

华山松不同生态位上蚜虫的快速鉴定 ——基于 DNA 条形码*

陈睿^{1,2} 姜立云¹ 乔格侠^{1**}

(1. 中国科学院动物进化与系统学重点实验室 北京 100101; 2. 中国科学院大学 北京 100193)

摘要 DNA 条形码技术是利用一个短的 DNA 标记对生物进行快速鉴定。模糊式快速鉴定则是在当前数据库信息不足的情况下利用 DNA 条形码技术,结合形态测量学在短时间内完成大量样品的鉴定。华山松 (*Pinus armandii* Franch) 是我国特有的重要用材树种之一,蚜虫是华山松的重要害虫,对其快速准确的鉴定有助于害虫的准确而有效的防治。本文以华山松上的蚜虫为研究对象,基于线粒体 COI 序列构建了 NJ 树,采自不同地区华山松上的蚜虫样品分为 13 个支,各节点的支持率均达到 90% 以上,蚜虫种内个体间平均遗传距离在 0~0.0536 之间,种间遗传距离在 0.0554~0.1444 之间。分析结果表明,不同的蚜虫种类占据华山松上不同的部位,取食部位多样性的分化是蚜虫物种竞争并占据不同生态位的结果。模糊式快速鉴定不仅能够快速的区分华山松上的不同蚜虫物种,而且有助于发现隐存分类单元。在当前数据库信息量不足的情况下,模糊式快速鉴定是在短时间内解决大量样品物种分类的行之有效的办法。

关键词 华山松, 蚜虫, DNA 条形码, 模糊式, 快速鉴定

DNA barcoding in rapid identification of aphids on *Pinus armandii*

CHEN Rui^{1,2} JIANG Li-Yun¹ QIAO Ge-Xia^{1**}

(1. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract DNA barcoding is a technique for identifying species using a short sequence of DNA. DNA barcoding combined with morphometry can be used to rapidly identify a large number of specimens when there is insufficient information for full species identification. Aphids are one of the most common pests of *Pinus armandii* Franch, an important endemic Chinese timber species. Rapid and accurate identification of these pests can contribute to effective prevention and control. This paper evaluates the usefulness of DNA barcoding with respect to aphids on *P. armandii*, Neighbour-Joining (NJ) tree was constructed based on mitochondrial COI sequences. Aphids from different locations on *P. armandii* formed 13 distinct clusters. Bootstrap values of nodes exceeded 90%. Average intra-species divergences were 0–0.0536 whereas inter-specific divergences were 0.0554–0.1444. DNA barcoding analysis revealed that different aphid species live on different parts of *P. armandii*. Competition between aphid species has lead to differentiation in feeding sites. A combination of DNA barcoding and morphometry not only quickly distinguished different aphid species on *P. armandii*, but also detected morphologically cryptic species. Despite the lack of data in the species' database, rapid identification is an effective method to resolve the identification of a large number of specimens in a short time.

Key words *Pinus armandii*, aphids, DNA barcoding, fuzzy type, rapid identification

蚜虫类 Aphidinea 昆虫隶属于昆虫纲 Insecta 半翅目 Hemiptera, 世界已知 4 700 余种 (von Dohlen *et al.*, 2006)。中国蚜虫类资源丰富, 已知种类 1 000 余种 (Qiao and Zhang, 2004)。很多蚜虫是农林经济植物上的重要害虫。蚜虫个体微小, 但取食植物后可造成植物变形、生长缓慢或停滞,

* 资助项目: 科技部基础工作专项 (2011FY120200); 国家杰出青年基金 (31025024); 国家自然科学基金委动物学特殊学科点 (J0930004) 和中国科学院动物进化与系统学重点实验室开放课题 (0529YX5105)。

** 通讯作者, E-mail: qiaogx@ioz.ac.cn

收稿日期: 2012-09-20, 接受日期: 2012-11-30

传播多种植物病毒,严重时可致植株死亡(张广学,1999)。因此,对华山松上为害的蚜虫进行快速而准确鉴定显得尤为重要。但是,由于蚜虫本身形态特征的特化或退化,致使可用于系统分类的有效形态特征相对比较有限。仅依据形态特征鉴定物种相对比较困难,且周期较长。

DNA 条形码(DNA barcoding)则是解决这类问题的有效手段之一,是利用一段短的标准序列对物种进行鉴定的新方法(Hebert *et al.*, 2003, 2004),具有快速、准确、重复性强等特点,为形态相近的物种的鉴定开拓了新的思路,如 Hebert 等(2004)成功运用线粒体 COI 序列对动物物种进行分类鉴定;也为快速物种鉴定,发现形态意义上的隐存分类单元等方面带来了新的契机(Miller and Footit, 2009)。同时, DNA 条形码技术也有力推动了蚜虫分类学领域的发展。Sabater 等(2005)用小片段 COI 基因序列鉴定形态学上难以鉴别的五节根蚜族 Fordini 蚜虫的次生寄主型;Wang 和 Qiao(2009)和 Qiao 等(2011)利用 DNA 条形码分别对蚜亚科 Aphidinae 声蚜属 *Toxoptera* 和蚜族 Aphidini 物种进行了分类;Footit 等(2008)和 Lee 等(2011)系统地研究了蚜科 Aphididae 物种的 DNA 条形码,结果表明 COI 能够很好地区分大多数蚜虫物种。

虽然 DNA 条形码已在各个类群广泛运用(Brown *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2005; Clare *et al.*, 2007; Wang and Qiao, 2009),但是对于特定的类群,当前的数据库,如 GenBank,信息量却非常有限,大多数物种只有 1~2 条序列,甚至有些物种没有对应的条形码序列。当一个地区发生大规模虫害,或者发生外来生物的入侵,需要大规模的对它们进行鉴定,仅仅依靠 DNA 条形码与当前数据库进行匹配,很难正确精准地定位。因此,我们在此引入模糊式快速鉴定技术,首先对被测样品进行简单的形态分类,在大规模测序后,再根据聚类信息,选取代表性样品进行形态鉴定,最后达到短时间内大量鉴定样品的目的。

华山松(*Pinus armandii* Franch)是重要的园林树种,也是极其重要的建筑木材和工业原料,具有非常重要的经济及生态价值。华山松上寄生着多种蚜虫,为害华山松的各个部位,其繁殖为害过程

中由于排泄大量的蜜露而导致煤烟病的发生,对华山松的生长发育产生严重影响。但是,不同种类的蚜虫寄生的部位以及为害状各不相同,生物学习性也大相径庭,只有正确的鉴定物种,才能对症下药达到防治的效果。

本文以华山松上的蚜虫为研究对象,应用 COI 序列作为 DNA 条形码进行模糊式快速鉴定,同时分析不同物种在华山松上取食部位的差异与关系,为后续 DNA 条形码在不同领域中的应用研究提供思路与依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以中国科学院动物研究所蚜虫研究组近 10 年采集的以华山松为寄主植物的蚜虫为实验材料,共计 56 号样品 1 000 多个个体。每号采集样品保证单一生态位上的单克隆。每号样品的采集信息及序列的 GenBank 登录号见表 1。采集的标本分别以 75% 和 95% 酒精溶液浸泡保存。75% 酒精浸泡标本用于形态学研究,95% 酒精保存的标本用于开展分子生物学实验。所有标本均存放于中国科学院动物研究所国家动物博物馆(中国,北京)。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序及序列比对分析

DNA 提取:用 Qiagen's DNeasy 提取试剂盒(Qiagen, Valencia, CA),按照从动物组织中提取 DNA 的步骤并稍做改进提取单个蚜虫基因组 DNA。

PCR 扩增:扩增体系为 30 μ L,包括 21 μ L DDW、3 μ L 10 $\times$ PCR Easy Buffer、0.4 μ L Easy Taq DNA 聚合酶、2.4 μ L dNTPs、0.6 μ L 引物、DNA 模板 2 μ L。

PCR 引物以及扩增条件:蚜虫 COI 序列由通用引物 LepF (ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG) 和 LepR (TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA TCA)(Footit *et al.*, 2008)扩增。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 反应在 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA) 进行。

表 1 研究所用实验样本

Table 1 The information of samples used in this study

瓶号 Samples no.	采集地 Location	采集时间 Date	生态位 Locality	活体体色 Color in life	登录号 GenBank GenBank accession no.
15729	北京中关村一街	2005. 04. 07	小树枝群居	/	JX034935
16076	北京海淀区植物园	2005. 04. 24	小树枝群居	/	JX034943
16077	北京海淀区植物园	2005. 04. 24	小树枝群居	/	JX034944
17244	四川美姑县平川镇	2005. 05. 01	小树枝群居	/	JX034962
17262	四川美姑县洪溪镇	2005. 05. 05	小树枝群居	/	JX034963
18168	云南省昆明市西山	2006. 04. 21	针叶群居	/	JQ920909
18203	云南省楚雄紫溪山	2006. 04. 25	针叶群居	/	JX678732
18207	云南省楚雄紫溪山	2006. 04. 25	嫩茎散居	/	JX034978
18222	云南省丽江林科所	2006. 04. 27	嫩茎散居	/	JX034980
18223	云南省丽江林科所	2006. 04. 27	嫩茎散居	/	JX034981
18227	云南省丽江林科所	2006. 04. 27	针叶散居	/	JX678733
18236	云南省丽江市玉龙雪山	2006. 04. 28	嫩茎群居	/	JX034983
18256	云南省宁蒗县泸沽湖	2006. 04. 29	嫩茎散居	/	JX034984
18716	云南省剑川县	2006. 05. 09	针叶群居	/	JX678734
18719	云南省剑川县	2006. 05. 09	嫩茎群居	/	JX034988
18720	云南省剑川县	2006. 05. 09	针叶散居	/	JQ916735
18767	云南省大理市苍山	2006. 05. 16	嫩茎尖群居	/	JX034990
18773	云南省大理市苍山	2006. 05. 16	嫩茎尖群居	/	JX034991
18827	北京植物园	2006. 05. 15	枝条群居	灰褐色	JX034992
23055	甘肃省天水市麦积山植物园	2009. 06. 02	茎上群居	无翅灰褐色;有翅灰褐色	JX035035
23074	甘肃省天水市麦积林场草滩村	2009. 06. 03	茎上群居	无翅灰褐色;有翅灰褐色	JX035036
24889	云南省楚雄市紫溪山	2010. 10. 22	针叶散居	褐色,被蜡粉	JX678735
27402	北京市中国林业科学院园区	2011. 9. 24	茎上群居	黑色	JX035063
27488	山西省霍州市曹村矿大门沟	2012. 5. 1	针叶枝干散居	黑色	JX678736
27781	云南省昆明市西山	2012. 5. 21	针叶基部枝干群居	灰黑,腹部偏红	JX678737
27787	云南省昆明市西山	2012. 5. 21	嫩茎群居	前胸白,腹偏红	JX678738
27793	云南省昆明市西山	2012. 5. 21	枝叶嫩枝群居	红腹,黑泛白	JX678739
27795	云南省昆明市西山	2012. 5. 21	树干群居	灰色	JX678740
27797	云南省昆明市西山	2012. 5. 21	树干群居	黑色	JX678741
27799	云南省昆明市西山	2012. 5. 21	针叶枝干群居	黑色,偏红	JX678742
27817	云南省楚雄州紫溪山	2012. 5. 22	嫩茎群居	橙红色	JX678743
27819	云南省楚雄州紫溪山	2012. 5. 22	树干群居	灰黑	JX678744
27821	云南省楚雄州紫溪山	2012. 5. 22	针叶基部嫩茎群居	红黄	JX678745
27851	云南省丽江市白沙乡	2012. 5. 24	针叶基部嫩枝群居	红黑色	JX678746

续表 1 (Table 1 continued)

瓶号 Samples no.	采集地 Location	采集时间 Date	生态位 Locality	活体体色 Color in life	登录号 GenBank GenBank accession no.
27853	云南省丽江市白沙乡	2012. 5. 24	针叶群居	绿色	JX678747
27855	云南省丽江市白沙乡	2012. 5. 24	针叶基部嫩茎散居	红黑色	JX678748
27859	云南省丽江市白沙乡	2012. 5. 24	针叶基部嫩茎群居	红	JX678749
27867	云南省玉龙雪山南坡	2012. 5. 24	针叶群居	绿	JX678750
27885	云南省玉龙雪山	2012. 5. 25	针叶群居	绿	JX678751
27895	云南省宁沪公路沿线	2012. 5. 26	针叶群居	绿	JX678752
27897	云南省宁沪公路沿线	2012. 5. 26	针叶群居	灰	JX678753
27901	云南省宁沪公路沿线	2012. 5. 26	嫩茎散居	黑,偏红	JX678754
27947	云南省丽江到香格里拉公路	2012. 5. 28	针叶群居	绿色	JX678755
28008	云南省维西县	2012. 5. 30	针叶群居	绿	JX678756
28010	云南省维西县	2012. 5. 31	针叶群居	绿	JX678757
28028	云南省大理市苍山	2012. 6. 1	嫩茎群居	褐-黑	JX678758
28061	云南省大理市苍山	2012. 6. 1	针叶群居	绿色	JX678759
28144	甘肃省莲花山	2012. 6. 21	嫩茎群居	褐色	JX678760
28145	甘肃省莲花山	2012. 6. 21	针叶群居	绿色	JX678761
28199	甘肃省文县刘家坪	2012. 6. 27	嫩茎群居	褐色,腹部泛绿	JX678762
28200	甘肃省文县刘家坪	2012. 6. 27	针叶群居	绿色	JX678763
28213	陕西省户县朱雀国家森林公园	2012. 6. 29	针叶群居	绿色	JX678764
28216	陕西省户县朱雀国家森林公园	2012. 6. 29	嫩茎群居	深绿-黑	JX678765
28230	陕西省太白山七女秀峰	2012. 7. 1	针叶群居	绿色	JX678766
28233	陕西省太白山	2012. 7. 1	针叶群居	绿色	JX678767
28234	陕西省太白山	2012. 7. 1	嫩茎群居	黑褐色	JX678768

扩增产物检测:取 3 ~ 5 μL PCR 产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 20 min) 分析检测,紫外灯下观察结果,照相。

扩增产物测序:扩增产物经纯化后使用正、反双向测序,以提高序列的精确度。测序反应用相应的扩增引物,在 ABI 3730 型自动测序仪 (Applied Biosystem, USA) 上进行。

序列比对:所获得的双向序列通过 DNASTar 5. 0 (DNASTAR, Inc. 1996) 软件包中的 Seqman 程序进行校对及拼接。由 Editseq (DNASTAR, Inc. 1996) 程序检验拼接后的序列是否能正确翻译为蛋白质,以确保序列的正确性。运用 Clustal X version 1. 81 (Thompson *et al.* , 1997) 软件进行多重

序列比对。

序列分析:使用 MEGA 5. 0 软件查看序列的碱基组成,基于 K2P 模型计算序列间的遗传距离,并构建邻接树 (Neighbour-Joining tree, NJ) (Saitou and Nei, 1987)。序列的饱和性分析在 DAMBE 程序 (Xia and Xie, 2001) 中,以转换、颠换数为纵轴,以 TN93 模型 (Tamura and Nei, 1993) 校正的距离为横轴做散点图。如果这些点随序列间分歧增大呈线性分布就说明序列间替换没有达到饱和,序列可以用于后续的分析。

1. 3 形态学鉴定

每号样品选取多头个体完整的无翅孤雌蚜并制作成玻片标本,在显微镜下进行形态学鉴定。

所有标本的鉴定基于蚜虫主要的形态学鉴别特征,并与相关联的已鉴定标本进行比较。名称与分类系统依据 Remaudière 和 Remaudière(1997)的系统。形态学鉴定在 DNA 条形码工作之后进行。

1.4 模糊式快速鉴定

模糊式快速鉴定首先要求对样品进行简单的分类,按照不同的生态位,把采集的蚜虫分装为不同的样品,每号样品确保单一生态位单克隆的多个个体;然后运用 DNA 条形码技术对每号样品选取一个或多个个体进行测序,得到的数据通过 NJ 树和遗传距离的分析,把这些样品分为不同的支系;最后,每个支系选一号样品进行形态学鉴定。这样,大量的样品就可在短时间内被区分开来。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增效率以及基因片段序列分析

获得 COI 序列共 56 条。DNA 扩增效率达到 100%,说明通用引物极其容易扩增。测序后的 DNA 序列片段去除两端引物序列及其他部分基因序列,经 Seqman 比对后得到 633 bp 用于后续的研究。其中保守位点 466 个,可变位点 167 个,简约信息位点 130 个。碱基平均含量为 40.0% T、13.4% C、36.2% A、10.4% G。A + T = 76.2%, C + G = 23.8%。

2.2 饱和度分析

用 DAMBE 4.5.20 计算了所有样品 COI 基因序列的转换与颠换比,由图1可知,序列间的转

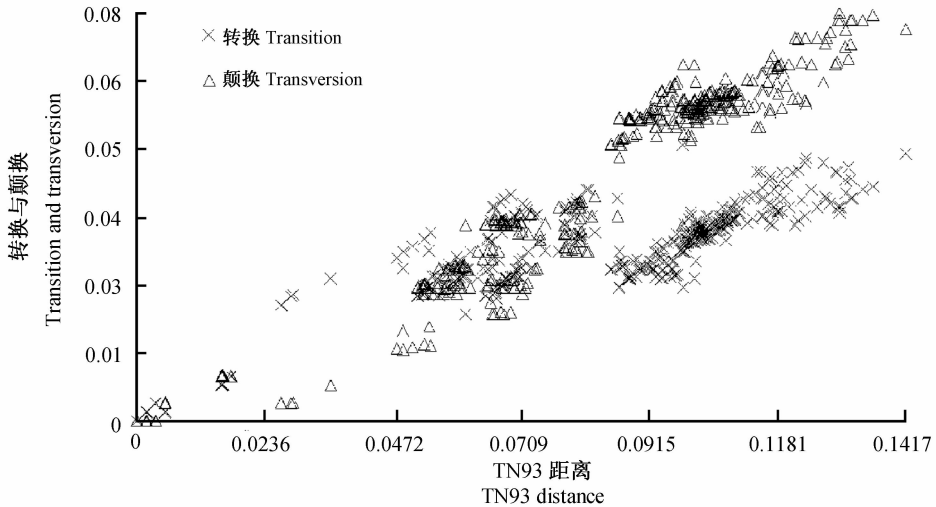


图 1 基于 633 bp 的 COI 序列饱和性分析散点图

Fig.1 Saturation plots for the mitochondrial 633 bp COI sequences

两两序列间转换、颠换数对 TN93 模型校正的距离做散点图。

The number of transitions and transversions of each pairwise comparison of taxa are plotted against the TN93 model corrected distance.

换、颠换数随距离增加呈线性增长趋势,未表现出饱和态势,所以数据能被用于后续的分析。

2.3 NJ 树的构建与遗传距离分析

基于 COI 标记构建了 NJ 树(图 2)。NJ 树中可以看出,华山松上的蚜虫明显分为了 13 个分支,并且支持率都高于 95%,分别记为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L 和 M;其中 A 与 B、C 与 D、E 与 F、K 与 L 分别聚为一支;A、B、C、D、E、F 和 G、

H、I、J、K、L 分别聚为一大支,记为 AS 和 GS,支持率分别为 96% 和 93%。暂定 A ~ M 分别为 13 个不同的物种。

基于 K2P 模型计算 13 个物种的平均种内遗传距离(表 2)。种间遗传距离选取每个物种至少 2 号样品,比较两两物种的平均遗传差异(表 3)。13 个物种的平均种内遗传距离在 0.0000 ~ 0.0033 之间;种间遗传距离的结果可以看出,除了 A 与 B

(0.0170),C 与 D (0.0370),E 与 F(0.0269)和 K 与 L (0.0055),其余两两物种的种间遗传距离均大于 0.040。

表 2 华山松上蚜虫的平均种内遗传距离
Table 2 Analysis of average intra-specific divergences of aphids from *Pinus armandii*

种名 Name	平均种内遗传距离 Average intra-specific divergences
A	0.0009 ± 0.0009 (0.0000 – 0.0033)
D	0.0000
F	0.0007 ± 0.0007 (0.0000 – 0.0016)
I	0.0020 ± 0.0011 (0.0000 – 0.0033)
J	0.0017
L	0.0000
M	0.0000

2.4 形态学鉴定结果

13 个“物种”各选取一个代表样品 (A1 ~ M1)(图 2),经过形态学鉴定,A1 与 B1 属于华山松长足大蚜 *Cinara piniarmandicola* Zhang, Zhang *et* Zhong,C1 与 D1 属于松长足大蚜 *Cinara pinea* (Mordvilko),E1 与 F1 属于短毛长足大蚜 *Cinara breviseta* Zhang, Zhang *et* Zhong,G1 属于高山长大蚜 *Eulachnus alticola* (Pašek),H1 属于龙细长大蚜 *Eulachnus drakontos* Zhang *et* Qiao,I1 属于黑松长大蚜 *Eulachnus thunbergii* (Wilson),J1、K1 与 L1 属于华山松长大蚜 *Eulachnus piniarmandifoliae* Zhang,M1 属于华山松球蚜 *Pineus armandicola* Zhang。综合分子和形态学数据,可以很清楚地判断出,A 支与 B 支是华山松长足大蚜,G 支是高山长大蚜,H 支是龙细长大蚜,I 支是黑松长大蚜,K 支与 L 支是华山松长大蚜,M 支是华山松球蚜。但是,由于 C 与 D,E 与 F,J 与 K(L)的遗传距离大于 2%,而形态学上这两两支系被鉴定为同一个物种,所以,这些物种的关系需要进一步的讨论。

3 讨论

3.1 遗传距离大于 2%的形态近似种

通过一系列数据分析,我们发现华山松上蚜虫的一些支系(C 与 D,E 与 F,J 与 K,J 与 L)之间的遗传距离超过了 2%,但是通过形态鉴定,这些支系在形态学上为同一物种。那么,这些支系是

表 3 华山松上蚜虫的种间遗传距离
Table 3 Analysis of inter-specific divergences of aphid from *Pinus armandii*

种名 Name	平均种间遗传距离 Inter-specific divergences	种名 Name	平均种间遗传距离 Inter-specific divergences
A 与 B	0.0170	D 与 K	0.1195
A 与 C	0.0554	D 与 L	0.1220
A 与 D	0.0775	D 与 M	0.1318
A 与 E	0.0795	E 与 F	0.0269
A 与 F	0.0617	E 与 G	0.0999
A 与 G	0.0838	E 与 H	0.1168
A 与 H	0.1001	E 与 I	0.1006
A 与 I	0.1042	E 与 J	0.1001
A 与 J	0.0956	E 与 K	0.1195
A 与 K	0.1001	E 与 L	0.1220
A 与 L	0.1025	E 与 M	0.1419
A 与 M	0.1214	F 与 G	0.0928
B 与 C	0.0617	F 与 H	0.1022
B 与 D	0.0795	F 与 I	0.0921
B 与 E	0.0838	F 与 J	0.0907
B 与 F	0.0659	F 与 K	0.0998
B 与 G	0.0882	F 与 L	0.1022
B 与 H	0.1095	F 与 M	0.1444
B 与 I	0.1016	G 与 H	0.0707
B 与 J	0.0930	G 与 I	0.0671
B 与 K	0.1069	G 与 J	0.0596
B 与 L	0.1094	G 与 K	0.0749
B 与 M	0.1316	G 与 L	0.0771
C 与 D	0.0370	G 与 M	0.1266
C 与 E	0.0863	H 与 I	0.0695
C 与 F	0.0748	H 与 J	0.0665
C 与 G	0.0905	H 与 K	0.0751
C 与 H	0.1147	H 与 L	0.0731
C 与 I	0.1113	H 与 M	0.1167
C 与 J	0.0862	I 与 J	0.0627
C 与 K	0.0976	I 与 K	0.0610
C 与 L	0.1001	I 与 L	0.0590
C 与 M	0.1393	I 与 M	0.1392
D 与 E	0.0885	J 与 K	0.0536
D 与 F	0.0748	J 与 L	0.0516
D 与 G	0.1023	J 与 M	0.1219
D 与 H	0.1121	K 与 L	0.0055
D 与 I	0.1177	K 与 M	0.1420
D 与 J	0.1001	L 与 M	0.1395

属于不同地理种群,还是存在隐存分类单元,需要进一步讨论。

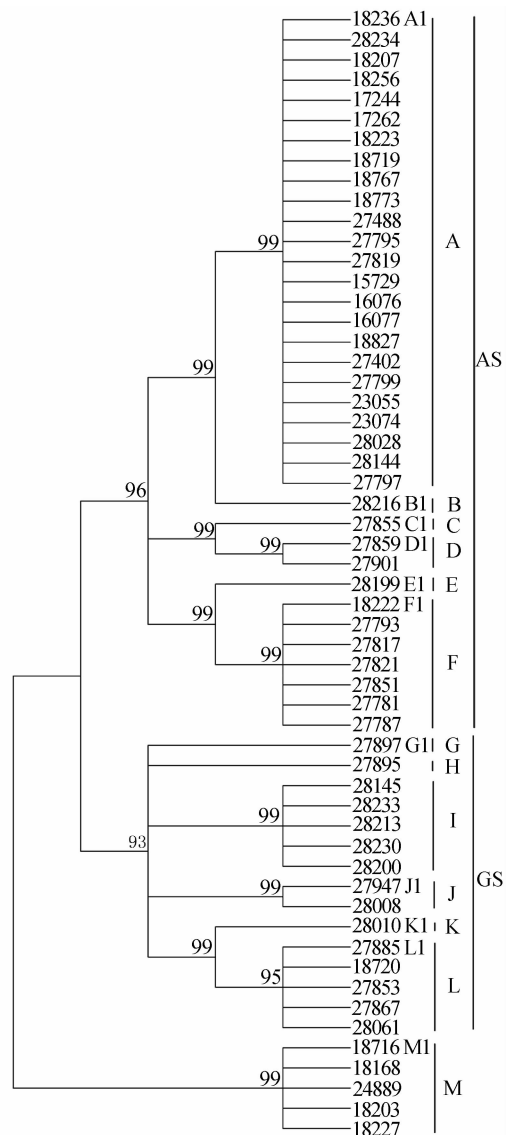


图 2 基于 633 bp COI 和 K2P 参数构建的华山松上蚜虫的 NJ 树,自举检验支持率标于分支上方 (≥90 %)

Fig. 2 Neighbour-Joining (NJ) tree of Kimura-2-parameter (K2P) distances based on 633 bp COI sequences with bootstrap percentages (≥90 %) above the branches

E 与 F 支系在形态上属于短毛长足大蚜。E1 样品采集地位于甘肃文县,F 支系的样品均采自云南。分子数据显示,E 与 F 之间的遗传距离为 0.0269。形态学上,E 与 F 支系的样品基本没有差异,属于同一个物种。因此,可以认为 E 与 F 应该属于两个不同的地理种群,由于明显的地理隔离以及生境的变化,使得两个种群之间的基因交流被阻断,从而存在一定的遗传距离,但是这种差

距没有达到种级水平。

C 与 D 两支系的 3 号样品均采自云南西北部,地理上距离很近,没有明显的地理隔离,属于同域分布。通过形态学鉴定均属于松长足大蚜,对比 3 号样品,发现大部分的形态特征并没有明显差异,只是 C1 样品腹部背片 VIII 具有一条完整的横带,而且腹部背片的骨化相对明显,而 D 支系的 2 号样品腹部背片 VIII 中侧斑中间仅有微弱的连接,其他腹部背片基本没有骨化;两个支系样品的形态差异并不是非常明显。但是,这两个支系的遗传距离达到了 0.0370,已经明显超过了平均种内遗传距离。鉴于形态上的近似性和遗传上的差异性,我们认为,这个物种存在隐存的分类单元。同样的,J 与 K(L)中也存在着类似的情况,它们之间的遗传距离都超过了 0.05 (0.0536 和 0.0516),这个距离已经达到了蚜虫的种间遗传距离 (Foottit *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011),而形态上 J 与 K(L)无明显的差异。因此,华山松长足大蚜中也可能存在着 J 分支这个隐存分类单元。但是,要确定一个隐存分类单元,仅仅使用一个 COI 标记是不充分的,之后我们将会利用更多的标记,对其进行深入的探讨。

由于人类大脑感觉器官处理信息大多数依靠视觉,所以形态特征比化学或者听觉特征在分类学上得到更广泛地应用,分类学家常常寻求多个变化一致的性状特征来区别物种。然而,很多物种的形态变化不那么明显,或者说人类视觉系统很难察觉,而非可视性状成为区分它们的标准。这样,很多物种由于形态的过分相似而被错误的归类为同一物种。DNA 条形码从遗传分子水平来衡量一个物种,比较它们的差异,大多数物种能够被客观的区分。随着 DNA 条形码的发展,很多隐存分类单元被发现,如:鳞翅目 (Hebert *et al.*, 2004)、鞘翅目 (Monaghan *et al.*, 2005) 等。往往在同域分布的物种可能存在隐存现象。因此,鉴定同一种寄主植物上的同类害虫,仅仅依靠形态学数据,可能会因为形态的同质性而把两个性状特征相似的物种错误的归类于同一物种。例如本文当中的长大蚜属的物种,占据着相同的生态位,具有相同的体型,甚至有着同样的体色(往往表现出与针叶相近的颜色),不同的种类很容易混淆。但是,仅仅依靠 DNA 条形码,又会出现数据库信息不全,无法匹配到具体物种的情况发生。所以,

模糊式快速鉴定,结合形态学和 DNA 条形码,不仅能够有效的区分物种,达到短时间内的快速鉴定,还有助于发现和揭示形态学特征极其相似、同域分布的隐存分类单元。

3.2 蚜虫与其寄主生态位的演化关系

蚜虫与其寄主植物在长期演化过程中,形成了密切的协同进化关系。不同的蚜虫种类往往与不同的寄主植物相联系,有些蚜虫类群寄主植物范围广泛,有些非常狭窄;不同的蚜虫具有不同的取食部位,占据不同的生态位以适宜其生存。蚜虫与寄主植物之间的复杂关系是长期进化的结果。华山松上寄生着不同种类的蚜虫,每种蚜虫有着各自不同的取食部位(图3)。华山松长足大蚜主要占据着树的主干和树枝,幼年期也会爬到嫩茎上吸食树汁;松长足大蚜和短胫长足大蚜主要占据针叶基部的嫩茎位置;高山长大蚜、龙细长大蚜、黑松长大蚜和华山松长大蚜在针叶上生活,它们拥有较快的行动能力,能在不同的针叶上取食;而华山松球蚜虽然也在针叶上取食,但是它们行动能力很弱,往往伴生大量的白色分泌物,为害大片的树木。

从蚜虫的分类地位来看,树干和茎上的华山松长足大蚜、松长足大蚜和短胫长足大蚜属于大蚜亚科 Lachninae 长足大蚜属 *Cinara*,也就是 AS 支的物种(图2);针叶上的高山长大蚜、龙细长大蚜、黑松长大蚜和华山松长大蚜(GS 支)属于大蚜亚科长大蚜属 *Eulachnus* 的物种;而 M 支的华山松球蚜属于球蚜科 Adelgidae 松球蚜属 *Pineus*,它与前两者亲缘关系较远。从不同生态位可以看出,亲缘关系相近的物种往往有比较相近的取食部位。

蚜虫在寄主植物上不同的取食部位可以看作是不同的小生境,取食部位多样性的分化是蚜虫物种竞争并占据不同生态位的结果。有意思的是,长大蚜属的物种往往占据着相同的生境,同一针叶上生活着几种长大蚜,但是由于它们行动能力强,相对减少了物种在同一生境上的竞争,有着更强的生活力。而长足大蚜属的物种有着相对独立的取食部位,同一棵植物上几种长足大蚜的生态位几乎没有重叠,它们在不同的部位(茎、嫩枝、老枝或者树干)以大量群居的方式生存,各个物种之间没有接触与交流。华山松球蚜则是选择大规

模爆发式的为害大片树木,主要为害华山松嫩梢和当年生针叶,严重时导致林木枯萎死亡。寄主植物和取食部位多样性与蚜虫物种多样性之间的关系是在漫长的进化历史中协同进化的结果(Richards, 1976; Blackman and Eastop, 1994, 2000)。从已有的研究分析,针叶上的种类(长大蚜属),由于叶片表皮薄,蚜虫易于吸取汁液,喙缩短,喙端部呈楔状,喙节 IV 和节 V 分节变得更不明显,同时由于喙的缩短一方面使得一部分蚜虫的行动更加自如,身体变得细长,能够在针叶上迅速逃避敌害;另一些种类(长足大蚜属)转移到枝干上,由于松树的木质部质地紧密,给蚜虫取食带来一定的困难,迫使蚜虫的取食器官进一步特化,喙末端变得尖锐,分节也很明显。由于针叶树有许多空的生态位,新生态位的拓展为蚜虫物种分化提供了空间,使得现生的长足大蚜属物种超过 200 种,是蚜科的第二大属。

3.3 模糊式快速鉴定的应用

DNA 条形码技术被广泛应用于物种的鉴定和分类,涉及了多个动物类群,例如鸟类(Hebert *et al.*, 2003),鱼类(Ward *et al.*, 2005),鳞翅目(Brown *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004),蜘蛛类(Barrett and Hebert, 2005),跳虫类(Hogg and Hebert, 2004),等翅目(Foster *et al.*, 2004),蜉蝣目(Ball *et al.*, 2005)及鞘翅目(Cardoso and Vogler, 2005; Monaghan *et al.*, 2005)等。

针对由于多型现象造成形态学上难以鉴定的物种, DNA 条形码带来了新的契机。许多昆虫类群都具有多型现象,而蚜虫是多型现象最为复杂的类群之一。蚜虫的多型现象与蚜虫复杂的生活周期有密切的关系。首先是有性世代和孤雌世代的交替,其次是在寄主植物之间的季节性迁移。在绝大多数蚜虫中,至少有 2 或 3 个,甚至 5 个或更多个不同的生物型,包括卵、干母、干雌蚜、迁移蚜、有翅侨蚜、无翅侨蚜、雌性母、雄性母、雌性蚜、雄性蚜 10 个型(张广学, 1999)。因此,由于表型可塑性(phenotypic plasticity)和遗传可变性(genetic variability)导致了早期分类学研究形成了许多异名。针对特定植物上的蚜虫物种,例如本文研究的华山松上的蚜虫,采集在全年的不同季节,因此可能包含着多个不同的生物型,仅仅依靠形态学,有时很难准确鉴定,且耗时耗力。而通过

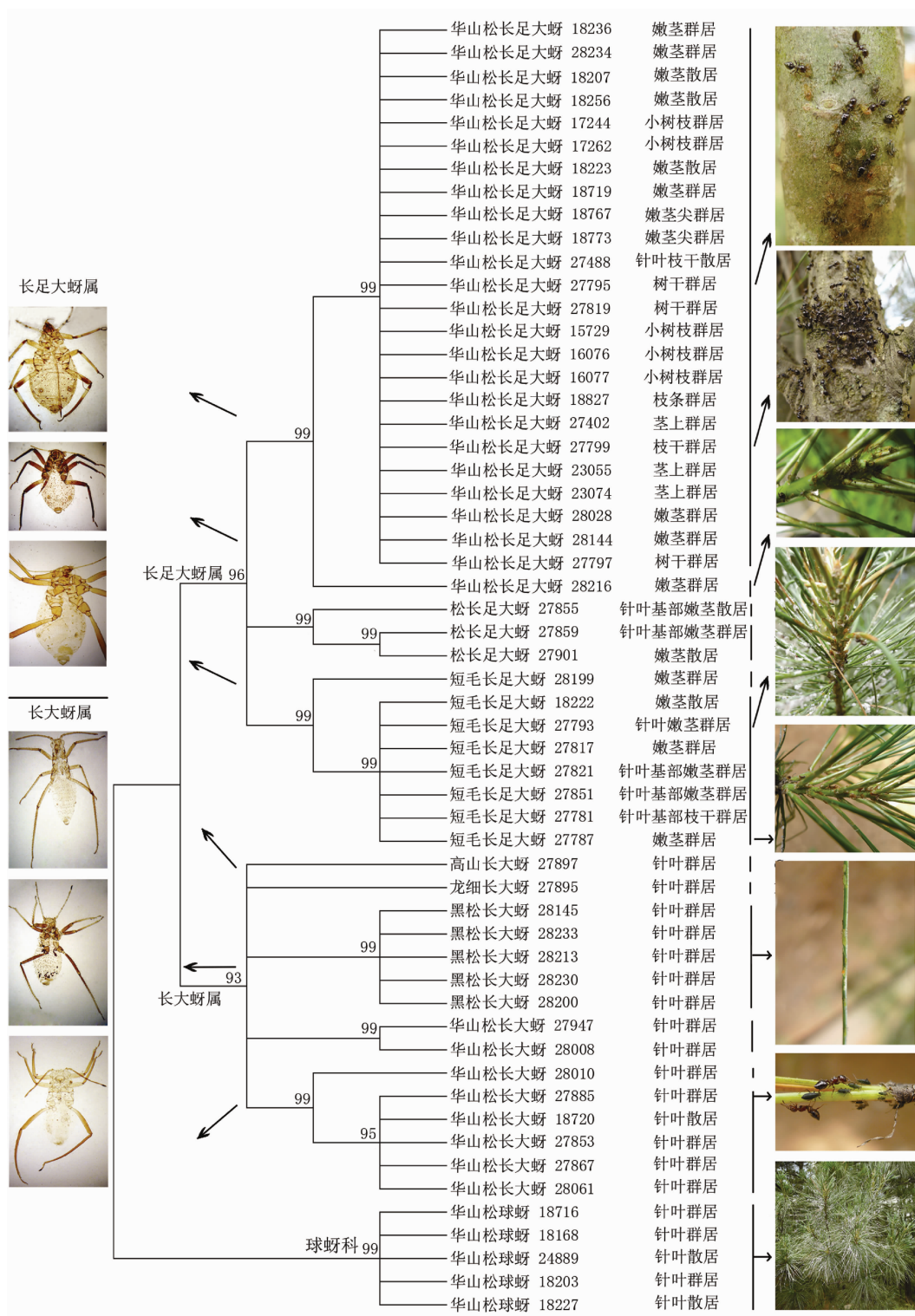


图3 华山松上蚜虫物种与生态位的关系

Fig. 3 Relationship between aphid from *Pinus armandii* and their niche

DNA 条形码的 COI 序列,比较分析其遗传距离,得到其条形码编码,从微观水平上增加基因序列鉴别特征,不仅能够达到快速鉴定物种的目的,还可

以将同一种蚜虫的不同型对应起来,澄清分类学混乱。

尽管 DNA 条形码具有许多优点,但是研究表

明它同时也反映出一些问题。母系遗传的标记,例如线粒体可能不能很好的反映自然的客观性(Chase *et al.*, 2005)。由于线粒体假基因(nuclear mitochondrial DNA, NUMT)的存在,可能高估了物种的多样性(Song *et al.*, 2008)。不完全的谱系分选可能会影响有机体线粒体的可变性(Petit and Excoffier, 2009)。而且,当前数据库的数据量有限,尽管全世界编码的物种已经达到 223 449 种 1 732 392 条序列(<http://www.barcodinglife.org/>),涉及多个动物类群,但对于特定的类群,比如蚜虫,已测得的物种数远远小于已知物种数,而且大多数数据只针对代表类群的几条序列,不能反映出种群水平上的变异程度。有此看出,仅仅依靠基于 COI 序列的 DNA 条形码鉴定物种,在一定程度上会出现信息的局限性。

在此引入模糊式快速鉴定的方法,把 DNA 条形码与形态学相结合,当需要在短时间内鉴定大量标本时,先集中进行 DNA 条形码检测与分析,得到结果后再抽样进行形态学鉴定,这样针对特定的寄主植物,无论采集的地域与时间,都能在短时间内完成准确快速的鉴定,一方面减轻了形态学鉴定繁杂与琐碎的工作量,另一方面弥补了仅靠 DNA 条形码分类出现的问题,并有助于发现隐存分类单元。通过这种方法,有助于对物种的进化、生态位的关系、物种成种,以及在寄主植物上的演化历程等过程有一个更好的认识。今后,我们将会在更多的寄主植物以及不同的物种阶元上进行 DNA 条形码的研究,此类研究也将推进生物分类的发展。

致谢:杨晋宇、黄晓磊为本研究采集样品,杨分地帮助制作玻片标本,在此一并表示诚挚的谢意。

参考文献 (References)

Ball SL, Hebert PDN, Burian SK, Webb JM, 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *JNABS*, 24(3):508–524.

Barrett RDH, Hebert PDN, 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 83(3):481–491.

Blackman RL, Eastop VF, 1994. Aphids on the world's trees. An identification and information guide. Wallingford: CAB International. 1–986.

Blackman RL, Eastop VF, 2000. Aphids on the world's

Crops: An Identification and Information Guide, 2nd edn. Chichester: John Wiley and Sons Limited. 1–466.

Brown J, Miller S, Horak M, 2003. Studies on New Guinea moths. 2 description of a new species of *Xenothictis meyrick* (Lepidoptera: Tortricidae: Archipini). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 105(4):1043–1050.

Cardoso A, Vogler AP, 2005. DNA taxonomy, phylogeny and Pleistocene diversification of the *Cicindela hybrida* species group (Coleoptera: Cicindelidae). *Mol. Ecol.*, 14(11):3531–3646.

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360(1462):1889–1895.

Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN, 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes.*, 7(2):184–190.

Footit RG, Maw HEL, von Dohlen CD, Hebert PDN, 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Mol. Ecol. Res.*, 8(6):1189–1201.

Foster BT, Cognato AI, Gold RE, 2004. DNA-based identification of the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.*, 97(1):95–101.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270(1512):313–321.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 101(41):14812–14817.

Hogg ID, Hebert PDN, 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 82(5):749–754.

Lee W, Kim H, Lim J, Choi HR, Kim Y, Kim YS, Ji JY, Footit RG, Lee S, 2011. Barcoding aphids (Hemiptera: Aphididae) of the Korean Peninsula: updating the global data set. *Mol. Ecol. Res.*, 11(1):32–37.

Miller GL, Footit RG, 2009. The taxonomy of crop pests: The aphids. *Insect Biodiversity: Science and Society*// Footit RG, Adler PH (eds.). UK: Wiley-Blackwell. 463–473.

Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP, 2005.

- DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360(1462):1925 – 1933.
- Petit RJ, Excoffier L, 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends. Ecol. Evol.*, 24(7):386 – 393.
- Qiao GX, Wang JF, Jiang LY, 2011. Use of a mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe Aphidina (Hemiptera, Aphididae). *ZooKeys*, 122:1 – 17.
- Qiao GX, Zhang GX, 2004. Preliminary study of aphid diversity in China: taxonomic and geographic variation// Simon JC, Dedryver CA, Hüllé M, Rispé C (eds.). *Aphids in a New Millennium*. Paris:INRA. 139 – 146.
- Remaudière G, Remaudière M, 1997. Catalogue des Aphididae du Monde. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 473.
- Richards WR, 1976. A host index for species of Aphidoidea described during 1935 to 1969. *Can. Entomol.*, 108 (5): 499 – 533.
- Sabater UB, Hidalgo NP, Latorre A, Castanera P, Footitt R, von Dohlen C, 2005. DNA barcodes: a useful character to assist in identification of aphid species in the new millennium. *Proceedings of the 7th International Symposium on Aphids*, Fremantle, Australia. 20.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4):406 – 425.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA, 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS*, 105(36):13486 – 13491.
- Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10(3):512 – 526.
- 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. Res.*, 25(24):4876 – 4882.
- von Dohlen CD, Rowe CA, Heie OE, 2006. A test of morphological hypotheses for tribal and subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Hemiptera: Aphididae) using DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 38(2):316 – 329.
- Wang JF, Qiao GX, 2009. DNA barcoding of genus *Toxoptera* Koch (Hemiptera: Aphididae): Identification and molecular phylogeny inferred from mitochondrial COI sequences. *Insect Sci.*, 16(6):475 – 484.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360(1462):1847 – 1857.
- Xia X, Xie Z, 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.*, 92(4):371 – 373.
- 张广学, 1999. 西北农林蚜虫志: 昆虫纲 同翅目 蚜虫类. 北京: 中国环境科学出版社. 1 – 563.