



马奉, 周青松, 曹焕喜, 陈婧婷, 王明强, 谢婷婷, 杨娟娟, 陶双伦, 张峰, 罗阿蓉, 朱朝东. 江西新岗山森林昆虫种内遗传距离研究[J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 1027–1037.

江西新岗山森林昆虫种内遗传距离研究

马 奉^{1,2}, 周青松², 曹焕喜³, 陈婧婷^{2,4}, 王明强^{2,5}, 谢婷婷²,
杨娟娟^{2,4}, 陶双伦¹, 张 峰⁶, 罗阿蓉^{2*}, 朱朝东^{2,4}

- (1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南吉首 416000; 2. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学(院)重点实验室, 北京 100101; 3. 中国科学院动物研究所国家动物标本资源库, 北京 100101; 4. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049; 5. 中国科学院成都生物研究所山地生态恢复与生物资源利用重点实验室与生态恢复生物多样性保护四川省重点实验室, 成都 610041; 6. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: DNA 条形码目前广泛用于昆虫多样性研究。本研究采用 DNA 条形码(即线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因 COI 5'端), 通过比较所获分子分类操作单元(Molecular operational taxonomic units, MOTU)的种内遗传距离, 探究 DNA 条形码在亚热带森林(位于我国江西省新岗山)不同昆虫类群中的物种鉴定和界定效用。数据分析中结合数据库比对信息, 采用 jMOTU、ABGD、bPTP、GMYC 这 4 种物种界定方法获得 MOTU, 从而开展种内遗传距离分析。本研究共挑选出 479 个昆虫样本, 获得 475 条 COI 序列, 经 NCBI、BOLD 在线数据库比对属于 6 个目, 与形态初步划分一致; 物种界定分析获得 288 个 MOTU, 其中鳞翅目最多, 达 85 个, 膜翅目、双翅目、半翅目、鞘翅目次之, 分别为 80、74、21 和 20 个, 直翅目最少, 仅 8 个。膜翅目和双翅目的种内遗传距离均值及标准偏差较大(膜翅目: 0.89% ± 0.87%; 双翅目: 0.73% ± 0.58%), 鳞翅目的最小(0.28% ± 0.20%)。研究表明: 不同昆虫类群的种内遗传距离虽然整体在一定范围, 但仍然存在一定的差异, 因此不能笼统地依靠遗传距离的距离阈值进行物种划分; 现有数据库需要补充足够的昆虫物种信息, 才能提升物种鉴定效率。本研究丰富了亚热带森林昆虫分子数据库, 同时也为进一步探索基于分子分类学开展昆虫多样性研究提供了基础数据和参考。

关键词: DNA 条形码; 种内遗传距离; 物种界定; 昆虫; 亚热带森林

中图分类号: Q968.1; Q9653; S433 文献标识码: A 文章编号: 1674-0858 (2023) 04-1027-11

Insect intraspecific genetic distance in a forest of Xingangshan, Jianxi Province

MA Feng^{1,2}, ZHOU Qing-Song², CAO Huan-Xi³, CHEN Jing-Ting^{2,4}, WANG Ming-Qiang^{2,5}, XIE Ting-Ting², YANG Juan-Juan^{2,4}, TAO Shuang-Lun¹, ZHANG Feng⁶, LUO Arong^{2*}, ZHU Chao-Dong^{2,4}

(1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan Province, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. National Animal Collection Resource Center, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 4. College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 5. Key Laboratory of Mountain Ecological Restoration and Bioresource Utilization & Ecological Restoration Biodiversity Conservation Key Laboratory of Sichuan

基金项目: 国家自然科学基金(32070465); 国家优秀青年科学基金(32122016); 科技部基础资源调查专项(2018FY100400); 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB31030400); 吉首大学研究生科研创新项目(JGY202168)

作者简介: 马奉, 女, 1991年生, 重庆垫江人, 硕士研究生, 研究方向为动物生态学, E-mail: mafeng@ioz.ac.cn

* 通讯作者 Author for correspondence: 罗阿蓉, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为动物系统学, E-mail: luoar@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2022-12-08; 接受日期 Accepted: 2023-01-02

Province, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 6. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: DNA barcoding has been widely used to study insect diversity. This study explored the utility of DNA barcoding in species identification and delimitation for multiple insect groups sampled from a subtropical forest (located at Xingangshan, Jiangxi Province). We compared their intraspecific genetic distance of the identified molecular operational taxonomic units (MOTUs), based on the universal DNA barcodes (i.e., the 5' end of the mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I gene, COI). Combined with alignment information against public databases, four methods, jMOTU, ABGD, bPTP and GMYC were used for molecular species delimitation to infer the MOTUs, and the intraspecific genetic distances were then calculated. In this study, we totally selected 479 insect samples and obtained 475 COI sequences. We found that their preliminary identifications with NCBI and BOLD online databases were consistent with our preliminary morphological classifications, belonging to six orders. After species delimitation analyses, we finally gained a total of 288 MOTUs; Lepidoptera was the most abundant group (85/288), while there were 80, 74, 21, 20 and 8 MOTUs for Hymenoptera, Diptera, Hemiptera, Coleoptera and Orthoptera, respectively. The mean and standard deviation of intraspecific genetic distances were relatively high in Hymenoptera (0.89%, 0.87%) and Diptera (0.73%, 0.58%), while being the lowest in Lepidoptera (0.28%, 0.20%). Our results showed that although the intraspecific genetic distance of different insect groups was within a certain range, there were still some variations; therefore, species delimitation should not be generalized based on a single distance threshold of genetic distance. Our results additionally indicate that the existing database needs to be supplemented with sufficient insect species information to promote the efficiency of species identification. On the whole, our study enriches the molecular database of insects from a subtropical forest, and also provides basic data and references for further research on insect diversity based on DNA barcoding.

Key words: DNA barcoding; intraspecific genetic distance; species delimitation; insect; subtropical forest

昆虫种类繁多,生物学特性复杂多样,在生态系统中发挥着植食、分解、传粉、寄生、捕食等服务功能,是生物多样性的重要组成部分,在生态系统中占有重要地位(彩万志等,2011; Kunin, 2019; 王明强等,2022)。准确、快速地进行物种鉴定是昆虫生物多样性监测评估等研究的基础(Dayrat, 2005)。在DNA分类学出现以前,昆虫分类学家在发现和描述物种时通常基于形态学特征,不仅耗时、费力,而且需要长时间形态学知识和经验的积累(Hong *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022)。因此,面对大量昆虫物种鉴定需求,形态分类学在描述昆虫物种多样性时往往很难提供高效、及时的支撑(Hebert *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2012)。此外,雌雄二型、变态发育、表型可塑与遗传可变性等问题,还会导致模棱两可甚至相互矛盾的鉴定结果(Knowlton, 1993; Jarman and Elliott, 2000; Hebert *et al.*, 2003)。因此,加强对多类群和大样本量物种界定方法的探

索,提升昆虫分类学效率,在昆虫多样性研究工作中显得非常重要而紧迫。

本世纪初以来,DNA条形码(DNA barcoding)技术为分类学研究提供了新的技术支撑,促使昆虫物种鉴定和多样性监测方法更加经济、高效,极大地提升了对已知物种、研究尚不充分或有待发现类群的物种界定效力(Hebert *et al.*, 2003)。该技术利用标准化的基因片段作为分子标记,基于种内遗传距离小于种间遗传距离的原则,在很多类群中实现物种识别及鉴定(Hebert *et al.*, 2003; Hebert and Gregory, 2005)。选取合适的分子标记是使用DNA条形码开展物种鉴定的关键因素(Waugh, 2007; Luo *et al.*, 2011)。相较于核基因,线粒体基因具有母系遗传、进化速率快、基因重组率发生率低等特点(刘青青和董志军,2018)。其中,线粒体细胞色素C氧化酶亚基I基因(Cytochrome c oxidase subunit I,简称COI)不存在内含子,在保证足够

变异的情况下, 容易被通用引物扩增, 被普遍用作动物各类群的通用条形码区域 (Hebert *et al.*, 2003)。目前, 基于 COI 基因的 DNA 条形码在昆虫物种鉴定、隐存种发现及种间互作关系等研究中已得到广泛应用和验证。例如: Hebert 等 (2004a) 利用 DNA 条形码对哥斯达黎加鳞翅目弄蝶科昆虫 *Astraptes fulgerator* 的研究, 发现了隐存种; Pentinsaari 等 (2014) 对北欧 1 872 个甲虫的 COI 条形码区域进行了测序和有效识别, 加速了甲虫新物种的发现; Wang 等 (2020, 2021) 利用 COI 基因对大量鳞翅目幼虫进行了物种界定, 进一步阐明了植食性昆虫与植物之间的互作关系。此外, 部分学者甚至单独应用 DNA 条形码开展昆虫分类研究 (Meierotto *et al.*, 2019; Sharkey *et al.*, 2021)。

随着基因组测序技术的发展, DNA 宏条形码 (DNA metabarcoding) 作为 DNA 条形码技术的拓展, 已经在一定程度上克服了物种多样性研究中的取样瓶颈, 能解决易获得但形态较难区分的昆虫及土壤、水体等环境样品分析中的问题 (Thomsen and Willerslev, 2015; Deiner *et al.*, 2017; 高养春等, 2020)。不过, 尽管新的技术在测序通量和效率等方面有了大幅提升, DNA 宏条形码在数据产生过程中容易受 PCR 扩增偏差、测序深度等因素的影响; 其后续的数据处理需要较复杂的生物信息学分析; 所获数据在物种注释过程中能鉴定到的物种水平也依赖于物种数据库的建立和完整性 (Yu *et al.*, 2012; 王萌等, 2021)。因此, DNA 宏条形码所恢复的生物多样性信息, 仍然可能与实际情况存在较大偏差。相比之下, DNA 条形码在物种鉴定准确性、高效性等方面依然具有综合优势, 在昆虫物种鉴定和生物多样性研究中仍占据重要地位 (Zahiri *et al.*, 2017; DeSalle and Goldstein, 2019; Wang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021)。

长期以来, 昆虫 DNA 条形码研究工作大多局限于某个具体类群, 因此其对不同昆虫类群物种多样性评估的功效一直存在争议。例如, Meier 等 (2006) 利用 1 333 条 COI 序列, 对 449 种双翅目昆虫进行了分子分类学研究, 获得了较低的物种鉴定成功率 (<70%); 不过, Ashfaq 等 (2018) 在利用 DNA 条形码开展多样性调查中, 则发现双翅目具有较高的物种分辨率 (92%)。又如: Hebert 等 (2003) 曾提出鳞翅目昆虫的物种区分

阈值为 3%; 蜉蝣目、毛翅目的有效阈值却为 2% (Zhou *et al.*, 2010; Webb *et al.*, 2012)。本研究对来自中国江西新岗山的昆虫样品开展 DNA 条形码研究, 比较不同类群所获 MOTU (Molecular operational taxonomic unit) 的种内遗传距离, 期望进一步阐释 DNA 条形码在不同昆虫类群的作用功效。

1 材料与方法

1.1 研究地点和样本

采样地点位于我国江西省新岗山, 其为中国亚热带森林生物多样性与生态系统功能实验样地 (Biodiversity-ecosystem functioning experiment China, 简称 BEF-China) (29°08′~29°11′N、117°90′~117°93′E) (马克平, 2013); 其地处亚热带, 年平均气温 16.7℃, 年均降雨量 1 821 mm, 具典型的季风气候 (Yang *et al.*, 2013; Bruelheide *et al.*, 2014)。

本研究于 2020 年利用马来氏网在 BEF-China 样地中采集昆虫标本, 并保存在无水乙醇中。从所获样品中随机选取 5 瓶样品, 手动分拣其中昆虫个体。鉴于 DNA 提取、易操作性等因素, 本研究仅选取个头较大的个体 (体长 >0.5 cm), 以建立方法流程。随后, 按形态特征将所选样品初步分成不同的类群 (即非严格的“形态种”), 并对每个类群选取 1~3 头用无水乙醇冲洗, 再分别取腿置于离心管中保存于 -20℃ 下用于 DNA 提取。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

首先将样品取出并在室温下晾干残余酒精, 再用液氮速冻后研磨。使用天根生化科技 (北京) 有限公司或凯杰 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 公司提供的血液和组织 DNA 提取试剂盒提取全基因组 DNA, 具体实验步骤参照相应试剂盒说明书操作。所提取的基因组 DNA 于 -20℃ 保存。

本研究所有聚合酶链式反应 (PCR) 均使用 LongGene PCR 仪进行扩增。PCR 总体体系为 30 μL: 15 μL Premix PrimeSTAR HS (TaKaRa), 正反引物 (10 μM) 各 1 μL, ddH₂O 10 μL, DNA 模板 3 μL。针对扩增目标, 即线粒体 COI 基因 5′端长度为 658 bp 区域, 首选通用引物 LCO1490 和 HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), 其具体反应程序见表 1。对于以上程序扩增不成功的, 则采用引物 LCO1490 和 HCOout (Carpenter and Wheeler,

1999), 并结合 PCR 反应程序 VI (PCR VI, 表 1) (Huangfu *et al.*, 2022) 进行扩增。

取 6 μ L PCR 产物用于 1% 琼脂糖凝胶电泳,

观察电泳目标条带是否明亮, 并拍照记录电泳结果。将凝胶电泳检测出目标条带的样品送北京天一辉远生物科技有限公司进行 Sanger 测序。

表 1 PCR 使用引物及反应程序

Table 1 Primers and thermocycling profiles for PCR amplification

分子标记 Molecular markers	引物 Primers	扩增程序 PCR conditions
COI	LCO1490: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198: TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA (Folmer <i>et al.</i> , 1994)	PCR I: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 50 s, 72°C 延伸 8 s, 94°C 30 s, 39 个循环; 最后 72°C 10 min, 停止反应。 PCR II: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 1 min, 45°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 94°C 1 min, 94°C 1 min, 53.2°C 1.5 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 5 min, 停止反应。 PCR III: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 46°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 将退火温度调整至 50°C 再扩增 35 个循环; 72°C 延伸 6 min, 之后降为 12°C, 停止反应 (白茜茜, 2018)。 PCR IV: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 40 s, 45°C 40 s, 72°C 1 min, 5 个循环; 94°C 变性 40 s, 51°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 5 min, 停止反应 (Ashfaq <i>et al.</i> , 2018)。 PCR V: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 1 min, 45°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 5 min, 停止反应 (Hebert <i>et al.</i> , 2003)。
	LCO1490: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG HCOout: CCAGGTAATAAATATAAACTTC (Carpenter and Wheeler, 1999)	PCR II: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 1 min, 45°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 94°C 1 min, 94°C 1 min, 53.2°C 1.5 min, 72°C 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 5 min, 停止反应。 PCR VI: 94°C 预变性 1 min; 94°C 变性 1 min, 45°C 退火 1.5 min, 72°C 延伸 1.5 min, 5 个循环; 94°C 1 min, 94°C 1 min, 58°C 1.5 min, 72°C 1 min, 36 个循环; 72°C 5 min, 停止反应 (Huangfu <i>et al.</i> , 2022)。

1.3 数据分析

1.3.1 序列处理及初步鉴定

记录测序公司返回的序列测序情况, 并采用 BioEdit (Hall, 1999; 2011)、MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 和 MEGA v7 (Kumar *et al.*, 2016) 软件对序列进行处理。首先, 将所有 COI 序列采用 MAFFT 进行比对, 用 MEGA 翻译为氨基酸序列以核阅读框是否中断, 用 BioEdit 软件对序列进行校对、剪切, 并统计序列的碱基位

点情况; 将序列导入到 BOLD system v4 在线系统, 使用 IDENTIFICATION 程序查看物种鉴定结果; 若在 BOLD 中无法获得分类信息, 则采用 NCBI 中的 Blast 程序再次比对查询; 将从 BOLD 和 NCBI 中获得的物种信息进行整合, 并结合挑选样本时的形态分类情况以确定获得的序列即为目的基因片段。

1.3.2 MOTU 界定

上述数据库鉴定可将所有序列清晰确定到目水平 (与形态分类一致), 因此后续分子分类将针

对涉及的昆虫各目分别展开。先将修剪好的序列采用 Mothur (Schloss *et al.*, 2009) 处理成单倍型, 随后采用 jMOTU (Jones *et al.*, 2011)、ABGD (Puillandre *et al.*, 2012)、bPTP (Zhang *et al.*, 2013)、GMYC (Fujisawa and Barraclough, 2013) 4 种方法对 6 个目昆虫序列分别进行物种界定, 划分出 MOTU。

(1) jMOTU 分析。分歧阈值设置为 1~20 bp, 聚集参数为 97%。

(2) ABGD 分析。种内差异先验值 P (prior intraspecific divergence) 最小值为 0.001, 最大值为 0.1, 最小相对 gap 宽度值 X (minimum relative gap width) = 0.5~1, Steps = 5, Nb bins = 20, 基于 K2P 模型 (Kimura, 1980) 计算遗传距离。

(3) bPTP 分析。首先, 采用 IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015) 以最大似然法及默认模型构建有外群的 ML 系统发生树; 随后, 基于 ML 树并设置默认参数 (MCMC 代数为 100 000, Burn-in 值为 0.1, seed 值为 123) 进行物种界定结果分析。

(4) GMYC 分析。基于以上构建的 ML 树采用 r8s 软件构建超度量树 (ultrametric tree), 继而通过 R 软件 “SPLITS” 包 (Monaghan *et al.*, 2009) 中单阈值 (single-threshold) GMYC 模型进行物种界定分析。

基于以上方法分别获得 MOTU 后, 采用 R “clues” 包的 Hubert & Arabie 调整兰德指数 (Hubert and Arabie's adjusted Rand index) (Milligan and Cooper, 1986; Chang *et al.*, 2010) 对 4 种方法的划分结果进行两两比较分析, 评估不同界定结果的稳定性, 并结合所构建的 ML 树情况, 选择一致性最高的分类结果确定为最终的 MOTU 或物种界定结果用于后续分析 (Wang *et al.*, 2019; Li

et al., 2022)。

1.3.3 遗传距离

根据上述确定的 MOTU 结果, 按不同昆虫目将序列导入 MEGA 中, 进行序列碱基含量分析; 并根据物种界定所得 MOTU 划分情况将序列分成不同的 “group”。当某 MOTU 中包含两条或以上序列时, 根据两两平均距离 (p-distance 模型) 计算种内遗传距离。随后, 分别计算 6 个昆虫目的种内平均遗传距离。

2 结果与分析

2.1 序列情况及物种鉴定

本研究共计扩增 479 个昆虫样本, 并成功获得 475 条 COI 序列, 扩增成功率达 99.2%。经与 BOLD 和 NCBI 在线物种数据库比对, 结果显示: 样本序列物种目级信息与形态学初步分类结果一致, 475 条序列分属于 6 个昆虫目 (鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目、半翅目、直翅目); 其中双翅目最多, 152 条 (占 32.4%); 其次为膜翅目和鳞翅目, 均超过 100 条; 鞘翅目、半翅目和直翅目均不到 40 条。物种数据库鉴定到科水平的 COI 序列共计 205 条, 其中数量占优势的双翅目鉴定到科共 70 条 (46.1%), 属于 14 科; 其次为鳞翅目 69 条 (58.5%), 属于 15 科; 膜翅目 46 条 (36.5%), 属于 7 科; 最少为直翅目, 仅 5 条, 属 2 科 (表 2)。

碱基组成计算结果显示: 6 个目昆虫的序列碱基含量均具有明显的 AT 偏向性。其中, 半翅目、鳞翅目、膜翅目和双翅目等 4 个目的 A+T 含量均比 G+C 含量高 2 倍多, 膜翅目 A+T 含量最高, 达 72.6%, 直翅目最少为 64.3% (表 3)。

表 2 不同目昆虫物种鉴定

Table 2 Species identification of different insect orders

目 Order	鉴定到科占 (%) The proportion of identified family	已鉴定到科信息 Identified family	包含序列数 Sequence numbers
鳞翅目 Lepidoptera	58.50	列蛾科 Autostichidae	4
		草螟科 Crambidae	8
		钩蛾科 Drepanidae	1
		裳蛾科 Erebidae	16
		尾夜蛾科 Euteliidae	1
		尺蛾科 Geometridae	7

续表 2 Continued table 2

目 Order	鉴定到科占 (%) The proportion of identified family	已鉴定到科信息 Identified family	包含序列数 Sequence numbers
膜翅目 Hymenoptera	36.50	祝蛾科 Lecithoceridae	7
		刺蛾科 Limacodidae	2
		灰蝶科 Lycaenidae	3
		微蛾科 Nepticulidae	1
		夜蛾科 Noctuidae	8
		蛱蝶科 Nymphalidae	8
		螟蛾科 Pyralidae	1
		蚬蝶科 Riodinidae	1
		卷蛾科 Tortricidae	1
		茧蜂科 Braconidae	6
		青蜂科 Chrysididae	3
		方头泥蜂科 Crabronidae	1
		蚁科 Formicidae	6
		姬蜂科 Ichneumonidae	24
胡蜂科 Vespidae	5		
双翅目 Diptera	46.10	丽蝇科 Calliphoridae	5
		摇蚊科 Chironomidae	3
		蚊科 Culicidae	2
		长足虻科 Dolichopodidae	1
		果蝇科 Drosophilidae	4
		厕蝇科 Fanniidae	1
		扁角菌蚊科 Keroplatidae	6
		蝇科 Muscidae	7
		菌蚊科 Mycetophilidae	3
		蚤蝇科 Phoridae	1
		头蝇科 Pipunculidae	8
		眼蕈蚊科 Sciaridae	23
		水虻科 Stratiomyidae	2
		寄蝇科 Tachinidae	5
半翅目 Hemiptera	13.33	蜡蝉科 Fulgoridae	1
		蝽科 Pentatomidae	1
		叶蝉科 Cicadellidae	2
鞘翅目 Coleoptera	34.38	象甲科 Curculionidae	5
		隐翅虫科 Staphylinidae	1
		瓢虫科 Coccinellidae	3
		伪瓢虫科 Endomychidae	1
		步甲科 Carabidae	1
直翅目 Orthoptera	45.45	螞蟥科 Tettigoniidae	4
		蟋蟀科 Gryllidae	1

表 3 不同目昆虫 COI 序列碱基组成信息

Table 3 Nucleotide composition in the COI barcoding sequences of different insect orders

目 Order	碱基 A 百分比 (%) Percentage of base A	碱基 T 百分比 (%) Percentage of base T	碱基 C 百分比 (%) Percentage of base C	碱基 G 百分比 (%) Percentage of base G	碱基 A + T 百分比 (%) Percentage of bases A and T	碱基 C + G 百分比 (%) Percentage of bases C and G
半翅目 Hemiptera	31.0	36.5	18.6	14.0	67.4	32.6
鳞翅目 Lepidoptera	30.5	38.9	16.2	14.4	69.3	30.7
膜翅目 Hymenoptera	32.5	40.1	14.9	12.5	72.6	27.4
鞘翅目 Coleoptera	28.7	35.7	19.6	16.0	64.4	35.6
双翅目 Diptera	29.7	38.1	16.8	15.3	67.9	32.1
直翅目 Orthoptera	29.1	35.2	20.2	15.5	64.3	35.7

2.2 物种界定

所获序列经比对修剪后 433 条序列 (占 90.4%) 用于物种界定分析。各昆虫目序列数从高到低依次为双翅目、鳞翅目、膜翅目、鞘翅目、半翅目和直翅目。采用 jMOTU、ABGD、bPTP 和 GMYC 这 4 种方法进行界定共得到 288 个 MOTU, 其中鳞翅目获得的 MOTU 最多, 半翅目、鞘翅目和膜翅目获得 MOTU 均超过样本量的 60%, 双翅目和直翅目的 MOTU 不到样本量的 50% (表 4)。

具体而言, 鞘翅目昆虫用 4 种方法界定的结果完全一致。鳞翅目昆虫除用 GMYC 方法界定结果少一个 MOTU 外, 其余 3 种方法界定结果完全一致。半翅目昆虫的 jMOTU 和 GMYC 方法界定结果完全一致, 而 ABGD 和 bPTP 方法存在两处差异, 涉及 5 条序列。bPTP 和 GMYC 对直翅目昆虫的界定结果完全一致, 但 ABGD 和 jMOTU 方法存在两处差异, 涉及 5 条序列。4 种方法对双翅目昆虫的结果均不一致, 存在 6 处差异, 涉及 28 条序列。GMYC 外的另外 3 种界定方法对膜翅目昆虫界定结果均不一致, 存在 7 处差异, 涉及 16 条序列 (图 1)。根据 R “clues” 包 Hubert & Ararie 调整兰

德指数对不同方法界定结果的稳定性评估情况, 选取一致性最高的为最终结果。因此, 鞘翅目昆虫基于 4 种方法划分为 20 个 MOTUs; 鳞翅目昆虫基于 ABGD、jMOTU、bPTP 方法划分为 85 个 MOTUs; 半翅目昆虫基于 jMOTU 和 GMYC 方法划分为 21 个 MOTUs; 直翅目昆虫基于 bPTP 和 GMYC 方法划分为 8 个 MOTUs; 双翅目昆虫基于 GMYC 的界定结果, 划分为 74 个 MOTUs; 膜翅目昆虫基于 jMOTU 方法的界定结果划分为 80 个 MOTUs。

2.3 遗传距离

基于物种界定所得 MOTU 计算种内遗传距离显示, 不同昆虫类群的种内遗传距离最小值差异很小, 鳞翅目、膜翅目、鞘翅目、双翅目均为 0.17%; 但最大值差异较大, 从 0.51% 至 2.69% (图 2, 表 4)。不同昆虫类群的种内遗传距离中, 膜翅目种内遗传距离均值及标准偏差最大 ($0.89\% \pm 0.87\%$, mean \pm SD), 其次为双翅目 ($0.73\% \pm 0.58\%$)、半翅目 ($0.71\% \pm 0.31\%$) 和鞘翅目 ($0.60\% \pm 0.47\%$), 鳞翅目的最小 ($0.28\% \pm 0.20\%$) (图 2)。

表 4 各目昆虫物种界定及种内遗传距离统计情况
Table 4 Species delimitation and intraspecific genetic distance of different insect orders

目 Order	样本量 Samples	序列数 Sequence number	物种界定 Species delimitation				MOTU/ 样本量 (%) MOTU/ Samples	种内遗传 距离 (%) Intraspecific genetic distance	平均种内遗传 距离 (%) Mean intraspecific genetic distance
			GMYC	ABGD	jMOTU	bPTP			
半翅目 Hemiptera	31	30	21	19	21	20	67.7	0.18 ~ 1.47	0.37 ~ 1.10
鳞翅目 Lepidoptera	118	118	84	85	85	85	72.0	0.17 ~ 0.51	0.17 ~ 0.68
膜翅目 Hymenoptera	126	103	-	73	80	81	63.5	0.17 ~ 2.69	0.17 ~ 2.69
鞘翅目 Coleoptera	32	32	20	20	20	20	62.5	0.17 ~ 1.66	0.17 ~ 1.33
双翅目 Diptera	155	139	74	71	78	78	47.7	0.17 ~ 2.24	0.17 ~ 2.91
直翅目 Orthoptera	17	11	8	6	9	8	47.1	1.26	-
总计 Total	479	433	207	274	293	292	60.1	-	-

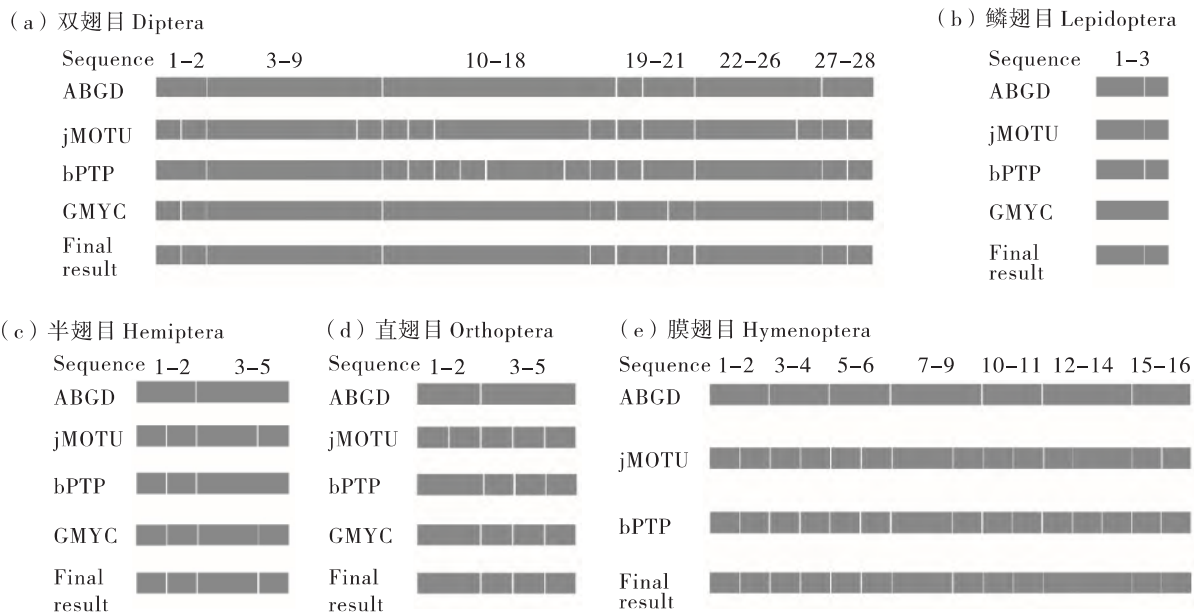


图 1 不同物种界定方法对不同目昆虫的物种界定结果

Fig. 1 Species delimitation results from different methods for different insect orders

注: 图中仅显示 4 种方法划分 MOTU 有差异的部分序列情况。Note: Figure only shows partial sequences for which species delimitations from the four methods differed.

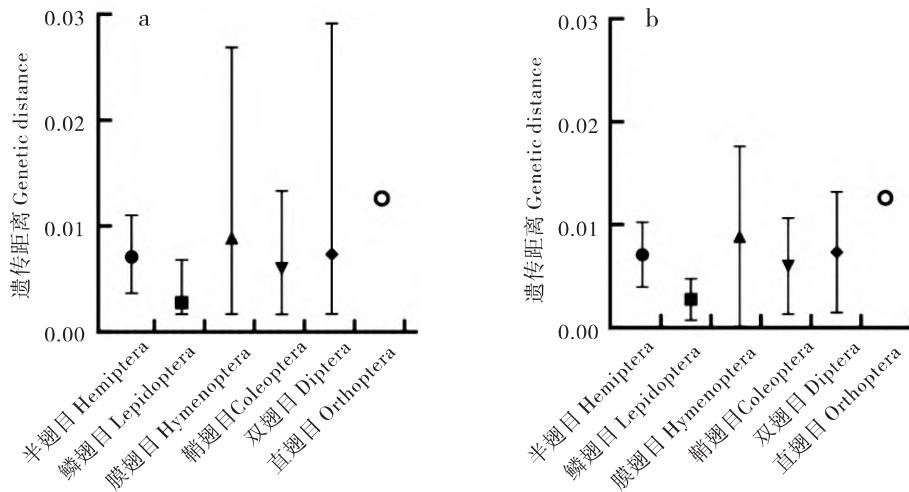


图2 不同目昆虫种内遗传距离的平均值、最大值和最小值 (a)、平均值 \pm 标准差 (b)

Fig. 2 Average, maximum and minimum value (a) and mean \pm SD (b) of the intraspecific genetic distance of different insect orders

3 结论与讨论

DNA 条形码通常被认为是一种经济、简便、可靠的分子鉴定工具, 在后生动物类群中具有广泛的适用性 (Hebert *et al.*, 2004a; Hebert and Gregory, 2005; Virgilio *et al.*, 2010)。本研究对测得的 COI 条形码序列与在线物种库进行了比对鉴定, 并基于划分的 MOTU 进行种内遗传距离分析。结果表明: 不同的昆虫类群的种内遗传距离, 虽然整体在一定范围内 (如小于 3%), 但呈现一定程度的差异。因此, 虽然曾有研究提出 10 倍法则或 3% 的遗传距离阈值作为物种水平差异诊断的标准 (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004b; Waugh, 2007), 但是昆虫分子分类不能简单地依赖于某具体距离阈值。本研究计算了 6 个昆虫目的种内遗传距离, 发现种内遗传距离最小值小于 1%, 而且鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目昆虫的种内遗传距离范围具有相似性; 双翅目、膜翅目昆虫的种内遗传距离和种内平均遗传距离最大值范围均大于 2%。这些均与 Hebert 等 (2003) 所认为的种内遗传距离多小于 1% 的说法不完全一致。此外, Zhang & Bu (2022) 对 BOLD 数据库中 64 414 种昆虫进行遗传距离分析发现: 大约四分之一的昆虫物种存在较高的遗传变异 (>3%)。然而, 新近的研究中, Sharkey 等 (2021) 依然使用 2% 的遗传距离阈值开展膜翅目昆虫物种划分。显然, 在对昆虫进行分子分类研究中针对不同昆

虫类群的划分方案还存在争议。本研究也再次证明不同的昆虫类群遗传距离存在差异性, 使用特定遗传距离阈值进行物种划分时需要慎重考虑。

其实, DNA 条形码用于昆虫物种鉴定在实验环节还受到取样、DNA 提取、PCR 扩增和测序等因素的影响。其中, 非常关键的环节是使用引物扩增目的基因片段。本研究以昆虫线粒体 COI 条形码扩增的常用引物 LCO1490 + HCO2198 为主, 以 LCO1490 + HCOout 作为补充进行扩增, 总体获得了较高的成功率, 达 99.2%。不同目昆虫表现出一定差异: 鳞翅目、鞘翅目、双翅目扩增成功率都达 100%, 而半翅目的扩增成功率只有 96.8%。值得一提的是, 对于双翅目昆虫使用引物 LCO1490 + HCOout 将扩增成功率从 61% 提高到了 98%。

同时, 尽管 BOLD 和 NCBI 数据库都包含有大量的 COI 数据, 但本研究获得的 6 个昆虫目 400 余条 COI 序列与在线物种数据库进行比对鉴定时, 能注释到科及属、种水平的尚不足 50%。Virgilio 等 (2010) 对 DNA 条形码在鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目、直翅目、半翅目这 6 个目昆虫中的性能比较研究中, 也证实了在缺少数据库资料作参考的情况下, 会影响 DNA 条形码的物种鉴定效率。Chesters & Zhu (2014) 发现现有的物种数据库仍然有较大的物种信息缺口, 需要不断完善。因此, 昆虫多样性研究需要分类学者提供足够的物种信息, 才能在测序技术和分析效率等方面有大幅提升的同时, 为更加高效地利用分子物种鉴定方法 (如: DNA 宏条形码) 提供基础。

本研究对亚热带森林中数量居多的鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目、半翅目、直翅目这 6 大目昆虫进行了 DNA 条形码研究,在目内科、属、种等多个水平探讨了 DNA 对不同昆虫类群的检测和界定效率,可以丰富本地昆虫分子数据库,为森林虫害防治提供基础数据;同时也为进一步探索基于 DNA 条形码的分子分类学研究提供参考。但本研究仍然存在一定的采样局限性(有的目样本只有 30 余个),不同物种的个体数量也分布不均,然而不影响 DNA 条形码在昆虫多样性研究工作中的物种鉴定有效性。后续的研究有必要扩大采样量,并进行更深入的探讨;同时应当在形态分类学的基础上加大对 DNA 条形码的研究,不断丰富 DNA 条形码数据库,从而可以为利用更加高效的分子分类方法开展多样性调查提供基础。

参考文献 (References)

- Ashfaq M, Sabir JSM, El-Ansary HO, *et al.* Insect diversity in the Saharo-Arabian region: Revealing a little-studied fauna by DNA barcoding [J]. *PLoS ONE*, 2018, 13 (7): e0199965.
- Bai QQ. Species Delimitation of the Predatory Insects around Beijing and Tianjin with DNA barcoding [D]. Baoding: Hebei University Master Thesis, 2018. [白茜茜. DNA 条形码在环京津捕食性天敌昆虫物种界定中的应用 [D]. 保定: 河北大学硕士论文, 2018]
- Bruelheide H, Nadrowski K, Assmann T, *et al.* Designing forest biodiversity experiments: General considerations illustrated by a new large experiment in subtropical China [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2014, 5: 74–89.
- Cai WZ, Pang XF, Hua BZ, *et al.* General Entomology (2nd Ed.) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011. [彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 等. 普通昆虫学 (第二版) [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011]
- Carpenter JM, Wheeler WC. Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in Hymenoptera [J]. *Zoologica Scripta*, 1999, 28 (1–2): 251–260.
- Chang F, Qiu WJ, Zamar RH, *et al.* Clues: An R package for nonparametric clustering based on local shrinking [J]. *Journal of Statistical Software*, 2010, 33: 1–16.
- Chesters D, Zhu CD. A protocol for species delineation of public DNA databases, applied to the insecta [J]. *Systematic Biology*, 2014, 63 (5): 712–725.
- Dayrat B. Towards integrative taxonomy [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2005, 85 (3): 407–415.
- Deiner K, Bik HM, Machler E, *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities [J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26 (21): 5872–5895.
- DeSalle R, Goldstein P. Review and interpretation of trends in DNA barcoding [J]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2019, 7: 302.
- Folmer O, Blacket M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3 (5): 294–299.
- Fujisawa T, Barraclough TG. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets [J]. *Systematic Biology*, 2013, 62 (5): 707–724.
- Gao YC, Li HT, Wang XC, *et al.* Research on zooplankton diversity using DNA-based metabarcoding technique: A case study in the Talvjian Estuary [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40 (11): 3822–3832. [高养春, 李海涛, 王孝程, 等. 利用宏 DNA 条形码研究浮游动物多样性—以鸭绿江口为例 [J]. 生态学报, 2020, 40 (11): 3822–3832]
- Hall T. Bioedit: An important software for molecular biology [J]. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2011, 2: 60–61.
- Hall TA. Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41 (41): 95–98.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of The Royal Society: Biological Sciences*, 2003, 270 (1512): 313–321.
- Hebert PD, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy [J]. *Systematic Biology*, 2005, 54 (5): 852–859.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004a, 101 (41): 14812–14817.
- Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biology*, 2004b, 2 (10): e312.
- Hong DY, Zhuang WY, Zhu M, *et al.* Positioning taxonomic research for the future [J]. *Zoological Systematics*, 2022, 47 (3): 185–187.
- Huangfu N, Cao HX, Zhu CD. Notes on the genus *Aceratoneuromyia girault* (Hymenoptera: Eulophidae) [J]. *Insects*, 2022, 13 (5): 1–21.
- Jarman SN, Elliott NG. DNA evidence for morphological and cryptic cenozoic speciations in the anaspididae, ‘living fossils’ from the triassic [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2000, 13: 624–633.
- Jones M, Ghoorah A, Blaxter M. Jmotu and taxonator: Turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6: e19259.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111–120.
- Knowlton N. Sibling species in the sea [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1993, 24: 189–216.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. Mega 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33 (7): 1870–1874.

- Kunin WE. Robust evidence of declines in insect abundance and biodiversity [J]. *Nature*, 2019, 574 (7780): 641–642.
- Li Y, Du YB, Chen JT, et al. Tree dissimilarity determines multi-dimensional beta-diversity of herbivores and carnivores via bottom-up effects [J]. *Journal of Animal Ecology*, 2022: 1–12.
- Liu QQ, Dong ZJ. Population genetic structure of gonionemus vertens based on the mitochondrial COI sequence [J]. *Biodiversity Science*, 2018, 26 (11): 1204–1211. [刘青青, 董志军. 基于线粒体 COI 基因分析钩手水母的群体遗传结构 [J]. 生物多样性, 2018, 26 (11): 1204–1211]
- Luo AR, Zhang AB, Ho SY, et al. Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: A case study using eutherian mammals [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 84.
- Ma KP. Studies on biodiversity and ecosystem function via manipulation experiments [J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21 (3): 247–248. [马克平. 生物多样性与生态系统功能的实验研究 [J]. 生物多样性, 2013, 21 (3): 247–248]
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, et al. DNA barcoding and taxonomy in diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success [J]. *Systematic Biology*, 2006, 55 (5): 715–728.
- Meierotto S, Sharkey MJ, Janzen DH, et al. A revolutionary protocol to describe understudied hyperdiverse taxa and overcome the taxonomic impediment [J]. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, 2019, 66: 119–145.
- Milligan GW, Cooper MC. A study of the comparability of external criteria for hierarchical cluster analysis [J]. *Multivariate Behavioral Research*, 1986, 21: 441–458.
- Monaghan MT, Wild R, Elliot M, et al. Accelerated species inventory on madagascar using coalescent-based models of species delineation [J]. *Systematic Biology*, 2009, 58 (3): 298–311.
- Nguyen LT, Schmidt HA, Haeseler AV, et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32: 268–274.
- Pentinsaari M, Hebert PD, Mutanen M. Barcoding beetles: A regional survey of 1872 species reveals high identification success and unusually deep interspecific divergences [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (9): e108651.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21 (8): 1864–1877.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (23): 7537–7541.
- Sharkey MJ, Janzen DH, Hallwachs W, et al. Minimalist revision and description of 403 new species in 11 subfamilies of costa rican braconid parasitoid wasps, including host records for 219 species [J]. *Zookeys*, 2021, 1013: 1–665.
- Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity [J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4–18.
- Virgilio M, Backeljau T, Nevado B, et al. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 206.
- Wang M, Jin XW, Lin XL, et al. Advances in the macrozoobenthos biodiversity monitoring and ecosystem assessment using environmental DNA metabarcoding [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41 (18): 7440–7453. [王萌, 金小伟, 林晓龙, 等. 基于环境 DNA – 宏条形码技术的底栖动物监测及水质评价研究进展 [J]. 生态学报, 2021, 41 (18): 7440–7453]
- Wang MQ, Luo AR, Zhou QS, et al. Research progress on insect diversity [J]. *Biodiversity Science*, 2022, 30 (10): 1–29. [王明强, 罗阿蓉, 周青松, 等. 昆虫多样性 30 年研究进展 [J]. 生物多样性, 2022, 30 (10): 1–29]
- Wang MQ, Li Y, Chesters D, et al. Multiple components of plant diversity loss determine herbivore phylogenetic diversity in a subtropical forest experiment [J]. *Journal of Ecology*, 2019, 107 (6): 2697–2712.
- Wang MQ, Li Y, Chesters D, et al. Host functional and phylogenetic composition rather than host diversity structure plant-herbivore networks [J]. *Molecular Ecology*, 2020, 29 (14): 2747–2762.
- Wang MQ, Yan C, Luo AR, et al. Phylogenetic relatedness, functional traits, and spatial scale determine herbivore co-occurrence in a subtropical forest [J]. *Ecological Monographs*, 2021, 92: e01492.
- Waugh J. DNA barcoding in animal species: Progress, potential and pitfalls [J]. *Bioessays*, 2007, 29: 188–197.
- Webb JM, Jacobus LM, Funk DH, et al. A DNA barcode library for North American Ephemeroptera: Progress and prospects [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (5): e38063.
- Yang XF, Bauhus J, Both S, et al. Establishment success in a forest biodiversity and ecosystem functioning experiment in subtropical china (BEF-China) [J]. *European Journal of Forest Research*, 2013, 132: 593–606.
- Yu DW, Ji YQ, Emerson BC, et al. Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2012, 3: 613–623.
- Zahiri R, Lafontaine JD, Schmidt BC, et al. Probing planetary biodiversity with DNA barcodes: The noctuoidea of North America [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12 (6): e0178548.
- Zhang HG, Bu WJ. Exploring large-scale patterns of genetic variation in the COI gene among insects: Implications for DNA barcoding and threshold-based species delimitation studies [J]. *Insects*, 2022, 13 (5): 425.
- Zhang JJ, Kapli P, Pavlidis P, et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29 (22): 2869–2876.
- Zhou X, Jacobus LM, DeWalt RE, et al. Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera fauna of Churchill (Manitoba, Canada): Insights into biodiversity patterns from DNA barcoding [J]. *Journal of the North American Benthological Society*, 2010, 29 (3): 814–837.
- Zhu CD, Luo AR, Bai M, et al. A joint call for actions to advance taxonomy in China [J]. *Zoological Systematics*, 2022, 47 (3): 188–197.