DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202102004

基于线粒体 COI 基因的 3 种草蛉的 系统发育关系分析^{*}

胡红岩,张职显,卢珍华,任相亮,马小艳,马亚杰,宋贤鹏,马 艳** (中国农业科学院棉花研究所,棉花生物学国家重点实验室,河南安阳455000)

摘要:【目的】基于线粒体 COI 基因片段测序及分析,研究 3 种草蛉的系统发育关系,探讨 DNA 条形码准确 鉴定草蛉种类的可行性。【方法】利用 PCR 扩增和测序技术,获得来自不同地区的 12 个样本 3 种草蛉的 COI 基因片段序列。运用 DNAMAN 软件对序列进行拼接比对,并从 GeneBank 数据库中下载 9 种草蛉的 COI 序列,利用 MEGA 7.0 软件对 23 条序列进行碱基序列分析、遗传距离分析及系统发育分析。【结果】序 列保守位点 469 个,变异信息位点 188 个,简约信息位点 150 个,自裔位点 38 个。序列中 A、T、G 和 C 的 含量分别为 28.6%、41.1%、15.4% 和 14.9%; A+T 含量 (69.7%) 高于 G+C 含量 (30.3%),呈现出明显的 A+T 碱基偏好。草蛉种内遗传距离为 0~0.005,种间遗传距离为 0.022~0.184。在系统发育树 (最大似然法/ 邻接法)中,同一属的物种以较高的置信度聚类在一起。【结论】基于 COI 基因片段的 DNA 条形码技术可以 用于草蛉的分类鉴定。

关键词: 草蛉; 线粒体 COI 基因; DNA 条形码; 遗传距离; 系统发育树 中图分类号: Q 969.384.2 文献标志码: A 文章编号: 1004–390X (2021) 06–0937–07

Phylogenetic Analysis of Three Green Lacewing Species (Neuropetra, Chrysopidae) Based on the Mitochondrial *COI* Gene

HU Hongyan, ZHANG Zhixian, LU Zhenhua, REN Xiangliang, MA Xiaoyan, MA Yajie, SONG Xianpeng, MA Yan

(Institute of Cotton Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang 455000, China)

Abstract: [**Purpose**] To verify the feasibility of DNA barcoding in Chrysopidae species, phylogenetic analyses of lacewing species were based on the sequencing of mitochondrial *COI* gene. [**Methods**] Twelve sequences (fragment of *COI* gene) of three common green lacewing species from different regions were sequenced in this study. The sequences were assembled by using DNA-MAN software, and nine lacewing species were downloaded from GeneBank. The analyses were performed with MEGA 7.0 software, including base composition and substitution, the genetic distance, and the phylogenetic trees of total 23 sequences. [**Results**] There were 469 conserved sites, 188

*基金项目:国家自然科学基金项目(31801751);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610162021029); 中国农业科学院科技创新工程。

网络首发地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20211103.1801.006.html



收稿日期: 2021-02-04 修回日期: 2021-04-24 网络首发时间: 2021-11-05 15:59:24

作者简介: 胡红岩 (1986—), 女, 河南安阳人, 博士, 副研究员, 主要从事昆虫分子生态学研究。 E-mail: huhongyan1986@163.com

^{**}通信作者 Corresponding author: 马艳 (1970—), 女,河南安阳人,学士,研究员,主要从事植物保护及农 药应用技术研究。E-mail: aymayan@126.com

variation sites, 150 parsimony information sites, and 38 singleton sites on the mitochondrial *COI* gene. The content of A, T, G, and C base in all sites was 28.6%, 41.1%, 15.4%, and 14.9%, respectively. The content of A+T base was up to 69.7% and higher than G+C base, showing A+T base preference. The intraspecific genetic distance ranged from 0 to 0.005. Interspecific distances ranged between 0.022 and 0.184. The phylogenetic tree built by the maximum likelihood and neighbor-joining method showed that the species in the same genus can be clustered into the same branch with high branch bootstrap values. [Conclusion] The technology of DNA barcoding based on the *COI* gene sequence is applicable in the classification and identification of green lacewing species.

Keywords: green lacewing; mtCOI gene; DNA barcoding; genetic distance; phylogenetic tree

草蛉为昆虫纲 (Insecta) 脉翅目 (Neuroptera) 草蛉科 (Chrysopidae) 昆虫,能捕食蚜虫、叶螨和 粉虱以及鳞翅目卵和幼虫等多种农林害虫,是生 物防治上重要的天敌类群。草蛉资源丰富,种类 繁多,在世界范围内广泛分布,据统计,目前全 世界已知草蛉种类约1415种[1]。草蛉科分为网蛉 亚科 (Apochrysinae)、幻草蛉亚科 (Nothochrysinae) 和草蛉亚科 (Chrysopinae), 其中草蛉亚科是最大 的亚科,大部分的草蛉隶属于该亚科。由于存在 地理亚种和生态型复杂等问题,部分草蛉在形态 学上极为相似,难以鉴定,分类位置变动频繁, 使得草蛉科的分类及系统发育关系变得较为复 杂^[2]。目前,草蛉科部分属种的命名及分类地位 仍存在分歧, 仅依赖外部形态特征进行草蛉物种 鉴定存在一定的困难^[3]。传统形态学分类能在较 高级的分类阶元内确定物种的分类地位,但在较 低级的分类阶元中,有时则难以确定物种的分 类。分子生物学在昆虫分类中的应用和发展,为 解决草蛉属种的鉴定问题提供了新思路。细胞色 素氧化酶亚基 I 基因 (COI) 是动物线粒体 DNA (mtDNA) 中最保守的编码蛋白基因,其结构相对 保守,同属物种的 COI 基因序列片段又存在足够 的变异,可用于区分亲缘关系很近的物种^[4]。因 此,基于 COI 基因片段的 DNA 条形码技术被广 泛应用于物种鉴定及系统进化研究[5-8]。

国内外已有关于草蛉线粒体基因序列的研究。如WINTERTON等^[9]利用 16S rRNA 和 COI 基因序列片段分析了 33 种草蛉的系统发育关 系。HARUYAMA等^[10]通过 COI 基因片段序列分 析和系统发育构建,探讨日本通草蛉 (Chrysoperla nipponensis) A 型和 B 型隐种与德国普通草蛉 (C. carnea) 的分子标记方法,并对日本通草蛉 A 型

隐种的起源进行分析。PALOMARES-PÉREZ 等[11] 利用 COI、COII、ND2 和ND5 分子标记方法,对 墨西哥普通草蛉 (C. carnea) 的 9 个地理种群进行 系统发育分析。目前,国内对草蛉科的研究主要 集中在形态学的分类鉴定及生物防治等方面,而 对草蛉的分子生物学及重要基因序列研究较少。 聂瑞娥等^[12]构建了日本通草蛉的 cDNA 文库,并 基于 16S rRNA 序列对草蛉科 7 种昆虫的系统发 育关系进行分析。部分研究者对草蛉线粒体基因 组进行测序和注释,并依据基因组数据对草蛉亚 科不同种进行系统发育分析^[13-14]。YI 等^[3]利用线 粒体 COI 基因片段对北京地区 49 种草蛉进行条 形码分析,对草蛉科的18个种进行分子鉴定, 发现其中的2个隐存种,认为基于 COI 基因的 DNA 条形码技术在草蛉分子鉴定方面具有很好 的应用前景。

本研究以中国华北棉区 3 种常见草蛉的 4 个 不同地理种群为研究对象,对其线粒体 COI 基因 片段进行测序,统计分析不同序列的碱基组成及 变异位点信息,并从 GeneBank 中下载其余 9 种 草蛉昆虫的 11 条 COI 基因序列片段,构建草蛉 的系统发育树,分析不同草蛉的亲缘关系,探讨 DNA 条形码技术在草蛉物种鉴定中应用的可能 性,为草蛉分类、资源保护及应用研究提供理论 依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试草 較于 2019 年 6—7月分别在山西运 城、河北邱县、河南鹿邑和河南安阳等地棉田采 集,标本采集信息见表 1。室内采用形态学分类 方法鉴定为中华通草 (Chrysoperla sinica)、丽 草 (Chrysopa formosa)和大草 (Chrysopa pal-

物种 species	采集地点 collection location	采集日期 collection date	个体数 number of individuals	登录号 accession number								
	山西运城 Yuncheng, Shanxi	2019-07	5	MW323552								
中华通草蛉	河北邱县 Qiuxian, Hebei	2019-06	5	MW323553								
Chrysoperla sinica	河南鹿邑 Luyi, Henan	2019-07	4	MW323554								
	河南安阳 Anyang, Henan	2019-06	10	MW323555								
	山西运城 Yuncheng, Shanxi	2019-07	6	MW323556								
丽草蛉	河北邱县 Qiuxian, Hebei	2019-06	7	MW323557								
Chrysopa formosa	河南鹿邑 Luyi, Henan	2019-07	5	MW323558								
	河南安阳 Anyang, Henan	2019-06	5	MW323559								
	山西运城 Yuncheng, Shanxi	2019-07	4	MW323560								
大草蛉	河北邱县 Qiuxian, Hebei	2019-06	8	MW323561								
Chrysopa pallens	河南鹿邑 Luyi, Henan	2019-07	7	MW323562								
	河南安阳 Anyang, Henan	2019-06	6	MW323563								

表1 3种草蛉的采集信息

Tab. 1 The sampling information of three green lacewing species

lens),试验用虫均为成虫,采集后的昆虫浸泡于 95%酒精中,保存于中国农业科学院棉花研究所 植保室,在-20℃冰箱中低温保存备用。从Gen-Bank 基因库中下载 9 种草蛉昆虫共 11 条 *COI* 基 因序列用于序列的对比分析,详细信息见表 2。

表 2	NCBI	下载的9	种草蛉线粒体	COI	基因片段信息

Tab. 2	The information of mitochondrial COI gene se-
	quence of nine green lacewing species
	downloaded from NCBI

物种	登录号	碱基长度/bp
species	accession number	base length
叶色草蛉 Chrysopa phyllochroma	KJ592436.1	658
普通草蛉 Chrysoperla carnea	KM534411.1	658
普通草蛉 Chrysoperla carnea	KR147968.1	658
红迪草蛉 Chrysoperla rufilabris	HM375006.1	658
玉带尼草蛉 Nineta vittata	KJ592520.1	658
黑腹早殿 Chrysopa perla	KJ592478.1	658
黑腹草蛉 Chrysopa perla	JN299371.1	658
自线草蛉 <i>Cunctochrysa albolineata</i>	KJ592467.1	658
黄垱草蛉 Mallada basalis	MN345126.1	658
花斑脉褐蛉 Micromus variegatus	JF839807.1	658
角纹脉褐蛉 <i>Micromus angulatus</i>	KM533369.1	658

1.2 试验方法

1.2.1 材料预处理

参考张德华等[15]的方法,将保存的标本用

0.9% 的生理盐水浸泡 24 h,随后用蒸馏水冲洗干净,放在干净的滤纸上待用。

1.2.2 基因组 DNA 提取

挑取单头草蛉成虫置于 1.5 mL 离心管中,根据上海生工生物工程股份有限公司 Ezup 动物组织基因组 DNA 抽提试剂盒说明书的操作步骤提取草蛉 DNA 模板, DNA 样品于-20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 mtDNA-COI 基因扩增与检测

对 3 种草蛉总 DNA 中的线粒体细胞色素氧 化酶 (mtDNA-COI) 基因进行 PCR 检测。所用引 物为通用引物 COIL1490: 5'-GGTCAACAAAT-CATAAAGATATTG-3'和 COIH2198: 5'-TAAA-CTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'^[16]。PCR 扩 增反应体系为 25 µL,包括 10×PCR Buffer 2.5 µL、 dNTPs 混合液 2.5 µL、5 U/µL 的 *Taq* 聚合酶 0.2 µL、10 µmol/L 的上下游引物各 1 µL 和 DNA 模板 1 µL 和 ddH₂O 16.8 µL。反应条件: 94 ℃ 预 变性 4 min,94 ℃ 变性 30 s,53 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 反应结束后,取 5 µL mtDNA-COI 基因扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。选取 目标条带清晰的样品委托上海生工生物工程股份 有限公司对扩增产物进行双向测序。

1.3 数据分析

采用 DNAMAN 软件查看序列质量。对所测的 3 种草蛉 COI 基因序列分别进行比对和拼接。 拼接结果在 NCBI 网站进行 BLAST 检索,与 GeneBank 基因库中同源序列对比,将获得的草 蛉 COI 基因序列提交至 GeneBank 数据库,获得 GeneBank 登录号。在 GeneBank 数据库中下载 11 条草蛉的 COI 基因序列 (表 2),采用 MEGA 7.0 软件分析 23 条序列的碱基组成、位点信息、碱 基转换与颠换值及其比值 (R)等。以褐蛉科的花 斑脉褐蛉 (Micromus variegatus) 和角纹脉褐蛉 (M. angulatus) 为外群,基于 Kimura 2-parameter 遗传 距离模型分析不同草蛉的遗传距离。采用最大似 然法 (ML) 和邻接法 (NJ) 构建系统发育树,采用 的模型分别为 GTR+I 和 p-distance 模型。自展检 验 (bootstrap test) 评估所建系统树的可靠性,重 复 1000 次评估各分支的置信值。

2 结果与分析

2.1 COI 基因序列组成与变异

对 4 个地理种群的 3 种草蛉 COI 基因序列测 序后去除上下游引物,得到 658 bp 的 COI 基因 片段。经过比对分析发现:同种草蛉同一地理种 群个体间 COI 基因片段序列没有差异。因此、将 获得的4个地理种群的3种草蛉的12条草蛉 COI 基因序列提交至 GeneBank 数据库,获得 GeneBank 登录号 (表 1)。12 条序列与 NCBI 上下 载的9种草蛉序列进行对比分析,去掉前面1个 碱基得到 657 bp 的有效长度。片段中未发现碱基 插入或缺失,其中保守位点469个,变异信息位 点 188个,简约信息位点 150个,自裔位点 38个。序列结构中A、T、G和C的含量分别为 28.6%、41.1%、15.4%和14.9%, A+T平均含量 为 69.7%, G+C 平均含量为 30.3%, 呈现出明显 的 A+T 碱基偏好。NCBI 数据库中拟果蝇 (Drosophia simulans) (JF872266.1、JF872338.1 和 JF-872410.1) 线粒体 COI 基因片段序列的 A+T 平均 含量为 67.2%, G+C 平均含量为 32.8%, 黑腹果 蝇 (D. melanogaster) (JF871600.1、KT117503.1 和 JF868423.1) 线粒体 COI 基因片段序列的 A+T 平 均含量为 69.3%, G+C 平均含量为 30.7%。3 种 草蛉与拟果蝇和黑腹果蝇及其他昆虫的线粒体基 因特征[13-14]类似。同种草蛉同一地理种群个体间 碱基没有差异,不同地理种群之间碱基差异很 小。其中,中华通草蛉4个地理种群间有3个变 异位点,与同属的普通草蛉间有7个变异位点; 丽草蛉4个地理种群间有1个变异位点,与同属 的叶色草蛉间有 60 个变异位点;大草蛉 4 个地 理种群间有 1 个变异位点,与同属的黑腹草蛉间 有 62 个变异位点。表明草蛉 COI 基因序列比较 保守,种内变异位点数小于种间。

2.2 碱基替换

由 12 种草蛉 COI 基因序列的转换数和颠换 数以及位点变异速率(表 3)可知:核苷酸的转换 位点为 25,颠换位点为 40, *R* 为 0.6,转换主要 发生在 A 和 T 之间,颠换主要发生在 G 和 C 之 间。其中,第1位点替换数为 8, *R* 为 7.4;第 2 位点替换数为 1, *R* 为 2.7;第3 位点替换数为 56, *R* 值为 0.4。可见,碱基替换主要发生在第 3 位点,其次为第1 位点,第2 位点的碱基在基 因序列中相对比较保守。

2.3 遗传距离分析

由表4可知:同物种间的遗传距离介于 0~0.005,其中,中华通草蛉4个地理种群的种内 遗传距离介于0~0.005,丽草蛉4个地理种群的 种内遗传距离介于0~0.002,大草蛉不同地理种 群的种内遗传距离也介于0~0.002,黑腹草蛉 2个地理种群的种内遗传距离介于0~0.002,普通 草蛉2个地理种群的种内遗传距离分于0~0.002,普通 草蛉2个地理种群的种内遗传距离分0。不同种 间的遗传距离介于0.022~0.184,其中,外群角纹 脉褐蛉与草蛉亚科的中华通草蛉和普通草蛉的遗 传距离最大(0.184),普通草蛉和中华通草蛉的遗 传距离最小(0.022)。遗传距离分析结果表明:草蛉 *COI* 基因序列相对保守,种内遗传距离小于种间。

2.4 系统发育树分析

以褐蛉科的花斑脉褐蛉 (M. variegatus) 和角 纹脉褐蛉 (M. angulatus) 为外群,分别构建 ML 树和 NJ 树,所显示的拓扑结构相同,仅在各分 支的置信度上略有差异。由图 1 可知:2 个外群 位于树的基部位置,与草蛉亚科的其他种类分 开,说明花斑脉褐蛉和角纹脉褐蛉亲缘关系较近 且较为原始,这与形态学分类一致。同一物种以 较高的置信度聚为一小支,如大草蛉的4条序列 以100% 的置信度聚在一起,黑腹草蛉的2条序 列聚为一支,丽草蛉的4条序列聚为一支,且分 支自展值均为100%。近缘种以较高的置信度聚 在一起,如普通草蛉2条序列和中华通草蛉4条 序列聚在一起,分支自展值为100%。同属的不 同种类聚在一起,如大草蛉、黑腹草蛉、叶色草 蛉和丽草蛉,这与形态学分类相一致。

表 3 12 种草蛉 COI 基因的核苷酸碱基替换值

		Tab.	3	The n	ucleot	ide ba	ise sul	bstitut	ion v	alue o	f COI	gene	in 12	lacew	ving sp	pecies			
位点 site	ii	si	sv	R	ΤT	TC	TA	TG	СТ	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA
기 average	592	25	40	0.6	242	8	18	1	11	87	1	0	17	1	167	2	2	0	3

位点 site	ii	si	sv	R	ΤT	TC	TA	TG	СТ	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
平均 average	592	25	40	0.6	242	8	18	1	11	87	1	0	17	1	167	2	2	0	3	97
第1 the first	211	7	1	7.4	62	3	0	0	5	28	0	0	0	0	60	0	0	0	0	61
第2 the second	218	1	0	2.7	96	0	0	0	0	57	0	0	0	0	30	0	0	0	0	35
第3 the third	164	17	39	0.4	84	6	18	1	6	2	1	0	17	1	77	2	1	0	3	1

注: ii. 相同碱基对; si. 转换碱基对; sv. 颠换碱基对; R. 转换碱基对和颠换碱基对的比值。

Note: ii. identical pairs; si. transitional paris; sv. transversional paris; R. si/sv.

表 4 基于 COI 基因的 Kimura 2-parameter 模型的 12 种草蛉种群遗传距离

Tab. 4 The genetic distance among 12 lacewing species populations based on Kimura 2-parameter model of COI gene

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1		0.003	0.003	0.003	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.006	0.006	0.010	0.012	0.014	0.015	0.013	0.014	0.016	0.019
2	0.005		0.000	0.000	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.006	0.006	0.010	0.012	0.014	0.014	0.013	0.014	0.016	0.019
3	0.005	0.000		0.000	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.006	0.006	0.010	0.012	0.014	0.014	0.013	0.014	0.016	0.019
4	0.005	0.000	0.000		0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.006	0.006	0.010	0.012	0.014	0.014	0.013	0.014	0.016	0.019
5	0.099	0.101	0.101	0.101		0.001	0.000	0.000	0.013	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.013	0.011	0.013	0.013	0.013	0.015	0.014	0.018	0.018
6	0.099	0.101	0.101	0.101	0.002		0.001	0.001	0.013	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.013	0.011	0.013	0.013	0.013	0.015	0.014	0.018	0.018
7	0.099	0.101	0.101	0.101	0.000	0.002		0.000	0.013	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.013	0.011	0.013	0.013	0.013	0.015	0.014	0.018	0.018
8	0.099	0.101	0.101	0.101	0.000	0.002	0.000		0.013	0.014	0.014	0.014	0.013	0.013	0.013	0.011	0.013	0.013	0.013	0.015	0.014	0.018	0.018
9	0.122	0.120	0.120	0.120	0.112	0.112	0.112	0.112		0.001	0.001	0.001	0.013	0.015	0.015	0.013	0.014	0.013	0.013	0.016	0.014	0.019	0.017
10	0 124	0.122	0.122	0.122	0 1 1 3	0.113	0 1 1 3	0 113	0.002		0.000	0.000	0.013	0.015	0.015	0.013	0.015	0.013	0.013	0.016	0.014	0.019	0.018
11	0.124	0.122	0.122	0.122	0.113	0.113	0.113	0.113	0.002	0.000	0.000	0.000	0.013	0.015	0.015	0.013	0.015	0.013	0.013	0.016	0.014	0.019	0.018
12	0.124	0.122	0.122	0.122	0.113	0.113	0.113	0.113	0.002	0.000	0.000	0.000	0.013	0.015	0.015	0.013	0.015	0.013	0.013	0.016	0.014	0.019	0.018
12	0.124	0.122	0.122	0.122	0.007	0.007	0.007	0.007	0.002	0.000	0.000	0 104	0.015	0.013	0.013	0.013	0.015	0.013	0.013	0.010	0.014	0.015	0.018
13	0.110	0.108	0.108	0.108	0.097	0.097	0.097	0.097	0.104	0.104	0.104	0.104	0 100	0.014	0.014	0.015	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.016	0.010
14	0.026	0.022	0.022	0.022	0.104	0.104	0.104	0.104	0.126	0.127	0.127	0.127	0.108	0.000	0.000	0.010	0.012	0.014	0.014	0.013	0.014	0.016	0.019
15	0.026	0.022	0.022	0.022	0.104	0.104	0.104	0.104	0.126	0.127	0.12/	0.12/	0.108	0.000	0.070	0.010	0.012	0.014	0.014	0.013	0.014	0.016	0.019
16	0.065	0.064	0.064	0.064	0.082	0.082	0.082	0.082	0.108	0.110	0.110	0.110	0.108	0.068	0.068		0.012	0.013	0.014	0.013	0.014	0.015	0.017
17	0.092	0.091	0.091	0.091	0.101	0.101	0.101	0.101	0.118	0.120	0.120	0.120	0.122	0.092	0.092	0.089		0.016	0.016	0.013	0.014	0.017	0.019
18	0.124	0.122	0.122	0.122	0.098	0.098	0.098	0.098	0.099	0.101	0.101	0.101	0.096	0.120	0.120	0.110	0.128		0.001	0.017	0.015	0.017	0.018
19	0.126	0.124	0.124	0.124	0.099	0.099	0.099	0.099	0.101	0.099	0.099	0.099	0.096	0.122	0.122	0.111	0.130	0.002		0.017	0.015	0.017	0.018
20	0.103	0.101	0.101	0.101	0.124	0.124	0.124	0.124	0.133	0.133	0.133	0.133	0.111	0.101	0.101	0.094	0.099	0.146	0.146		0.014	0.015	0.017
21	0.113	0.111	0.111	0.111	0.120	0.120	0.120	0.120	0.108	0.110	0.110	0.110	0.110	0.115	0.115	0.106	0.111	0.120	0.122	0.111		0.018	0.018
22	0.148	0.146	0.146	0.146	0.170	0.170	0.170	0.170	0.178	0.180	0.180	0.180	0.142	0.138	0.138	0.135	0.140	0.148	0.150	0.126	0.163		0.019
23	0.184	0.182	0.182	0.182	0.166	0.166	0.166	0.166	0.165	0.166	0.166	0.166	0.170	0.184	0.184	0.161	0.168	0.170	0.172	0.172	0.166	0.178	

注:对角线以下为遗传距离,对角线以上为标准误差。1~4.中华通草蛉运城种群、邱县种群、鹿邑种群和安阳种群;5~8.丽草蛉运城种群、邱 县种群、鹿邑种群和安阳种群; 9~12. 大草蛉运城种群、邱县种群、鹿邑种群和安阳种群; 13. 叶色草蛉; 14. 普通草蛉1; 15. 普通草蛉 2; 16. 红 通草蛉; 17. 玉带尼草蛉; 18. 黑腹草蛉 1; 19. 黑腹草蛉2; 20. 白线草蛉; 21. 黄玛草蛉; 22. 花斑脉褐蛉; 23. 角纹脉褐蛉。

Note: The values below the diagonal and above the diagonal are genetic distance and standard error respectively. 1-4. Chrysoperla sinica populations from Yuncheng, Qiuxian, Luyi and Anyang; 5-8. Chrysopa formosa populations from Yuncheng, Qiuxian, Luyi and Anyang; 9-12. Chrysopa pallens populations from Yuncheng, Qiuxian, Luyi and Anyang; 13. Chrysopa phyllochroma; 14. Chrysoperla carnea 1; 15. Chrysoperla carnea 2; 16. Chrysoperla rufilabris; 17. Nineta vittata; 18. Chrysopa perla 1; 19. Chrysopa perla 2; 20. Cunctochrysa albolineata; 21. Mallada basalis; 22. Micromus variegatus; 23. Micromus angulatus.

3 讨论

中国草蛉资源丰富, 草蛉的分类及鉴定对天 敌资源保护及优势草蛉天敌物种的开发和利用具 有重要意义[17]。长期以来草蛉主要依赖传统形态

学的方法进行鉴定,分类方法的局限性使一些形 态特征相似或相近的种鉴定比较困难,关于草蛉 科的区系研究及分类目前仍存在很多争议[2,18-19]。 本研究运用 DNA 条形码技术,对草蛉亚科部分 昆虫进行系统发育分析,进而从分子水平上明确



注:图上数值为 ML/NJ 的自展值,%/%。

Note: Data in the figure was bootstrap values based on ML/NJ analyses, %/%.

图 1 基于 COI 基因序列的最大似然法 (ML)/邻接法 (NJ) 系统发育树

Fig. 1 Maximum likelihood (ML)/neighbor-joining (NJ) tree based on the analysis of COI gene sequence

不同草蛉的分类地位。运用无脊椎动物线粒体 COI 基因序列通用引物,对棉田常见的3种草蛉 COI 基因进行扩增和测序,序列拼接后在基因库 中进行 BLAST 搜索。结果显示:中华通草蛉、 大草蛉和丽草蛉 COI 基因序列与 NCBI 上登录的 草蛉类线粒体 COI 基因序列同源性在 95% 以 上,说明所测序列准确性强、可信度高。COI基 因序列相对保守,同种草蛉不同地理种群之间序 列差异很小。与 NCBI 下载的其他草蛉序列比较 分析发现:核苷酸在第3位点替换数为56,远大 于第1位点和第2位点的替换数。转换和颠换的 比值 R 可以用于评估序列的饱和度, R 值越低物 种的分歧时间越长,进化速率越快^[20]。密码子位 点分析表明: 第3位点的R值仅为0.4,低于第 1位点和第2位点。可见,第3位点的进化速率 最快。COI 基因结构稳定, 很少有插入和缺失基 因, 密码子第3位点碱基能够自由变异, 用以区 分近缘物种,因此,线粒体 COI 基因被广泛应用 于物种区分[21-23]。

在 DNA 条形码分析中,种内、种间遗传距

离间的差异程度是物种鉴定的判断标准之一。 HEBERT等^[24]对动物线粒体 COI 基因条形码进行 了大量研究,认为 98% 的物种种内遗传距离小 于 0.02,种间平均遗传距离差异为 11.3%。本研 究结果表明:地理来源对同种草蛉 COI 基因片段 序列的影响不大,草蛉种内平均遗传距离为 0.001,明显低于遗传距离为 0.02 的阈值,种间 的平均遗传距离为 0.116,种间遗传距离是种内 遗传距离的 116 倍,种内遗传距离明显小于种 间,符合 DNA 条形码鉴定物种的标准,表明 COI 基因序列适用于草蛉的分类鉴定。

基于 COI 基因的草蛉 ML/NJ 系统发育树的 拓扑结构分析发现:来自不同地理来源的同种草 蛉物种聚为同一小支,如大草蛉和丽草蛉等,且 分支自展值均为 100%;草蛉物种间的近缘种聚 集在一起,如普通草蛉、中华通草蛉和红通草蛉 (分支自展值≥82%);亲缘关系较远的物种间差 异表现较为明显,如白线草蛉和黄玛草蛉等。遗 传距离和系统进化树综合分析结果表明:同一属 内不同种间的遗传距离较小,亲缘关系较近;不 同属间的遗传距离较大,亲缘关系较远;外群褐 蛉科与草蛉科的10个种之间的亲缘关系较远, 遗传距离也较大,与草蛉形态学分类结果基本一致。

4 结论

草 較线粒体 COI 基因序列能够区分不同物种,证实基于 COI 基因的 DNA 条形码技术可以作为草 較物种鉴定的辅助工具。研究结果为草 較利昆虫 DNA 条形码数据库的构建提供了理论依据。

[参考文献]

- OSWALD J D, MACHADO R J P. Biodiversity of the Neuropterida (Insecta: Neuroptera, Megaloptera, and Raphidioptera)[M]//ROBERT G F, PETER H A. Insect biodiversity: science and society, volume II. Oxford: John Wiley & Sons Ltd., 2018.
- [2] 杨集昆. 我国富饶的草蛉资源对保护利用及世界草蛉 区系的意义[J]. 生物防治通报, 1988, 4(8): 131. DOI: 10. 16409/j.cnki.2095-039x.1988.03.011.
- [3] YI P, YU P, LIU J Y, et al. A DNA barcode reference library of Neuroptera (Insecta, Neuropterida) from Beijing[J]. ZooKeys, 2018, 807: 127. DOI: 10.3897/zoo keys.807.29430.
- [4] 池宇, 王诗迪, 张春田. 基于线粒体COI基因的双翅目 昆虫研究进展[J]. 昆虫分类学报, 2010, 32(S1): 71.
- [5] DAWNAY N, OGDEN R, MCEWING R, et al. Validation of the barcoding gene *COI* for use in forensic genetic species identification[J]. Forensic Science International, 2007, 173(1): 1. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.09.013.
- [6] 常虹,郝德君,肖荣堂,等.基于线粒体COI基因的齿小 蠹属昆虫DNA条形码研究[J].昆虫学报,2012,55(9): 1075. DOI: 10.16380/j.kcxb.2012.09.009.
- [7] DUMIDAE A, JANTHU P, SUBKRASAE C, et al. Genetic analysis of *Cryptozona siamensis* (Stylommatophora, Ariophantidae) populations in Thailand using the mitochondrial 16S rRNA and *COI* sequences[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0239264. DOI: 10.1371/journal.pone. 0239264.
- [8] KARTHIKA P, VADIVALAGAN C, THIRUMURU-GAN D, et al. DNA barcoding of five Japanese encephalitis mosquito vectors (*Culex fuscocephala, Culex gelidus, Culex tritaeniorhynchus, Culex pseudovishnui and Culex vishnui*)[J]. Acta Tropica, 2018, 183: 84. DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.04.006.
- [9] WINTRETON S, DE FREITAS S. Molecular phylogeny of the green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae)[J]. Australian Journal of Entomology, 2006, 45(3): 235. DOI: 10.1111/j.1440-6055.2006.00537.x.
- [10] HARUYAMA N, NAKA H, MOCHIZUKI A, et al. Mitochondrial phylogeny of cryptic species of the lacewing *Chrysoperla nipponensis* (Neuroptera: Chrysopidae) in Japan[J]. Annals of the Entomological Society of Ameria, 2008, 101(6): 971. DOI: 10.1603/0013-8746-101. 6.971.

- [11] PALOMARES-PÉREZ M, MORENO-RODRIGUEZ C, CONTRERAS-BERMUDEZ Y, et al. Molecular characterization of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) from commercial insectaries in Mexico[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(6): 6577. DOI: 10.1007/ S11033-019-05034-9.
- [12] 聂瑞娥,杨星科,刘志琦.日本通草蛉cDNA文库构建 及部分ESTs分析[J].昆虫学报,2008,51(8):792.DOI: 10.16380/j.kcxb.2008.08.008.
- [13] DAI Y T, WINTERTON S L, GARZON-ORDUNA I J, et al. Mitochondrial phylogenomic analysis resolves the subfamily placement of enigmatic green lacewing genus *Nothancyla* (Neuroptera: Chrysopidae)[J]. Austral Entomology, 2017, 56(3): 322. DOI: 10.1111/aen.12220.
- [14] JIANG Y L, GARZON-ORDUNA I J, WINTERTON S L, et al. Phylogenetic relationships among tribes of the green lacewing subfamily Chrysopinae recovered based on mitochondrial phylogenomics[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 7218. DOI: 10.1038/s41598-017-07431-1.
- [15] 张德华,周开亚,孙红英.乙醇保存的动物标本基因组 DNA提取方法的比较[J]. 生物学杂志, 2004, 21(6): 46. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1736.2004.06.016.
- [16] SIMON C, FRATI F, BECHENBACH A, et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. Annals of the Entomological Society of America, 1994, 87(6): 651. DOI: 10.1093/aesa/ 87.6.651.
- [17] 赖艳, 刘星月. 中国草蛉科天敌昆虫及其生防应用研究 进展[J]. 植物保护学报, 2020, 47(6): 1169. DOI: 10. 13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2020250.
- [18] 范仁俊,杨星科.中国的草蛉及其地理分布(脉翅目:草 蛉科)[J].昆虫分类学报,1995,6(17):42.
- [19] 杨星科,杨集昆,李文柱.中国动物志:昆虫纲 第三十 九卷 脉翅目 草蛉科[M].北京:科学出版社,2005.
- [20] KNIGHT A, MINDELL D. SUBSITITIONS. Weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic position of fea's viper[J]. Systematic Biology, 1993, 42(1): 18. DOI: 10.2307/2992554.
- [21] 张旭, 王柳玉, 万胜豪, 等. 基于COI基因的10种水螨 DNA条形码分析[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2020, 41(2): 55.
- [22] 高娅蓉, 熊康宁, 袁周伟, 等. 基于线粒体COI基因的 DNA条形码技术对小叶蝉亚科昆虫种类的分子鉴 定[J]. 西南农业学报, 2020, 3(2): 307. DOI: 10.16213/j. cnki.scjas.2020.2.015.
- [23] BAI M X, QING X, QIAO K K, et al. Mitochondrial COI gene is valid to delimitate Tylenchidae (Nematoda: Tylenchomorpha) species[J]. Journal of Nematology, 2020, 52: 1. DOI: 10.21307/jofnem-2020-038.
- [24] HEBERT P D, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2003, 270(suppl_1): 96. DOI: 10.1098/rsbl. 2003.0025.

责任编辑: 何謦成