

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230012



主持人: 缪卫国

基于 DNA 条形码的棕榈裸蠓雄虫的发现与描述

何泽华, 李加慧, 林晓丹

(海南大学 植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 棕榈裸蠓 *Atrichopogon palmatus* Tokunaga, 1962 年迄今仅有雌虫被记录, 雄虫一直未被发现。笔者利用 DNA 条形码技术成功将采自海南岛的棕榈裸蠓雌、雄个体进行配对, 首次发现了棕榈裸蠓雄虫, 并详细描述了棕榈裸蠓雄虫的形态特征, 提供了鉴定特征图以及 CO I(细胞色素 C 氧化酶亚基 I)条形码。

关键词: 分子鉴定; 形态分类; 裸蠓属; 双翅目

中图分类号: Q964 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 7054(2024)01 - 0094 - 06

何泽华, 李加慧, 林晓丹. 基于 DNA 条形码的棕榈裸蠓雄虫的发现与描述 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(1): 94-99. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230012

棕榈裸蠓 *Atrichopogon palmatus* 隶属于蠓科 Ceratopogonidae 缺蠓亚科 Forcipomyiinae 裸蠓属 *Atrichopogon*^[1], 该种雌虫于 1962 年在日本被首次记述^[2], 可根据其腹部第 7~9 节腹面具有特殊的赘生物进行鉴别。1990 年刘增加等^[3] 基于甘肃康县的雌虫标本命名新种多刺裸蠓 (*Atrichopogon sentus* Yu and Qi, 1990), 该种后被 Liu 等^[4] 异名为棕榈裸蠓, 但棕榈裸蠓的雄虫迄今仍未发现。经海南岛裸蠓标本整理鉴定发现了棕榈裸蠓的雌虫, 形态学鉴定为棕榈裸蠓, 并利用 DNA 条形码技术对雌、雄个体进行配对, 首次发现了棕榈裸蠓雄虫, 并对该种进行描述。

1 材料与方

研究样本为 2020—2021 年于海南岛内采集的所有棕榈裸蠓成虫酒精标本, 标本处理参照吴小香的方法^[5], 对所有总计 12 头标本进行无损形态 DNA 提取, DNA 提取参照天根血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒方法, 随后制成玻片。

DNA 条形码: 以 COI(细胞色素 C 氧化酶亚

基 I) 基因作为 DNA 条形码基因, 通用引物为 LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATAT-TGG-3' 和 HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3', 进行 PCR 扩增^[6]。扩增体系和反应程序参考吴小香的方法^[5] 并进行了一定的改动, 在原 25 μ L 体系中, DNA 模板由原来的 2 μ L 增加至 3 μ L, ddH₂O 减少 1 μ L, PCR 反应循环由原来的 35 个降至 30 个。经测序, 最终获得长度为 658 bp 序列 11 条, 目前已在 BOLD (<http://www.boldsystems.org/index.php>) 上公开。选择并下载已公开的 5 种裸蠓 COI 序列: ①稀瘤裸蠓 *Atrichopogon oedemerarum*, GenBank 登录号: KJ767872.1; ②温勒裸蠓 *Atrichopogon winnertzi*, GenBank 登录号: KT278275.1; ③棕色裸蠓 *Atrichopogon fuscus*, GenBank 登录号: HQ945252.1; ④ *Atrichopogon infuscus*, GenBank 登录号: KJ767868.1; ⑤ *Atrichopogon hirtidorsum*; GenBank 登录号: KT278273.1。利用 MEGA 7.0.14 采用 Kimura 双参数模型 (Kimura-2-Parameter, K2P) 计算种内和种间遗传距离^[7]; 选择残脂库蠓

收稿日期: 2023 - 02 - 10

修回日期: 2023 - 03 - 29

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目资助 (421RC485); 海南省自然科学基金青年基金项目 (320QN201); 海南大学科研启动项目 [KYQD(ZR)20026]

第一作者: 何泽华 (1996-), 男, 海南大学植物保护学院 2020 级硕士研究生。E-mail: 2431580548@qq.com

通信作者: 林晓丹 (1991-), 女, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 昆虫系统分类。E-mail: 994239@hainanu.edu.cn

Culicoides imicola(GenBank 登录号: KT307823.1) 和台湾铗蠓 *Forcipomyia taiwana*(GenBank 登录号: KF528691.1)作为外群, 构建系统发育树(phylogenetic tree), 并进行自举检验(Bootstrap=2000)。

形态学方法: 使用奥林巴斯 SZX16 体视显微镜观察酒精标本, 并连接 CCD(DP72)对虫体整体轮廓进行拍摄。完成拍摄后, 对虫体进行消化裂解, 并在福斯德 XPZ-830BI 连续变倍体视显微镜下进行解剖制成玻片标本, 最后使用生物显微镜 XSP-12CA 和 CCD(YH5001)对玻片标本进行鉴定、测量和拍摄。利用 Adobe Illustrator CC 2018 对雄性成虫生殖器进行绘制; 利用 Photoshop 对绘图和照片进行排版。形态术语及测量依据遵循 Borkent & Picado 和 Felipe-Bauer 的方法, 测量数据值在文中的表达形式为最小值至最大值(平均值, n 为测量标本数)^[8-9]。

形态术语缩写如下, 触角比(AR): 雄虫触角鞭

节 10 ~ 13 节总长与 1 ~ 9 节总长的比值, 雌虫触角鞭节 9 ~ 13 节总长与 1 ~ 8 节总长的比值; 触须比(PR): 触须第 3 节长与其宽的比值; 前缘脉比(CR): 从翅弓脉开始至前缘脉末端总长与从弓脉至翅末端缘总长的比值; 跗节比(TR): 各足第 1 跗节与第 2 跗节的长度比值, 前足跗节比(TRI)、中足跗节比(TR II)、后足跗节比(TR III)。

2 结果与分析

2.1 棕榈裸蠓雌、雄虫的配对 测序获得雄性个体 CO I 序列 7 条, 雌性个体 CO I 序列 4 条(GenBank 登录号: OQ413720-OQ413730), 序列长度为 658 bp, 该种种内遗传距离为 0.000 ~ 0.005, 平均遗传距离为 0.002, 种间遗传距离为 0.148 ~ 0.206, 构建的系统发育树(图 1)与图不一致显示测序的所有个体聚为支持率 100% 的单系, 说明雌雄同种, 均为棕榈裸蠓。

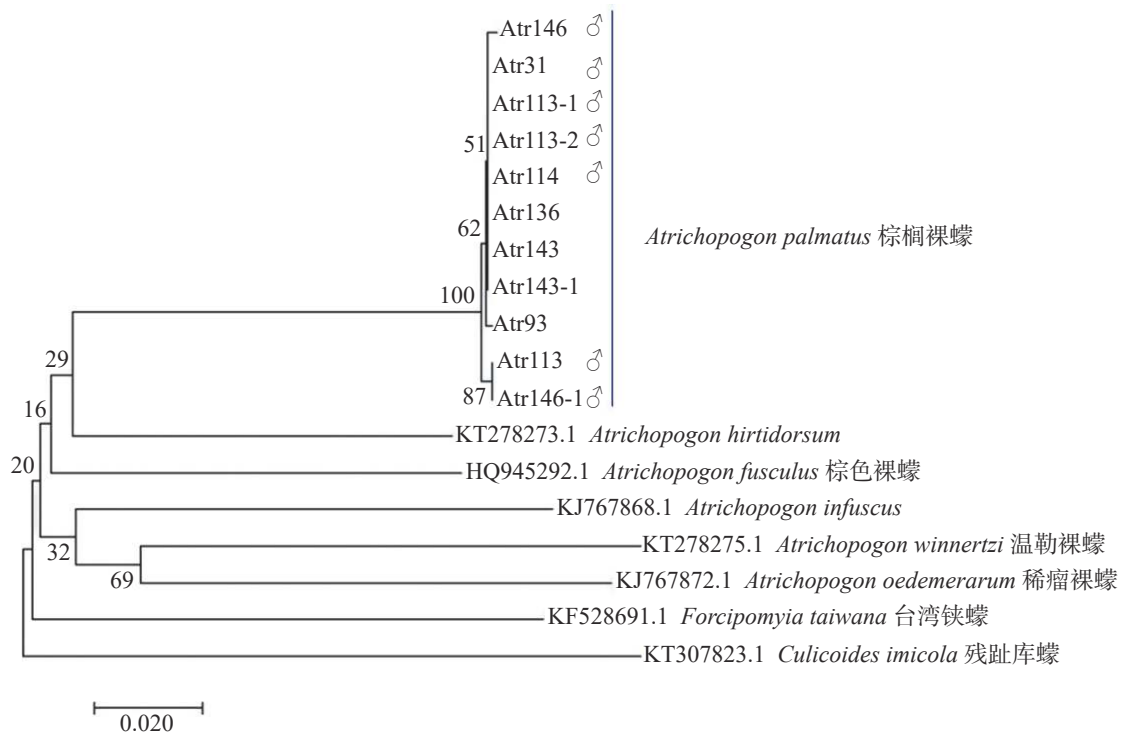


图 1 根据 CO I 序列所建裸蠓属系统发育树

2.2 棕榈裸蠓 *Atrichopogon palmatus* Tokunaga, 1962 (海南新纪录) *Atrichopogon palmatus* Tokunaga, 1962: 160; Liu et al. 2001: 136; Yu et al. 2005: 455^[1-2,4]. 模式产地: 日本(冲绳)

Atrichopogon sentus Yu e Liut, 1990: (218);

Liu et al. 2001: 136^[3-4]. 模式产地: 中国(甘肃)

鉴别特征: 中小型棕黄色蠓种; 复眼遍布柔毛; 小盾片后缘有粗鬃 2 根; 翅面无大毛; 雄虫爪尖分叉, 雌虫爪尖无分叉; 雄虫阳基侧突拱桥状, 端部 1/2 覆有纵皱的膜, 顶端有延伸, 阳茎中叶基

部与阳基侧突基部重合;雌虫受精囊卵形或椭圆形,第7腹板中央有1个棕榈树状突起,第8腹节腹面有2对翼状突,第9腹节两侧各有一长辫状突起。

雄成虫(图2-A)翅长1.02~1.14(1.08, $n=6$) mm;翅宽0.38~0.40(0.39, $n=6$) mm

头:棕黄色(图2-B)。头宽与喙长比为2.22~2.55(2.38, $n=7$)。两复眼间距与小眼直径近乎相等(图2-C),小眼面间柔毛遍布整个复眼。触角棕色,鞭节2~10节上着生轮毛;鞭节第10~13节延长,第10节延长程度最低;第13节延长程度最高,端突明显,触角比(AR)0.87~1.03(0.95, $n=7$)。触须5节,棕色,第3节最长,呈柱状,中部有感觉器窝;第5节呈锥状,端钝,触须比(PR)2.42~

2.77(2.56, $n=7$)。

胸:中胸背板棕黄色,鬃毛稀疏,肩部及两侧缘色淡,中间有两条平行淡色带从端部向基部延伸,基部有两个对称淡色斑,呈“八”字;侧面色淡,侧背片具1根刚毛;小盾片黄色,具2根鬃毛,2~5根刚毛;后小盾片较小盾片颜色略深。翅面无大毛分布,中脉叉有柄;第2径室长/第1径室长为1.14~1.81(1.45, $n=6$);CR 0.60~0.62(0.61, $n=6$)(图2-D)。平衡棒浅棕色。各足均为浅棕色,TRI 3.14~3.84(3.49, $n=7$);TR II 2.91~3.25(3.12, $n=7$);TR III 2.70~2.97(2.85, $n=7$),后足胫端鬃7~8根,爪端分叉。

腹:浅棕色。背板颜色较腹板深。尾器(图2-E):第9背板后缘弧形,尾须耳状,着生于第9背

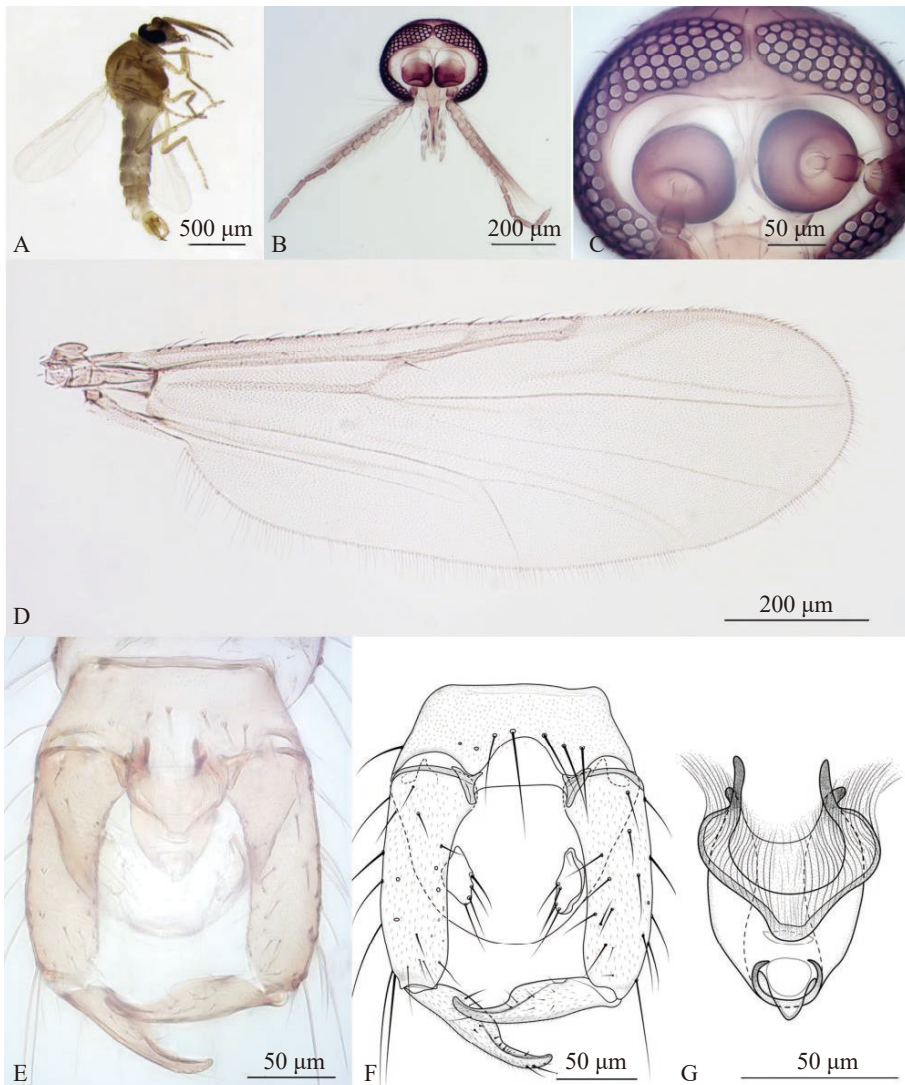


图2 棕榈裸蠓 *Atrichopogon palmatus* Tokunaga, 1962 ♂

A: 整体; B、C: 头; D: 翅; E: 尾器; F: 尾器(不含阳茎中叶和阳茎侧突); G: 阳茎中叶及阳茎侧突。

板腹面两侧, 不超出第 9 背板; 第 9 腹板后缘两侧与抱握基节衔接处呈弧形浅凹, 中间则呈半圆形凹陷, 沿中间凹缘有一列弧形排布的鬃毛。抱握基节细长, 长于第 9 背板, 基部内侧有三角形腹踝, 与阳基侧突基部接近, 踝突短小, 呈倒锥状, 抱握端节基部 2/3 宽而端部 1/3 细(图 2-F)。阳基侧突拱桥状, 表面覆有一层布有纵纹的膜结构, 外缘折叠且硬化, 端钝且硬化程度略低, 上着有一层透明片状结构; 阴茎中叶与阳基侧突基部愈合, 腹面近端部有开口, 中突指状, 背面中部纵向开口。(图 2-G)。

雌成虫(图 3-A), 翅长 0.95 ~ 1.11(1.01, $n=5$) mm; 翅宽 0.42 ~ 0.47(0.44, $n=5$) mm。体型及颜色与雄虫相似。头宽与喙长比为 1.77 ~ 2.00(1.90, $n=5$)(图 3-B)。触角棕色, 鞭节 1 ~ 8 节近乎球形, 鞭节 9 ~ 13 节为延长节; 端节末端端突明显, 呈剑状, AR 1.62 ~ 1.78(1.68, $n=5$)。触须 PR 2.31 ~ 2.69(2.56, $n=4$)。大颚发达, 大颚齿 11 ~ 14 枚。小盾片上的刚毛数为 2 ~ 7 根。翅较雄虫宽, 翅面无大毛; 第 2 径室长/第 1 径室长为 1.83 ~ 2.25(2.13 $n=5$); CR 0.65 ~ 0.68(0.66 $n=5$)(图 3-C)。各足颜色与雄虫一致, TRI 2.93 ~ 3.52(3.23 $n=5$); TR II 3.25 ~ 3.59(3.44 $n=5$); TR III 2.70 ~ 3.19(2.94 $n=5$), 后足胫端鬃 7 ~ 9 根, 爪端无分叉。腹部颜色与雄虫相似, 受精囊 1 个, 椭圆形(0.06 ~ 0.09) mm × (0.05 ~ 0.06) mm, 有颈, 基部有刻点(图 3-E)。第 7 腹板中央有 1 个棕榈树状突起, 其上有约 20 条枝突, 第 8 腹节腹板有 2 对翼状突, 靠侧缘的翼状突基部有若干鬃毛, 中间的翼状突由 4 ~ 5 根粗刺由长至短并排组成, 第 9 腹节两侧各有 1 个长辫状突起(图 3-D)。

检视标本: 标本 7♂4♀来自海南省琼中县黎母山国家森林公园, 其中, 2♀2♂, 黎母山林间(19.1731°N/109.7310°E, H 663 m), 为吴小香、何泽华于 2020-11-20 灯诱获得, 标本编号: Atr143、Atr143-1、Atr146、Atr146-1; 1♂, 黎母山村落溪水边(19.1743°N/109.7324°E, H 686 m), 为吴小香、何泽华于 2020-11-20 灯诱获得, 标本编号: Atr31; 1♀, 黎母山主峰路口(19.1753°N/109.7427°E, H 647 m), 为吴小香、何泽华于 2020-11-20 灯诱获得, 标本编号: Atr93; 1♀, 黎母山(19.1742°N/109.7431°E, H 646 m), 为何泽华于 2020-11-19 灯诱获得, 标本编

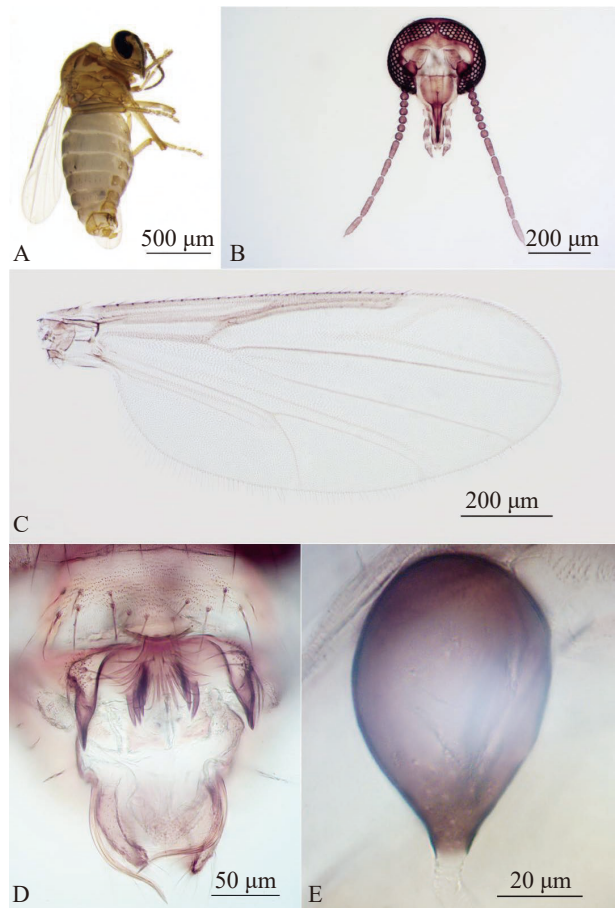


图 3 棕榈裸蠓 *Atrichopogon palmatus* Tokunaga, 1962 ♀

A: 整体侧面观; B: 头; C: 翅; D: 腹部, 赘生物, 腹面观; E: 受精囊。

号: Atr136; 4♂, 黎母山森林公园(19.1774°N/109.7427°E, H 686 m), 为吴小香、何泽华于 2020-11-21 灯诱获得, 标本编号: Atr113、Atr113-1、Atr113-2、Atr114。标本 1♀来自海南省文昌市八门湾上圪村红树林内(19.4527°N/110.7440°E, H 5 m), 为邓斌于 2021-11-18 网捕获获得, 标本编号: Atr221。

国外分布: 日本^[2]

国内分布: 甘肃^[3]、海南。

3 讨论

棕榈裸蠓隶属于裸蠓属多赘(*Psilokempia*)类群^[10-11], 雄虫与琴形裸蠓 *Atrichopogon lyratus* Yu et Yan, 2005 的尾器形态特征相似^[1], 但棕榈裸蠓第 9 背板后缘呈弧形、尾须的着生位置以及复眼相离可区别于琴形裸蠓。

棕榈裸蠓雌虫腹部具有特殊的赘生物, 而雄虫缺少上述特征, 仅通过形态学特征进行雌、雄配

对较为困难。基于 CO I 条形码, 棕榈裸蠓的种内遗传距离为 0.000 ~ 0.012, 符合蠓科种内差异范围 0.000 ~ 0.040^[12-13], 远小于裸蠓种间遗传距离 0.148。通过 DNA 条形码技术实现了棕榈裸蠓雌、雄个体的配对, 首次描述了棕榈裸蠓的雄性个体。

全世界目前已记录裸蠓 513 现生种^[14], 中国记录 92 种^[1, 15-20], 而有相当一部分种类是仅有雌虫或雄虫的记录。DNA 条形码技术可以实现不同性别个体配对, 有助于加速单性别的裸蠓物种缺失性别的发现。

致谢: 感谢吴小香在绘图及排版方面给予帮助。

参考文献:

- [1] 虞以新. 中国蠓科昆虫(昆虫纲, 双翅目) [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006.
- [2] TOKUNAGA M. Biting midges of the Ryukyu Islands (Diptera: Ceratopogonidae)[J]. *Pacific Insects*, 1962, 4: 154 - 169.
- [3] 刘增加, 齐福祥, 虞以新. 甘肃宁夏蠓类二新种描述(昆虫纲: 双翅目: 蠓科)[J]. *动物分类学报*, 1990(2): 218 - 221.
- [4] LIU JH, YAN G, LIU GP, et al. Forcipomyiinae of China (Diptera: Ceratopogonidae) I. General Introduction and the Genus *Atrichopogon* Kieffer, Fauna of China . *Magnolia Press. Bellevue W. A. USA*, 2001, 2: 5-160.
- [5] 吴小香, 杨浩, 孟祥瑞, 等. 阿蠓属一新种及一中国新记录种(昆虫纲: 双翅目: 蠓科)[J]. *环境昆虫学报*, 2022, 44(4): 1043 - 1052.
- [6] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294 - 299.
- [7] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725 - 2729.
- [8] BORKENT A, PICADO A. Distinctive new species of *Atrichopogon* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) from Costa Rica[J]. *Zootaxa*, 2004, 637: 1 - 68.
- [9] FELIPPE-BAUER M L. Two new species of *Atrichopogon* Kieffer from Acre State, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae)[J]. *Zootaxa*, 2018, 4532(2): 257 - 265.
- [10] ENDERLEIN G. Ordnung: Zweiflügler, Diptera[M]. Quelle & Meyer in Leipzig, 1936.
- [11] SPINELLI G H R, MARINO P I, HUERTA H. Revision of the Neotropical species of the subgenus *Atrichopogon* (*Psilokempia*) (diptera: Ceratopogonidae)[J]. *Zootaxa*, 2015, 4003(1): 1 - 64.
- [12] ANDER M, TROELL K, CHIRICO J. Barcoding of biting midges in the genus *Culicoides*: a tool for species determination[J]. *Medical and Veterinary Entomology*, 2013, 27(3): 323 - 331.
- [13] NIELSEN S A, KRISTENSEN M. Delineation of *Culicoides* species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia[J]. *Parasites & Vectors*, 2015, 8: 151.
- [14] BORKENT A, DOMINIAC P. Catalog of the biting midges of the world (Diptera: Ceratopogonidae)[J]. *Zootaxa*, 2020, 4787(1): 1 - 377.
- [15] 虞以新, 严格. 云南蠓科昆虫二新种记述(双翅目: 蠓科)[J]. *四川动物*, 2010, 29(2): 200 - 202.
- [16] 邓成玉, 廖忠友, 张有植, 等. 峨嵋山发现蠓类二新种及一新纪录(双翅目: 蠓科)[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2011, 18(2): 115 - 119.
- [17] 宋福春, 王健, 虞以新. 淮南裸蠓属一新种(双翅目: 蠓科)[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2013, 24(5): 444 - 445.
- [18] 刘仰青, 虞以新, 陈海婴. 江西省裸蠓属采集名录及一新种描述(双翅目: 蠓科)[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2021, 32(4): 461 - 463.
- [19] HUANG E, CAI H, YANG A, et al. Two new species of *Atrichopogon* (Diptera: Ceratopogonidae) from China[J]. *Oriental Insects*, 2009, 43(1): 365 - 367.
- [20] WANG F, HUANG E, ZHANG L, et al. Two new species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from China[J]. *Oriental Insects*, 2013, 47(4): 194 - 198.

Discovery and description of male *Atrichopogon palmatus* based on DNA barcodes

HE Zehua, LI Jiahui, LIN Xiaodan

(School of Plant Protection/ Ministry of Education Key Laboratory of Green Prevention and Control of Diseases and Pests in Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Only females of *Atrichopogon palmatus* Tokunaga, have been recorded since 1962, while males have never been discovered. Specimens of *Atrichopogon palmatus* collected in Hainan Island were identified by using DNA barcoding and morphological methods. The DNA barcodes of the specimens were used to establish a phylogenetic tree for analysis, based on which the males were successfully associated with females. The males of *A. palmatus* collected in Hainan were newly described and illustrated, and their CO I- barcodes were also provided.

Keywords: molecular identification; morphological classification; *Atrichopogon*; Diptera

(责任编辑:叶 静)