

真菌 DNA 条形码技术研究进展

周均亮 赵瑞琳*

(西南林业大学 林学院 云南省森林灾害预警与控制重点实验室
云南省森林保护重点学科 云南 昆明 650224)

摘要: DNA 条形码(DNA barcoding)技术作为一门新兴的物种鉴定方法以其灵敏、精确、方便和客观的优势,在动植物和微生物的分类鉴定中已经得到广泛应用。真菌鉴定中常用作标准条形码的是核糖体 DNA 内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS),如今也有一些新型条形码被发现和应用到实际操作中,如微条形码、ND6、EF3。本文对 DNA 条形码技术的产生和发展做出了总结,通过研究其在真菌中应用的实际案例分析了 DNA 条形码技术的优缺点及发展趋势,并指出 DNA 条形码技术将以全新的视角来弥补传统分类学的不足,最终实现生物自身的序列变异信息与现有形态分类学的结合。

关键词: 真菌, DNA 条形码技术, CO I, ITS

Advances on DNA barcoding in fungi

ZHOU Jun-Liang ZHAO Rui-Lin*

(Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Key Subject of Forestry Protection in Yunnan Province, College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: As an emerging organism identification method, DNA barcoding has been widely used in plants, animals and microorganisms for its advantage of higher sensitivity, accuracy, and objectivity. Even the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) is used as a standard barcode in fungal identification frequently, nowadays, there are more and more new

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 31000013); 中科院“西部之光”人才培养计划项目; 云南省中青年科学技术带头人后备人才培养项目

*通讯作者: Tel: 86-871-3863145; 信箱: zhaoruilin@gmail.com

收稿日期: 2012-10-17; 接受日期: 2012-12-10

barcodes, such as the microcoding, ND6 and EF3. In this article we summarized the generation and developing history of DNA barcoding, also we present the advantage, shortcomings and the development trend based on fungal barcoding case studies. We indicated that DNA barcoding technique will be a good supplementary to the traditional morphology-based taxonomy, and towards a combination of natural evolutionary relationships and morphological taxonomy in fungi.

Keywords: Fungi, DNA barcoding, CO I, ITS

1735–1753年, 瑞典植物学家林奈陆续出版了《自然体系》、《植物种志》等著作, 建立了以生殖器官为分类依据的分类法, 由此创立了“双名法”, 开创了人类对生物系统命名的先河。此后的二百五十多年中, 真菌学家利用以形态比较学为基础的经典分类学方法, 发现并描述了大量新物种。但随着人们对更加精确和客观分类研究结果的要求增强, 传统的形态分类方法因为所需时间较长、精确度相对较差、依赖于繁殖结构的形态特征、而且常会因为操作人员能力所限或者认识偏差而得不同鉴定结果, 已不再满足今天人们对物种分类鉴定的要求。伴随着科学技术的发展, 尤其是PCR技术的出现, 生物化学、遗传学、分子生物学等学科得以迅速崛起, 许多新兴技术逐渐被应用于物种的分类鉴定中, 为生物的分类研究开辟了广阔的空间。DNA条形码技术正是在这种背景下应运而生, 并以其不受个体形态特征限制、不受个体发育阶段影响、客观准确区分物种、操作方法简便快捷等优点在生物的分类鉴定中得以广泛应用^[1]。

1 DNA 条形码技术简介

DNA条形码技术是指利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段(DNA barcode)自身在物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的生物身份识别系统, 它可以对物种进行快速的自动化鉴定^[2], 并能普遍为非专

业人士应用^[3]。通过该技术, 我们可以将一些不宜用形态鉴定方法做出结论的生物在任一发育阶段做出准确的鉴定^[4]。

1.1 DNA 条形码技术的产生及发展

1993年, Arnot等^[5]根据数字条形码在商品中的应用最先提出了DNA条形码的概念, 但是这篇文章在当时并未引起人们过多的关注。2002年, Tautz等^[6]提出以DNA序列为基础建立物种识别体系, 利用不同物种DNA序列间的差异进行物种的分类, 并将此与林奈的生物命名系统一一对应。随后的2003年无疑是DNA条形码史上重要的纪元, 这一年中, 加拿大Guelph大学的动物学家Herbert等^[2,7]在对鳞翅目昆虫进行研究中, 用线粒体细胞色素C氧化酶亚基 I (Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I)基因作为DNA条形码, 成功地将200种关系密切的昆虫区分开来。Herber不仅明确提出了DNA条形码的概念, 并将其应用于实际的物种鉴定中, 他还倡导将CO I 作为通用序列以建立起全球性的物种鉴别系统, 因此被称为“DNA条形码之父”。

2003年3月和9月, 20多位生物学专家在美国冷泉港召开了两次会议, 会上首次提出了国际生命条形码计划(iBOL, International Barcode of Life Project)^[8]。2004年, 由Alfred Sloan基金会赞助, 在美国华盛顿Smithsonian国家自然历史博物馆成立了“生命条形码联盟”(Consortium for the Barcode of Life, CBOL), 致力于发展鉴定生物物

种的全球标准^[9]。2004年秋,美国国家生物技术信息中心(NCBI)与生命条形码联盟签署合作协议,将物种条形码的标准DNA序列及其相关数据存档于GenBank中^[10]。到2011年4月,该数据库中已存储了大约2亿个序列^[11]。

1.2 DNA条形码技术的原理

DNA是由A、T、C、G 4种碱基组成的,因此, n 个碱基就可能有 4^n 个编码组合。但是由于自然选择的影响,某些基因位点上的碱基几乎不再变换,排列相对固定,这就导致了实际中的编码组合数比理论上要少很多。所以,长度仅为几十个碱基对(bp)的DNA片段就不能提供足够的编码信息。目前的DNA条形码分析都是基于几百个碱基长度的DNA序列进行的。为解决自然选择对条形码序列基因选取造成的不便,在选择片段进行研究时通常是选取蛋白编码基因进行研究,因为在蛋白编码基因中,由于密码子的简并性,其第三个位点的碱基通常不受自然选择的作用,是自由变化的^[12]。在长期的进化过程中,同一物种会积累下来一些特定的编码基因,不同物种间的基因差异也会表现出来,我们只要找到一个通用的DNA片段,以此为目标条形码,就可以通过对比此基因片段的差异性来判定物种之间的关系。

1.3 目标条形码的选取标准

在选取相应的目标DNA条形码时,应尽量使其具备以下5个特征^[8]:

(1) 必须是一段普遍存在于多数生物中的标准DNA区段;

(2) 目标DNA区段中应当包含足够的系统进化信息以定位物种在分类系统(科、属等)中的位置;

(3) 应该具有保守的引物设计区以便于通用引物的设计;

(4) 应该具有足够多的变异性来区分不同的物种;

(5) 目标DNA区段应该足够的短以便于DNA的扩增,尤其是对那些易降解DNA的扩增。

1.4 DNA条形码技术在应用中的优势

与传统的形态分类法相比,DNA条形码技术具有5大明显的优势,主要表现在:

首先,技术的简便性。不像传统鉴定方法那样耗时耗力,DNA条形码技术更为简便快捷,易于在大量物种中构建统一的DNA条形码数据库,以此为基础进行物种的鉴定。

其次,鉴定的客观准确性。不会因为鉴定人员对于物种表型特征相似性的影响而出现鉴定误差,DNA条形码技术可以客观地实现门、纲、目、科、属、种、亚种等不同分类水平上物种的鉴定,且具有高度的可重复性。例如DNA条形码技术可以帮助鉴定形态非常相似的物种,也可以解决亚种的地位^[13]。

第三,使用的方便性。研究者可以根据所测得的结果利用DNA条形码数据库中的数据方便地进行数据比对,准确的完成鉴定工作。

第四,鉴定的无限制性。DNA条形码技术在鉴定试验中不受生物体生长阶段的限制,仅需要生物体的一部分组织结构就可以得出准确的鉴定结果,利用DNA条形码鉴别物种可以不受发育阶段的影响。

最后,DNA条形码在研究生物进化和物种起源方面具有独特的优势。Tabrizi等^[14]以Ministeria vibrans为研究对象,测试了78种蛋白基因,证明了多细胞动物的起源和进化。

2 DNA条形码技术在真菌分类鉴定中的应用

2.1 真菌分类学的发展

Micheli P. A.是第一个培养并用显微镜观察真菌的人,他在1729年发表的《植物新属》中提出了真菌的隶属检索表,并命名了一些属,如

Aspergillus、*Clathrus*、*Geaster*、*Mucor*、*Polyporus* 和 *Tuber* 等, 至今仍被采用。所以, 1729 年应该是真菌学诞生年^[15]。林奈在提出双名法的同时, 也描述了 *Agaricus*、*Hydnum*、*Lycoperdon*、*Peziza* 等 10 个属, 被认为是现代真菌分类命名的起点^[15]。但是在随后的一百八十多年中真菌一直被置于植物界中, 分类研究也仅仅是停留在根据表型特征进行分类的层面上, 并无重大的突破。

自 1951 年之后的六十多年, 是现代真菌学迅速发展的阶段, 真菌分类研究也异常活跃, 并因众多新兴技术在分类方面的应用而取得了丰硕成果, 如最重要的成果之一就是根据真菌的细胞发育循环和异养吸收方式的特点, 将真菌从植物界中独立出来, 成立为菌物界^[15]。伴随着生物化学、分子生物学、遗传学和生物显微技术的快速发展, 真菌分类系统已由传统的基于形态特征的分类系统向以分子系统发育和演化为主轴的分类系统方向发展。同时, 人们对真菌的描述也更加的准确和丰富, 并且多伴有 rDNA 序列分析^[16]。

将分子技术应用于真菌分类学研究最早开始于 20 世纪 80 年代, 相继出现了限制性片段长度多态性(RFLP)、等位酶技术、核酸分子杂交技术、DNA 分子标记技术、随机扩增多态性(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)等多种分子技术^[17]。但是, 真正将真菌分类学带入高速发展阶段的标志是分析 PCR 扩增核糖体 RNA 基因(rDNA)技术的应用, 尤其是近年来对真菌 DNA 条形码技术的不断研究, 真菌分类学已呈现出日新月异的发展趋势。如今, 真菌分子系统学已经成为了一门成熟的学科, 多位点数据对象、广泛的分类取样和严格的分析技术已经为世人所公认^[18]。

2.2 真菌中标准条形码的选取

经过多年的发展, DNA 条形码技术在动物分类研究上已经相当成熟, CO I 已被动物学家选作

动物的条形码, 并在多种昆虫、鱼类和鸟类的研究获得了较好的结果^[19-23]。但是在真菌研究方面, 研究人员并没有达成共识, 在以不同的真菌作为研究对象进行研究时, 不同基因片段的区分效果也有很大的不同。

Min 等^[24]对子囊菌门、担子菌门和壶菌门中 31 种真菌的 CO I 基因进行了研究, 证明了长度大约 600 bp 的基因片段能够对真菌进行准确鉴定。同年, Seifert 等^[25]以 545 bp 的 CO I 基因为条形码对青霉属的 58 个物种和 12 个同系物种进行了鉴定, 并与 ITS 和 BenA (β -Tubulin sequences)做了对比, 结果发现, 虽然后两者在物种分析中的分辨率更高, 但是由于青霉属真菌的 CO I 基因中并不含有内含子, 所以以其为条形码进行鉴定时, DNA 的扩增和校对更为容易。

虽然在一些真菌中 CO I 基因可以应用于物种鉴定, 但是对于大多数陆生植物和真菌而言, 由于线粒体基因进化太慢, 以至于区分不同物种的精确度不足^[26]。并且, CO I 基因是线粒体基因中内含子含量最多的序列, 基因的扩增受到几个较大内含子的束缚^[27], 有时, CO I 基因中的内含子片段长度会超过 20 kb, 这就使我们难于扩增和获取 DNA 的通用序列^[28]。因此, CO I 基因并不适合作为真菌的标准条形码。

在随后的研究中, 人们将目光投向了 ITS 基因, 并且以多种真菌为对象证明了其在真菌分类中的优势。如 Chen 等^[29]以药用植物及其近缘物种(藻类和真菌)为样品, 对比了 7 种潜在的条形码基因(psbA-trnH, matK, rbcL, rpoC1, ycf5, ITS2 和 ITS); Dentinger 等^[30]以伞菌亚门中的蘑菇和相关类群为对象对比了 CO I 基因和 ITS; Schoch 等^[31]也以多种真菌为对象对比了 ITS、LSU 和 SSU 在真菌分类中的区分效果, 结果都证明 ITS 比其他基因片段有着更好的区分效果, 可以将不同真菌进行准确分类。

通常情况下我们将ITS1、5.8S和ITS2这3个区段合称为ITS序列。真菌ITS的长度一般维持在650–750 bp之间^[32]。研究发现, ITS中含有许多高度可变的无义序列, 这就造成其功能片段和识别序列与ITS的总长相比是很少的。也正是因为这些无义序列的存在, 使得ITS在进化过程中承受的自然选择压力非常小, 也就可以出现更多的变异, 在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性, 即使是亲缘关系非常接近的两个种, 在ITS序列上都表现出差异^[33]。nrDNA序列中的ITS1和ITS2是中度保守区域, 其保守性基本上表现为种内相对一致, 种间差异较为明显。这种特点使得ITS序列更适合用于真菌物种的分子鉴定以及属内物种间或种内差异较明显的菌群间的系统发育关系分析^[34]。

Bellemain等^[35]在研究不同ITS引物对扩增不同类群真菌所具有的误差时表明, 一些引物, 如ITS1-F、ITS1和ITS5, 在扩增担子菌时存在较为明显的误差; 而其他的引物, 如ITS2、ITS3和ITS4, 则在扩增子囊菌中存在较为明显的误差。

2.3 ITS序列在真菌DNA条形码中被广泛应用

1990年, White等^[36]首次为真菌设计出了通用引物对ITS1和ITS4, 可以对多种担子菌和子囊菌的细胞核核糖体RNA基因进行扩增, 此后, ITS序列分析技术在真菌分类鉴定中的应用越来越广泛。

近年来, 国内外专家学者对很多真菌种类进行了条形码测序的研究, 并取得了很多重要成果。利用DNA条形码技术可以有效解决部分真菌应用形态特征进行分类所引起的纷争, 弥补了传统分类上的一些不足。例如: Hibbett等^[37]用ITS对香菇属中亚洲和澳洲的样品进行了研究, 并与形态分类做了对比, 在一定程度上解决了香菇属传统分类上的难题; 以往的形态分类研究中人们认为分生孢子的长度和扩散色素的产量是树粉孢属(*Oidiodendron*)真菌分类的关键特征, 但是

Hambleton等^[38]用ITS对该属真菌做了研究, 证明了这种观点是错的; Desjardin等^[39–40]利用ITS和LSU序列分析分别对采自泰国中部和马来西亚的两种不同的真菌(*Spongiforma thailandica*和*Hydnangium echinulatum*)做了研究, 分子研究结果证明这两种形态极像腹菌的真菌却是两种新的牛肝菌; Zhao等^[41]对采自泰国北部小蘑菇属(*Micropsalliota*)和与其形态相似属的样品进行了ITS和LSU序列分析, 证明了该属与蘑菇科其它属在分子系统发育鉴定中具有区分价值的形态特征。

利用ITS序列的DNA条形码技术在对真菌物种快速鉴定上也有着广泛的应用, 例如: 黄学顺等^[42]对引起梔子树叶斑病的拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)真菌进行了ITS序列分析研究, 结果证明该病原菌属于*P. gracilis*; 宋瑞清等^[43]利用DNA条形码技术对采自不同地区的4个姬松茸样品进行ITS序列比较, 证明了4个样本与*A. brasiliensis* (AJ884651)和*A. blazei* (AF161013)相似率最高; Li等^[44]对采自华南地区的122个大红菌样品进行序列分析, 证明这种蘑菇与3个不同的家系联系较为紧密; Seena等^[45]对从葡萄牙不同溪流中搜集的94个水生丝孢菌隔离群进行ITS序列分析, 将这94个隔离群分到19个种。

2.4 真菌中新型条形码的应用

伴随着科学技术的不断发展, 加之人们对于经济节约、快速高效的要求, 实际应用中对于条形码的选取已不仅仅局限于常用的ITS片段, 一些新的条形码也在不断地应用于实际操作中。与通常所用的500 bp以上的基因片段不同, Summerbell等^[46]提出了微条形码的概念, 他用少于25 bp的片段, 快速鉴定出了大约100–200个物种。然而, 与Summerbell的研究方向相反, Stockinger等^[47]用不同长度片段对丛枝菌根菌进行序列对比时发现, 片段长度为1 500 bp (跨越

SSU、ITS区段和LSU)的时候,能够区分出所有的样品,但是,另外较短的片段,诸如全ITS区段、大约800 bp的LSU rDNA以及其它3个大约400 bp的片段,却不能区分亲缘关系较近的几个物种。正因真菌线粒体基因中内含子的存在,线粒体基因在用作条形码上有着诸多的缺陷,因此Santamaria等^[27]以子囊菌的线粒体基因为材料绘制了其线粒体基因的内含子图谱,以求找到一个不含内含子的特定区域来区分物种。他们的研究表明,这种特定区域的确是存在的,其中就包括了完整的NADH脱氢酶亚基6 (ND6)基因。Robert等^[48]和Lewis等^[49]也分别以不同的方式研究基因组中新的条形码序列,分别指出RPB2和EF1在真菌分类中可以作为条形码。

国内曾昭清等^[50]以丛赤壳科 13 个属中的 34 个种为材料,对比了 4 种蛋白编码基因(*Hsp90*、*AAC*、*CDC48* 和 *EF3*)。结果表明,*EF3* 基因的最大种内距离为 1.79%,最小种间距离为 3.19%,不存在种内、种间距离重叠,并具有较高的 PCR 扩增与测序成功率(96.3%),适合作为该科真菌的 DNA 条形码。

在分类研究中,由于不同真菌的基因差异较大,单一的条形码无法做到很好的区分所有的物种,在植物方面,已经有人开始用多基因片段组合的方式来进行分类,并取得了很好的效果。因此我们可以考虑运用不同基因片段的组合作为真菌的通用条形码,这样就可以弥补单个基因在分类中的不足。

3 DNA 条形码技术在应用中的局限

经历了十多年的发展,DNA条形码技术已经有了一定的规模,在物种分类鉴定中的优势也完美的表现出来,但是,它在真菌中的应用仍然处于起步阶段,在实际操作中有着诸多的局限性,主要表现在:

(1) 如何选取合适的基因标记序列作为DNA条形码的标记基因。条形码技术提出之始,生物学家是想找到一个普遍存在于所有生物中的通用序列,区分地球上所有的生物,但是这种设想就算在技术最为成熟的动物研究方面也没能达到。根据理想DNA条形码的选取标准,理论上说难以获得普遍适用于所有物种的标记基因,因此在鉴别不同的物种种类时,需要根据实际情况选择目标基因。

(2) 在研究的取样上尺度较大,对整个类群的研究不足,就算是同一种内的取样也不能做到全部取样,仅仅用几个代表属种来作为验证的标志,虽然表面上看来用选定的条形码能够很容易的将样品区分开来,但将验证范围扩大后,结果未必尽如人意。DNA条形码的应用主要集中在属内物种水平,因此只有针对具体类群进行探索研究,才可能为建立完整的条形码数据库起到积极有效的作用^[10]。

(3) 只使用DNA链中一段较小长度的碱基序列,来作为物种分类的唯一标志物,这种理念并没有得到所有人的支持,有些人在其能否解决关系非常近的物种问题方面存有怀疑。Sperling^[51]根据其对昆虫CO I 序列的研究数据认为至少有1/4的物种是不容易用DNA条形码技术来区分的。

(4) DNA条形码技术对物种的鉴定,重点在于种内和种间差异的限定,但种内和种间定义并不太明确,不同物种的变异范围并不一样,没有一个统一的标准界限。随着数据的增多,我们还不得不再去考虑一个阶元划分标准的问题,到底序列差异到何种程度是一个种间差别,到何种程度又分别是属间、科间差别^[12]。

此外,碱基的二次变异,线粒体DNA的修剪机制,以及近缘物种间的基因交流,同属物种间较低的差异也会给快速进化的物种和杂交新品种在鉴定上带来很多困难。

4 前景展望

在2000–2010年间,真菌界总共发表了1个新亚界、4个新门、7个新亚门、18个新纲、9个新亚纲、37个新目等高级分类单元,这是前所未有的^[52],但这也仅仅是揭开了真菌界的冰山一角。据估计,全球总共约有150万到350万种真菌^[53–54],然而直到2008年,全球被描述并命名的真菌种类约有97 861种,分属于8 283属、560科、140目、36纲^[55]。如此巨大的缺口,使得人们对于鉴定技术的要求极为迫切。DNA条形码技术的出现极大地简化了物种的鉴定工作,加快了物种鉴定的步伐。当然,也只有分子方法能够对于上百万未被描述的真菌进行鉴定,尤其是在它们的营养阶段^[47]。

当前DNA条形码技术的应用还主要停留在属和种的分类阶元上,在两个阶元上的应用也是较为成熟。由美国、英国、德国、中国等多个国家的学者^[18]已经联合开始着手对较高阶元的真菌分类进行了研究。但是总体来看,对科、目、纲和门等这些高的阶元上的研究还较少。所以,相信在今后的研究中,会有越来越多的研究者研究高级阶元上真菌的条形码。

就目前的研究而言,尽管要找到一段适合所有物种的标准条形码难度很大,但是通过几个条形码的组合来逐渐缩小鉴定范围,对物种进行自动鉴定是可行的。今后的科研将会着重偏向于条形码组合的应用,并且有可能会与网络工程技术相结合,开发出物种自动鉴定的系统,研制出小巧灵活的便携式检定装置来为科研服务。

在对具有相同或相似特性的不同真菌的研究方面,可以利用DNA条形码技术加以区分归类。例如,利用某一特殊条形码鉴定药用真菌、有毒真菌、可食用真菌等,从而方便地区分不同功能的真菌。

我国李艳春等^[56]利用DNA条形码技术对广义粉孢牛肝菌属的支系发生与演化做了研究。杜习慧等^[57]也利用DNA条形码技术研究了羊肚菌属真菌的分子系统学和生物地理学,并研究了其在中国的多样性分布中心。这些研究工作的进行显示了我国科研人员对DNA条形码技术的应用已不仅仅局限于对物种的分类鉴定,而是向着物种的起源、分布、进化等方向迈进。类似研究在今后必将大放异彩,为真菌学的研究开辟新的空间。

伴随着DNA条形码技术给物种分类鉴定带来的巨大变革,有学者开始认为这项新技术将会取代传统分类学^[58],但更多的人则认为它们之间不应该是取代与被取代的关系,而应该是相互并存,相互补充的,也就是说DNA条形码技术将以全新的视角来弥补传统分类学的不足^[59–60]。Herbert等^[61]在提出DNA条形码之后,也声明了不鼓励放弃传统分类方法,他更为推崇的是将传统分类学与条形码技术放在一起考虑。这实质上就是将条形码技术作为一种新的性状来构建分类系统,以此来实现生物自身的序列变异信息与现有形态分类学的结合^[62–63],加快对全球生物物种进行分类和鉴定的步伐^[19]。因此,我们应将DNA条形码技术与传统分类学方法相结合,弥补日渐萎缩的传统形态分类学。

致谢:感谢西南林业大学的高瑾同学、南开大学的于朋同学,以及泰国皇后大学的陈洁同学在论文写作与修改中提出宝贵意见。

参考文献

- [1] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417–425.
- [2] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings. Biological Sciences/The Royal

- Society, 2003, 270(1512): 313–321.
- [3] Frézal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects[J]. Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 2008, 8(5): 727–736.
- [4] Gilmore SR, Gräfenhan T, Louis-Seize G, et al. Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9 (Suppl s1): 90–98.
- [5] Arnot DE, Roper C, Bayoumi RA. Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1993, 61(1): 15–24.
- [6] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 2002, 418(6897): 479.
- [7] Hebert PD, Ratnasingham S, dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings. Biological Sciences/The Royal Society, 2003, 270 (Suppl 1): S96–S99.
- [8] 程佳月, 王丽华, 彭克美, 等. 国际生命条形码计划—DNA Barcoding[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(8): 49–53.
- [9] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1–12.
- [10] 焦明超, 赵大显, 欧阳珊, 等. DNA 条形码技术在生物分类学中的应用前景[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 886–890.
- [11] GenBank: GenBank overview[EB/OL][2013-01-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>.
- [12] 肖金花, 肖辉, 黄大卫. 生物分类学新动向—DNA 条形编码[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 852–855.
- [13] 孙瑶, 郝厚诚, 薛春迎, 等. 植物 DNA 条形码技术: 机遇与挑战[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2011, 20(2): 71–75.
- [14] Shalchian-Tabrizi K, Minge MA, Espelund M, et al. Multigene phylogeny of choanozoa and the origin of animals[J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2098.
- [15] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984: 17–18.
- [16] 贺运春. 真菌学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2008: 16.
- [17] 张建博, 桂明英, 刘蓓, 等. 分子生物学在大型真菌遗传多样性研究中的应用[J]. 中国食用菌, 2008, 27(6): 3–7.
- [18] Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi[J]. Mycological Research, 2007, 111(Pt 5): 509–547.
- [19] Smith MA, Fisher BL, Hebert PD. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1825–1834.
- [20] Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 968–971.
- [21] 齐兴柱, 骆剑, 刘志亮, 等. 基于 COI 序列的 DNA 条形码在中国南海裸胸鳝属鱼类中的应用[J]. 热带生物学报, 2010, 1(4): 321–326.
- [22] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemplak TS, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLoS Biology, 2004, 2(10): e312.
- [23] Yoo HS, Eah JY, Kim JS, et al. DNA barcoding Korean birds[J]. Molecules and Cells, 2006, 22(3): 323–327.
- [24] Min XJ, Hickey DA. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3): 365–373.
- [25] Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, et al. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(10): 323–327.

- 3901–3906.
- [26] Chase MW, Fay MF. Barcoding of plants and fungi [J]. *Science*, 2009, 325: 682–683.
- [27] Santamaria M, Vicario S, Pappadà G, et al. Towards barcode markers in Fungi: an intron map of Ascomycota mitochondria[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(Suppl 6): S15.
- [28] Xu JP. DNA Barcoding, fungal diversity and authentication of wild gourmet mushrooms [J]. *江西农业大学学报*, 2010, 32(5): 1010–1017.
- [29] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [30] Dentinger BT, Didukh MY, Moncalvo JM. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and Allies (Agaricomycotina)[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25081.
- [31] Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6241–6246.
- [32] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. *陕西农业科学*, 2004, 4: 35–37.
- [33] 郑雪松, 杨虹, 李道棠, 等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(6): 678–684.
- [34] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(13): 3785–3786, 3792.
- [35] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 189.
- [36] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. In *PCR-protocols: a guide to methods and applications*. Edited by: Innis MA, Gelfand DH, Sninski JJ, White TJ (eds). San Diego: Academic press, 1990: 315–322.
- [37] Hibbett DS, Nakai YF, Tsuneda A, et al. Phylogenetic diversity in Shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences[J]. *Mycologia*, 1995, 87(5): 618–638.
- [38] Hambleton S, Egger KN, Currah RS. The genus *Oidiodendron*: species delimitation and phylogenetic relationships based on nuclear ribosomal DNA analysis[J]. *Mycologia*, 1998, 90(5): 854–868.
- [39] Desjardin DE, Wilson AW, Durianella BM. A new gasteroid genus of boletes from Malaysia[J]. *Mycologia*, 2008, 100(6): 956–961.
- [40] Desjardin DE, Binder M, Roekring S, et al. *Spongiforma*, a new genus of gasteroid boletes from Thailand[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 37: 1–8.
- [41] Zhao RL, Desjardin DE, Soyong K, et al. A monograph of *Micropsalliota* in northern Thailand based on morphological and molecular data[J]. *Fungal Diversity*, 2010, 45(1): 33–79.
- [42] 黄学顺, 付艳平, 秦乐业, 等. 栀子叶斑病及其病原的鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(1): 21–25.
- [43] 宋瑞清, 余江勇, 冀瑞卿, 等. 4个姬松茸菌株 rDNA ITS 序列比较[J]. *林业科技*, 2007, 32(4): 23–27.
- [44] Li M, Liang J, Li Y, et al. Genetic diversity of Dahongjun, the commercially important “Big Red Mushroom” from southern China[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10684.
- [45] Seena S, Pascoal S, Marvanová L, et al. DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species[J]. *Fungal Diversity*, 2010, 44: 77–87.
- [46] Summerbell RC, Lévesque CA, Seifert KA, et al. Microcoding: the second step in DNA barcoding[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1897–1903.
- [47] Stockinger H, Krüger M, Schüßler A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytologist*, 2010, 187: 461–474.
- [48] Robert V, SzÖke S, Eberhardt U, et al. The quest

- for a general and reliable fungal DNA barcode[J]. *The Open Applied Informatics Journal*, 2011, 5(Suppl 1-M6): 45–61.
- [49] Lewis CT, Bilkhu S, Robert V, et al. Identification of fungal DNA barcode targets and PCR primers based on pfam protein families and taxonomic hierarchy[J]. *The Open Applied Informatics Journal*, 2011, 5 (Suppl 1-M5): 30–44.
- [50] 曾昭清, 赵鹏, 罗晶, 等. 从真菌全基因组中筛选丛赤壳科的 DNA 条形码[J]. *中国科学: 生命科学*, 2012, 42(1): 55–63.
- [51] Sperling F. DNA barcoding: deus ex machine[J]. *Newsletter of the Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods)*, 2003, 22(1): Opinion Page.
- [52] 杨祝良. 基因组学时代的菌物分类学: 挑战与机遇[C]//中国菌物学会第五届会员代表大会暨2011年学术年会论文摘要集, 2011: 27–28.
- [53] Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited[J]. *Mycological Research*, 2001, 105(12): 1422–1432.
- [54] O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5544–5550.
- [55] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, et al. *Dictionary of the fungi*, 10th edition[M]. Wallingford, UK: CABI, 2008.
- [56] 李艳春, 杨祝良. 广义粉孢牛肝菌属的支系发生与演化[C]//中国菌物学会第五届会员代表大会暨2011年学术年会论文摘要集, 2011: 17–18.
- [57] 杜习慧, 赵琪, 杨祝良. 羊肚菌属的分子系统学和生物地理学研究及其在中国的现代多样性分布中心[C]//2011年全国系统与进化植物学暨第十届青年学术研讨会论文集, 2011: 142.
- [58] Ebach MC, Holdrege C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy[J]. *Nature*, 2005, 434(7034): 697.
- [59] Hcj G. Towards taxonomy's "glorious revolution"[J]. *Nature*, 2002, 420: 461.
- [60] Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding a useful tool for taxonomists[J]. *Nature*, 2005, 435(7038): 17.
- [61] Hebert PD, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. *Systematic Biology*, 2005, 54(5): 852–859.
- [62] Vogler AP, Monaghan MT. Recent advances in DNA taxonomy[J]. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2007, 45(1): 1–10.
- [63] Hajibabaei M, Singer GA, Hebert PD, et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics[J]. *Trends in Genetics: TIG*, 2007, 23(4): 167–172.