

# 小球藻属 DNA 条形码的鉴定研究

张稚兰<sup>1</sup>, 邢炳鹏<sup>1,2</sup>

(1. 自然资源部第三海洋研究所 厦门 361005; 2. 自然资源部北部湾滨海湿地生态系统野外科学观测研究站 北海 536015)

**摘要:**为探讨小球藻鉴定的新方法以及评估小球藻属 DNA 条形码候选序列的鉴定作用,文章对 20 株小球藻的线粒体基因细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI)、核基因组 rDNA 的内转录间隔区 (ITS) 以及核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶 (rbcL) 3 个片段进行 PCR 扩增测序,并对各序列进行生物信息学分析。研究结果表明:COI、ITS 和 rbcL 序列在 20 株小球藻中的扩增和测序效率均呈阳性,扩增成功率分别为 76%、83% 和 70%;经评估,COI、ITS 和 rbcL 序列作为 DNA 条形码在小球藻分类鉴定中均不适合较低的分类单位,但可参考动植物的分类方法,将多个片段组合应用,从而筛选不同进化级别的 DNA 条形码。

**关键词:**小球藻;DNA 条形码;分类鉴定;物种;基因

中图分类号:Q949.21

文献标志码:A

文章编号:1005-9857(2021)02-0069-08

## Assessment of Candidate DNA Sequences for Barcoding of the Genus *Chlorella*

ZHANG Zhilan<sup>1</sup>, XING Bingpeng<sup>1,2</sup>

(1. Third Institute of Oceanography, MNR, Xiamen 361005, China;

2. Observation and Research Station of Coastal Wetland Ecosystem in Beibu Gulf, MNR, Beihai 536015, China)

**Abstract:** To evaluate the validation of DNA barcoding candidate sequence in identifying *Chlorella*, to discuss the new ways of identifying, this paper took 20 individuals sampled for analysis, 3 sequences cytochrome oxidase I (COI), internal transcribed spacer (ITS) and ribulose-1, 5-bisphosphate of carboxylase (rbcL) were amplified and sequenced. These sequences were analyzed by bioinformatics methods. The result showed both amplifying and sequencing effects of COI, ITS and rbcL towards the sample of *chlorella* were positive, the amplification success rate was 76%, 83% and 70%, these 3 sequences were not suitable for lower taxa level. In the future the combination of many segments could be considered and tested, to pick out the different evolutionary levels of DNA barcoding.

**Keywords:** *Chlorella*, DNA barcoding, Identification, Species, Gene

收稿日期:2020-03-23;修订日期:2021-01-08

基金项目:自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科 2015012、海三科 2019015)。

作者简介:张稚兰,助理研究员,硕士,研究方向为海洋生物多样性

通信作者:邢炳鹏,助理研究员,硕士,研究方向为海洋生物多样性

0 引言

小球藻(*Chlorella*)是球形单细胞真核微藻,隶属绿藻门(*Chlorophyta*),是地球上最早出现的生命之一。目前已发现的小球藻有十数种,变种达数百种,生态分布广泛。小球藻生长速度快且光合效率高,既可以光能自养,又可以使用有机碳源异养生长和繁殖,有很高的营养价值,其油脂还可转化为生物柴油,在医药、化工、食品和生物能源等领域有广阔的应用前景<sup>[1-3]</sup>。

关于小球藻的分类,已有的方法侧重于形态结构特征、生理生化特征、超微结构以及细胞壁成分等指标<sup>[4-5]</sup>,这些指标均是小球藻鉴定的重要依据,但易受环境影响。小球藻体积小、变种多且形态特征简单,分属于共球藻纲(*Trebouxiophyceae*)和绿藻纲(*Chlorophyceae*)<sup>[4]</sup>,类群之间的分类特征交叉重叠且界限模糊不清,大大增加小球藻鉴定的难度,甚至可能导致出现错误的鉴定结果。根据对小球藻属基因组成的研究,其属内成员 GC 含量值的分布范围很广,几乎涵盖整个真核生物的 GC 图谱,表明目前对小球藻的分类并不能代表自然界的真实情况<sup>[4]</sup>,因此准确对小球藻进行分类鉴定目前仍是难题。

DNA 条形码技术直接利用生物的 DNA 信息作为分类鉴定的方法,具有独特的优势,为小球藻的鉴定拓宽道路。DNA 条形码的概念于 2003 年被首次提出<sup>[6]</sup>,此后相关研究快速发展,并成为生物分类的研究热点。DNA 条形码是利用 1 段标准的短序列进行物种鉴定的技术<sup>[6]</sup>,不受个体形态和生长阶段的影响,具有操作简单、鉴定周期短、可重复性强以及可高效和准确地鉴定单个物种、辨别相近物种和发现隐形种等优点。目前在藻类分子分类研究中,学者已陆续将 10 余种基因序列作为藻类的候选 DNA 条形码并在不同类群中应用,但尚未取得统一的藻类条形码标准片段<sup>[7-12]</sup>,研究的基因主要包括 COI、ITS、UPA (23S)、*rbcL*、LSU (28S rDNA)、SSU (18S rDNA)、*tufA* (elongation factor Tu gene)。其中,COI 和 ITS 由于具有较高的进化速率,常被用于近缘群体或物种的鉴定<sup>[13]</sup>; Rubisco 酶在光合作用和光呼吸过程中发挥重要

作用<sup>[14]</sup>,其大亚基基因 *rbcL* 在物种之间的保守性强,因此成为分子系统学研究中被广泛使用的标准片段之一<sup>[15]</sup>。

本研究尝试将 COI、ITS 和 *rbcL* 基因作为小球藻 DNA 条形码的候选序列,评估 3 条 DNA 条形码候选序列在小球藻属中的鉴定能力,以期为深入研究小球藻条形码和选择标准条形码提供理论和数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究选取的所有藻种均购置于中国科学院淡水藻种库,共有 20 株小球藻样品。培养基为 BG-11,培养温度为 25℃,光照照度为 4 500 lx,光暗比为 12 h : 12 h。小球藻株系来源如表 1 所示。

表 1 小球藻样品的名称和来源

| 名称                                            | 来源            |
|-----------------------------------------------|---------------|
| <i>Chlorella luteorividis</i>                 | 捷克布拉格大学       |
| <i>Chlorella protothecoides</i>               | 捷克布拉格大学       |
| <i>Chlorella saccharophila</i>                | 捷克布拉格大学       |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>                  | 美国            |
| <i>Chlorella vulgaris</i>                     | 福建省水产研究所      |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i>                  | 从 Tris 缓冲液中分离 |
| <i>Chlorella regularis</i> var. <i>minima</i> | 与美国德州大学交换     |
| <i>Chlorella</i> sp.                          | 云南西双版纳        |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>                  | 中国科学院水生生物研究所  |
| <i>Chlorella protothecoides</i>               | 捷克布拉格大学       |
| <i>Chlorella</i> 64.01 sp.                    | 波多黎各          |
| <i>Chlorella sorokiniana</i>                  | 与美国德州大学交换     |
| <i>Chlorella</i> sp.                          | 长江三峡袁水河       |
| <i>Chlorella</i> sp.                          | 内蒙古           |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>                  | 湖北黄石卫校        |
| <i>Chlorella vulgaris</i>                     | 湖南益阳          |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i>                  | 胡征宇           |
| <i>Chlorella vulgaris</i>                     | 东湖            |
| <i>Chlorella</i> sp.                          | 郑州            |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>                  | 关桥鱼塘          |

1.2 样品 DNA 提取以及 PCR 扩增和测序

离心采集对数期藻液,使用天根生化科技(北京)有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒,提取

基因组总 DNA。PCR 反应的总体积为 25 mm<sup>3</sup>,其中包括 2×Taq Plus PCR Mix 12.5 mm<sup>3</sup>、引物(0.01 mmol/dm<sup>3</sup>)各 1 mm<sup>3</sup>、DNA 模板 2 mm<sup>3</sup>以及超纯水 8.5 mm<sup>3</sup>。PCR 扩增的引物序列如表 2 所示。

表 2 PCR 扩增的引物序列

| 引物名称   | 序列(5'-3')                |
|--------|--------------------------|
| COI-F  | ATGTTGACTCGTTGGTTTTATT   |
| COI-R  | CAGAATAAGTGTGGTAAAGAAT   |
| ITS-F  | TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAG |
| ITS-R  | TTAAGTTCAGCGGGTAGTCTTGCC |
| rbcL-F | ATGKCTCCACAACTGAAACTAR   |
| rbcL-R | TTAAAGAGTATCGATWGTTCGAA  |

COI 基因 PCR 循环参数设定为 95℃,3 min;30 个循环包括:95℃、0.5 min,50℃、1 min,74℃、1.5 min,74℃、7 min。ITS 基因 PCR 循环参数设定为 94℃,5 min;30 个循环包括:94℃、1 min,50℃、1 min,72℃、1.5 min,72℃、8 min。rbcL 基因 PCR 循环参数设定为 94℃,5 min;30 个循环包括:94℃、1 min,53℃、1 min,72℃、1 min,72℃、10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

利用 Sequencher 软件拼接样品的双向测序结果,经人工校对确定无误后提交至 GenBank 数据库。利用 Clustal X 2.0 软件进行多序列比对并查错。利用 MEGA 7.0 软件对 DNA 序列特征进行分析,包括序列长度、GC 含量、多态位点和简约信息位点等参数。采用最大似然法进行序列饱和性检验,使用 DAMBE 软件建立碱基替换饱和曲线<sup>[16]</sup>。利用 Kimura-2-parameter (K2P)<sup>[17]</sup>模型计算种内和种间的遗传距离。将实验所得数据信息与 GenBank 中的数据进行了比对,采用邻接法构建不同序列的小球藻系统发育树。采用自举检验法检验邻接法分支树的可信度,各分支经 1 000 次重复抽样检验得到支持率。以计算机 Perl 语言统计各序列种内和种间遗传距离的分布频度,评估 3 条 DNA 条形码候选序列的间隔(barcoding gap)。

2 结果分析

2.1 COI、ITS 和 rbcL 的序列结构特征

3 条 DNA 条形码候选序列在 20 株小球藻中的扩增均呈阳性,扩增成功率分别为 76%、83%和 70%。各条候选 DNA 条形码的序列特征如表 3 所示。

表 3 3 个基因片段的序列特征

| 基因名称 | 序列长度/bp | 保守位点  | 变异位点(占比/%) | 简约信息位点(占比/%) | GC 含量/% |
|------|---------|-------|------------|--------------|---------|
| COI  | 694~713 | 531   | 181(25.4)  | 110(15.4)    | 37.0    |
| ITS  | 671~738 | 291   | 475(60.6)  | 286(36.3)    | 55.4    |
| rbcL | 1 428   | 1 250 | 178(12.5)  | 108(7.6)     | 40.5    |

各序列长度的范围为 671~1 428 bp,其中 ITS 的变化范围最大(671~738 bp)。实验所得的 ITS 序列包含完整的 ITS<sub>1</sub>、5.8S rDNA 和 ITS<sub>2</sub>,20 条 ITS 的序列长度并不一致,其中 5.8S rDNA 最为保守(159 bp),而 ITS<sub>1</sub>和 ITS<sub>2</sub>出现一定的变化。3 条序列的 GC 含量也不同,其中 ITS 最高(55.4%),COI 最低(37.0%)。

3 条 DNA 条形码候选序列的遗传差异是通过 *p* 距离和简约信息位点占比(PI%)计算的,其中 COI、ITS 和 rbcL 的平均 *p* 距离分别是 0.057、0.220 和 0.033,而其 PI%值分别为 15.4%、36.3%和 7.6%。其中 ITS 的平均 *p* 距离和 PI%值最高,表明 ITS 在 3 条 DNA 条形码候选序列中的遗传变异度最高。

2.2 碱基替换饱和性

COI、ITS 和 rbcL 的碱基替换饱和性曲线如图 1 所示。

由图 1 可以看出:COI 和 rbcL 的转换值略高于颠换值,而 ITS 的颠换值高于转换值;ITS 转换曲线已进入平稳期,表明小球藻的 ITS 序列的转换已达到饱和;与之相比,COI 和 rbcL 的转换曲线和颠换曲线均为线性关系,表明这 2 个序列之间的替换尚未达到饱和,更适合用于系统树的构建。

2.3 COI、ITS 和 rbcL 的 barcoding gap

标准 DNA 条形码的种间遗传变异应显著大于种内遗传变异,并形成 1 个间隔区即 barcoding

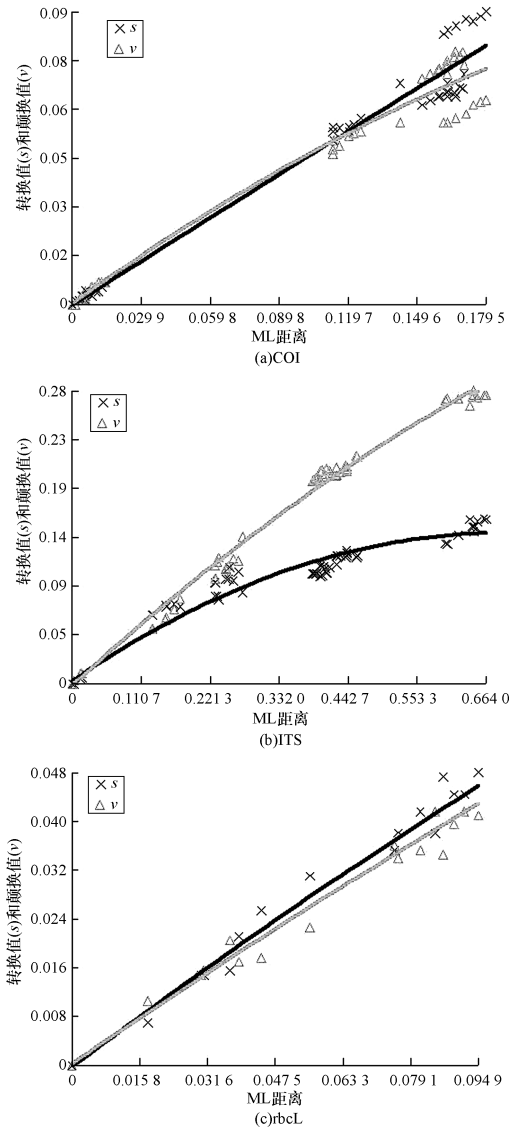


图 1 3 个基因的碱基替换饱和性曲线

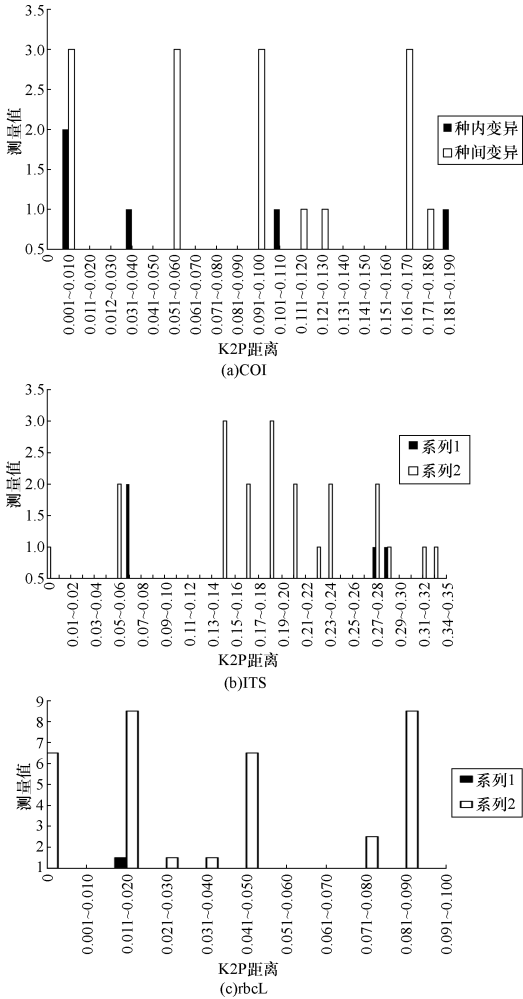


图 2 不同序列的种间变异和种内变异分布

gap<sup>[18-19]</sup>,因此种内变异应集中分布于 barcoding gap 图中数值较小的一侧,而数值较大的一侧应集中显示种间变异<sup>[20]</sup>。小球藻的 3 条 DNA 条码候选序列的 barcoding gap 如图 2 所示。

由图 2 可以看出,COI、ITS 和 rbcL 的种内变异和种间变异存在不同程度的重叠。其中:COI 的种内变异超过种间变异,因此不利于小球藻的分类鉴定;而 ITS 和 rbcL 的种内变异和种间变异虽有一定的重叠,但仍存在间隔区,且相比之下 rbcL 的间隔区更大,因此有利于小球藻的分类鉴定。

2.4 COI、ITS 和 rbcL 的系统发育

在目前对 3 个候选序列分别进行的系统发育分

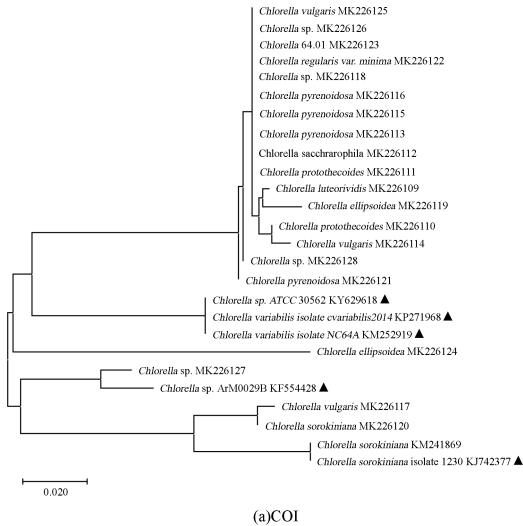
析中,各分支内的聚类情况都是无序的,与各自的形态学分类地位不符。在形态学分类上,同种的小球藻没有被完全聚为同一类,而不同种的小球藻又没有被分开,与传统分类学存在较大差异。由于 3 个候选片段都不能完全区分所有的小球藻种类,可能其并不适合较低的分类单位。

基于 COI、ITS 和 rbcL 的小球藻 NJ 系统树如图 3 所示,其中▲标记的为 GenBank 中的数据。

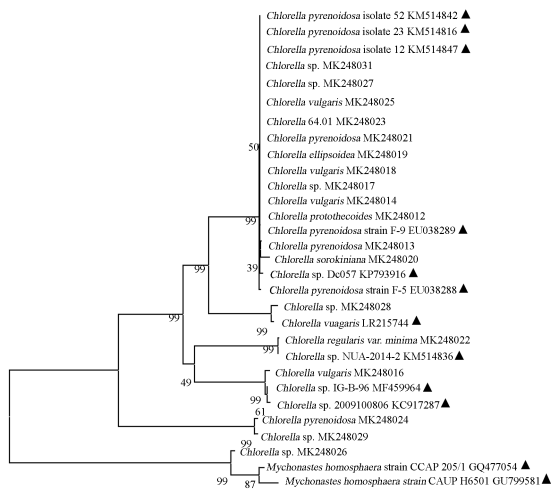
3 讨论

理想的 DNA 条形码序列应具有易于高效扩增、种间差异显著和种内变异较小等特点<sup>[21]</sup>。根据对小球藻不同序列的分析结果,3 条候选 DNA 条形码序列均不适合单独完成对小球藻到种水平的鉴定,但其各具特点。Hebert 等<sup>[22]</sup>对动物界中除刺胞动物门外的所有动物门进行 COI 基因研究,发现

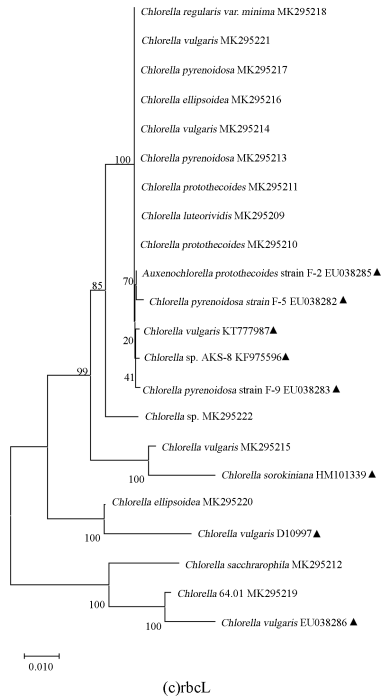
COI 基因的长度较短、易于扩增且变异率适度,适合作为物种 DNA 条形码。COI 基因是目前公认的动物 DNA 条形码基因,其有效性在对软体动物、鸟类<sup>[23-26]</sup>和鳞翅目昆虫<sup>[27]</sup>等的研究中得到验证。多名学者和国际机构分别对陆生植物 DNA 条形码进行研究,发现 COI 基因不仅进化速率低,而且基因含量和结构改变很大,因此其作为植物 DNA 条形码并不合适<sup>[21,28-30]</sup>。在藻类 DNA 条形码研究中,COI 基因在硅藻、甲藻、褐藻和红藻研究中都得到成功应用<sup>[8,31-33]</sup>;但 COI 基因在绿藻中不能设计出有效的引物,因此不适合作为绿藻的条形码<sup>[34]</sup>。本研究的结果也表明 COI 序列不适合作为小球藻 DNA 条形码,其原因可能有 2 点:①缺乏数据,



(a)COI



(b)ITS



(c)rbcL

图 3 基于 COI,ITS 和 rbcL 的小球藻 NJ 系统树(续)

即 GenBank 数据库中缺乏本研究实验所采用藻种的 COI 基因序列;②在形态分类时,由于样本缺少明确的形态特征或形态指标不适合作为种的分类标准,导致分类出现偏差<sup>[35]</sup>。

ITS 序列是核糖体 rRNA 基因的转录间隔区,包含 ITS<sub>1</sub>、5.8S rDNA 和 ITS<sub>2</sub>,其中 ITS<sub>1</sub> 和 ITS<sub>2</sub> 的进化速率较快,而 5.8S rDNA 最为保守。较高的变异度使 ITS 在区分物种方面的能力较强,其在一些原生物<sup>[10]</sup>、真菌<sup>[11-12]</sup>、藻类<sup>[13,36-37]</sup>、植物<sup>[38-39]</sup>和动物<sup>[40]</sup>的分类鉴定中得到成功应用,而本研究基于 ITS 基因构建的系统树无法将所有种类的小球藻完全分开。Muller 等<sup>[41]</sup>对 29 株普通小球藻的 ITS 序列长度和基因扩增片段长度的多态性(AFLP)进行分析,提出有些已由传统分类方法确定的普通小球藻并不属于此分类;Huss 等<sup>[4]</sup>基于小球藻的生化 and 分子信息,认为蛋白核小球藻和普通小球藻同种异名,因此在系统树中表现为 ITS 长度相同的普通小球藻和蛋白核小球藻被聚在同一个分枝中。而在依赖小球藻类 18S rRNA 基因构建的系统发育树中,*Chlorella saccharophila*、*Chlorella ellipsoidea*、*Chlorella luteoviridis* 和 *Chlorella mirabilis* 各自以很高的自展值聚在一起<sup>[4]</sup>,与本研究实验

图 3 基于 COI,ITS 和 rbcL 的小球藻 NJ 系统树

根据 ITS 基因序列构建的系统发育树的结果类似,表明这些小球藻具有很近的亲缘关系。在本研究实验中,ITS 的遗传距离( $p$  距离)和 PI% 值均比 COI 和 *rbcL* 高很多,表明其具有较高的变异度,而碱基替换饱和性分析也证明 ITS 具有很高的变异度,这可能导致 ITS 序列不适合单独用于小球藻的系统发育分析。

*rbcL* 基因全长约 1.4 kb,能提供较多的分子信息,在光合作用和光呼吸中占据重要地位。受到功能的限制,*rbcL* 的进化速率较慢,因此更适合较高分类阶元的研究<sup>[42-44]</sup>。本研究实验中 *rbcL* 基因的遗传距离( $p$  距离)和 PI% 值在 3 个条形码候选片段中均最低,表明其较为保守。但 *rbcL* 的引物通用性强且序列易比对,可参考将其与多个片段组合,以提升物种鉴定的正确率<sup>[43-45]</sup>。Friedl<sup>[46]</sup> 基于 18S rDNA 序列的分析以及 Huss 等<sup>[4]</sup> 对生物化学、生理学、超微结构和 18S rDNA 的研究,均将小球藻类群划分为 2 个不同的纲,即绿藻纲(Chlorophyceae)和共球藻纲(Trebouxiophyceae),其中 Huss 等<sup>[4]</sup> 又将共球藻纲中的小球藻分为 2 个类群。本研究实验根据 *rbcL* 基因所构建的系统发育树与 Huss 等<sup>[4]</sup> 的分类相似,即类群 I 中的 *Chlorella vulgaris* 和 *Chlorella protothecoides* 聚在一起,而类群 II 中的 *Chlorella ellipsoidea* 和 *Chlorella saccharophila* 分布在外围;但又与 Huss 等<sup>[4]</sup> 的分类略有差别,如属于类群 II 的 1 株 *Chlorella ellipsoidea* 和 *Chlorella luteorividis* 与类群 I 聚在一起,而这与孙雪等<sup>[2]</sup> 的研究结果类似。出现这种情况的原因可能为实验所采用的藻株不同、数据库中的信息错误、样品 DNA 污染和分类命名错误等,导致分析结果的可信度降低或找不到可参考的数据<sup>[7]</sup>。

随着时代的发展,小球藻属的成员不断变化,而目前对于藻类 DNA 条形码的研究还不成熟,小球藻 DNA 条形码尚没有统一的标准基因片段。但可参考动植物的分类方法,将多个片段组合应用,以筛选不同进化级别的 DNA 条形码<sup>[7]</sup>。随着小球藻类不同 DNA 片段信息的不断丰富、规范化和规模化以及 DNA 条形码技术的不断成熟,DNA 条形码将在小球藻分类鉴定中得到更广泛的应用。

## 参考文献

- [1] 黄燕娟,王小芬,陈向凡.小球藻的营养及药用价值[J].现代生物医学进展,2013,13(32):6396-6398.
- [2] 孙雪,吴晓微,李兴文,等.小球藻核 rDNA ITS 与叶绿体 *rbcL* 基因序列分析及应用[J].水产学报,2009,33(4):565-571.
- [3] BLANC G, DUNCAN G, AGARKOVA I, et al. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex[J]. Plant Cell, 2010, 22(9): 2943-2955.
- [4] HUSS V A R, FRANK C, HARTMANN E C, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) [J]. Journal of Phycology, 1999, 35(3): 587-598.
- [5] KRIENITZ L, HEGEWALD E H, HEPPELLE D, et al. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) [J]. Phycologia, 2004, 43(5): 529-542.
- [6] HEBERT P D, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(S1): 96-99.
- [7] 崔翠菊,张立楠,王娜,等.藻类 DNA 条形码研究进展[J].中国生物工程杂志,2012,32(9):113-117.
- [8] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1879-1888.
- [9] KUCERA H, SAUNDERS G W. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding [J]. Botany, 2008, 86(9): 1065-1079.
- [10] STERN R F, ANDERSEN R A, JAMESON I, et al. Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate dinoflagellate barcode marker [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42780.
- [11] SEIFERT K A. Progress towards DNA barcoding of fungi [J]. Mol Ecol Resour, 2009, 9(S1): 83-89.
- [12] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHNDORF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [13] 郭立亮. 海洋微藻 DNA 条形码基因的评估及环境样本多样性分析和定量基因的开发[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [14] 孙雪, 马斌, 周成旭. 蛋白核小球藻核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加

- 氧酶小亚基部分基因序列的克隆与分析[J].海洋科学,2008(3):40—43.
- [15] HASEBE M, ITO M, KOFUJI R, et al. Phylogenetic relationships in gnetophyta deduced from *rbcL* gene sequences[J]. The Botanical Magazine, Tokyo, 1992, 105(3): 385—391.
- [16] XIA X. DambE 7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution[J]. Mol Biol Evol, 2018, 35(6): 1550—1552.
- [17] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol, 1980, 16(2): 111—120.
- [18] 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 of the United States of America, 2008, 105(8): 2923—2928.
- [19] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling[J]. PLoS Biol, 2005, 3(12): e422.
- [20] 姜黎. 基于 DNA 条形码技术的重楼正伪品鉴定方法研究[D]. 泸州: 泸州医学院, 2013.
- [21] CBOL Plant Working Group 1, PETER M H, LAURA 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.
- [22] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313—321.
- [23] JOHNSEN A, RINDAL E, ERICSON P G P, et al. DNA barcoding of scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-atlantic species[J]. Journal of Ornithology, 2010, 151(3): 565—578.
- [24] PARK H, YOO H S, JUNG G, et al. New DNA barcodes for identification of Korean birds[J]. Genes & Genomics, 2011, 33(2): 91—95.
- [25] LIJTMAER D A, KERR K C, STOECKLE M Y, et al. DNA barcoding birds: from field collection to data analysis[J]. Methods Mol Biol, 2012, 858: 127—152.
- [26] ALIABADIAN M, BEENTJES K K, ROSELAAR C S, et al. DNA barcoding of Dutch birds[J]. Zookeys, 2013(365): 25—48.
- [27] HEBERT P D, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(41): 14812—14817.
- [28] VIJAYAN K, TSOU C H. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective[J]. Current Scienc, 2010, 99(11): 1530.
- [29] 闫化学, 于杰. DNA 条形码技术在植物中的研究现状[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 102—108.
- [30] 唐建阳, 周先治. 植物 DNA 条形码研究现状及应用前景[J]. 中国农学通报, 2009, 25(24): 35—43.
- [31] EVANS K M, MANN D G. A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae[J]. Phycologia, 2009, 48(1): 70—74.
- [32] EVANS K M, WORTLEY A H, MANN D G. An assessment of potential diatom “barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in sellaphora (bacillariophyta) [J]. Protist, 2007, 158(3): 349—364.
- [33] 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]. Am J Bot, 2006, 93(8): 1101—1108.
- [34] 郭盛华. DNA 条形码技术的概况及其在大型海藻中的应用[J]. 科技资讯, 2012(18): 247.
- [35] FUNK D J, OMLAND K E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA [J]. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 2003, 34: 397—423.
- [36] MONIZ M B, KACZMARSKA I. Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited [J]. Protist, 2010, 161(1): 7—34.
- [37] MONIZ M B, KACZMARSKA I. Barcoding diatoms: is there a good marker? [J]. Mol Ecol Resour, 2009, 9(S1): 65—74.
- [38] YANG J B, GAO L M, LIU J Q, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19641—19646.
- [39] DU Z, QIMIKE A, YANG C, et al. Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 246—251.
- [40] MORITZ G, PAULSEN M, DELKER C, et al. Identification of thrips using ITS-RFLP analysis[J]. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera, 2002: 365—367.
- [41] MULLER J, FRIEDL T, HEPPELLE D, et al. Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and ITS rDNA sequences[J]. Journal of Phycology, 2005(41): 1236—1247.
- [42] DAUGBJERG N, ANDERSEN R A. Phylogenetic analyses of the *rbcL* sequences from haptophytes and heterokont algae

suggest their chloroplasts are unrelated[J]. *Mol Biol Evol*, 1997, 14(12):1242—1251.

[43] NEWMASTER S G, FAZEKAS A J, STEEVES R A, et al. Testing candidate plant barcode regions in the myristicaceae [J]. *Mol Ecol Resour*, 2008, 8(3):480—490.

[44] 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(11):e1154.

[45] 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.

[46] FRIEDL T. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae; a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from dictyochloropsis reticulata and from members of the genus myrmecia (chlorophyta, trebouxioephyceae cl. nov.) [J]. *Journal of Phycology*, 1995, 31(4):632—639.