•综述•

传粉网络构建的定性定量分子研究：应用与展望

郎丹丹^{1,2} 唐 敏^{1,3} 周 欣^{1,3*}

1 (中国农业大学北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100193)

2 (中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

3 (中国农业大学植物保护学院, 北京 100193)

摘要：传粉者是重要的生态功能提供者，在维持稳定的生态系统和高效的农业生产力中发挥着重要作用。因此，传粉网络的构建和监测工作对评价生态系统平衡和调控农业生产至关重要。该工作的基础就是通过对传粉者及植物的物种鉴定构建其相关性。传统的形态学物种鉴定对分类学专家的专业知识、时间和经验都提出较高的要求。DNA条形码和高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)的发展及其在传粉网络研究中的应用，提供了高效、准确鉴定传粉者与植物的方法，大大提高了传粉网络构建的效率。本文阐述了传粉网络研究相关的研究方法和技术进展，并提出利用高通量测序技术结合无PCR扩增(PCR-free)的“超级条形码”技术，有望实现以更高的灵敏度和分辨率对混合物种样品进行定性及相对定量的监测。该方法的有效性已在其他生物多样性研究中得以验证，在传粉网络研究中虽处于初始阶段，但应用前景广阔。

关键词：线粒体；叶绿体；花粉；宏条形码；宏基因组；PCR-free；定量

Qualitative and quantitative molecular construction of plant–pollinator network: Application and prospective

Dandan Lang^{1,2}, Min Tang^{1,3}, Xin Zhou^{1,3*}

1 Beijing Advanced Innovation Center for Food Nutrition and Human Health, China Agricultural University, Beijing 100193

2 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

3 College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193

Abstract: Pollinators serve key ecological functions, ensuring stable ecosystems and high agricultural yields. Hence, assessing ecosystem health and effects of agricultural management would benefit from understanding and monitoring pollination networks, which involves identifications of pollinators and pollinated plants. Classic approaches of morphology-based identification of plants and pollinators can be time-consuming, labor-intensive and costly, and require highly specialized taxonomic expertise. In comparison, DNA barcoding and high-throughput sequencing technologies can provide efficient and accurate identifications of plants and their pollinators, which may facilitate construction of pollination networks. Here we propose using sequencing technologies with a PCR-free genome-skimming work frame, using "super DNA barcode" as a new method to assess plant-pollinator networks. We expect this technique to improve resolution and accuracy of taxonomic identification to help gain quantitative information for bulk samples of pollinators or pollens. Although there are technical challenges to be resolved, the robustness of the new methodology has been validated in relevant biodiversity studies, suggesting promise in constructing pollination networks.

Key words: mitochondria; chloroplast; pollen; metabarcoding; metagenome; PCR-free; quantify

生物多样性是生态系统的重要组成成分，也是维持生态系统及其功能的关键因素，其中种类繁多

的传粉者提供了重要的生态服务功能——促进植物的有性繁殖。在传粉者中，昆虫授粉对维持陆地

收稿日期: 2018-02-15; 接受日期: 2018-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(31772493)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xinzhou@cau.edu.cn

生态系统(Ashman et al, 2004; Aguilar et al, 2006)和农业生产力(Klein et al, 2007; Ricketts et al, 2008)至关重要。近年来, 由于人为因素(如杀虫剂的广泛使用、栖息地破坏等)和自然因素(如疾病和寄生虫的传播扩散、外来物种入侵等)造成的传粉昆虫衰退现象十分严重(Potts et al, 2010, 2016)。传粉昆虫的衰减会减弱自然区域和农业环境对干扰的抵抗能力(Kaiser-Bunbury et al, 2017)。同时, 传粉网络结构可以作为评价传粉质量的一个指标, 其对物种共存能力、稳定性以及协同进化过程都有十分重要的影响(Bascompte & Jordano, 2007)。开花植物与传粉者之间存在互惠互利关系, 群落中的开花植物通过共享当地不同的传粉者达到授粉目的, 同时为授粉者提供一定的食物报酬, 两者之间构成了复杂的传粉网络(方强和黄双全, 2014)。传粉网络构建包括对传粉昆虫与植物的鉴定及两者关系的确立, 其中物种鉴定是传粉网络构建的基石。

传统的传粉网络构建方法以开花植物为主要对象进行观察。待传粉昆虫访问被观察植物且完成授粉行为时予以记录并将其捕获, 用于后续传粉昆虫的分类鉴定, 这一方法需要投入大量的人力和时间, 且只能对有限对象进行研究。Weiner等(2014)对德国119个草原地区的传粉昆虫进行的调查花费了962小时。此方法的另一局限性在于访花昆虫多样性丰富, 存在典型的分类瓶颈。鉴于此, 部分学者认为以植物为对象观察访花昆虫的方法并不能构建真实的植物-传粉昆虫网络(Popic et al, 2013; King et al, 2013)。另一类方法以传粉昆虫为主要观察对象, 通过收集传粉昆虫携带的花粉并对其进行定性与定量分析, 从而实现传粉网络的构建(Bosch et al, 2009)。但此方法需建立在孢粉学的基础上, 同样面临孢粉分类瓶颈。此外, 传粉昆虫携带花粉并不一定会完成授粉功能, 所以传粉昆虫携粉分析也未必能反映全面的传粉关系。

随着DNA条形码技术在传粉网络研究中的应用逐渐增多, 初期基于克隆和Sanger测序技术的单一物种鉴定逐渐发展至建立在高通量测序基础上的混合物种鉴定。基于高通量测序技术的宏条形码(metabarcoding)技术相比于传统的孢粉学来说, 可以获得更准确的混合花粉鉴定结果(Keller et al, 2015; Smart et al, 2017)。本文将介绍传粉网络研究方法的研究进展以及基于高通量测序技术的分子

方法在传粉网络研究中的应用, 并提出了一种结合高通量测序技术、无需PCR扩增(PCR-free)和“超级条形码”的方法, 以实现传粉网络研究中传粉昆虫和植物多样性在时间、空间维度上更准确的监测。这一技术可以在传粉昆虫携粉分析中提高传粉昆虫和开花植物物种的鉴定准确率和效率, 尤其是混合花粉的物种多样性及相对丰度分析的效率及准确度, 以增加复杂传粉网络的构建效率(图1)。

1 传粉网络研究的传统方法学及其局限性

在传粉者的鉴定方面, 蜜蜂科作为最重要的传粉昆虫类群, 对全球90%以上的主要作物进行授粉(Klein et al, 2007)。以蜜蜂科昆虫为例, 传统的鉴定方法依靠形态学特征对单一标本逐一完成分检和鉴定, 整个分类流程需要分类专业知识并要花费大量的时间。蜜蜂科物种繁多, 全球已描述超过5,700种(Danforth et al, 2013), 而专业分类人员则严重匮乏。部分物种在种群间存在较大的种内形态差异(如: *Bombus terrestris*, Rasmont et al, 2008), 但同时近缘种(如: *Bombus hortorum* 和 *B. ruderatus*, Cameron et al, 2007)或隐存种(Murray et al, 2008)间依靠形态特征难以区分, 这对传粉蜜蜂的鉴定提出了巨大挑战。昆虫的形态鉴定是描述传粉昆虫-植物相互作用的重要限制因素(Pornon et al, 2016); 而相对于分类专业的挑战, 更大的困难可能来自于分类专业知识的不均衡, 很难跨区域跨时间进行方法学的比较。在不同区域开展的传粉研究往往因为分类学基础的不平衡而无法进行课题间的横向比较。

关于粉源植物的鉴定及传粉关系的构建, 一方面, 以植物为主体进行观察及形态学鉴定的方法存在显著的局限性。由于开花周期的差异, 被观察植物的抽样调查很难反映真实传粉网络中的植物多样性(Pornon et al, 2016); 而观察时间需根据传粉昆虫的自然访花时间进行抽样, 很难提高数据采集效率。另一方面, 通过对传粉昆虫体表携带的混合花粉进行定性、定量分析, 也可建立传粉网络关系。传统的孢粉学使用显微镜、电镜等对花粉形态及数量进行观察与鉴定(Rahl, 2008), 这在过去30年中占主导地位(Bambara, 1991; Escriche et al, 2011)。虽然花粉自动分析数字化技术已应用于当代孢粉学研究当中(Holt & Bennett, 2014), 但部分近缘植物的花粉缺乏显著的物种识别特征(Rahl, 2008), 造成鉴

图1 传粉网络构建流程及混合花粉组成分析方法比较。图中蓝色框和绿色框中内容分别为形态学与宏条形码方法，橙色框中内容为宏基因组方法。底部黑色网络为真实传粉网络模型，蓝、绿和橙色网络模型分别代表经对应方法分析可能得到的网络结构。由于各种方法都有其局限性，所得网络均与真实网络存在一定差异。宏条形码和宏基因组技术可解决孢粉学种内形态差异的问题，但仍存在部分近缘种难以区分的情况。相对于宏条形码技术，宏基因组技术可避免PCR带来的物种偏倚性，提高相对丰度的准确率。

Fig. 1 Construction of pollination network and comparison of analysis methods of mixed pollen composition. The contents of the blue and the green boxes refer to morphological and molecular methods, respectively. The content in the orange box is the PCR-free genome-skimming (metagenomics) approach proposed in this paper. The black network model at the bottom represents the real pollination network, and the blue, green and orange network models represent network structures constructed by the corresponding methods. Due to the limitations of various methods, the constructed networks are potentially deviated from the real network. Metabarcoding and metagenomic techniques can alleviate issues caused by intra-specific morphological variations; but some closely related species remain difficult to differentiate. Compared to metabarcoding, the metagenomic technology can reduce species bias caused by PCR and improve the accuracy in relative abundance.

定结果通常只能达到科、属级别(Khansari et al, 2012; Bell et al, 2016), 导致孢粉学在花粉多样性研究中受到限制(Bagella et al, 2013)。

2 DNA条形码技术的研究进展及其应用

DNA条形码技术(Hebert et al, 2003)使用标准化DNA序列, 通过比对基于权威鉴定标本所产生的参考序列数据库, 对未知样本进行分类鉴定。线粒体基因组的*COI* (Cytochrome Oxidase *c* subunit I)基因片段作为标准条形码序列被广泛应用于动物物种的鉴定中(Hebert et al, 2003; Janzen et al, 2009)。对于植物类群, 生物条形码联盟植物工作组(Consortium for the Barcode of Life, CBOL) (2009)建议将叶绿体基因组编码区域*rbcL*和*matK*片段作为植物鉴定的核心条码。也有研究者建议与核基因ITS2、ITS联合使用以更高效地鉴定疑难类群(Chen et al, 2010; China Plant BOL Group et al, 2011)。另外还有研究者选用其他叶绿体片段作为候选条形码, 如*atpF-atpH*, *trnH-psbA*等(Lahaye et al, 2008; Whitlock et al, 2010; Hollingsworth et al, 2011)。

通过DNA条形码技术进行物种鉴定的相关算法也在快速更新, 如: BarcodingR (Zhang et al, 2017), 并被成功运用于生物多样性评估、入侵物种检测和保护生物学中(Pecnikar & Buzan, 2014)。DNA条形码技术的应用大大缩短了传粉网络构建的时间(Sheffield et al, 2009), 并能够保证物种鉴定的准确性。*COI*条形码在鉴定欧洲蜜蜂总科昆虫时与传统形态学方法鉴定结果一致(Schmidt et al, 2015)。在区分形态学特征差异很小的隐存种时, DNA条形码技术还具有更高的鉴定效率(Smith et al, 2006; Schmidt et al, 2015)。植物DNA条形码也可成功对传粉昆虫所携带的花粉进行鉴定, 以用于研究植物与传粉昆虫的关系(Widmer et al, 2000)。但是, DNA条形码技术也有其自身局限性, 如: 标准条形码无法区分部分近缘物种, 尤其在植物中较为普遍。将条形码参考基因扩展到更大的基因集, 如全线粒体或全叶绿体基因组, 在一定程度上可以解决近缘种鉴定的问题。

3 高通量测序技术在传粉网络研究中的应用及前景

经典DNA条形码技术的分析流程是基于单个

样本处理与Sanger测序技术的, 可用于鉴定单一物种组成的花粉颗粒(Wilson et al, 2010)。但用于传粉网络构建的花粉样本通常来源于多种植物, 无法通过标准条形码流程得到各组分的分类信息。有研究尝试从混合花粉中分离出单个花粉粒(Matsuki et al, 2007; Aziz & Sauve, 2008), 但低效率限制了其在大规模生态网络研究中的应用。相似地, 使用扩增子克隆技术(Bruni et al, 2015)纯化混合花粉的扩增子后再进行Sanger测序也很难降低成本同时提高分析效率。高通量测序技术的出现及其与DNA条形码技术的结合(即DNA宏条形码, DNA metabarcoding)使这一问题得到解决, 且有效降低了混合物种识别的综合成本。

3.1 DNA宏条形码技术利用通用条形码片段快速鉴定混合样本的物种组成

DNA宏条形码技术从包含完整生物体的混合样本或含有降解DNA的环境样本(土壤、水、粪便等)中同时识别多个物种(Taberlet et al, 2012), 是一种结合大规模样本采集、高通量测序和生物信息学分析以实现混合物种样本多样性分析的方法(Yu et al, 2012)。Binladen等(2007)进行了DNA条形码与高通量测序相结合的初步尝试, 通过生物信息学分析可以将几乎所有生成的DNA序列分配给正确的源物种。Hajibabaei等(2011)首次将该技术应用于淡水无脊椎动物群落分析中。目前, DNA宏条形码技术已趋于成熟, 在不同领域中都得以应用, 如Raphaël等(2016)利用环境DNA (eDNA)宏条形码技术对法国Aiguebelette湖至Tier河一带淡水系统中的鱼类多样性进行了描述, 相比于传统的采样方法, 更有效地监测了物种的发生。算法与分析流程的不断产生与更新推进与完善了DNA宏条形码技术在物种鉴定中的应用。Liu等(2013)运用新的分析流程使*COI*宏条形码的长度达到了标准条形码的全长(658 bp), 克服了二代高通量测序技术读长短的缺点, 提高了物种鉴定效率。Shi等(2018)使用FuzzyID2大大加速了物种识别过程中对大型条码数据库的查询, 查询具有数万个条形码的数据集仅需数秒, 且识别成功率高于其他常用方法(如Blast)。

近年来, DNA宏条形码技术被不断应用于传粉昆虫-植物网络的构建(Richardson et al, 2015a; Bell et al, 2017)。相比于传统形态学方法和Sanger DNA条形码方法, 该技术可有效降低混合物种鉴定成本

(Yu et al, 2012)。此外, 相比于孢粉学, DNA宏条形码技术对混合花粉的鉴定具有更高的灵敏度(Richardson et al, 2015b)。

3.2 无需PCR扩增的宏基因组方法减少类群偏向性、更准确地还原生物多样性组成

DNA宏条形码技术需要首先针对特定的条形码区域进行扩增, 以获得足够量的标准扩增子用于高通量测序。采用PCR扩增的一个局限在于扩增引物对不同类群存在系统性的效率偏差(Bellemain et al, 2010; Arif et al, 2011)。即使引物得到优化, PCR扩增还受DNA模板的核苷酸组成和二级结构的影响。一个典型的例子是, 膜翅目的昆虫中很多类群在COI条形码区域普遍存在多聚物, 这一特性导致部分膜翅目全长条形码序列的获得比较困难(Li et al, 2010), 在宏条形码检测中其成功率系统地低于其他类群(Yu et al, 2012)。此外, PCR扩增在高通量测序的高敏感性下使假阳性增多(Hajibabaei et al, 2011)。当混合样本包含较多的远缘类群时, PCR扩增存在的类群偏倚性可能会使真实的生物量比率或物种相对丰度发生改变, 用基于PCR的DNA宏条形码技术得到的数据不能准确地反映物种的相对丰度(Piñol et al, 2015)。面对生物多样性的迅速丧失, 准确的定性和定量对于评估生物多样性和了解生物多样性与生态系统功能的关系都是必不可少的(Loreau & Mazancourt, 2013)。而目前DNA宏条形码技术仅能对传粉昆虫-植物相互作用进行半定量测量(即将相互作用分类为弱、中等和强相互作用)(Pornon et al, 2016)。

Taberlet等(2012)展望, 针对环境DNA, 在无需PCR扩增的前提下, 使用鸟枪法测序有可能减少PCR扩增对多样性组成的影响。Zhou等(2013)首次使用真实混合昆虫样本证实了该方法的可行性。新方法省略了PCR扩增的步骤, 直接使用混合样本提取的总DNA进行高通量鸟枪法测序, 并用生物信息学方法从混合序列中提取与物种鉴定相关的基因信息。PCR-free技术对提取DNA总量是否满足高通量建库要求提出了挑战。Yamasaki等(2016)以按蚊(*Anopheles*)为模型提供了针对于小体型昆虫的改良DNA提取方案(提取DNA平均浓度为1.33 ng/μL)和低输入(10 ng)基因组DNA文库制备方案。这使得PCR-free技术的应用更为广泛。基于PCR-free的宏基因组方法也成功运用于传粉昆虫的物种鉴定及

多样性分析(Tang et al, 2015)。同理, 该方法有望实现混合花粉的物种鉴定及相对丰度分析。唐敏等(2013)指出, PCR-free技术将是植物DNA宏条形码应用的突破重点。

3.3 更完善的线粒体/质体基因组参考数据库有利于充分发挥宏基因组方法学优势

基于宏基因组方法的多样性分析流程也存在一定弊端, 在减少因PCR扩增造成的类群偏倚性的同时, 该方法完全依赖于原始混合样本中的条形码DNA模板的数量(即: 动物的线粒体COI, 植物叶绿体的matK和rbcL)。虽然缺乏系统性的调查, 但线粒体和叶绿体基因在动、植物总核酸量中的比例普遍较低(通常在1%及以下水平)。因此, 宏基因组测序结果中绝大部分数据并没有提供有效的分类学信息, 而混合样本中比例较低的物种存在更高的假阴性风险。

针对上述问题, 研究人员研发了基于物理、化学方法如差速离心(Zhou et al, 2013; Macher et al, 2017)或分子生物学方法如探针捕获(Liu et al, 2016), 以提高混合DNA中线粒体或质体的核酸比例。与此同时, 使用更多的具备物种分类能力的参考基因可以提高物种鉴定的成功率并有效减少因可用DNA片段含量低导致的假阴性结果。对于动、植物类群来说, 一个合理的参考基因集的拓展是使用线粒体或叶绿体(质体)上更多的编码基因乃至全基因组, 该方法也可称为“超级条形码”。Tang等(2015)成功将用于物种鉴定的参考序列从传统的标准COI条形码扩展到全线粒体基因组, 使可用于物种鉴定的有效序列信息扩大了约20倍。而植物条形码应用叶绿体全基因组序列则提供了比传统条形码多100倍的有用信息(Ruhsam et al, 2015)。对于植物DNA条形码, 使用叶绿体全基因组或者将少数植物DNA条形码与细胞器基因组结合使用可达到将物种鉴定至种水平的效果(Parks et al, 2009; Li et al, 2015; Coisac et al, 2016; Hollingsworth et al, 2016)。

我们选取了蜜蜂属(*Apis*)的6个物种(表1)和蜜蜂科的20个物种(表1)中线粒体基因组(NCBI已有数据)上13个蛋白编码基因分别进行比对, 然后将比对后的13个蛋白编码基因序列合并, 并以100个碱基的滑动窗口形式以5个碱基为间隔进行属内和科内遗传距离(P-distance)计算(图2)。同理, 我们选取了石斛兰属(*Dendrobium*) 31个物种(表2)和兰科84

表1 蜜蜂科20个物种(包括蜜蜂属6个物种)列表及其线粒体基因组NCBI序列号
Table 1 The list of 20 species of Apidae (including six species of *Apis*) and their mitochondrial genomes' accession numbers in NCBI

物种 Species	NCBI序列号 NCBI accession number	物种 Species	NCBI序列号 NCBI accession number
<i>Apis andreniformis</i>	KF736157.1	<i>Bombus lapidarius</i>	KT164641.1
<i>Apis cerana</i>	NC_014295.1	<i>Bombus lucorum</i>	KT164681.1
<i>Apis dorsata</i>	KC294229.1	<i>Bombus pascuorum</i>	KT164630.1
<i>Apis florea</i>	NC_021401.1	<i>Bombus terrestris</i>	KT368150.1
<i>Apis mellifera sahariensis</i>	NC_035883.1	<i>Melipona bicolor</i>	NC_004529.1
<i>Apis nigrocincta</i>	KY799147.1	<i>Melipona scutellaris</i>	NC_026198.1
<i>Bombus breviceps</i>	MF478986.1	<i>Nomada fabriciana</i>	KT164663.1
<i>Bombus consobrinus</i>	MF995069.1	<i>Nomada flava</i>	KT164670.1
<i>Bombus hypocrita sapporensis</i>	NC_011923.1	<i>Nomada flavoguttata</i>	KT164617.1
<i>Bombus ignitus</i>	NC_010967.1	<i>Nomada goodeniana</i>	KT164660.1

图2 遗传距离图绘制流程
Fig. 2 The pipeline for P-distance distribution map of mitochondrial and chloroplast genomes

个物种(表2)的叶绿体基因组上67个蛋白编码基因序列进行了同样的处理及P-distance计算。线粒体基因组上除COI条形码所在区域以及叶绿体基因组上除rbcL和matK两个条形码所在区域, 仍有其他蛋白编码基因所在区域具有同等或更高的遗传歧义度, 即具有相同或更高的物种分辨率, 且各蛋白编码基因属间遗传距离整体上大于其种间遗传距离, 这与DNA条形码用于分类鉴定时在属间分辨率大于种

间分辨率相符合(图3)。

4 高通量测序技术应用于传粉网络研究的挑战

基于高通量测序技术的宏基因组方法意在减少由PCR扩增带来的物种偏倚性, 从而实现物种定量分析。但此方法的应用还具有一定的挑战性, 如完整参考数据库的构建、足量核酸的获取及高效生物信息流程的创建等。

4.1 完整参考数据库的构建

不完整的参考数据库往往是造成假阴性的关键因素。Gómez-Rodríguez等(2015)使用基因组鸟枪法测序和线粒体基因组组装、比对来测量节肢动物混合样品的多样性, 实现了较高的物种检出率(>90%), 其中少数假阴性便是由于参考数据库的不完整造成。随着DNA条形码及高通量测序技术的发展, 昆虫及植物的相关参考序列在快速增长, 但针对特定区域(如中国)或特定研究系统(如传粉网络)的DNA参考数据库仍极不完整, 无法支持全面、深入的物种多样性研究。因此, 构建完整的DNA参考数据库是利用高通量测序技术实现传粉网络定性、定量研究的首要任务, 而针对我国重要的农业、自然生态系统进行全面的传粉昆虫、粉源植物本底调查和分子数据库的构建应成为重中之重。近期的一些研究显示, 高通量测序技术可有效降低获得标准DNA条形码(Liu et al, 2017)和线粒体基因组(Tang et al, 2014)参考序列的经费和时间成本, 为更快地构建参考DNA数据库铺平了道路。

表2 兰科84个物种(包括石斛兰属31个物种)列表及其叶绿体基因组NCBI序列号

Table 2 The list of 84 species of Orchidaceae (including 31 species of *Dendrobium*) and their chloroplast genomes' accession numbers in NCBI

物种 Species	NCBI序列号 NCBI accession number	物种 Species	NCBI序列号 NCBI accession number
<i>Anoectochilus emeiensis</i>	NC_033895.1	<i>Dendrobium parviflorum</i>	NC_035334.1
<i>Apostasia odorata</i>	NC_030722.1	<i>Dendrobium parishii</i>	NC_035339.1
<i>Bletilla ochracea</i>	NC_029483.1	<i>Dendrobium pendulum</i>	NC_029705.1
<i>Bletilla striata</i>	NC_028422.1	<i>Dendrobium primulinum</i>	NC_035321.1
<i>Calanthe triplicata</i>	NC_024544.1	<i>Dendrobium salaccense</i>	NC_035332.1
<i>Cattleya crispata</i>	NC_026568.1	<i>Dendrobium spatella</i>	NC_035333.1
<i>Cattleya liliputana</i>	NC_032083.1	<i>Dendrobium strongylanthum</i>	NC_027691.1
<i>Cephalanthera longifolia</i>	NC_030704.1	<i>Dendrobium wardianum</i>	NC_035329.1
<i>Cymbidium aloifolium</i>	NC_021429.1	<i>Dendrobium wilsonii</i>	NC_035330.1
<i>Cymbidium ensifolium</i>	NC_028525.1	<i>Dendrobium xichouense</i>	NC_035341.1
<i>Cymbidium faberi</i>	NC_027743.1	<i>Elleanthus sodiroi</i>	NC_027266.1
<i>Cymbidium goeringii</i>	NC_028524.1	<i>Epipactis mairei</i>	NC_030705.1
<i>Cymbidium kanran</i>	NC_029711.1	<i>Epipactis veratrifolia</i>	NC_030708.1
<i>Cymbidium lancifolium</i>	NC_029712.1	<i>Erycina pusilla</i>	NC_018114.1
<i>Cymbidium macrorhizon</i>	NC_029713.1	<i>Gastrochilus fuscopunctatus</i>	NC_035830.1
<i>Cymbidium mannii</i>	NC_021433.1	<i>Gastrochilus japonicus</i>	NC_035833.1
<i>Cymbidium sinense</i>	NC_021430.1	<i>Goodyera fumata</i>	NC_026773.1
<i>Cymbidium tortisepalum</i>	NC_021431.1	<i>Goodyera procera</i>	NC_029363.1
<i>Cymbidium tracyanum</i>	NC_021432.1	<i>Goodyera schlechtendaliana</i>	NC_029364.1
<i>Cypripedium formosanum</i>	NC_026772.1	<i>Goodyera velutina</i>	NC_029365.1
<i>Cypripedium macranthos</i>	NC_024421.1	<i>Habenaria pantlingiana</i>	NC_026775.1
<i>Dendrobium aphyllum</i>	NC_035322.1	<i>Habenaria radiata</i>	NC_035834.1
<i>Dendrobium brymerianum</i>	NC_035323.1	<i>Listera fugongensis</i>	NC_030711.1
<i>Dendrobium catenatum</i>	NC_024019.1	<i>Ludisia discolor</i>	NC_030540.1
<i>Dendrobium chrysanthum</i>	NC_035336.1	<i>Masdevallia coccinea</i>	NC_026541.1
<i>Dendrobium chrysotoxum</i>	NC_028549.1	<i>Masdevallia picturata</i>	NC_026777.1
<i>Dendrobium crepidatum</i>	NC_035331.1	<i>Neottia ovate</i>	NC_030712.1
<i>Dendrobium denneanum</i>	NC_035324.1	<i>Neottia pinetorum</i>	NC_030710.1
<i>Dendrobium devonianum</i>	NC_035325.1	<i>Oberonia japonica</i>	NC_035832.1
<i>Dendrobium ellipsophyllum</i>	NC_035340.1	<i>Paphiopedilum armeniacum</i>	NC_026779.1
<i>Dendrobium exile</i>	NC_035343.1	<i>Paphiopedilum niveum</i>	NC_026776.1
<i>Dendrobium falconeri</i>	NC_035326.1	<i>Pelatantheria scolopendrifolia</i>	NC_035829.1
<i>Dendrobium fanjingshanense</i>	NC_035344.1	<i>Phalaenopsis equestris</i>	NC_017609.1
<i>Dendrobium fimbriatum</i>	NC_035342.1	<i>Phragmipedium longifolium</i>	NC_028149.1
<i>Dendrobium gratiosissimum</i>	NC_035327.1	<i>Sobralia callosa</i>	NC_028147.1
<i>Dendrobium henryi</i>	NC_035335.1	<i>Thrixspermum japonicum</i>	NC_035831.1
<i>Dendrobium hercoglossum</i>	NC_035328.1	<i>Vanilla aphylla</i>	NC_035320.1
<i>Dendrobium huoshanense</i>	NC_028430.1	<i>Vanilla planifolia</i>	NC_026778.1
<i>Dendrobium jenkinsii</i>	NC_035337.1	<i>Sobralia aff. bouchei</i>	NC_028209.1
<i>Dendrobium lohohense</i>	NC_035338.1	<i>Phalaenopsis hybrid</i>	NC_025593.1
<i>Dendrobium moniliforme</i>	NC_035154.1	<i>Phalaenopsis aphrodite formosana</i>	NC_007499.1
<i>Dendrobium nobile</i>	NC_029456.1	<i>Oncidium hybrid</i>	NC_014056.1

图3 线粒体基因组和叶绿体基因组种间及属间遗传距离图。(a) *Apis*属内6个物种线粒体基因组上13个蛋白编码基因序列P-distance图; (b) *Apidae*科内20个物种线粒体基因组上13个蛋白编码基因序列P-distance图; (c) *Dendrobium*属内31个物种叶绿体基因组上67个蛋白编码基因序列P-distance图; (d) *Orchidaceae*科内84个物种叶绿体基因组上67个蛋白编码基因序列P-distance图。图a和b中, 橙色区域为*COI*条形码序列所在位置, 橙色虚线圆圈表示*COI*条形码序列P-distance中值; 图c和d中, 橙色区域为*matK*条形码序列所在位置, 紫色区域为*rbcL*条形码序列所在位置, 橙色虚线圆圈表示*matK*条形码序列P-distance中值, 紫色虚线圆圈表示*rbcL*条形码序列P-distance中值。

Fig. 3 The P-distance map among species and genera of the mitochondrial genomes and the chloroplast genomes. (a) The P-distance map of 13 protein-coding genes in the mitochondrial genomes among six species in *Apis*; (b) The P-distance map of 13 protein-coding genes in the mitochondrial genomes among 20 species in *Apidae*; (c) The P-distance map of 67 protein-coding genes in the chloroplast genomes among 31 species in *Dendrobium*; (d) The P-distance map of 67 protein-coding genes in the chloroplast genomes among 84 species in *Orchidaceae*. In panels a & b, the orange area is the location of the *COI* barcode, and the orange dotted circle represents the median value of the *COI* barcode's P-distance. In panels c & d, the orange area is the location of the *matK* barcode, the purple area is the location of the *rbcL* barcode, and the orange dotted circle represents the median value of the *matK* barcode's P-distance, the purple dotted circle represents the median value of the *rbcL* barcode's P-distance.

4.2 足量核酸的获取

基于PCR-free的宏基因组高通量测序方法的应用对DNA总量要求较高。根据我们的已有经验, DNA总量大于等于200 ng可以满足基于PCR-free方

法的高通量Illumina测序平台的建库要求。Pornon等(2016)从10,000粒不同花粉中提取所得DNA总量最多不超过6 ng, 而一只传粉昆虫体表所携带花粉总量一般小于这个数目。由此可见, 现有研究对一

只传粉昆虫体表所得混合花粉进行核酸提取所得DNA总量远远达不到宏基因组方法的建库要求。从微量组织中提取足量DNA是需要解决的一大技术难题。该难题期待从以下两方面着手解决: 一方面是优化混合花粉提取方案, 提高混合花粉的DNA提取效率; 另一方面是增加混合花粉总量, 如将同一时间、地点的同种传粉昆虫的多个个体的体表花粉进行混合或采取其他混合花粉来源(如携粉筐等)。

4.3 高效生物信息流程的创建

本文所提出的方法除数据库的完整性对结果准确性影响较大外, 其分析准确性和效率还与所使用组装、比对的生物信息学软件与流程相关(Gómez-Rodríguez et al, 2015)。目前, 该方法应用于传粉网络研究还处于探索阶段, 虽然已有研究(Zhou et al, 2013; Tang et al, 2015)成功开发出一套基于高通量Illumina测序平台的PCR-free的宏基因组研究物种多样性相对丰度的分析流程, 但这些研究主要是针对昆虫线粒体进行的优化, 所涉及的流程未必适用于植物多样性相对丰度的处理, 且针对植物叶绿体基因组的分析尚需进一步完善。针对不同的研究目标、研究对象及测序数据, 需要开发更适合、应用更广泛的生物信息学处理流程。

5 结语

高通量测序技术结合“超级条形码”的使用, 使传粉网络研究中传粉昆虫及植物的鉴定更为快捷准确, 而且此方法基于PCR-free的基础上更有望实现对粉源植物的相对定量分析。此方法主要具有以下优势: (1)相对于传统的形态学鉴定, 此方法省时省力, 研究成本不断降低, 且在一定程度上提高了物种分辨率, 解决了形态学上一部分物种难以鉴定的困难; (2)相比于传统DNA条形码技术, 此方法在宏条形码的基础上, 以“超级条形码”, 即线粒体基因组或叶绿体基因组作为物种比对的参考序列, 大幅提高了混合物种的鉴定灵敏度和分辨率; (3)此方法利用PCR-free的方法进行高通量测序, 可以解决由于PCR扩增造成的物种偏倚性导致的混合物种相对丰度难以分析的问题。虽然此方法应用还处于探索阶段, 面临一系列挑战, 但该方法在无脊椎动物中已得到验证, 有望为传粉昆虫及植物物种鉴定提供更快速、准确、有效的方法。

参考文献

- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: Review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters*, 9, 968–980.
- Arif IA, Khan HA, Al Sadoon M, Shobrak M (2011) Limited efficiency of universal mini-barcode primers for DNA amplification from desert reptiles, birds and mammals. *Genetics and Molecular Research*, 10, 3559–3564.
- Ashman TL, Knight TM, Steets JA, Amarasekare P, Burd M, Campbell DR, Dudash MR, Johnston MO, Mazer SJ, Mitchell RJ, Morgan MT, Wilson WG (2004) Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85, 2408–2421.
- Aziz AN, Sauve RJ (2008) Genetic mapping of *Echinacea purpurea* via individual pollen DNA fingerprinting. *Molecular Breeding*, 21, 227–232.
- Bagella S, Satta A, Floris I, Caria MC, Rossetti I, Podani J (2013) Effects of plant community composition and flowering phenology on honeybee foraging in Mediterranean silvo-pastoral systems. *Applied Vegetation Science*, 16, 689–697.
- Bambara SB (1991) Using pollen to identify honey. *American Bee Journal*, 131, 242–243.
- Bascompte J, Jordano P (2007) Plant–animal mutualistic networks: The architecture of biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 38, 567–593.
- Bell KL, Julie F, Kevin SB, Emily KD, David G, Brice L, Connor M, Berry JB (2017) Applying pollen DNA metabarcoding to the study of plant–pollinator interactions. *Applications in Plant Sciences*, 5, 1600124.
- Bell KL, Kevin SB, Kazufusa CO, Roman A, Berry JB (2016) Review and future prospects for DNA barcoding methods in forensic palynology. *Forensic Science International: Genetics*, 21, 110–116.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10, 189.
- Binladen J, Gilbert MT, Bollback JP, Panitz F, Bendixen C, Nielsen R, Willerslev E (2007) The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS ONE*, 2, e197.
- Bosch J, González AM, Rodrigo A, Navarro D (2009) Plant–pollinator networks: Adding the pollinator’s perspective. *Ecology Letters*, 12, 409–419.
- Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, Mattia DF, Casiraghi M, Labra M (2015) A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chemistry*, 170, 308–315.
- Cameron SA, Hines HM, Williams PH (2007) A comprehensive

- phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91, 161–188.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 12794–12797.
- Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, Shi LC, Zhu YJ, Ma XY, Gao T, Pang XH, Luo K, Li Y, Li XW, Jia XC, Lin YL, Leon C (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5, 1–8.
- China Plant BOL Group, Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, Chen ZD, Zhou SL, Chen SL, Yang JB, Fu CX, Zeng CX, Yan HF, Zhu YJ, Sun YS, Chen SY, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan GW (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, USA*, 108, 19641–19646.
- Coissac E, Hollingsworth PM, Lavergne S, Taberlet P (2016) From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 25, 1423–1428.
- Danforth BN, Cardinal S, Praz C, Almeida EA, Michez D (2013) The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology*, 58, 57–78.
- Escriche I, Kadar M, Juan-Borrás M, Domenech E (2011) Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International*, 44, 1504–1513.
- Fang Q, Huang SQ (2014) Progress in pollination ecology at the community level. *Chinese Science Bulletin*, 59, 449–458. (in Chinese with English abstract) [方强, 黄双全 (2014) 群落水平上传粉生态学的研究进展. *科学通报*, 59, 449–458.]
- Gómez-Rodríguez C, Crampton-Platt A, Timmermans MJTN, Baselga A, Vogler AP (2015) Validating the power of mitochondrial metagenomics for community ecology and phylogenetics of complex assemblages. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 883–894.
- Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer GAC, Baird DJ (2011) Environmental Barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring Applications Using River Benthos. *PLoS ONE*, 6, e17497.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 6, e19254.
- Hollingsworth PM, Li DZ, van der Bank M, Twyford AD (2016) Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150338.
- Holt KA, Bennett KD (2014) Principles and methods for automated palynology. *New Phytologist*, 203, 735–742.
- Janzen DH, Hallwachs W, Burns J, Solis MA, Woodley NE (2009) Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1–26.
- Kaiser-Bunbury CN, James M, Andrew EW, Terence V, Ronny G, Jens MO, Nico B (2017) Ecosystem restoration strengthens pollination network resilience and function. *Nature*, 542, 223–227.
- Keller A, Danner N, Grimmer G, Ankenbrand M, von der Ohe K, von der Ohe W, Rost S, Härtel S, Steffan-Dewenter I (2015) Evaluating multiplexed next-generation sequencing as a method in palynology for mixed pollen samples. *Plant Biology*, 17, 558–566.
- Khansari E, Zarre S, Alizadeh K, Attar F, Aghabeigi F, Salmaki Y (2012) Pollen morphology of *Campanula* (Campanulaceae) and allied genera in Iran with special focus on its systematic implication. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207, 203–211.
- King C, Ballantyne G, Willmer PG (2013) Why flower visitation is a poor proxy for pollination: Measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 811–818.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffandewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 303–313.
- Lahaye R, Savolainen V, Duthoit S, Maurin O, van der Bank M (2008) A test of *psbK-psbI* and *atpF-atpH* as potential plant DNA barcodes using the flora of the Kruger National Park as a model system (South Africa). <http://precedings.nature.com/documents/1896/version/1>.
- Li XW, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang YT, Chen SL (2015) Plant DNA barcoding: From gene to genome. *Biological Reviews*, 90, 157–166.
- Li YW, Zhou X, Feng G, Hu HY, Niu LM, Hebert PD, Huang DW (2010) *COI* and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). *Molecular Ecology Resources*, 10, 31–40.
- Liu SL, Li YY, Lu JL, Su X, Tang M, Zhang R, Zhou LL, Zhou CR, Yang Q, Ji YQ, Yu DW, Zhou X (2013) SOAP-Barcode: Revealing arthropod biodiversity through assembly of Illumina shotgun sequences of PCR amplicons. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 1142–1150.
- Liu SL, Wang X, Xie L, Tan MH, Li ZY, Su X, Zhang H, Miso B, Kjer KM, Tang M, Niehuis O, Jiang H, Zhou X (2016) Mitochondrial capture enriches mito-DNA 100 fold, enabling PCR-free mitogenomics biodiversity analysis. *Molecular Ecology Resources*, 16, 470.
- Liu SL, Yang CT, Zhou CR, Zhou X (2017) Filling reference

- gaps via assembling DNA barcodes using high-throughput sequencing—moving toward barcoding the world. *GigaScience*, 6, 1–8.
- Loreau M, Mazancourt CD (2013) Biodiversity and ecosystem stability: A synthesis of underlying mechanisms. *Ecology Letters*, 16, 106–115.
- Macher JN, Zizka VMA, Weigand AM, Leese F (2017) A simple centrifugation protocol for metagenomic studies increases mitochondrial DNA yield by two orders of magnitude. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 1071–1075.
- Matsuki Y, Isagi Y, Suyama Y (2007) The determination of multiple microsatellite genotypes and DNA sequences from a single pollen grain. *Molecular Ecology Notes*, 7, 194–198.
- Murray TE, Úna F, Brown MJF, Paxton RJ (2008) Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conservation Genetics*, 9, 653–666.
- Parks M, Cronn R, Liston A (2009) Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology*, 7, 84.
- Pecnikar ZF, Buzan EV (2014) 20 years since the introduction of DNA barcoding: From theory to application. *Journal of Applied Genetics*, 55, 43–52.
- Piñol J, Mir G, Gomez-Polo P, Agustí N (2015) Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 15, 819–830.
- Popic TJ, Wardle GM, Davila YC (2013) Flower-visitor networks only partially predict the function of pollen transport by bees. *Austral Ecology*, 38, 76–86.
- Pornon A, Escaravage N, Burrus M, Holota H, Khimoun A, Mariette J, Pellizzari C, Iribar A, Etienne R, Taberlet P, Vidal M, Winterton P, Zinger L, Andalo C (2016) Using metabarcoding to reveal and quantify plant–pollinator interactions. *Scientific Reports*, 6, 27282.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 345–353.
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ (2016) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540, 220–229.
- Rahl M (2008) Microscopic identification and purity determination of pollen grains. *Humana Press*, 138, 263–269.
- Raphaël C, Tony D, Alice V, Nicolas R, Jean-Claude R, Aurélie B, Taberlet P, Pont D (2016) Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS ONE*, 11, e0157366.
- Rasmont P, Coppée A, Michez D, Meulemeester TD (2008) An overview of the *Bombus terrestris* (L.1758) subspecies (Aymenoptera: Apidae). *Annales-Societe Entomologique de France*, 44, 243–250.
- Richardson RT, Lin CH, Quijia JO, Riusech NS, Goodell K, Johnson RM (2015a) Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach. *Applications in Plant Sciences*, 3, 1500043.
- Richardson RT, Lin CH, Sponsler DB, Quijia JO, Goodell K, Johnson RM (2015b) Application of ITS2 metabarcoding to determine the provenance of pollen collected by honey bees in an agroecosystem. *Applications in Plant Sciences*, 3, 1400066.
- Ricketts TH, Regetz J, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Bogdanski A, Gemmill-Herren B, Greenleaf SS, Klein AM, Mayfield MM, Morandin LA, Ochieng A, Potts SG, Viana BF (2008) Landscape effects on crop pollination services: Are there general patterns? *Ecology Letters*, 11, 499–515.
- Ruhsam M, Rai HS, Mathews S, Ross TG, Graham SW, Raubeson LA, Mei W, Thomas PI, Gardner MF, Ennos RA, Hollingsworth PM (2015) Does complete plastid genome sequencing improve species discrimination and phylogenetic resolution in *Araucaria*? *Molecular Ecology Resources*, 15, 1067–1078.
- Schmidt S, Schmid-Egger C, Moriniere J, Haszprunar G, Hebert PDN (2015) DNA barcoding largely supports 250 years of classical taxonomy: Identifications for Central European bees (Hymenoptera, Apoidea *partim*). *Molecular Ecology Resources*, 15, 985–1000.
- Sheffield CS, Hebert PDN, Kevan P, Packer L (2009) DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9, 196–207.
- Shi ZY, Yang CQ, Hao MD, Wang XY, Ward RD, Zhang AB (2018) FuzzyID2: A software package for large dataset species identification via barcoding and metabarcoding using Hidden Markov models and fuzzy set methods. *Molecular Ecology Resources*, 18, 666–675.
- Smart MD, Cornman RS, Iwanowicz DD, McDermott-Kubeczko M, Pettis JS, Spivak MS, Otto CRV (2017) A comparison of honey bee-collected pollen from working agricultural lands using light microscopy and its metabarcoding. *Environmental Entomology*, 46, 38–49.
- Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN (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, USA*, 103, 3657–3662.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21, 2045–2050.
- Tang M, Hardman CJ, Ji YQ, Meng GL, Liu SL, Tan MH, Yang SZ, Moss ED, Wang JX, Yang CX, Bruce C, Nevard

- T, Potts SG, Zhou X, Yu DW (2015) High-throughput monitoring of wild bee diversity and abundance via mitogenomics. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1034–1043.
- Tang M, Tan MH, Meng GL, Yang SZ, Su X, Liu SL, Song WH, Li YY, Wu Q, Zhang AB, Zhou X (2014) Multiplex sequencing of pooled mitochondrial genomes—a crucial step toward biodiversity analysis using mito-metagenomics. *Nucleic Acids Research*, 42, e166.
- Tang M, Yi TS, Wang X, Tan MH, Zhou X (2013) The application of metabarcoding technology in identification of plant species diversity. *Plant Diversity and Resources*, 35, 769–773. (in Chinese with English abstract) [唐敏, 伊廷双, 王欣, 谭美华, 周欣 (2013) Metabarcoding技术在植物鉴定和多样性研究中的应用. *植物分类与资源学报*, 35, 769–773.]
- Weiner CN, Werner M, Linsenmair KE, Blüthgen N (2014) Land-use impacts on plant–pollinator networks: Interaction strength and specialization predict pollinator declines. *Ecology*, 95, 466–474.
- Whitlock BA, Hale AM, Groff PA (2010) Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 5, e11533.
- Widmer A, Cozzolino S, Pellegrino G, Soliva M, Dafni A (2000) Molecular analysis of orchid pollinaria and pollinaria-remains found on insects. *Molecular Ecology*, 9, 1911–1914.
- Wilson EE, Sidhu CS, LeVan KE, Holway DA (2010) Pollen foraging behavior of solitary Hawaiian bees revealed through molecular pollen analysis. *Molecular Ecology*, 19, 4823–4829.
- Yamasaki YK, Nieman CC, Chang AN, Collier TC, Main BJ, Lee Y (2016) Improved tools for genomic DNA library construction of small insects. <https://f1000research.com/posters/5-211>.
- Yu DW, Ji YQ, Emerson BC, Wang XY, Ye CX, Yang CY, Ding ZL (2012) Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 613–623.
- Zhang AB, Hao MD, Yang CQ, Shi ZY (2017) BarcodingR: An integrated R package for species identification using DNA barcodes. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 627–634.
- Zhou X, Li YY, Liu SL, Yang Q, Su X, Zhou LL, Tang M, Fu RB, Li JG, Huang QF (2013) Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. *GigaScience*, 2, 4.

(责任编辑: 戈峰 责任编辑: 时意专)