

菌物 DNA 条形码技术的研究进展

刘淑艳 张傲 李玉

吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心, 长春 130118

摘要 DNA条形码技术是通过对一个DNA片段的分析比对,进而对物种进行鉴定的方法。研究的基因片段可以是1个或多个,进而完成物种识别和鉴定或者发现新物种。该项技术的优势在于整个鉴定过程不受研究对象不同发育阶段的影响。由于菌物具有独特而复杂的生活史,因此对菌物的鉴定工作相对较困难。世界上许多科学家都尝试过寻找适合于大多数菌物的标准DNA条码,但还没有找到能满足条件的基因片段。笔者对DNA条形码技术的发展历史、目的基因片段的筛选和研究进展等方面进行了综述,并讨论了DNA条形码技术存在的问题和今后研究的方向。

关键词 菌物; DNA条形码; 技术; 分子鉴定

中图分类号 Q 78; Q 949.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0121-06

DNA条形码技术(DNA barcoding)是通过对一个或多个相关基因进行大范围的扫描,进而识别和鉴定未知物种或者发现新物种的技术。DNA条形码的概念是由被誉为DNA条形码技术之父的加拿大生物学家Herbert在2003年首次提出的^[1]。目前,DNA条形码技术已经成为当今分类学和分子生物学研究的热点之一。

对于标准条形码的选择标准,多数学者认为应具有这样一些共同的特征:a.种间存在明显的遗传变异,但是变异又不可以太大;b.目的片段要足够短;c.所选片段应当便于提取、扩增和测序;d.应该具备较好的保守区域,为方便通用引物的设计。符合这些标准的DNA条形码将更加有利于分类学家进行物种鉴定,并大大推进鉴定速率,从而丰富已报道的物种资源和资料数据库^[2-5]。

1 发展历史与现状

2003年9月,20多位分类专家、分子生物学家和生物信息学家在美国冷泉港,召开了题为“Taxonomy, DNA and the Barcode of Life”的会议,对DNA条形码编码所有真核生物的科学性与社会利益进行了深入讨论。2004年,Alfred Sloan基金会在华盛顿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。2005年2月,由CBOL和英国自然历史博物馆主办的生命条形码协会第一次国际会议在伦敦召开,讨论决定为1000万物种建立条形码编码库。2007年9月在中国台湾召开的第二次和2009年11月在墨西哥召开的第三次国际DNA条形码会议上,与会学者都对理想条形码的选择给予了高度重视。这2次会议对在全球推进DNA条形码研究计划起到了重要推动作用。2011年4月17日至25日,在荷兰阿姆斯特丹举行了国际真菌DNA条形码工作会议。在这次会议上,参与到这一广泛国际合作的多国学者讨论了最新的研究进展,确定采用ITS序列作为真菌通用条形码,部分类群可引入补充条形码,并且向国际生命条码计划(International Barcode of Life Project, iBOL)组织提出正式申请。

国际生命条形码计划(iBOL)是一个全新的国际性科学计划,于2009年1月启动。该计划旨在建立条形码文库、序列文库和信息学工具,希望使DNA条形码技术成为全球生命科学体系的一部分。2008年10月14日,中加国际生命条形码计划会议在中国北京召开。同年10月20日,在中国科学院微生物研究所又召开了中国真菌DNA条形码系统

收稿日期: 2011-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970017和30300003)和教育部博士学科点专项科研基金项目(20102223120003)

刘淑艳, 博士研究生。研究方向: 菌物分子生物学。E-mail: liussyan@163.com

通讯作者: 李玉, 教授/院士。研究方向: 菌物学。E-mail: yuli966@126.com

建设研讨会,这是为所有真菌派发“身份证”的分类学革命会议,是继基因组计划后的又一个大型生命科学计划。这 2 次会议都对 DNA 条形码技术在中国菌物领域的应用和发展有着里程碑的意义。学者们一致认为,抓住时机开展菌物条码工作,将会对我国生物多样性检测与利用具有重要意义,在法医学、流行病学、医药、食品质量控制等社会经济领域都有广泛的应用前景。

2 研究进展

近年来科学家在多种生物的物种鉴定中广泛开展了 DNA 条形码技术的研究,并取得了可喜的进展。Herbert 等^[1]的研究发现,通过对线粒体基因 CO I (细胞色素 c 氧化酶第 I 亚基)的比对,能够在种级分类单位上将 200 种鳞翅目的近缘种成功地区分开。为了进一步探究 CO I 对物种的辨别能力,Herbert 等^[6]又将研究拓展到了整个动物界。其研究表明,应用 CO I 能够区分除刺胞动物门外的所有动物门。CO I 基因序列在这些动物门之间的差异能够很好地区分。此后,为了探讨 CO I 基因是否能够作为所有物种的 DAN 条形码标准基因,科学家们在许多生物类群中对其进行了测试,研究结果涵盖了鸟类^[7]、两栖爬行动物^[8]、鱼类^[9]、昆虫^[10-11]、陆生植物^[12-13]、藻类植物^[14]、病毒^[15]和细菌^[16]。与上述研究相比,菌物 DNA 条形码研究才刚刚起步,且有关研究主要集中在条码基因的筛选上。

2.1 菌物 DNA 条形码的选择

与动物的 DNA 条形码研究比较而言,关于菌物 DNA 条形码技术的研究进展是颇为缓慢的,目前仍处于寻找适合的目的基因片段并对其进行调试的阶段。人们最先将焦点放在对单一片段的筛选上,研究涉及了细胞色素 c 氧化酶第 I 和第 II 亚基 (CO I 和 CO II) 基因,核糖体基因中的 ITS 序列、大亚基、小亚基和小亚基基因操纵子片段,肌动蛋白、延长因子、核糖体聚合酶 B1 和 B2 基因和 β -微管蛋白等序列。

1) CO I 基因。尽管 CO I 已被公认可较好地作为动物的 DNA 条形码,但这段基因在菌物中的应用却出现了问题。在菌物中,CO I 基因的长度变化范围较大,较短的也有 1 584 bp,而长的片段可达 22 kb。这种长度上的变化是由其中所插入的内含子序列个数以及长短的不同造成的^[17]。由于这一

因素的存在,对 CO I 基因的研究结果可谓喜忧参半。Seifert 等^[18]在 2007 年利用针对青霉菌 (*Penicillium* spp.) 所设计的 CO I 通用引物,对青霉属的 370 多份样本进行了扩增,并得到了 540 bp 左右的 PCR 产物。经分析比对,该 DNA 片段能够很好地区分试验所涉及到的青霉属青霉亚属的 58 个种和 12 个近缘种,其区分效果在不同程度上都要优于 ITS 序列和 β -微管蛋白序列,而且 CO I 中内含子的检出率仅为 1%。Nguyen 和 Seifert^[19]在 2008 年以 CO I 为参考,发现了 *Leohumicola* 的 3 个新种,这不仅成为应用条形码发现菌物隐藏种和新种的试验依据,更为后人的进一步研究提供了详尽的理论指导。Martin 和 Tooley^[20]在 2003 年应用 CO I 和 CO II 基因,在系统发育方面对疫霉属 (*Phytophthora* spp.) 菌物进行了分析。他们坚信利用 CO I 和 CO II 基因相结合的分析方法,其结果往往比单一考虑 ITS 序列更加稳定可靠。但是,由于内含子的扰乱,CO I 基因在担子菌的鉴定中并不理想^[21]。另外,还有的研究表明,在镰孢菌属 (*Fusarium* spp.) 中应用 CO I 作为标准条码基因也是不可行的^[22]。

2) 核糖体基因。在解决菌物系统发育和分子鉴定等问题方面,核糖体基因是最早被应用的。White 等^[23]所设计的通用引物至今还在世界各地的实验室被使用,它们主要被用于扩增 3 种主要菌物核糖体基因: a. 大亚基 (LSU, 亦有被称为 28S 或 26S), 如今对 D1、D2 亚区的研究也逐渐深入; b. 小亚基 (SSU); c. 内转录间隔区 (ITS), 研究主要针对 ITS1 和 ITS2, 也有将 5.8S 保留下来一并研究的。其中,ITS 在菌物分子生物学研究领域的应用是最频繁,也是测得序列最多的片段 (表 1), 主要涉及系统学研究、系统发育和菌株鉴定等。多数学者也认为 ITS 是菌物条形码的最有潜力的候选片段。Kashimoto 等^[24]利用 ITS 序列,将在日本发现的番茄白粉病菌鉴定为 *Oidium neolycopersici*。刘淑艳等^[25]通过分析从病原菌中扩增出的 ITS 序列,将蝴蝶兰茎基腐病的病原菌鉴定为镰孢菌 (*Fusarium* spp.), 为今后对该病菌的诊断提供了分子依据。尽管如此,ITS 也无法避免其自身的缺陷,即种内差异过于明显,大多研究者对 ITS 的质疑也在于此。不仅如此,ITS 在不同类群中的变异度也是不统一的^[26]。Montero 等^[27]从试验所涉及的 133 份样品 (其中涵盖了 *Candida* spp., *Trichosporon* spp.,

Cryptococcus spp., *Malassezia* spp., *Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Blastoschizomyces* spp. 等)的 ITS 序列中得到了其扩增子,并应用焦磷酸测序技术(pyrosequencing technology)对其进行了分析。试验结果显示,应用焦磷酸测序技术能够对 *Candida* spp. 的样本在物种水平上进行鉴定,但是 *Trichosporon* spp. 和部分 *Cryptococcus* spp. 则不能用同样的方法对物种作出较为精确的鉴定。这一结果与之前 Nilsson 等^[28]在同年 5 月发表的试验结果相近。Nilsson 等^[28]有针对性地分析了在研究真菌分类时应用 ITS 序列总会出现的种内差异问题,并利用 ITS 数据库中近乎全部的资料进行了比对。但是,试验结果未能像预期的那样有一个明确的结论。由此可见,对 ITS 序列的研究不仅包含了对病原真菌的鉴定,也涉及了针对 ITS 序列本身的全面研究和测试。该序列的种内差异问题是否可以忽略,仍有待更进一步深入研究。

表 1 NCBI 中可检索到的菌物相关序列数目和平均长度(截止到 2011 年 8 月)

Table 1 Statistical data about the number and the average length of related fungal sequences which were available from NCBI(as of August 2011)

| 基因 Genes/ 序列 Sequences | 序列条数 No. of sequences | 平均长度/bp Average length |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 内转录间隔区 ITS | 510 410 | 570 |
| β -微管蛋白 Beta-tubulin | 23 253 | 430 |
| 延长因子 EF | 24 136 | 1 000 |
| 肌动蛋白 Actin | 10 443 | 1 100 |
| 核糖体大亚基 LSU | 5 943 | 800 |
| 核糖体小亚基 SSU | 3 651 | 480 |
| 细胞色素 c 氧化酶第 I 亚基 COI | 593 | 1 500 |

3)其他基因。相比之下,对其他基因的研究和报道均比较零散。所登录的基因序列也比 ITS 少很多(表 1)。其中包括刘淑艳等^[29]在中国首次将长尖团毛菌(*Trichia decipiens*)的小亚基序列扩增成功,为后续分子生物学研究提供了有价值的素材。Geiser 等^[30]研究认为,对于曲霉菌 *Aspergillus* 而言, β -微管蛋白和钙调蛋白基因可能会更适合作为该真菌的条码基因。另有部分研究表明,大亚基基因和 EF-1 α 对毛霉目真菌的辨认程度可以达到或接近种的水平^[31-33]。Fiore-Donno 等^[34]分别利用小亚基和延长因子基因,试图从分子角度来讨论腹黏菌亚纲内的系统发生关系,已取得了初步成果。Fiore-Donno 等^[35]又利用小亚基基因研究了黏菌纲

绒泡菌目与发网菌目的系统进化关系,并将讨论的焦点汇集在亮皮菌属(*Lamproderma*)和发菌属(*Comatricha*),分子数据显示这 2 个属都不是一个单系类群。而且,试验结果并没有像之前预料的那么好,在个别类群中 SSU 的灵敏度较低。在这 2 次试验以后,研究人员均反复强调了分子系统学研究将为解决困扰传统分类学许久的难题带来新的出路。

4)多基因片段分析。以上所涉及的内容主要集中在对单个片段的选拔和分析上。多片段联合分析的情况在植物 DNA 条形码的研究中进展较快^[36]。宁淑萍等^[4]对此做过详尽的调查和统计,但在真菌方面还鲜有报道。其研究中涵盖的基因片段较多的是 Helgason 等^[37]对 AM 真菌(arbuscular mycorrhizal fungi)的分子系统学研究。该试验对 AM 真菌的小亚基、肌动蛋白和延长因子 1- α 等基因片段进行了比较和分析,结果表明 AM 真菌在系统发育中与接合菌纲的被孢霉目(Mortierellales)亲缘关系较近。Fiore-Donno 等^[38]利用 18S rDNA 和 EF-1 α 序列,分析了腹黏菌亚纲(Myxogastria)、网柄黏菌亚纲(Dictyostelia)和原柄黏菌亚纲(Protostelia)之间的系统发育关系,系统进化分析结果显示,原柱黏菌亚纲很有可能是黏菌与阿米巴类的过度类群,而鹅绒菌(*Ceratiomyxa fruticulosa*)则是以腹黏菌亚纲姐妹群的形式出现的。Stockinger 等^[39]的研究表明,ITS 并不适合用于区分灌木菌根菌,尤其是在某些近缘种方面。通过筛选 SSU、ITS1、ITS2、LSU-D1、LSU-D2 等候选片段,Stockinger 等^[39]认为,1 段长度大约是 1 500 bp 的 SSU-ITS-LSU 组合片段最适合作为灌木菌根的标准 Barcoding 片段。

2.2 菌物 DNA 条形码的分析方法

DNA 条形码技术的关键不仅仅是候选片段的筛选,对目标片段的组合策略以及相应分析方法的选择同样重要。Markus 等^[40]在 2009 年通过群集算法对已知的 *Peronospora* 的 ITS 序列进行了分析和研究,其研究结果将经典分类学与分子生物学技术相结合,得到了一个可靠的关于 *Peronospora* 的分类系统。以此验证了群集算法在分析菌物 DNA 条形码数据时的重要作用。同年 Marlis 等^[41]运用 DNA 条形码微点阵与 PhyloChip(生物芯片)技术相结合的方法,解决了交叉杂交的问题。而一直以来,这个问题在研究外生菌根菌的群落关系时是无

法克服的。Santamaria 等^[42]在 2009 年 10 月自主改编了 BLAST (basic local alignment search tool) 比对程序对输入序列的识别方式,重新编写了 BLAST 识别系统。与此同时,他的团队有针对性地分析了子囊菌门真菌的线粒体基因中的全部内含子区域,并首次绘制了这些内含子区域的图谱。有了该图谱以后,无论研究对象的内含子有多么杂乱,都能够实现对特定基因区域的 BLAST 比对。为设计子囊菌门真菌的标准 DNA 条形码扫清了障碍。与菌物相关的 DNA 条形码技术的研究资料,大多只是记载了其分子生物学的的数据,而且在已公布的基因数据中又穿插了许多内含子,这就给分子系统学鉴定带来了很大的麻烦,从而使得菌物界标准条码的公布一拖再拖。

3 问题与展望

将地球上无数的生物区分开来,这对任何一位分类学家来说都是一个不敢奢望的目标。事实上,只有少数的分类学家能够精确地鉴定出预计存在的 1 000 万至 1 500 万个物种的 0.01%。照这样计算,要想认全所有物种,至少还需要一个由 15 000 位分类学家组成的团体^[9],而且,经典分类学自身也存在局限性: A. 不同的基因型共有同样表型,这使得通过形态学来进行分类研究变得非常困难,常常导致将不同基因类型,但是外表很相似的不同物种归为一个类群; B. 形态学所依据的大多数指标和特征通常只是被鉴定生物的一个特定的生长时期,许多处在不同发育期的个体并不易辨认; C. 即便是在分类学研究上有很高造诣的分类学家,有时也会做出一些误判; D. 形态分类有时会漏掉一些隐藏种。

在当今的菌物分类和鉴定中,非常需要一种高效的标准化分子生物学鉴定体系,来鉴定这些在人们身边无处不在且深深影响着人们的小生命体。DNA 条形码技术讲求以较短的标靶序列来完成对物种的精确鉴定。到目前为止,长度仅有 640 bp 左右的线粒体细胞色素 *c* 氧化酶 I (CO I) 作为标准条形码的通用性已经在动物界被证实^[12]。在植物界,CO I 的进化速率较动物慢,所以 CO I 的应用也仅限于一些藻类^[14]。对于植物条形码的探索,许多学者目前所采用的策略是利用多片段组合的方案^[43-44],而且生命条形码联盟(CBOL)最初建议了 6 个片段作为候选片段: *matK*、*rpoC1*、*rpoB*、*accD*、*nhdJ* 和 *YCF5*^[36],但至今在植物条形码上也没有

达成一个共识。虽然菌物线粒体 DNA 条形码技术的应用已经越来越广泛,但不幸的是又不得不面对一个切实存在的问题,即在菌物线粒体基因中充斥着的内含子,而且至今也未见学者对菌物 DNA 条形码的筛选方向,即采取单一的基因片段还是仿照植物采取多片段组合的方式给出明确的结论。虽然在 2011 年 4 月的荷兰会议上,确定采用 ITS 序列作为真菌通用条形码,对于部分类群可引入补充条形码。然而,在菌物中的不少类群,ITS 并不适用,例如在黏菌的分子生物及系统发育的研究中,SSU 和 EF-1a 序列的应用是最为广泛的^[29,34-35,39]。由此可见,对菌物 DNA 条形码的筛选和检测是非常有必要的。

中国地域广阔,地理环境和气候差异巨大,因此菌物资源非常丰富。这些生物资源不仅是系统发育特殊的珍贵研究材料,也是非常重要的生物资源。我国拥有生物多样性极高的菌物资源,完全可以根据已有的标本资源来补充采集新鲜样本,构建一个完整的包含物种标准基因序列、物种个体图片、采集地点经纬度、采集者、采集时间和分类地位等重要信息的菌物 DNA 条形码数据库。无论是从 DNA 条形码数据库的应用价值,还是从生命探索来看,这种标准数据库的建立将给科研工作和生物资源的保护与开发带来便利。

参 考 文 献

- [1] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 2003, 270: 96-99.
- [2] WITT J D S, THERLOFF D L, HEBERT P D N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation[J]. Molecular Ecology, 2006, 15: 3073-3082.
- [3] 彭居俐, 王绪桢, 何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 916-919.
- [4] 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.
- [5] STOECKLE M. Taxonomy, DNA, and the barcode of life[J]. Bioscience, 2003, 53(9): 2-3.
- [6] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 2003, 270: 313-321.
- [7] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAKE T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. Public Library of Science Biology, 2004, 2(10): 1657-1663.

- [8] VENCES M, THOMAS M, BONETT R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges[J]. Philosophical the Royal Transactions of Society B, 2005, 360: 1859-1868.
- [9] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical the Royal Transactions of Society B, 2005, 360: 1847-1857.
- [10] HEBERT P D N, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2004, 101: 14812-14817.
- [11] JANZEN D H, HAJIBABAEI M, BURNS J M. Wedding biodiversity inventory of a large and complex *Lepidoptera fauna* with DNA barcoding[J]. Philosophical the Royal Transactions of Society B, 2005, 360: 1835-1845.
- [12] CHASE M W, SALAMIN N, WILKINSON M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals[J]. Philosophical the Royal Transactions of Society B, 2005, 360: 1889-1895.
- [13] HOLLINGSWORTH P M, FORREST L L, SPOUGE J L, et al. A DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2009, 106 (31): 12794-12797.
- [14] SAUNDERS G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications[J]. Philosophical the Royal Transactions of Society B, 2005, 360: 1879-1888.
- [15] ALLANDER T, EMERSON S U, ENGLE R E, et al. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two *Bovine parvovirus* species [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98: 11609-11614.
- [16] HAMELS S, GALA J L, DUFOUR S, et al. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus* species, and methicillin resistance [J]. Biotechniques, 2001, 31: 1364-1372.
- [17] SHEIFERT K A. Progress towards DNA barcoding of fungi [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(suppl. 1): 83-89.
- [18] SEIFERT K A, SAMSON R A, DEWAARD J R, et al. Prospects for fungus identification using CO I DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104: 3901-3906.
- [19] NGUYEN H D T, SEIFERT K A. Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States[J]. Persoonia, 2008, 21: 57-69.
- [20] MARTIN F N, TOOLEY P W. Phylogenetic relationship among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrial encoded cytochrome oxidase I and II genes[J]. Mycologia, 2003, 95: 269-284.
- [21] VIALLE A, FEAU N, ALLAIRE M, et al. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for *Basidiomycota* [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(suppl. 1): 99-113.
- [22] GILMORE S R, GRAFENHAN T, LOUIS-SEIZE G, et al. Multiple copies of cytochrome oxidase I in species of the fungal genus *Fusarium* [J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(suppl. 1): 90-98.
- [23] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: PCR protocols a guide to methods and applications [M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [24] KASHIMOTO K, MATSUDA Y, MATSUTANI K, et al. Morphological and molecular characterization for a Japanese isolate of tomato powdery mildew *Oidium neolycopersici* and its host range [J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69: 176-185.
- [25] 刘淑艳, 龚利娟, 杨信东, 等. 首次测得蝴蝶兰基腐病菌 rDNA ITS 区序列 [J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(4): 386-387, 393.
- [26] SMITH M E, DOUHAN G W, RIZZO D M. Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus* woodland [J]. Mycorrhiza, 2007, 18: 15-22.
- [27] MONTERO C I, SHEA Y R, JONES P A, et al. Evaluation of pyrosequencing technology for the identification of clinically relevant non-dematiaceous yeasts and related species [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2008, 27(9): 821-830.
- [28] NILSSON R H, KRISTIANSOON E, RYBERG M, et al. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification [J]. Evolutionary Bioinformatics, 2008, 4: 193-201.
- [29] 刘淑艳, 李玉. 首次用 PCR 法扩得长尖团毛菌小亚基 rDNA 片段 [J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(3): 291-292.
- [30] GEISER D M, KLICH M A, FRISVAD J C, et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus* [J]. Studies in Mycology, 2007, 59: 1-10.
- [31] ABE A, ODA Y, ASANO K, et al. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2006, 70: 2387-2393.
- [32] ABE A, ODA Y, ASANO K, et al. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers [J]. Mycologia, 2007, 99: 714-722.
- [33] SCHWARZ P, BRETAGNE S, GANTIER J C, et al. Molecular identification of *Zygomycetes* from culture and experimentally infected tissues [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44: 340-349.
- [34] FIORE-DONNO A M, BERNEY C, PAWLOWSKI J, et al. Higher-order phylogeny of plasmodial slime molds (*Myxogastria*) based on elongation factor 1A and small subunit rRNA gene sequences [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2005,

- 52:201-210.
- [35] FIORE-DONNO A M, MEYER M, BALDAUF S L, et al. Evolution of dark-spored *Myxomycetes* (slime-molds): molecules versus morphology[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 46: 878-889.
- [36] 闫化学, 于杰. DNA 条形码技术在植物中的研究现状[J]. *植物学报*, 2010, 45(1): 102-108.
- [37] HELGASON T, WATSON I J, YOUNG J P W. Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences[J]. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2003, 229: 127-132.
- [38] FIORE-DONNO A M, NIKOLAEVB S I, NELSON D M, et al. Deep phylogeny and evolution of slime moulds (*Mycetozoa*) [J]. *Protist*, 2010, 161: 55-70.
- [39] STOCKINGER H, KRUGER M, SCHUBLER A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytologist*, 2010, 187: 461-474.
- [40] GOKER M, GARCIA-BLAZQUEZ G, VOGLMAYR H, et al. Molecular taxonomy of phytopathogenic fungi: a case study in *Peronospora* [J]. *Public Library of Science One*, 2009, 4(7): 6319.
- [41] REICH M, KOHLER A, MARTIN F, et al. Development and validation of an oligonucleotide microarray to characterise ectomycorrhizal fungal communities[J]. *BioMed Central Microbiology*, 2009, 9: 241.
- [42] SANTAMARIA M, VICARIO S, PAPPADA G, et al. Towards barcode markers in fungi: an intron map of *Ascomycota mitochondria* [J]. *BioMed Central Bioinformatics*, 2009, 10(suppl. 6): 15.
- [43] CHASE M W, COWAN R S, HOLLINGSWORTH P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants [J]. *Taxon*, 2007, 56: 295-299.
- [44] KRESS W J, ERICKSON D L. DNA barcodes: genes, genomics and bioinformatics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105: 2761-2762.

Advances in research on the fungal DNA barcoding technology

LIU Shu-yan ZHANG Ao LI Yu

Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract DNA barcode is a technology which utilizes a short standardized DNA fragment to provide rapid DNA-based identification of unknown life samples. Its advantage is that the entire identification process would not be troubled by different life stages of the specimen, especially in fungi. The fungal identification is usually difficult because of their complex life cycle. In literature more studies have been conducted to screen a powerful suitable gene which could be used as the standard DNA barcode for fungi. The current review introduces the history of DNA barcode, DNA fragment screening, and the significance of DNA barcode to fungal taxonomy in China.

Key words fungi; DNA barcode; technology; molecular identification

(责任编辑:陈红叶)