

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2011.01.019

DNA 条形码的应用进展及讨论

武宇鹏^{1,2,3}, 丁亮², 李捷^{4,5}, 武春生², 范仁俊⁴, 朱朝东^{2*}

(1. 山西大学黄土高原研究所, 太原 030006; 2. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学院重点实验室, 北京 100101;

3. 山西省植保植检总站, 太原 030001; 4. 山西省农业科学院植物保护研究所, 太原 030031)

摘要: DNA 条形码 (DNA Barcoding) 是近几年来国际生物研究的热点之一。但是在国内, 相关概念还存在不同程度的模糊, 不利于研究工作的进一步开展。本文在对 DNA 条形码与 DNA 分类 (DNA Taxonomy) 两个不同概念进行辨析的基础上, 回顾与总结了 DNA 条形码的产生背景与应用进展, 并对 DNA 条形码目前所面临的基因交流、取样、计算方法等问题进行了总结和分析, 最后对 DNA 条形码研究前景进行了展望。

关键词: DNA 条形码; DNA 分类

中图分类号: Q969

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2011) 01-0099-08

DNA barcoding: current progresses and discussions

WU Yu-Peng^{1,2,3}, DING Liang², LI Jie⁴, WU Chun-Sheng^{2*}, FAN Ren-Jun⁴, ZHU Chao-Dong^{2*} (1. Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030001, China; 2. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Shanxi Plant Protection and Plant Quarantine Station, Taiyuan 030001, China; 4. Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: DNA Barcoding has been among hot topics in biology in recent years. However, there has been some ambiguity on some relevant concepts, which is not helpful for further studies. In this review, we tried to compare DNA Barcoding and DNA Taxonomy, summarizing methodologies on gene flow, sampling and calculation methods during the procedure. Finally, we looked into the future of DNA Barcoding.

Key words: DNA Barcoding; DNA Taxonomy

1 DNA 条形码产生的背景

分类学是生物学的基础, 是人类认识自然的第一步。自林奈创立双名法近 250 年来, 已经有 170 多万物种被命名。目前全球生物估计的物种数量至少有 1 亿种 (Erwin, 1982; May, 1990; Stock, 1993)。如此巨大的数量, 单靠专业的经典分类学家, 几乎是不可能完成的任务。以平均一个经典分类学家一生鉴定 1000 个物种的标准来计算, 需要 1 万多个经典分类学家同时参与完成。

由于经典分类学方法具有局限性, 很难同时、有效地对某一个地区、某一个项目或某一次大型考察所得到的全部生物样本进行鉴定与记录。以现在人类社会生产力发展的需求来看, 亟需一种更加具有效率的生物物种鉴定体系, 更好地为生产生活服务; 况且现有物种正以每年 1~2 万种的速度在灭绝, 也亟需一种更加具有效率的生物物种鉴定与记录体系, 为人类进一步深入全面地认识自然界和评估自身存在留备更加系统的物种本底资料。

近 20 年来, 快速发展的分子生物学技术为众

基金项目: 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (200803006); 国家自然科学基金项目 (30870268, J0930004)

作者简介: 武宇鹏, 男, 1978 年生, 博士研究生, 研究方向为生态学, E-mail: wuyupeng007@163.com

* 通讯作者 Authors for correspondence, E-mail: zhued@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2010-06-20; 接受日期 Accepted: 2010-09-13

多传统学科提供了新的发展机遇, 分类学亦不例外。利用 DNA 进行物种鉴定已经成功应用到了多个生物类群中 (Hebert *et al.*, 2004a; Ward *et al.*, 2005; Barber *et al.*, 2006; Chantangsi *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008)。国际互联网 DNA 数据平台的构建, 使得大量物种基因信息第一时间公示, 例如美国国家生物技术信息中心 NCBI (National Center of Biotechnology Information) 的 GenBank 数据库中生物基因数据爆炸式增加。但在分类学中, 尚缺乏一个专门将 DNA 序列与分类学相结合的标准。

在此趋势之下, Tautz 等 (2002) 首先提出 DNA 分类的概念 (DNA Taxonomy), 以 DNA 序列为基础建立物种识别体系, 利用 DNA 序列的差异进行种级阶元的分类, 并与林奈命名系统一一对应。利用此体系可以鉴定物种, 也可以解决一些形态学上的难题, 发掘隐存种。Tautz 等 (2003) 指出, 虽然 DNA 测序技术是昂贵的, 但培养一个分类学专家所花成本更大, 而且需要长时间的投入, DNA 分类是未来分类学发展的必然趋势。

随后, Herbert 等 (2003a) 提出 DNA 条形码概念 (DNA Barcoding)。针对形态学分类固有的缺陷, 如表型可塑性和遗传可变性, 无法鉴定隐存分类单元和不同发育阶段的物种等, Herbert 倡导利用线粒体 CO I 基因 (线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因) 作为通用序列, 建立全球性的物种鉴别系统。与其它基因片段相比, CO I 基因有许多优点, 相对保守又有足够的变异, 并且序列长度适中 (Hebert *et al.*, 2003b)。DNA 条形码系统的建筑流程为预先收录已知种名物种的 CO I 基因建立一个庞大的条形码数据库, 将未知种名物种的 CO I 基因输入数据库进行检索, 根据序列相似度来快速鉴定物种, 解决实际问题并不断丰富数据库。这个过程类似于超市利用给商品添加条形码, 分类管理成千上万种不同的商品, 故称之为 DNA 条形码。

2003 年, 全球多位生物学专家在美国冷泉港召开了两次会议, 深入讨论了 DNA 条形码的科学性和社会功能, 提出了国际 DNA 条形码计划——iBOL (International Barcode of Life)。2004 年, “生命条形码联盟” (CBOL, the Consortium for the Barcode of Life) 成立, 至今已经有来自 50 个国家的 170 多个组织成为其会员 (<http://barcoding.si.edu/>)。目前, 针对全球鸟类的计划: All

Birds Barcoding Initiative (www.barcodingbirds.com)、全球鱼类计划: Fish Barcode of Life Initiative (www.fishbol.org)、鳞翅目昆虫计划: All Lepa Barcode of Life (www.lepbarcoding.org)、极地生物计划: Polar Barcode of Life (www.polarbarcoding.com) 等 DNA 条形码项目正在实施中 (关申民等, 2008)。2007 年 5 月, 加拿大圭尔夫大学正式筹建生命条形码数据库系统 (Barcode of Life Data Systems, BOLD)。该数据库不仅包括序列信息, 也包括完整的物种描述、地理分布信息、标本图片等。

有关 DNA 条形码的学术论文也逐年增加。截至目前, 在 Sciencedirect (<http://www.science-direct.com>) 中输入 “DNA barcode” 检索可得到 1155 篇文献。DNA 条形码研究已成为不可逆转的趋势。

2 DNA 条形码的研究进展

DNA 条形码自提出以来, 已在多个类群的研究中得到了应用。包括真菌 (Seifert *et al.*, 2007), 植物 (Kress *et al.*, 2007), 纤毛虫 (Chantangsi *et al.*, 2007), 珊瑚 (Barber *et al.*, 2006), 腹足类 (Remigio and Hebert, 2003), 蜘蛛 (Greenstone *et al.*, 2005), 甲壳动物 (Costa *et al.*, 2007), 昆虫 (Hebert *et al.*, 2004a; Hajibabaei *et al.*, 2006b; Burns *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008), 鱼类 (Ward *et al.*, 2005), 两栖类 (Vences *et al.*, 2005), 鸟类 (Hebert *et al.*, 2004b) 及灵长类 (Lorenz *et al.*, 2005) 等。国内也有学者开展了一些研究, 如高玉石等 (2007)、屠云洁等 (2009) 分别对 6 个地方和 3 个地方鸡的线粒体 CO I 基因多样性进行了研究, 结果表明 CO I 基因对鸡品种的鉴定结果与形态鉴定基本相符。冯毅等 (2009) 利用 DNA 条形码信息研制 DNA 芯片, 成功鉴定了 3 种西花蓟马。彭居俐等 (2009) 的研究表明以 CO I 基因作为鲎属鱼类 DNA 条形码进行物种鉴定具有一定的可行性。王中锋等 (2009) 探讨了 CO I 条码序列在硬骨鱼类辅助物种鉴别的适用性。

传统形态学分类对于一些类群的鉴定非常耗时, 缺乏可用的鉴定性状 (Huang *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2007)。相比之下, DNA 条形码提供了一个快速、简便的鉴定系统 (Herbert *et al.*, 2003a)。在一些生物多样性调查研究中, DNA 条

形码鉴定物种的准确率达到 97% (Janzen *et al.*, 2005) 或 97.9% (Hajibabaei *et al.*, 2006b)。在鳞翅目等类群中, 通过 DNA 条形码发现了大量隐存种或新种 (Herbert *et al.*, 2004a; Monaghan *et al.*, 2005): Vaglia 等 (2008) 通过 DNA 条形码在天蛾科 Sphingidae) 中发现的隐存种与形态学鉴定结果相一致; Silva - Brandão 等 (2009) 认为鳞翅目中出现如此多隐存种, 跟动物相互之间通过模仿或拟态而造成的物种形成或分化有关, 借助 DNA 条形码是很好的研究途径; Janzen 等 (2009) 通过 DNA 条形码研究哥斯达黎加瓜纳卡斯特省 (ACG) 的昆虫标本, 发现该地区鳞翅目 19 个科中, 有 17 个科的种类有所增加。

另外, DNA 条形码能够从不同发育时期的动植物标本或分散的组织中鉴别出物种, 例如对幼鱼的鉴定 (Pegg *et al.*, 2006); Domingo - Roura 等 (2006) 通过对一种名贵的修面刷所用材料进行 DNA 条形码分析, 获知该产品是由欧亚獾 *Meles meles* 的毛所制成; Teletchea 等 (2008) 将 DNA 条形码用在对超市食品的检验上。DNA 条形码也可用在对包含多种生物组合的环境样本如动物的粪便、水、土壤等的鉴定中, 例如根据粪便中提取的线粒体 DNA 多态性, 可以将同一区域活动的阿穆尔豹 *Panthera pardus orientalis* 和西伯利亚虎 *Panthera tigris altaica* 区分开来 (Sugimoto *et al.*, 2006)。

但有不少学者反对仅仅依靠 DNA 序列进行物种分类 (Will and Rubinoff, 2004; Moritz and Cicero, 2004; Will *et al.*, 2005)。他们提出抛弃传统分类方法, 会造成分类学的倒退, 分类学有可能又回归到依据单一性状进行分类的类型学 (typology) 时代; 他们认为仅用 DNA 序列作为分类依据, 会丧失很多有用信息, 特别是颠覆了传统意义上的物种认知, 使人们对物种的理解变成了抽象的代码。也有学者提出应该取消 DNA 分类的概念, 认为 DNA 分类只是部分科学家的一厢情愿, 并没有多少实际意义 (Köhler *et al.*, 2007)。还有学者结合生态学、形态学、行为学等多种性状, 进行物种的鉴定、发现与高级阶元的分类, 即综合分类 (Integrated taxonomy) (Will *et al.*, 2005)。实际上, 无论是 DNA 分类还是 DNA 条形码, 无论在理论上或实际应用中都不可能完全取代传统分类, 但却可以从各种不同的角度和领域填补传统分类的不足或解决一些传统分类无法入手的难题。总

之, DNA 分类和 DNA 条形码研究仍然在飞速向前推进。

3 与 DNA 条形码有关的讨论

3.1 DNA 条形码与 DNA 分类的关系

DNA 条形码与 DNA 分类几乎同时提出, 彼此虽然相互联系, 但又有所不同 (Vogler *et al.*, 2006; Hajibabaei *et al.*, 2007; DeSalle, 2005; DeSalle *et al.*, 2007)。

目的不同: DNA 条形码基于 DNA 序列之间的相似度进行物种鉴定, 注重实效, 而不是构建生命树 (the Tree of Life) 或进行系统发育研究 (Hajibabaei *et al.*, 2007)。DNA 条形码只作为物种鉴定的工具, 并不单独作为物种分类的平台。相比之下, DNA 分类则是要建立一个单独依靠 DNA 序列的分类系统 (Blaxter *et al.*, 2005; Cognato *et al.*, 2006; Vogler *et al.*, 2007)。虽然 DNA 分类结果也需要与林奈命名系统相对应, 但根据 Tautz (2003) 的构想, DNA 分类不依赖形态特征, 能有效排除人为因素, 基于 DNA 序列的分类更为客观, 更接近物种的自然属性。DNA 分类在为物种鉴定提供平台的同时, 还需要进一步探讨物种的系统发育、高阶元分类地位等深层次的内容。

所用基因不完全相同: DNA 条形码在提出之初, 就强调用统一的基因序列进行鉴定, 虽然研究者倡导在解决一些特殊类群, 或处理一些特殊情况如假基因、基因交流等时, 需要再加一条候补基因 (alternate loci/candidate loci) (Hajibabaei *et al.*, 2007)。但目前动物类群中使用较多的仍是 CO I 基因。甚至在一些特殊领域 (如法医) 中, 标本的 DNA 已经降解, 无法提取完整长度的 CO I 基因, 提取的 CO I 基因短到 200 bp ~ 500 bp 也可以准确鉴定物种 (Hajibabaei *et al.*, 2006b)。植物的线粒体基因进化速率较慢, CO I 基因无法有效区分物种, 经过近几年的反复研究讨论, 倾向于在叶绿体基因组中选取不同片段进行组合 (Chase *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2005)。

但在 DNA 分类中, 对于长度仅为 658 bp 的 CO I 基因来讲, 所包含的信息量并不足以很好的解决物种的系统发育等问题。特别是针对一些特殊类群, 仅仅凭借 CO I 基因不具有强大的说服力。所以, 要进行更深层次的分类工作, 一般仍需要再加至少一条其它区域的 DNA 序列 (如核基

因等), 甚至还需要附加其它的性状(生态学、行为学等)来进行辅助研究(Hajibabaei *et al.*, 2007)。

分析方法不完全相同: 虽然 DNA 条形码主要用系统发育分析常用的树来做分析, 但仅仅是为了验证物种的单源性和聚类关系, 通常要求所用分析方法简洁、快速, 所以这些树并不能看做系统发育树。而 DNA 分类为了解决系统发育与高级阶元分类关系等问题, 针对 DNA 序列的特点, 可能要用到多种软件、多种算法构建系统发育树, 运算耗时较长。

从某种程度上来讲, DNA 条形码与 DNA 分类虽然目的不同, 但也可相辅相成, DNA 条形码计划可以为 DNA 分类提供大量可用数据, 完全可以作为 DNA 分类系统的实践部分 (practical component) (Hajibabaei *et al.*, 2007)。

3.2 物种概念的定义

近年来, 有关物种概念的定义一直在争论之中。十九世纪之前, 分类学家主要根据生物表型特征上的差异来识别和区分物种。随着现代综合进化论和群体遗传学的建立, Mayr (1963) 提出了“生物学物种概念”(the biological species concept/BSC), 认为对于有性生殖生物而言, 物种是一个具有共同基因库、与其它类群之间存在生殖隔离的类群。

但物种形成是一个渐进的过程, 何时确定为新物种形成, 有时在分类实践中难以操作。单从进化历史的一个截面上讨论物种问题, 有其局限性 (Hennig, 1966)。有学者认为物种形成是对不同自然环境或性选择的分化适应, 生殖隔离是这种分化适应的副产物, 而没有必要将整个基因组上完全的生殖隔离作为物种形成的绝对标准 (Wu, 2001)。

DNA 条形码的研究不可避免会触及到物种定义的问题。Herbert (2004b) 认为, 种内种间的线粒体 CO I 基因差异存在一个阈值 (barcode gap/threshold), 低于此阈值就可认为是同一个种, 例如鳞翅目大约在 3% 左右 (Herbert *et al.*, 2003a)。不少研究支持这一假设 (鸟类: Hebert *et al.*, 2004b; 鱼类: Ward *et al.*, 2005; 鳞翅目: Hajibabaei *et al.*, 2006b)。但在实际研究中, 许多类群存在种内种间线粒体基因序列差异重叠的现象, 而且各类群、谱系之间的阈值也不相同。有学者认为种内种间差异更多的是经验法则, 缺乏理论

基础, 很难成为适用于所有动物类群的标准值 (Meyer and Paulay, 2005; Hickerson *et al.*, 2006; Wiemer and Fiedler *et al.*, 2007; Townzen *et al.*, 2008)。也有学者指出, 物种的形成是一个动态的、连续的过程, 单用种内种间差异来进行物种定义不能准确将其表达 (Rubinoff *et al.*, 2006)。虽然传统概念上, 生殖隔离的不同物种在 DNA 序列的差异比同一物种之间可能要大, 但 DNA 序列的差异标准难以确定, 是否针对各类群制定不一样的标准, 仍需要进一步研究 (Vogler *et al.*, 2006)。

物种定义是一个复杂的问题, 虽然仅凭 DNA 条形码并不足以解决, 但 DNA 条形码提出的种内种间差异阈值, 及存在的种间基因流等现象可以为进一步修订物种定义提供参考。

3.3 DNA 条形码面临的问题

3.3.1 进化速率

CO I 基因在不同生物中的进化速率并不一致 (Erpenbeck *et al.*, 2006), 如果进化太慢, 则难以鉴别物种。有研究表明, 珊瑚虫线粒体 DNA 种间差异很小, 难以区分物种 (Shearer *et al.*, 2002)。在高等植物中, CO I 基因并不适合物种鉴定 (Kress *et al.*, 2005; Chase *et al.*, 2005; Pennisi, 2007)。在这种情况下, 需要增加其它候选基因。CBOL 植物工作组 (CBOL Plant Working Group) 提出在植物 DNA 条形码中利用两种基因 *rbcL* 和 *matK* 的组合来进行鉴定。而动物中, 各个类群并不一致。对于候选基因的确定, 目前并没有统一。

3.3.2 假基因现象

核内的线粒体基因拷贝 (即假基因 NUMTs, Willams and Kowltton, 2001; Silva - Brandão *et al.*, 2009) 很容易用保守的通用引物与同源的线粒体基因同时扩增出来, 由于假基因进化速率一般较小, 所以会严重影响 DNA 条形码的准确性。虽然假基因可以鉴定 (Thalman *et al.*, 2004; Silva - Brandão *et al.*, 2009), 但仍然会有遗漏, 且其存在不能预知, 给研究带来了较大困难。目前有效避免扩增出假基因的技术正在不断完善, 期待将来能够加以妥善解决。

3.3.3 种间线粒体基因交流

因为线粒体基因属于母系遗传, 所以可能会出现一些导致错误鉴定的现象。比如: 种间杂交和内共生体感染, 杀雄微生物和细胞质不亲和共生菌 (如: 沃尔巴克 *wolbachia*) 所导致的在线粒

体基因上发生的间接选择 (Funk *et al.*, 2000; Whitworth *et al.*, 2007)。沃尔巴克是细胞内寄生、母系遗传的 α -变形菌。约有 17% ~ 76% 的节肢动物被沃尔巴克感染, 包括昆虫及蛛螨类。已有研究发现, 沃尔巴克等内共生菌的存在, 会造成寄主 mtDNA 多态性降低或提高, 从而影响基于 mtDNA 的 DNA 条形码及系统发育研究。也有学者正在积极进行沃尔巴克共生菌的研究, 期待能有效避免其对 DNA 条形码研究的影响。

另外, Funk 和 Omland (2003) 在对 2319 个动物种类的研究中发现有 23% 的动物种类线粒体 DNA 呈多系 (polyphyly) 或并系 (paraphyly), 另外还有发生在一个谱系中的网状进化等现象 (Hulcr *et al.*, 2007; Silva-Brandão *et al.*, 2009), 如果仅用线粒体 DNA 条形码来鉴定物种, 可能会出现很多错误 (Meyer and Paulay, 2005; Meier *et al.*, 2006)。

3.3.4 取样的问题

一些浸泡标本给取样带来了困难。例如浸泡在福尔马林等溶液中的标本, 无法提取 DNA (Frézal *et al.*, 2008)。还有一些个体很小的标本, 如果用作 DNA 提取, 将会完全破坏标本, 或模式标本不复存在。对于后者, 有研究设计出超声波降解法, 从体长在毫米数量级的蚋科昆虫标本中成功地提取 DNA (Mann *et al.*, 2009)。但该方法仍然存在缺陷, 由于 PCR 阻碍物的存在、DNA 释放量不充足以及提取到的 DNA 片段被过度缩短等原因, 并不是所有标本都可按照这种方法提取 DNA 和进行随后的 DNA 序列分析。

也有研究者提出, 因为取样的范围过小和不均匀, 才会出现种内种间有差异阈值的现象存在 (Meyer and Paulay, 2005), 如果增加地理种和近缘种的干扰, DNA 条形码鉴定的准确率就会下降。所以取样时, 尽可能包括同一种群的不同地理亚种, 使 DNA 条形码数据库的覆盖面尽可能扩大, 才能达到准确鉴定物种的目的。而且, 目前对于 DNA 样品的收集和保存还没有一个统一的标准, 保护这些具有潜在价值的 DNA 样品是一个亟待解决的问题。

3.3.5 分析方法

DNA 条形码一般采用 K-2-P (Kimura-2-parameter) 模型计算种内种间距离。K2P 是遗传距离值很小时的最佳模型 (Hebert *et al.*, 2003a), 是生物条形码联盟 (CBOL) 推荐使用的遗传距离

计算模型 (barcoding. si. edu/)。也有少数研究采用多元尺度分析 (Multidimensional scaling, Herbert *et al.*, 2003a)、似然法 (Likelihood, Matz and Neilsen, 2005) 或贝叶斯 (Nielsen and Matz, 2006) 等方法。

常用的系统发育分析方法有 NJ (Neighbor-Joining)、UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean)、ML (Maximum Likelihood)、MP (Maximum Parsimony)、贝叶斯、Austerlitz 等。第二次 iBOL 会议 (台北, 2007 年 9 月) 对几种系统发育分析方法进行了比较, 认为 ML 法比基于遗传距离的系统发育分析方法更准确, 但 ML 法运算时间较长。此外, 所有方法的精确性受取样范围和分类单元内变异程度所影响。Lahaye 等 (2008) 经过研究认为, MP 法和 UPGMA 法得到的物种正确识别率最高, 并在最新的论文中只用这两种方法。但目前 DNA 条形码研究使用较多的仍然是基于遗传距离的系统发育分析方法, 如 NJ 法。在对大规模数据集进行分析时, NJ 法速度较快, 在物种序列同源性较高的情况下, NJ 法的准确性是值得信任的。

一些研究者认为基于遗传距离的计算方法有缺陷, 如种内种间差异经常发生重叠的问题, 而这些缺陷可用基于多种性状的分析方法 (character-based approach) (DeSalle *et al.*, 2005) 或纯粹基于分类算法的统计方法 CAOS (characteristic attribute organization system) (Sarkar *et al.*, 2002) 加以解决。但这些方法目前仅在蜻蜓目 (Rach *et al.*, 2008)、石鳖 (Kelly *et al.*, 2007) 等类群中应用。其它计算方法还有最大似然法、BLAST 等, 但均未广泛应用。

4 DNA 条形码计划在中国的进展

由 CBOL 主办的国际条形码会议已经举办了三届, 我国均有代表与会。2008 年 4 月, 中国科学院代表团与 iBOL 签订了合作谅解备忘录, 使我国成为 iBOL 四个中心节点之一, 与加拿大、美国和欧盟具有同等地位。随后又成立了 iBOL 中国委员会, 该委员会设立了南方和北方两个分中心, 该委员会的主要宗旨在于加强我国与 iBOL 的合作, 同时搭建中国 DNA 条形码数据库体系与协同工作平台并召开 iBOL 中国委员会会议, 争取经费, 合理配置人力资源, 推动学科发展。

在中国科学院知识创新工程重要方向性项目的支持下, DNA 条形码技术规程和规范体系已在准备和探讨, 对不同类群的启动策略、数据库构建、人才队伍建设已有比较全面的设计。优先启动农林害虫、药用昆虫、媒介昆虫、传粉昆虫、外来入侵物种、重要保护动物等具有重要经济及理论价值的类群。中国 DNA 条形码的数据库平台, 在 iBOL 中国委员会南方中心和北方中心的共同努力下已经建成, 数据库的整体结构与加拿大的总库保持一致。

5 DNA 条形码研究展望

不同物种的传统鉴定工作常常需要采用不同的方法和技术, 而 DNA 条形码大大简化了这个程序, 在一定程度上是一个较为通用的标准方法 (Hajibabaei *et al.*, 2007)。DNA 条形码在各个领域与不同类群的研究中, 所取得的成果有目共睹。针对 DNA 条形码可行性的争论似乎已经不再继续, 科学家们目前正在各自领域争分夺秒地获取大量条形码数据, BOLD 系统正以每年 300 万条序列, 30 万个样本的速度扩充。DNA 条形码数据库不但可以为鉴定物种服务, 同时获取的大量资源可为系统发育学、种群遗传学等学科提供有用信息。iBOL 是一个庞大的工程, 取样、证据标本、DNA 提取都需要大量资金和人力, 需要各国分类学、生态学等专家的通力合作才能完成。为了能尽快检验 DNA 条形码的准确性和便捷性, 及早建立一个完整类群的条形码数据库是非常必要的。DNA 条形码的特点和优势, 使 DNA 条形码在生物多样性调查研究、保护生物学、有害生物控制、流行病传染源检测、法医、食品工业及检验检疫等领域都将有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- Barber P, Boyce SL, 2006. Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proc. R. Soc. B*, 273: 2053-2061.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360: 1935-1943.
- Burns JM, Janzen, DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN, 2008. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste. Costa Rica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 6350-6355.
- Costa FO, deWaard JR, Boutillier J, Ratnasingham S, Dooh RT, Hajibabaei M, Hebert PDN, 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 64: 272-295.
- Chantangsi C, Lynn DH, Brandl MT, Cole JC, Hetrick N, Ikononi P, 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of the genus *Tetrahymena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 2412-2425.
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 360: 1889-1895.
- Cognato AI, Caesar RM, Blaxter M, Vogler AP, 2006. Will DNA barcoding advance efforts to conserve biodiversity more efficiently than traditional taxonomic methods? *Frontiers in Ecology and Environment*, 4: 268-273.
- Desalle R, Egan MG, Siddall ME, 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation, and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360: 1905-1916.
- DeSalle R, 2007. Phenetic and DNA taxonomy; a comment on Waugh. *BioEssays*, 29: 1289-1290.
- Domingo-Roura X, Marmi J, Ferrando A, López-Giráldez F, Macdonald DW, Jansman HAH, 2006. Badger hair in shaving brushes comes from protected Eurasian badgers. *Biol. Co. Jansman nser*, 128: 425-430.
- Evans KM, Wortley AH, Mann DG, 2007. An assessment of potential diatom "barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist*, 158: 349-364.
- Erwin TL, 1982. Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *Coleopt. Bull.*, 36: 74-75.
- Erpenbeck D, Hooper JNA, Worheide G, 2006. COI phylogenies in diploblasts and the 'Barcoding of Life' - are we sequencing a suboptimal partition? *Mol. Ecol. Notes*, 6: 550-553.
- Funk DJ, Helbling L, Wernegreen JJ, Moran NA, 2000. Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B*, 267: 2517-2521.
- Funk DJ, Omland KE, 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 34: 397-423.
- Fen Y, Wang L, Bai, YF, Wang J, Feng JN, 2009. Molecular identification of *Frankliniella* based on CO I sequences by DNA Barcoding Chip. *Bio. Technology Bull. Etin.*, 8: 169-173 [冯毅, 王莉, 白云峰, 王洁, 冯纪年. 2009. 基于 CO I 序列快速鉴定花蓟马的 DNA 条形码芯片初探. 生物技术通报, 8: 169-173]
- Greenstone MH, Rowley DL, Heimbach U, Lundgren JG, Pfannenstiel RS, Rehner SA, 2005. Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders. *Mol. Ecol.*, 14: 3247-3266.
- Gao YS, Tu YJ, Tong HB, Wang KH, Chen KW, Gu R, 2007. DNA barcoding application of mtDNA CO I gene in identifying six indigenous chicken breeds in China. *Journal of Agricultural Biotechnology*

- gy, 15 (6): 924–930. [高玉石, 屠云洁, 童海兵, 王克华, 陈宽维, 顾荣, 2007. 6 个地方鸡种线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码. 农业生物技术学报, 15 (6): 924–930]
- Guan SM, Gao BQ, 2008. CO I sequence, the DNA Barcode affecting animal taxonomy and ecology. *Chinese Journal of Ecology*, 27 (8): 1406–1412. [关申民, 高邦权, 2008. CO I 序列: 影响动物分类学与生态学的 DNA Barcode. 生态学杂志, 27 (8): 1406–1412]
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B*, 270: 313–321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B*, 270, S96–S99.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 14812–14817.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM, 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *Plos. Biol.*, 2: 1657–1663.
- Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN, 2006a. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol. Ecol. Notes.*, 6: 959–964.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006b. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 103: 968–971.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA, 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends. Genet.*, 23: 167–172.
- Hennig W, 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C, 2006. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Syst. Biol.*, 55: 729–739.
- Huang J, Qin XQ, Sun ZJ, Tang GL, Su ZY, 2007. Identifying earthworms through DNABarcodes. *Pedobiologia*, 51: 301–309.
- Hulcr J, Miller SE, Setliff GP, Darrow K, Mueller ND, Hebert PDN, Weiblen GD, 2007. DNA barcoding confirms polyphagy in a generalist moth, *Homona mermerodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Mol. Ecol. Notes.*, 7: 549–557.
- Janzen DH, Hajibabaei M, Burns JM, Hallwachs W, Remigio E, Hebert PDN, 2005. Wedding biodiversity inventory of a large complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360: 1835–1845.
- Köhler F, 2007. From DNA taxonomy to barcoding – how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Mitt. Mus. Nat. kd. Berl., Zool. Reihe*, 83: 44–51.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102: 8369–8374.
- Kress WJ, Erickson DLAT, 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.
- Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P, 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 44: 1–7.
- Kelly RP, Sarkar IN, Eernisse DJ, deSalle R, 2007. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology*, 7: 177–183.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Dutoit Barraclough TG, Savolainen V, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (8): 2923–2928.
- Lorenz JG, Jackson WE, Beck JC, Hanner R, 2005. The problems and promise of DNA barcodes for species diagnosis of primate biomaterials. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 1869–1878.
- Mann TL, Krull UJ, 2009. The application of ultrasound as a rapid method to provide DNA fragments suitable for detection by DNA biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (5): 945–955.
- Mayr E, 1963. *Animal Species and Evolution*. The Belknap Press, Cambridge, MA.
- May RM, 1990. How many species? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 330: 293–304.
- Matz M, Nielsen R, 2005. A likelihood ratio test for species membership based on DNA sequence data. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1969–1974.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PKL, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst. Biol.*, 55: 715–728.
- Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS. Biol.*, 3: 2229–2238.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP, 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 1925–1933.
- Moritz C, Cicero C, 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS. Biol.*, 2: e354.
- Pennisi E, 2007. Wanted: a barcode for plants. *Scienc.*, 318: 190–191.
- Pen JL, Wang J, He SP, 2009. Application of DNA Barcoding based on the mitochondrial CO I gene sequences in classification of culter (Pisces: Cyprinidae). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 33 (2): 271–276. [彭居俐, 王绪祯, 王丁, 何舜平. 2009. 基于线粒体 CO I 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用水生生物学报, 33 (2): 271–276]
- Rach J, Desalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Gadhys H, 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. B.*, 275: 237–247.
- Rubinoff D, 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, 20 (4): 1026–1033.
- Rubinoff D, Cameron S, Will K, 2006. Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends Ecol. Evol.*, 21 (1): 1–2.
- Remigio EA, Hebert PDN, 2003. Testing the utility of partial CO I sequences for phylogenetic estimates of Gastropod relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29: 641–647.
- Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraken J, Levesque CA,

- Moncalvo JM, Louis-Seize G, Hebert PDN, 2007. Prospects for fungus identification using COI DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 3901–3906.
- Smith MA, Rodriguez J, Whitfield J, Deans A, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN, 2008. Extraordinary diversity of parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology and collections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 12359–12364.
- Sugimoto T, Nagata J, Aramilev VV, Belozor A, Higashi S, McCullough DR, 2006. Species and sex identification from faecal samples of sympatric carnivores, Amur leopard and Siberian tiger, in the Russian Far East. *Conserv. Genet.*, 7: 799–802.
- Sarkar IN, Paul JP, Bael TE, Stanley SE, Siddall M, DeSalle R, David HF, 2002. Characteristic attributes in cancer microarrays. *Journal of Biomedical Informatics*, 35, 111–122.
- Shearer TL, Van Oppen MJH, Romano SL, Wörheide G, 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, 11: 2475–2487.
- Silva-Brandão KL, Lyra ML, Freitas AVL, 2009. Barcoding Lepidoptera: Current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Neotropical Entomology*, 38 (4): 441–451.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP, 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature*, 418–479.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP, 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 70–74.
- Teletchea F, Bernillon J, Duffraisse M, Laudet V, Hänni C, 2008. Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *J. Appl. Ecol.*, 45: 967–975.
- Thalman O, Hebler J, Poinar HN, Paabo S, Vigilant L, 2004. Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes. *Mol. Ecol.*, 13: 321–335.
- Townzen JS, Brower AVZ, Judd DD, 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Med. Vet. Entomol.*, 22: 386–393.
- Tu YJ, Chen GH, Gao YS, Wang KH, Tong HB, Zhang XY, 2009. Genetic diversity of CO I gene as DNA barcodes in three indigenous chicken breeds. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 30 (1): 16–19. [屠云洁, 陈国宏, 高玉石, 王克华, 童海兵, 张学余, 2009. 3个地方鸡种线粒体 DNA CO I 基因条形码遗传多样性研究. *家畜生态学报*, 30 (1): 16–19]
- Vaglia T, Haxaire J, Kitching IJ, Meunier I, Rougerie R, 2008. Morphology and DNA barcoding reveal three cryptic species within the *Xylophanes neoptolemus* and *loelia* species-groups (Lepidoptera: Sphingidae). *Zootaxa*, 1923: 18–36.
- Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chari Y, Vieites DR, 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 5.
- Vogler AP, Monaghan MT, 2007. Recent advances in DNA taxonomy. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 45 (1): 1–10.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 360: 1847–1857.
- Wheeler QD, Meier R, 2000. Species Concepts and Phylogenetic Theory. A Debate. Columbia University Press, New York.
- Whitworth TL, Dawson RD, Magalon H, Baudry E, 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proc. R. Soc. Biol. Sci. Ser. B.*, 274: 1731–1739.
- Wilson RA, 1999. Species: New Interdisciplinary Essays. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Wiemer M, Fiedler K, 2007. Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.*, 4: 8–23.
- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD, 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54 (5): 844–851.
- Williams ST, Knowlton N, 2001. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Mol. Biol. Evol.*, 18: 1484–1493.
- Wu CI, 2001. The genic view of the process of speciation. *J. Evol. Biol.*, 14: 851–865.
- Wang ZD, Guo YS, Chen RL, He XY, Liu CW, Liu J, 2009. CO I Barcoding sequences of teleosts in the South China Sea. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 40 (5): 608–614. [王中锋, 郭昱嵩, 陈荣玲, 何晓莹, 刘楚吾, 刘筠, 2009. 南海常见硬骨鱼类 CO I 条形码序列. *海洋与湖沼*, 40 (5): 608–614]