从核糖体 RNA 基因序列探讨双尾虫的系统进化*

栾云霞[①②] 张亚平[②] 岳巧云[①] 庞峻峰[②] 谢荣栋[①] 尹文英[①**]

(①中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200025; ②中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223)

摘要 双尾虫是否单系, 以及双尾虫与其他六足动物系统关系是多年来动物分类学家争议的一个关键问题. 测定了双尾虫的两大类群: 康虮类和铗虮类, 以及原尾虫、跳虫和蝗虫等核糖体 RNA 基因 18SrDNA 全序列和 28SrDNA 部分序列(D3~D5 区), 并选用甲壳动物卤虫为外群, 采用最大简约(MP)法构建分子系统树. 结果表明: (ⅰ) 18SrDNA 和 28SrDNA 数据整合分析含有较强的系统发育信息, 支持双尾虫单系性观点; (ⅱ) 双尾虫与原尾虫在系统树中构成姊妹群, 且支持率很高.

关键词 双尾虫 六足总纲 18SrRNA 基因 28SrRNA 基因 系统发育

Hennig[1]将传统的、广义的昆虫纲 Insecta *s. lat.*(= 六足总纲 Hexapoda)分为内颚亚纲 Entognatha 和外颚亚纲 Ectognatha, 前者包括原尾目(Protura)、弹尾目(Collembola, 俗称跳虫)和双尾目(Diplura)三类低等六足动物, 后者(即狭义昆虫纲 Insecta *s. str.*)包括石蛃目(Microcoryphia)、衣鱼目(Zygentoma)和有翅昆虫(Pterygota). 随着多年来系统发育研究的不断深入, 在内颚亚纲的高级阶元分类问题上产生了诸多争论, 如双尾虫、原尾虫和跳虫的系统分类地位以及双尾虫的单系性[2~5].

双尾虫主要分为两大类: 康虮类(Campodeidae)具有一对长形多节尾须, 铗虮类(Japygidae)生有一对几丁质化的单节尾铗, 二者在生殖细胞超微结构等方面存在较大差异, 致使双尾虫的单系性受到质疑[6]. 另一方面, 双尾虫的系统地位问题也是争论的一个焦点: 双尾虫是不是昆虫? 它与原尾虫、跳虫以及狭义昆虫的系统关系如何? 这些目前有待解决的问题, 对六足总纲乃至整个节肢动物门的系统分类都有着举足轻重的作用[7~9].

线粒体、核糖体和核编码蛋白等基因已先后被用于六足动物的系统关系分析[10~14]. 相比较而言, 核糖体 RNA 基因(rDNA)具有保守性高等优点, 适于真核生物高级阶元的系统学研究[15,16]. 本文对中国康虮类的韦氏鳞虮(*Lepidocampa weberi*)和铗虮类的爱媚副铗虮(*Parajapyx emeryanus*), 以及 2 种原尾虫、3 种跳虫进行了 18SrDNA 全序列和 28SrDNA 部分序列(D3~D5 区)的测定分析, 并与外颚亚纲的石蛃和蝗虫进行同源比较, 采用甲壳动物卤虫(*Artemia salina*)作为外群, 利用 MP 法构建六足总纲代表类群系统树, 以期为双尾虫的单系性及其系统地位提供

2002-01-14 收稿, 2002-06-24 收修改稿

* 国家自然科学基金重点资助项目(批准号: 30130040)和中国科学院生物科学与技术特别支持费资助项目

** 联系人, E-mail: sieyin@online.sh.cn

新的分子生物学证据.

1 材料与方法

1.1 材料

用 Tullgren 漏斗法收集双尾虫、跳虫和原尾虫标本于 75%乙醇中, 鉴定后用无水乙醇–20℃保存; 中华稻蝗(*Oxya chinensis*)风干室温保存, 涉及物种的相关信息见表 1.

鉴于目前分子证据都认为甲壳动物是六足动物的姐妹群[14,17], 我们选择已报道的甲壳动物卤虫(*A. salina*)作为系统发育关系分析的外群[18],1). 所选的 GenBank 相关 18SrDNA 数据均为全序列, 序列号为 AF005471(康虻)和 AF005473(石蛃)的 28SrDNA 序列仅为 D3 区片段, 序列号为 AF169697(卤虫)的 28SrDNA 序列为 D3~D5 区片段.

1.2 实验技术

用 Gloor 等人[19]的快速提取单只果蝇 DNA 的方法提取单只虫体标本的总 DNA. 提取过程中以无菌水作空白提取对照, 并将其作为 PCR 阴性对照的模板, 以防止外源 DNA 的污染.

目的 DNA 片段扩增和测序的引物设计根据文献[17,20]及 GenBank 序列, 引物信息见表 2. 引物 18SL0001 与 18SR1100 及 18SL0922 与 18SR2090 分别扩增前后各约 1000 bp 序列, 覆盖了 18S 全序列, 根据初步的测序结果设计内引物 18SL0466, 18SR0532, 18SL1362 和 18SR1524 分别将正反链读通. 引物 28SD3a 与 28SD5b 扩增 28SrDNA D3~D5 区段 600~700 bp 序列, 采用内引物 28SD3b 和 28SD5a 测通正反链.

使用 HotStart PCR 技术(98℃预变性 5 min 后加 Taq 酶)进行 PCR 扩增, 反应条件如下: 94℃, 1 min; 46℃~54℃(因不同引物而定), 70 s; 72℃, 70 s, 运行 35 个循环. 循环结束后于 72℃充分延伸 10 min.

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 用回收柱(上海华舜生物试剂公司, W5212)纯化后, 采用 BigDye^{TM} Terminator Kit (Perkin-Elmer), 根据厂家推荐的条件进行测序反应. 在 ABI 377 全自动测序仪(PE Biosystems, Perkin-Elmer, USA)上读取序列. 所有序列至少经过正反链两次重复测定.

1.3 排序和序列分析

用 DNAStar 软件(DNASTAR, Inc. 1996)进行序列编辑, 对所得序列及从 GenBank 中选用的序列进行同源排序. 排序过程参照果蝇 *Drosophila melanogaster* 18SrRNA 和 28SrRNA 的二级结构[21]以及跳虫 *Bilobella aurantiaca* 28SrRNA D3~D5 区的二级结构[20]. 鉴于所分析的是高级阶元间的系统关系, 对于测序中的不够确切的碱基和排序中变异过大的区段予以舍弃[22,23]. 用 MEGA2.1 计算序列的碱基组成和两两序列间的转换、颠换数[24].

1.4 系统发育分析

用 PAUP 4.0b8a[25]的最大简约法(maximum-parsimony, MP)分别对 2 个数据集进行最大简约树的搜索. 用 Partition Homogeneity test[26]检验得到的两个片段是否可以合并为一个数据集进行下一步的分析. 使用 PAUP 4.0b8a 的 PTP test[27]和 g1 统计分析(10000 Random tree)[28]检验数据是否含有对系统发育有价值的信息. Partition Homogeneity test 和 PTP test 的参数如下: heuristic search, 100 random-addition sequences, TBR branch swapping, 1000 replicates.

1) Jarman S N. The relatives of krill inferred from slowly-evolving nuclear rDNA sequences

表 1　双尾虫和其他六足动物代表种及外群的相关信息

物种及其类别	采集地	GenBank 序列号		文献
		18SrDNA 全序列	28SrDNA (D3~D5 区)	
六足总纲 Hexapoda				
双尾纲 (目) Diplura				
康虮科 Campodeidae: 鳞虮属 *Lepidocampa*				
韦氏鳞虮 *Lepidocampa weberi*	上海佘山	AY037167[a)]	AF416870[a)]	本研究
康虮科 Campodeidae: ? 属				
康虮科一种 Compodeidae sp.2		AF005455	AF005471	Giribet, 2000[13]
副铗虮科 Parajapygidae: 副铗虮属 *parajapyx*				
爱媚副铗虮 *Parajapyx emeryanus*	昆明筇竹寺	AY037168[a)]	AF416871[a)]	本研究
原尾纲 (目) Protura				
襞蚖科 Berberentulidae: 巴蚖属 *Baculentulus*				
天目巴蚖 *Baculentulus tienmushanensis*	昆明筇竹寺	AY037169[a)]	AF416872[a)]	本研究
始蚖科 Protentomidae: 新康蚖属 *Neocondeellum*				
长跗新康蚖 *Neocondeellum dolichotarsum*	上海佘山	AY037170[a)]	AF416873[a)]	本研究
弹尾纲 (目) Collembola				
棘蛛科 Onychiuridae: 棘蛛属 *Onychiurus*				
东洋棘蛛 *Onychiurus yodai*	上海佘山	AY037171[a)]	AF416874[a)]	本研究
疣蛛科 Neanuridae: 疣蛛属 *Neanura*				
宽疣蛛 *Neanura latior*	上海佘山	AY037172[a)]		本研究
原蛛科 Poduridae: 原蛛属 *Podura*		AF005452		Giribet, 1998[17]
水生原蛛 *Podura aquatica*	上海植物园		AF416875[a)]	本研究
石蛃目 Microcoryphia				
石蛃科 *Machilidae*: 角蛃属 Dilta				
海滨角蛃 Dilta littoralis		AF005457	AF005473	Edgecombe, 1999[29]
直翅目 Orthoptera				
斑腿蝗科 Catantopidae: 稻蝗属 *Oxya*				
中华稻蝗 *Oxya chinensis*	天津塘沽岗	AY037173[a)]	AF416876[a)]	本研究
甲壳纲 Crustacea				
鳃足亚纲 Branchiopoda: 无甲目 Anostraca				
卤虫科 Artemiidae: 卤虫属 *Artemia*				
卤虫 *Artemia salina*		X01723		Nelles, 1984[18]
			AF169697	Jarman (unpublished)[1)]

a) 本研究所测序列

表 2　扩增和测序 18SrRNA 全序列与 28SrDNA D3~D5 区段的引物

引物名称	5′~3′序列
18SL0001	TAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT
18SR1100	CGA CGA TCC AAG AAT TTC AC
18SL0466	GTT CGA TTC CGG AGA GGG AG
18SR0532	TTG CGC GCC TGC TGC CTT CC
18SL0922	AAT TGG AGT GCT CAA AGC AGG C
18SR2090	CCT ACG GAA ACC TTG TTA CG
18SL1362	CTT AAT TTG ACT CAA CAC GGG
18SR1524	AGT CTC GTT CGT TAT CGG AAT
28SD3a	GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA
28SD3b	TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA
28SD5a	CTC AAA CTT TAA ATG G
28SD5b	ACA CAC TCC TTA GCG GA

1) 见 536 页脚注

对 11 条 18SrDNA+28SrDNA 整合数据用 PAUP 4.0b8a 的最大简约法构建系统发育关系, 参数如下: heuristic search, 100 random-addition sequences, TBR branch swapping. 用 Bootstrapping(1000 replications)[30]和 Decay indices[31]来检验各节点的置信度, 使用的参数与搜索最简约树相同. 用 Autodecay 4.0[32]计算 Decay indices. 在搜索最简约树时, 所有位点被认为是具有 4 种状态(A, T, C, G)的无序位点, 排序中的裂缝作为缺失处理, 缺少的序列片段用“?”代替. 对所有位点采取两种加权方式: (ⅰ) 所有位点等权赋值为“1”[33]; (ⅱ) 根据 MacClade3.0[34]计算的转换/颠换值进行加权.

2 结果

2.1 排序

我们得到了所选物种的 18SrDNA 全序列和除宽疣蛛 *N. latior* 外的 28SrDNAD3~D5 区序列. 序列已存入 GenBank, 序列号见表 1.

对 11 条 18SrDNA 序列和 28SrDNA 序列参照二级结构标准模型分别进行同源排序, 18SrDNA 得到 2038 个碱基位点, 28SrDNA 得到 699 个碱基位点(均含缺失/插入). 变异过大的 18SrDNA 的 704~868, 1502~1640, 1951~2038 区段和 28SrDNA 的 1-202, 515-550 区段予以舍弃. 对其余保守区段(共 2107 bp)进行序列分析和分子系统树构建.

2.2 数据分析

18SrDNA 数据集的平均碱基组成是: T = 22.9%, C = 24.4%, A = 23.7%和 G = 29.1%; 28SrDNA 数据集的平均碱基组成为: T = 19.4%, C = 23.8%, A = 25.0%和 G = 31.8%. 分别对两个数据集进行两两序列间的转换和颠换数计算, 结果表明这两个数据集转换发生的次数均大于颠换(表 3).

表 3 18SrDNA(右上三角)和 28SrDNA(左下三角)两两序列间转换和颠换的数目(转换/颠换)[a)]

比较	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		26/19	82/69	210/176	217/176	192/117	180/107	189/108	196/143	183/131	179/131
2	6/0		89/67	193/179	203/175	181/111	174/101	182/102	185/138	174/127	175/121
3	14/4	4/0		218/213	219/215	192/142	174/133	187/133	204/159	183/154	187/145
4	28/20	10/3	26/18		57/37	174/127	161/120	167/121	177/141	143/134	173/128
5	29/20	10/3	25/20	8/12		169/127	157/120	162/121	171/144	146/135	169/131
6	34/24	15/5	34/23	34/20	30/25		30/19	37/15	142/59	96/55	120/45
7	45/17	17/2	45/17	44/17	39/21	11/6		21/4	128/58	81/51	109/45
8	n	n	n	n	n	n	n		139/55	89/48	114/45
9	12/3	11/3	13/3	12/2	12/2	15/4	16/1	n		94/60	118/75
10	30/21	11/2	26/20	24/19	23/22	13/9	24/5	n	12/1		86/65
11	42/36	12/7	35/32	30/36	29/36	27/32	36/29	n	10/8	22/29	

a) 1 韦氏鳞虻 *L. weberi*; 2 康虻科一种 Campodeidae sp.2; 3 爱媚副铗虻 *P. emeryanus*; 4 天目巴蚖 *B. tienmushanensis*; 5 长跗新康蚖 *N. dolichotarsum*; 6 东洋棘蛛 *O. yodai*; 7 水生原蛛 *P. aquatica*; 8 宽疣蛛 *N. latior*; 9 海滨角蛹 *D. littoralis*; 10 中华稻蝗 *O. chinensis*; 11 卤虫 *A. salina*

2.3 分子系统树的构建

以卤虫 *A. salina* 作为外群, 分别对两个数据集进行最大简约树的搜索: 18SrDNA 数据集得到 2 棵最简约树(未列出), 28SrDNA 数据集搜索得 3 棵最简约树(未列出), 其参数见表 4. 所有 MP 树均支持双尾虫是一个单系群, 并与原尾虫近缘.

Partition Homogeneity test 的检验结果 *P* 为 0.505, 说明得到的两个数据集可以合并进行系

统关系分析. 对合并的数据集进行检验的结果 g1 = –1.271971, $P < 0.001$(PTP 检验), 表明合并数据集含有较强的系统发育信号.

对 18SrDNA 和 28SrDNA 合并数据集, 所有位点等权赋值为“1”进行简约搜索, 得到一棵最简约树, 见图 1(c), 参数见表 4. 根据 MacClade 3.0 计算的转换/颠换为 1.71, 对合并数据

表 4　3 个数据集进行最大简约法搜索的结果

比较	18S rDNA	28S rDNA	整合数据
位点	1646	461	2107
可变位点数	695	122	817
简约信息位点数	487	74	561
简约树的棵树	2	3	1
树长	1134	190	1326
一致性指数(CI)	0.8042	0.8421	0.8084
保留指数(RI)	0.7824	0.7500	0.7772
重标指数(RC)	0.6092	0.6316	0.6283

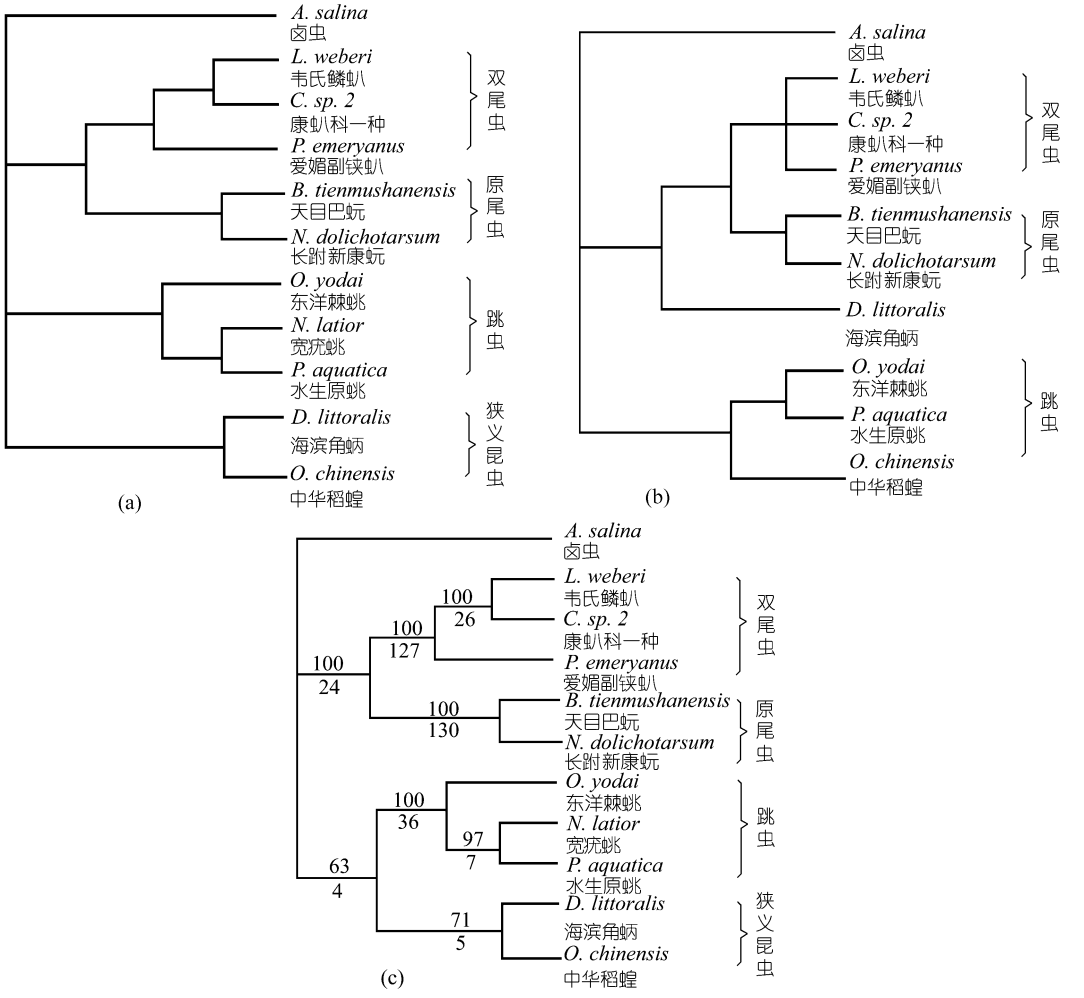


图 1　用最大简约法构建六足动物代表类群部分物种的最大简约树

(a) 基于 18SrDNA 序列构建 2 棵 MP 树的严格合意树; (b) 基于 28SrDNA 序列构建 3 棵 MP 树的严格合意树; (c) 基于 18SrDNA+28SrDNA 整合数据构建的 MP 树. 分支上的数字是 Bootstrapping value, 分支下的数字是 Decay index

集转换的权值为 1, 而颠换权值为 2 加权, 再次进行最大简约树的构建, 所得到的 MP 树的拓扑结构(未列出)与等权赋值的 MP 树相同.

合并数据集得到的简约树(图 1(c))与 18SrDNA 数据集得到的 2 棵简约树的严格合意树(图 1(a))的拓扑结构基本一致, 只是跳虫与狭义昆虫在 18SrDNA 数据分析中没有形成姐妹群; 与 28SrDNA 数据集得到的 3 棵简约树的严格合意树在康虮科一种 Campodeidae sp.2 和海滨角蛎 *D. littoralis* 的位置上略有差别(图 1(b)), 这可能是由于这两条从网上选取的 28SrDNA 序列只有 D3 区段, 缺少 D4, D5 区段. 取大数据集并给予合适的分析方法已经成为分子系统学研究的趋势[35], 因此, 以下分析讨论主要基于合并数据集得到的简约树.

在我们构建的 MP 树上, 六足动物代表类群形成四个聚类组: 双尾虫、原尾虫、跳虫和狭义昆虫(石蛎 + 蝗虫), 其中双尾虫组的支持率非常高: bootstrap support 为 100%, Decay index 为 127. 原尾虫和跳虫的代表物种也呈现好的单系性.

这 4 个聚类组在 MP 树上又可以合并成两大支: 双尾虫和原尾虫形成姊妹群, 且支持率很高(bootstrap support 为 100%, Decay index 为 24); 跳虫与狭义昆虫形成姊妹群, 但支持率稍低(bootstrap support 为 63%, Decay index 为 4).

3 讨论

通过对数据集进行的 g1 statistic 和 PTP test 检验的结果说明 18SrDNA 和 28SrDNA 数据集符合简约假设. 一般认为如果这些数据符合简约假设, 那么把它们合并在一起进行分析, 获得真实系统发育关系的可能性就会增大[36,37]. 尽管未获得宽疣蛛 *N. latior* 的 28SrDNA 序列, 以及选取的网上序列康虮科一种 Campodeidae sp.2 和海滨角蛎 *D. littoralis* 缺少 28SrDNA 的 D4, D5 区段, 但是数据的合并分析可以在一定程度上克服这个缺陷. 例如, 合并数据集的分析结果以很高的支持率认可 3 类低等六足动物(双尾虫、原尾虫和跳虫)的单系性.

双尾虫究竟是不是单系类群? 前人由于康虮类和铗虮类在精子形态、卵巢结构等方面存在明显差异[38], 且与跳虫、原尾虫以及外颚亚纲之间在一些特征上呈现交叉分布, 对双尾虫的单系性有很多争论[39]. Štys 等人[6]提出康虮类与铗虮类应分别提升为目甚至纲[6]. 晚石炭纪托马斯铗虮(*Testajapyx thomasi*)化石的发现也对双尾虫的一些共有衍征提出了质疑[8], 它与现生康虮类明显不同, 如具有明显的复眼, 内口式也不明显. 不过, Bitsch[40]对托马斯铗虮的分类地位的准确性提出了怀疑, 认为将其归入双尾虫主要依据是其铗状的尾须, 而这一特征也可能是平行进化的结果. Roch[4]对内颚亚纲口器等结构研究发现, 康虮类与铗虮类具有相同的内颚结构, 且与跳虫和原尾虫的不同, 支持其单系性观点. 另外, Dallai[41]和 Kristensen[7]也都认为, 铗虮类的精子结构可能是康虮类精子结构的进一步特化, 支持双尾虫是一个单系群.

Shultz 等人[14]利用核编码蛋白 EF-1α和 Pol Ⅱ基因构建的节肢动物分子系统树中, 康虮类和铗虮类不形成单系, 但二者的系统地位都不明确. 而 Carapelli 等人[12]通过 12SrDNA 和 EF-1α基因部分序列的研究结果支持双尾虫的单系性. 本文利用 18SrDNA 序列变异、28SrDNA 序列变异和 18SrDNA + 28SrDNA 序列变异构建得到的分子系统树均显著支持双尾虫的单系性.

双尾虫与六足动物的哪个类群近缘? 从形态分类学研究来看, 双尾虫是界于内、外颚亚纲之间的一个类群: 一方面双尾虫具有尾须、针突和基节囊泡等附器, 与外颚类的石蛃和衣鱼接近;

另一方面它的口器却又是内颚式的, 与外颚亚纲明显不同[4]. Kukalová-Peck[8]根据化石等特征分析认为双尾虫与狭义昆虫是姐妹群, 但正如前面提到, 化石托马斯铗虮的分类地位是否准确已经受到了越来越多学者的怀疑[38]. 从生殖细胞的超微结构来看, 康虮类精子结构与石蛃的精子结构有共同之处, 而其卵巢结构却接近于跳虫; 相反, 铗虮类精子结构与跳虫相近, 但其卵巢结构与狭义昆虫相似[42,38]. 这些错综交叉的特点使得双尾虫的系统发生地位问题长期悬而未决[39].

近年来的分子系统学工作对双尾虫的系统发生有以下几种见解: 邵红光等人[10,11]利用线粒体 *cytb* 数据(约 450 bp)和 COⅡ数据(约 690 bp)分析认为双尾虫与有翅昆虫近缘; Carapelli 等人[12]对线粒体 12SrDNA 数据(约 300 bp)分析支持内颚亚纲的单系性, 即双尾虫与缺尾纲(原尾虫 + 跳虫)形成姐妹群, 而核内 EF-1α基因数据(约 500 bp)分析显示双尾虫与跳虫近缘, 但支持率都不够高. 由于线粒体基因变异速度较快, 对于研究高级阶元的系统关系存在一定的局限性. 本文从核糖体 RNA 基因的高度保守区段着手, 所有 MP 树均显示双尾虫与原尾虫形成姊妹群.

至于六足动物是不是单系类群? 其高级阶元之间的亲缘关系如何? 单系的昆虫纲 Insecta *s.str*. 究竟从哪一个类群开始? 这些都是多年来争论不休的问题. Kristensen[3]最初把双尾虫与跳虫、原尾虫归入缺尾纲 Ellipura, 主张昆虫纲从石蛃目开始, 后来又把双尾虫单独作为一个地位未定的类群放在缺尾纲(原尾虫 + 跳虫)和昆虫纲之间[7]. Kukalová-Peck[8]则提出昆虫纲应从双尾虫开始, 跳虫和原尾虫组成近昆虫纲 Parainsecta, 是昆虫纲的姐妹群, 其观点得到了 Koch[4]的支持. 而 Manton[2]和尹文英等人[9]认为原尾虫、跳虫和双尾虫三者各具独特性, 应分别独立成纲与昆虫纲平行. 随着分子生物学与系统分类学的结合, 各种分子数据的引入, 六足动物系统演化的脉络似乎更加复杂了, Giribet 等人[43]新近整合了 8 个分子标记, 并结合形态学数据分析节肢动物的系统发生, 其结果强调了用“泛甲壳纲 Pancrustacea”取代传统的“六足总纲”与“甲壳纲”分类阶元, 由此引发了更激烈的争论.

我们的分析结果显示六足动物可能是多源发生的, 其中双尾虫与原尾虫形成了姐妹群关系, 并且与狭义昆虫平行, 但跳虫的系统地位并不十分明确. 总的来看, 不支持传统的高级分类阶元内颚亚纲 Entognatha(原尾虫 + 跳虫 + 双尾虫)和缺尾纲 Ellipura(原尾虫 + 跳虫)的单系性, 这些可能是多源的而非自然类群的名称应该慎用.

总之, 对核糖体 RNA 基因的分析表明它包含有解决六足动物系统发生关系有用的信息, 能为双尾虫的系统发育提供有力的分子生物学证据, 明确支持双尾虫的单系性和双尾虫与原尾虫的姊妹群关系. 目前对于分子分析与经典形态学分析结果不一致的问题, 尚待解决. 增添样本种类, 包括六足类和节肢动物中非六足类标本, 选择更多合适的分子标记, 并结合形态、解剖学等特征进行全面的分析将能更准确的阐明它们之间的系统关系.

致谢　衷心感谢杨毅明和肖宁年教授协助采集标本; 感谢王保成提供蝗虫标本; 感谢姚永刚、龙继蓉、何晓芳、刘仲敏和满孝勇等在工作中给予的帮助.

参　考　文　献

1　Hennig W. Kritische bemerkungen zum phylogenetischen system der insekten. Beitr Ent, 1953, 3: 1~85

2 Manton S M. The evolution of arthropodan locomotory mechanisms. Part 10. Locomotory habits, morphology and evolution of the hexapod classes. Zool J Linn Soc, 1972, 51: 203~400
3 Kristensen N P. Phylogeny of insect orders. Ann Rev Ent, 1981, 26: 135~157
4 Koch M. Monophyly and phylogenetic position of the Diplura (Hexapoda). Pedobiologia, 1997, 41: 9~12
5 尹文英. 有关六足动物(昆虫)系统分类中的争论热点. 生命科学, 2001, 13(2): 49~53
6 Štys P, Zrzavý J, Weyda F. Phylogeny of the Hexapoda and ovarian metamerism. Biol Rev Cambridge Phil Soc, 1993, 68: 365~379
7 Kristensen N P. Phylogeny of extant hexapods. In: Naumann I D, ed. The Insects of Australia. Vol. 1. 2nd ed. Carlton: Melbourne University Press, 1991. 125~140
8 Kukalová-Peck J. Fossil history and the evolution of hexapod structures. In: Naumann I D, ed. The Insects of Australia. Vol. 1. 2nd ed. Carlton: Melbourne University Press, 1991. 141~179
9 尹文英, 薛鲁征. 原尾虫比较精子学的研究及其在系统分类学上的重要意义. 中国科学, B 辑, 1992, 22(7): 703~711
10 邵红光, 张亚平, 谢荣栋, 等. 原尾虫 DNA 序列变异及无翅类昆虫的系统进化. 科学通报, 1999, 44(17): 1836~1841
11 邵红光, 张亚平, 柯 欣, 等. 南极隐蛛线粒体 COⅡ基因序列及无翅类昆虫分子进化. 中国科学, C 辑, 2000, 30(3): 330~336
12 Carapelli A, Frati F, Nardi F, et al. Molecular phylogeny of apterygotan insects based on nuclear and mitochondrial genes. Pedobiologia, 2000, 44(4): 361~373
13 Giribet G, Ribera C. A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. Cladistics, 2000, 16: 204~231
14 Shultz J W, Regier J C. Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean+hexapod clade. Proc R Soc Lond, B, 2000, 267: 1011~1019
15 Field K G, Olsen G J, Lane D J, et al. Molecular phylogeny of the animal kingdom. Science, 1988, 239: 748~753
16 Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol, 1991, 66(4): 411~453
17 Giribet G, Ribera C. The position of arthropods in the animal kingdom: a search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. Mol Phylogenet Evol, 1998, 9: 481~488
18 Nelles L, Fang B L, Volckaert G, et al. Nucleotide sequence of a crustacean 18S ribosomal RNA gene and secondary structure of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. Nucleic Acids Res, 1984, 12(23): 8749~8768
19 Gloor G B, C R Preston, D M Johnson-Schlitz, et al. Type I repressors of P element mobility. Genetics, 1993, 135: 81~95
20 Frati F, Dell'Ampio E. Molecular phylogeny of three subfamilies of the Neanuridae (Insecta, Collembola) and the position of the antarctic species *Friesea grisea* Schäffer. Pedobiologia, 2000, 44: 342~360
21 Hancock J M, Tautz D, Dover G A. Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. Mol Biol Evol, 1988, 5(4): 393~414
22 Turbeville J M, Pfeifer D M, Field K G, et al. The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18SrRNA sequences. Mol Biol Evol, 1991, 8(5): 669~686
23 Schulte II J A, Macey J R, Pethiyagoda R, et al. Rostral horn evolution among agamid lizards of the genus *Ceratophora* endemic to Sri Lanka. Mol Phylogenet Evol, 2002, 22(1): 111~117
24 Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Tempe: Arizona State University, 2001
25 Swofford D L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.08b (Sinauer). Sunderland, MA. 2001
26 Farris J S, Kallersjo M, Kluge A G, et al. Testing significance of incongruence. Cladistics, 1994, 10: 315~319
27 Faith D P, Cranston P S. Could a cladogram this short have arisen by chance alone?: on permutation tests for cladistic structure. Cladistics, 1991, 7: 1~28
28 Hillis D M, Huelsenbeck J P. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. J Hered, 1992, 83(3): 189~195
29 Edgecombe G D, Giribet G, Wheeler W C. Phylogeny of Chilopoda: combining 18S and 28S rRNA sequences and morphology. Bol SEA, 1999, 26: 293~331

30 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 1985, 39: 783~791
31 Bremer K. Branch support and tree stability. Cladistics, 1994, 10: 295~304
32 Eriksson T. Autodecay (Hypercard Stack Program). Stockholm: Stockholm University, 1998
33 Cibois A, Pasquet E, Schulenberg T S. Molecular systematics of the Malagasy babblers (Passeriformes: timaliidae) and warblers (Passeriformes: sylviidae), based on cytochrome *b* and 16S rRNA sequences. Mol Phylogenet Evol, 1999, 13(3): 581~595
34 Maddison W P, Maddison D R. MacClade, Analysis of Phylogeny and Character Evolution. Version 3.0 (Sinauer). Sunderland, MA. 1992
35 Murphy W J, Eizirik E, O'Brien S J, et al. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. Science, 2001, 294: 2348~2351
36 Wiens J J. Combining data sets with different phylogenetic histories. Syst Biol, 1998, 47: 568~581
37 Flores-V O, Kjer K M, Benabib M, et al. Multiple data sets, congruence, and hypothesis testing for the phylogeny of basal groups of the Lizard genus *Sceloporus* (Squamata, Phrynosomatidae). Syst Biol, 2000, 49(4): 713~739
38 Bilinski S. The ovary of Entognatha. In: Büning J, ed. The Insect Ovary. London: Chapman & Hall, 1994. 7~30
39 栾云霞, 谢荣栋, 尹文英. 双尾虫系统进化的初步探讨. 动物学研究, 2002, 23(2): 149~154
40 Bitsch J. The morphological groundplan of Hexapoda: critical review of recent concepts. Ann Soc Ent Fr (N.S.), 1994, 30: 103~129
41 Dallai R. Recent findings on apterygotan sperm structure. Acta Zoologica Fennica, 1994, 195: 23~27
42 Jamieson B G M, Dallai R, Afzelius B A. Insects: Their Spermatozoa and Phylogeny. New Hampshire: Science Publishers, 1999. 60~80
43 Giribet G, Edgecombe G D, Wheeler W C. Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. Nature, 2001, 413: 157~161