应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2012,49(1):161—167

基于 mtDNA COI 基因的系统分析表明栗属植物上隐藏瘿蜂种的存在*

陆鹏飞[1] 朱道弘[1,2**] 杨筱慧[1] LIU Zhi-Wei[3]

(1. 中南林业科技大学昆虫行为与进化生态学实验室 长沙 410004; 2. 湖南第一师范学院动物学实验室 长沙 410205;
3. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois 61920, USA)

摘 要 本研究利用 mtDNA CO I 基因的部分序列对 11 种群不同寄主的栗瘿蜂 *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu 遗传多态性进行了分析。在获得的 660 bp 的序列中,变异位点(V)80 个,包括简约信息位点(Pi)15 个和自裔位点(Si)65 个。T、A、C、G 平均含量分别为 30.6%、43.3%、13.7% 和 12.4%,A + T 平均值为 73.9%,远高于 G + C 的 26.1%,表现出明显的 A + T 偏向性。为害锥栗的六步溪、大围山种群与茅栗、板栗的不同地理种群,以及为害欧洲栗的意大利 Piedmont 种群之间,基因序列完全一致或者遗传距离在 0.3% 以内,无论是 NJ 系统树还是 UPGMA 系统树均聚合在同一分支内,亲缘关系较近。而为害锥栗的采自福建省建瓯市水源镇的水源种群、福建省周宁县纯池镇的纯池种群,与其它各栗瘿蜂种群的基因序列差异较大,遗传距离均大于 2%,在 NJ 和 UPGMA 系统树中水源种群和纯池种群均聚合为一单独的分支,与其它种群形成的分支互为姊妹分支。据此我们认为水源种群和纯池种群很有可能属于不同的物种,有进一步研究的必要。

关键词 mtDNA, CO I 基因, 遗传多态性, 寄主植物, 栗瘿蜂

Phylogenetic analysis of the mtDNA COI gene suggests cryptic *Dryocosmus kuriphilus* associated with certain populations of Chinese chestnuts (*Castanea* spp.)

LU Peng-Fei[1] ZHU Dao-Hong[1,2**] YANG Xiao-Hui[1] LIU Zhi-Wei[3]

(1. Laboratory of Insect Behavior & Evolutionary Ecology, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China; 2. Laboratory of Zoology, Hunan First Normal University, Changsha 410205, China;
3. Department of Biological Sciences, Eastern Illinois University, Charleston, Illinois 61920, USA)

Abstract The phylogenetic relationships between 11 populations of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu attacking different *Castanea* species from different areas was analyzed based on partial CO I gene sequences. The results revealed a total of 80 variable sites in the resultant 660 bp DNA fragment, including 15 parsimony - informative sites and 65 singletons. The average content of T, A, C and G was 30.6 %, 43.3 %, 13.7 % and 12.4 %, respectively. The average content of A + T (73.9 %) was much higher than that of G + C (26.1 %), displaying a distinct A + T bias. Overall, the sequenced CO I gene region showed very limited variation among 8 populations on *C. mollissima*, *C. seguinii* or *C. henryi* hosts from China, and one population on *C. sativa* hosts from Italy, with between population genetic distances of less than 0.3 %. Phylogenetic reconstruction using Neighbor - joining and UPGMA methods supported a monophyletic clade comprised of two Fujian populations associated with *C. henryi* hosts in Shuiyuan (Jianou, Fujian) and Chunchi (Zhouning, Fujian). Sequences of individuals sampled from *C. henryi* populations from Shuiyuan and Chunchi were quite different from those of the other samples, with genetic distances greater than 2 %. These populations form a basal sister clade to all other populations investigated. It is highly likely that these two populations represent a cryptic species and deserve further investigation.

Key words mtDNA, CO I gene, genetic diversity, host plant, *Dryocosmus kuriphilus*

* 资助项目:国家自然科学基金(30872036)。

** 通讯作者,E-mail:daohongzhuja@ yahoo. com. cn

收稿日期:2011-02-28,接受日期:2011-12-15

线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）具有分子结构简单、序列保守、母系遗传、无重组等特征，随着分子生物学的发展，线粒体基因已经成为研究生物进化的重要材料（徐庆刚和花保桢，2001；高红秀等，2006）。由于细胞色素氧化酶 I 亚基（Cytochrome oxidase subunit I，CO I）是线粒体氧化呼吸链的重要成员，且进化速度快，包含的遗传进化信息量大，是研究种间、种内分子进化和系统发育最有用的基因之一，近年来已被广泛地应用于昆虫系统发育、种群遗传变异和分化，以及鉴定近缘种等的研究（Song *et al.*，2008；杨曼尼和马雅军，2009）。

栗瘿蜂 *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu 属膜翅目（Hymeoptera）瘿蜂科（Cynipidae）瘿蜂亚科（Cynipinae）栎瘿蜂族（Cynipini），是我国和东亚其他国家板栗（*Castanea mollissima* Blume）的主要害虫。虽然绝大多数造瘿瘿蜂不成为典型的农林业害虫，但受栗瘿蜂的影响，板栗的受害芽春季形成瘤状虫瘿，不能抽新梢和开花结实，严重时可出现枝条枯死。栗瘿蜂自然分布于我国的陕西、河北、山东、河南、湖北、湖南、福建等省和邻近的日本和韩国（Yasumatsu，1951）、尼泊尔（Ueno，2006），并作为外来物种侵入欧洲的意大利（Brussino *et al.*，2002）、斯洛维尼亚（Seljak，2006），美国（Rieske，2007）等地，引起不同程度的危害。栗瘿蜂已成为世界范围栗属植物的重要害虫之一，EPPO（European and Mediterranean Plant Protection Organization）已将其列为检疫对象（EPPO，2005）。

瘿蜂科的造瘿种类与其寄主的关系非常紧密，往往表现出很强的寄主专一性，在单一寄主中或很少相近种上造瘿（Ronquist and Liljeblad，2001；Nylander *et al.*，2004；Liu and Ronquist，2006）。栗瘿蜂是广为所知的重要板栗害虫，据报道也在栗属几乎所有种上形成虫瘿，包括分布于我国的茅栗（*C. seguinii* Dode.）和锥栗（*C. henryi* Rehd. & Wils.）、日本及朝鲜半岛的日本栗（*C. crenata* Sieb. & Zucc.）、欧洲的欧洲栗（*C. sativa* Mill.）以及北美洲的美洲栗（*C. dentata* Marsh.）（Yasumatsu，1951；Brussino *et al.*，2002；吴晖等，2004；丁玉洲等，2004；Seljak，2006；Rieske，2007）。在栗属 7 个已知种中（Johnson，1988），只有北美野生的矮栗（*C. pumila* Mill.）没有为害的记录（EPPO，2005）。但是还无有关栗瘿蜂不同寄主和地理种群间的遗传差异的报道。本文通过对为害我国板栗、茅栗和锥栗的栗瘿蜂不同种群，以及 GenBank 登录的为害欧洲栗的栗瘿蜂意大利 Piedmont 种群 mtDNA CO I 基因的序列分析，检测了不同寄主栗瘿蜂的遗传多态性，探讨其遗传差异和分化现象。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

栗瘿蜂 1 年发生 1 代，营孤雌生殖（靳杏蕊等，1995；丁玉洲等，2004；吴晖等，2004）。本研究于 2006 年 6 月和 2010 年 5—6 月采集了板栗、锥栗和茅栗共 10 个种群的栗瘿蜂虫瘿（表 1）。采集的虫瘿置于养虫笼（长 × 宽 × 高 = 30 cm × 20 cm × 30 cm）内于室温条件下保存让其羽化，羽化成虫以无水乙醇浸泡，于 −20 ℃冷冻柜内保存备用。

表 1 栗瘿蜂的标本采集信息及其 CO I 基因 GenBank 登录号

Table 1 Collection information and GenBank accession numbers of CO I genes for *Dryocosmus kuriphilus*

样品代号 Sample code	寄主植物 Host plant	采集地点（时间） Collecting location（date）	纬度（°N） Latitude（°N）	经度（°E） Longitude（°E）	GenBank 登录号 GenBank accession number
CM-LZ	板栗 *C. mollissima*	河南林州（2010 − 06）Linzhou，Henan	36.04	113.48	JF411594
CM-RD	板栗 *C. mollissima*	河南任店（2010 − 06）Rendian，Henan	32.39	113.59	JF411594
CM-NC	板栗 *C. mollissima*	江西南昌（2010 − 06）Nanchang，Jiangxi	28.45	115.51	JF411594
CH-DWS	锥栗 *C. henryi*	湖南大围山（2010 − 06）Daweishan，Hunan	28.27	114.00	JF411594
CM-LBX	板栗 *C. mollissima*	湖南六步溪（2010 − 06）Liubuxi，Hunan	28.23	111.12	JF411598
CS-LBX	茅栗 *C. seguinii*	湖南六步溪（2010 − 06）Liubuxi，Hunan	28.23	111.12	JF411594
CH-CC	锥栗 *C. henryi*	福建纯池（2010 − 06）Chunchi，Fujian	27.14	119.19	JF411597
CH-SY	锥栗 *C. henryi*	福建水源（2006 − 06）Shuiyuan，Fujian	27.09	118.44	JF411596
CH-LC	锥栗 *C. henryi*	福建龙村（2010 − 06）Longcun，Fujian	26.51	118.23	JF411594
CM-FS	板栗 *C. mollissima*	广西富庶（2010 − 05）Fushu，Guangxi	22.55	107.50	JF411595

1.2　DNA 的提取

DNA 提取参照 Zhu 等(2007)的方法,取栗瘿蜂成虫 1 只以超纯水冲洗并浸泡 30 min 左右,经滤纸吸干后,置于盛有 100 μL STE 缓冲液(100 mmol/ L NaCl , 10 mmol/ L Tris- HCl, 1 mmol/ L EDTA, pH 8.0)的 1.5 mL 离心管内,将其充分捣碎。加 SDS 至终浓度为 1%,加蛋白质分解酶 K (20 mg/ L),37 ℃水浴 30 min。再加等量的 PCL(苯酚: 氯仿: 异戊醇 =25: 24: 1)混匀,5 000 r/ min 离心 10 min 后抽提上清液,同条件再次抽提得上清液,加 1/ 10 体积 3 mol/L 醋酸钠,混匀后加入 2.5 倍体积无水乙醇 -20 ℃过夜,经 14 000 r/ min 低温离心 20 min,去上清液,用 75% 冷乙醇洗涤,再次低温离心去上清液,室温条件干燥后,获得的总 DNA 以 TE 缓冲液溶解,于 4 ℃过夜, - 20 ℃保存备用。

1.3　CO I 基因片段的 PCR 扩增及测序

参照 Ács 等(2007),本文采用调整过的 CO I 基因引物 HCO1490(5′-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT-3′)和 LCO2198(5′ -GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3′)(上海生工生物工程技术服务有限公司)扩增 mtDNA CO I 基因长度约 660 bp 的片段。PCR 扩增体积为 50 μL,包含 5 μL 10 × buffer(含 $MgCl_2$),1 μL 的 dNTPs (10 μmol/L),上下游引物(10 μmol/L) 各 1 μL,1 μL Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL),1 μL DNA 模板,40 μL H_2O。PCR 扩增条件为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s,46 ℃ 30 s,72 ℃ 75 s,共 36 个循环,循环结束后 72 ℃延伸 5 min。目的片段的获得在 PCR 扩增仪(PTC-200, MJ Research, Bio-Rad Inc., Foster City, CA, USA)上进行。

PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶于 0.5 × TBE 缓冲液中电泳,电压 70 V,时间约为 50 min。电泳后 EB 染色,通过凝胶成像系统观察,确认目的条带的有无。

使用 DNA 凝胶回收试剂盒(TaKaRa) 回收纯化目的片段。委托北京六合华大基因科技股份有限公司(武汉测序部)进行双向测序。

1.4　数据处理及系统树的构建

采用 ContigExpress 软件进行正反链序列拼接,将拼接好的序列保存为 FASTA 格式,在 NCBI 网站上(http ://// www. ncbi. nlm. nih. gov/)运行 BLAST 程序进行序列同源性比较,确定扩增的片段为 CO I 基因序列,使用 Clustalx 1.18 软件进行序列校准,并对本研究所测得的序列以及 GenBank 已登录的栗瘿蜂意大利 Piedmont 种群和同属种 *Dryocosmus caspiensis*(Ács *et al.*, 2007)CO I基因序列进行排序。基于 Kimura-2 参数,采用 Mega 4.0 软件计算不同序列间的碱基变异位点、简约信息位点、转换/颠换比率以及 A、T、G、C 的平均含量,利用 Mega 4.0 中的双参数模型计算各种群间的遗传距离。Knight 和 Mindell(1994)认为,在重建系统树时,转换/ 颠换值如果小于 2.0,那么该基因序列突变达到饱和,受进化噪音的影响会比较大。本文中转换/ 颠换平均值明显大于 2.0,且内群中所有序列的平均遗传距离为 2.8%,也远远低于昆虫线粒体 DNA 突变饱和点 25% ~ 30% (Desalle *et al.*, 1987; Brower and Desalle, 1998)。因此构建分子系统树时不需要对转换和颠换进行特别加权。以瘿蜂亚科 Synergini 族的 *Synergus thaumacerus* 为外群, 采用邻近法(NJ), 最小进化法(ME), 非加权配对算术平均法(UPGMA)构建了系统进化树, 系统进化树中结点的自举检验置信度以 1 000 次自导复制计算估计。

2　结果与分析

2.1　栗瘿蜂 mtDNA CO I 基因序列分析

10 个栗瘿蜂种群 mtDNA CO I 基因的 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测后, 约在 600 ~ 700 bp 之间可见清晰条带, 与预期的产物大小相近(图 1)。分别选取各种群 3 个体左右的明亮、清晰的条带纯化后测序,所得栗瘿蜂 mtDNA CO I 基因序列已提交 GenBank 登录,登录号为:JF411594—JF411598(表 1)。

本研究获得的栗瘿蜂不同种群 CO I 基因部分序列以及 GenBank 已登录的栗瘿蜂意大利 Piedmont 种群和同属种 *Dryocosmus caspiensis* 的 CO I 基因部分序列经 MEGA 分析比对,共有 660 个位点,无插入和缺失的出现,密码子皆起始于第 2 个碱基,各有 3 个终止密码子 UGA。保守位点(C)580 个,变异位点(V)80 个,简约信息位点(Pi)15 个,自裔位点(Si)65 个。T、A、C、G 平均含量分别为:30.6%、43.3%、13.7% 和 12.4%,A + T 平均值为 73.9%,远远高于 G + C 的 26.1%,表现出明显的 A + T 偏向性。与典型的昆虫线粒体 DNA 碱基组成一致。

通过 Mega 软件分析, 计算了我国为害板栗、

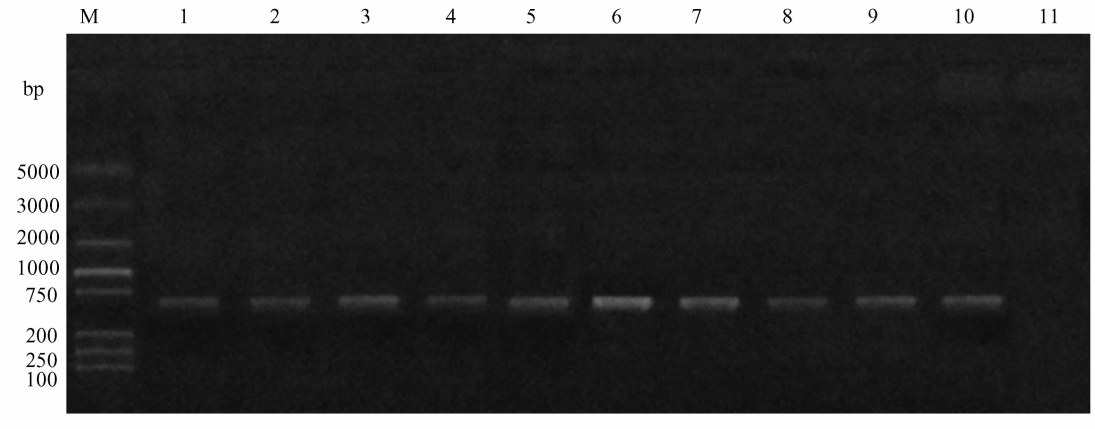

图 1 不同种群栗瘿峰 mtDNA COI 基因段片 PCR 产物

Fig. 1 Polymerase chain reaction (PCR) products of the mtDNA COI gene fragment of different populations in *Dryocosmus kuriphihus*

Lanes: M, molecular size marker; 1, CM - LZ; 2, CM - RD; 3, CM - NC; 4, CH - DWS; 5, CS - LBX; 6, CM - LBX; 7, CH - CC; 8, CH - SY; 9, CH - LC; 10, CM-FS; 11, negative control.

锥栗、茅栗不同种群,及 GenBank 已知为害欧洲栗的栗瘿蜂和同属种 *D. caspiensis* 的遗传距离(表 2)。*D. caspiensis* 与不同寄主栗瘿蜂各种群的遗传距离最大,均在 11.9% 以上,碱基差异在 73 个以上。为害板栗的河南林州、河南任店、江西南昌种群,为害茅栗的湖南安化六步溪种群,为害锥栗的湖南浏阳大围山、福建建瓯龙村种群的 mtDNA CO I 基因序列,与为害欧洲栗的意大利 Piedmont 种群完全一致。为害板栗的广西富庶种群和湖南安化六步溪种群与上述种群间也仅 1 个碱基的差异,遗传距离仅为 0.15% ~0.3%。而为害锥栗的福建建瓯水源种群和福建周宁纯池种群与上述栗瘿蜂种群的碱基差异均在 13 个以上,遗传距离均大于 2%。上述瘿蜂种群的序列中,核苷酸的替换以转换为主,转换/颠换平均值为 13.2,转换明显高于颠换(表 2)。

表 2 不同种群栗瘿蜂及近缘种 *Dryocosmus caspiensis* 间的遗传距离和转换/颠换率

Table 2 The genetic distances and transition/transversion ratios among different populations of *Dryocosmus kuriphilus* and *D. caspiensis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 *D. k*[+]		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
2 CM-LZ	0.0000		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
3 CM-RD	0.0000	0.0000		0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
4 CH-DWS	0.0000	0.0000	0.0000		0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
5 CS-LBX	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		0/0	0/0	1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
6 CH-LC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		0/0	1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
7 CM-NC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		1/0	1/0	12/1	12/1	13/1	28/46
8 CM-LBX	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015		2/0	13/1	13/1	14/1	27/46
9 CM-FS	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0030		13/1	13/1	14/1	27/46
10 CH-CC	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0216	0.0216		0/0	1/0	29/45
11 CH-SY-1	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0201	0.0216	0.0216	0.0000		1/0	29/45
12 CH-SY-2	0.0216	0.0216	0.0216	0.0216	0.0216	0.0216	0.0216	0.0232	0.0232	0.0015	0.0015		30/45
13 *D. c*[‡]	0.1215	0.1215	0.1215	0.1215	0.1215	0.1215	0.1215	0.1197	0.1197	0.1215	0.1215	0.1233	

注: + 栗瘿蜂意大利 Piedmont 种群 population of *C. sativa* from Italy (Ács *et al.*, 2007); ‡ *D. caspiensis* (Ács *et al.*, 2007). 下三角为遗传距离,上三角为转换/颠换率。标本采集信息见表 1。

The genetic distances are shown below the diagonal and the values of transition / transversion are shown above the diagonal. Detailed collection data are shown in Table 1.

2.2　分子系统进化树的构建

本研究以膜翅目瘿蜂科瘿蜂亚科 Synergini 族的 *Synergus thaumacerus* 为外群,采用 MEGA 软件,分别使用 NJ 法、ME 法和 UPGMA 法对上述各种群栗瘿蜂及 *D. caspiensis* 构建系统进化树,Bootstrap 1 000 次重复检验各个分支的置信度,得到的置信度在 51% ~100% 之间。3 种方法得到的分子系统树拓扑结构基本一致,其中 NJ 法和 ME 法所获系统树则完全一致,图 2 为为害板栗、锥栗、茅栗及欧洲栗的栗瘿蜂不同种群和同属种 *D. caspiensis* 的 NJ 和 UPGMA 系统树。从 NJ 和 UPGMA 系统树可以看出,以栗叶栎(*Quercus castaneifolia*)为寄主植物的 *D. caspiensis* 与以栗属植物为寄主的栗瘿蜂明显地分为两大支,不同寄主的栗瘿蜂各种群聚合在同一分支内。在栗瘿蜂的分支中,为害锥栗的福建建瓯市水源种群、福建周宁县纯池种群以 99% 的置信度聚为一支,其他各种群的栗瘿蜂聚为另一分支,两分支互为姊妹群。

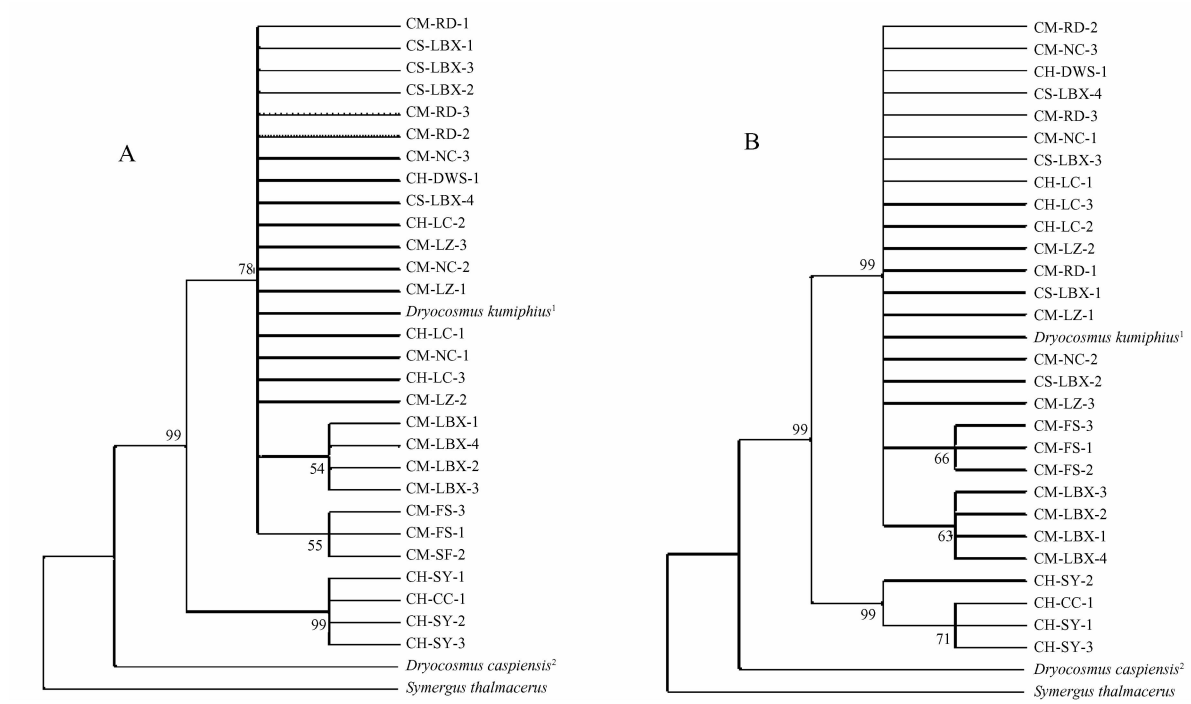

图 2　基于 mtDNA COI 基因序列构建的不同种群栗瘿蜂及 *Dryocosmus caspiensis* 的 NJ 树(A)和 UPGMA 树(B)

Fig. 2　NJ(A) and UPGMA(B) tree of *Dryocosmus kuriphihus* and *D. caspiensis* based on the mtDNA COI gene sequences

标本采集信息见表 1 Detailed collection data are shown in Table 1.

1: 栗瘿蜂意大利 Piedmont 种群 population of *C. sativa* from Italy(Ács *et al.*,2007); 2: *D. caspiensis*(Ács *et al.*,2007).

3　讨论

瘿蜂科瘿蜂亚科 Cynipinae 昆虫通常于为害的寄主植物的不同部位形成结构复杂的虫瘿,已知种类超过 1 300 种,是仅次于瘿蚊(双翅目 Diptera 瘿蚊科 Cecidomyiidae)的第 2 大造瘿昆虫类群(Stone *et al.*, 2002;Csóka *et al.*, 2004)。瘿蜂亚科可划分为 6 个族,其中栎瘿蜂族(Cynipini)种类最多,全球有 27 属约 1 000 种,主要为害壳斗科(Fagaceae)植物,形成形态多样的虫瘿(Pujade-Villar *et al.*, 2001; Pujade-Villar and Díaz, 2001; Csóka *et al.*, 2004)。由于其虫瘿的形成及最终虫瘿的形态,既是造瘿者基因组延伸的表现型,又与寄主植物的防御代谢密切相关,因此,瘿蜂的寄主选择极其保守,寄主的专一性高(Stone and Schönrogge, 2003)。正因为瘿蜂寄主选择具高度的精准性,Abrahamson 等(1998)甚至认为可以壳斗科植物的系统关系推测 Cynipini 族瘿蜂的种间

系统发育关系。栗属植物全球已知有 7 个种(Johnson, 1988),板栗、茅栗、锥栗、日本栗、欧洲栗、美洲栗均有栗瘿蜂为害的报道(Yasumatsu, 1951; Brussino *et al.*, 2002;丁玉洲等,2004;吴晖等,2004;Seljak,2006;Rieske,2007)。基于瘿蜂选择寄主植物的特性,或许不同寄主植物的栗瘿蜂种群存在着较大的遗传变异。然而,mtDNA CO I 基因序列分析的结果表明,本研究为害锥栗的六步溪、大围山种群与茅栗、板栗的不同地理种群,以及为害欧洲栗的意大利 Piedmont 种群(Ács *et al.*, 2007)之间,基因序列完全一致或者遗传距离在0.3%以下,无论是 NJ 系统树还是 UPGMA 系统树均聚合在同一分支内(表 2,图 2)。可见不同寄主的栗瘿蜂之间遗传分化程度低,在自然条件下栗瘿蜂存在一定的寄主可塑性,可进行寄主互相转移,利用板栗、锥栗、茅栗等同属的不同植物,且当被引入新的区域后成功定殖亲缘关系较远的欧洲栗和美洲栗。另一方面,为害锥栗的采自福建省建瓯市水源镇的水源种群(27.09 °N,118.44 °E)、福建省周宁县纯池镇的纯池种群(27.14 °N, 119.19 °E),与上述栗瘿蜂各种群,即使是采自建瓯市龙村镇(26.51 °N,118.23 °E)锥栗的龙村种群,CO I 基因序列差异较大,遗传距离均大于 2%,在 NJ 和 UPGMA 系统树中水源种群和纯池种群均聚合为另一分支(表 2,图 2)。因此,笔者认为采自锥栗的水源种群和纯池种群很有可能为栗瘿蜂的近似种,有必要进一步进行超微形态和生物学的研究加以证实。

致谢:本文的植物种类承蒙中南林业科技大学林学院喻勋林教授帮助鉴定,谨致谢意。

参考文献(References)

Abrahamson WG, Melika G, Scrafford R, Csoka G, 1998. Gall-inducing insects provide insights into plant systematic relationships. *Am. J. Bot.*, 85(9):1159—1165.

Ács Z, Melika G, Pénzes Z, Pujade-Villar J, Stone GN, 2007. The Phylogenetic relationships between *Dryocosmus*, *Chilaspis* and allied genera of oak gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae:Cynipini). *Syst. Entomol.*, 32(1):70—80.

Brower AV, Desalle R, 1998. Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies:the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Mol. Biol.*, 7 (1):73—82.

Brussino G, Bosio G, Baudino M, Giordano R, Ramello F, Melika G, 2002. The cynipid gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*:a dangerous exotic insect for chestnut in Europe. *Informatore Agrario*, 37:59—61.

Csóka G, Stone GN, Melika G, 2004. Biology, ecology and evolution of gall-inducing Cynipidae// Raman A, Schaefer CW, Withers TM (eds.). Biology, Ecology and Evolution of Gall-inducing Arthropods. New Hampshire: Science Publishers. 569—636.

Desalle R, Freedman T, Prager EM, Wilson AC, 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 26 (1/2): 157—164.

EPPO, 2005. *Dryocosmus kuriphilus*. *EPPO Bull.*, 35:422—424.

Johnson GP, 1988. Revision of Castanea sect. Balanocastanon (Fagaceae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 69:25—49.

Knight A, Mindell DP, 1994. Compositional effects and weighting of nucleotide sequences for phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 43(3):449—459.

Liu Z, Ronquist F, 2006. Cynipidae//Fernández F, Sharkey MJ (eds.). Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical Sociedad Colombiana de Entomología. Colombia:Bogotá DC. 839—849.

Nylander JAA, Buffington ML, Liu Z, Nieves-Aldrey JL, Liljeblad J, Ronquist F, 2004. Molecular phylogeny and evolution of gallwasps//Nylander JA (ed.). Bayesian Phylogenetics and the Evolution of Gallwasps. Uppsala, Sweden. 1—40.

Pujade-Villar J, Bellido D, Segú G, Melika G, 2001. Current state of knowledge of heterogony in Cynipidae (Hymenoptera, Cynipoidea). *Ses. Entom.*, *ICHN-SCL*, 11:85—105.

Pujade-Villar J, Díaz NB, 2001. Cìnípìdos gallígenos introducidos en América del Sur (Hymenoptera: Cynipoidea: Cynipidae). *Revista de la Sociedad Entomológica de Argentina*, 60:209—214.

Rieske L, 2007. Success of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus*, on chestnut in the USA:an historical account. *EPPO Bull.*, 37:172—174.

Ronquist F, Liljeblad J, 2001. Evolution of the gall wasp-host plant association. *Evolution*, 55:2503—2522.

Seljak G, 2006. Chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. Report-Phytosanitary Administration of the Republic of Slovenia. URL:http://www.furs.si/

Song ZK, Wang XZ, Liang GQ, 2008. Phylogenetic relationships among 15 sarcophagid fly species (Diptera: Sarcophagidae) based on partial sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase subunit Ⅰ genes. *Acta Entomol. Sin.*, 51 (3):298—306.

Stone GN, Schönrogge K, 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18:512—522.

Stone GN, Schönrogge K, Atkinson RJ, David B, Pujade-Villar J, 2002. The population biology of oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 633—668.

Ueno W, 2006. Occurrence and control of chestnut gall wasp in Nepal. *Shokubutsu Boeki. Plant Prot.*, 60:510—512.

Yasumatsu K, 1951. A new *Dryocosmus* injurious to chestnut trees in Japan. *Mushi*, 22:89—92.

Zhu DH, He YY, Fan YS, Ma MY, 2007. Negative evidence of parthenogenesis induction by *Wolbachia* in a gallwasp species, *Dryocosmus kuriphilus*. *Entomol. Exp. Appl.*, 124 (3):279—284.

丁玉洲, 毕守东, 方国飞, 何林, 2004. 栗瘿蜂虫瘿形成及发育与发生量关系研究. 应用生态学报, 15 (1): 108—110.

高红秀, 韩岚岚, 赵奎军, 樊东, 刘健, 2006. 大豆蚜细胞色素氧化酶Ⅱ基因的克隆及其在捕食性天敌昆虫鉴定中的应用. 昆虫学报, 49 (5):754—758.

靳杏蕊, 田士波, 赵淑娥, 孙鸿祥, 1995. 控制栗瘿蜂形成虫瘿的研究. 林业科学, 31(1):77—80.

吴晖, 陈顺立, 黄金聪, 叶小瑜, 邓秀明, 黄红青, 2004. 锥栗品种抗栗瘿蜂性状的评价. 福建林学院学报, 24 (4):344—348.

徐庆刚, 花保祯, 2001. 线粒体 DNA 在昆虫系统学研究中的应用. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 29(增刊):79—83.

杨曼尼,马雅军, 2009. 基于 mtDNA-COI 基因序列的雷氏按蚊分子群体遗传结构研究. 昆虫学报, 52 (9): 1000—1007.