

检疫性昆虫 DNA 条形码检测技术的研发与应用实例*

叶兼菱^{1**} 安榆林^{1***} 钱路¹ 杨晓军¹ 徐梅¹
吴翠萍¹ 魏春艳² 牛磊³ 甘英俊⁴

(1. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001; 2. 吉林出入境检验检疫局, 长春 130062;
3. 南京贺林科技有限公司, 南京 210037; 4. 南京林业大学, 南京 210037)

摘要 【目的】DNA 条形码技术是近年来生物分类鉴定的研究热点之一, 已成为植物检疫性昆虫鉴定的有力工具。为快速、准确地鉴定口岸截获的昆虫种类, 实现“检得出、检得准、检得快”的要求, 我们研发了昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术 (Insect DNA barcoding identification kit)。【方法】该检测技术针对出入境植物检疫性及危险性昆虫的主要类群, 选择合适的基因片段、设计引物、对目标基因进行扩增测序, 找出基因片段上区分每个物种的多态位点规律, 作为该物种的鉴定特征并建立数据库, 应用于植物检疫性及危险性昆虫的物种鉴定。【结果】以检疫性昆虫木蠹象属 *Pissodes* 为例, 确定了木蠹象属 5 种昆虫的多态位点规律 (鉴定特征), 构建了用于物种鉴定的数据库。通过比对数据库里的鉴定特征, 将未知样品鉴定为榛梢木蠹象 *P. terminalis* (相似度 100%), 与形态鉴定结果一致。本文介绍了检测技术的原理、方法、技术流程及应用实例, 并展望了其在有害生物检测中的推广应用前景。【结论】昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术为建立标准化, 准确性高的物种鉴定平台打下基础, 有着良好的推广应用前景。

关键词 DNA 条形码, 植物检疫, 多态位点规律, 鉴定特征

Development and application of quarantine insect DNA barcoding technology

YE Jian-Ling^{1**} AN Yu-Lin^{1***} QIAN Lu¹ YANG Xiao-Jun¹ XU Mei¹
WU Cui-Ping¹ WEI Chun-Yan² NIU Lei³ GAN Ying-Jun⁴

(1. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 2. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China; 3. Nanjing Helin Technology Co. Ltd., Nanjing 210037, China; 4. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract 【Objectives】DNA barcoding has been one of the main focuses of insect taxonomic research in recent years and has become a powerful tool for the identification of plant quarantine insects. In order to accurately identify and intercept pest insects at ports of entry, we developed an insect DNA barcoding identification kit (IDK). This kit allows the quick and accurate identification of known, and potential, pest insects. 【Methods】New primers for specific insect genera or groups were designed to improve amplification efficiency. A combination of nucleotide diagnostic sites from molecular sequences of closely related species from the same genera was generated and a database was built specifically for species identification. 【Results】We took quarantine insects *Pissodes* for the example, the combination of nucleotide diagnostic sites (identification characteristics) of 5 *Pissodes* species were generated, and the database was built for species identification. One unidentified sample of *Pissodes* was compared to the identification characteristics stored in the library. Similarity between the query sequence and *P. terminalis* in database is 100%. This identification was confirmed by later morphological examination.

* 资助项目 Supported projects: 国家科技支撑计划项目 (2012BAK11B03); 国家质检总局科研项目 (2012IK278)

**第一作者 First author, E-mail: jianlingshine@msn.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: anyl@jsciq.gov.cn

收稿日期 Received: 2014-04-18, 接受日期 Accepted: 2015-01-25

This paper introduces the principles, technical methods, identification process and application of this new kit, and discusses its prospective benefits for plant quarantine. **[Conclusion]** Insect DNA barcoding identification kit will lay a basis for establishment of standard and accurate species identification platform. It will has a good prospect of application.

Key words DNA barcoding, plant quarantine, combination of nucleotide diagnostic sites, identification characteristic

随着世界经济、贸易一体化进程的加速, 出入境人员及货物逐年递增, 特别是随着进口木材及木质包装量持续增长, 出入境检验检疫机构在口岸截获的危险性林业有害生物的种类和数量逐年递增。在世界各地造成严重危害的森林有害生物, 以及许多潜在的危险性有害生物如大兵压境, 严重威胁我国森林资源及国家生态安全(安榆林等, 2010; 安榆林, 2012)。

有害生物物种的准确鉴定是检验检疫工作中的重要一环。目前植物检疫性昆虫鉴定以形态学方法为主, 传统的形态鉴定存在一定的局限性, 如昆虫的早期形态与残缺虫体难以辨认、鉴定结果受主观影响大、鉴定周期较长等, 在一定程度上影响了口岸检疫工作的准确性和疫情检出率。DNA 条形码技术(DNA barcoding)的发展弥补了传统分类的诸多不足, 为有害生物的分子鉴定提供了新的手段(刘勇等, 2010; 岳巧云等, 2011; 伏建国等, 2012)。DNA 条形码是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的分子诊断新技术, 是近年来生物分类鉴定的研究热点。该技术广泛应用于发现和描述新种或隐存种、物种分子鉴定、系统发育等研究(Hebert *et al.*, 2003a, 2003b; Hebert and Gregory, 2005)。

常用的 DNA 条形码的分析方法有 3 种: 建树法、距离法、特征法(Sarkar *et al.*, 2002; Hebert *et al.*, 2003a; Hebert *et al.*, 2004)。建树法和距离法广受关注, 但也面临一些问题和争议(Hickerson *et al.*, 2006; Trewick, 2008; Yassin *et al.*, 2010)。特征分析法是最新提出的分析方法, 是寻找某分类单元内成员共享、并可以将其与其他分类单元区分开的固定核苷酸位点。一个物种独特的碱基组合可以作为鉴定该种的诊断特征, 类似于经典分类学中的形态特征。特征法在近缘物种的鉴定上有一定优势, 表现出更高的

鉴定效力(Rach *et al.*, 2008; Yassin *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2012; 杨聪慧等, 2013; 邹山梅, 2013; 宋韶彬等, 2014)。

为快速、准确地鉴定口岸植物检疫截获的昆虫, 我们研发了昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术(DNA barcoding identification kit), 将基因片段上的核苷酸多态位点规律作为物种的鉴定特征, 并通过比对数据库进行物种鉴定。本文详细介绍了检测技术的原理、方法、技术流程、应用实例, 并展望了该技术在有害生物检测中的推广应用前景。

1 研发原理

昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术针对我国出入境植物检疫性及危险性昆虫的主要类群, 选择合适的目标基因片段, 设计引物, 提高扩增效率。将目标基因序列上的多态位点规律作为物种的鉴定特征, 为检疫性物种建立身份证, 构建数据库, 应用于检疫性及危险性昆虫的鉴定。通过比对数据库中的鉴定特征, 可以确定未知昆虫样品的分类地位, 并准确地将其与近似种区分开来(图 1)。

常用的昆虫条形码通用引物 LCO1490、HCO2198, Jerry、Pat (Folmer *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1994) 等在部分检疫性昆虫类群中的扩增效率不高, 导致物种无法准确鉴定。针对某属(类)昆虫设计引物(或巢式引物), 可以提高 PCR 扩增效率和测序成功率, 保证该类群的昆虫在不同的实验条件下都能特异性扩增及准确测序, 确保实验的通用性和可重复性。使用新设计的引物尽可能多的对该类群昆虫不同地理种群的个体进行测序, 结合从 Genbank, BOLD 等公开数据库下载的序列, 找出该类群昆虫种内种间均保守的碱基位点, 将这些位点形成的保守碱基

规律作为该类群的鉴定特征；将种内保守，种间变异的多态位点形成的差异碱基规律作为种的鉴定特征。种特有的碱基位点（标记性碱基），是指基因片段上物种特有的多态位点，可用于进一步的分子快速鉴定，如设计特异性引物或探针等。

各物种的鉴定特征及标记性碱基信息储存在数据库中。使用多态位点规律作为种的鉴定特征，将昆虫种间的差异追溯到 DNA 序列上碱基的差异，直观形象。

2 开发昆虫 DNA 条形码试剂盒的方法

昆虫 DNA 条形码试剂盒的研制步骤：筛选目标基因片段、设计引物、生成鉴定特征，构建数据库。

2.1 筛选目标基因片段

选择合适的基因片段是确定鉴定特征的基础。细胞色素 *c* 氧化酶亚基 I（Mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I，CO I）基因是动物通用的物种鉴定标记，相对保守同时有足够的变异，在许多动物类群中得到成功应用（Hebert *et al.*, 2003a）。对昆虫不同类群及不同分类水平可采用不同的基因。常用的基因片段有昆虫线粒体基因 CO I、CO II、12S rRNA、16S rRNA 等以及核基因 ITS2 等（Hebert *et al.*, 2003a；Yeap *et al.*, 2009；张媛等，2011）。例如检疫性昆虫天牛、小蠹、长蠹、实蝇、鳞翅目等普遍采用 CO I 基因（刘殿锋和蒋国芳，2005；常虹等，2012；刘慎思，2012；郑斯竹，2012；李婧，2013），白蚁使用 16S rRNA、CO II 等基因（Yeap *et al.*, 2009）。

2.2 设计引物

引物的扩增产物长度视基因片段类型而定，CO I 基因可以扩增 300~500 bp 的短片段，运用于 DNA 降解严重的标本，短片段更容易扩增和测序，准确性好；对于一些保存时间较长的昆虫标本，可以使用巢氏 PCR 方法，提高扩增效率和特异性（常虹等，2012；郑斯竹，2012）。

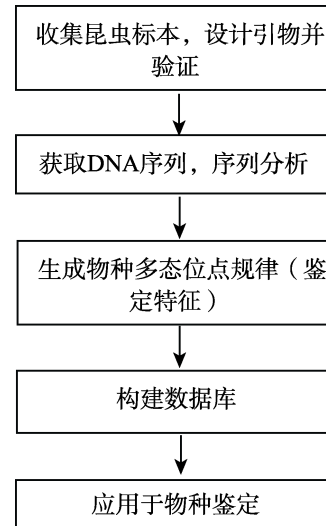


图 1 检测技术的原理

Fig. 1 Principle of identification technology

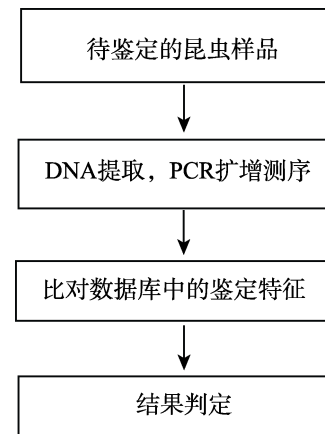


图 2 物种鉴定流程图

Fig. 2 Workflow of species identification

为昆虫特定类群设计引物时，从公开数据库下载序列进行比对分析。使用软件确定新引物的通用性，引物结合的上下游保守区域在目标类群所有序列中都应是保守的。尽可能多的对该类群下物种的 DNA 模板进行 PCR 扩增，确定退火温度范围，说明其通用性和灵敏性。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳成像分析，目的条带应当清晰明亮，没有杂带。对扩增产物纯化测序，得到双向测序峰图文件。为确保测序结果的可靠性，需对测序质量进行评估，去除测序结果两端的低质量序列，序列方向应与 PCR 扩增正向引物方向一致。质量评估以碱基的 Q 值为依据，可以通

过 CodonCode 软件查看 (陈士林, 2012)。需要对所有序列的阅读框架进行确认, 没有出现碱基缺失和插入现象, 能全部翻译成氨基酸序列, 排除线粒体假基因 (Numts) 的干扰。将测序结果进行 BLAST 比对, 证明可以特异性扩增该基因片段。

2.3 生成鉴定特征

使用新设计的引物尽可能多的对该类群昆虫不同地理种群的个体进行扩增测序。对测序得到和公开数据库下载的基因序列进行数据分析, 其中公开数据库的序列经过重新整理, 排除了含简并碱基的序列, 未鉴定到种的序列。去除测序结果两端的低质量序列, 使用 MEGA 软件检验序列是否能正确翻译为蛋白质, 以确保序列的正确性。应用 MEGA 软件包中 CLUSTAL W 软件将序列剪切对齐, 保证长度一致, 种内的序列按照统一格式命名, 然后保存为 Fasta 格式的文件。以 CO I 全序列 (全长 1 545 bp) 为参考序列, 确定多态位点的位置。

我们自行设计了基因条码分析软件 (植物有害生物检疫鉴定系统, <http://58.211.92.14/sysinspect/comparegene.aspx>), 软件能够识别并排除种内的变异位点, 保证生成的多态位点规律的准确性。登陆植物有害生物检疫鉴定系统, 上传比对好的序列文件, 软件会自动输出该昆虫类群的鉴定特征, 各物种的鉴定特征和标记性碱基信息。

2.4 构建数据库

将基因条码分析软件输出的鉴定特征, 标准条码名称, 多态位点的位置, 引物名称, 上传人等信息提交至数据库, 保存在植物有害生物检疫鉴定系统中。数据库主要应用于检疫性昆虫的物种鉴定, 目前以 CO I 序列为主。基本原理是通过基因条码分析软件, 比对数据库中的鉴定特征进行物种准确鉴定。植物有害生物检疫鉴定系统整合了数据库、有害生物的信息检索、辅助鉴定、数字标本库等模块, 并在进一步完善之中。

3 物种鉴定流程

检测技术适用于植物检疫性及危险性昆虫的物种鉴定, 也适合其它物种类群。对数据库范围内的昆虫样品进行鉴定时, 首先采用 DNA 条形码试剂盒提供的引物, 通过 DNA 提取和 PCR 扩增测序, 得到目的基因序列后进行比对分析和结果判定 (图 2)。

(1) DNA 提取

使用常规方法提取待鉴定昆虫样品的 DNA。针对微量或 DNA 模板质量不高的样品, 推荐使用磁珠试剂盒法或基于玻璃纤维膜的 DNA 提取方法 (Ivanova *et al.*, 2006; 2007; 郑斯竹, 2012), 可得到质量较高的 DNA 模板。

(2) 引物扩增和测序

使用试剂盒提供的引物对昆虫样品进行 PCR 扩增和测序, 对双向测序峰图的质量进行评估后, 得到目的基因序列。去除测序结果两端的低质量序列, 序列方向应与 PCR 扩增正向引物方向一致, 保存为 Fasta 格式的文件。

(3) 结果判定

登陆植物有害生物检疫鉴定系统 (<http://58.211.92.14/sysinspect/comparegene.aspx>), 使用基因条码分析软件对查询序列进行分析比对, 通过比对数据库中的鉴定特征, 将符合该类群鉴定特征的且相似度为 100% 的物种判定为该未知种。

操作方法如下: 首页选择“基因条码”模块, 在“输入比对的序列”窗口中黏贴查询序列。点击“比对”, 软件会在数据库范围内比对, 输出物种鉴定结果。也可以指定数据库范围内具体的昆虫类群进行比对, 缩小比对范围, 鉴定到种级水平。在“更多比对结果”里, 可进一步查看有害生物的详细信息 (形态鉴定特征, 生物学信息等)。

4 研究实例

我们以重要林木检疫性昆虫木蠹象属 *Pissodes* 为例, 研制了木蠹象属 DNA 条形码试

剂盒,应用于物种鉴定。使用巢氏引物扩增木蠹象属昆虫 CO I 基因片段 3' 端(769-1 139 位点) 371 bp 的片段。巢氏第 1 轮引物 Jerry、Pat (Simon *et al.*, 1994), 第 2 轮引物 PF46 (5' -ACTATCAATCAAGAACGAGG -3')、PR416 (5' -ACATAATGGAAGTGGGCTAC -3') (自行设计)。琼脂糖电泳检测结果显示目的条带清晰明亮,没有杂带,测序结果经过 Blast 比对结果显示均为目的基因。通过对自行测序得到及 GenBank 下载的木蠹象属 5 个种的 45 条 CO I 序列进行比对分析,确定了木蠹象属昆虫的保守位点规律,属下 5 种昆虫的多态位点规律及标记性碱基信息(图 3, 图 4),构建了数据库。

由图 3, 图 4 可以看出基因条码分析软件在 CO I 基因片段序列(769-1 139 位点, 371 bp) 上共检测到 46 个多态位点和 37 个标记性碱基。这些多态位点形成的规律作为木蠹象属昆虫的鉴定特征,可以根据特征对该属物种进行准确鉴

定。标记性碱基(图 4)的确定为木蠹象属昆虫的分子快速鉴定提供了实验依据。

对木蠹象属昆虫样品进行分子鉴定时,首先使用试剂盒提供的巢氏引物对样品扩增测序。得到双向测序结果后,进行序列拼接并去除两端低质量序列。登陆植物有害生物检疫鉴定系统,选择“基因条码”模块,使用基因条码分析软件将查询序列与数据库中的鉴定特征进行比对,比对结果显示查询序列与数据库中木蠹象属的相似度最高,为 100% (图 5)。进一步的比对结果显示(图 6),查询序列与该属的榛梢木蠹象 *P. terminalis* Hopping 的相似度最高,为 100%。结果显示昆虫样品为榛梢木蠹象,与形态鉴定结果一致。

5 讨论

在昆虫某些类群中,线粒体 DNA 的碱基置换率在同一种内和不同种的个体间差异度很大,

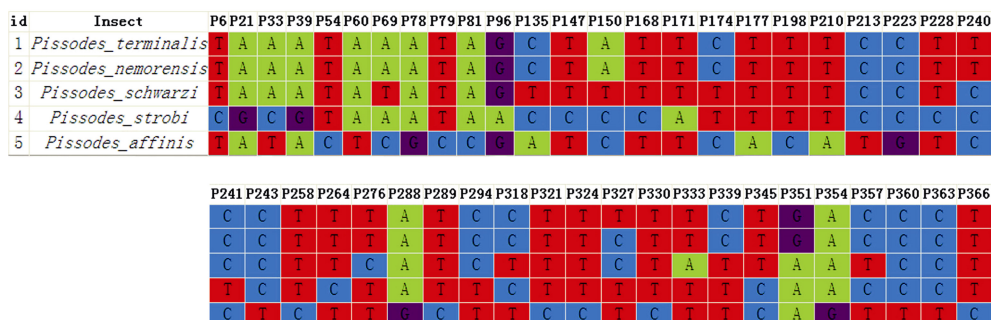


图 3 木蠹象属昆虫的鉴定特征 (CO I 基因片段长度 371 bp)

Fig. 3 The identification characteristics of genus *Pissodes* (the length of CO I fragment is 371 bp)

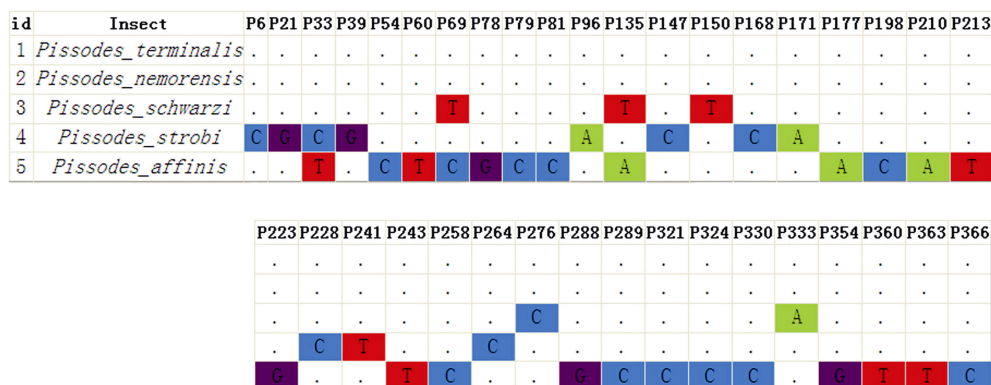


图 4 木蠹象属昆虫的标记性碱基信息 (CO I 基因片段长度 371 bp)

Fig. 4 Species-specific sites of genus *Pissodes* (the length of CO I fragment is 371 bp)



图 5 榛梢木蠹象 *Pissodes terminalis* 在数据库里的比对结果 1
Fig. 5 Comparison results 1 of *Pissodes terminalis* in the database

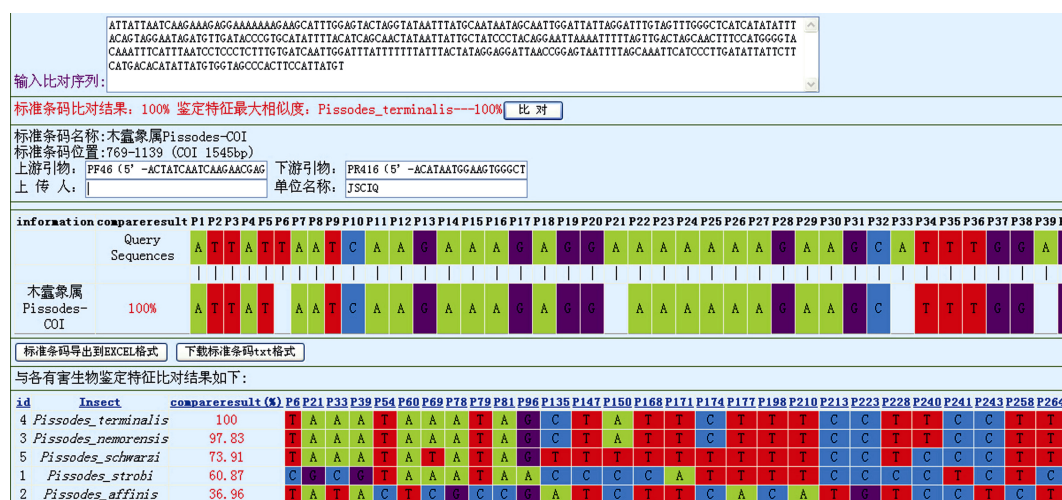


图 6 榛梢木蠹象 *Pissodes terminalis* 的比对结果 2
Fig. 6 Comparison results 2 of *Pissodes terminalis* in the database

导致物种种内种间序列遗传距离出现重叠, 进而影响鉴定的准确性 (肖金花等, 2004; Rubinoff *et al.*, 2006)。有些物种由于进化时间较短, 部分物种表现出较小的种间遗传距离, 在系统进化树上会形成嵌套关系, 不构成单系群。基于核苷酸位点的物种鉴定不依赖于遗传距离和拓扑结构, 通过寻找种内保守、种间变异的多态位点, 将近缘物种清晰的区分开来 (Rach *et al.*, 2008; Yassin *et al.*, 2010; Goldstein and DeSalle, 2010; 杨聪慧等, 2013; 邹山梅, 2013)。昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术为植物检疫性有害生物

鉴定提供了新的解决方法。安榆林等 (2006) 通过实验证明光肩星天牛与其近缘种、外缘种间在序列上存在明显规律性差异, 中国、美国、韩国等不同地理来源的光肩星天牛样品间存在一定的碱基差异。使用多态位点鉴定有望进一步解决地理种、复合种、隐存种等鉴定难题。

针对昆虫科, 属或类群设计 DNA 条形码试剂盒, 可以实现不同分类阶元物种的鉴定。对于包含物种多的昆虫类群 (如种类多的属), 很难收集到该属所有昆虫种类的标本和序列用于研究, 可采取优先针对形态上相近的物种或不同地

区的地理种及不同寄主上的种类设计试剂盒,以缩小数据库的检测范围,提高物种鉴定的准确性和试剂盒的使用效率,达到区分近似种的目的。口岸植物检疫是特殊的预防手段。针对外来危害严重、在国内未发生(或分布未广)的有害生物,形成 DNA 条形码试剂盒,起到“预防为主”的效果。研制试剂盒时,可以充分利用现有公开数据库里的序列信息,收集足够的基础数据,序列需涵盖该类群的大部分常见种,确保数据库用于物种鉴定的准确性。

随着研究的不断深入和数据的积累,数据库将不断补充完善,检测范围将不断扩大,有望应用于植物病原真菌、细菌、病毒、杂草、线虫及软体动物的检疫鉴定。昆虫 DNA 条形码试剂盒检测技术为建立标准化,准确性高的物种鉴定平台打下基础,有着良好的推广应用前景,有利于提高外来有害生物的检出率,有效防范外来有害生物传入,加快通关速度,促进对外贸易健康发展。

参考文献 (References)

- An YL, 2012. Exotic Forest Pests and Quarantine. Beijing: Science Press. 1-695. [安榆林, 2012. 外来森林有害生物检疫. 北京: 科学出版社. 1-695.]
- An YL, Qian L, Xu M, Fu JG, Chen K, Chen NZ, 2010. Analysis and suggestions of intercepted exotic forest pests of China. *Plant Quarantine*, 24(3): 45-49. [安榆林, 钱路, 徐梅, 伏建国, 陈克, 陈乃中, 2010. 外来林木有害生物疫情截获分析与建议. 植物检疫, 24(3): 45-49.]
- An YL, Yang XJ, Lin XJ, Shi LM, Huang XM, Chen JD, 2006. Genetic variation of mtDNA COI in *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) populations. *Scientia Silvae Sinicae*, 42(05): 77-83. [安榆林, 杨晓军, 林晓佳, 师丽敏, 黄晓明, 陈建东, 2006. 光肩星天牛 mtDNA COI 基因遗传差异的研究. 林业科学, 42(05): 77-83.]
- Chen SL, 2012. Molecular Identification of Chinese Materia Medica Using DNA Barcodes. Beijing: People's Medical Publishing House. 1-510. [陈士林, 2012. 中药 DNA 条形码分子鉴定. 北京: 人民卫生出版社. 1-510.]
- Chang H, Hao DJ, Xiao RT, Liu Y, Qian L, An YL, Yang XJ, 2012. DNA barcoding based on the mitochondrial CO I gene sequences for *Ips* species (Coleoptera: Scolytidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(09): 1075-1081. [常虹, 郝德君, 肖荣堂, 刘勇, 钱路, 安榆林, 杨晓军, 2012. 基于线粒体 COI 基因的齿小蠹属昆虫 DNA 条形码研究. 昆虫学报, 55(09): 1075-1081.]
- Folmer O, Black M, Hoeh W, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 3(5): 294-299.
- Fu JG, Yang XJ, Qian L, An YL, 2012. Application of plant DNA barcoding in inspection and quarantine. *Plant Quarantine*, 26(2): 64-69. [伏建国, 杨晓军, 钱路, 安榆林, 2012. 植物 DNA 条形码技术在出入境检验检疫领域的应用. 植物检疫, 26(2): 64-69.]
- Goldstein PZ, DeSalle R., 2010. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33(2): 135-147.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270(1512): 313-321.
- Hebert PDN, Gregory TR, 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5): 852-859.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase I divergence among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270(Suppl. 1): S96-S99.
- 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 *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 101(41): 14812-14817.
- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C, 2006. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Syst. Biol.*, 55(5): 729-739.
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN, 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6(4): 998-1002.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH, Hebert PDN, 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4): 544-548.
- Liu DF, Jiang GF, 2005. The application of nuclear genes sequences in insect molecular systematics. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 30(3): 484-492. [刘殿锋, 蒋国芳, 2005. 核基因序列在昆虫分子系统学上的应用. 动物分类学报, 30(3): 484-492.]
- Li J, 2013. DNA Barcoding of 14 carpenter moth species (Lepidoptera: Cossidae) in China. Master Degree Dissertation. Beijing: Beijing Forestry University. [李婧, 2013. 中国木蠹蛾科 14 种昆虫的 DNA 条形码研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学.]

- Liu SS, 2012. Identification of major Tephritid fruit fly pests based on DNA barcoding. Master Degree Dissertation. Chongqing: Southwestern University. [刘慎思, 2012. DNA 条形码技术在主要实蝇类害虫识别中的应用. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]
- Liu Y, Song L, Li XY, 2010. Application of DNA barcode technology in insect molecular identification based on the mitochondrial COI gene. *Plant Quarantine*, 24(2): 46–50. [刘勇, 宋毓, 李晓宇, 2010. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用. *植物检疫*, (2): 46–50.]
- Neil Sarkar I, Thornton JW, Planet PJ, Figurski DH, Schierwater B, DeSalle R, 2002. An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 24(3): 388–399.
- Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H, 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 275(1632): 237–247.
- Rubinoff D, Cameron S, Will K, 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *J. Hered.*, 97(6): 581–594.
- Sarkar IN, Thornton JW, Planet PJ, Figurski DH, Schierwater B, DeSalle R, 2002. An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24(3): 388–399.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651–701.
- Song SB, Shi ZY, Jin Q, Han HL, Liu XF, Hao MD, Zhang AB, 2014. Species identification of *Noctuidae* moths (Insecta: Lepidoptera) from Baoding and Langfang, Hebei, China with DNA barcoding and establishment of a local DNA barcoding library. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(1): 156–168. [宋韶彬, 石志勇, 金倩, 韩辉林, 刘晓枫, 郝梦迪, 张爱兵, 2014. DNA 条形码技术在河北保定、廊坊地区鳞翅目昆虫上的应用及小型区域数据库的构建. *应用昆虫学报*, 51(1): 156–168.]
- Trewick SA, 2008. DNA barcoding is not enough: mismatch of taxonomy and genealogy in New Zealand grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Cladistics*, 24(2): 240–254.
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: new approach of biological taxonomy. *Acta Zoologica Sinica*, 50(5): 852–855. [肖金花, 肖晖, 黄大卫, 2004. 生物分类学的新动向—DNA 条形码编码 3. *动物学报*, 50(5): 852–855.]
- Yang CH, Jin Q, Chen FQ, Wu AS, Zhang AB, 2013. Application of tree-based, distance-based and character-based DNA barcoding methods for the identification of Crambidae species. (Insecta: Lepidoptera) in Baihuashan, China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(1): 61–70. [杨聪慧, 金倩, 陈付强, 武春生, 张爱兵, 2013. 基于进化树、距离和特征的 DNA 条形码方法研究—以百花山地区草螟科为例. *应用昆虫学报*, 50(1): 61–70.]
- Yassin A, Markow TA, Narechania A, O’Grad PM, DeSalle R, 2010. The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species identification using DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 57(2): 509–517.
- Yeap BK, Othman AS, Lee CY, 2009. Molecular systematics of Coptotermes (Isoptera: Rhinotermitidae) from east Asia and Australia. *Annals of the Entomological Society of America*, 102(6): 1077–1090.
- Yue QY, Qiu DY, Huang YW, Liu GX, 2011. Application of DNA barcoding to species identification of an unknown insect larva. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 21(3): 615–617. [岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 刘国雄, 2011. DNA 条形码技术在未知昆虫幼虫种类鉴定中的应用. *中国卫生检验杂志*, 21(3): 615–617.]
- Zhang Y, Guo XH, Liu GC, Zhang Z, 2011. Application of DNA barcodes to molecular systematics of Coleoptera. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(02): 410–416. [张媛, 郭晓华, 刘广纯, 张卓, 2011. DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用. *应用昆虫学报*, 48(02): 410–416.]
- Zhen SZ, 2012. A study on DNA barcoding and the rapid molecular identification and detection methods of Cerambycidae. Doctoral Degree Dissertation. Nanjing: Nanjing Forestry University. [郑斯竹, 2012. 天牛科基因条形码构建及分子快速鉴定技术研究. 博士学位论文. 南京: 南京林业大学.]
- Zou SM, Li Q, Kong LF, 2012. Monophyly, distance and character-based multigene barcoding reveal extraordinary cryptic diversity in nassarius: A complex and dangerous community. *PLoS ONE*, 7(10): e47276.
- Zou SM, 2013. DNA barcoding and phylogeny of Neogastropoda. PhD Dissertation. Qingdao: Ocean University of China. [邹山梅, 2013. 新腹足目贝类 DNA 条形码系统构建及系统发育研究. 博士学位论文. 青岛: 中国海洋大学.]