

应用 DNA 条形码技术对蚤蝇科性二型鉴别^{*}

王剑峰 申熙熙 冯典兴 刘广纯^{**}

(沈阳大学 城市有害生物治理与生态安全辽宁省重点实验室 沈阳 110044)

摘要 蚤蝇科昆虫种类繁多,其幼虫食性分化明显,具典型的性二型现象,面临物种鉴定与系统发育重建两大难题。依靠网络技术发展起来的 DNA 分类,特别是基于单一短片度的 DNA 条形码技术的快速发展和应用给解决蚤蝇难题带来了新的契机和突破点。本文针对 4 种实验室长期饲养的尸食性蚤蝇:蛆症异蚤蝇 *Megaselia scalaris* (Loew),东亚异蚤蝇 *Megaselia spiracularis* Schmitz,广东栅蚤蝇 *Diplonevra peregrina* (Wiedemann) 和角喙栓蚤蝇 *Dohrniphora cornuta* (Bigot),应用 676 bp COI 基因序列对性二型蚤蝇进行雌雄配对,验证了 DNA 条形码在解决性二型配对难题方面的有效性,同时为蚤蝇系统分类学、生物防治、口岸检疫以及法医鉴定等领域提供相应技术支持。

关键词 蚤蝇科, DNA 条形码, 性二型, DNA 分类

DNA-based identification of sexual dimorphism in the Phoridae (Diptera)

WANG Jian-Feng SHEN Xi-Xi FENG Dian-Xing LIU Guang-Chun^{**}

(Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract The Phoridae are an extremely large family within the Diptera. Phoridae are mainly small and often exhibit sexual dimorphism. More than 50% of described species are known from just one sex. The divisions of taxa within the family in the current classification system are widely disputed. Identification of many species and phylogenetic reconstruction remain as two important problems for resolution by the world's phoridologists. Due to a lack of available morphological characters, it is very difficult to resolve these problems using traditional morphological methods, and DNA-based identification systems represent a promising approach to resolving this taxonomic impediment. We examined 4 species, *Megaselia scalaris* (Loew), *Megaselia spiracularis* Schmitz, *Diplonevra peregrina* (Wiedemann) and *Dohrniphora cornuta* (Bigot), using DNA methods. Quick and accurate species-level identifications were provided by use of the 676 bp COI sequence, which could play an important role in taxonomy, biological control, port quarantine and forensic identification, etc.

Key words Phoridae, DNA barcode, sexual dimorphism, DNA taxonomy

蚤蝇科是双翅目中较大科之一,目前世界已记录大约 4 000 种,但实际种类可能达该数量的 10 倍(Brown, 2004)。其幼虫食性分化明显,以腐食、粪食和尸食为主,更兼有寄生、捕食和植食等种类,部分种类如虻蚤蝇属 *Pseudacteon* 种类、嗜菇异蚤蝇 *Megaselia halterata*、蛆症异蚤蝇 *Megaselia scalaris* 等是重要的农业、卫生害虫以及天敌和法

医昆虫(Feener and Brown, 1992; Campobasso, 2004; Gilbert *et al.*, 2008)。

蚤蝇体小到中型,具有典型的雌雄二型现象,目前 50% 以上的属为单性属(Disney, 1994)。占据蚤蝇约 45% 种类的异蚤蝇属,在已知的 1 500 多种中超过 60% 的种类是以单性种发表,其中雄性种占到 59% (Disney, 1989)。蚤蝇雌雄个体间

^{*} 资助项目:国家自然科学基金(31201743;31071965;81102296)。

^{**} 通讯作者, E-mail: liugc@ yahoo. cn

收稿日期: 2012-12-07, 接受日期: 2012-12-30

的差异表现在触角类型、

翅、足、腹部气门与背板、体型大小等众多方面(刘广纯,2001):如蛇蚤蝇属 *Puliciphora*,雄虫有翅,雌虫翅常退化或无翅;栅蚤蝇属 *Diplonevra* 和栓蚤蝇属 *Dohrniphora* 两属中雄虫喙常是典型的舐吸式,而雌虫则为短或长的刺吸式等。传统分类鉴别主要依据形态差异来区分不同的蚤蝇种类,早期分类研究中雌雄单性标本均可作为模式发表新物种,不能否认,其中可能存在较多的同物异名:如 *Spiniphora genitalis* 是 Schmitz 于 1940 年依据单雄标本确立的新种,而 *Spiniphora variegata* 是 Borgmeier 于 1961 年依据雌性标本描述,在 2001 年两者被确定为同一物种(刘广纯,2001);Brown (1992) 通过饲养发现仅有雄性的单性属 *Gymnoselia* 和仅有雌性种类的属 *Rhynchomicropteron* 为同属种类,雌雄形态特征差异甚至可以达到属级。性二型现象不仅带来物种鉴定问题,更严重的是,大量蚤蝇的错误鉴定必将干扰蚤蝇科系统发育关系的重建。目前蚤蝇高阶元系统发育关系混乱,争议颇多,一个重要原因是物种鉴定不准确。众多蚤蝇专家也尝试解决上述难题,但现有研究显示,仅依靠形态学手段解决这些难题显得极为困难。

而基于分子生物学和网络技术发展,以 DNA 序列为主体构建 DNA 分类平台对生物进行鉴定,这将是持续分类的方向(Tautz *et al.*, 2002, 2003; Hebert *et al.*, 2003b),也给彻底解决物种鉴定难题带来了新的希望。特别是 Hebert 等(2003a, 2003b)提出 DNA 条形码技术,应用单一片段来区分所有物种,由于其原理简单、实际操作可行等特点,已经得到了国、内外众多专家的认可(Besansky *et al.*, 2003; Proudlove and Wood, 2003; Janzen, 2004; Schindel and Miller, 2005)。国、内外众多专家在动物、植物以及微生物等诸多领域开展了相关研究(Brown *et al.*, 2003; Hogg and Hebert, 2004; Ball and Hebert, 2005; Barrett and Hebert, 2005; Kress *et al.*, 2005; Monaghan *et al.*, 2005; Vences *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2005; 诸立新等, 2006; Clare *et al.*, 2007; 雷富民和杨岚, 2009; Wang and Qiao, 2009; 李敏等, 2010; 岳巧云等, 2010),并取得了较好的成果。在蚤蝇方面也有成果报道,Boehme 等(2010)应用 COI 条形码成果鉴定 6 种腐生蚤蝇;Smith 和 Brown(2008)、Brown 和 Smith

(2010)与 Cook 和 Mostovski(2002)应用核基因(28S 和 *CAD*)和线粒体基因(12S, 16S, *ND1* 和 *COI*),分别对寄生于蜜蜂的 *Melaloncha* 属以及蚤蝇属 *Phora* 的蚤蝇物种进行了雌雄二型的对应鉴别。

本文应用 DNA 条形码技术,对 4 种长期饲养的性二型蚤蝇进行雌雄配对,旨在开展有效尝试,解决性二型蚤蝇鉴定这一难题,同时发挥其在系统分类学、生物防治、口岸检疫以及法医鉴定等领域的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究测试了 4 种尸食性蚤蝇:蛆症异蚤蝇 *Megaselia scalaris* (Loew),东亚异蚤蝇 *Megaselia spiracularis* Schmitz, 广东栅蚤蝇 *Diplonevra peregrina* (Wiedemann) 和角喙栓蚤蝇 *Dohrniphora cornuta* (Bigot)。材料均取自辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室长期饲养种类。相关信息以及序列的 GenBank 登录号见表 1。

1.2 DNA 提取,PCR 扩增和测序

总 DNA 提取采用无损伤提取法,将浸泡于 80% 乙醇中的单头标本取出,用 TE (Tris, EDTA) 缓冲液洗涤 2 次。按照手册说明,使用 QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒提取总 DNA,溶于 30 μ L Buffer AE 中,并于 -20 $^{\circ}$ C 中保存,备用。提取 DNA 后标本继续保存于 80% 乙醇中,留待形态学研究。

PCR 扩增时,采用通用引物(Folmer *et al.*, 1994): LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATA-AAGATATTGG-3') 和 HCO2198 (5'-TAAACT-TCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')。反应体系采用 30 μ L:10 $\times$ Buffer 3.0 μ L, dNTP 2.4 μ L, 上下游引物各 0.6 μ L, *Taq* 酶 0.15 μ L (5 U/ μ L), DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 21.25 μ L。扩增反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;变性 94 $^{\circ}$ C 1 min,退火 40 ~ 44 $^{\circ}$ C 1 min,延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s,进行 35 个循环;终延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 2 μ L PCR 扩增产物采用 1.5% 的琼脂糖胶电泳检验扩增效果。

PCR 产物测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

表 1 研究所用蚤蝇标本信息

Table 1 Information for Phoridae species examined in this study

亚科 Suberfamily	属 (种) Genus (Species)	饲养标本采集地点 Collection locality	饲养标本 处理时间 Sample date	GenBank
				登录号/ 标本凭证号 GenBank accession no. /Phoridae no.
裂蚤蝇亚科 Metopininae	蛆症异蚤蝇 雌	辽宁省沈阳市	2011. 3. 31	JQ941745/ Phoridae01
	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew) female	Liaoning, Shenyang		
	蛆症异蚤蝇 雄	辽宁省沈阳市	2011. 3. 31	JQ941746/ Phoridae04
	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew) male	Liaoning, Shenyang		
	东亚异蚤蝇 雄	辽宁省沈阳市	2011. 07. 18	JQ941751/ Phoridae53
	<i>Megaselia spiracularis</i> Schmit male	Liaoning, Shenyang		
蚤蝇亚科 Phorinae	东亚异蚤蝇 雌	辽宁省沈阳市	2011. 10. 21	JQ941752/ Phoridae54
	<i>Megaselia spiracularis</i> Schmit female	Liaoning, Shenyang		
	广东栅蚤蝇 雄	辽宁省沈阳市	2011. 07. 15	JQ941747/ Phoridae47
	<i>Diplonevra peregrine</i> (Wiedemann) male	Liaoning, Shenyang		
	广东栅蚤蝇 雌	辽宁省沈阳市	2011. 07. 15	JQ941748/ Phoridae48
	<i>Diplonevra peregrine</i> (Wiedemannn) female	Liaoning, Shenyang		
	角喙栓蚤蝇 雄	广东省广州市	2011. 10. 07	JQ941749/ Phoridae49
	<i>Dohrniphora cornuta</i> (Bigot) male	Guangdong, Guangzhou		
	角喙栓蚤蝇 雌	广东省广州市	2011. 10. 07	JQ941750/ Phoridae50
	<i>Dohrniphora cornuta</i> (Bigot) female	Guangdong, Guangzhou		

1.3 DNA 序列分析

利用 DNASar 软件包中的 SeqMan 软件对双向测序获得的序列进行拼接。采用 Clustalx1.83 软件对基因序列进行比对分析。将其比对结果转换成 Mega 格式,应用 MEGA4.0 软件(www.megasoftware.net),基于 K2P (Kimura-2-Parameter)模式构建近邻结合树 NJ 树(Neighbour-Joining tree)(Saitou and Nei,1987)。K2P 模型是研究低基因距离的最适模型(Nei and Kumer,2000),基于序列相似性,NJ 树可以用于物种鉴定(Barrett and Hebert,2005)。

1.4 形态拍照

性二型标本拍照采用 Olympus 显微摄像系统(DP71)。

2 结果与分析

2.1 蚤蝇的形态差异

蚤蝇雌雄个体间的差异表现在触角类型、翅、

足、腹部气门与背板、体型大小等众多方面,本研究观察的 4 种蚤蝇均具有典型性二型现象。蛆症异蚤蝇:雌雄腹部背板具明显差异,雄虫黑色或黑褐色,前缘中部具黄斑,尤以背板Ⅳ和Ⅴ黄斑最大;雌虫腹部背板Ⅱ~Ⅴ向后渐狭,背板Ⅴ显著长于背板Ⅵ,背板Ⅵ呈马鞍形,伸达两侧,前缘具 3 个浅色斑(图 1:A,B)。东亚异蚤蝇:雄虫腹面Ⅲ~Ⅶ节的气门明显增大;雌虫正常(图 1:C,D)。广东栅蚤蝇:雌雄腹部背板具明显差异,雄虫腹部腹面黄色,背板黄褐相间,或黄黑相间,背板Ⅰ大部分暗褐,前、后缘为黄色,背板Ⅱ~Ⅵ黑褐色,具淡黄色后缘,背板Ⅱ~Ⅴ中央呈桔黄色;雌虫腹部背板黑褐色,仅背板Ⅱ~Ⅳ具极狭的后缘;背板Ⅰ极短,后缘黑色;背板Ⅱ大,前缘中央有半圆形的浅黄色或金黄色区域(图 1:E,F)。角喙栓蚤蝇:雄虫的喙常是典型的舐吸式,雌虫则为或短或长的刺吸式(图 1:K,L);雄虫后足股节基部具有 4~6 个栓状的刺状感觉器官,雌虫无(图 1:I,J);雄虫腹部背板Ⅱ~Ⅵ延长,背板Ⅰ黄褐色,两侧各具一

楔形的黑斑,背板Ⅱ黑色,前缘具一黄带,背板Ⅲ~Ⅴ黑色,背板Ⅵ前部黄色,后部黑色;雌虫腹部背板Ⅰ黄色,背板Ⅱ暗褐,背板Ⅲ~Ⅳ黑色(图 1:G,H)。

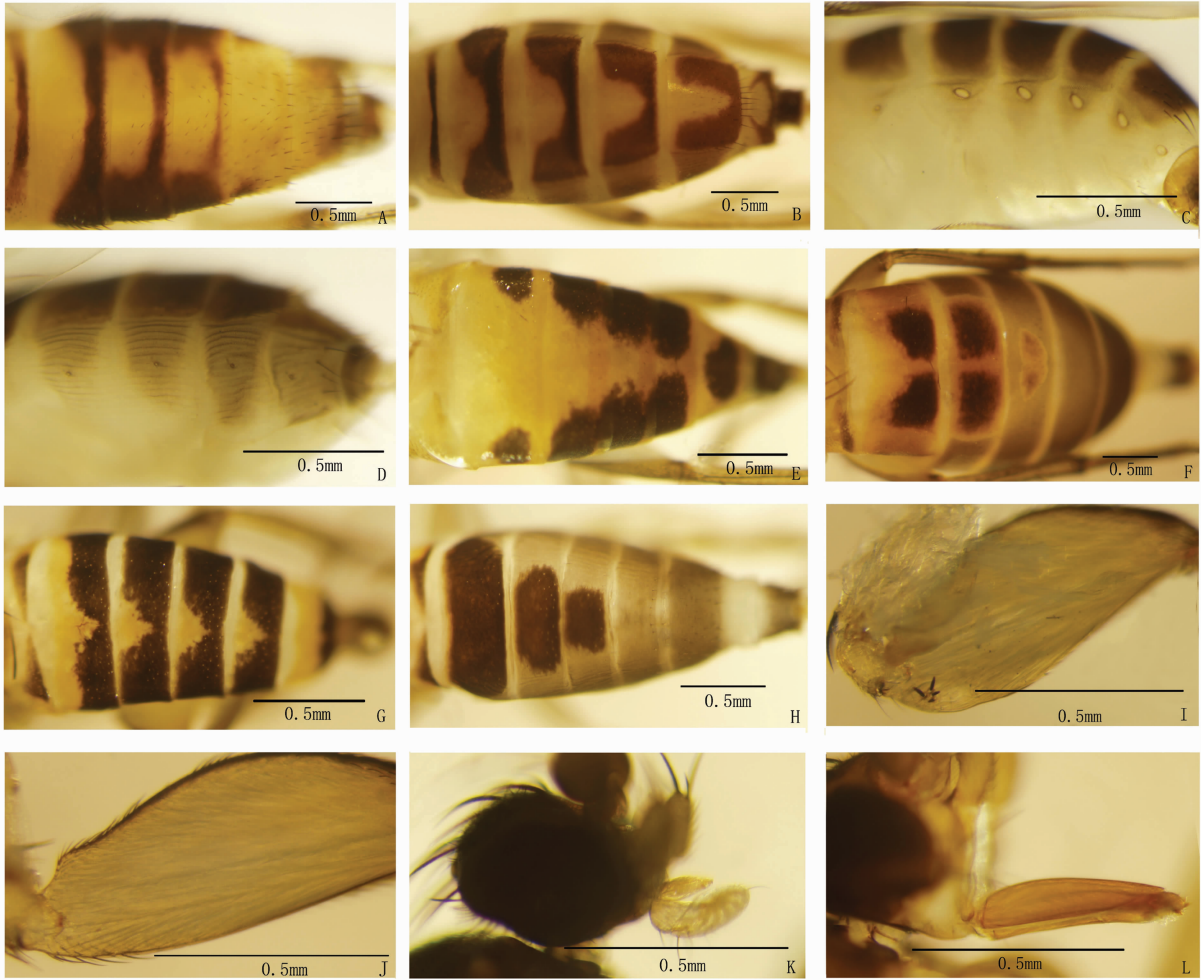


图 1 4 种蚤蝇雌雄差异

Fig.1 Sexual dimorphism of four species in Phoridae

A,B:蛆症异蚤蝇,A ♂ 腹部背板, B ♀ 腹部背板; C,D:东亚异蚤蝇,C ♂ 腹部气门, D ♀ 腹部气门; E,F 广东栅蚤蝇, E ♂ 腹部背板, F ♀ 腹部背板; G~L:角喙栓蚤蝇, G ♂ 腹部背板, H ♀ 腹部背板, I ♂ 后足股节基部及感器, J ♀ 后足股节基部, K ♂ 喙, L ♀ 喙。

A,B:*Megaselia scalaris*, A ♂ abdomen tergites, B ♀ abdomen tergites; C,D:*Megaselia spiracularis*, C ♂ abdomen spiracles, D ♀ abdomen spiracles; E,F: *Diplonevra peregrina*, E ♂ abdomen tergites, F ♀ abdomen tergites; G-L: *Dohrniphora cornuta*, G ♂ abdomen tergites, H ♀ abdomen tergites, I ♂ basal half of hind femur and sensory complex, J ♀ basal half of hind femur, K ♂ proboscis, L ♀ proboscis.

2.2 DNA 数据

扩增共 4 种 8 条序列,经 DNASTar 中的 SeqMan 比对后得到 676 bp 序列,将拼接校对后的序列输入 NCBI 网站,进行 BLAST 比对,确认所测序列无误,可用于后续的系统发育分析。

2.2.1 碱基组成分析 所得 676 个位点中无空

位出现,其中保守位点 537 个,可变位点 139 个,简约信息位点 139 个,可变位点占 25.9%,简约信息位点占 25.9%。碱基平均含量为 28.7% A、39.8% T、16.0% G、15.5% C。其中 A + T% 为 68.5%,G + C% 为 31.5%。

2.2.2 序列差异分析 基于 676 bp COI 序列,对

表 2 蚤蝇科 8 样品 COI 序列差异

Table 2 Nucleotide divergences for Phoridae species, using Kimura's two parameter model

样品序号 Phoridae no.	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>D. cornuta</i> 49								
2 <i>D. cornuta</i> 50	0.0000							
3 <i>D. peregrina</i> 47	0.1097	0.1097						
4 <i>D. peregrina</i> 48	0.1097	0.1097	0.0000					
5 <i>M. scalaris</i> 01	0.1414	0.1414	0.1359	0.1359				
6 <i>M. scalaris</i> 04	0.1414	0.1414	0.1359	0.1359	0.0000			
7 <i>M. spiracularis</i> 53	0.1430	0.1430	0.1413	0.1413	0.1254	0.1254		
8 <i>M. spiracularis</i> 54	0.1430	0.1430	0.1413	0.1413	0.1254	0.1254	0.0000	

8 个样品进行序列差异分析(表 2),共有 28 对序列差异,平均差异是 11.38%,标准差(SD)为 4.86%,范围 0~14.30%。种内雌雄个体间差异均为 0;种间序列差异平均差异是 13.28%,SD 为 1.21%,范围 10.97%~14.30%。

2.2.3 构建 NJ 树 构建蚤蝇科 2 亚科 4 种的 NJ

树。在所建 NJ 树中蚤蝇科中 4 个种的雌雄样品有效的聚在一支,且自举检验支持率均为 100%。同时,4 个种有效的区分为不同的支,其中角喙栓蚤蝇与广东栅蚤蝇聚在一支,自举检验支持率均 97%;蛆症异蚤蝇与东亚异蚤蝇聚在一支,但自举检验支持率低于 50%(图 2)。

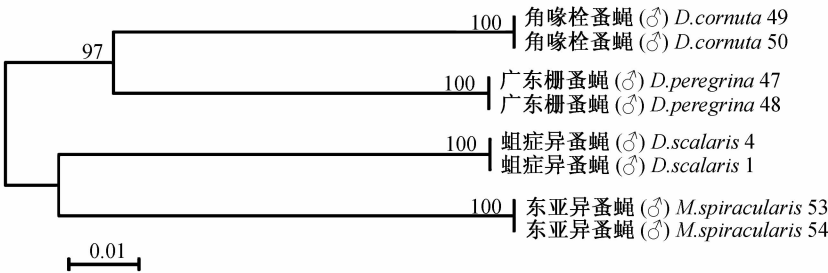


图 2 基于 676 bp COI 序列和 K2P 参数模型构建蚤蝇科 4 种 NJ 树(自举检验支持率低于 50% 的分支不显示)

Fig.2 Neighbour-Joining (NJ) tree of four species in Phoridae based on 676 bp mitochondrial COI sequences with bootstrap percentages shown above the branch ($\geq 50\%$), using Kimura-2-Parameter model

3 讨论

3.1 应用 DNA 条形码解决性二型问题的有效性

从 NJ 树分析结果来看,4 种 8 个样品都各自聚在一支,同种的雌雄个体分别有效的聚在一支,自举检验支持率为 100%,说明应用线粒体 COI 序列可以有效的鉴定蚤蝇物种,解决其性二型问题,可将雌雄个体差异较大的种类配对。

蚤蝇 8 个样品的 COI 基因序列,A + T(%) 为 68.5%,G + C(%) 为 31.5%,A + T 的平均含量明显高于 G + C 的含量,这与昆虫线粒体基因碱基组成特征基本一致(Simon *et al.*,1994)。基于 676

bp 的 COI 序列差异比对结果显示,平均差异是 11.38%,SD 为 4.86%,范围 0~14.30%,与 Hebert 等(2003b)对 11 科不同动物类群 13 320 对序列差异研究的范围相似;蚤蝇雌雄个体序列完全一致,种内差异 0,其差异范围同其他类群相似,如鳞翅目为 0.46%(Hajibabaei *et al.*,2006),蜘蛛类为 1.40%(Barrett and Hebert,2005),鸟类为 0.27%(Herbert *et al.*,2004);种间序列差异平均差异是 13.28%,范围 10.97%~14.30%,同样类似其他类群,如北美洲浮游为 18.10%(Ball and Hebert,2005),蜘蛛类为 16.4%(Barrett and Hebert,2005)。

因此,DNA 条形码技术可以为蚤蝇科性二型昆虫的快速鉴定提供技术和理论的支持。

3.2 增加标本与分子标记

在本研究所构建 NJ 树中,同种个体以较高置信值聚在一起,验证了应用 DNA 条形码可以有效的解决性二型现象带来的鉴别难题。但要实现所有蚤蝇标本的有效鉴定,还需要不断的补充和完善 DNA 序列数据库。因此在进一步的研究中,应从蚤蝇科分类系统的全局出发增加标本的数量,尽量选取不同地理种群、不同个体、不同属等具有代表性的物种,以增强分类单元的代表性;同时增加分子标记,如核基因 28S, *CAD*, *EF1- α* 和线粒体基因 12S, 16S, *ND1* 等,使结果更为科学合理。

3.3 促进法医等相关领域的发展

蚤蝇科部分种类可寄生于人类尸体,被应用于法医领域死亡间隔时间的推断。应用蚤蝇作为昆虫学证据的一个重要环节是种类鉴定,包括不同发育阶段的虫态,以及雌雄型的鉴别。而这一过程直接影响死亡间隔时间的判断。本研究运用 676 bp COI 序列成功鉴定了 4 种性二型法医蚤蝇,为促进法医昆虫快速鉴定提供一条新途径。同时,随着蚤蝇 DNA 数据库的不断完善,应用 DNA 条形码技术快速准确的鉴定蚤蝇种类,可以为农业、卫生害虫防治以及天敌昆虫研究等领域提供技术支持。

致谢:感谢王晓旭在实验材料饲养及蔡云龙和刘威在拍照过程中给予的协助。

参考文献 (References)

Ball SL, Hebert PDN, 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *J. N. Am. Bent. Soc.*, 24(3):508–524.

Barrett RDH, Hebert PDN, 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 83(3):481–491.

Besansky NJ, Severson DW, Ferdig MT, 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends Parasitol.*, 19(12):545–546.

Boehme P, Amendt J, Disney RHL, Zehner R, 2010. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *Int. J. Legal. Med.*, 124(6):577–581.

Brown BV, Smith PT, 2010. The bee-killing flies, genus *Melaloncha* Brues (Diptera: Phoridae): a combined molecular and morphological phylogeny. *Syst. Entomol.*, 35(4):649–657.

Brown BV, 1992. Life history, immature stages and undescribed male of *Rhynchomicropteron* (Diptera: Phoridae). *J. Nat. Hist.*, 26(2):407–416.

Brown BV, 2004. Diversity of ant-decapitating flies (Diptera: Phoridae: *Apocephalus*) from the ALAS project: new results and projections. *Sociobiology*, 44(3):683–688.

Brown J, Miller S, Horak M, 2003. Studies on new Guinea moths. 2. Description of a new species of *Xenothictis meyrick* (Lepidoptera: Tortricidae: Archipini). *Proc. Entomol. Soc. Wash.*, 105(4):1043–1050.

Campobasso CP, Disney RHL, Introna F, 2004. A case of *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae) breeding in a human corpse. *Aggrawal's Int. J. Forensic Med. Toxicol.*, 5(1):3–5.

Clare EL, Lim BK, Engstrom MD, Eger JL, Hebert PDN, 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Mol. Ecol. Notes*, 7(2):184–190.

Cook CE, Mostovski MB, 2002. 16S mitochondrial sequences associate morphologically dissimilar males and females of the family Phoridae (Diptera). *Biol. J. Linn. Soc.*, 77(2):267–273.

Disney RHL, 1994. Scuttle Flies: The Phoridae. London: Chapman & Hall Press. 1–469.

Disney RHL, 1989. Scuttle flies-Diptera, Phoridae, genus *Megaselia*. Handbooks for the identification of British insects. *R. Entomol. Soc. Lond.*, 10(8):1–155.

Feener DH, Brown BV, 1992. Reduced foraging of *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) in the presence of parasitic *Pseudacteon* spp. (Diptera: Phoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 85(1):80–84.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3(5):294–299.

Gilbert LE, Barr CL, Calixto AA, Cook JL, Drees BM, LeBrun EG, Patrock RJW, Plowes RM, Porter SD, Puckett RT, 2008. Introducing phorid fly parasitoids of red imported fire ant workers from South America to Texas: outcomes vary by region and by *Pseudacteon* species released. *Southwest. Entomol.*, 33(1):15–29.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical

- Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(4):968 – 971.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270(1512):313 – 321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*, 270(Suppl. 1):S96 – S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM, 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.*, 2(10):1657 – 1663.
- Hogg ID, Hebert PDN, 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 82(5):749 – 754.
- Janzen DH, 2004. Now is the time. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B*, 359(1444):731 – 732.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(23):8369 – 8374.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP, 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B*, 360(1462):1925 – 1933.
- Nei M, Kumer S, 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 1 – 348.
- Proudlove G, Wood PJ, 2003. The blind leading the blind: cryptic subterranean species and DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18(6):272 – 273.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4):406 – 425.
- Schindel DE, Miller SE, 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435(7038):17.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6):51 – 701.
- Smith P, Brown B, 2008. Utility of DNA sequences for inferring phylogenetic relationships and associating morphologically dissimilar males and females of the bee-killing flies, genus *Melaloncha* (Diptera: Phoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 101(4):713 – 721.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP, 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature*, 418(6897):479.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP, 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18(2):70 – 74.
- Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR, 2005. Comparative performance of the 16S *rRNA* gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.*, 2(5):1 – 12.
- Wang JF, Qiao GX, 2009. DNA barcoding of genus *Toxoptera* Koch (Hemiptera: Aphididae): identification and molecular phylogeny inferred from mitochondrial COI sequences. *Insect Sci.*, 16(6):475 – 484.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B*, 360(1462):1847 – 1857.
- 李敏, 席丽, 朱卫兵, 卜文俊, 2010. 基于 DNA 条形码的中国普缘蝽属分类研究. *昆虫分类学报*, 32(1):36 – 42.
- 雷富民, 杨岚, 2009. 中国鸟类的 DNA 分类及系统发育研究概述. *动物分类学报*, 34(2):309 – 315.
- 刘广纯, 2001. 中国蚤蝇分类 双翅目: 蚤蝇科(上册). 沈阳: 东北大学出版社. 1 – 292.
- 岳巧云, 冯文军, 王章根, 管维, 刘国雄, 邱德义, 2010. DNA 条形码技术在鉴定蛆症异蚤蝇中的应用. *中国卫生检验杂志*, 20(6):1400 – 1402.
- 诸立新, 吴孝兵, 晏鹏, 2006. 基于 COI 基因部分序列对尾凤蝶属(鳞翅目, 凤蝶科)四种蝴蝶分子系统学关系及相关问题的探讨. *动物分类学报*, 31(1):25 – 30.