

果园螟蛾总科部分种类DNA条形码鉴定

武宇鹏^{1,2} 武春生² 张 萌³ 苏田娟² 朱朝东^{2*}

(1. 太原科技大学, 太原 030024; 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. 山西省植物保护植物检疫总站, 太原 030001)

摘要: 为检验DNA条形码在鳞翅目螟蛾总科蛾类鉴定中的可行性,对采自山西省太原市晋源区螟蛾总科26种78头蛾类标本分别提取了DNA,扩增了全部78头标本的线粒体*cox1*基因和其中75头标本的核糖体28S基因,并通过构建系统发育树、计算遗传距离及种间差异阈值等方法,对所有标本进行了鉴定和比较分析,检验了国际DNA条形码数据库BOLD(the barcode of life data)系统的鉴定成功率。结果表明,基于*cox1*基因和28S基因的系统发育树鉴定成功率分别为100.00%和97.14%,BOLD系统的鉴定成功率达到67.94%。基于最大简约法、邻接法和最大似然法构建的系统发育树,鉴定结果均相同。基于*cox1*基因的种内遗传距离全部小于1.00%,种内种间的遗传距离形成明显的3.00%阈值现象。研究表明,*cox1*及28S基因均适用于供试螟蛾总科种类的鉴定,核糖体28S基因可以作为DNA条形码鉴定的辅助基因;BOLD系统数据库仍有待充实,且标本鉴定工作相对滞后;不同聚类分析方法对结果影响很小,其中邻接法计算速度快,更适合DNA条形码大数据的分析。

关键词: 果园; 螟蛾总科; DNA条形码

DNA barcoding of some pyraloid moths (Lepidoptera: Pyraloidea) in an apple orchard

Wu Yupeng^{1,2} Wu Chunsheng² Zhang Meng³ Su Tianjuan² Zhu Chaodong^{2*}

(1. Taiyuan University of Science and Technology, Taiyuan 030024, Shanxi Province, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Shanxi Plant Protection and Plant Quarantine Station, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

Abstract: In order to investigate the accuracy of DNA barcoding in identifying pyraloid moths of Lepidoptera, 78 samples (belonging to 26 species of pyraloids) from an apple orchard in Jinyuan District of Taiyuan were collected. All samples were used for DNA extraction. The genes of *cox1* and 28S were successfully amplified for all of the 78 samples, except for the 28S genes of three samples. The sequences were used to construct phylogenetic trees, analyze the genetic distance and threshold, and test the identification success rate of the barcode of life data (BOLD) system. The results showed that the success rate according to the phylogenetic analysis using the genes of *cox1* and 28S were 100.00% and 97.14%, respectively. The success rate of BOLD system was 67.94%. Furthermore, the results from the phylogenetic trees based on different methods (maximum parsimony, neighbor-joining and maximum likelihood) were consistent. The intra-species genetic distance was less than 1.00% in all species. There was an obvious 3.00% threshold between the intra-species and the inter-species genetic distances. The results indicated that *cox1* and 28S genes were suitable for DNA identification of the tested pyraloid moths, and 28S gene could be used as an auxiliary gene for DNA barcoding; the BOLD system database

基金项目: 山西省自然科学基金(2015011077), 太原科技大学博士科研启动基金(20142031)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: zhucd@ioz.ac.cn

收稿日期: 2017-03-29

still need to be enriched, and the specimen identification was somewhat lagging behind; different clustering methods only had a little influence on the result, and the neighbor-joining method was more suitable for the analysis of DNA barcoding for its faster calculation.

Key words: orchard; Pyraloidea; DNA barcoding

螟蛾总科 Pyraloidea 包括螟蛾科 Pyralidae 和草蛾科 Crambidae, 是鳞翅目的第 3 大总科, 仅次于夜蛾总科 Noctuoidea 和尺蛾总科 Geometroidea。全世界已描述的螟蛾总科种类超过 16 000 种, 中国记录有 2 000 余种 (Solis, 2007; 马晓静, 2010; 刘家宇等, 2011)。大多数螟蛾总科幼虫为害粮食、蔬菜、果树等各种植物, 多数钻蛀取食, 少数卷叶取食。与大多数鳞翅目其它种类昆虫一样, 螟蛾总科昆虫的鉴定主要依靠成虫的外部形态特征, 但幼虫的鉴定较为困难。一些暴发性的农林害虫, 如果在幼虫时期不能准确鉴定, 会贻误防治适期。还有一些检疫性害虫, 往往以幼虫附着在货物的包装材料内, 单以外部形态很难鉴定。而且, 传统分类学方法鉴定物种需要很强的专业知识和丰富的经验, 具有较大的局限性, 很难同时、高效地对某一个地区、某一个项目所得到的全部生物样本进行鉴定与记录。单靠传统的人为鉴定已越来越难满足当前对鉴定工作准确度和大规模的需求, 亟需一种更加具有效率的生物物种鉴定与记录体系。

2003 年加拿大圭尔夫大学生物学家 Hebert 提出利用线粒体基因组上的一段线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因 (*cox1*) 对物种进行鉴定 (Hebert et al., 2003)。通过预先构建基因条形码数据库, 然后将未知物种的基因在数据库中进行检索比对, 根据序列相似度进行鉴定, 其过程如同超市里的条形码, 称之为 DNA 条形码 (Hebert et al., 2003; 2004a, b)。DNA 条形码技术可在物种生长发育的任一阶段对其进行鉴定, 甚至是某一物种的部分或碎片。目前已在昆虫 (Hajibabaei et al., 2006; Smith et al., 2008)、植物 (Kress & Erickson, 2007)、鸟类 (Hebert et al., 2004b)、鱼类 (Ward et al., 2005)、腹足类 (Remigio & Hebert, 2003)、两栖类 (Vences et al., 2005) 及灵长类 (Lorenz et al., 2005) 等多个种类中进行了研究和应用。DNA 条形码不但可以快速鉴定物种, 而且可以同时为系统发育学、种群遗传学提供海量数据, 甚至为隐存种、新种的发现提供了参考依据 (Hebert et al., 2004a; Monaghan et al., 2009)。

蛾类是鳞翅目中最丰富的类群, 也是 DNA 条形码研究较多的类群 (杨聪慧等, 2013; 宋韶彬等,

2014)。但从地域角度来讲, 尚缺乏关于山西省鳞翅目类群的研究。在鳞翅目类群中, DNA 条形码的通用基因一般是 *cox1*, 虽然鉴定效果很好, 但在部分类群中鉴定率还不能达到 100%, 有学者提出可以适当增加一个基因片段以保证鉴定的准确性 (Lahaye et al., 2008)。针对不同类群, DNA 条形码的计算方法往往不同, 最常用的是邻接法 (neighbor-joining, NJ)、最大简约法 (maximum parsimony, MP) 和最大似然法 (maximum likelihood, ML) 等。不同计算方法各有优劣, NJ 法、MP 法计算快, 费时少, 而 ML 法更准确, 但运算时间较长。本试验对采自山西省太原市郊区的螟蛾总科 26 种 78 头蛾类标本进行鉴定, 基于线粒体 *cox1* 基因, 并增加核糖体 28S 基因作为辅助基因, 检验国际 DNA 条形码数据库 BOLD (the barcode of life data) 系统的鉴定成功率, 并基于 *cox1* 基因计算种内及种间遗传距离, 对不同的计算方法所得鉴定结果进行比较分析, 测试和分析 DNA 条形码技术鉴定太原市晋源区螟蛾科类群的准确性, 探讨增加 DNA 条形码辅助基因的可行性, 这对于构建鳞翅目蛾类区域性 DNA 条形码数据库、螟蛾科地理种的资源信息补充及害虫的防治和鉴定具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

供试昆虫标本: 78 头螟蛾总科昆虫标本于 2015 年 8 月份采自山西省太原市晋源区南大寺村苹果园。夜间设置高压汞灯, 诱集螟蛾成虫, 8 月份最低气温为 13℃, 最高气温为 32℃。8 月 3 日、6 日、9 日、14 日、20 日、23 日共收集 6 次, 诱捕到蛾类 335 头, 其中准确鉴定到螟蛾科的有 78 头。各取一侧后足, 用无水乙醇浸泡, 置于 -20℃ 冰箱保存。

试剂: DNA 提取试剂盒 QIAGEN DNeasy® Tissue Kit 2004、PCR MasterMix、LA Taq, 天根生化科技 (北京) 有限公司; DL2000 Marker, 日本 TaKaRa 公司; BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit, 美国 Applied Biosystems 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

仪器: Philips 高压汞灯, 北京长风仪器仪表公

司;Mastercycler Gradient 5341 PCR 仪,德国Eppendorf公司;DYY-11 电泳仪、WD-9403F 紫外仪,北京六一仪器厂;ABI-377 自动测序仪,美国Applied Biosystems公司。

1.2 方法

1.2.1 螟蛾总科昆虫标本的PCR扩增和测序

将浸泡于无水乙醇中的78头标本后足取出,晾干,分成2~3段,放入1.5 μ L的离心管中。按照DNA提取试剂盒使用手册说明进行总DNA提取。抽提的DNA溶于200~300 μ L AE缓冲液中,并置于-20℃冰箱保存备用。线粒体 $coxI$ 扩增通用引物为LCO1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATA-TTGG-3')和HCO2198(5'-TAAACTTCAGGGTGAC-CAAAAAATCA-3')。核基因28S扩增通用引物为28SU1(5'-GACTACCCCCTGAATTTAAGCAT-3')和28SD1(5'-GACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG-3')。反应体系均为25 μ L:上下游引物各0.5 μ L、PCR MasterMix 12.5 μ L、DNA模板3 μ L、ddH₂O 8.5 μ L。取3 μ L PCR扩增产物使用1%的琼脂糖胶电泳检验。 $coxI$ 扩增反应条件:94℃预变性2 min;94℃变性1 min,53℃退火45 s,72℃延伸1 min,进行35个循环。28S扩增反应条件:94℃预变性2 min;94℃变性1 min,58℃退火45 s,72℃延伸1 min,进行35个循环。引物合成及PCR产物测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.2 BOLD系统鉴定

将1.2.1中所得的78条 $coxI$ 样本序列进行校对后,在BOLD系统中逐一进行鉴定,记录相似度最高的鉴定结果。并与形态鉴定结果进行对比,检验BOLD系统的鉴定成功率。

1.2.3 种间遗传距离计算

在NCBI中下载螟蛾总科 $coxI$ 基因序列418条,与78条样本 $coxI$ 基因序列进行整合,使用ClustalW进行比对,剔除错误序列,得到长度为659 bp的 $coxI$ 序列491条。用Mega 6.0软件(Tamura et al., 2013)计算属内、种内种间遗传距离,分别生成散点图,以检验种内种间差异是否存在阈值。

1.2.4 系统发育树鉴定

为了比较基于 $coxI$ 与28S的鉴定结果差异,以及DNA条形码不同算法的差别,从491条 $coxI$ 序列中筛选出127条同源序列,包括78条 $coxI$ 样本序列,使用ClustalW进行比对,得到长度为655 bp的 $coxI$ 序列集。将75条28S样本序列进行校对后,使用ClustalW进行比对,得到长度为591 bp的28S序

列集。基于 $coxI$ 和28S分别整合形成的数据集,分别用Mega 6.0软件选择MP法构建系统发育树;选择NJ法、K2P(Kimura-2-Parameter)模型(Kimura, 1980)构建系统发育树;选择ML法、Jukes-Cantor模型(Jukes & Cantor, 1969)构建系统发育树。Bootstrap自检值1 000,其它参数为默认值。

2 结果与分析

2.1 采集标本的鉴定

采集的78头标本均成功扩增到线粒体 $coxI$ 基因,其中75头标本扩增到核糖体28S基因。根据形态特征,72头标本均成功鉴定到种,有6头标本鉴定到暗野螟属*Bradina*,共24属26种(表1)。

2.2 BOLD系统鉴定结果

将78头标本的 $coxI$ 序列在BOLD系统进行鉴定,有53个样本与形态鉴定结果相同,成功率为67.94%。在鉴定成功的53个样本中,相似度达到100.00%的样本有28个,除了编号为201507015和201507016的2个样本相似度较低,分别为95.79%和95.85%外,其它样本的相似度均在98.51%以上,但这2个样本的鉴定结果正确,与形态鉴定结果相同,均为三斑绢野螟*Glyphodes pyralis*。编号为201507042~201507049的8个样本形态鉴定为库氏歧角螟*Endotricha kuznetzovi*,在BOLD系统中的鉴定相似度虽然均达到98.00%以上,但只鉴定到科,没有准确种名,所以没有鉴定成功(表1)。

2.3 种内与种间遗传距离

NCBI下载序列与本试验78条样本序列整合筛选的491条 $coxI$ 序列,共44属81种,含本研究的26种。种内遗传距离在0~0.61%之间,平均种内遗传距离为0.04%,除了品缟螟*Aglossa pinguinalis*和二型陶螟*Tosale ovipalagalis*这2个种的遗传距离分别为0.61%和0.32%外,其余种的遗传距离均小于0.30%。81个种,种与种两两之间计算的种间遗传距离,形成3 240对,遗传距离在1.00%~83.00%之间,有18对小于3.00%,其余均大于3.00%。18对为秆野螟属*Ostrinia*内种间的遗传距离,有4对标本为1.00%,包括2个种欧洲玉米螟*O. nubilalis*和远东秆野螟*O. orientalis*,有14对标本为2.00%,包括6个种:酒花秆野螟*O. kurentzovi*、麻秆野螟*O. narynensis*、远东秆野螟、欧洲玉米螟、亚洲玉米螟*O. furnacalis*和麻田豆秆野螟*O. scapularis*。表明基于 $coxI$ 基因的种内遗传距离全部小于1.00%(图1-A)。除了秆野螟属的个别种之外,种间遗传距离都大于3.00%,3.00%阈值现象较为明显(图1-B)。

表 1 螟蛾科部分种类样本信息及 BOLD 系统鉴定结果

Table 1 Information of the pyraloid species and identification of BOLD system

样本编号 Specimen no.	形态鉴定结果 Morphological identification result	<i>coxI</i>		基于 <i>coxI</i> 的 BOLD 系统鉴定结果 BOLD identification based on <i>coxI</i>				28S	
		长度 Length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.	科名 Family	属名 Genus	种名 Species	相似度 Similarity (%)	长度 Length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
201507001	金黄螟 <i>Pyralis regalis</i>	615	KY816438	Pyralidae	<i>Pyralis</i>	<i>regalis</i>	99.67	546	KY816513
201507002	金黄螟 <i>Pyralis regalis</i>	597	KY816439	Pyralidae	<i>Pyralis</i>	<i>regalis</i>	100.00	546	KY816514
201507003	金黄螟 <i>Pyralis regalis</i>	612	KY816440	Pyralidae	<i>Pyralis</i>	<i>regalis</i>	100.00	546	KY816515
201507004	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	616	KY816588	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	91.54	508	KY816516
201507005	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	614	KY816441	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.12	508	KY816517
201507006	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	614	KY816442	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.28	508	KY816518
201507007	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	615	KY816443	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.16	508	KY816519
201507008	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	597	KY816444	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	91.92	504	KY816520
201507009	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	597	KY816445	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.26	504	KY816521
201507010	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	597	KY816446	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.09	504	KY816522
201507011	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	617	KY816447	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.52	500	KY816523
201507012	二点织螟 <i>Melissoblastes zelleri</i>	615	KY816448	Pyralidae	<i>Lamoria</i>	<i>imbella</i>	92.32	506	KY816524
201507013	<i>Hypsotropa solipunctella</i>	610	KY816449	Pyralidae	<i>Immyrta</i>	<i>nigrovittella</i>	89.93	464	KY816525
201507014	三斑绢野螟 <i>Glyphodes pyloalis</i>	606	KY816450	Crambidae	<i>Glyphodes</i>	<i>pyloalis</i>	100.00	489	KY816526
201507015	三斑绢野螟 <i>Glyphodes pyloalis</i>	606	KY816451	Crambidae	<i>Glyphodes</i>	<i>pyloalis</i>	95.85	488	KY816527
201507016	三斑绢野螟 <i>Glyphodes pyloalis</i>	597	KY816452	Crambidae	<i>Glyphodes</i>	<i>pyloalis</i>	95.79	488	KY816528
201507017	艾锥额野螟 <i>Loxostege aeruginalis</i>	617	KY816453	Crambidae	<i>Loxostege</i>	<i>aeruginalis</i>	98.86	496	KY816529
201507018	条螟 <i>Chilo sacchariphagus</i>	606	KY816454	Crambidae	crambJanzen01	Janzen06	89.72	498	KY816530
201507019	条螟 <i>Chilo sacchariphagus</i>	606	KY816455	Crambidae	spilobiolep01	biolep304	89.72	498	KY816531
201507020	条螟 <i>Chilo sacchariphagus</i>	599	KY816456	Crambidae	<i>Donacaula</i>		89.61	497	KY816532
201507021	<i>Nacoleia sibirialis</i>	600	KY816457	Crambidae	<i>Nacoleia</i>	<i>sibirialis</i>	99.67	495	KY816533
201507022	细条纹野螟 <i>Tabidia strigiferalis</i>	597	KY816458	Crambidae	<i>Tabidia</i>	<i>strigiferalis</i>	99.83	501	KY816534
201507023	细条纹野螟 <i>Tabidia strigiferalis</i>	597	KY816459	Crambidae	<i>Tabidia</i>	<i>strigiferalis</i>	100.00	501	KY816535
201507024	细条纹野螟 <i>Tabidia strigiferalis</i>	606	KY816460	Crambidae	<i>Tabidia</i>	<i>strigiferalis</i>	100.00	500	KY816536
201507025	麻楝锄须丛螟 <i>Termioptycha margarita</i>	610	KY816461	Pyralidae			95.38	485	KY816537

续表 1 Continued

样本编号 Specimen no.	形态鉴定结果 Morphological identification result	<i>cox1</i>		基于 <i>cox1</i> 的 BOLD 系统鉴定结果 BOLD identification based on <i>cox1</i>				28S	
		长度 Length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.	科名 Family	属名 Genus	种名 Species	相似度 Similarity (%)	长度 Length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
201507026	<i>Tylostega tylostegalis</i>	615	KY816462	Crambidae	<i>Tylostega</i>	<i>tylostegalis</i>	99.84	500	KY816538
201507027	<i>Tylostega tylostegalis</i>	614	KY816463	Crambidae	<i>Tylostega</i>	<i>tylostegalis</i>	99.18	500	KY816539
201507028	旱柳原野螟 <i>Proteuclasta stotzneri</i>	597	KY816464	Crambidae	<i>Euclasta</i>	<i>stotzneri</i>	100.00	496	KY816540
201507029	旱柳原野螟 <i>Proteuclasta stotzneri</i>	606	KY816465	Crambidae	<i>Euclasta</i>	<i>stotzneri</i>	100.00	495	KY816541
201507030	旱柳原野螟 <i>Proteuclasta stotzneri</i>	606	KY816466	Crambidae	<i>Euclasta</i>	<i>stotzneri</i>	100.00	496	KY816542
201507031	褐翅黄纹草螟 <i>Xanthocrampus lucellus</i>	609	KY816467	Crambidae	<i>Thisanotia</i>	<i>chrysonuchella</i>	93.20	496	KY816543
201507032	褐翅黄纹草螟 <i>Xanthocrampus lucellus</i>	617	KY816468	Crambidae	<i>Thisanotia</i>	<i>chrysonuchella</i>	92.81	496	KY816544
201507033	暗野螟属 <i>Bradina</i> sp.	617	KY816469	Crambidae	<i>Bradina</i>	sp.2ZY	99.67	493	KY816545
201507034	暗野螟属 <i>Bradina</i> sp.	617	KY816470	Crambidae	<i>Bradina</i>	sp.2ZY	100.00	493	KY816546
201507035	暗野螟属 <i>Bradina</i> sp.	617	KY816471	Crambidae	<i>Bradina</i>	sp.2ZY	100.00	493	KY816547
201507036	暗野螟属 <i>Bradina</i> sp.	617	KY816472	Crambidae	<i>Bradina</i>	sp.2ZY	99.67	493	KY816548
201507037	暗野螟属 <i>Bradina</i> sp.	617	KY816473	Crambidae	<i>Bradina</i>	sp.2ZY	100.00	493	KY816549
201507038	暗野螟属 <i>Bradina</i> sp.	617	KY816474	Crambidae	<i>Bradina</i>	sp.2ZY	100.00	304	KY816550
201507039	桃蛀野螟 <i>Conogethes punctiferalis</i>	606	KY816475	Crambidae	<i>Conogethes</i>	<i>punctiferalis</i>	100.00	498	KY816551
201507040	桃蛀野螟 <i>Conogethes punctiferalis</i>	610	KY816476	Crambidae	<i>Conogethes</i>	<i>punctiferalis</i>	99.84	493	KY816552
201507041	桃蛀野螟 <i>Conogethes punctiferalis</i>	601	KY816477	Crambidae	<i>Conogethes</i>	<i>punctiferalis</i>	100.00	492	KY816553
201507042	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	617	KY816478	Pyalidae			100.00	486	KY816554
201507043	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	615	KY816479	Pyalidae			99.84	492	KY816555
201507044	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	615	KY816480	Pyalidae			99.84	492	KY816556
201507045	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	617	KY816481	Pyalidae			99.84	486	KY816557
201507046	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	617	KY816482	Pyalidae			100.00	486	KY816558
201507047	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	617	KY816483	Pyalidae			100.00	486	KY816559
201507048	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	510	KY816484	Pyalidae			99.80	490	KY816560
201507049	库氏歧角螟 <i>Endotricha kuznetzovi</i>	615	KY816485	Pyalidae			100.00	519	KY816561
201507050	豆莢斑螟 <i>Etiella zinckenella</i>	617	KY816486	Pyalidae	<i>Etiella</i>	<i>zinckenella</i>	98.51	485	KY816562
201507051	豆莢斑螟 <i>Etiella zinckenella</i>	597	KY816487	Pyalidae	<i>Etiella</i>	<i>zinckenella</i>	98.83	485	KY816563
201507052	豆莢斑螟 <i>Etiella zinckenella</i>	604	KY816488	Pyalidae	<i>Etiella</i>	<i>zinckenella</i>	98.51	489	KY816564
201507053	豆莢斑螟 <i>Etiella zinckenella</i>	597	KY816489	Pyalidae	<i>Etiella</i>	<i>zinckenella</i>	98.83	489	KY816565

续表 1 Continued

样本编号 Specimen no.	形态鉴定结果 Morphological identification result	<i>coxI</i>		基于 <i>coxI</i> 的 BOLD 系统鉴定结果 BL0D identification based on <i>coxI</i>				28S	
		长度 Length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.	科名 Family	属名 Genus	种名 Species	相似度 Similarity (%)	长度 Length (bp)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
201507054	豆莢斑螟 <i>Etiella zinckenella</i>	597	KY816490	Pyrilidae	<i>Etiella</i>	<i>zinckenella</i>	98.83	489	KY816566
201507055	贯众伸缘野螟 <i>Uresiphila gracilis</i>	561	KY816491	Crambidae	<i>Uresiphila</i>	<i>gracilis</i>	100.00	492	KY816567
201507056	贯众伸缘野螟 <i>Uresiphila gracilis</i>	608	KY816492	Crambidae	<i>Uresiphila</i>	<i>gracilis</i>	99.83	492	KY816568
201507057	贯众伸缘野螟 <i>Uresiphila gracilis</i>	610	KY816493	Crambidae	<i>Uresiphila</i>	<i>gracilis</i>	100.00	497	KY816569
201507058	四斑绢野螟 <i>Glyphodes quadrimaculalis</i>	606	KY816494	Crambidae	<i>Talanga</i>	<i>quadrimaculalis</i>	100.00	491	KY816570
201507059	四斑绢野螟 <i>Glyphodes quadrimaculalis</i>	606	KY816495	Crambidae	<i>Talanga</i>	<i>quadrimaculalis</i>	99.83	501	KY816571
201507060	四斑绢野螟 <i>Glyphodes quadrimaculalis</i>	606	KY816496	Crambidae	<i>Talanga</i>	<i>quadrimaculalis</i>	99.83		
201507061	甜菜白带野螟 <i>Spoladea recurvalis</i>	606	KY816589	Crambidae	<i>Spoladea</i>	<i>recurvalis</i>	99.46	491	KY816572
201507062	甜菜白带野螟 <i>Spoladea recurvalis</i>	599	KY816497	Crambidae	<i>Spoladea</i>	<i>recurvalis</i>	100.00	496	KY816573
201507063	甜菜白带野螟 <i>Spoladea recurvalis</i>	606	KY816498	Crambidae	<i>Spoladea</i>	<i>recurvalis</i>	100.00	496	KY816574
201507064	草地螟 <i>Loxostege sticticalis</i>	606	KY816499	Crambidae	<i>Loxostege</i>	<i>sticticalis</i>	100.00	496	KY816575
201507065	草地螟 <i>Loxostege sticticalis</i>	606	KY816500	Crambidae	<i>Loxostege</i>	<i>sticticalis</i>	100.00		
201507066	草地螟 <i>Loxostege sticticalis</i>	606	KY816501	Crambidae	<i>Loxostege</i>	<i>sticticalis</i>	100.00	494	KY816576
201507067	红云翅斑螟 <i>Oncocera semirubella</i>	615	KY816502	Pyrilidae	<i>Oncocera</i>	<i>semirubella</i>	99.84	489	KY816577
201507068	红云翅斑螟 <i>Oncocera semirubella</i>	614	KY816503	Pyrilidae	<i>Oncocera</i>	<i>semirubella</i>	99.84	489	KY816578
201507069	红云翅斑螟 <i>Oncocera semirubella</i>	615	KY816504	Pyrilidae	<i>Oncocera</i>	<i>semirubella</i>	99.84	489	KY816579
201507070	尖锥额野螟 <i>Sitochroa verticalis</i>	610	KY816505	Crambidae	<i>Sitochroa</i>	<i>verticalis</i>	99.84	495	KY816580
201507071	尖锥额野螟 <i>Sitochroa verticalis</i>	617	KY816506	Crambidae	<i>Sitochroa</i>	<i>verticalis</i>	100.00	496	KY816581
201507072	尖锥额野螟 <i>Sitochroa verticalis</i>	617	KY816507	Crambidae	<i>Sitochroa</i>	<i>verticalis</i>	99.84	496	KY816582
201507073	尖锥额野螟 <i>Sitochroa verticalis</i>	597	KY816590	Crambidae	<i>Sitochroa</i>	<i>verticalis</i>	100.00	494	KY816583
201507074	欧洲玉米螟 <i>Ostrinia nubilalis</i>	606	KY816508	Crambidae	<i>Ostrinia</i>	<i>furnacalis</i>	100.00	492	KY816584
201507075	<i>Plodia interpunctella</i>	609	KY816509	Pyrilidae	<i>Plodia</i>	<i>interpunctella</i>	100.00	491	KY816585
201507076	<i>Plodia interpunctella</i>	609	KY816510	Pyrilidae	<i>Plodia</i>	<i>interpunctella</i>	100.00	491	KY816586
201507077	<i>Pyrausta contigualis</i>	617	KY816511	Crambidae	<i>Pyrausta</i>	<i>contigualis</i>	100.00	497	KY816587
201507078	米蛾 <i>Corcyra cephalonica</i>	659	KY816512	Pyrilidae	<i>Corcyra</i>	<i>cephalonica</i>	100.00		

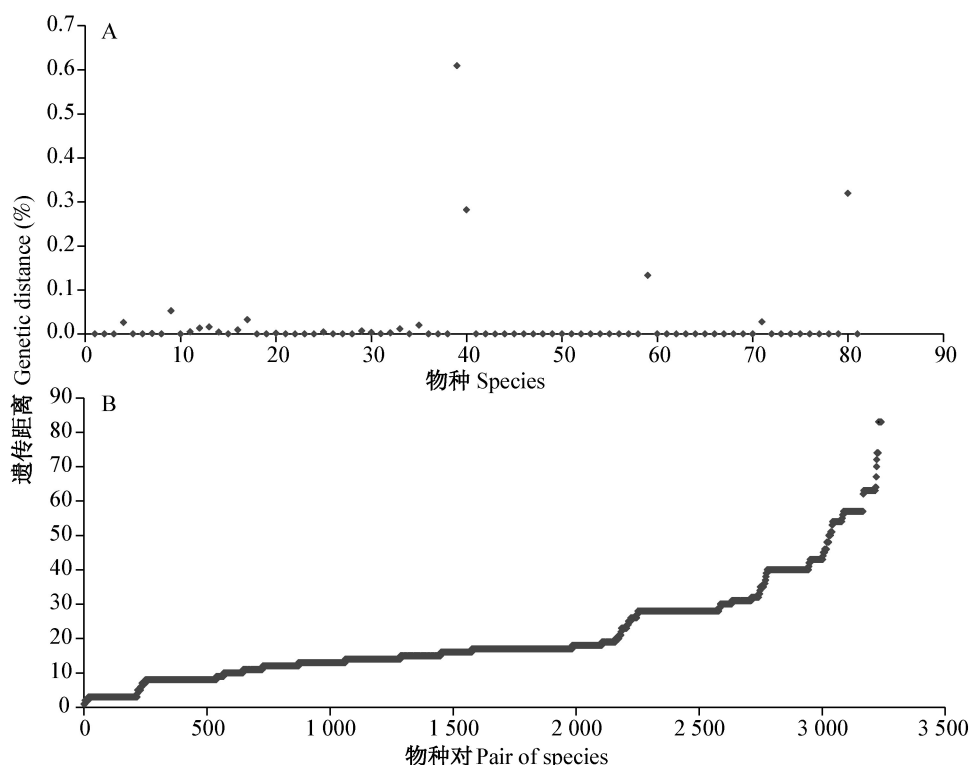


图1 螟蛾科部分种类种内(A)和种间(B)遗传距离散点图

Fig. 1 Scatter plot of inter-species (A) and intra-species (B) genetic distances of some pyraloid moths

2.4 系统发育树鉴定结果

本试验采集的26个种,在基于 $cox1$ 基因所构建的MP、NJ、ML系统发育树中,其鉴定结果均相同,因此仅给出了NJ系统发育树图(图2)。剔除4个没有同源序列的种(米蛾 *Corcyra cephalonica*、黑斑尖腹斑螟 *Hypsotropa solipunctella*、西伯网脉野螟 *Nacoleia sibirialis* 和麻楝锄须丛螟 *Termioptycha margarita*),其它22个种均有同种类的同源序列,且全部成功聚在一起,鉴定成功率为100.00%。暗野螟属 *Bradina* sp. 没有鉴定到种,在BOLD系统中的鉴定结果也仅到属,但在基于 $cox1$ 基因的系统发育树中,有2个编号为201507034和201507037的暗野螟属种与白斑暗水螟 *B. atopalis* (KC135909)形成单系(图2),说明二者的同源性很高,这2个种的关系需要在后续研究中通过生殖器的解剖来进行进一步鉴定。

通过28S基因构建的MP、NJ、ML系统发育树,拓扑结构有一定的差别,但是鉴定结果没有差别,因此本文仅给出了NJ系统发育树图(图3)。除了四斑绢野螟 *Glyphodes quadrimaculalis* 同种名的2个样本没有聚在一起外,其它同种名的序列均聚在一起,并且都为单系,鉴定结果与形态鉴定完全相同,鉴定成功率为97.14%(图3)。

3 讨论

本研究中,在BOLD系统中鉴定成功的53个样本中,除了三斑绢野螟的2个样本序列相似度为95.79%和95.85%外,其它鉴定成功的序列相似度均在98.51%以上。从BOLD系统中查询得知,DNA条形码数据库中三斑绢野螟的现有序列来自于美国和中国,与本试验所采集的同种相似度差异超过4.00%,表明有隐存种存在的可能性(Burns et al., 2008),因为缺少形态数据,尚无法准确确定,需要更多的信息进行深入研究。BOLD系统所推荐的物种鉴定成功标准为相似度大于98.00%(Ratnasingham & Hebert, 2007)。从BOLD系统鉴定结果来看,本研究鉴定结果基本符合BOLD系统推荐的标准;但利用BOLD系统的鉴定成功率为67.94%,说明虽然BOLD系统的数据量已经很庞大,现已有超过530万条基因序列,但仍然存在盲区,需要继续充实数据。而且,有相当一部分种类虽然已经有同源序列,但形态鉴定工作滞后,仅鉴定到科,没有鉴定到种,导致鉴定成功率降低。近年来,我国已启动了多个行业或类群的DNA条形码研究项目(陈岩等,2014),中国生命条形码数据门户的标本数量已达到5.5万头,序列数达到6.9万条。期望将来通过国内外学者的不断努力,能很好地解决上述问题。

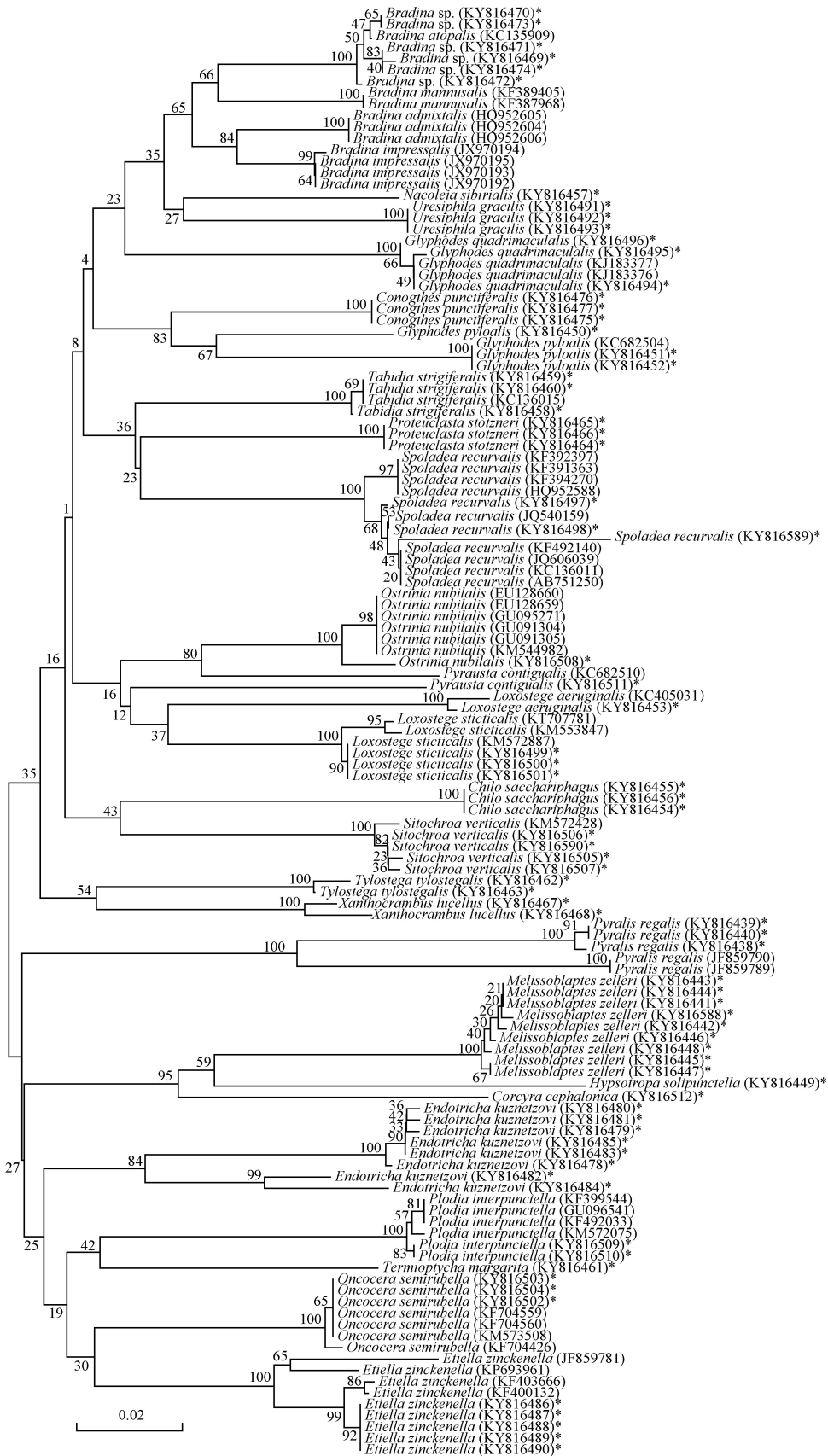


图2 基于 *cox1* 基因构建本试验中 26 种螟蛾总科昆虫及相关昆虫的 NJ 系统发育树

Fig. 2 NJ tree based on *cox1* gene sequences of 26 pyraloid moths in this study and other related insects
 标星序列为本试验的样本序列。The sequences marked with a star are from this study.

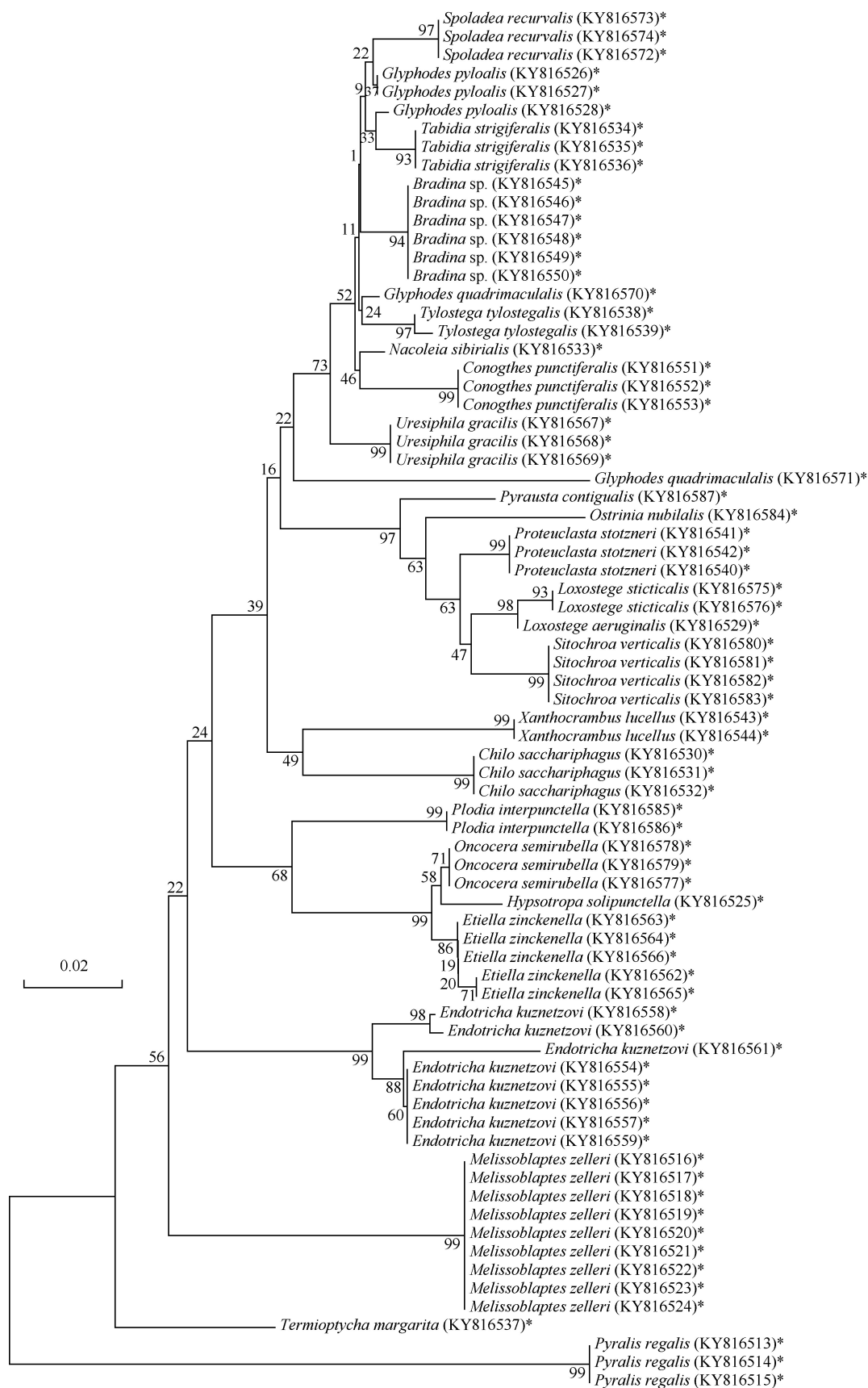


图3 基于28S基因构建本试验中26种蛱蛾总科昆虫及相关昆虫的NJ系统发育树

Fig. 3 NJ tree based on 28S gene sequences of 26 pyraloid moths in this study and other related insects
 标星序列为本试验的样本序列。The sequences marked with a star are from this study.

基于 *cox1* 基因构建的系统发育树, 鉴定成功率为 100.00%, 表明 *cox1* 作为螟蛾总科种类 DNA 条形码的通用基因毋庸置疑。基于 MP、NL 和 ML 方法构建的系统发育树仅在拓扑结构上存在较小差异, 对鉴定结果没有影响, 其中 NJ 法由于计算速度快, 费时少, 更适应于大数据的处理, 建议作为 DNA 条形码的主要分析方法。在本研究采集的螟蛾总科种类中, 28S 基因的鉴定成功率很高, 达到 97.14%, 但在其它一些类群中, 28S 基因不能很好地鉴定种一级分类单元(武宇鹏等, 2016), 常被用于较高阶元的系统发育分析(陈诚等, 2010; 梅洪等, 2007)。28S 基因在不同类群中的研究结果差异较大, 这可能与类群或取样有关, 下一步将继续在不同类群中进行尝试, 并将加大取样。

秆野螟属的种间遗传距离较小, 在 1.00%~2.00% 之间, 该属在全球分布有 20 余种, 地理分布广泛, 形态特征复杂, 种间生殖隔离较小, 甚至有共享性诱剂的现象, 寄主和生态区重叠严重, 所以种间差异较小(杨瑞生等, 2007)。Hebert et al. (2003) 根据鳞翅目研究结果发现种内遗传距离一般都低于 1.00%, 种间遗传距离至少为 3.00%, 本研究结果与该结果相似。种内和种间遗传距离虽然有一些重叠, 但 3.00% 阈值现象仍比较明显, 这一结果与武宇鹏等(2016)对夜蛾科种类的研究结果也一致。

DNA 条形码自问世以来, 在某些方面仍存在争议, 主要集中在基因的筛选、计算方法的选择、种间差异阈值的有无等方面。本试验通过研究发现, *cox1* 及 28S 基因均适用于螟蛾总科种类的鉴定, 核糖体 28S 基因可以作为 DNA 条形码鉴定的辅助基因。不同聚类分析方法对结果影响很小, 对于本试验所选取螟蛾总科部分类群而言, 种内、种间差异阈值明显存在。

参 考 文 献 (References)

- Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN. 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17): 6350–6355
- Chen C, Shen HD, Wu WJ, Wei LL, Wang L. 2010. Phylogenetic studies of Onchidiidae (Mollusca, Pulmonata) based on 28S rDNA partial sequence. *Biotechnology Bulletin*, (6): 172–178 (in Chinese) [陈诚, 沈和定, 吴文健, 魏雷雷, 王玲. 2010. 基于 28S rDNA 部分序列的石磺科系统发育研究. *生物技术通报*, (6): 172–178]
- Chen Y, Zhang L, Liu L, Zhu SF. 2014. DNA barcode databases on Chinese quarantine pests. *Plant Quarantine*, 28(1): 1–5 (in Chinese) [陈岩, 张立, 刘力, 朱水芳. 2014. 我国检疫性有害生物 DNA 条形码信息系统建设. *植物检疫*, 28(1): 1–5]
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4): 968–971
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41): 14812–14817
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10): e312
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules. // Munro HN. *Mammalian protein metabolism*. New York: Academic Press, pp. 21–132
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2): 111–120
- Kress WJ, Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2(6): e508
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8): 2923–2928
- Liu JY, Ren YD, Li HH. 2011. Taxonomic study of the genus *Didia* Ragonot (Lepidoptera, Pyralidae, Phycitinae) in China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 36(3): 783–788 (in Chinese) [刘家宇, 任应党, 李后魂. 2011. 中国帝斑螟属分类研究(鳞翅目, 螟蛾科). *动物分类学报*, 36(3): 783–788]
- Lorenz JG, Jackson WE, Beck JC, Hanner R. 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462): 1869–1877
- Ma XJ. 2010. Study on taxonomy, fauna and geographical distribution of Pyraloidea insects in Henan. Master Thesis. Zhengzhou: Zhengzhou University (in Chinese) [马晓静. 2010. 河南螟蛾总科昆虫的分类、区系及分布地理研究. 硕士学位论文. 郑州: 郑州大学]
- Mei H, Liu GX, Hu ZY. 2007. Phylogenetic studies of Oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on 28S rDNA sequences. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 31(4): 492–498 (in Chinese) [梅洪, 刘国祥, 胡征宇. 2007. 基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育研究. *水生生物学报*, 31(4): 492–498]
- Monaghan MT, Wild R, Elliot M, Fujisawa T, Balke M, Inward DJ,

- Lees DC, Ranaivosolo R, Eggleton P, Barraclough TG, et al. 2009. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*, 58(3): 298–311
- Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. Bold: the barcode of life data system (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3): 355–364
- Remigio EA, Hebert PDN. 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3): 641–647
- Smith MA, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Deans AR, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN. 2008. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34): 12359–12364
- Solis M. 2007. Phylogenetic studies and modern classification of the Pyraloidea (Lepidoptera). *Revista Colombiana de Entomologia*, 33(1): 1–8
- 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(1): 156–168 (in Chinese) [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(1): 156–168]
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729
- Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2(1): 51–53
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462): 1847–1857
- Wu YP, Wu CS, Lu JJ, Yang J, Zhu CD. 2016. DNA barcoding of moths (Lepidoptera: Noctuidae) in an apple orchard. *Journal of Environmental Entomology*, 38(4): 813–820 (in Chinese) [武宇鹏, 武春生, 陆俊娇, 杨静, 朱朝东. 2016. 苹果园鳞翅目夜蛾科DNA条形码鉴定. *环境昆虫学报*, 38(4): 813–820]
- Yang RS, Wang ZY, He KL. 2007. Advances in phylogenetic and taxonomic studies on genus *Ostrinia*. *Plant Protection*, 33(2): 20–26 (in Chinese) [杨瑞生, 王振营, 何康来. 2007. 秆野螟属(*Ostrinia*)系统进化与分类研究进展. *植物保护*, 33(2): 20–26]
- Yang CH, Jin Q, Chen FQ, Wu CS, Zhang AB. 2013. Application of tree-based, distance-based and character-based DNA barcoding methods for the identification of Crambidae species (Insecta: Lepidoptera) in Baihuashan, China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 61–70 (in Chinese) [杨聪慧, 金倩, 陈付强, 武春生, 张爱兵. 2013. 基于进化树、距离和特征的DNA条形码方法研究——以百花山地区草螟科为例. *应用昆虫学报*, 50(1): 61–70]

(责任编辑:李美娟)