

• 综述 •

Metabarcoding技术在真菌多样性研究中的应用

曹 云^{1,2} 沈文静² 陈 炼³ 胡飞龙² 周 蕾⁴ 徐海根^{2*}

1 (南京大学生命科学院, 南京 210093)

2 (环境保护部南京环境科学研究所国家环境保护生物安全重点实验室, 南京 210042)

3 (江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 南京 210013)

4 (南京林业大学林学院, 南京 210037)

摘要: 由于受到气候变化、土地利用变化及环境污染等诸多因素的干扰, 真菌多样性受到不容忽视的威胁, 亟需得到保护。构建物种数据库是实现真菌多样性研究和保护的重要前提。近年来兴起的DNA条形码及metabarcoding技术能够在很大程度上弥补传统鉴定方法的缺陷, 可对真菌物种进行大规模、准确、快速、高效地鉴定。本文梳理了metabarcoding技术在真菌物种多样性评估、真菌多样性影响机制和真菌古生态重建等研究中的应用, 同时强调了metabarcoding技术用于真菌多样性研究尚处于初期阶段, 在构建有效参照数据库、优化实验流程以及升级生物信息学工具等方面仍需要进一步的完善。建议加强真菌分类学家、生态学家以及计算机工具研发工程师之间的合作, 共同解决metabarcoding技术在真菌多样性研究及应用中面临的问题, 为宏观尺度上真菌多样性保护提供更加科学的依据。

关键词: metabarcoding; DNA条形码; 真菌多样性保护; 物种鉴定; 高通量测序

Application of metabarcoding technology in studies of fungal diversity

Yun Cao^{1,2}, Wenjing Shen², Lian Chen³, Feilong Hu², Lei Zhou⁴, Haigen Xu^{2*}

1 School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093

2 State Environmental Protection Key Laboratory of Biosafety, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042

3 College of Life Sciences, Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu Second Normal University, Nanjing 210013

4 College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037

Abstract: Fungal diversity is threatened by climate change, land-use change, and environmental pollution, and requires urgent conservation action. Construction of the fungal species database is an important prerequisite for the study and conservation of fungal diversity. Recently developed DNA barcoding and metabarcoding technologies can provide accurate, rapid, and highly efficient identification on a large scale, and to a large extent compensate for the defects of traditional identification methods. In this paper, we review the application of metabarcoding in fungal species diversity assessment, the study of mechanisms underlying fungal diversity, and the reconstruction of fungal palaeoecology. We emphasize that the application of metabarcoding technology in fungal diversity studies is still in the primary phase, and greater efforts are needed in the construction of reliable reference databases, the optimization of experimental procedures, and updates of bioinformatics tools. Hence, we suggest enhancing cooperation among fungal taxonomists, ecologists, and computer technicians. They should work together to address problems in fungal diversity studies via metabarcoding, which would provide more sound scientific evidence for fungal diversity conservation on a large scale.

Key words: metabarcoding; DNA barcoding; fungal diversity conservation; species identification; high-throughput sequencing

收稿日期: 2016-04-01; 接受日期: 2016-05-27

基金项目: 国家自然科学基金(31500455)、中国博士后面上基金(2015M571663)和环保公益性行业科研专项(201409061)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xhg@nies.org

真菌是真核生物中第二大类, 存在于地球上每一个角落, 构成了极为丰富的多样性。真菌在自然界扮演不同的角色, 如分解者、共生菌及病原菌等, 与其他生物类群形成密切联系。真菌能够驱动生态系统碳循环和能量流动, 促进植物对营养元素和水的吸收, 增强植物的抗逆性和提高其生产力, 对于维持生态系统平衡, 增进人类福祉起着重要作用(van der Heijden et al, 1998; Tedersoo et al, 2014)。由于受到气候变化、土地利用变化、环境污染、氮沉降、生境丧失及破碎化等诸多因素的干扰, 真菌多样性受到不容忽视的威胁, 其中部分真菌物种还没有被发现就已经从地球上消失(Arnolds, 2001; Turini & Giovannetti, 2012)。因此, 真菌多样性保护也是当前生物多样性保护的重要内容之一。

实施真菌多样性保护的重要任务包括构建物种数据库、评估多样性及认识影响机制等。根据Hawksworth (1991, 2001, 2012)的保守估计, 地球上真菌至少有150万种。随着热带真菌研究和大规模环境样品测序取得进展, 推算真菌数目可能会多达300万种。然而, 基于保守估计, 目前已经描述的真菌种数只占5%, 获得基因序列的物种数更少, 只占1% (Nilsson et al, 2009; Begerow et al, 2010)。全球、区域和局地尺度上真菌物种以及基因序列的基础数据缺乏, 且真菌多样性的影响机制尚不明确, 是真菌多样性保护的主要障碍(Krishnamurthy & Francis, 2012)。实现对真菌物种进行大规模、快速、准确地鉴定, 系统地获取物种信息是真菌多样性研究的重要前提。

绝大多数真菌物种形态微小, 肉眼难以识别, 缺乏有效的形态识别特征, 或者存在较大的表型可塑性, 或者存在隐种, 或者存在二型性(或多型性)生活史, 有时关键的形态特征只在其生活史某一段时期如孢子成熟期才表现出来。真菌这些固有的特点给传统的基于形态特征的鉴定带来了很大困难(Geiser et al, 1998; Slepecky & Starmer, 2009; Begerow et al, 2010)。此外, 真菌分类学家团队规模较小且分散在全球各地区(Chase & Fay, 2009), 很难在短时间内集中进行大规模真菌标本鉴定, 这就给顺利开展真菌多样性评估及相关研究造成了一定的障碍。

随着分子测序技术的发展, 近年来DNA条形码技术以及基于高通量测序的metabarcoding技术能

够在很大程度上弥补传统鉴定方法的缺陷, 基于具有可靠物种分类信息的DNA条形码数据库, 通过与其中参照序列进行比对, 可在短时间内实现对物种的大规模、准确、高效鉴定(Hebert et al, 2003; Ji et al, 2013)。本文将重点介绍DNA条形码及metabarcoding技术的提出及发展, metabarcoding技术在真菌物种多样性评估、真菌多样性影响机制和真菌古生态重建等研究中取得的进展, 及其在真菌多样性研究中面临的挑战。

1 真菌标准DNA条形码的提出和发展

DNA条形码技术是用基因组内一段标准化的DNA片段来鉴定生物物种的分子鉴定技术(Hebert et al, 2003)。Hebert等(2003)提出用线粒体细胞色素c氧化酶亚基I基因(cytochrome c oxidase I, COI)作为动物物种鉴定的通用DNA条形码序列; 生命条形码联盟植物工作组(CBOL Plant Working Group, 2009)推荐以叶绿体基因组的*rbcL*和*matK*片段作为植物鉴定的DNA条形码(Burgess et al, 2011)。生命条形码联盟真菌工作组(CBOL Fungal Working Group)根据Schoch等(2012)对真菌候选条形码的评估研究, 在第四届国际生命条形码大会上正式推荐核糖体DNA内转录间隔区基因(nuclear ribosomal internal transcribed spacer, ITS)为真菌首选DNA条形码。由于ITS序列在部分真菌类群中不能准确地鉴定多数物种, Stielow等(2015)通过对1,500种真菌样品的评估, 提出TEF-1 α 适合作为ITS之外的辅助DNA条形码。在真菌多样性评估的研究中, Schoch等(2012)建议适当地选择辅助DNA条形码, 系统地提高DNA条形码在真菌类群中的物种识别能力。

2 基于高通量测序的metabarcoding技术的应用

Metabarcoding的设计思路最初起源于环境微生物的研究。由于环境中不少微生物无法分离培养成功, 只能直接研究混合样品并通过高通量测序获取物种信息(刘莉扬等, 2013)。Metabarcoding技术使用通用引物对环境样品或者生物混合样品中生物总DNA的一段具有鉴定信息的基因片段(即DNA条形码)进行大规模扩增, 并采用高通量测序技术实现大规模快速测序, 得到可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs), 通过与具有可

靠物种分类信息的DNA条形码数据库中的参照序列进行比对,实现物种的鉴定,从而在短时间内快速获取混合样品中目标物种的信息(Ji et al, 2013)。与标准的DNA条形码技术仅能从单一样品中获取DNA信息相比,metabarcoding技术的优势在于能够直接从环境样品或生物混合样品中大批量地识别物种,更加省时、高效、低成本。目前,metabarcoding技术已应用到环境样品的研究中,使得大规模、快速、准确地鉴定物种成为可能,能够满足当前生物多样性快速评估的需求。近年来,metabarcoding技术在真菌的物种多样性评估、多样性影响机制及古生态重建等研究方向上已经取得显著的进展,并且在真菌多样性保护的应用上具有广阔的前景。

2.1 应用于真菌物种多样性评估

为了制定科学的保护策略,系统地开展真菌多样性保护,必须掌握总体区域及关键地区的真菌物种、数量及分布等信息,构建真菌多样性数据库(Halme et al, 2012)。传统的真菌鉴定方法包括形态学、解剖学、超微结构及化学物质等鉴定法(Brasier, 1996; Crous et al, 2007),存在耗时长、鉴定准确率不高等缺陷,很难满足在短时间内快速构建真菌物种名录的需求(Cannon, 1997; Begerow et al, 2010)。Metabarcoding技术能够在很大程度上弥补传统鉴定方法的缺陷。它依据可靠的DNA条形码数据库,通过与其中的参照序列比对后进行物种识别,能够检测到隐藏的真菌物种,获取更为完整的真菌物种信息(Ovaskainen et al, 2013)。目前,该技术已经应用到典型自然保护区或特定生境中各种真菌类群的多样性评估中,特别是在新物种的发现、稀有物种和特有物种的识别及红色物种名录的完善等方面取得了初步进展。

Geml等(2014)采用metabarcoding技术在西欧海岸沙丘代表性植被匍匐柳(*Salix repens*)群落中开展土壤真菌多样性评估,获取688,434条ITS2序列,包含1,211个OTUs,具有相当高的多样性,完善了荷兰真菌物种数据库信息,提供了新的分布数据;同时还监测到不少荷兰国家红色名录物种(如*Inocybe exilis*、*Pseudobaeospora pyrifera*、*Russula pascua*、*Scutellinia vitreola*),发现部分过去认为是稀有的真菌物种在该匍匐柳沙丘地中大量存在,为稀有物种名录特别是红色名录的更新提供了宝贵的补充数据。Ovaskainen等(2013)采用metabarcoding技术与真

菌子实体调查相结合的方法,对芬兰赫尔辛基北部挪威云杉(*Picea abies*)林中的木腐真菌多样性进行了评估,用metabarcoding技术检测到198种木腐菌种,其中还包含了不少红色名录物种,而通过子实体调查法仅检测到137种。Zhang和Yao (2015)采用metabarcoding技术首次评估了高纬度北极地区斯瓦尔巴群岛寄生于维管植物叶部和茎部的内生真菌的多样性,获得了250个OTUs,其中190个属于子囊菌门,50个属于担子菌门,1个属于壶菌门,9个属于未知真菌,识别了31种已知内生真菌,其中绝大多数是首次在北极维管植物的叶部和茎部发现,另外也检测到不少内生真菌属于未知物种,很可能是新种及该区域的特有种。与采用菌株培养方法评估南极洲(Rosa et al, 2010)和我国白马雪山(Li et al, 2012)维管植物的内生真菌多样性相比,metabarcoding技术能够监测到更多的稀有物种,有助于掌握更加全面的真菌物种信息(Zhang & Yao, 2015)。

2.2 应用于真菌多样性影响机制研究

气候变化和土地利用变化是威胁生物多样性的关键因素,在过去短短几十年的时间内导致了大规模的生境丧失和物种灭绝(Jetz et al, 2007)。近年来,学者们在宏观尺度上系统地研究了气候变化和土地利用变化对哺乳动物、鸟类、两栖爬行动物和植物等的影响,揭示了陆地生物多样性变化的内在规律(Thuiller et al, 2005, 2006; Jetz et al, 2007; Fofopoulos et al, 2011)。但是由于很难大范围获取真菌物种及其分布数据,因而难以全面系统地研究气候及土地利用变化对真菌多样性的影响。Metabarcoding技术对真菌物种的鉴定更加准确、高效,对真菌群落变化的监测更加敏感,促进了气候及土地利用变化对真菌多样性影响机制的研究。例如,采用metabarcoding技术,Tedersoo等(2014)获取了全球365个样地土壤样品的真菌ITS序列,发现气候因子对土壤真菌的物种丰富度和群落组成的影响最大,并直接或间接通过土壤和植物等因素的变化来影响土壤真菌多样性。Newsham等(2015)在南半球气候变暖速度最快的南极海洋气候区的研究发现,空气温度是影响该地区土壤真菌多样性的最显著和稳定的气候因子,并预测到本世纪末,气候变暖将引起该地区真菌物种数增加20–27%,随之对生物生产力也造成影响。Cordier等(2012)在法国比利牛斯山以1,000 m海拔为梯度调查了欧洲山毛

榉(*Fagus sylvatica*)叶际真菌群落组成的变化,发现温度对于真菌多样性格局的形成起着重要作用,气候变暖改变了叶际真菌物种的发生率和多度。

此外,metabarcoding技术也用于研究土地利用变化对真菌多样性的影响。例如,基于metabarcoding技术,Mueller等(2014)评估了巴西热带雨林地区的原始林、次生林及牧场等3种不同土地利用类型的生境中土壤真菌及植物的群落组成,发现土地利用变化对真菌群落组成具有显著的影响。森林采伐对真菌群落的影响很大程度上因为植物群落的改变而缓解。真菌群落组成与植物群落组成具有更大的关联性,这一结论可为热带森林中地上及地下群落的联合管理提供依据,并促进生态退化区生态系统功能的恢复。Cui等(2016)在我国江苏东台近50年来开垦频繁的滨海盐碱地研究了土壤丛枝菌根真菌群落对土地开垦及植物演替的响应,显示在过去30年中,丛枝菌根真菌的群落结构发生了明显的变化,各类多样性指数下降,揭示出土地开垦对于真菌物种多样性的不利影响。

2.3 应用于真菌古生态重建研究

古生态重建研究主要从沉积物的古DNA中获取基因信息来构建古代生物群落及相关环境条件,通过研究环境动态变化下的基因变化、物种如何应对环境变化以及古代生物与现代生物之间的关系等为现代生物多样性的保护和管理提供预见性信息(Willis & Birks, 2006; Dawson et al, 2011)。真菌作为共生菌、分解者和寄生菌,在生态环境的进化过程中起着重要的作用(Taylor & Osborn, 1996)。目前,古生态环境中的真菌鉴定主要依赖于常规方法,如对沉积物、动物排泄物或者各种化石中的真菌进行形态学鉴定(Davis & Shafer, 2006; Berbee & Taylor, 2010; van Geel et al, 2011)。近年来,采用分子生物学方法从沉积物中提取古DNA,能够更加准确地识别物种和鉴别材料来源,尤其是metabarcoding技术能够沿时间尺度记录基因变化,直接反映生物进化和生态变化的过程(Boessenkool et al, 2014)。Bellemain等(2013)首次采用metabarcoding技术研究了西伯利亚东部地区16,000–32,000放射性碳年永冻土沉积物中的真菌多样性,并且评估了真菌在古生态系统中的作用,发现真菌种类主要是子囊菌物种(序列所占比例为74.25%, OTUs为78.33%),而担子菌物种丰富度要低得多(OTUs所占比例为

10.3%)。该研究结果与采用克隆技术及Sanger测序技术所获得的真菌类群及种类所占比例相近,且在相似年限永冻土沉积物中监测到2倍的真菌OTUs数目(Lydolph et al, 2005)。与其他真菌古生态学重建方法相比,metabarcoding技术能够监测到种类相当或者更多的真菌种类(Lydolph et al, 2005; Aptroot & van Geel, 2006; Ozerskaya et al, 2009),是真菌古生态重建的有效方法。然而,由于测序深度不够、DNA降解及可能的样品保存偏差等因素的干扰,所获取的物种信息可能并不代表完整的真菌群落信息。因此,将metabarcoding技术应用于真菌古生态构建分析时需要考虑到上述偏差。建议与形态学鉴定的方法相结合开展研究,确保为真菌多样性保护政策的制定提供准确、科学的物种信息。

3 Metabarcoding技术面临的挑战

Metabarcoding技术用于真菌多样性研究还处于初期阶段,目前尚未形成完善的实验和分析流程,面临着缺乏序列参照数据库、实验偏差及缺乏合适的生物信息学分析工具等诸多挑战,需要在今后的研究工作中加以解决。

3.1 有效参照数据库的构建

尽管metabarcoding技术能够大规模地从真菌样品中迅速获取DNA条形码序列数据,然而由于缺乏标准的序列参照数据库,不少序列难以准确地鉴定到种。Nilsson等(2006)对国际核苷酸序列数据库(INSDB, 包括GenBank、EMBL和DDBJ)中的真菌ITS序列进行评估,发现其中82%的序列缺少明确的鉴定信息。因而,如果将INSDB中现有的ITS序列直接作为参照序列,很难得到广泛的认可。有些真菌学家建议将模式标本或菌株、具有公认分类修订信息或者可靠鉴定信息的DNA条形码序列作为参照依据(Seifert, 2009),提出对世界范围内标本馆中有效鉴定的真菌标本尤其是模式标本进行测序,进而获得具有正确物种名称的DNA条形码序列数据(Begerow et al, 2010; Sun & Guo, 2012)。因此,基于可靠鉴定标本的序列构建公认的真菌DNA条形码序列数据库,是实现将metabarcoding技术应用到真菌多样性研究中的重要前期任务。

3.2 实验流程中偏差的影响

PCR扩增及高通量测序等实验过程中产生的任何偏差都可能影响OTUs数目或者物种鉴定信息的

统计(Kunin et al, 2010; Lynch et al, 2012)。这些偏差主要来源于以下操作步骤:

(1)宏条形码片段(metabarcoding)的选择。目前基于metabarcoding技术研究多数采用ITS、ITS1和ITS2序列(Geml et al, 2014; Mueller et al, 2014; Zhang & Yao, 2015), 少数采用rpb1、rpb2和nLSU序列等(Stockinger et al, 2014; Větrovský et al, 2016)。采用不同的宏条形码, 对物种丰富度等相关生物多样性指数的评估结果不同。虽然有学者初步比较分析了ITS1和ITS2哪一段序列更加适合作为真菌的宏条形码(Bazzicalupo et al, 2013; Blaaliid et al, 2013), 但是目前在这个问题上尚未达成一致。

(2)DNA抽提方法的选择。采用不同的DNA提取方法, 细胞壁降解程度和抑制物去除程度不同, 最终获得的DNA条形码序列及物种数目等信息会受到明显的影响(Sun & Guo, 2012)。

(3)引物的选择。在PCR扩增过程中不同引物对真菌类群有选择偏好性, 如ITS1-F、ITS1和ITS5偏向于担子菌的扩增, 而ITS2、ITS3和ITS4偏向于子囊菌的扩增(Bellemain et al, 2010; Tedersoo et al, 2010), 进而影响真菌种类及数量的判定。

(4)高通量测序的操作。有研究发现, 焦磷酸测序中产生的单拷贝序列(singletons)绝大多数是人为形成的, 与自然形成的种间与种内变异相比, 包含更高的插入比例(Tedersoo et al, 2010), 因而建议去除掉该类单拷贝序列后再进行后续分析, 否则会影响多样性评估结果。

在以上过程中选择不同的实验方法或条件, 都可能影响目标样品中真菌种类、数量等信息的判定, 进而影响生物多样性指数的计算。因此, 一方面需要根据不同的研究目的, 严格地控制实验条件, 实现流程的科学化和标准化; 另一方面, 要最大程度地减少实验流程中可能出现的偏差, 如使用PCR-free metabarcoding, 避免PCR扩增过程中引起的偏差, 同时确保在直接测序过程中能够检测到那些在PCR过程中不能成功扩增的类群(Yu et al, 2012), 最大程度地保证测序结果符合环境或生物混合样品中真菌物种及数量的真实信息。

3.3 生物信息学工具的升级

目前, 学者们开发出专门用于真菌高通量测序结果分析的生物信息学工具, 如SCATA (<http://scata.mykopat.slu.se>)、CLOTU (Kumar et al,

2011)、PlutoF (Abarenkov et al, 2010)和ITScan (Ferro et al, 2014), 已经取得了初步进展。但是在应用范围、鉴定的准确性等诸多方面还存在较大的局限性: (1)多数分析工具(pipelines)是为454测序平台研发的, 与其他高通量测序平台相匹配的pipelines较少; (2)不少分析工具的设计基于网络服务平台, 受到网络状态的限制, 并且不利于研究者根据自己的实验需求修改相关参数进行计算; (3)不少分析工具依赖于GenBank服务器来执行Blast搜索, 而不是根据研究者自己建立的本地数据库来进行物种比对(Ferro et al, 2014); (4)基于真菌ITS的分析工具如FHiTINGS (Dannemiller et al, 2014)、CloVR-ITS (White et al, 2013), 目前还依赖于常用的Blast进行序列匹配分析和分类信息指定(Bálint et al, 2014; Gweon et al, 2015), 很少采用分类效率更高的RDP分类器(Ribosomal Database Project)进行物种鉴定(Wang et al, 2007)。因此, 亟需开发出更加科学、灵活、易操作的生物信息学工具, 构建合理的分析框架, 进而有效执行科学算法及相关数据分析, 促进metabarcoding技术在真菌多样性研究中的应用。

4 结语

基于高通量测序的metabarcoding技术在真菌多样性研究上已经取得显著进展, 该技术在大尺度上的真菌多样性监测和保护方面具有巨大潜力和应用前景。在气候变化、物种灭绝加速的大背景下, 应加强真菌分类学家、生态学家和计算机工具研发工程师之间的合作, 特别需要发挥真菌分类学家在构建DNA条形码基础数据库中的重要作用, 实现DNA条形码序列转化为准确的物种鉴定信息, 获取可信的、可检验的、易解释的生物多样性参数, 开发更加稳健、准确的评估方法, 形成普遍可以接受的实验和分析标准, 从而为真菌多样性在大尺度上的研究和真菌多样性保护提供更加科学的依据。

参考文献

- Abarenkov K, Tedersoo L, Nilsson RH, Vellak K, Saar I, Veldre V, Parmasto E, Proust M, Aan A, Ots M (2010) PlutoF—a web based workbench for ecological and taxonomic research, with an online implementation for fungal ITS sequences. *Evolutionary Bioinformatics*, 6, 189–196.
- Aptroot A, van Geel B (2006) Fungi of the colon of the Yukagir Mammoth and from stratigraphically related permafrost samples. *Review of Palaeobotany and Palynology*,

- 141, 225–230.
- Arnolds E (2001) The future of fungi in Europe: threats, conservation and management. In: Fungal Conservation: Issues and Solutions (eds Moore D, Nauta MM, Evans SE, Roether M), pp. 64–80. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bálint M, Schmidt PA, Sharma R, Thines M, Schmitt I (2014) An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. *Ecology and Evolution*, 4, 2642–2653.
- Bazzicalupo AL, Bálint M, Schmitt I (2013) Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6, 102–109.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 99–108.
- 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.
- Bellemain E, Davey ML, Kauserud H, Epp LS, Boessenkool S, Coissac E, Geml J, Edwards M, Willerslev E, Gussarova G (2013) Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environmental Microbiology*, 15, 1176–1189.
- Berbee ML, Taylor JW (2010) Dating the molecular clock in fungi—how close are we? *Fungal Biology Reviews*, 24, 1–16.
- Blaalid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk P, Kauserud H (2013) ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13, 218–224.
- Boessenkool S, McGlynn G, Epp LS, Taylor D, Pimentel M, Gizaw A, Nemomissa S, Brochmann C, Popp M (2014) Use of ancient sedimentary DNA as a novel conservation tool for high-altitude tropical biodiversity. *Conservation Biology*, 28, 446–455.
- Brasier CM (1996) Low genetic diversity of the *Ophiostoma novo-ulmi* population in North America. *Mycologia*, 88, 951–964.
- Burgess KS, Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Graham SW, Husband BC, Newmaster SG, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SC (2011) Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL* + *matK* DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, 333–340.
- Cannon P (1997) Strategies for rapid assessment of fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 6, 669–680.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106, 12794–12797.
- Chase MW, Fay MF (2009) Barcoding of plants and fungi. *Science*, 325, 682–683.
- Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Fabreguettes O, Desprez-Loustau ML, Vacher C (2012) The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist*, 196, 510–519.
- Crous P, Braun U, Schubert K, Groenewald J (2007) Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*, 58, 33–56.
- Cui X, Hu J, Wang J, Yang J, Lin X (2016) Reclamation negatively influences arbuscular mycorrhizal fungal community structure and diversity in coastal saline-alkaline land in Eastern China as revealed by Illumina sequencing. *Applied Soil Ecology*, 98, 140–149.
- Dannemiller KC, Reeves D, Bibby K, Yamamoto N, Peccia J (2014) Fungal high-throughput taxonomic identification tool for use with next-generation sequencing (FHiTINGS). *Journal of Basic Microbiology*, 54, 315–321.
- Davis OK, Shafer DS (2006) *Sporormiella* fungal spores, a palynological means of detecting herbivore density. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 237, 40–50.
- Dawson TP, Jackson ST, House JJ, Prentice IC, Mace GM (2011) Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. *Science*, 332, 53–58.
- Ferro M, Antonio EA, Souza W, Bacci M (2014) ITScan: a web-based analysis tool for internal transcribed spacer (ITS) sequences. *BMC Research Notes*, 7, 857.
- Foufopoulos J, Kilpatrick AM, Ives AR (2011) Climate change and elevated extinction rates of reptiles from Mediterranean Islands. *The American Naturalist*, 177, 119.
- Geiser DM, Pitt JI, Taylor JW (1998) Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 388–393.
- Geml J, Gravendeel B, van der Gaag KJ, Neilen M, Lammers Y, Raes N, Semenova TA, de Knijff P, Noordeloos ME (2014) The contribution of DNA metabarcoding to fungal conservation: diversity assessment, habitat partitioning and mapping red-listed fungi in protected coastal *Salix repens* communities in the Netherlands. *PLoS ONE*, 9, e99852.
- Gweon HS, Oliver A, Taylor J, Booth T, Gibbs M, Read DS, Griffiths RI, Schonrogge K (2015) PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 973–980.
- Halme P, Heilmann-Clausen J, Rämä T, Kosonen T, Kunttu P (2012) Monitoring fungal biodiversity—towards an integrated approach. *Fungal Ecology*, 5, 750–758.
- Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95, 641–655.
- Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105, 1422–1432.
- Hawksworth DL (2012) Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity and Conservation*, 21, 2425–2433.
- 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.
- Jetz W, Wilcove DS, Dobson AP (2007) Projected impacts of climate and land-use change on the global diversity of birds.

- PLoS Biology, 5, e157.
- Ji Y, Ashton L, Pedley SM, Edwards DP, Tang Y, Nakamura A, Kitching R, Dolman PM, Woodcock P, Edwards FA (2013) Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 16, 1245–1257.
- Krishnamurthy PK, Francis RA (2012) A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*, 21, 1901–1919.
- Kumar S, Carlsen T, Mevik BH, Enger P, Blaallid R, Shalchian-Tabrizi K, Kauserud H (2011) CLOTU: an online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation. *BMC Bioinformatics*, 12, 182.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12, 118–123.
- Li HY, Shen M, Zhou ZP, Li T, Wei YL, Lin LB (2012) Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. *Fungal Diversity*, 54, 79–86.
- Liu LY, Cui HF, Tian G (2013) Application of high throughput sequencing in metagenomics. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 8(3), 196–200 (in Chinese) [刘莉扬, 崔鸿飞, 田埂 (2013) 高通量测序技术在宏基因组学中的应用. *中国医药生物技术*, 8(3), 196–200.]
- Lydolph MC, Jacobsen J, Arctander P, Gilbert MTP, Gilichinsky DA, Hansen AJ, Willerslev E, Lange L (2005) Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1012–1017.
- Lynch MD, Bartram AK, Neufeld JD (2012) Targeted recovery of novel phylogenetic diversity from next-generation sequence data. *The ISME Journal*, 6, 2067–2077.
- Mueller RC, Paula FS, Mirza BS, Rodrigues J, Nüsslein K, Bohannon B (2014) Links between plant and fungal communities across a deforestation chronosequence in the Amazon rainforest. *The ISME Journal*, 8, 1548–1550.
- Newsham KK, Hopkins DW, Carvalhais LC, Fretwell PT, Rushton SP, O'Donnell AG, Dennis PG (2015) Relationship between soil fungal diversity and temperature in the maritime Antarctic. *Nature Climate Change*, 6, 182–186.
- Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E (2009) The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*, 296, 97–101.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U (2006) Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS ONE*, 1, e59.
- Ovaskainen O, Schigel D, Ali-Kovero H, Auvinen P, Paulin L, Nordén B, Nordén J (2013) Combining high-throughput sequencing with fruit body surveys reveals contrasting life-history strategies in fungi. *The ISME Journal*, 7, 1696–1709.
- Ozerskaya S, Kochkina G, Ivanushkina N, Gilichinsky DA (2009) Fungi in permafrost. In: *Permafrost Soils* (eds Margesin R), pp. 85–95. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Rosa LH, Vieira MdLA, Santiago IF, Rosa CA (2010) Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 178–189.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E, Voigt K, Crous PW (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 6241–6246.
- Seifert KA (2009) Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9, 83–89.
- Slepecky RA, Starmer WT (2009) Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 101, 823–832.
- Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Iriny L, Smits D, Renfurm R, Verkley GJM, Groenewald M, Chaduli D, Lomascio A, Welti S, Lesage-Meessen L, Favel A, Al-Hatmi AMS, Damm U, Yilmaz N, Houbraken J, Lombard L, Quaedvlieg W, Binder M, Vaas LAI, Vu D, Yurkov A, Begerow D, Roehl O, Guerreiro M, Fonseca A, Samerpitak K, van Diepeningen AD, Dolatabadi S, Moreno LF, Casaregola S, Mallet S, Jacques N, Roscini L, Egidi E, Bizet C, Garcia-Hermoso D, Martin MP, Deng S, Groenewald JZ, Boekhout T, de Beer ZW, Barnes I, Duong TA, Wingfield MJ, de Hoog GS, Crous PW, Lewis CT, Hambleton S, Moussa TAA, Al-Zahrani HS, Almaghrabi OA, Louis-Seize G, Assabgui R, McCormick W, Omer G, Dukik K, Cardinali G, Eberhardt U, de Vries M, Robert V (2015) One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, 35, 242–263.
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, Bouffaud ML, Redecker D (2014) The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLoS ONE*, 9, e107783.
- Sun X, Guo LD (2012) Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3, 65–76.
- Taylor TN, Osborn JM (1996) The importance of fungi in shaping the paleoecosystem. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 90, 249–262.
- Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, Ruiz LV, Vasco-Palacios AM, Thu PQ, Suija A (2014) Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, 346, 1256688.
- Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, Bahram M, Bechem E, Chuyong G, Kõljalg U (2010) 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytologist*, 188, 291–301.

- Thuiller W, Broennimann O, Hughes G, Alkemade JRM, Midgley GF, Corsi F (2006) Vulnerability of African mammals to anthropogenic climate change under conservative land transformation assumptions. *Global Change Biology*, 12, 424–440.
- Thuiller W, Lavorel S, Araújo MB, Sykes MT, Prentice IC (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 8245–8250.
- Turrini A, Giovannetti M (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi in national parks, nature reserves and protected areas worldwide: a strategic perspective for their *in situ* conservation. *Mycorrhiza*, 22, 81–97.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396, 69–72.
- van Geel B, Guthrie RD, Altmann JG, Broekens P, Bull ID, Gill FL, Jansen B, Nieman AM, Gravendeel B (2011) Mycological evidence of coprophagy from the feces of an Alaskan Late Glacial mammoth. *Quaternary Science Reviews*, 30, 2289–2303.
- Větrovský T, Kolařík M, Žifčáková L, Zelenka T, Baldrian P (2016) The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular Ecology Resources*, 16, 388–401.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5261–5267.
- White JR, Maddox C, White O, Angiuoli SV, Fricke WF (2013) CloVR-ITS: automated internal transcribed spacer amplicon sequence analysis pipeline for the characterization of fungal microbiota. *Microbiome*, 1, 6.
- Willis KJ, Birks HJB (2006) What is natural? The need for a long-term perspective in biodiversity conservation. *Science*, 314, 1261–1265.
- Yu DW, Ji Y, Emerson BC, Wang X, Ye C, Yang C, Ding Z (2012) Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 613–623.
- Zhang T, Yao YF (2015) Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high Arctic zone are highly diverse and host-plant specific. *PLoS ONE*, 10, e0130051.

(责任编辑: 杨祝良 责任编辑: 时意专)