

DNA 条形码在昆虫分类中的应用

宋南^{1 2#}, 刘杰^{3#}, 彩万志², 赵忠懿^{1*}

(1. 中华人民共和国河南出入境检验检疫局 郑州 450003; 2. 中国农业大学昆虫系 北京 100094;
3. 中国科学院动物研究所 北京 100101)

摘要: DNA 条形码(DNA barcoding)是生物分类学领域出现的一项新技术,其本质是一段含有生物信息的 DNA 片段,人们可以利用这段基因片段进行物种鉴别。在昆虫分类领域,DNA barcoding 采用的标记基因主要是线粒体 CO I 基因。该基因在引物对应部分比较保守,其它部分具相当变异,容易利用通用引物进行 PCR 扩增;同时在近缘种间,这段基因的差异又足够大。近年来,人们利用 DNA barcoding 技术针对昆虫纲不同类群开展了广泛的研究,尤其在物种鉴定和生物多样性领域。与传统分类相比,DNA barcoding 具有客观、简便、准确、快捷等优势,但是作为一种新技术,它仍有许多问题亟待解决,这主要表现在理论和技术两个方面。在理论方面,DNA barcoding 的基本功能是物种鉴定而非物种定义。在技术方面,DNA barcoding 应着力解决基因标记的选择、与形态分类系统的兼容以及干扰基因的排除。本文主要针对 DNA barcoding 在昆虫分类中的应用、存在的问题以及可能的解决方法等予以综述。

关键词: DNA 条形码; 昆虫分类; 物种鉴定; 存在问题

中图分类号: Q78; Q969 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2013)03-0470-05

Application of DNA Barcoding in Insect Taxonomy

SONG Nan^{1 2#}, LIU Jie^{3#}, CAI Wanzhi², ZHAO Zhongyi^{1*}

(1. Henan Bureau of Entry-exit Inspection and Quarantine, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: DNA barcoding is a new technique in the field of taxonomy. This technique is based on a fragment of DNA sequence, such as the mitochondrial CO I gene, on which we can identify organisms by assessing its similarity to a set of reference taxa. The CO I gene is conservative enough to be amplified by the "universal primers". Meanwhile, diversity in nucleotide sequences of the same gene region of CO I permits the discrimination of closely allied species. In recent years, DNA barcoding had been widely applied to the insect taxonomy, especially in species identification of different insects and biodiversity researches. DNA barcoding is generally considered as a reliable, cost-effective and easy tool in molecular identification, yet it has faced several taxonomic and molecular problems. Firstly, DNA barcoding should be used as a tool for species identification instead of species definition. Secondly, there are several issues in the DNA barcoding methodologies including gene locus selection, compatibility with traditional taxonomic system, and pseudogenes as well. This paper aims to review the DNA barcoding technique and its applications in insect taxonomy. Some problems and possible solutions in this technique will be analyzed as well.

Key words: DNA barcoding; insect taxonomy; species identification; existing problem

近年来,随着分子生物学技术的快速发展,在分类学研究领域人们以生物体的某段 DNA 序列作为类似于商品条形码的标记,以此来标志一个物种。这项技术即为 DNA 条形码(DNA barcoding)。

21 世纪初,德国进化生物学家 Tautz 教授在 Nature 等杂志撰文,首次提出将 DNA 作为生物分类研究平台的观点(Tautz *et al.*, 2002, 2003)。随后,加拿大 Hebert 教授提出了 DNA barcoding 的概念(Hebert *et al.*, 2003a),并以 CO I (cy-

tochrome oxidase subunit I) 基因为基础进行动物分类研究(Hebert *et al.*, 2003b)。昆虫作为世界上物种数量最多的类群,其在分类上存在大量争议,并且,目前尚有大量种类有待我们去发现、描述和命名,因此其分类任务复杂而艰巨。DNA barcoding 具有客观、简便、准确、快速、易操作等优点,它的出现弥补了传统形态分类的诸多不足,为提高昆虫物种鉴定效率、发现新种和隐存种、研究系统进化关系、保护昆虫物种资源多样性等提供了新的研究方法。本文主要综述了

收稿日期: 2012-12-21 接受日期: 2013-02-04

作者简介: 宋南(1980~)男,博士,主要研究方向:半翅目昆虫分子系统发育及 DNA 条形码研究, E-mail: songnan1980@126.com #并列第一作者

* 通讯作者 Corresponding author

DNA barcoding 在昆虫分类研究中的进展以及存在的问题和解决的办法,旨在使人们对这项新技术有一个更加深入的了解。

1 DNA barcoding 概述

DNA barcoding 本质就是一段 DNA 片段,这个片段具有

的某些特点可以使其成为某一物种的分子标签,即人们以已知的一系列分类单元的 DNA 序列为参考,通过序列间相似度的评价来实现物种的鉴定。中文资料中多将 DNA barcoding 翻译为 DNA 条形码,但事实上,DNA 条形码与传统意义的条形码有着本质区别。现将 DNA barcoding 与传统条形码的一些内容进行比较(表 1),以此来探究它们之间的差异。

表 1 DNA barcoding 与传统条形码的比较
Table 1 Comparison of DNA barcoding and commodity barcode

	DNA barcoding	传统条形码
编码本身是否有意义	自然形成的,非人为赋予,本身具有生物学意义	人为赋予,离开数据库则没有任何意义
是否可变	DNA 序列处于进化中,是可变的,其变化的机理未完全明确	人为设定的,不会变化
使用方式	使用时需要进行运算,通常以距离或者序列差异进行核对,目前的研究中未能实现精确对应	直接查对,一一对应
有无明确的对应性	没有明确的对应。可以对应一个群体,也可以对应于个体。当前的概念主要用于对应物种,应用时必须考虑到群体的个体差异	明确对应

在昆虫分类研究中,人们主要利用线粒体 CO I 基因进行物种鉴定。目前作为 DNA barcoding 使用的 CO I 基因是靠近 5' 末端的约 650 bp 的一段。DNA barcoding 的技术流程比较简洁(图),主要包括样品获取、DNA 提取、PCR 扩增、序列测定、序列比对及根据序列差异进行判别。

2 DNA barcoding 在昆虫分类中的应用

DNA barcoding 最基本的用途是物种间的相互区别和新物种的发现。由这两个用途衍生出许多其它用途,比如:物种多样性分析、发现新种和隐存种、监测外来物种入侵、检验检疫中的快速物种鉴定等。

目前,DNA barcoding 技术已经应用于昆虫纲 31 个目的种类鉴定(表 2),已经公布的 CO I 序列主要集中在物种多样性较为突出的鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目、毛翅目和半翅目。最早将 DNA barcoding 技术应用于昆虫分类研究的是加拿大 Guelph 大学的 Hebert 教授,他基于 CO I 序列对双翅

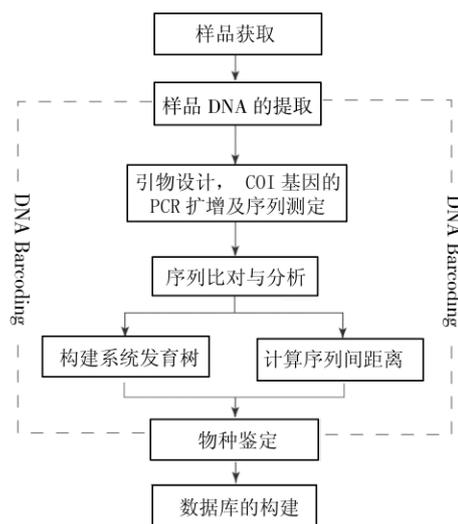


图 DNA barcoding 的技术流程
Fig. Roadmap for DNA barcoding

表 2 DNA barcoding 在昆虫纲部分种类中的应用(来自 BOLD,截止 2012 年 8 月)
Table 2 Utilization of DNA barcoding in different insect orders (from BOLD, up to August, 2012)

目(Order)	已公布的 CO I 序列数目	目(Order)	已公布的 CO I 序列数目
石蛎目 Archaeognatha	78	长翅目 Mecoptera	84
蜚蠊目 Blattaria	680	广翅目 Megaloptera	1290
鞘翅目 Coleoptera	36 458	脉翅目 Neuroptera	1780
革翅目 Dermaptera	137	蜻蜓目 Odonata	4976
双尾目 Diplura	10	直翅目 Orthoptera	5363
双翅目 Diptera	114 009	口目 Phasmatodea	108
纺足目 Embioptera	14	虱目 Phthiraptera	701
蜉蝣目 Ephemeroptera	9444	襀翅目 Plecoptera	3852
恐蠊目 Grylloblattodea	1	啮虫目 Psocoptera	432
半翅目 Hemiptera	25 225	蛇蛉目 Raphidioptera	15
膜翅目 Hymenoptera	136 816	蚤目 Siphonaptera	156
等翅目 Isoptera	826	捻翅目 Strepsiptera	12
鳞翅目 Lepidoptera	584 881	缨翅目 Thysanoptera	1618
螳螂目 Mantodea	372	缨尾目 Thysanura	12
螳螂目 Mantophasmatodea	2	毛翅目 Trichoptera	27 781

目、鞘翅目、膜翅目和鳞翅目昆虫进行序列差异分析,其结果显示鳞翅目具有较低的序列分歧(Herbert *et al.*, 2003b)。此后,Herbert 等(2004a)又基于 CO I 基因证明了双带蓝闪弄蝶 *Astrartes fulgerator* 实际上是 10 种蝴蝶的混合种团。针对长久保存的馆藏标本,人们提出了 DNA 微型条形码(mini-barcode)技术(约 130 bp 的 CO I 序列),起初这项技术被应用于寄生蜂的种类鉴定(Hajibabaei *et al.*, 2006a)。Hajibabaei 等(2006b)利用 DNA barcoding 对鳞翅目 3 科 521 种昆虫进行分类鉴定,其结果证明 DNA barcoding 具有很高的准确性。Linares 等(2009)利用 DNA barcoding 技术研究了马达加斯加特有的蝴蝶 *Heteropsis* 的进化多样性。Jurado-Rivera 等(2009)通过 DNA barcoding 研究了鞘翅目叶甲类昆虫与寄主植物之间的关系。Gauthier(2010)基于微卫星序列和 CO I 序列研究了鞘翅目小蠹亚科 683 个样本的分类关系,证明了同一种 *Hypothenemus hampei* 中存在隐存复合体。Seabra 等(2010)通过 DNA barcoding 对沫蝉 *Philalaenus spumarius* 进行了准确的分类鉴定。Virgilio 等(2010)比较了 DNA barcoding 在昆虫纲鞘翅目、双翅目、半翅目、膜翅目、鳞翅目和直翅目中的鉴定效率,其结果显示在没有数据库资料作为参照的情况下,利用 DNA barcoding 进行物种鉴定的效率会受到一定的影响。Zhou 等(2011)测定了毛翅目石蛾类昆虫 1000 余条 CO I 基因序列,并基于这些序列构建了 DNA barcoding 参考数据库。Park 等(2011)通过 DNA barcoding 研究了半翅目 178 属 344 种蜻类的分类关系,揭示了隐存种的存在。Elderkin 等(2012)利用 DNA barcoding 成功地鉴定了两种蜉蝣: *Hexagenia limbata* 和 *Hexagenia rigida* 的幼虫,而这两种蜉蝣在幼虫阶段是无法通过形态特征予以区分的。Lee 等(2012)基于 DNA barcoding 对鞘翅目、半翅目和鳞翅目 77 种昆虫进行分类鉴定,证明了 DNA barcode 在林木害虫鉴定方面的有效性。Smith 等(2012)研究了 DNA barcoding 在昆虫共生菌 *Wolbachia* 存在情况下的鉴定效率,其结果表明 DNA barcoding 对昆虫的种类鉴定不会受到 *Wolbachia* DNA 的影响。

近年来,我国昆虫学家也利用 DNA barcoding 开展了大量的研究,并取得了丰硕的成果。如安榆林等(2006)通过 CO I 基因研究了鞘翅目光肩星天牛的种间遗传差异。付景和张迎春(2006)基于 DNA barcoding 探讨了鞘翅目瓢虫科的分类关系。欧阳小艳等(2007)基于 CO I 基因比较了 DNA 条形码在口岸医学媒介蚊类识别中的准确性。Zhang 等(2008)将 DNA barcoding 与反向传播神经网络(Back-Propagation Neural Networks)相结合,提出了基于 BP 人工神经网络的物种鉴定新方法;并且,他们通过数据模拟验证了基于 BP 物种鉴定的可行性,成功地鉴定了东亚步甲和哥斯达黎加弄蝶。范京安等(2009)基于 CO I 基因对双翅目实蝇科 12 属 36 种昆虫进行分类鉴定,其结果证实了 DNA barcoding 在果实蝇鉴定中具有较高的准确率。Zhang 等(2010)通过计算机模拟与实例研究相结合,提出了与 DNA barcoding 相关的物种取样策略,并给出了关键取样量的计算方法。Zhang 等(2011)将模糊集合理论与 DNA 条形码相结合,成功地对蝶类和蝇类昆虫进行分类鉴定。岳巧云等(2011)通过 CO I 基因对形态无法区分的鞘翅目幼虫进行鉴定,证实了 DNA bar-

coding 在幼虫种类鉴定中的准确性和实用性。Zhang 等(2011)通过 DNA barcoding 证明了内寄生蜂 *Anicetus* 具有很强的寄主特异性。梁亮等(2011)测定了 25 种果实蝇的 155 条 CO I 条形码序列,验证了 CO I 基因对果实蝇属的鉴定效率。Zhang 等(2012)将生物信息学方法(DV-RBF 和 FJ-RBF)引入 DNA barcoding 技术中,证明了新方法的优越性。中国科学院动物研究所 Chesters 等(2012)基于 CO I 基因与核基因 28S rDNA 序列,揭示了膜翅目跳小蜂科中的 *Encyrtus sasakii* 包含了 3 个隐存种。刘慎思等(2012)将 DNA barcoding 应用于桔小实蝇幼虫及成虫残体的分类鉴定。乔玮娜等(2012)将 DNA 条形码技术应用于蓟马分类研究,验证了 DNA 条形码在蓟马快速准确鉴别中的有效性。Dai 等(2012)基于 CO I 基因以及 ITS1 和 ITS2 基因对松毛虫近缘种进行了分类鉴定,并构建了相关类群的系统演化关系。

3 存在的问题

DNA barcoding 的出现表明了生物微观特征进入分类学研究的趋势。然而,如同一切新生事物一样,DNA barcoding 从开始提出就存在许多争议。目前,这种争论仍然非常激烈,其焦点主要集中在两个方面:一是 DNA barcoding 与传统分类学的关系,二是关于 DNA barcoding 的一些技术问题。

3.1 DNA barcoding 与传统分类学的关系

传统的生物分类学是以众多的形态特征为基础,而 DNA 序列可以被看作众多特征中的一个。因此,有研究者认为不应赋予 DNA 序列高于其它特征的“特权”,仅仅以有限的 DNA 序列作为鉴定物种的依据可能会存在说服力不足的问题(Prendini, 2005)。因此,关于 DNA barcoding 与分类学的关系,合理的看法应该是把 DNA barcoding 定义为一个有前途的技术工具(Schindel & Miller, 2005),其作用应该是服务于分类学而不是取代分类学(Ebach & Holdrege, 2005)。

DNA barcoding 的初衷是提供一个简便的物种鉴定方法,然而在分类研究中,研究者时常遇到两个问题,一是物种的区分与鉴定,二是定义新发现的物种,DNA 序列在这两个方面都具有应用的潜力。因此有学者指出,这两种相近的潜力必须予以区别,强调物种鉴定而非物种定义是 DNA barcoding 技术的基本功能。DNA 序列用于区别不同物种是可行的,例如在检疫鉴定方面用以区别形态学上十分相近的物种。但用于定义物种,或者仅仅依据 DNA 的差别定义物种是不充分的(Prendini, 2005)。

3.2 关于 DNA barcoding 的几个技术性问题

3.2.1 DNA barcoding 标记基因的选择及取样数量

关于使用什么序列作为 DNA Barcoding 的问题存在诸多争论,仅以 CO I 基因的部分序列作为 Barcoding 可能是不充分的(Prendini, 2005)。Hebert 等(2004b)基于对鸟类的研究,提出 10 倍于种内差异可以作为界定物种的界线,并提议将此界线作为一个通用标准。但 CO I 是一个处在不断变化中的基因,而且人们已经发现 CO I 基因序列在某些物种的同种个体间也存在非常大的差异(Edmands, 2001; Goetze, 2003)。因此,决定采用什么基因序列作为 Barcode 和划定什么样的界线作为物种界定的问题尚待商榷。与此相关联的

还有取样数量的问题,即多少个体可以代表一个物种。由于不同类群的种内差异与种间差异是未知的,所以必须有充足的样本来反映种间差异与种内差异,依此来制定一个鉴别的标准,而且对于不同的类群,这个标准可能会有差异。

3.2.2 与形态分类系统的兼容问题 形态分类系统已经被广泛应用了 200 多年,当今的生物分类主要基于此系统。新出现的 DNA barcoding 必须解决与此系统的兼容问题。在形态分类系统出现并不断完善的过程中,人们依据形态分类命名了大量的物种。要获取 DNA barcoding 需要的基因片段,最可靠的方法就是直接从这些物种的模式标本取样。然而,某些物种的模式标本已经遗失,有的也因年代过于久远而无法取样。并且这些标本通常具有重要的分类学价值,提取 DNA 的操作对于标本具有破坏性,因此把 DNA barcoding 用于珍贵的模式标本是不合适的。对于这个问题可以采取使用一般标本的方式作为折衷,但这种处理方式可能导致 DNA barcoding 系统与林奈分类系统在对应上出现偏差。

3.2.3 存在基因序列的干扰 细胞内含有大量的不同 DNA 序列,包括自身序列以及非自身序列,这就导致出现干扰的可能。在造成干扰的因素中,核基因是一个主要的方面。核基因组里存在线粒体基因的同源序列(假基因, pseudogene),如果这些序列被错误用作 DNA barcodes,将会引起严重干扰。但由于核基因组里的线粒体同源序列为假基因,不被表达,所以细胞中不存在相应的 RNA (Collura *et al.*, 1996),可以通过 RT-PCR 的方法予以解决 (Lorenz *et al.*, 2005)。

此外,由共生微生物导致的干扰也是亟待解决的问题。昆虫体内存在共生微生物的现象十分普遍,比如 *Wolbachia* (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Nice *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2012)。近年来的研究发现,这些共生体可对线粒体发生选择作用,使线粒体差异发生增大或减小的变化,进而使得线粒体 DNA 的进化偏离中性进化 (Hurst & Jiggins, 2005)。这种影响对依据 CO I 片段差异判定物种的 DNA barcoding 技术有着非常严重的影响。比如,地理分布上相距较远的同种生物因共生体的不同可能会导致线粒体 DNA 序列的差异变大,从而出现一个物种具有多个不同 COI Barcode 的情况。这种现象在果蝇 *Drosophila simulans* 中已被发现 (James & Ballard, 2000)。另外,一种共生体生物可以寄生于不同的物种,从而可能导致两种生物对应一个 CO I Barcode 的情况。这些可能的影响都将使一条 CO I Barcode 对应一个物种的设想不能实现。针对这类问题,有研究者建议联合使用核基因予以解决 (Rokas *et al.*, 2001)。

4 结语

在通常情况下,同一物种中不同个体的 DNA 序列存在一定的差别,但是其差别通常并不显著。基于这样的假设, DNA barcoding 使用的基因片段可以依据相似性产生一个线索,进而对该样本是否属于某个物种提供数据上的支持或者不支持。所以, DNA barcode 应该是一个用于检索的线索而非一个传统意义上的“Barcode”。在某种意义上, DNA barcode 更应该被视为一个物种所具有的众多特征中的一个特

征,因此,人们应当将 DNA 序列作为与形态特征等宏观特征并列的特征进行记录。

对于昆虫分类学而言, DNA barcoding 的提出具有十分积极的一面。同时,如同任何新技术刚刚出现时一样,它也不可避免的要面临一些问题。但是, DNA 作为一种微观特征加入到分类研究中是大势所趋。将分子生物学技术应用于分类学是一个巨大的进步,它使分类学发展到了分子水平。尽管 DNA barcoding 技术不能解决所有问题,但是它仍然可以作为一个有用的工具服务于昆虫分类与系统学。

5 参考文献

- 安榆林, 杨晓军, 林晓佳, 等. 2006. 光肩星天牛 mtDNA CO I 基因遗传差异的研究 [J]. 林业科学, 42(5): 77~83.
- 范京安, 顾海丰, 陈世界, 等. 2009. DNA 条形码识别 VI: 基于微型 DNA 条形码的果实蝇物种鉴定 [J]. 应用与环境生物学报, 30(2): 215~219.
- 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 [J]. 昆虫分类学报, 28(3): 179~186.
- 梁亮, 江威, 余慧, 等. 2011. 中国果实蝇属种类的 DNA 条形码鉴定, 双翅目, 实蝇科 [J]. 动物分类学报, 36(4): 925~932.
- 刘慎思, 张桂芬, 武强, 等. 2012. 桔小实蝇幼体及成虫残体 DNA 条形码识别技术的建立与应用 [J]. 昆虫学报, 55(3): 336~343.
- 欧阳小艳, 莫帮辉, 余华丽, 等. 2007. DNA 条形码识别——DNA 条形码与 DNA 芯片识别蚊媒准确性的比较 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 30(6): 349~352.
- 乔玮娜, 万方浩, 张爱兵, 等. 2012. DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用 [J]. 昆虫学报, 55(3): 344~356.
- 岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 等. 2011. DNA 条形码技术在未知昆虫幼虫种类鉴定中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 21(3): 615~617.
- Chesters D, Wang Y, Yu F, *et al.* 2012. The integrative taxonomic approach reveals host specific species in an encyrtid parasitoid species complex [J]. PLoS ONE, 7(5): e37655.
- Collura RV, Auerbach MR, Stewart CB. 1996. A quick, direct method that can differentiate expressed mitochondrial genes from their nuclear pseudogenes [J]. Current Biology, 6(10): 1337~1339.
- Dai QY, Gao Q, Wu CS, *et al.* 2012. Phylogenetic reconstruction and DNA barcoding for closely related pine moth species (*Dendrolimus*) in China with multiple gene markers [J]. PLoS ONE, 7(4): e32544.
- Ebach MC, Holdrege C. 2005. DNA Barcoding is no substitute for taxonomy [J]. Nature, 434(7034): 697.
- Edmands S. 2001. Phylogeography of the intertidal copepod *Tigriopus californicus* reveals substantially reduced population differentiation at northern latitudes [J]. Molecular Ecology, 10(7): 1743~1750.
- Elderkin CL, Corkum LD, Bustos C. 2012. DNA barcoding to confirm morphological traits and determine relative abundance of burrowing mayfly species in western Lake Erie [J]. Journal of Great Lakes Research, 38(1): 180~186.
- Gauthier N. 2010. Multiple cryptic genetic units in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae): evidence from microsatellite and mitochondrial DNA sequence data [J]. Journal of the Linnean Society, 101(1): 113~129.
- Goetze E. 2003. Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, (1531): 2321~2331.

- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, *et al.* 2006b. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(4): 968 ~ 971.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, *et al.* 2006a. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded[J]. Molecular Ecology Notes, 6(4): 959 ~ 964.
- Hebert PDN, Cywinska A, Bal SL, *et al.* 2003a. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, (1512): 313 ~ 321.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, *et al.* 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(41): 14812 ~ 14817.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270, Suppl 1: S96 ~ S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, *et al.* 2004b. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLoS Biology, 2(10): 1657 ~ 1663.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, *et al.* 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data[J]. FEMS Microbiology Letters, 281(2): 215 ~ 220.
- Hurst GD, Jiggins FM. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 272(1572): 1525 ~ 1534.
- James AC, Ballard JWO. 2000. Expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* and its impact on infection frequencies and distribution of *Wolbachia pipiensis*[J]. Evolution, 54(5): 1661 ~ 1672.
- Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CAM, *et al.* 2009. DNA barcoding insect-host plant associations[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 276(1657): 639 ~ 648.
- Lee W, Koh SH, Choi WI, *et al.* 2012. Barcoding forest insect pests in South Korea: Constructing a basic endemic species dataset[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 15(3): 363 ~ 368.
- Linares MC, Soto-Calderon ID, Lees DC, *et al.* 2009. High mitochondrial diversity in geographically widespread butterflies of Madagascar: A test of the DNA barcoding approach[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 50(3): 485 ~ 495.
- Lorenz JG, Jackson WE, Beck JC, *et al.* 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 360(1462): 1869 ~ 1878.
- Nice CC, Gompert Z, Forister ML, *et al.* 2009. An unseen foe in arthropod conservation efforts: The case of *Wolbachia* infections in the Karner blue butterfly[J]. Biological Conservation, 142(12): 3137 ~ 3146.
- Park DS, Footitt R, Maw E, *et al.* 2011. Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs, Insecta: Hemiptera: Heteroptera[J]. PLoS ONE, 6(4): e18749.
- Prendini L. 2005. Comment on "Identifying spiders through DNA barcodes" [J]. Canadian Journal of Zoology, 83(3): 498 ~ 504.
- Rokas A, Atkinson RJ, Brown GS, *et al.* 2001. Understanding patterns of genetic diversity in the oak gallwasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a *Wolbachia selective* sweep? [J]. Heredity, 87: 294 ~ 304.
- Schindel DE, Miller SE. 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists[J]. Nature, 435(7038): 17.
- Seabra SG, Pina-Martins F, Marabuto E, *et al.* 2010. Molecular phylogeny and DNA barcoding in the meadow-spittlebug *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Cercopidae) and its related species[J]. Molecular Phylogenetic and Evolution, 56(1): 462 ~ 467.
- Smith MA, Bertrand C, Crosby K, *et al.* 2012. *Wolbachia* and DNA barcoding insects: Patterns, potential, and problems [J]. PLoS ONE, 7(5): e36514.
- Sun XJ, Xiao JH, Cook JM, *et al.* 2011. Comparisons of host mitochondrial, nuclear and endosymbiont bacterial genes reveal cryptic fig wasp species and the effects of *Wolbachia* on host mtDNA evolution and diversity[J]. BMC Evolutionary Biology, 11: 86.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, *et al.* 2002. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 418(6897): 479.
- Tautz D, Arctander P. Minelli A, *et al.* 2003. A plea for DNA taxonomy [J]. Trends in Ecology & Evolution, 18(2): 70 ~ 74.
- Virgilio M, Backeljau T, Nevado B. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders [J]. BMC Bioinformatics, 11: 206.
- Zhang AB, Feng J, Ward RD, *et al.* 2012. A New Method for Species Identification via Protein-coding and Non-coding DNA Barcodes by Combining Machine Learning with Bioinformatic Methods[J]. PLoS ONE, 7(2): e30986.
- Zhang AB, He LJ, Crozier RH, *et al.* 2010. Estimating sample sizes for DNA Barcoding[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 54(3): 1035 ~ 1039.
- Zhang AB, Muster C, Liang HB, *et al.* 2011. A fuzzy-set-theory-based approach to analyse species membership in DNA barcoding[J]. Molecular Ecology, 21(8): 1848 ~ 1863.
- Zhang AB, Sikes DS, Muster C, *et al.* 2008. Inferring Species Membership using DNA sequences with Back-propagation Neural Networks[J]. Systematic Biology, 57(2): 202 ~ 215.
- Zhang YZ, Sheng LS, Zheng JT, *et al.* 2011. DNA barcoding of endoparasitoid wasps in the genus *Anicetus* reveals high levels of host specificity (Hymenoptera: Encyrtidae) [J]. Biological Control, 58(3): 182 ~ 191.
- Zhou X, Robinson JL, Geraci CJ, *et al.* 2011. Accelerated construction of a regional DNA-barcode reference library: caddisflies (Trichoptera) in the Great Smoky Mountains National Park [J]. Journal of the North American Benthological Society, 30(1): 131 ~ 162.