•研究报告•

白洋淀湿地蝗虫多样性调查及DNA条形码应用研究

郝金凤 张晓红 王昱淞 刘金林 智永超 李新江*

(河北大学生命科学学院河北省动物系统学与应用重点实验室, 河北保定 071002)

摘要: 为了解白洋淀湿地蝗虫的物种多样性及其分布情况, 探究DNA条形码技术在物种鉴定方面的可行性, 本研究对白洋淀湿地的蝗虫进行了采集调查。采用自行设计的*cox1*基因引物, 本研究共扩增得到21种蝗虫的*cox1*序列97条, 并利用构建NJ系统发育树法、计算遗传距离的ABGD法以及序列差异阈值分类的MOTU法对已得到的序列连同GenBank下载的10种25条*cox1*序列进行了比较分析。结果表明: 白洋淀湿地蝗总科昆虫共有6科23属34种, 包括1个新记录属, 即异爪蝗属(*Euchorthippus*), 和3个新记录种, 即素色异爪蝗(*E. unicolor*)、柳枝负蝗(*Atractomorpha psittacina*)和日本稻蝗(*Oxya japonica*); 蝗虫在白洋淀湿地主要分布在农田及其周围、堤坝及其周围以及淀边草丛; DNA条形码技术能够在种级阶元对蝗总科物种进行良好地解析, 但物种鉴定时, 不能完全脱离形态学方法。

关键词: 直翅目; 蝗总科; 白洋淀湿地; 多样性; DNA条形码

Diversity investigation and application of DNA barcoding of Acridoidea from Baiyangdian Wetland

Jinfeng Hao, Xiaohong Zhang, Yusong Wang, Jinlin Liu, Yongchao Zhi, Xinjiang Li*

The Key Laboratory of Zoological Systematics and Application, College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Hebei 071002

Abstract: Both the species diversity and distribution pattern of the superfamily Acridoidea of the suborder Caelifera have important contributions to understanding the local biodiversity of the Baiyangdian Wetland. This research tries to study the species diversity and distribution pattern of the superfamily Acridoidea within the Baiyangdian Wetland and test the feasibility of DNA barcoding in species identification for this superfamily. Sequences of the *cox1* gene were obtained from 97 individuals of 21 species of the superfamily Acridoidea. Phylogenetic, genetic distance and sequence difference threshold analyses using the Neighbor Joining (NJ), Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) and Molecular Defined Operational Taxonomic Units (MOTU) methods, respectively, were performed for these and the 25 additional sequences of 10 species downloaded from GenBank. The results indicate that there are 34 species, 23 genera, and 6 families of the superfamily Acridoidea insects around the farmland, dam, and grassland of the Baiyangdian Wetland, including a new-record genus, *Euchorthippus*, and three new-record species, *Euchorthippus unicolor*, *Atractomorpha psittacina* and *Oxya japonica*. The DNA barcoding technology therefore is very efficient and helpful for identifying the species of the superfamily Acridoidea, although the morphological approach is still playing a key role in the species identifications.

Key words: Orthoptera; Acridoidea; Baiyangdian Wetland; diversity; DNA barcoding

白洋淀位于冀中平原北部, 在北京、天津、石家庄之间, 是华北平原最大、最典型的淡水湖泊湿

地, 有“北国江南”、“华北明珠”之誉。独特的资源与区位优势使白洋淀在缓洪滞沥、调节气候、保护

收稿日期: 2016-11-22; 接受日期: 2017-04-10

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2014017)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: hbulxj@163.com

生物多样性、维护华北地区生态平衡等方面具有不可替代的作用,被誉为“华北之肾”。近年来,由于自然因素和人类活动的影响,白洋淀湿地生态系统遭到严重破坏,水域面积日趋减少,雾霾现象十分严重,水生植物大面积死亡,造成鱼类的锐减以及其他野生动物数量的降低。

蝗虫隶属于直翅目蝗亚目蝗总科。根据印象初和夏凯龄建立的中国蝗虫分类系统(夏凯龄, 1994; 郑哲民和夏凯龄, 1998; 印象初和夏凯龄, 2003; 李鸿昌和夏凯龄, 2006), 任春光(2009)总结白洋淀湿地有蝗虫31种, 隶属于6科22属, 依据蝗虫种群、密度及分布范围, 确定东亚飞蝗(*Locusta migratoria manilensis*)、黄胫小车蝗(*Oedaleus infernalis infernalis*)、中华稻蝗(*Oxya chinensis*)、短星翅蝗(*Calliptamus abbreviatus*)、大垫尖翅蝗(*Epacromius coeruleipes*)、花胫绿纹蝗(*Aiolopus tamulus*)、长翅素木蝗(*Shirakiacris shirakii*)、中华剑角蝗(*Acrida cinerea*)、短额负蝗(*Atractomorpha sinensis*)等9种为优势种。作为具有巨大经济价值的一个类群, 蝗虫不仅是白洋淀湿地栖息的众多鸟类的主要食物之一, 还对维护白洋淀湿地生物多样性及生态平衡调节起着至关重要的作用。因此, 对白洋淀湿地的蝗虫进行系统地研究, 摸清物种多样性家底可以为白洋淀湿地生态修复、昆虫资源化开发利用提供理论依据, 为当地绿色农业的发展提供科技支撑。

DNA条形码(DNA barcoding)的概念1993年首次被提出, 它是指利用一段保守的目标DNA分子片段作为媒介来快速、准确地进行物种鉴定与分类, 但在当时并没有引起大家的关注(Arnot et al, 1993)。Hebert等(2003)根据对动物界11门1.3万多个物种的线粒体细胞色素C氧化酶亚基I (*cox1*)的基因序列分析的研究, 提出了利用1个或少数几个DNA片段对地球上现有物种进行识别和鉴定的DNA条形码技术。近年来DNA条形码技术在动物分类鉴定方面发展迅速, 应用越来越广, 特别是对于昆虫, 由于其具有体型小、数量多、变异多、物种多、有些物种单从形态上不易区分的特点。如Derocles等(2015)用DNA条形码和mini条形码分子的方法来描述很难观察到的植物-斑潜蝇-寄生蜂的相互作用, 发现*cox1*片段具有重要的作用。Oba等(2015)通过对鞘翅目叩甲科昆虫的研究发现DNA条形码技术能够快速可靠地对日本叩甲科昆虫进行

物种鉴定。Kolesik和Butterill (2014)对巴布亚新几内亚双翅目瘿蚊科的研究表明, 瘿蚊科成虫和幼虫阶段的*cox1*基因的DNA序列在每个物种中存在着不同。

迄今, 针对蝗虫DNA条形码的研究也有所开展, 如潘程莹等(2006)研究了7种斑腿蝗线粒体*cox1*基因的DNA条形码, 结果表明, 斑腿蝗科3属7种的DNA条形码分类和形态学分类基本一致, 该基因可以探讨蝗虫属、种分类阶元的系统发育问题。Huang等(2013)以8种蝗虫为研究对象, 采用K2P距离分析种内变异和种间分歧的重叠范围, 利用BM (best match)、BCM (best close match)、ASB (all species barcodes)、BP-based method (back-propagation neural networks)来检测物种鉴定的准确率, 以及用系统发育树和网络结构分析进行物种分类。Allegrucci等(2014)通过对意大利最西端直翅目Dolichopoda属的研究, 提出了一种新的分类体系。赵玲等(2015)研究表明DNA条形码技术用于鉴定新疆的蝗蝻具有可行性, 同时对样本进行了系统发育分析。

本研究立足于白洋淀湿地蝗虫的多样性调查研究, 结合形态分类和DNA条形码技术对其分布种类进行鉴定, 力求对白洋淀湿地蝗虫进行深度摸底, 并构建白洋淀湿地蝗虫的DNA条形码基因库, 希望可以为白洋淀湿地的生物多样性保护和生态平衡维护助力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究用于分类鉴定的标本信息见表1。依据白洋淀湿地蝗虫名录, 对采自于白洋淀湿地的蝗虫标本利用分子生物学技术获取DNA条形码数据; 对本研究未能采集到标本的白洋淀湿地蝗虫种类, 选取实验室保存的标本或GenBank下载获得相应的DNA条形码数据, 详见附录1。

1.2 标本采集及形态鉴定

根据现有资料和白洋淀湿地生态特点, 按照生态类型进行样地设计, 如选取农田及其周围、堤坝及其周围和淀边草丛等3种生态类型, 每种生态类型选取3–6个样地, 于2011年8月、2014年9月、2015年8–9月共3次对各样地进行了系统采集, 具体采集地点及分布见图1。在每个样地采用网捕法采集蝗虫标本, 详细记录采集地的环境、经纬度和植被情

表1 白洋淀湿地蝗总科昆虫名录及标本采集信息

Table 1 Species checklist of Acridoidea from Baiyangdian Wetland with the specimen information

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	采集地点 Collection location	采集时间 Collection time
癩蝗科 Pamphagidae	笨蝗属 <i>Haplotropis</i>	笨蝗 <i>Haplotropis brunneriana</i> ▲		
锥头蝗科 Pyrgomorphidae	负蝗属 <i>Atractomorpha</i>	短额负蝗 <i>Atractomorpha sinensis</i>	寨里 Zhaili	2011.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
			大树刘庄 Dashuliuzhuang	2015.9
		柳枝负蝗 <i>Atractomorpha psittacina</i> ★	宋庄 Songzhuang	2015.8
			杨庄子 Yangzhuangzi	2011.8
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
		令箭负蝗 <i>Atractomorpha sagittaris</i>	南曲堤 Nanqudi	2011.8
			大树刘庄 Dashuliuzhuang	2015.9
			端村 Duancun	2014.9
		长额负蝗 <i>Atractomorpha lata</i>	圈头 Quantou	2011.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			杨庄子 Yangzhuangzi	2011.8
			宋庄 Songzhuang	2015.8
斑腿蝗科 Catantopidae	稻蝗属 <i>Oxya</i>	日本稻蝗 <i>Oxya japonica</i> ★	寨里 Zhaili	2011.8
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
			端村 Duancun	2014.9
		中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i>	圈头 Quantou	2011.8
			南曲堤 Nanqudi	2011.8
			大树刘庄 Dashuliuzhuang	2015.9
	蔗蝗属 <i>Hieroglyphus</i>	斑角蔗蝗 <i>Hieroglyphus annulicornis</i> ▲		
	棉蝗属 <i>Chondracris</i>	棉蝗 <i>Chondracris rosea rosea</i> ▲		
	黄脊蝗属 <i>Patanga</i>	日本黄脊蝗 <i>Patanga japonica</i> ▲		
	星翅蝗属 <i>Calliptamus</i>	短星翅蝗 <i>Calliptamus abbreviatus</i>	杨庄子 Yangzhuangzi	2011.8
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
	素木蝗属 <i>Shirakiacris</i>	长翅素木蝗 <i>Shirakiacris shirakii</i>	南曲堤 Nanqudi	2011.8
			大树刘庄 Dashuliuzhuang	2015.9
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
斑翅蝗科 Oedipodidae	飞蝗属 <i>Locusta</i>	东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria manilensis</i>	崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
			宋庄 Songzhuang	2015.8
	车蝗属 <i>Gastrimargus</i>	云斑车蝗 <i>Gastrimargus marmoratus</i> ▲		
	尖翅蝗属 <i>Epacromius</i>	大垫尖翅蝗 <i>Epacromius coerulipes</i>	端村 Duancun	2014.9
			赵北口 Zhaobeikou	2011.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
	小车蝗属 <i>Oedaleus</i>	黄胫小车蝗 <i>Oedaleus infernalis infernalis</i>	大王镇 Dawangzhen	2015.8
			端村 Duancun	2014.9
			南曲堤 Nanqudi	2011.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
		亚洲小车蝗 <i>Oedaleus asiaticus</i>	杨庄子 Yangzhuangzi	2011.8
			南曲堤 Nanqudi	2011.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
			端村 Duancun	2014.9
	赤翅蝗属 <i>Celes</i>	大赤翅蝗 <i>Celes skalozubovi akitanus</i> ▲		
	疣蝗属 <i>Trilophidia</i>	疣蝗 <i>Trilophidia annulata</i>	崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
			杨庄子 Yangzhuangzi	2011.8
	绿纹蝗属 <i>Aiolopus</i>	花胫绿纹蝗 <i>Aiolopus tamulus</i>	崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
			赵北口 Zhaobeikou	2014.9
			杨庄子 Yangzhuangzi	2011.8
	异痂蝗属 <i>Bryodemella</i>	轮纹异痂蝗 <i>Bryodemella tuberculatum dilutum</i> ▲		

表1(续) Table 1 (continued)

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	采集地点 Collection location	采集时间 Collection time
网翅蝗科 Arcypteridae	曲背蝗属 <i>Pararcyptera</i>	宽翅曲背蝗 <i>Pararcyptera microptera meridionalis</i> ▲		
		隆额网翅蝗 <i>Arcyptera coreana</i> ▲		
	网翅蝗属 <i>Arcyptera</i>	黑翅雏蝗 <i>Chorthippus aethalinus</i> ▲		
		小翅雏蝗 <i>Chorthippus fallax</i> ▲		
	雏蝗属 <i>Chorthippus</i>	北方雏蝗 <i>Chorthippus hammarstroemi</i> ▲		
		狭翅雏蝗 <i>Chorthippus dubius</i> ▲		
		白纹雏蝗 <i>Chorthippus albonemus</i> ▲		
		华北雏蝗 <i>Chorthippus brunneus huabeiensis</i> ▲		
		东方雏蝗 <i>Chorthippus intermedius</i> ▲		
		异爪蝗属 <i>Euchorthippus</i> ★		
		素色异爪蝗 <i>Euchorthippus unicolor</i> ★	寨里 Zhaili	2011.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
剑角蝗科 Acrididae	鸣蝗属 <i>Mongolotettix</i>	条纹鸣蝗 <i>Mongolotettix japonicus vittatus</i> ▲		
		中华剑角蝗 <i>Acrida cinerea</i>		
	剑角蝗属 <i>Acrida</i>		南曲堤 Nanqudi	2011.8
			大树刘庄 Dashuliuzhuang	2015.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
			崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			寨里 Zhaili	2011.8
	夏蝗属 <i>Gonista</i>	二色夏蝗 <i>Gonista bicolor</i>	崔公堤 Cuigongdi	2014.9
			大王镇 Dawangzhen	2015.8
			寨里 Zhaili	2011.8

★表示白洋淀湿地新记录属种, ▲表示文献记录但本研究未采集到的种类。★ indicates the new record genus and new record species from Baiyangdian Wetland; ▲ indicates the species which was not collected in this study.

图1 白洋淀湿地蝗虫采集点分布图
Fig. 1 The collecting localities of grasshoppers from Baiyangdian Wetland

况,统计蝗虫数量并制作成干制标本和酒精浸泡标本。对获得的标本,根据已出版的《中国动物志》蝗虫类部分及相关分类文献(任春光,2009)进行镜检分类鉴定。

1.3 DNA提取、PCR扩增及测序

取样本后足肌肉组织,参照Tamura和Aotsuka (1988)的方法将线粒体进行分离,根据高盐提取法(Aljanabi & Martinez, 1997)、Ma等改进方法(Ma et al, 2009),并综合本实验室多年来的经验提取mtDNA,然后置于-20℃冰箱保存备用。

使用DNA条形码引物:上游引物5'-TTCAA-CAAAYCATAARGAATTGG-3';下游引物5'-TAA-CTTTGGRTCCAAARAATC-3'扩增线粒体*cox1*基因657 bp的目的片段,用40 μL的PCR体系:10 × Buffer (with MgCl₂) 4 μL, dNTP Mixture (2.5 mM) 2.6 μL, 引物上游和下游各2 μL (10 μmol/L), 模板DNA 4 μL, ddH₂O 25 μL, *Taq* DNA polymerase (5 U/μL) 0.4 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;30个循环包括94℃变性30 s, 50℃复性30 s, 72℃延伸30 s;最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用凝胶成像系统拍照。所有样品的测序工作由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

1.4 数据分析

1.4.1 构建系统发育树

使用Chromas软件观察序列峰图质量,对每个碱基逐一进行人工校对。如果峰图质量差或遇到套峰而不能准确判断碱基,则重新进行扩增和测序。经校对的序列用Clustal X (Thompson et al, 1997)软件进行多重序列比对分析。然后利用Mega 6.0 (Tamura et al, 2013)软件以Kimura双参数模型(Kimura-2-parameter, K2P) (Kimura, 1980)采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,以日本蚱(*Tetrix japonica*)的2条同源序列作为外群。使用1,000次重复检测的Bootstrap值验证树上各节点的支持率。

1.4.2 利用距离法进行分类

使用ABGD (automatic barcode gap discovery) 软件(Puillandre et al, 2011)基于遗传距离对样本进行划分,同一组的样本被认定为1个种。将所有样本的基因序列的fasta文件在线提交到ABGD网站(<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>),种内差异先验值P (prior intraspecific divergence)为0.001到0.1,最小相对gap宽度值X (minimum relative gap width)为1.0。然后将样本划分结果与其形态鉴定结果进行比较。

1.4.3 利用阈值进行分类

使用基于序列差异的DNA分类的方法,即利用cox1序列之间的差异来鉴定分子可操作分类单元(molecular defined operational taxonomic units, MOTU) (Floyd et al, 2002; Blaxter et al, 2005),序列差异小于指定阈值的样本被划分到一个MOTU里,由于不同阈值的选取会产生不同的MOTU划分结果,因此选取了多个序列差异阈值进行分析,最后将样本划分结果与其形态鉴定结果进行比较(宋韶彬等, 2014)。

2 结果

2.1 白洋淀湿地蝗虫的物种多样性

通过系统地调查、采集与鉴定,本研究在白洋淀湿地共采集到蝗总科昆虫标本6科12属17种3,000余号,其中干制标本1,200余号,酒精浸泡标本1,800余号。综合调查结果和已有报道可知,白洋淀湿地的蝗总科昆虫共有6科23属34种(表1),其中包括本研究所采集到新记录1属3种。新记录属为异爪

蝗属(*Euchorthippus*),新记录种为素色异爪蝗(*Euchorthippus unicolor*)、柳枝负蝗(*Atractomorpha psittacina*)和日本稻蝗(*Oxya japonica*)。

2.2 白洋淀湿地蝗总科昆虫的分布现状

由于白洋淀湿地水域之外大多数都是村庄和农田,农药使用很多,况且闲置荒地较少,生境较为单一,蝗总科昆虫的生存环境较以前有了很大的改变,有些种类已经很难发现。对所采集到的种类进行统计发现,蝗总科昆虫的分布地可以分为:农田及其周围、堤坝及其周围和淀边草丛。在农田及其周围分布较多的种类为花胫绿纹蝗、疣蝗(*Trilophidia annulata*)、短额负蝗、柳枝负蝗、黄胫小车蝗、亚洲小车蝗(*Oedaleus asiaticus*)、短星翅蝗和大垫尖翅蝗;在堤坝及其周围分布较多的种类为短额负蝗、柳枝负蝗、黄胫小车蝗、亚洲小车蝗、短星翅蝗、大垫尖翅蝗和二色戛蝗(*Gonista bicolor*);在淀边草丛分布较多的种类为短额负蝗、柳枝负蝗、日本稻蝗、黄胫小车蝗、亚洲小车蝗、二色戛蝗和长翅素木蝗。

2.3 系统发育树的聚类分析

本研究提取了采自于白洋淀湿地的13种(令箭负蝗*Atractomorpha sagittaris*、长额负蝗*A. lata*、中华稻蝗、素色异爪蝗因标本干制或标本量少,未能成功获取DNA条形码数据)、河北蔚县的7种以及湖南怀化的1种共21种蝗虫的97个样本的线粒体DNA,使用DNA条形码引物进行PCR扩增,经序列测定,每个样本均得到1条长度为657 bp的cox1序列,扩增成功率为100%。

另外,从GenBank下载6属9种蝗虫和1个外群日本蚱的cox1序列,共25条。使用邻接法以122条序列构建的NJ系统发育树由于其多数分支,特别是处于基部的分支置信度较低,本研究根据置信度(>60%)进行了合意聚类,分析结果如图2所示。结果表明:在蝗总科内部锥头蝗科的3种负蝗聚为一支最先分出,蝗总科的其他5个科为多个平行分支,该系统树不能解析蝗总科科级阶元的系统进化关系;对于种级阶元,除了中华稻蝗、日本稻蝗、黄胫小车蝗、短额负蝗和柳枝负蝗没有聚为独立的一支外,其他26个物种(包括外群在内)全部以较高的置信度独立分支,显示出cox1序列可以对种级阶元进行良好的解析。

图2 基于cox1序列构建的白洋淀湿地蝗总科昆虫NJ系统发育树、ABGD和MOTU聚类结果

Fig. 2 NJ phylogenetic tree, ABGD result and MOTU result of Acridoidea from Baiyangdian Wetland based on *cox1* gene sequences

2.4 基于距离方法的分类结果

利用ABGD软件以0.001–0.1的先验值P区间对122个样本进行划分, 结果包含了初始划分(initial partition)和递归划分(recursive partition)两种情况, 如图3所示。其中, 初始划分较为稳定, 122个样本均被分成23组(图2); 递归划分将样本分成了24–28组。因此我们选择比较稳定的初始划分结果与形态鉴定结果进行比较, 发现雏蝗属(*Chorthippus*)的5个种为1个Group; 日本稻蝗和中华稻蝗为1个Group; 柳枝负蝗和短额负蝗为1个Group; 亚洲小车蝗和黄胫小车蝗为1个Group。隆额网翅蝗(*Arcyptera coreana*)和宽翅曲背蝗(*Pararcyptera microptera meridionalis*)为1个Group, 其余17个种与形态学分类结果保持一致。

2.5 阈值分类结果

蝗总科分子序列差异截取值(cut-off value)与分子可操作分类单元数(MOTU)的分析结果如图4所示。MOTU数目在33–64的序列差异内出现了一个平台, 122条序列被分为25个MOTU, 每个MOTU分类结果已在系统发育树上标示(图2)。结果表明: (1) 其中18种蝗虫和1个日本蚱分组结果与形态学分类结果保持一致; (2) 日本稻蝗和中华稻蝗为1个MOTU; 柳枝负蝗和短额负蝗为1个MOTU; 亚洲小车蝗和黄胫小车蝗为1个MOTU; 隆额网翅蝗和宽翅曲背蝗为1个MOTU; 黑翅雏蝗(*Chorthippus aethalinus*)和北方雏蝗(*C. hammarstroemi*)为1个MOTU; 东方雏蝗(*C. intermedius*)和华北雏蝗(*C. brunneus huabeiensis*)为1个MOTU。

图3 以0.001–0.1的先验值区间对122个样本ABGD划分结果
Fig. 3 Automatic partition results of ABGD in 122 samples based on prior intraspecific divergence range of 0.001–0.1

图4 0–100的分子序列差异截取值与可操作分类单元数目的关系
Fig. 4 Variation in the number of MOTUs defined at 0 to100 cut-off values for DNA barcodings

3 讨论

本研究先后3次系统地对白洋淀湿地及相关区域的蝗总科昆虫进行了多样性调查,共发现6科12属17种蝗虫。采集样地涵盖白洋淀湿地所有代表性区域,但所采集标本仅占已知种类的1/2,造成采集种类远远低于已知种类的原因固然有采集时间分布因素,如采集主要集中于8月和9月,而对于蝗总科中的早熟且生活史较短的类群,如雏蝗等,其成虫期在7月初;但跟目前白洋淀湿地的闲置荒地较少、人为过度开发、农药使用泛滥、生境较为单一、污染日益严重等因素也有着密不可分的关系。

从DNA条形码分子水平,我们利用系统发育树、遗传距离、序列差异阈值的方法对白洋淀湿地蝗总科昆虫进行了比较分析。从系统发育树来看,蝗总科内部的锥头蝗科处于蝗总科的基部,最先分出,应是蝗总科中较为原始的部分,这也与传统进化分类学研究的结果一致。本研究的蝗总科其他类群中,各科种类均不能聚为独立一支,且表现为平行进化,这与传统的观点相矛盾,这可能是该DNA条形码片段相对进化较快,序列较短,不适合高级阶元进化关系推断。在种级阶元(包括外群),NJ法、ABGD法和MOTU法分别能对83.9% (26/31)、74.2% (23/31)和80.6% (25/31)的物种进行解析,显示出该DNA条形码在物种识别鉴定上的良好表现。

综合来看,解析欠佳的种类主要为:(1)5种雏蝗无法明确解析;(2)柳枝负蝗和短额负蝗划分不开;(3)日本稻蝗和中华稻蝗合为1种;(4)亚洲小车蝗和黄胫小车蝗无法区分;(5)隆额网翅蝗和宽翅曲背蝗归在一起。前4种情况都是发生在同一属内,而且均是在形态分类上十分接近的种类,推测这些种类可能是近期分化物种,遗传差异还没有达到阈值,或者在以上类群中可能有不完全谱系分选现象(incomplete lineage sorting) (Floyd et al, 2002; Wiemers & Fiedler, 2007; Mcfadden et al, 2011)。不完全谱系分选是指在分子水平,对于一些分化时间较短的物种,它们基因序列的最近共祖事件早于物种形成事件,导致构建的基因树不能反映物种真实的进化关系(Velzen et al, 2012)。不完全谱系分选会导致种内种间遗传距离出现重叠区域、近缘物种在基因树上不易区分等现象。除此之外,后生动物类群偶尔发生的高速率核苷酸置换也会导致*cox1*条形码鉴定中的不可靠

分类(Meyer & Paulay, 2005; Vences et al, 2005)。隆额网翅蝗和宽翅曲背蝗分属于不同的属级阶元,两者形态上具有较大的差异,但遗传距离和序列差异阈值的方法都把它们聚为一支,是何原因造成这种状况还需要做进一步的研究。

综上所述,在蝗总科物种鉴定中,DNA条形码有很好的分类效果,但在个别种鉴定上存在问题。所以在用DNA条形码技术进行物种鉴定分析时不能脱离形态学手段。除此以外,由于单分子标记的局限性,可将其他基因片段与*cox1*一起作为DNA条形码的标记基因,以适应物种鉴定的需要(刘勇等, 2010; 何静超等, 2016)。

致谢: 感谢河北大学生命科学学院印象初院士、张道川教授在蝗虫鉴定方面的帮助。

参考文献

- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692–4693.
- Allegrucci G, Rampini M, Russo CD, Lana E, Cocchi S, Sbordoni V (2014) Phylogeography and systematics of the westernmost Italian *Dolichopoda* species (Orthoptera, Rhaphidophoridae). *Zookeys*, 437, 1–23.
- Arnot DE, Roper C, Bayoumi RAL (1993) Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61, 15–24.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E (2005) Defining operational taxonomic units using DNA barcoding data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1935–1943.
- Derocles SAP, Evans DM, Nichols PC, Evans SA, Lunt DH (2015) Determining plant-leaf miner-parasitoid interactions: a DNA barcoding approach. *PLoS ONE*, 10, e0117872.
- Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11, 839–850.
- He JC, Hu LL, Guo CH, Zhang F (2016) Molecular identification of crab spider from Xiaowutai Mountains, China with DNA barcoding. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 36, 286–292. (in Chinese with English abstract) [何静超, 胡岚岚, 郭晨辉, 张锋 (2016) 小五台山蟹蛛DNA条形码分子鉴定. 河北大学学报(自然科学版), 36, 286–292.]
- Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal So-*

- ciety B: Biological Sciences, 270(Suppl.1), 96–99.
- Huang JH, Zhang AB, Mao SL, Huang Y (2013) DNA barcoding and species boundary delimitation of selected species of Chinese Acridoidea (Orthoptera: Caelifera). PLoS ONE, 8, 243–265.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16, 111–120.
- Kolesik P, Butterill PT (2014) New gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) from Papua New Guinea. Austral Entomology, 54, 79–86.
- Li HC, Xia KL (2006) Fauna Sinica, Insecta, Vol. 43, Orthoptera, Acridoidea, Catantopidae. Science Press, Beijing. (in Chinese) [李鸿昌, 夏凯龄 (2006) 中国动物志 昆虫纲 第四十三卷 直翅目 蝗总科 斑腿蝗科. 科学出版社, 北京.]
- Liu Y, Song Y, Li XY (2010) Application of mtDNA *coxI* barcodes on molecular identification of insects. Plant Quarantine, 2(24), 46–50. (in Chinese) [刘勇, 宋毓, 李晓宇 (2010) 基于线粒体 $coxI$ 基因的DNA条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用. 植物检疫, 2(24), 46–50.]
- Ma C, Liu CX, Yang PC, Kang L (2009) The complete mitochondrial genomes of two band-winged grasshoppers, *Gastrimargus marmoratus* and *Oedaleus asiaticus*. BMC Genomics, 10, 550–551.
- Mcfadden CS, Benayahu Y, Pante E, Thoma JN, Nevarez PA, France SC (2011) Limitations of mitochondrial gene barcoding in Octocorallia. Molecular Ecology Resources, 11, 19–31.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biology, 3, 2229–2238.
- Oba Y, Ohira H, Murase Y, Moriyama A, Kumazawa Y (2015) DNA barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera, Elateridae). PLoS ONE, 10, e0116612.
- Pan CY, Hu J, Zhang X, Huang Y (2006) The DNA barcoding application of mtDNA *COI* genes in seven species of Catantopidae (Orthoptera). Entomotaxonomia, 28, 103–110. (in Chinese with English abstract) [潘程莹, 胡婧, 张霞, 黄原 (2006) 斑腿蝗科(Catantopidae)七种蝗虫线粒体 COI 基因的DNA条形码研究. 昆虫分类学报, 28, 103–110.]
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2011) ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. Molecular Ecology, 21, 1864–1877.
- Ren CG (2009) Governance of Grasshoppers in Baiyangdian. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. (in Chinese) [任春光 (2009) 白洋淀的蝗虫与治理. 中国农业科学技术出版社, 北京.]
- Song SB, Shi ZY, Jin Q, Han HL, Liu XF, Hao MD, Zhang AB (2014) Species identification of Noctuidae moths (Insecta: Lepidoptera) from Baoding and Langfang, Hebei, China with DNA barcoding and establishment of a local DNA barcoding library. Chinese Journal of Applied Entomology, 51, 156–168. (in Chinese with English abstract) [宋韶彬, 石志勇, 金倩, 韩辉林, 刘晓枫, 郝梦迪, 张爱兵 (2014) DNA条形码技术在河北保定、廊坊地区鳞翅目昆虫上的应用及小型区域数据库的构建. 应用昆虫学报, 51, 156–168.]
- Tamura K, Aotsuka T (1988) Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. Biochemical Genetics, 26, 815–819.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725–2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25, 4876–4882.
- Velzen RV, Weitschek E, Felici G, Bakker FT (2012) DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. PLoS ONE, 7, e30490.
- Vences M, Thomas M, Bonett RM, Vieites DR (2005) Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 360, 1859–1868.
- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist?—A case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). Frontiers in Zoology, 4, 64–68.
- Xia KL (1994) Fauna Sinica, Insecta, Vol. 4, Orthoptera, Acridoidea, Pamphagidae, Chrotogonidae, Pyrgomorphidae. Science Press, Beijing. (in Chinese) [夏凯龄 (1994) 中国动物志 昆虫纲 第四卷 直翅目 蝗总科 癩蝗科 瘤锥蝗科 锥头蝗科. 科学出版社, 北京.]
- Yin XC, Xia KL (2003) Fauna Sinica, Insecta, Vol. 32, Orthoptera, Acridoidea, Gomphoceridae, Acrididae. Science Press, Beijing. (in Chinese) [印象初, 夏凯龄 (2003) 中国动物志 昆虫纲 第三十二卷 直翅目 蝗总科 槌角蝗科 剑角蝗科. 科学出版社, 北京.]
- Zhao L, Zhao L, Li Q, Ren JL (2015) DNA barcoding of nymph grasshoppers from Xinjiang. Xinjiang Agricultural Sciences, 52, 785–794. (in Chinese with English abstract) [赵玲, 赵莉, 李琴, 任金龙 (2015) 基于DNA条形码技术识别新疆蝗蝻. 新疆农业科学, 52, 785–794.]
- Zheng ZM, Xia KL (1998) Fauna Sinica, Insecta, Vol. 10, Orthoptera, Acridoidea, Oedipodidae, Arcypteridae. Science Press, Beijing. (in Chinese) [郑哲民, 夏凯龄 (1998) 中国动物志 昆虫纲 第十卷 直翅目 蝗总科 斑翅蝗科 网翅蝗科. 科学出版社, 北京.]

(责任编辑: 黄晓磊 责任编辑: 闫文杰)

附录 Supplementary Material

附录1 本研究测定及从GenBank下载的蝗虫DNA条形码信息

Appendix 1 DNA barcoding of Acridoidea sequenced in this study and downloaded from GenBank

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2016331-1.pdf>

郝金凤, 张晓红, 王昱淞, 刘金林, 智永超, 李新江. 白洋淀湿地蝗虫多样性调查及DNA条形码应用研究. 生物多样性, 2017, 25 (4): 409–417.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2016331>

附录1 本研究测定及从GenBank下载的蝗虫DNA条形码信息

Appendix 1 DNA barcoding of Acridoidea sequenced in this study and downloaded from GenBank

种名 Species	采集地点 Collection location	采集时间 Collection time	GenBank登录号 GenBank accession number
笨蝗 <i>Haplotropis brunneriana</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2009.6.23	KY199445; KY199469; KY199471; KY199472; KY199478; KY199506
短额负蝗 <i>Atractomorpha sinensis</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2011.8.16	KY199438; KY199458; KY199507
柳枝负蝗 <i>Atractomorpha psittacina</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.15	KY199453; KY199485; KY199501; KY199510; KY199515
长额负蝗 <i>Atractomorpha lata</i> ☆			HM180485; HM180484; KF966613; KF966607; KF966602
日本稻蝗 <i>Oxya japonica</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.15	KY199434; KY199511
中华稻蝗 <i>Oxya chinensis</i> ☆			KC140004; KC140003; KM362658; KM362657; KM362656; KM362562
斑角蔗蝗 <i>Hieroglyphus annulicornis</i> ☆			KC140006; JQ301453
棉蝗 <i>Chondracris rosea rosea</i> *	湖南怀化 Huaihua, Hu'nan	2010.8.26	KY199441; KY199481; KY199484; KY199489; KY199497; KY199522
短星翅蝗 <i>Calliptamus abbreviatus</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.13	KY199437; KY199460; KY199467; KY199483; KY199519; KY199521
长翅素木蝗 <i>Shirakiacris shirakii</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.15	KY199439; KY199442; KY199446; KY199474; KY199524
东亚飞蝗 <i>Locusta migratoria manilensis</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.13	KY199448; KY199525
云斑车蝗 <i>Gastrimargus marmoratus</i> ☆			EU513373; EU527334
大垫尖翅蝗 <i>Epacromius coerulipes</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.13	KY199443; KY199504; KY199529
黄胫小车蝗 <i>Oedaleus infernalis infernalis</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.13	KY199436; KY199450; KY199464
亚洲小车蝗 <i>Oedaleus asiaticus</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.13	KY199447; KY199457; KY199487
大赤翅蝗 <i>Celes skalozubovi akitanus</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2009.7.7	KY199468; KY199509
疣蝗 <i>Trilophidia annulata</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.15	KY199440; KY199451; KY199462; KY199476; KY199491; KY199517
花胫绿纹蝗 <i>Aiolopus tamulus</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2015.8.10	KY199433; KY199475; KY199488; KY199499; KY199505; KY199514
轮纹异瘤蝗 <i>Bryodemella tuberculatum dilutum</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2008.7.5	KY199490; KY199495; KY199498; KY199512; KY199513; KY199520
宽翅曲背蝗 <i>Pararcyptera microptera meridionalis</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2009.6.23	KY199444; KY199459; KY199461; KY199463; KY199466; KY199492
隆额网翅蝗 <i>Arcyptera coreana</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2009.6.27	KY199482; KY199486; KY199500
黑翅雏蝗 <i>Chorthippus aethalinus</i> ☆			AY738350
小翅雏蝗 <i>Chorthippus fallax</i> ☆			KC261384
北方雏蝗 <i>Chorthippus hammarstroemi</i> ☆			AY738353
华北雏蝗 <i>Chorthippus brunneus huabeiensis</i> ☆			KC140092
东方雏蝗 <i>Chorthippus intermedius</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2009.6.21	KY199452; KY199455; KY199456; KY199477; KY199494; KY199503
素色异爪蝗 <i>Euchorthippus unicolor</i> ☆			KC140089; KC140088; KC140087; KC140086
条纹鸣蝗 <i>Mongolotettix japonicus vittatus</i> *	河北蔚县 Yuxian, Hebei	2009.6.18	KY199454; KY199465; KY199496; KY199518; KY199526; KY199528
中华剑角蝗 <i>Acrida cinerea</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.15	KY199435; KY199449; KY199470; KY199473; KY199523; KY199527
二色戛蝗 <i>Gonista bicolor</i> *	白洋淀 Baiyangdian Wetland	2014.9.13	KY199479; KY199480; KY199493; KY199502; KY199508; KY199516
日本蚱 <i>Tetrix japonica</i> ☆			NC_018543; JQ340002

*表示本研究所测定的DNA条形码种类; ☆表示从GenBank下载的DNA条形码种类。

* indicates the DNA barcoding which sequenced in this study; ☆ indicates the DNA barcoding downloaded from GenBank.