

刘娜,李梦臻. DNA 条形码技术在病原真菌分类鉴定中的应用[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):10-12.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.003

# DNA 条形码技术在病原真菌分类鉴定中的应用

刘娜,李梦臻

(河南工业大学,河南郑州 450001)

**摘要:**病原真菌是一种具有致病性的真菌,对植物有极大的危害。DNA 条形码技术是通过足够变异、短、能够作为标准目的基因的 DNA 序列进行分析,并进一步对未知物种进行快速、高效地分类和鉴定或者发现新物种的一项新技术。在介绍 DNA 条形码技术概况的基础上,对 DNA 条形码技术在病原真菌分类鉴定中的应用前景进行展望,以推进我国病原真菌 DNA 条形码在相关研究和应用领域的发展。

**关键词:**DNA 条形码;病原真菌;分类鉴定

**中图分类号:**Q949.32;S432.4<sup>+</sup>4

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2015)03-0010-03

真菌是自然界中一类庞大而广泛的生物类群,已确认 1 万余属 12 万余种<sup>[1-2]</sup>。病原真菌(Pathogenic fungi)是一种具有致病性的真菌,分布广泛,尤其在植物中普遍存在,70%~80%的植物病害均由病原真菌引起,对植物造成极大的危害,严重影响生态平衡<sup>[3]</sup>。病原真菌能使花草及农作物的质量受到较大程度损害,产量明显下降<sup>[4]</sup>。对物种进行正确的分类鉴定,识别每一个生物体的内部信息,如分类地位、生理生化指标和危害程度等,可以及时采取一定的措施阻止病原真菌危害<sup>[5]</sup>;因此,病原真菌分类鉴定具有重要意义。

## 1 病原真菌传统分类鉴定方法的不足之处

病原真菌的传统分类和鉴定主要以微观形态特征、生长

特性及生理生化指标为依据,对病原真菌进行形态学、生理及生化特征等分析,并对照已有的研究资料判断它所处的分类地位以及不同菌株之间的亲缘关系。采用传统分类方法进行病原真菌鉴定费时、耗力、复杂且繁乱<sup>[6]</sup>,其不足之处具体如下所示。

### 1.1 病菌形态简单,分类鉴定较为困难

病原真菌形态简单,有些菌株仅用形态观察进行分类鉴定很难,如尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)和串珠镰孢菌(*F. moniliforme*)的分生孢子都呈镰刀状,两端渐尖,菌落及显微形态特征相似,特别是有时培养物不典型或不产孢,仅用传统方法鉴定更加困难<sup>[7]</sup>。朱桂宁等对 25 个病害标样的 12 个炭疽病原菌株进行形态观察和生物学特征研究发现,炭疽病原菌结构比较单一,传统生物学特性及致病性基本一致,病原菌形态和生物学特征均无明显差异<sup>[8]</sup>。

### 1.2 病原真菌形态特征易受外界环境影响

病原真菌形态特征易受培养条件和其他因素影响,生长特性和生理生化指标不稳定<sup>[9]</sup>。如炭疽菌菌丝生长和产孢

收稿日期:2014-04-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300015);河南省科技厅基础与前沿项目(编号:132300410350)。

作者简介:刘娜(1978—),女,河南周口人,博士,副教授,主要从事真菌分子系统学研究。E-mail:liuna3456@163.com。

[23] Mao C H, Wang Q M, Huang R Q, et al. Synthesis and insecticidal evaluation of novel *N*-oxalyl derivatives of tebufenozide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(22): 6737-6741.

[24] Mao C H, Wang Q M, Huang R Q, et al. Synthesis and insecticidal evaluation of novel *N*-oxalyl derivatives of diacylhydrazines containing methylcarbamate moieties[J]. Heteroatom Chemistry, 2005, 16(6): 472-475.

[25] Shang J, Wang Q M, Huang R Q, et al. Synthesis, crystal structure and biological activity of aryl[(*N,N'*-diacyl-*N'*-tert-butylhydrazino)1thio]methylcarbamates[J]. Pest Management Science, 2005, 61(10): 997-1002.

[26] Shang J, Liu Y X, Huang R Q, et al. Synthesis and insecticidal evaluation of *N*-tert-butyl-*N'*-thio[*O*-(1-methylthioethylimino)-*N''*-methylcarbamate]-*N,N'*-diacyl-hydrazines[J]. Heteroatom Chemistry, 2007, 18(6): 631-636.

[27] Zhao Q Q, Shang J, Liu Y X, et al. Synthesis and insecticidal activities of novel *N*-sulfenyl-*N'*-tert-butyl-*N,N'*-diacyl-

hydrazines. 1. *N*-alkoxysulfenyl derivatives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(23): 9614-9619.

[28] Shang J, Sun R F, Li Y Q, et al. Synthesis and insecticidal evaluation of *N*-tert-butyl-*N'*-thio[1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-2-nitroiminoimidazolidine]-*N,N'*-diacylhydrazines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(3): 1834-1837.

[29] Toya T, Yamaguchi K, Endo Y. Cyclic dibenzoylhydrazines reproducing the conformation of ecdysone agonists, RH-5849[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10(4): 953-961.

[30] Wang Q M, Huang R Q. Synthesis and biological activity of novel *N*-tert-butyl-*N,N'*-substituted benzoylhydrazines containing 2-methyl-3-(triphenylgermyl)propoxycarbonyl[J]. Appl Organometal Chem, 2002, 16(10): 593-596.

[31] Mao C H, Wang K L, Wang Z W, et al. Synthesis and insecticidal evaluation of novel *N'*-tert-butyl-*N'*-substituted benzoyl-*N*-5-chloro-6-chromanecarbohydrazide derivatives[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 16(1): 488-494.

受温度、pH 值等生态条件和碳源、氮源等营养条件的影响较大<sup>[10]</sup>。

## 2 DNA 条形码技术概述及其在病原真菌分类鉴定中的应用

随着分子生物学技术和一些相关学科的飞速发展以及对 DNA 序列认识的不断增加,人们提出利用 DNA 条形码进行病原真菌分类鉴定的设想<sup>[11]</sup>。从遗传本质探索病原真菌的亲缘关系,以 DNA 条形码技术替代传统分类方法进行病原真菌鉴定,为病原真菌的分类鉴定构建了新前景<sup>[12]</sup>。

### 2.1 DNA 条形码技术简介

2003 年,Herbert 等提出 DNA 条形码概念<sup>[13]</sup>。生命 DNA 条形码协会对 DNA 条形码的定义是:DNA 条形码为一短段能够高效鉴定物种的 DNA 标准区域<sup>[14]</sup>。DNA 条形码技术通过对 2 个来自不同生物个体的较短同源 DNA 序列进行 PCR 扩增和测序,对序列进行多重比对和聚类分析,将该个体精确定位到一个已描述的分类群中<sup>[15]</sup>。DNA 条形码技术可准确地辨别形态分类难以区分的病原真菌,任何生长发育时期的任何形态均可使用该技术,是传统鉴定方法所不能比拟的<sup>[16]</sup>,且易于构建统一的 DNA 条形码数据库,可一次性快速鉴定大量样本或者发现新物种<sup>[17]</sup>,弥补了传统分类鉴定方法的不足,这为分类学研究提供了标准快速的物种鉴定方法,并逐渐成为病原真菌分类学领域进展最迅速的前沿学科<sup>[18]</sup>。

DNA 条形码需具备以下特征特性:(1)具有可以区分不同物种的足够变异性和系统进化信息<sup>[19]</sup>,同时种间存在明显的遗传变异,种间变异超过种内变异<sup>[20]</sup>;(2)在普遍的分类群中均存在,并且有利于 DNA 提取和 PCR 扩增;(3)具有高度保守的区域,便于设计通用引物<sup>[21]</sup>;(4)包含充分的系统进化信息,便于确认物种的系统地位<sup>[22-23]</sup>。

### 2.2 DNA 条形码技术在病原真菌分类鉴定中的应用

DNA 条形码技术利用病原真菌有足够变异、容易扩增、较短的标准 DNA 片段对物种进行分类鉴定<sup>[24]</sup>,其中,*COI* 和 ITS 等已被提出较适合作为备选片段<sup>[25]</sup>。

#### 2.2.1 *COI* 线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚基 I 在病原真菌中的应用

2003—2004 年,已有少量学者使用 *COI* 对真菌进行研究<sup>[26]</sup>。有研究发现,利用病原真菌 *COI* 一段长度为 648 bp(5 末端开始第 58 ~ 705 位)的基因片断,能够在 DNA 水平上成功地将物种进行分类<sup>[27]</sup>,这被认为是每种生物都具有的独一无二的 DNA 条形码编码理想区域<sup>[28]</sup>。*COI* 序列拥有更多的系统发育信号,更适合于分析亲缘关系密切的分类类群<sup>[29]</sup>。Seifert 等对青霉属(*Penicillium*)的 58 个物种 370 余份样本 *COI* 序列进行扩增,对 PCR 产物进行分析,发现了 4 个属,并认为 *COI* 序列适合作为青霉属分类鉴定的 DNA 条形码<sup>[5]</sup>。Nguyen 等利用菌物的 *COI* 序列进行研究,发现锤舌菌属(*Leohumicola*)的 3 个新种,*COI* 序列作为该类群有效的物种分类鉴定条码,可以发现菌物的隐藏种和新种<sup>[30]</sup>。Martin 对疫霉属(*Phytophthora* spp.)*COI* 和 *COII* 基因进行研究,发现,利用 *COI* 和 *COII* 基因相结合对物种进行分类鉴定,比单一考虑 ITS 序列更加稳定可靠<sup>[31]</sup>。

#### 2.2.2 ITS 核糖体转录间隔区在病原真菌分类鉴定中的应用

转录间隔区是位于 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间及 5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的区域片段<sup>[9]</sup>,是目前真菌物种分辨

率最高的单一 DNA 片段。该基因片段虽然较短,但人们可以从不太长的序列中获得足够的信息,有更高的 PCR 扩增成功率,进行测序和克隆也比较容易<sup>[32]</sup>。种内的不同菌株之间高度保守,但在种间变化极大,近缘的种属也能够通过 ITS 序列上的不同而加以鉴别。Landeweert 等认为,真菌通过 ITS 区域比对,序列相似性小于 95%,鉴别为同科;序列相似性大于 95% 且小于 99%,鉴别为同属;序列相似性大于 99%,鉴别为同种<sup>[33]</sup>。没有一种单一线粒体基因在病原真菌分类鉴定上比 ITS 基因更加合适<sup>[34]</sup>。

段维军等对轮枝菌的 ITS 片段进行研究,成功区分了所涉及的 10 个种,ITS 序列是轮枝菌理想的 DNA 条形码,能对物种或未知菌进行准确分类鉴定<sup>[35]</sup>。Bryn 等通过 ITS 序列对伞菌亚门(Agaricomycotina)进行研究,发现 ITS 基因比 *COI* 基因更适合作为该类群的 DNA 条形码<sup>[36]</sup>。Boyanton 等对 60 株念珠菌属(*Candida*)进行 ITS2 序列扩增,并进行菌种分类鉴定,检测出 8 种不同菌株,其结果与生化检测和形态学鉴定结果一致,且所用时间均比两者短<sup>[37]</sup>。Sert 等利用 ITS 序列和 18S rDNA 片段,对古代大理石纪念碑中的 250 个黑色真菌样品进行研究,发现其中有 99 种不同的真菌菌株,它们全都是子囊菌的新种<sup>[38]</sup>,利用 DNA 条形码技术对物种进行分类鉴定,不受物种生长时期的限制。Feau 等对 8 个不同的栅锈菌(*Melampsora*)物种的形态学特征和 DNA 条形码进行比较,纠正加拿大标本馆的错误定名,证明 *Melampsora aecidioides* 与栅锈菌属的其他 4 个种密切相关但不相同<sup>[39]</sup>。李依韦等应用 ITS 序列进行腐霉菌(*Pythium*)的分子鉴定及菌群之间的系统发育分析,从形态学角度对腐霉菌的分类起到了修正和补充的作用<sup>[40]</sup>。

## 3 展望

目前,病原真菌的分类鉴定方法多种多样。依据病原真菌的形态特征、生长特性以及生理生化指标进行分类鉴定的传统方法,由于受到许多客观因素影响,测定指标往往不稳定,给病原真菌的分类鉴定带来严峻挑战。随着分子生物学的飞速发展和不断成熟,一种高效的标准化分子生物学鉴定体系——DNA 条形码技术应运而生<sup>[41-42]</sup>。DNA 条形码技术为探测未知物种和识别病原菌提供了大量数据,成为阐明宿主寄生和共生关系的一种有效的工具<sup>[43]</sup>。需要说明的是,DNA 条形码技术也有一定的局限性,适用于所有物种的 DNA 条形码是基本不存在的,在对不同物种类群进行分类鉴别时需要用不同的目的基因<sup>[14]</sup>。DNA 条形码技术是传统鉴定方法强有力的补充,有着其他方法不可比拟的优势,已在病原真菌的研究中得到广泛应用,已经成为病原真菌分类鉴定的有力工具,解决了许多重要的生物问题,为国家经济和生态环境建设、生物多样性维护、生物安全保障、物种保护等科学领域开辟了一个新的方向<sup>[24]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 杨祝良. 基因组学时代的真菌分类学:机遇与挑战[J]. 菌物学报, 2013, 32(6): 931-946.
- [2] 吴绍熙, 郭宁如. 真菌的分子生物学[J]. 中国真菌学杂志, 2007, 2(4): 231-239, 242.

- [3]高山,王孟飞,胡平,等. 基于 ITS 序列对万寿菊叶斑病原菌的分子鉴定[J]. 湖北农业科学,2013,52(9):2074-2076.
- [4]李斌,盛鸥,李春雨,等. 香蕉枯萎病病原菌的研究进展[J]. 分子植物育种,2013,11(5):638-646.
- [5]Seifert K A, Samson R A, Dewaard J R, et al. Prospects for fungus identification using *COI* 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):3901-3906.
- [6]吴清平,黄龙花,杨小兵,等. 核酸序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(4):959-961.
- [7]郑雪芳,蓝江林,曹宜,等. 瓜类作物枯萎病病原菌的分类鉴定及其 ITS 序列差异性分析[J]. 中国农业科学,2008,41(12):4077-4084.
- [8]朱桂宁,蔡健和,胡春锦,等. 广西山药炭疽病病原菌的鉴定与 ITS 序列分析[J]. 植物病理学报,2007,37(6):572-577.
- [9]白树猛,田黎. ITS 序列分析在真菌分类鉴定和分子检测中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(1):52-53,189.
- [10]齐慧霞,李双民,余金咏,等. 八仙花炭疽病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 经济林研究,2008,26(3):84-87.
- [11]Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Biological Sciences, 2003, 270(1512):313-321.
- [12]李立平,罗玉萍,李思光. 真菌非编码 RNA[J]. 微生物学报,2013,53(8):790-797.
- [13]武宇鹏,丁亮,李捷,等. DNA 条形码的应用进展及讨论[J]. 环境昆虫学报,2011,33(1):99-106.
- [14]杨耀华. DNA 条形码技术的应用进展[J]. 中国医药指南,2013,11(17):484-485.
- [15]Gregory T R. DNA barcoding does not compete with taxonomy[J]. Nature, 2005, 434:1067.
- [16]Velmurugan S, Prasannakumar C, Manokaran S, et al. DNA barcodes for marine fungal identification and discovery[J]. Fungal Ecology, 2013, 6(5):408-418.
- [17]周均亮,赵瑞琳. 真菌 DNA 条形码技术研究进展[J]. 微生物学通报,2013,40(8):1468-1477.
- [18]马英,鲁亮. DNA 条形码技术[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2012,23(3):185-190,205.
- [19]Stoeckle M Y, Hebert P N. Bar code of Life; DNA tags help classify animals[J]. Scientific American, 2008, 299(4):82-88.
- [20]Schoch C L, Seifert K A, 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.
- [21]Eberhardt U. A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi[J]. New Phytologist, 2010, 187(2):266-268.
- [22]刘淑艳,张傲,李玉. 菌物 DNA 条形码技术的研究进展[J]. 华中农业大学学报,2012,31(1):121-126.
- [23]Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23):8369-8374.
- [24]陈士林,庞晓慧,罗焜,等. 生物资源的 DNA 条形码技术[J]. 生命科学, 2013, 25(5):459-466.
- [25]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.
- [26]Seifert K A. Progress towards DNA barcoding of fungi[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(1):83-89.
- [27]Min X J, Hickey D A. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3):365-373.
- [28]王颖,方绍庆,刘明杰,等. DNA 条形码技术在媒介蝇类分子鉴定中的应用[J]. 口岸卫生控制, 2013, 18(3):55-58.
- [29]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.
- [30]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.
- [31]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(2):269-284.
- [32]Li H C, Bouchara J P, Hsu M M, et al. Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(10):3160-3166.
- [33]Landeweert R, Leeflang P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1):327-333.
- [34]Vialle A, Feau N, Allaire M, et al. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(1):99-113.
- [35]段维军,张慧丽,郭立新,等. ITS 片段作为轮枝菌 DNA 条形码的评价研究[J]. 植物保护, 2013, 39(4):72-77, 89.
- [36]Bryn T M D, Maryna Y D, Jean-Marc M. Comparing *COI* and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina)[J]. Plos One, 2011, 6(9):e25081.
- [37]Boyanton B L, Luna R A, Fasciano L R, et al. DNA pyrosequencing based identification of pathogenic *Candida* species by using the internal transcribed spacer 2 region[J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2008, 132(4):667-674.
- [38]Sert H B, Sümbül H, Sterflinger K. Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey)[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2007, 91(3):217-227.
- [39]Feau N, Vialle A, Allaire M, et al. Fungal pathogen (mis-) identifications: a case study with DNA barcodes on *Melampsora* rusts of aspen and white poplar[J]. Mycological Research, 2009, 113(6/7):713-724.
- [40]李依韦,银玲. rDNA-ITS 序列分析在植物病原真菌分类鉴定中的应用[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版, 2012, 27(1):66-67.
- [41]陈亚辉,朱海军,生静雅,等. DNA 条形码序列对不同品种美国山核桃的鉴定[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6):1445-1450.
- [42]崔志伟,王康才,郑晖,等. DNA 条形码序列对不同品种金银花的鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8):43-45.
- [43]Frézal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2008, 8:727-736.