

遗传信息及其获取技术与 iFlora^{*}

李洪涛, 曾春霞, 高连明, 伊廷双, 杨俊波^{**}

(中国科学院昆明植物研究所中国西南野生生物种质资源库, 云南 昆明 650201)

摘要: 随着世界主要国家和地区传统植物志的完成和即将完成, 植物学进入后植物志时代。由于学科的积累和科技的发展, 新一代植物志 (iFlora) 成为植物志发展的必然。本文概述了 iFlora 的特点、主要构件和应用范围; 介绍了近三十年来遗传信息及其获取技术的发展概况, 以及它们在 iFlora 中的重要作用; 讨论了目前技术条件下各类遗传信息获取技术的优劣和整合提高的方法; 提出了 iFlora 实施过程中的阶段性目标; 以及随着数据信息的快速积累, 相关技术特别是快速、简便测序技术和设备的发展与 iFlora 可能的最终发展目标。

关键词: 新一代植物志; 遗传信息; 遗传信息获取技术

中图分类号: Q 948.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2012)06-585-07

Genetic Information and Technologies Related to iFlora^{*}

LI Hong-Tao, ZENG Chun-Xia, GAO Lian-Ming, YI Ting-Shuang, YANG Jun-Bo^{**}

(Germplasm Bank of Wild Species, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: As the traditional Floras of major countries and regions are completed, or about to be completed, botany is entering a post-Flora era. Furthermore, with accumulation of multi-disciplines and the rapid progress of science and technology, the next-generation Flora or iFlora becomes necessary and more and more feasible. The main goals of this article are to: 1) provide an overview of the iFlora idea, its characteristics, components and applications; 2) present the fast progress in the accumulation and direction of development of genetic information and technology for acquiring genetic information over the last 30 years; 3) elucidate the indispensable role of genetic information and its technology for the future of iFlora; 4) summarize the pros and cons for current methods for acquiring genetic information and introduce improved methods; 5) propose the feasible short-term and ultimate goals of iFlora, along with the rapid accumulation of molecular data and related information technologies, especially the streamlined rapid, and easily applied sequencing technologies and equipment.

Key words: iFlora; Genetic information; Acquisition technology

物种准确鉴定是生物学各学科研究的基础 (Bell, 1986)。随着社会经济的发展, 对生物多样性的认识、保护和利用受到越来越多的关注, 从国家相关部门到普通公众对物种快速准确鉴定和提取物种相关信息的要求也日益迫切 (Che 等,

2010)。Flora of China 和 世界各主要植物志电子版 (eFlorals) 的出版, 使植物信息的检索和查询, 以及即时更新和提取数据信息成为现实 (Brach 和 Song, 2005; Brach 和 Boufford, 2011), 也为植物学研究步入“后植物志时代”奠定了基础。

* 基金项目: 中国科学院仪器设备功能开发技术创新项目实施方案 (植物遗传信息高效获取技术体系集成研制); 中国科学院科技创新交叉与合作团队 (iFlora 交叉与合作团队); 国家科技部科技基础工作专项项目; 国家高科技研究发展计划 (863 计划) (2012AA021801); 中国科学院大科学装置开放研究项目 (2009-LSFGBOWS-01)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: jbyang@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2012-11-05, 2012-11-09 接受发表

作者简介: 李洪涛 (1971-) 男, 博士, 高级工程师, 主要从事植物遗传信息学相关研究。E-mail: lihongtao@mail.kib.ac.cn

自上世纪80年代,就有研究者尝试使用生物遗传信息对一些古代生物遗迹进行鉴定(Higuchi等,1984; Savolainen等,1995; Waneler等,2007)。随着分子进化和分子系统学等相关学科的快速发展,DNA序列分析作为传统分类方法的有效辅助手段被广泛用于物种的鉴定(Niesters等,1993; Brown等,1999; Wells等,2001; Tautz等,2002)。2003年Herbert提出DNA条形码用于生物快速鉴定,使利用遗传信息对生物进行快速鉴定和相关研究成为生物学研究的热点之一(Hebert等,2003; Qiu等,2006; Smith和Donoghue,2008; Willis等,2009; Tang等,2010)。由于生物系统的复杂和多样性,当代生物学发展已进入整合生物学研究时代(Gebiola等,2012)。整合各学科领域的研究成果,研发一个支撑植物学相关研究(如分类学、系统学)和广泛应用(普通公众、食品和海关、司法等国家相关部门)的开放、智能的新一代植物志(iFlora)具有重要意义(李德铎等,2012)。

1 iFlora的主要特点

随着植物学研究的全面深入,以及计算机技术、图像处理技术和网络技术的飞速发展,植物学研究正进入后植物志时代,iFlora的研发是植物学发展的必然结果。作为新一代的智能植物志,iFlora具有以下特点:(1)整合性:以分类学为基础,采用新技术和新方法融入遗传信息,整合物种信息以及多学科的研究成果。(2)信息化:以信息网络和信息技术为依托,将物种的多学科研究成果转化为信息资源。(3)便捷性:iFlora是一个智能化的小型装备,在实际应用中非常方便快捷。(4)开放性:基于信息、网络和云服务等技术,即时收集、整理、更新物种信息和最新研究成果。(5)智能化:从样品采集、物种信息收集整理、遗传信息获取到快速准确的多途径物种鉴定、物种信息的提取和更新,实现高度的智能化。iFlora是使用多途径进行物种鉴定的智能工具,其中基于数字化的遗传信息的物种鉴定是目前研究的热点,最具代表性的就是近年来兴起和不断发展的DNA条形码物种鉴定。ITS、*rbcL*和*matK*是目前通用的植物鉴定核心

条码(Hollingsworth等,2011; Li等,2011a),这些条码的信息经数字化后能比较方便地应用于植物的鉴定。快速获取植物相关遗传信息并建立物种标准遗传信息库和快速、高效、小型化的遗传信息获取体系是iFlora研制的重要内容和主要构件之一。

2 遗传信息与物种鉴定

由于遗传信息具有高度稳定性和可重复性及生物不同部位和生长发育阶段无差异等特点,其作为一种新的物种鉴定信息最早可追溯到上世纪80年代初(Higuchi等,1984)。这一时期的研究主要集中于对收藏多年的生物样本和生物遗迹遗传信息的提取(Savolainen等,1995; Waneler等,2007; Lister等,2008)。由于分子生物学技术的快速发展,特别是PCR技术的发明和不断完善,使遗传信息的获取最大限度地减少对植物样品量的要求,大大促进了遗传信息在植物分子系统发育(Chase等,1993; Soltis和Soltis,1999; APG,1998,2003,2009)、植物遗传多样性(Vandepoele等,2005; Tang等,2010)、植物基因功能的发生和演化(Sage,2003; Chanderbali等,2009; Edwards等,2010)等相关领域的广泛应用。遗传信息在植物学中的广泛应用甚至改变了一些传统学科的认识,例如已有学者建议新的植物志应参照和基于以分子数据为基础的APG系统(Kress,2004)。

DNA条形码用于生物快速鉴定,即利用标准化的DNA序列对物种进行快速准确鉴定,为快速认识物种和了解生物多样性提供了一个便捷的途径(Hebert等,2003; Hollingsworth等,2011; Yang等,2012)。随着国际生命条形码计划(International Barcode of Life,iBOL)的启动和生命条形码联盟(Consortium for the Barcode of Life,CBOL)的成立,DNA条形码技术的研究和运用成为生物学等领域的研究热点。近十年来,植物DNA条形码研究主要集中于片段筛选,虽然ITS、*matK*和*rbcL*作为核心条码已被广泛接受,并表现出了巨大的应用潜力(Arnot等,1993; Floyd等,2002; Herbert等,2004; Li等,2011b),但核心条码对于经历快速辐射进化、杂交、基因渐渗等复杂进化且物种数目较多的类群分辨率受

限。分辨率更高的 DNA 片段和分子标记的加入可能难以避免 (Taberlet 等, 2007; Seberg 等, 2009; Ran 等, 2010; Yang 等, 2012); 同时, 对于这些困难类群, 一个值得探讨的方法是, 首先通过核心条码鉴定到属, 再使用 1~2 个属内专用的补充条码。可用于植物研究的遗传信息主要来自核基因组和叶绿体基因组。植物核基因组蕴含的信息非常巨大, 是一个潜在的取之不竭的信息库, 但由于植物复杂的进化关系, 如基因组重复、基因渐渗、杂交等广泛存在, 目前较为广泛使用的片段是作为植物 DNA 核心条形码的 ITS 及其部分片段 ITS2 (Yao 等, 2010; Li 等, 2011)。其它如 GBSSI、Leafy 等基因片段只在少数类群中应用 (Kress 等, 2005; Ran 等, 2010)。叶绿体基因组具有单亲遗传、很少的重组以及大小适中并能提供较多的变异位点等特点, CBOL 植物工作组 (2009) 推荐 *rbcL* 和 *matK* 作为核心条码被较为广泛地认可 (Li 等, 2011a, b)。许多较为通用、进化速度更快的叶绿体片段 (如: *atpF-atpH*、*psbI-psbK*、*trnH-psbA* 等) 也被不同研究者提出作为候选条码 (Kim 等, 2007 unpublished; Kress 等, 2007; Ran 等, 2010)。同时, 对于一些特别难鉴定到种的属, 也比较容易通过叶绿体全基因组的比较研究 (Parks 等, 2009), 筛选、开发出针对特定类群 (属内种间) 的专属条码。最近, 我们对山茶属 (*Camellia* Linnaeus)、兰属 (*Cymbidium* Swartz) 等的研究表明: 尽管叶绿体基因组较为保守, 但还是能提供较多进化速率较快的备选片段, 这些片段具有较高的属特异性 (杨俊波等, 待发表资料)。近来也有学者提到, 一些分子标记技术 (如 AFLP、SNP 和 SSR 等) 也可用于快速分化类群、近缘物种和重要植物品种的鉴定 (宁淑萍等, 2008)。总之, 由于植物物种和演化方式的多样性 (如: 快速辐射进化、杂交、多倍化和分类学上困难的种复合群等), 除标准的核心条码外, 针对一些特定的类群和特殊的鉴定要求, 更多的遗传信息和更灵活的鉴定方法被用于物种鉴定是 DNA 条形码和 iFlora 发展的必然趋势。同时, 更多分辨率较高的遗传信息 DNA 片段将进一步用于分子系统发育、物种演化和生态集合体的形成和互作等相关方面的研究, 这些研究也可进一步充实

iFlora 的研究内容。

经快速脱水、干燥的植物叶片, 是目前最有利于遗传信息保存的分子材料和供 DNA 提取的样品, 也是目前大量获取遗传信息的基础, 同时对它的采集可极大地充实植物标本馆。按 DNA 条形码标准规范采集的植物分子材料, 不但提供了优质的遗传信息提取材料, 同时收集到物种许多重要的基本信息 (如: 凭证标本、植物图片、生长环境、GPS 等信息), 这些信息和遗传信息经数字化, 一起构成 iFlora 最重要的物种信息。因而, 在可能的情况下, 按标准采集的植物分子材料是遗传信息获取的优先选择。然而, 遗传材料的获取是一项十分庞大而艰巨的任务, 一方面需要大量的人力和物力, 特别是需要具有良好经典分类学功底的专业人才, 而现实的情况却使这方面的发展困难重重。近年来, 由于各种因素, 从事传统分类学的人才已是凤毛麟角 (Li 等, 2011b), 对采集材料的准确鉴定愈加困难。此外, 全球气候的变化对生物多样性产生了极大的影响, 特别是经济的高速发展, 致使生物的生存空间不断收缩、生存环境日趋恶化、分布区逐渐减少、多样性急剧下降, 材料的采集愈发困难。因此, 培养新一代分类学家、发掘和利用好已有遗传信息材料已经迫在眉睫, 特别是从已有材料中提取利用好遗传信息具有重要意义。馆藏标本是最可以依赖的遗传材料, 它不但具有准确可靠的鉴定信息, 而且短期内可以获得种类最丰富、多样性最高的材料, 近十多年来已经越来越受到关注 (Ristaino, 1998; Staats 等, 2011; Vere 等, 2012)。生物技术的飞速发展也使得利用标本作为遗传信息提取材料成为可能, 并取得了较大的进展 (Savolainen 等, 1995; Telle 等, 2008; Andreassen 等, 2009; Knapp 等, 2010), 即使是高度降解的材料, 也能在新技术的应用下通过改进 DNA 提取技术和方法、缩短扩增片段等来加以利用。因此, 从以植物标本为代表的降解材料中获取遗传信息的技术方法是 iFlora 的主要应用之一, 如对所有植物制品 (中草药、茶叶、卷烟、食品等) 的鉴定识别。此外, 利用已有的如 GenBank、BOLD 等数据库的数据, 进行必要的整理核实也是一条可考虑的遗传信息获取和补充校准的途径。

3 遗传信息获取体系

目前已知植物物种为 30 万种左右, 并可能有大量尚未发现和未鉴定的隐存物种存在 (Herbert 等, 2004; van Velzen 等, 2007)。以多份植物样品代表一个物种, 快速准确获取和增加植物物种遗传信息是近十年来包括 DNA 条形码研究计划在内的众多研究首先关心的问题 (Borisenko 等, 2009; Puillandre 等, 2012)。遗传信息获取体系主要是实验技术体系和与之相配的实验装备体系。目前, 尚无专门用于植物分子鉴定的系统、规范的实验技术及其实验装备体系。使用现有分子生物学实验技术和实验装备获取植物遗传信息具有可行性, 并有较高的通用性, 但存在遗传信息获取时间长、依靠大量人力投入、实验繁琐、涉及较多仪器设备和空间, 缺乏标准、规范的实验体系等制约因素, 较大的限制了该技术领域的发展和运用。因此, 植物遗传信息的高效获取还有较大提升空间, 研发高效、自动化、小型化整合的遗传信息获取体系是发展趋势之一, 集

成化、微型化和智能化的便携式装备是 iFlora 的方向和目标 (Janzen 等, 2005)。就目前的技术而言, 在近期内可能完成的初期目标是研制一个集成化的遗传信息获取设备, 为方便快捷的获取遗传信息服务。这一设备是一个可以车载流动的集成设备, 它的主要功能是集成快速批量化的 DNA 提取、多重和超快速的目标基因片段扩增以及快速的 DNA 测序。通过这一集成设备的研制, 可大大提高目前遗传信息的获取效率 (图 1, 表 1)。

随着以美国 illumina 公司的 Solexa 测序仪 (Fedurco 等, 2006; Turcatti 等, 2008) 和 Roche Applied Science 公司的 454 (Margulies 等, 2005) 等为代表的第二代测序仪不断完善, 及以 Helicos 公司的 Heliscope 单分子测序仪 (Braslavsky 等, 2003; Harris 等, 2008) 和 Pacific Biosciences 公司的 SMRT 技术 (Turner, 2008) 等为代表的第三代测序仪的出现, 快速、方便、低成本获取海量遗传信息成为现实 (Knapp 和 Hofreier, 2010;

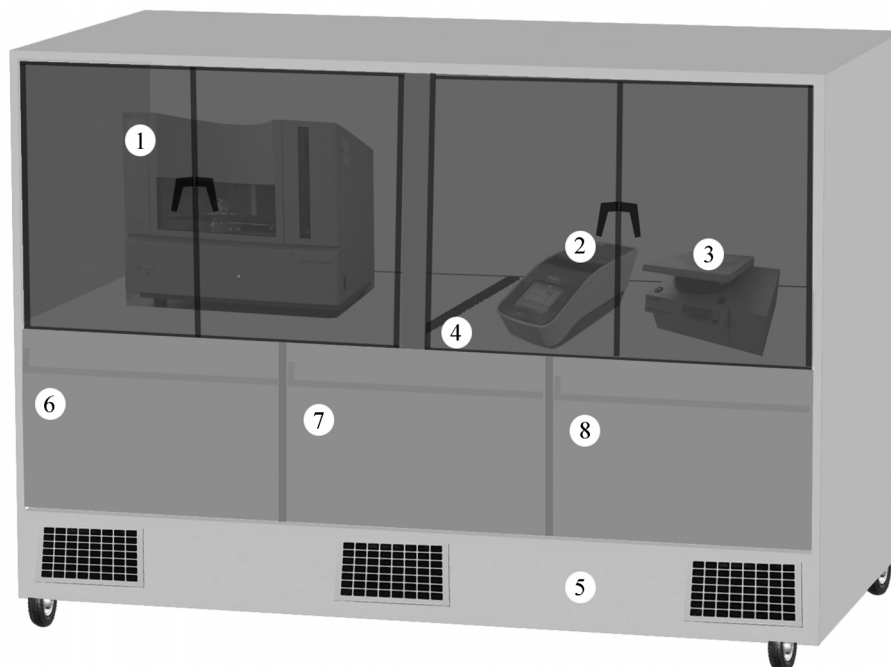


图1 植物遗传信息高效获取技术装备体系框架图

1. 高通量遗传信息快速准确获取系统; 2. 小型高通量快速总 DNA 提取及目的片段获取系统; 3. 小型高通量遗传物质快速纯化系统; 4. 控温实验操作支撑平台 (20 °C); 5. 稳压蓄电池组; 6. -20 °C 低温储物柜; 7. 2~8 °C 储物柜; 8. 常温储物柜

Fig. 1 Conceptual plant genetic information acquisition equipment

1. high-throughput, quick and accurate acquisition system of genetic information; 2. portable, high-throughput and rapid total DNA extraction and target fragment acquisition system; 3. portable, high-throughput and rapid purification system of genetic material; 4. temperature control platform (20 °C); 5. voltage regulators and batteries; 6. -20 °C refrigerator; 7. 2-8 °C refrigerator; 8. lockers

Glenn, 2011)。同时, 新一代测序仪的小型化和微型化也为便携式 iFlora 装置的创建提供了可能。目前也有研究人员提出用新一代测序仪平台开展如 DNA 条形码研究, 但由于该类工作的特点是需要获取大量植物样品特定的少数基因片段的遗传信息, 而新一代测序仪平台的特点是获取同一样品或少数样品的海量信息, 因而, 在遗传信息标准数据库建立的工作中, 我们认为以 3730xL 为代表的一代测序平台有其不可替代的优势, 而在有了标准数据库需要对特定样品进行鉴定时, 新一代测序仪平台可能会提供一个更高效的自动化的微型测序平台。两种测序平台的比较见表 2。

4 iFlora 短期目标和最终可能的发展目标

综上所述, iFlora 是一个集物种信息提取, 计算机数字化, 存储、比对和信息输出为一体的

双向开放智能装备。图片和遗传信息是最重要的两个检索途径。iFlora 短期目标是: 参照国际遗传信息数据库的建设标准, 筛选代表属为范例, 整理、保存并建成生物信息标准数据库和生物信息获取关键技术库; 研制出小型化、程序化、自动化和可移动的遗传信息获取集成装备, 摆脱对实验场地和人员的过度依赖, 随时随地获取目标遗传信息; 基于目前植物 DNA 条形码和属志等工作的开展和数据积累, 将物种图片、分布、生境、形态学性状和遗传信息等标准规范化并且数字化, 构建初级的 iFlora 标准数据库。iFlora 终极目标是研制便携式智能设备: 随着新一代测序技术的不断成熟和完善, 测序设备微型化植入便携式 iFlora 智能装备, 建成集数据采集、整合、浏览、查询、统计、比对与分析一体的物种快速鉴定和相关信息方便提取的共享与应用平台系统, 方便、准确、快速的识别物种并获取相关信息。

表 1 植物遗传信息高效获取技术装备体系与现有装备性能比较 (96 个样品的遗传信息获取)

Table 1 Performance comparison between plant genetic information effective acquisition technology and equipment and existing equipment (96 samples)

	所需设备	所需时间	人力投入	所占空间	配套试剂耗材
目前状况	近 10 台/套各类分散的设备	5~7 个工作日	依靠人的实验步骤多, 劳动强度大, 持续工作程度低	较大, 需在 4~5 个房间进行	较多
整合后目标	一套整合的装置	1 个工作日	主要依靠装备进行实验, 工作强度较低, 可持续工作	可在不超出 5 m ² 的空间进行	整合预制的试剂

表 2 3730xL 与新一代测序平台的比较

Table 2 Comparison between 3730xL and new-generation sequence analyzer

	3730xL 测序	新一代测序 (第二代和第三代)
测序准确率	99.9%	99% (范围变动大)
读长	900 bp (相对固定)	150 bp 或 500 bp 或 10 kb (范围变动大)
信息量/运行	96 × 900 bp	以 Gb 为单位
样品数量/运行	96 (相对固定)	较少样品 (样品混合测序、前处理不同、测序量差异大)
数据处理	容易	复杂
技术条件	成熟 (定型产品)	较为成熟, 升级换代快
一次性成本投入	较低, 易控	较大, 不易控制
数据使用率	目标信息 (片段)	海量信息量 (需进一步处理、分选)
样品前处理	比较成熟, 可进一步整合提高	复杂
适合工作范围	获取目标片段, 构建 iFlora 标准数据库	海量数据, 与 iFlora 标准数据库比较分析, 获取物种信息

(参 考 文 献)

- Andreasen K , Manktelow M , Razafimandimbison SG , 2009. Successful DNA amplification of a more than 200-year-old herbarium specimen: recovering genetic material from the Linnaean era [J]. *Taxon* , **58**: 959—962
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) , 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden* , **85**: 531—553
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) , 2003. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* , **141**: 399—436
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) , 2009. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society* , **161**: 105—121
- Arnot DE , Roper C , Bayoumi RAL , 1993. Digital codes from hyper-variable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology* , **61**: 15—24
- Bell EA , 1986. Preface [A]. In: Clayton WD , Renvoize SA (eds.) , *Genera Graminum , Grasses of the World* [M]. London: Her Majesty's Stationary Office
- Borisenko AV , Sones JE , Hebert PD , 2009. The front-end logistics of DNA barcoding: challenges and prospects [J]. *Molecular Ecology Resources* , **9**: 27—34
- Brach AR , Boufford DE , 2011. Why are we still producing paper floras? [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden* , **98**: 297—300
- Brach AR , Song H , 2005. ActKey: A web-based interactive identification key program [J]. *Taxon* , **54**: 1041—1046
- Braslavsky I , Hebert B , Kartalov E *et al.* , 2003. Sequence information can be obtained from single DNA molecules [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **100** (7) : 3960—3964
- Brown B , Emberson RM , Paterson AM , 1999. Mitochondrial COI and II provide useful markers for *Weiseana* (Lepidoptera , Hepialidae) species identification [J]. *Bulletin of Entomological Research* , **89**: 287—294
- CBOL Plant Working Group , 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **106**: 12794—12797
- Chase MW , Soltis DE , Olmstead RG *et al.* , 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl* [J]. *Annals of the Missouri Botanical Garden* , **80**: 528—580
- Che J , Huang DW , Li DZ *et al.* , 2010. DNA barcoding and the international barcode of life project in China [J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences* , **24**: 257—260
- Chanderbali AS , Albert VA , Leebens-Mack J *et al.* , 2009. Transcriptional signatures of ancient floral developmental genetics in avocado (*Persea americana*; Lauraceae) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **106**: 8929—8934
- Edwards EJ , Smith SA , 2010. Phylogenetic analyses reveal the shady history of C₄ grasses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **107**: 2532—2537
- Fedurco M , Romieu A , Williams S *et al.* , 2006. BTA , a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies [J]. *Nucleic Acids Research* , **34** (3) : e22
- Floyd R , Abebe E , Papert A *et al.* , 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification [J]. *Molecular Ecology* , **11**: 839—850
- Gebiola M , Gómez-Zurita J , Monti MM *et al.* , 2012. Integration of molecular , ecological , morphological and endosymbiont data for species delimitation within the *Pnigalio soemius* complex (Hymenoptera: Eulophidae) [J]. *Molecular Ecology* , **21**: 1190—1208
- Glenn TC , 2011. Field guide to next-generation DNA sequencers [J]. *Molecular Ecology Resources* , **11**: 759—769
- Harris TD , Buzby PR , Babcock H *et al.* , 2008. Single-molecule DNA sequencing of a viral genome [J]. *Science* , **320**: 106—109
- Hebert PDN , Cywinska A , Ball SL *et al.* , 2003. Biological identification through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London* , series B **270**: 313—321
- Hebert PDN , Penton EH , Burns JM *et al.* , 2004. 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* , **101**: 14812—14817
- Higuchi R , Bowman B , Freiburger M *et al.* , 1984. DNA sequences from the quagga , an extinct member of the horse family [J]. *Nature* , **312**: 282—284
- Hollingsworth PM , Graham SW , Little DP , 2011. Choosing and using a plant DNA barcode [J]. *PLoS One* , **6**: e19254
- Janzen DH , Hajibabaei M , Burns JM *et al.* , 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* , Series B **360**: 1835—1845
- Knapp M , Hofreiter M , 2010. Next generation sequencing of ancient DNA: requirements , strategies and perspectives [J]. *Genes* , **1**: 227—243
- Kress WJ , 2004. Paper floras: How long will they last? A review of Flowering Plants of the Neotropics [J]. *American Journal of Botany* , **91**: 2124—2127
- Kress WJ , Wurdack KJ , Zimmer EA *et al.* , 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , **102**: 8369—8374

- Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* apacer region [J]. *PLoS One*, **2**: e508
- Li DZ, Gao LM, Li HT *et al.*, 2011a. 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*, **108**: 19641—19646
- Li DZ, Liu JQ, Chen ZD *et al.*, 2011b. Plant DNA barcoding in China [J]. *Journal of Systematical and Evolution*, **49**: 165—168
- Li DZ (李德铎), Wang YH (王雨华), Yi TS (伊廷双) *et al.*, 2012. The next-generation Flora: iFlora [J]. *Plant Diversity and Resources*, **34** (6): 525—531
- Lister DL, Bower MA, Howe CJ *et al.*, 2008. Extraction and amplification of nuclear DNA from herbarium specimens of emmer wheat: a method for assessing DNA preservation by maximum amplicon length recovery [J]. *Taxon*, **57**: 254—258
- Margulies M, Egholm M, Altman WE *et al.*, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. *Nature*, **437**: 376—380
- Niesters HG, Goessens WH, Meis JF *et al.*, 1993. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**: 904—910
- Ning SP (宁淑萍), Yan HF (颜海飞), Hao G (郝刚) *et al.*, 2008. Current advances of DNA barcoding study in plants [J]. *Biodiversity Science (生物多样性)*, **16** (5): 417—425
- Parks M, Cronn R, Liston A, 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes [J]. *BMC Biology*, **7** (1): 84
- Puillandre N, Bouchet P, Boisselier-Dubayle MC *et al.*, 2012. New taxonomy and old collections: integrating DNA barcoding into the collection curation process [J]. *Molecular Ecology Resources*, **12**: 396—402
- Qiu YL, Li L, Wang B *et al.*, 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 15511—15516
- Ran JH, Wang PP, Zhao HJ *et al.*, 2010. A test of seven candidate barcode regions from the plastome in *Picea* (Pinaceae) [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**: 1109—1126
- Ristaino JB, 1998. The importance of archival and herbarium materials in understanding the role of Oospores in late blight epidemics of the past [J]. *Phytopathology*, **88**: 1120—1130
- Sage RF, 2003. The evolution of C₄ photosynthesis [J]. *New Phytologist*, **161**: 341—370
- Savolainen V, Cuénoud P, Spichiger R *et al.*, 1995. The use of the herbarium specimens in DNA phylogenetics: Evaluation and improvement [J]. *Plant Systematics and Evolution*, **197**: 87—98
- Seberg O, Petersen G, 2009. How many loci does it take to DNA barcode a crocus? [J]. *PLoS One*, **4**: e4598
- Smith SA, Donoghue MJ, 2008. Rates of molecular evolution are linked to life history in flowering plants [J]. *Science*, **322**: 86—89
- Soltis DE, Soltis PS, 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**: 348—352
- Staats M, Cuenca A, Richardson JE *et al.*, 2011. DNA Damage in plant herbarium tissue [J]. *PLoS One*, **6**: e28488
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F *et al.*, 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding [J]. *Nucleic Acids Research*, **35**: e14
- Tang H, Bowers JE, Wang X *et al.*, 2010. Angiosperm genome comparisons reveal early polyploidy in the monocot lineage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**: 472—477
- Tautz D, Arctander P, Minelli A *et al.*, 2002. A plea for DNA taxonomy [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **18** (2): 70—74
- Telle S, Thines M, 2008. Amplification of *cox2* (—620 bp) from 2 mg of up to 129 years old herbarium specimens, comparing 19 extraction methods and 15 polymerases [J]. *PLoS One*, **3**: e3584
- Turcatti G, Romieu A, Fedurco M *et al.*, 2008. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis [J]. *Nucleic Acids Research*, **36** (4): e25
- Turner S, 2008. Harnessing nature's powerful DNA sequencing engine: single molecule real time sequencing-by-synthesis in advances in genome biology and technology meeting. Marco Island, FL
- Vandepoele K, Van de PY, 2005. Exploring the plant transcriptome through phylogenetic profiling [J]. *Plant Physiology*, **137**: 31—42
- van Velzen R, Bakker FT, van Loon JJA, 2007. DNA barcoding reveals hidden species diversity in *Cymothoe* (Nymphalidae) [J]. *Proceeding of the Section Experimental and Applied Entomology-Netherlands Entomological Society*, **18**: 95—103
- Vere N, Rich TCG, Ford CR *et al.*, 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales [J]. *PLoS One*, **7**: e37945
- Wandeler P, Hoeck P, Keller LF, 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics [J]. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**: 634—642
- Wells JD, Pape T, Sperling FAH, 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important sarcophagidae (Diptera) [J]. *Journal of Forensic Sciences*, **46**: 1098—1102
- Willis CG, Ruhfei B, Primack BA *et al.*, 2009. Phylogenetic patterns of species loss in Thoreau's woods are driven by climate change [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 17029—17033
- Yang JB, Wang YP, Michael M *et al.*, 2012. Applying plant DNA barcodes to identify species of *Parnassia* (Parnassiaceae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, **12**: 267—275
- Yao H, Song JY, Liu C *et al.*, 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS One*, **5**: e13102