

草原毛虫寄生蝇物种鉴定及其系统发育研究*

王海贞^{1**} 张剑霜^{2***}

(1. 吕梁学院生物与食品工程系, 吕梁 033000; 2. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550000)

摘要 【目的】充分挖掘草原毛虫 *Gynaephora qinghaiensis* 寄生天敌资源应用于草原毛虫的生物防治。【方法】在草原毛虫蛹期采集到一种寄生蝇, 采用形态学与 *CO I* 基因分子标记相结合的方法对该寄生蝇进行物种鉴定, 并对其系统发育关系进行研究。【结果】扩增的草原毛虫寄生蝇 *CO I* 基因序列长度为 571 bp, A、T、C、G 碱基含量分别为 40.63%、31.00%、14.54%、13.84%, AT 含量达 71.63%, GC 含量达 28.37%, 具有明显的 AT 偏好性; 基于形态学与分子水平, 草原毛虫寄生蝇被一致鉴定为寄蝇科 Tachinidae 鬃堤寄蝇属 *Chaetogena* 草毒蛾鬃堤寄蝇 *Chaetogena gynaephorae*; *Exorista larvarum*、*Tachinomyia nigricans*、*Parasetigena silvestris*、*Phorocera obscura*、*Gueriniopsis setipes*、*Chetogena gelida*、*Chetogena tessellata* 及 *Carcelia* sp. 等寄蝇科物种先后聚为一支, 然后再与草毒蛾鬃堤寄蝇聚为一支, 表明本研究采集的草毒蛾鬃堤寄蝇与寄蝇科其他物种亲缘关系较远。此外, 草毒蛾鬃堤寄蝇分支距离系统发育树根部较近, 表明其进化较早。【结论】本研究为草原毛虫寄生蝇的分子分类提供了标准化鉴定流程, 为草原毛虫寄生蝇物种鉴定奠定了基础。

关键词 草原毛虫寄生蝇; 物种鉴定; 系统发育; 生物防治

Species identification and phylogenetic studies of parasitic fly in *Gynaephora qinghaiensis*

WANG Hai-Zhen^{1**} ZHANG Jian-Shuang^{2***}

(1. Department of Biological and Food Engineering, Luliang University, Luliang 033000, China;

2. School of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550000, China)

Abstract 【Objectives】The natural enemies of *Gynaephora qinghaiensis* should be fully exploited for biological control of *G. qinghaiensis*. 【Methods】A parasitic fly was collected from the pupal stage of *G. qinghaiensis*. The species was identified by morphological method combined with molecular markers of *CO I* gene, and its phylogenetic relationship was studied. 【Results】The length of the amplified *CO I* gene was 571 bp, and the contents of A, T, C and G bases were 40.63%, 31.00%, 14.54% and 13.84%, respectively. The contents of AT and GC were 71.63% and 28.37%, respectively, showing obvious AT bias. The parasitic fly in *G. qinghaiensis* was unanimously identified as *Chaetogena gynaephorae* of the Tachinidae family based on morphology and molecular data. The species of Tachinidae, such as *Exorista larvarum*, *Tachinomyia nigricans*, *Parasetigena silvestris*, *Phorocera obscura*, *Gueriniopsis setipes*, *Chetogena gelida*, *Chetogena tessellata*, and *Carcelia* sp., were clustered and then grouped with *Chaetogena gynaephorae*, indicating that the *Chaetogena gynaephorae* collected in this study is not closely related to other Tachinidae species. In addition, the branch of *Chaetogena gynaephorae* was closer to the root of the phylogenetic tree than the other branches, indicating that this species diverged earlier. 【Conclusion】This study provides a standardized identification

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (82060779); 山西省高等学校科技创新项目 (2021L571); 吕梁市引进高层次人才重点研发项目 (2021RC-1-7)

**第一作者 First author, E-mail: 573367435@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: assassin1986@126.com

收稿日期 Received: 2022-12-07; 接受日期 Accepted: 2023-05-07

process for the molecular classification of parasitic flies in *G. qinghaiensis* and lays a foundation for their identification.

Key words parasitic fly in *Gynaephora qinghaiensis*; species identification; phylogeny; biological control

草原毛虫别名红头黑毛虫, 隶属昆虫纲 Insect 鳞翅目 Lepidoptera 毒蛾科 Lymantriidae 草原毛虫属 *Gynaephora*, 全世界共有 15 个种, 主要分布在北半球的高山以及北极的冻土地带, 尤以海拔 3 000 m 以上高原地区居多 (Yuan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017)。在我国分布的草原毛虫共有 8 个种, 全部为青藏高原特有种 (Wang *et al.*, 2020, 2021)。草原毛虫在青藏高原高寒牧区分布广, 对草地植被危害严重。据最新报道, 仅青海省玉树州高寒牧区草场的草原毛虫最大密度就达到 200.6 头/m², 且在布设的 10 个调查点中, 30% 的调查样地达到重度、极重度危害等级 (王海贞和刘昕, 2022)。

目前, 草原毛虫的防治主要依赖化学农药。但是, 化学农药的持续使用严重破坏了青藏高寒牧区的生态平衡, 加剧了农药残留污染 (Wang *et al.*, 2019; 郭丽等, 2023)。因此, 寻找合适的寄生天敌对草原毛虫进行生物防治成为必然途径。至今, 已经报道的草原毛虫寄生天敌共有 8 种, 其中, 严林等 (1994) 发现 7 种, 分别是草原毛虫金小蜂 *Pteromalus qinghaiensis*、草原毛虫姬小蜂 *Symiesis qinghaiensis*、姬蜂 *Ichneumonidae* spp.、草毒蛾鬃堤寄蝇 *Chaetogena gynaephorae*、多刺孔寄蝇 *Spoggosia echinura* 和古毒蛾追寄蝇 *Exorista larvarum*; 杨忠岐等 (2020) 发现 1 个寄生蜂新种——三江源草原毛虫金小蜂 *Pteromalus sanjiangyuanicus* Yang。为了挖掘更多的草原毛虫寄生天敌资源应用于草原毛虫的生物防治, 本研究对青海省玉树州治多县高寒草甸分布的草原毛虫蛹进行采集与调查, 发现了一种外寄生的寄生蝇。为了准确鉴定该寄生蝇的种类, 本研究采用形态学与分子生物学相结合的方法对其进行物种鉴定, 丰富了草原毛虫的天敌资源库。

DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 是基于一段具有足够变异、易扩增、相对较短的 DNA

基因片段进行物种识别的方法 (卢西西等, 2022), 它的原理是利用基因组 DNA 上一段标准的或者大家公认的基因片段作为分子标记来进行种级水平的种类鉴定。用于分子标记的 DNA 序列与整个基因组 DNA 相比要短得多, 而且非常容易获得 (岳巧云等, 2011)。线粒体 DNA (mitochondria DNA, mtDNA) 是一种群体遗传学研究常用的分子标记 (梁宏伟等, 2018; 王玲等, 2018), 具有进化速度快、母系遗传、基因重组缺失以及易于扩增等特点 (Djebbi *et al.*, 2018; Palraju *et al.*, 2018), 是国际公认的广泛应用于昆虫种类鉴别的分子生物学技术之一 (Janzen *et al.*, 2017; 李文杰等, 2023)。目前, 昆虫线粒体基因中结构与功能研究较为深入的是线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 基因, 在蜘蛛 (方文渊, 2017)、蓟马 (游中华等, 2007)、实蝇 (叶军等, 2007)、果蝇 (朱振华等, 2005) 等多种昆虫的物种分子鉴定以及系统发育研究中广为应用。但迄今为止, 尚未见利用 CO I 基因对寄生蝇类进行物种鉴定和系统发育研究。本研究通过扩增所采集的草原毛虫寄生蝇 CO I 基因, 并对其序列以及系统发育进行分析, 为草原毛虫寄生蝇的分子分类提供标准化鉴定流程, 为草原毛虫寄生蝇物种鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集与保存

草原毛虫寄生蝇采集自青海省玉树州治多县海拔 4 580 m 高寒草甸的草原毛虫蛹内, 采集地的地理坐标为 33°47'11.92" N, 95°49'8.84" E。采集的草原毛虫寄生蝇一部分制作成标本, 用于形态学物种鉴定, 另一部分浸泡于非冻型 DNA 组织保存液 (天恩泽, 北京, 中国), 4 °C 保存, 用于样品总 DNA 的提取及分子物种鉴定。

1.2 昆虫标本制作与形态学种类鉴定

将采集到的被寄生草原毛虫蛹带回实验室,并置于试管中饲养,管口用脱脂棉塞进以保持湿度,每天检查有无寄生蝇羽化。将羽化 3 d 后的寄生蝇用乙酸乙酯杀死,黏在三角纸板上制成针插标本(杨忠岐等,2015),在体视显微镜 Nikon SMZ15 (Nikon, Tokyo, Japan) 下观察并记录标本的体色及其躯体(头、胸、腹)、触角、足和翅的构造,根据《中国动物志·昆虫纲》(赵建铭等,2001)分类检索表记录的昆虫外部形态特征,逐条比对进行物种鉴定。草原毛虫寄生蝇形态学物种鉴定由中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室张古忍教授完成。

1.3 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因扩增

在采集的草原毛虫寄生蝇样品中,随机选取 3 个样品进行总 DNA 提取。样品总 DNA 提取参照基因组 DNA 提取试剂盒说明书(Axygen, Suzhou, China)进行。CO I 基因扩增引物设计参照寄蝇亚科 CO I 基因通用引物(池宇等,2011)。

上游引物为: 5'GGTCAACAAATCATAAAG ATATTGG-3',下游引物为: 5'-TAAACTTCAGGG TGACCAAAAAATCA-3'。

CO I 基因扩增反应体系和反应程序如表 1、表 2 所示。扩增完成后,通过 1%琼脂糖凝胶电泳法检测 COI 基因扩增效果,挑选扩增效果较好的样品,委托华大基因进行正反链双向测序,共获得双向 6 条序列。

表 1 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因扩增反应体系

Table 1 Amplification system of CO I gene of parasitic fly in *Gynaephora qinghaiensis*

反应试剂 Reaction reagent	体积 (μL) Volume (μL)
10×rTaq Buffer (20 mmol/L Mg ²⁺)	2.5
dNTP Mixture (2.5 mmol/L)	2.0
Sense Primer (10 μmol/L)	2.5
Antisense Primer (10 μmol/L)	2.5
rTaq DNA polymerase (5 U/μL)	0.1
DNA samples (40 ng/μL)	2.0
ddH ₂ O	13.4
共计 Total	25.0

表 2 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因扩增反应程序

Table 2 Amplification procedure of CO I gene of parasitic fly in *Gynaephora qinghaiensis*

步骤 Steps	温度 (°C) Temperature (°C)	时间 Duration	循环 Cycles
预变性 Pre-incubation	95	3 min	1
变性 Denaturation	95	40 s	
退火 Annealing	50	55 s	35
延伸 Elongation	72	1 min	
最后延伸 Final elongation	72	7 min	1

1.4 CO I 基因序列分析与系统发育树构建

1.4.1 CO I 基因序列拼接及碱基组成分析 利用 Seqman 软件对测序所得 6 条 CO I 基因正、反向序列进行拼接,删除头尾载体序列,通过观察测序峰图校正可疑位点,然后将拼接完成后的序列保存为 Fasta 格式的文件,并对拼接后的基因序列碱基组成进行统计分析。

1.4.2 CO I 基因序列在 NCBI 数据库比对及其用于构建系统发育树的物种选择 为证实寄生蝇物种形态学鉴定结果,本研究将测序得到的 CO I 基因序列在 NCBI 数据库 Nucleotide BLAST (Basic local alignment search tool) 功能下进行序列比对,根据物种 CO I 基因序列相似度进行寄生蝇物种分子鉴定;为探索草原毛虫寄生蝇在进化中的系统发育情况,从比对到的核酸序列中,挑选双翅目寄蝇科 Tachinidae 2 亚科 3 族 9 属 10 种寄生蝇 CO I 基因用于草原毛虫寄生蜂遗传关系的分析及系统发育树的构建,同时选取果蝇科 Drosophilidae,果蝇属 *Drosophila*,黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 作为外群(表 3)。选取的 CO I 基因序列通过登录号从 GenBank 中下载,并保存为 Fasta 格式文件,用于物种间基因序列比对和系统发育分析。

1.4.3 系统发育树构建 应用 Mega 6.0 软件,基于 Kimura 2-paramter 模型,计算物种间的遗传距离;应用 IQtree v2.0.6 软件,采用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统发育 M-L 树(Guindon and Gascuel, 2003)。

表 3 GenBank 中收录的 10 种寄生蝇 CO I 基因信息
Table 3 Information of CO I gene of ten parasitic flies from GenBank

亚科 Subfamilies	族 Tribes	属 Genera	种 Species	登录号 GenBank ID
Exoristinae	Exoristini	<i>Chetogena</i>	<i>Chetogena tessellata</i>	MG968006
			<i>Chetogena gelida</i>	KR656922
		<i>Tachinomyia</i>	<i>Tachinomyia nigricans</i>	KP899672
		<i>Phorocera</i>	<i>Phorocera obscura</i>	KX844009
		<i>Gueriniopsis</i>	<i>Gueriniopsis setipes</i>	MG967817
		<i>Parasetigena</i>	<i>Parasetigena silvestris</i>	KT103325
		<i>Exorista</i>	<i>Exorista larvarum</i>	JF869109
	Eryciini	<i>Carcelia</i>	<i>Carcelia</i> sp.	GU142147
Tachininae	Tachinini	<i>Peleteria</i>	<i>Peleteria aenea</i>	KU374653
		<i>Paradejeania</i>	<i>Paradejeania rutilioides</i>	MG968219
Drosophilidae		<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	KC750827

2 结果与分析

2.1 草原毛虫寄生蝇物种形态学鉴定

2.1.1 标本采集信息 分布: 青海省玉树州治多县 (33°47'11.92" N, 95°49'8.84" E)

研究标本: 正模: 1 ♂ 1 ♀, 青海省玉树州治多县, 海拔 4 580 m, 2017-VIII-23; 由作者采集自草原毛虫雄性蛹和雌性蛹, 标本保存在国家教育部食品与健康工程研究中心; 副模: 4 ♀, 3 ♂, 采集信息同正模。

生物学: 寄生于草原毛虫蛹外, 为外寄生。

2.1.2 形态学特征描述 **雄** (图 1: A-J): 雄性成虫体型中等, 腹部膨大, 体色黑色, 全身被黑色毛或鬃。

头部 (图 1: C-F) 黑色, 覆银白色粉被, 后头向后方拱起; 头顶各具一对内顶鬃和外顶鬃, 眼后鬃较密、黑色, 外顶鬃与眼后鬃明显分离; 具一对复眼, 被灰白色细短毛, 3 个单眼呈倒三角型排列, 单眼鬃较为发达; 额宽为复眼宽的 1.5 倍, 间额黑色, 有 4 根额鬃下降至侧颜, 最前方一根触角芒着生下方; 后头毛浓密, 浅黄色; 颜堤密被黑色颜堤鬃, 颜堤鬃上升至颜堤上方的 1/3 处; 触角黑色, 上着生黑色触角芒, 触角芒基本 2/5 处显著加粗 (图 1: D); 髭黑色, 粗长, 位于口缘上方水平。下颏须中等大小, 黑

色; 唇瓣 (图 1: C) 较小, 口盘较小, 长度不超过中喙长的 1/3。

胸部 (图 1: G, H) 较腹部短, 前胸背板前部与中胸背板前方相愈合, 并与头部相连; 肩甲上密被肩鬃; 中胸背板由盾片、小盾片、后盾片、后背片和侧背片组成, 中胸盾片和背片密被黑色细长鬃毛, 小盾片黄色, 小盾端鬃发达, 小盾亚端鬃粗长。前胸、中胸和后胸 (图 1: B, E) 各具一对黑色足, 分别为前足、中足和后足, 足上被黑色鬃, 其中腿节和胫节鬃较粗长, 较密, 跗节鬃较短, 较稀疏。翅 (图 2) 色浅透明, 前缘由 5 个脉段组成, 前缘刺较短; 中肘横脉与肘脉在端部 1/3 处交接, 中肘横脉位于中室端部 1/3 处; 中脉心角为锐角, 后具 1 条黑色赘脉向翅后缘略延伸; 下腋瓣正常, 外侧不向下方弯曲; 中肘横脉和端横脉两侧具轻微黑晕, 在径中横脉上具一黑斑, 第五径室在翅顶前方闭合。

腹部 (图 1: E, I, G) 黑色, 较短且膨大; 腹背面有 5 块背板组成, 其中第 1 和第 2 块背板愈合为第 1+2 合背板, 背板两侧为相应的背板所压盖, 背板上密生细长黑色心鬃和缘鬃, 但排列不规则, 末端细长, 基部宽, 后表面周围被黑毛。

雌 (图 1: K-L): 雌性成虫与雄性相似, 体黑色, 比雄性略大; 额宽为复眼的 1.7 倍, 侧颜略窄于触角第 3 节, 触角第 3 节为第 2 节长的 2 倍, 腹部末端略钝。

2.1.3 形态学鉴定结果 根据《中国动物志·昆虫纲·双翅目·寄蝇科》中追寄蝇亚科 Exoristinae 追寄蝇族的属分类检索表和种分类检索表(赵建铭等, 2001), 本研究的草原毛虫寄生蝇与鬃堤寄蝇属 *Chaetogena* 草毒蛾鬃堤寄蝇 *Chaetogena gynaephorae* 形态特征相近, 故认为本研究采集的寄生蝇为寄蝇科 Tachinidae 鬃堤寄蝇属草毒蛾鬃堤寄蝇。

2.2 CO I 基因扩增结果与序列分析

2.2.1 CO I 基因扩增质量检测 1%的琼脂糖电泳检测结果显示, 扩增的草原毛虫寄生蝇 CO I 基因电泳条带清晰明亮, 无拖尾, 无游离片段(图 3)。通过与 DNA Marker 2000 比对, 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因电泳条带在 500-750 bp。

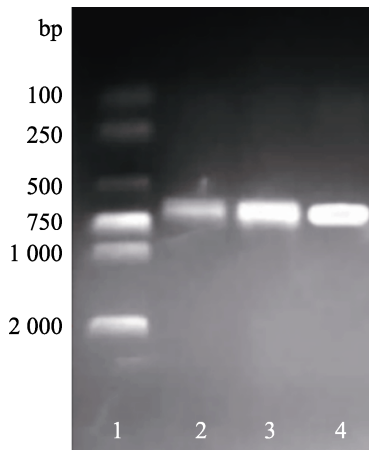


图 3 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因扩增产物电泳检测结果
Fig. 3 Electrophoretic detection of amplification products from CO I gene of parasitic fly in *Gynaephora qinghaiensis*

第 1 泳道为 DNA Marker 2000, 第 2-4 泳道为草原毛虫寄生蝇 CO I 基因扩增产物。

Lane 1 from left was DNA Marker 2000, Lane 2-4 were the amplification products from CO I gene of parasitic flies.

GCTAATACTGGTAATGATAATAATAATAAAGCTGTAATACTACTGATCAAACAATAAAGGTATTCGGTCTAA
TGTAATAATTTGTTGATCGTATATTAATTACTGTTGTAATAAAATTTACAGCCCCCAAATTGATGAAATTCAGCTAA
ATGAAGAGAAAAATAGCTAAATCAACAGAAGCTCCTCCATGAGCAATTACTGAAGATAAAGGTGGATAAACTGT
TCATCCTGTTCCAGCTCCGTTTTCTACTATACTACTTGCTAATAAAAGTGTTAATGAAGGAGGAAGTAATCAAAAA
CTTATATTATTTATTCGTGGGAAAGCTATATCTGGAGCTCCTAATATTAAAGGAACTAACCAATTTCCAAATCCTCCA
ATTATAATTGGTATTACTATAAAAAAATTATAATAAATGCATGAGCTGTTACAATAACATTATAAATTGATCATCTC
CAATTAAAGAACCAGGATGACCTAATTCAGTCGAATTAATACTTAAGAAGTGA

图 4 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因序列

Fig. 4 CO I gene of parasitic fly in *Gynaephora qinghaiensis*

2.2.2 CO I 基因序列分析与物种分子鉴定 碱基组成分析结果显示, 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因扩增产物序列长度约 571 bp (图 4), A、T、C、G 碱基含量分别为 40.63%、31.00%、14.54%、13.83%, AT 含量达 71.63%, GC 含量达 28.37%, AT 含量显著高于 GC 含量, 具有明显的 AT 偏好性。

NCBI 数据库 Blast 结果(表 4)显示, 草原毛虫寄生蝇 CO I 基因与寄蝇科 Tachinidae 2 亚科 3 族 9 属 22 种昆虫的 125 条序列具有较高的相似度, 其中比对到鬃堤寄蝇属 *Chaetogena* 的序列最多, 为 84 条, 占总比对序列的 67.7%, 并且与鬃堤寄蝇属 *Chaetogena* 草毒蛾鬃堤寄蝇的 CO I 基因序列相似度最高, 为 97%, 从分子标记水平支持了形态学物种鉴定结果。

2.3 系统发育研究

遗传距离计算结果如表 5 所示, 经形态学鉴定的草毒蛾鬃堤寄蝇与 *Peleteria aenea* 遗传距离最小为 1.207, 与 *Tachinomyia nigricans* 遗传距离最大, 为 1.474, 说明进化过程中, 本研究采集的草原毛虫寄生蝇与 *Peleteria aenea* 亲缘关系最近, 与 *Tachinomyia nigricans* 亲缘关系最远。

基于 CO I 基因构建的系统发育 M-L 树如图 5 所示, 黑腹果蝇作为外群物种, 与寄蝇科物种分离并单独形成一支; 除 *Exorista larvarum* 与 *Tachinomyia nigricans*, *Parasetigena silvestris* 与 *Phorocera obscura* 明显聚为两类外, 其他参与建树的物种并没有明确的分类结构; *Exorista larvarum*、*Tachinomyia nigricans*、*Parasetigena silvestris*、*Phorocera obscura*、*Gueriniopsis*

表 4 草莓蛾鬃堤寄蝇 CO I 基因在 NCBI 数据库中的比对结果

Table 4 Comparison of CO I genes of *Chaetogena gynaephorae* in NCBI database

亚科 Subfamilies	族 Tribes	属 Genera	种 Species	匹配的序列数 Number of hits
Exoristinae	Exoristini	<i>Chetogena</i>	<i>Chetogena tschorsnigi</i>	1
			<i>Chetogena tessellata</i>	2
			<i>Chetogena gelida</i>	1
		<i>Chaetogena</i>	<i>Chaetogena gynaephorae</i>	80
		<i>Tachinomyia</i>	<i>Tachinomyia nigricans</i>	4
		<i>Phorocera</i>	<i>Phorocera obscura</i>	6
			<i>Phorocera grandis</i>	2
			<i>Phorocera assimilis</i>	3
			<i>Phorocera slossonae</i>	8
			<i>Phorocera</i> sp.	1
			<i>Exorista larvarum</i>	2
		<i>Exorista</i>	<i>Exorista deligata</i>	3
			<i>Exorista bisetosa</i>	1
			<i>Exorista doddi</i>	1
			<i>Exorista ladelli</i>	1
			<i>Exorista globosa</i>	1
		<i>Gueriniopsis</i>	<i>Gueriniopsis setipes</i>	1
		<i>Parasetigena</i>	<i>Parasetigena silvestris</i>	3
			<i>Parasetigena bicolor</i>	1
			<i>Carcelia</i> sp.	1
Tachininae	Eryciini	<i>Carcelia</i>	<i>Carcelia</i> sp.	1
	Tachinini	<i>Peleteria</i>	<i>Peleteria aenea</i>	1
		<i>Paradejeania</i>	<i>Paradejeania rutilioides</i>	1
Total	3	9	22	125

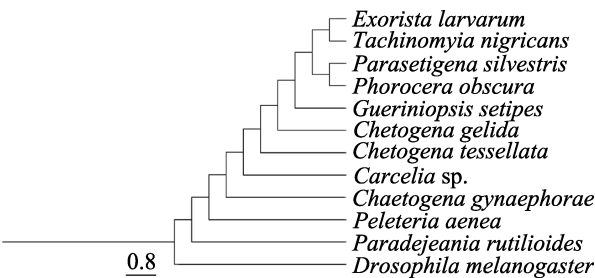


图 5 基于 CO I 基因构建的寄生蝇系统发育 M-L 树

Fig. 5 Phylogenetic M-L tree of parasitic fly based on CO I gene

setipes、*Chetogena gelida*、*Chetogena tessellata*、*Carcelia* sp.等寄蝇科物种先后聚为一支,然后再与草莓蛾鬃堤寄蝇聚为一支。

3 讨论

寄生天敌昆虫种类鉴定是害虫生物防控的前提,而建立在形态学特征观察基础上的物种鉴定,通常情况下会因为观察者存在主观性而导致物种鉴定不准确,同时,传统的形态学鉴别技术需要由专业的高技术人员识别,而且受样本保存情况、样品发育阶段、细微差异的近缘种等因素的限制(何艳霞等, 2017; 卢西西等, 2022)。随着 DNA 条形码技术在昆虫分类学中的应用,利用形态学观察与分子生物学相结合的技术逐渐取代了单一依靠的形态学观察的物种鉴定方法,

表 5 基于寄蝇科 *CO I* 基因的遗传距离矩阵
Table 5 The matrix of genetic distance for Tachinidae based on *CO I* gene

<i>Carcelia</i> sp.	<i>Chetogena</i> <i>gelida</i>	<i>Chetogena</i> <i>tessellata</i>	<i>Exorista</i> <i>larvarum</i>	<i>Gueriniopsis</i> <i>setipes</i>	<i>Paradejeania</i> <i>rutilioides</i>	<i>Parasetigena</i> <i>silvestris</i>	<i>Peleteria</i> <i>aenea</i>	<i>Phorocera</i> <i>obscura</i>	<i>Tachinomyia</i> <i>nigricans</i>	<i>Chaetogena</i> <i>gynaephorae</i>
<i>Carcelia</i> sp.										
<i>Chetogena gelida</i>	0.159									
<i>Chetogena tessellata</i>	0.128	0.063								
<i>Exorista larvarum</i>	0.148	0.105	0.088							
<i>Gueriniopsis setipes</i>	0.152	0.095	0.074	0.091						
<i>Paradejeania rutilioides</i>	0.177	0.174	0.163	0.178	0.178					
<i>Parasetigena silvestris</i>	0.135	0.081	0.063	0.063	0.070	0.170				
<i>Peleteria aenea</i>	0.164	0.161	0.126	0.153	0.166	0.104	0.158			
<i>Phorocera obscura</i>	0.125	0.088	0.067	0.063	0.081	0.158	0.032	0.154		
<i>Tachinomyia nigricans</i>	0.139	0.105	0.074	0.066	0.077	0.190	0.052	0.166	0.056	
<i>Chaetogena gynaephorae</i>	1.259	1.241	1.331	1.447	1.449	1.266	1.385	1.207	1.414	1.474
<i>Drosophila melanogaster</i>	0.176	0.157	0.133	0.170	0.153	0.162	0.158	0.137	0.162	1.248

为物种鉴定提供了更加全面的证据,也为发现隐存种、新物种提供了新依据 (Ogden and Lindsay, 2016; 杨锦等, 2017)。

寄蝇科昆虫的形态特征十分相似,给形态学物种鉴定带来了一定困难。同时,由于鉴定者参考的资料和主观原因,样品的鉴定往往会有一定的出入。因此,有必要在形态鉴定的同时结合 DNA 条形码技术对样品进行双重鉴定。迄今为止,利用 DNA 条形码技术对寄蝇科物种进行分类及系统发育的相关研究较少。池宇等 (2011) 研究表明,寄蝇亚科 6 个物种 DNA 条形码分类与形态学分类的结果一致;智妍等 (2016) 研究认为,寄蝇亚科、寄蝇族分别为一个单系群;这些研究都证明可以用 DNA 条形码技术探讨寄蝇科、亚科、族、属、种分类单元的系统发育和进化关系。本研究采用形态学与 *CO I* 分子标记相结合的方法对该寄生蝇进行物种鉴定,形态学观察到本研究采集到的寄生蝇头顶各具一对内顶鬃和外顶鬃,眼后鬃较密、黑色,外顶鬃与眼后鬃明显分离,这是鬃堤寄蝇属寄生蝇的典型特征,鉴于样品来自草原毛虫蛹,因此,初步将草原毛虫寄生蝇鉴定为草毒蛾鬃堤寄蝇;序列比对结果也显示,本研究采集到的寄生蝇与草毒蛾鬃堤寄蝇 *CO I* 基因序列相似度最高,达 97%,从分子标记水平证实了形态学鉴定结果的正确性。

一直以来,利用线粒体 *CO I* 基因进行物种鉴定由于缺乏统一的区分标准而存在很大争议,即序列差异达到什么程度才能明确为两个不同的物种 (肖金花等, 2004; 岳巧云等, 2011)。Hajibabaei 等 (2006) 研究表明,绝大多数物种的 *CO I* 基因表现出较低的种内遗传差异及较高的种间差异,因此 *CO I* 基因完全可以作为一个稳定的分子标记将两个不同物种分开。鉴于此,加拿大人保尔·赫伯特提出要为生命建立条形码,并成立生命条形码协会 (Consortium for the Barcode of Life, CBOL), 在全球范围内发起运用条形码技术进行物种鉴定的科学研究活动,把线粒体 *CO I* 作为分子标记鉴定物种提升到一个历史高度。此外,很多学者认为,仅仅利用一个基因的分子标记进行物种鉴定时,可能存在一定

的误差风险 (吴文珊等, 2013), 因此今后应利用线粒体 *CO II*、*Cytb* 基因及核糖体 16S、28S 基因对草原毛虫寄生蝇进行更加全面的分子生物学物种鉴定。

关于寄蝇科的分类鉴定,由于一些研究者对寄蝇复杂的形态特征认知不足,导致所建立的分类阶元不恰当。寄蝇科被一些分类学家分为大约 60 个不同的科,实际上这些科还不及一般亚科的等级 (赵建铭等, 2001)。由于寄蝇科昆虫分类阶元的模糊,因此,在进行寄生蝇系统发育研究时尽量选择不同属及不同亚科的物种进行遗传关系分析,本研究挑选双翅目寄蝇科 Tachinidae 亚科 3 族 9 属 10 种寄生蝇 *COI* 基因进行系统发育研究,结果显示, *Exorista larvarum*、*Tachinomyia nigricans*、*Parasetigena silvestris*、*Phorocera obscura*、*Gueriniopsis setipes*、*Chetogena gelida*、*Chetogena tessellata*、*Carcelia* sp. 等寄蝇科物种先后聚类,再与草毒蛾鬃堤寄蝇聚为一支,表明本研究采集的草原毛虫寄生蝇与寄蝇科其他物种亲缘关系较远。此外,草原毛虫寄生蝇分支距离系统发育树根部较近,表明其进化较早。尽管线粒体基因组被认为是一种有效的系统发育分子方法,被广泛应用于昆虫的系统发育研究,但是,目前草毒蛾鬃堤寄蝇的线粒体基因组还未完全测序,本研究已测序的 *CO I* 基因仅代表非常有限的遗传信息。因此,对于草毒蛾鬃堤寄蝇系统发育的研究仍需对更多样品进行线粒体全基因组测序,才能为草毒蛾鬃堤寄蝇起源及进化分析提供更为全面、科学的数据信息。

参考文献 (References)

- Chi Y, Zhi Y, Wang SD, Zhang CT, 2011. The DNA barcoding of *COI* gene in some species of Tachininae (Diptera: Tachinidae). *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science)*, 29(3): 434–438. [池宇, 智妍, 王诗迪, 张春田, 2011. 寄蝇亚科部分物种线粒体 *COI* 基因 DNA 条形码分类. 沈阳师范大学学报 (自然科学版), 29(3): 434–438.]
- Djebbi S, Amara WB, Bouktila D, Makni H, Makni M, Mezghani KM, 2018. Assessment of pea weevil *Bruchus pisorum* (Coleoptera: Bruchidae) genetic diversity based on mitochondrial *COI* gene sequences. *African Entomology*, 26(1): 95–103.

- Fang WY, 2017. Species identification and phylogeny analysis of cropland spiders based on DNA barcodes and mitogenomes. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [方文渊, 2017. 基于 DNA 条形码和线粒体基因的农田蜘蛛种类鉴定及系统发育分析. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量大学.]
- Guindon S, Gascuel O, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696–704.
- Guo L, Chen HB, Wu CX, Zhang SF, Kong XB, Liu F, Zhang Z, 2023. Advances in the development of oviposition-resistant plants. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(2): 463–474. [郭丽, 陈海波, 武承旭, 张苏芳, 孔祥波, 刘福, 张真, 2023. 植食性昆虫产卵诱导寄主植物抗虫机制研究进展. 应用昆虫学报, 60(2): 463–474.]
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burna JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS*, 103(4): 968–971.
- He YX, Chen XD, Fan SS, Luo HB, 2017. Application of molecular phylogeny based on mitochondrial *COI* gene in identification of simuliidae. *Genomics and Applied Biology*, 36(7): 2826–2831. [何艳霞, 陈晓丹, 樊莎莎, 罗洪斌, 2017. 基于 *COI* 基因的分子系统发育分析在蚋科昆虫鉴定中的应用. 基因组学与应用生物学, 36(7): 2826–2831.]
- Janzen DH, Burns JM, Cong Q, Hallwachs W, Dapket T, Manjunath R, Hajibabaei M, Hebert PDN, Grishin NV, 2017. Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology. *PNAS*, 114(31): 8313–8318.
- Li WJ, Chen ZL, Zhou SY, 2022. Phylogenetic study of the Camponotini (Hymenoptera: Formicidae) based on mitochondrial *COI* gene variation. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 59(6): 1347–1361. [李文杰, 陈志林, 周善义, 2022. 基于线粒体 *COI* 基因的弓背蚁族系统发育研究. 应用昆虫学报, 59(6): 1347–1361.]
- Liang HW, Meng Y, Luo XZ, Li Z, Zou GW, 2018. Genetic diversity of six *Monopterus albus* populations based on *COI* gene sequences. *Journal of Fishery Sciences of China*, 25(4): 837–846. [梁宏伟, 孟彦, 罗相忠, 李忠, 邹桂伟, 2018. 基于线粒体 *COI* 基因的 6 个黄鳝群体遗传多样性. 中国水产科学, 25(4): 837–846.]
- Lu XX, Chen ZJ, Xie YY, Xia Q, Lu YJ, 2022. Molecular identification and phylogenetic analysis on *Psychoda alternata* based on the *COI* gene in Hainan. *Journal of Medical Pest Control*, 38(5): 467–471. [卢西西, 陈子杰, 解芸芸, 夏琪, 芦亚君, 2022. 基于 *COI* 基因的海南星斑蛾蚋分子鉴定及系统发育分析. 医学动物防制, 38(5): 467–471.]
- Ogden NH, Lindsay LR, 2016. Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: ticks are different. *Trends in Parasitology*, 32(8): 646–656.
- Palraju M, Paulchamy R, Sundaram J, 2018. Population genetic structure and molecular diversity of *Leucinodes orbonalis* based on mitochondrial *COI* gene sequences. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(8): 1231–1239.
- Wang HZ, Liu X, 2022. Distribution of *Gynaephora qinghaiensis* population and its effect on habitat grassland vegetation in Yushu prefecture. *Journal of Environmental Entomology*, 44(4): 891–902. [王海贞, 刘昕, 2022. 玉树州境内草原毛虫种群分布及其对生境草场植被的影响. 环境昆虫学报, 44(4): 891–902.]
- Wang HZ, Zhong X, Gu L, Li SS, Zhang GR, Liu X, 2019. Analysis of the *Gynaephora qinghaiensis* pupae immune transcriptome in response to parasitization by *Thektogaster* sp. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 100(3): e21533.
- Wang HZ, Zhong X, Lin HF, Li SS, Yi JQ, Zhang GR, Liu X, Gu L, 2021. Genetic diversity and population structure of *Gynaephora qinghaiensis* in Yushu prefecture, Qinghai province based on the mitochondrial *COI* gene. *Biochemical Genetics*, 59(6): 1396–1412.
- Wang HZ, Zhong X, Zhang GR, Liu X, Gu L, 2020. Transcriptome characterization and gene expression analysis related to immune response in *Gynaephora qinghaiensis* pupae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2): 458–469.
- Wang L, Li Q, Kong LF, Yu H, 2018. Population genetic structure and demographic history of *Barbatia virescens* along Chinese coast based on mitochondrial *COI* sequences. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 49(1): 87–95. [王玲, 李琪, 孔令锋, 于红, 2018. 基于 *COI* 基因的中国沿海青蚶野生群体遗传结构及种群动态研究. 海洋与湖沼, 49(1): 87–95.]
- Wu WS, Chen YL, Sun LL, Mao JP, Yang WX, Wang AF, 2013. The molecular genetic relationship between the pollinators of *Ficus pumila* var. *pumila* and *Ficus pumila* var. *Awkeotsang*. *Acta Ecologica Sinica*, 33(19): 6049–6057. [吴文珊, 陈友铃, 孙伶俐, 毛建萍, 杨问新, 王爱芳, 2013. 基于 28S, *COI* 和 *Cytb* 基因序列的薜荔和爱玉子传粉小蜂分子遗传关系研究. 生态学报, 33(19): 6049–6057.]
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy. *Acta Zoologica Sinica*, 50(5): 852–855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学新动向——DNA 条形码编码. 动物学报, 50(5): 852–855.]
- Yan L, Liu ZK, Mei JR, Huo KK, Lan JH, 1994. A preliminary observation on the natural enemy species in pupae of grassland caterpillar. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*

- in Qinghai, 24(6): 15–16. [严林, 刘振魁, 梅洁人, 霍科科, 兰景华, 1994. 草原毛虫蛹期寄生天敌种类初步观察. 青海畜牧兽医杂志, 24(6): 15–16.]
- Yang J, Cao LJ, Geng YF, Wei DF, Chen M, 2017. Determination of the complete mitochondrial genome of *Thyestilla gebleri* and comparative analysis of the mitochondrial genome in Cerambycidae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 54(5): 755–766. [杨锦, 曹利军, 耿涌鑫, 魏丹峰, 陈敏, 2017. 麻竖毛天牛线粒体基因组测定及天牛科线粒体基因组比较分析. 应用昆虫学报, 54(5): 755–766.]
- Yang ZQ, Wang XY, Zhong X, Liu X, Cao LM, Wang HZ, 2020. A new species of *Pteromalus* (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitizing pupa of *Gynaephora qinghaiensis* (Lepidoptera: Lymantriidae) from Qinghai-Tibet Plateau. *Scientia Silvae Sinicae*, 56 (2): 99–105. [杨忠岐, 王小艺, 钟欣, 刘昕, 曹亮明, 王海贞, 2020. 寄生青海草原毛虫的金小蜂一新种 (膜翅目: 金小蜂科). 林业科学, 56(2): 99–105.]
- Yang ZQ, Yao YX, Cao LM, 2015. A Small Bee That Parasitises a Leaf-Eating Pest of Forest Trees. Beijing: Science Press. 26–27. [杨忠岐, 姚艳霞, 曹亮明, 2015. 寄生林木食叶害虫的小蜂. 北京: 科学出版社. 26–27.]
- Ye J, Zhou GL, Yi JP, Wu JJ, Ruan CH, Liang F, Zheng JZ, Wang WB, 2007. Molecular identification for larvae of *Ceratitis capitata*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(4): 562–566. [叶军, 周国梁, 易建平, 吴家教, 阮长浩, 梁帆, 郑建中, 王文兵, 2007. 地中海实蝇幼虫分子鉴定. 昆虫知识, 44(4): 562–566.]
- You ZH, Lu H, Zhang XS, Feng JN, Shi BC, Gong YJ, Huang DW, 2007. Molecular identification of the introduced western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and other eight common thrips species (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 720–726. [游中华, 路虹, 张宪省, 冯纪年, 石宝才, 宫亚军, 黄大卫, 2007. 入侵害虫西花蓟马及其他 8 种常见蓟马的分子鉴定. 昆虫学报, 50(7): 720–726.]
- Yuan ML, Zhang QL, Guo ZL, Wang J, 2016. The complete mitochondrial genome of *Gynaephora alpherakii* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(3): 2270–2271.
- Yue QY, Qiu DY, Huang YW, Liu GX, 2011. Application of DNA barcoding to species identification of an unknown insect larva. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 21(3): 615–617. [岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 刘国雄, 2011. DNA 条形码技术在未知昆虫幼虫种类鉴定中的应用. 中国卫生检验杂志, 21(3): 615–617.]
- Zhang L, Zhang QL, Wang XT, Yang XZ, Li XP, 2017. Selection of reference genes for qRT-PCR and expression analysis of high-altitude-related genes in grassland caterpillars (Lepidoptera: Erebiidae: *Gynaephora*) along an altitude gradient. *Ecology and Evolution*, 7(21): 9054–9065.
- Zhao JM, Liang EY, Shi YS, 2001. Zoography of China Insecta (Volume 23), Diptera, Tachinidae (1). Beijing: Science Press. 162–164. [赵建铭, 梁恩义, 史永善, 2001. 中国动物志·昆虫纲 (第二十三卷) 双翅目寄蝇科(一). 北京: 科学出版社. 162–164.]
- Zhi Y, Li X, Liu JY, Ge ZP, Zhao Z, Zhang CT, 2016. Molecular phylogenetic analysis of some Tachininae species (Diptera: Tachinidae) from China based on 28S rRNA gene sequences. *Genomics and Applied Biology*, 35(8): 1999–2006. [智妍, 李新, 刘家宇, 葛振萍, 赵喆, 张春田, 2016. 基于 28S rRNA 基因序列的中国寄蝇亚科部分种类分子系统发育研究(双翅目: 寄蝇科). 基因组学与应用生物学, 35(8): 1999–2006.]
- Zhu ZH, Ye H, Zhang ZY, 2005. Molecular identification of six *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA. *Acta Entomologica Sinica*, 48(3): 386–390. [朱振华, 叶辉, 张智英, 2005. 基于 mtDNA Cytb 的六种果实蝇的分子鉴定(双翅目: 实蝇科). 昆虫学报, 48(3): 386–390.]