

BÖLÜM 15

MOLEKÜLER TÜR TANIMLAMASINDA BİR ARAÇ OLARAK DNA BARKODLAMA

Dr. Ayşe Nur PEKTAŞ¹

Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK^{1,2}

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Sivas, Türkiye. e-posta:aysenurpektas@cumhuriyet.edu.tr
ORCID ID: 0000-0001-5621-2844

² Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Fen Fakültesi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 58140, Sivas, Türkiye.e-posta:sberk@cumhuriyet.edu.tr
ORCID ID: 0000-0003-4687-0223

GİRİŞ

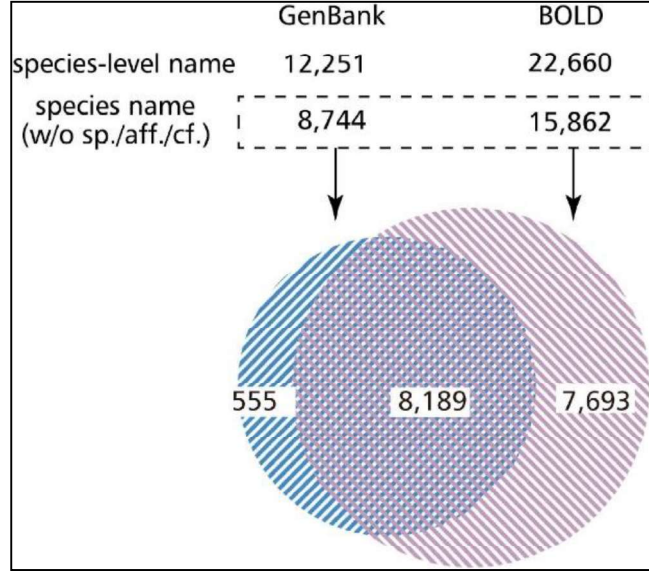
Türlerin taksonomik tanımlamasında DNA kullanma kavramı ilk olarak Hebert ve Gregory tarafından önerilmiştir (P. D. Hebert ve ark., 2003). DNA barkodlama kavramı, türleri birbirinden ayırmak için kullanılabilen "küçük standart DNA dizisi" anlamına gelir. Genomda seçilmiş spesifik bölgelerin PCR amplifikasyonuna dayanan ve tür tanımlaması için kullanılan bir tekniktir. İlk barkodlama çalışmasından bu yana 6000'in üzerinde barkodlama makalesi yayınlanmıştır (Dormontt ve ark., 2018). Türlerin yaşam formlarını birbirinden ayırt edebildiği bir barkodlama bölgesi fikri hızla benimsenmiştir. Daha sonra diğer organel bölgelerinin, işaretleyicilerin ve ilgili primer setlerinin de barkodlama için kullanılabilceği düşüncesiyle barkodlama çalışmaları genişlemiştir (Bohmann ve ark., 2020).

Temel olarak, barkodlama, moleküler karakterizasyon yoluyla kesin tanımlamaya izin vermede her biri diğeri kadar dolaylı olarak hayati önem taşıyan iki temel öge içerir. Bunlar bilinmeyen ve hedeftir. Bilinmeyen, normalde kaynağı bilinmeyen (yaklaşık 650 baz çifti) kısmi bir COI dizisiyle temsil edilirken, hedef önceden belirlenmiş (tipik olarak morfoloji ve tercihen tür düzeyine göre) veri tabanında veya başka bir depoda bulunan bir COI dizisidir. DNA barkodlamanın amacı, ekosistemimizdeki türlerin çeşitliliğini tanımlamaya yardımcı olmaktır ve bu amaca ulaşmak için tür düzeyinde tanımlama çok önemlidir (Kvist, 2013).

1. BARKODLAMA VERİ TABANLARI

DNA barkodlama, genetik işaretleyiciler olarak DNA barkod dizilerini ve DNA barkodu tarafından tanımlanan tür bilgilerini (veya türleri tanımlamak için gereken numune bilgilerini) sorgulamak için bir veri tabanı gerektirir. **BOLD**, hayvanlar ve bitkiler için popüler bir DNA barkod veri tabanıdır (Ratnasingham & Hebert, 2007) ve **UNITE3** de mantarlar için kullanılır (Nilsson ve ark., 2019). DNA barkodları ayrıca DNA sekansı özelliklerini içerir; bu nedenle DNA barkodları, **NCBI** (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, ABD) **GenBank Nucleotide** veri tabanında da depolanmıştır. **BOLD** ve **GenBank Nucleotide**, DNA barkod verilerini ayrı ayrı toplar ve verileri birbirinden alır. Ancak arka planlarındaki farklılıktan dolayı içerikleri farklıdır. Örneğin bir türün barkod bilgisi hem **BOLD** hem de **GenBank** veritabanında olabilir ya da sadece tek bir veri tabanına kaydedilmiş de olabilir. Şekil 1 de balık türlerinin barkod verisi ile ilgili iki veri tabanındaki barkodların paylaşımı gösterilmiştir. Nakazato ve Jinbo (2022), çalışmalarında balık türlerinde **BOLD** ve **GenBank**'ın kaç türü kapsadığını ve

bu veri tabanlarında kaç türün örtüştüğünü araştırmışlardır. Veri tabanlarında türler genellikle tür düzeyinde tanımlanmaz (örneğin, sp. veya aff.). GenBank'ın kapsadığı türlerin çoğu aynı zamanda BOLD kapsamındadır, bunun nedeni GenBank verilerinin BOLD sisteminden alınmış olabilir (Nakazato & Jinbo, 2022).



Şekil 1. GenBank ve BOLD veri tabanlarının kapsadığı balık türlerinin Venn diyagramı (Nakazato & Jinbo, 2022)

BOLD, DNA barkod kayıtlarının alınmasına, saklanmasına, analiz edilmesine ve yayınlanmasına yardımcı olan bir bilişim altyapısıdır; 2005 yılında piyasaya sürülmüştür (Ratnasingham & Hebert, 2007). BOLD, yaklaşık 11 milyon DNA barkod sağlayarak Mayıs 2022 itibarıyla 239.000 hayvan, 71.000 bitki ve 24.000 mantar ve diğer türü indekslemektedir (Nakazato & Jinbo, 2022). BOLD, örneklerin resmi bir DNA barkod statüsüne sahip numune kaydı olarak nitelendirilebilmesi için aşağıdaki yedi öğeyi içeren verileri talep eder; tür adı, (ii) belge verileri (katalog numarası ve saklanan kurum), (iii) toplama kaydı (toplayıcı, toplama tarihi ve konumu, GPS koordinatları), (iv) örneğin tanımlayıcısı, (v) barkod dizisi, (vi) amplicon oluşturmak için kullanılan PCR primerleri ve (vii) trace dosyaları (Ratnasingham & Hebert, 2007). BOLD, özellikle taksonomistler ve filogenetikçiler tarafından, kanıt örneklerinin kapsamlı fotoğrafik veri arşivi ve kullanıcıya tür tanımlama veya incelemeye olanak tanıyan örnekler

üzerindeki bilgi zenginliği nedeniyle ve DNA barkodlamasında kullanılan biyoçeşitlilik bilgilerine atıfta bulunmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

DNA dizileri, NCBI, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü (**EBI**) ve Japonya DNA Veri Bankası'ndan (**DDBJ**) oluşan Uluslararası Nükleotid Dizisi Veritabanı İşbirliği **INSDC**, (Arita ve ark., 2021) tarafından 30 yılı aşkın bir süredir toplanmaktadır ve sırasıyla **NCBI GenBank** (Sayers ve ark., 2022), **Avrupa Nükleotid Arşivi (ENA)** ve **DDBJ** veri tabanlarında sunulmaktadır. Son yıllarda çeşitli organizmalar için DNA barkodları, mitokondriyal genomlar, tüm genomlar ve diğer gen dizileri elde edilmekte ve dizi bilgileri bu veri tabanlarında arşivlenmektedir. Ek olarak, NGS verileri (metagenomik ve metabarkodlama dahil) **INSDC** tarafından Dizi Okuma Arşivi (SRA) biçiminde toplanır. Moleküler biyologlar ve biyoinformatikçiler araştırmalarını genellikle DNA dizisi üzerinden gerçekleştirirler ve DNA dizileriyle ilgilenen NCBI hizmetlerini kapsamlı bir şekilde kullanırlar.

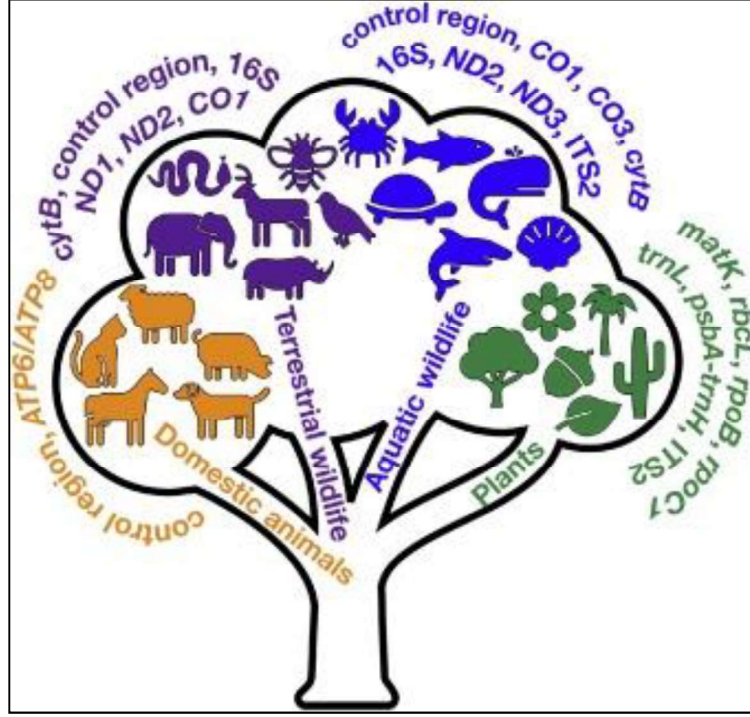
Son zamanlarda, **Küresel Biyoçeşitlilik Bilgi Tesisi'nde (GBIF)**, biyoçeşitlilik bilgilerinin ana veritabanı) çevresel DNA (**eDNA**) gibi dizilere dayalı oluşum bilgilerini kaydetmek mümkün hale gelmiştir (Andersson ve ark., 2020). Ayrıca GenBank artık birçok biyolojik çeşitlilik bilgisini de kaydedebilir durumdadır.

1.1. Taksonomik Sınıflandırmada Barkodlama

Taksonomik sınıflandırma, ölçülen özelliklerin altında yatan gözlemlenen benzerliklere (veya farklılıklara) dayalı olarak organizmaları kategorize etmek için insan yapımı bir olgudur. Yeni bilgilerin edinilmesiyle taksonomi anlayışımız değişse ve yerleşik adlarda revizyonlara yol açabilse de, tür kategorizasyonlarının genel olarak "gerçek" olduğu kabul edilmelidir. Morfolojik sınıflandırma, biyolojik materyallerin taksonomik tanımlaması için temel yöntemdir. Morfolojik inceleme, yeterli teşhis özellikleri mevcut olduğunda ve uygulama uzmanlığı ve uygun karşılaştırmalı referans materyali mevcut olduğunda taksonomik grupları belirlemek için güvenilir, ucuz bir yöntemdir. Bu koşullar karşılanmadığında ve genetik materyal mevcut olduğunda, taksonomik tanımlama için genellikle DNA kullanılır.

Nükleotid bazlarının bilgilendirici bölgelerdeki konumu ve sırası tanı için kullanılan sınıf karakterleridir. Şirket içi ve/veya halka açık veri tabanlarından alınan diziler, referans karşılaştırmaları olarak kullanılır ve numune tanımlaması, bilinmeyen dizi ile referans arasındaki benzerlik derecesine dayanır. Bu tür tanımlamalar, belirli bir genetik bölge için karakterize edilen tüm yakından ilişkili taksonlara sahip iyi ayrılmış gruplar

için basittir, ancak takson örnekleme tamamlanmamış ve sığ birleşme derinliklerine sahip gruplarda zorlaşır. Yaban hayatı çalışmalarında taksonomik gruplandırma ve analiz için kullanılan gen bölgelerinin şematik gösterimi şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Yaban hayatı taksonomik tanımlamasında kullanılan dört ana takson grubunun ve genlerin şematik gösterimi. 1) **Mitokondriyal bölgeler** – 12S, 12S ribozomal RNA; 16S, 16S ribozomal RNA; *cytB*, sitokrom b; *CO1*, sitokrom c oksidaz alt birim 1; *CO3*, sitokrom c oksidaz alt birim 3; *ND1*, NADH alt birim 1; *ND2*, NADH alt birim 2; *ND3*, NADH alt birim 3; *ATP6*, ATP sentaz membran alt birimi 6; *ATP8*, ATP sentaz zar alt birimi 8. 2) **Nükleer bölgeler** – *ITS2*, dahili transkripsiyonlu ayırıcı alt birim 2. 3) **Kloroplast bölgeleri** – *MatK*, maturaz K; *RbcL*, ribuloz bifosfat karboksilaz; *rpoB*, DNA'ya yönelik RNA polimeraz alt birim beta; *rpoC1*, plastid kodlu RNA polimeraz alt birim beta (Meiklejohn ve ark., 2021).

2. HAYVANLARDA BARKODLAMA ÇALIŞMALARI

DNA barkodlama tekniği standardizasyon, minimalizm ve ölçeklenebilirlik gibi üç önemli ilkeye dayanır. Bu ilkeler göz önüne alındığında, uygun barkodlamanın seçilmesi, bir türü diğerinden ayırt etmek için veri setlerini kolayca karşılaştırılabilir hale getirmek için çok kapsamlı ve çeşitli bir numune setinde en yüksek güvenilirlikle rutin dizileme için tek veya çoklu standart lokusların seçilmesine bağlıdır. 600 ila 1000 baz çifti DNA dizilerine sahip Sitokrom C oksidaz alt birimi 1'in (*cox-1*, COXI, COI veya COI-5P) 5'-ucu genel olarak türler arası değişkenlik amacına uygundur ve hayvanlar için evrensel tür düzeyinde barkod olarak kabul edilir (Kress & Erickson, 2007). Haploit, anneden kalıtsal, hücre başına yüksek kopya sayısına sahip protein kodlama bölgesi olan tek lokus, kötü korunmuş örneklerden sekans geri kazanımını garanti eder (Fazekas ve ark., 2009; P. D. Hebert ve ark., 2003; Hollingsworth ve ark., 2011). COI primerlerinin son derece spesifik, sağlam olması ve hedef DNA'nın 5' ucunu almak için en yüksek doğruluk derecesini göstermesi nedeniyle COI, diğer mitokondriyal genlere göre önceliklidir (Folmer ve ark., 1994).

DNA'daki mutasyon oranı, genomun boyutuyla ters bir ilişki gösterdiğinden, mitokondriyal DNA, nükleer DNA'ya kıyasla daha küçük boyutu için nispeten yüksek mutasyona uğrar ve bu, mitokondriyal COI'yi evrensel bir hayvan barkodu olarak nükleer *RbcL*, *MatK*'den ya da başka nükleer barkodlardan daha yetenekli kılar (Drake ve ark., 1998; Waugh, 2007). COI'nin tür içi varyasyonu genellikle, insersiyon ve delesyonların nadir olduğu türler arası varyasyondan %10'dan daha azdır (Blaxter, 2004).

Morfolojik çeşitliliğin derecesi, anatomik özellikler hakkında bilgi eksikliğinden kaynaklanan zayıf filogenetik bilgi ve kriptik türlerin oluşumu, tanımlamada kesinlik getirmek ve hayvanlar dünyasının mevcut sorunlarını çözmek için morfo-moleküler bir yaklaşıma olan ihtiyacı artırmaktadır (Wang ve ark., 2020). Türlerin kriptik biyoçeşitliliğini (morfolojik olarak benzer ancak genetik olarak farklı türler) anlamak ve kaydetmek, fenotipik benzerliğin maskesini düşürerek ve çevresel değişikliklere biyolojik çeşitliliğin tepkilerini tahmin ederek etkili türlerin korunmasını sağlamak için kritik öneme sahiptir. Örneğin, kurbağalar kriptik tür araştırması için bir hedef grup olarak kabul edildiğinden, amfibi *Limnonectes kuhlii*'nin mtDNA verilerini kullanan modern bir moleküler sistematiki çalışması, 22 farklı evrimsel soy ortaya çıkarmıştır; bunlardan 16'sı şu anda tarihsel olarak tek bir tür olarak kabul edilen *L. kuhlii* altında yer almaktadır (McLeod ve ark., 2011). Türleşme her zaman morfolojik değişikliklerle görülemediğinden,

moleküler araçların uygulanmaması tür çeşitliliğinin hafife alınmasına neden olur (D. Bickford ve ark., 2007) (McLeod ve ark., 2011).

DNA barkodlama yaklaşımı, kriptik türlerin ve yeni keşfedilen türlerin ortaya çıkması nedeniyle farklı hayvan cinslerinin taksonomik revizyonuna duyulan ihtiyacı önemli ölçüde vurgulamaktadır. Bir biyolojik çeşitlilik sıcak noktası olan Qinghai-Tibet Platosu'nda *Triplophysa* cinsi, 1630 örneğin DNA barkodlaması ile 2 kriptik tür olan *T. robusta* ve *T. minxianensis* ile 24 yerli türü bulmak için incelenmiştir (Wang ve ark., 2020). Ayrıca, hassas tanımlama amaçları için yüksek verimli teknolojilerin uygulanması artmaktadır. İstilacı böceklerin gelişini kontrol etmeye yönelik geleneksel tuzak tabanlı sürveyans stratejileri, yalnızca DNA metabarkodlamanın eşlik ettiği zamandan daha az verimlidir çünkü ikincisi, karışık popülasyonların eş zamanlı, çok-türlü tanımlanmasına yardımcı olur (Piper ve ark., 2019). Böceklerin, kısa yaşam döngüleri nedeniyle sıcaklığa duyarlı hale gelmeleri beklenmektedir, örneğin, Avrupa'da göçmen olmayan kelebeklerin önemli ölçüde kutuplara doğru kaymasında sıcaklık büyük ölçüde hakimdir (Parmesan ve ark., 1999).

Böcek topluluğundaki değişiklikler, ayrışma modelleri, besin döngüsü, birincil üretkenlik ve biyolojik çeşitlilik değerlendirmesi dahil olmak üzere ekolojik parametrelerdeki değişiklikleri anlamak için kritik öneme sahiptir. Çoklu grup veri setlerini yüksek verimli DNA barkodlama teknolojileriyle birleştirmek, büyük ölçekli gözlemin önündeki çeşitli lojistik, finansal ve sistematik engelleri en aza indirme potansiyeline sahiptir. Arktik Eklembacıklı Topluluğu, Arachnida, Collembola ve Insecta'ya odaklanarak toplanan 24.198 örneğin (MN665381'den MN683476'ya değişen GenBank erişim numaralarına sahip), BIN'lere atanacak mitokondriyal COI kullanan 18.096 (%75) adet barkodunu geliştirmişlerdir (Pentinsaari ve ark., 2020).

Bir primat çalışmasında, tür tanımlaması için uygun bir belirteç önermek amacıyla, 12 mitokondriyal protein kodlayan genin etkinliği test edilirken, barkodların tür düzeyinde daha muhafazakar doğasına işaret eden COI'den ziyade, NADH alt birimi 5 (ND5) ve sitokrom c oksidaz alt birimi II (COII)'nin cins ve aile içinde türler arasında olduğundan daha büyük barkod boşluklarını ürettiğini keşfetmişlerdir (Jackson & Nijman, 2020).

Yasadışı kaçak avlanma, zehirlenme ve habitat kaybı nedeniyle tehdit altında olan memelilerin en ilginç ailelerinden biri olan Canidae'nin 3 türü, COI barkodunu doğrulamak ve genetik sapmayı tespit etmek için DNA barkodlama yaklaşımı ile araştırılmıştır. Türler arasındaki ve içindeki ortalama dizi farklılığı, sırasıyla %12,32 ve %0,61 olup; bu, daha önce

bildirilen çalışmalardan nispeten daha yüksek genetik çeşitliliğe işaret etmektedir (Aksöyek ve ark., 2017).

Belirli bir tür için DNA barkodlama ve morfolojik tanımlama arasındaki tutarlılık, morfolojik ve genetik olarak benzer olan kardeş türlerin varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Aynı DNA barkodunu paylaşan belirli barkodların olmaması, daha düşük operasyonel taksonomik birimleri (OTU'lar) tanımlamak için belirsizlik yaratabilir. Buna ek olarak, numunelerin yanlış tanımlanması ve yanlış etiketlenmesi, daha sonraki araştırmalarda olası hata ve tereddütlere neden olur (Pleijel ve ark., 2008; Dixon, 2012).

Yumuşakçaların en bol bulunan grubu olan gastropodlar, çeşitli büyüme evrelerinde farklı morfolojik karakterleri nedeniyle morfolojik olarak farklılaşırlar ve dünya çapında 80.000 türle deniz biyoçeşitliliğinin önemli bir parçasını oluştururlar, ekonomik açıdan önemli oldukları için aşırı kullanım nedeniyle tehditlerle karşı karşıyadırlar (Bieler, 1992). Doğru tür tespiti, flora ve faunanın korunmasında çok önemli bir rol oynar. COI genini potansiyel bir mitokondriyal DNA barkodu olarak kullanarak verimli bir balıkçılık kaynak araştırması ve doğal kaynak yönetimi yapmak ve COI geninin etkinliğini barkod dizisi olarak doğrulamak için, Çin'de 35 aileye ve 7 takıma ait, 3 yeni kayıt içeren 120 türden elde edilen, MN388943 ile MN389209 arasında değişen GenBank erişim numaraları olan 306 barkod dizisi içeren bir barkod referans kitaplığı geliştirilmiştir (Ran ve ark., 2020).

Moleküler araçların yardımı olmadan ornitologlar, bazen kuşların doğru kimliğini sağlamak için zorluklarla karşılaşılırlar. Yararlı bir araç olarak DNA barkod referans kitaplıkları, COI dizileri için coğrafi örnekleme genişletmelerine yardımcı olabilir. Bir çalışmada 10 familyaya ait 18 türden kuş kanı örneklerinden toplam 26 COI dizisi elde edildi. Bir kuzey göçmen kuşu, moleküler çalışmadan sonra farklı bir tür olarak yeniden tanımlanmıştır (Pulgarin ve ark., 2021).

Köpekbalığı etlerinin çoğunluğu Asya'dan ithal eden Brezilya'da bu balıkların aşırı avlanması büyüyen bir sorundur. Feitosa ve diğerleri, (2018), Brezilya'nın Kuzey Kıyısında nesli tükenmekte olan köpekbalığı türlerinin yasa dışı ticaretini ortaya çıkarmak için bir çalışma yürüterek ve COI (260) ve NADH2 (167) ile incelenen 427 örnekten 17 tür belirledi. Tespit edilen türlerin %53'ü yok olma tehdidi altındaki kategorilerde ve %76'sı da yakın tehdit altındaki kategoriler altında listelenmiştir (Feitosa ve ark., 2018).

3. BİTKİLERDE BARKODLAMA ÇALIŞMALARI

Dünyadaki bitki çeşitliliğinin çoğu, yok olma tehdidi altındaki yüksek oranda endemik bitki türleri içeren tanınmış biyolojik çeşitlilik sıcak noktalarında yoğunlaşmıştır (Myers ve ark., 2000). Bu aşırı çeşitlilikteki floralar, insan faaliyetlerinden kaynaklanan artan tehditlere karşı savunmasız olduğundan, koruma çabalarına yardımcı olmak için türlerin hızlı bir şekilde tanımlanmasını ve miktarının belirlenmesini sağlayan yöntemlere ihtiyaç vardır (Brooks ve ark., 2006; Gonzalez ve ark., 2009). Geleneksel biyoçeşitlilik envanteri yöntemleri zaman alıcıdır ve azalmakta olan bir kaynak olan taksonomik uzmanlığın mevcudiyetine bağlıdır. Tropikal yağmur ormanlarındaki bitkilerin tanımlanması çoğu durumda uzmanlar için bile bir sorun olmaya devam etmektedir (Gonzalez ve ark., 2009). DNA barkodlama konusu başlangıçta bilim adamları arasında pek çok tartışmayı teşvik etse de, teknolojinin daha yeni ve ilginç uygulamalarının düzenli olarak tasarlanmasıyla artık kabul gören bir taksonomik araçtır. DNA barkodları artık çeşitli biyolojik uygulamalar için kullanılmakta ve tanıtılmaktadır bu uygulamalar: şifreli türlerin tanımlanması (Burns ve ark., 2008; Smith ve ark., 2006), ağaç kökleri gibi türlerin parçaları (Jackson ve ark., 1999; Kesanakurti ve ark., 2011), ekosistemlerdeki istilacı türlerin tespiti (Armstrong & Ball, 2005; Cross ve ark., 2011), tür keşfi (David Bickford ve ark., 2007), taksonomik revizyon (Lara ve ark., 2010), besin ağlarının çözülmesi ve avcı-av ilişkileri (Kaartinen ve ark., 2010), karantina (Bonants ve ark., 2010) ve nesli tükenmekte olan türlerin yasa dışı ticaretine (Eaton ve ark., 2010) ve yasa dışı olarak kesilmiş keresteye (Lowe & Cross, 2011) karşı mücadele. DNA barkodlama, genellikle, biyolojik çeşitlilik envanteri ve türlerin sahada tanımlanması gibi, bilimsel verilerin ve yeni teknolojilerin genel halka ve uzman olmayanlara (Kress & Erickson, 2008) erişilebilirliğini artırma kabiliyeti nedeniyle desteklenir. Bilinmeyen bölgelerdeki türlerin geleneksel yöntemlerle doğru bir şekilde tanımlanması, flora bilgisi eksikliği ve/veya tanımlama için gerekli olan mevsimsel çiçek ve meyve karakterlerinin eksikliği nedeniyle uzun yıllar alabilir. Mevcut olduğunda bile, birçok tür için gölgelikte yüksek olabileceğinden, verimli materyali toplamak genellikle zordur ancak, DNA ekstraksiyonu için yaprak veya kambiyum dokusunun toplanması çok daha az çaba gerektirmektedir (Colpaert ve ark., 2005).

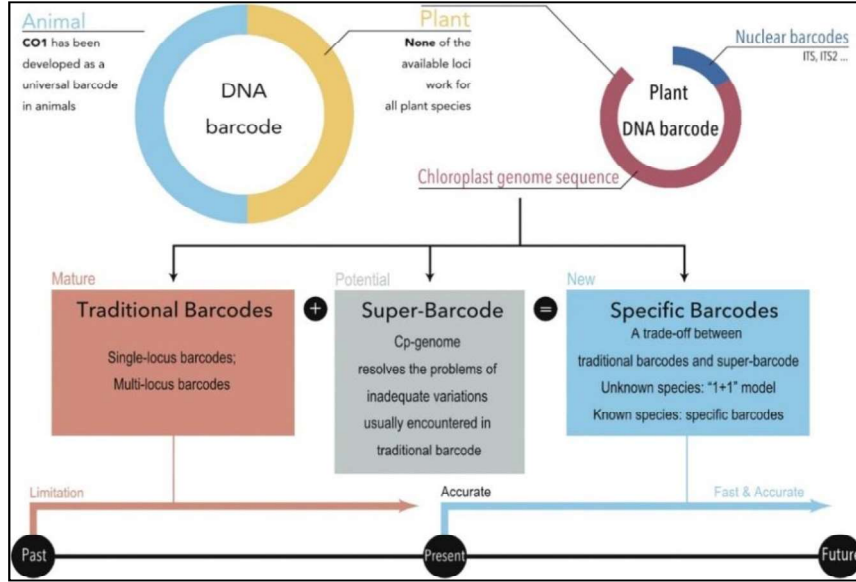
Yüzyıllarca süren taksonomik çabaya rağmen, bitki türleri çeşitliliğinin karakterizasyonu önemli ve önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir. Bitkiler, böcekler gibi çok çeşitli gruplara kıyasla şüphesiz iyi anlaşılabilir olsa da, son tahminler yaklaşık 70.000 çiçekli bitki türünün keşfedilmeyi

beklediğini göstermektedir (Bebber ve ark., 2010). Yeni türler bulmanın ötesinde, mevcut taksonomik hesapların uzlaştırılması ve güncellenmesi gerekir ve tanımlanamayan örnekleri bilinen türlere atamanın daha geniş pratik zorluğu da vardır. Bu son nokta, özellikle mevcut materyalin optimumun altında olduğu (örneğin genç, parçalanmış, işlenmiş) veya mevcut taksonomik uzmanlık seviyelerinin düşük olduğu durumlarda geçerlidir. DNA barkodlama, türleri ayırt etmek için bir veya birkaç DNA bölgesinin standartlaştırılmış kullanımını içermektedir (Paul DN Hebert ve ark., 2003).

3.1. Standart Bitki Barkodları

Hayvanlarda Sitokrom oksidazın (COI) evrenselliği ve çözme gücü ile eşleşen tek bir bitki barkodu yoktur (Paul DN Hebert ve ark., 2003). Numune tabanlı bitki barkodlama çalışmalarının çoğunda, bir veya birkaç plastid bölgesini (örneğin, “ana barkodlar” olan *RbcL* ve *MatK*'yi kodlayan protein ve kodlamayan aralayıcı *TrnH-psbA*) ve nükleer ribozomal DNA'nın (*ITS*—ya tamamı ya da sadece *ITS2* bölgesi) dahili kopyalanmış ayırıcı (*ITS*) bölgelerini kullanılmaktadır (Group, 2009; Hollingsworth, 2011; Kress & Erickson, 2007). Karışık şablonlara ve/veya bozulmuş DNA'lara (örn. çevresel numuneler) odaklanan bitki çalışmaları, tipik olarak, kısa uzunluk ve korunmuş primer dizileri, onu yeni nesil dizileme yoluyla amplifikasyona ve yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri aracılığıyla kısa okumalı dizilemeye uygun hale getiren plastid *trnL* intronun P6 halkasını kullanmaktadır (Taberlet ve ark., 2007; Valentini ve ark., 2009). Birçok hayvan grubunda, türlerin barkod dizisi kümeleri ile yakın uyumluluğu, tür çeşitliliğinin yarı otomatik olarak ölçülmesini sağlamaktadır (Hebert ve ark., 2016; Ratnasingham & Hebert, 2013). Bununla birlikte, bitki-plastid ve ribozomal-DNA barkodları tipik olarak daha düşük ayırt etme gücüne sahiptir (Hollingsworth ve ark., 2011) ve dizi uzayında diğer türlerden net süreksizliklerle ayrılan türdeşlerin sıkı bir şekilde kümelenmesine yol açmaz. Bunun yerine, tipik olarak ilgili türler arasında yaygın olarak paylaşılan barkodlarla tür içi ve türler arası mesafelerin dereceli bir sürekliliği vardır (Hollingsworth ve ark., 2011). Bunun iki ana sonucu var. İlk olarak, standart bitki barkodları, tür düzeyinde bir çerçeve tanımlamak için bağımsız bir şekilde hareket etme çözme gücüne sahip olmak yerine, mevcut sınıflandırmalara moleküler güçlendirmeler olmaya en uygun olanlardır. İkinci olarak, bitki barkodlarının kullanımında, tekniğin çözme gücü ile çalışmadan istenen bilgiler arasında bir uyum sağlanmasına en baştan dikkat edilmelidir (Hollingsworth ve ark., 2016).

Küresel DNA barkodlama başlangıçta "büyük bilim" programı (Gregory, 2005) ve hatta taksonominin rönesansı (Miller, 2007) olarak görülüyordu. Ancak hayvanlarda evrensel bir barkod olarak geliştirilen sitokrom c oksidaz 1 (CO1) dizisi, çok daha yavaş mutasyon hızı nedeniyle çoğu bitkiyi ayırt edememektedir (Kress & Erickson, 2007). Birçok çalışma evrensel bir bitki barkodu aramış olsa da, mevcut lokusların hiçbiri tüm türlerde çalışmamaktadır (Chase & Fay, 2009; Chen ve ark., 2010). Yaşam-Bitki Çalışma Grubu Barkodu Konsorsiyumu (CBOL) kısa süre önce *MatK+RbcL*'nin iki lokuslu kombinasyonunu yalnızca %72'lik bir ayırım etkinliğiyle en iyi bitki barkodu olarak önermiştir (Plant, 2009). Taksonomistler, bitki türlerini ayırt etmek için çok lokuslu bir yöntemin gerekli olabileceğini öne sürmüşlerdir (Chase ve ark., 2007; Erickson ve ark., 2008; Hebert ve ark., 2004; Kane ve ark., 2012; Kane & Cronk, 2008; Kress & Erickson, 2007; Lahaye ve ark., 2008). Ancak CBOL, birden fazla lokus kullanımının bu tekniklerin tür düzeyinde ayırım yapma yeteneğini açıkça geliştirmediğini göstermiştir (Group, 2009). Şekil 3'te bitki barkod seçiminin geçmişini ve bitkilerde DNA barkodlaması için gelecekteki beklentileri özeti gösterilmektedir.



Şekil 3. Bitki barkodlama tarihinin şematik zaman çizelgesi ve olası gelişmeler. CO1, sitokrom c oksidaz 1; cp, kloroplast; *ITS*, dahili transkripsiyonlu ayırıcı (Li ve ark., 2015).

3.2. Tek Lokuslu DNA barkodları

Geleneksel barkodlar geniş çapta incelenmiştir ancak yine de önemli sınırlamaları vardır. Yaygın olarak kullanılan bu tek konumlu barkodlardan bazıları aşağıda açıklanmıştır.

- **MatK**

MatK, yüksek bir evrim hızına, uygun uzunluğa ve bariz türler arası ayrışmanın yanı sıra düşük bir geçiş/dönüşüm oranına sahiptir (Min & Hickey, 2007; Selvaraj ve ark., 2008). CBOL Bitki Çalışma Grubu, tek bir primer çifti kullanarak anjiosperm DNA'sının çoğaltılmasında yaklaşık %90'lık bir başarı oranı ortaya koymuştur (Group, 2009). Bununla birlikte, çoklu primer setleriyle bile başarı açık tohumlularda sınırlı (%83) ve kriptomalarda çok daha kötü (%10) olmuştur. Farklı taksonomik gruplarda farklı primer çiftleri gerekli olduğu öne sürülmüştür (Chase ve ark., 2007; Hollingsworth, 2008). Lahaye ve ark. 1667 kapalı tohumlu bitki örneğinin *MatK* genini çoğaltmak için spesifik primerler (Cuénoud ve ark., 2002) kullanarak %100'lük bir başarı oranı elde etmişlerdir (Lahaye ve ark., 2008). Diğer bir zorluk ise, farklı taksonomik gruplardaki farklı ayırım oranlarıdır. *MatK*, Orchidaceae'deki türlerin %90'ından fazlasını ayırt edebilmektedir (Kress & Erickson, 2007), küçük hindistan cevizi ailesinde ise %49'dan daha azını ayırt edebilmektedir (Newmaster ve ark., 2006). Fazekas ve ark. *MatK* barkodunu kullanarak 32 cinse ait 92 türün teşhisini denemiş ancak başarı oranı sadece %56 olarak elde etmişlerdir (Fazekas ve ark., 2008). Bu bulgular *MatK* barkodunun tek başına uygun bir evrensel barkod olmadığını göstermektedir.

- **RbcL**

RbcL, Genbank'ta bulunan 50000'den fazla dizi ile filogenetik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu genin avantajları, çoğu kara bitkisinde amplifikasyonunun, sekanslanmasının ve hizalanmasının kolay olması ve familya ve cins seviyelerinde bitkiler için iyi bir DNA barkodlama bölgesi olmasıdır. Bununla birlikte, *RbcL* dizileri yavaş gelişir ve bu lokus, çiçekli bitkilerde plastid genlerinin açık ara en düşük ayrışmasına sahiptir (Kress ve ark., 2005). Sonuç olarak, orta düzey ayırım gücü nedeniyle tür düzeyinde uygun olmadığı sonucu elde edilmiştir (Chen ve ark., 2010; Fazekas ve ark., 2008; Group, 2009; Lahaye ve ark., 2008). Tüm gen dizisinin çift sarmal dizilimi dört primer gerektirebileceğinden, genin uzunluğu da

sorun olabilmektedir. Bu sınırlamalara rağmen, *RbcL*, gen dizisinin basit bir şekilde geri kazanılmasına, büyük miktarda kolay erişilebilir veriye ve daha önce tür tanımlaması için bir hedef olarak reddedilmesine rağmen (Gielly & Taberlet, 1994; Renner, 1999; Salazar ve ark., 2003) iyi, ancak olağanüstü olmayan ayırım gücüne dayalı olarak hala en iyi potansiyel aday bitki barkodlarından biri olarak önerilmiştir (Blaxter, 2004; Group, 2009; Hollingsworth ve ark., 2011). *RbcL* tek başına bir barkod lokusunun istenen özelliklerini karşılamasa da, *RbcL*'nin çeşitli plastid veya nükleer lokuslarla kombinasyonunun doğru tanımlamalar yapabileceği kabul edilmektedir (Chase ve ark., 2007; Group, 2009; Hollingsworth ve ark., 2009; Kress & Erickson, 2007; Newmaster ve ark., 2008).

• ***TrnH-psbA***

TrnH-psbA şu anda en yaygın kullanılan plastid barkodudur. Her iki tarafta yüksek oranda korunmuş kodlama dizilerinin varlığı, neredeyse tüm kapalı tohumluları büyütme olasılığı bulunan tek bir primer çifti ile evrensel primerlerin tasarımını mümkün kılmaktadır (Shaw ve ark., 2005). Kodlamayan genler arası bölge, çoğu dizi farklılığını sergiler ve yüksek ekleme/silme oranlarına sahiptir (Kress & Erickson, 2007). Bu özellikler, *TrnH-psbA*'yı tür ayrımcılığı için bir bitki barkodu olarak son derece uygun hale getirmektedir (Kress & Erickson, 2007; Shaw ve ark., 2005) ve kapsamlı barkodlama çalışmaları, Hydrocotyle, Dendrobium ve Pteridophytes gibi bazı kara bitki gruplarında *trnH*'nin *-psbA* bölgesi neredeyse tüm türleri tanımlayabilmektedir (Ma ve ark., 2010; Van De Wiel ve ark., 2009; Yao ve ark., 2009). *TrnH-psbA* ayırıcısının hizalanması, karmaşık moleküler evrimi, önemli uzunluk varyasyonları (Chang ve ark., 2006) ve daha büyük anjiosperm ailelerinde yüksek ekleme/silme oranları nedeniyle oldukça belirsiz olabilmektedir (Chase ve ark., 2007). Ayrıca, duplike lokusların ve bir sözde genin varlığı nedeniyle, *TrnH-psbA* dizisi bazı kozalaklı ağaçlarda ve tek çeneklilerde çok daha uzun [>1000 baz çifti (bp)] iken, diğer gruplarda aşırı derecede kısadır, 300 bp'den azdır ve briyofitlerde 100 bp'den daha kısa. Ek olarak, duplike lokusların ve bir sözde genin varlığı nedeniyle, *TrnH-psbA* dizisi bazı kozalaklı ağaçlarda ve tek çeneklilerde çok daha uzunken [>1000 baz çifti (bp)] (Chase ve ark., 2007; Hollingsworth ve ark., 2009), diğer gruplarda aşırı derecede kısadır- 300 bp'den az (Kress ve ark., 2005), briyofitlerde 100 bp'den daha kısadır (Stech & Quandt, 2010). *TrnH-psbA*'nın standart bir barkod olarak kullanılmasıyla ilgili temel sorunlardan biri, bazı bitki soylarında sık sık meydana gelen tersine çevirmelerdir; bu da, genetik

farklılığın büyük ölçüde fazla tahmin edilmesine ve yanlış filogenetik atamaya yol açabilmektedir (Whitlock ve ark., 2010). Ek olarak, mononükleotit tekrarlarının neden olduğu dizileme okumalarının erken sonlandırılması nedeniyle, yüksek kaliteli çift yönlü diziler elde etmek için tasarlanmış taksonlara özgü dahili dizileme primerleri olmadan daha uzun *TrnH-psbA* bölgelerinin alınması zor olabilmektedir (Devey ve ark., 2009; Ebihara ve ark., 2010). Daha kısa *TrnH-psbA* ayırıcılar, *Solidago* cinsinde olduğu gibi tür ayrımcılığı için yeterli dizi varyasyonuna sahip olmayabilir (Kress ve ark., 2005). Sonuç olarak, Kress ve ark. ve Chase ve ark. sırasıyla, *TrnH-psbA*'nın yeterli çözünürlük sağlamak için iki veya üç lokuslu barkod sistemlerinde kullanılabileceğini önermiştir (Chase ve ark., 2007; Kress ve ark., 2005).

• ITS

ITS ayırıcı, türler düzeyinde yüksek düzeylerde türler arası sapma gösteren güçlü bir filogenetik belirteçtir (Alvarez & Wendel, 2003). Düşük taksonomik seviyelerde *ITS*'nin plastid bölgeleri üzerindeki daha büyük ayırt edici gücü, özellikle plastid barkodlarından daha az çözünürlük sunan parazitik bitkilerde bir bitki barkodu olarak önerilmesine yol açacak şekilde geniş çapta incelenmiştir (Hollingsworth, 2011; Kress ve ark., 2005; Sass ve ark., 2007; Stoeckle, 2003). Bununla birlikte, CBOL, *ITS*'yi yalnızca tamamlayıcı bir yer olarak kabul etmiştir (Group, 2009). Eksik uyumlu evrim, mantar kontaminasyonu ve amplifikasyon ve dizileme zorlukları gibi bazı sınırlamalar, bunun ana bir barkod olmasını engellemektedir (Hollingsworth, 2011). Farklı bir görüş sunan China Plant BOL Group yakın zamanda, doğrudan dizileme mümkün olduğunda, plastid barkodlardan daha yüksek ayırım gücü nedeniyle *ITS* bölgesinin ana barkodlara dahil edilmesi gerektiğini savunmuştur (Li ve ark., 2011). Tüm *ITS*'nin sekanslanmasıyla ilgili zorlukları çözmek için, amplifikasyon ve sekanslama problemlerini azaltan korunmuş sekans karakterleri nedeniyle *ITS2*'yi yedek olarak önermişlerdir. *ITS2*'nin, DNA'sı bozulmuş herbaryum örneklerinden bile (Chiou ve ark., 2007) daha geniş bir bitki takson yelpazesinin tanımlanması için yeni bir evrensel barkod olarak kullanılabileceği kabul edilmiştir (Chen ve ark., 2010; Gao, Yao, Song, Liu, ve ark., 2010; Gao, Yao, Song, Zhu, ve ark., 2010; Luo ve ark., 2010; Pang ve ark., 2010; Pang ve ark., 2011). *ITS2* barkodu, *ITS* de dahil olmak üzere diğer aday lokuslara göre bazı avantajlar gösterse de, araştırmacılar bu bölgeye fazla ilgi göstermemiştir. Önemli bir endişe, genomda yüksek düzeyde tür içi ve hatta bireysel dizi farklılaşmasına sahip çoklu kopyaların

varlığı olmuştur (Yamaguchi ve ark., 2006), bu da yanlış veya yanıltıcı sonuçlara yol açabilmektedir (Alvarez & Wendel, 2003). Song ve ark. yakın zamanda, *ITS2* genom içi mesafelerinin, çok çeşitli bitki familyalarındaki tür içi veya türler arası varyantlarından belirgin şekilde daha küçük olduğunu göstermiştir (Song ve ark., 2012). *ITS2*'nin kullanımı düşük polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) etkinliğini engellese de, daha az karaktere erişimin tüm *ITS* bölgesine kıyasla ayırım gücünü ne ölçüde azalttığını değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Hollingsworth ve ark., 2011). Örneğin, *ITS2* dizileri *Fritillaria*'da genellikle 300 bp'den azdır ve türlerin çözünürlüğü için yeterli türler arası ayırışmaya sahip olmadığı saptanmıştır (Li ve ark., 2015).

Günümüzde DNA barkodlama teknolojisi, nükleer lokuslarla karşılaştırıldığında nispeten düşük evrim hızları nedeniyle büyük ölçüde kloroplast lokuslarına dayanmaktadır (Dong ve ark., 2012). Yukarıda açıklanan aday barkodların ötesinde, *rpoB*, *rpoC1*, *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *ycf5* ve *trnL* (P6) gibi yaygın olarak kullanılan birçok başka plastid barkodlama belirteçleri vardır ve özellikleri, Hollingsworth ve ekip arkadaşları ve Vijayan & Tsou tarafından ayrıntılı olarak tartışılmıştır (Hollingsworth ve ark., 2011; Vijayan & Tsou, 2010). Bu kloroplast bölgeleri, daha yüksek taksonomik seviyelerde filogenetik analizler ve barkodlama çalışmaları için değerlidir ancak yetersiz varyasyon nedeniyle daha düşük taksonomik seviyelerde bitki DNA barkodlaması için uygun olmadığı ileri sürülmüştür (Li ve ark., 2015).

3.3. Aday Çoklu Lokus DNA Barkodları

Hayvanlarda CO1 ile karşılaştırılabilir evrensel bir bitki barkodu tanımlamaya yönelik kapsamlı çabalara rağmen, tek lokuslarda yeterli varyasyon olmaması nedeniyle görevin zor olduğu kanıtlanmıştır (Chase ve ark., 2007; Fazekas ve ark., 2008; Kress & Erickson, 2007; Kress ve ark., 2005; Lahaye ve ark., 2008; Newmaster ve ark., 2006; Sass ve ark., 2007). Pek çok araştırmacı, yeterli tür ayırımı elde etmek için çok lokuslu bir yöntemin gerekli olacağını öne sürmüştür (Chase & Fay, 2009; Erickson ve ark., 2008; Group, 2009; Hebert ve ark., 2004; Kane & Cronk, 2008; Kress & Erickson, 2007; Lahaye ve ark., 2008). *RbcL+TrnH-psbA* (Kress & Erickson, 2007), *rpoC1+rpoB+MatK* veya *rpoC1+MatK+TrnH-psbA* (Chase ve ark., 2007) ve *MatK+atpF-atpH+psbK-psbI* veya *MatK+atpF-atpH+TrnH-psbA* dahil olmak üzere çeşitli plastid lokus kombinasyonları önerilmiştir (Pennisi, 2007). Bu birleştirilmiş barkodlar, tek lokuslu yaklaşımlardan daha yüksek tür

ayrımı sergilemektedir. Farklı araştırma grupları, evrensel bir barkod seçmeye çalışırken farklı taksonlar kullanarak farklı kombinasyonları test edilmiş, ancak evrensel bir anlaşmaya henüz ulaşılmamıştır. Fazekas ve ark. aynı büyük ölçekli taksonomik örnekleri kullanarak bu barkod kombinasyonlarını karşılaştırdı, ancak hiçbiri test edilen türlerin %70'inden fazlasını tanımlayamamıştır (Fazekas ve ark., 2008).

CBOL Çalışma Grubu, *RbcL* bölgesinin basit bir şekilde geri kazanılması ve *MatK* dizisinin ayırt edici gücü nedeniyle yakın zamanda *MatK* + *RbcL*'yi evrensel barkod kombinasyonu olarak önermiştir (Group, 2009). *RbcL+MatK* seçimi, diğer kombinasyonlardan biraz daha yüksek tanımlama verimliliği sunsa da, *RbcL+MatK* barkodu, orijinal evrensel DNA barkodu hedefini hala karşılayamamıştır. İlk olarak, *RbcL+MatK* kombinasyonu, *MatK*'nin düşük PCR etkinliğini önleyemez ve ikinci olarak, *RbcL+MatK*'nin bitkileri ayırt etmedeki başarısı tipik olarak hayvanlardaki CO1'inkinden daha düşüktür. Kombine barkodlar, özellikle hedef lokuslardan biri amplifiye olmadığında, tek lokuslu işaretleyicilere kıyasla analitik zorlukları artırmaktadır. Dahası, CBOL, yedi aday lokus kullanımının, *RbcL+MatK* ile karşılaştırıldığında tür düzeyinde ayırım yapma yeteneğini önemli ölçüde geliştirmediğini göstermiştir. Bazı araştırmacılar, çoklu lokuslu barkodların tür ayrımcılığını arttırmadaki başarısızlığının sadece varyasyon eksikliğinden kaynaklanmadığını düşünmüşlerdir; bunun yerine plastid gen ağacı ve tür sınırları arasındaki tutarsızlıkları yansıtmaktadır (Fazekas ve ark., 2008; Hollingsworth ve ark., 2011). Bu nedenle, aday lokusların kombinasyonları, bitkilerin mevcut DNA barkodlamasının doğal eksikliklerini ortadan kaldırmaktadır (Li ve ark., 2015).

SONUÇ

Moleküler sistematikte önemli bir gelişme olan DNA barkodlama, morfolojik çalışmanın zahmetli bir şekilde zor olduğu ve toplam tür sayısının çok fazla olduğu çeşitli grupları tanımlamak için oldukça elverişlidir. Metagenomik ve yeni nesil yüksek verimli dizileme teknolojisinin ortaya çıkmasıyla, DNA barkodlama çok hızlı ilerlemektedir. Taksonomik bilginin DNA barkodlama yaklaşımıyla entegrasyonu, yüksek düzeyde doğruluk sağlamak için daha tatmin edicidir.

Biyçeşitlilik izlemenin ötesinde, DNA barkodlama bilgisi, doğal kaynak yönetimini iyileştirerek, ekolojik değerlendirmeleri birbirine bağlayarak ve ortak kitle arasında farkındalığı artırarak küresel biyoçeşitliliğe yönelik tehditleri önemli ölçüde azaltabilir.

KAYNAKÇA

- Aksöyek, E., İbiş, O., Özcan, S., Moradi, M., & Tez, C. (2017). DNA barcoding of three species (*Canis aureus*, *Canis lupus* and *Vulpes vulpes*) of Canidae. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 28(5), 747-755. <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1180512>
- Alvarez, I., & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal *ITS* sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol*, 29(3), 417-434. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00208-2)
- Andersson, A. F., Bissett, A., Finstad, A. G., Fossoy, F., Grosjean, M., Hope, M., Jeppesen, T. S., Kõljalg, U., Lundin, D., & Nilsson, R. (2020). Publishing DNA-derived data through biodiversity data platforms. version 1.0.
- Arita, M., Karsch-Mizrachi, I., & Cochrane, G. (2021). The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic acids research*, 49(D1), D121-D124.
- Armstrong, K., & Ball, S. (2005). DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1813-1823.
- Bebber, D. P., Carine, M. A., Wood, J. R., Wortley, A. H., Harris, D. J., Prance, G. T., Davidse, G., Paige, J., Pennington, T. D., & Robson, N. K. (2010). Herbaria are a major frontier for species discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22169-22171.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol Evol*, 22(3), 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 148-155.
- Bieler, R. (1992). Gastropod Phylogeny and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 311-338. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.23.110192.001523>
- Blaxter, M. L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359(1444), 669-679. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>

- Bohmann, K., Mirarab, S., Bafna, V., & Gilbert, M. T. P. (2020). Beyond DNA barcoding: The unrealized potential of genome skim data in sample identification. *Mol Ecol*, 29(14), 2521-2534. <https://doi.org/10.1111/mec.15507>
- Bonants, P., Groenewald, E., Rasplus, J. Y., Maes, M., De Vos, P., Frey, J., Boonham, N., Nicolaisen, M., Bertacini, A., & Robert, V. (2010). QBOL: a new EU project focusing on DNA barcoding of quarantine organisms. *Eppo Bulletin*, 40(1), 30-33.
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Da Fonseca, G. A., Gerlach, J., Hoffmann, M., Lamoreux, J. F., Mittermeier, C. G., Pilgrim, J. D., & Rodrigues, A. S. (2006). Global biodiversity conservation priorities. *science*, 313(5783), 58-61.
- Burns, J. M., Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. (2008). DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6350-6355.
- Chang, C. C., Lin, H. C., Lin, I. P., Chow, T. Y., Chen, H. H., Chen, W. H., Cheng, C. H., Lin, C. Y., Liu, S. M., Chang, C. C., & Chaw, S. M. (2006). The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and *ITS* phylogenetic implications. *Mol Biol Evol*, 23(2), 279-291. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj029>
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, 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., & Wilkinson, M. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *TAXON*, 56(2), 295-299. <https://doi.org/10.1002/tax.562004>
- Chase, M. W., & Fay, M. F. (2009). Barcoding of plants and fungi. *science*, 325(5941), 682-683.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., & Pang, X. (2010). Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS one*, 5(1), e8613.
- Chiou, S. J., Yen, J. H., Fang, C. L., Chen, H. L., & Lin, T. Y. (2007). Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified *ITS2* with

- specific primers. *Planta Med*, 73(13), 1421-1426.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-990227>
- Colpaert, N., Cavers, S., Bandou, E., Caron, H., Gheysen, G., & Lowe, A. (2005). Sampling tissue for DNA analysis of trees: trunk cambium as an alternative to canopy leaves. *Silvae Genetica*, 54(6), 265-269.
- Cross, H. B., Lowe, A. J., & Gurgel, C. F. D. (2011). DNA barcoding of invasive species. *Fifty years of invasion ecology: the legacy of Charles Elton, 1*, 289-300.
- Cuénoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J., & Chase, M. W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *RbcL*, *atpB*, and *MatK* DNA sequences. *Am J Bot*, 89(1), 132-144.
<https://doi.org/10.3732/ajb.89.1.132>
- Devey, D. S., Chase, M. W., & Clarkson, J. J. (2009). A stuttering start to plant DNA barcoding: microsatellites present a previously overlooked problem in non-coding plastid regions. *TAXON*, 58(1), 7-15.
<https://doi.org/10.1002/tax.581003>
- Dixon, A. (2012). Conservation of the Saker Falcon *Falco cherrug* and the use of hybrids for falconry. *Aquila*, 119, 9-19.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS one*, 7(4), e35071.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>
- Dormontt, E. E., van Dijk, K.-j., Bell, K. L., Biffin, E., Breed, M. F., Byrne, M., Caddy-Retalic, S., Encinas-Viso, F., Nevill, P. G., Shapcott, A., Young, J. M., Waycott, M., & Lowe, A. J. (2018). Advancing DNA Barcoding and Metabarcoding Applications for Plants Requires Systematic Analysis of Herbarium Collections—An Australian Perspective [Perspective]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00134>
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148(4), 1667-1686.
<https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1667>
- Eaton, M. J., Meyers, G. L., Kolokotronis, S.-O., Leslie, M. S., Martin, A. P., & Amato, G. (2010). Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics*, 11(4), 1389-1404.

- Ebihara, A., Nitta, J. H., & Ito, M. (2010). Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan. *PLoS one*, 5(12), e15136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015136>
- Erickson, D. L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L. A., & Kress, W. J. (2008). DNA Barcoding In Land Plants: Developing Standards To Quantify And Maximize Success. *Taxon*, 57(4), 1304-1316.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M., & Barrett, S. C. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS one*, 3(7), e2802. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
- Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Burgess, K. S., Percy, D. M., Graham, S. W., Barrett, S. C., Newmaster, S. G., Hajibabaei, M., & Husband, B. C. (2009). Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Mol Ecol Resour*, 9 Suppl s1, 130-139. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02652.x>
- Feitosa, L. M., Martins, A. P. B., Giarrizzo, T., Macedo, W., Monteiro, I. L., Gemaque, R., Nunes, J. L. S., Gomes, F., Schneider, H., Sampaio, I., Souza, R., Sales, J. B., Rodrigues-Filho, L. F., Tchaicka, L., & Carvalho-Costa, L. F. (2018). DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark species in a global elasmobranch conservation hotspot. *Scientific reports*, 8(1), 3347. Retrieved 2018/02//, from <http://europepmc.org/abstract/MED/29463851>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5), 294-299.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H., & Chen, S. (2010). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode *ITS2*. *J Ethnopharmacol*, 130(1), 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.026>
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Zhu, Y., Liu, C., & Chen, S. (2010). Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evol Biol*, 10, 324. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-324>

- Gielly, L., & Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *RbcL* sequences. *Mol Biol Evol*, *11*(5), 769-777. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040157>
- Gonzalez, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S. A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C., & Chave, J. (2009). Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. *PLoS one*, *4*(10), e7483.
- Gregory, T. R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*, *434*(7037), 1067-1067.
- Group, C. P. W. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 12794-12797.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*, *270*(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(41), 14812-14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., Zakharov, E. V., Telfer, A. C., Levesque-Beaudin, V., Milton, M. A., Pedersen, S., Jannetta, P., & DeWaard, J. R. (2016). Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *371*(1702), 20150333.
- Hollingsworth, M. L., Andra Clark, A., Forrest, L. L., Richardson, J., Pennington, R. T., Long, D. G., Cowan, R., Chase, M. W., Gaudeul, M., & Hollingsworth, P. M. (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol Ecol Resour*, *9*(2), 439-457. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02439.x>
- Hollingsworth, P. M. (2008). DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: progress and outstanding questions. *Heredity (Edinb)*, *101*(1), 1-2. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.16>

- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19451-19452.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS one*, 6(5), e19254.
- Hollingsworth, P. M., Li, D. Z., van der Bank, M., & Twyford, A. D. (2016). Telling plant species apart with DNA: from barcodes to genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371(1702). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0338>
- Jackson, A. S., & Nijman, V. (2020). DNA barcoding of primates and the selection of molecular markers using African Great Apes as a model. *J Anthropol Sci*, 98. <https://doi.org/10.4436/jass.98017>
- Jackson, R., Moore, L., Hoffmann, W., Pockman, W., & Linder, C. (1999). Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11387-11392.
- Kaartinen, R., Stone, G. N., Hearn, J., Lohse, K., & Roslin, T. (2010). Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological entomology*, 35(5), 623-638.
- Kane, N., Sveinsson, S., Dempewolf, H., Yang, J. Y., Zhang, D., Engels, J. M., & Cronk, Q. (2012). Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.; Malvaceae) using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA. *Am J Bot*, 99(2), 320-329. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100570>
- Kane, N. C., & Cronk, Q. (2008). Botany without borders: barcoding in focus. *Mol Ecol*, 17(24), 5175-5176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03972.x>
- Kesanakurti, P. R., Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Percy, D. M., Newmaster, S. G., Graham, S. W., Barrett, S. C., Hajibabaei, M., & Husband, B. C. (2011). Spatial patterns of plant diversity below-ground as revealed by DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 20(6), 1289-1302.
- Kress, W. J., & 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.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcoding: A windfall for tropical biology? *Biotropica*, 40(4), 405-408.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A*, 102(23), 8369-8374.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Kvist, S. (2013). Barcoding in the dark? A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Mol Phylogenet Evol*, 69(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.012>
- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G., & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(8), 2923-2928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709936105>
- Lara, A., Ponce de León, J. L., Rodríguez, R., Casane, D., Cote, G., Bernatchez, L., & García-Machado, E. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. *Molecular ecology resources*, 10(3), 421-430.
- Li, D. Z., Gao, L. M., Li, H. T., Wang, H., Ge, X. J., Liu, J. Q., Chen, Z. D., Zhou, S. L., Chen, S. L., Yang, J. B., Fu, C. X., Zeng, C. X., Yan, H. F., Zhu, Y. J., Sun, Y. S., Chen, S. Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T., . . . China Plant, B. O. L. G. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (*ITS*) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19641-19646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108>
- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 90(1), 157-166. <https://doi.org/10.1111/brv.12104>
- Lowe, A. J., & Cross, H. B. (2011). The Application of DNA methods to Timber Tracking and Origin Verification. *IAWA journal*, 32(2), 251-262.
- Luo, K., Chen, S., Chen, K., Song, J., Yao, H., Ma, X., Zhu, Y., Pang, X., Yu, H., Li, X., & Liu, Z. (2010). Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family. *Sci China Life Sci*, 53(6), 701-708. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-4009-1>
- Ma, X. Y., Xie, C. X., Liu, C., Song, J. Y., Yao, H., Luo, K., Zhu, Y. J., Gao, T., Pang, X. H., Qian, J., & Chen, S. L. (2010). Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Biol Pharm Bull*, 33(11), 1919-1924. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1919>

- McLeod, D., Horner, S., Husted, C., Barley, A., & Iskandar, D. T. (2011). "Same-same, but different": An unusual new species of the *Limnonectes kuhlii* Complex from West Sumatra (Anura: Dicroglossidae). *Zootaxa*, 2883, 52-64. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2883.1.4>
- Meiklejohn, K. A., Burnham-Curtis, M. K., Straughan, D. J., Giles, J., & Moore, M. K. (2021). Current methods, future directions and considerations of DNA-based taxonomic identification in wildlife forensics. *Forensic Science International: Animals and Environments*, 1, 100030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100030>
- Miller, S. E. (2007). DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 4775-4776.
- Min, X. J., & Hickey, D. A. (2007). Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Mol Ecol Notes*, 7(3), 365-373. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01698.x>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nakazato, T., & Jinbo, U. (2022). Cross-sectional use of barcode of life data system and GenBank as DNA barcoding databases for the advancement of museomics [Systematic Review]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.966605>
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of *RbcL* in a multigene tiered approach. *CANADIAN JOURNAL OF BOTANY-REVUE CANADIENNE DE BOTANIQUE*, 84(3), 335-341. <https://doi.org/10.1139/B06-047>
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., Steeves, R. A., & Janovec, J. (2008). Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Mol Ecol Resour*, 8(3), 480-490. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02002.x>
- Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., & Tedersoo, L. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264.

- Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xie, C., & Chen, S. (2010). Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Med*, 76(15), 1784-1786. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249806>
- Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xu, H., Huang, L., & Chen, S. (2011). Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics*, 27(2), 165-170. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00328.x>
- Parnes, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J. K., Thomas, C. D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Kullberg, J., Tammaru, T., Tennent, W. J., Thomas, J. A., & Warren, M. (1999). Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature*, 399(6736), 579-583. <https://doi.org/10.1038/21181>
- Pennisi, E. (2007). Taxonomy. Wanted: a barcode for plants. *science*, 318(5848), 190-191. <https://doi.org/10.1126/science.318.5848.190>
- Pentinsaari, M., Blagoev, G. A., Hogg, I. D., Levesque-Beaudin, V., Perez, K., Sobel, C. N., Vandenbrink, B., & Borisenko, A. (2020). A DNA Barcoding Survey of an Arctic Arthropod Community: Implications for Future Monitoring. *Insects*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/insects11010046>
- Piper, A. M., Batovska, J., Cogan, N. O. I., Weiss, J., Cunningham, J. P., Rodoni, B. C., & Blacket, M. J. (2019). Prospects and challenges of implementing DNA metabarcoding for high-throughput insect surveillance. *Gigascience*, 8(8). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz092>
- Plant, C. (2009). Group W. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci US A*, 106(12794), 7.
- Pleijel, F., Jondelius, U., Norlinder, E., Nygren, A., Oxelman, B., Schander, C., Sundberg, P., & Thollesson, M. (2008). Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Mol Phylogenet Evol*, 48(1), 369-371. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.024>
- Pulgarin, P., Olivera-Angel, M., Ortíz, L., Nanclares, D., Velásquez-Restrepo, S., & Díaz-Nieto, J. (2021). DNA barcodes of birds from northern Colombia. *Biodiversity Data Journal*, 9. <https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e64842>
- Ran, K., Qi, L., Li, W., & Kong, L. (2020). DNA barcoding for identification of marine gastropod species from Hainan island, China. *Fisheries Research*, 225, 105504. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105504>

- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System ([http://www. barcodinglife. org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2013). A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. *PloS one*, 8(7), e66213.
- Renner, S. S. (1999). Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *Am J Bot*, 86(9), 1301-1315.
- Salazar, G. A., Chase, M. W., Soto Arenas, M. A., & Ingrouille, M. (2003). Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *Am J Bot*, 90(5), 777-795. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.5.777>
- Sass, C., Little, D. P., Stevenson, D. W., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001154>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2022). GenBank 2023 update. *Nucleic acids research*.
- Selvaraj, D., Sarma, R. K., & Sathishkumar, R. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast *MatK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*, 3(1), 24-27. <https://doi.org/10.6026/97320630003024>
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot*, 92(1), 142-166. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>
- Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. (2006). DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3657-3662.
- Song, J., Shi, L., Li, D., Sun, Y., Niu, Y., Chen, Z., Luo, H., Pang, X., Sun, Z., Liu, C., Lv, A., Deng, Y., Larson-Rabin, Z., Wilkinson, M., & Chen, S. (2012). Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-

- genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *PLoS one*, 7(8), e43971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043971>
- Stech, M., & Quandt, D. (2010). 20,000 species and five key markers: The status of molecular bryophyte phylogenetics. *PHYTOTAXA*, 9, 196-228.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BIOSCIENCE*, 53(9), 796-797. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0796:TDATBC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0796:TDATBC]2.0.CO;2)
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2007). Power and limitations of the chloroplast trn L (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic acids research*, 35(3), e14-e14.
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M. A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., & Wincker, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular ecology resources*, 9(1), 51-60.
- Van De Wiel, C. C. M., Van Der Schoot, J., Van Valkenburg, J., Duistermaat, H., & Smulders, M. J. M. (2009). DNA barcoding discriminates the noxious invasive plant species, floating pennywort (*Hydrocotyle ranunculoides* L.f.), from non-invasive relatives. *Molecular ecology resources*, 9(4), 1086-1091. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02547.x>
- Vijayan, K., & Tsou, C. H. (2010). DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *CURRENT SCIENCE*, 99(11), 1530-1541.
- Wang, T., Zhang, Y. P., Yang, Z. Y., Liu, Z., & Du, Y. Y. (2020). DNA barcoding reveals cryptic diversity in the underestimated genus *Triplophysa* (Cypriniformes: Cobitidae, Nemacheilinae) from the northeastern Qinghai-Tibet Plateau. *BMC Evol Biol*, 20(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01718-0>
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays*, 29(2), 188-197. <https://doi.org/10.1002/bies.20529>
- Whitlock, B. A., Hale, A. M., & Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the *TrnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS one*, 5(7), e11533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011533>
- Yamaguchi, A., Kawamura, H., & Horiguchi, T. (2006). A further phylogenetic study of the heterotrophic dinoflagellate genus,

Protopteridinium (Dinophyceae) based on small and large subunit ribosomal RNA gene sequences. *PHYCOLOGICAL RESEARCH*, 54(4), 317-329. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00438.x>

Yao, H., Song, J. Y., Ma, X. Y., Liu, C., Li, Y., Xu, H. X., Han, J. P., Duan, L. S., & Chen, S. L. (2009). Identification of *Dendrobium* species by a candidate DNA barcode sequence: the chloroplast psbA-trnH intergenic region. *Planta Med*, 75(6), 667-669. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185385>