

北京地区 7 种常见嗜尸性蝇类的 COI 基因 序列分析及 DNA 条形码的建立

陈庆^{1,2}, 白洁^{1,2}, 刘力², 林红斌^{1,3}, 唐晖², 赵伟²,
周红章⁴, 严江伟³, 刘雅诚², 胡松年^{3,*}

(1. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 2. 北京市公安局刑侦总队法医检验鉴定中心, 北京 100085;

3. 中国科学院北京基因组研究所, 北京 100029; 4. 中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 嗜尸性蝇类在命案死亡时间和现场推断方面有着十分重要的应用, 而 DNA 条形码技术能摆脱对虫卵和幼虫的饲养以及后续物种鉴定方面专业知识的依赖, 有助于实现现场采集蝇类样本的快速鉴定。本研究采集了北京地区 7 种嗜尸性蝇类优势种共 77 个个体的样本, 测定了所有个体线粒体 DNA 上细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 基因 1 120 bp 的序列。基于序列的系统发生分析显示, 同一物种不同个体的序列均以高达 99% 的支持值聚集在一起。序列间的分歧统计表明这些蝇类在物种内的个体分歧不超过 1%, 而不同物种间的净分歧均超过 7.74%, 最高可达 14.85%。滑动窗口分析表明, 在整个序列区段种间差异位点存在较平均的分布。通过测定 COI 基因的序列, 建立了北京地区 7 种嗜尸性蝇类优势种的 DNA 条形码, 据此实现了对这些物种准确、快速、简单的区分和鉴定, 同时也为后续应用于物种鉴定的种属特异性位点之筛选提供了基础数据。

关键词: 法医昆虫学; 嗜尸性蝇类; 物种鉴定; 线粒体 COI 基因; DNA 条形码; 北京

中图分类号: D919 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)02-202-08

Sequential analysis of mitochondrial COI gene for seven common sarcosaphagous flies (Diptera) in Beijing and the establishment of their DNA barcodes

CHEN Qing^{1,2}, BAI Jie^{1,2}, LIU Li², LIN Hong-Bin^{1,3}, TANG Hui², ZHAO Wei², ZHOU Hong-Zhang⁴,
YAN Jiang-Wei³, LIU Ya-Cheng², HU Song-Nian^{3,*} (1. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. Forensic Medical Examination and Identification Center, Beijing Public Security Bureau, Beijing 100085, China; 3. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China; 4. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Sarcosaphagous flies have very important applications in death time estimation and crime scene reconstruction for homicide cases. DNA barcoding technology can extricate the investigators from the difficulty of culturing eggs and larvae of these flies as well as the reliance on special knowledge to scientifically identify the following imagoes, which is of great help for rapid identification of fly samples collected at the crime scene. We collected 77 samples, which belong to 7 dominant species of sarcosaphagous flies in Beijing, from different districts, and sequenced a 1 120 bp region of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene for each individual. Phylogenetic analysis showed that individual sequences of each species highly clustered together with 99% bootstrap support. Sequence divergences within species were less than 1%, while net divergences between species were all greater than 7.74%, the highest reaching 14.85%. Sliding window analysis demonstrated that variable sites for all species were relatively equally distributed along the entire region. By sequencing part of the COI gene, we

基金项目: 公安部科技创新项目(20061B0400100113)

作者简介: 陈庆, 男, 1976 年 10 月生, 甘肃兰州人, 硕士研究生, 研究方向为法医昆虫学, E-mail: cq7q7q7q7@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: husn@big.ac.cn

收稿日期 Received: 2008-07-25; 接受日期 Accepted: 2008-12-17

established the DNA barcodes for the seven dominant species of sarcosaphagous flies in Beijing, which realized the accurate, rapid, and easy identification of these species and provided basic material for the future selection of variable sites that can be used for direct identification of sarcosaphagous flies.

Key words: Forensic entomology; sarcosaphagous flies; species identification; mitochondrial COI gene; DNA barcode; Beijing

1996 年北京市公安局与中国科学院动物研究所合作, 对北京地区嗜尸性蝇类展开了系统的研究, 在几年内连续采集了北京不同地区、不同季节(春夏秋)和不同环境下命案尸体周围出现的嗜尸性蝇类的不同虫态, 通过对成虫的固定、幼虫及虫卵的饲养并进行最终的形态学鉴定, 总结出北京地区嗜尸性蝇类优势种涉及 3 科 6 属共 7 种(杨玉璞等, 1998): 红头丽蝇 *Calliphora vicina*、大头金蝇 *Chrysomya megacephala*、丝光绿蝇 *Lucilia sericata*、肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis*、急钩亚麻蝇 *Parasarcophaga portschinskyi* Rohdendorf、棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrina* 和家蝇 *Musca domestica*。

传统物种鉴定工作主要依靠形态学上的特征, 但是用于区分物种的形态学差别很多时候是如此之复杂和细微, 以至于经常仅有少数专家能对一组关系紧密的物种进行准确区分。还有一些物种更多以幼态(juvenile form)形式存在, 而此时它们并不表现出任何物种水平的区分特征, 只有等培养成熟以后(如果可以的话)才能被准确鉴定(Catts and Goff, 1992; Stoeckle, 2003)。作为应用学科的法医昆虫学, 现场发现的蝇卵或蛆虫往往要饲养一段时间后才能进行形态学种属鉴定, 这对于侦破命案而言是极其低效的, 这也是法医昆虫学在实际办案中很难应用的根本原因。

随着 DNA 检测和分析技术的飞速发展, 法医昆虫学领域逐渐尝试着应用各种分子手段对法医昆虫(尤其是嗜尸性蝇类)进行种属鉴定, 如 RFLP、AFLP 以及 DNA 测序等(Sperling *et al.*, 1994; Kakouli-Duarte *et al.*, 2001; Amendt *et al.*, 2004)。近年来, 通过测定某个或者某几个基因的部分序列来进行物种鉴定和区分的 DNA 条形码(DNA barcode)技术在国外得到了迅速的发展和应用(Hebert *et al.*, 2004b; 肖金花等, 2004; Meyer and Paulay, 2005; Savolainen *et al.*, 2005)。使用这一技术可以让非专业人员在很短时间内准确、经济地对目标物种进行鉴定和区分, 大大提高了与物种鉴定有关的学科如分子生态学(Smith *et al.*, 2005; 王剑峰和乔格侠, 2007)、保护生物学(Hebert *et al.*,

2004a)和农业科学(Ward *et al.*, 2005; 屠云洁等, 2007)等的应用效率和实用价值。线粒体 DNA 上的细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(cytochrome oxidase subunit 1, COI)的 100 ~ 650 bp 被证实能对很多动物物种进行高效区分(Hebert *et al.*, 2003; Stoeckle, 2003)。因此, 它也是进行法医昆虫学 DNA barcode 研究的首选分子材料。

本研究即是应用测序技术对前述 1993 年所确定的北京地区常见的 3 科 4 属 7 种嗜尸性蝇类线粒体基因 COI 1 120 bp 的 DNA 序列进行检测, 在通过序列比较对有关个体进行鉴定和区分的同时, 也为后续 DNA barcode 的分析选择和单位点分型研究提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 样本采集

嗜尸性蝇类样本采集自 2006 - 2007 年北京市案发现场尸体周围, 具体地点覆盖顺义(北京东部)、昌平(西)、房山(南)、天通苑(北)、德胜门(中)等 5 个位于不同方向的地区。采集到的成虫样本共计 77 头, 样本采集后浸泡于 95% 的乙醇中, 由中国科学院动物研究所张学忠进行形态学分类鉴定, 鉴定结果为: 红头丽蝇 1 头, 大头金蝇 17 头, 丝光绿蝇 19 头, 肥须亚麻蝇 7 头, 急钩亚麻蝇 1 头, 棕尾别麻蝇 6 头和家蝇 26 头, 详情参见表 1。

1.2 DNA 提取

用德国 QIAGEN 公司的 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒提取上述嗜尸性蝇类的 mtDNA。具体提取方法如下:(1)样本前期处理: 将上述样本用双蒸水漂洗 4 ~ 5 次, 吸水纸吸干后, 分别用消毒剪刀剪去苍蝇头、腹、足及翅, 将留取的苍蝇胸部肌肉放置于液氮中, 用镊子夹取包裹于锡纸中, 迅速用研钵将锡纸内肌肉组织碾成粉末, 分别提取 25 mg 样本粉末置于 1.5 mL 离心管中备用;(2)加入 180 μ L Buffer ATL;(3)加入 20 μ L Proteinase K, 56 $^{\circ}$ C 水浴消化 3 h, 每小时振荡 2 ~ 3 次;(4)轻微离心, 加入 200 μ L AL, 充分混匀, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;(5)加入

200 μL (96% ~100%) 乙醇, 充分混匀, 轻微离心; (6) 转移混合物到 QIAamp spin 中, 8 000 rpm 离心 1 min, 换套管; (7) 加入 500 μL AW1, 8 000 rpm 离心 1 min, 换套管; (8) 加入 500 μL AW2, 14 000 rpm 离心 3 min, 换 1.5 mL 离心管; (9) 加入 200 μL 蒸馏水, 室温静置 5 min, 8 000 rpm 离心 1 min, -20℃ 保存备用。

1.3 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 软件(Primer 公司, 加拿大) 设计 COI 引物, 扩增产物覆盖了 COI 基因 106 bp 到 1 326 bp 的序列。具体引物序列为:
Sense (F): 5'-CGAGCTGAATTAGGACATCCTGG-3' 23 bp
Anti-sense (R): 5'-TCGGTAATCTGAATAACGTCGAGG-3' 24 bp

表 1 嗜尸性蝇类样本采集信息和 COI 基因序列的 GenBank 登录号
Table 1 Collecting data of sarcosaphagous flies in various localities in Beijing and GenBank accession numbers of COI sequence

种类 Species	采集地点 Locality	采集日期 Date (yy-mm-dd)	GenBank 登录号 GenBank accession no.
丽蝇科 Calliphoridae	丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i>	顺义 Shunyi	06-07-09 EU815010 – EU815013
		昌平 Changping	06-07-11 EU815014 – EU815018
		房山 Fangshan	06-08-03 EU815019 – EU815023
		天通苑 Tiantongyuan	07-08-12 EU815024
		天通苑 Tiantongyuan	06-08-13 EU815025 – EU815026
		德胜门 Deshengmeng	07-08-22 EU815027 – EU815028
	红头丽蝇 <i>Calliphora vicina</i>	天通苑 Tiantongyuan	07-09-27 EU814982
	大头金蝇 <i>Chrysomya megacephala</i>	顺义 Shunyi	06-07-09 EU815035 – EU815036
		顺义 Shunyi	07-09-27 EU815037
		昌平 Changping	06-07-11 EU815038 – EU815040
		房山 Fangshan	06-08-03 EU815041 – EU815044
		天通苑 Tiantongyuan	06-08-13 EU815045 – EU815047
		德胜门 Deshengmeng	07-08-22 EU815048
麻蝇科 Sarcophagidae	棕尾别麻蝇 <i>Boettcherisca peregrina</i>	顺义 Shunyi	06-07-09 EU815029
		昌平 Changping	06-07-11 EU815030
		房山 Fangshan	06-08-03 EU815031
		天通苑 Tiantongyuan	06-08-13 EU815032 – EU815034
	肥须亚麻蝇 <i>Parasarcophaga crassipalpis</i>	顺义 Shunyi	06-07-09 EU814975 – EU814976
		昌平 Changping	06-07-11 EU814977 – EU814978
		房山 Fangshan	06-08-03 EU814979 – EU814980
		天通苑 Tiantongyuan	06-08-13 EU814981
	急钩亚麻蝇 <i>Parasarcophaga portschinskyi</i> Rohdendorf	天通苑 Tiantongyuan	07-08-12 EU814983
蝇科 Muscidae	家蝇 <i>Musca domestica</i>	顺义 Shunyi	06-07-09 EU814984 – EU814990
		昌平 Changping	06-07-11 EU814991 – EU814995
		房山 Fangshan	06-08-03 EU814996 – EU814999
		天通苑 Tiantongyuan	07-08-12 EU815000 – EU815007
		德胜门 Deshengmeng	07-08-22 EU815008 – EU815009

1.4 PCR 扩增和测序

PCR 反应体系为 25 μL, 具体包含: 2.5 μL 10

× buffer, 2.5 μL dNTP (2.5 mmol/L), 1.6 μL Mg²⁺ (25 mmol/L), 13.5 μL 双蒸水, 3 μL DNA 模

板, 0.3 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL , 华美公司), 正反引物各 0.8 μL (5 nmol/L)。通过 Perkin2Elmer 9600 扩增仪进行 PCR 扩增。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min, 然后进行 35 次 PCR 循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 55 s, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, PCR 产物保存于 4 $^{\circ}\text{C}$, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, Goldview 核酸染料(EB 替代品)染色。扩增产物用使用 BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing 试剂盒进行正反向测序反应, 按推荐方法操作。使用 ABI 3130 (AB 公司, 美国) 自动测序仪进行测序。

1.5 序列分析

利用 Lasergene v7.2 (Burland, 2000) 的 SeqMan 程序对每一个体正反向测序的结果拼接, 然后使用 MegAlign 程序比对并手工校对同一物种的多个样本序列, 最后通过所有序列的比对和比较确定每一个体可用的区段。在此基础上, 使用 75 bp 和 51 bp 的滑动窗口考察所有序列可变位点的分布情况, 窗口和窗口之间分别取相应窗口长度的 1/3 进行重叠。使用 Mega4 软件 (Tamura *et al.*, 2007) 采用 Kimura 2-parameter 模型 (Kimura, 1980) 和最大组合似然模型 (Maximum Composite Likelihood, MCL) (Tamura *et al.*, 2004) 构建序列间的 UPGMA (Sokal and Sneath, 1963) 和邻接 (Neighbor-Joining) (Saitou and Nei, 1987) 系统发生树, 同时采用 bootstrap 检验 (Felsenstein, 1985) (1 000 次) 计算系统发生树每一分支的支持值。另外, 还使用 Mega4 计算物种内和物种间的分歧情况, 计算采用 Kimura 2-parameter 模型。

2 结果

2.1 序列结果和滑动窗口统计

经过正反向拼接、同物种序列比对和手工校正以及去除低质量区段, 我们得到了最后可供比较分析的高质量序列 77 条, 序列长度分布在 1 076 bp 至 1 155 bp 之间, 平均为 1 105 bp。所有序列提交至 GenBank 得到相应的编号(表 1)。后面的分析以多序列比对的 1 076 bp 公共区段为参照。

通过滑动窗口考察序列可变位点分布的结果见图 1。从图中我们可以看到, 序列间的差异位点在整个研究区段内均有分布且密度差别不大, 位点数随窗口中心的移动有轻微下降趋势。500 bp 附近可变位点数最少, 而 600 ~ 650 bp 附近可变位点数最多。所以, 相比使用部分序列进行比较, 使用序

列整个区段能够包含更丰富的信息。

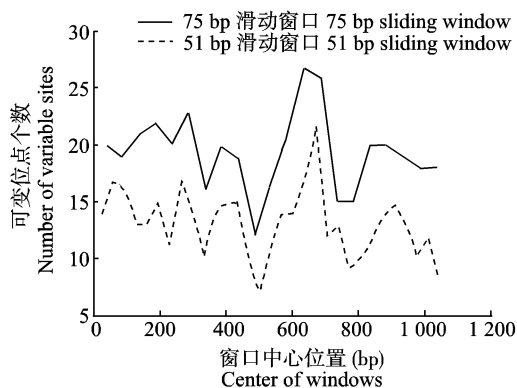


图 1 序列可变位点的滑动窗口分析

Fig. 1 Sliding window analysis of variable sites among all sequences

相邻窗口互相覆盖 1/3 窗口长度。Adjacent windows have an overlap of 1/3 window span.

2.2 系统发生树构建

图 2 是 77 条序列间的 UPGMA 系统发生树。图中分属各物种的个体的聚集趋势十分显著, 相应分支的支持值均超过 99%, 表明同一物种的个体可以同其他物种的个体很好地地区分开。在种间水平, 家蝇同丽蝇科的 3 个物种以及麻蝇科的 3 个物种间的分支支持值分别为 95% 和 92%, 而丽蝇科和麻蝇科内部的分支支持值只有 55% 和 76%。其中肥须亚麻蝇和急钩亚麻蝇同属亚麻蝇属, 但别麻蝇属的棕尾别麻蝇和急钩亚麻蝇表现出更近的距离, 且相应分支仅有 76% 的支持值。

我们将样本序列与一段长 278 bp 的 COI 序列 AY818110 (蔡继峰等, 2005) 的重合区段做了类似的系统发生分析。该重合区段的长度只有 186 bp, 但是得到的系统发生树在物种水平的分支模式与 1 076 bp 全序列的结果一致, 且各物种内的序列仍以 99% 的分支支持值聚集在一起 (数据未展示)。

另外我们选用序列的最大组合似然模型对 1 076 bp 和 186 bp 序列构建 UPGMA 发生树, 结果得到同样的分支模式, 同一物种的序列以 100% 的支持值聚集成簇, 而种间分支的支持值存在略微的变化 (图 2 以及未展示数据)。当采用邻接方法构建发生树时, 大头金蝇对应的簇和家蝇簇接合在一起 (数据未展示)。这一结果和分类学结论存在分歧, 不过上述接合分支的支持值为 90% (对应 1 076 bp 结果), 低于 UPGMA 发生树中大头金蝇和丝光绿蝇簇相接合分支的 95% 支持值。改用 Kimura 2-parameter 模型同样也不影响 NJ 建树方法的结果。

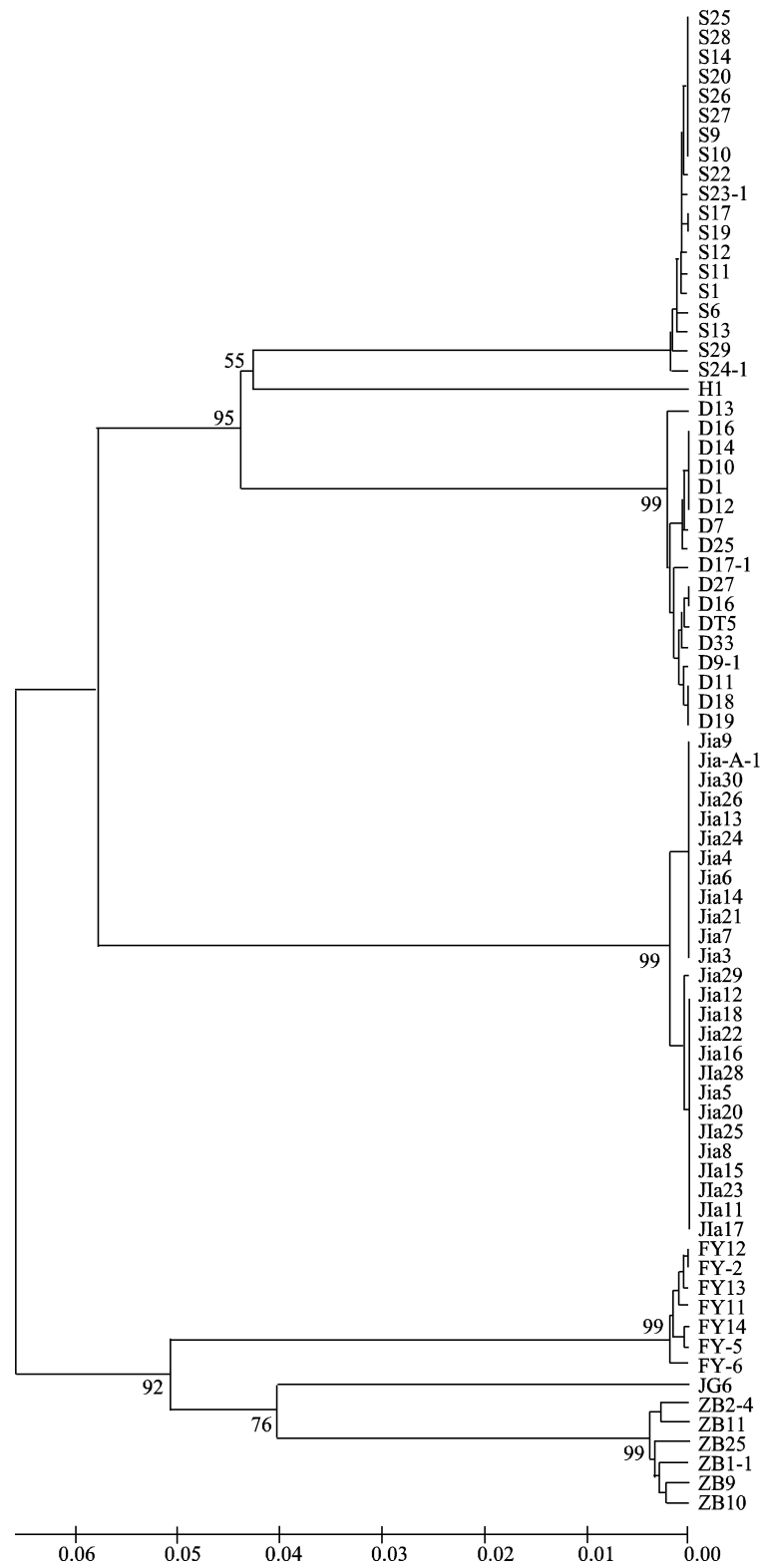


图 2 1 076 bp 序列给出的个体间 UPGMA 系统发生树

Fig. 2 Unrooted UPGMA tree constructed under Kimura 2-parameter model with 1 076 bp sequences

Jia: 家蝇 *Musca domestica*; D (DT): 大头金蝇 *Chrysomya megacephala*; FY: 肥须亚麻蝇 *Parasarcophaga crassipalpis*; JG: 急钩亚麻蝇 *Parasarcophaga portschinskyi* Rohdendorf; ZB: 棕尾别麻蝇 *Boettcherisca peregrine*; H: 红头丽蝇 *Calliphora vicina*; S: 丝光绿蝇 *Lucilia sericata*. 图中的数值为 1 000 次 bootstrap 检验的支持值, 同物种个体序列聚集的支持值均达到 99%。种内序列分支的支持值未予显示。Sequences of same species are highly clustered with a support value of 99%. The number for each interior branch is the bootstrap value, and values within species are not shown.

2.3 序列分歧统计

物种内部和物种间的序列分歧统计见表 2。从表中可以看到, 序列的种内差异为 0.0016(S) 到 0.0069(ZB) 不等, 均未超过 1%。种间差异净值最小出现在 ZB 和 JG 之间, 为 0.0774, 最大值出现在 JIA 和 FY 之间, 达到了 0.1485。此结果和系统发生分析的结论相一致, 种内序列差异较小因而会在所有序列的分析中紧密聚集在一起。

样本采集和测序得到红头丽蝇和急钩亚麻蝇的 DNA 序列仅 1 条。为了在种内序列分歧统计上不影响和其他物种的比较, 我们将这两个 DNA 序列在 GenBank 做了 blastn 比对。其中和红头丽蝇序列 H1 相似性最低的同物种序列为 DQ345096, 达到 99.5%; 序列相似性最高的不同物种序列为 DQ345095(黑丽蝇 *Calliphora pattoni*), 仅为 96.4%。和急钩亚麻蝇的序列 JG6 相似度最高的不同物种序列是 EF405937(酱亚麻蝇 *Sarcophaga dux*), 相似度为 94.4%; 同物种序列未找到。这些结果表明, 虽然红头丽蝇和急钩亚麻蝇的序列分别只有 1 条, 但是我们得到的序列信息足以将它们同其他物种区分开。

表 2 种内和种间序列分歧情况

Table 2 Sequence divergence between and within species

	FY	H	JG	Jia	S	ZB	D
FY	0.0027	0.1232	0.0867	0.1485	0.1113	0.099	0.1131
H	0.1245	NA	0.1304	0.1341	0.0846	0.1326	0.1028
JG	0.0881	0.1304	NA	0.1408	0.1033	0.0774	0.1211
Jia	0.1509	0.1351	0.1418	0.002	0.119	0.1428	0.1069
S	0.1134	0.0854	0.1041	0.1208	0.0016	0.1158	0.0848
ZB	0.1037	0.136	0.0808	0.1472	0.1201	0.0069	0.1291
D	0.1157	0.1041	0.1224	0.1092	0.0869	0.1339	0.0026

种名代码同图 2。对角线为种内序列差异, 下三角为种间差异, 上三角为除开种内差异的种间差异净值。NA 表示仅一条序列。Species code is the same as Fig. 2. Diagonal, lower triangle and upper triangle values are for within-species, between-species and net between-species divergence, respectively. NA means just one sequence and no comparison.

3 讨论

通过进行线粒体 DNA 上 COI 基因 1 076 bp 序列的测定和比较分析, 不同地点采集的不同种类嗜尸性蝇类个体得到了成功的区分, 序列信息的聚集结果和形态学鉴定的种类归属完全一致, 因此本研究得到的各物种的序列完全可以作为 DNA barcode

应用于实际案件的调查。后续实际应用中, 对案件现场采集的嗜尸性蝇类蛆虫或者成虫提取线粒体 DNA 后进行测序, 并与我们的 barcode 序列进行比对, 即可根据序列的分支归属确定其物种。这种方法的推广在保证物种鉴定准确性的同时, 将能大大降低嗜尸性蝇类在法医鉴定中的应用难度。

另一方面, 滑动窗口分析显示可变位点信息基本遍布 COI 基因的整个区段, 同时 186 bp 序列比对分析与全序列给出的区分一致(蔡继峰等, 2005)。基于 COI 基因的可变位点分布特征, 650 bp 甚至更短的片段序列即可达到类似使用全序列时的区分效果(Hajibabaei *et al.*, 2006b), 所以不同引物设计得到的部分区段不论长短, 均可以和本研究给出的长序列进行比较(即读取 barcode 过程), 从而实现有关物种的区分和鉴定。

在使用全序列或部分序列构建的系统发生树中, 同一物种个体序列聚集的同时也有部分物种整体出现在和分类学结果不一致的位置。例如, 同属亚麻蝇属的急钩亚麻蝇与肥须亚麻蝇之间的距离反而比不同属的急钩亚麻蝇与棕尾别麻蝇之间的距离表现的更远。所以虽然应用了很多系统发生的工具, 但在涉及进化树的深度构建时, barcode 并不能代替传统的系统发生分析, 分析 barcode 序列构建的系统发生树不能直接视为相应物种在进化上的系统发生关系, 这和之前的很多研究是一致的(Russo *et al.*, 1996; Zardoya and Meyer, 1996; Hajibabaei *et al.*, 2006a)。

各种 DNA 分子标记, 包括 STR 和 Y 染色体 SNP 等等, 被广泛应用于亲子鉴定和个体识别等领域(李孟华等, 2001; 李生斌等, 2001)。从本质上来讲, 这都是利用了亲缘关系远近决定遗传信息差异的水平。本研究所获得的约 1 100 bp 的序列也可以为筛选用于嗜尸性蝇类物种区分的线粒体 DNA 差异位点提供帮助。通过考察所有嗜尸性蝇类每一物种多个独立个体的序列, 我们很容易确定在线粒体 DNA 某一区段某一物种所特有的突变位点的组合, 从而根据对这些组合位点的分型达到实现区分相应蝇类物种的目的。这样的研究在其他如细菌、水稻等领域已经有一些研究工作(Troesch *et al.*, 1999; 包颖和葛颂, 2003; 李文芬等, 2008), 而在法医昆虫学的研究中此方法具有同样重要的开发价值。对嗜尸性蝇类种类和时间分布的进一步研究、新的基因分型技术的发展以及有关物种线粒体 DNA COI 基因序列的进一步积累, 最终将帮助我们

选择最佳的突变位点组合并由此实现更加便利的嗜尸性蝇类物种的鉴定。

参 考 文 献 (References)

- Amendt J, Krettek R, Zehner R, 2004. Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91(2): 51–65.
- Bao Y, Ge S, 2003. Identification of *Oryza* species with the CD genome based on RFLP analysis of nuclear ribosomal ITS sequences. *Acta Bot. Sin.*, 45(7): 762–765. [包颖, 葛颂, 2003. 根据核 DNA 的 ITS 序列的 RFLP 分析鉴定稻属 CD 染色体组物种. 植物学报, 45(7): 762–765]
- Burland TG, 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol. Biol.*, 132: 71–91.
- Cai JF, Liu M, Ying BW, Dong JG, Deng ZH, Tao T, Pan HF, Zhang HX, Yan HT, Liao ZG, 2005. Sequencing of mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit I for identification of sarcophagous flies (Diptera) in Chengdu. *Acta Entomol. Sin.*, 48(1): 101–106. [蔡继峰, 刘敏, 应斌武, 董建国, 邓振华, 陶涛, 潘洪富, 张红霞, 闫红涛, 廖志钢, 2005. 成都地区四种食尸性蝇类 mtDNA 中 COI 基因序列检测. 昆虫学报, 48(1): 101–106]
- Catts EP, Goff ML, 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 253–272.
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
- Hajibabaei M, Singer GA, Hickey DA, 2006a. Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome*, 49(7): 851–854.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN, 2006b. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes*, 6(4): 959–964.
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(41): 14 812–14 817.
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.*, 270(Suppl. 1): 96–99.
- Hebert PD, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM, 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.*, 2(10): e312.
- Kakouli-Duarte T, Casey DG, Burnell AM, 2001. Development of a diagnostic DNA probe for the fruit flies *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae) using amplified fragment-length polymorphism. *J. Econ. Entomol.*, 94(4): 989–997.
- Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16(2): 111–120.
- Li MH, Wang HS, Zhao SH, Liu B, Chen SL, Li K, 2001. The application DNA molecular markers on animal individual identification and paternity tests. *Biotech. Bull.*, 5: 4–7. [李孟华, 王海生, 赵书红, 刘榜, 陈世林, 李奎, 2001. DNA 分子标记在动物个体识别与亲权鉴定方面的应用. 生物技术通报, 5: 4–7]
- Li SB, Yan CX, Lai JH, 2001. Studies and applications of DNA-based identity test in forensic sciences. *Hereditas (Beijing)*, 23(2): 157–159. [李生斌, 阎春霞, 赖江华, 2001. DNA 鉴定技术在法科学中的应用. 遗传, 23(2): 157–159]
- Li WF, Yu DJ, Yan HM, Li JG, Xu L, Ren LF, 2008. The gene chip detection technique for the Mediterranean fly, *Ceratitis capitata*, and its related species (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 51(1): 61–67. [李文芬, 余道坚, 颜亨梅, 李建光, 徐浪, 任鲁凤, 2008. 地中海实蝇及其近缘种基因芯片检测研究. 昆虫学报, 51(1): 61–67]
- Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.*, 3(12): e422.
- Russo CA, Takezaki N, Nei M, 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol. Biol. Evol.*, 13(3): 525–536.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406–425.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R, 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360(1 462): 1 805–1 811.
- Smith MA, Fisher BL, Hebert PD, 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360(1 462): 1 825–1 834.
- Sokal RR, Sneath PHA. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.
- Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA, 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Foren. Sci.*, 39(2): 418–427.
- Stoeckle M, 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience*, 53(9): 796–797.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8): 1 596–1 599.
- Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(30): 11 030–11 035.
- Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarennes S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, Mabilat C, 1999. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J. Clin. Microbiol.*, 37(1): 49–55.
- Tu YJ, Gao YS, Zhou XM, Zhang XY, Wang KH, Tang XJ, 2007. The genetic diversity analysis of mtDNA COI genes in six indigenous chicken breeds in China. *J. Yangzhou Univ. (Agric. Life Sci. Ed.)*, 28(3): 31–33. [屠云洁, 高玉时, 周新民, 张学余, 王克华, 唐修君, 2007. 我国 6 个地方鸡品种线粒体 COI 基因遗传多样性分析. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 28(3):

31-33]

- Wang JF, Qiao GX, 2007. Application of DNA barcoding to Aphidinea (Insecta, Hemiptera) studies. *Acta Zootaxon. Sin.*, 32(1): 153-159. [王剑峰, 乔格侠, 2007. DNA 条形码在蚜虫类昆虫中的应用. *动物分类学报*, 32(1): 153-159]
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360(1462): 1847-1857.
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW, 2004. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy. *Acta Zool. Sin.*, 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. *动物学报*, 50(5): 852-855]
- Yang YP, Ren JC, Liu L, Li YW, Yan R, Wang XJ, Zhang XZ, 1998. Study on sarcosaphagous flies of Beijing and their applications in forensic identification. *Chin. J. Foren. Med.*, 13(3): 159-162. [杨玉璞, 任嘉诚, 刘力, 李彦文, 阎荣, 汪兴鉴, 张学忠, 1998. 北京地区尸生性蝇类研究及其在法医鉴定中的应用. *中国法医学杂志*, 13(3): 159-162]
- Zardoya R, Meyer A, 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol. Biol. Evol.*, 13(7): 933-942.

(责任编辑: 袁德成)