

ITS 序列的特点及其在昆虫学研究中的应用*

马婷婷^{1,2**} 陈光¹ 刘春香^{2***}

(1. 吉林农业大学生命科学学院 长春 130118;

2. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学国家重点实验室 北京 100101)

摘要 随着 PCR 技术和 DNA 测序技术的成熟及广泛应用,分子数据的分析和利用逐渐成为生物学研究的重要手段。基因组中含有丰富的遗传信息,运用核基因序列或将核基因与线粒体基因序列相结合作为遗传标记,研究昆虫的系统发育,已成为分子系统学领域的发展趋势。由于长度适中、易于扩增、进化速度快、变异性高等优点,核糖体基因中内转录间隔区(ITS)已在昆虫系统学研究中得到广泛的应用。本文介绍了 ITS 序列的结构特点,重点对 ITS 序列在近缘种及种型快速鉴定、属及属上高级阶元系统学研究、谱系生物地理学及与其它基因联合分析昆虫系统进化关系等研究中的应用及前景进行了综述。

关键词 内转录间隔区,分子鉴定,昆虫系统学,谱系生物地理学

Characteristics and application of ITS in Entomology

MA Ting-Ting^{1,2**} CHEN Guang¹ LIU Chun-Xiang^{2***}

(1. College of Life Sciences, Ji Lin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract With the extensive application of PCR technology and DNA sequencing technology, analysis of molecular data has become increasingly important in biological research. That genomic DNA contains rich genetic information renders nuclear markers or combination of nuclear and mitochondrial markers as useful means to study insect phylogeny. For the internal transcribed spacer (ITS) possesses moderate length, fast evolutionary rate, and especially is easy to amplify, it has been widely used as a genetic marker in insect phylogenetic research. In this paper, we briefly introduce its structure and characteristics, summarize its application in rapid identification of closely related species and species status, insect phylogeny at genus or higher levels, and insect phylogeography, and discuss its research prospects.

Key words internal transcribed spacer, molecular identification, insect phylogeny, phylogeography

林奈创立生物分类学至今已有 200 多年的历史,传统的昆虫分类学或系统学研究主要依据昆虫的形态特征、生物性状以及生物地理分布等信息。但昆虫纲物种丰富,某些属、种之间的形态或生理生化差异不显著,仅依据传统的分类方法对其进行鉴定十分困难。另外,利用传统的分类学性状进行进化关系分析存在特征少、特征状态的选取主观性较强等缺点。随着分子生物学技术的迅速发展及其在昆虫分类鉴定及进化关系研究中

的广泛应用,传统系统学研究中存在的问题不断得到解决。近年来,PCR 直接测序方法的建立和广泛使用,极大地推动了核糖体 RNA (rRNA) 的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) 在昆虫近缘种、种型鉴定及系统学研究中的广泛应用。ITS 序列已成为昆虫系统学研究中重要的分子标记。本文重点综述 ITS 序列的特点及其在昆虫学研究中的应用。

* 资助项目:国家自然科学基金项目(31071953)。

**E-mail: matingting1986@126.com

***通讯作者,E-mail: liucx@ioz.ac.cn

收稿日期:2011-01-24,接受日期:2011-04-11

1 ITS 序列的结构及特点

目前,用于系统学研究的基因序列,主要有线粒体 DNA 和 rRNA。核糖核蛋白体(ribosome)简称核糖体,是一个致密的核糖核蛋白颗粒,执行着蛋白质合成功能。核糖体由几十种蛋白质和 rRNA 组成,其中 rRNA 是其主要组成成分,在细胞中含量较高,约占总 RNA 的 80%~85%。在真核生物中 rRNA 分为大小 2 个亚基,大亚基由 28SrRNA、5.8SrRNA 和 5SrRNA 组成,小亚基为 18SrRNA(昊晓华和刘望夷,1996;潘大仁,2007)。编码 18S、5.8S、28S 的 rDNA 作为 1 个转录单元,以中等重复的串联多拷贝形式存在于染色体 DNA

的 1 个或多个位点上,其拷贝数大约在 100~500 之间,总长度约为 7~13 kb。对于大多数真核生物来说,rRNA 基因群的一个重复单位(按 5'→3' 方向)包括 1 个基因间隔区(intergenic spacer, IGS)、1 个 18SrRNA 编码区、1 个内转录间隔区(ITS)和 1 个 28SrRNA 编码区。其中 ITS 区分成 ITS1 和 ITS2,二者之间夹有 5.8SrRNA 编码区。IGS 包括 18SrRNA 上游的外转录间隔区 1(external transcribed spacer 1,ETS1)和 28SrRNA 下游的外转录间隔区 2(external transcribed spacer 2,ETS2),以及二者之间的非转录间隔区(non-transcribed spacer,NTS)(Tautz *et al.*, 1988; 龚志云等,2002; 郜金荣和叶林柏,2007)(图 1)。

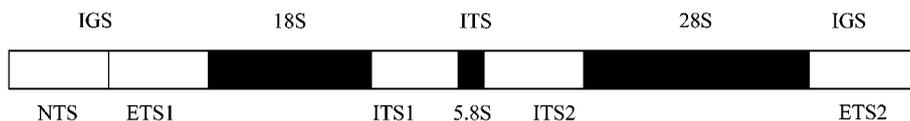


图 1 核糖体 RNA 基因簇结构示意图

Fig. 1 Structure of the ribosomal RNA genes cluster

IGS: 基因间隔区; 18S: 18SrRNA; ITS: 内转录间隔区; 28S: 28SrRNA;

NTS: 非转录间隔区; ETS: 外转录间隔区; 5.8S: 5.8SrRNA。

IGS: intergenic spacer; 18S: 18SrRNA; ITS: internal transcribed spacer; 28S: 28SrRNA;

NTS: non-transcribed spacer; ETS: external transcribed spacer; 5.8S: 5.8SrRNA。

rRNA 结构既具有保守性又具有高变性,其保守性反映生物物种的亲缘关系,高变性则揭示生物物种的变异程度。rRNA 各区的进化速度不同,编码区较保守,其中 18SrRNA 及 28SrRNA 基因序列较长且进化速度较慢,是系统学研究中属以上高级阶元的良好标记。5.8SrRNA 基因分子量小且高度保守,较少用于系统学研究中。而 ITS 和 IGS 不参与 rRNA 成熟过程,进化速度较快,适用于低级阶元的系统学研究。其中 ITS 序列是核糖体 RNA 上的一个非编码区域,它不参与蛋白质的合成,进化速度相对较快,其进化速度大约是 18SrRNA 的 10 倍,其作为一个很重要的分子标签,广泛应用于物种的属内及种间低级阶元的进化关系研究(黄华平等,2006;刘春来等,2007)。

ITS 序列作为一种遗传分子标记,被广泛应用于昆虫研究的各个领域。与形态标记、细胞学标记和生化标记相比,它具有明显的优越性,具体表现为:①中等串联重复的 rRNA 基因簇的多拷贝序列(包括 ITS 序列)高度相似或一致化,为 PCR

产物直接测序及系统进化关系分析提供了可能;②在 ITS 序列两侧的 18S、5.8S 和 28S rRNA 的序列相当保守,这些保守序列便于设计通用引物,可广泛地对物种进行 PCR 扩增和测序(刘伟等,1998);③在昆虫中 ITS 序列长度适中,一般为 1.0~1.5 kb,含有足够的遗传信息;④ ITS 序列是中等重复的多拷贝基因,仅需很少的标本量就能达到分析鉴定的要求;⑤ ITS 序列并不承担编码蛋白质的功能,也不参与核糖体的形成,承受的选择压力较小,进化速度相对较快,能够积累更多的变异,同时 ITS 拥有明显的序列长度多态性,能广泛的应用于同属近缘种及种内的进化关系研究(许超德和李绍兰,2004);⑥ ITS 序列变异以点突变为,变异位点相互独立,便于对变异位点进行的研究;⑦在真核生物中 ITS2 二级结构的核心区域具有高度的保守性,在研究物种的起源及高级阶元的系统进化关系中起着很重要的作用(Coleman, 2009)。

2 ITS 序列在昆虫研究中的应用

2.1 在近缘种及种型快速鉴定中的应用

长期以来,一些重要农林害虫的分类鉴定都以形态特征作为主要的分类依据。对于这些害虫种类及种型的准确鉴定,有利于对其进行防治和抗药性研究。但是由于这些物种中存在着复合体及亲缘种,仅依靠形态分类学很难进行鉴定。ITS 重复元件(repeated element)在不同的近缘种中拷贝数目不同,且在不同的近缘种中易产生插入或缺失,从而导致 ITS 序列在不同的近缘种之间存在着长度的差异(Scott *et al.*, 1993; Mukha *et al.*, 2002)。这种差异为形态上不易区分的近缘种及种型的快速鉴定提供了依据。

在近缘种的快速鉴定方面:如 Baffi 和 Ceron (2002)对果蝇属的 2 个姐妹种(*Drosophila mulleri* 和 *D. arizonae*)进行研究,发现前者 ITS1 片段长度为 600 bp,后者为 500 bp,并且它们的杂交体可表现出 2 种片段长度,揭示了 ITS 序列长度差异在姐妹种群研究中的可行性。管维等(2006)对斑潜蝇 ITS1 序列进行分析,设计出 2 条新的特异性引物并筛选到 2 个特异性内切酶,通过 PCR 产物的酶切分析,可区分三叶草斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* 与美洲斑潜蝇 *L. sativae* 这 2 种亲缘关系较近的昆虫。刘玉娣等(2009)应用分子鉴定方法对褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、白背飞虱 *Sogatella furcifera* 和灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 进行了研究,显示 ITS2 序列在这 3 个物种中表现出较大差异,其特异性引物为 3 种稻飞虱在特殊情况下的快速鉴别提供了有效的工具。

在种型鉴定方面:周水森等(2002)比较了我国云南省、海南省、广西壮族自治区及泰国等不同地区微小按蚊 *Anopheles minimus* 的 ITS2 序列,发现除云南元江地区为微小按蚊 C 型,其余地区均为微小按蚊 A 型,说明我国的微小按蚊同样存在复合体亲缘种问题。武松等(2008)选用 ITS2 序列对多斑按蚊复合体 *A. maculatus complex* 的种型进行鉴定,发现 PCR 种型鉴定结果与同源性比对及系统进化树的结果一致,揭示西藏林芝地区多斑按蚊复合体由伪威氏按蚊 *A. pseudowillmori* 和威氏按蚊 *A. willmori* 构成,且伪威氏按蚊为优势蚊种。

2.2 在高级阶元系统学研究中的应用

ITS 序列不编码蛋白质也不参与核糖体的形成,进化速度相对较快,除应用于近缘种及种型的研究中,也广泛应用于属级阶元的系统进化关系的研究。赤眼蜂属(*Trichogramma*)是赤眼蜂科的模式属,该属中的物种是很多农业害虫的天敌昆虫,利用其进行生物防治已成为非常有效的手段。李正西和沈佐锐(2002)利用 ITS2 序列对赤眼蜂属 5 个种进行了研究,表明 ITS2 在赤眼蜂属不同种之间表现出一定的序列保守性(60% ~ 75%),变异率适中,并且发现食胚赤眼蜂 *T. embryophagum* 与其他赤眼蜂属种类亲缘关系较远,而松毛虫赤眼蜂 *T. dendrolimi*、拟澳洲赤眼蜂 *T. confusum*、广赤眼蜂 *T. evanescen* 和甘蓝夜蛾赤眼蜂 *T. brassica* 共同形成一个分支(clade),亲缘关系较近。可以看出,ITS2 是研究该属分类鉴定的良好靶标序列。

另外 ITS 序列也应用于属上阶元的系统学研究,如 Pitts 等(2010)获得了北美蚁蜂亚科中几个夜行性蚁蜂属约 2 600 bp 的 ITS 序列,基于该序列并应用贝叶斯算法进行系统进化分析,得到了支持率较高(bootstrap 值 > 95%)的进化树,有利地支持了新北夜行性蚁蜂属 *Sphaerophthalminae* 的单系性,并发现新近纪的造山运动或者更新世冰期活动造就了北美蚁蜂的分化模式。

2.3 在谱系生物地理学研究中的应用

谱系生物地理学(phylogeography)从系统进化角度来探讨基因谱系地理格局的历史演化以及形成的原理和过程。其主要用于揭示隐存种、评价基因流、分析生物地理分布格局、辨别入侵物种的地理来源等等(冯贤等 2008)。目前线粒体 DNA、ITS 及微卫星(microsatellite)是用于昆虫谱系生物地理学研究中最频繁的分子标记。其中 ITS 序列进化速度快、变异率高,可作为一个优良的分子标记,已广泛用于多个物种的谱系生物地理学研究(Rokas *et al.*, 2002; De la Rúa *et al.*, 2007b; Pereira *et al.*, 2009)。

Cruz 等(2006)对巴西东北地区无刺蜜蜂 *Melipona subnitida* 13 个地理种群的 ITS1 序列进行了研究。结果表明该种 ITS1 序列差异范围在 1.1% ~ 18% 之间,可以用于该种的谱系生物地理学研究;这种 ITS 序列差异的原因是该种古老的起

源及长时期的地理隔离;并推断是由于气候差异及资源利用量等生态因素导致了这种地理隔离,造成了该物种种群间基因交流频率较低,使各种种群间形成独立进化。

郑福山等(2007)基于对 ITS1 部分序列的分析,初步探讨了我国菱角萤叶甲 *Galerucella birmanica* 6 个地理种群间的遗传关系。研究结果表明,菱角萤叶甲的 6 个地理种群间虽存在一定程度的遗传分化,但分化程度较低;从聚类分析结果推断出菱角萤叶甲的 6 个地理种群可分为 3 个分支;初步反映了种群间遗传关系与生物地理分布格局之间的关系,表明菱角萤叶甲 6 个地理种群间的遗传分化与寄主和地理距离之间具有较高的相关性。

白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 即亚洲虎蚊,是一种重要的病媒生物,能够传播多种病毒,是全球最具侵袭性的蚊种,广布于温带地区。De Jong 等(2009)根据 ITS2 序列的长度差异,对入侵法国科西嘉岛的蚊虫进行鉴定,确定其为亚洲虎蚊,来源于欧洲温带地区,同时也对该种群的地理分布做了初步分析和预测。该研究指出谱系生物地理学研究可为追溯外来物种的起源及预测其分布提供重要的依据。

2.4 与其它基因联合在昆虫研究中的应用

目前在对一些物种的研究中,仅依据 ITS 序列并不能全面地解释物种的系统进化关系。如 De la Rúa 等(2007a)在对蜜蜂 *Apis mellifera* 10 个亚种 ITS1 序列的研究中发现,该序列在其中 8 个亚种中是相同的,仅在分布于南非和北非的 2 个亚种中存在差异,但其它研究(De La Rúa *et al.*, 2005)发现,对于该种的种内系统进化研究,线粒体基因是更合适的遗传标记。类似的情况在其它研究也有报道。如 Szalanski 等(2008)报道的一种重要医学害虫—温带臭虫 *Cimex lectularius* 和 Barr 等(2009)报道的一种体外寄生蜂—亮腹釉小蜂 *Tamarixia radiata* 中,由于种内的不同地理种群间频繁的基因交流,导致 ITS 在种群间无序列差异,使其不能作为有效的分子标记来进行系统进化关系研究。

由于单个序列的变异程度的局限性,一些学者将 ITS 序列与其它遗传标记联合,共同用于昆虫的系统进化关系研究(Hamarshah *et al.*, 2009;

Blandón-Naranjo *et al.*, 2010)。这种多个序列联合分析的方法有利于将系统进化关系研究与物种鉴定结合起来,能确切地鉴定隐存种的存在,更有利于分析物种间的系统进化关系。如 Jenkins 等(2007)在对亚洲地下白蚁 *Coptotermes gestroi* 的谱系生物地理学的研究中,将 ITS1 序列与线粒体 16SrRNA 和 COII 基因进行联合分析,揭示了该白蚁在一些地区的入侵来源,并指出 ITS1 序列虽然在种内无差异,但在该属的不同种间存在着差异,可作为一种研究选择压力如何作用于 DNA 序列的遗传标记。Dorn 等(2009)在对墨西哥和危地马拉的锥猎蝽 *Triatoma dimidiata* 的研究中应用 ITS2 和 Cytb 相结合,在进行系统进化关系分析的基础上,发现该种在当地存在着 2 个同域分布的隐存种。Turner 等(2010)对巢蛾属(*Yponomeuta*)的 20 多个种进行了 ITS1 序列、16SrRNA 及 COII 基因的联合序列分析,支持日本地区的 *Y. sedellus*、*Y. yanagawanus*、*Y. kanaellus* 和古北区西部的几个种的单系性,指出 ITS1 序列与其他基因联合能够准确地解释该属的系统进化关系。很多科学家将世界性分布的黄粪蝇 *Scathophaga stercoraria* 作为研究种群生态、行为及系统进化的一个模式种,但对在南非分布的黄粪蝇的分类地位存在着争议,部分学者认为其是世界性分布的黄粪蝇 *S. stercoraria*,部分学者认为是该种黄粪蝇的一个亚种 *S. stercoraria soror*,也有学者认为其是一个独立的种 *S. soror*。Bernasconi(2010)等人利用 COI、12SrRNA、16SrRNA 及 ITS2 序列对黄粪蝇科的 21 个种(包括 *S. stercoraria* 不同地理种群及多个南非黄粪蝇地理种群)进行系统发育分析,结果支持 *S. soror* 是一个独立的种,与 *S. stercoraria* 为姐妹种。

3 应用前景及展望

ITS 序列的诸多优点使其成为昆虫分子系统学研究中的重要标记,在昆虫近缘种区分、种型鉴定、物种起源、物种进化关系及谱系生物地理等研究中起到了重要作用,ITS 序列的使用也解决了许多长期存在的分类争议。然而,ITS 序列本身也存在不足之处,如它在某些物种间及种内可能具有高度变异性,作为分子标记存在一定的风险;ITS 序列仅表示物种核基因进化方式,并不能完全阐述物种系统进化关系。随着昆虫基因组测序计划

的展开,我们对 ITS 序列会有更加全面的认识,ITS 序列在昆虫研究中的应用范围将大大拓展,并最终推动昆虫学科的深入发展。

参考文献 (References)

- Baffl MA, Ceron CR, 2002. Molecular analysis of the rDNA ITS-1 intergenic spacer in *Drosophila mulleri*, *D. arizonae*, and their hybrids. *Biochem. Genet.*, 40(11/12): 11—12.
- Barr NB, Hall DG, Weathersbee AA, Nguyen R, Stansly P, Qureshi JA, Flores D, 2009. Comparison of laboratory colonies and field populations of *Tamarixia radiata*, an ectoparasitoid of the Asian citrus psyllid, using internal transcribed spacer and cytochrome oxidase subunit I DNA sequences. *J. Econ. Entomol.*, 102(6): 2325—2332.
- Bernasconi MV, Berger D, Blanchenhorn WB, 2010. Systematic ambiguity in the well-established model system insect *Scathophaga stercoraria* (Diptera: Scathophagidae): sister species *S. soror* revealed by molecular evidence. *Zootaxa*, 2441: 27—40.
- Blandón-Naranjo M, ZuriCaga Má, Azoifeifa G, Zeledón R, Bargues MD, 2010. Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. *Parasitol Res.*, 106: 895—905.
- Coleman AW, 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 50: 197—203.
- Cruz DO, Jorge DMM, Pereira JOP, Torres DC, Soares CEA, Freitas BM, Grangeiro TB, 2006. Intraspecific variation in the first internal transcribed spacer (ITS1) of the nuclear ribosomal DNA in *Melipona subnitida* (Hymenoptera, Apidae), an endemic stingless bee from northeastern Brazil. *Apidologie*, 37: 376—386.
- De Jong L, Moreau X, Dalia J, Coustau C, Thiéry A, 2009. Molecular characterization of the invasive Asian tiger mosquito, *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Corsica. *Acta. Tropica.*, 112: 266—269.
- De la Rúa P, Fuchs S, Serrano J, 2007a. A scientific note on the ITS-1 region of *Apis mellifera* subspecies. *Apidologie*, 38(4): 378—379.
- De la Rúa P, Hernández-García R, Jiménez Y, Galián J, Serrano J, 2005. Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from north-eastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect Syst. Evol.*, 36: 21—28.
- De la Rúa P, May-Itzá WJ, Serrano J, Quezada-Euán JJG, 2007b. Sequence and RFLP analysis of the ITS2 ribosomal DNA in two Neotropical social bees, *Melipona beecheii* and *Melipona yucatanica* (Apidae, Meliponini). *Insect. Soc.*, 54: 418—423.
- Dorn PL, Calderon C, Melgar S, Moguel B, Solorzano E, Dumonteil E, Rodas A, De la Rúa N, Garnica R, Monroy C, 2009. Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 3(3): e393.
- 冯贤, 罗广生, 陈乃中, 马骏, 2008. 分子生物学技术在昆虫系统发育地理学研究中的应用. *昆虫知识*, 45(5): 712—717.
- 郜金荣, 叶林柏, 2007. 分子生物学. 武汉: 武汉大学出版社. 22—23.
- 龚志云, 吴信淦, 程祝宽, 顾铭洪, 2002. 水稻 45S rDNA 和 5S rDNA 的染色体定位研究. *遗传学报*, 29(3): 241—244.
- 管维, 王章根, 陈定虎, 2006. 三叶草斑潜蝇和美洲斑潜蝇的分子鉴定. *昆虫知识*, 43(4): 558—561.
- Hamarsheh O, Presber W, Al-Jawabreh A, Abdeen Z, Amro A, Schönián G, 2009. Molecular markers for *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) and their usefulness for population genetic analysis. *Trans. R. Soc. Tro. Med. Hyg.*, 103: 1085—1086.
- 吴晓华, 刘望夷, 1996. 核糖体的结构与功能研究进展. *生命的化学*, 16(3): 1—4.
- 黄华平, 杨腊英, 王国芬, 黄俊生, 2006. rDNA 和 mtDNA 在昆虫系统发育与区系研究中的应用. *华南热带农业大学学报*, 12(4): 45—49.
- Jenkins TM, Jones SC, Lee CY, Forschler BT, Chen Z, Lopez-Martinez G, Gallagher NT, Brown G, Neal M, Thistleton B, Kleinschmidt S, 2007. Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 42: 612—621.
- 刘春来, 文景芝, 杨明秀, 李永刚, 2007. rDNA—ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用. *东北农业大学学报*, 38(1): 101—106.
- 刘伟, 陈晓峰, 王瑛, 1998. rDNA 在昆虫纲系统发育研究中的应用. *昆虫知识*, 35(2): 123—126.
- 刘玉娣, 林克剑, 韩兰芝, 侯茂林, 2009. 基于 rDNA ITS1 和 ITS2 序列的褐飞虱、白背飞虱和灰飞虱的分子鉴定. *昆虫学报*, 52(11): 1266—1272.
- 李正西, 沈佐锐, 2002. rDNA—ITS2 应用于赤眼蜂分子鉴定的研究. *中国农业大学学报*, 7(5): 80—84.
- Mukha D, Wiegmann MB, Schal C, 2002. Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat unit in the Blattodea (Insecta). *Insect. Biochem.*

- Mol. Biol.* ,32: 951—960.
- 潘大仁, 2007. 细胞生物学. 北京: 科学出版社. 267—269.
- Pereira JO, Freitas BM, Jorge DM, Torres DC, Soares CE, Grangeiro TB, 2009. Genetic variability in *Melipona quinquefasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from northeastern Brazil determined using the first internal transcribed spacer (ITS1). *Genet. Mol. Res.* , 8 (2): 641—648.
- Pitts JP, Wilson JS, von Dohlen CD, 2010. Evolution of the nocturnal Nearctic Sphaerophthalminae velvet ants (Hymenoptera: Mutillidae) driven by Neogene orogeny and Pleistocene glaciation. *Mol. Phylogenet. Evol.* ,56: 134—145.
- Rokas A, Nylander JA, Ronquist F, Stone GN, 2002. A maximum-likelihood analysis of eight phylogenetic markers in gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae): implications for insect phylogenetic studies. *Mol. Phylogenet. Evol.* ,22: 206—219.
- Scott JA, Brogdon WG, Collins FH, 1993. Identification of a single specimen of *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 49 (4): 520—529.
- Szalanski AL, Austin JW, Mckern JA, Steelman CD, Gold RE, 2008. Mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer 1 diversity of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* ,45(2): 229—236.
- Tautz D, Hancock JM, Webb DA, Tautz C, Dover GA, 1988. Complete sequence of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* ,5(4): 366—376.
- Turner H, Lieshout N, Van Ginkel WE, Menken SB, 2010. Molecular phylogeny of the small ermine moth genus *Yponomeuta* (Lepidoptera, Yponomeutidae) in the palaeartic. *PLoS One* ,5(3): e9933.
- 武松, 潘嘉云, 王学忠, 周水森, 张国庆, 汤林华, 2008. 西藏墨脱县疟疾流行区多斑按蚊复合体种型鉴. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* ,26(4): 286—289.
- 许超德, 李绍兰, 2004. 核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用进展. *微生物通报* ,31(3): 126—129.
- 郑福山, 杜予州, 丁建清, 2007. 菱角萤叶甲不同地理种群及近缘种 rDNA—ITS1 基因序列初步分析. *动物分类学报* ,32(2): 350—354.
- 周水森, 汤林华, 顾政诚, 王漪, 2002. 不同地区微小按蚊 rDNA—ITS 序列差异. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* ,2(20): 29—31.