

毛乌素沙地切叶蜂科 8 种类 *COI* 基因序列比较分析

胡红岩 陈欢 徐环李*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 采用 PCR 扩增和序列测定技术,对内蒙古毛乌素沙地切叶蜂科的 8 种野生蜂线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I (*COI*) 基因片段进行了研究。结果表明:扩增得到 658 bp 的基因片段长度,碱基组成的 A+T 为 75.8%,含量显著高于 G+C(24.2%)含量。共检测到 203 个变异位点,占总位点的 30.9%。变异位点转化数明显少于颠换数,颠换主要以 A-T 之间为主。采用邻接法(NJ)、最大似然法(MP)和 UPGMA 法构建系统进化树,结果显示:海切叶蜂 *Megachile maritima* 和大和切叶蜂 *M. japonica* 亲缘关系最近;北方切叶蜂 *M. manchuriana*、双斑切叶蜂 *M. leachella* 和凹足切叶蜂 *Megachile* sp. 聚为一类;戎拟孔蜂 *Hoplitis princeps* 和花黄斑蜂 *Anthidium florentinum* 与其他 6 个种间的遗传差异最大,亲缘关系最远。研究结果与传统分类一致,对利用 *COI* 序列建立快速、准确野生蜂的分子鉴定具有一定参考价值。

关键词 切叶蜂科; 线粒体 *COI* 基因; 序列分析; 分子系统发育; 毛乌素沙地

中图分类号 Q 969.2

文章编号 1007-4333(2012)03-0022-06

文献标志码 A

COI of eight species of Megachilidae in Mu Us sandland, Inner Mongolia, China

HU Hong-yan, CHEN Huan, XU Huan-li*

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

Abstract Leaf-cutting bees are important pollinators for crop pollination. The aim of this article is try to explore genetic ecology of eight species of Megachilidae (Hymenoptera: Apoidea) in the Mu Us sandland, Inner Mongolia, China. The mitochondrial *COI* of eight bees were amplified and sequenced. Nucleotides composition, transition and transversion, and genetic distance of the sequence were analyzed by sequence alignment. *Anthidium florentinum* was used as outgroup to reconstruct the molecular phylogenetic trees of these species with Neighbor-Joining (NJ), Maximum Parsimony(MP) and UPGMA methods. The results of the sequence analysis showed that the *COI* genes are 657 bp in length by alignment, including 454 conserved, 230 variable and 107 parsimonious-informative sites, and the average A + T content is 75.8%, much more than that of C + G(24.2%). Molecular phylogenetic trees showed that the five species of *Megachile* clustered together ordinally, which indicating that they have closer relationship among them. *Hoplitis princeps*, *Anthidium florentinum* were far from the other six species in genetic difference. The results are in accord with that of traditional morphological classification. It could be important than quickly to identify bees by *COI* gene sequence.

Key words Megachilidae; *COI*; sequence analysis; molecular phylogeny; Mu Us sandland

鄂尔多斯毛乌素沙地处于草地和沙地的过渡带,植被覆盖率低,沙漠化严重^[1]。披针叶黄华、塔落岩黄芪和角蒿是当地重要的防沙固沙植物,主要

依靠切叶蜂科 (Megachilidae) 的几种蜂和熊蜂 *Bombus* 为其传粉。因此,开展对切叶蜂科传粉蜂种类的调查和对重要切叶蜂的生活史,传粉行为及传

收稿日期: 2011-12-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970412); 公益性行业(农业)科研专项(201203080)

第一作者: 胡红岩,硕士研究生, E-mail: huhongyan1986@163.com

通讯作者: 徐环李,副教授,博士,主要从事传粉昆虫学研究, E-mail: hanabati@cau.edu.cn

粉作用等基本生物学特性的研究,对于揭示野生蜂传粉与植物生态适应对策,保护野生传粉蜂资源具有重要的意义。蒙艳华等对海切叶蜂 *Megachile maritima* 和双斑切叶蜂 *M. leachella* 的筑巢和访花行为等进行了研究^[2-3];杨俊伟等研究了大和切叶蜂 *M. japonica* 对披针叶黄华的访花和盗蜜等行为^[4]。野外调查发现花黄斑蜂 *Anthidium florentinum* 和一未知种切叶蜂是当地塔落岩黄芪授粉蜂。戎拟孔蜂 *Hoplitis princeps* 为批针叶黄花授粉、大顎尖腹蜂 *Coelioxys mandibularis* 盗寄生以上几种切叶蜂。

细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 基因是动物线粒体 DNA (mtDNA) 中最保守的编码蛋白基因。基于线粒体基因 COI 的这一特性,在分子系统学的研究中,COI 基因已经越来越多的被用于种间系统

关系的研究。DNA-Barcoding 技术已应用于快速准确鉴定野生蜂种类,成为生态学研究的一种潜在手段^[5]。因此,本研究对毛乌素沙地分布的切叶蜂科蜂 8 种类 COI 基因片段进行扩增、序列分析和遗传距离计算并构建系统发育树,从分子水平确立未知种凹足切叶蜂的分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究供试昆虫均采自内蒙古鄂尔多斯毛乌素沙地,详细信息见表 1。试验用昆虫均为成虫,其中花黄斑蜂和北方切叶蜂为干标本,分别于 2007 和 2004 年采集,其余标本均为 2010 年采集的新鲜标本,自采集后立即用无水乙醇固定,在实验室 4 ℃ 条件下低温保存。

表 1 样本采集信息及提取的个体数
Table 1 Samples collection information and number of extraction

属 名	种 名	拉丁学名	采集地	采集日期	提取的个体数
切叶蜂属	北方切叶蜂	<i>Megachile manchuriana</i>	内蒙磴口	2004-08-13	7
	双斑切叶蜂	<i>M. leachella</i>	内蒙鄂尔多斯	2010-08-24	10
	凹足切叶蜂	<i>Megachile</i> sp.	内蒙鄂尔多斯	2010-07-09	10
	海切叶蜂	<i>M. maritima</i>	内蒙鄂尔多斯	2010-08-24	10
	大和切叶蜂	<i>M. japonica</i>	内蒙鄂尔多斯	2010-05-26	10
尖腹蜂属	大顎尖腹蜂	<i>Coelioxys mandibularis</i>	内蒙鄂尔多斯	2010-07-09	10
拟孔蜂属	戎拟孔蜂	<i>Hoplitis princeps</i>	内蒙鄂尔多斯	2010-05-26	10
黄斑蜂属	花黄斑蜂	<i>Anthidium florentinum</i>	内蒙鄂尔多斯	2007-07-27	6

1.2 方法

1.2.1 材料的预处理

对于乙醇保存的标本,用 0.9% 的生理盐水浸泡 24 h,取出虫体用蒸馏水冲洗,清除表面的污染放入离心管中待用。对于干标本的处理参考朴美花等的方法^[6],首先用 75% 的乙醇和蒸馏水冲洗干净,然后放入 STE 缓冲液 (0.1 mol/L NaCl, 10 mol/L Tris·Cl pH 8.0) 中浸泡 24 h,用蒸馏水冲洗干净待用。

1.2.2 总 DNA 提取

本试验是以成虫胸部肌肉组织或整个昆虫个体为材料,采用常规的 CTAB 法提取总 DNA^[7],将虫体清洗干净后用吸水纸吸干水分,取头和胸部肌肉放入 1.5 mL 离心管中,加液氮研磨成粉末状。加

入 200 μ L 的 CTAB 提取缓冲液和 20 μ L 的蛋白酶 K (20 mg/mL),充分混匀后 65 ℃ 水浴 3 h,中间轻轻震荡几次,12 000 r/min 离心 15 min。吸取上清液,加入 500 μ L 氯仿/异戊醇 (24 : 1) 溶液抽提,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于新的离心管中,重复抽提 2 次以溶液澄清透明为止。再加入 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc (醋酸钠) 和 2 倍体积的 -20 ℃ 无水乙醇,混匀后置 -20 ℃ 冰箱过夜,12 000 r/min 离心 15 min。弃上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次;最后室温下干燥 10 min,溶于 50~100 μ L TE 缓冲液中 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 1 mmol/L EDTA pH 8.0)。取 1 μ L 溶液用紫外分光光度计测定核酸浓度和纯度,剩余溶液于 -20 ℃ 下保存备用。

1.2.3 PCR 扩增及产物测序

扩增所用引物为无脊椎动物通用引物:COI L 1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' 和 COI H2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACC-AAAAAATCA-3'^[8]。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增体系为 50 μL,包括 2×Taq PCR StarMix 25 μL,上下游引物各 2.5 μL,ddH₂O 17.5 μL,DNA 模板 2.5 μL。扩增条件为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环;循环结束后 72 ℃延伸 5 min。产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像仪检测凝胶成像系统观察、照相。对扩增效果良好的样品委托北京三博远志生物技术有限责任公司进行纯化和测序,为提高测序的准确度,每个样品采用正反链双向测序。

1.2.4 序列分析

将每个个体测得正反向序列用 BioEdit、DNAMAN 等软件进行拼接校对,并结合测序荧光峰图人工修正,去除上下游引物,得到长度为 658 bp 的 COI 基因序列。将序列输入 NCBI 网站,进行 BLAST 相似性检索,显示与基因库中已有的昆虫 COI 基因序列有很高的同源性,确认所得序列为部分 COI 基因序列,其中没有出现缺失现象。用 DNAMAN 5.2 软件对序列进行多重比对,并计算序列差异百分比,根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离。以花黄斑蜂作为外群,用 MEGA 4.0 软件构建 NJ (neighbor-joining)、MP (maximum-parsimony) 和 UPGMA 分子系统树,采用 Bootstrap(重复数=1 000)检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果与分析

2.1 碱基组成及替换

对 8 种蜂进行扩增均得到 658 bp 的片段长度,去掉前面一个碱基得到 657 bp 的有效长度,比较同

一种类的不同个体间的碱基差异,结果表明:北方切叶蜂、双斑切叶蜂、大和切叶蜂、戎拟孔蜂和花黄斑蜂 5 种蜂种内个体间碱基没有任何差异,凹足切叶蜂个体间碱基没有任何差异。将比对结果输入 MEGA4.0 软件分析碱基组成,8 种蜂的 COI 序列片段碱基组成如表 2 所示,在 COI 基因序列中,A、T、G、C 平均含量分别为 33.9%、41.9%、10.3%、13.9%,A+T 的含量为 75.8%,G+C 的含量为 24.2%,A+T 含量明显高于 G+C 含量。4 种碱基在密码子不同位点的含量也有很大差异,A+T 在 3 个位点的含量分别为 69.2%、62.2%、95.7%;而 G+C 在 3 个位点的含量为 30.5%、37.8%、4.2%。第 3 位以 A 的含量为最高,平均含量为 53.9%,C 的含量最低,仅为 0.5%,可见密码子碱基的使用频率有明显的偏向性^[8]。

表 2 8 种蜂 COI 基因片段的碱基组成				
Table 2 Base composition of COI gene fragments of the eight species				%
蜂的种类	T	C	A	G
<i>Megachile</i> sp.	41.0	14.0	34.7	10.3
<i>M. manchuriana</i>	41.3	14.6	34.0	10.0
<i>M. japonica</i>	41.5	13.4	34.8	10.3
<i>Anthidium florentinum</i>	44.8	12.5	32.1	10.6
<i>M. maritima</i>	40.7	14.1	35.0	10.2
<i>Coelioxys mandibularis</i>	42.4	15.0	32.7	9.9
<i>Hoplitis princeps</i>	43.3	13.1	33.3	10.3
<i>M. leachella</i>	40.6	14.4	34.7	10.3
平均	42.0	13.9	33.9	10.3

对序列的碱基替换进行统计(表 3),显示该基因有 454 个保守位点;203 个变异位点,占总位点的 30.9%;107 个简约信息位点,占总位点的 16.3%,占变异位点的 52.7%。核苷酸转换的位点数是 26,

表 3 切叶蜂科 8 种 COI 基因部分片段碱基统计表
Table 3 Nucleotides substitution of COI gene parts sequences of 8 species of Megachilidae

位点	ii	sv	si	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC
第一	197	11	11	1.0	74	4	4	1	2	26	1	0	4	1	63	2	0	0
第二	164	3	4	0.7	99	2	1	0	1	51	0	1	1	0	33	0	0	1
第三	211	12	43	0.3	67	5	22	0	5	1	2	0	17	2	96	0	0	0
全组	573	26	58	0.4	241	11	28	1	8	78	3	1	22	3	191	3	0	1

注:ii 为 Identical Pairs;si 为 Transitional Pairs;sv 为 Transversional Pairs;R = si/sv。

颠换的位点数是 58,转换以 C-T 之间为主,颠换以 A-T 之间为主,转换和颠换比为 0.4。统计成对序列间碱基替换数表明,第 1 和第 2 密码子位点替换数分别为 22 次和 7 次,密码子第 3 位点上碱基替换数为 55 次,可见碱基替换主要发生在密码子第 3 位点上,较少发生在保守的第 2 位点上。

2.2 遗传距离分析

运用 MEGA 4.0 软件计算 8 种切叶蜂遗传距离,结果见表 4;8 种蜂的遗传距离 $d(TV+TS)$ 在 0.059~0.196 之间。同一属内的不同种之间的遗传距离较小,如大和切叶蜂和海切叶蜂之间 d 值为 0.059,亲缘关系最近;凹足切叶蜂与以上 2 种蜂的 d 值分别为 0.082 和 0.079,亲缘关系也较近;北方切叶蜂与大和切叶蜂和海切叶蜂的亲缘关系次之 d

值分别为 0.090 和 0.108。在形态学分类上戎拟孔蜂属于拟孔蜂属,花黄斑蜂属于黄斑蜂属,大颚尖腹蜂属于尖腹蜂属,3 个种与其他几种蜂间的 d 值在 0.148~0.196 之间,说明同科不同属之间的遗传距离较大,亲缘关系较远。

8 个种之间的转换/颠换数(TS/TV)也有很大的差异, d 值最小的大和切叶蜂和海切叶蜂间有最高的 TS/TV,为 0.967;切叶蜂属的 4 个种与凹足切叶蜂之间的 TS/TV 平均值为 0.606;戎拟孔蜂、大颚尖腹蜂、花黄斑蜂与其他种之间的 TS/TV 较小,分别为 0.344、0.387、0.456。综合分析 d 值和 TS/TV,表明距离较近的属种之间显示较高的 TS/TV 值,随着距离的增加,TS/TV 值基本呈现下降趋势,这是昆虫线粒体 DNA 转换/颠换数 TS/TV

表 4 遗传距离(对角线以下)和转换/颠换数(对角线以上)的比较

Table 4 Pairwise distance matrix (below diagonal) and number of transition/transversion (above diagonal)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.548	0.559	0.432	0.967	0.295	0.409	
2	0.082		0.580	0.712	0.533	0.396	0.370	0.452
3	0.090	0.084		0.710	0.464	0.348	0.373	0.431
4	0.090	0.082	0.091		0.559	0.376	0.325	0.500
5	0.059	0.079	0.108	0.090		0.305	0.394	0.475
6	0.148	0.161	0.159	0.170	0.167		0.451	0.523
7	0.161	0.186	0.178	0.196	0.178	0.168		0.561
8	0.174	0.180	0.180	0.168	0.191	0.172	0.182	0.251

注:1 为 *Megachile japonica*;2 为 *Megachile* sp.;3 为 *M. manchuriana*;4 为 *M. leachella*;5 为 *M. maritima*;6 为 *Coelioxys mandibularis*;7 为 *Hoplitis princeps*;8 为 *Anthidium florentinum*。

值的一个典型特征,即距离依赖性^[9]。

2.3 系统发育树分析

采用双参数(Kimura 2-parameter)作为距离参数,用邻接法(NJ)、最大似然法(MP)和 UPGMA 法构建系统进化树。构建的 NJ(图 1)、MP(图 2)、UPGMA(图 3)树拓扑结构基本一致。从进化树可知,大和切叶蜂和海切叶蜂以很高的置信度首先聚为 1 支,切叶蜂属的双斑切叶蜂和北方切叶蜂依次聚在一起,置信度很高。新种凹足切叶蜂也被聚到了大和切叶蜂和海切叶蜂一支上。NJ、UPGMA 树表明大颚尖腹蜂与切叶蜂属以上 5 个种亲缘关系较近,与传统分类的大颚尖腹蜂和切叶蜂属同属于切叶蜂族的说法相吻合。戎拟蜂和花黄斑蜂与其他 6 种切叶蜂的亲缘关系较远。

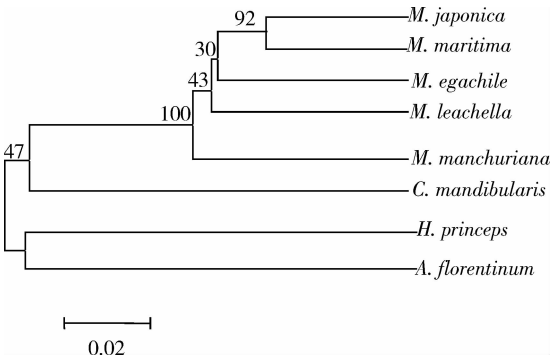


图 1 8 种昆虫的 NJ 树(各分支上的数字为 bootstrap 1 000 个循环的自举检验值)

Fig. 1 N-J tree of 8 species (with confident values of bootstrap 1 000 indicated above each branch)

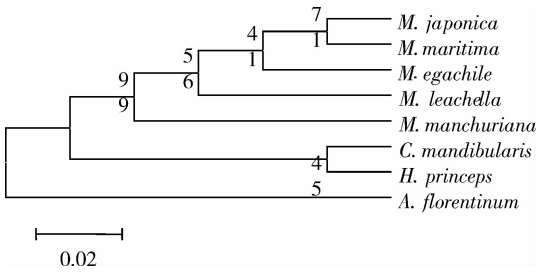


图2 8种昆虫的MP树(各分支上的数字为bootstrap 1 000个循环的自举检验值)

Fig. 2 M-P tree of 8 species (with confident values of bootstrap 1 000 indicated above each branch)

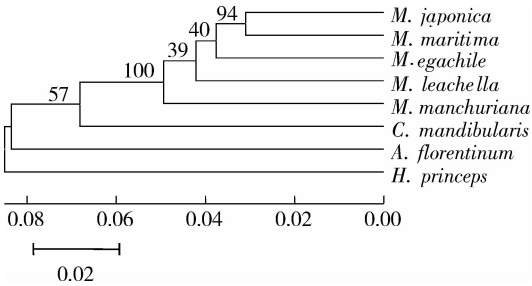


图3 8种昆虫的UPGMA树(各分支上的数字为bootstrap 1 000个循环的自举检验值)

Fig. 3 UPGMA tree of 8 species (with confident values of bootstrap 1 000 indicated above each branch)

3 讨论

本试验运用无脊椎动物通用引物,对切叶蜂科几个种和凹足切叶蜂的线粒体 *COI* 基因片段进行扩增,结果显示与 NCBI 上登录的蜂类线粒体 *COI* 基因序列有很大的相似性。在所测序列中,同一种蜂种内个体间碱基没有任何差异。比较 8 种蜂的 *COI* 基因序列,得知 A+T 的平均含量为 75.8%,显示碱基组成有很强的偏好性,较高的 A+T 含量是无脊椎动物线粒体基因的一个普遍现象^[10],尤其是膜翅目昆虫线粒体基因组的 AT 含量最高,通常在 80% 以上^[11]。如蜜蜂属的熊蜂种类的 AT 含量在 73% 以上^[12];木蜂的 AT 含量也高达 80%^[13]。核苷酸转换的位点数是 26,颠换的位点数是 58,碱基替换主要发生在密码子第 3 位点上,第 2 位点的替换率最低,表明密码子第 2 位点的碱基比较保守,碱基替换较少发生在该位点上,与前人研究的结果一致^[14]。

8 种蜂的遗传距离 $d(TV + TS)$ 在 0.059 ~ 0.196 之间,符合鉴定最小种间遗传距离为 0.002

的标准^[15],说明线粒体 *COI* 基因适合用来研究属内或科内种群的系统发育关系。综合分析种间遗传距离表明,同一属内不同种间的遗传距离最小,亲缘关系最近;同科不同属之间的遗传距离最大,表明亲缘关系较远。凹足切叶蜂与切叶蜂属的 4 个种平均遗传距离为 0.082,而与大顎尖腹蜂、戎拟孔蜂和花黄斑蜂的遗传距离分别为 0.161、0.186 和 0.180,说明凹足切叶蜂与切叶蜂属的 4 个种亲缘关系近。TV/TS 值的大小与遗传距离有很大的关系,也可以作为衡量亲缘关系远近的一个重要参数^[14],从转换/颠换数(TV/TS)可以看出,TV/TS 最大的种之间遗传距离最小,如大和切叶蜂和海切叶蜂;戎拟孔蜂、大顎尖腹蜂、花黄斑蜂与切叶蜂属的几个种之间的 TV/TS 较小,表明遗传距离较大,亲缘关系较远。

系统树分析结果显示,大和切叶蜂和海切叶蜂以较高的置信度(92/71/94,NJ/ MP/ UPGMA)首先分化出来,凹足切叶蜂和双斑切叶蜂依次聚集到一起,北方切叶蜂以接近 100 的置信度(100/99/100,NJ/ MP/ UPGMA)与以上 4 种蜂聚在一起。传统分类认为大和切叶蜂、海切叶蜂属黄足切叶蜂亚属 *Xanthosarus*,双斑切叶蜂、凹足切叶蜂和北方切叶蜂均属隐脊切叶蜂亚属 *Entricharaea*,由 3 种发育树可以看出,凹足切叶蜂与切叶蜂属的 4 个种聚到了一起,据此可以推测凹足切叶蜂属于切叶蜂属。传统分类中尖腹蜂属的大顎尖腹蜂与切叶蜂属同属切叶蜂族,亲缘关系较近,与 NJ 和 UPGMA 发育树显示的结果较为一致。戎拟孔蜂和花黄斑蜂分属于壁蜂族拟孔蜂属和黄斑蜂族黄斑蜂属,与以上 6 个种的亲缘关系最远。而在 MP 树中,大顎尖腹蜂与戎拟孔蜂聚到一起,但是支持率不高,并且传统分类中 2 种蜂在习性和形态上差异比较大,因此 2 种蜂的亲缘关系远近,应以 NJ 和 UPGMA 发育树显示为准。比较发现 NJ、MP、UPGMA 3 种方法建立的发育树存在一定的差异,NJ 和 UPGMA 发育树都是以遗传矩阵构建的进化树,目前应用较为广泛,在研究有亲缘关系的物种或群体分化时能获得满意结果^[16]。而 NJ 算法是在 UPGMA 方法的基础上,结合临近序列信息而改进的一种算法,在处理相似度较高、亲缘关系较近的序列时更为准确^[17]。Saitou 等^[18]研究表明,NJ 法和 ME (minimum-evolution)法建立的系统树相比其他方法建的系统树准确性要高。吕宝忠^[16]认为 MP 最大简约法计算时除去各序列中不变的位点和只在一个序列中改

变的位点,是一种更快的计算方法适合于大量的变异比较明显的序列,更适合于较远亲缘关系的物种分化研究。本研究 NJ 和 UPGMA 发育树显示了 8 种蜂的亲缘关系与形态学上的分类结果是一致的。

目前关于膜翅目内部各类群的系统发育关系仍然存在许多争议^[19],切叶蜂科作为膜翅目蜜蜂总科的第二个大科,其系统发育关系也较为复杂。本试验通过对线粒体 *COI* 基因的扩增和分析,基于基因序列数据来探讨 8 种蜂的亲缘关系并确立了凹足切叶蜂的亚属分类地位,有关凹足切叶蜂的具体分类和营巢生物学将另文发表。

参 考 文 献

- [1] 徐小玲,延军平. 毛乌素沙地的脆弱性与可持续发展研究[J]. 干旱区研究,2004,21(3):286-289
- [2] 蒙艳华,徐环李. 海切叶蜂的筑巢和访花行为[J]. 昆虫学报,2007,50(12):1247-1254
- [3] 蒙艳华,徐环李. 双斑切叶蜂的筑巢习性[J]. 昆虫学报,2008,51(11):1170-1176
- [4] 杨俊伟,徐环李,孙洁茹,等. 大和切叶蜂对其蜜源植物披针叶黄华的盗蜜行为[J]. 昆虫学报,2010,53(9):1015-1021
- [5] Sheffield C S, Hebert P D N, Kevan P G, et al. DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9 (Suppl. 1):196-207
- [6] 朴美花,陈学新,何俊华. 膜翅目昆虫干标本的基因组提取[J]. 动物分类学报,2002,27(4):672-675
- [7] Winnepenninckx B, Backeljau T, Dewachter R. Extraction of high molecular weight DNA from mollusks [J]. Trends Genetic, 1993, 9(12):407
- [8] Simon C, Frati F, Bechenbach A, et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. Annual of the Entomological Society of America, 1994, 87: 651-701
- [9] 付景. 瓢虫科部分种类基于线粒体 *COI* 基因的系统发育与食性演化研究[D]. 西安:陕西师范大学,2007
- [10] Downton M, Castro L R, Campbell S L, et al. Frequent mitochondrial gene rearrangements at the hymenopteran nad3-nad5 junction[J]. Journal of Molecular Evolution, 2003, 56(5): 517-526
- [11] 位正鹏,孔晓瑜,吴相云,等. 基于 *COI* 序列的翡翠股贻贝 *Perna viridis* 线粒体遗传特性分析及其近缘种间的系统关系探讨[J]. 热带海洋学报,2009,28(6):72-78
- [12] 黄家兴. 华北地区熊蜂属 (Hymenoptera: Apidae) 系统发育的初步研究[D]. 北京:中国农业科学院,2006
- [13] Leys R, Cooper J B, Schwarz M P. Molecular phylogeny of the large carpenter bees, genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae) based on mitochondrial DNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2000, 17:407-418
- [14] 孙娜,郭晓华,刘广纯. 金龟子部分种类 *COI* 基因序列比较分析[J]. 沈阳农业大学学报,2009,40(6):688-692
- [15] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceeding of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270:313-321
- [16] 吕宝忠. 分子进化树的构建[J]. 动物学研究,1993,14(2):186-193
- [17] 郑毅,迟德富,杜波,等. 不同色斑型异色瓢虫 *COI* 和 *COII* 基因序列系统进化分析[J]. 昆虫知识,2009,46(6):866-873
- [18] Saitou N, Imanishi T. Relative efficiencies of the fitch-margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree[J]. Molecular Biology and Evolution, 1989, 6(5):514-525
- [19] Beutel R G, Pohl H. Endopterygote systematics-where do we stand and what is the goal (Hexapoda, Arthropoda)? [J]. Systematic Entomology, 2006, 31(2):202-219

责任编辑:袁文业