研究论文

基于线粒体 16SrRNA 序列和线粒体基因组裂化程度分析吸虱亚目系统发育*

李 伟[1**] 陈 婷[2] 董文鸽[2***]

（1. 大理大学实验室管理处，大理 671003；2. 大理大学病原与媒介生物研究所，下关 671000）

摘 要 【目的】 吸虱亚目是真兽类哺乳动物体表的专性吸血寄生虫和潜在的病原传播媒介昆虫。吸虱亚目线粒体基因组具有不同于两侧对称动物线粒体基因组传统认识的典型性，其线粒体基因组呈现出剧烈的裂化现象，形成多个线粒体微环染色体。目前针对吸虱亚目 16SrRNA 基因序列和线粒体基因组裂化程度分析吸虱亚目系统发育的研究很少，亟需对吸虱亚目的亲缘关系进行研究和探讨。**【方法】** 采用非加权组平均法（UPGMA）、邻近法（NJ）和最大简约法（MP）对 6 科 6 属 13 种吸虱的 16SrRNA 基因长片段序列进行进化关系分析。采用高通量测序法测定 2 科 2 属 4 种吸虱的线粒体基因组，并分析 5 科 5 属 10 种吸虱线粒体基因组裂化程度与吸虱亚目的系统发育关系。**【结果】** 进化树结果表明吸虱的 6 个科均为单系群，猴虱科较另外 5 个科相对原始，结果支持形态分类地位。对 5 科 5 属 10 种吸虱线粒体基因组裂化程度分析结果表明裂化速率最快的是 3 种人虱（体虱、头虱和阴虱），最慢的是 3 种血虱（猪血虱、野猪血虱和驴血虱），4 种鼠虱（亚洲多板虱、棘多板虱、红姬甲肋虱和克氏甲肋虱）处于中间。在进化树上，进化程度由低到高依次为血虱<鼠虱<人虱，与线粒体基因组裂化所显示的由慢到快的顺序一致。**【结论】** 系统进化树中不同谱系的吸虱基本上形成单系群，结果与形态学研究结果非常吻合。吸虱亚目线粒体基因组的裂化程度或许与类群（分类单元）的进化程度具有一致性。

关键词 吸虱亚目；16SrRNA；线粒体基因组裂化；系统发育

Phylogeny of the Anoplura based on variation in 16SrRNA sequences and the extent of mitochondrial genome fragmentation in this group

LI Wei[1**] CHEN Ting[2] DONG Wen-Ge[2***]

(1. Laboratory Management Office, Dali University, Dali 671003, China;
2. Institute of Pathogens and Vectors, Dali University, Xiaguan 671000, China)

Abstract [Objectives] The Anoplura are sucking lice; obligate, hematophagous ectoparasites of eutherian mammals and potential vectors for pathogens that can cause severe infectious diseases in humans and other animals. The mitochondrial genome of the Anoplura is distinct from the traditional understanding of that of a bilateral animal. Extensive fragmentation is present in the mt genome forming multiple mini-circular mitochondrial chromosomes. Although a revision of the taxonomic status of the Anoplura is urgently required, there has so far been very little phylogenetic analysis of the group based on 16SrRNA sequence variation and mitochondrial genome fragmentation. **[Methods]** Phylogenetic relationships were inferred by comparing 16SrRNA gene sequences of 13 species from 6 genera and 6 families using the arithmetic mean (UPGMA), neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP), methods. The mitochondrial genomes of 4 species in 2 genera and 2

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31660314）；云南省自然科学基金（2016FB135）；大理大学媒介生物学创新团队项目（ZKLK2019104）

**第一作者 First author，E-mail：01.05.01@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：dongwenge2740@sina.com

收稿日期 Received：2019-08-09；接受日期 Accepted：2020-01-10

families were sequenced using the Illumina Hiseq 2000 platform, and the extent of mitochondrial genome fragmentation in 10 species from 5 genera and 5 families was analyzed. **[Results]** A phylogenetic tree supports the current morphological taxonomy in that the 6 families are monophyletic and the Pedicinidae the most primitive. The analysis of the extent of mitochondrial genome fragmentation in 10 species from 5 genera and 5 families shows that the 3 species of human lice (*Pediculus humanus*, *Pediculus capitis* and *Pthirus pubis*) are more fragmented than the 4 species of rat lice (*Polyplax asiatica*、*Polyplax spinulosa*、*Hoplopleura kitti* and *Hoplopleura akanezumi*). The 3 species of *Haematopinus* lice (*Haematopinus suis*, *Haematopinus apri and Haematopinus asini*) have the least degree of fragmentation. The phylogenetic tree indicates that the relative degree of evolutionary divergence can be ranked as: *Haematopinus* lice < rat lice < human lice, which is consistent with the extent of mitochondrial genome fragmentation from slow to fast. **[Conclusion]** A phylogenetic tree of the Anoplura based on variation in 16SrRNA gene sequences indicates that different lineages are basically monophyletic, and supports the current morphological taxonomy. The level of mitochondrial genome fragmentation in the Anoplura may be consistent with the divergence of taxa.

Key words Anoplura; 16SrRNA; mitochondrial genome fragmentation; phylogeny

吸虱亚目是真兽类哺乳动物体表的专性吸血寄生虫，全世界已知有 15 科 50 属 540 余种（Durden and Musser，2006），我国目前已知 11 科 22 属 96 种（金大雄，1999）。业已证明，吸虱中的体虱 *Pediculus humanus* 能传播流行性斑疹伤寒、流行性回归热及战壕热。其他吸虱虽然不能直接在人与野生动物之间传播人兽共患病，但却可以在近缘动物宿主之间传播和保存地方性斑疹伤寒、野兔热乃至鼠疫等疾病的病原体，在流行病学上 具有保存、扩展疫源地的特殊意义（Nelson *et al.*，1970；Gibney *et al.*，1985；Otter *et al.*，2003；Hornok *et al.*，2010）。吸虱亚目的传统分类主要依据其形态特征，但形态学鉴定受主观因素影响较大，尤其是近缘种或相似种很难从形态上进行准确鉴定，有时会把形态特征近似的种类遗漏造成隐存种。形态学分类的局限性导致吸虱亚目分类一直存在不同观点，如 Kim 和 Ludwng（2008）在甲胁虱科（Hoplopleuridae）下列 2 属；Durden 和 Musser（1994）在甲胁虱科下列 6 属；Kim 和 Ludwng（2008）在多板虱科下列 14 属，Durden 和 Musser（1994）在多板虱科下列 19 属。因此，一些学者引入了分子生物技术对部分吸虱系统发育进行分析研究，特别是线粒体基因组方面的研究成果显著（Shao *et al.*，2009，2012；Jiang *et al.*，2013；Song *et al.*，2014；Dong *et al.*，2014a，2014b），并获得物种特定遗传标记的一些数据构建进化树，对传统分类予以重要佐证以及补充和修正（Yoshizawa and Johnson，2010）。

线粒体基因组是真核细胞内独立于核基因以外的一类遗传物质，大小为 15-20 kb 的双链闭合环状分子，具有母系遗传、高度保守、进化速度快，结构简单等特点，正是研究物种起源进化及分析种间亲缘关系的理想研究手段（Wolstenholme，1992；Boore，1999；朱保建等，2010）。典型的动物线粒体基因组是由 37 个基因组成的双链闭合环状的 DNA 分子，包含 13 个蛋白质编码基因，22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因以及非编码区（图 1：A）。而吸虱亚目的线体基因组不同于上述典型结构，呈现出剧烈的裂化现象（Extensive fragmentation），形成多个线粒体微环染色体（Mitochondrial minicircular chromosomes 或 Minichromosomes），如体虱线粒体基因组裂化成 18 个线粒体微环染色体（图 1：B）。迄今为止，国内外已经报道了 5 科 5 属 10 种吸虱发现有裂化线粒体基因组，且不同种间裂化速度和裂化程度有很大差异。这些吸虱的线粒体基因组裂化成 9-20 个微环染色体，每一个微环染色体大小 1.5-4.0 kb, 有 1-8 个基因（Shao *et al.*，2009，2012；Jiang *et al.*，2013；Dong *et al.*，2014a，2014b；Song *et al.*，2014）。迄今为止，基于线粒体基因组裂化程度分析吸虱亚目系统发育的研究尚属空白。

线粒体 16SrRNA 基因在结构和功能上具有高度的保守性，其进化速度较为适中，其序列测定分析适于确定属及属以上分类单元的亲缘关

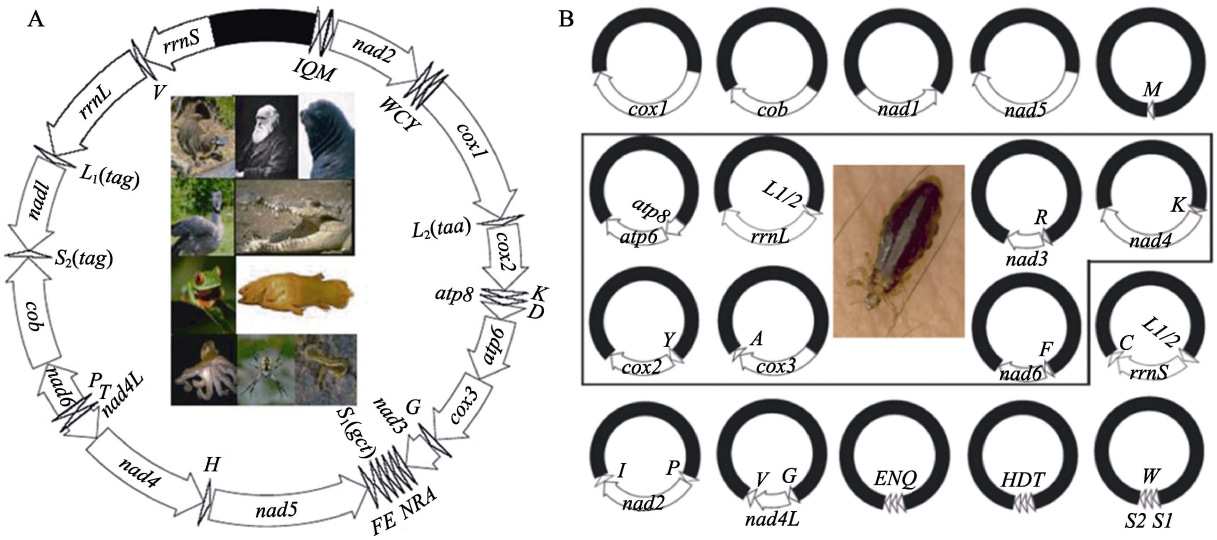

图 1　大多数动物的线粒体基因组结构图（A）和体虱线粒体基因组结构图（B）（Shao *et al.*，2009）

Fig. 1　The mitochondrial genome of most animals (A) and *Pediculus humanus* (B) (Shao *et al.*, 2009)

系，因此被认为是科级以下水平物种间亲缘关系和系统演化研究的有效标记（Foighil *et al.*，1995；Schneider and Foighil，1999）。目前，在蝗总科（徐淼洋，2009）、叶蜂科（王德明，2010）、天牛科（冯波，2010）、球甲科（Robertson *et al.*，2013）、瓢虫科（黄卫东等，2019）等昆虫的系统发育研究中 16SrRNA 基因也得到了广泛应用。但是基于 16SrRNA 基因长片段序列研究吸虱亚目系统发育的报道却很少。本研究测得的 2 科 2 属 4 种吸虱，外加 NCBI 数据库收录的 4 科 4 属 9 种吸虱，共 6 科 6 属 13 种吸虱的 16SrRNA 基因长片段序列进行了序列比对、遗传距离和系统发育分析。本研究所获 16SrRNA 基因序列较长，所蕴含的信息量充足，为准确分析 6 科 6 属 13 种吸虱的系统进化关系提供了保证。

本研究基于线粒体 16SrRNA 基因长片段序列和线粒体基因组裂化程度分析吸虱亚目的系统发育关系，其结果对厘定吸虱亚目分类地位提供了依据，同时也为建立更加完善的吸虱亚目分类系统提供了重要资料。

1　材料与方法

1.1　材料

本实验所用标本均来自于大理大学病原与媒介生物研究所的馆藏标本中的 2 科 2 属 4 种吸虱，其中亚洲多板虱 *Polyplax asiatica*、棘多板虱 *Polyplax spinulosa* 和克氏甲胁虱 *Hoplopleura kitti* 采自云南省金平县，红姬甲胁虱 *Hoplopleura akanezumi* 采自云南省大理市苍山国家自然保护区，所采集吸虱置于盛有 95%乙醇的 EP 小管内固定，放在 - 20 ℃冰箱或 - 80 ℃的超低温冰箱内保存、备用，具体的采集信息及登录号见表 1。同时，选取 NCBI 数据库收录的 4 科 4 属 9 种吸虱，共 6 科 6 属 13 种吸虱样本用于最终的系统发育分析（表 1）。

1.2　实验方法

1.2.1　基因组 DNA 的提取　用镊子取出保存在 95%酒精中的吸虱标本，在 S8APO 体视显微镜下鉴别吸虱的种类和雌、雄，然后放入 1.5 mL 离心管中。把装有吸虱标本的离心管放入液氮中冻结 10 min 后取出研磨。用 The Dneasy Tissue Kit（QIAGEN）试剂盒提取 DNA，详细的提取步骤严格按照试剂盒说明进行。提取的 DNA 置于 - 20 ℃冰箱内保存备用。

1.2.2　PCR 扩增、纯化和测序　用 The TaKaRa Ex Taq 酶和引物 16SF/Lx16SR 扩增出每一种吸虱 16SrRNA 基因的短片段，把获得的这个短片段基因的扩增产物送往测序公司测序，获得 16SrRNA 基因短片段序列，然后在基因序列的保守区设计上下游引物作为扩增长片段 PCR 的

表 1　样本信息及 GenBank 登录号
Table 1　Sample information and GenBank ID

编号 No.	种名 Species	采集地点 Collecting locality	GenBank 登录号 GenBank ID
1	亚洲多板虱 *Polyplax asiatica*	云南金平 Jinping Yunnan	KF647757.1
2	棘多板虱 *Polyplax spinulosa*	云南金平 Jinping Yunnan	KF647767.1
3	克氏甲胁虱 *Hoplopleura kitti*	云南金平 Jinping Yunnan	KJ648937.1
4	红姬甲胁虱 *Hoplopleura akanezumi*	云南大理 Dali Yunnan	KJ648931.1
5	猪血虱 *Haematopinus suis*		KC814606.1
6	野猪血虱 *Haematopinus apri*		KC814615.1
7	驴血虱 *Haematopinus asini*		KF939322.1
8	阴虱 *Pthirus pubis*		EU219994.2
9	黑猩猩虱 *Pediculus schaeffi*		KR706168.1
10	头虱 *Pediculus capitis*		DQ076659.1
11	体虱 *Pediculus humanus*		KC685853.1
12	红疣猴虱 *Pedicinus badii*		EU827263.1
13	钝猴虱 *Pedicinus obtusus*		AB478979.1

特异引物 16SF-16SR，从这对特异引物扩增出长片段序列。长片段扩增用 TaKaRa LA Taq 酶，每 1 个反应体系 25 μL，反应的条件：94 ℃预变性 1 min，30-40 个循环：98 ℃变性 10 s，45-65 ℃变性 30 s，68 ℃延伸 1-4 min，72 ℃终止延伸 2-6 min。为了让实验结果更准确，每一次 PCR 都需进行阳性对照和阴性对照实验，这样可以及时发现假阳性扩增和 DNA 的污染。阴性对照实验一般做 3 个设置：第 1 个设置，所有条件与阳性对照实验一致，模板 DNA 替换成蒸馏水即可；第 2 个设置，所有条件与阳性对照实验一致，前引物替换成蒸馏水即可；第 3 个设置，所有条件与阳性对照实验一致，后引物替换成蒸馏水即可；阳性对照实验设置，需要加入 DNA 模板和配对引物，扩增出需要的基因条带。扩增出的条带大小参考 Markers 值。然后把扩增成功的 PCR 原液用 Wizard SV Gel and PCR clean-up system（Promega）试剂盒纯化后送到上海美吉生物用 Illumina Hiseq 2000 platform 高通量测序法测序。

1.2.3　高通量测序、序列组装和基因识别　运用 Illumina Hiseq 2000 platform 高通量测序获得亚洲多板虱、棘多板虱、克氏甲胁虱和红姬甲胁虱的线粒体基因组，基因序列用 Geneious 6.1.6 软件组装，参数设置为：Minimum overlap 50 bp 和 Minimum Overlap Identity 98%（Kearse *et al.*，2012）。所有的 tRNA 基因用 tRNAScan-SE 和 ARWEN 查找（Lowe and Eddy，1997；Laslett and Canback，2008）。蛋白质编码基因和 rRNA 基因用 BLAST 查找（Altschul *et al.*，1997；Gish and State，1993）。

1.2.4　数据分析　利用 Mega 4.0 软件对 13 种吸虱的 16SrRNA 基因序列进行碱基组成、序列同源性比较及遗传距离分析，采用 Mega 4.0 程序中的非加权组平均法（UPGMA 法）、邻近法（NJ 法）和最大简约法（MP 法）构建系统发育树（Tamura *et al.*，2007）。另从 GenBank 中进行同源序列查找，获得黑猩猩虱 *Pediculus schaeffi*（KC241885.1）、头虱 *Pediculus humanus capitis*（JX080391.1）、体虱 *Pediculus humanus*（DQ076660.1）、阴虱 *Pthirus pubis*、猪血虱 *Haematopinus suis*（KC814606.1）、野猪血虱 *Haematopinus apri*（KC814615.1）、驴血虱 *Haematopinus asini*（KF939322）、红疣猴虱 *Pedicinus badii*（EU827263.1）和钝猴虱 *Pedicinus obtusus*（AB478978.1）9 种吸虱的 16SrRNA 基因长片段序列，作为比较资料。利用 geneious

6.1.7 软件组装线粒体基因组序列，查找并鉴别 37 个基因在微环染色体的分布，进一步分析 5 科 5 属 10 种吸虱线粒体基因组的裂化程度。

2 结果与分析

2.1 序列同源性

对棘多板虱，亚洲多板虱，红姬甲胁虱和克氏甲胁虱 4 种吸虱线粒体 16SrRNA 长片段序列进行 PCR 扩增和 Illumina Hiseq 2000 platform 高通量测序。4 种吸虱的线粒体 16SrRNA 序列存在差异，棘多板虱，亚洲多板虱，红姬甲胁虱和克氏甲胁虱序列长度分别是 1 044、1 125、1 131 和 1 107 bp。在 GenBank 中进行同源序列查找，获得黑猩猩虱、头虱、体虱、阴虱、猪血虱、野猪血虱、驴血虱、红疣猴虱和钝猴虱 9 种吸虱的 16SrRNA 基因长片段序列。用 Geneious 6.1.7 软件分析结果表明，13 种吸虱 16SrRNA 同源序列的 AT 含量在 54.3%-74.7%，明显高于 GC 含量 25.3%-45.7%（表 2）。同科同属的吸虱 AT 含量相近，GC 含量也相近。虱科（头虱，体虱和黑猩猩虱）的 AT 含量（73.5%-74.7%）最高，猴虱科（红疣猴虱和钝猴虱）的 AT 含量（53.3%-54.5%）最低。6 科吸虱 AT 含量大小依次为：虱科>血虱科>多板虱科>甲胁虱科>阴虱科>猴虱科。

对 13 种吸虱的 16SrRNA 基因序列的同源性比较分析结果见表 3。头虱和体虱 16SrRNA 基因长片段序列高度一致，其相似度达到 99.5%；钝猴虱和红疣猴虱的 16SrRNA 基因序列相似性也高，达到 95.4%；野猪血虱和猪血虱 16SrRNA 基因序列相似性达到 93.9%。表明同科同属的吸虱 16SrRNA 基因序列相似度较高。棘多板虱和钝猴虱的 16SrRNA 基因序列相似度最低，只有 30.3%。其次是红姬甲胁虱和红疣猴虱的 16SrRNA 基因序列相似度也低，只有 30.4%。表明不同科不同属的吸虱 16SrRNA 基因长片段序列相似度较低。其余种间的序列同源性为 30.6%-78.7%，差异度 20.8%-68.9%。

2.2 线粒体 16SrRNA 基因长片段序列的系统发育分析

用 Kimuras 双参数法计算所得 13 种吸虱的种间遗传距离见表 4。13 种吸虱相互间遗传距离大部分分布在 0.506-1.938 之间。只有体虱和头虱间、钝猴虱和红疣猴虱间以及野猪血虱和猪血

表 2 13 种吸虱 16SrRNA 基因的碱基组成（%）

Table 2 Base composition of 16SrRNA gene in 13 species of sucking lice (%)

种类 Species	核苷酸含量 Nucleotides Proportions (%)					
	A	C	G	T	A+T	G+C
头虱 *Pediculus capitis*	35.2	13.3	15.8	35.7	73.5	26.5
体虱 *Pediculus humanus*	35.2	13.1	15.8	35.9	73.7	26.3
黑猩猩虱 *Pediculus schaeffi*	36.6	13.1	14.8	35.5	74.7	25.3
阴虱 *Pthirus pubis*	31.0	14.6	21.4	33.0	66.0	34.0
亚洲多板虱 *Polyplax asiatica*	30.2	16.1	23.5	30.1	65.3	34.7
棘多板虱 *Polyplax spinulosa*	34.9	13.5	19.4	32.2	72.9	27.1
红姬甲胁虱 *Hoplopleura akanezumi*	30.9	17.8	21.7	29.7	65.3	34.7
克氏甲胁虱 *Hoplopleura kitti*	31.1	15.4	20.5	33.0	68.9	31.1
猪血虱 *Haematopinus suis*	35.9	11.8	19.2	33.1	72.0	28.0
野猪血虱 *Haematopinus apri*	35.9	11.8	18.8	33.5	72.4	27.6
驴血虱 *Haematopinus asini*	32.4	12.9	20.4	34.3	69.5	30.5
钝猴虱 *Pedicinus obtusus*	28.9	19.4	27.1	24.6	54.5	45.5
红疣猴虱 *Pedicinus badii*	29.2	19.7	26.9	24.2	54.3	45.7

表 3　13 种吸虱 16SrRNA 基因序列的同源性比较（%）

Table 3　Homology comparison of 16SrRNA sequences among 13 species of sucking lice (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	—												
2	99.5	—											
3	78.4	78.7	—										
4	59.4	59.4	60.0	—									
5	49.9	49.8	49.8	47.8	—								
6	51.7	51.7	50.6	46.0	61.3	—							
7	50.9	51.0	50.1	48.4	60.1	56.7	—						
8	50.1	50.1	51.6	46.9	58.2	57.6	66.6	—					
9	55.1	55.1	55.4	51.0	54.4	52.5	54.3	53.9	—				
10	55.4	55.5	54.7	51.1	54.7	53.4	55.6	54.7	93.9	—			
11	52.9	53.1	53.0	49.5	53.0	52.1	53.7	54.6	67.0	67.8	—		
12	33.4	33.4	33.0	33.2	32.6	30.3	30.6	31.0	32.9	32.6	32.3	—	
13	33.9	33.9	32.8	33.7	32.7	30.6	30.4	30.7	33.4	33.1	32.6	95.4	—

1. 头虱；2. 体虱；3. 黑猩猩虱；4. 阴虱；5. 亚洲多板虱；6. 棘多板虱；7. 红姬甲肋虱；8. 克氏甲肋虱； 9. 猪血虱；10. 野猪血虱；11. 驴血虱；12. 钝猴虱；13. 红疣猴虱。

1. *Pediculus capitis*; 2. *Pediculus humanus*; 3. *Pediculus schaeffi*; 4. *Pthirus pubis*; 5. *Polyplax asiatica*; 6. *Polyplax spinulosa*; 7. *Hoplopleura akanezumi*; 8. *Hoplopleura kitti*; 9. *Haematopinus suis*; 10. *Haematopinus apri*; 11. *Haematopinus asini*; 12. *Pedicinus obtusus*; 13. *Pedicinus badii*.

表 4　基于 16SrRNA 基因序列的 13 种吸虱的遗传距离

Table 4　Distance matrix of 13 sucking lice based on 16S rRNA gene sequences

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A 头虱 *Pediculus capitis*	—												
B 钝猴虱 *Pedicinus obtusus*	1.598	—											
C 猪血虱 *Haematopinus suis*	0.579	1.670	—										
D 阴虱 *Pthirus pubis*	0.506	2.066	0.692	—									
E 亚洲多板虱 *Polyplax asiatica*	0.663	1.744	0.556	0.712	—								
F 红姬甲肋虱 *Haematopinus akanezumi*	0.693	1.938	0.577	0.758	0.516	—							
G 野猪血虱 *Haematopinus apri*	0.571	1.597	0.059	0.698	0.542	0.563	—						
H 体虱 *Pediculus humanus*	0.004	1.574	0.573	0.507	0.670	0.702	0.565	—					
I 克氏甲肋虱 *Hoplopleura kitti*	0.596	1.641	0.553	0.673	0.561	0.391	0.542	0.597	—				
J 棘多板虱 *Polyplax spinulosa*	0.576	1.691	0.541	0.711	0.481	0.541	0.545	0.582	0.511	—			
K 黑猩猩虱 *Pediculus schaeffi*	0.226	1.582	0.545	0.494	0.680	0.689	0.558	0.227	0.581	0.609	—		
L 红疣猴虱 *Pedicinus badii*	1.519	0.042	1.679	1.853	1.675	2.016	1.605	1.498	1.563	1.751	1.544	—	
M 驴血虱 *Haematopinus asini*	0.619	1.619	0.386	0.719	0.603	0.616	0.370	0.613	0.582	0.578	0.614	1.653	—

A 头虱 *Pediculus capitis*；B 钝猴虱 *Pedicinus obtusus*；C 猪血虱 *Haematopinus suis*；D 阴虱 *Pthirus pubis*；E 亚洲多板虱 *Polyplax asiatica*；F 红姬甲肋虱 *Haematopinus akanezumi*；G 野猪血虱 *Haematopinus apri*；H 体虱 *Pediculus humanus*；I 克氏甲肋虱 *Hoplopleura kitti*；J 棘多板虱 *Polyplax spinulosa*；K 黑猩猩虱 *Pediculus schaeffi*；L 红疣猴虱 *Pedicinus badii*；M 驴血虱 *Haematopinus asini*.

虱之间的遗传距离为 0.004-0.059，明显低于它们与不同属的种间的遗传距离值范围。以同属的体虱和头虱间的遗传距离最小，仅为 0.004。

本研究采用非加权组平均法（UPGMA 法）、邻近法（NJ 法）和最大简约法（MP 法）构建系统发育树。以 NJ 法为代表的邻近法可以使种间的进化距离在度量树中得到直观的体现，但由于不能避免将性状数据转化为距离时的信息丢失，因此所建树的精确度量仍有所欠缺。MP 法的优点是不需要在处理核苷酸或者氨基酸替代时引入假设（替代模型），其不足是在分析序列位点上有回复突变或平行突变。UPGMA 法是一种较常用的聚类分析方法，所产生的进化树是物种树的简单体现。由于 3 种分析方法各有优缺点，因此本研究同时采用这 3 种方法构建 6 科 6 属 13 种吸虱的进化树，通过对这 3 种进化树拓扑结构的比较分析，以保证获得更为真实的 6 科 6 属 13 种吸虱系统进化关系。

遗传距离数据用 UPGMA、NJ 和 MP 法构建吸虱的分子进化树（图 2），得出的分子进化树基本一致，只有少许的差异。Boootstrap 1 000 次检验进化树各支均得到较高的支持率。总体而言，各科均各自构成单系，各科内部聚为一支的置信度很高，但是各科之间相聚的置信度则普遍较低。

用 UPGMA 构建的进化树形成 5 个明显的分支。这 5 个分支中有 4 个分支分别隶属四个科，即血虱科，甲胁虱科，多板虱科、猴虱科。另一个分支含有阴虱科和虱科 2 个科。猴虱科与另 5 个科构成的分支为姐妹群，其处于属的基部而为相对原始的类群。

NJ 法构建进化树形成 8 个明显的分支。猴虱科的 2 个种聚为一支并位于进化树基部，虱科的 3 个种各自独立分支，阴虱科和血虱科的驴血虱也各自独立分支，多板虱科的 2 个种和甲胁虱科的 2 个种聚为一支而后又分离互为姐妹群。因此，除虱科和血虱科外，甲胁虱科，多板虱科，猴虱科和阴虱科 4 个科在进化树上均表现为单系群。猴虱科处于 NJ 树的最基部，是相对原始的类群。

MP 法构建的进化树显示，6 个科分为互为姐妹群的两大平行进化的单系群：甲胁虱科、多板虱科和血虱科为独立进化的一支，猴虱科、阴虱科、虱科为独立进化的另一支；虽然多板虱科、多板虱属的 2 个种分别独立分支，但其分支邻近；血虱科、猴虱科分别位于两大平行进化支的基部，是两个相对原始的类群。因此，MP 法构建的进化树表明，本研究涉及的 6 个科及其属级分类单元似乎是符合其自然分类系统的。

因此，综合 UPGMA、NJ 和 MP3 种方法构建的进化树的信息，可以认为吸虱的 6 个科均为单系群，其科、属分类地位似符合其自然系统，猴虱科较另外 5 个科相对原始。

2.3 吸虱亚目线粒体基因组裂化速度比较

本文运用 Illumina Hiseq 2000 platform 高通量测序法，对既有区系优势代表性，又有进化支代表性的小兽（小型哺乳动物）体表寄生 2 科 2 属 4 种吸虱（亚洲多板虱、棘多板虱、红姬甲胁虱和克氏甲胁虱）的线粒体基因组进行了研究，发现亚洲多板虱（表 5）和棘多板虱（表 5）的线粒体基因组有典型动物的 37 个线粒体基因，并均裂化成 11 个线粒体微环染色体；每个线粒体微环染色的大小 2-4 kb，有 2-7 个基因。2 种多板虱每个线粒体微环染色体平均有 3.4 个基因，多于体虱和头虱（每个线粒体微环染色体有 2.1）及阴虱（每个线粒体微环染色体有 2.4 个基因），少于猪虱和马虱（每个线粒体微环染色体有 4.1 个基因）。显然，两种多板虱的线粒体基因组裂化速度高于猪虱和马虱，但是低于体虱，头虱和阴虱。两种多板虱的 11 个线粒体微环染色体中仅 2 个微环有相同的基因和基因排序，表明同属的多板虱线粒体基因组裂化模式有明显差异（表 5）。

同样甲胁虱科的红姬甲胁虱（表 5）和克氏甲胁虱（表 5）也有裂化线粒体基因组。红姬甲胁虱测出 28 个线粒体基因，分布在 10 个线粒体微环染色体上，每个线粒体微环染色体大小 1.7-2.7 kb，有 1-6 个基因，平均每个线粒体微环染色体上有 2.8 个线粒体基因。红姬甲胁虱还有 1 个嵌合线粒体微环染色体，由 2 个不同的 rRNA

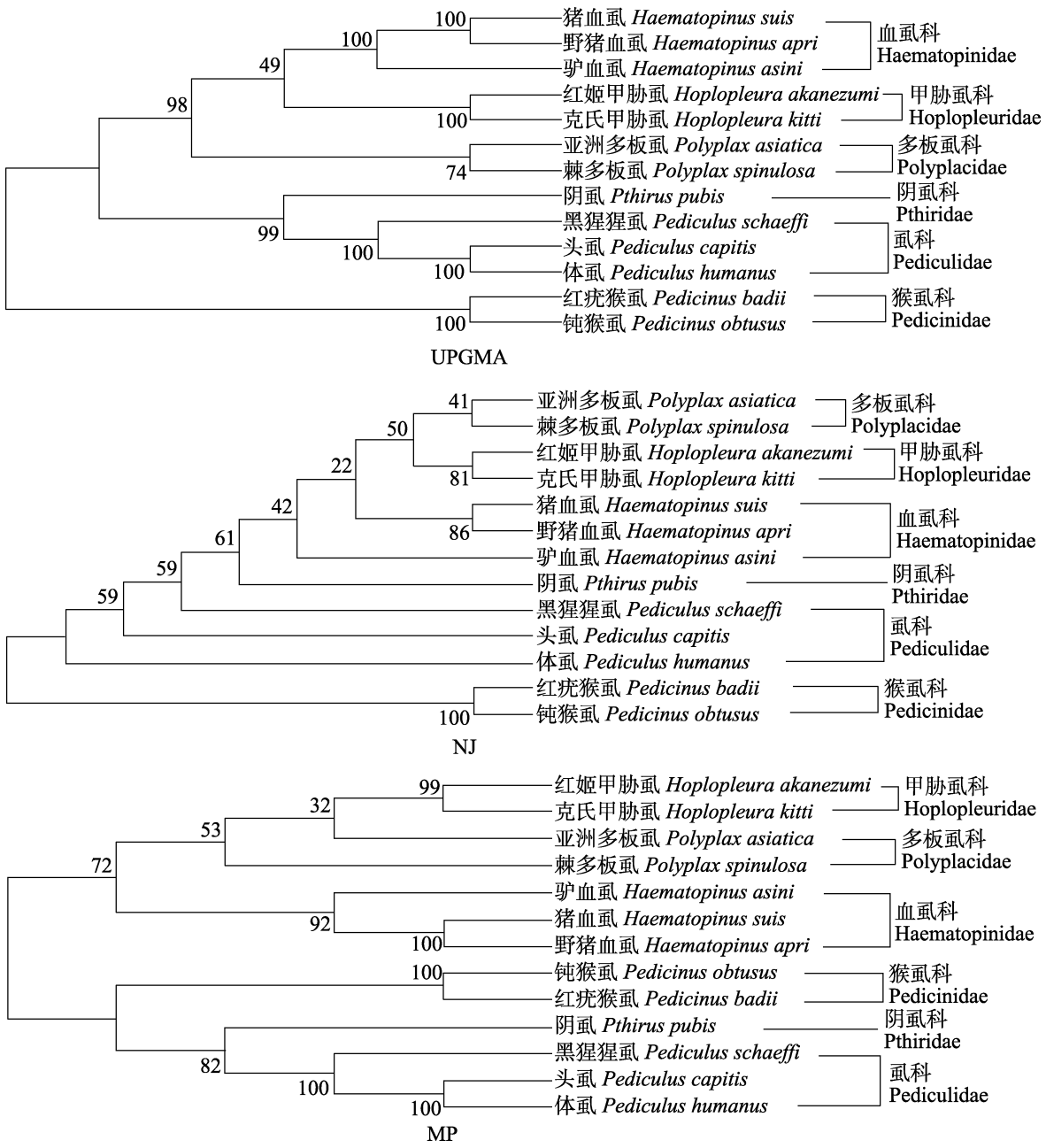

图 2　用 UPGMA、NJ 和 MP 法构建 13 种吸虱 16SrRNA 基因序列的进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree inferred from16SrRNA gene sequence of 13 species of sucking lice using UPGMA, NJ and MP methods

支上显示 Bootstrap 1 000 个循环的置信度。

The numbers represent the perce+ntage of 1 000 bootstrap replications.

基因的部分序列和 *trnY* 基因组成。克氏甲胁虱测出 34 个线粒体基因，分布在 11 个线粒体微环染色体上，每个线粒体微环染色体大小 1.8-2.8 kb，有 1-5 个基因，平均每个线粒体微环染色体上有 3.1 个线粒体基因。两种甲胁虱线粒体微环染色体平均基因数低于上述的 2 种多板虱（平均 3.4 个基因）、猪虱和马虱（平均 4.1 基因），多于体虱和头虱（平均 2.1 基因）及阴虱（平均 2.4 基因）。显然，2 种甲胁虱的线粒体基因组裂化速度高于猪虱和 2 种多板虱，但是低于体虱，头虱

和阴虱。2 种甲胁虱线粒体微环染色体中也有 7 个微环有相同的基因和基因排序，表明同属吸虱裂化线粒体基因组的裂化模式有差异是很常见的现象（表 5）。

表 5　4 种吸虱的线粒体基因组

Table 5　The mitochondrial genomes of 4 species of sucking lice

亚洲多板虱线粒体基因组 The mt genomes of *Polyplax asiatica*	棘多板虱线粒体基因组 The mt genomes of *Polyplax spinulosa*	红姬甲胁虱线粒体基因组 The mt genomes of *Hoplopleura akanezumi*	克氏甲胁虱线粒体基因组 The mt genomes of *Hoplopleura kitti*
atp8-atp6	*atp8-atp6*	*atp8-atp6-N*	*atp8-atp6-N*
E-cob-I	*E-cob-I*	*E-cob-*$S_{1(tct)}$*-*$S_{2(tga)}$	*E-cob-*S_1*-*S_2
cox1-$L_{2(taa)}$	*cox1-*$L_{1(tag)}$	*I-cox1*	*I-cox1*
D-Y-cox2-nad6	*T-D-Y-cox2-nad6-A*	*D-*$Y_{1(gta)}$*-cox2*	*D-Y-cox2-T*
R-nad4L-cox3-A	*R-nad4L-P-cox3*	*R-nad4L-P-cox3-A-T*	*R-nad4L-P-cox3-A*
S_1*-*S_2*-nad1-T-G-nad3-W*	*nad1-G-nad3-W*	*nad2*	*Q-nad1-G-nad3*
Q-nad2-N-P	*Q-nad2-N*	*trnK-nad4*	*nad2*
trnK-nad4-F	*trnK-nad4*	*C-nad6-W-*$L_{2(taa)}$	*trnK-nad4*
H-nad5	*H-nad5-F*	*rrnS*	*C-nad6-W-*$L_{2(taa)}$
rrnS-C	S_1*-*S_2*-rrnS*	$Y_{2(ata)}$*-rrnL-V*	*rrnS*
M-$L_{1(tag)}$*-rrnL-V*	*M-*L_2*-rrnL-V*	$Y_{2(ata)}$*-prrnL-prrnS*	*M-*$L_{1(tag)}$*-rrnL-V*

3　结论与讨论

本文通过对红姬甲胁虱、克氏甲胁虱、棘多板虱和亚洲多板虱的线粒体 16SrRNA 基因长片段进行 PCR 扩增，获得的 4 种吸虱的序列长度分别为 1 137、1 107、1 044 和 1 125 bp 的目标序列。通过 GenBank 查找到黑猩猩虱（KC241885.1）、头虱 *Pediculus capitis*（JX080391.1）、体虱 *Pediculus humanus*（DQ076660.1）、阴虱 *Pthirus pubis*（EU219994.2）、猪血虱 *Haematopinus suis*（KC814606.1）、野猪血虱 *Haematopinus apri*（KC814615.1）、驴血虱 *Haematopinus asini*（KF939322）、红疣猴虱 *Pedicinus badii*（EU827263.1）和钝猴虱 *Pedicinus obtusus*（AB478978.1）的 16SrRNA 基因长片段序列。序列比对发现 13 种吸虱 16SrRNA 基因长片段序列的同源性从 30.3%-99.5%，其趋势是同属的种间同源性高，不同属的种间同源性低，如血虱科血虱属的 3 种吸虱中 16SrRNA 基因长片段序列的同源性为 67%-93.9%；甲胁虱科甲胁虱属 2 种的序列同源性达 66.6%；多板虱科多板虱属 2 种的序列同源性达 61.3%；虱科虱属 3 种的序列同源性为 78.4%-99.5%；猴虱科猴虱属 2 种的序列同源性 95.47%。而不同属的种间差异很大，如棘多板虱和 2 种猴虱的同源性的同源性分别仅为 30.3%和 30.6%。表明吸虱的 16SrRNA 基因长片段在进化过程中比较保守，其较高程度的同源性对吸虱科级和属级单元的鉴定和系统发育分析十分有利。遗传距离值大小反映了亲缘关系的远近（江建平和周开亚，2001）。本文的 6 科 6 属 13 种吸虱遗传距离从 0.004（头虱和体虱）到 2.066（阴虱和钝猴虱），说明头虱和体虱亲缘关系最近，而阴虱和钝猴虱亲缘关系最远。从表 4 可以看出，头虱和体虱之间的遗传距离远远小于其与不同属的种之间的遗传距离。钝猴虱和红疣猴虱之间遗传距离为 0.042，野猪血虱和猪血虱之间的遗传距离 0.059，都明显低于它们与不同属的种之间的遗传距离。这表明同科同属吸虱的种间遗传距离明显小于不同科不同属之间的遗传距离，即基于 16SrRNA 基因长片段序列的遗传距离可用于界定物种及其所在高级分类单元

的地位。

在线粒体的 4 类基因中，rRNA 基因进化速度最慢，tRNA 基因的进化速率比 rRNA 基因快，但比各种蛋白质基因的进化速率慢，而转录控制区（D-loop）具有最快的进化速率。16SrRNA 基因作为一种非编码蛋白基因，在进化上受到的选择压力相对较小。Canapa 等（2000）在对扇贝科的线粒体 16SrRNA 基因研究结果发现：与种群内遗传多样性相比，16SrRNA 基因片段序列可能更适合在种以上分类阶元系统构建的研究。杨建敏等（2008）研究中国沿海（大连、秦皇岛等居群）脉红螺（*Rapana venosa*）及蒋国芳等（2004）研究 9 种蟋蟀 16SrRNA 基因得到的结果均支持了 Canapa 等（2000）的理论。UPGMA、NJ 和 MP 3 种方法构建的进化树表明（图 1），本研究分析的吸虱亚目 6 个科都可认为是单系群，应肯定其科、属级阶元分类地位，这也支持了 Canapa 等（2000）的观点。还有学者认为，16SrRNA 序列也可用于种级单元的鉴别。如王鹭骁等（2006）通过对 8 种鲍的研究发现，16SrRNA 基因片段能较好第分辨鲍种间水平和亚种水平的遗传差异，但无法区分亚种以下分类单元的遗传差异。本研究通过 6 科 6 属 13 种吸虱 16SrRNA 基因序列进行分析，认为 16SrRNA 基因序列能够较好地分辨吸虱的科、属级单元甚至不同种间的遗传差异，同属的种间遗传距离值小，如同属的头虱和体虱间的遗传距离为 0.004，而不同科不同属的种间遗传距离值大，如钝猴虱和阴虱间的遗传距离为 2.066（表 4）。因此，16SrRNA 可以用于种级或亚种级水平的分类。

国内外对 5 科 5 属 10 种吸虱（体虱、头虱、阴虱、猪血虱、野猪血虱、驴血虱、前述的 2 种多板虱和 2 种甲胁虱）线粒体基因组的研究表明，它们的线粒体基因组都因裂化而由 9-20 个线粒体微环染色体组成，每个线粒体微环染色体的大小 1.5-4 kb，有 1-8 个基因，且不同种间的裂化速度和裂化程度有很大差异（Shao *et al.*，2009，2012；Jiang *et al.*，2013；Song *et al.*，2014；Dong *et al.*，2014a，2014b）。以每个线粒体微环染色体上平均基因数计，红姬甲胁虱为 2.8 个基因，克氏甲胁虱为 3.1 个基因（Dong *et al.*，2014a），2 种多板虱为 3.4 个基因（Dong *et al.*，2014b），体虱和头虱为 2.1 个基因，阴虱为 2.4 个基因（Shao *et al.*，2012），猪虱和马虱有 4.1 个基因（Song *et al.*，2014）。显然，不同谱系的吸虱线粒体基因组裂化速度有很大的差异，10 种吸虱中裂化速率最快的是 3 种人虱（体虱、头虱和阴虱），最慢的是 3 种血虱（猪血虱、野猪血虱和驴血虱），4 种鼠虱（亚洲多板虱、棘多板虱、克氏甲胁虱和红姬甲胁虱）处于中间。在基于 16SrRNA 的系统进化树中，血虱科、多板虱科和甲胁虱科分支邻近。MP 树上，此 3 科构成独立的分支，按所处位置，进化程度由低到高依次为血虱科、多板虱科、甲胁虱科，与线粒体基因组裂化所显示的由慢到快的顺序一致。且作为此 3 科姐妹群的另外 3 科，也以裂化程度高的虱科处于本支的最末端（最进化）。在 NJ 树中，此 3 科的分支位于树的端部，2 种猪虱和 1 种马虱构成的分支与甲胁虱科和多板虱科构成的分支互为姐妹群，即猪虱和马虱较甲胁虱和多板虱原始，因此，就此 3 科而言，进化程度与线粒体基因组裂化程度的趋势一致。但线粒体基因组裂化程度最高的虱属却处于 NJ 树下部，即进化程度与其线粒体基因组裂化程度相反，这可能与 NJ 法的局限性（信息损失）有关。在 UPGMA 树上，多板虱科+甲胁虱科+血虱科与虱科+阴虱科也互为姐妹群，前 3 科在本支上的进化程度与线粒体基因组的裂化程度不一致，但后二者在本支上以虱科最进化（本支内的最顶端单元）。进化程度与线粒体裂化程度趋势不尽一致，可能与该法视全部信息具有同等重要性有关。

本研究首次运用线粒体基因 16SrRNA 和线粒体基因组裂化程度分析吸虱亚目的系统发育关系，初步认为本研究涉及的 6 个科均为单系群，猴虱科较另外 5 个科相对原始，结果支持形态分类地位。本研究还认为涉及的 6 个科可分为平行进化的两大类群（两支），一支是“多板虱科+甲胁虱科+血虱科”，另一只是“虱科+阴虱科+猴虱科”；线粒体基因组的裂化程度或许与类群（分类单元）的进化程度具有一致性，其

结果对完善吸虱亚目系统发育研究奠定了一定基础。

参考文献 (References)

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389–3402.

Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27(8): 1767–1780.

Canapa A, Barucca M, Marinelli A, 2000. Molecular data from the16S rRNA gene for the phylogeny of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). *J. Mol. Evol.*, 50(1): 93–97.

Chin TH, 1999. Taxonomy and Fauna of Sucking Lice (Anoplura) in China. Beijing: Science Press. 1–132. [金大雄, 1999. 中国吸虱的分类和检索. 北京: 科学出版社. 1–132.]

Dong WG, Song S, Guo XG, Jin DC, Yang QQ, Barker SC, Shao R, 2014a. Fragmented mitochondrial genomes are present in both major clades of the blood-sucking lice (suborder Anoplura): Evidence from two *Hoplopleura* rodent lice (family Hoplopleuridae). *BMC Genomics*, 15(751): 1–13.

Dong WG, Song S, Jin DC, Guo XG, Shao R, 2014b. Fragmented mitochondrial genomes of the rat lice, *Polyplax asiatica* and *Polyplax spinulosa*: Intra-genus variation in fragmentation pattern and an inverse link between the extent of fragmentation and the length of life cycle. *BMC Genomics*, 15(44): 1–12.

Durden LA, Musser GG, 2006. The mammalian hosts of the sucking lice (Anoplura) of small mammals: True parasites//Micromammals and Macroparasites: From Evolutionary Ecology to Management. Tokyo: Springer. 141–160.

Durden LA, Musser GG, 1994. The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: A taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions. *B. Am. Mus. Nat. Hist.*, 218(1): 1–90.

Feng B, 2010. Phylogenetic analysis of the Prionini (Coleoptera: Cerambycidae: Prioninae). Doctoral dissertation. Chongqing: Southwest University. [冯波, 2010. 中国锯天牛族系统发育分析. 重庆: 西南大学.]

Foighil D, Gaffney PM, Hilbish TJ, 1995. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C.ariakensis* Wakiya] oyster species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 192(2): 211–220.

Gibney VJ, Campbell JB, Boxler DJ, Clanton DC, Deutscher GH, 1985. Effects of various infestation levels of cattle lice (Mallophaga: Trichodectidae and Anoplura: Haematopinidae) on feed efficiency and weight gains of beef heifers. *J. Econ. Entomol.*, 78(6): 1304–1307.

Gish W, States DJ, 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.*, 3(3): 266–272.

Hornok S, Hofmann-Lehmann R, Fernandez de Mera IG, Mera ML, Elek V, Hajtos I, Repasi A, Gonczi E, Tanczos B, 2010. Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. *Vet. Parasitol.*, 174(3): 355–358.

Huang WD, Liang XY, Xie XF, Wang XM, Chen XS, 2019. Phylogenetic analysis of the genus *Scymnus* Kugelann (Coleoptera: Coccinellidae) from China based on 12S, 16S and 28S rRNA gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 62(2): 241–254. [黄卫东, 梁馨月, 谢秀凤, 王兴民, 陈晓胜, 2019. 基于 12S, 16S 和 28SrRNA 基因序列的中国小毛瓢虫属系统发育分析. 昆虫学报, 62(2): 241–254.]

Jiang HW, Barker SC, Shao R, 2013. Substantial variation in the extent of mitochondrial genome fragmentation among blood-sucking lice of mammals. *Genome Biol. Evol.*, 5(7): 1298–1308.

Jiang GF, Chen AH, Feng JY, 2004. Phylogenetic relationships of nine crickets based on partial sequences of 16SrRNA gene (Orthoptera: Gryllidae). *Entomotaxonomia*, 26(4): 249–254. [蒋国芳, 陈爱辉, 冯金叶, 2004. 九种蟋蟀 mtDNA-16S rRNA 基因序列及其系统进化. 昆虫分类学报, 26(4): 249–254.]

Jiang JP, Zhou KY, 2001. Evolutionary relationships among Chinese ranid frogs inferred frommitochondrial DNA sequences of 12S rRNA gene. *Acta Zoologica Sinica*, 47(1): 38–44. [江建平, 周开亚, 2001. 从 12S rRNA 基因序列研究中国蛙科 24 种的进化关系. 动物学报, 47(1): 38–44.]

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A, 2012. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647–1649.

Kim KC, Ludwig HW, 2008. The family classification of the Anoplura. *Syst. Entomol.*, 3(3): 249–284.

Laslett D, Canback B, 2008. ARWEN: A program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 24(2): 172–175.

Lowe TM, Eddy SR, 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.*, 25(5): 955–964.

Nelson WA, Shemanchuk JA, Haufe WO, 1970. *Haematopinus*

eurysternus: Blood of cattle infested with the short-nosed cattle louse. *Exp. Parasitol.*, 28(2): 263–271.

Otter A, Twomey DF, Crawshaw TR, Bates P, 2003. Anaemia and mortality in calves infested with the long-nosed sucking louse (*Linognathus vituli*). *Vet. Rec.*, 153(6): 176–179.

Robertson JA, S' lipiński A, Hiatt K, Miller KB, Whiting MF, Mchugh JV, 2013. Molecules, morphology and minute hooded beetles: A phylogenetic study with implications for the evolution and classification of Corylophidae (Coleoptera: Cucujoidea). *Syst. Entomol.*, 38(1): 209–232.

Schneider JA, Foighil DO, 1999. Phylogeny of giant clams (Cardiidae: Tridacninae) based on partial mitochondrial 16SrDNA gene sequences. *Mol. Phylogenet Evol.*, 13(1): 59–66.

Shao R, Kirkness EF, Barker SC, 2009. The single mitochondrial chromosome typical of animals has evolved into 18 minichromosomes in the human body louse, *Pediculus humanus*. *Genome Res.*, 19(5): 904–912.

Shao R, Zhu XQ, Barker SC, Herd K, 2012. Evolution of extensively fragmented mitochondrial genomes in the lice of humans. *Genome Biol. Evol.*, 4(11): 1088–1101.

Song S, Barker SC, Shao R, 2014. Variation in mitochondrial minichromosome composition between blood-sucking lice of the genus *Haematopinus* that infest horses and pigs. *Parasit Vectors*, 7(144): 1–8.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.*, 24(8) 1596–1599.

Wang DM, 2010. Molecular phylogeny of the Sawfly family based on partial sequence of 16S rRNA and 12S rRNA gene: Tenthredinidae (Hymenoptera: Tenthredinoidea). Master dissertation. Changsha: Central South University of Forestry and Technology. [王德明, 2010. 基于 16SrRNA 和 12SrRNA 的叶蜂科昆虫分子系统学研究. 长沙：中南林业科技大学.]

Wang LX, Ke CH, Wang ZY, Liu B, Cai BY, Wang YL, 2006. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene and molecular phylogeny of eight species of abalones in genus *Haliotis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 13(2): 167–173. [王鹭骁, 柯才焕, 王志勇, 刘波, 蔡明夷, 王艺磊, 2006. 中国沿岸几种鲍线粒体 16SrRNA 基因片段序列比较及鲍属系统发育. 中国水产科学, 13(2): 167–173.]

Wolstenholme DR, 1992. AnimaI mitochondrial DNA, structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141(1): 173–216.

Xu MY, 2009. Molecular phylogeny of Acridoidea based on 18S rRNA, 16S rRNA, COI, COII genes. Master dissertation, Hebei: Hebei University. [徐淼洋, 2009. 基于 18SrRNA、16SrRNA、COI、COII 基因的蝗总科系统发育研究. 河北: 河北大学.]

Yang JM, Li Q, Zhang XD, Song ZL, Wang RC, 2008. Genetic diversity in populations of *Rapana venosa* in coastal waters of China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 39(3): 257–262. [杨建敏, 李琪, 郑小东, 2008. 中国沿海脉红螺（*Rapana venosa*）自然群体线粒体 DNA 16S rRNA 遗传特性研究. 海洋与湖沼, 39(3): 257–262.]

Yoshizawa K, Johnson KP, 2010. How stable is the “polyphyly of lice” hypothesis (Insecta: Psocodea)?: A comparison of phylogenetic signal in multiple genes. *Mol. Phylogenet Evol.*, 55(1): 939–951.

Zhu BJ, Liu CL, Cao J, Li XQ, Wei GQ, 2010. Phylogenetic analysis of *Actias selene* based on 18Sribosomal RNA and mitochondrial 16S rRNA genes. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(2): 285–292. [朱保建, 刘朝良, 曹甲, 李旭全, 魏国清, 2010. 基于 18SrRNA 和线粒体 16SrRNA 基因序列的柳蚕进化分析. 昆虫知识, 47(2): 285–292.]