

DNA 条形码在入侵植物鉴定中的应用进展

田旭飞, 曲 波*

沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866

摘要: 生物入侵对世界经济、环境造成了巨大的影响, 已经成为世界关注的焦点。传统的海关检验方法存在鉴定缓慢、准确率低、鉴定专家稀缺等问题, 因此急需一种鉴定率高、操作简单和快速的方法对入侵植物的繁殖体进行精确的鉴别。DNA 条形码是一种基于 DNA 序列差异进行物种鉴定的技术, 鉴定结果只受样品组织内 DNA 保存状况影响, 不受形态学性状保存状态影响, 只需掌握简单分子生物学技术的工作人员即可实现对未知样品的鉴定, 在入侵植物检疫鉴定中有很大的应用潜力。根据入侵植物进化快、变异多的特点, 可优先考虑种间、种内差异度高的 ITS 基因作为核心条形码, 再以 *matK* 和 *rbcL* 基因为辅助条形码。本文分析了植物 DNA 条形码技术及其衍生出的超级 DNA 条形码和 metabarcoding 技术在入侵植物鉴定中的应用潜力, 提出构建入侵植物 DNA 条形码参考数据库与智能植物志 (iFlora) 相结合, 为利用 DNA 条形码技术对入侵植物进行快速鉴定和相关研究提供参考。

关键词: DNA 条形码; 入侵植物; 超级 DNA 条形码; metabarcoding; 智能植物志

Progress in the use of DNA barcoding in invasive plants identification

Xu-fei TIAN, Bo QU*

College of Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

Abstract: Biological invasion, which has caused huge economic losses and severe environmental disruption, has become an international challenge. Traditional methods of customs inspection has several potential problems, ranging from inefficient sampling strategy, low accuracy, and a lack of specialists, all of which can create opportunities for biological invasion. The technology of identifying species based on DNA differences, the results of DNA barcoding may provide a useful addition to the inspection toolkit. Identification does not depend on morphology but on the quality of the isolated DNA; the process requires molecular biological techniques that are becoming more and more simple. Consequently, these methods will have a huge potential in customs inspection of invasive plants. Considering the complex evolution and variation in plants, the internal transcribed spacer (ITS) with great differences within or between species is suggested as the basis of barcoding supplemented by two chloroplast genes: *matK* and *rbcL*. The database of DNA barcode of alien invasive plants based on DNA barcoding, extended ultra-barcoding, and meta-barcoding combined with iFlora will be a good new method to the fast identification of invasive plants.

Key words: DNA barcoding; invasive plant; ultra-barcoding; meta-barcoding; iFlora

生物入侵已经成为一个极其严峻的问题, 如今甚至可以和能源问题相提并论, 成为世界难题, 每年给世界造成巨大的经济损失 (李振宇和解焱, 2002; Pimentel *et al.*, 2000)。入侵植物一般具有强大的适应能力, 在自然条件下比本地植物的生存和繁殖能力更强, 基本都能快速扩散形成单优群落, 占据生态位, 导致当地生物多样性下降甚至丧失, 严重威胁生态健康; 入侵植物也可加剧许多珍贵濒

危物种的灭绝, 据统计, 35%~46% 的濒危物种因生物入侵而出现灭绝 (张伟亮等, 2006)。此外, 某些入侵植物带有特殊的病原菌或本身含有某种有毒成分, 威胁人们的健康, 如豚草 *Ambrosia artemisiifolia* L. 的花粉容易引起过敏、咳嗽、哮喘, 甚至导致死亡, 其还是枯草热的主要病原。

入侵生物的传播途径主要有 3 种: (1) 有意识引进, 即人为引进具有一定经济价值、实用价值的

收稿日期 (Received): 2015-12-02 接受日期 (Accepted): 2016-02-08

基金项目: 沈阳市大型仪器共享项目 (F13-306-4-00); 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2012ZX07202-004-01)

作者简介: 田旭飞, 男, 硕士研究生。研究方向: 生物入侵。E-mail: txf_job@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: syau_qb@163.com

物种,最后演变为入侵种,如凤眼莲 *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms;(2)无意识引进,即随贸易、运输、旅游等活动传入的物种演变而成的入侵种;(3)自然入侵,即通过物种自身的扩散能力或借助自然条件而实现的入侵。据统计,我国入侵植物已逾 500 种,而其中约有 50%是由于检疫疏漏,随贸易品、运输工具等方式引进,即无意识引进(闫小玲等,2014)。当今是经济全球化的时代,人为活动范围扩大,海关运输、进出口贸易量与日俱增,随之而来就是对检验检疫工作的挑战。检疫工作面临业务量大、鉴定专家匮乏、人力不足等诸多难题,且目前植物物种鉴定以传统的形态学鉴定为主,具有很大的局限性。如繁殖体难以鉴定,其主要以果实或种子形态出现,形态学信息不足,且繁殖体通常夹杂在粮食、羊毛及交通工具中,运输时会发生磨损,形态学信息进一步丢失(伏建国等,2012)。因此,如何快速检疫、鉴定携带或夹带的植物样本或种子是一个至关重要的问题。DNA 条形码技术正是解决此问题的有效途径。

2003 年,Hebert *et al.* (2003) 首次提出了以基因序列作为鉴别不同物种的“条形码”,即 DNA 条形码(DNA barcoding)。DNA 条形码是一种基于 DNA 序列鉴定生物物种的技术,即利用标准化的一个或几个 DNA 片段进行序列分析,根据核苷酸序列差异,对物种进行快速和准确的鉴定。与传统的鉴定方法相比,植物 DNA 条形码技术具有快速、精准的特点,并且不受植物样本生长状态及性状的限制,只需一小片能提取出 DNA 的组织碎片即可鉴定样本(Hibert *et al.*, 2013; Valentini *et al.*, 2009; Yoccoz, 2012; Yoccoz *et al.*, 2012)。DNA 条形码提出至今虽仅有十几年,但发展迅速,取得了很大的成就,已经由当初单一的物种鉴定与分类成功地应用到其他领域,如进化生态学、分子系统学、生物多样性研究等。由此可见,植物 DNA 条形码在入侵植物研究中有巨大的应用潜力。

目前已经有学者提出将 DNA 条形码技术应用于生物入侵的防治与鉴定中(陈士林等, 2013; Shneyer, 2009),并对一些入侵生物进行了研究(龚秀泽等, 2014; 魏晓雅等, 2014; Nagoshi *et al.*, 2011)。但大多以动物为研究对象,有关植物 DNA 条形码技术在植物入侵方面的系统研究较少。

1 入侵植物 DNA 条形码的筛选

1.1 标准 DNA 条形码的选择

标准的条形码必须有统一的标准,才能用一段或多段基因片段尽可能多地对物种进行鉴别和分类。DNA 条形码的选取标准有 2 个方面:(1)片段具有足够的变异性,以鉴别不同的物种,区分不同的分类群;(2)片段大小适中,并且两端具有相对保守序列,便于使用通用引物进行扩增和测序。

动物线粒体中的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit 1, COI) 基因,包含约 650 bp 大小的 DNA 片段,是动物界理想的条形码(程希婷等, 2011; 康晓龙和冯登侦, 2012)。与动物相比,植物的线粒体基因进化缓慢,COI 基因不能用作植物 DNA 条形码。植物叶绿体和核糖体的进化速率快于线粒体,因此,植物学家推荐的潜在条形码区域主要集中在核糖体间隔区和叶绿体基因组上。但是,植物基因组中并未找到一条像 COI 基因在动物界中一样通用的序列,作为通用的植物 DNA 标准条形码。

国内外学者对适合作植物 DNA 条形码的候选基因做了大量的探索与研究。Kress *et al.* (2005)、Kress & Erickson (2007)、Lahaye *et al.* (2008a、2008b)、Newmaster *et al.* (2006、2008) 认为,单个候选片段都有各自的适用范围和优缺点,并提出组合 DNA 条形码形式作为植物 DNA 标准条形码。我国学者刘宇婧等(2011)、宁淑萍等(2008)、任保青和陈之端(2010)、唐建阳和周先治(2009)讨论了植物 DNA 条形码的单片段和多片段组合。结合所有的研究结果,生物条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)建议将 *rbcL* 和 *matK* 作为核心条形码片段,将 ITS 和 *trnH-psbA* 作为参考片段,使用这 4 种片段,可以逐级鉴别到科级、属级、种级类群(Hollingsworth *et al.*, 2009)。

研究表明,入侵植物在进入新地域时,会产生遗传变异等适应性进化,这种进化主要由环境压力、奠基者效应(founder effect)、遗传漂变(genetic drift)以及杂交(hybridization)等作用所引起(冯玉龙等, 2009; Bossdorf *et al.*, 2005)。入侵我国的紫茎泽兰 *Ageratina adenophora* Spreng. 由于受到地理距离、海拔和气候等因素的影响,不同地理种群之间产生了一定程度的遗传分化,这种丰富的遗传多

样性对紫茎泽兰快速适应新环境有重要作用(Gui *et al.*, 2008)。此外,若入侵植物只是一次引入,在经历瓶颈效应和奠基者效应后,入侵种群遗传多样性低于原产地种群;若存在多次引入,则入侵种的遗传多样性不一定比原产地种群低,因为多次引入带来了不同的基因型,使得入侵种群能保留足够的遗传变异,有些在原产地生殖隔离的种群甚至可在入侵地相互接触发生种内杂交,产生新的基因型(潘晓云等, 2006; 施雯等, 2010; Hollingsworth *et al.*, 2009)。可见,入侵植物相对于一般植物进化速度更快。只有选择高灵敏度的DNA序列作为标准条形码片段,才能准确鉴别出可能已经发生一定遗传变异的入侵植物。目前,在热门的植物DNA条形码的候选片段中,并没有公认的在大多数植物中具有高分辨率的条形码。核糖体内转录间隔区ITS(18S-5.8S-26S)认可度很高,是植物分子鉴定中最常用的片段,ITS区段进化速率快,同源性比对复杂。

“黄莺花”由于色彩艳丽、栽培容易、价钱低廉,越来越受到人们的欢迎;但是其外形与恶性入侵植物加拿大一枝黄花 *Solidago canadensis* L.相似,因此学者们对其分类地位一直存在分歧,为该入侵生物的防治工作造成了困难,甚至产生了执法纠纷(马玲和强胜, 2007)。董莹雪(2011)对来自我国华东、华中、西南和华南61个城市的入侵种群和日本、北美原产地的29个种群的加拿大一枝黄花,以及云南、连云港、南京等地市场上销售的“黄莺花”,共计356个样本的ITS序列进行了测序分析,结果显示,加拿大一枝黄花与“黄莺花”的ITS序列并无差异,即市场上销售的“黄莺花”就是入侵植物加拿大一枝黄花。徐晗等(2015)以新疆口岸进境货车截获的未知植物果实为例,采用ITS、*atpF-H*、*psbK-I*3个通用条形码片段分析,*psbK-I*序列仅能初步将未知样品鉴定范围锁定在蔷薇属 *Rosa* sp.; *atpF-H*序列可以得出未知样品与沼泽蔷薇 *R. palustris* 和犬蔷薇 *R. canina* L.的亲缘关系较近;再通过ITS序列重建的系统发育树可见,未知样品与犬蔷薇的相似度最高,最终确定该未知果实为原产于西亚的蔷薇科蔷薇属犬蔷薇。朱珣之和高婷(2014)分析了植物DNA条形码序列ITS2片段在入侵植物中的鉴定能力,结果表明,ITS2序列在入侵物种及其近缘物种间存在明显的遗传差异,种间变异大于种内变异,在17种常见入侵植物与36种近缘物种的300份

样品鉴定中成功率达95.5%。张伟等(2013)利用ndhF、*waxy*3个片段的DNA条形码,对检疫性杂草银毛龙葵 *Solanum elaeagnifolium* Cav.及其近缘种进行了鉴定分析,结果显示,银毛龙葵可以成功从其近缘种中被鉴定出来,3个片段都有较强的分辨力及明显的barcoding gap,可以作为茄属植物的补充条形码。

陈士林等(2013)针对中药植物药材中753属4800种6600个样品的研究结果显示,ITS2序列具有良好的通用性,在种级水平上的分辨成功率可以达到92.7%。为此,该研究小组建议将ITS2序列作为植物DNA条形码之一(韩建萍等, 2012; Chen *et al.*, 2010)。胡伟毅等(2014)通过苍耳属 *Xanthium* sp.(苍耳属中的瘤突苍耳 *X. strumarium* L.是一种恶性入侵植物)对*psbA-trnH*、ITS、ITS2、*rbcL*、*matK*等5种DNA条形码候选基因做了研究对比,发现就苍耳属而言,ITS基因作为植物DNA条形码比ITS2基因具有更好的稳定性;作为植物DNA条形码,*matK*基因优于*psbA-trnH*基因,这对后续的入侵植物DNA条形码筛选具有重要的借鉴意义。Sass *et al.*(2007)研究发现,ITS在属水平上对苏铁目植物鉴定的成功率达80.9%,适于作为苏铁目植物的条形码;但是由于序列存在长的Poly-G、Poly-C和Poly-A,导致测序成功率低。由于核基因组具有多拷贝特性以及二级结构问题导致该片段扩增、测序、比对困难。可见,ITS虽然有很多优势,但也有其局限性。

此外,*matK*也具有进化速率快、片段大小合适、种间差异度高和碱基转换/颠换数低的特点(Chase *et al.*, 2007; Selvaraj *et al.*, 2008),但其引物通用性较差;*rbcL*基因引物通用性好,但只能准确鉴别到属。因此,在初期的入侵植物条形码研究中,建议优先考虑ITS基因,以*matK*和*rbcL*作为辅助基因。

1.2 ultra-barcoding与metabarcoding技术的应用

高通量测序技术的核心理念是边合成边测序,该测序技术单次反应可以对数以百万计的样品进行分析,大大节省了成本和时间,已在全基因组测序、RNA测序和蛋白质相互作用中得到了广泛的应用(王兴春等, 2012)。因此,在此项技术的基础上, Kane & Cronk (2008)提出了运用整个质体基因作为植物DNA条形码,即超级DNA条形码(ultra-bar-

coding, UBC)。Parks *et al.* (2009) 和 Steele & Pires (2011) 讨论了第 2 代测序技术获得完整质体基因组序列在物种鉴定中的应用潜力。Kane *et al.* (2012) 采用高通量第 2 代测序技术 (Illumina 测序技术), 对 9 种基因型、3 个品种的可可树 *Theobroma cacao* L. 和可可树属的大花可可树 *T. grandiflorum* Schum. 的整个质体基因组和核糖体的 6000 多个碱基对进行了测序分析。结果显示, 可以从大花可可树中鉴别出可可树, 甚至还可鉴别出个别基因型的可可树; 并比较了 UBC 数据结果与传统 DNA 条形码片段 *rbcL*、*matK*、ITS 的数据结果, 认为 UBC 可以提供更多的遗传差异信息。因此, UBC 在鉴别近缘种方面有极大的应用前景, 可作为传统 DNA 条形码技术的补充。

在传统组合片段植物 DNA 条形码体系尚未完善的情况下, 建立入侵植物超级 DNA 条形码是可行的选择。对整个质体基因组测序需要先获得完整质体基因组, 再进行长片段 PCR, 最后进行测序。这可能会存在一些问题, 如获得完整质体基因组困难, 提取过程中会受到核基因组干扰, 或质体基因组存在断裂和降解等; 同时, 大量的长片段 PCR 也是一道繁琐的工序。但是, 随着技术的发展, 这些问题都会得到很好的改善 (Shokralla *et al.*, 2014), 如第 3 代测序技术, 即单分子测序技术, 省去了 PCR 这一过程, 直接对待测样品 DNA 分子进行测序 (张得芳等, 2013)。

目前, metabarcoding 技术也是 DNA 条形码研究的热点之一。metabarcoding 技术整合了 DNA 条形码和高通量测序技术, 主要用于环境群落样品或混合样品中的物种鉴定和生物多样性分析 (Yu *et al.*, 2012)。该技术的主要过程: 从混合样品 (如土壤) 中获取总 DNA, 对特定 DNA 条形码片段使用通用引物扩增, 对扩增产物进行高通量 PCR 测序并对测序结果进行分析。这项技术在微生物研究中应用比较广泛。目前, metabarcoding 技术也逐步应用于动物和植物的生物多样性分析中。Coissac *et al.* (2012) 讨论了 metabarcoding 技术在动植物生物多样性分析中所遇到的引物设计、扩增误差、庞大的数据处理等问题, 并提出了相应的解决办法, 为该技术的广泛应用提供了技术参考。唐敏等 (2013) 介绍了 metabarcoding 技术在植物多样性的快速检测、植食性动物的食性分析等方面的应用,

认为该技术最大的优势在于能高通量、低成本并快速地鉴定物种, 最大的局限为 PCR 的偏向性、条形码的解析度和普适性及数据库的完善度。因此, 应用 PCR-free 技术和建立健全的数据库是未来 metabarcoding 技术的工作重点。如果将 metabarcoding 技术应用于入侵植物的群落多样性分析, 将会使鉴定更高效、更准确、更快捷。

2 入侵植物 DNA 条形码参考数据库与 iFlora 数据的构建

建立入侵植物 DNA 条形码研究体系与参考数据库对入侵植物的研究具有重要意义和实用价值, 但目前还没有通用的植物 DNA 条形码, 因此可以优先考虑使用在入侵植物中适用的 DNA 条形码构建体系和参考数据, 甚至可以按照入侵植物的入侵地点和不同物种而利用不同的 DNA 条形码和构建子数据库。

CBOL 建立了生命条形码数据库系统 BOLD, 是专门收集和分析 DNA 条形码数据的平台。BOLD 针对动物类群 DNA 条形码提出了详细的技术规范, 但由于植物类群本身的生物学特点及所用的条形码与动物类群不同, BOLD 提出的技术规范并不完全适用于植物 DNA 条形码研究。因此, 高连明等 (2012) 根据植物生物学特点并结合我国实际研究情况, 从植物样本的野外采集与保存、DNA 提取、条形码片段扩增与测序, 到条形码命名及数据分析等 10 个方面提出了详细标准及规范。李德铎等 (2012) 则以植物 DNA 条形码为核心组件, 进一步融入现代植物学、新一代测序技术、地理信息数据和计算机信息技术等新元素, 提出了新一代植物志 (iFlora) 的研究计划。iFlora 是将现代植物学、DNA 测序技术与信息技术相结合, 通过系列关键技术的集成和攻关, 构建便捷、准确识别植物和掌握相关数字化信息的智能植物志 (或智能装备)。

这些研究对入侵植物 DNA 条形码参考数据库的构建具有重要参考价值, 入侵植物 DNA 条形码作为植物条形码的重要组成部分, 应与植物 DNA 条形码标准保持一致, 因此应依照高连明等 (2012) 提出的 10 个方面的规范, 构建入侵植物 DNA 条形码体系, 实现对入侵植物样品的快速鉴别。iFlora 数据一般分为 3 级: 核心数据库 (一级信息), 包括 DNA 条形码信息、关键识别特征、植物图像识别数

据和分子系统发育核心数据,即能够实现物种鉴定的数据;基础数据(二级信息),即常用的数字化植物数据库信息,包括形态学描述、生境、物候、特征、出现频度、种数及分布、模式信息、经济、用途、形态学分类研究历史、物种名单等,利于用户对类群进行基本认知;拓展数据(三级信息),包括孢粉学、种子形态学、传粉生物学、染色体、次生代谢产物、植物共生关系、生物地理等信息,满足需要对该类群进行深入认识的用户,或满足其他教育、科普之用(杭悦宇等,2013;陆露等,2012)。

除此之外,根据入侵植物自身的特点,入侵植物DNA条形码参考数据库还应具有自己的构成特点,如入侵植物的入侵历史、危害程度、防治方法等。在入侵植物参考数据库中,入侵物种的特点应占重要地位,以方便用户查询阅览。

3 展望

中国科学院昆明植物研究所的iFlora系统(<http://www.iflora.cn>)专门制作了国家重点保护植物、中国药典植物鉴定信息平台。该系统涉及244科1842属7570种,DNA条形码90975条,植物照片87082张,采集信息18524条,种质资源信息31671条,民族植物学4717条,标本信息127万余条,其中包含部分入侵植物物种信息。随着BOLD和iFlora数据库的完善,DNA条形码的鉴定速度会更快,准确度也会更高,进而从侧面拓宽DNA条形码的应用范围,这也正好解决了metabarcoding技术数据对比问题。基因组学和测序技术的发展,将会解决植物标准DNA条形码的选择问题,也可能会找到分辨率更高的DNA片段代替目前的组合条形码,克服植物DNA条形码的发展瓶颈。

随着DNA条形码技术的发展,实现快速检测的DNA条形码试剂盒、微测序仪等技术将成为可能,这将极大地提高鉴别的准确性和速度。建立标准化入侵植物DNA条形码研究体系能够促进DNA条形码在入侵植物研究和海关检疫中的应用,这不仅对植物入侵的早期预防有重要意义,而且能节省人力、财力、物力,并提高鉴定效率。

参考文献

陈士林,庞晓慧,罗焜,姚辉,韩建萍,宋经元,2013. 生物资源的DNA条形码技术. 生命科学, 25(5): 451-459.

程希婷,王爱民,顾志峰,王嫣,战欣,石耀华,2011. DNA条形码研究进展. 基因组学与应用生物学, 30(6): 748-758.

董莹雪,2011. 基于分子标记和形态学的一枝黄花属中国入侵种及鲜切花“黄莺花”的分类鉴定研究. 硕士学位论文. 南京:南京农业大学.

冯玉龙,廖志勇,张茹,郑玉龙,李扬苹,类延宝,2009. 外来入侵植物对环境梯度和天敌逃逸的适应进化. 生物多样性, 17(4): 340-352.

伏建国,杨晓军,钱路,安榆林,2012. 植物DNA条形码技术在出入境检验检疫领域的应用. 植物检疫, 26(2): 64-69.

高连明,刘杰,蔡杰,杨俊波,张挺,李德铎,2012. 关于植物DNA条形码研究技术规范. 植物分类与资源学报, 34(6): 592-606.

龚秀泽, Nopparat B, 卢厚林,李志红,张君潮,2014. 利用DNA条形码技术对截获瓜实蝇幼虫的鉴定研究. 植物检疫, 28(1): 57-60.

韩建萍,宋经元,姚辉,陈晓辰,陈士林,2012. 中药材DNA条形码鉴定的基因序列比较. 中国中药杂志(8): 1056-1061.

杭悦宇,孙小芹,李密密,2013. 关于iFlora核心数据建设中的一些思考. 植物分类与资源学报, 35(6): 701-705.

胡伟毅,汪连军,秦国勋,盛志超,2014. 5种DNA条形码在苍耳属中遗传距离比较. 江苏农业科学, 42(4): 36-38.

康晓龙,冯登侦,2012. DNA条形码及其在动物遗传多样性中的应用. 畜牧与兽医, 44(6): 94-97.

李德铎,王雨华,伊廷双,王红,高连明,杨俊波,2012. 新一代植物志:iFlora. 植物分类与资源学报, 34(6): 525-531.

李振宇,解焱,2002. 中国外来入侵种. 北京:中国林业出版社.

刘宇婧,刘越,黄耀江,龙春林,2011. 植物DNA条形码技术的发展及应用. 植物资源与环境学报, 20(1): 74-82, 93.

陆露,王红,李德铎,2012. iFlora与植物志修订的若干思考——以杜鹃花科白珠树属为例. 植物分类与资源学报, 34(6): 562-584.

马玲,强胜,2007. 利用分子标记技术对鲜切花“黄莺花”的鉴定和分类. 植物分类学报, 45(4): 497-504.

宁淑萍,颜海飞,郝刚,葛学军,2008. 植物DNA条形码研究进展. 生物多样性, 16(5): 417-425.

潘晓云,梁汉钊, Sosa A, 耿宇鹏,李博,陈家宽,2006. 喜旱莲子草茎叶解剖结构从原产地到入侵地的变异式样. 生物多样性, 14(3): 232-240.

任保青,陈之端,2010. 植物DNA条形码技术. 植物学报, 45(1): 1-12.

施雯,耿宇鹏,欧晓昆,2010. 遗传多样性与外来物种的成功入侵:现状和展望. 生物多样性, 18(6): 590-597.

唐建阳,周先治,2009. 植物DNA条形码研究现状及应用

- 前景. 中国农学通报, 25(24): 35-43.
- 唐敏, 伊廷双, 王欣, 谭美华, 周欣, 2013. Metabarcoding 技术在植物鉴定和多样性研究中的应用. 植物分类与资源学报, 35(6): 769-773.
- 王兴春, 杨致荣, 王敏, 李玮, 李生才, 2012. 高通量测序技术及其应用. 中国生物工程杂志, 32(1): 109-114.
- 魏晓雅, 邱德义, 岳巧云, 郭智屏, 2014. 应用 DNA 条形码技术鉴定口岸截获的国内未见分布蚊种. 检验检疫学刊, 24(6): 46-49.
- 徐晗, 孙旻旻, 吴品珊, 王文正, 2015. DNA 条形码、形态学与地理分布相结合的植物果实(种子)鉴定方法——以口岸截获的外来入侵植物犬蔷薇(*Rosa canina* L.)为例. 杂草科学, 33(2): 26-31.
- 闫小玲, 刘全儒, 寿海洋, 曾宪锋, 张勇, 陈丽, 刘演, 马海英, 齐淑艳, 马金双, 2014. 中国外来入侵植物的等级划分与地理分布格局分析. 生物多样性, 22(5): 667-676.
- 张得芳, 马秋月, 尹佟明, 夏涛, 2013. 第三代测序技术及其应用. 中国生物工程杂志, 33(5): 125-131.
- 张伟, 范晓虹, 邵秀玲, 熊玉芬, 李春喜, 2013. DNA 条形码在检疫性杂草银毛龙葵鉴定中的应用研究. 植物检疫, 27(3): 60-65.
- 张伟亮, 杨国强, 申海江, 杨三保, 江军霞, 2006. 外来生物黄顶菊入侵引发的思考. 植物检疫, 20(4): 230-231.
- 朱珣之, 高婷, 2014. 基于 ITS2 序列的 17 种外来入侵植物分子鉴定. 草业科学, 31(10): 1900-1907.
- Bossdorf O, Auge H, Lafuma L, Rogers W E, Siemann E and Prati D, 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, 144(1): 1-11.
- Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgensen T, Cameron K M, Carine M, Pedersen N, Hedderson T A J, Conrad F, Salazar G A, Richardson J E, Hollingsworth M L, Barraclough T G, Kelly L and Wilkinson M, 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2): 295-299.
- Chen S L, Yao H, Han J P, Liu C, Song J Y, Shi L C, Zhu Y J, Ma X Y, Gao T, Pang X H, Luo K, Li Y, Li X W, Jia X C, Lin Y L and Leon C, 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5(1): e8613.
- Coissac E, Riaz T and Puillandre N, 2012. Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, 21(8): 1834-1847.
- Gui F R, Wan F H and Guo J Y, 2008. Population genetics of *Ageratina adenophora* using inter-simple sequence repeat (ISSR) molecular markers in China. *Plant Biosystems*, 142(2): 255-263.
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L and Waard J R, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hibert F, Taberlet P, Chave J, Scotti-Saintagne C, Sabatier D and Richard-Hansen C, 2013. Unveiling the diet of elusive rainforest herbivores in next generation sequencing era? The tapir as a case study. *PLoS ONE*, 8(4): e60799.
- Hollingsworth P M, Forrest L L, Spouge J L, Hajibabaei M, Ratnasingham S, van der Bank M, Chase M W, Cowan R S, Erickson D L, Fazekas A J, Graham S W, James K E, Kim K J, Kress W J, Schneider H, van Alphenstahl J, Barrett S C, van den Berg C, Bogarin D, Burgess K S, Cameron K M, Carine M, Chacón J, Clark A, Clarkson J J, Conrad F, Devey D S, Ford C S, Hedderson T A J, Hollingsworth M L, Husband B C, Kelly L J, Kesanakurti P R, Kim J S, Kim Y D, Lahaye R, Lee H L, Long D G, Madriñán S, Maurin O, Meusnier I, Newmaster S G, Park C W, Percy D M, Petersen G, Richardson J E, Salazar G A, Savolainen V, Seberg O, Wilkinson M J, Yi D K and Little D P, 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31): 12794-12797.
- Kane N C and Cronk Q, 2008. Botany without borders: barcoding in focus. *Molecular Ecology*, 17(24): 5175-5176.
- Kane N, Sveinsson S, Dempewolf H, Yang J Y, Zhang D P, Engels J M M and Cronk Q, 2012. Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 99(2): 320-329.
- Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, Weigt L A and Janzen D H, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23): 8369-8374.
- Kress W J and Erickson D L, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 2(6): e508.
- Lahaye R R Y, Savolainen V, Duthoit S, Maurin O and van der Bank M, 2008a. A Test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as Potential Plant DNA Barcodes Using the Flora of the Kruger National Park (South Africa) as A Model System. [2015-11-10]. <http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.1896.1>.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough T G and Savol-

- ainen V, 2008b. DNA barcoding the floras of bio-diversity-hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8): 2923–2928.
- Nagoshi R N, Brambila J and Meagher R L, 2011. Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm *Spodoptera* species in Florida. *Journal of Insect Science*, 11: 154.
- Newmaster S G, Fazekas A J and Ragupathy S, 2006. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany*, 84(3): 335–341.
- Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D and Janovec J, 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources*, 8(3): 480–490.
- Parks M, Cronn R and Liston A, 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology*, 7: 84.
- Pimentel D, Lach L, Zuniga R and Morrison D, 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *BioScience*, 50(1): 53–65.
- Sass C, Little D P, Stevenson D W and Specht C D, 2007. DNA barcoding in the Cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of Cycads. *PLoS ONE*, 2(11): e1154.
- Selvaraj D, Sarma R K and Sathishkuman R, 2008. Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3(1): 24–27.
- Shneyer V S, 2009. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russian Journal of Genetics*, 45(11): 1267–1278.
- Shokralla F, Gibson J F, Nikbakht H, Janzen D H, Hallwachs W and Hajibabaei M, 2014. Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources*, 14(5): 892–901.
- Steele P R and Pires J C, 2011. Biodiversity assessment: state-of-the-art techniques in phylogenomics and species identification. *American Journal of Botany*, 98(3): 415–425.
- Valentini A, Miquel C, Nawaz M A, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson J E and Taberlet P, 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources*, 9(1): 51–60.
- Yoccoz N G, 2012. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology*, 21(8): 2031–2038.
- Yoccoz N G, Bråthen K A, Gielly L, Haile J, Edwards M E, Goslar T, Von Stedingk H, Brysting A K, Coissac E, Pompanon F, Sønsteby J H, Miquel C, Valentini A, DeBello F, Chave J, Thuiller W, Wincker P, Cruaud C, Gavory F, Rasmussen M, Gilbert M T P, Orlando L, Brochmann C, Willerslev E and Taberlet P, 2012. DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth from diversity. *Molecular Ecology*, 21(15): 3647–3655.
- Yu D W, Ji Y Q, Emerson B C, Wang X Y, Ye C X, Yang C Y and Ding Z L, 2012. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(4): 613–623.

(责任编辑:杨郁霞)