

• 研究报告 •

基于DNA条形码的物种丰富度估计： 以宿迁地区鳞翅目蛾类为例

金倩^{1,2} 陈芬¹ 罗桂杰¹ 蔡卫佳¹ 刘旭¹ 王昊¹
杨采青² 郝梦迪² 张爱兵^{2*}

¹ (江苏省农业科学院宿迁农科所, 江苏宿迁 223800)

² (首都师范大学生命科学院, 北京 100048)

摘要: 为了探究基于DNA条形码方法量化物种多样性指标的可行性, 本研究以江苏省宿迁地区蛾类群落为例, 基于DNA条形码方法估计群落物种丰富度并绘制等级多度分布曲线(rank-abundance curves), 同时与基于传统形态学的对应指标进行比较。结果表明: (1)基于DNA条形码的物种丰富度估计与基于形态的物种丰富度估计之间没有显著差异; (2)基于形态和DNA条形码的等级多度分布曲线趋势一致, 通过K-S检测发现二者之间没有显著性差异($P > 0.05$)。结果显示, 基于DNA条形码的物种丰富度估计能够在一定程度上补充基于形态学的方法, 可以尝试将其应用于蛾类群落生态学调查研究中。

关键词: 鳞翅目; DNA条形码; 物种丰富度; 等级多度分布曲线

Estimation of species richness of moths (Insecta: Lepidoptera) based on DNA barcoding in Suqian, China

Qian Jin^{1,2}, Fen Chen¹, Guijie Luo¹, Weijia Cai¹, Xu Liu¹, Hao Wang¹, Caiqing Yang², Mengdi Hao², Aibing Zhang^{2*}

¹ Suqian Institute of Agricultural Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Suqian, Jiangsu 223800

² College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048

Abstract: To explore the feasibility of assessing species diversity using DNA barcoding, we investigated this approach by focusing on moths species (Lepidoptera) in Suqian, China. The study evaluated community species richness and rank-abundance curves using the DNA barcoding method, and compared it with the traditional morphology method. Results indicated that there was no significant difference between the DNA barcode-based approach and the morphology-based approach. All DNA barcode-based rank-abundance curves gave similar and clear patterns when compared with morphology-based curves (Kolmogorov-Smirnov two sample test, $P > 0.05$). Our results indicate that the DNA barcode-based approach is able to be used to estimate species richness.

Key words: Lepidoptera; DNA barcoding; species richness; rank-abundance curves

对于个体小、物种丰富度高的鳞翅目蛾类进行多样性调查的研究中, 通常需要对野外收集到的大量标本进行鉴定, 然后计算各种物种多样性指数。然而, 对于没有分类学背景的生态学者而言, 凭借传统形态学知识对群落内所有物种进行鉴定往往

耗时耗力(May, 1988; Blaxter & Floyd, 2003)。DNA条形码的兴起打破了这一局面, Hebert等致力于构建一个全球生物多样性数据库(Hebert et al, 2003; Ebach & Holdrege, 2005; Schindel & Miller, 2005; Dincă et al, 2011)。截至2016年6月22日, BOLD系统

收稿日期: 2016-07-22; 接受日期: 2016-11-02

基金项目: 国家杰出青年基金(31425023)、国家自然科学基金(31272340)、国家自然科学基金委青年科学基金项目(31601877)和宿迁市自主创新项目(SQCX2015-06)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: zhangab2008@mail.cnu.edu.cn

中共记录鳞翅目物种 101,790 个, 条形码序列 1,075,731 条 (<http://www.barcodinglife.org>)。DNA 条形码研究主要分为 2 种类型: 理论研究和实例研究, 理论研究重点探讨基于 DNA 条形码的识别方法及有效性, 包括经典的系统发育方法(Saitou & Nei, 1987; Ekrem et al, 2007)、基于聚类的统计学方法(Austerlitz et al, 2009; Jin et al, 2012; 金倩和张爱兵, 2013)、人工智能方法(Zhang et al, 2008, 2012a)以及模糊集合理论(Zhang et al, 2012b); 实例研究是不同生物类群的分类学家通过 DNA 条形码研究各自感兴趣的生物类群, 例如探讨类群之间的系统发育关系(Qin et al, 2015), 未知物种的分配(Li et al, 2015), 隐存种复合体的研究(Leray & Knowlton, 2015), 对群落内的生物多样性进行测度, 对生态系统的 α 和 β 多样性进行估计(Quicke et al, 2012; Jin et al, 2013; Decaëns et al, 2015; Leray & Knowlton, 2015)。群落物种丰富度(species richness)、等级多度分布曲线(rank-abundance curves)是测度群落多样性的重要指标, 对群落中种类和数量繁多的鳞翅目昆虫类群来说, 探讨基于分子的方法能否一定程度上代替或补充基于形态的指标体系, 将大大有利于群落多样性的调查和评估。

宿迁是江苏省林业资源大市, 鳞翅目种类相对较多, 包括舟蛾类的杨小舟蛾(*Micromelalopha troglodyte*)、杨扇舟蛾(*Clostera anachoreta*)等, 以及美国白蛾(*Hyphantria cunea*)、刺蛾类、螟蛾类等。杨树(*Populus*)作为本地主栽树种, 发展较快, 形成了树种单一、林相单纯的林业生态现状, 导致本土农林害虫日趋猖獗。针对宿迁地区种类和数量繁多的鳞翅目昆虫类群, 我们尝试基于 DNA 条形码的方法估计群落的物种丰富度并绘制等级多度分布曲线, 同时与基于传统形态学的对应指标进行比较, 探讨基于 DNA 条形码的方法能否在一定程度上补充基于形态学的指标体系。本研究在提高物种识别效率的同时, 能够对农林害虫的防控提供基础数据, 为建立宿迁及周边地区生态环境监测与保护体系打下基础。

1 材料与方法

1.1 标本采集及形态鉴定

样品取自宿迁市运河湾基地(海拔 17 m, 118.32° E, 33.97° N)。该基地面积 260 亩, 地势平坦,

周围种植了大面积的林木和蔬菜。属暖温带季风气候区, 光热资源比较优越, 四季分明, 气候温和, 全年日照 2,271 h, 无霜期较长, 全年作物生长期为 310.5 天, 年均降水量为 892.3 mm。

2015 年 9 月 22–27 日每晚 20 点至凌晨 2 点, 利用高压汞灯(1 个)和黑光灯(1 个)诱集蛾类, 共收集得到 320 个样本。采集的样本低温冷冻后展翅保存并制作外生殖器玻片, 参照动物志等鳞翅目相关文献进行鉴定, 疑难标本由相关类群专家帮助鉴定。320 个标本隶属于 10 个科, 60 个属, 67 个种, 科的数量由高到底排序依次为: 夜蛾科、草螟科、裳蛾科、螟蛾科、尺蛾科、卷蛾科、毒蛾科、舟蛾科、天蛾科、枯叶蛾科(附录 1)。

1.2 DNA 提取、COI 扩增及测序

取样本 3–4 条足, 分离足部肌肉组织并置于 100% 的酒精中 4℃ 保存。用 Biomed 组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA, 置于 -20℃ 冰箱保存备用。使用 DNA 条形码引物 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HC O2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC-A-3') (Vrijenhoek, 1994) 扩增线粒体 COI 基因 5' 端长度为 658 bp 的目的片段。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括: 2 \times Mastermix 12.5 μ L, 引物 LCO1490 和 HCO2198 各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 模板 DNA 2.5 μ L, ddH₂O 9 μ L。反应条件为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 20 s, 54℃ 复性 20 s, 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 若结果为 700 bp 左右的亮带, 则将产物送北京中科西林公司测序, 序列分析仪为 ABI 3130 全自动序列测序仪。所有的序列提交至 GenBank, 序列号为 KX440631–440950 (附录 1)。

1.3 数据分析

1.3.1 分子可操作分类单元估计

本研究主要采用两种方法进行分子可操作单元(molecular operational taxonomic units, MOTU)估计: (1) 利用 ABGD 软件估计(Puillandre et al, 2012)。将样本在线提交至 ABGD 网站 (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>), 基于 K2P 模型计算遗传距离, 其余参数使用缺省值; 基于遗传距离对样本进行划分, 将划分在同一组的样本认定为 1 个种。(2) GMYC 模型估计。通过 BEAST v1.8.0 软件, 直接构建(Drummond & Rambaut, 2007)超度量系统

发育树(ultrametric tree)。主要参数设置: Yule物种分化模型、ULRC宽松分子钟(Drummond et al, 2006), 2×10^8 次MCMC分析、后验分布样本每 10^4 保存1次。最佳碱基替代模型由jModelTest2.2.2软件评估获得(Darriba et al, 2012)。在Tracer软件(Rambaut & Drummond, 2007)中检验分析结果以确保每个参数的有效取样量(effective sample size)均超过200。在BEAST软件包的TreeAnnotator version中生成最大谱系置信树(maximum clade credibility tree)。最后在R环境中使用语言包“SPLITS”进行单阈值(single-threshold) GMYC物种界定(Fujisawa & Barraclough, 2013)。通过函数gmyc可获得零模型与GMYC模型之间的似然比值(LRT)、种(Yule模型) - 种群(溯祖模型)的转折点, 以及转折点对应的物种数量。

1.3.2 物种丰富度估计

任何生态学采样过程都无法保证获得一个群落内的所有物种, 故研究者们一般通过参数或非参数的方法对群落内物种的丰富度进行估计(Colwell & Coddington, 1994)。非参数方法因其不需要物种多度分布数据和拟合先验的模型而受到研究者的青睐。本研究采用两种非参数方法进行物种丰富度估计: Chao1方法(Chao, 1984)和ACE方法(Kempton & Taylor, 1974; Chao et al, 2000)。

假设群落内的物种无迁入迁出。Chao1计算公式如下:

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{f_1^2}{2f_2} \quad (1)$$

其中, S_{obs} 表示群落内实际观测到的物种数目, f_1 表示群落内物种个体数为1的物种频数, f_2 表示群落内物种个体数为2的物种频数。 S_{chao1} 为估计的物种丰富度。

ACE计算公式如下:

$$S_{\text{ACE}} = S_{\text{abund}} + \frac{S_{\text{rare}}}{C_{\text{ACE}}} + \frac{f_1}{C_{\text{ACE}}} \gamma_{\text{ACE}}^2 \quad (2)$$

其中, $S_{\text{rare}} = \sum_{k=1}^{10} f_k$, 表示稀有物种(≤ 10 个个体)的数目, f_k 表示群落内物种个体数为k的物种频数。

$S_{\text{abund}} = \sum_{k=11}^{S_{\text{obs}}} f_k$ 代表优势种(> 10 个个体)的数目。

$C_{\text{ACE}} = 1 - \frac{f_1}{n_{\text{rare}}}$ 是除去个体数为1个的所有稀有种个

体占总体比率, $n_{\text{rare}} = \sum_{k=1}^{10} k f_k$, 是稀有种的个体总数量, f 表示群落内物种个体数为1的物种频数。

$\gamma_{\text{ACE}2}$ 为估计 f_k 方差的系数, 具体计算公式如下:

$$\gamma_{\text{ACE}2} = \max \left\{ \frac{S_{\text{rare}}}{C_{\text{ACE}} (n_{\text{rare}})(n_{\text{rare}}-1)} - 1, 0 \right\} \quad (3)$$

1.3.3 基于形态与基于DNA条形码的等级多度分布曲线

分别基于形态学和DNA条形码(ABGD和GMYC)的分类结果绘制等级多度分布曲线, 并且使用K-S检验(Kolmogorov-Smirnov two sample test)判断二者间是否存在差异。此外, 还采用断棍模型(Broken stick model) (MacArthur, 1957)、生态位优先占领模型(Preemption model) (Tokeshi, 1990)、对数正态分布模型(Log normal model) (Preston, 1948)、Zipf模型(Zipf model) (Zipf, 1949)、Zipf-Mandelbrot模型(Zipf-Mandelbrot model) (Zipf, 1949; Mandelbrot, 1983)进行物种多度分布格局拟合, 并通过赤池信息量准则(Akaike Information Criterion, AIC)检验获取最优拟合模型(AIC值越小, 拟合效果越好) (Burnham & Anderson, 2002)。

2 结果

2.1 分子可操作分类单元估计结果

ABGD方法划分结果: 利用ABGD软件以0.001–0.100的先验值P区间对320个样本进行划分, 结果包含了初始划分(initial partition)和递归划分(recursive partition)两种情况, 如图1所示。其中, 初始划分较为稳定, 320个样本均被分成67个组; 递归划分结果波动较大, 且出现过度划分的情况, 先验值P为0.001–0.0017时为100个组, $P > 0.0028$ 时样本被划分为69个组。本研究选择比较稳定的初始划分结果与形态鉴定结果进行比较, 结果如表1所示, ABGD方法划分的MOTUs数目与形态学鉴定的物种数目一致, 除了MOTU54包含2个形态种、MOTU58与MOTU60被合并为1个形态种 *Plusia nadeja* 之外, 剩余64个MOTUs与形态种呈现一一对应的关系, 物种划分准确率达95.5%。

GMYC模型划分结果: 利用自主开发的Perl脚本进行单倍型分析, 去除320个样本中相同的碱基序列, 得到共享单倍型121条, 经jModelTest2.2.2检

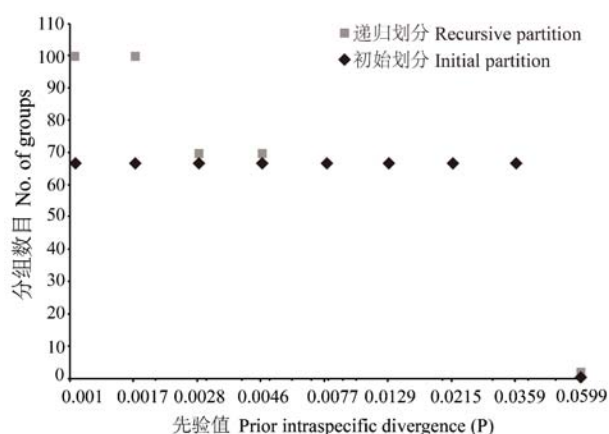


图1 ABGD方法划分MOTU结果

Fig. 1 The automatic partition results of dataset with ABGD method

测发现该数据集适用于HKY + I + G碱基替代模型。如图2所示, 种(Yule模型)-种群(溯祖模型)的转折点发生在-0.0075 Mya, 转折点对应的物种数量为68 (67-69)。零模型与GMYC模型之间的似然比值(LRT)为176.866***, 形态种数目(67)在GMYC划分数目的置信区间范围内(67-69)。除了MOTU31、MOTU16被合并为1个形态种*Plusia nadeja*之外, 剩余66个MOTUs与形态种呈一一对应的关系(附录2), 物种划分准确率达97%。

2.2 物种丰富度估计结果

在物种丰富度估计中, Chao1和ACE结果均表明, 基于DNA条形码(ABGD初始划分结果和GMYC模型)的物种丰富度估计与基于形态的物种丰富度估计之间没有显著差异, 置信区间呈现重叠(图3)。Chao1方法: $Chao1_{Morphology} = 99.8$, 置信区间[94.98-104.62]; $Chao1_{ABGD} = 100.12$, 置信区间[95.68-104.56]; $Chao1_{GMYC} = 100.83$, 置信区间[96.33-105.34]。ACE方法: $ACE_{Morphology} = 103.9$, 置信区间[92.64-115.16]; $ACE_{ABGD} = 104.80$, 置信区间[95.42-114.18]; $ACE_{GMYC} = 104.90$, 置信区间[92.64-115.16]; $ACE_{ABGD} = 104.80$, 置信区间[95.82-114.0]。ACE方法与Chao1方法之间没有显著性差异, Chao1方法置信区间跨度范围在ACE方法内(图3)。

2.3 等级多度分布曲线

本文绘制了基于形态、DNA条形码(ABGD初始划分结果和GMYC方法)的等级多度分布曲线(如图

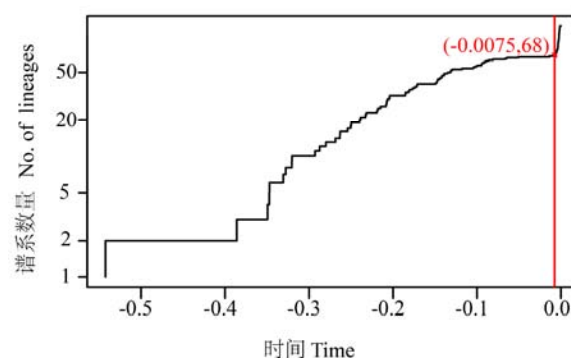


图2 121条单倍型基于超度量树绘制的时间-谱系数量关系图。曲线表示支长速率, 支长速率急剧上升的变化转折点对应物种界定的数量。

Fig. 2 Lineages-through-time plot based on the time calibrated tree obtained from all 121 haplotypes. The sharp increase in branching rate, corresponding to the transition from interspecies to intraspecies branching events.

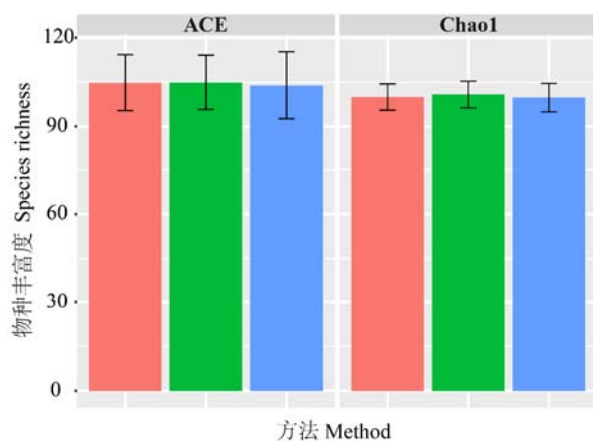


图3 基于不同方法的物种丰富度估计结果。粉红色表示基于ABGD方法的结果, 绿色表示基于GMYC方法的结果, 蓝色表示形态学结果, 黑色误差线表示置信区间。

Fig. 3 Species richness estimation results with different methods. Pink colour represents ABGD-based method. Green colour represents GMYC-based method. Blue colour represents morphology-based method. Black error bar indicates confidence interval.

4a-1, a-2, a-3)。结果表明, 基于形态、DNA条形码的等级多度分布曲线趋势一致, 通过K-S检测发现二者之间没有显著性差异(形态学与ABGD方法之间 $P = 0.45$; 形态学与GMYC方法之间 $P = 0.88$)。说明基于DNA条形码的等级多度分布曲线适用于该数据集并可以替代基于形态学的等级多度分布曲线。此外, 通过赤池信息量准则(AIC)检测发现, 基于DNA条形码的等级多度分布曲线显示该数据集

表1 ABGD方法MOTU分组结果与形态种类对照
Table 1 The comparison of ABGD method with morphospecies

MOTU ^①	种名 Species ^②	MOTU	种名 Species
MOTU01	<i>Lacanobia contigua</i>	MOTU34	<i>Parapoynx vittalis</i>
MOTU02	<i>Agrotis segetum</i> 黄地老虎	MOTU35	<i>Heliothis assulta</i> 烟青虫
MOTU03	<i>Conogethes punctiferalis</i> 桃蛀螟	MOTU36	<i>Herminia grisealis</i>
MOTU04	<i>Nola cicalricalis</i>	MOTU37	<i>Spodoptera depravata</i>
MOTU05	<i>Hipoepa fractalis</i> 中影单跗夜蛾	MOTU38	<i>Scopula subpunctaria</i>
MOTU06	<i>Oraesia lata</i> 平嘴壶夜蛾	MOTU39	<i>Diaphania indica</i> 瓜绢野螟
MOTU07	<i>Spodoptera litura</i> 斜纹夜蛾	MOTU40	<i>Botyodes diniasalis</i> 黄翅缀叶野螟
MOTU08	<i>Uropyia meticulodina</i> 核桃美舟蛾	MOTU41	<i>Emmelia trabealis</i> 谐夜蛾
MOTU09	<i>Evergestis extimalis</i>	MOTU42	<i>Termiopycha nigrescens</i>
MOTU10	<i>Mythimna separate</i>	MOTU43	<i>Ipimorpha subtusa</i> 杨逸色夜蛾
MOTU11	<i>Ctenoplusia albostrata</i>	MOTU44	<i>Spilosoma lubricipeda</i>
MOTU12	<i>Peridea lativitta</i> 侧带内斑舟蛾	MOTU45	<i>Parapediasia teterrellus</i>
MOTU13	<i>Thyas juno</i> 肖毛翅夜蛾	MOTU46	<i>Adoxophyes orana</i>
MOTU14	<i>Nephopterix fumella</i>	MOTU47	<i>Simplicia rectalis</i> 黑点贫夜蛾
MOTU15	<i>Spodoptera exigua</i> 甜菜夜蛾	MOTU48	<i>Glyptoteles leucacrinella</i> 亮雕斑螟
MOTU16	<i>Oglasa consanguis</i>	MOTU49	<i>Somena scintillans</i>
MOTU17	<i>Diaphania perspectalis</i> 黄杨绢野螟	MOTU50	<i>Anadevidia peponis</i> 葫芦夜蛾
MOTU18	<i>Athetis lepigone</i>	MOTU51	<i>Hypocala subsatura</i> 苹梢鹰夜蛾
MOTU19	<i>Miyakea raddeella</i>	MOTU52	<i>Choristoneura diversana</i> 异色卷蛾
MOTU20	<i>Herpetogramma pseudomagna</i> 狭翅切叶野螟	MOTU53	<i>Choristoneura luticostana</i> 棕色卷蛾
MOTU21	<i>Axylia putris</i> 朽木夜蛾	MOTU54	<i>Archips betulana</i>; <i>Archips podana</i>
MOTU22	<i>Mocis ancilla</i>	MOTU55	<i>Palpita nigropunctalis</i> 白蜡绢须野螟
MOTU23	<i>Mecyna tricolor</i>	MOTU56	<i>Epiblema foenella</i> 白钩小卷蛾
MOTU24	<i>Mamestra brassicae</i> 甘蓝夜蛾	MOTU57	<i>Grammodes geometrica</i> 象夜蛾
MOTU25	<i>Xanthorhoe quadrifasiata</i>	MOTU58; MOTU60	<i>Plusia nadeja</i>
MOTU26	<i>Euproctis similis</i>	MOTU59	<i>Sphinx caligineus</i>
MOTU27	<i>Zanclognatha lunalis</i> 朽镰须夜蛾	MOTU61	<i>Acronicta rumicis</i> 梨剑纹夜蛾
MOTU28	<i>Theretra japonica</i>	MOTU62	<i>Herminia tarsipennalis</i>
MOTU29	<i>Herminia tarsicrinalis</i>	MOTU63	<i>Pangrapta trimantesalis</i>
MOTU30	<i>Eremodrina morosa</i>	MOTU64	<i>Eutelia hamulatrix</i> 沟尾夜蛾
MOTU31	<i>Helicoverpa armigera</i> 棉铃虫	MOTU65	<i>Plusilla rosalia</i>
MOTU32	<i>Nomophila noctuella</i>	MOTU66	<i>Bertula bistrigata</i>
MOTU33	<i>Dysgonia mandschuriana</i>	MOTU67	<i>Gastropacha populifolia</i> 杨枯叶蛾

①表示基于ABGD方法的MOTU分组结果; ②表示对应的形态物种。ABGD方法与形态种不一致情况以灰色显示。
① Results of ABGD method. ② Results of morphospecies. The grey shaded areas show the difference between ABGD method and morphospecies.

的最优模型是Zipf-Mandelbrot模型, 与基于形态的检测结果一致(如图4b-1, b-2, b-3) ($AIC_{\text{Morphology}} = 199.54$; $AIC_{\text{ABGD}} = 205.97$; $AIC_{\text{GMYC}} = 207.52$)。

3 讨论

本研究以宿迁地区蛾类为例, 尝试提出基于

DNA条形码的方法估计群落的物种丰富度和绘制等级多度分布曲线, 检测了基于形态学的多样性评估方法和基于条形码的多样性评估方法之间的关系。结果显示, 基于DNA条形码的物种丰富度估计能够在一定程度上补充基于形态学的估计, 可以尝试将其应用于蛾类群落生态学调查研究中。

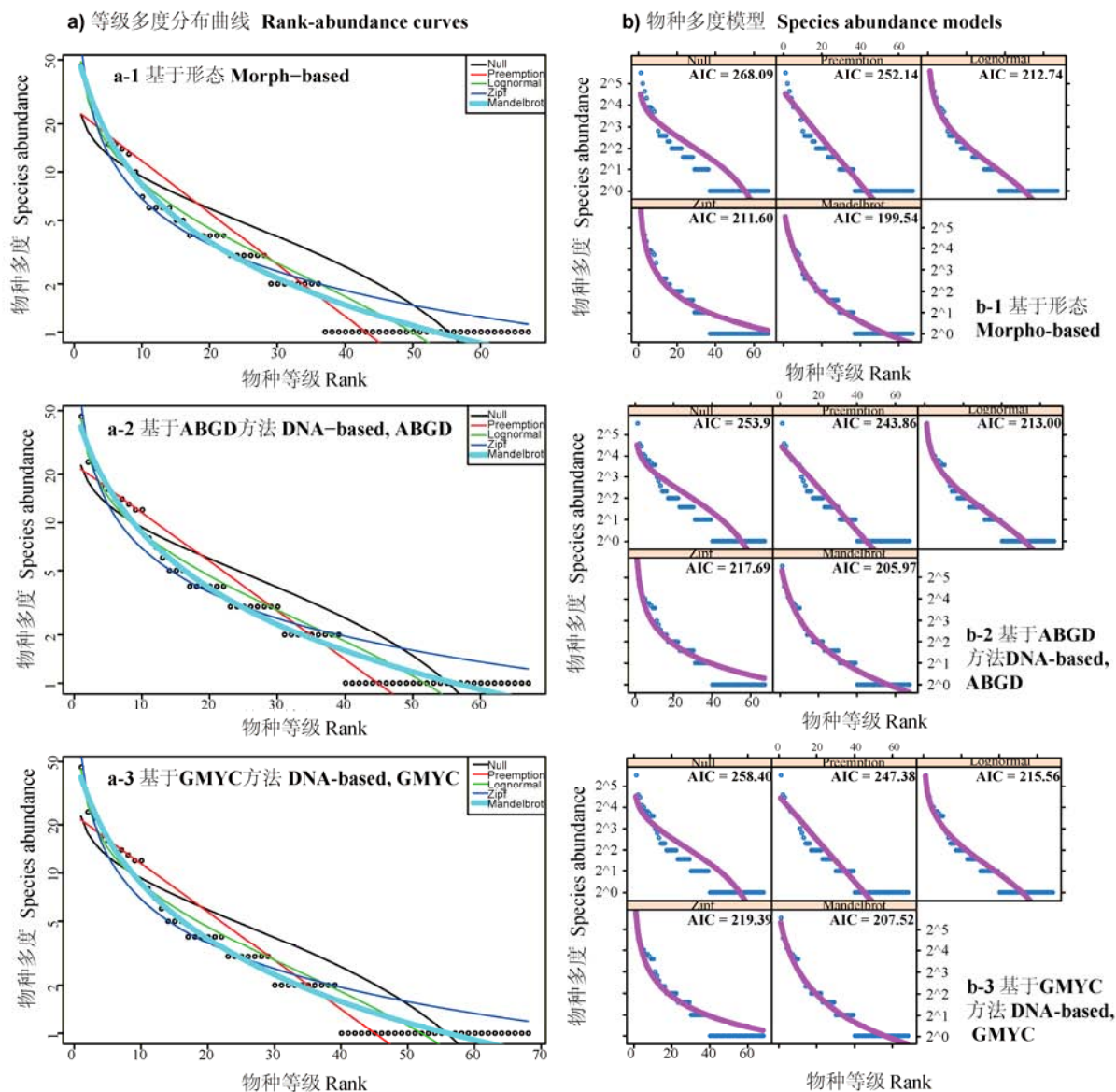


图4 等级多度分布曲线及模型拟合。a-1) 基于形态的等级多度分布曲线, a-2) 基于ABGD方法的等级多度分布曲线, a-3) 基于GMYC方法的等级多度分布曲线; b-1) 基于形态学的物种多度模型, b-2) 基于ABGD方法的物种多度模型, b-3) 基于GMYC方法的物种多度模型。黑点表示实际观测数据, 黑色曲线是零模型断棍模型, 红色曲线是生态位优先占领模型, 绿色曲线是正态分布模型, 深蓝色曲线是Zipf模型, 淡蓝色曲线是Zipf-Mandelbrot模型。

Fig. 4 Rank-abundance curves and fittings of five models. a-1) Species rank-abundance curves based on morphological method, a-2) Species rank-abundance curves based on ABGD method, a-3) Species rank-abundance curves based on GMYC method; b-1) Species abundance models based on morphological method, b-2) Species abundance models based on ABGD method, b-3) Species abundance models based on GMYC method. Black points represent the real abundance data. Black curve represents broken stick model. Red curve represents preemption model. Green curve represents log normal model. Dark blue curve represents Zipf model. Light blue curve represents Zipf-Mandelbrot model.

3.1 阈值法划分物种

研究者曾试图建立种内种间遗传距离差异的标准值(标准值为3%或10倍法则)对物种进行阈值划分(Hebert et al, 2004)。Smith等(2005)将条形码技

术应用于蚂蚁类群的多样性研究中, 并将2-3% COI序列差异作为区分各类群的标准。结果表明, 对于群落中的物种丰富度, 形态学方法和分子可操作单元方法之间并没有显著性的差异。微生物群落

研究中已经将3%的16S rRNA阈值作为区分物种的标准(Ovreas, 2000; Oline, 2006; Gomez-Alvarez et al, 2007; Herrera et al, 2007)。对于生物多样性调查,尤其是针对那些没有良好分类学基础的研究而言,根据DNA条形码阈值法进行物种识别确实行之有效。然而,该方法不适用于种内种间遗传距离分布存在重叠现象的研究(Hickerson et al, 2006; Rubinoff, 2006; Ward et al, 2009)。在本研究中,我们发现类群之间的平均种间遗传距离约是平均种内遗传距离的8倍,但是最小种间遗传距离0.0576小于最大种内遗传距离0.1559,使得种内和种间遗传距离分布出现了重叠(overlap),种内和种间没有严格定义的DNA条形码空白区(附录3),如果主观设定一个阈值在本研究中很难奏效。

3.2 ABGD方法和GMYC方法划分物种的有效性

本研究采用的ABGD方法和GMYC模型方法规避了阈值划分的主观性,仅仅依赖分子本身的信息而不需要借助参考数据库,可自主地进行物种划分(Puillandre et al, 2012)。ABGD方法的优势在于能够自动地找到DNA条形码空白区的位置,即使分布重叠,也可以进行准确的物种划分。该算法首先用先验种内变异范围去推断种内遗传差异的单边置信区间界限,用检测到的第一个DNA条形码空白区进行MOTUs划分(初始划分),以此类推,递归地进行置信限的推断和DNA条形码空白区检测,直到不能划分MOTUs为止(递归划分)。有学者对ABGD方法的可靠性进行了验证(Puillandre et al, 2012; Ratnasingham & Hebert, 2013),结果显示递归划分结果不稳定且容易出现过度划分MOTUs的情况,初始划分却在一个大范围P值内表现出稳定性,并且与形态种更加匹配。本研究同样支持该结论,初始划分结果稳定且与形态种更加吻合,当采用ABGD方法进行物种划分时,建议以初始划分结果为准。

Pons等(2006)提出GMYC模型对物种进行划分,该方法基于最大似然法进行模型构建。主要用于单分子标记的MOTUs界定,也有学者尝试用于多分子的界定,但效果还不稳定(Boykin et al, 2012)。该方法需在一个系统发育框架内进行,主要是确定物种形成事件与溯祖事件之间发生变化的转折点,通过此点对物种进行划分。相关学者以鸟类、蛾类、蝴蝶等为例,进行不同物种界定算法的比较验证,发现GMYC方法准确率最高(89%),其次为ABGD

算法(85.2%) (Ratnasingham & Hebert, 2013)。在本研究中, GMYC方法划分的准确率也较高(97%)。但从计算效率上看,基于BEAST的GMYC方法计算过程耗时较长,尤其对于大数据而言往往不太适合。划分结果显示,除了*P. nadeja*物种之外,绝大多数物种都能够通过ABGD方法和GMYC方法进行准确区分,我们尝试提出将这两种方法应用于群落多样性调查研究中。

DNA条形码的应用加速了生物多样性的研究进程,也使得大量的隐存种被不断发现。例如, Hebert等(2004)在关于哥斯达黎加西北部蝴蝶*Astraptes fulgerator*的研究中运用DNA条形码技术发现了10个隐存种; Smith等(2005)较早运用DNA条形码方法研究了非洲马达加斯加岛屿上蚂蚁的多样性,明确了DNA条形码在加速节肢动物类群多样性调查中的作用,并且发现DNA条形码方法会产生较高的物种丰富度;一项针对南美洲厄瓜多尔热带雨林尺蛾的研究表明基于DNA条形码的物种界定有时能发现额外的物种丰富度(Hebert & Humble, 2011)。在本研究中,无论是ABGD还是GMYC方法都将*P. nadeja*物种划分为2个MOTUs,说明隐存种存在的可能性,但是该种样本之间遗传距离差异较大(最大种内遗传距离为0.1559),不排除假阳性现象的存在,即在一个种内差异较高的物种中发现伪隐存种(Meyer & Paulay, 2005)。不完全谱系分选可能是导致假阳性现象、种内种间遗传距离出现重叠区域的原因(Wiemers & Fiedler, 2007)。MOTUs的划分可以作为物种分类的一个初步假设,是否真正存在隐存种仍需要增加形态学、生态学等其他非分子数据信息作为必要的补充。

3.3 Chao1方法和ACE方法的适用范围

非参数估计物种丰富度不需要物种多度分布模型作为前提假设,只需根据数据集本身进行统计学计算。通常使用Chao1方法和ACE方法,前者倾向估计物种丰富度的下限值(Chao, 1984),后者则基于多度的盖度统计量,更加侧重于那些广泛分布的物种或大量包含在每个群落中的物种。ACE方法估计的结果可能只包含整体群落的极少信息,因此有研究者指出,在样本量比较小的情况下, ACE方法易高估物种丰富度(O'hara, 2005)。本研究由于样本量较小, ACE方法的实际估计值确实略高于Chao1方法,但后者的估计结果落在了前者的置信区间

内, 因而二者间并不存在显著性的差异。Chao1 估计量提供了丰富度的最小估计, 并假设样本具有同质性(Chao, 1984), 而本研究中所涉及的样本均采自同一样点, 气候生态因子相同, 因此该指数对于本文数据集而言更为适用。今后研究需要注意的是, 在进行物种丰富度估计时, 需根据数据集的实际特点选择合适的度量体系。

3.4 结论

本研究尝试基于 DNA 条形码进行蛾类物种多样性初步探索, 一方面能够对农林害虫的防控提供基础数据; 另一方面有助于提高物种多样性的调查效率。本研究结论虽然支持基于 DNA 条形码的物种丰富度估计能够在一定程度上补充基于形态学的方法, 但由于采样的局限性, 不同物种间个体样本数量不均衡、部分物种中个体样本偏少, 每种蛾类的序列数目也有限(1–46 条), 导致代表性略显不足, 在涉及的类群方面还显得不够全面, 后续更详尽的研究需尽可能地纳入更多的类群以及引入宏条形码技术, 进行更为深入的验证和推理。

参考文献

- Austerlitz F, David O, Schaeffer B, Bleakley K, Olteanu M, Leblois R, Veuille M, Laredo C (2009) DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics*, 10(Suppl. 14), 1–13.
- Blaxter M, Floyd R (2003) Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 268–269.
- Boykin LM, Armstrong KF, Kubatko L, Barro PD (2012) Species delimitation and global biosecurity. *Evolutionary Bioinformatics*, 8, 1–37.
- Burnham KP, Anderson DR (2002) *Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. Springer-Verlag, New York.
- Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 265–270.
- Chao A, Hwang WH, Chen YC, Kuo CY (2000) Estimating the number of shared species in two communities. *Statistica Sinica*, 10, 227–246.
- Colwell RK, Coddington JA (1994) Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 345, 101–118.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Decaëns T, Porco D, James SW, Brown G, Da SE, Dupont L, Lapid E, Rougerie R, Taberlet P, Roy V (2015) Dissecting tropical earthworm biodiversity patterns in tropical rainforests through the use of DNA barcoding. *Genome*, 58, 210.
- Dincă V, Zakharov EV, Hebert PDN, Vila R (2011) Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278, 347–355.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4, e88.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Ebach MC, Holdrege C (2005) DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature*, 434, 697.
- Ekrem T, Willassen E, Stur E (2007) A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 530–542.
- Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology*, 62, 707–724.
- Gomez-Alvarez V, King GM, Nüsslein K (2007) Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 60–73.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hebert PDN, Humble LM (2011) A comprehensive DNA barcode library for the looper moths (Lepidoptera: Geometridae) of British Columbia, Canada. *PLoS ONE*, 6, e18290.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 14812–14817.
- Herrera A, Héry M, Stach JEM, Jaffré T, Normand P, Navarro E (2007) Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *European Journal of Soil Biology*, 43, 130–139.
- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C (2006) DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology*, 55, 729–739.
- Jin Q, He LJ, Zhang AB (2012) A simple 2D non-parametric resampling statistical approach to assess confidence in species identification in DNA barcoding—an alternative to Likelihood and Bayesian approaches. *PLoS ONE*, 7, e50831.
- Jin Q, Han HL, Hu XM, Li XH, Zhu CD, Ho SYW, Ward RD, Zhang AB (2013) Quantifying species diversity with a DNA barcoding-based method: Tibetan moth species (Noctuidae) on the Qinghai-Tibetan Plateau. *PLoS ONE*, 8, e64428.
- Jin Q, Zhang AB (2013) Distance-based DNA barcoding

- methods for insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50, 283–287. (in Chinese) [金倩, 张爱兵 (2013) 昆虫DNA条形码分析中的距离方法. *应用昆虫学报*, 50, 283–287.]
- Kempton RA, Taylor LR (1974) Log-series and log-normal parameters as diversity discriminants for the Lepidoptera. *The Journal of Animal Ecology*, 43, 381–399.
- Leray M, Knowlton N (2015) DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112, 2076–2081.
- Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y, Chen S (2015) Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 90, 157–166.
- MacArthur RH (1957) On the relative abundance of bird species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 43, 293–295.
- Mandelbrot BB (1983) *The Fractal Geometry of Nature*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- May RM (1988) How many species are there on earth? *Science*, 241, 1441–1449.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3, e422.
- O'hara RB (2005) Species richness estimators: how many species can dance on the head of a pin? *Journal of Animal Ecology*, 74, 375–386.
- Oline DK (2006) Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6965–6971.
- Ovreas L (2000) Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters*, 3, 236–251.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595–609.
- Preston FW (1948) The commonness, and rarity, of species. *Ecology*, 29, 254–283.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21, 1864–1877.
- Qin J, Zhang YZ, Zhou X, Kong XB, Wei SJ, Ward RD, Zhang AB (2015) Mitochondrial phylogenomics and genetic relationships of closely related pine moth (*Lasiocampidae*: *Dendrolimus*) species in China, using whole mitochondrial genomes. *BMC Genomics*, 16, 428.
- Quicke DLJ, Smith MA, Janzen DH, Hallwachs W, Fernandez-Triana J, Laurence NM, Zaldivar-Riveron A, Shaw MR, Broad GR, Klopstein S, Shaw SR, Hrccek J, Hebert PDN, Miller SE, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Sharkey MJ, Sharanowski BJ, Jussila R, Gauld ID, Chesters D, Vogler AP (2012) Utility of the DNA barcoding gene fragment for parasitic wasp phylogeny (Hymenoptera: Ichneumonoidea): data release and new measure of taxonomic congruence. *Molecular Ecology Resources*, 12, 676–685.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4: MCMC Trace Analyses Tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> (accessed on 2014-10-08).
- Ratnasingham S, Hebert PD (2013) A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8, e66213.
- Rubioff D (2006) DNA barcoding evolves into the familiar. *Conservation Biology*, 20, 1548–1549.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Schindel DE, Miller SE (2005) DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435, 17.
- Smith MA, Fisher BL, Hebert PDN (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1825–1834.
- Tokeshi M (1990) Niche apportionment or random assortment: species abundance patterns revisited. *The Journal of Animal Ecology*, 10, 1129–1146.
- Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Ward RD, Hanner R, Hebert PDN (2009) The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329–356.
- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? — a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology*, 4, 8.
- Wilson JB (1991) Methods for fitting dominance/diversity curves. *Journal of Vegetation Science*, 2, 35–46.
- Zhang AB, Feng J, Ward RD, Wan P, Gao Q, Wu J, Zhao WZ (2012a) A new method for species identification via protein-coding and non-coding DNA barcodes by combining machine learning with bioinformatic methods. *PLoS ONE*, 7, e30986.
- Zhang AB, Muster C, Liang HB, Zhu CD, Crozier R, Wan P, Feng J, Ward RD (2012b) A fuzzy-set-theory-based approach to analyse species membership in DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 21, 1848–1863.
- Zhang AB, Sikes DS, Muster C, Li SQ (2008) Inferring species membership using DNA sequences with back-propagation neural networks. *Systematic Biology*, 57, 202–215.
- Zipf GK (1949) *Human Behavior and the Principle of Least Effort*. Hafner, New York.

(责任编辑: 黄晓磊 责任编辑: 闫文杰)

附录 Supplementary Material

附录1 样品信息及COI序列GenBank登录号

Appendix 1 Species, Sample ID and GenBank accession numbers in this study

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2016202-1.pdf>

附录2 GMYC方法划分MOTUs的结果。该树为基于BEAST软件构建的超度量树, 树中红色竖线表示物种形成事件和种群溯祖事件的转折点, 支长为红色表示种下种群溯祖事件, 支长为黑色表示种上物种形成事件, 右侧方格内为GMYC划分的MOTU结果。

Appendix 2 MOTU results with GMYC method. The ultrametric tree implemented with BEAST software. Red line indicates transition from between-species to within-species. Red branches represent coalescence processes. Black branches represent speciation and extinction processes. Box shows the MOTU results with GMYC method.

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2016202-2.pdf>

附录3 DNA条形码空白区

Appendix 3 DNA barcoding gap

<http://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2016202-3.pdf>

金倩, 陈芬, 罗桂杰, 蔡卫佳, 刘旭, 王昊, 杨采青, 郝梦迪, 张爱兵. 基于DNA条形码的物种丰富度估计: 以宿迁地区鳞翅目蛾类为例. 生物多样性, 2016, **24** (11): 1296–1305. <http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2016202>

附录1 样品信息及COI序列GenBank登录号

Appendix 1 Species, sample ID and GenBank accession numbers in this study

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
草螟科 Crambidae	缀叶野螟属 <i>Botyodes</i>	黄翅缀叶野螟 <i>B. diniasalis</i>	SQ150927036	KX440742
			SQ150927011	KX440747
			SQ150924009	KX440750
			SQ150925044	KX440791
			SQ150925004	KX440805
			SQ150925037	KX440807
			SQ150925075	KX440838
			SQ150926067	KX440841
			SQ150922069	KX440857
			SQ150926056	KX440870
			SQ150926101	KX440897
			SQ150926089	KX440899
			SQ150926070	KX440915
			SQ150925082	KX440940
	蛀野螟属 <i>Conogethes</i>	桃蛀螟 <i>C. punctiferalis</i>	SQ150924020	KX440633
			SQ150923039	KX440644

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
			SQ150924075	KX440647
			SQ150924029	KX440654
			SQ150923012	KX440659
			SQ150924010	KX440667
			SQ150926055	KX440668
			SQ150926080	KX440682
			SQ150924077	KX440690
			SQ150926041	KX440732
			SQ150922080	KX440796
			SQ150923023	KX440799
			SQ150927019	KX440815
			SQ150922025	KX440740
			SQ150925039	KX440697
			SQ150925065	KX440793
			SQ150927015	KX440665
			SQ150927033	KX440670
			SQ150927004	KX440866
			SQ150926068	KX440719

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
	<i>Mecyna</i>	<i>M. tricolor</i>	SQ150925090	KX440746
			SQ150926005	KX440663
			SQ150926004	KX440676
			SQ150926010	KX440679
			SQ150923031	KX440691
			SQ150922058	KX440692
			SQ150922158	KX440693
			SQ150925043	KX440694
			SQ150925079	KX440696
			SQ150925052	KX440705
			SQ150923006	KX440724
			SQ150926087	KX440735
			SQ150926100	KX440741
			SQ150926104	KX440743
			SQ150926065	KX440748
			SQ150926022	KX440751
			SQ150924041	KX440784
			SQ150926109	KX440787
			SQ150924086	KX440794

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
			SQ150925067	KX440798
			SQ150925045	KX440830
			SQ150927026	KX440834
			SQ150925011	KX440849
			SQ150926029	KX440852
			SQ150927038	KX440862
			SQ150926033	KX440874
			SQ150925073	KX440877
			SQ150926028	KX440880
			SQ150926054	KX440882
			SQ150925085	KX440906
			SQ150925084	KX440919
			SQ150925070	KX440929
			SQ150924058	KX440945
			SQ150927039	KX440662
	<i>Miyakea</i>	<i>M. raddeella</i>	SQ150925078	KX440851
	<i>Nomophila</i>	<i>N. noctuella</i>	SQ150927031	KX440700
			SQ150927016	KX440716
			SQ150927006	KX440783

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
裳蛾科 Erbidae	绢须野螟属 <i>Palpita</i>	白蜡绢须野螟 <i>P. nigropunctalis</i>	SQ150926074	KX440879
			SQ150926115	KX440907
			SQ150926105	KX440819
			SQ150926096	KX440832
			SQ150927034	KX440764
			SQ150927020	KX440712
			SQ150926027	KX440770
			SQ150927024	KX440817
			SQ150927023	KX440905
			SQ150926040	KX440831
			SQ150922203	KX440721
			SQ150926044	KX440890
			SQ150926094	KX440925
			SQ150922166	KX440689
裳蛾科 Erbidae	绢须野螟属 <i>Palpita</i>	白蜡绢须野螟 <i>P. nigropunctalis</i>	SQ150924049	KX440914
			SQ150922048	KX440635
			SQ150925008	KX440782
			SQ150925008	KX440782
			SQ150925008	KX440782
			SQ150925008	KX440782

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
	嘴壶夜蛾属	平嘴壶夜蛾	SQ150926098	KX440653
			<i>Oraesia</i>	<i>O. lata</i>
			SQ150924037	KX440703
			SQ150925081	KX440714
	<i>Spilosoma</i>	<i>S. lubricipeda</i>	SQ150926015	KX440717
			SQ150925047	KX440730
			SQ150925024	KX440855
			SQ150926014	KX440761
尺蛾科 Geometridae	<i>Zanclognatha</i>	朽镰须夜蛾	SQ150922036	KX440684
	<i>Z. lunalis</i>		SQ150922075	KX440927
	<i>Scopula</i>	<i>S. subpunctaria</i>	SQ150927008	KX440731
			SQ150927028	KX440801
			SQ150924083	KX440842
	<i>Xanthorhoe</i>	<i>X. quadrifasiata</i>	SQ150926025	KX440916
			SQ150926059	KX440646
			SQ150927029	KX440669
			SQ150927025	KX440797
			SQ150922087	KX440833

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
枯叶蛾科 Lasiocampidae	<i>Gastropacha</i>	杨枯叶蛾	SQ150922066	KX440950
		<i>G. populifolia</i>		
毒蛾科 Lymantriidae	<i>Euproctis</i>	<i>E. similis</i>	SQ150927030	KX440681
			SQ150926102	KX440756
			SQ150926075	KX440802
			SQ150926030	KX440779
	<i>Somena</i>	<i>S. scintillans</i>	SQ150926031	KX440920
	剑纹夜蛾属 <i>Acronicta</i>	梨剑纹夜蛾 <i>A. rumicis</i>	SQ150923027	KX440892
			SQ150922191	KX440632
			<i>A. segetum</i>	
			SQ150926035	KX440683
			SQ150927002	KX440839
			SQ150926007	KX440847
			SQ150924043	KX440781
			<i>A. peponis</i>	
			SQ150926063	KX440856
			SQ150925020	KX440881
夜蛾科 Noctuidae	地夜蛾属 <i>Agrotis</i>	黄地老虎 <i>A. segetum</i>	SQ150925057	KX440895
			SQ150924076	KX440666
			SQ150924096	KX440816

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
	<i>Bertula</i>	<i>B. bistrigata</i>	SQ150926043	KX440845
			SQ150925026	KX440883
			SQ150924057	KX440656
			SQ150926021	KX440677
			SQ150924051	KX440699
			SQ150924063	KX440702
			SQ150922012	KX440704
			SQ150926024	KX440715
			SQ150922096	KX440767
			SQ150925009	KX440774
			SQ150925056	KX440836
			SQ150923060	KX440854
			SQ150926050	KX440900
			SQ150925072	KX440903
			SQ150925042	KX440911
			SQ150926108	KX440948
			SQ150922063	KX440949
	<i>Crenoplusia</i>	<i>C. albostrigata</i>	SQ150924036	KX440636

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
	<i>Dysgonia</i>	<i>D. mandschuriana</i>	SQ150924046	KX440709
	<i>Emmelia</i>	谐夜蛾	SQ150926003	KX440745
		<i>E. trabealis</i>		
	<i>Eremodrina</i>	<i>E. morosa</i>	SQ150922167	KX440698
			SQ150925048	KX440729
			SQ150925005	KX440822
			SQ150926032	KX440946
	尾夜蛾属	沟尾夜蛾	SQ150924024	KX440922
	<i>Eutelia</i>	<i>E. hamulatrix</i>		
	铃夜蛾属	棉铃虫	SQ150925038	KX440657
	<i>Helicoverpa</i>	<i>H. armigera</i>		
			SQ150927017	KX440672
			SQ150923025	KX440695
			SQ150925086	KX440722
			SQ150927013	KX440726
			SQ150924050	KX440737
			SQ150926058	KX440760
			SQ150925016	KX440773
			SQ150925094	KX440785
			SQ150925068	KX440884
			SQ150925083	KX440888

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
夜蛾科 Noctuidae	铃夜蛾属 <i>Helicoverpa</i>	棉铃虫 <i>H. armigera</i>	SQ150925051	KX440901
			SQ150925050	KX440923
			SQ150925027	KX440930
			SQ150925023	KX440934
		烟青虫 <i>H. assulta</i>	SQ150924099	KX440661
			SQ150926020	KX440701
			SQ150926016	KX440752
			SQ150924109	KX440875
			SQ150925098	KX440896
			SQ150925088	KX440926
			SQ150926097	KX440941
	逸色夜蛾属 <i>Ipimorpha</i> <i>Lacanobia</i>	杨逸色夜蛾 <i>I. subtusa</i> <i>L. contigua</i>	SQ150926018	KX440757
			SQ150922168	KX440631
			SQ150922049	KX440637
			SQ150922136	KX440763
	<i>Mamestra</i>	甘蓝夜蛾 <i>M. brassicae</i>	SQ150922142	KX440795
			SQ150922148	KX440928
			SQ150926038	KX440675

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
	<i>Mocis</i>	<i>M. ancilla</i>	SQ150925074	KX440917
	<i>Mythimna</i>	<i>M. separate</i>	SQ150924069	KX440642
			SQ150924002	KX440645
			SQ150924034	KX440688
			SQ150925053	KX440708
			SQ150927001	KX440727
			SQ150922003	KX440728
			SQ150926049	KX440749
			SQ150926037	KX440765
			SQ150922040	KX440775
			SQ150925087	KX440780
			SQ150926057	KX440790
			SQ150926073	KX440800
			SQ150924091	KX440810
			SQ150924027	KX440828
			SQ150925034	KX440837
			SQ150926090	KX440840
			SQ150925025	KX440844
			SQ150926060	KX440889

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
			SQ150922026	KX440912
			SQ150926061	KX440947
			SQ150927018	KX440634
			SQ150925097	KX440641
			SQ150925041	KX440651
			SQ150926048	KX440723
			SQ150925046	KX440725
			SQ150926039	KX440759
			SQ150925036	KX440806
			SQ150927035	KX440813
			SQ150925049	KX440814
			SQ150926071	KX440823
			SQ150927037	KX440871
			SQ150925062	KX440921
			SQ150924047	KX440655
			SQ150926069	KX440680
			SQ150924012	KX440720
			SQ150926036	KX440789
			SQ150922176	KX440811

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
	<i>Plusilla</i>	<i>P. rosalia</i>	SQ150925006	KX440863
			SQ150926026	KX440933
			SQ150925015	KX440769
	<i>Simplicia</i>	黑点贫夜蛾 <i>S. rectalis</i>	SQ150925003	KX440788
			SQ150926072	KX440859
			SQ150922197	KX440643
	斜纹夜蛾属 <i>Spodoptera</i>	<i>S. depravata</i>	SQ150924054	KX440652
			SQ150926008	KX440660
			SQ150926111	KX440674
			SQ150925018	KX440685
			SQ150922028	KX440713
			SQ150926006	KX440733
			SQ150926047	KX440755
			SQ150926062	KX440758
			SQ150925007	KX440772
			SQ150922041	KX440777
			SQ150925022	KX440778
			SQ150922031	KX440786

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
		甜菜夜蛾 <i>S. exigua</i>	SQ150927003	KX440820
			SQ150926042	KX440829
			SQ150926011	KX440850
			SQ150926079	KX440858
			SQ150925017	KX440861
			SQ150926023	KX440864
			SQ150924098	KX440886
			SQ150926045	KX440891
			SQ150925064	KX440909
			SQ150923005	KX440913
			SQ150924044	KX440918
			SQ150925054	KX440936
			SQ150926103	KX440650
			SQ150926099	KX440664
			SQ150926017	KX440673
			SQ150926112	KX440678
			SQ150924061	KX440706
			SQ150926052	KX440707
			SQ150927007	KX440710

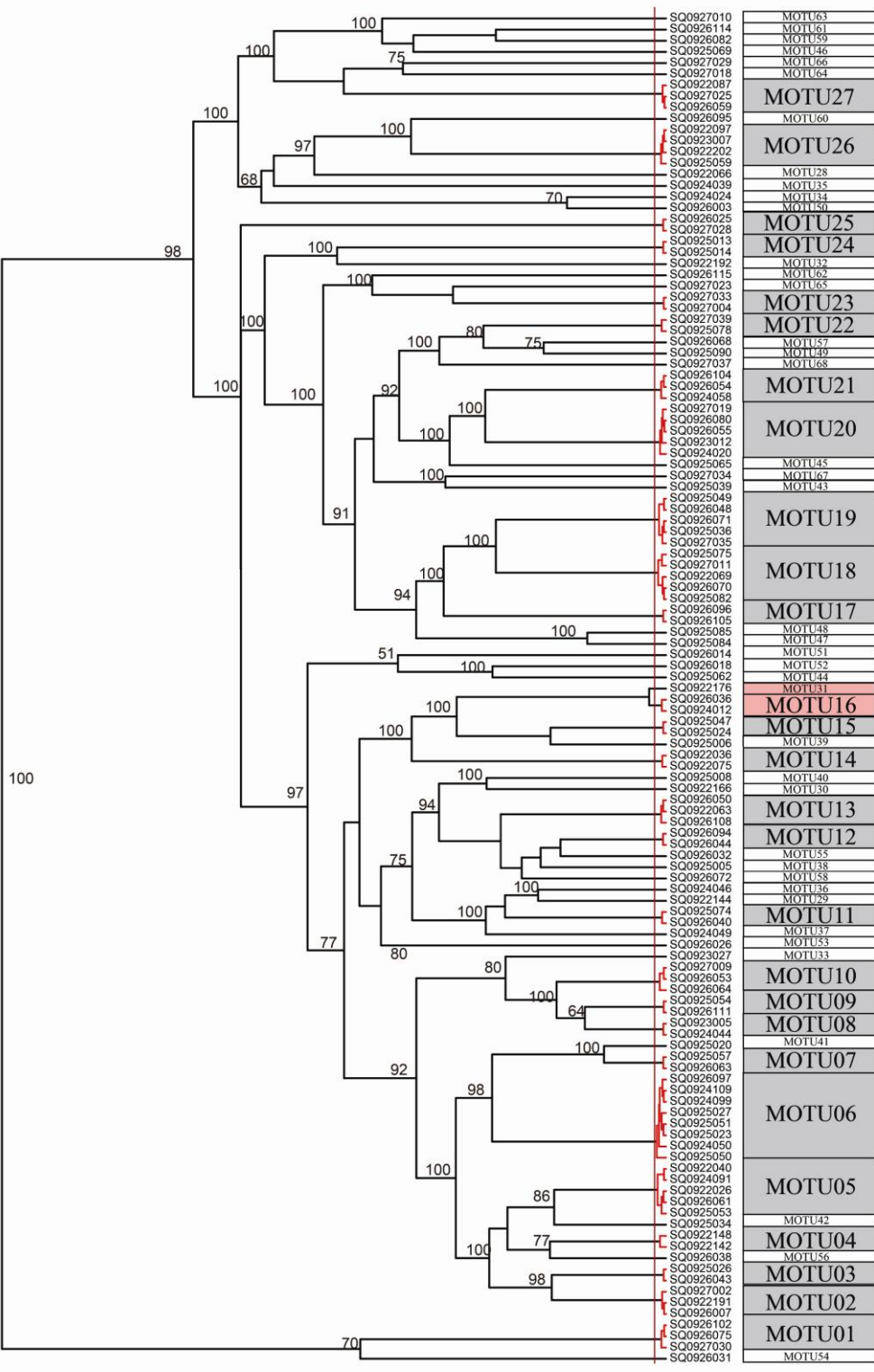
科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
			SQ150926051	KX440711
			SQ150926083	KX440718
			SQ150925055	KX440734
			SQ150926019	KX440736
			SQ150927009	KX440738
			SQ150926013	KX440739
			SQ150927022	KX440753
			SQ150927005	KX440754
			SQ150925092	KX440776
			SQ150926113	KX440792
			SQ150925093	KX440803
			SQ150927014	KX440809
			SQ150926084	KX440812
			SQ150924031	KX440818
			SQ150925077	KX440824
			SQ150926110	KX440825
			SQ150926064	KX440826
			SQ150926078	KX440835
			SQ150924005	KX440843

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
			SQ150926088	KX440846
			SQ150926009	KX440848
			SQ150926092	KX440853
			SQ150925021	KX440865
			SQ150926066	KX440868
			SQ150925071	KX440869
			SQ150926046	KX440872
			SQ150926086	KX440887
			SQ150925080	KX440893
			SQ150925010	KX440898
			SQ150925058	KX440902
			SQ150925066	KX440904
			SQ150926012	KX440910
			SQ150926093	KX440931
			SQ150925029	KX440937
			SQ150926106	KX440938
			SQ150925063	KX440939
			SQ150923061	KX440942
			SQ150926081	KX440943

科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
舟蛾科 Notodontidae	肖毛翅夜蛾属 <i>Thyas</i>		SQ150926053	KX440944
		斜纹夜蛾 <i>S. litura</i>	SQ150924045	KX440638
		肖毛翅夜蛾 <i>T. juno</i>	SQ150922144	KX440648
	内斑舟蛾属 <i>Peridea</i>	侧带内斑舟蛾 <i>P. lativitta</i>	SQ150926034	KX440860
		美舟蛾属 <i>Uropyia</i>	SQ150922192	KX440639
		核桃美舟蛾 <i>U. meticolodina</i>		
			SQ150925096	KX440640
螟蛾科 Pyralidae	<i>Glyptoteles</i>	<i>G. leucacrinella</i>	SQ150926095	KX440771
	<i>Nephopterix</i>	<i>N. fumella</i>	SQ150924068	KX440649
			SQ150924074	KX440766
			SQ150922043	KX440873
			SQ150922146	KX440894
			SQ150922097	KX440908
			SQ150925059	KX440935
	<i>Termioptycha</i>	<i>T. nigrescens</i>	SQ150925095	KX440658
			SQ150922201	KX440687
			SQ150923007	KX440744
			SQ150922202	KX440762

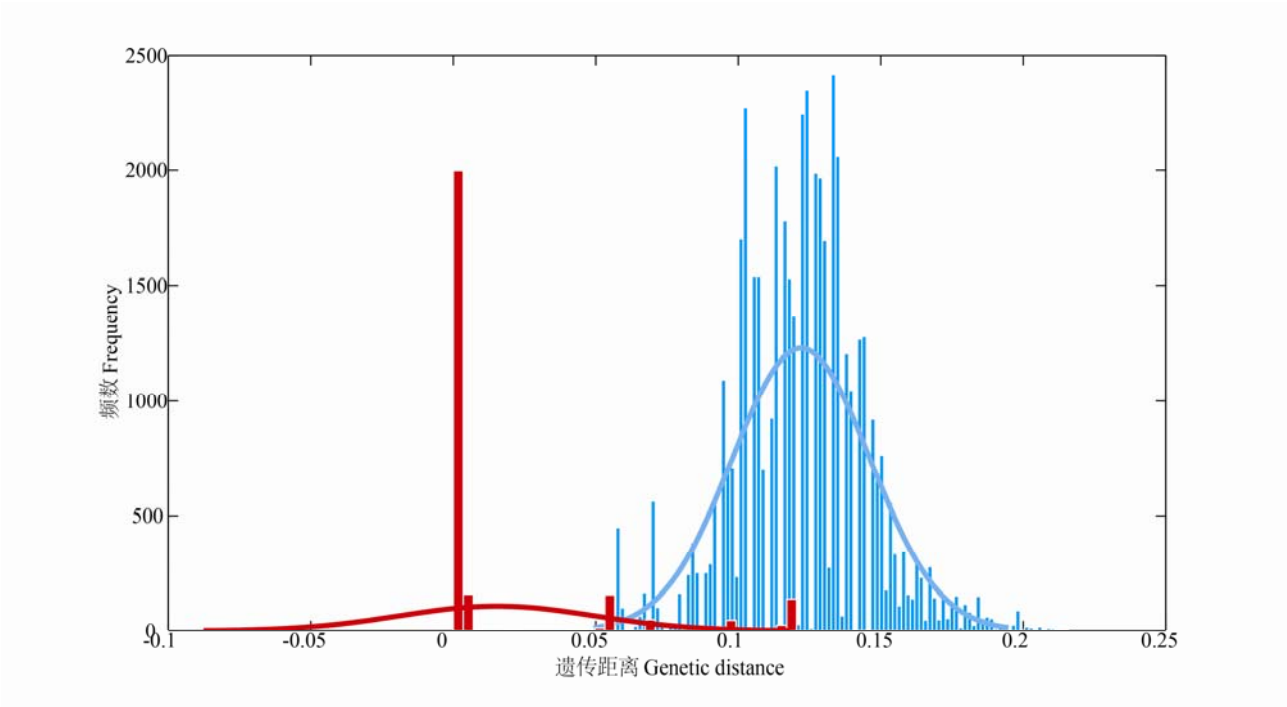
科	属	种	标本编号	序列号
Family	Genus	Species	Sample ID	Accession no.
天蛾科 Sphingidae	<i>Sphinx</i>	<i>S. caligineus</i>	SQ150925089	KX440808
			SQ150926085	KX440821
			SQ150925013	KX440878
	<i>Theretra</i>	<i>T. japonica</i>	SQ150925014	KX440885
			SQ150924039	KX440686
卷蛾科 Tortricidae	<i>Adoxophyes</i>	<i>A. orana</i>	SQ150925069	KX440768
	<i>Archips</i>	<i>A. betulana</i>	SQ150926077	KX440804
		<i>A. podana</i>	SQ150926114	KX440876
	色卷蛾属 <i>Choristoneura</i>	异色卷蛾 <i>C. diversana</i>	SQ150926076	KX440867
			SQ150927021	KX440924
	<i>Epiblema</i>		SQ150926082	KX440932
		棕色卷蛾 <i>C. luticostana</i>	SQ150927027	KX440671
		白钩小卷蛾 <i>E. foenella</i>	SQ150927010	KX440827

金倩, 陈芬, 罗桂杰, 蔡卫佳, 刘旭, 王昊, 杨采青, 郝梦迪, 张爱兵. 基于DNA条形码的物种丰富度估计: 以宿迁地区鳞翅目蛾类为例. 生物多样性, 2016, **24** (11): 1296–1305.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2016202>



附录2 GMYC方法划分MOTUs的结果。该树为基于BEAST软件构建的超度量树，树中红色竖线表示物种形成事件和种群溯祖事件的转折点，支长为红色表示种下种群溯祖事件，支长为黑色表示种上物种形成事件，右侧方格内为GMYC划分的MOTU结果。
Appendix 2 MOTU results with GMYC method. The ultrametric tree implemented with BEAST software. Red line indicates transition from between-species to within-species. Red branches represent coalescence processes. Black branches represent speciation and extinction processes. Box shows the MOTU results with GMYC method.

金倩, 陈芬, 罗桂杰, 蔡卫佳, 刘旭, 王昊, 杨采青, 郝梦迪, 张爱兵. 基于DNA条形码的物种丰富度估计: 以宿迁地区鳞翅目蛾类为例. 生物多样性, 2016, **24** (11): 1296–1305.
<http://www.biodiversity-science.net/CN/10.17520/biods.2016202>



附录3 DNA条形码空白区
Appendix 3 DNA barcoding gap