



潘凤溜, 瞿玉国, 张佑祥, 向颖, 赵驰珺, 曹成全, 黄兴龙. 湘西峒河流域星齿蛉幼虫分子鉴定与体表呼吸结构观察 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (2): 441–449.

湘西峒河流域星齿蛉幼虫分子鉴定与 体表呼吸结构观察

潘凤溜¹, 瞿玉国², 张佑祥¹, 向颖¹, 赵驰珺¹, 曹成全^{1,3}, 黄兴龙^{1*}

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000; 2. 古丈县农业农村局, 湘西 416300; 3. 乐山师范学院生命科学学院, 乐山 614004)

摘要: 星齿蛉属 *Protohermes* 隶属于广翅目 Megaloptera 齿蛉科 Corydalidae, 是一类原始的完全变态昆虫, 幼虫水生, 常作为指示生物用于水质监测。本文对湘西峒河流域两种星齿蛉幼虫进行了分子鉴定和体表呼吸结构观测。结果表明两种星齿蛉幼虫 CO I 基因序列分别与花边星齿蛉 *Protohermes costalis* 和炎黄星齿蛉 *Protohermes xanthodes* 同源性较高; 遗传距离分析和系统发育分析进一步证实两种星齿蛉幼虫分别属于花边星齿蛉和炎黄星齿蛉, 分子鉴定结果与成虫形态鉴定结果一致。花边星齿蛉和炎黄星齿蛉幼虫体表呼吸结构气门、毛簇、气管鳃和臀足侧突均与气管相连, 毛簇是主要的水下呼吸结构。本研究结果为峒河流域星齿蛉昆虫资源的保护和开发利用提供了科学数据。

关键词: 峒河流域; 花边星齿蛉; 炎黄星齿蛉; 幼虫; CO I 基因

中图分类号: Q964; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 02-0441-09

Molecular identification of *Protohermes* larvae in Donghe River basin and observation of the surface respiratory structures

PAN Feng-Liu¹, QU Yu-Guo², ZHANG You-Xiang¹, XIANG Ying¹, ZHAO Chi-Jun¹, CAO Cheng-Quan^{1,3}, HUANG Xing-Long^{1*} (1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan Province, China; 2. Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Guzhang Country, Xiangxi 416300, Hunan Province, China; 3. College of Life Science, Leshan Normal University, Leshan 614004, Sichuan Province, China)

Abstract: Species of *Protohermes* (Megaloptera, Corydalidae) are holometabolous insects. Their larvae are aquatic and are widely used as indicators of water quality. In this study, *Protohermes* larvae collected from Donghe River basin were identified based on CO I gene sequence. The cloned CO I gene sequences share high identities with that of *Protohermes costalis* and *Protohermes xanthodes*, respectively. Genetic distance analysis and phylogenetic analysis further confirmed that the collected larvae are *P. costalis* and *P. xanthodes*. The surface respiratory structures (spiracles, tracheal gill tufts, tracheal gills and proleg lateral lobe) of *P. costalis* and *P. xanthodes* larvae are linked with the trachea, and the tracheal gill tufts are the main structures for respiration in water. These findings provide basis for conservation and exploitation of *Protohermes* larvae in Donghe River basin.

Key words: Donghe River basin; *Protohermes costalis*; *Protohermes xanthodes*; larva; CO I

基金项目: 吉首大学大学生研究性学习和创新性实验项目 (JDCX2018080); 湖南省教育厅科研项目 (18B318)

作者简介: 潘凤溜, 女, 1996年生, 本科生, 主要从事水生昆虫分类研究, E-mail: 2582249617@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 黄兴龙, 男, 1987年生, 博士, 讲师, 主要从事农业昆虫与害虫防治、资源昆虫学研究, E-mail: hxlong@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-02-27; 接受日期 Accepted: 2019-08-06

星齿蛉属 *Protohermes* 隶属于昆虫纲 Insecta 广翅目 Megaloptera 齿蛉科 Corydalidae, 是齿蛉亚科 Corydalinae 最大的属 (Liu *et al.*, 2013)。我国是星齿蛉种类最丰富的国家, 目前已知超过 38 种, 占全世界已知种类的 70% (Liu *et al.*, 2006)。星齿蛉是原始的完全变态昆虫, 幼虫水生, 蛹和成虫陆生 (Hayashi *et al.*, 1988), 幼虫大多栖息于生态环境优越的河流溪沟中, 对水质变化敏感, 因此星齿蛉也被广泛用于淡水生态系统的水质监测 (王备新和杨莲芳, 2004; 杨定和刘星月, 2010)。星齿蛉幼虫体表具有多种呼吸结构, 胸部和腹部分别具有 2 对和 8 对气门, 1~8 腹节各具有一对气管鳃; 此外, 1~7 腹节气管鳃下方还具有毛簇 (杨定和刘星月, 2010)。在鞘翅目和蜻蜓目的研究中发现, 具有气管鳃的水生昆虫, 主要以气管鳃进行气体交换获取生命活动所需的 O_2 (郑霞林等, 2007; 马龙和张明峰, 2012)。Barclay 等 (2005) 对齿蛉亚科新齿蛉属 *Corydalis* 昆虫的研究发现, *Corydalis cornutus* 幼虫毛簇具有大量纤毛, 每条纤毛中具有一条气管, 并推测毛簇是新齿蛉属幼虫的主要呼吸结构。星齿蛉属为齿蛉亚科中最大的属, 但是关于星齿蛉幼虫体表呼吸结构观察的报道比较缺乏。

峒河, 也被称作武水, 是湘西土家族苗族自治州南部的的主要河流, 源头位于花垣县雅酉镇, 于泸溪县武溪镇汇入沅江, 干流总长约 150 km, 主要支流包括洽比河、龙午河、司马河和丹清河 (朱程等, 2010)。峒河流域植被覆盖率高, 动植物种类极为丰富, 是我国生态安全建设和生态扶贫的重点区域 (邵佳和冷志明, 2016)。同时, 峒河流域也是土家族和苗族聚居区域。当地少数民族群众常在河流、溪沟中捕捞和食用俗称“桃花虫”和“水蜈蚣”的水生昆虫 (贾维秀, 2016)。这些昆虫食品也是苗族百虫宴的核心内容之一。实地调查发现, 桃花虫和水蜈蚣是多种水生昆虫的统称, 桃花虫主要指蜻蜓目稚虫, 水蜈蚣主要指星齿蛉幼虫。因此星齿蛉在当地生态系统和少数民族文化中具有重要地位。但是, 目前峒河流域的星齿蛉种类还不明确。

线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 基因序列广泛用于昆虫的系统地位和系统发育关系分析 (张丹丹等, 2017)。星齿蛉幼虫形态与其他齿蛉亚科幼虫形态相似, 传统的星齿蛉分类鉴定主要通过观察成虫的形态学特征。近年来, 星齿蛉

属昆虫的分子生物学研究不断深入, 文献报道了 *Protohermes concolorus* 线粒体基因组和 67 条星齿蛉属昆虫 CO I 基因片段序列信息, 使基于 CO I 基因的星齿蛉属昆虫分子鉴定成为可能 (Hua *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2013)。Jung 等人 (2016) 的研究证实, CO I 基因序列可作为 DNA 条形码, 用于广翅目幼虫的分类鉴定。本研究通过 CO I 基因序列分析对峒河流域星齿蛉幼虫进行了鉴定, 并对其体表呼吸结构进行了观察, 以期对星齿蛉的保护和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 昆虫采集和形态学观察

本研究于 2018 年 9-10 月对峒河流域进行星齿蛉幼虫采集, 样线涵盖峒河干流以及支流洽比河、龙午河、司马河和丹青河。峒河及其支流两岸为山地, 植被覆盖率高, 村落和农田沿河分布。每条河流选取 3 个样点, 每个样点选取 $2\text{ m} \times 2\text{ m}$ 的样方 3 个。单个样方由 1 人使用宽度 30 cm、网孔 2 mm 的 D 形网捕捞 15 min, 然后以样方为单位将捕获的星齿蛉幼虫放入打孔的塑料盒, 带回实验室数量统计。部分幼虫直接用于形态特征观察, 然后进行 DNA 提取或浸泡在 80% 酒精中, 于 4°C 冰箱长期保存。其余幼虫在室内饲养, 并在 2019 年 6 月羽化获得成虫, 对成虫进行了形态学鉴定。使用外接数码相机 (D810, 尼康) 的体视显微镜 (XTL-165-VT, 凤凰) 进行形态学观察和拍照, 照片由 Photoshop 7.0 软件 (Adobe) 进行裁切和图层叠加。用于观察气管分布情况的星齿蛉幼虫新鲜标本浸泡于含 0.03% Triton X-100 和 0.85% NaCl 磷酸缓冲液中, 4°C 放置 24 h。形态学特征描述参考杨定和刘星月 (2010)。

1.2 PCR 扩增

按照 EasyPure Genomic DNA Kit (北京全世金) 试剂盒说明书的操作步骤提取幼虫一侧中足和胸部肌肉组织 DNA。用于 CO I 基因扩增的通用引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 上下游引物序列分别为 (P3: $5'$ -CAACATTTATT TTGATTTTTGG- $3'$) 和 (P4: $5'$ -TCCATTGCACT AATCTGCCATATTA- $3'$) (Yang *et al.*, 2017)。PCR 反应体系为 25 μL , 包含 PCR Mastermix (北京康为世纪) 12.5 μL , 上下游引物各 1 μL , 模版 DNA 1 μL , ddH_2O 9.5 μL 。反应程序为 94°C 预变性

5 min; 94℃变性 1 min, 50℃退火 45 min, 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 10% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

1.3 序列分析

测序结果通过 NCBI 网站的 Blastn 服务 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行相似性比较, 确定 PCR 扩增得到的序列是否来自齿蛉科昆虫。使用 Clustal X 1.83 软件进行多重序列比对 (Thompson *et al.*, 1997)。通过 Mega 5.0 软件计算星齿蛉 CO I 基因序列的遗传距离。使用 Mega 5.0 软件构建系统发育树, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum likelihood, ML), 重复 1 000 次 (Tamura *et al.*, 2011)。用于构建系统发育树的 CO I 基因序列除来自峒河流域星齿蛉标本外, 还包括 Genbank 中齿蛉亚科昆虫的 CO I 基因序列, 分别来自巨齿蛉属 *Acanthacorydalis*、齿蛉属 *Neoneuromus*, 以及星齿蛉属的花边星齿蛉种团和炎黄星齿蛉种团 (表 1)。

2 结果与分析

2.1 峒河流域星齿蛉

通过对峒河干流及其 4 条支流进行了水生昆虫采集, 共发现两种外部形态存在差异的星齿蛉幼虫, 星齿蛉 A 和星齿蛉 B (表 2)。洽比河、司马河和丹清河, 两种星齿蛉幼虫均有分布; 而在峒河干流和龙午河仅发现星齿蛉 A。星齿蛉幼虫在室内羽化得到的成虫经形态学鉴定, 星齿蛉 A 为花边星齿蛉 *Protohermes costalis* 和星齿蛉 B 为炎黄星齿蛉 *Protohermes xanthodes*。

2.2 遗传距离

选取 3 头星齿蛉 A 标本 (P001、P002 和 P003) 和 2 头星齿蛉 B 标本 (P004 和 P005) 用于 DNA 提取和 CO I 基因序列分析。P001、P002 和 P003 CO I 基因序列与 Genbank 中的花边星齿蛉 CO I 基因序列同源性达到 99%, 初步认定为花边星齿蛉; P004 和 P005 CO I 基因序列与炎黄星齿蛉 CO I 基因序列同源性为 99%, 初步认定为炎黄星齿蛉。

利用 MEGA 5.0 软件计算峒河流域星齿蛉标本 CO I 基因序列与 Genbank 中花边星齿蛉种团和炎黄星齿蛉 CO I 基因序列的遗传距离 (表 3)。花边星齿蛉种团内种间遗传距离在 0.060 ~ 0.095 之间,

表 1 用于系统发育分析的齿蛉亚科 CO I 基因序列
Table 1 CO I gene sequences of Corydalinae used in the phylogenetic analysis

种名 Species	学名 Scientific name	CO I 基因 序列登录号 Registration number
属模巨齿蛉	<i>Acanthacorydalis asiatica</i>	KF944550
越中巨齿蛉	<i>Acanthacorydalis fruhstorferi</i>	KF944551
东方巨齿蛉	<i>Acanthacorydalis orientalis</i>	KF944552
单斑巨齿蛉	<i>Acanthacorydalis unimaculata</i>	KF944553
云南巨齿蛉	<i>Acanthacorydalis yunnanensis</i>	KF944554
普通齿蛉	<i>Neoneuromus ignobilis</i>	KF944563
东方齿蛉	<i>Neoneuromus orientalis</i>	KF944564
锡金齿蛉	<i>Neoneuromus sikkimensis</i>	KF944565
截形齿蛉	<i>Neoneuromus tonkinensis</i>	KF944566
滇印星齿蛉	<i>Protohermes arunachalensis</i>	KF944574
花边星齿蛉	<i>Protohermes costalis</i>	KF944577
古田星齿蛉	<i>Protohermes gutianensis</i>	KF944584
湖南星齿蛉	<i>Protohermes hunanensis</i>	KF944587
炎黄星齿蛉	<i>Protohermes xanthodes</i>	KF944590
云南星齿蛉	<i>Protohermes yunnanensis</i>	KF944591
李氏星齿蛉	<i>Protohermes lii</i>	KF944592
东方星齿蛉	<i>Protohermes orientalis</i>	KF944594
杨氏星齿蛉	<i>Protohermes yangi</i>	KF944600

花边星齿蛉种团各种与炎黄星齿蛉种团间遗传距离为 0.085 ~ 0.106。P001、P002 和 P003 之间的遗传距离在 0.012 ~ 0.030, 低于种间遗传距离; 三者与花边星齿蛉遗传距离分别为 0.016、0.033 和 0.020, 也低于种间遗传距离, 说明 P001、P002、P003 与花边星齿蛉为同一物种。P004 和 P005 遗传距离为 0.04, 低于种间遗传距离; 二者与炎黄星齿蛉的遗传距离分别为 0.009 和 0.011, 也低于种间遗传距离, 说明 P004 和 P005 属于炎黄星齿蛉。

2.3 系统发育分析

以齿蛉亚科 3 属 (星齿蛉属、齿蛉属和巨齿蛉属) 的 CO I 基因构建系统发育树。NJ 法和 ML 法构建的系统发育树中, 星齿蛉属、齿蛉属和巨齿蛉属均各自聚为一支 (图 1: A, B); P001、P002、P003、P004 和 P005 位于星齿蛉属昆虫构成的分支; 其中 P001、P002、P003 位于花边星齿蛉

表 2 样点星齿蛉幼虫数量
Table 2 Number of *Protohermes* larvae in the sample sites

河流 River	样点 Sampling point	经纬度 Longitude and latitude	海拔 (m) Elevation	星齿蛉 A Protohermes A	星齿蛉 B Protohermes B
峒河干流	1	N28°18'48.20" E109°32'11.72"	266	7	0
	2	N28°18'37.33" E109°33'9.99"	254	5	0
	3	N28°18'52.47" E109°34'14.13"	245	10	0
洽比河	1	N28°25'21.35" E109°39'55.38"	342	7	1
	2	N28°20'13.50" E109°40'10.64"	229	9	1
	3	N28°19'40.10" E109°40'37.93"	223	19	4
龙午河	1	N28°23'27.79" E109°40'4.77"	321	35	0
	2	N28°22'19.01" E109°42'9.30"	243	21	0
	3	N 28°21'3.97" E109°43'56.62"	206	29	0
司马河	1	N28°18'6.26" E109°49'59.11"	197	60	18
	2	N28°16'51.25" E109°49'18.65"	186	8	6
	3	N28°16'25.79" E109°49'43.96"	179	0	0
丹清河	1	N28°26'1.94" E109°55'30.19"	228	50	26
	2	N28°22'8.04" E109°58'0.91"	212	16	2
	3	N28°21'36.47" E109°57'47.51"	194	41	48

表 3 基于 CO I 基因序列的星齿蛉遗传距离
Table 3 Genetic distance of *Protohermes* based on CO I gene sequence

序号 No.	物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	P001													
2	P002	0.024												
3	P003	0.012	0.030											
4	P004	0.096	0.099	0.100										
5	P005	0.095	0.097	0.099	0.004									
6	<i>Protohermes xanthodes</i>	0.100	0.105	0.101	0.009	0.011								
7	<i>Protohermes costalis</i>	0.016	0.033	0.020	0.105	0.104	0.106							
8	<i>Protohermes orientalis</i>	0.067	0.075	0.068	0.096	0.095	0.096	0.078						
9	<i>Protohermes lii</i>	0.075	0.083	0.079	0.095	0.096	0.093	0.083	0.070					
10	<i>Protohermes yunnanensis</i>	0.060	0.066	0.060	0.097	0.096	0.096	0.070	0.080	0.081				
11	<i>Protohermes hunanensis</i>	0.084	0.091	0.085	0.087	0.083	0.085	0.091	0.085	0.085	0.083			
12	<i>Protohermes arunachalensis</i>	0.084	0.091	0.085	0.095	0.093	0.093	0.089	0.071	0.080	0.088	0.068		
13	<i>Protohermes gutianensis</i>	0.080	0.081	0.081	0.095	0.093	0.096	0.088	0.076	0.091	0.078	0.075	0.076	

种团, 与花边星齿蛉聚为一支; P004 和 P005 与炎黄星齿蛉聚为一支。综合考虑遗传距离分析结果

和系统发育分析结果, 峒河流域采集的星齿蛉 A 和 B 分别属于花边星齿蛉和炎黄星齿蛉。

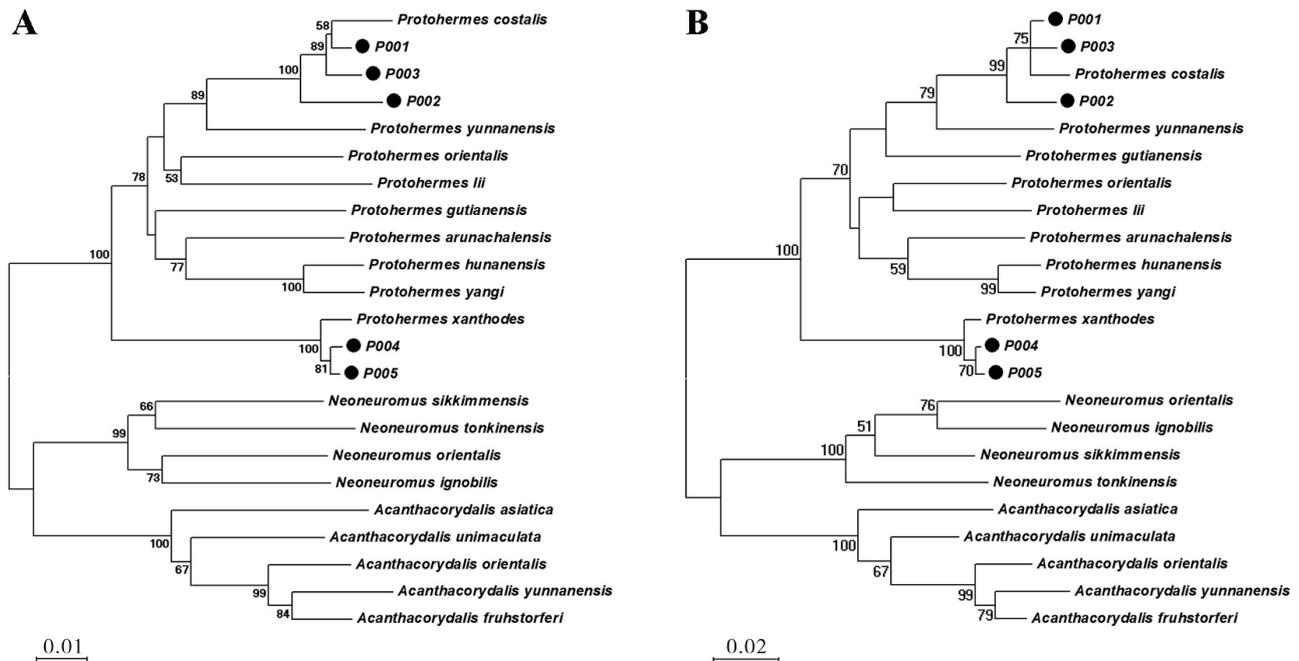


图 1 基于 CO I 基因的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees based on CO I gene sequence

注: A, 基于 CO I 基因的 NJ 树; B, 基于 CO I 基因的 ML 树。Note: A, NJ trees based on CO I gene sequence; B, ML trees based on CO I gene sequence.

2.4 外部形态

炎黄星齿蛉幼虫体长 50.0 ~ 53.6 mm, 体粗长, 略扁 (图 2: A, B)。头部方形, 深棕色或棕色, 表面光滑, 背面具有黄色花 (图 2: C); 上唇三角形, 上颚发达, 具有 4 个小齿; 触角 5 节, 第 3 节较长, 端部两节较短。前胸背板方形, 与头部等宽, 深棕色或棕色, 具有黄色斑纹 (图 2: E); 头部背面和前胸背板斑纹形状在个体间存在一定差异, 同一个体左侧和右侧斑纹也存在细微变化。中胸和后胸背面浅棕色, 具有黄色斑纹 (图 2: F)。前胸与中胸之间、中胸与后胸之间各具有 1 对气孔。腹部 10 节, 表面具有大量刚毛; 1-8 腹节各具有一对气管鳃, 鞭状, 表面具有刚毛, 第 8 腹节气管鳃刚毛较长呈羽状; 每条气管鳃基部前方具有 1 个气孔; 1-7 腹节气管鳃下具有浓密的白色毛簇, 第 8 腹节气管鳃下无毛簇 (图 2: H); 第 9 腹节无特化的结构; 第 10 腹节具一对钩状臀足, 臀足末端具 2 个爪, 臀足外侧具 1 刺突, 形状与第 8 腹节气管鳃相似, 呈羽状, 但更短小 (图 2: H)。

花边星齿蛉幼虫体长 46.2 ~ 51.7 mm, 体粗长, 略扁 (图 2: I, J)。头部方形, 浅棕色, 背面斑纹黄色; 上唇三角形, 上颚发达, 具 4 个小齿

(图 2: K); 触角 5 节, 端部两节较短, 第三节较长。前胸背板与头部等宽, 或略宽于头部, 斑纹不明显 (图 2: M)。中胸和后胸背面浅棕色, 具有黄色斑纹 (图 2: N)。前胸与中胸之间、中胸与后胸之间各具有 1 对气孔。腹部 10 节, 表面具有大量刚毛; 1-8 腹节各有一对鞭状气管鳃, 表面具有刚毛; 每条气管鳃基部前方具有 1 个气孔, 1-7 腹节气管鳃下方具棕色或白色毛簇, 第 8 腹节气管鳃下无毛簇 (图 2: P); 第 9 腹节无特化结构; 第 10 腹节具一对钩状臀足, 臀足末端具有 2 个小爪, 臀足外侧具 1 鞭状刺突, 形状与气管鳃相近, 但更短小纤细 (图 2: P)。

2.5 体表呼吸结构

炎黄星齿蛉和花边星齿蛉幼虫腹部具有 8 对气门, 分别位于第 1 至第 8 腹节 (图 3: A, I)。胸部具有 2 对气门, 分别位于中胸和后胸前端, 后胸气门较小; 中胸气门较大 (图 3: B, J)。腹部和胸部气门均具有单瓣式开闭机构, 胸部气门开闭机构位于气孔后沿 (图 3D, L), 腹部气门开闭机构位于气孔前沿 (图 3: E, F, M, N)。沿气门剪开体壁, 可以观察到胸部和腹部气门均与内部气管相连。



图2 炎黄星齿蛉和花边星齿蛉幼虫

Fig. 2 Larvae of *Protohermes xanthodes* and *Protohermes costalis*

注: A, 炎黄星齿蛉幼虫背面观; B, 炎黄星齿蛉幼虫腹面观; C, 炎黄星齿蛉头部背面观; D, 炎黄星齿蛉头部腹面观; E, 炎黄星齿蛉前胸背板; F, 炎黄星齿蛉中胸、后胸背面; G, 炎黄星齿蛉7-10腹节背面; H, 炎黄星齿蛉7-10腹节腹面观; I, 花边星齿蛉幼虫背面观; J, 花边星齿蛉幼虫腹面观; K, 花边星齿蛉头部背面; L, 花边星齿蛉头部腹面; M, 花边星齿蛉前胸背板; N, 花边星齿蛉中胸后胸背面; O, 花边星齿蛉7-10腹节背面; P, 花边星齿蛉7-10腹节腹面。
 Note: A, dorsal view of *P. xanthodes* larva; B, ventral view of *P. xanthodes* larva; C, dorsal view of *P. xanthodes* larva head; D, ventral view of *P. xanthodes* larva head; E, pronotum of *P. xanthodes* larva; F, mesothorax and metathorax of *P. xanthodes* larva; G, dorsal view of 7~10 abdominal segment of *P. xanthodes* larva; H, ventral view of 7~10 abdominal segment of *P. xanthodes* larva; I, dorsal view of *P. costalis* larva; J, ventral view of *P. costalis* larva; K, dorsal view of *P. costalis* larva head; L, ventral view of *P. costalis* larva head; M, pronotum of *P. costalis* larva; N, mesothorax and metathorax of *P. costalis* larva; O, dorsal view of 7~10 abdominal segment of *P. costalis* larva; P, ventral view of 7~10 abdominal segment of *P. costalis* larva.

两种星齿蛉第1至第8腹节均具有1对气管鳃,第十腹节臀足外侧具有1对气管鳃状刺突,第1至第7腹节气管鳃下方具有浓密的气管鳃毛簇。观察发现,炎黄星齿蛉毛簇由两丛小簇组成;小簇包含大量细长的纤毛,每条纤毛中均具有一条银色的气管(图3:H)。花边星齿蛉毛簇也由两

丛小簇组成,由于体壁颜色较浅,可以观察到小簇基部与大量银色微气管相连,这些微气管向纤毛延伸,直到纤毛端部(图3:O)。而花边星齿蛉气管鳃和臀足只观察到一条银色的气管(图3:H)。

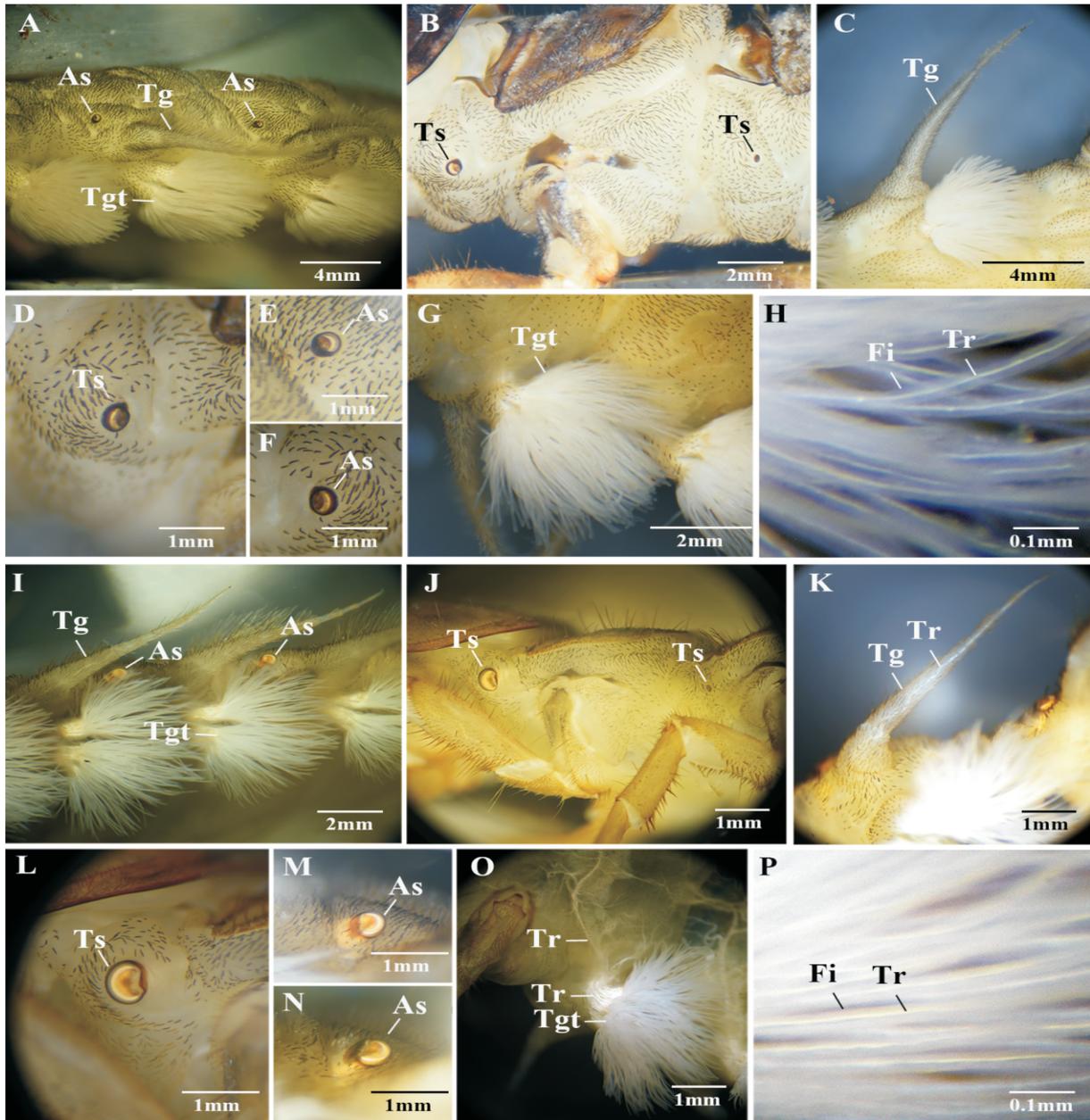


图 3 炎黄星齿蛉和花边星齿蛉幼虫体表呼吸结构

Fig. 3 Surface respiratory structures of *Protohermes xanthodes* and *Protohermes costalis* larva

注：A，炎黄星齿蛉幼虫腹部体表呼吸结构；B，炎黄星齿蛉幼虫胸部体表呼吸结构；C，炎黄星齿蛉幼虫气管鳃；D，炎黄星齿蛉幼虫中胸气门；E和F，炎黄星齿蛉幼虫1-2腹节气门；G，炎黄星齿蛉幼虫毛簇；H，炎黄星齿蛉幼虫毛簇纤毛；I，花边星齿蛉幼虫体表呼吸结构；J，花边星齿蛉幼虫胸部体表呼吸结构；K，花边星齿蛉幼虫气管鳃；L，花边星齿蛉幼虫中胸气门；M和N，花边星齿蛉幼虫1-2腹节气门；O，花边星齿蛉幼虫毛簇；P，花边星齿蛉幼虫毛簇纤毛。简称：As，腹部气门；Ts，胸部气门；Tg，气管鳃；Tgt，毛簇；Tr，气管；Fi，毛簇纤毛。Note: A, surface respiratory structures in abdomen of *P. xanthodes* larva; B, surface respiratory structures in thorax of *P. xanthodes* larva; C, tracheal gill of *P. xanthodes* larva; D, spiracle in mesothorax of *P. xanthodes* larva; E and F, spiracle in 1~2 abdominal segment of *P. xanthodes* larva; G, tracheal gill tuft of *P. xanthodes* larva; H, tracheal gill tuft filaments of *P. xanthodes* larva; I, surface respiratory structures in abdomen of *P. costalis* larva; J, surface respiratory structures in thorax of *P. costalis* larva; K, tracheal gill of *P. costalis* larva; L, spiracle in mesothorax of *P. costalis* larva; M and N, spiracle in 1~2 abdominal segment of *P. costalis* larva; O, tracheal gill tuft of *P. costalis* larva; P, tracheal gill tuft filaments of *P. costalis* larva. Abbreviations: As, abdominal spiracle; Ts, thoracic spiracle; Tg, tracheal gill; Tgt, tracheal gill tuft; Tr, trachea; Fi, filament.

3 结论与讨论

CO I 基因被广泛用于昆虫的系统地位和系统发育研究,是 DNA 条形码选用的主要基因之一,可在昆虫生长发育的不同阶段对其进行鉴定(陈珊等,2017)。本研究发现,湘西峒河流域星齿蛉幼虫的 CO I 基因片段分别与花边星齿蛉和炎黄星齿蛉 CO I 基因一致性最高。后续的遗传距离分析发现,花边星齿蛉种团和炎黄星齿蛉范围内的种间遗传距离为 0.060 ~ 0.106,而 P001、P002、P003 与花边星齿蛉的遗传距离不超过 0.033,低于种间遗传距离;P004、P005 与炎黄星齿蛉的遗传距离也低于种间遗传距离,由此推测 P001、P002 和 P003 属于花边星齿蛉,P004 和 P005 属于炎黄星齿蛉。为了验证遗传距离分析结果,本研究用齿蛉亚科昆虫 3 属(星齿蛉属、齿蛉属和巨齿蛉属)的 CO I 基因构建了系统发育树,CO I 基因片段的分支情况与属级分类地位一致。Jung 等(2016)使用鱼蛉科和齿蛉科昆虫 CO I 基因片段构建的系统发育树分支也得到了与本研究类似的结果,各分支与物种的属级分类地位一致,来自同一物种的 CO I 基因聚为一支。P001、P002 和 P003 与花边星齿蛉聚为一支,P004 和 P005 与炎黄星齿蛉聚为一支,该结果进一步证实峒河流域采集的星齿蛉幼虫分别属于花边星齿蛉和炎黄星齿蛉。

花边星齿蛉和炎黄星齿蛉为我国广布种。花边星齿蛉主要分布于东洋界,分布范围包括云南、贵州、湖北、湖南、江西、安徽、浙江、福建、广西、广东和台湾,在河南商城也有发现(Liu *et al.*,2007)。炎黄星齿蛉分布范围涵盖东洋界和古北界,包括辽宁、北京、河北、山西、山东、甘肃、陕西、云南、贵州、四川、重庆、河南、湖南、湖北、江西、安徽、浙江、广西和广东(Liu *et al.*,2006)。本研究的野外采集发现,洽比河、司马河和丹青河两种星齿蛉均有分布,峒河干流和龙午河仅发现花边星齿蛉。丹青河水量充沛,上游位于高望界国家级自然保护区。该保护区自然环境优越,人类活动干扰小,动植物多样性极高,保护区生物多样性对保持丹青河星齿蛉多样性可能有积极作用。峒河干流流经矮寨镇和吉首市区,河流沿线居民区和工农业设施较多,部分河段存在严重的污染问题(朱程等,2010)。

人类活动引起的水质污染可能是峒河干流星齿蛉数量少和种类单一的重要原因。龙午河是峒河较小的一条支流,干流长度不足 20 km,在枯水季节常常出现断流;花边星齿蛉在龙午河种群数量较大,但未发现炎黄星齿蛉。因此推测,河水干枯可能是影响龙午河星齿蛉多样性的重要因素,花边星齿蛉可能比炎黄星齿蛉更能适应河水断流的自然情况。花边星齿蛉和炎黄星齿蛉在洽比河和司马河均有分布。洽比河和司马河上游位于保靖县吕洞山区,吕洞山被苗区人民称为圣山,自然环境优越,人类活动干扰较小(刘晓蓉,2018)。综上,河流污染和断流可能是影响星齿蛉种群数量的重要因素,水量充沛、水质清洁的河流更有利于星齿蛉生存。

水生昆虫由陆生昆虫演化而来,因此水生昆虫均保留了气管呼吸系统(Lee,1929;郑霞林等,2008)。齿蛉科包括齿蛉属和星齿蛉属,它们的幼虫均为淡水生,具有发达的气管呼吸系统。曹成全等(2010)研究齿蛉属普通齿蛉 *Neoneuromus ignobilis* 幼虫的呼吸系统,发现普通齿蛉具有两条较粗的侧纵干气管,侧纵干气管分支而来的二级气管与气门、毛簇相连。本研究在星齿蛉属幼虫上也观察到了气管呼吸系统,花边星齿蛉体表的 10 个气门均与气管相连,毛簇、气管鳃和臀足侧突中均具有气管;对炎黄星齿蛉和花边星齿蛉毛簇的观察还发现,毛簇基部具有大量微气管,这些微气管从毛簇纤毛的基部向上延伸,一直到达纤毛的端部。Barclay 等(2005)使用扫描电镜观测了新齿蛉属昆虫 *C. cornutus* 毛簇纤毛横切面,发现 *C. cornutus* 毛簇纤毛的主体是贯穿其中的微气管,微气管螺旋状内脊使纤毛具有足够的刚性抵抗水压;同时纤毛表面具有密集的褶皱,这些褶皱增加了纤毛与水的接触面积,有利于纤毛与水介质的气体交换。齿蛉亚科幼虫毛簇还与一条收缩肌相连,可以有节律的摆动,以促进毛簇与水介质的气体交换(Bitsch,2012)。炎黄星齿蛉和花边星齿蛉幼虫的毛簇在水中也会进行这样的摆动。本研究推测,星齿蛉与齿蛉类似,纤毛中的微气管使纤毛在水压下保持贯通,水介质中溶解的氧气能够穿过纤毛进入微气管,然后通过气管系统传递到整个虫体。对花边星齿蛉气管鳃和臀足侧突的观察发现,这些结构中具有一条比纤毛微气管略粗的气管。由此推测,气管鳃和臀足侧突也具有气体交换的功能,但呼吸效率远不如毛

簇。综上,本研究认为星齿蛉幼虫在水下主要通过毛簇纤毛获取水中的氧气,毛簇是星齿蛉幼虫在水下呼吸的主要结构。

参考文献 (References)

- Barclay A, Portman RW, Hill PSM. Trachealgills of the dobsonfly larvae, or hellgrammite *Corydalus cornutus* L. (Megaloptera: Corydalidae) [J]. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 2005, 78 (2): 181–185.
- Bitsch J. The controversial origin of the abdominal appendage – like processes in immature insects: Are they true segmental appendages or secondary outgrowths? (Arthropoda, Hexapoda) [J]. *Journal of Morphology*, 2012, 273 (8): 919–931.
- Cao CQ, Huang MY, Qing YT, et al. Respiratory system and respiratory behaviors of the larva of *Neoneuromus ignobilis* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2011, 48 (2): 392–396. [曹成全, 黄明远, 卿玉强, 等. 普通齿蛉幼虫的呼吸系统及呼吸行为 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48 (2): 392–396.]
- Chang WC, Hayashi F, Liu XY, et al. Discovery of the female of *Protohermes niger* Yang & Yang (Megaloptera: Corydalidae): Sexual dimorphism in coloration of a dobsonfly revealed by molecular evidence [J]. *Zootaxa*, 2013, 3745 (1): 84–92.
- Chen S, Zhou Q, Li G. DNA barcoding of various developmental stages of *Endoclyta davidi* (Lepidoptera: Hepialidae) based on mtDNA CO I gene sequence [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (6): 681–690. [陈珊, 周琼, 李纲. 巨疔蝙蛾不同虫态的 COI 基因条形码识别 [J]. 昆虫学报, 2017, 60 (6): 681–690]
- Hayashi F. Life history variation in a dobsonfly, *Protohermes grandis* (Megaloptera: Corydalidae): Effects of prey availability and temperature [J]. *Freshwater Biology*, 1988, 19: 205–216.
- Hua JM, Li M, Dong PZ, et al. The mitochondrial genome of *Protohermes concolorus* Yang et Yang 1988 (Insecta: Megaloptera: Corydalidae) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 36 (7): 1757–1765.
- Jia WX. Baojing Dialect Pronunciation and Vocabulary Study [D]. Jishou: Jishou University Master Thesis, 2016. [贾维秀. 保靖方言语音和词汇研究 [D]. 吉首: 吉首大学学位论文, 2016]
- Jung SW, Vshivkova T, Bae YJ. DNA – based identification of South Korean Megaloptera larvae with taxonomic notes [J]. *Canadian Entomologist*, 2016, 148 (2): 123–139.
- Lee MO. Respiration in the insects [J]. *Quarterly Review of Biology*, 1929, 4: 13–232.
- Liu XR. On the change of confucian sacrificial ritual in Miao nationality area in western Hunan—Based on Ludong mountain's interpretation of memorial service ceremonial scriptures [J]. *Journal of Huaihua University*, 2018, 37 (9): 1–5. [刘晓蓉. 儒家祭奠礼在湘西苗族地区的嬗变——基于吕洞山“奠礼科仪本”的解读 [J]. 怀化学院学报, 2018, 37 (9): 1–5]
- Liu XY, Hayashi F, Yang D. Systematics of the *Protohermes costalis* species – group (Megaloptera: Corydalidae) [J]. *Zootaxa*, 2007, 1439 (1439): 1–46.
- Liu XY, Hayashi F, Yang D. Systematics of the *Protohermes xanthodes* species – group in eastern Asia (Megaloptera: Corydalidae) [J]. *Entomological Science*, 2006, 9 (4): 399–409.
- Liu XY, Hayashi F, Yang D. Taxonomic notes on the *Protohermes changninganus* species group (Megaloptera: Corydalidae), with description of two new species [J]. *Zootaxa*, 2013, 3722 (4): 569–580.
- Ma L, Zhang MF. The respiratory gill of animals [J]. *Bulletin of Biology*, 2012, 47 (4): 7–8. [马龙, 张明峰. 动物的呼吸鳃 [J]. 生物学通报, 2012, 47 (4): 7–8]
- Shao J, Leng ZM. Regionalecological security evaluation on Wuling Mountain Area [J]. *Economic Geography*, 2016, 36 (10): 166–171. [邵佳, 冷志明. 武陵山片区区域生态安全测度与评价 [J]. 经济地理, 2016, 36 (10): 166–171]
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10): 2731–2739.
- Thompsonue JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple seqnce alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24): 4876–4882.
- Wang BX, Yang LF. A study on tolerance values of benthic macroinvertebrate taxa in eastern China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (12): 2768–2775. [王备新, 杨莲芳. 我国东部底栖无脊椎动物主要分类单元耐污值 [J]. 生态学报, 2004, 24 (12): 2768–2775]
- Yang D, Liu XY. Fauna Sinica, Insecta, Vol. 51, Megaloptera [M]. Beijing: Science Press, 2010: 137–233. [杨定, 刘星月. 中国动物志, 昆虫纲, 第五十一卷, 广翅目 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 137–233]
- Yang F, Jiang Y, Yang D, et al. Mitochondrial genomes of two Australian fishflies with an evolutionary timescale of Chauliodinae [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 (1): 4481.
- Zhang DD, Chen K. Advances in molecular systematics of Pyraloidea (Lepidoptera) [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2017, 39 (2): 254–262. [张丹丹, 陈凯. 螟蛾总科分子系统学研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39 (2): 254–262.]
- Zheng XL, Yuan HH, Wang YY, et al. Respiratory system and respiratory behaviors of *Luciola leii* larvae [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008 (3): 445–448, 507. [郑霞林, 袁洪海, 王余勇, 等. 雷氏黄萤幼虫呼吸系统和呼吸行为 [J]. 昆虫知识, 2008 (3): 445–448, 507]
- Zheng XL, Zhang Y, Fu XH. Observation and comparison of the structure of respiratory system during different instars of *Luciola substriata* (Coleoptera: Lampyridae) larva [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2007 (6): 644–648. [郑霞林, 张应, 付新华, 等. 条背萤幼虫不同发育阶段呼吸系统构造的观察和比较 [J]. 昆虫学报, 2007 (6): 644–648]
- Zhu C, Ma TW, Zhou K, et al. Pollution characteristics and potential ecotoxicity risk of heavy metals in surface river sediments of western Hunan. [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30 (15): 3982–3993. [朱程, 马陶武, 周科, 等. 湘西河流表层沉积物重金属污染特征及其潜在生态毒性风险 [J]. 生态学报, 2010, 30 (15): 3982–3993]