

# 捕食线虫性真菌 18S rDNA 基因序列 与种系发生关系研究

杨莲茹<sup>1</sup>, 杨晓野<sup>1</sup>, 刘珍莲<sup>1</sup>, 汪明<sup>2</sup>, 考桂兰<sup>1</sup>, 刘海成<sup>3</sup>, 刘军<sup>4</sup>

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094;

3. 巴彦淖尔盟兽医工作站, 临河 015000; 4. 内蒙古包头市畜牧兽医工作站, 包头 014010)

**摘要:** 对捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌 A1 分离株(*Arthrobotrys oligospora* A1) 的 18S rDNA 基因序列进行了研究。结果表明: 其 18S rDNA 全基因序列为 1769 bp, 在进化树上与同种国外分离株 *A. oligospora* var *oligospora* 1 最为接近, 同源率为 94.7%, 这与二者都具有捕食性结构—菌网的特点相一致, 证实捕食线虫性真菌的捕食性结构与捕食线虫性真菌种系发生有关。从少孢节丛孢菌 3 个分离菌株(*Arthrobotrys oligospora* A1、*A. oligospora* 1、*A. oligospora* 2) 的进化树及同源性来看, 不同国家地区的丛孢菌属(*Arthrobotrys*) 分离株确实存在差异。

**关键词:** 捕食线虫性真菌; 少孢节丛孢菌; 捕食性结构; 18S rDNA 基因; 种系发生

中图分类号: S855.4; S852.66

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)-03-0329-05

捕食线虫性真菌种类很多, 但分类非常混乱。目前其种类鉴定主要取决于分生孢子的形态结构。Cooke<sup>[1]</sup> 在 Drechsler<sup>[2-4]</sup> 详细描述捕食线虫性真菌形态及捕食特点的基础上, 给出了捕食线虫性真菌检索表。在此之后, 又发现了许多新属, 其中有些种是非捕食性的, 而后来发现的这些属种并未被普遍接受。Schenck 等<sup>[5]</sup> 重新修订了丛孢菌属 (*Arthrobotrys*), 把捕食性作为该属的一个特点。在研究了分生孢子发生、孢子形态、捕食性结构的基础上, Persson 等<sup>[6]</sup>、Liou 等<sup>[7]</sup>、Ahren 等<sup>[8]</sup> 利用分子生物学技术对一些捕食线虫性真菌 18S rDNA 及核糖体 DNA 的 ITS 片段进行了分子分类学方面的研究。但到目前为止, 捕食线虫性真菌的分类鉴定尚无一个统一标准。

本试验是在传统的捕食线虫性真菌分类基础上, 采用现代分子生物学技术对捕食线虫性真菌的代表种——少孢节丛孢菌的 A1 分离株及其相关种属的 18S rDNA 基因序列进行了研究, 力图从中得出一些有用的生物信息, 从而在分子水平上了解少孢节丛孢菌不同菌株间是否存在差异及捕食线虫性真菌的种系发生关系, 比较传统的形态分类学与现

代分子分类学两者间的差异, 寻求一种较为准确、更符合实际的捕食线虫性真菌分类方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌 A1 分离株, 由内蒙古农业大学动科院预防兽医学实验室自我国内蒙古地区分离并保存, 经传统分类方法鉴定<sup>[9,10]</sup>。

### 1.2 捕食线虫性真菌 18S rDNA 序列有关资料

捕食线虫性真菌及相关真菌不同分离株 18S rDNA 序列有关资料自 GenBank 下载(表 1)。捕食性结构资料来源于 Liou 等和 Ahren 等有关文献。表中 1 号菌株系我们自己分离的菌株; 每个菌株后所标符号表示不同试验所用的菌株。

### 1.3 少孢节丛孢菌 A1 分离株 DNA 提取

按常规酚—氯仿抽提法进行提取。每个样品加 40  $\mu$ l TE(pH 8.0) 溶解, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.4 少孢节丛孢菌 A1 分离株 18S rDNA 基因 PCR 扩增

所用引物根据 Innis, M. A. (1999) 所述方法设计, 由 TaKaRa(大连) 宝生物技术公司合成。引物共 4 对, 其碱基顺序为: 上游引物 NS1: 5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3', 下游引物 NS2: 5'-GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC-3'; 上游引物 NS3: 5'-GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC-3',

收稿日期: 2003-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30260081)

作者简介: 杨莲茹(1960-), 女, 内蒙呼和浩特市人, 副教授, 学士, 主要从事家畜寄生虫生物防治研究。

下游引物 NS4: 5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG-3'; 上游引物 NS5: 5'-AACTTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3'; 下游引物 NS6: 5'-GCA TCA CAG ACC TGT TAT TGC CTC-3'; 上游引物 NS7: 5'-GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC-3', 下游引物 NS8: 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'。扩增产物的长度约分

别为 597 bp、555 bp、377 bp、310 bp。PCR 反应体系 50  $\mu$ l, 其中含 10 $\times$  buffer、dNTP、上下游引物各 5  $\mu$ l, *Taq* 酶 1  $\mu$ l, DNA 模板 10  $\mu$ l, 双蒸水 24  $\mu$ l。按下列条件进行扩增: 94 $^{\circ}$ C 初变性 4 min。50 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min; 循环 30 个周期。然后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。PCR 产物在含有溴化乙锭的 1.25% 琼脂糖上电泳, 检测其纯度与大小。

表 1 捕食线虫性真菌及相关真菌分离株 18S rDNA 基因样品信息表

Table 1 The 18S rDNA gene data about the isolates of nematode-trapping fungi and related fungi

捕食线虫性真菌分离株	基因库资料序列号	捕食线虫性结构
1. <i>Arthrobotrys oligospora</i> A1(少孢节丛孢菌) <sup>★♦</sup>	* 本试验分离菌株	Adhesive nets
2. <i>Arthrobotrys amerospora</i>	AF106533	
3. <i>Arthrobotrys conoides</i> 1(圆锥节丛孢菌) <sup>*</sup>	AF106534	Adhesive nets
4. <i>Arthrobotrys conoides</i> 2 <sup>★♦</sup>	AJ001983	Adhesive nets
5. <i>Arthrobotrys dactyloides</i> <sup>★♦</sup>	AJ001997	Constricting rings
6. <i>Arthrobotrys flagrans</i>	AF106520	
7. <i>Arthrobotrys hertziana</i>	AF106519	
8. <i>Arthrobotrys musiformis</i> <sup>★♦</sup>	AJ001985	Adhesive nets
9. <i>Arthrobotrys oligospora</i> var. <i>oligospora</i> 1(少孢节丛孢菌) <sup>★♦</sup>	AJ001986	Adhesive nets
10. <i>Arthrobotrys oligospora</i> var. <i>oligospora</i> 2(少孢节丛孢菌) <sup>★♦</sup>	AJ001987	Adhesive hyphae
11. <i>Arthrobotrys robusta</i> ( <i>pyriformis</i> ) <sup>★♦</sup>	AJ001988	Adhesive nets
12. <i>Arthrobotrys superba</i> (多孢节丛孢菌) <sup>★♦</sup>	AJ001989	Adhesive net(hyphae)
13. <i>Arthrobotrys thaumasia</i>	AF106526	
14. <i>Arthrobotrys</i> sp.	AF106535	
15. <i>Arthrobotrys</i> sp.	AF106536	
16. <i>Dactylella cylindrospora</i>	AF106538	
17. <i>Dactylella oxyspora</i> 1 <sup>*</sup>	AF106537	
18. <i>Dactylella oxyspora</i> 2 <sup>★♦</sup>	AJ001993	Not nematophagous
19. <i>Dactylella rhopalota</i> <sup>*</sup>	AJ001992	Not nematophagous
20. <i>Duddingtonia flagrans</i> <sup>★♦</sup>	AJ001895	Adhesive nets
21. <i>Duddingtonia flagrans</i> <sup>★♦</sup>	AJ001991	Adhesive nets
22. <i>Monacrosporium doedycoides</i> ( <i>Dactylaria doedycoides</i> ) <sup>*</sup>	AJ001994	Constricting rings
23. <i>Monacrosporium ellipsosporum</i> <sup>*</sup>	AJ001995	Adhesive knobs
24. <i>Monacrosporium gephyropagum</i> ( <i>Dactylella gephyropaga</i> ) <sup>★♦</sup>	AJ001996	Adhesive branches
25. <i>Monacrosporium haptotylum</i> ( <i>Dactylaria candida</i> ) <sup>★♦</sup>	AJ001990	Adhesive knobs
26. <i>Monacrosporium psychrophilum</i> ( <i>Dactylaria psychrophila</i> ) <sup>*</sup>	AJ001998	Adhesive nets

注: 标“★”者用于“捕食性结构与捕食线虫性真菌及相关真菌 18 个分离株分类关系比较”, 见 2.4; 标“♦”者用于“不同捕食线虫性真菌及相关真菌属种的比较”, 见 2.5; 标“▼”者用于“丛孢菌属捕食线虫性真菌中 8 个分离株比较”, 见 2.6。

## 1.5 少孢节丛孢菌 A1 分离株 18S rDNA 基因测序

交由宝生物(大连)技术公司进行测序。每条序列都经过正反链验证。

## 1.6 基因序列比较分析与系统发生树的建立

用分子生物学 DNASTAR 软件对捕食线虫性真菌及相关真菌不同分离株 18S rDNA 基因序列进行聚类分析, 并绘制进化树, 对结果进行分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增试验

少孢节丛孢菌 A1 分离株 18S rDNA 基因可被特异的 PCR 引物扩增(图 1)。从电泳图上可以看出, 少孢节丛孢菌 A1 分离株 PCR 产物 18S rDNA 的 4 个核苷酸片段非常清晰, 其大小分别是 597 bp、555 bp、377 bp 和 310 bp。

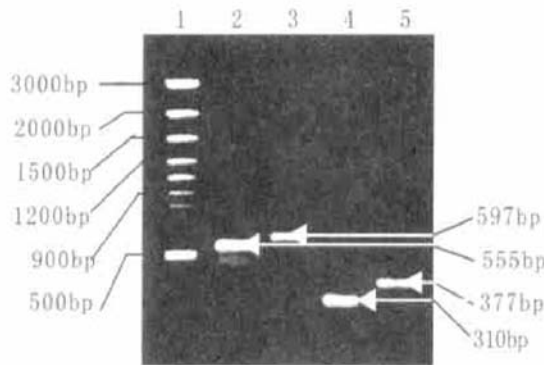


图 1 PCR 纯化产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 The agarose gel electrophoretogram of PCR purified product

1. Marker 带 (Marker Line); 2. NS1-NS2 扩增带 (NS1-NS2 line); 3. NS3-NS4 扩增带 (NS3-NS4 line); 4. NS5-NS6 扩增带 (NS5-NS6 line); 5. NS7-NS8 扩增带 (NS7-NS8 Line)

## 2.2 基因序列

少孢节丛孢菌 A1 分离株 PCR 产物 4 个核苷酸片段测序后经连接, 18S rDNA 全基因序列为 1769bp。

## 2.3 少孢节丛孢菌 A1 分离株与 GenBank 中 25 个相关分离株比较

用 DNASTAR 分析软件进行聚类分析, 结果见图 2。从图中可以看出少孢节丛孢菌 A1 分离株 (*Arthrobotrys oligospora* A1) 在进化树上与 *A. oligospora* var. *oligospora* 1 位于同一个分枝上, 二者之间的同源性达到 94.7%; 与 *A. oligospora* var. *oligospora* 2 不在一个分枝上, 同源性为 93.1%; 相比较而言, 少孢节丛孢菌 A1 菌株与 *A. oligospora* var. *oligospora* 1 相近。这与二者都具有捕食性结构-粘性菌网 (Adhesive nets) 的形态学特点是一致的; 而 *A. oligospora* var. *oligospora* 2 仅具有粘性菌丝, 无粘性菌网。

## 2.4 捕食性结构与捕食线虫性真菌及相关真菌 18 个分离株分类关系比较

用 DNASTAR 分析软件进行聚类分析, 结果见图 3。可以看出: 16 个用于比较的捕食线虫性真菌分离株和相近的 2 个非捕食线虫性真菌分离株在进化树上很有规律地按捕食性结构的有无和捕食性结构的不同, 分别聚类进行了排列。

## 2.5 不同捕食线虫性真菌及相关真菌属种的比较

用 DNASTAR 软件对 4 个属 8 个分离株的 18S rDNA 序列进行了比较, 结果表明: 4 个属的

18S rDNA 基因相同序列以 majority 序列为标准, 在 768bp、773bp、959bp、1014bp、1015bp、1016bp、1317bp、1460bp、1643bp、1650bp 处, 每个属的 2 个种株该位置碱基相同, 不同属间其中至少 1 个属与其它属在该位置的碱基有明显差异。

## 2.6 丛孢菌属捕食线虫性真菌中 8 个分离株比较

用 DNASTAR 软件对丛孢菌属 (*Arthrobotrys*) 8 个分离株捕食线虫性真菌的 18S rDNA 序列进行比较, 结果表明: 丛孢菌属 8 个分离株的 18S rDNA 基因核苷酸序列, 有 3 个区域在不同的分离株之间存在较多变异。它们分别是 400 bp-410 bp 区域、1450 bp-1475 bp 区域及 1650 bp-1675 bp 区域; 而在 490 bp-590 bp、880 bp-990 bp、1030 bp-1070 bp、1170 bp-1210 bp 几个区域基本稳定。

## 3 讨论和小结

传统的捕食线虫性真菌分类一般主要取决于分生孢子发育特点和分生孢子的形态结构, 但是上述这些特征并不稳定, 在不同的发育时期, 不同的培养条件或重复培养时可能表现不同。近几年, 随着分子生物学技术的发展, 国外有人试图寻找另一种分类途径, 这就是利用 18S rDNA、5.8S rDNA 等来进行捕食线虫性真菌的分类。

18S rDNA 基因的保守性较好, 进化相对较慢, 因此被广泛用于真核生物的种系发生关系和进化研究。本试验是针对捕食线虫性真菌形态学分类鉴定中存在的种种缺陷, 应用分子生物学的理论和技术, 对捕食线虫性真菌的种类鉴定、种系发生、分子分类与捕食性结构之间的关系进行探讨。

试验结果表明, 少孢节丛孢菌 A1 分离株 (*Arthrobotrys oligospora* A1) 与同一种的另一来源于瑞典的分离株在进化树上位于同一分枝上, 二者之间的同源性达到了 94.7%, 而与另一个来源于瑞典的同种分离株不在一个分枝上, 同源性为 93.1%, 这与上述三个株的捕食性结构是一致的。 *A. oligospora* A1 株与 *A. oligospora* var. *oligospora* 1 都可产生粘性菌网, 而 *A. oligospora* var. *oligospora* 2 仅产生粘性菌丝。并且从进化树及同源性比较可以看出, *Arthrobotrys oligospora* 在不同国家、地区可能存在不同的株, 其生物学特性是有差异的。从种系发生上看, 3 个少孢节丛孢菌分离株中, *A. oligospora* 2 应是最早, 然后是 *A. oligospora* A1, 最后是 *A. oligospora* 1。

从捕食线虫性真菌及相关真菌的 26 个分离株组成的进化树来看,其中 4 个属共 18 个分离株位于一个大分枝内。同一属的不同分离株不完全聚于相近位置上,这从另一个角度说明传统形态学分类方

法并不能反映出种系发生关系,形态学分类与分子生物学分类存在一定矛盾,应该说后者更能反映生物进化的实际情况。

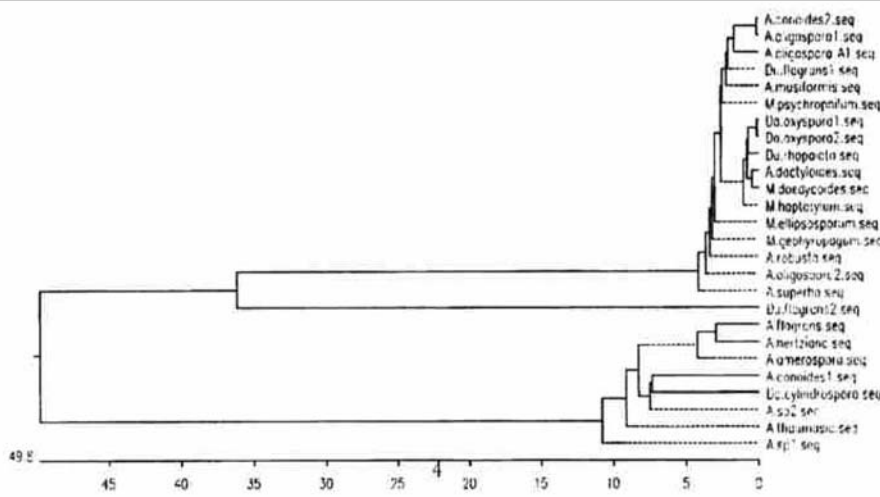


图 2 捕食线虫性真菌及相关真菌 26 个真菌分离株 18S rDNA 序列聚类分析进化树  
Fig. 2 The phylogenetic tree of 26 isolates of fungi by cluster analysis of 18S rDNA gene

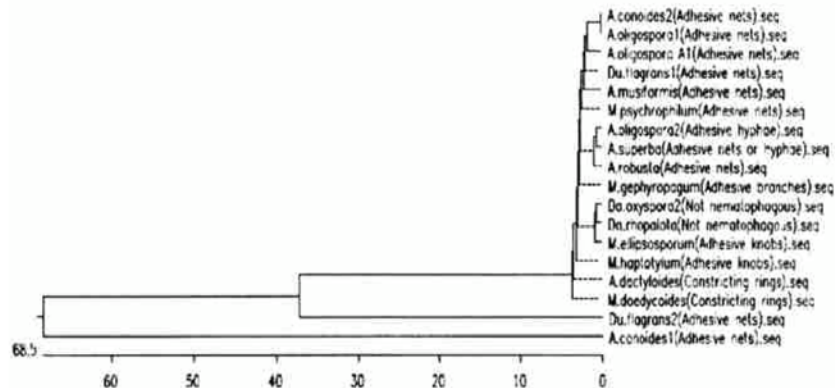


图 3 捕食线虫性真菌及相关真菌 18 个分离株 18S rDNA 序列聚类分析进化树  
Fig. 3 The phylogenetic tree of 18 isolates of fungi by cluster analysis of 18S rDNA gene

16 个捕食线虫性真菌和 2 个非捕食线虫性真菌分离株的聚类分析结果显示,它们在进化树上较有规律地按照捕食性结构的有无和捕食性结构的不同分别聚类进行排列,这与 Liou<sup>[7]</sup>、Ahren<sup>[8]</sup>所作结果类似,再一次证明了捕食线虫性真菌的种系发生与分生孢子发育特点及分生孢子形态并不完全相关,而是与捕食性结构关系密切。因此,基于目前的捕食线虫性真菌分类较为混乱的情况,我们认为如果从简便实用角度出发,是否可将分子生物学分类所获得的有关信息与形态学分类结合起来进行考虑。分类时,可首先将捕食线虫性真菌与非捕食线虫性真菌在种属的位置上分开,然后根据捕食性结构并结合分生孢子发育、发生及形态特点将捕食线虫

性真菌分属、分种。当然,如何分类才能更好地反映生物进化、种系发生的本质,并充分考虑到现实的可行性和实用价值,尚需进一步探讨研究。

从捕食线虫性真菌 4 个属、8 个分离株 18S rDNA 基因相应序列的对比来看,在 10 个碱基位点,每个属的 2 个种碱基相同,另外几个属中,至少有一个属在该位点处与其它几个属有明显差异,但同一属内的 2 个种株碱基相同。由此可以推测是否这些碱基位点决定着属的差异,但这需要进行更多种属的比较来加以验证。另外,从 18S rDNA 序列对比来看, *Duddingtonia* 2 与其它 7 个种株之间核苷酸序列差别较大,表现为碱基缺失或替换,因此,该种的有效性值得进一步加以核实和考虑。

丛孢菌属(*Arthrobotrys*) 中 8 个分离株的 18S rDNA 基因核苷酸序列比较结果显示, 有 3 个区域在不同的分离株之间存在较多差异, 这些区域可能在种株之间的变异上有一定作用, 具有区别种株的价值; 而在另外一些区域(区域碱基数在 40bp 以上) 较为稳定, 反映了属的共同特征。

#### 参考文献:

- [1] Cooke R C, Godfrey B E S. A key to the nematode-destroying fungi[J]. *Frans Brit Mycol Soc*, 1964, 47 (1): 61~ 74.
- [2] Drechsler C. Several species of *Dactylella* and *Dactylaria* that capture free-living nematodes[J]. *Mycologia*, 1950, 46: 762~ 782.
- [3] Drechsler C. Some hyphomycetes that capture eelworms in southern states[J]. *Mycologia*, 1954, 44: 533~ 556.
- [4] Drechsler C. Some clampless hyphomycetes predacious on nematodes and rhizopods[J]. *Sydowia*, 1962, 15: 9~ 25.
- [5] Schenck S, Kendrick W B, Pramer D. A new nematode-trapping hyphomycete and a reevaluation of *Dactylaria* and *Arthrobotrys*[J]. *Can J Bot*, 1977, 55: 977~ 985.
- [6] Persson y, Erland S, Jansson H. Identification of nematode-trapping fungi using RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of ribosomal DNA[J]. *Mycol Res*, 1996, 100(5): 531~ 534.
- [7] Liou G Y, Tzean S S. Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences[J]. *Mycologia*, 1997, 89 (6): 876 ~ 884.
- [8] Ahren D, Ursing B M, Tunlid A. Phylogeny of nematode-trapping fungi based on 18S rDNA sequences [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 158: 179~ 184.
- [9] 杨莲茹, 杨晓野, 杨玉琴, 等. 捕食线虫真菌的分离鉴定[J]. *中国农业大学学报*, 1998, (增刊): 76~ 78.
- [10] 杨晓野, 杨莲茹, 刘珍莲, 等. 捕食线虫性真菌分离培养及形态学研究[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22 (2): 175~ 177.

### Study of the Relation on the 18S rDNA Gene Sequence and the Phylogeny of Nematode-trapping Fungi

YANG Lian-ru<sup>1</sup>, YANG Xiao-ye<sup>1</sup>, LIU Zhen-han<sup>1</sup>,

WANG Ming<sup>2</sup>, KAO Gui-lan<sup>1</sup>, LIU Hai-cheng<sup>3</sup>, LIU Jun<sup>4</sup>

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia

Agricultural University, Huhehot 010018, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3. Veterinary Station of Bayannaer District, Linhe 015000, China;

4. Station of Animal Husbandry and Veterinary in Baotou City, Baotou 014010, China)

**Abstract:** The 18S rDNA gene sequence and the phylogeny of nematode-trapping fungus such as the isolate of *Arthrobotrys oligospora* A1 were studied. The results showed that the full 18S rDNA gene of *Arthrobotrys oligospora* A1 contained 1769bp nucleotides. The phylogenetic analysis of 18S rDNA gene sequence from nematode-trapping fungus reported in GenBank and our isolate was conducted by DNASTAR and evolution trees were established. In evolution trees *Arthrobotrys oligospora* A1 showed a relatively closer relationship with *A. oligospora* var. *oligospora* 1, the homology of the nucleotide sequence of them was 94.7%, which was in agreement with their trapping organs-net works. It indicated that the trapping devices might be related with the phylogenetic evolution of nematode-trapping fungi. It implied that they may belong to different strains from the areas of different countries based on the evolution tree and the homogeneity result of 3 isolates of *Arthrobotrys oligospora* (*Arthrobotrys oligospora* A1, *A. oligospora* 1, *A. oligospora* 2) in this study.

**Key words:** Nematode-trapping fungi; *Arthrobotrys oligospora*; Nematode-trapping organ; 18S rDNA gene; Phylogeny