线粒体 COI 基因在昆虫 DNA 条形码中的研究与应用*

杨倩倩 李志红** 伍 祎 柳丽君

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘 要 自 2003 年 DNA 条形码(DNA barcodes)概念出现以来,DNA 条形码技术(DNA barcoding)受到生物分类学领域普遍关注,线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(mtDNA COI)被用作动物类群的主要条形码序列,基于该基因片段的昆虫条形码研究在国内外广泛开展。本文在概述 DNA 条形码、条形码技术及已开展的昆虫条形码研究计划的基础上,总结了昆虫 mtDNA COI 条形码及其技术在发现和描述隐种、种类分子鉴定以及系统发育等方面的研究进展,分析了细胞核线粒体假基因(Numts)对 mtDNA COI 条形码扩增的影响,提出检测和避免 Numts 的方法,并对 DNA 条形码技术的进一步研究和应用进行了讨论和展望。

关键词 DNA 条形码,DNA 条形码技术,mtDNA COI,昆虫

Advance and application of mtDNA COI barcodes on insects

YANG Qian-Qian LI Zhi-Hong** WU Yi LIU Li-Jun

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China).

Abstract DNA barcoding has been widely used in taxonomy since the concept appeared in 2003. The mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase I (COI) is regarded as one of the most acceptable molecular markers and insect DNA barcoding research based on this gene has been developed internationally. This paper gives a general introduction to DNA barcodes, DNA barcoding and insect DNA barcode projects. It summarizes research into and the application of insect mtDNA COI barcoding in the description of cryptic species, species molecular identification and phylogenetics. In addition, we analyse the influence of coamplification of Numts with mtDNA COI barcodes, presenting several suggestions on detecting and avoiding Numts. Finally, we discuss future prospects for DNA barcoding.

Key words DNA barcodes, DNA barcoding, mtDNA COI, insect

DNA 条形码(DNA barcodes)是生物基因组中普遍存在的一段短的标准 DNA 序列;基于 DNA 条形码序列分析而形成的技术体系,即 DNA 条形码技术(DNA barcoding)出现在生物分类学的关键时代,成为促进该传统学科复兴的原因之一(Hebert *et al.*, 2003a; Hebert, 2005; Miller, 2007)。近年来,DNA 条形码技术在昆虫学领域研究逐步深入,多项昆虫国际条形码计划先后开展,极大地丰富了昆虫条形码序列信息库。该技术在发现和描述新种或隐种、种类分子鉴定、系统发育等研究中广泛应用。

虽然 DNA 条形码技术应用广泛,但也存在一些技术上的难题,其中最主要是如何避免旁系同源序列的协同扩增(coamplification)。DNA 序列的直系同源性是条形码研究的基本假设,而旁系同源序列的协同扩增将造成 DNA 条形码的错误分析(Hebert *et al.*, 2004)。细胞核线粒体假基因(nuclear mitochondrial pseudogenes, Numts)是线粒体基因旁系同源序列的主要存在形式,也是 COI 基因片段是否适用于条形码研究的争议点之一。本文在综述 DNA 条形码技术研究进展的基础上,分析了 Numts 对 COI 条形码研究的影响,并总结

* 资助项目:国家自然科学基金课题(30971916)。

** 通讯作者,E-mail:lizh@cau.edu.cn

收稿日期:2011-01-25,接受日期:2012-02-20

了有效避免 Numts 扩增的方法，对完善条形码技术的应用具有重要意义。

1 昆虫 mtDNA COⅠ 条形码研究

1.1 DNA 条形码发展与原理

加拿大分类学家 Hebert 等(2003a)首次提出“生物条形码”的概念，通过对动物界 11 门 13 320 个物种的 658 bp 的 COⅠ 基因序列比较分析，认为该序列片段可作为动物 DNA 条形码的基础；随后 Stoeckle(2003)又证明 COⅠ 作为 DNA 条形码不仅在于近似种之间序列位点信息具有足够的差异性，还在于能被通用引物广泛扩增。2004 年，生命条形码委员会(CBOL)提出从目前已被描述的 170 万个物种入手，逐步实现对 100～200 万个未知物种的条形码研究；2009 年 1 月，依照加拿大基因组基金会的国际合作计划框架而建立的国际条形码计划(iBOL)启动，首期目标是 5 年内取得 50 万个物种的 500 万个标本的 DNA 条形码记录。

DNA 条形码可用于绝大多数动物物种的分析，其基本原理在于，假设 DNA 序列改变率为 2% 每百万年，600 bp 的序列中就有 12 个可识别的碱基差异，而多数物种进化历史均超过一百万年，理论上可以完成所有物种的分析和鉴定(Hebert *et al.*, 2003a)。经证实，超过 95% 的被测动物类群具有明显区分的条形码序列(Hebert *et al.*, 2003b; Stoeckle, 2003)。

1.2 BOLD

由加拿大 Guelph 大学开发和维护的生命条形码数据系统(barcode of life database, BOLD)是一个集收录、存储、分析和发布 DNA 条形码记录为一体的信息平台。该数据库收录的条形码物种不仅包括条形码序列，还包括扩增引物、物种名称、标本信息、采集记录、鉴定人和跟踪文件 6 项信息要素(Ratnasingham, 2007)。截止到 2010 年 12 月，该 BOLD 注册的条形码序列达到 1 074 517 条，DNA 条形码正式描述的物种为 92 441 个，其中具有条形码的昆虫已达 30 个目共计 84 410 个物种。

1.3 昆虫 DNA 条形码计划及其进展

DNA 条形码技术在昆虫中的应用范围逐渐扩大，目前国际上明确提出的 DNA 条形码计划有 6 个，分别针对鳞翅目、毛翅目，以及双翅目和膜翅目各 2 个科展开，详细情况见表 1。

此外，涉及昆虫的条形码计划还包括入侵生物 DNA 条形码计划(INBIPS)，主要由政府机构的科研人员组成，进行信息交换和发展全球性 DNA 条形码计划；由欧盟第七框架项目资助的检疫条形码计划(QBOL)，计划在 3 年内构建欧盟指令及欧洲和地中海植物保护组织(EPPO)名录中有害生物的 DNA 条形码库。

1.4 昆虫 mtDNA COⅠ 条形码技术流程

经过国内外昆虫学家探索，目前昆虫 mtDNA COⅠ 条形码技术流程主要包括样本 DNA 的提取、序列扩增、序列检测与分析等。

1.4.1 样本 DNA 的提取 DNA 提取试剂盒的方法使用较为普遍，对于个体微小的样品，传统的 DNA 提取方法如 CATB 法、SDS 法等仍发挥一定优势(刘佳妮等，2009；秦萌，2009)。个体较大的昆虫一般选用线粒体含量丰富的特定组织，需要整头提取的虫体，特别是捕食性昆虫，建议解剖捕食者以获取不受污染的组织碎片(King *et al.*, 2008)。此外，目前样本的无损伤提取已经得以实现，以便提取 DNA 后仍可将样本完整保存或结合形态学研究(李艳伟，2009)。

1.4.2 mtDNA COⅠ 序列的扩增 DNA 条形码研究主要利用 COⅠ 基因序列 5′端位于轻链 1 490 和重链 2 198 之间目的片段(Cywinska, 2006)。目前，扩增昆虫该目的序列常用的 5 对通用引物及其扩增情况如表 2 所示，其中每对引物扩增的高质量序列总量均在 1.5 万条以上，以 LepF1/LepR1 扩增数量最多，扩增高质量序列总量接近 60 万条，该引物对最早由 Hebert 改造 LCO1490/HCO2198 获得，用于鳞翅目扩增。

有些样品可能会带有 PCR 抑制物质而影响扩增效率，如土壤昆虫或肠道中存在的 PCR 抑制物质的样品。可通过加入少量牛血清蛋白、Q-solution(Qiagen，德国)或洗涤样品、稀释 DNA 等方法降低抑制作用(李凯等，2010)。关于高效扩增 COⅠ 条形码的标准化试剂和扩增程序参见加拿大 DNA 条形码研究中心(CCDB, http://dnabarcoding.ca/)操作过程以及文献(Hajibabaei *et al.*, 2005; Ivanova *et al.*, 2006)。

1.4.3 mtDNA COⅠ 序列检测与分析 随着测序技术的发展，600 bp 左右的序列片段可以直接进

表 1　已经开展的昆虫 DNA 条形码计划

Table 1　Launched insect DNA barcoding programs

条形码计划 Barcoding programs	成立年份 Launched year	编码物种目标 Target species	研究进展 Research development		参考网址* Reference website
			编码标本量 Specimens barcoded	编码种数 Species barcoded	
鳞翅目条形码计划 LepBOL	2004	165 000	—	48 676	http://lepbarcoding.org/
毛翅目条形码计划 TrichopteraBOL	2007	1 165	18 645	2 478	http://trichopterabol.org/
蚂蚁条形码计划 FormicidaeBOL	2008	12 205	8 588	796	http://www.formicidaebol.org/
蜜蜂条形码计划 BeeBOL	—	>20 000	6 663	1 533	BOLD
实蝇条形码计划 TBI	2006	2 000	2 277	543	BOLD
蚊子条形码计划 MBI	—	3 200	7 255	529	BOLD

注:* 表示获取研究进展数据的网址,部分来自相应计划的自主网站,其余来自于 BOLD 数据库,数据为截止到 2010 年 12 月;—表示缺少相关信息。

Some of the development data are from independent websites of the programs, the other are from BOLD (http://www.boldsystems.org/views/login.php); data ended up to Dec. 2010; — represents lack of relative information.

表 2　昆虫 mtDNA COI 条形码常用引物

Table 2　Common primers in amplifying insect mtDNA COI barcodes

名称 Name	扩增效率 Ratio			序列 Sequence 5′-3′	适用类群 Taxonomic groups	参考文献 Reference
	高 High	中 Medium	低 Low			
LCO1490 HCO2198	66.08%	17.48%	16.44%	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	各种类群 Various phyla	Folmer *et al.*, 1994
LCO1490-t1 HCO2198-t1	66.05%	12.23%	21.71%	TGTAAAACGACGGCCAGTGGTCAACA AATCATAAAGATATTGG CAGGAAACAGCTATGACTAAACTT CAGGGTGACCAAAAAATCA		
LepF1 LepR1	73.72%	13.21%	13.07%	ATTCAACCAATCATAAAGATATGG TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	昆虫 Insects	Hebert *et al.*, 2004
MLepF1 (LepR1)*	63.78%	14.63%	21.59%	GCTTTCCCACGAATAAATAATA	两栖类 Amphibians	Hajibabaei *et al.*, 2006
MlepR1 (LepF1)*	62.91%	15.63%	21.45%	CCTGTTCCAGCTCCATTTTC		

注:* 表示括号内为组合使用的另一向引物;表格中的扩增效率数据主要依据 BOLD。

Inbrackets is another primer used; ratio was calculated according to data from BOLD (http://www.boldsystems.org/views/primerlist.php).

行 PCR 产物测序，这也使 DNA 条形码技术程序更简便快捷。

序列分析即利用生物信息学软件统计分析序列差异，主要包括基于距离的分析方法（distance based methods）和基于特征的分析方法（character based methods），前者主要包括邻接法、BLAST 搜索或使用软件分析碱基遗传距离等，后者主要包括 DNA 序列中核苷酸的组成、替换与缺失等分析。在分析种以下水平的序列差异时，由于基因距离较小，使用基于特征的分析方法更为可靠（DeSalle *et al.*，2005；Kohler，2007；Rach *et al.*，2008）。

2 昆虫 mtDNA COI 条形码的应用

近年来，除上述已开展的昆虫条形码计划中涉及的类别，DNA 条形码研究在等翅目（Foster *et al.*，2004），鞘翅目（Monaghan *et al.*，2005），蜻蜓目（Rach *et al.*，2008），直翅目（潘程莹等，2006），弹尾目（Hogg and Hebert，2004），蜉蝣目（Ball *et al.*，2005）等中均已开展。就国内外文献报道分析，昆虫 mtDNA COI 条形码的应用主要集中在辅助发现和描述新种和隐种、种类分子鉴定和系统发育研究等方面。

2.1 辅助发现和描述新种和隐种

许多种组中隐种（cryptic species）普遍存在，其形态分类地位模糊，利用 DNA 条形码可以辅助发现隐种，并界定可操作的分类单元（Kohler，2007；Waugh，2007）。昆虫中以鳞翅目研究最为广泛，Hebert 等（2004）对哥斯达黎加的2 500只蝴蝶进行研究，DNA 条形码结合形态学和自然生活史研究揭示了 10 种蝴蝶复合体，尽管一些物种条形码差异相对较小，但依据寄主植物和形态信息共同描述了这个复合体内的物种。该研究作为条形码在发现隐种领域应用的一个示范案例，不仅在鳞翅目大范围开展，其有效性在其他类群中也不断得到验证。

DeWaard 等（2009）利用 DNA 条形码对温哥华夜间活动的鳞翅目昆虫进行研究，发现了 4 个新种和 2 个隐种；Vershinina 和 Lukhtanov（2010）利用 COI 条形码构建系统发育树将灰蝶科的 2 个隐种区分开。膜翅目方面，Smith 等（2008）对 6 个小茧蜂科的2 597个寄生蜂进行条形码研究显示，临时种比形态鉴定的 171 个多出 142 个，同时一种被认为寄生多种弄蝶科幼虫的寄生蜂，实际为 36 个寄生一到几种密切相关弄蝶科物种的临时形态种；May-Itzá 等（2010）对墨西哥和危地马拉 2 个种群的稀有无刺蜂研究，形态特征分析显示其仅有体形大小的差异，基于 DNA 条形码的贝叶斯分析和微卫星位点分析显示 2 个不同地理种群实际为 2 个不同种。半翅目方面，Foottit 等（2009）结合生活史和样品地理变异的评估模式，利用 DNA 条形码 658 bp 的 COI 序列片段对球蚜科的 17 个种的不同形态、未成熟发育阶段和在不同寄主和不同生活周期的样品有效区分，并揭示了分类群内隐存的的多样性。双翅目方面，Smith 等（2006）对寄蝇科 20 个杂食性的形态种（Tachinidae）物种进行鉴定研究，发现 DNA 条形码不仅准确鉴定了 17 种高度寄主专一种，同时发现被认为是泛化种的 3 个种实际为 15 个高度寄主专一性的隐种；2007 年 DNA 条形码又证明 16 种认为泛化种的热带寄蝇并非都是泛化种（Smith *et al.*，2007）。

2.2 种类分子鉴定

相对于形态鉴定的局限性，DNA 条形码用于辅助种水平的物种鉴定具有快速准确的优点，而且 DNA 条形码技术可以对非成虫态、近缘种（sibling species）以及多型性昆虫进行有效识别和鉴定。姜帆等（2011）基于 DNA 条形码对广西南宁地区苦瓜中获取的实蝇幼虫进行分子鉴定，同时检测到瓜实蝇和南瓜实蝇 2 个物种，与当地实蝇监测情况一致；van Velzen 等（2007）认为 DNA 条形码可以有效辅助区分近缘种，对蛱蝶科卵及幼虫准确鉴定；多型现象在许多昆虫类群中均存在，王剑锋和乔格侠（2007）认为 DNA 条形码可以很好地解决蚜虫多型性造成的形态学问题，解决昆虫幼期及多型性昆虫种类鉴定的难题。

就应用领域来分析，昆虫 mtDNA COI 条形码目前已在法医昆虫鉴定以及入侵昆虫鉴定方面得到应用，对于帮助非专业人员经济、快速识别物种具有重要意义。

2.2.1 法医昆虫学上的应用 法医昆虫学主要利用尸体上出现的昆虫，如嗜尸性蝇类的生长发育规律判断死亡时间，而案例中最常收集到的是昆虫的卵、幼虫、蛹或昆虫残体（尹晓宏和王江峰，2010）。利用 DNA 条形码能够为法医学提供鉴定

未知物种的方法,实现快速鉴定,帮助野外犯罪调查。Nelson 等(2007)利用基因 COⅠ条形码序列对澳大利亚 9 种重要法医学和医学 *Chrysoma* 属蝇类的 56 个样本进行研究,利用 K2P 距离模型和邻接法计算序列差异,结果显示 COⅠ条形码序列能够实现对澳大利亚东海岸该属昆虫的鉴定;Dawney 等(2007)验证了 COⅠ条形码基因在法医遗传物种鉴定中的应用,研究表明在 GenBank 等有充分参考序列时,COⅠ可以用作法医遗传物种的分子标记;Boehme 等(2010)利用 DNA 条形码 658 bp 的 COⅠ片段能够对 6 种在腐肉中繁殖的蚤蝇属 *Phoridae* 物种进行有效区分,从而能促进该属昆虫在法医鉴定中的应用。

2.2.2　入侵物种检测与鉴定的应用　随着国际贸易与旅游业的发展以及气候变化等因素的影响,有害生物的传播风险加剧,生物安全已逐渐成为全球关注的重要问题。加强防控物种入侵首先要加强有害生物风险预测与监测,对口岸截获样品的准确快速鉴定是其中一项重要内容。分子鉴定的方法能实现外来有害物种的有效鉴定,DNA 条形码的出现能够很好地应对检疫生物名录不断更新变化,国内国际分子鉴定的方法难以统一化、标准化的问题。Foottit 等(2008)对 13 属 300 种蚜虫研究,证明 DNA 条形码序列能够有效区分其中 96% 的物种,种内的序列差异平均仅为 0.2%,对于入侵蚜虫物种的监测与防控具有重要意义;陈念和赵树进(2009)以毒蛾和果蝇为例综述并讨论了在入侵物种分子鉴定中,DNA 条形码的方法比物种特异性 PCR 或 PCR-RFLP 鉴定方法更具有可操作性,在成本、周期和稳定性方面具有明显的优势,认为 COⅠ条形码是对入侵昆虫准确和灵活鉴定的首选方法。第 27 号植物检疫措施国际标准(ISPM27)提出制定检测和鉴定植物害虫的标准化体系,Floyd 等(2010)认为基于 DNA 条形码技术鉴定自身的优点,同时具有完善的技术体系和通用的高质量标准数据,应纳入政策的制定准则中,另外美国农业部(USDA)和加利福尼亚粮食农业部已采用 DNA 条形码检测浅棕苹果蛾 *Epiphyas postvittana*,并制定了可在线获取的分子检测方法。

2.3　系统发育研究

分子系统学于 20 世纪 80 年代兴起,并于 90 年代广泛应用于昆虫研究。DNA 序列分析法是分子系统学研究中的常用方法,线粒体 COⅠ基因序列是目前研究昆虫系统发育最广泛的分子标记之一(王备新和杨莲芳,2002)。虽然 DNA 条形码提出的目的不是用来揭示系统发育关系(Hebert,2005;Hajibabaei *et al.*,2007),但由于 DNA 条形码所应用的 COⅠ序列片段包含一定的变异速度相对较快的系统发育信息,因而可以用以探讨属级以下的,如亲缘关系密切的种、亚种或种群之间等低级阶元的系统发育关系,对低阶元的系统发育研究具有重要意义(Lunt *et al.*,1996;Zhang and Hewltt,1996)。DNA 条形码区段用于系统发育学研究在多种物种中具有报道(Acs *et al.*,2009;Wang *et al.*,2010;Feng *et al.*,2011)。Smith 等(2005)对马达加斯的蚂蚁进行了个体归类,表明形态学方法一般比基于序列分析的结果更保守,基于 DNA 序列的方法能够产生更大的丰富性和明显更低的相似性;黄华等(2010)以 DNA 条形码 COⅠ序列区段为分子标记,对 11 个不同寄主植物上茶黄硬蓟马进行系统发育研究,序列分析表明,不同寄主上茶黄硬蓟马 mtDNA COⅠ的遗传距离为 0 ~ 0.046 之间,平均遗传距离为 0.012。

3　Numts 对 COⅠ条形码研究的影响及避免方法

在分子进化过程中,线粒体基因旁系同源序列大量存在(Song *et al.*,2008)。DNA 条形码研究利用通用引物从基因组 DNA 中扩增目的片段时可协同扩增相应旁系同源序列,从而造成条形码序列的错误判断和分析。其中由 mtDNA 片段转移到核序列中而形成的细胞核线粒体假基因(Numts)广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物细胞中,是线粒体基因旁系同源序列的主要存在形式(Bensasson *et al.*,2001;Richly and Leister,2004)。Numts 协同扩增的可能性对于 DNA 条形码构成一个严峻的挑战。

3.1　Numts 对 COⅠ条形码研究的影响

昆虫中蝗虫、蚜虫、蓟马、蜜蜂等报道基因组内含有相对较多的 Numts。Pamilo 等(2007)对实蝇、非洲疟蚊、黑粉虫和蜜蜂 4 种昆虫的基因组序列与大量 Numts 序列比对,表明蜜蜂基因组中 Numts 超过 2 000 个,在 4 种昆虫中含量最多,这些 Numts 起源于线粒体基因组中的任意部位,密

度为每 1 kb 核序列中至少有 1.0 bp 为转移入的序列;假基因可能造成错误的鉴定,过高或者过低的估计物种数量(Pamilo *et al.*, 2007);Song 等(2008)针对含有较大数量 Numts 的昆虫类和甲壳类研究 Numts 对条形码序列的影响,实验表明由于大量的 Numts 通常由许多点突变造成,因而不仅具有种或种群水平的特异性,而且在高低分类阶元的 Numts 分布模式亦不相同。在有些物种个体中,通用引物更倾向于扩增 Numts,这是由于 Numts 与祖先序列更相似或者是引物区域与 mtDNA 的差异位点更多;Cai 等(2010)利用通用引物分别从总 DNA,mtDNA 和细胞核 DNA 3 种模板中扩增 COⅠ序列,发现红脂大小蠹中存在大量 COⅠ假基因,Numts 严重影响 COⅠ序列进行种群遗传和系统发育分析。

3.2 检测和避免 Numts 扩增的方法

Numts 序列和目的 mtDNA 序列协同扩增时,多数会造成电泳杂带、测序双峰、背景噪音或模糊等现象而无法获取目的序列,利用这些现象可以初步判断 PCR 产物中 Numts 的存在。另外,Numts 一般含有阅读框内终止密码子、插入缺失或点突变位点等,对获得条形码序列对序列进行分析,通过检测成分偏向性,是否能正确翻译以及与相近种序列比对可以确定序列是否为目的 COⅠ序列(Song *et al.*, 2008)。利用通用引物从基因组 DNA 中扩增 COⅠ序列是 Numts 协同扩增的主要原因(Yuan *et al.*, 1999),可以通过富含线粒体基因的组织中提取 DNA,富集或分离线粒体的方法排除核基因组上 Numts 的干扰(Bensasson *et al.*, 2001);由于 Numts 序列长度一般较短,具有不能表达的特点,扩增较长的片段序列(750 bp)以进行二次 PCR,采用 RT-PCR 技术或设计特异引物对物种进行特异扩增将有效避免这一问题(Hebert *et al.*, 2004; Pereira and Baker, 2004; Moulton *et al.*, 2010)。

4 讨论与展望

4.1 讨论

DNA 条形码取得迅猛发展并对隐种发现和描述、分子鉴定、分子系统学研究等起到了促进作用,然而正如每个新生事物都必然在争议中发展,DNA 条形码技术从提出伊始就有一些学者对该技术持反对态度,激发了众多争议,主要体现在以下 3 个方面。

首先,DNA 条形码是否会取代形态学分类。DNA 条形码不仅不能取代形态学分类,二者亦不会形成冲突,相反 DNA 条形码数据能引导形态数据分析更为仔细(Kohler, 2007)。基因序列辅助鉴定物种具有一定的优势,而仅用 DNA 条形码数据进行分类学研究,如描述新种是远远不够的。显著的 DNA 条形码差异与形态学特征以及生态学等研究相结合才能在物种鉴定中取得最有效的结论,提供新的林奈命名(Will and Rubinoff, 2004)。

其次,COⅠ基因是否适用于所有类群条形码研究。任何单一基因都不可能在所有生物的鉴定中完全通用,即没有完全统一的 DNA 条形码。为适应不同物种分子鉴定的需要,刘勇等(2010)建议将 16S rRNA 和 COⅠ一起作为 DNA 条形码的标记基因。除 16S rRNA 和 COⅠ外,DNA 条形码研究还可以结合其他的基因,如线粒体 Cytb,12S rRNA,ND6 或核基因 18S rRNA,ITS 等。选取多个基因共同用于物种鉴定不仅能丰富分子分析数据,而且能使鉴定与分析更为准确。

第三,mtDNA COⅠ条形码研究中 Numts 协同扩增的问题。Numts 的存在与协同扩增是 DNA 条形码研究中一个不可忽视的问题,研究过程加强对 Numts 的检测和排查是非常有必要的。通过采用多种方法可以很大程度上避免和解决 Numts 的扩增,因而 Numts 不足以否定 DNA 条形码技术的应用前景,大部分物种类群均可利用条形码有效鉴定(Magnacca and Brown, 2010)。

4.2 展望

目前更短更易于获得的微型 DNA 条形码(mini-barcodes)研究已经展开探索,存放年限过久的博物馆标本 DNA 发生降解而不易获取条形码全长,长度约 100 bp 的微型条形码经济有效地解决这问题(Hajibabaei *et al.*, 2006)。研究证明微型条形码也能有效进行物种的鉴定,从而拓展了条形码在生物多样性研究中的应用,为制备条形码芯片中的目标靶序列打下理论基础(Meusnier *et al.*, 2008;范京安等, 2009;Lees *et al.*, 2010),有利于推动研制手持便捷式 DNA 条形码识别仪,不仅在有鉴定需求的部门有重要的使用价值,同

样可在人们的日常生活中普及。

综上所述,随着 DNA 条形码在生物学领域中的广泛开展,DNA 条形码数据信息不断丰富,将有助于开展大规模生物多样性调查,有力地促进分类学发展并对丰富物种多样性有重要意义。

参考文献(References)

Acs Z, Challis R, Bihari P, Blaxter M, Hayward A, 2009. Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palaearctic. *Mol. Phyl. Evol.*, 55(1):210—225.

Ball SL, Hebert PDN, Burian SK, Webb JM, 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *J. North. Am. Benthol. Soc.*, 24(3): 508—524.

Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM, 2001. Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.*, 16(6):314—321.

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

Cai Y, Cheng XY, Duan D, Xu R, 2010. Mitochondrial COⅠ gene transfers to the nuclear genome of *Dendroctonus valens* and its implications. *J. Appl. Entomol.*, 135(4): 302—310.

Cywinska A, 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med. Vet. Entomol.*, 20(4): 413—424.

Dawney N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS, 2007. Valication of the barcoding gene COⅠ for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.*, 173(1):1—6.

DeJesús May-Itzá W, Quezada-Euán JJG, Medina Medina LA, Enríquez E, De la Rúa P, 2010. Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conserv. Genet.*, 11(5):2079—2084.

DeSalle R, Egan MG, Siddall M, 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, 360(1462):1905—1916.

DeWaard JR, Landry J, Schmidt BC, Derhousoff J, McLean JA, Humble LM, 2009. In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. *Biodivers. Conserv.*, 18(4):3825—3839.

Feng Y, Li Q, Kong L, Zheng X, 2011. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial COⅠ and 16S rRNA genes. *Mol. Biol. Rep.*, 38(1):291—299.

Floyd R, Lima J, DeWaard J, Humble L, Hanner R, 2010. Common goals: Policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biol. Invasions*, 12(9):2947—2954.

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.

Foottit RG, Maw HEL, Havill NP, Ahern RG, Montgomery ME, 2009. DNA barcodes to identify species and explore diversity in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Mol. Ecol. Res.*, 9 (Suppl. 1):188—195.

Foottit RG, Maw HEL, Von Dohlen CD, Hebert PDN, 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Mol. Ecol. Res.*, 8 (6):1189—1201.

Foster BT, Cognato AI, Gold RE, 2004. DNA-based identification of the eastern subterranean termite, reticulitermes flavipes (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.*, 97(1):95—101.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS*, 103(4):968—971.

Hajibabaei M, Natalia JRD, Ratnasingham S, Dooh RT, Kirk SL, Mackie PM, Hebert PDN, 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 360(1462):1959—1967.

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, Rosdriguez JJ, 2006. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes*, 6(4):959—964.

Hebert PDN, 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.*, 54(5):852—859.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 270(1512):313—321.

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.

Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 270(Suppl. 1):595—599.

Hogg ID, Hebert PDN, 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 82:549—754.

Ivanova NV, deWaard JR, Hebert PDN, 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Mol. Ecol. Notes*, 6(4):998—1002.

King RA, Read DS, Traugott M, Symondson WOC, 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice forDNA-based approaches. *Mol. Ecol.*, 17(4):947—963.

Kohler F, 2007. From DNA taxonomy tobarcoding-how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Mitt. Mus. Nat. Kd. Berl. Zool. Reihe.*, 83(Suppl.):44—51.

Lees DC, Rougerie R, Lukashort CZ, Kristensen NP, 2010. DNA mini-barcodes in taxonomic assignment: a morphologically unique new homoneurous moth clade from the Indian Himalayas described in *Micropterix* (Lepidoptera: Micropterigidae). *Zool. Scrip.*, 39(6): 642—661.

Lunt DH, Zhang D, Szymura JM, Hewitt GH, 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and consered primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.*, 5(3):153—165.

Magnacca KN, Brown MJ, 2010. Research article Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprosopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evol. Biol.*, 10:174—189.

May-Itzá WJ, Quezada-Euán JJG, Medina Medina LA, Enríquez E, De la Rúa P,2010. Morphometric and genetic differentiation in isolated populations of the endangered Mesoamerican stingless bee *Melipona yucatanica* (Hymenoptera: Apoidea) suggest the existence of a two species complex. *Conserv. Genet.*, 11(5):2079—2084.

Meusnier I, Singer GA, Landry JF, Hickey DA, Hebert PDH, 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 9:214—217.

Miller SE. 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *PNAS*,104(12):4775—4776.

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. B. Biol. Sci.*, 360(1462):1925—1933.

Moulton MJ, Song H, Whiting MF, 2010. Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: a case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta). *Mol. Ecol. Res.*, 10(4):615—627.

Nelson LA, Wallman JF, Dowton M, 2007. Using COⅠ barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med. Vet. Entomol.*, 21(1):44—52.

Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A, 2007. Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Mol. Biol. Evol.*,24(6):1340—1346.

Pereira SL, Baker AJ, 2004. Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (*Gallus gallus*) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics. *BMC Evol. Biol.*, 4:17.

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. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 275(1632):237—247.

Ratnasingham S, 2007. Bold: the barcode of life data system (www. barcodinglife. org). *Mol. Ecol. Notes*, 7(3):355—364.

Richly E, Leister D, 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 21(6):1081—1084.

Smith MA, Fisher BL, Hebert PDN, 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of *Madagascar*. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, 360(1462):1825—1834.

Smith MA, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Deans AR, Janzen DH, Hebert PDN, 2008. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology and collections. *PNAS*,105(34):12359—12364.

Smith MA, Wood DM, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN, 2007. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *PNAS*, 104(12): 4967—4972.

Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes reveal cryptichost-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flie (Diptera: Tachinidae). *PNAS*, 103(10): 3657—3662.

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.

Stoeckle M, 2003. Taxonomy, DNA and the bar code of life.

Bioscience, 53(9):2—3.

van Velzen R, Bakker FT, van Loon JJA, 2007. DNA barcoding reveals hidden species diversity in *Cymothoe* (Nymphalidae). *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.*, 18(1):95—103.

Vershinina AO, Lukhtanov VA, 2010. Geographical distribution of the cryptic species *Agrodiaetus alcestis*, *A. alcestis karacetinae* and *A. demavendi* (Lepidoptera: Lycaenidae) revealed by cytogenetic analysis. *Comp. Cytogenet.*, 4(1):1—10.

Wang ZD, Guo YS, Tan W, Li L, Tang EP, Liu CW, Liu Y, 2010. DNA barcoding, phylogenetic relationships and speciation of snappers (genus *Lutjanus*). *Sci. China Life Sci.*, 53(8):1025—1030.

Waugh J, 2007. DNA barcoding in animal species: progrress, potential and pitfalls. *Biol. Essays*, 29:288—197.

Will KW, Rubinoff D, 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20:17—55.

Yuan JD, Shi JX, Meng GX, An LG, Hu GX, 1999. Nuclear pseudogenes of mitochondrial DNA as a variable part of the human genome. *Cell Res.*, 9(4):281—290.

Zhang DX, Hewltt GM, 1996. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrrial COⅠ primers in insects. *Insect Mol. Biol.*, 6(2):143—150.

陈念, 赵树进, 2009. 入侵种的 DNA 条形码鉴定. 生物技术通讯, 20(1):135—137.

范京安, 顾海丰, 陈世界, 莫帮辉, 温演庆, 何万兴, 刘伟, 曾晓茂, 2009. DNA 条形码识别 VI:基于微型 DNA 条形码的果实蝇物种鉴定. 应用与环境生物学报, 15(2):215—219.

黄华, 牛黎明, 韩冬银, 张方平, 符悦冠, 2010. 不同寄主植物上茶黄硬蓟马 mtDNA COⅠ序列分析. 热带作物学报, 31(6):1009—1013.

姜帆, 刘佳琪, 李志红, 吴佳教, 赵朔, 2011. 基于 DNA 条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究. 植物保护, 37(4):150—153.

李凯, 赵丽亚, 田俊策, 王欢, 叶恭银, 肖君华, 2010. 食物链网络 DNA 跟踪技术研究进展. 植物保护学报, 37(1):83—88.

李艳伟, 2009. DNA 条形码在中国榕小蜂中的应用研究. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学.

刘佳妮, 桂富荣, 李正跃, 沈文武, 2009. 稻飞虱基因组 DNA 提取方法的比较. 云南农业大学学报, 24(1):37—41.

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, 24(2):46—50.

潘程莹, 黄原, 胡婧, 张霞, 2006. 斑腿蝗科 Catantopidae 七种蝗虫线粒体 COⅠ基因的 DNA 条形码研究. 昆虫分类学报, 28(2):103—110.

秦萌, 2009. 四种常见仓储书虱的分子鉴定. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学.

王备新, 杨莲芳, 2002. 线粒体 DNA 序列特点与昆虫系统学研究. 昆虫知识, 39(2):88—92.

王剑锋, 乔格侠, 2007. DNA 条形编码在蚜虫类昆虫中的应用. 动物分类学报, 32(1):153—159.

尹晓宏, 王江峰, 2010. DNA 条形码技术在法医昆虫学中研究进展. 政法学刊, 27(2):97—101.