利用不同的基因进行系统进化分析时, 得出的分析结果可能也存在差异, 为此, 本研究联合线粒体 *CO1*、*CytB* 基因及 *28S* 核基因进行系统进化分析, 这在一定程度上提高了分析结果的准确性。结果表明, 圆柏大痣小蜂与 *M. bipunctatus* 有很近的进化关系, 然而, 其确切的系统进化关系还需深入的研究。

4.5. 结论

圆柏大痣小蜂 *CO1* 和 *CytB* 基因的核苷酸组成特征与昆虫线粒体基因相似, 即碱基的使用频率存在偏向性, 但 *28S* 基因与线粒体基因形成了对比, 偏向使用碱基 G 和 C。三种基因的转换率明显大于颠换率。大痣小蜂线粒体 *CO1* 和 *CytB* 基因密码子使用具有节肢动物样的偏向性。圆柏大痣小蜂与 *M. bipunctatus*、*M. amicorum* 等有较近的遗传进化距离, 与 *M. bipunctatus* 有很近的进化关系。

参考文献

- [1] 徐志宏, 何俊华. 大痣小蜂一新种(膜翅目: 长尾小蜂科) [J]. 动物分类学报, 1989, 14(4): 484-485.
- [2] 徐志宏, 何俊华. 中国大痣小蜂属食植群记述(膜翅目: 长尾小蜂科) [J]. 昆虫分类学报, 1995, 17(4): 243-253.
- [3] 吴洪源, 张德海, 陈道玉. 圆柏大痣小蜂羽化期的预测预报研究[J]. 林业科技通讯, 1992(7): 4-6.
- [4] 李秉新, 吕东, 张宏斌, 等. 祁连圆柏林圆柏大痣小蜂幼虫空间分布格局[J]. 环境昆虫学报, 2014, 36(2): 276-282.
- [5] 吕东, 李秉新, 张宏斌, 等. 圆柏大痣小蜂羽化的生态学特性及幼虫空间分布[J]. 应用昆虫学报, 2017, 54(1): 169-174.
- [6] 吴洪源, 张德海, 陈道玉. 圆柏大痣小蜂的防治试验研究[J]. 陕西林业科技, 1992(2): 81-83.
- [7] 李春风, 缪晓星. 玛可河林区圆柏大痣小蜂的发生与防治[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2009, 27(2): 66-68.
- [8] 李秉新, 张继义, 傅辉恩. 圆柏大痣小蜂生活习性及防治技术的研究[J]. 甘肃林业科技, 1991(4): 30-35.
- [9] Salvato, P., Simonato, M., Battisti, A. and Negrisola, E. (2008) The Complete Mitochondrial Genome of the Bag-Shelter Moth *Ochrogaster lunifer* (Lepidoptera, Notodontidae). *BMC Genomics*, **9**, Article No. 331. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-331>
- [10] Wei, S.J., Shi, M., He, J.H., *et al.* (2009) The Complete Mitochondrial Genome of *Diadegma semiclausum*, (Hymenoptera: Ichneumonidae) Indicates Extensive Independent Evolutionary Events. *Genome*, **52**, 308-319. <https://doi.org/10.1139/G09-008>
- [11] Yang, W., Yu, W. and Du, Y. (2013) The Complete Mitochondrial Genome of the Sycamore Lace Bug *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). *Gene*, **532**, 27-40. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.087>
- [12] Liu, Y.Q., Li, Y.P., Wang, H., *et al.* (2012) The Complete Mitochondrial Genome of the Wild Type of *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **105**, 498-505. <https://doi.org/10.1603/AN11156>