

大型经济真菌的 DNA 条形码研究——以我国剧毒鹅膏为例*

蔡 箐, 唐丽萍, 杨祝良**

(中国科学院昆明植物研究所生物多样性与生物地理学院重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 鹅膏属 (*Amanita*) 部分物种为重要食用真菌, 而另外部分物种则是剧毒的, 在我国及其他许多国家, 每年都有因误食剧毒鹅膏而导致中毒甚至死亡的事件发生。DNA 条形码是用一段或几段短的 DNA 序列来对物种进行快速、准确鉴定的方法。本研究选取三个候选片段, 即核糖体大亚基 (nLSU)、内转录间隔区 (ITS) 和翻译延长因子 $1-\alpha$ (*tef1-\alpha*), 使用真核生物通用引物, 测试我国已知的 7 种剧毒鹅膏及 2 种易混的可食鹅膏, 并将欧美分布的但与黄盖鹅膏 (*A. subjunquillea*) 亲缘关系密切的绿盖鹅膏 (*A. phalloides*) 纳入分析中。nLSU 的 PCR 扩增和测序成功率均为 100%, 但种内和种间遗传变异偶有重叠。ITS 的 PCR 扩增和测序成功率分别达到 100% 和 85.7%, 且具有高的种间变异和低的种内变异。*tef1-\alpha* 的 PCR 扩增和测序成功率分别达到 85.7% 和 100%, 种间和种内遗传分化均高于 ITS 和 nLSU。三个片段的物种分辨率均较高, 但与 nLSU 相比, ITS 和 *tef1-\alpha* 具有更为明显的 barcode gap。鉴于 ITS 可能会成为真菌界的通用条码, 故建议将 ITS 作为鹅膏属的核心条形码, *tef1-\alpha* 和 nLSU 作为该属的辅助条形码。

关键词: DNA 条形码; 食用野生蘑菇; 真菌; 毒蘑菇; 物种识别

中图分类号: Q 523, Q 949

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2012)06-614-09

DNA Barcoding of Economically Important Mushrooms: A Case Study on Lethal Amanitas from China

CAI Qing, TANG Li-Ping, YANG Zhu-Liang**

(Key Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: Some species of the genus *Amanita* are economically important gourmet mushrooms, while others cause dramatic poisonings or even deaths every year in China and in many other countries. A DNA barcode is a short segment or a combination of short segments of DNA sequences that can distinguish species rapidly and accurately. To establish a standard DNA barcode for poisonous species of *Amanita* in China, three candidate markers, the large subunit nuclear ribosomal RNA (nLSU), the internal transcribed spacer (ITS), and the translation elongation factor 1-alpha (*tef1-\alpha*) were tested using the eukaryotic general primers for their feasibility as barcodes to identify seven species of lethal fungi and two species of edible ones which can easily be confused with the lethal ones known from China. In addition, *A. phalloides*—a European and North American species closely related to one of the seven taxa, *A. subjunquillea* was also included. PCR amplification and sequencing success rate, intra- and inter-specific variation and rate of species identification were considered as main criteria for evaluation of the candidate DNA barcodes. Although the nLSU had high PCR and sequencing success rates (100% and 100% respectively), occasional overlapping occurred between the intra- and inter-specific variations. The PCR amplification and sequencing success rates of ITS were 100% and 85.7% respectively. ITS showed high sequence variation among species group and low

* 基金项目: 国家科技部科技基础工作专项项目; 国家高科技研究发展计划 (863 计划) (2012AA021801); 中国科学院大科学装置开放研究项目 (2009-LSF-GBOWS-01)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: fungi@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2012-11-05, 2012-11-09 接受发表

作者简介: 蔡 箐 (1986-) 女, 在读博士生, 主要从事大型经济真菌的多样性与分子进化研究。E-mail: caiqing223@yahoo.com.cn

variation within a given species. There was a relatively high PCR amplification and sequencing success rate for *tefl*- α (85.7% and 100% respectively), and its intra- and inter-specific variation was higher than that of ITS or nLSU. All three candidate markers showed high species resolution. ITS and *tefl*- α had a more clearly defined barcode gap than nLSU. Our study showed that the *tefl*- α and nLSU can be proposed as supplementary barcodes for the genus *Amanita*, while ITS can be used as a primary barcode marker considering that the ITS region may become a universal barcode marker for the fungal kingdom.

Key words: DNA barcoding; Edible wild mushrooms; Fungi; Poisonous mushrooms; Species recognition

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是一种基于 DNA 序列进行生物物种鉴定的技术, 即利用标准化的一个或几个 DNA 片段进行序列分析, 根据核苷酸序列差异, 实现快速和准确地鉴定物种 (Hebert 等, 2003a; Kress 和 Erickson, 2007; Hollingsworth, 2011; Schoch 等, 2012)。该技术已被用于物种的鉴定和新种的发现 (Hebert 等, 2004; Newmaster 等, 2008; Liu 等, 2011) 以及生物多样性评估和植物群落监测 (Lahaye 等, 2008; Valentini 等, 2009) 等领域。DNA 条形码具有以下优点: (1) 生物体各个发育阶段的组织块都可用于鉴定, 而不需要传统分类学要求的“典型标本”; (2) 不受生态环境引起的形态差异影响; (3) 不太多依赖分类学专家对专科专属长期积累的实践经验; (4) DNA 核苷酸序列易于数字化和构建数据库, 能提供明确的信息, 也便于网络化和大众化 (www.barcoding.si.edu/PDF/TenReasonsBarcoding.pdf)。

与动植物相比, 真菌的 DNA 条形码研究起步相对较晚 (Eason 等, 2004; Seifert 等, 2007; 王文婧等, 2009; 刘淑艳等, 2012)。筛选通用性高、序列质量好、物种分辨率高的 DNA 条形码候选片段是问题的关键, 已成为真菌条形码研究的首要任务之一。在真菌中, ITS 序列被广泛应用于系统发育研究中。基于真菌的特点和研究现状, Rossman (2007) 总结了 ITS 序列在真菌 DNA 条形码中应用的可能性, 并建议在真菌 DNA 条形码研究中采用多片段联合分析的方法, 以 ITS 进行初步鉴定, 再结合其他基因序列进行进一步的准确鉴定。Seifert (2009) 还对其它 DNA 片段作为条形码的可能性进行了探讨。最近, 多国研究人员合作, 对真菌各大类群 6 个 DNA 片段的综合分析发现, 在真菌中 COI 常含有大的内含子而不易扩增, 因此不宜作为候选片段; 与核糖体候选片段相比, 蛋白质编码区

(protein-coding gene regions) 虽常具有更高的鉴定准确率, 但由于 PCR 扩增和测序成功率较低, 难以成为真菌的通用条码, 而 ITS 适宜的真菌类群范围最广, 鉴定的准确率相对较高, 正式建议将 ITS 作为真菌的核心条形码, 而对于某个具体类群则可加用辅助条形码来鉴定物种 (Schoch 等, 2012), 但也有学者提出 ITS 有其一定的局限性 (Kiss, 2012)。

在国际上, 大型经济真菌的 DNA 条形码研究起步不久 (Mouhamadou 等, 2008; Xu, 2010; Dentinger 等, 2011; Du 等, 2012)。在我国, 真菌 DNA 条形码的研究刚刚开始 (Zhao 等, 2011; Zeng 等, 2012)。鹅膏属 (*Amanita* Pers.) 全球已描述且被承认的有近 500 种, 我国有 80 余个分类单元 (杨祝良, 2005; Zhang 等, 2010)。该属中既包括了一些著名的食用菌, 如红黄鹅膏 [*A. hemibapha* (Berk. & Broome) Sacc.], 黄棱鹅膏 (俗称“黄罗伞”) (*A. aff. javanica*)、大白鹅膏 (俗称“白罗伞”) (*A. aff. princeps*)、隐花青鹅膏 (俗称“草鸡枞”) [*A. manginiana* sensu W. F. Chiu], 袁氏鹅膏 (*A. yuaniana* Zhu L. Yang) 等, 也有一些剧毒的种类, 如黄盖鹅膏 (*A. subjunquillea* S. Imai)、致命鹅膏 (*A. exitialis* Zhu L. Yang & T. H. Li)、鳞柄鹅膏 (*A. virosa* Bertillon)、灰花纹鹅膏 [*A. fuliginea* Hongo], 绿盖鹅膏 [*A. phalloides* (Fr.) Link.] 等。世界各地每年都有因误食毒菌而中毒死亡的事件发生, 其中绝大部分是因误食剧毒鹅膏而引起的 (Bresinsky 和 Besl, 1985)。在我国, 因蘑菇中毒导致死亡的毒菌主要是鹅膏属剧毒种类, 如 2000 年 3 月在广州 9 人误食致命鹅膏, 其中 8 人死亡 (Yang 和 Li, 2001; 谭铭雄等, 2002)。开展该属 DNA 条形码的研究, 对于食用菌和剧毒菌的快速准确鉴定、预防和有的放矢地治疗毒菌中毒具有重要的现实意义。我国学者曾利用 ITS 序列鉴定鹅膏 (李海波等, 2007; 曹杰等, 2009), 但

对其中的剧毒鹅膏尚未开展过系统的研究。

本文选取三个候选片段,即核糖体大亚基(nLSU)、内转录间隔区(ITS)和翻译延长因子1- α (*tefl*- α),对我国已知的7种剧毒鹅膏及2种

易混的可食鹅膏(图1)进行研究,筛选合适的DNA条形码片段。为测试各片段的可靠性,我们也将与黄盖鹅膏有密切亲缘关系的、但分布于欧美的绿盖鹅膏(*A. phalloides*)纳入分析中。



图1 我国5种常见的剧毒鹅膏(A-D, F)及2种与之易混的可食鹅膏(E, G)

A. 淡粉色鹅膏; B. 鳞柄鹅膏; C. 灰花纹鹅膏; D. 裂皮鹅膏; E. 大白鹅膏; F. 黄盖鹅膏; G. 黄棱鹅膏

Fig. 1 Five common species of lethal *Amanitas* (A-D, F) and two easily confusable species of edible ones (E, G) in China
A. *Amanita pallidorosea*; B. *A. virosa*; C. *A. fuliginea*; D. *A. rimosa*; E. *A. aff. princeps*; F. *A. subjunquillea*; G. *A. aff. javanica*

1 材料和方法

1.1 研究材料

本研究共选取了鹅膏属 10 个种的 28 份标本, 除拟灰花纹鹅膏 (*A. fuligineoides*) 和绿盖鹅膏 (*A. phalloides*) 每种仅选取 1 份标本外, 剩余的 8 个种每种选取 3~4 份标本材料。凭证标本存放于中国科学院昆明植物研究所隐花植物标本馆 (HKAS) 和吉林农业大学菌物标本馆 (HMJAU)。标本鉴定主要依据杨祝良 (2005) 和 Zhang 等 (2010)。具体研究材料见下表 (表 1)。

1.2 样品 DNA 的提取、PCR 扩增和测序

总 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法 (Doyle 和 Doyle, 1987)。nLSU 片段的正向引物为 LROR, 反向引物为 LR5 (Vilgalys 和 Hester, 1990); ITS 正向引物为 ITS5, 反向引物为 ITS4 (White 等, 1990); *tef1- α* 的引物为

983F 和 1567R (Rehner, 2001)。

PCR 反应体系 25 μ L, 包括 10 \times 扩增缓冲液 (含 $MgCl_2$) 2.5 μ L, 1.5 μ L 牛血清蛋白 (Bovine Serum Albumin; BSA; 20 mg \cdot mL⁻¹), 2.5 μ L dNTP (200 Mm), 2 μ L 的引物 (5 μ M), TaqDNA 聚合酶 0.3 μ L (2.5 u \cdot μ L⁻¹), DNA 模板 0.5~1.5 μ L, 用 ddH₂O 定容至 25 μ L。nLSU 片段的扩增程序: 94 $^{\circ}$ C, 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 30 s (进行 35 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。ITS 和 *tef1- α* 的扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C, 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min (进行 35 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 扩增产物用多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司) 进行纯化。PCR 产物经纯化后直接送出测序, 测序仪为 ABI3730, 所用引物同扩增

表 1 研究鹅膏材料信息表

Table 1 Specimens of *Amanita* used in the analyses and their GenBank accession numbers

分类单元 Taxon	凭证标本 Voucher	GenBank 号码 GenBank accession		
		nLSU	ITS	<i>tef1-α</i>
致命鹅膏 <i>A. exitialis</i> ¹	HKAS75774	JX998052	JX998027	JX998001
致命鹅膏 <i>A. exitialis</i> ²	HKAS75775	JX998053	JX998026	JX998002
致命鹅膏 <i>A. exitialis</i> ³	HKAS75776	JX998051	JX998025	JX998003
灰花纹鹅膏 <i>A. fuliginea</i> ¹	HKAS75782	JX998049	JX998022	JX997996
灰花纹鹅膏 <i>A. fuliginea</i> ²	HKAS75780	JX998048	JX998023	JX997995
灰花纹鹅膏 <i>A. fuliginea</i> ³	HKAS75781	JX998050	JX998021	JX997994
拟灰花纹鹅膏 <i>A. fuligineoides</i>	HKAS52727	JX998047	JX998024	—
淡红鹅膏 <i>A. pallidorosea</i> ¹	HKAS75786	JX998054	JX998037	JX998011
淡红鹅膏 <i>A. pallidorosea</i> ²	HKAS75783	JX998055	JX998035	JX998010
淡红鹅膏 <i>A. pallidorosea</i> ³	HKAS75784	JX998056	JX998036	JX998009
绿盖鹅膏 <i>A. phalloides</i>	HKAS75773	JX998060	JX998031	JX998000
裂皮鹅膏 <i>A. rimosa</i> ¹	HKAS75779	JX998046	JX998020	JX998004
裂皮鹅膏 <i>A. rimosa</i> ²	HKAS75777	JX998044	JX998018	JX998005
裂皮鹅膏 <i>A. rimosa</i> ³	HKAS75778	JX998045	JX998019	JX998006
黄盖鹅膏 <i>A. subjunquillea</i> ¹	HKAS75770	JX998062	JX998034	JX997999
黄盖鹅膏 <i>A. subjunquillea</i> ²	HKAS75771	JX998063	JX998032	JX997997
黄盖鹅膏 <i>A. subjunquillea</i> ³	HKAS75772	JX998061	JX998033	JX997998
鳞柄鹅膏 <i>A. virosa</i> ¹	HKAS75790	JX998057	JX998028	—
鳞柄鹅膏 <i>A. virosa</i> ²	HKAS56694	JX998058	JX998030	JX998007
鳞柄鹅膏 <i>A. virosa</i> ³	HMJAU20396	JX998059	JX998029	JX998008
黄棱鹅膏 <i>A. aff. javanica</i> ¹	HKAS56957	JX998068	JX998039	JX998017
黄棱鹅膏 <i>A. aff. javanica</i> ²	HKAS56863	JX998071	JX998040	JX998014
黄棱鹅膏 <i>A. aff. javanica</i> ³	HKAS52668	JX998069	JX998038	JX998015
黄棱鹅膏 <i>A. aff. javanica</i> ⁴	HKAS53281	JX998070	JX998041	JX998016
大白鹅膏 <i>A. aff. princeps</i> ¹	HKAS59780	JX998064	KC006435	—
大白鹅膏 <i>A. aff. princeps</i> ²	HKAS59777	JX998066	KC006434	—
大白鹅膏 <i>A. aff. princeps</i> ³	HKAS75787	JX998065	JX998042	JX998012
大白鹅膏 <i>A. aff. princeps</i> ⁴	HKAS75788	JX998067	JX998043	JX998013

Herbarium acronyms: HKAS=Herbarium of Cryptogams, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences;

HMJAU=Herbarium of Mycology of Jilin Agricultural University

引物(测序由上海生工生物工程测序有限公司完成)。

对 PCR 产物直接测序失败的样品,通过克隆后进行测序。克隆的过程包括 LB 培养基的配制,感受态细胞的制备,链接(采用 Takara 公司的 pMD18-T 载体),大肠杆菌的转化,菌落 PCR 的克隆检测,菌液的培养和测序。本研究克隆所得的序列共四条,均为 ITS 序列,其它序列则为直接测序的结果。

1.3 数据分析

测序后所得峰图采用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 进行校对拼接,拼接后所得序列采用 MUSCLE ver. 3.8.3.1 (Edgar, 2004) 进行比对,并利用 BioEdit ver. 7.0.9 (Hall, 1999) 进行手工调整以保证对应碱基的同源性。

衡量 DNA 条形码的一个重要指标是 Barcoding gap 是否存在,即序列的种内变异要足够小而种间变异要足够大,从而在中间形成一个明显的间隙(Meyer 和 Paulay, 2005)。本文利用 MEGA (version 4.0) 软件,采用 Kimura-2-parameter distance (K2P) 模型计算各物种的种内、种间遗传距离。再利用 Microsoft Office Excel 构建能体现种间、种内遗传距离的分布柱形图。通过 Wilcoxon 秩和检验来检验各片段序列之间的变异性差异。

衡量 DNA 条形码的另一个重要指标是片段对物种的准确鉴定率,即物种分辨率。利用 MEGA 软件构建单个片段的邻接树(neighbor-joining, NJ),建树时采用 Kimura2-parameter 模型,所有对位排列结果中的空位(gaps)或缺失数据(missing data)作完全删除(complete deletion)处理,系统树的每个分支的支持率以自展法(bootstrap)进行检验,重复次数为 5 000 次(Tamura 等, 2007)。若每个种的所有个体都聚为一个单系分支则认为该物种鉴定正确(Hollingsworth 等, 2009)。

2 结果

2.1 PCR 扩增和测序成功率

本研究选取 nLSU、ITS 和 *tef1- α* 三个 DNA 候选片段进行扩增和测序,三个候选片段的长度为 538 ~ 834 bp,各片段 GC 含量不同,以 *tef1- α* 的 GC 含量最高,为 49.2%,具体情况见如表 2。

PCR 的扩增效率和测序成功率是评价 DNA 条形码序列的一个重要标准,各候选片段的 PCR 扩增效率,*tef1- α* 较低,为 85.7%,nLSU 和 ITS 片段均为 100%。测序成功率以 ITS 最低,为 85.7%,nLSU 和 *tef1- α* 均为 100%。综合 PCR 扩增效率和测序效率,以 nLSU 片段最优,均为 100%。

2.2 Barcode gap 的评估及种间和种内遗传差异的统计学检验

从三个片段种内和种间遗传变异的分布图可

以看出(表 3,图 2),虽 nLSU 片段在遗传距离 0.001 ~ 0.002 处有重叠,但仍表现出一定的 barcode gap,而 ITS 和 *tef1- α* 存在明显的 barcode gap。

表 2 条形码候选片段序列及扩增、测序效率信息表

Table 2 PCR amplification and sequencing success rate of DNA barcoding candidate segments

分项 item	候选片段 Candidate segment		
	nLSU	ITS	<i>tef1-α</i>
长度 Length/bp	834	594	538
GC 含量 GC content/%	48.2	41.9	49.2
PCR 扩增效率 PCR success/%	100	100	85.7
测序成功率 Sequencing success/%	100	85.7	100

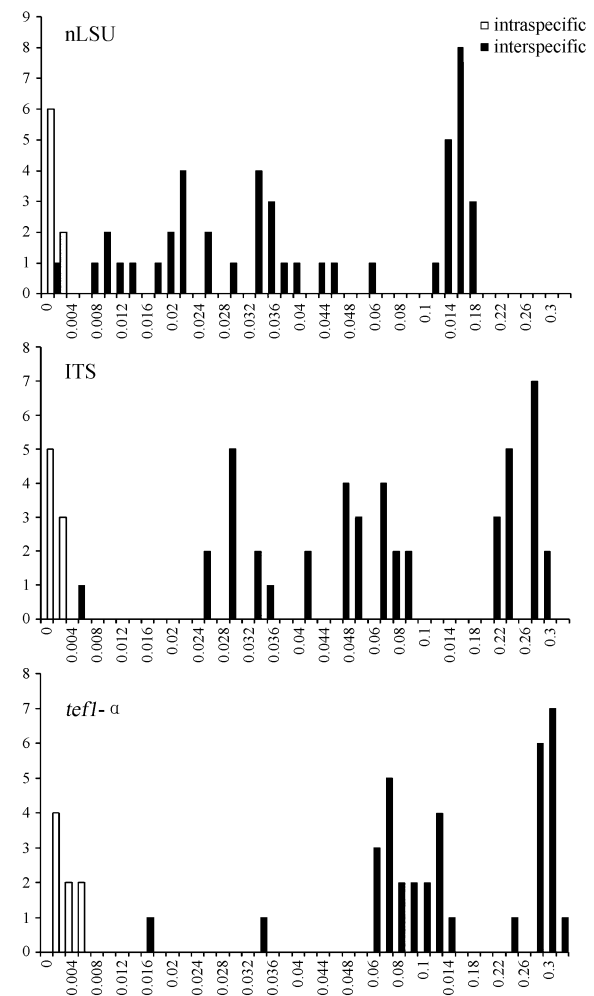


图 2 三个候选条形码片段的种内和种间遗传变异分布频率比较(x轴:遗传距离;y轴:分布频率)

Fig. 2 Comparisons of frequency distribution of intra- and inter-specific pairwise distances among three barcoding candidate segments (x-axis: pairwise distance; y-axis: frequency distribution)

利用 Wilcoxon 秩和检验对不同序列种内和种间的变异进行统计分析, 结果表明三个片段的种内变异率无明显差别 (表 4)。种间变异率则表现出一定的差异, 以 *tefl- α* 的种间变异最大, 而 nLSU 的种间变异最小, 即 *tefl- α* >ITS>nLSU (表 5)。

2.3 物种分辨率

在基于三个候选片段所构建的邻接树上, 本研究选取的样品均聚为 A、B、C 三大支。其中 B、C 两支为可食用鹅膏, 与 A 支所代表的剧毒鹅膏明显区分开。在分支 A 中, 各物种均以较高的支持率聚为单系分支。分布于欧美的绿盖鹅膏和东亚的黄盖鹅膏亲缘关系密切, 在三个片段分别构建的邻接树上均构成一单系分支并得到较高的支持, 二者互为姐妹群关系 (图 3, 4)。

3 讨论

3.1 DNA 条形码引物通用性与 barcode gap 的评价

DNA 条形码筛选的三个主要标准包括: 引物通用性高; DNA 序列的可读性好, 且具有较

高的序列质量; 物种分辨率高 (CBOL Plant Working Group, 2009), 而且 DNA 条形码长度合适, 在 300 ~ 800 bp 之间 (Kress 等, 2005)。本研究选取的三个候选序列, 序列长度为 538 ~ 834 bp, 满足 DNA 条形码的基本需要。在引物通用性方面, nLSU 片段的扩增及测序成功率最高, 均为 100%, ITS 的扩增效率虽然很高, 但测序成功率相比较低, 部分序列需要克隆测序获得, 可能是由于 ITS 在基因组中存在多个拷贝有关, 在种子植物中的一些属中也存在相似的情况 (Li 等, 2011)。*tefl- α* 为低拷贝的蛋白质编码基因片段, 可能在 PCR 扩增的过程中对总 DNA, 即标本质量的要求比较高, 所以扩增效率较其他两个片段低, 为 85.7%, 但测序成功率高达 100%, 具有较高的应用性。综合来看, 三个 DNA 条形码候选片段均具有较高的 PCR 扩增和测序成功率。

Barcode gap 也是评价 DNA 条形码的标准之一, 理想的条形码其种内的遗传变异应该小于种

表 3 候选条形码片段的种内和种间变异分析

Table 3 Intra- and inter-specific variation of DNA barcoding candidate segments

分项 Item	候选片段 Candidate segment		
	nLSU	ITS	<i>tefl-α</i>
种内变异 Intra-specific variation	0.0003 \pm 0.0007	0.0006 \pm 0.0008	0.0027 \pm 0.00243
种间变异 Inter-specific variation	0.0725 \pm 0.0614	0.1245 \pm 0.1037	0.1630 \pm 0.1012
种间最小变异 Minimum intra-specific variation	0.001	0.006	0.016
种内最大变异 Maximum inter-specific variation	0.002	0.002	0.006

表 4 种内遗传变异的 Wilcoxon 检验

Table 4 Wilcoxon test of pairwise intra-specific variation

W+	W-	种内变异相关性 Correlation of intra-specific variations	N 值 N value	P 值 P value	结果 Result
<i>tefl-α</i>	nLSU	W+ = 0, W- = 15	8	0.031	差异不显著 No significant difference
nLSU	ITS	W+ = 1.5, W- = 4.5	8	0.375	差异不显著 No significant difference
ITS	<i>tefl-α</i>	W+ = 0, W- = 15	8	0.31	差异不显著 No significant difference

表 5 种间遗传变异的 Wilcoxon 检验

Table 5 Wilcoxon test of pairwise inter-specific variation

W+	W-	种间变异相关性 Correlation of interspecific variations	N 值 N value	P 值 P value	结果 Result
<i>tefl-α</i>	nLSU	W+ = 666, W- = 0	36	$P \leq 0.001$	<i>tefl-α</i> >nLSU
<i>tefl-α</i>	ITS	W+ = 468, W- = 0	36	$P \leq 0.001$	<i>tefl-α</i> >ITS
ITS	nLSU	W+ = 999, W- = 10	45	$P \leq 0.001$	ITS>nLSU

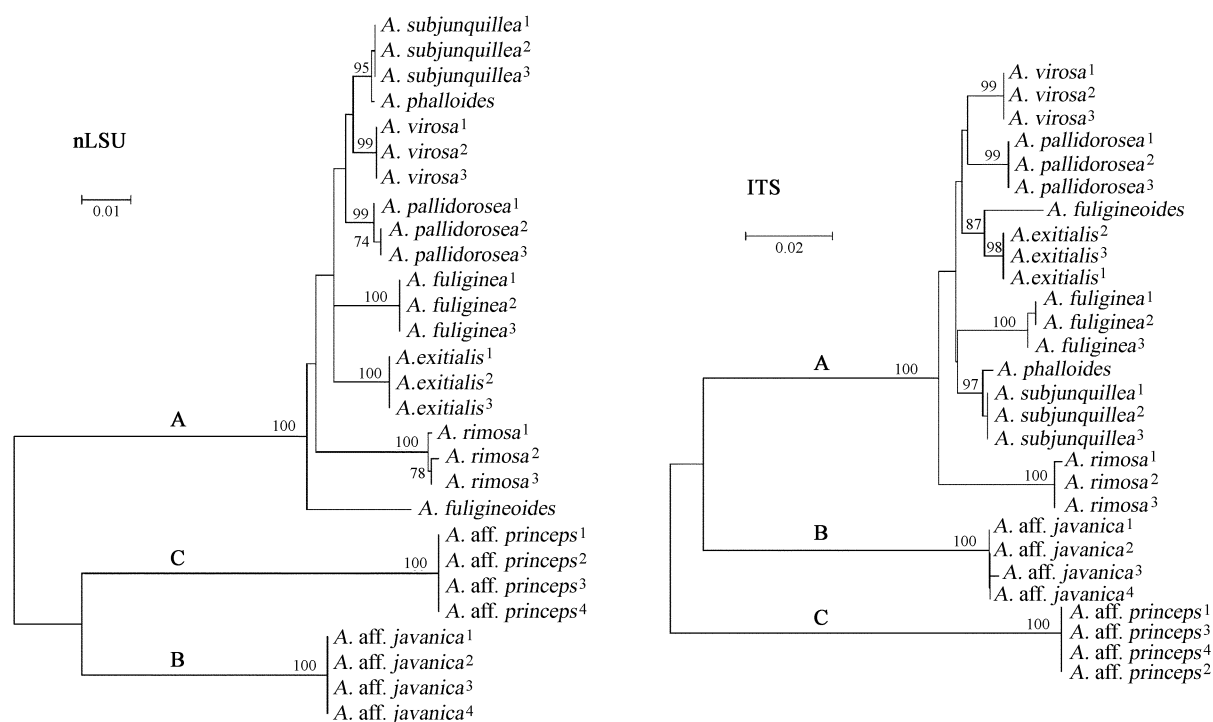


图 3 基于 nLSU 和 ITS 片段构建的邻接树, 分枝上的数值为靴带值
 Fig. 3 Neighbor-joining trees based on nLSU and ITS sequence data respectively.
 Bootstrap support values are indicated above the branches

间的遗传变异 (Meyer 和 Paulay, 2005)。在本研究中, 三个候选条形码片段种内和种间遗传距离分析表明, *tef1- α* 片段的种间遗传变异最大, 其次是 ITS, *tef1- α* 和 ITS 均存在明显的 barcode gap (图 2), 而 nLSU 的种内最大变异虽然超过了种间最小变异, 但仍表现出一定的 barcode gap。

3.2 物种分辨率的评价

基于三个候选片段所构建的邻接树, 均可以将可食用鹅膏 (分支 B 和 C) 和剧毒鹅膏 (分支 A) 明显分开 (图 3, 4), 因此, 三个 DNA 条形码候选片段均可以作为区分可食用鹅膏和剧毒鹅膏的 DNA 条形码。在物种鉴定方面, 每个物种所代表的个体均分别聚为单系分支, 且具有较高的内部支持率 (图 3, 4), 表明利用三个候选片段中的任何一个均能将本文所选取的鹅膏属所有物种成功分辨, 并表现出高的物种分辨能力。因此, 本文选用的三个 DNA 候选片段均可作为鹅膏属物种鉴定的 DNA 条形码。

综上所述表明, 在所选取的三个条形码候选片段中, *tef1- α* 扩增效率稍低、但测序成功率高, 存在明显的 barcode gap, 且物种鉴定率相对

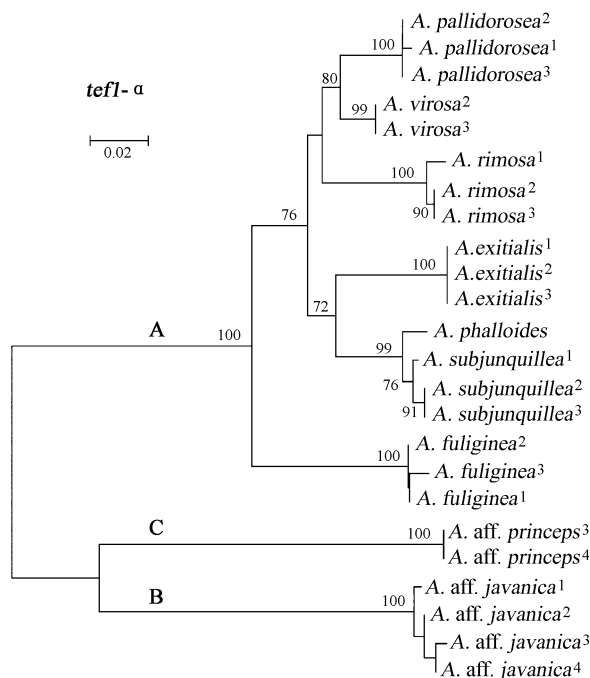


图 4 基于 *tef1- α* 片段所构建的邻接树, 分枝上的数值为靴带值
 Fig. 4 Neighbor-joining tree based on *tef1- α* sequence data.
 Bootstrap support values are indicated above the branches

较高, 为较优的 DNA 条形码候选片段。nLSU 的 PCR 扩增和测序效率均为 100%, 表现出了一定的 barcode gap, 物种鉴定率也相对较高, 可作为 DNA 条形码候选片段。但考虑到 ITS 可能会成为真菌界的通用条码 (Schoch 等, 2012), 也考虑到单一片段在很多情况下并不能区分近缘物种的实际情况 (Dupuis 等, 2012; Kiss, 2012), 故建议将 ITS 作为鹅膏属的核心条形码, *tef1- α* 和 nLSU 作为该属的辅助条形码。本研究对于解决鹅膏属食用菌和剧毒菌的快速准确鉴定、预防和有效治疗毒菌中毒具有很好的应用前景和较重要的现实意义。

此外, 作者还对 *rpb1*、*rpb2*、 *β -tubulin* 等基因片段进行了测试, 发现这些片段的 DNA 扩增和测序的成功率相对较低, 引物的通用性较差, 可能不宜作为鹅膏属的 DNA 条形码候选片段。

致谢 中山大学李方博士、海南医学院曾念开博士及中国科学院昆明植物研究所赵琪先生提供部分图片, 特此感谢。

[参 考 文 献]

- Bresinsky A, Besl H, 1985. *Giftpilze, mit einer Einführung in die Pilzbestimmung* [M]. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Cao J (曹杰), Zhang ZG (张志国), Liu D (刘弟) *et al.*, 2009. ITS sequence analysis of 8 *Amanita* species from Tibetan and Yunnan [J]. *Journal of Yunnan University, Natural Science Edition* (云南大学学报, 自然科学版), **31**: 90—96
- CBOL Plant Working Group, 2009. A DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: 12794—12797
- Dentinger BTM, Didukh MY, Moncalvo J-M, 2011. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina) [J]. *PLoS One*, **6**: e25081
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochemistry Bulletin*, **19**: 11—15
- Du XH, Zhao Q, Yang ZL *et al.*, 2012. How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*) [J]. *Mycologia*, **104** (6), doi: 10.3852/12-056
- Dupuis JR, Roe AD, Sperling FAH, 2012. Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough [J]. *Molecular Ecology*, **21**: 4422—4436
- Eason RG, Pourmand N, Tongprasit W *et al.*, 2004. Characterization of synthetic DNA barcodes in *Saccharomyces cerevisiae* gene-deletion strains [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 11046—11051
- Edgar RC, 2004. MUSCLE: a multiple sequences alignment method with reduced time and space complexity [J]. *BMC Bioinformatics*, **5**: 1—19
- Hall TA, 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95—98
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL *et al.*, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, **270**: 313—321
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS *et al.*, 2004. Identification of birds through DNA barcodes [J]. *PLoS Biology*, **2** (10): 1657—1663
- Hollingsworth ML, Clark AA, Forrest LL *et al.*, 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 439—457
- Hollingsworth PM, 2011. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 19451—19452
- Kiss L, 2012. Limits of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences as species barcodes for Fungi [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**: E1811
- Kress WJ, Erickson DL, 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, **2**: e508
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA *et al.*, 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 8369—8374
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D *et al.*, 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 2923—2928
- Li DZ, Gao LM, Li HT *et al.*, 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 19641—19646
- Li HB (李海波), Wu XQ (吴学谦), Wei HL (魏海龙) *et al.*, 2007. A primary studies on classification and identification of seven *Amanita* species based on morphological characteristics and ITS sequences of rDNA [J]. *Journal of Fungal Research (菌物研究)*, **5**: 14—19, 50
- Liu J, Möller M, Gao LM *et al.*, 2011. DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L.*, Taxaceae) and the dis-

- covery of cryptic species [J]. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 89—100
- Liu SY (刘淑艳), Zhang A (张傲), Li Y (李玉), 2012. Principle and procedure of fungal DNA barcoding [J]. *Journal of Fungal Research* (菌物研究), **10**: 205—209
- Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biology*, **3**: e422
- Mouhamadou B, Carriconde F, Gryta H *et al.*, 2008. Molecular evolution of mitochondrial ribosomal DNA in the fungal genus *Tricholoma*: barcoding implications [J]. *Fungal Genetics and Biology*, **45**: 1219—1226
- Newmaster SG, Fazekas AJ, Steeves RAD *et al.*, 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 480—490
- Rehner S, 2001. Primers for elongation factor 1- α (*tef1- α*). <http://www.afitol.org/pdfs/EF1primer.pdf>.
- Rossmann A, 2007. Report of the planning workshop for All Fungi DNA Barcoding [J]. *Supplement to Mycologia*, **58**: 1—5
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S *et al.*, 2012. 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*, **109**: 6241—6246
- Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR *et al.*, 2007. 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*, **104**: 3901—3906
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi [J]. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 83—89
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.*, 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596—1599
- Tang MZ (谭铭雄), Li KY (李宽银), Ma L (马林) *et al.*, 2002. Investigation of a case led to 8 persons death by mushroom poisoning [J]. *South China Journal of Preventive Medicine* (华南预防医学), **28** (2): 51—52
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, **24**: 110—117
- Vilgalys R, Hester M, 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species [J]. *Journal of Bacteriology*, **172**: 4238—4246
- Wang WJ (王文婧), Wang XL (王晓亮), Wang XC (王新存) *et al.*, 2009. Application of DNA barcoding in fungal research [J]. *Frontier Science* (前沿科学), **3**: 4—12
- White TJ, Bruns T, Lee S *et al.*, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies [A]. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* [M]. New York: Academic Press, 315—322
- Xu JP, 2010. DNA barcoding, fungal diversity, and authentication of wild gourmet mushrooms [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, **32**: 1010—1017
- Yang ZL (杨祝良), 2005. *Flora Fungorum Sinicorum*, Vol. 27, *Amanitaceae* [M]. Beijing: Science Press, 1—258
- Yang ZL, Li TH, 2001. Notes on three white *Amanita* of section *Phalloideae* (Amanitaceae) from China [J]. *Mycotaxon*, **78**: 439—448
- Zeng ZQ, Zhao P, Lou J *et al.*, 2012. Selection of a DNA barcode for Nectriaceae from fungal whole-genomes [J]. *Science China-Life Sciences*, **55**: 80—88
- Zhang P, Chen ZH, Xiao B *et al.*, 2010. Lethal amanitas of East Asia characterized by morphological and molecular data [J]. *Fungal Diversity*, **42**: 119—13
- Zhao P, Luo J, Zhuang WY *et al.*, 2011. DNA barcoding of the fungal genus *Neonectria* and the discovery of two new species [J]. *Science China-Life Sciences*, **54**: 664—674