

基于线粒体 *COI* 基因序列的壮真蝎与普洱真蝎的分子鉴定

李蓉[#], 郑雨田[#], 李春青, 陈艳艳, 杨振升, 陈善元^{*}, 肖衡^{*}

(云南大学生命科学学院, 昆明 650091)

摘要: 对蝎类物种的传统分类主要依靠形态和行为特征,但由于该类群种间形态特征极为相似,物种的划分和鉴定困难。为弥补传统分类方法的不足,本研究以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*COI*) 基因作为分子标记,对形态相似的壮真蝎 *Euscorpions validus* 和普洱真蝎 *E. puerensis* 进行分子水平的物种鉴定。采用 PCR 扩增测序获得壮真蝎与普洱真蝎共 24 个样本的 *COI* 基因部分片段序列(660 bp),进行了遗传距离、系统发育及单倍型网络图分析。结果显示:壮真蝎 15 个样本中共检测到 4 个单倍型,单倍型之间的相似度为 99.3%~99.8%;普洱真蝎 9 个样本中共检测到 4 个单倍型,单倍型之间的相似度为 99.6%~99.8%;2 种蝎的种间序列相似度为 90.1%~90.6%,单倍型间的稳定差异核苷酸位点数为 61 个。壮真蝎与普洱真蝎种内平均遗传距离分别为 0.004 0、0.002 3,种间平均遗传距离为 0.103 9,且种间遗传距离为种内的 34.6 倍。此外,分子系统发育树显示壮真蝎与普洱真蝎的单倍型序列各自聚为 2 个单系枝,且具有很高的分枝自举值(100%)。单倍型网络图结果也显示壮真蝎与普洱真蝎 8 个单倍型明显分为 2 大类群,且壮真蝎的单倍型 HAP2 与普洱真蝎的单倍型 HAP7 之间的突变步数高达 62 步。上述结果不仅进一步确认壮真蝎与普洱真蝎为 2 个不同的物种,且表明线粒体 *COI* 基因可用于开展真蝎属 *Euscorpions* 物种的分子鉴定。

关键词: 壮真蝎; 普洱真蝎; *COI* 基因; 分子鉴定

中图分类号: Q953; Q38 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2017)02-0139-06

Molecular Identification of *Euscorpions validus* and *E. puerensis* Based on Mitochondrial *COI* Gene Sequences

LI Rong[#], ZHENG Yutian[#], LI Chunqing, CHEN Yanyan, YANG Zhensheng,
CHEN Shanyuan^{*}, XIAO Heng^{*}

(School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The traditional classification and taxonomy of scorpiones are mainly based on morphological and behavioral characteristics. However, due to the similar morphological characteristics among species, it is difficult to classify and identify distinct species among scorpions. To compensate for the insufficiency of traditional taxonomic methodology, this study used mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) gene as molecular marker to conduct molecular identification of 2 morphologically similar scorpion species *Euscorpions validus* and *E. puerensis*. The partial *COI* gene sequences (660 bp) from 24 samples of *E. validus* and *E. puerensis* were amplified by PCR followed by gene sequencing. The genetic distances, phylogenetic and haplotype network analyses were then carried out. The results showed that: 4 haplotypes with similarity of 99.3%–99.8% were detected in 15 individuals of *E. validus*, and 4 haplotypes with similarity of 99.6%–99.8% were found in 9 individuals of *E. puerensis*; the interspecific similarity was 90.1%–90.6% and the number of stable differentiated nucleotide sites between the haplotypes of 2 species was 61. The intraspecific average genetic distances among *E. validus* haplotypes and among *E. puerensis* haplotypes were 0.004 0 and 0.002 3, respectively, while the interspecific average genetic distance between *E. validus* and *E. puerensis* was 0.103 9, being 34.6 times higher than that of intraspecific values. In addition, molecular phylogenetic tree clearly showed that the haplotype sequences of *E. validus* and *E. puerensis* clustered as 2 reciprocally monophyletic clades with high bootstrap values (100%). The haplotype network also showed that 8 haplotypes of *E. validus* and *E. puerensis* can be clearly divided into 2 clades, and the mutation steps between HAP2 hap-

收稿日期:2016-11-07 接受日期:2017-01-03

基金项目:云南省大学生创新创业训练计划项目(201310673008);云南大学引进人才科研启动基金项目(XT412002)

作者简介:李蓉(1990—),女,硕士研究生,主要从事动物遗传学研究, E-mail:12014000884@mail.ynu.edu.cn; 郑雨田(1992—),女,本科生,主要从事动物遗传学研究, E-mail:leizhenyu201@163.com [#]同等贡献作者

^{*}通信作者 Corresponding author, E-mail:chensy@ynu.edu.cn; xiaoheng@ynu.edu.cn

lotype of *E. validus* and HAP7 haplotype of *E. puerensis* reached 62. These results further confirmed that *E. validus* and *E. puerensis* were 2 distinct species, and indicated that mitochondrial *COI* gene was suitable for molecular species identification of *Euscorpions* species.

Keywords: *Euscorpions validus*; *Euscorpions puerensis*; *COI* gene; molecular identification

壮真蝎 *Euscorpions validus* 和普洱真蝎 *E. puerensis* 均属节肢动物门 Arthropoda 螯肢动物亚门 Chelicerata 蛛形纲 Arachnida 蝎目 Scorpiones 真蝎科 Euscorpionidae 真蝎属 *Euscorpions*, 为真蝎属中等大小的物种 (Kovařík *et al.*, 2015)。壮真蝎分布于中国云南省蒙自市; 普洱真蝎俗名山螃蟹, 分布于中国云南省普洱市翠云区和澜沧县 (Di *et al.*, 2011)。壮真蝎与普洱真蝎为发现较晚的真蝎属物种, 二者分布的纬度基本相同, 气候相似, 均属于亚热带山地季风气候。壮真蝎与普洱真蝎的传统分类主要依靠触肢螯长宽比, 但二者属于昼伏夜出的物种, 获取样本相对困难, 在样本采集过程中会导致触肢螯、步足、尾部等重要体征脱落, 用游标卡尺对触肢螯长、触肢螯宽、头胸甲长、腿节长、膝节宽等进行测量时, 工作较为繁琐, 且容易产生人为误差。此外, 传统分类学家对壮真蝎与普洱真蝎的物种描述尚未统一, Di 等 (2011) 研究发现壮真蝎与普洱真蝎的触肢螯长宽比分别为 2.9 ~ 3.2 与 2.7; 杨振升 (2012) 分析发现壮真蝎与普洱真蝎的触肢螯长宽比分别为 2.7 ~ 3.7 与 3.1。因此, 仅依靠传统的形态学特征对二者进行准确区分, 存在一定的局限性。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 分子鉴定技术为解决物种分类难题提供了有效手段。

加拿大分类学家 Hebert 于 2003 年首次提出了 DNA 条形码的概念, 即将线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*COI*) 基因的一段长度约 648 bp 的片段作为物种鉴定的基础片段 (Hebert *et al.*, 2003a)。对动物界 11 个门 13 320 个物种的研究结果显示, *COI* 基因序列间的差异能够对动物界所有物种进行有效鉴定 (Hebert *et al.*, 2003b)。由于 DNA 条形码技术无需依赖形态分类就能够对所研究的物种进行准确辨别, 不仅操作简单迅速 (彭居俐等, 2008), 而且减少了物种鉴别的模糊性, 因此被广泛应用。Yamashita 和 Rhoads (2013) 基于线粒体 *COI* 基因对刺尾蝎属 *Centruroides* 的 *C. vittatus* 与 *C. pantheriensis* 构建系统发育树并进行聚类分析, 结果同形态学分类结果吻合。Barrett 和 Hebert (2005) 利用线粒体 *COI* 基因对 168 种蜘蛛及其他 35 种蛛形纲物种 (美洲沙漠木

蝎 *Centruroides vittatus*、土耳其斯坦叶螨 *Tetranychus turkestani*、美洲大革蜱 *Dermacentor variabilis* 等) 的系统发育关系和遗传距离的 DNA 条形码分析发现, *COI* 基因能很好地实现对蜘蛛及其他蛛形纲物种的有效鉴定。何静超等 (2016) 对小五台山 10 属 25 种蟹蛛样本进行划分及 DNA 条形码分子鉴定分析发现, 其划分及鉴定结果同形态学分类方法得出的结果一致。Talal 等 (2015) 利用 *COI* 及其他基因片段对中东金蝎 *Scorpio maurus* 的 *S. maurus fuscus* 和 *S. maurus palmatus* 2 个亚种进行形态特征、系统发育及遗传差异分析发现, 中东金蝎是一个复合种, 与先前的分类观点相符, 并证明了 *S. fuscus*、*S. kruglovi*、*S. palmatus*、*S. propinquus* 物种分类修订的合理性。

目前, 基于线粒体 *COI* 基因对壮真蝎与普洱真蝎的 DNA 条形码进行物种鉴定的相关研究还未见报道, 因此 *COI* 基因能否对壮真蝎与普洱真蝎进行有效鉴定还未曾得知。鉴于此, 本研究首次对形态相似的壮真蝎与普洱真蝎共 24 个个体进行基因组总 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定, 并对二者的遗传距离、系统发育和单倍型网络图进行分析, 以期对二者及其他蝎类物种的鉴定提供分子水平的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

壮真蝎 (编号: HHMZ) 与普洱真蝎 (编号: PELC) 分别采自云南省红河州蒙自市和普洱市澜沧县的潮湿混交林石块、土堆或废墟中, 总计 24 个样本。采样点的经纬度分别为 103.0°E, 22.9°N 和 99.9°E, 22.5°N, 采集后使用数码相机记录样本的形态特征, 选取较为完整的样本进行形态鉴定后, 保存于 75% 乙醇中, 标本存放于云南大学生命科学学院动物学实验室。

1.2 DNA 提取

取样本蝎腹部肌肉组织约 30 mg, 将组织剪碎用 ddH₂O 处理为细胞悬液 (处理 2 次), 按照血液/细胞/组织基因组提取试剂盒 (TIANGEN, 北京) 说明书的步骤提取样本蝎基因组总 DNA, 提取后, 使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计及琼脂糖凝胶电

泳检测技术进行 DNA 浓度和纯度检测,检测后将提取的总 DNA 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.3 PCR 扩增及序列测定

PCR 扩增所用引物为 *COI* 基因通用引物 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'), HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994), 所有引物均由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增体系为 $50\text{ }\mu\text{L}$, 包括 $10\times\text{Buffer}$ $5\text{ }\mu\text{L}$, 25 mM MgCl_2 $5\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ U}/\mu\text{L}$ Taq DNA 聚合酶 $0.15\text{ }\mu\text{L}$, 2.5 mM dNTP $4\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{M}$ 正反引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $31.85\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 35 个循环; 循环结束后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。每次 PCR 扩增均设置阴性对照, 以确保实验过程不受外源 DNA 的污染。扩增结束后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将检测合格的 PCR 产物送北京六合华大基因科技有限公司广州分公司进行双向测序。

1.4 数据分析

将 2 种蝎获得的测序峰图利用 DNASTAR (Burland, 2000) 中的 SeqMan (Swindell & Plasterer, 1997) 进行正反链校对和编辑, 手动去除序列两端的引物区, 获得有效片段的样本序列, 用 MegAlign (Clewley & Arnold, 1997) 进行排序后, 利用 Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998) 进行多序列比对, 采用 DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) 计算信息位点、变异位点、单倍型数, 通过 BioEdit (Hall, 1999) 计算单倍型序列间的相似度, 利用 MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) 分析碱基组成、单倍型间变异位点, 并基于 Kimura-2-parameter (K2P) 模型进行遗传距离分析及采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, 系统发育

树的节点支持率采用自举值进行估计, 重复检测 $1\text{ }000$ 次 (Felsenstein, 1985)。单倍型网络图采用 POPART (Leigh & Bryant, 2015) 构建。

2 结果与分析

2.1 基于 *COI* 基因的序列分析

经 *COI* 基因通用引物 PCR 扩增、序列测定, 共获得 24 条 DNA 序列, 经人工校对后, 获得有效序列长度均为 660 bp , 所测 *COI* 基因序列中未发现碱基的插入或缺失。壮真蝎 15 个样本的 A、T、C、G 平均含量分别为 21.5% 、 45.4% 、 14.0% 、 19.1% , 其中 A + T 含量 (66.9%) 大于 G + C 含量 (33.1%); 15 条序列共检测到 1 个信息位点, 占序列总长度的 0.15% , 4 个变异位点, 4 个单倍型 (HAP1 ~ HAP4), 单倍型之间的相似度为 $99.3\% \sim 99.8\%$ 。普洱真蝎 9 个样本的 A、T、C、G 平均含量分别为 23.1% 、 42.5% 、 15.2% 、 19.2% , 其中 A + T 含量 (65.6%) 大于 G + C 含量 (34.4%), 9 条序列共检测到 2 个信息位点, 占序列总长度的 0.30% , 3 个变异位点, 4 个单倍型 (HAP5 ~ HAP8), 单倍型之间的相似度为 $99.6\% \sim 99.8\%$ 。壮真蝎与普洱真蝎种间相似度为 $90.1\% \sim 90.6\%$ (表 1), 2 种蝎共 8 个单倍型中的变异位点数为 68 , 其中 61 个位点为二者的稳定差异位点, 可作为壮真蝎与普洱真蝎物种鉴定的诊断位点 (图 1)。

2.2 遗传距离分析

基于 *COI* 基因, 利用 MEGA 6.06 中的双参数模型计算壮真蝎与普洱真蝎的遗传距离。结果显示, 壮真蝎 4 个单倍型 (HAP1 ~ HAP4) 间的遗传距离为 $0.002 \sim 0.006$, 平均遗传距离为 $0.004\text{ }0$; 普洱真蝎 4 个单倍型 (HAP5 ~ HAP8) 间的遗传距离为 $0.002 \sim$

表 1 基于 *COI* 基因序列的壮真蝎与普洱真蝎单倍型之间的遗传距离与相似度
Table 1 Genetic distance and similarity of haplotypes from *Euscorplops validus* and *E. puerensis* based on *COI* gene sequences

	HAP1	HAP2	HAP3	HAP4	HAP5	HAP6	HAP7	HAP8
HAP1		0.003	0.002	0.003	0.103	0.103	0.101	0.103
HAP2	0.996		0.005	0.006	0.103	0.103	0.101	0.103
HAP3	0.998	0.995		0.002	0.105	0.105	0.103	0.105
HAP4	0.996	0.993	0.998		0.107	0.107	0.105	0.106
HAP5	0.904	0.904	0.903	0.901		0.003	0.002	0.002
HAP6	0.904	0.904	0.903	0.901	0.996		0.002	0.003
HAP7	0.906	0.906	0.904	0.903	0.998	0.998		0.002
HAP8	0.904	0.904	0.903	0.901	0.996	0.996	0.998	

注: 对角线上方为单倍型间遗传距离, 对角线下方为单倍型间相似度; HAP1 ~ HAP4 为壮真蝎的单倍型, HAP5 ~ HAP8 为普洱真蝎的单倍型。

Notes: The genetic distances between haplotypes are above the diagonal, and the similarities between haplotypes are below the diagonal; HAP1 - HAP4 are the haplotypes of *E. validus*, HAP5 - HAP8 are the haplotypes of *E. puerensis*.

[1111111112	2222222222	2223333333	3344444444	4455555555	5566666666]
[234567889	0135678890	0011123346	7781123467	7936778888	8924445556	88112334]
[3165498170	2780273621	4736921704	6985870535	8658470137	9580130254	25587698]
HHMZ_HAP1	A	A	T	T	T	T	T
HHMZ_HAP2
HHMZ_HAP3
HHMZ_HAP4
PELC_HAP5	G	A	A	A	A	A	A
PELC_HAP6	G	A	A	A	A	A	A
PELC_HAP7	G	A	A	A	A	A	A
PELC_HAP8	G	A	A	A	A	A	A

图 1 基于 COI 基因序列的壮真蝎与普洱真蝎单倍型之间的变异位点

Fig. 1 Variable sites of haplotypes from *Euscorpions validus* and *E. puerensis* based on COI gene sequences

HAP1 ~ HAP4 为壮真蝎的单倍型, HAP5 ~ HAP8 为普洱真蝎的单倍型; 阴影部分为非稳定变异位点。

HAP1 - HAP4 are the haplotypes of *E. validus*, HAP5 - HAP8 are the haplotypes of *E. puerensis*; the shaded regions are non-stable variable sites.

0.003, 平均遗传距离为 0.002 3; 壮真蝎与普洱真蝎单倍型间的遗传距离为 0.101 ~ 0.107, 种间平均遗传距离为 0.103 9 (表 1)。壮真蝎与普洱真蝎种间平均遗传距离显著高于种内平均遗传距离, 为种内平均遗传距离的 34.6 倍。

2.3 系统发育关系与单倍型网络图分析

以 *E. flavicaudis* (GenBank 登录号: KF548117、JN018212、HM418267) 的 3 条序列为外群, 结合本研究的壮真蝎与普洱真蝎单倍型序列, 采用邻接法构建

系统发育树(图 2)。结果显示, 二者的单倍型序列都各自聚为独立的单系枝, 且具有较高的分歧自举值(100%)。为进一步了解二者单倍型之间的关系, 利用 POPART 的中间结合法(Median-joining)构建了 2 种蝎的单倍型网络图(图 3)。结果显示, 8 个单倍型可分为 2 大类群, 普洱真蝎的单倍型为聚类 A, 壮真蝎的单倍型为聚类 B, 无共享单倍型。且壮真蝎的单倍型 HAP2 与普洱真蝎的单倍型 HAP7 之间的突变步数高达 62 步。

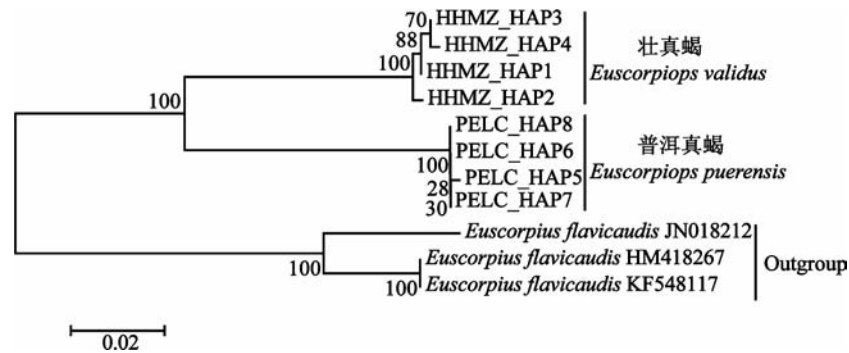


图 2 基于 COI 基因序列构建的壮真蝎和普洱真蝎的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Euscorpions validus* and *E. puerensis* based on COI gene sequences using Neighbor-Joining method

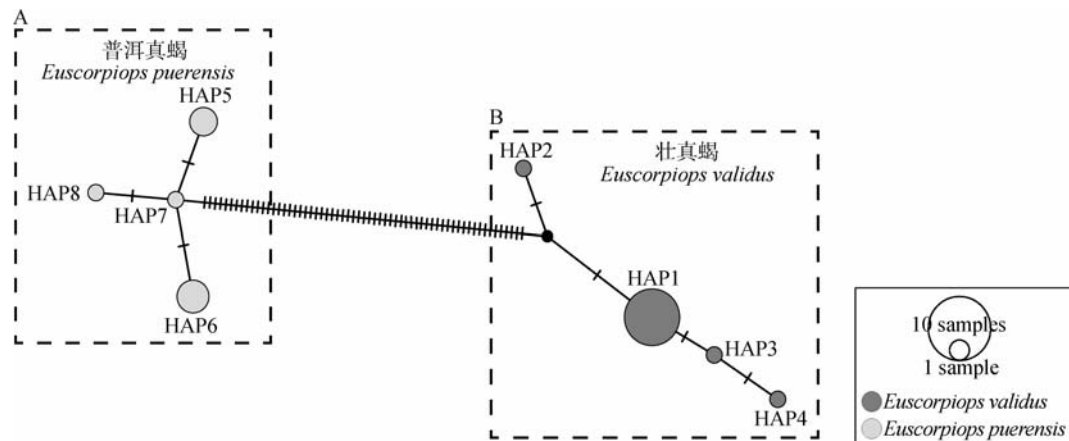


图 3 基于 COI 基因序列构建的壮真蝎与普洱真蝎的单倍型网络图

Fig. 3 The haplotype network of *Euscorpions validus* and *E. puerensis* based on COI gene sequences

3 讨论

线粒体基因序列中稳定的变异位点或核苷酸诊断位点可作为物种划分的鉴别位点。朱振华等(2005)基于线粒体 *Cyt b* 基因对 6 种果实蝇进行序列比对发现,基因片段的 30 个变异位点具有较高的稳定性,可作为果实蝇物种分子鉴定的依据。王康等(2016)通过比较沙果小食心虫 *Grapholita dimorpha* Komai 和梨小食心虫 *G. molesta* Busck 的线粒体 *COI* 基因与 *COII* 基因序列发现,*COI* 基因序列中存在 30 个稳定变异位点,*COII* 基因序列中存在 26 个稳定变异位点,并以此作为 2 种食心虫鉴定的参考依据。Li 等(2011)对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和烟夜蛾 *H. assulta* *COI* 基因序列分析,发现独特的 17 对核苷酸诊断位点可对二者进行区分。本研究发现,壮真蝎与普洱真蝎 *COI* 基因序列间存在 61 个稳定差异核苷酸位点,这些变异位点可作为壮真蝎与普洱真蝎分子鉴定的依据。

线粒体 DNA 序列的差异可作为不同物种划分的依据 (Wiens & Penkrot, 2002; Hebert *et al.*, 2003a)。例如,Avise 和 Walker (1999) 基于线粒体 *Cyt b* 基因序列对 252 种脊椎动物研究发现,90% 的脊椎动物显示出超过 2% 的序列差异。Hebert 等 (2003a) 基于 *COI* 基因序列对 200 种鳞翅目 *Lepidoptera* 昆虫分析发现,*COI* 基因 3% 的序列差异可用于鳞翅目昆虫的物种鉴定。Barrett 和 Hebert (2005) 对 203 种蛛形纲物种 *COI* 基因序列研究发现,*COI* 基因 4% 的序列差异可作为鉴定不同物种的标准。本研究中壮真蝎与普洱真蝎的种间平均序列差异为 9.6%,同 Barrett 和 Hebert (2005) 的研究结果一致。

种内、种间遗传距离是进行物种鉴别的主要标准。本研究基于 *COI* 基因对壮真蝎和普洱真蝎的遗传距离进行分析,发现两者的种内平均遗传距离分别为 0.004 0、0.002 3,同 Hebert 等 (2003b) 对动物界 11 个动物门 13 320 个物种进行分析得出的种内遗传距离大多小于 1%,很少大于 2% 的结论相符。壮真蝎与普洱真蝎的种间平均遗传距离 (0.103 9) 显著高于种内平均遗传距离 (0.003 0),为种内平均遗传距离的 34.6 倍,符合种间平均遗传距离大于种内平均遗传距离 10 倍以上的原理 (Hebert *et al.*, 2004),且种间遗传距离和种内遗传距离无重叠区域,符合对物种进行有效性鉴定的检验标准 (Hebert

et al., 2003a; Aliabadian *et al.*, 2009)。因此,基于线粒体 *COI* 基因的壮真蝎与普洱真蝎的遗传距离分析表明,*COI* 基因可用于 2 种蝎的分子鉴定。

系统发育分析显示,壮真蝎与普洱真蝎的单倍型序列都各自聚为单系枝,且具有较高的分枝自举值 (100%),与遗传距离分析得出的结论一致。单倍型网络图分析发现所有单倍型明显分为 2 大集群,整个单倍型网络图无共享单倍型,且种间的单倍型突变步数高达 62 步。以上鉴定结果同传统分类结论吻合 (Di *et al.*, 2010a, 2010b)。综上所述,基于线粒体 *COI* 基因可实现对壮真蝎与普洱真蝎物种的分子鉴定。

本研究首次利用 *COI* 基因的部分片段序列对真蝎属的壮真蝎与普洱真蝎进行分子鉴定,初步证明了 DNA 条形码对壮真蝎与普洱真蝎物种鉴定的有效性。鉴于本实验的研究利用了 *COI* 基因的部分序列片段,与全长序列相比,包含的信息量有限,且只运用了线粒体 *COI* 基因进行了分析,难免存在一定的局限性。为此,今后需要考虑全长序列的分析及结合其他核基因或运用下一代测序技术开发更加稳定准确的分子鉴定的基因组标记,以此来验证采用分子手段对壮真蝎与普洱真蝎物种鉴定的有效性。

致谢:感谢罗康、罗正荣、唐天强、黄顺福在样品采集中给予的支持和帮助,感谢杨阳、沈灵、饶峻瑜在实验技术方面给予的指导与帮助。

参考文献:

- 何静超, 胡岚岚, 郭晨辉, 等. 2016. 小五台山蟹蛛 DNA 条形码分子鉴定[J]. 河北大学学报(自然科学版), 36(3): 286-292.
- 彭居刚, 王绪楨, 何舜平. 2008. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报, 32(6): 916-919.
- 王康, 李玉婷, 郑燕, 等. 2016. 基于线粒体 *COI* 和 *COII* 基因的沙果小食心虫与梨小食心虫的分子鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 44(2): 156-164.
- 杨振升. 2012. 云南省蝎类资源分布、部分种类再记述和形态差异研究[D]. 昆明: 云南大学.
- 朱振华, 叶辉, 张智英. 2005. 基于 mtDNA *Cytb* 的六种果实蝇的分子鉴定(双翅目: 实蝇科)[J]. 昆虫学报, 48(3): 386-390.
- Aliabadian M, Kaboli M, Nijman V, *et al.* 2009. Molecular identification of birds; performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species [J]. PLoS ONE, 4(1): e4119. DOI:10.1371/journal.pone.0004119.
- Avise JC, Walker D. 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(3): 992-995.

- Barrett RDH, Hebert PDN. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes [J]. Canadian Journal of Zoology, 83(3): 481-491.
- Burland TG. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software [J]. Methods in Molecular Biology, 132: 71-91.
- Clewley JP, Arnold C. 1997. MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE [J]. Methods in Molecular Biology, 70(70): 119-129.
- Di Z, He Y, Wu Y, et al. 2011. The scorpions of Yunnan (China): updated identification key, new record and redescriptions of *Euscorpions kubani* and *E. shidian* (Arachnida, Scorpiones) [J]. Zookeys, 30(82): 1-33.
- Di ZY, Cao ZJ, Wu YL, et al. 2010a. A new species of the genus *Euscorpions* Vachon, 1980 (Scorpiones: Euscorpionidae, Scorpioninae) from Yunnan, China [J]. Zootaxa, 2361(1): 39-48.
- Di ZY, Wu YL, Cao ZJ, et al. 2010b. A catalogue of the genus *Euscorpions* Vachon, 1980 (Scorpiones: Euscorpionidae, Scorpioninae) from China, with description of a new species [J]. Zootaxa, 2361(2477): 49-61.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 39(4): 783-791.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology & Biotechnology, 3(5): 294-299.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 41(41): 95-98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 270(1512): 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences, 270(suppl_1): S96-S99.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, et al. 2004. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biology, 2(10): e312. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, et al. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X [J]. Trends in Biochemical Sciences, 23(10): 403-405.
- Kovařík F, Košulič O, Štáhlavský F, et al. 2015. Two new species of *Euscorpions* Vachon, 1980 from Thailand and Myanmar (Scorpiones: Euscorpionidae: Scorpioninae) [J]. Annales Zoologici, 65(1): 109-122.
- Leigh JW, Bryant D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction [J]. Methods in Ecology & Evolution, 6(9): 1110-1116.
- Li QQ, Li DY, Ye H, et al. 2011. Using *COI* gene sequence to barcode two morphologically alike species: the cotton bollworm and the oriental tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Molecular Biology Reports, 38(8): 5107-5113.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 25(11): 1451-1452.
- Swindell SR, Plasterer TN. 1997. SEQMAN. Contig assembly [J]. Methods in Molecular Biology, 70(70): 75-89.
- Talal S, Tesler I, Sivan J, et al. 2015. Scorpion speciation in the Holy Land: multilocus phylogeography corroborates diagnostic differences in morphology and burrowing behavior among *Scorpio* subspecies and justifies recognition as phylogenetic, ecological and biological species [J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 91: 226-237.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 30(12): 2725-2729.
- Wiens JJ, Penkrot TA. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*) [J]. Systematic Biology, 51(51): 69-91.
- Yamashita T, Rhoads DD. 2013. Species delimitation and morphological divergence in the scorpion *Centruroides vittatus* (Say, 1821): insights from phylogeography [J]. PLoS ONE, 8(7): e68282. DOI:10.1371/journal.pone.0068282.