

Taksonomska identifikacija s pomočjo sistema črtnih kod DNA kot sodobna podpora biovarnosti

Taxonomic identification using DNA barcoding as a modern support for biosafety

Živa Fišer Pečnikar, Elena Varljen Bužan

Povzetek: Do nedavnega je določanje taksonov temeljilo na uporabi morfoloških značilnosti predstavnikov vrst. Razvoj molekularnih orodij v zadnjem času nakazuje možnost hitre in zanesljive taksonomske identifikacije preko sistema črtnih kod DNA (angl. DNA barcoding). Sistem temelji na uporabi kratkih, v znanstvenih krogih sprejetih in standardiziranih odsekov DNA, ki vsebujejo dovolj informacije, da lahko na njihovi podlagi predstavnika neznane vrste uvrstimo v znano taksonomsko skupino. V ta namen se pri živalih in nekaterih drugih evkariontih najpogosteje uporablja regija podenote mitohondrijskega gena za citokrom c oksidazo (COI), pri rastlinah pa regiji kloroplastne DNK *rbcL* in *matK*. Poleg uporabe črtnih kod DNA v taksonomiji raziskovalci napovedujejo vedno večjo uporabo takih informacij tudi v drugih naravoslovnih panogah, na primer v varstveni biologiji (trgovanje z zavarovanimi vrstami, vnos potencialno invazivnih vrst), medicini (identifikacija medicinsko pomembnih patogenov in njihovih vektorjev) ali farmaciji (identifikacija zdravilnih čajnih mešanic).

Gljučne besede: molekularna orodja, črna koda DNA, identifikacija organizmov

Abstract: Until recently, the determination of taxa has been based on the use of morphological characteristics. Recent development of molecular tools suggests the possibility of fast and reliable taxonomic identification through DNA barcoding. Such determination is based on the use of short and standardized sections of DNA that contain sufficient information to enable the discrimination of specimens into taxonomic groups. The most commonly used region to discriminate animals and some other eukaryotes is the mitochondrial gene for cytochrome c oxidase (COI), whereas in plants the most frequently used markers are the chloroplast DNA regions *rbcL* and *matK*. In addition to using DNA barcodes in taxonomic studies, researchers predict an increase in the use of such information in other fields of natural science, for example in conservation biology (trafficking with protected species, introduction of potentially invasive species), medicine (identification of medically important pathogens and their vectors) or pharmacy (identification of individual herbal drugs in tea mixtures).

Key words: molecular tools, DNA barcode, identification of organisms

1 Uvod

Identifikacija organizmov na podlagi morfoloških znakov neredko predstavlja zahtevno nalogo. Številne vrste so si tako podobne, da jih lahko prepoznajo le strokovnjaki, specializirani za posamezno skupino organizmov (1). Poleg tega imajo živali pogosto tudi kompleksen razvojni krog, sestavljen iz različnih razvojnih stadijev, kar še dodatno otežuje delo raziskovalcev, ki se ukvarjajo z razvrščanjem organizmov. Včasih so vzorci lahko poškodovani ali pa imajo strokovnjaki za identifikacijo na voljo le majhen del tkiva. V slednjem primeru je določanje s pomočjo morfoloških znakov nemogoče. Podobno velja tudi za številne rastline, ki jih pogosto v vegetativnem stanju (brez cvetov ali plodov) ne moremo določiti vse do taksonomske stopnje vrste.

Identifikacija vzorcev vse do vrste je pogosto ključnega pomena, še posebno ko gre za prepoznavanje izdelkov iz ogroženih vrst, kmetijskih škodljivcev, invazivnih vrst, patogenih organizmov, živalskih prenašalcev bolezni oz. vektorjev (vmesnih gostiteljev), zajedavcev (parazitov) ter zdravilnih ali strupenih rastlin (2). Zaradi omenjenih težav z identifikacijo ter dejstva, da se število odkritih vrst iz leta v leto večja, število strokovnjakov za taksonomijo pa konstantno zmanjšuje, postajajo pri identifikaciji vse bolj pomembna molekularna orodja. Identifikacija vzorcev preko sistema črtnih kod se naslanja na dejstvo, da se v genomu dveh vrst, četudi sta si morfološko izjemno podobni, nahaja dovolj razlik, da se ju na njihovi podlagi uvrsti v dve ločeni taksonomski enoti.

Mag. Živa Fišer Pečnikar, univ. dipl. biol., Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper in Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije
Doc. dr. Elena Varljen Bužan, univ. dipl. biokem., Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper in Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije

Sistem črtnih kod DNA rešuje številne težave taksonomske identifikacije, saj lahko nestrokovnjaki iz majhnih delov tkiva pridobijo potrebno informacijo za uvrstitev vzorca v določeno taksonomsko kategorijo. Uporaba zaporedij DNA zagotavlja relativno zanesljivo določanje taksonov, med katerimi ni jasno opredeljivih morfoloških razlik ter identifikacijo organizmov v vseh razvojnih stopnjah (1, 3, 4). Metodologija je že v uporabi v primeru organizmov z morfološko najtežje določljivimi vrstami, kot so virusi, bakterije in protisti (1), v zadnjih letih pa so vedno pogostejše tudi študije na višjih organizmih (5, 6, 7). To seveda ne pomeni, da postaja tradicionalna taksonomija manj pomembna. Identifikacija s pomočjo DNA služi dvojnemu namenu: kot nov pristop v taksonomiji, ki se ga lahko uporabi v kombinaciji z morfološki znaki, ter kot orodje za hitro določanje organizmov ali bioloških vzorcev, katerih morfološka identifikacija zahteva čas in znanje, ki nista vedno na voljo.

Izredno pomembna je tudi povezava sistema črtnih kod DNA z muzejskimi in herbarijskimi primerki, kar v nasprotju z drugimi podatkovnimi bazami (npr. *GenBank*) omogoča veliko večjo taksonomsko zanesljivost. Določitev po sistemu črtnih kod na mednarodnem nivoju koordinira Konzorcij za črtne kode življenja (Consortium for the Barcode of Life; CBOL). V februarju 2010 je podatkovna zbirka *BOLD* (angl. The Barcode of Life Datasystem) vsebovala več kot 790.000 nukleotidnih zaporedij 67.000 formalno opisanih vrst (2, 8). Le-ta pa ne predstavlja edine podatkovne zbirke nukleotidnih zaporedij. *All Leps Barcode of Life* je podatkovna zbirka za identifikacijo metuljev, v kateri je trenutno shranjenih okoli 450.000 nukleotidnih zaporedij, pripadajočih 41.000 vrstam metuljev (9). Tudi za rastline obstajajo nekatere specializirane podatkovne zbirke, na primer *Genome Database for Rosaceae* (GDR), ki hrani nukleotidna zaporedja vrst iz družine rožnic (9).

2 Lastnosti črtnih kod DNA

Kljub temu, da je izraz »črtna koda DNA« (DNA barcode) v uporabi šele od leta 2002 (4), je sama metodologija določanja organizmov na podlagi nukleotidnih zaporedij veliko starejša (10). Novost principa črtnih kod je v določitvi enotnega odseka DNA (označevalca), ki bi bil uporaben pri identifikaciji vseh živih bitij.

Kljub večletnemu delu na tem področju si strokovnjaki zaenkrat še niso enotni glede enotnega označevalca, ki bi bil primeren za identifikacijo vseh taksonov. Zelene lastnosti črtnih kod DNA pa so dokaj jasno opredeljene.

- 1) Odsek DNA mora biti skoraj identičen pri osebkih znotraj iste vrste in različen pri osebkih različnih vrst.
- 2) Odsek mora biti standardiziran, t.j. isti odsek mora biti uporaben pri različnih taksonomskih skupinah.
- 3) Odsek mora vsebovati dovolj filogenetske informacije, da se na njegovi podlagi osebek lahko razporedi v ustrezno taksonomsko skupino (vrsto, rod, družino...).
- 4) Odsek mora biti robusten, imeti mora ohranjena mesta za vezavo začetnih oligonukleotidov in mora omogočati enostavno pomnoževanje odseka ter določanje nukleotidnega zaporedja (to je zlasti pomembno pri kompleksih vzorcih iz narave, na primer vzorcih zemlje, pri katerih želimo identificirati veliko vrst naenkrat).

- 5) Odsek mora biti dovolj kratek, da ga lahko pomnožimo tudi v primeru degradirane DNA (fragmenti, krajši od 150 baznih parov) (11).

Žal pa regije, ki bi bila uporabna za vse organizme in bi vsebovala vse našete lastnosti, še niso našli in morda sploh ne obstaja. Največ težav predstavlja iskanje primernih označevalcev za identifikacijo nižjih organizmov (12), medtem ko je bila identifikacija s črtnimi kodami DNA do sedaj uspešna pri določanju alg (13), gliv (13), bakterij (14), rastlin (15, 16, 17), pajkov (18), rib (19), ptic (1), in glodavcev (20).

2.1 Vretenčarji in nekatere druge živalske skupine

Pri vretenčarjih in nekaterih drugih živalskih skupinah temelji sistem črtnih kod na 648 baznih parov dolgi regiji na mitohondrijskem genu za podenoto I citokroma C (COI). Trenutno so v javno dostopni bazi *GenBank* shranjena nukleotidna zaporedja za približno 60.000 različnih vrst živali. Za identifikacijo s črtnimi kodami je mitohondrijski genom v primerjavi z jedrnim primernejši, saj ne vsebuje intronov, je manj izpostavljen rekombinaciji in je haploiden, kar omogoča enostavnejšo in nedvoumnejšo analizo njegovih nukleotidnih zaporedij (1, 21). Zaporedje COI je visoko spremenljivo, mutacije so večinoma substitucijskega tipa in ne vstavitve ali izbrisi, ki bi otežile poravnavanje nukleotidnih zaporedij (23). Na splošno velja, da vsebuje gen COI višji filogenetski signal kot katerikoli drugi mitohondrijski gen. Zaradi pogostih substitucij na tretjem mestu v kodonu poteka njegova evolucija dovolj hitro, da omogoča diskriminacijo na različne vrste in celo na linije znotraj posameznih vrst (22).

2.2 Rastline

Iskanje enotne črtno kode DNA pri rastlinah predstavlja mnogo trši oreh kot pri živalih. Zaradi nižje heterogenosti v rastlinskem mitohondrijskem genu COI ta ni primeren za razlikovanje rastlinskih vrst, zato so botaniki kar nekaj časa posvetili iskanju odseka DNA, ki bi ustrezal genu COI pri živalih. Nekaj časa se je kot najbolj ustrežno regijo omenjalo zaporedje jedrne regije ITS (Internal Transcribed Spacer) in kloroplastnega medgenskega vmesnika trnH-psbA (24). Z vse boljšim poznavanjem in večanjem količine dostopnih začetnih oligonukleotidov pa se je v zadnjih letih razširil tudi izbor potencialnih regij za črtne kode rastlin. Kljub temu kaže, da pri rastlinah ne obstaja nobena regija, ki bi bila tako spremenljiva, kot je pri živalih odsek COI.

Iskanje ustrezne regije za črtno kodo DNA se je pri rastlinah osredotočilo na kloroplastni genom, ki predstavlja alternativo živalskemu mitohondrijskemu genomu. Kloroplastni genom je za črtne kode ustrezen, saj se v vsaki celici nahaja v visokem številu kopij in ga sestavlja ohranjeno zaporedje genov, njegova slaba lastnost pa je relativno nizka stopnja evolucije. Znanstveniki so se tako osredotočili na iskanje regije znotraj kloroplastnega genoma, ki bi se relativno hitro spreminjala, po drugi strani pa bi morala biti regija dovolj ohranjena, da bi bila prisotna pri vseh kopenskih rastlinah in bi jo bilo mogoče pomnožiti na enostaven način (z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi).

Zaradi odsotnosti regije, ki bi ustrezala potrebnim standardom, so raziskovalci predlagali hkratno uporabo več regij. Prvi predlogi so obsegali kombinacijo treh regij, na primer kombinacijo treh kloroplastnih genov (rpoC1, rpoB in matK) ali kombinacijo dveh kloroplastnih genov (rpoC1 in matK) in enega medgenskega vmesnika (psbA-trnH) (25), še

vedno pa se omenja tudi zaporedje ITS jedrnega genoma. Prelomnico v napredku iskanja najboljše rešitve pa zaenkrat predstavlja publikacija skupne CBOL Plant Working Group v reviji PNAS avgusta 2009 (26). Kratek prispevek s kar 52 avtorji s celega sveta obravnava potencialne kandidate DNA črtna kode. Raziskovalci so pomnoževali različne regije kloroplastne DNA 907 vzorcev rastlin, med katerimi je bilo 445 vrst kritosemenk, 38 vrst golosemenk in 68 vrst nižjih rastlin. Pri vrednotenju potencialnih kandidatov za DNA črtna kode so upoštevali kriterije CBOL in na njihovi podlagi ovrednotili sedem najbolj resnih kandidatov: štiri kodirajoče (matK, rbcL, rpoC1, rpoB) in tri nekodirajoče regije (psbA-trnH, atpF-atpH, psbK-psbL).

Na podlagi testiranja vseh sedmih regij so ovrgli štiri. Ostale tri regije – rbcL, psbA-trnH in matK so relativno dobro ustrezale kriterijem za črtna kode, čeprav nobena izmed njih ni povsem zadovoljila vseh. Na podlagi omenjenega so nekateri raziskovalci skupine za rastline v okviru CBOL za črtno kodo DNA za rastline predlagali kombinacijo vseh treh regij.

Kljub vsemu pa se zdi kombinacija kar treh regij pri rastlinah v primerjavi z eno samo regijo pri živalih veliko. Pomnoževanje večjega števila regij je dražje in zamudnejše, zato je bil narejen korak dlje: med testiranimi regijami so izbrali kombinacijo tistih dveh, ki sta dali najboljše rezultate glede na kriterije CBOL. Izkazalo se je, da najugodnejšo kombinacijo predstavljata regiji matK in rbcL. Pri testiranju njune uporabnosti so ugotovili, da omogočata učinkovito določanje do vrste v 72% primerov, v ostalih primerih pa vsaj do rodu. Kljub temu, da je odstotek relativno nizek, lahko ob poznavanju geografskega izvora vzorca število potencialnih vrst krepko zmanjšamo, v najboljšem primeru na eno samo.

2.3 Ostali organizmi

Glede črtnih kod za ostale organizme si raziskovalci še niso enotni. Pri nekaterih glivah se kot ustrezno regijo uporablja gen COI, torej istega kot za živali (8). V drugih skupinah gliv pa ta gen ni uporaben, kar onemogoča univerzalno uporabo za vse glive. V zadnjem času predstavlja potencialnega kandidata tudi jedrna regija ITS (7).

Regijo COI se zaenkrat uporablja tudi pri nekaterih nevretenčarskih skupinah, na primer spužvah in koralah (27, 28), pri morskih planktonskih ličinkah (29) ter pri nekaterih invazivnih vrstah, prisotnih v balastnih vodah (30). Pri nekaterih drugih skupinah, na primer glistah, regijo COI nadomeščajo zaporedja ribosomskih genov (4, 31, 32). Zaporedje COI se je izkazalo za neuporabno tudi pri določanju ožigalkarjev zaradi premajhne raznolikosti mitohondrijskega genoma (1, 33).

3 Uporaba črtnih kod DNA

Z razvojem novih, hitrejših in enostavnejših molekularno-genetskih metod postajajo informacije o nukleotidnih zaporedjih DNA vedno bolj dostopne in koristne tudi v drugih vejah biologije. Raziskovalci napovedujejo vedno večjo uporabo črtnih kod DNA v varstveni biologiji (trgovanje z zavarovanimi vrstami in izdelki iz njih, vnos potencialno invazivnih vrst v komercialne namene itd.), v ekoloških raziskavah (npr. pri ocenjevanju biotske pestrosti ali raziskavah prehrane), v medicini, farmaciji in sistemski biologiji. Ena od najpomembnejših vlog sistema črtnih kod DNA je taksonomska identifikacija medicinsko pomembnih patogenov in njihovih nevretenčarskih vektorjev, pri katerih je morfološka identifikacija pogosto zelo zahtevna ali nemogoča (34, 35) ter za identifikacijo vrst, ki se uporabljajo pri izdelavi zdravil naravnega izvora.

Glede na število obolelih in stopnjo umrljivosti, ki so posledica okuženosti s paraziti in njihovimi prenašalci, lahko trdimo, da sta ti ekološki skupini med nevarnejšimi skupinami organizmov na Zemlji (34). Taksonomska identifikacija parazitov je zelo zahtevna; poleg tega, da so številni paraziti izredno majhni, se ponavadi razvijajo preko zapletenega življenjskega kroga (iz jajčeca preko ličinke, nimfe do odraslega osebk), ki lahko vključuje tudi več gostiteljev. V gostitelju pa so lahko paraziti prisotni tudi kot združba različnih vrst, ki so si včasih morfološko izjemno podobne (t.i. kriptični kompleks). Taksonomska določitev je osrednjega pomena za razumevanje interakcije med gostiteljem in paraziti, saj pomeni osnovo za razumevanje poteka parazitskih bolezni, ki pestijo ljudi ter domače in prostoživeče živali (36). Za določitev parametrov, kot so specifičnost gostitelja, virulenca in prenos, je zelo pomembno poznavanje ekološko-evolucijskega odnosa med parazitom in gostiteljem. Pravilna taksonomska identifikacija parazitov zagotavlja tudi nadaljnjo prepoznavnost njegovih pomembnih rezervoarjev ter razlikovanje morfološko podobnih vrst, ki povzročajo različne bolezni.

Sistem črtnih kod DNA se je kot uspešen pokazal pri določitvi vektorjev lišmanioze, bolezni kože, sluznic in notranjih organov, ki se prenaša s pikom dvokrilca peščene muhe (*Lutzomyia* spp.; 37) in jo povzročajo bičkarji različnih vrst lišmanije (*Leishmania* spp.). Pri analizi 20 vrst rodu *Lutzomyia* so ugotovili, da dve vrsti, ki pripadata ločenima filogenskima kladama, prenašata lišmaniozo v visoki koncentraciji in služita kot vektorja za bolezen pri ljudeh in drugih sesalcih.

V tropskih območjih predstavljajo komarji ene izmed najpogostejših prenašalcev bolezni. Od 3.500 znanih vrst komarjev je medicinsko pomembnih le peščica, ker so vektorji pri prenosu virusov, glist ali praživali. Nekatere vrste komarjev širijo med drugim malarijo, mrzlico denga, virus vročice chikungunya, japonski encefalitis in rumeno mrzlico ter tako vplivajo na zdravstveno stanje milijonov ljudi (32). V Afriki uporabljajo DNA identifikacijo za določanje komarjev, ki širijo limfatično filariozo, s katero je okuženo več kot 120 milijonov ljudi v 80 državah (38, 39).

Identifikacija vrst preko črtnih kod DNA se vse pogosteje uporablja tudi pri razkrivanju sestavin zeliščnih mešanic ali pripravkov (40). Zdravilne snovi iz naravnih virov se že stoletja uporabljajo v zdravljenju vsakdanjih bolezni. V zadnjih letih tudi v zahodnem svetu narašča trend »naravnega« zdravljenja s pomočjo zdravilnih rastlin. Učinkovitost takega zdravljenja pa je kritično odvisna od pravilno uporabljenega rastlinskega materiala (9, 41). Napačno uporabljene zdravilne rastline pogosto motijo terapevtske učinke mešanic in lahko celo vodijo do življenjsko nevarnih zastrupitev. Leta 1989 sta na primer dve osebi v Hong Kongu utrpeli hudo nevropatijo in encefalopatijo po zaužitju juhe, pripravljene iz korenin rastline *Hexandrum podophyllum*, strupenega zelišča, ki sta ga zamenjala z vrsto *Gentiana rigescens*. Leta 2002 je 63 ljudi na Nizozemskem poročalo o splošno slabem počutju in bruhanju po zaužitju zeliščnega čaja, ki je vseboval nevrotoksični japonski zvezdasti janež (*Illicium anisatum*) (42). Leta 2008 se je ženska v Singapurju zastrupila zaradi uživanja pripravka, ki je namesto vrste slreča *Rhododendron molle* vseboval strupeni indijski kristavec (*Datura metel*) (43).

Gao in sod. (44) so raziskovali možnost identifikacije vrst iz družine metuljnic (fam. Fabaceae) s pomočjo zaporedja jedrnega gena ITS2. Metuljnice so druga največja družina rastlin, ki se uporablja v zdravilne

namene (kar 490 vrst). Pri treh vrstah iz rodu sladkega korena (*Glycyrrhiza uralensis*, *G. inflata* in *G. glabra*), ki so pogosto uporabljene v tradicionalni medicini, so odkrili inhibitorne učinke pri *in vitro* podvojevanju virusa HIV (29), pri vrsti *Trigonella foenum-graecum* pa so dokazali sposobnost zmanjševanja nivoja glukoze v krvi (44). Po drugi strani pa družina metuljnic vsebuje tudi številne strupene vrste, saj je toksičnih kar 290 vrst iz 100 rodov: vrsta *Acacia rigidula* vsebuje precejšnje vrednosti toksičnih alkaloidov (44), številne vrste rodu *Crotalaria* vsebujejo pirolozidinske alkaloidne, ki so strupeni za sesalce in ptiče (45). Problematične so vrste, ki so si med seboj podobne ali vrstni kompleksi (morfološko izjemno podobne vrste istega rodu), pri katerih so lahko nekatere vrste zdravilne, druge pa ne, ali pa so celo strupene. Za take vrste je pravilna identifikacija ključnega pomena. V raziskavi, ki je zajela 1.507 zaporedij regije ITS2, pripadajočih 1.126 vrstam iz 196 družin, je Gao s sod. (44) ugotovil, da je bila identifikacija do vrste uspešna v 80% in do rodu v 100% primerov.

Kot primer uporabnosti identifikacije s pomočjo črtnih kod DNA lahko navedemo raziskavo ameriškega profesorja porodništva, ginekologije in reproduktivne medicine Davida Bakerja z Univerze Stony Brook (46). Številne pacientke v ZDA v postmenopavzalni dobi uporabljajo kot nadomestilo za hormonske terapije zeliščne pripravke iz grozdnate svetilke (*Actaea racemosa*). Izvleček iz te rastline lajša simptome menopavze preko vezave na estrogenske receptorje. Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA), ki je med drugim zadolžena za varnost in učinkovitost zdravil, bioloških proizvodov in živil, nima nadzora nad prehranskimi dodatki. Baker je želel preveriti, ali pripravki, ki so mu jih prinašale pacientke, res vsebujejo izvleček grozdnate svetilke. Po testiranju več kot dvajsetih na trgu dostopnih pripravkov se je izkazalo, da jih je precej vsebovalo popolnoma drugo vrsto. Uporaba takšnih pripravkov je problematična, saj nekatere vrste istega rodu (*Actea*) vsebujejo toksine in ima njihovo jemanje lahko negativne stranske učinke.

Zaradi številnih napak, ki se dogajajo pri uporabi zdravilnih mešanic, je bila leta 2009 vzpostavljena baza MMDBD (angl. *Medical Materials DNA Barcode Database*), ki vsebuje nukleotidna zaporedja rastlinskih in živalskih vrst, opisanih v različnih farmakopejah (npr. Ameriški in Kitajski) (9). Ta zbirka podatkov omogoča spletno platformo za shranjevanje, iskanje, primerjanje in analizo DNA zaporedij medicinsko uporabnih vrst in njihovih najpogostejših zamenjav (9).

4 Sklep

Na podlagi omenjenih raziskav je razvidno, da je sistem črtnih kod DNA tako pri živalih kot tudi pri rastlinah in drugih organizmih še na stopnji razvoja. Cilj raziskav je predvsem usmerjen predvsem v zmožnost večjega vrstnega razlikovanja. Razvoj in napredek pa je tesno povezan tudi z razvojem novih tehnologij določanja nukleotidnega zaporedja DNA (npr. pirosekveniranje), ki bodo omogočale hitrejšo in cenejšo analizo nukleotidnih zaporedij, kar bo najverjetneje doprineslo k širši aplikativni uporabi v različnih panogah, kot sta medicina in farmacija.

5 Literatura

1. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*. 2003; 270: 313–321.

2. Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*. 2010; 11(4): 440–453.
3. Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2005; 360(1462): 1805–1811.
4. Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 2002; 11: 839–850.
5. Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 6350–6355.
6. Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2004; 2(10): e312.
7. Seena S, Pascoal C, Marvanová L, Cássio F. DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Diversity* 2010; 44: 77–87.
8. Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 2007; 7: 355–364.
9. Lou SK, Wong KL, Li M, But PPH, Tsui SKW, Shaw PC. An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database) *BMC Genomics* 2010; 11: 402.
10. Wilson KH. Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 192–208.
11. Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 2008; 24(2): 110–117.
12. Kuksa P, Huang PH, Pavlovic V. Efficient use of unlabeled data for protein sequence classification: a comparative study. *BMC Bioinformatics* 2009; 10 (Suppl 4): S2.
13. Saunders G. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2005; 360, 1879–1888.
14. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM and Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103(32):12115–12120
15. Kress W, Wurdack K, Zimmer E and Weigt L: Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 8369–8374.
16. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N and Savolainen V. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 2005, 360(1462):1889–95.
17. Kress WJ, Erickson DL. DNA Barcoding – a Windfall for Tropical Biology? *Biotropica* 2008; 40(4): 405–408.
18. Barrett R and Hebert P. Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool* 2005, 83(3): 481–491.
19. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR and Hebert PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2005, 360(1462): 1847–1857.
20. Robins J, Hingston M, Matisoo-Smith E, Ross H. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 2007; 7(5): 717–729.
21. Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2003; 270: S596–S599.
22. Cox AJ, Hebert PDN. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.* 2001; 10: 371–386.
23. Lynch M, Jarrell PE. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 1993; 135, 1197–1208.
24. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23): 8369–74.
25. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans, Ser B* 2007; 360: 1889–1895.
26. CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 12794–12797.
27. Moura CJ, Harris DJ, Cunha MR, Rogers AD. DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zool. Scr.* 2008; 37: 93–108.

28. Wörheide G, Erpenbeck D. DNA taxonomy of sponges - progress and perspectives. *J. Mar. Biolog. Assoc. U.K.* 2007; 87: 1629-1633.
29. Heimeier D, Lavery S, Sewell MA. Using DNA barcoding and phylogenetics to identify Antarctic invertebrate larvae: Lessons from a large scale study. *Marine Genomics* 2010; 3(3-4): 165-177.
30. Briski E, Cristescu ME, Bailey SA, MacIsaac HJ. Use of DNA barcoding to detect invertebrate invasive species from diapausing eggs. *Biological Invasions* 2010. Online publication date: 9-Nov-2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-010-9892-7>. Dostop: 15-12-2010.
31. Holterman M, Rybarczyk K, Van Den Elsen S, Van Megen H., Mooyman P, Santiago RP, Bongers T, Bakker J, Helder J. A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources* 2008; 8: 23-34.
32. Virgilio M, Backeljau T, Nevado B, De Meyer M. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics* 2010, 11: 206.
33. Shearer TL, Coffroth MA. Barcoding corals: Limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Resources* 2008; 8(2): 247-255.
34. Besansky NJ, Severson DW, Ferdig MT. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology* 2003; 19 (12): 545-546.
35. Powers T. Nematode Molecular Diagnostics: From Bands To Barcodes. *Annual Review of Phytopathology* 2004; 42: 367-383.
36. Leung TLF, Donald KM, Keeney DB, Koehler AV, Peoples RC, Poulin R. Trematode parasites of Otago Harbour (New Zealand) soft-sediment intertidal ecosystems: life cycles, ecological roles and DNA barcodes. *N.Z. J. Mar. Freshwater Res.* 2009; 43: 857-865.
37. Azpurua J, De La Cruz D, Anayansi V, Windsor D. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(3): e627.
38. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2007; 44: 1-7.
39. Becker N, Petrić D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Kaiser A. Mosquitoes and their control. Second edition. Springer-Verlag, 2010: 39. 40. Slanc P, Ravnikar M, Strukelj B. Identification of individual herbal drugs in tea mixtures using restriction analysis of ITS DNA and real-time PCR. *Pharmazie* 2006; 61(11): 912-5.
41. Sucher NJ, Carles MC. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Med* 2008; 74(6): 603-623.
42. Johanns ES, Van der Kolk LE, Van Gemert HM, Sijben AE, Peters PW, De Vries I. An epidemic of epileptic seizures after consumption of herbal tea. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; 146: 813-816.
43. Phua DH, Cham G, Seow E. Two instances of Chinese herbal medicine poisoning in Singapore. *Singapore Med J* 2008; 49: e131-133.
44. Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. Jul 06, 2010. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130(1): 116-121.
45. Williams MC, Molyneux RJ. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. *Weed Sci* 1987. 35: 476-481.
46. Harmon K. Rare flowers and common herbal supplements get unmasked with plant DNA barcoding. *Scientific American*, 18 Apr 2010.