

蜚蠊目昆虫的野外采集、标本制作和数据分析

Collection, Specimen Making and Data Analysis of Blattodea Species

邓文波¹, 车艳丽¹, 李志强², 王宗庆^{1,*}

¹植物保护学院, 西南大学, 重庆; ² 广东省生物资源应用研究所, 广州

*通讯作者邮箱: zqwang2006@126.com

引用格式: 邓文波, 车艳丽, 李志强, 王宗庆. (2021). 蜚蠊目昆虫的野外采集、标本制作和数据分析. *Bio-101* e1010634. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010634.

How to cite: Deng, W. B., Che, Y. L., Li, Z. Q. and Wang, Z. Q. (2021). Collection, Specimen Making and Data Analysis of Blattodea Species. *Bio-101* e1010634. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010634. (in Chinese)

摘要: 蜚蠊目昆虫系统学研究中, 基本可以分为两个方面: 经典分类学和分子系统学。前者主要是通过形态对蜚蠊目昆虫进行分类学研究, 后者则主要是从分子水平上来进行物种界定并研究各分类单元之间的亲缘关系、起源及演化。这两方面研究相互补充、相互支撑, 极大的促进了蜚蠊系统学的发展。基于此, 本文较为详细地总结并梳理了目前蜚蠊目昆虫系统学研究中常用的研究方法, 以期为蜚蠊目或其他类群的系统学学者提供一个详实的参考和借鉴。

关键词: 蜚蠊, 野外采集, 标本制作, 物种界定, 系统发育, 分化时间

研究背景

蜚蠊目昆虫包含蜚蠊和白蚁。白蚁与蜚蠊中隐尾蠊在取食习性、若虫形态以及内共生菌等方面有诸多相似之处, Lo *et al.* (2000) 首次利用分子数据揭示了白蚁是从食木蜚蠊进化而来, 随后探究白蚁与蜚蠊关系的多项基于分子数据 (Lo *et al.*, 2006; Terry and Whiting, 2005) 和形态数据 (Klass and Meier, 2006) 的系统发育研究展开, Inward *et al.* (2007) 建议取消等翅目分类地位, 降为白蚁超科归入到蜚蠊目中。虽然白蚁是社会性的蜚蠊, 但按照习惯, 仍将其称为白蚁。蜚蠊目也因此成为一个中型规模的昆虫目, 世界已知有 7500 余种 (其中, 蜚蠊 4600 余种, 白蚁 2900 余种)。但实际上该目昆虫多样性应该远不止如此, 因为世界上很多物种多样性很丰富的地区都没有系统地调查过

蜚蠊目昆虫的物种多样性；我国也是如此，生境多样化程度高，物种丰富，却缺乏系统调查，而且蜚蠊类群的种间形态差异小，容易导致错误鉴定。白蚁归入蜚蠊目以后，该目的系统发育研究也是非常火热，虽然澄清了一些关键类群的系统发育关系，但是还有很多类群的亲缘关系依然未能澄清，需要进一步的研究。

该类群栖息地范围广、类型复杂，从温带到热带森林、草甸、荒地、溪流、盐沼、高原、沿海地带以及沙漠，也可分布到海拔高度 5000 多米的地方。多数蜚蠊目昆虫都是生活在地表或土壤中，林冠层也是蜚蠊主要的栖息场所，少数种类是水生的。多数该类昆虫都喜欢温暖潮湿的环境，已知蜚蠊种类的绝大多数都分布于非洲、亚洲以及美洲热带雨林，也有一些类群生活在温带地区或适应高海拔或高纬度地区冷湿地区。多数种类白天主要栖息于枯枝落叶下，取食土壤中或地表的有机质或落叶，有时也取食其他动物或昆虫的尸体；也有一些蜚蠊在树木冠层栖息、觅食。晚上成虫则在灌木叶片、草叶、树干等处栖息，寻找异性蜚蠊进行交配，若虫则隐藏在林下地面各类覆盖物之下栖息。另外，洞穴栖息（包含在空心的木头，其他社会性昆虫的巢穴，人造洞穴，脊椎动物的洞穴，在土壤中发掘的洞穴，在木头上挖掘的洞穴）的蜚蠊目昆虫也占有很大的比重，洞穴栖息的专化程度因种而已，有些物种发生了适应性变化（视力或翅丧失、无昼夜节律性、温度适应范围窄或湿度耐受性低）而被限制生活在洞穴里面生活，多样而特殊的行为习性及其栖息生境，为该类群的物种多样性调查及系统发育关系研究增添了诸多困难和挑战。

采集工具和相关试剂

1. 野外采集工具：

- 1) 吸虫管
- 2) 排刷
- 3) 小瓷盘
- 4) 镊子
- 5) 收集管
- 6) 多功能兵工铲
- 7) 柴刀
- 8) 捕虫网

- 9) 镊子
 - 10) 头灯
 - 11) 强光手电
 - 12) 黑光灯
 - 13) 诱集管
 - 14) 马式网
2. 制作标本工具:
 - 1) 昆虫针
 - 2) 三级台
 3. 采集或保存试剂
 - 1) 无水乙醇 (重庆骏伟广, 05.001.0170)
 - 2) RNALater (拓世众和, RE1031-100 ml)
 - 3) 丙二醇 (重庆骏伟广, 05.001.0615)

常用分析软件与网站

1. BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
2. MEGA7.0: <https://www.megasoftware.net>
3. ABGD: <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd>
4. Partition Finder: <http://www.robertlanfear.com/partitionfinder>
5. BEAST: <http://www.beast2.org>
6. R: <https://www.r-project.org>
7. TNT: <file:///Users/Shirley/che/Downloads/TNT/tnt.htm>
8. PAUP: <http://paup.csit.fsu.edu>
9. MAFFT7: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>
10. DAMBE: <http://dambe.bio.uottawa.ca/DAMBE/dambe.aspx>
11. RaxML: <https://github.com/stamatak/standard-RAxML>
12. MrBayes: <http://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html>
13. Tracer: <http://beast.community/tracer>
14. Mesquite: <http://www.mesquiteproject.org/>

一、野外采集

蜚蠊标本的采集方法有很多种，在进行种类调查时需要多种方法结合使用，以避免调查的片面性，因为不同类别的蜚蠊栖镜、行为存在很大的变化。此外蜚蠊目中白蚁有品级分化的现象，因而采集白蚁时需同时采集各品级不同形态的标本。

1. 白蚁的采集

白蚁生活于多种环境中，根据不同白蚁的生物学特性，在其活跃的时间和生境采集，常用工具有吸虫管、排刷、小瓷盘、镊子、收集管、多功能兵工铲、柴刀等。采集白蚁时，应尽量采集全部虫态、品级的标本，包括成虫、兵蚁、工蚁、若蚁、幼蚁、卵等，特别是繁殖蚁和兵蚁；其次，如果条件允许，白蚁蚁巢也可以一起采回。

白蚁采集应按群体进行采集并加注标签。对某个白蚁群体进行初步收集后，直接或通过镊子将白蚁标本转入以 75%以上乙醇为保存液的收集管内收集，亦可根据采集目的调整保存液。此外，可用饵料诱集白蚁工蚁、兵蚁或灯光诱集有翅成虫。每个收集管内只能收集同一群体的白蚁标本，不同群体白蚁必须分装在不同的容器内，记录详细的采集记录，然后收集管加注标签，注明样品编号、采集时间、采集地点、采集人等信息。

2. 蜚蠊日间采集

白天能见度高，是采集蜚蠊非常重要的一个时间段，既可以调查昼出活动的蜚蠊，也可以寻找夜行性蜚蠊，以此了解其主要的栖息环境。对于昼出性蜚蠊可以采用观察法，再利用捕虫网进行网捕；也可以直接用网在杂草或者灌木等植物上进行扫网；也可以在溪流边查看，有些光蠊亚科 *Epilamprinae* 的种类生活在水边的石块下，受到惊扰时若虫会潜入水底躲避。利用工具剖开木头是采集木栖性蜚蠊的重要方法，如果确定木头里面有蜚蠊，但木头太硬不好剖开，可以采用把木头立起来，孔朝下，用力连续敲击木头，蜚蠊会从木头中掉落。对于隐藏在落叶下的蜚蠊，可以慢慢地掀开落叶查看，发现隐藏地后用广口瓶扣住，蜚蠊会受惊爬入瓶子。在林边或树根周围遇到质地松软的土壤，可以慢慢拨开，里面有可能栖息着蜚蠊。倒伏的枯木，以及树木的老树皮都是蜚蠊栖身的地方。在南方地区采集蜚蠊，还有一类体型较小的蜚蠊-蠹蠊，寄居在白蚁巢中，需仔细查看。林冠是蜚蠊栖息的重要场所，可以采用局部喷雾法，在林下采用白纱布做成的工具收集从树上掉下来的虫子。

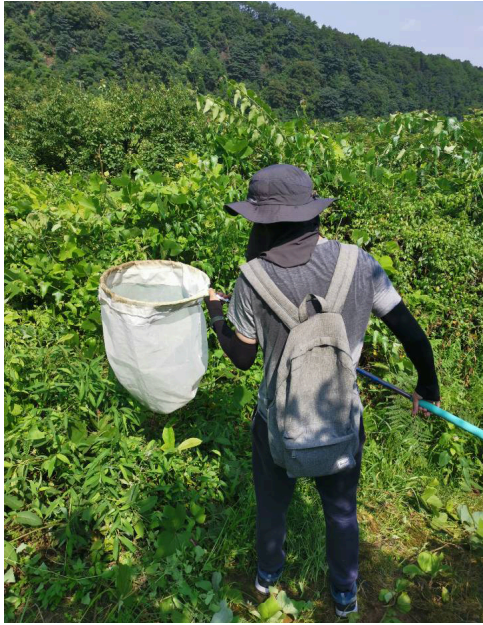


图 1. 白天用捕虫网寻找躲藏的蜚蠊 (王宗庆摄)

3. 蜚蠊夜间采集

很多蜚蠊种类夜间出来活动的，在林下树干或者灌木和杂草的叶片上会有各种蜚蠊的成虫趴在叶片上取食、求偶或者交配。采集者需要配备头灯或者强光手电筒，配合使用捕虫网扫网，就会收获大量的蜚蠊标本。此时也是获取生态照片的好时机，拍摄生态照片需要性能优良的单反相机及镜头并配合能自如调节角度的闪光灯。在蜚蠊发生高峰时段 (21 点—23 点)，使用黑光灯诱集也是很高效的一种采集方式。完成夜间搜索之后，可以在蜚蠊资源较为丰富的采集地使用诱集罐进行诱集，将诱集罐埋入土中，使诱集罐口与地面齐平，倒入小半罐丙二醇 (Propylene glycol)；也可以采用食物代替丙二醇，但食物要装在网袋里并固定网袋；另外也可以使用马氏网诱集。

。



图 2. 夜晚用头灯搜寻蜚蠊 (罗新星摄)

二、蜚蠊标本的制作

蜚蠊或是白蚁标本通常制作成乙醇浸渍标本。

1. 针插标本的制作

过去曾有研究者依据直翅类针插标本的制作方法，将昆虫针插在蜚蠊的前胸背板中央或稍偏离中线，但是在实践中，这种做法存在较多问题，一是制作的标本不平衡，标本干燥以后，稍有震动，标本容易从颈部断开，从而导致标本身体和头部匹配也成为问题；而是在制作时容易将头部损坏或损毁。比较适合的做法应该是将昆虫针从中胸背板中间插入直穿腹部而出，再用三级台固定采集标签的高度。如果解剖了雄性外生殖器进行鉴定，则可将雄性外生殖器保存在装有甘油的小型离心管中并插在标本之下；或者将雄性外生殖器标本统一保存在一个小盒中，并对它们进行编号，将编号插在对应的标本下。

2. 浸渍标本的制作

为了较好地保存用于分子生物学研究的标本，一般将蜚蠊标本保存在无水乙醇中，置于低温长期保存。但首先对标本进行前期处理，取适量酒精对采集的标本进行脱水处理，一天后更换酒精继续脱水 1 d，然后分装到小型采集瓶；同时制作两份采集标签，1 份放入瓶中，另一份用透明胶带固定在瓶身上。浸渍标本定期检查补充乙醇保存液。

为了获取转录组数据,少量的标本要保存在 RNA 组织保存试剂 (RNAlater) 中,但整体保存效果不是很好,可以用洁净的剪刀将标本的头、胸、腹等剪成小段存在小管中。

三、蜚蠊目昆虫的分析方法

蜚蠊目分为三个总科:蜚蠊总科、硕蠊总科、地鳖总科,蜚蠊总科包含 6 个科(蜚蠊科、褶翅蠊科、隐尾蠊科、工蠊科、辉蠊科、白蚁科),硕蠊总科包含 2 个科(硕蠊科、姬蠊科),地鳖总科包含 2 个科(地鳖科、蟹蠊科)。目前已知辉蠊科仅分布于南美洲,工蠊科仅分布于澳洲及其周边地区,其余 8 个科在我国均有分布。

各科的主要特征如下:

- 1) 蜚蠊科常见种类一般体型较大,前胸背板卵圆形,雄虫一般具有一对细长的圆柱形或渐细、相似、对称的尾刺,外生殖器结构复杂,阳茎分左右两部分;雌虫下生殖板分瓣(王晨晨, 2016)。
- 2) 褶翅蠊科昆虫体微小型(0.6 mm 左右),唇基加厚突出,后翅具有发达的附属区(邓文波, 2020)。
- 3) 隐尾蠊科雌雄均无翅,成虫黑色,若虫白色、黄色至深红褐色,第七背板和第七腹板发达包住末端体节,故雌雄难辨(柏奇坤, 2017)。
- 4) 硕蠊科昆虫尾须较短,常不伸出肛上板后缘,体型中到大型,雄性外生殖器结构简单,但骨片粗壮。卵胎生或胎生,卵荚完全缩回腹腔进行孵化(李欣然, 2016)。
- 5) 姬蠊科昆虫体微小型到中型,瘦长;体色多为黄褐色,少数黑色,唇基不加厚,腹部背板常具腺体,肛侧板和下生殖板形态多变,雄性外生殖器分为左、中、右阳茎,常有附属骨片(郑玉红, 2015)。
- 6) 地鳖科昆虫体小到大型(0.5-5 cm),体纤弱或壮硕,体型多变,长椭圆形到卵圆形;通常雄虫具翅,雌虫有翅或无;翅脉常复杂,具翅个体后翅臀域在停息状态时仅向腹侧折叠一次,雄性外生殖器结构复杂(邱鹭, 2017)。
- 7) 蟹蠊科昆虫体微型(小于 5 mm),通常狭长,十分纤弱;雄虫通常具翅,雌虫无翅;具翅个体翅脉简单,通常仅保留若干不分叉的脉;常栖居于蚁穴、白蚁巢或洞穴。

8) 白蚁是一类特殊的蜚蠊，与传统意义上的蜚蠊目昆虫外形差异巨大，是真社会性昆虫。身体小到中型，多型现象明显。无变态或变态微弱，无蛹期。大多体壁柔软，颜色较浅，尤其是非生殖类型所属各品级。

1. 种类鉴定

1.1 形态鉴定

一般来讲，蜚蠊的种类鉴定需要对雄虫标本进行解剖，一般外部形态特征结合外生殖器结构、肛上板和下生殖板等特征来进行种类鉴定。

蜚蠊目 (不含白蚁) 分科检索表

- 1) 雄性外生殖器阳茎结构简单，分为左、中、右阳茎.....2 (硕蠊总科)
 - 雄性外生殖器阳茎结构复杂，骨片错综复杂，分左右两部分.....3
- 2) 体细长，黄褐色；尾须长，伸出肛上板后缘；卵生.....姬蠊科
 - 体壮硕，黄褐色或黑褐色；尾须短，一般不伸出肛上板后缘；卵胎生或胎生.....
 - ...硕蠊科
- 3) 雌雄异型常不明显，雌虫下生殖板分两瓣，雄虫下生殖板后缘两侧常具圆棒状尾刺.....4 (蜚蠊总科)
 - 雌雄异型明显，雄虫常具翅，雌虫常无翅，雌虫下生殖板不分瓣.....
 -6 (地鳖总科)
- 4) 雌雄均无翅，第七背板和腹板均发达，包住末端体节，尾须和尾刺均不可见.....隐尾蠊科
 - 不似上述.....5
- 5) 唇基加厚突出，后翅具有发达的附属区 (占翅长近 40%).....褶翅蠊科
 - 唇基不加厚突出，后翅不具附属区.....蜚蠊科
- 6) 体微型，通常狭长，小于 5 mm，十分纤弱；通常雄虫具翅，雌虫无翅；具翅个体翅脉简单，通常仅保留若干不分叉的脉；常栖居于蚁穴、白蚁巢或洞穴.....蟹蠊科
 - 体小到大型 (0.5-5 cm)，体纤弱或壮硕，体型多变，长椭圆形到卵圆形；通常雄虫具翅，雌虫有翅或无；翅脉常复杂，具翅个体后翅臀域在停息状

态时仅向腹侧折叠一次栖息环境多样，常为土栖，也有木栖，洞栖或栖居于社会性昆虫（白蚁，胡蜂等）巢穴的种类.....地鳖科

在白蚁的种类鉴定中，全面可靠的鉴定应包括所有品级的标本。不过野外采集时较难获得各品级的全套标本，在实际鉴定中，主要依据兵蚁和有翅成虫，特别是兵蚁的形态特征。兵蚁的特征随种类有明显不同，且一年四季都能采集，较为方便。有翅成虫也有这样的特点，不过它仅在一年中特定季节才能采集，不如兵蚁便利，不过在兵蚁差异不大的情况下就需要结合使用有翅成虫的特征。工蚁数量虽然多，但不同种间特征差异小。短翅和无翅型补充性白蚁除去生殖器官外，大多特征保留着若虫状态，特征不明，在分类鉴定上意义不大。

鉴定白蚁的主要形态特征如下：身体及头部的形态大小，上颚的形状长短及齿的形状、树木和排列方式；面部构造包括上唇、唇基、单眼、复眼；触角的节数和最初几节的大小比例；前胸背板的形状；翅的长短和翅脉等。

1.2 分子特征 (COI)

利用形态学特征进行蜚蠊物种鉴定也存在一定局限性，近缘种类之间形态高度相似，同种不同个体的体色以及虫体上刺的大小、排列方式等可能存在变异，而对于具有雌雄二型现象的雌虫以及若虫更加难以鉴定到具体的种类，甚至难以归入到属。另一方面在白蚁当中，除去不同品级标本获取有难度，还有用具体数值范围来作为分类特征的情况，近缘种间有度量值重叠的情况 (喻敏, 2014)。因此有必要通过分子手段来辅助物种鉴定。常用的分子手段就是 DNA 条形码 (DNA Barcodes)，线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 基因的一段短的标准 DNA 片段 (658 bp)，被广泛地用于蜚蠊种类的鉴定以及雌雄配对。

样本的 COI 序列是用 DNA 提取试剂盒抽提出酒精标本的总 DNA (提取步骤参考 DNA 试剂盒说明书)，然后用蜚蠊类群 COI 的通用引物，通过 PCR 扩增这一段序列 (PCR 体系以及程序设置参考 PCR MIX 说明书)，经由凝胶电泳检验扩增质量，合格的送往公司进行测序。得到序列组装后，将片段放入网站 BLAST 进行同源性比较 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)，确定所测片段是否为需要的片段。确定完成后，将所有需要进行分析的序列整理到一个 fas 文件中保存待用。

遗传距离运算：将人工校对后生成的 *fas* 文件放入 MEGA7.0 (Kumar *et al.*, 2016) 中，用 Kimura 2-parameter model (K2P) (Kimura, 1980) 模型计算种间和种内遗传距离，得到的结果保存为 *xls* 格式文件。

邻接法运算 (Neighbor-joining method)：该方法是基于遗传距离进行运算得到 NJ 树。该方法计算速度快，适用于遗传距离不大，信息位点少的短序列。使用软件 MEGA7.0 就可以完成。

分子物种界定方法有多种，本文主要介绍 ABGD 和 GMYC 两种。

- 1) Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012) 。该方法是基于遗传距离进行聚类的研究方法。将人工校对后的 *COI* 序列直接放入 ABGD 网站进行物种界定分析，只修改参数 X (relative gap width) 为 1.0，其余为默认参数，最终得到界定结果。
- 2) General Mixed Yule-Coalescent (GMYC) (Pons *et al.*, 2006) 。该方法是采用 Likelihood 方法在基因树上进行基于模型测试的溯祖物种界定。将校对后的 *COI* 序列的单倍型，放在 Partition Finder V.1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012) 运行得到合适的进化模型，依据选出的模型在 BEAUti 中进行参数设置，然后在 BEAST v.1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) 运行得到超度量树，最后在 R (R Core Team, 2013) 中运行软件包 SPLITS (Ezard *et al.*, 2009) 进行 GMYC 分析，得到 GMYC 界定结果。

1.3 形态特征与分子特征相结合

在物种鉴定的过程中也常遇见一些较为复杂情况，例如同一个地点的样本形态上有明显差异但遗传距离却较小，两个相聚较远地点采集到的样本形态基本一致但遗传距离较大。因此，我们通常采用形态特征与分子数据结合的方法来进行综合分析，从而确保准确鉴定物种。

2. 系统发育分析

2.1 基于形态特征数据的系统发育分析

在目前蜚蠊目的系统发育分析中，基于形态特征进行系统发育研究并不多，大部分研究采用分子数据来进行研究。形态系统发育分析的出现早于分子系统发育分析，它的难点在于形态特征的选取，既要保证是同源特征，又要确定进化的方向。选取合适的形态特征来进行系统发育分析需要对所研究类群的形态学

有较为深入的认识和理解，需建立在大量检视和研究该类群解剖结构的基础上才有可能进行，难度较大。具体的方法如下：最重要的就是依据大量的文献和检视标本的情况选择一系列形态特征，接下来就是使用软件 **Mesquite** 并根据所选取的形态特征构建特征数据矩阵，然后再用软件 **T.N.T** 或者 **PAUP** 进行计算分析得出结果。更为详细内容请参考 **Klass and Meier (2006)**。

2.2 基于分子序列数据的系统发育分析

目前蜚蠊分子系统发育分析使用较多的是多基因片段以及线粒体基因组，常用的分子标记是线粒体基因 **COI**、**COII**、**12S**、**16S**，以及核基因 **H3**、**28S**、**18S**，当然还有其它的分子标记，如线粒体基因 **COIII**、**ND1**，核基因 **ITS** 在某些研究中偶有使用。线粒体基因组数据则为 13 个蛋白编码基因，2 个 **rRNA** 基因以及 **tRNA** 基因，其中常使用的是蛋白编码基因与 **rRNA** 基因联合，不同类群的 **tRNA** 基因对系统发育研究结果有不同的影响，需要测试后再进行使用。接下来主要阐述两种常用的分子系统发育树构建方法：最大似然法 (**Maximum Likelihood**) 和贝叶斯法 (**Bayesian Inference**)。

2.3 数据处理：获得相应的数据后，按照分子标记将各个类群数据保存在同一个 **fas** 文件中待用。接下来是比对序列，可在 **MAFFT7** 网站 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 在线比对并在 **MEGA7.0** 中进行人工校对。将 **fas** 文件导入网站 **MAFFT7**，允许非正常字符，参照第一条序列调整后续序列的方向 (均调整为 5'端至 3'端)。蛋白质序列比对策略选择的是 **G-INS-i**，**RNA** 序列比对策略选择的是 **Q-INS-i**，输出结果为 **fas** 文件。蛋白质编码基因序列放入 **MEGA 7.0** 中，主要查看核酸序列是否可以正常翻译成蛋白质序列，根据结果进行人工调整；**RNA** 序列的人工校对则是根据信息位点依次进行调整，校对后的文件都保存为 **fas** 文件。

1) 饱和度测试和数据联合：由于蛋白编码基因的第三位密码子的碱基组成异质性较高，容易达到替换饱和，因此需要进行饱和度测试。然后用软件 **DAMBE** (**Xia and Xie, 2001**) 通过 **Xia's test** (**Xia et al., 2003; Xia and Lemey, 2009**) 来查看是否达到饱和，结果为 **Iss < Iss.c** 表示没有饱和，饱和则舍弃第三位密码子。此外，在测试中，还应注意第三位密码子的 **Iss** 是否远大于

第一二位密码子的 **Iss**，若差异显著也可考虑舍弃第三位密码子。最后就是将所用的数据联合做成一个数据集 (**nex** 文件) 待用。

- 2) 最大似然树 (**ML**): 运行 **ML** 树的软件较多, 如 **Phylip**, **PhyML**, **GarLi**, **EaxML**, **MEGA**, **RAxML** 等。以 **RAxML** (*Stamatakis et al.*, 2008) 为例介绍一下方法: 将联合后的数据集转换成 **phy** 格式的文件, 使用软件默认的模式 **GTRGAMMA** 进行 1000 次的非参数检验 (**Bootstrap**) 分析, 同时进行 100 次的自助分析检验系统树的支持度。
- 3) 贝叶斯树 (**BI**): 首先使用 **Partition Finder V.1.1.1** 确定碱基替换模型, 根据模型选择的结果在联合数据集 (**nex**) 文件中编写相应的命令行, 完成后用软件 **MrBayes3.2** (*Ronquist et al.*, 2012) 运行计算。**MrBayes3.2** 会运行四条独立的马尔可夫 (**MCMC**) 链, 迭代运算 10,000,000 代 (作者建议运行代数), 每 1000 代取一次样本, 前 25% 的样本作为老化值 (**Burnin**) 舍弃, 当平均标准分化频率偏差小于 0.01 即结束运行, 然后计算生成合意树。

在获得满意的系统发育树后, 对系统发育树进行评估, 同时结合形态、生物学特征等展开对系统发育关系的探讨。

3. 分化时间分析

分化时间是当前宏观进化分析的一个热点, 以某一特定类群的化石记录作为参照点, 通过基因序列间的分歧程度以及分子钟来估计速率恒定分支间的分歧时间, 同时计算系统发育树上其他节点的发生时间, 从而推断相关类群的起源时间和不同类群的发生时间。蜚蠊目当中的分化时间研究比较有限, 并且这些研究都是以整个网翅总目、蜚蠊目或者 (白蚁 + 隐尾蠊) 为主要研究对象。就目前的研究结论来看, 网翅总目与其姐妹群的分化时间是在 300-370 Ma (百万年); 蜚蠊目与螳螂目的分化时间是在 204-290 Ma; 隐尾蠊和白蚁的分化时间是在 145 Ma 左右。

分化时间可以使用 **r8s**, **Beast**, **mcmctree** 等软件来进行分析, 下面以 **BEAST v.1.10.4** (*Suchard et al.*, 2018) 为例介绍具体的研究方法。

3.1 首先将进行 **BI** 系统发育分析的 **nex** 文件载入 **Beauti**, 依据最优碱基替换模型对 **Sites** 模块进行设置。

3.2 **TreePrior** 模块可以选择 **Yule Process** 或者 **Birth-Death Process** 运行, 分子钟模型常选择 **Uncorrelated relaxed clock** (不相关对数松弛分子钟模型)

(Drummond *et al.*, 2006), 选择合适的化石标记并在 Taxa 模块中进行单系设置。

3.3 分析可迭代运行 5 千万代 (作者建议运行代数), 每 5000 代取样记录一次, Burnin 一般为 10%-40%。

3.4 Beast 运行的结果 (log 文件) 放在 Tracer (Rambaut and Drummond, 2007) 中查看各个参数的有效样本量 (ESS) 是否大于 200, 若小于 200 则继续运行或者重新运行一次。

3.5 将两次结果用软件包 LogCombiner 进行组合, 直到 ESS 大于 200。

3.6 最后由软件包 TreeAnnotator 生成最大进化置信树。

在这些操作步骤和各种参数的设置中, 化石标记的选取和设置是其中的难点。利用化石标记作为参照来校准各类群的分化时间, 一旦化石选取有问题会直接影响最后的结果, 因而这一步很关键。选取化石需要参考大量的相关文献, 并且可能还需要多次在软件中设置尝试, 才能得到比较好的化石选取的方案。目前在蜚蠊分化时间分析中, 可以参考 Bourguignon *et al.* (2018), Che *et al.* (2019) 与 Evangelista *et al.* (2019) 所选取的化石标记。

致谢

西南大学植物保护学院蜚蠊物种多样性与进化实验室历届研究生为蜚蠊系统学研究的发展做出了重要贡献; 悉尼大学 Nathan LO 及 Simon HO 团队在研究上给予了诸多帮助。

参考文献

1. 柏奇坤. (2017). 隐尾蠊分子进化与生物地理学. 硕士学位论文. 西南大学.
2. 邓文波. (2020). 褶翅蠊科物种界定与蜚蠊总科分子系统发育研究. 硕士学位论文. 西南大学.
3. 李欣然. (2016). 蜚蠊脉相的阐释以及中国甲蠊亚科和球蠊亚科的分类. 硕士学位论文. 西南大学.
4. 邱鹭. (2017). 中国地鳖蠊科分类研究 (蜚蠊目: 地鳖蠊总科). 硕士学位论文. 西南大学.

5. 王晨晨. (2016). 中国蜚蠊科分类研究. 硕士学位论文. 西南大学.
6. 喻敏. (2014). [中国土白蚁属常见种的形态和分子鉴定](#). 硕士学位论文. 江西农业大学.
7. 郑玉红. (2015). 中国姬蠊科属种的厘定及再描述. 硕士学位论文. 西南大学.
8. Bourguignon, T., Tang, Q., Ho, S. Y. W., Juna, F., Wang, Z. Q., Arab, D. A., Cameron, S. L., Walker, J., Rentz, D., Evans, T. A. and Lo, N. (2018). [Transoceanic dispersal and plate tectonics shaped global cockroach distributions: evidence from mitochondrial phylogenomics](#). *Mol Biol Evol* 35: 1-4.
9. Che, Y. L., Bai, Q. K., Deng, W. B., Liao, S. R., He, J. J., Ho, S. Y. W. and Wang, Z. Q. (2019). [Uplift-driven diversification revealed by the historical biogeography of the cockroach *Cryptocercus* Scudder \(Blattodea: Cryptocercidae\) in eastern Asia](#). *Syst Entomol* 45(1): 60-72.
10. Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., Rambaut, A. and Penny, D. (2006). [Relaxed phylogenetics and dating with confidence](#). *PLoS Biol* 4(5): e88-710.
11. Evangelista, D. A., Wipfler, B., Bethoux, O., Donath, A., Fujita, M., Kohli, M. K., Legendre, F., Liu, S. L., Machida, R., Misof, B., Peters, R. S., Podsiadloeski, L., Rust, J., Schuette, K., Tollenaar, W., Ware, J. L., Wappler, T., Zhou, X., Meusemann, K. and Simon, S. (2019). An integrative phylogenomic approach illuminates the evolutionary history of cockroaches and termites (Blattodea). *Proc. R. Soc. B* 286, 20182076.
12. Inward, D., Beccaloni, G. and Eggleton, P. (2007). [Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches](#). *Biol Lett* 3: 331-335.
13. Kimura, M. (1980). [A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences](#). *J Mol Evol* 16: 111-120.
14. Klass, K. D. and Meier, R. (2006). [A phylogenetic analysis of Dictyoptera based on morphological characters](#). *Entomologische Abhandlungen* 63: 3-50.
15. Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). [MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets](#). *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874.

16. Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. and Guindon, S. (2012). [Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses](#). *Mol Biol Evol* 29: 1695-1701.
17. Lo, N., Luykx, P., Santoni, R., Beninati, T., Bandi, C., Casiraghi, M., Wen-hua, L., Zakharov, E. V. and Nalepa, C. A. (2006). [Molecular phylogeny of *Cryptocercus* wood-roaches based on mitochondrial COII and 16S sequences, and chromosome numbers in Palearctic representatives](#). *Zool Sci* 23: 393-398.
18. Lo, N., Tokuda, G., Watanabe, H., Rose, H., Slaytor, M., Maekawa, K., Bandi, C. and Noda, H. (2000). [Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches](#). *Curr Biol* 10: 801-804.
19. Pons, J., Barraclough, T. G., Gomezzurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D. and Vogler, A. P. (2006). [Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects](#). *Syst Biol* 55: 595-609.
20. Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. and Achaz, G. (2012). [ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation](#). *Mole Ecol* 21: 1864-1877.
21. Rambaut, A. and Drummond, A. J. (2007). Tracer, version 1.6. Last accessed on February 2020. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>.
22. Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. and Huelsenbeck, J. P. (2012). [MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space](#). *Syst Biol* 61(3): 539-542.
23. Stamatakis, A., Hoover, P. and Rougemont, J. (2008). [A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers](#). *Syst Biol* 57: 758-771.
24. Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J. and Rambaut, A. (2018). [Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10](#). *Virus Evol* 4(1): vey016.
25. Team, R. C. (2013). R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
26. Terry, M. and Whiting, M. (2005). [Mantophasmatodea and phylogeny of the lower neopterous insects](#). *Cladistics* 21: 240-257.
27. Xia, X. and Xie, Z. (2001). [DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution](#). *J Hered* 92(4): 371-373.

28. Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L. and Wang, L. (2003). [An index of substitution saturation and its application](#). *Mol Phylogenet Evol* 26: 1-7.
29. Xia, X. and Lemey, P. (2009). [Assessing substitution saturation with DAMBE](#). *The Phylogenetic Handbook* 615-630.