

DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学 研究中的应用*

张 媛 郭晓华** 刘广纯 张 卓

(沈阳大学生物与环境工程学院 沈阳 110044)

摘 要 近年来,DNA 条形码(DNA Barcoding)技术已经成为生物分类学研究中备受关注的新型技术,并在鞘翅目昆虫系统发育研究中得到广泛应用。本文总结了鞘翅目昆虫 DNA 条形码研究所用 CO I 基因序列,概述了 DNA 条形码在鞘翅目昆虫的物种分类鉴定、发现新种和隐存种、系统发育关系研究等方面的应用,并对 DNA 条形码研究技术新进展和标准序列筛选需要注意的问题进行了讨论。

关键词 鞘翅目,DNA 条形码,细胞色素 c 氧化酶亚单位 I (CO I 或 *cox1*),分子系统学

Application of DNA barcodes to molecular systematics of Coleoptera

ZHANG Yuan GUO Xiao-Hua** LIU Guang-Chun ZHANG Zhuo

(College of Biological and Environmental Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044, China)

Abstract The DNA barcoding technique has recently been the subject of considerable interest in taxonomy and has been widely applied to the molecular systematics of the Coleoptera. This paper summarizes the Coleopteran COI gene sequence and the application of DNA barcoding in species' identification, discovery of cryptic and new species and phylogenetic analysis of the Coleoptera. Progress in DNA barcode technology and problems in DNA barcode standardization are discussed.

Key words Coleoptera, DNA barcode, cytochrome c oxidase subunit I (CO I / *cox1*), molecular systematics

鞘翅目(Coleoptera)昆虫是自然界中种类最为丰富的昆虫类群,约有 36 万多已知种,占全球昆虫总数的三分之一(Sheffield *et al.*, 2008)。鞘翅目昆虫分类阶元复杂、形态多种多样,给快速、准确分类鉴定带来许多困难。同时,受地理位置、寄主植物种类、不同发育阶段等因素的影响,物种鉴定和系统发育关系模糊不清的现象时有发生。DNA 条形码是鞘翅目昆虫分子系统学研究的重要手段,在提高物种鉴定效率、发现新种和隐存种、研究系统发育和进化关系等方面具有重要应用价值。新型的 DNA 条形码技术将推动应用研究快速的发展,但在基因标准化以及应用方面仍有一些值得关注的问题。

1 鞘翅目昆虫 DNA 条形码的研究概述

2003 年,加拿大 Guelph 大学的 Hebert 教授以鳞翅目昆虫为分析对象,首次提出利用单一基因序列片段区分物种的 DNA 条形码(DNA barcoding)技术,即利用不同物种之间的线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基基因(cytochrome c oxidase subunit I gene, CO I 或 *cox1*, 约 650 bp)的序列差异进行分类鉴定,并对鞘翅目 891 个种的 CO I 进行了序列分析(Hebert *et al.*, 2003b)。大量研究表明,CO I 序列进化速率较慢,在亲缘关系很近的类群之间也存在几个百分比差异,具有很高的物种鉴定可靠性,因此,被选作绝大多数高等动物的标准编码(Hebert *et al.*, 2003a)。随着研究的不断

* 资助项目:辽宁省科技厅农业攻关计划项目(2008214001)。

** 通讯作者, E-mail: zikexi@163.com

收稿日期:2010-05-17, 接受日期:2010-12-20

断深入,CO I 序列作为标准编码的应用已经扩展到鞘翅目多数科,报道较多为步甲科 Carabidae、叶甲科 Chrysomelidae、象甲科 Curculionidae、隐翅虫科 Staphylinidae 等(表 1)。截止到 2010 年 12 月 11 日,鞘翅目昆虫的核苷酸序列总计 98 625 条,用 Coleoptera 和 barcoding 词条搜索时得到 918 条。Coleoptera 与 CO I 搜索时为 2 937 条(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。除序列 CO I 外,鞘翅目

昆虫 DNA 条形码研究涉及的核基因主要包括 28 S rDNA、18 S rDNA、延长因子 1- α (elongation factor-1 α ,EF-1 α)等,涉及线粒体基因主要有 16 S rDNA、12 S rDNA、CO II、wg(无翅基因,wingless)、ND1(NADH 脱氢酶的亚基 1,NADH dehydrogenase subunit 1)等。如 Carabidae 科的 *Carabus* 属 28 S 基因序列为 52 条,wg 为 55 条。

表 1 鞘翅目部分类群 DNA 条形码研究所用的 CO I 序列(来自 GenBank,截止 2010 年 12 月)
Table 1 CO I sequence used in DNA barcoding of partial groups of Coleoptera
(from GenBank, up to December, 2010)

科 Family	涉及的属 The related genus	CO I	科 Family	涉及的属 The related genus	CO I
Carabidae	35	121	Coccinellidae	12	18
Chrysomelidae	30	45	Cryptophagidae	3	6
Curculionidae	23	33	Scirtoidea	3	4
Staphylinidae	57	117	Spercheidae	1	1
Hydrophilidae	7	12	Ptiliidae	2	3
Cantharidae	2	4	Corylophidae	1	2
Brentidae	3	2	Tetratomidae	1	1
Pyrochroidae	1	2	Zopheridae	1	2
Tenebrionidae	4	4	Cucujidae	1	1
Scaptiidae	1	3	Histeridae	3	3
Nitidulidae	3	4	Phalacridae	1	1
Elateridae	5	10	Scydmaenidae	2	2
Mycetophagidae	2	3	Salpingidae	1	1
Monotomidae	3	4	Derodontidae	1	1
Erotylidae	1	1	Endomychidae	2	2
Lucanidae	1	1	Dermestidae	1	1
Cerylonidae	1	4	Silphidae	2	2
Ciidae	1	1	Noteridae	1	1
Latridiidae	3	9	Silvanidae	1	1
Leiodidae	7	52	Helophoridae	1	1
Scarabaeidae	3	3	Anthicidae	1	1
Ptiliidae	1	3	Elateridae	1	2
Melyridae	1	1	Lampyridae	1	1
Dytiscidae	3	14	Anobiidae	1	1

2 DNA 条形码在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用

分子系统学是检测、描述并揭示生物在分子水平上的多样性及其演化规律的科学,研究内容包括分类学、系统发育和分子进化等领域(黄原,1998)。DNA 条形码技术在鞘翅目昆虫分子系统学研究中的应用主要体现在种群分类鉴定、发现新种及隐存种、系统发育与进化关系等方面。

2.1 鞘翅目昆虫分类鉴定

DNA 条形码是分类鉴定的重要补充手段,可以解决鞘翅目昆虫分类阶元划分不清、形态相近鉴定困难、专业人员匮乏等诸多问题(中国科协学会学术部,2010)。

2.1.1 提高已知种的鉴定效率和准确性 目前,应用 DNA 序列研究鞘翅目昆虫分类鉴定涉及科间(Lord *et al.*,2010)、亚科间(Grebennikov and Newton,2009)、族间(Villalba *et al.*,2002)、属间

(郑福山等, 2007)、种间(安榆林等, 2006)和种下(Woodcock *et al.*, 2007)等各级分类阶元,但多数为属间、种间研究。已有研究通过对形态学定义的 3 500 个物种(包括蛾类、蝶类、寄生蝇、寄生蜂等) 100 000 个标本进行 DNA 条形码分类,结果显示,不同标本间没有完全相同的 DNA 条形码,不到 1% 的物种有相似的分类条码,说明利用 DNA 条形码可对昆虫进行准确分类鉴定(Janzen *et al.*, 2009)。付景和张迎春(2006)基于 CO I 序列对瓢虫科 Coccinellidae 4 个亚科 27 种瓢虫进行序列比较,探讨了形态学存在较大争议的高级阶元分类问题。有学者应用 CO I 序列对粪金龟科 *Trypocopris* 属的地理谱系和种群结构进行分析,显示出 CO I 序列分类与形态学亚种分类地位的一致性(Carisio *et al.*, 2004)。王银竹等(2010)基于 CO I 基因对长小蠹科 Platypodidae 研究结果表明,其分子水平的亲缘关系与 Wood(1993)新修订的分类系统基本一致,说明长小蠹科的新分类系统可能更趋于合理。Vogler 和 Welsh(1997)应用 Cytb、CO I、16S rRNA 序列对虎甲属 *Cicindela* 的 DNA 分类与传统形态分类学的差别进行了探讨。Miller(2007)采用 CO II 序列对形态学难以区分的鳃金龟 *Lepidiota frenchi* Blackburn、*L. negatoria* Blackburn、*L. noxia* Britton 之间, *Antitrogus consanguineus* Blackburn 与 *A. rugulosus* Blackburn 之间进行了区分。上述结果说明应用 DNA 条形码可对鞘翅目昆虫种群进行分类鉴定。

2.1.2 鉴定不同发育阶段的物种 在形态不完整、形态分类特征不足、非成体特征描述不详、鉴定不便或不可能分类情况下, DNA 条形码能提供有价值的参考信息,对种群进行分类鉴定。如利用已知的、来自成年样本的 DNA 序列,与形态上难以辨认的、处于未成熟阶段的物种条形码进行比较,建立条形码数据库,以便对不同发育阶段的昆虫进行身份识别。Ahrens 等(2007)分析了金龟子科 Scarabaeidae 幼虫和成虫的线粒体 *cox1*、*rrnL* 基因和核 28 S rRNA 片段,认为 DNA 条形码可作为卵和幼虫分类的有效工具。Greenstone 等(2005)通过对步甲科 Carabidae 的卵、幼虫(或若虫)、蛹与成虫 CO I 序列比较研究,认为利用该基因可对未成熟步甲进行种间鉴定。Mitchell 和 Maddox(2010)结合形态学分类和 DNA 条形码识别,对澳大利亚坚果植物上的外侵害虫小蠹虫亚

科(Curculionidae: Scolytinae)不成熟阶段进行分类研究,显示 DNA 条形码在进行卵、幼虫鉴定时具有优越性。

2.1.3 区分不同生物型 因地理隔离和生态环境影响,不同地理位置的相同种可能产生遗传分化。很多情况下,依据形态特征难以区别种下不同的生物型。DNA 条形码在区分不同生物型种群上具有显著优势。Monaghan 等(2006)联合分析金龟总科 214 个种的 28 S rDNA、*cox1*、*rrnL* 基因,认为不同生物型的种群行为和形态特征因地理环境不同可能会发生变化,地理隔离和生态环境是形成金龟类不同生物型的重要因素。

2.2 发现鞘翅目昆虫的新种和隐存种

在新种记录过程中,应用 DNA 条形码可以快速给样本分群,在一定条件下还可以快速判定样本是否来源已知物种,同时在未知种分类研究中具有优势(Pfenninger *et al.*, 2007),可以解决因特征不明显或形态小带来的鉴定难问题。Maddison(2009)联合分析 28 S rDNA、CO I、CAD 和 *wg* 基因,从美国洛基山脉步甲科 Carabidae 的 *Bembidion aenulum* Hayward 种中发现了 *Bembidion paraenulum* Yoshitake 新种。Yoshitake 等(2008)采用 DNA 条形码 CO I 基因 1 366 bp 序列发现了日本北部象甲科龟象亚科 Ceutorhynchinae 中存在的 *Wagnerinus frugivorus* Yoshitake 新种。Monaghan 等(2007)采用线粒体 *rrnL*、*cox1*、*cyt b* 和 H3 核基因对热带岛屿挖掘甲虫 *Copelatus* 属进行了分类鉴定研究,得出与形态学分类不同的结果,揭示了未知种的存在。说明 DNA 条形码可帮助鉴定未知新种。

鉴定隐存种(cryptic species)和近缘种(siblings species),揭示隐存生物多样性,是 DNA 条形码对分类学的特殊贡献(van Velzen *et al.*, 2007)。许多昆虫群体是由多个隐存种组成的,因其形态极为相似而被视为同一物种。尽管这些群体中的隐存种形态十分相近甚至难以区别,但遗传本质产生了分化,一些行为和生理特征出现差异。依据形态学特征发现形态相似隐存种十分困难(Huang *et al.*, 2007),DNA 条形码是鉴定隐存种的必要手段。Gauthier(2010)采用微卫星序列和线粒体 CO I 序列研究了 18 个国家 37 个地区的小蠹亚科(Coleoptera: Scolytinae) 683 个

Hypothenemus hampei 小蠹样本复合隐存单位,证明在 *H. hampei* 种中存在隐存复合体。Bradford 等(2010)用 CO I 序列作为 DNA 条形码基因研究龙虱科 Dytiscidae 等地下水中的无脊椎动物,揭示了存在的隐存种。

2.3 探讨鞘翅目昆虫的系统发育与进化关系

研究鞘翅目昆虫系统发育关系是 DNA 条形码应用的优势所在。采用基因序列比对和系统发育树构建,可揭示不同群体的系统发育和进化关系。Piau 等(1999)基于 CO I 基因研究了蜉金龟科 Aphodiidae 的 *Aphodius obsurus* 和 *A. immaturus* 的种间亲缘关系。Villalba 等(2002)对金龟甲亚科 Scarabaeinae 33 种不同族的粪金龟 CO I 与 CO II 序列进行分析,阐明了金龟甲亚科内大多数已知族的组成及其合理性。Stanger-Hall 等(2007)基于核基因 18S rDNA 和线粒体基因 16S rDNA、CO I 研究了北美萤科 Lampyridae 的 17 个属 26 个种系统发育关系,显示现行的形态分类大部分不被分子系统研究结果所支持。Garin 等(1999)分析了寄生于 8 种植物的 30 种金叶甲属 *Chrysolina* 甲虫 16S rDNA 和 CO I 序列,构建了该属的系统发育树,得到与形态学和染色体研究较为一致的结论。Scatagliini 等(2005)基于 CO I 序列并结合形态学特征,对象甲科的 *Pantomorus-Naupactus* 复合体中 7 个种的系统发育关系进行研究,认为 *Pantomorus* 属为单系, *Naupactus* 属为并系。Ribera 等(2004)分析了龙虱科 Agabinae 亚科内 350 个种的 16S rRNA 和 CO I 基因序列,对其进化关系进行了研究。本研究小组对金龟总科 Scarabaeoidea 不同种类的 CO I 进行测序及建树分析,显示与形态学一致的亲缘关系(孙娜等,2009)。

DNA 条形码在探讨鞘翅目昆虫系统地理格局(phylogeographic pattern)上具有重要作用。系统地理格局可以反映种群分化的历史和种群现有分布格局。利用 DNA 条形码探讨系统地理格局的形成机制和演化历史,可打破形态学时间和空间的局限,分析不同地域同类种群的分子变化水平,追溯种群分化的历史,构建种群格局与分布。Emerson 和 Oromí(2005)基于 CO I 与 CO II 序列对加那利岛、马德拉群岛、亚速尔群岛的坚甲科 *Tarphius* 属的 29 个种进行分析,结果显示,加那利岛的物种集合年代久远,但物种多样性的形成则

是相对近期的事情。顾杰等(2009)通过 Cyt b 和 CO I 基因对中国海南、喀麦隆、韩国、泰国 4 个不同地理种群的豆象科 Bruchidae 34 个四纹豆象 *Callosobruchus maculatus* 样本单倍型及其分布格局、种群遗传结构进行研究,显示不同种群之间既存在一定的基因交流,也存在一定的遗传分化。Kobayashi 等(2000)对亚洲东部和东南部 8 个地区瓢虫科植食瓢虫 *Epilachna viginti* 种群内 17 个样本的 CO I 基因进行序列分析,显示种团间碱基替换数目为 57 ~ 60,种团内碱基替换数目为 1 ~ 8,说明该种群已经分化成 2 个遗传上不同的种团。Lee 等(2003)分析了来自日本和韩国不同岛屿萤科 *Pyrocoelia rufa* 种 CO I 基因,采用 PAUP 和 PHYLIP 法构建系统树,认为来自不同岛屿的种群已经出现分化,大量山脉是导致种群隔离的重要原因。

昆虫与寄主植物及食性的协同进化关系是 DNA 条形码研究的主要方向之一。在长期的进化历史中,昆虫与寄主植物以及食性之间形成了十分密切的协同关系,如花金龟科 Cetoniidae 的小青花金龟 *Oxycetonia jucunda* 多寄生在植物的花器上。Jurado-Rivera 等(2009)用从昆虫体内分离的叶绿体 *trn-L* 基因序列为 DNA 条形码,分析了叶甲科的 Chrysomelinae 亚科 76 种甲虫与 13 个科寄主植物的进化关系,认为甲虫与寄主植物协同进化普遍具有保守性,但 DNA 条形码分析也支持少数种类甲虫偏离寄主植物的现象,说明 DNA 条形码可有效用于昆虫与寄主植物的相互关系研究。Hunt 等(2007)基于包括 CO I 基因等 3 个基因,研究了代表 80% 鞘翅目 1 900 个种的系统发育和多食性,认为甲虫的丰富度主要源于家系的高度存活率和各种生境条件下的持续分化。

昆虫行为进化是长期的历史演化过程,比较种群分子序列差异可推测种群分化时间。Sole 和 Scholtz(2010)利用 CO I 和两个核基因,并结合化石的研究结论,对金龟亚科 Scarabaeinae 的 Canthonini 族甲虫滚球行为和 Dichotomiini 族甲虫挖掘行为进行了进化研究,认为这两个种群的分化时间约在 56 百万年前。Zhang 和 Sota(2007)比较了步甲科日本 *Leptocarabus* 属的线粒体 CO I 基因和 LWRho(长波视紫红质, long-wavelength rhodopsin)、wg、磷酸核糖激酶基因 PEK、28S rRNA 核基因,推测了种间杂交后可能发生的渐渗杂交

事件,研究了种间系统发育和多态性。

3 DNA 条形码的研究展望

DNA 条形码计划的目标是以便捷、低廉的 DNA 提取、扩增和测序技术为前提,所以,新技术的研发是解决 DNA 条形码应用的关键。用昆虫标本浸出液直接对 DNA 进行扩增和测序,可免去 DNA 提取过程,提高基因的扩增效率 (Shokralla *et al.*, 2010); ABI454、Solexa、SOLID 等新型技术可大大推进 DNA 测序进程 (Frézal and Leblois, 2008); 特异性微型条形码 (minimalist-barcoding) 应用于质量不高的标本能提高鉴定的准确性 (Hajibabaei *et al.*, 2006); 条形码信息芯片研制技术 (Hajibabaei *et al.*, 2007)、基于单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的单分子条形码技术 (Xiao *et al.*, 2007)、硅芯片、尼龙膜等宏阵列技术备受关注 (Summerbell *et al.*, 2005)。

同时, DNA 条形码标准基因筛选过程中仍需要考虑以下问题: (1) 形态学与标准基因的整合和多个标准基因的联合使用。完全脱离形态学的 DNA 分类是没有意义的, 需要形态学与标准基因的联合分析。单一的 CO I 序列不能对所有阶元的物种进行准确鉴定, 增加分析基因的数量是确保准确分类的有效途径 (Moritz and Cicero, 2004)。Caterino 等 (2000) 主张将 18S rDNA、CO I、16S rDNA、EF-1 α 作为昆虫分子系统学研究中的标准序列, 以增加同源序列之间的可比性。(2) 在某些种群出现的核线粒体 (nuclear mitochondrial DNAs, NUMTs) 拷贝现象是否会影响 DNA 条形码的种群分类鉴定 (Lorenz *et al.*, 2005)。NUMTs 又称为核线粒体假基因, 即真核生物主要分类阶元存在的核内无功能的 mtDNA 拷贝。Song 等 (2008) 基于系统发育和 NUMTs 分析, 认为异质 mtDNA 拷贝的共同扩增可导致 DNA 条形码对物种数目的偏高估计, 从而增加 DNA 条形码准确使用的难度。(3) 可遗传的内共生体对线粒体 DNA 结构的影响。母系遗传的共生体可能引起 mtDNA 连锁不平衡, 不同种群 mtDNA 也会由于共生体在种群间的转移形成 mtDNA 单倍型的同质化 (Hurst and Jiggins, 2005)。(4) 确定标准基因序列还需考虑分子钟、基因结构、地理区域的分布等因素的作用 (Hebert *et al.*, 2003a)。

未来的 DNA 条形码研究将继续集中在: (1)

条形码标准基因优化、筛选和标准条码基因数据库建立。研究标准基因的变异规律, 奠定标准基因分类鉴定的理论基础; (2) 研究 DNA 条形码及其数据库应用的新型技术, 解决标准条码基因运用存在的问题。(3) 整合昆虫分子水平、个体水平、群体水平的特征, 研究利用标准条码发现昆虫新种和隐存种的理论和方法, 揭示隐存多样性; (4) 利用标准基因序列构建系统树, 探讨种群亲缘关系、物种分化、生物地理等进化问题, 拓展分子系统学研究的理论体系。

参考文献 (References)

- Ahrens D, Monaghan MT, Vogler AP, 2007. DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44(1): 436—449.
- 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 CO I 基因遗传差异的研究. *林业科学*, 42(15): 77—83.
- Bradford T, Adams M, Humphreys WF, Austin AD, Cooper SJB, 2010. DNA barcoding of stygofauna uncovers cryptic amphipod diversity in a calcrete aquifer in Western Australia's arid zone. *Mol. Ecol. Res.*, 10(1): 41—50.
- Carisio L, Cervella P, Palestini C, DelPero M, Rolando A, 2004. Biogeographical patterns of genetic differentiation in dung beetles of the genus *Trypocopris* (Coleoptera, Geotrupidae) inferred from mtDNA and AFLP analyses. *J. Bioger.*, 31(7): 1149—1162.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH, 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45(1): 1—54.
- Emerson BC, Oromí P, 2005. Diversification of the forest beetle genus *Tarphius* on the Canary Islands, and the evolutionary origins of island endemics. *Evolution*, 59(3): 586—598.
- Frézal L, Leblois R, 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* doi: 10.1016/j.meegid.2008.05.005
- 付景, 张迎春, 2006. 27 种瓢虫 mtDNA—CO I 基因序列分析及系统发育研究 (鞘翅目: 瓢虫科). *昆虫分类学报*, 28(3): 179—186.
- Garin CF, Juan C, Petitpierre E, 1999. MtDNA phylogeny and the evolution of host plant use in palearctic *Chrysolina* leaf beetles. *J. Mol. Evol.*, 48(4): 435—444.
- Gauthier N, 2010. Multiple cryptic genetic units in

- Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae): evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data. *Biol. J. Linn. Soc.* ,101(1):113—129.
- Greenstone MH, Rowley DL, Heimbach U, Lundgren JG, Pfannenstiel RS, Rehner SA, 2005. Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. *Mol. Ecol.* ,14(10):3247—3266.
- Grebennikov VV, Newton AF, 2009. Good-bye Scydmaenidae, or why the ant-like stone beetles should become megadiverse *Staphylinidae sensu latissimo* (Coleoptera). *Eur. J. Entomol.* ,106(2):275—301.
- 顾杰,毛雅琴,王莉萍,许佳君,张愚,杜予州,2009. 四纹豆象不同地理种群的遗传分化. *昆虫学报* ,52(12):1349—1355.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA, 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* ,23(4):167—172.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield J, Hebert PDN, 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes* ,6(4):959—964.
- 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, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B.* ,270(Suppl.):96—99.
- Huang J, Xu Q, Sun ZJ, Tanga GL, Su ZY, 2007. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* ,51(4):301—309.
- 黄原,1998. 分子系统学—原理,方法及应用. 北京:中国农业出版社. 1—372.
- Hunt T, Bergsten J, Levkanicov Z, Papadopoulou A, St. John O, Wild R, Hammond PM, Ahrens D, Balke M, Caterino MS, Gómez-Zurita J, Ribera I, Barraclough TG, Bocakova M, Bocak L, Vogler AP, 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* ,318(5858):1913—1916.
- Hurst GD, Jiggins FM, 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. Biol. Sci.* ,272(1572):1525—1534.
- Janzen DH, Wachs WH, Blandin P, Burns J, Cadiou JM, Chacon I, Dapkey T, Deans AR, Epstein ME, Espinoza B, Franclemont JG, Haber WA, Hajibabae M, Hall JPW, Hebert PDN, 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Mol. Ecol. Res.* ,9(Suppl.1):1—26.
- Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CA, Petitpierre E, Gómez-Zurita J, 2009. DNA barcoding insect-host plant associations. *Proc. Biol. Sci.* 276(1657):639—648.
- Kobayashi N, Shirai Y, Tsurusaki N, Tamura K, Aotsuka T, Katakura H, 2000. Two cryptic species of the phytophagous ladybird beetle *Epilachna vigintioctopunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) detected by analyses of mitochondrial DNA and karyotypes, and crossing experiments. *Zool. Sci.* ,17(8):1159—1166.
- Lee SC, Bae JS, Kim I, Suzuki H, Kim SR, Kim JG, Kim KY, Yang WJ, Lee SM, Sohn HD, Jin BR, 2003. Mitochondrial DNA sequence-based population genetic structure of the firefly, *Pyrocoelia rufa* (Coleoptera: Lampyridae). *Biochem. Genet.* ,41(11/12):427—452.
- Lorenz JG, Jackson WE, Beck JC, Hanner R, 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Philos. Trans. R. Soc. B.* ,360(1462):1869—1877.
- Lord NP, Hartley CS, Lawrence JF, McHugh JV, Whiting MF, Miller KB, 2010. Phylogenetic analysis of the minute brown scavenger beetles (Coleoptera: Latridiidae), and recognition of a new beetle family, Akalyptoischidae fam. n. (Coleoptera: Cucujoidea). *J. Syst. Entomol.* ,35(4):753—763.
- Maddison DR, 2009. A review of the Bembidion (Odontium) aenulum subgroup (Coleoptera: Carabidae), with description of a new species. *Zootaxa* ,2214:45—61.
- Miller SE, 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* ,104(12):4775—4776.
- Mitchell A, Maddox C, 2010. Bark beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) of importance to the Australian macadamia industry: an integrative taxonomic approach to species diagnostics. *Aust. J. Entomol.* ,49(2):104—113.
- Monaghan MT, Balke M, Pons J, Vogler AP, 2006. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific Island radiation. *Proc. R. Soc. B.* ,273(1588):887—893.
- Monaghan MT, Inward DJG, Hunt T, Vogler AP, 2007. A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Mol. Phylogenet. Evol.* ,45(2):674—692.
- Moritz C, Cicero C, 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* ,2(10):1529—1531.
- Pfenninger M, Nowak C, Kley C, Steinke D, Streit B, 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of

- larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Mol. Ecol.*, 16 (9): 1957—1968.
- Piau O, Lumaret JP, de Stordeur E, 1999. Within and among population divergence levels in mtDNA of *Aphodius obsurus* and *A. immaturus* from France. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 35 (Suppl): 117—123.
- Ribera I, Nilsson AN, Vogler AP, 2004. Phylogeny and historical biogeography of Agabinae diving beetles (Coleoptera) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 30(2): 545—562.
- Scatagliini MA, Lanteri AA, Confalonieri VA, 2005. Phylogeny of the *Pantomorus*-*Naupactus* complex based on morphological and molecular data (Coleoptera: Curculionidae). *Cladistics* 21(2): 131—142.
- Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF, 2008. A comparative analysis of mitochondrial genomes in coleoptera (arthropoda: insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Mol. Biol. Evol.* 25(11): 2499—2509.
- Shokralla S, Singer G, Hajibabaei M, 2010. Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol. *Benchmarks*, 48(3): 233—234.
- Sole CL, Scholtz CH, 2010. Did dung beetles arise in Africa? A phylogenetic hypothesis based on five gene regions. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 56(2): 631—641.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA, 2008. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *PNAS*, 105(36): 13486—13491.
- Stanger-Hall KF, Lloyd JE, Hillis DM, 2007. Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): implications for the evolution of light signals. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 45(1): 33—49.
- Summerbell RC, Lévesque CA, Seifert KA, Bovers M, Fell JW, Diaz MR, Boekhout T, de Hoog GS, Stalpers J, Crous PW, 2005. Microcoding: the second step in barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 360 (1462): 1897—1903.
- 孙娜, 郭晓华, 刘广纯, 2009. 金龟子部分种类 CO I 基因序列比较分析. 沈阳农业大学学报, 40(6): 688—692.
- van Velzen R, Bakker FT, van Loon JJA, 2007. DNA barcoding reveals hidden species diversity in Cymothoe (Nymphalidae). *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.*, 18: 95—103.
- Villalba S, Lobo JM, Martín-Piera F, Zardoya R, 2002. Phylogenetic relationships of Iberian dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae): insights on the evolution of nesting behaviour. *Mol. Evol.*, 55(1): 116—126.
- Vogler AP, Welsh A, 1997. Phylogeny of North American *Cicindela* tiger beetles inferred from multiple mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 8(2): 225—235.
- 王银竹, 余道坚, 张润杰, 2010. 基于 mtDNA CO I 基因的十种长小蠹分子系统进化研究(鞘翅目: 长小蠹科). 昆虫学报, 53(4): 457—463.
- Wood SL, 1993. Revision of the genera of Platypodidae (Coleoptera). *Great. Basin. Nat.*, 53(3): 259—281.
- Woodcock MR, Kippenhan MG, Knisley CB, 2007. Molecular genetics of *Cicindela* (*Cylindera*) *terricola* and elevation of *C. lunalonga* to species level, with comments on its conservation status. *Conserv. Genet.*, 8(4): 865—877.
- Xiao M, Gordon MP, Phong A, Ha C, Chan TF, Cai D, Selvin PR, Kwok PY, 2007. Determination of haplotypes from single DNA molecules: a method for single-molecule barcoding. *Hum. Mut.*, 28(9): 913—921.
- Yoshitake H, Kato T, Jinbo U, Ito M, 2008. A new *Wagnerinus* (Coleoptera: Curculionidae) from northern Japan: Description including a DNA barcode. *Zootaxa*, 1740: 15—27.
- Zhang AB, Sota T, 2007. Nuclear gene sequences resolve species phylogeny and mitochondrial introgression in *Leptocarabus* beetles showing trans-species polymorphisms. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 45(2): 534—546.
- 郑福山, 杜予州, 王志杰, 王莉萍, 2007. 基于线粒体 CO I 基因序列的小萤叶甲属部种类分子系统学研究. 昆虫学报, 50(5): 507—507.
- 中国科协学会学术部, 2010. DNA 条形码可以改变人类认知生物物种的方式吗? 新观点新学说学术沙龙文集. 中国科学技术出版社, 北京. 75—78.