



基于 *EF-1a* 序列特征的西藏毛壳属真菌系统进化分析

岳海梅^{1,2}, 庄华^{3*}, 潘朝晖⁴, 张新军⁴, 巩文峰¹

- (1. 西藏农牧学院植物科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193;
3. 西北农林科技大学 植物保护学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100;
4. 西藏高原生态研究所, 西藏 林芝 860000)

摘要: 为研究 *EF-1a* 基因在毛壳菌 (*Chaetomium* Kunze) 属内种间的鉴别能力, 采用 23 株毛壳菌进行 *EF-1a* 基因序列分析。通过碱基变异结果分析可发现 23 株毛壳菌的 *EF-1a* 基因体现出较大的变异性, 通过邻近法构建 *EF-1a* 基因的系统发育树, 23 株毛壳菌被划分在 8 个分枝上, 分别归属于 7 个不同的种。*EF-1a* 基因不仅可以用来区分毛壳菌属的一些形态差异较大的种, 如粪生毛壳 (*C. funicola*), 大果毛壳 (*C. megalocarpum*)、球毛壳 (*C. globosum*) 和马拉斯毛壳 (*C. madrasense*), 还可以用来区分一些形态上非常相似的种, 如: 印度毛壳 (*C. indicum*)、粪生毛壳 (*C. funicola*) 和 (*C. erectum*)、球毛壳 (*C. globosum*) 和近缘毛壳 (*C. subaffine*) 类群。同时, 对一些通过形态特征不能确定的种也可以进行初步鉴定。因此, *EF-1a* 基因可用于毛壳菌属内不同种的鉴定。

关键词: *EF-1a* 基因序列; 毛壳菌属; 系统进化分析

中图分类号: S432.44; Q785 文献标识码: A 文章编号: 1672-6820(2017)11-0005-05

Evolutionary analysis of Tibetan *Chaetomium* based on *EF-1a* gene sequence

Yue Haimei^{1,2}, Zhuang Hua³, Pan Zhaohui⁴, Zhang Xinjun⁴, Gong Wenfeng¹

(1. Department of Plant Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi Tibet 860000, China; 2. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. College of Plant Protection, Northwest A&F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling Shaanxi 712100, China; 4. Tibet Plateau Institute of Ecology, Linzhi Tibet 860000, China)

Abstract: In order to discover identification ability of *EF-1a* in the genus *Chaetomium* Kunze, 23 strains were studied by sequence analysis. The results showed that 23 strains of *Chaetomium* spp. indicated great variability in *EF-1a* gene. Phylogenetic tree of *EF-1a* gene was constructed by neighbor-joining method. 23 strains were divided into 8 branches and belonged to seven different species. *EF-1a* gene can be used not only to distinguish some species with different morphological differences, such as *C. funicola*, *C. megalocarpum*, *C. globosum*, and *C. madrasense*, but also to distinguish between very similar morphological species, such as *C. indicum*, *C. funicola* and *C. erectum*, *C. globosum* and *C. subaffine*. Also, *EF-1a* gene can be used for identification of some species which could not be identified by morphological characteristic. *EF-1a* gene was suitable for identification of species within *Chaetomium* spp..

Key words: *EF-1a* gene sequence; *Chaetomium* spp.; phylogenetic analysis

收稿日期: 2017-05-05; 修回日期: 2017-09-01

基金项目: 国家自然科学基金 (31360006); 作物学科建设项目 (2015ZWXXJS, 2016ZWXXJS)

作者简介: 岳海梅, 硕士, 副教授, 研究方向为植物病理学。E-mail: yuehm1980@163.com

* 通讯作者: 庄华, 硕士, 实验师, 研究方向为植物病理学。E-mail: zhuanghuaok@nwsuaf.edu.cn。



毛壳菌属(毛壳菌, *Chaetomium* Kunze)为子囊菌门(Ascomycota)核菌纲(Pyrenomycetes)粪壳目(Sordariales)毛壳菌科(Chaetomiaceae)真菌,分布在各种含纤维素的基质上,能够产生大量的纤维素酶^[1],具有拮抗多种微生物的作用。1817年由Kunze建立了毛壳菌属。随着人们对毛壳菌分类标准的日趋统一,1881年产生了第一部毛壳菌专著。该书中仅记录了10个毛壳菌种。在真菌字典第9版中记载了81个不同种^[2]。2008年最后由Kirk确定为95个种。陈庆涛于1959年对我国的毛壳菌进行首次研究,报道了2个新种^[3]。1979年戴芳澜在中国真菌总汇里记录了30个毛壳菌不同种^[4];孙广宇等报道了3个新种^[5];谭悠久记载了1个新种^[6];王雪薇对中国毛壳菌科真菌进行系统研究,共报道了毛壳菌31个种,含5个中国新记录种和2个新种^[7];刘富江对我国部分地区的毛壳菌资源进行研究,共发现了14个种,其中包括1个新记录种^[8]。截至目前,我国发现并记载的毛壳菌共有31个种。

随着分子生物学技术的发展,DNA序列分析技术被广泛应用于真菌分类和鉴定中。其中rDNA-ITS序列应用最为广泛,但其提供的遗传信息有限,而且对亲缘关系较近的真菌物种分辨率不够高,一些功能基因如细胞色素氧化酶亚基(cytochrome oxidase subunit, *COI*)和翻译延伸因子(translation elongation factor, *TEF*)基因的序列在一些真菌种类鉴定中成为更好的分子标记^[9-11]。其中,翻译延伸因子*EF-1a*基因表达调控十分保守,其分子进化过程与生物物种的整体进化过程一致,可以较好地表现种一级的关系^[12-13]。由于毛壳菌种群中各种之间rDNA-ITS序列基因碱基变化较小,因此,在解决毛壳菌种内的遗传关系上分辨力较弱。笔者采用*EF-1a*基因序列对毛壳菌进行系统发育分析,为我国毛壳菌种内分类鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

供试的23个菌株,分属于毛壳菌属7个不同的种,其中1个为不确定种,均来自西藏农牧学院植物病理学与微生物学实验室,菌株信息见表1。14个标准菌株为genbank数据库里的菌株。

1.2 PCR扩增和序列测定

DNA的提取方法主要参考Nakada等^[14]的方法,并略有改进。*EF-1a*基因序列的PCR引物对序列为^[15]EF983:5'-AGTTCGAGGCTGGTATCTCC-3', EF2218R:5'-CCTTGACGGAGACGTTCTT-3',由上海美吉生物科技有限公司合成。反应体积为25 μL。其中,10×PCR缓冲液2.5 μL,DNA模板为10 ng,2.5 mmol/L dNTP2.0 μL,10 μmol/L引物共1.0 μL,5 u/μL *Taq*酶0.2 μL。反应程序:扩增*EF-1a*基因序列的PCR反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,56℃退火40 s,72℃延伸40 s,为1个循环,扩增35个循环;72℃最后延伸10 min。PCR产物的纯化和序列测定均由上海美吉生物科技有限公司完成。

1.3 序列分析及系统发育树的构建

将供试的23个菌株的*EF-1a*基因序列测序结果在GenBank中申请接受号(表1),利用Blast进行同源序列查找,选择14个所需的相关种的序列(表1)。用Clustal X 1.8软件,对所测定的核苷酸序列进行校排(alignment)后,用Bioedit软件将序列两端切割整齐,保存为fastal格式,利用DnaSP Version 5.0软件对供试的23个菌株进行*EF-1a*基因序列多态性分析,分别统计序列间每对碱基的平均差异(P_i)、多态位点数目(S)、单倍型数目基因型多样性(h)和核苷酸差异的平均值(k)。用MEGA5.0软件构建*EF-1a*基因系统进化树(选择*Achaetomium strumarium*为外群)。

2 结果与分析

2.1 碱基变异分析

对供试的23株毛壳菌分别进行*EF-1a*基因片段扩增,获得590 bp左右大小片段,用Bioedit软件将序列两端切割整齐得到534 bp大小片段。从表2可以看出,供试的23个菌株共有86个变异位点,12种单倍型,单倍型多样度为0.947,核苷酸多样性指数为0.058 63,核苷酸平均差异数为30.779,23株毛壳菌的*EF-1a*基因体现出较大的碱基变异性。

2.2 系统发育分析

从Genbank中选择14个所需的相关种的序列,利用MEGA4.0软件构建*EF-1a*基因系统发育进化树(供试的23个菌株加黑显示),结果显示,供试的23个菌株被划分在8个分枝上,各分支的支持强



表1 供试毛壳菌(*Chaetomium* spp.)菌株来源及14个标准菌株

菌株编号	种名	来源	<i>EF-1a</i> 基因 Genbank 接受号
LSZ0001	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,拉萨	KY316245
LZZ0042	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,林芝县	KY316246
2-2-1	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,西藏林芝	KY316252
22-3-3	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	朽木,西藏林芝	KY316273
39-6-2	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,墨脱	KY316282
39-2	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,墨脱	KY316283
39-7-1	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,墨脱	KY316284
90-10	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	土壤,昌都	KY316290
39-7-2	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	土壤,墨脱	KY316278
25-9-2	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	牛粪,西藏林芝	KY316265
23-41	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	树叶,西藏林芝	KY316266
24-3-2	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	土壤,西藏林芝	KY316267
56-2	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	土壤,拉萨	KY316287
41-4	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	土壤,墨脱	KY316289
LZT0042	印度毛壳(<i>C. indicum</i>)	树枝,林芝县	KY316247
Z24-12	近缘毛壳(<i>C. subaffine</i>)	树叶,林芝县	KY316276
LZZ0012	近缘毛壳(<i>C. subaffine</i>)	树叶,林芝县	KY316240
Z24-13-1	马德拉斯毛壳(<i>C. madrasense</i>)	树叶,林芝县	KY316272
92-35	大果毛壳(<i>C. megalocarpum</i>)	树叶,昌都	KY316299
LZT0021	毛壳菌(<i>Chaetomium</i> sp.)	土壤,林芝县	KY316242
LZZ0045	毛壳菌(<i>Chaetomium</i> sp.)	树叶,林芝县	KY316243
Z30-4	毛壳菌(<i>Chaetomium</i> sp.)	土壤,林芝县	KY316271
LZT0041	毛壳菌(<i>Chaetomium</i> sp.)	土壤,林芝县	KY316248
CBS140.56(T)	直立毛壳(<i>C. erectum</i>)	欧芹,美国	KC485018
CGMCC3.12900	直立毛壳(<i>C. erectum</i>)	土壤,山东	KC485019
CBS159.52(Epitype)	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	德国	KC485013
CGMCC3.12918	粪生毛壳(<i>C. funicola</i>)	羊粪,青海	KC485012
CBS212.74	印度毛壳(<i>C. indicum</i>)	草食动物粪便,肯尼亚	KC485007
CBS860.68	印度毛壳(<i>C. indicum</i>)	空气,德国	KC485008
CBS148.51	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	储存棉花,美国	KC485028
CGMCC3.12922	球毛壳(<i>C. globosum</i>)	土壤,山东	KC485029
CBS315.74	马德拉斯毛壳(<i>C. madrasense</i>)	未知	KF001741
CBS637.91	近缘毛壳(<i>C. subaffine</i>)	未知	KF001727
CBS149.59	大果毛壳(<i>C. megalocarpum</i>)	未知	KF001738
CGMCC3.9443	大果毛壳(<i>C. megalocarpum</i>)	未知	KF001739
CGMCC3.3595	大果毛壳(<i>C. megalocarpum</i>)	未知	KF001740
CBS333.67(T)	嗜热子囊菌(<i>Achaetomium strumarium</i>)	土壤,印度	KC503252

表2 *EF-1a* 基因在23株毛壳属(*Chaetomium* sp.)真菌中的核苷酸多样性

基因	比对长度 (bp)	变异位点数 (S)	单倍型总数 (H)	单倍型 多样性(H_d)	核苷酸多样 性度(P_i)	核苷酸平均 差异数(K)	中性 检测	中性显著 检验性
<i>EF-1a</i>	534	86	12	0.947	0.058 63	30.779	0.766 48	$P>0.10$

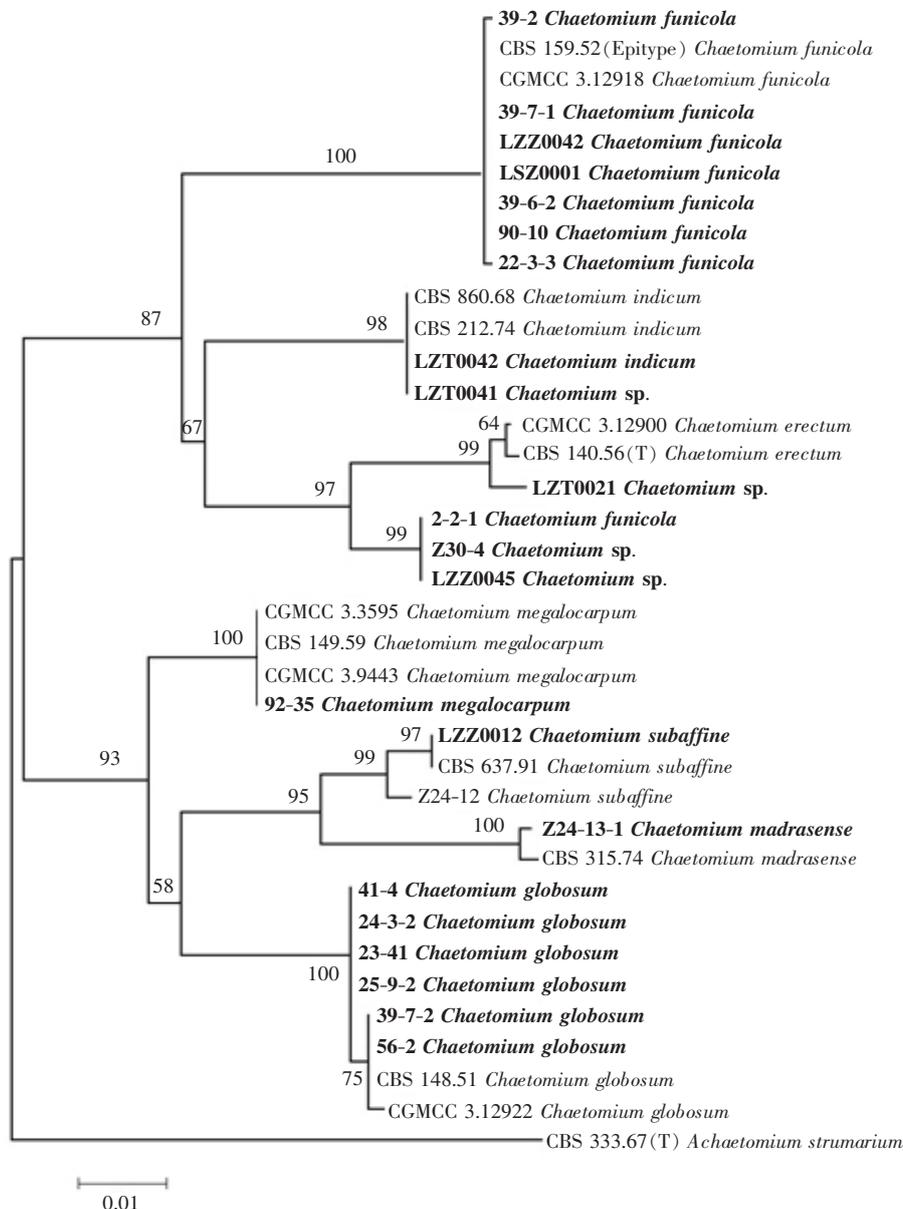


度均达64%以上(图1)。其中,10个菌株在99%相似水平上与粪生毛壳(*C. funicola*)聚在一起,分别划分在2个分枝上;2个菌株在98%相似水平上与印度毛壳(*C. indicum*)聚在一起;1个菌株在99%相似水平上与直立毛壳(*C. erectum*)聚在一起;1个菌株在100%相似水平上与大果毛壳(*C. megalocarpum*)聚在一起;2个菌株在99%相似水平上与近缘毛壳(*C. subaffine*)聚在一起;1个菌株在100%相似水平上与马德拉斯毛壳(*C. madrasense*)聚在一起;6个菌株在

100%相似水平上与球毛壳(*C. globosum*)聚在一个分枝上;形态上未定种的菌株LZT0041与印度毛壳(*C. indicum*)聚在一个分枝上,形态上未定种的菌株LZT0021与直立毛壳(*C. erectum*)聚在一个分枝上,形态上未定种的菌株Z30-4和LZZ0045与粪生毛壳(*C. funicola*)聚在一起,23个菌株通过*EF-1a*基因构建的系统发育树彼此可以很好地分开。

3 结论与讨论

毛壳菌种的形态鉴定主要以子囊果、子囊孢子



图中编号加黑者为供试的23个菌株;示分支处数值为自举值。尺标为每个核苷酸位点上的0.01替换值

图1 基于*EF-1a*基因序列构建的系统发育树



和子囊果壁表观结构等特征为基础,子囊果附属丝的形态作为辅助性状,但通过传统方法很难鉴定一些形态特征极为相似的种,如印度毛壳(*C. indicum*)和粪生毛壳(*C. funicola*)类群,球毛壳(*C. globosum*)和近缘毛壳(*C. subaffine*)类群,必须结合分子生物学方法才能进行准确鉴定。

本文通过 *EF-1a* 基因对来源于西藏的 23 个菌株进行 *EF-1a* 基因核酸多样性和分子进化分析。从碱基变异分析的各项指标可以看出,23 株毛壳菌的 *EF-1a* 基因核酸变异较大,适合于毛壳菌种内的分析。从系统发育树上可以看出,*EF-1a* 不仅可以用来区分毛壳菌属的一些形态差异较大的种,如粪生毛壳(*C. funicola*)、大果毛壳(*C. megalocarpum*)、球毛壳(*C. globosum*)、马德拉斯毛壳(*C. madrasense*),还可以区分一些形态上非常相似的毛壳菌种,如印度毛壳(*C. indicum*)、粪生毛壳(*C. funicola*)、直立毛壳(*C. erectum*)、球毛壳(*C. globosum*)和近缘毛壳(*C. subaffine*)类群。同时,对一些通过形态特征不能确定的种也可以进行初步鉴定,比较适合于毛壳菌属内种间的鉴定。

目前,*EF-1a* 基因序列已在真菌分类中广泛应用,一些研究表明 *EF-1a* 基因序列在镰刀菌种的水平上信息丰富,是鉴定镰刀菌的理想基因,可提高鉴定的准确性^[16-17]。同时,也可提高小新壳梭孢菌和毛壳菌科真菌鉴定的准确性^[18-19]。笔者通过 *EF-1a* 基因对西藏毛壳菌的研究发现,该基因同样适用于毛壳菌种的鉴定,对毛壳菌属内不同种的分辨力较强。

参考文献

[1] 刘守安,李多川,俄世瑾,等.嗜热毛壳菌纤维素酶(CBH) cDNA的克隆及在毕赤酵母中的表达[J].生物工程学报,2005,21(6):892-899.
[2] Kirk P M, Cannon P F, David J C, et al. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi [M]. 9th ed. Wallingford: CAB International, 2001.
[3] 陈庆涛.毛壳菌和壳针孢菌的新种[J].微生物学报,1973(2):124-128.
[4] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学技术出版社,1979.
[5] 孙广宇,谭悠久,张荣.中国毛壳菌科研究 I. 毛壳菌属的种[J].菌物学报,2004,23(3):333-337.

[6] 谭悠久,张荣,张军林,等.中国毛壳菌科(Chaetomiaceae)分类研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(8):267.
[7] 王雪薇.中国毛壳属 *Chaetomium* Kunze 及其形态相似类群的系统分析研究[D].北京:中国科学院微生物研究所,2005.
[8] 刘富江.中国部分省(区)毛壳属真菌的分类研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
[9] Geiser D M, del Jimenez-Gasco M, Kung S C, et al. Fusarium-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2004, 110(5):473-479.
[10] Buee M, Reich M, Murat C, et al. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity[J]. New Phytologist, 2009, 184(2):449-456.
[11] Asgari B, Zare R. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species [J]. Mycologia, 2011, 103(4):863-882.
[12] 刘启鹏,赵思峰,吴品珊,等.基于 ITS 基因、*Actia* 基因和 *EF-1a* 基因序列的新疆向日葵黑茎病菌亲缘关系分析[J].植物检疫,2013(5):50-56.
[13] 胡兰,姜钮,徐秀德.基于形态学和 *EF-1a* 序列特征的我国高粱子粒寄藏镰孢菌种群鉴定[J].作物杂志,2013(4):129-132.
[14] Nakada M, Tanaka C, Tsunewaki K. RFLP analysis for species separation in the genera *Bipolaris* and *Curvularis* [J]. Mycoscience, 1994, 35:271-278.
[15] Glass N L, Donaldson G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4):1323-1330.
[16] 魏巍,朱杰华,张宏磊,等.河北和内蒙古马铃薯干腐病菌种类鉴定[J].植物保护学报,2013,40(4):296-301.
[17] 郭成,魏宏玉,郭满库,等.甘肃玉米穗腐病样品中轮枝镰孢菌的分离鉴定及生物学特性[J].植物病理学报,2014,44(1):17-25.
[18] 吴代东,付岗,叶云峰,等.毛葡萄穗轴溃疡病原鉴定及防治药剂初步筛选[J].植物保护,2016,42(1):203-207.
[19] Wang X W, Wang X L, Liu F J, et al. Phylogenetic assessment of *Chaetomium indicum* and allied species, with the introduction of three new species and epitypification of *C. funicola* and *C. indicum* [J]. Mycological Progress, 2014, 13:719-732.