

DNA 条形码应用于甘肃省高山草原蝗虫物种的鉴定研究*

郑成卓** 钱秀娟** 张洁 刘恒亮 王兴铎 董子信 付连海 刘长仲***

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘要 【目的】为准确鉴定甘肃省高山草原常见蝗虫。【方法】本研究采用通用引物扩增得到来自 20 种蝗虫的 106 条长度为 657 bp 的线粒体 CO I 序列, 另从 GenBank 下载无齿稻蝗 *Oxya adentata* 2 条同源序列作为外群。通过构建 ML 系统发育树、基于遗传距离分类的 ABGD 法和基于序列差异分类的 jMOTU 法对序列处理后同形态学鉴定结果比较。【结果】ML 系统发育树显示短星翅蝗 *Calliptamus abbreviatus*、黑腿星翅蝗 *Calliptamus barbarus*、李氏大足蝗 *Gomphocerus licenti*、大胫刺蝗 *Compsorhipis davidiana* 和大垫尖翅蝗 *Epacromius coerulipes* 均存在 2 个分支, 其余 15 种有各自独立的分支; jMOTU 结果显示鼓翅皱膝蝗 *Anagracris barabensis*、科氏痲蝗 *Bryodema kozlovi*、黑翅痲蝗 *Bryodema nigroptera*、大胫刺蝗 *Compsorhipis davidiana* 为 1 组, 肃南短鼻蝗 *Filchnerella sunanensis* 和祁连山短鼻蝗 *Filchnerella qilianshanensis* 为 1 组, 不能互相区分, 其余 14 种与形态分类一致; ABGD 将 108 个样本分为 28 组, 鼓翅皱膝蝗 *Anagracris barabensis*、科氏痲蝗 *Bryodema kozlovi*、黑翅痲蝗 *Bryodema nigroptera*、大胫刺蝗 *Compsorhipis davidiana* 为 1 组, 再无其他不同种划分为 1 组, 其他 16 种与形态分类一致。【结论】DNA 条形码技术, 可作为传统形态学分类鉴定的重要辅助手段, 可以提高蝗总科, 尤其是近缘种鉴定结果的可靠性, 但不能完全脱离传统形态学方法。

关键词 DNA 条形码; 高山草原; 蝗虫; 线粒体 CO I; 物种界定

DNA barcoding based identification of locust species in the alpine grasslands of Gansu province

ZHENG Cheng-Zhuo** QIAN Xiu-Juan** ZHANG Jie LIU Heng-Liang
WANG Xing-Duo DONG Zi-Xin FU Liang-Hai LIU Chang-Zhong***

(College of Plant Protection of Gansu Agriculture University, Biocontrol Engineering Laboratory of Crop

Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract 【Objectives】To accurately identify insects of the superfamily Acridoidea in the alpine grasslands of Gansu province. 【Methods】Sequences of the mitochondrial CO I gene with a length of 657 bp were obtained from 106 individuals of 20 species from the superfamily Acridoidea, and two homologous sequences of *Oxya adentata* were downloaded from GenBank as outgroups. A Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree was constructed using the Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) threshold method based on genetic distance classification, and the Molecular Defined Operational Taxonomic Units (jMOTU) threshold method based on sequence difference classification. 【Results】The phylogenetic tree placed *Calliptamus abbreviatus*, *Calliptamus barbarus*, *Gomphocerus licenti*, *Compsorhipis davidiana* and *Epacromius coerulipes* on two branches, and the other 15 species on separate branches. The results of jMOTU place *Anagracris barabensis*, *Bryodema kozlovi*, *Bryodema nigroptera*, *Compsorhipis davidiana* in one MOTU, and *Filchnerella sunanensis* and *Filchnerella qilianshanensis* in another MOTU which cannot be distinguished from each other. Identification of the other 14

*资助项目 Supported projects: 国家科技基础资源调查专项 (2019FY100400) 和甘肃农业大学学生科研训练计划(SRTP)项目 (202213022)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: zhengcz1997@qq.com; qianxj@gsau.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuchzh@gsau.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-05-18; 接受日期 Accepted: 2023-06-10

species were consistent with the traditional morphological classification. ABGD divided the 108 samples into 28 groups, placing *Angaracris barabensis*, *Bryodema kozlovi*, *Bryodema nigroptera*, and *Compsorhipis davidiana* in one group. Identification of the other 16 species was consistent with morphological classification. **[Conclusion]** DNA barcoding technology is an important auxiliary method for classifying and identifying locust species, improving the identification of species in the superfamily Acridoidea, especially closely-related species that cannot be reliably distinguished using traditional morphological methods.

Key words DNA barcoding; alpine steppe; locust; species definition; mitochondrial CO I

蝗总科 (Acridoidea) 是昆虫纲 (Insect) 直翅目 (Orthoptera) 蝗亚目 (Caelifera) 中最为广泛分布的类群, 全世界约有 12 000 种, 我国已记载 1 200 余种 (卢迎春, 2019)。2020 年以来, 因为气候变化异常, 起源于非洲的沙漠蝗虫爆发成灾, 威胁到亚非大陆多个国家的生态安全 (刘海涛和徐艳玲, 2021)。甘肃省草地蝗虫种类繁多, 草地类型多样, 部分地区蝗灾危害严重 (柳小妮, 2004)。蝗虫种类的准确鉴定, 是其生物学、生态学研究的基础, 更是对蝗虫实施科学有效的预测预报及防治的保障, 因此蝗虫分类研究一直是草原有害生物防控的研究热点。

自林奈提出双名法近 200 多年时间, 人类共描述和鉴定超过了 170 万种生物, 但这仅占到分类学家预计物种数量的 15% 左右, 给如此众多的物种进行分类和鉴定仍然是一项长期而艰巨的任务 (王荣亮等, 2016)。21 世纪初, 加拿大学者 Hebert 等 (2003) 提出 DNA 条形码技术: 将一段标准 DNA 序列作为标记对物种进行快速有效的鉴定, 并且建议动物物种鉴定所用条码序列为线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 5'端的一段长度为 658 bp 的片段。经过多年来的发展, 这项技术在大部分生物鉴定中得到应用 (张蒙等, 2019)。如姜帆等 (2011) 利用 DNA 条形码成功鉴定出广西地区苦瓜中的实蝇科 (Bactrocera) 幼虫; Woodcock 等 (2013) 利用 DNA 条形码对加拿大 3 203 头鞘翅目 (Coleoptera) 昆虫进行了多样性及生境的研究, 总共鉴定了 320 个分子操作类单元; 王玉生 (2016) 以线粒体 CO I 基因和核糖体 28S rRNA 为靶标, 研究探讨了双基因 DNA 条形码在粉蚧科 (Pseudococcidae) 鉴定中的作用, 评价了该技术对重大潜在入侵害虫大洋臀纹粉蚧

Planococcus minor 的鉴定有效性; 田小娟 (2018) 对体型微小的捕食性蝽科 (Hemiptera) 昆虫进行了鉴定; 韩武 (2020) 对双翅目 (Diptera) 摇蚊科 (Chironomidae) 昆虫进行了分子鉴定以及系统发育分析迄今, 已经有许多学者将 DNA 条形码技术应用于直翅目昆虫的研究。例如, 潘程莹等 (2006) 将线粒体 CO I 基因作为媒介对 7 种蝗虫进行分类, 结果显示分子序列构成的系统发育树划分结果和形态学鉴定结果基本一致; 汪晓阳等 (2011) 利用 18S rRNA 基因全序列对 78 种直翅目昆虫进行扩增, 并构建了各个分类单元之间的系统发育关系; 赵玲等 (2015) 将 DNA 条形码技术用于形态学难以区分的蝗蝻, 利用样本序列构建系统发育树结果显示 DNA 条形码技术可以鉴定蝗蝻; 卢慧 (2018) 利用形态学与 CO I 基因相结合的方法对云南一种蛉蟋新种进行了描述, 并确定了其分类地位。而关于甘肃省高山草原蝗虫利用分子技术进行物种鉴定的报道较少。因此, 本研究基于高山草原蝗虫的调查结果, 结合形态分类和 DNA 条形码技术对其分布种类进行鉴定, 通过比对分析线粒体 CO I 基因序列, 并利用分子系统树、遗传距离和序列差异分析甘肃省高山草原蝗虫系统发育关系, 为蝗虫鉴定提供分子数据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试蝗虫样本于 2020-2021 年 8 至 10 月采自甘肃省永昌县、山丹县、肃南县、天祝县和夏河县 (表 1), 试验将样线法、样方法相结合采集蝗虫, 并将样本浸泡于无水乙醇备用, 或取后足置于 -20 °C 冰箱保存备用。

表 1 供试蝗虫名录及采集信息
Table 1 List of tested locusts and collection information

科 Family	属 Genus	种 Species	样品数量 Sample size	采集地点 Collection location	经度 (°) Longitude	纬度 (°) Latitude
斑翅蝗科 Oedipodidae	皱膝蝗属 <i>Angaracris</i>	鼓翅皱膝蝗 <i>Angaracris barabensis</i>	4	肃南县 Sunan county	101.77	37.82
				夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
	尖翅蝗属 <i>Epacromius</i>	大垫尖翅蝗 <i>Epacromius coerulipes</i>	6	山丹县 Shandan county	101.34	38.70
	异痲蝗属 <i>Bryodemella</i>	黄胫异痲蝗 <i>Bryodemella holdereri holdereri</i>	2	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
				山丹县 Shandan county	101.34	38.70
	胫刺蝗属 <i>Compsorhipis</i>	大胫刺蝗 <i>Compsorhipis davidiana</i>	3	肃南县 Sunan county	101.77	37.82
				夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
	痲蝗属 <i>Bryodema</i>	黑翅痲蝗 <i>Bryodema nigroptera</i>	6	天祝县 Tianzhu county	102.00	36.97
		科氏痲蝗 <i>Bryodema kozlovi</i>	8	肃南县 Sunan county	101.77	37.82
	束颈蝗属 <i>Sphingonotus</i>			永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
		盐池束颈蝗 <i>Sphingonotus yenchinensis</i>	8	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
				山丹县 Shandan county	101.34	38.70
	小车蝗属 <i>Oedaleus</i>	亚洲小车蝗 <i>Oedaleus decorus asiaticus</i>	8	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
				肃南县 Sunan county	101.77	37.82
斑腿蝗科 Catantopidae	星翅蝗属 <i>Calliptamus</i>	短星翅蝗 <i>Calliptamus abbreviatus</i>	8	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
				肃南县 Sunan county	101.77	37.82
		黑腿星翅蝗 <i>Calliptamus barbarus</i>	8	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
网翅蝗科 Arcypteridae	雏蝗属 <i>Chorthippus</i>	黑翅雏蝗 <i>Chorthippus aethalinus</i>	3	夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
				肃南县 Sunan county	101.77	37.82
		小翅雏蝗 <i>Chorthippus fallax</i>	4	夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
				肃南县 Sunan county	101.77	37.82
		白边雏蝗 <i>Chorthippus albomarginatus</i>	7	山丹县 Shandan county	101.34	38.70
	蚰蝗属 <i>Eremippus</i>	华北雏蝗 <i>Chorthippus brunneus huabeiensis</i>	2	夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
				肃南县 Sunan county	101.77	37.82
		祁连山蚰蝗 <i>Eremippus qilianshanensis</i>	2	山丹县 Shandan county	101.34	38.70
				肃南县 Sunan county	101.77	37.82
槌角蝗科 Comphoceridae	蚁蝗属 <i>Myrmeleotettix</i>	宽须蚁蝗 <i>Myrmeleotettix Palpalis</i>	5	山丹县 Shandan county	101.34	38.70
				夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
	大足蝗属 <i>Gomphocerus</i>	李氏大足蝗 <i>Gomphocerus licenti</i>	5	夏河县 Xiahe county	102.50	35.05
癩蝗科 Pamphagidae	短鼻蝗属 <i>Pseudotmethis</i>	祁连山短鼻蝗 <i>Filchnerella qilianshanensis</i>	6	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
				天祝县 Tianzhu county	102.00	36.97
		肃南短鼻蝗 <i>Filchnerella sunanensis</i>	5	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22
	华癩蝗属 <i>Sinotmethis</i>			肃南县 Sunan county	101.77	37.82
		短翅华癩蝗 <i>Sinotmethis brachypterus</i>	6	永昌县 Yongchang county	101.85	38.22

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取方法 采用常规的酚-氯仿抽提法(周明等, 2019)。

组织样品处理: 取样品后足肌肉组织(<30 mg), 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 550 μ L 的细胞裂解缓冲液(即核裂解液), 充分研磨, 匀浆至不见组织块。加入 5 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 消化, 充分振荡混匀。再加入 20 μ L SDS (20%) 振荡离心管数次以混匀。56 $^{\circ}$ C 孵育 3-4 h 或过夜。

酚/氯仿/异戊醇抽提及纯化: 56 $^{\circ}$ C 孵育过后, 可见管底有部分沉淀, 上清, 室温冷却几分钟。4 $^{\circ}$ C, 4 700 r/min, 离心 10 min。将上清液转入新管中, 加入等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 颠倒混匀(50-60 次)。4 $^{\circ}$ C, 4 700 r/min, 离心 10 min, 将上清液转入新管中。

基因组 DNA 沉淀及溶解: 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出预冷的异丙醇, 按体积 1:1 的比例加入到上一步的上清中, 颠倒混匀。4 $^{\circ}$ C, 4 700 r/min, 离心 10 min, 去上清保留沉淀加入 1 mL 预冷的 70% 乙醇, 轻弹离心管, 重悬沉淀。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心 2 min 去上清。置于 37 $^{\circ}$ C 干燥 15 min, 检查确保酒精挥发完全。加入 100 μ L ddH₂O 溶解 DNA, 同时加入 2 μ L RNase A, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min。

1.2.2 PCR 扩增、纯化和测序 CO I 条形码引物使用通用引物 LCO1490 和 HCO2198。

上游引物 LCO1490: 5'-GGTCAACAAAT-CATAAAGATATTGG-3'; 下游引物 HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'。

本试验采用的 PCR 体系为 25 μ L: DNA 模板 2 μ L, 2 $\times$ PCR MIX 12.5 μ L, 上游引物和下游引物各 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。线粒体基因 CO I 片段 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 数据处理和分析

序列拼接和比对参考杨兰(2020)的方法, 具体如下: 对于测序结果, 使用 DNA 分析软件

Chromas 查看图谱文件的峰图进行校对, 对于理想序列, 直接进行分析处理。将其正反向序列在 Seqman 中核查, 根据序列峰图信息, 对序列进行科学校正, 将校对好的序列保存为 fas 文件格式, 得到的序列分别在 NCBI 上通过 Blast 功能进行同源比对, 以确定扩增片段的目的序列是否为所需序列。通过 MEGA7 把所有的序列放于同一个文件夹下。得到 fas 文件之后, 用 ClustalX 软件进行比对。

1.4 物种界定方法

1.4.1 重建系统发育树 使用 MEGA7 程序分析校对序列, 并使用基于 Kimura-2-P 参数模型(K2P)的序列通过最大似然法(Maximum Likelihood)将无齿稻蝗的 2 条同源序列作为外群重建系统发育树。此系统发育分析使用 1 000 次引导复制来验证树中每个节点的支持率。

1.4.2 ABGD 阈值分析 ABGD (Automatic barcode gap discovery (Puillandre *et al.*, 2012)) 阈值分析是根据遗传距离划分样本, 将一组样本视为同一物种(余海军和王茜, 2021)。所有序列的 FASTA 文件在线提交到 ABGD 网站(<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>), 除 Kimura (K80) TS/TV 设置为 0.9 (此参数下分子分类结果稳定, 最接近形态分类), 其余参数保持默认值。然后将样本划分结果与形态识别结果进行比较(Chen *et al.*, 2018)。

1.4.3 jMOTU 阈值分析 jMOTU (Jones *et al.*, 2011) 阈值分析是基于序列差异的 DNA 分类方法, 即利用 CO I 序列之间的差异来识别分子定义的操作分类单元(MOTU)。序列差异小于指定阈值的样本被划分为一个 MOTU。由于不同的阈值会导致不同的 MOTU 划分结果, 因此选取多个序列差分阈值进行分析。最后, 对样本划分结果进行分析, 并与形态识别结果进行比较(宋韶彬等, 2014)。

2 结果与分析

2.1 系统发育树分析

本研究共获取 20 种蝗虫的 106 条线粒体

DNA 序列, 利用 DNA 条形码引物 PCR 扩增, 经测定, 最终选用的每个样本均得到 1 条长度为 657 bp 的 CO I 序列, 扩增成功率为 100%, 此外在 GenBank 下载无齿稻蝗 2 条 CO I 序列作为外群, 用 MEGA7.0 重建 ML 系统发育树(图 3), 结果表明除短星翅蝗 *Calliptamus abbreviatus*、黑腿星翅蝗 *Calliptamus barbarus*、李氏大足蝗 *Gomphocerus licenti*、大胫刺蝗 *Compsorhipis davidiana* 和大垫尖翅蝗 *Epacromius coerulipes* 分别分为 2 个分支外, 其余 16 种均有独立的分支, 自举率高, CO I 序列对物种具有较好的分析能力。但在科级水平, 斑翅蝗科 Oedipodidae 与癞蝗科 Pamphagidae 和斑腿蝗科 Catantopidae 聚为一支, 不能明确它们之间的系统发育关系。

2.2 jMOTU 阈值分析

分子序列差异值和可操作分类单元数的结果如图 1 所示。图 1 显示, 当序列差异数在 29-41 时, MOTU 数趋于稳定形成一个平台, 将 108 个序列划分为 27 个 MOTU。每个 MOTU 分类的结果都已标记在系统发育树上(图 3)。与形态鉴定结果进行比较, 发现鼓翅皱膝蝗 *Angaracris*

barabensis、科氏痲蝗 *Bryodema kozlovi*、黑翅痲蝗 *Bryodema nigroptera* 及大胫刺蝗为 1 组, 肃南短鼻蝗 *Filchnerella sunanensis* 和祁连山短鼻蝗 *Filchnerella qilianshanensis* 为 1 组, 不能互相区分, 其余 15 种形态分类结果一致。此外由于地理分布的影响, 同一种划分为不同组, 例如黄胫异痲蝗划 *Bryodemella holdereri holdereri* 分为 2 组、小翅雏蝗 *Chorthippus fallax* 划分为 3 组、祁连山蚰蝗 *Eremippus qilianshanensis* 划分为 2 组等。

2.3 ABGD 阈值分析

ABGD 结果包括初始分区和递归分区(如图 2 所示)。我们选择了较为稳定的初始划分结果, 将 108 个样本分为 28 组, 与形态鉴定结果进行比较, 发现鼓翅皱膝蝗、科氏痲蝗、黑翅痲蝗、大胫刺蝗为 1 组, 其它 17 种与形态分类一致。与 jMOTU 相比, ABGD 可以区分开肃南短鼻蝗和祁连山短鼻蝗。由于地理分布的影响, ABGD 也存在同一种划分为不同组, 例如大垫尖翅蝗划分为 2 组、小翅雏蝗划分为 3 组、宽须蚁蝗 *Myrmeleotettix palpalis* 划分为 2 组等。

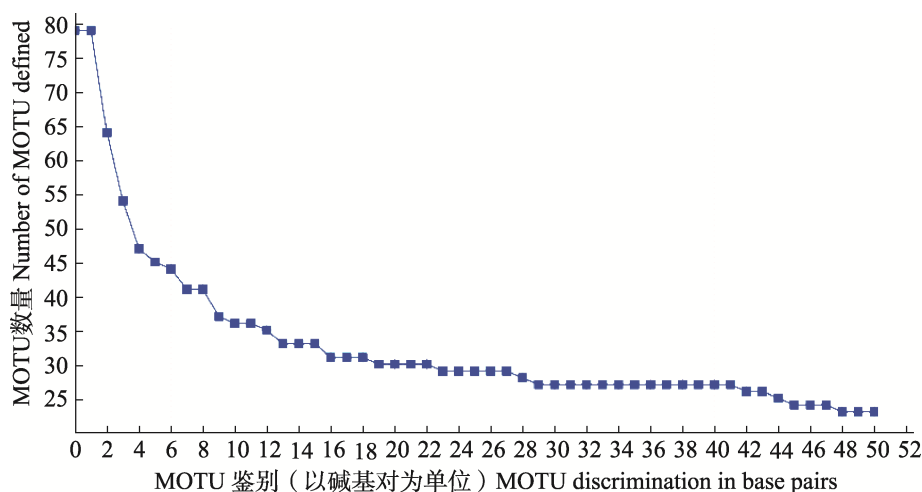


图 1 0-7.5% CO I 序列差异与分子可操作分类单元数目的关系

Fig. 1 Relationship between 0-7.5% CO I sequence differences and the number of molecularly operable taxa

3 结论与讨论

本研究通过形态特征, 初步确定蝗虫种类, 以线粒体 CO I 基因对物种扩增, 基于 DNA 条

形码, 在分子水平上, 利用系统发育树、遗传距离和序列差异阈值对甘肃省高山草原 20 种蝗虫进行比较分析。DNA 条形码技术是近年来发展快速的一种生物鉴定分类方法, 与传统分类学中

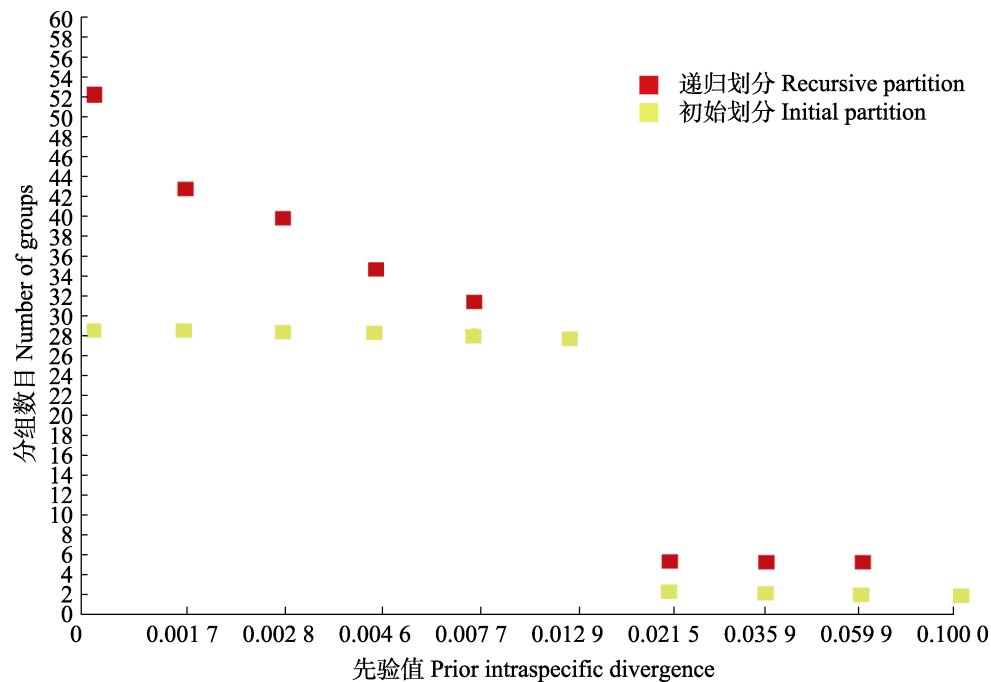


图2 以 0.001-0.1 的先验值区间对 108 条序列 ABGD 划分结果
Fig. 2 ABGD division results of 108 sequences with a priori value interval of 0.001-0.1

的鉴定方法相比较, DNA 条形码具有更加客观、简便、准确、快捷等优点, 在系统学等方面的研究已经日渐成熟稳定, 利用分子生物学手段筛选出快速鉴定 DNA 条形码将是发展方向之一(陈光辉等, 2018)。本试验结果显示, 21 种蝗虫(含外群) 基于 ML 系统发育树、ABGD 和 jMOTU 划分后, 其中分别对应 16、15 和 17 种蝗虫与传统形态学分类结果一致。在种级水平, 对比物种采集信息, 发现同一物种虽然采集地域不同, 但在系统发育树中以高自举聚集为一个分支, 并在 ABGD 和 MOTU 结果中分别聚集为一组, 如盐池束颈蝗(2+6 序列)、亚洲小车蝗(3+5 序列)。这有力地证明了 DNA 条形码技术是一种非常有效的识别方法。

此外, 系统发育树部分结果与传统形态学分类结果不一致, 如 ML 系统发育树无法明确区分鼓翅皱膝蝗和科氏痼蝗、李氏大足蝗和华北雏蝗、这些案例都发生在同一科中, 并且在形态分类上非常相似, 推测这些物种可能是最近分化的物种, 遗传差异没有达到阈值, 或者它们之间存在不完全谱系分选现象(白茜茜, 2018)。本研究其他类群中, 各科种类均不能聚为独立一支,

呈现平行进化, 与传统分类形成差异。这可能是 DNA 条形码片段相对进化较快且具有异质性, 或短序列包含的信息有限, 不适合高级阶元进化关系推断, 该结果与郝金凤等(2017)观点相吻合。ABGD 和 jMOTU 结果显示相同种划分为不同组, 如黄胫异痼蝗被划分为 2 组、小翅雏蝗被划分为 3 组、宽须蚁蝗被划分为 2 组, 华北雏蝗被划分为 2 组。查阅采集信息后发现这些蝗虫来自不同研究区, 推测可能存在线粒体异质性, 这是由于 mtDNA 的突变导致同一细胞中同时存在野生型 mtDNA 和突变型 mtDNA, 因此可以在单个样本中产生两种不同的 DNA 条形码(张克瑶等, 2019)。因此, 多个物种的深度测序表明, 线粒体异质性是一种普遍现象, 当线粒体 DNA 用作系统发育标记和种群分析时, 应考虑异质性的影响。此外, 同一物种之间的核苷酸替换通常比不同种之间的核苷酸替换要少(花远, 2020), 而蝗虫群落中偶尔出现同一物种中核苷酸替换多于正常替换同样会导致 CO I 条形码识别的分类不可靠。因此, DNA 条形码在物种鉴定和分析中离不开形态学方法。此外, 由于单分子标记的局限性, 其他基因片段可以与 CO I 一起作为

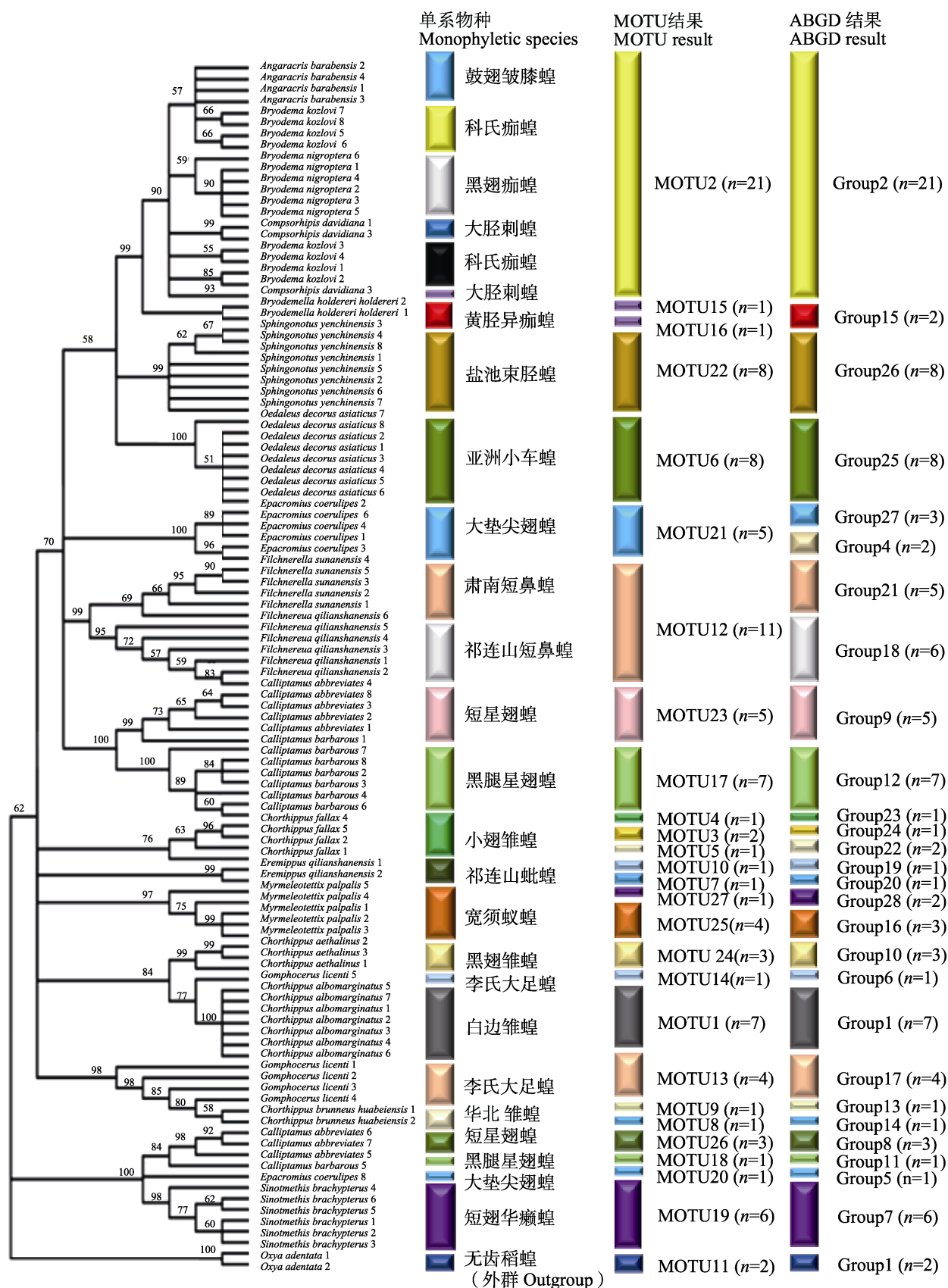


图 3 基于 CO I 序列构建的 ML 系统发育树、ABGD 和 J MOTU 划分结果

Fig. 3 ML phylogenetic tree, ABGD and J MOTU division results based on CO I sequence

DNA 条形码的标记基因, 以满足物种鉴定的需要 (何静超等, 2016)。

综上所述, DNA 条形码技术尽管在单个物种的鉴定中存在一些问题, 但对蝗总科的物种鉴定是非常有效和有益的, 且不可脱离形态学鉴定手段。作为物种鉴定的有效工具, 研究人员应该增加物种测序的数量, 丰富 DNA 条形码数据库, 可以大大提高物种鉴定的可靠性和准确性。

参考文献 (References)

- Bai QQ, 2018. Species delimitation of the predatory insects around Beijing and Tianjin with DNA barcoding. Master dissertation. Baoding: Hebei University. [白茜茜, 2018. DNA 条形码在环京津捕食性天敌昆虫物种界定中的应用. 硕士学位论文. 保定: 河北大学.]
- Chen LP, Chang YG, Li J, Wang JM, Liu JL, Zhi YC, Li XJ, 2018. Application of DNA barcoding in the classification of grasshoppers (Orthoptera: Acridoidea)-A case study of grasshoppers from Hebei province, China. *Zootaxa*, 4497(1): 99–110.
- Chen GH, Li Y, Liu D, Li FJ, Aynur A, Hu HY, 2018. DNA barcoding of *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(3): 454–463. [陈光辉, 李焱, 刘东, 李凤姐, 阿依努尔·阿卜杜艾尼, 胡红英, 2018. 玉米象 *Sitophilus zeamais* DNA 条形码研究. 应用昆虫学报, 55(3): 454–463.]
- Han W, 2020. Molecular identification and phylogeny of *Stenochironomus* Kieffer (Diptera: Chironomidae) from China. Master thesis. Guangzhou: Jinan University. [韩武, 2020. 中国狭摇蚊属 (双翅目: 摇蚊科) 分子鉴定及系统发育研究. 硕士学位论文. 广州: 暨南大学.]
- Hao JF, Zhang XH, Wang YS, Liu JL, Zhi YC, Li XJ, 2017. Diversity investigation and application of DNA barcoding of Acridoidea from Baiyangdian wetland. *Biodiversity*, 25(4): 409–417. [郝金凤, 张晓红, 王昱淦, 刘金林, 智永超, 李新江, 2017. 白洋淀湿地蝗虫多样性调查及 DNA 条形码应用研究. 生物多样性, 25(4): 409–417.]
- He JC, Hu LL, Guo CH, Zhang F, 2016. Molecular identification of crab spider in Xiaowutai mountain, China with DNA barcoding. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 36(3): 286–292. [何静超, 胡岚岚, 郭晨辉, 张锋, 2016. 小五台山蟹蛛 DNA 条形码分子鉴定. 河北大学学报(自然科学版), 36(3): 286–292.]
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences*, 270(1512): 313–21.
- Hua Y, 2020. Population genetics and phylogeny of panorpidae based on mitochondrial DNA. Master thesis. Xianyang: Northwest A&F University. [花远, 2020. 基于线粒体 DNA 的蜴蛉科昆虫群体遗传与系统发育研究. 硕士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学.]
- Jiang F, Liu JQ, Li ZH, Wu JJ, Zhao S, 2011. Molecular identification of fruit fly larvae by DNA barcodes. *Plant Protection*, 37(4): 150–153. [姜帆, 刘佳琪, 李志红, 吴佳教, 赵翔, 2011. 基于 DNA 条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究. 植物保护, 37(4): 150–153.]
- Jones M, Ghoorah A, Blaxter M, 2011. jMOTU and taxonator: Turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS ONE*, 6(4): e19259.
- Liu HT, Xu YL, 2021. Global environmental governance and China's role and contribution. *Theoretical Perspectives*, 2021(3): 66–72. [刘海涛, 徐艳玲, 2021. 全球环境治理与中国角色和贡献. 理论视野, 2021(3): 66–72.]
- Liu XN, 2004. Studies on the expert system of forecast grasshoppers in Gansu. Master thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University. [柳小妮, 2004. 甘肃省草地蝗虫预测预报专家系统的研究与开发. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学.]
- Lu YC, 2019. Genome size determination and evolution analysis of 51 locusts. Master thesis. Xian: Shaanxi Normal University. [卢迎春, 2019. 51 种蝗虫基因组大小测定及进化分析. 硕士学位论文. 西安: 陕西师范大学.]
- Lu H, 2018. The molecular phylogeny of Trigonidiidae from China (Orthoptera: Grylloidea). Master thesis. Shanghai: East China Normal University. [卢慧, 2018. 中国蛉蟋科分子系统学研究 (直翅目: 蟋蟀总科). 硕士学位论文. 上海: 华东师范大学.]
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G, 2012. ABGD, Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8): 1864–1877.
- Pang CY, Hu J, Zhang X, Huang Y, 2006. The DNA barcoding application of mtDNA CO I genes in seven species of Catantopidae (Orthoptera). *Entomotaxonomia*, 2006(2): 103–110. [潘程莹, 胡婧, 张霞, 黄原. 斑腿蝗科 Catantopidae 七种蝗虫线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码研究. 昆虫分类学报, 2006(2): 103–110.]
- 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.

- [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.]
- Tian XJ, 2018. DNA barcoding of predatory true bugs (Insecta: Hemiptera). Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [田小娟, 2018. 捕食性蝽类昆虫的 DNA 条形码研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Wang YS, 2016. Identification of common mealybug species based on double genes barcoding techniques in China. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [王玉生, 2016. 我国常见粉蚧类害虫双基因条形码鉴定技术研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]
- Wang RL, Duan RP, Bao D, Bai J, Zhou XM, Wang Y, 2016. From species identification to biodiversity assessment: DNA barcoding and DNA metabarcoding technology. *Bulletin of Biology*, 51(4): 10–13. [王荣亮, 段润平, 包丹, 白俊, 周宪民, 汪雁, 2016. 从物种识别到生物多样性评估——DNA 条形码与 DNA metabarcoding 技术. 生物学通报, 51(4): 10–13.]
- Wang XY, Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM, 2011. The phylogenetic relationships of higher orthopteran categories inferred from 18S rRNA gene sequences. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 36(3): 627–638. [汪晓阳, 周志军, 黄原, 石福明, 2011. 基于 18S rRNA 基因序列的直翅目主要类群系统发育关系研究. 动物分类学报, 36(3): 627–638.]
- Woodcock TS, Boyle EE, Roughley RE, Kevan PG, Labbee RN, Smith ABT, Goulet H, Steinke D, Adamowicz SJ, 2013. The diversity and biogeography of the Coleoptera of Churchill: Insights from DNA barcoding. *BMC Ecology*, 13(Suppl. 4): 40.
- Yang L, 2020. Preliminary study on molecular phylogeny of *Pachyneuron* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae). Master thesis. Baoding: Hebei University. [杨兰, 2020. 楔缘金小蜂属分子系统发育研究初探 (膜翅目: 小蜂总科: 金小蜂科). 硕士学位论文. 保定: 河北大学.]
- Yu HJ, Wang Q, 2021. Exploring the utility of DNA barcoding in species identification of *Chironomus*. *Hubei Agricultural Science*, 60(5): 144–148. [余海军, 王茜, 2021. 探讨 DNA 条形码对摇蚊属物种界定的有效性. 湖北农业科学, 60(5): 144–148.]
- Zhao L, Zhao L, Li Q, Ren JL, 2019. DNA barcoding of nymph grasshoppers from Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 52(5): 785–794. [赵玲, 赵莉, 李琴, 任金龙. 基于 DNA 条形码技术识别新疆蝗蚱. 新疆农业科学, 52(5): 785–794.]
- Zhang KY, Ding Y, Sun K, Huang Y, Huang HT, 2019. Advances of research on nuclear mitochondrial DNA segments (Numts). *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 31(9): 931–939. [张克瑶, 丁颖, 孙阔, 黄原, 黄华腾, 2019. 核内线粒体 DNA 片段(Numts)的研究进展. 生命科学, 31(9): 931–939.]
- Zhang M, Sun XQ, Fang N, Cao ZH, Wang HW, 2019. Application of DNA barcoding on survey of zooplankton in Baiyangdian watershed. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 39(2): 217–224. [张蒙, 孙泉琼, 方楠, 曹智涵, 王宏伟, 2019. DNA 条形码技术在白洋淀流域浮游动物调查中的应用. 河北大学学报(自然科学版), 39(2): 217–224.]
- Zhou M, Li B, Ouyang B, Zhong Y, Yang JD, 2019. Cloning and adaptive evolution analysis of toll-like receptor 5 gene in Chinese monal (*Lophophorus lhuysii*). *Journal of Sichuan Agricultural University*, 37(2): 232–240. [周明, 李彪, 欧阳菠, 钟赞, 杨建东, 2019. 绿尾虹雉(*Lophophorus lhuysii*)Toll 样受体 5 基因的克隆和适应性进化分析. 四川农业大学学报, 37(2): 232–240.]