

DNA 条形码技术在大型海藻学研究中的应用及前景

The application and perspective of DNA barcoding technology on the macroalgae

丁兰平, 马元元, 黄冰心

(汕头大学, 广东汕头 515063)

中图分类号: Q949.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)11-0103-08

DNA 条形码(DNA barcoding)是一段特殊的、可用于物种鉴定的 DNA 序列, 是近几年以来国际上生物分类学研究的主要热点之一^[1], 其技术的发展为后现代生物分类学的研究与完善提供了有力的手段。在一定前提条件下, 它既可以用来验证已知分类群鉴定的准确性, 也可以用来发现新的物种。

简单地说, DNA 条形码是通过将一组来自不同生物个体的较短同源 DNA 序列进行 PCR 扩增和测序, 并对序列进行多重比对和聚类分析, 从而将该个体精确定位到一个已描述的分类群中, 甚至还可提供充分的信息将某些物种定位到特定的地理种群^[2]。

迄今为止, 已有大量的基因片段被作为 DNA 条形码用于物种的鉴定^[3], 既有单一序列也有组合序列^[3-5], 但对于植物 DNA 条形码的选择还没有一个明确的统一标准。目前, 一般认为较理想的 DNA 条形码标准要具有如下特征: 1)种间具有明显的变异而种内变异足够小; 2)应尽可能是一段 DNA 片段; 3)DNA 片段应足够短, 长度约 700 bp 左右, 便于单向测序; 4)存在高度保守区域, 便于设计通用引物; 5)目标 DNA 条形码应包含充分的进化信息, 便于对物种进行系统地位确认^[6-7]。

用 DNA 条形码对物种进行鉴定具有很多优点, 1)不受个体形态特征变异和发育阶段影响; 2)对形态分类难以区分的类群, DNA 条形码可从基因水平上提供一种分类鉴定依据; 3)核苷酸序列数据库作为数字化平台, 能弥补形态鉴定的不足, 从而有利于加快已知物种的识别速度。

鉴于近几年以来 DNA 条形码技术已在海藻学研究中得到了一定程度的应用和发展^[8-19], 为了跟踪国际上的这种新变化, 本文尝试论述大型海藻学研究中 DNA 条形码技术的应用及前景, 目的是希望将

其更广泛地应用于海藻物种多样性鉴定、新物种的发现等研究领域, 促使我国海藻分类学尽快融入国际后现代分类学系统中。

1 背景及发展史

人类在利用地球自然生物资源过程中逐步发展了生物分类学, 正确区分物种, 特别是具有重要经济和/或环境价值的种类, 都离不开对物种的分类鉴定。分类学的主要任务包括描述和鉴定物种, 提供简洁、方便的信息检索系统。分子系统学则是借助于分子水平的标记, 如基因序列进行的系统研究。分子水平标记是近十几年来广泛采用的指标, 但不同的指标针对的系统水平是不同的, 属间分类标准一般采用细胞核或质体基因组标记^[20]。各种分子遗传标记的研究在陆地生物学中已深入开展, 在海洋生物学中分子遗传标记的研究也是方兴未艾^[21]。注意到在物种鉴定中分子系统学的重要性, 最近数十年, 利用 DNA 中携带的遗传信息来探讨植物的系统发育引起了广泛关注, 有许多是关于海藻的^[3-4,8,11,22-23]。随着该领域研究的不断发展, 2003 年, 加拿大 Paul Hebert 教授等首次正式提出了 DNA 条形码的概念^[24]。其基本思想是通过 DNA 片段中 A、T、C 和

收稿日期: 2012-03-11; 修回日期: 2012-06-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31070185)和重大项目(31093440); 广东省科技计划项目(2011B031100010); 广东省自然科学基金团队项目(S2011030005257); 广东省高等学校人才引进项目(2011); 海洋赤潮灾害立体监测技术与应用国家海洋局重点实验室项目(MATHAB20100301); 汕头市科技计划项目(2011-162); 汕头大学科研启动项目(09400133 和 09400134); 汕头大学青年基金项目(YR11004)
作者简介: 丁兰平(1969-), 博士, 教授, 研究方向: 海藻学; 通信作者, 黄冰心, 副教授, 博士, 主要从事海洋生物技术及海藻资源利用研究, 电话: 0754-82904166, E-mail: bxhuang@stu.edu.cn

G 等 4 个碱基在基因中的排列顺序识别物种, 原理类似于现代商品零售业的条形码编码系统。2004 年 5 月, 在华盛顿成立了生物条形码联盟(consortium for the barcode of life, CBOL), 致力于发展鉴定生物物种的全球标准。

2 大型海藻及 DNA 条形码技术的应用

2.1 大型海藻

大型海藻一般指红藻、褐藻、绿藻和蓝藻等四大门类, 和海洋浮游藻类一起构成海洋的主要初级生产者。我国大型海藻物种资源比较丰富, 先后报道了 1 277 个物种^[25]。长期以来, 由于简单的外部形态和内部生理结构、生理上的趋同性以及高度的表型可塑性, 海洋藻类成为用传统方法难以区分和鉴定的类群。海洋藻类的分类学一直是困扰人们的难题^[26], 随着 DNA 条形码的出现, 近几年, 该技术已被逐渐应用于各种海洋大型藻类的分类和鉴定^[11-12]。

2.2 DNA 条形码技术的应用

随着浒苔的暴发, 我国海藻分类学研究成了颇具争议的焦点。面对严峻的质疑和挑战, 开拓新的分类学方法势在必行。其中, DNA 条形码技术由于具有某些较明显的优势而吸引了大家的关注, 虽然在海洋藻类方面尚无统一的基因片断和研究标准。

2.2.1 不同基因序列在大型海藻方面的应用

相对于动物 DNA 条形码技术而言, 高等植物和藻类 DNA 条形码研究进展缓慢且存在较大争议。目前, 已知陆续有 10 种基因序列、15 对引物应用到总计 3 个门类 197 个属 403 个物种中, 而且大多集中在红藻门, 达到 58%, 而绿藻门仅占 5.8%; 研究的基因主要是 COI(Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, 细胞色素 C 氧化酶亚基 I) 基因(26.3%)、ITS(internal transcribed spacer, 内转录间隔区)(17.1%)、UPA(universal plastid amplicon, the portion of 23S rDNA)(12.9%)等^[27]。然而一些作者选择的基因序列及研究对象各不相同, 无法判断目标引物的通用性及适用性。

Lin 等^[28]利用 *rbcL*(1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶大亚基) 基因片段扩增了仙菜目红叶藻科 48 个属 91 份样品, 建立了红叶藻亚科、亮叶藻亚科和红肋藻亚科等三亚科系统进化树, 然而在更高分类阶元上如科、目等, *rbcL* 基因就起不到应有的效果。

Saunders 等^[8] 分析了红藻 3 个群体的 46 个样品的 COI, 发现它能准确地区分形态相似的种类, 并发现了一些新物种。Robba 等^[9] 分析了红藻门 6 个目 79 份样品, 发现其种内差异为 0%~2.6%, 属内种间差异为 5.2%~27.5%, 因此认为 COI 可以分辨近缘种, 且可划分科级以下分类阶元。Sherwood 等^[29] 分析了 107 份藻类样品, 包括红藻、绿藻、褐藻、蓝藻等, 发现 UPA 片段变异范围非常大, 可将大多数种类区分开。褐藻分子系统学研究主要集中在 *rRNA* 基因、*rbcL* 和 *rbcS* 序列分析上^[26], Lane 等^[30] 利用 COI、ITS 和 *rbcSp* (Plastid Rubisco operon spacer) 基因分析了褐藻门翅藻属 *Alaria* 的 54 个样品, 发现单一的 COI 基因片段效果不佳, 而 3 个基因片段的组合则能有效区分大部分种类。Brodie 等^[31] 分析了红藻门紫菜属 102 份样品, 发现 COI 基因片段能将样品鉴定到种。Yang 等^[32] 分析了红藻门江蓠属 11 个种的 28 份样品, 发现 COI 基因片段在江蓠属内的种间差异为 $13\% \pm 3.2\%$, 种内差异为 0.9%, 可将样品区分为 7 个地理群; 而 *rbcL* 基因片段在江蓠属内的种间差异为 1.2%~12.6% (平均 9.7%), 种内差异为 0.289%。Conklin 等^[33] 分析了红藻门麒麟菜属和卡帕藻属的 15 个样品, 发现这两个属的 UPA 基因片段有明显差异, 而属内差异则非常小, 而 COI 基因片段在属级水平上则有明显的差异。Freshwater 等^[14] 发现红藻门石花菜目的 COI 序列比 *rbcL* 序列更多变, 在姐妹种间具有更大的间隔区, 认为 COI 基因更适合作为石花菜目的分子辅助鉴定标签。Rueness^[34] 对海洋红藻中两种多管藻 COI 序列进行了比较, 表明它们只有 1.2% 的不同, 这两种藻类的分类情况被解决。KIM 等^[35] 分析了红藻门 5 个种类 75 个样本的 COI 序列, 其中 4 种江蓠, 一种是龙须菜, 种内不符合的偏差范围在 0%~0.9% 之间, 种间偏差是 9.2%~16.1%。Sherwood 等^[36] 分析了红藻门的 17 个目 290 份样品, 发现 UPA 标记序列成功率为 64.7%, 而 COI 序列是 46.8%, 表明这两个序列在鉴定该样品方面存在一定的差异性。Mattio 等^[37] 研究潜在的 5 种不同的标记作为 DNA 条形码应用在褐藻门马尾藻属, 结果论证了 ITS-2 和 RubisCO 作为条形码标记的不充分性, 虽然它们暗示了作为线粒体标记的潜在性, 还需要额外的研究去进一步评估这些标记的鉴定成功性。McDevit 等^[38] 分析了褐藻门 20 个属 106 个种的 COI 基因片段, 发现其属内种间差异为 3.04%~10.08%, 种内差异为 0.00%~0.46%。Macaya 等^[13] 分析了世界

19 个地点的巨藻属样品(褐藻门)的 COI 基因,发现分布于南半球的隔离种类均为单倍型的。Kucera^[18]将 COI-5P(the 5' region of the mitochondrial cytochrome oxidase 1)作为 DNA 条形码应用到褐藻门墨角藻属 *Fucus* 的样品鉴定中,发现它与其他标记有相同的作用。

目前在褐藻和红藻中 COI 基因片段都是较为理想的条形码片段,但是针对绿藻 COI 基因片段研究较少。

Saunders 和 Kucera^[11]评估了海洋绿藻的 *rbcL*、*tufA*、*UPA*、*LSU* 和 *ITS* 等片段作为 DNA 条形码标记的效果,发现仅 *ITS* 有较低的成功率、*tufA* 标记在扩增时有 95% 的成功率(除刚毛藻科外),认为 *tufA* 适合作为海洋绿藻条形码的标准分子标记。腾林宏^[39]对刚毛藻目不同样品序列的分析和构建的系统树清楚地表明, *ITS* 和 18S rDNA 序列种间差异明显大于种内差异, 18S rDNA 序列种内差异 0.0%~0.1%, 种间差异在 0.3%~6.1%; *ITS* 序列种内差异 0.0%~1.7%, 种间差异 4.9%~63.4%, 显示出分子方法对刚毛藻目物种的分类鉴定具有重要辅助作用。因此,她认为,根据国际 DNA 条形码的技术标准,这两个序列可以作为其分子条形码对物种进行快速有效的鉴定^[39]。

迄今,NCBI(美国国立生物技术信息中心)已公布了 44 种藻类叶绿体全基因组和 40 种藻类线粒体全基因组序列,这是进一步设计和开发大型海藻 DNA 条形码的有用资源,将在基因水平阐述各级分类阶元的划分与系统构建提供有力的支撑信息。

2.2.2 作为条形码的不同基因的优缺点

DNA 条形码需要有一个通用的标准序列,但是找到能够区分全部物种的理想 DNA 片段比较困难。目前认为,线粒体基因适合作为通用 DNA 条形码序列,因为它没有内含子,很少有重组现象,并且大多为母系遗传的单倍体。但植物线粒体基因组进化速率慢,达不到条形码的通用性要求,因此植物 DNA 条形码序列主要在叶绿体和核基因上进行选择。生物条形码联盟植物工作组已经决定将叶绿体 *rbcL* 和 *matK*(叶绿体基因组的成熟酶基因)两个基因片段作为植物 DNA 标准条形码的核心条码,叶绿体 *trnH-psbA*(叶绿体非编码区片段)片段和核基因片段 *ITS* 为植物 DNA 条形码的补充条码。

(1) COI

2003 年,Herbert 研究发现利用 COI 基因一段长度为 648bp 的片段,能够在 DNA 水平上成功地区分

物种。COI 基因序列是区分种间差异的有效分子标记,因此可以利用 COI 基因序列将因地理环境等因素造成表型各异的不同物种和其他种区分开来^[40]。

COI 基因具有以下优点: 1) COI 基因比核基因具有更丰富的系统进化信息,和目前已知的其他蛋白质基因相比,COI 密码子第 3 个位点的碱基置换更频繁,进化速率比 12S rDNA 和 16S rDNA 快 3 倍^[41]; 2) COI 序列比较短,在 650 bp 中就有 4⁶⁵⁰ 个 ATGC 的可能组合,一般情况下其序列种间遗传变异大于种内遗传变异^[42]。缺点: 1) COI 基因在植物中的进化速率远慢于在动物中的,只适用于低等植物中某些藻类的鉴定^[43-44]; 2) 对通常选择 COI 作为 DNA 条形码的标记基因的,因 COI 不能含盖全部物种,所以有时需要选择使用其他片段作为辅助标记基因。已有研究者研究证实 COI 基因作为 DNA 条形码能够准确地区分红藻门物种^[8-9]。

(2) nrITS

核基因组的核糖体 DNA ITS 片段广泛分布于光合真核生物(蕨类植物除外)中,是系统学研究中最常用的片段之一。从 Baldwin^[45]首次把 ITS 应用于植物系统发育研究以来,ITS 已经成为系统发育重建中最受欢迎的序列之一。

ITS 的具有如下优点: 1) 在核基因组中是高度重复的,有利于扩增、克隆和测序^[46]; (2) 经过协同进化,不同 ITS 拷贝间的序列接近纯合^[47],可对种间关系进行精确重建。因此 Kress 等最早将其视为植物条形码候选片段。组成该片段的不同部分(ITS1、ITS2 和 5.8S)序列变异差别较大,5.8S 最为保守,ITS1 的识别效果好于 ITS2^[48]。ITS2 片段较短,易于扩增和测序,尤其对发生 DNA 降解的材料更为有利^[49-50],该片段在种间水平上变异较大,已被广泛用于物种分子鉴定、系统进化和植物条形码研究^[6]。

其缺点: 1) 扩增成功率是 ITS 作为条形码应用的一个限制因素。Kress 和 Erickson^[51]报道,ITS1 正确识别率为 81.5%,但其扩增成功率仅为 60.4%,因此全部样品的正确识别率则下降为 45.8%。2) 长度变异大,多数物种扩增片段长度超过 1 100 bp。3) 存在长的 Poly-G、poly-C 和 poly-A,导致测序和序列分析困难^[52]。4) 核基因自身存在多拷贝的特性,在某些类群中种内变异较大,降低了它作为条形码的应用性^[51]。已有研究者发现 ITS 作为海藻的一些类群的 DNA 条形码标记时有较低的成功性^[11,37]。

但是,随着测序技术的发展及数据分析技术的

进步, ITS 作为组合的条形码之一, 仍具有很大的应用前景。有研究者用包括 ITS 在内的 3 个基因研究藻类, 发现用 3 个基因片段的组合能够有效区分大部分种类^[30]。

(3) *matK*

matK 序列是植物叶绿体 DNA 中进化较快的一条编码区序列, 也是多位研究者推荐的条形码序列之一^[5]。*matK* 基因位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因(*trnK*)的内含子中, 长约 1550bp, 编码一种参与 RNA 转录体中 II 型内含子剪切的成熟酶^[53], 为单拷贝编码基因。

matK 基因具有如下优点: 1) 其进化速率大约是 *rbcL* 的 2~3 倍^[54]; 2) 该基因在系统学研究方面的应用十分普遍^[55-58]。缺点: 1) 一些学者发现在 DNA 条形码研究中, *matK* 扩增效果并不理想^[52,59]; 2) *matK* 片段的引物通用性较差, 鉴定不同类群时往往需要设计不同的引物^[60-61]。因此, 只有在解决了 *matK* 序列的扩增问题, 才有可能作为 DNA 条形码使用。Sanders 等在分析轮藻科 6 个属的藻类时, 发现 *matK* 基因能够鉴定的轮藻科平均分枝长度超过 *rbcL* 基因的 5 倍, 更适合轮藻科的分类鉴定^[62]。目前, *matK* 基因在大型海藻物种鉴定方面的应用研究报道较少。

(4) *trnH-psbA*

trnH-psbA 片段是叶绿体基因中进化速率最快的片段之一^[63]。其优点是 1) 其序列两端具有约 75bp 的保守区, 便于设计通用引物^[64]; 2) *trnH-psbA* 序列已经在很多植物中扩增成功, 且有很好的鉴别能力^[59]; 3) 92% 的物种扩增片段长度为 340~660bp, 且均具有独特的间隔区序列, 符合理想的条形码标准^[6]。其缺点是: 1) 该片段中普遍存在插入/缺失事件, 即使在近缘种间也是如此^[65], 导致不同物种间片段长度变异较大; 2) 该片段具有较高的突变率和简单的序列重复和重排, 在进行序列分析时需要人工校正^[60], 从而限制了在系统发育研究中的应用。由于插入/缺失过多, 导致 *trnH-psbA* 在不同属物种间的比对困难^[6,66]。然而, 比对的难易不是条形码必需的条件, 只要建立了适合的条形码数据分析方法, 插入/缺失还将会丰富物种识别信息^[6]。由于 *trnH-psbA* 变异大, 主要适用于被子植物中物种丰富的属。目前, 很少有研究报道 *trnH-psbA* 在大型海藻物种鉴定方面的应用。

(5) *rbcL*

rbcL 基因为核酮糖-1, 5-二磷酸羧化/加氧酶(Rubisco)的大亚基, 长度约为 1 400 bp, 无内含子。

rbcL 具有如下优点: 1) 在大部分植物中, *rbcL* 片段都比较容易扩增和测序, 已有许多相关报道^[67-69]; 2) 目前, *rbcL* 基因已广泛应用于被子植物科级以上较高类群之间的系统发育分析^[70]; 3) *rbcL* 序列具有通用、易扩增、易比对的特点, 被提议作为条形码片段, 可以用作核心片段将某些未知样品识别到种级以上水平; 4) 通过使用 GenBank 中大约 10 300 条长度大于 1 000 bp 的 *rbcL* 序列进行比较分析, Newmaster 等发现尽管 *rbcL* 不能识别全部物种, 但可以区分不少同属植物。缺点: (1) 由于 Rubisco 在光合作用及光呼吸中所起的关键作用, *rbcL* 基因的进化明显受功能限制, 它的编码序列高度保守。2) 植物中 *rbcL* 片段的变异主要存在于种级以上水平, 物种水平的变异通常不够^[51-52,59,66]。因此, 有人建议将 *rbcL* 与其他 DNA 基因片段组合使用^[71]。但存在的问题是, *rbcL* 的整体长度较长(至少 1 300 bp), 需要使用 4 个引物并进行双向测序才能完成整个基因的测序^[6], 而理想的条形码要求片段长度较短, 因此有些研究仅选取其中一段进行扩增, 如 *rbcL-a*^[71]。Kucera 在 2010 年对 *rbcL*、UPA 及 ITS 等片段进行了评估, 发现 *rbcL*-3P 在若干隐存种类(由于在长期的进化过程中其形态停滞, 从而使其根据形态特征被命名为同一种名的不同种)中作用很显著, 能够很好地区分石莼属的种类。还有一些研究者已证明了 *rbcL* 在鉴定一些大型海藻方面的效果^[14,19]。

(6) UPA 片段

UPA 片段非常适合于藻类的研究, 同时也可作为陆地植物的组合条形码之一^[3]。有研究者提议将 UPA 片段作为光合作用植物的 DNA 条形码, 已有研究表明 UPA 片段在海藻中存在一定的变异, 但在陆地植物中变异率很低^[52,72-73]。Kucera 在 2010 年利用 COI-5P 作为 DNA 条形码对加拿大红藻门紫菜品种进行鉴定时, 通过与 *rbcL* 及 UPA 进行了比较, 从而发现了两个新种。姚雪等^[27]发现 COI、UPA、*rbcL* 三种基因片段引物具有较高的通用性, 在三个门类 28 种海藻的 38 份样品中获得有效基因序列为 65%~82%, 显示出这三个基因片段具有一定的通用性价值。有研究者分析了红藻门多个类群的样品, 发现其 UPA 基因片段能够较好的辨别物种^[33,36]。

(7) 多片段组合

如上所述, 在植物中, 采用单片段的识别率一般不高, 往往不能达到条形码的要求^[52,59,71-72], 靠一个片段来区分杂交种或存在基因渗透的类群也存在

问题^[67]。因此,很有必要把来源于不同基因组的片段加以组合。任保青等^[74]认为:在整个植物界,若想用 1 个基因或 1 个短的 DNA 片段来区别所有物种几乎是不可能的,但是可以通过 1 个条形码组合在基因组范围内实现阶层条形码,进而逐级缩小鉴定范围,最终达到物种自动鉴定的目的。多序列组合方案为植物 DNA 条形码的研究指出了一个新的方向,但根据现有的研究结果筛选出的片段并不能完全满足 DNA 条形码的标准,仍需要大量的实验去验证它们的物种识别和鉴定能力。目前,多序列组合在大型海藻方面也有很广阔的应用前景^[31]。

3 DNA 条形码技术在海藻学的应用 前景及存在的问题

众所周知,大型海藻因其生长环境、发育阶段的不同,外部形态经常发生很大的变化,这就给主要依据形态特征来鉴别物种的经典分类工作带来很大困难。某些藻类的分类结果一直存在争议。与此同时尚存在大量未命名海藻种类,已命名的物种也存在同物异名和异物同名现象。新兴的 DNA 条形码技术能够对我国大型海藻进行高效鉴定和分类,进而加速新物种的发掘。目前,利用 DNA 条形码技术对我国大型海藻进行物种鉴定和分类的报道还较少。随着 DNA 条形码的广泛应用,整个技术体系日趋完善,其在我国大型海藻分类鉴定方面将有广阔的应用前景。

需要强调的是, DNA 条形码技术的使用不能完全脱离经典的分类学研究方法,尤其是未知或尚未界定的物种的分类鉴定工作^[75]。

DNA 条形码技术在应用时仍然存在一些问题。在整个基因组中,有大量的基因序列能够满足我们一个或多个要求。作为 DNA 条形码技术的标准基因,必须一方面足够保守(其引物有强的保守性,能够进行大范围的物种扩增),另一方面有足够的变异来区分不同物种从而达到鉴定的目的,但是理论上不存在一种普遍适用的 DNA 条形码基因。任何一个基因都不可能在各种生物中都保守,同时又包含足够的序列变异信息来进行物种的辨别。因此,在鉴定不同的物种时,需要确定不同的目的基因。另外,植物的线粒体 DNA 因杂交和基因渗入而变异很小,真菌线粒体 DNA 含有内含子。对这些特殊类群的标准条形码基因的选择还有待进一步探讨。另外物种间杂交

造成了在种的水平上有较大的差异,不同物种同一片段的进化速率不同,同时受制于取样数量以及地理群体代表性等,都可能导致种间遗传差异的增大。这使得在藻类中建立类似于动物的 COI 基因片段 DNA 条形码技术成为一项艰巨的任务。但是,随着条形码序列数据的不断积累及其研究范围的不断扩大,条形码技术将逐渐实现与世界范围内其他分类学研究计划的协调发展,作为一种物种鉴定工具,势必在生物系统学和分类学研究中得到广泛应用。

参考文献:

- [1] 葛家文,王好转. DNA 条形码与生物分类学研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(5): 52-53.
- [2] Gregory T R. DNA barcoding does not compete with taxonomy[J]. Nature, 2005, 434: 1067.
- [3] 刘宇婧,刘越,黄耀江,等. 植物 DNA 条形码技术的发展及应用[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(1): 74-82, 93.
- [4] 宁淑萍,颜海飞,郝刚,等. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417-425.
- [5] 李妮,陈士林,刘义梅,等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选[J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [6] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [7] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Power and limitations of the chloroplast trnL(UAA) intron for plant DNA barcoding[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(3): 1-8.
- [8] Saunders G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. Phil Trans R, Soc B, 2005, 360: 1879-1888.
- [9] Robba L, Russell S J, Barker G L, et al. Assessing the use of the Mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of red Algae (Rhodophyta)[J]. American Journal of Botany, 2006, 93(8): 1101-1108.
- [10] Evans K M, Mann D G. A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae[J]. Phycologia, 2009, 48(1): 70-74.
- [11] Saunders G W, Kucera H. An evaluation of *rbcL*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae[J]. Cryptogamie Algologie,

- 2010, 31(4): 487-528.
- [12] Mcdevit D C, Saunders G W. A DNA barcode examination of the Laminariaceae (Phaeophyceae) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights[J]. Phycologia, 2010, 49: 235-248.
- [13] Macaya E C, Zuccarello G C. DNA barcoding and genetic divergence in the giant kelp macrocystis (Laminariales)[J]. Journal of Phycology, 2010, 46(4): 736-742.
- [14] Freshwater D W, Tudor K, O'Shaughnessy K, et al. DNA barcoding in the red algal order Gelidiales: comparison of COI with *rbcL* and verification of the "barcoding gap"[J]. Cryptogamie Algologie, 2010, 31(4): 435-449.
- [15] Gile G H, Stern R F, James E R, et al. DNA barcoding of Chlorarachniophytes using nucleomorph its sequences[J]. Journal of Phycology, 2010, 46: 743-750.
- [16] Saunders G W, McDonald B. DNA barcoding reveals multiple overlooked Australian species of the red algal order Rhodymeniales (Florideophyceae), with resurrection of *Halopeltis* J. Agardh and description of *Pseudohalopeltis* gen. Nov.[J]. Botany, 2010, 88: 639-667.
- [17] Legall L, Saunders G W. Establishment of a DNA-barcode library for the Nemaliales (Rhodophyta) from Canada and France uncovers overlooked diversity in the species *Nemalion helminthoides* (Vellay) Batters[J]. Cryptogamie Algologie, 2010, 31(4): 403-421.
- [18] Kucera H. Species identification and discovery in common marine macroalgae: *Fucus*, *Porphyra* and *Ulva* using a DNA barcoding approach[D]. The University of New Brunswick, PHD, 2010.
- [19] Manghisi A, Morabito M, Bertuccio C, et al. Is routine DNA barcoding an efficient tool to reveal introductions of alien macroalgae? A case study of *Agardhiella subulata* (Solieriaceae, Rhodophyta) in Cape Peloro lagoon (Sicily, Italy)[J]. Cryptogamie Algologie, 2010, 31(4): 423-433.
- [20] 隋正红, 张学成, 孙雪. 红藻分子生物学研究进展 II 分子系统学与进化[J]. 海洋科学, 2004, 28(6): 5-59.
- [21] 刘志毅, 相建海. 微卫星 DNA 分子标记在海洋动物遗传分析中的应用[J]. 海洋科学, 2001, 25(6): 11-13.
- [22] 高杨, 梁君荣, 高亚辉, 等. 赤潮拟菱形藻形态学分类和分子生物技术鉴定研究概述[J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 67-72.
- [23] 汪文俊, 许璞, 王广策, 等. 红毛菜生物学研究进展 II. 系统分类学研究[J]. 海洋科学, 2008, 32(5): 73-77.
- [24] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: 313-321.
- [25] 丁兰平, 黄冰心, 谢艳齐. 中国大型海藻的研究现状及其存在的问题[J]. 生物多样性, 2011, 19(6): 798-804.
- [26] 徐涤, 秦松. 海洋褐藻分子系统学研究进展[J]. 海洋科学, 2002, 26(2): 19-22.
- [27] 姚雪, 于丹, 王绪敏, 等. 大型海洋藻类 DNA 条形码技术的开发与应用[J]. 应用技术, 161-162.
- [28] Lin S M, Fredericq S, Hommersand M H. Systematics of the Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) based on LSU rDNA and *rbcL* sequences, including the Phycodryoideae, subfam Nov[J]. Journal of Phycology, 2001, 37: 881-899.
- [29] Sherwood A R, Presting G G. Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria[J]. Journal of phycology, 2007, 43: 605-608.
- [30] Lane C E, Lindstrom S C, Saunders G W. A molecular assessment of northeast Pacific *Alaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding [J]. Mol Phylogen Evol, 2007, 44: 634-648.
- [31] Brodie J, Mortensen A, Ramirez M E, et al. Making the links: towards a global taxonomy for the red algal genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta)[J]. J Appl Phycol, 2008, 20: 939-949.
- [32] Yang E C, Kim M S, Geraldino P J L, et al. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta)[J]. Journal of applied phycology, 2008, 20: 161-168.
- [33] Conklin K Y, Kurihara A, Sherwood A R. A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii[J]. J Appl Phycol, 2009, 21: 691-699.
- [34] Rueness J. DNA barcoding of select freshwater and marine red algae (Rhodophyta) [J]. Cryptogamie, Algologie, 2010, 31(4): 377-386.

- [35] Kim M S, Yang M Y, Cho G Y. Applying DNA barcoding to Korean Gracilariaceae (Rhodophyta) [J]. Cryptogamie, Algologie, 2010, 31(4): 387-401.
- [36] Sherwood A R, Sauvage T, Kurihara A, et al. A comparative analysis of COI, LSU and UPA marker data for the *Hawaiian florideophyte* Rhodophyta: implications for DNA barcoding of red algae[J]. Cryptogamie, Algologie, 2010, 31(4): 451-465.
- [37] Mattio L, Payri C. Assessment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales) [J]. Cryptogamie, Algologie, 2010, 31(4): 467-485.
- [38] Mcdevit D C, Saunders G W. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol[J]. Phycological research, 2009, 57: 131-141.
- [39] 滕林宏. 中国刚毛藻目海藻的形态及系统发育学研究——兼 DNA 条形码技术在刚毛藻目的应用初探[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2011.
- [40] 张姝, 李喜莲, 崔朝霞, 等. 线粒体基因片段在梭子蟹系统发育及物种鉴定中的应用[J]. 海洋科学, 2008, 32(4): 9-18.
- [41] Knowlton N, Weigt L A. New dates and new rates for divergence cross the Isthmus of Panama [J]. Proc R Soc Lond B, 1998, 265: 2257-2263.
- [42] Dayrat B. Towards integrative taxonomy [J]. Biol J Linn Soc, 2005, 85: 407-415.
- [43] Blaxter M, Mann J, Chapman T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data[J]. Philos Trans R Soc B: Biological Sciences, 2005, 360: 1935-1943.
- [44] Rach J, DeSalle R, Sarkar I N, et al. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata [J]. Proc R Soc B: Biological Sciences, 2008, 275: 237-247.
- [45] Baldwin B G. Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: Chromosomal and morphological evolution reexamined[J]. Amer J Bot, 1993, 80: 222-238.
- [46] 石开明, 彭昌操, 彭振坤, 等. DNA 序列在植物系统进化研究中的应用[J]. 西北民族学院学报, 2002, 20(4): 5-10.
- [47] 李学营, 彭建营, 白瑞霞. 基于核 rDNA 的 ITS 序列在种子植物系统发育研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2005, 25(4): 829-834.
- [48] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals[J]. Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci, 2005, 360: 1889-1895.
- [49] 罗焜. 基于芸香科、天南星科的植物 DNA 条形码通用序列研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2010.
- [50] Chiou S J, Yen J H, Fang C L, et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers[J]. Planta Medica, 2007, 73(13): 1421-1426.
- [51] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region[J]. PloS One, 2007, 2: e508.
- [52] Sass C, Little D P, Stevenson D W, et al. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads[J]. PloS One, 2007, 2: e1154.
- [53] Neuhaus H, Link G. The chloroplast tRNA^{Lys}(UUU) gene from mustard (*Sinapsis alba*) contains a class H intron potentially coding for a maturase related polypeptide[J]. Curr Genet, 1987, 11: 251-257.
- [54] Gadek P A, Alpers D L, Heslewood M M, et al. Relationships within Cupressaceae sensu lato: a combined morphological and molecular approach[J]. American Journal of Botany, 2000, 87: 1044-1057.
- [55] Khidir W, Hilu, Lawrence A. Alice. Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae[J]. American Journal of Botany, 1999, 86: 1735-1741.
- [56] 金虹, 施苏华, 潘恒犯, 等. 含笑亚族及其近缘植物 *matK* 基因序列分析[J]. 中山大学学报, 1999, 38(1): 94-98.
- [57] Mark E, Mort, Douglas E, et al. Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data[J]. American Journal of Botany, 2001, 88: 76-91.
- [58] 李保进. 叶籽银杏 *matK* 和 ITS 序列分析及系统发育研究[D]. 山东: 山东农业大学, 2008.
- [59] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae[J]. Molecular Ecology Resources. 2008, 8(3): 480-490.
- [60] Hollingsworth P M, Forrest L L, Spouge J L, et al. A DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [61] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. *Taxon*, 2007, 56: 295-299.
- [62] Sanders E R, Karol K G, McCourt R, et al. Occurrence of *matK* in a *trnK* group II intron in charophyte green algae and phylogeny of the Characeae[J]. *American Journal of Botany*, 2003, 90(4): 628-633.
- [63] torchová H, Olson M S. The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2007, 268: 235-256.
- [64] Shaw J, Edgar B, Lickey, et al. The tortoise and the hare. II. Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis[J]. *American Journal of Botany*, 2005, 92: 142-166.
- [65] Aldrich J B W, Chemey E, Merlin L C. The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between *PsbA* and *trnH* in the chloroplast genome[J]. *Curr Genet*, 1988, 14: 137-146.
- [66] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2008b, 105: 2923-928.
- [67] Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in the land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2006, 84: 335-341.
- [68] 李耀利, 朱华, 杨俊波. 从 *rbcL* 序列探讨单室茛蓂属的系统位置[J]. *云南植物研究*, 2002, 24(3): 352-358.
- [69] 王彦涵, 张寿州, 高建平, 等. 从叶绿体 DNA *rbcL* 序列分析探讨五味子科的系统发育[J]. *复旦学报: 自然科学版*, 2003, 42(4): 550-554.
- [70] 胡雅琴, 肖娅萍. *rbcL*、*matK* 基因在植物系统进化分析中的应用[J]. *中学生物教学*, 2002, 12: 1-3.
- [71] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region[J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.
- [72] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2802.
- [73] Presting G G. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2006, 84: 1434-1443.
- [74] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术[J]. *植物学报*, 2010, 45(1): 1-12.
- [75] Desalle R. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff[J]. *Conserv Biol*, 2006, 20(5): 1545-1547.

(本文编辑: 张培新)