

胡珍珠,杨志辉,刁琢,等. 子囊菌门无性产孢 *brlA* 基因家族的系统发育分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):48-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.013

子囊菌门无性产孢 *brlA* 基因家族的系统发育分析

胡珍珠,杨志辉,刁琢,赵冬梅,朱杰华

(河北农业大学植物保护学院,河北保定 071000)

摘要:无性产孢基因 *brlA* 在子囊菌产孢的中心调控通路中控制分生孢子梗的形成,*brlA* 基因的激活是曲霉属真菌产孢的一个关键步骤。以子囊菌门已测序的无性产孢 *brlA* 基因家族的 60 条核苷酸序列为材料,用邻接法、最小进化法构建系统发育树,分析该基因家族在子囊菌中的演化关系。结果表明:以 *brlA* 基因家族序列所构建的系统发育树共形成了稳定的、高支持率的 I ~ IV 共 4 个大分支;该系统发育树又可细分为以子囊菌 8 个目为代表的 8 个小分支,即爪甲团囊菌目(Onygenales)、刺盾负目(Chaetothyriales)、格孢腔菌目(Pleosporales)、肉座菌目(Hypocreales)、小丛壳目(Glomerellales)、粪壳菌目(Sordariales)、柔膜菌目(Helotiales)、散囊菌目(Eurotiales)。由结果可知,子囊菌门无性产孢 *brlA* 基因家族的演化与子囊菌高级分类阶元目的演化相对应,为子囊菌门不同类群间分生孢子梗演化学方面的研究提供可靠的分子证据。

关键词:子囊菌门;无性产孢;*brlA*;基因家族;系统发育树

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0048-04

无性孢子的形成是大多数子囊菌最常见的繁殖方式,包括特定的细胞分化、基因表达的时空调控和细胞信号转导^[1]。分生孢子是高等真菌的无性孢子,对保持长期生存发育有重要作用^[2]。

子囊菌门曲霉属的分生孢子在分生孢子梗上形成^[3],分生孢子梗的形态是曲霉属一个重要的分类学依据。构巢曲霉分生孢子的形成在形态学上被分为几个不同的阶段^[4]:首先是基细胞分支出气生梗,然后梗的尖端开始肿胀形成多核囊泡;在囊泡表面形成 2 层小梗,分别是梗基、瓶梗;最后,瓶梗经历了重复的不对称的有丝分裂,产生了分生孢子链。产孢的整个过程都是特定的,并且不同的基因组合在每个阶段行使的功能不同^[5]。

brlA、*abaA*、*wetA* 这 3 个基因组成调控分生孢子特定基因表达的中心调控通路,并决定分生孢子梗形成、孢子成熟过程中基因激活的顺序^[6]。*brlA* 基因的激活是曲霉属产孢的一个关键步骤,*brlA* 在从分生孢子梗极化的顶端生长到囊泡肿胀的转型期是必需的^[7]。敲除 *brlA* 的突变体形成刚毛状的结构,产生 1 个细长的梗,从而不能产生囊泡或者其他后续的产孢结构^[8];相反,*brlA* 在生长的细胞中超表达会导致生长中断,并且从菌丝尖端直接形成可育的分生孢子^[9]。*brlA* 有 1 个复合结构,包含 2 个重叠的转录本 *brlAα*、*brlAβ*,在分生孢子发育过程中起着不同的作用^[10]。*BrlA* 蛋白主要定位于囊泡或小梗上。*AbaA* 是瓶梗分化的主要成分,在分生孢子发育中

期阶段被 *BrlA* 激活^[11]。*wetA* 基因在分生孢子形成的晚期被 *AbaA* 诱导,并且在使分生孢子成熟的过程中起重要作用^[12]。

子囊菌门绝大多数都可产生无性的分生孢子,但是分生孢子的产生方式、形态有很大差别,而控制其产生的关键基因 *brlA* 基因家族在不同类群中的系统发育关系对揭示其孢子产生方式和形态的不同有重要价值,也为该基因家族基因的分子演化提供数据支撑。因此,本研究从 GenBank 中下载子囊菌门 8 个目的 *brlA* 基因家族的 60 条核苷酸序列,用邻接法、最小进化法构建子囊菌门 *brlA* 基因家族高级分类阶元的系统发育树,并对其系统发育关系进行分析。

1 材料与方法

1.1 *brlA* 基因的核苷酸序列

brlA 基因的核苷酸序列来自 GenBank 数据库,通过该数据库下载子囊菌 8 个目中 60 条含有 *brlA* 基因的核苷酸序列,其中散囊菌目(Eurotiales)15 条,爪甲团囊菌目(Onygenales)9 条,肉座菌目(Hypocreales)7 条,格孢腔菌目(Pleosporales)8 条,刺盾负目(Chaetothyriales)、粪壳菌目(Sordariales)各 6 条,小丛壳目(Glomerellales)5 条,柔膜菌目(Helotiales)4 条(表 1)。

1.2 序列分析

对所下载序列按照 GenBank 登录号进行重命名后,用 MEGA 6 软件^[13]中的 ClustalW 进行比对后剪切。

1.3 系统发育树的构建

用 MEGA 6 软件^[13],采用邻接法、最小进化法对已剪切的序列进行系统发育树的构建,bootstrap 值重复 1 000 次,隐藏 50% 以下的支持率。

2 结果与分析

2.1 *brlA* 基因的系统发育分类

利用邻接法、最小进化法对 *brlA* 基因的核苷酸序列所构

收稿日期:2015-05-28

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201303018);现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-10-P12)。

作者简介:胡珍珠(1990—),女,河北保定人,硕士研究生,主要从事植物病理学研究。E-mail: huzhenzhu421@163.com。

通信作者:朱杰华,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病理学研究。E-mail: zhujiehua356@126.com。

表 1 子囊菌门 *brla* 基因家族的基本信息

| 纲 | 目 | 属 | 菌株号 | GenBank 登录号 |
|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------|---------------|
| 散囊菌纲 (Eurotiomycetes) | 爪甲团囊菌目 (Onygenales) | <i>Ajellomyces</i> | SLH14081 | XM_002622349 |
| | | <i>Ajellomyces</i> | NAmI | XM_001537479 |
| | | <i>Paracoccidioides</i> | Pb01 | XM_002791638 |
| | | <i>Uncinocarpus</i> | 1704 | XM_002542696 |
| | | <i>Coccidioides</i> | C735 | XM_003065089 |
| | | <i>Coccidioides</i> | RS | XM_001240808 |
| | | <i>Arthroderma</i> | CBS 113480 | XM_002849155 |
| | | <i>Arthroderma</i> | CBS 112371 | XM_003012403 |
| | | <i>Trichophyton</i> | HK1 0517 | XM_003023607 |
| | 刺盾负目 (Chaetothyriales) | <i>Cyphellophora</i> | CBS 101466 | XM_008712528 |
| | | <i>Cladophialophora</i> | CBS 110553 | XM_007748439 |
| | | <i>Cladophialophora</i> | CBS 114405 | XM_007759880 |
| | | <i>Capronia</i> | CBS 617. 96 | XM_007724343 |
| | | <i>Capronia</i> | CBS 606. 96 | XM_007737179 |
| | | <i>Exophiala</i> | NIH/UT8656 | XM_009161242 |
| | | | | |
| 座囊菌纲 (Dothideomycetes) | 格孢腔菌目 (Pleosporales) | <i>Phaeosphaeria</i> | SN15 | XM_001795537 |
| | | <i>Leptosphaeria</i> | JN3 | XM_003835490 |
| | | <i>Setosphaeria</i> | E128A | XM_008022198 |
| | | <i>Pyrenophora</i> | Pt – 1C – BFP | XM_001934479 |
| | | <i>Pyrenophora</i> | 0 – 1 | XM_003298911 |
| | | <i>Bipolaris</i> | 26 – R – 13 | XM_007713084 |
| | | <i>Bipolaris</i> | ATCC 44560 | XM_007691594 |
| | | <i>Bipolaris</i> | ND90Pr | XM_007706074 |
| | 肉座菌目 (Hypocreales) | <i>Fusarium</i> | CS3487 | CBME010001333 |
| | | <i>Fusarium</i> | PH – 1 | XM_386404 |
| | | <i>Nectria</i> | mpVI 77 – 13 – 4 | XM_003046447 |
| | | <i>Metarhizium</i> | ARSEF 23 | XM_007824311 |
| | | <i>Trichoderma</i> | QM6a | XM_006961068 |
| | | <i>Cordyceps</i> | CM01 | XM_006672341 |
| | | <i>Beauveria</i> | ARSEF 2860 | XM_008598065 |
| | 小丛壳目 (Glomerellales) | <i>Colletotrichum</i> | | GU647087 |
| | | <i>Colletotrichum</i> | Nara gc5 | XM_007278354 |
| | | <i>Colletotrichum</i> | PJ7 | XM_007591928 |
| | | <i>Verticillium</i> | Vd8 | KF555283 |
| | | <i>Verticillium</i> | VaMs. 102 | XM_003009342 |
| | 粪壳菌目 (Sordariales) | <i>Neurospora</i> | OR74A | XM_957439 |
| | | <i>Sordaria</i> | k – hell | XM_003349963 |
| | | <i>Podospora</i> | S mat + | XM_001910123 |
| | | <i>Thielavia</i> | NRRL 8126 | XM_003653144 |
| | | <i>Myceliophthora</i> | ATCC 42464 | XM_003660469 |
| | | <i>Chaetomium</i> | CBS 148. 51 | XM_001223890 |
| | | | | |
| 锤舌菌纲 (Leotiomycetes) | 柔膜菌目 (Helotiales) | <i>Marssonina</i> | MB_m1 | XM_007294501 |
| | | <i>Glarea</i> | ATCC 20868 | XM_008089233 |
| | | <i>Sclerotinia</i> | 1980 | XM_001589286 |
| | | <i>Botrytis</i> | B05. 10 | XM_001554081 |
| | | | | |
| 散囊菌纲 (Eurotiomycetes) | 散囊菌目 (Eurotiales) | <i>Talaromyces</i> | | AY078193 |
| | | <i>Talaromyces</i> | ATCC 10500 | XM_002479242 |
| | | <i>Aspergillus</i> | NIH2624 | XM_001214318 |
| | | <i>Aspergillus</i> | | AY817176 |
| | | <i>Aspergillus</i> | SCA1_d8910 | D8910 |
| | | <i>Aspergillus</i> | NRRL3357 | XM_002373159 |
| | | <i>Aspergillus</i> | | AF533070 |
| | | <i>Aspergillus</i> | FGSC4 | L25858 |
| | | <i>Aspergillus</i> | FGSC4 | M20631 |
| | | <i>Neosartorya</i> | NRRL 181 | XM_001264101 |
| | | <i>Aspergillus</i> | A1293 | XM_747933 |

续表 1

| 目 | 纲 | 属 | 菌株号 | GenBank 登录号 |
|---|---|--------------------|---------------------|--------------|
| | | <i>Aspergillus</i> | NRRL 1 | XM_001268617 |
| | | <i>Penicillium</i> | | AY940453 |
| | | <i>Penicillium</i> | Pd01 | JX298844 |
| | | <i>Penicillium</i> | Wisconsin 54 - 1255 | XM_002560241 |

建的 2 个系统发育树的拓扑结构基本一致。由邻接法对核苷酸序列所构建的系统发育树(图 1)可以看出,所构建的子囊菌门无性产孢 *brlA* 基因家族的系统发育树形成了 4 个高 bootstrap 值所支持的即 I ~ IV 等大分支。其中,分支 I 包括爪甲团囊菌目(Onygenales)、刺盾负目(Chaetothyriales),这 2 个目聚到一起的支持率为 84%,都属于散囊菌纲(Eurotiomycetes);分支 II 为支持率为 99% 的格孢腔菌目(Pleosporales);分支 III 包括肉座菌目(Hypocreales)、小丛壳目(Glomerellales)、粪壳菌目(Sordariales)、柔膜菌目(Helotiales)等 4 个目,除柔膜菌目属于锤舌菌纲外,其余 3 个目均为粪壳菌纲;分支 IV 为散囊菌目(Eurotiales),单独聚为 1 个支,属散囊菌纲(Eurotiomycetes)。

而上述 4 个大分支又可划分为以子囊菌门下所属目为代表的 8 个末端小分支,即爪甲团囊菌目(Onygenales)、刺盾负目(Chaetothyriales)、格孢腔菌目(Pleosporales)、肉座菌目(Hypocreales)、小丛壳目(Glomerellales)、粪壳菌目(Sordariales)、柔膜菌目(Helotiales)和散囊菌目(Eurotiales)(图 1)。

2.2 *brlA* 基因家族演化与子囊菌演化间关系的分析

由文献[14]可知,散囊菌目(Eurotiales)、爪甲团囊菌目(Onygenales)、刺盾负目(Chaetothyriales)归为散囊菌纲(Eurotiomycetes),肉座菌目(Hypocreales)、粪壳菌目(Sordariales)、小丛壳目(Glomerellales)归为粪壳菌纲(Sordariomycetes),格孢腔菌目(Pleosporales)归为座囊菌纲(Dothideomycetes),柔膜菌目(Helotiales)归为锤舌菌纲(Leotiomyces)。将子囊菌产孢相关基因 *brlA* 的核苷酸序列进行系统发育树分析可知,该树划分为 I ~ IV 4 个大分支,而形成的 8 个小分支按子囊菌的 8 个目分类。分支 I 包含的爪甲团囊菌目(Onygenales)、刺盾负目(Chaetothyriales)均属于散囊菌纲,且 2 个目聚到一起的支持率较高;爪甲团囊菌目(Onygenales)中,还有 1 株散囊菌目的青霉菌 XM_002560241 也与之聚到了一起;分支 II 以座囊菌纲中的格孢腔菌目为代表;分支 III 包括的 4 个目中,除柔膜菌目属于锤舌菌纲外,其余 3 个目均为粪壳菌纲;分支 IV 以散囊菌目为代表,聚成 1 个大分支。

由图 1 可知,无性产孢 *brlA* 基因家族的演化关系与子囊菌高级分类阶元的演化关系基本一致。形成的 8 个小分支中的每个分支分别以子囊菌的 1 个目为代表,且亲缘关系较近的目聚到一起的支持率也较大。

3 结论与讨论

在真菌中,子囊菌门是最大的 1 个门,呈现最广泛、最复杂的分化现象。其中,无性产孢是一种主要的繁殖方式,对其产孢机制及相关基因的研究情况已有大量报道^[15]。子囊菌门不同类群间所共有的 *brlA* 基因是其无性产孢过程中分生孢子梗形成阶段所必需的基因,是保证子囊菌无性产孢顺利进行的内在因素。

子囊菌门无性产孢 *brlA* 基因家族以目为代表的高级分类阶元的 *brlA* 基因间存在巨大差异,而同一目不同种属间的差异相对较小,这表明该基因在进化过程中受到了与子囊菌门高级分类单元间类群分化的严重正选择作用。但是也有例外,如本属于散囊菌目的 XM_002560241 这株青霉菌与爪甲团囊菌目聚到了一起,且支持率高达 82%,可能是由于散囊菌目、爪甲团囊菌目同属于散囊菌纲^[14]。在子囊菌门更高分类阶元纲的水平上,*brlA* 基因家族的演化与其纲的目前分类系统没有很明确的对应关系,如散囊菌目与同属于散囊菌纲的爪甲团囊菌目、刺盾负目未聚到一起,这值得进一步论证,而爪甲团囊菌目、刺盾负目聚到一起的支持率高达 84%。此系统发育树中,柔膜菌目与粪壳菌纲的 3 个目聚到了一起,推测是由于柔膜菌目所属的锤舌菌纲与粪壳菌纲关系较近,均属于盘菌亚门^[16-17]。这也从另外一个侧面表明,囊菌门纲的划分及之间的系统发育关系仍须进一步研究。

参考文献:

[1] Ni M, Gao N, Kown N J, et al. Regulation of *Aspergillus* conidiation [J]. Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi, 2010; 559 - 576.

[2] Borkovich K, Ebbole D J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi [M]. Washington: American Society for Microbiology Press, 2010.

[3] Yu J H. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* [J]. Mycobiology, 2010, 38(4): 229 - 237.

[4] Adams T H, Wieser J K, Yu J H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans* [J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews, 1998, 62(1): 35 - 54.

[5] Etxebeeste O, Garzia A, Espeso E A, et al. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules [J]. Trends in Microbiology, 2010, 18(12): 569 - 576.

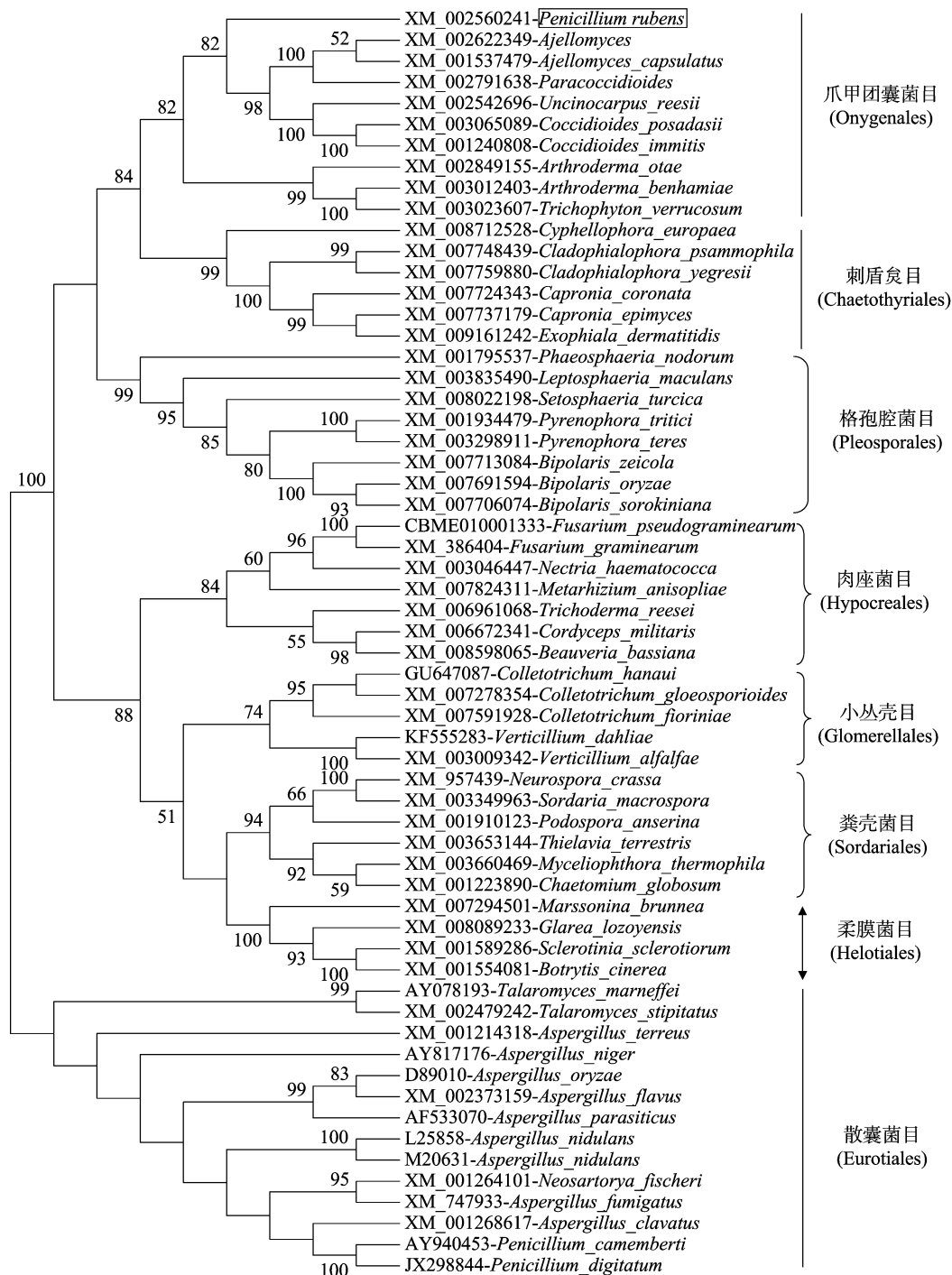
[6] Boylan M T, Mirabito P M, Willett C E, et al. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans* [J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(9): 3113 - 3118.

[7] Chang Y C, Timberlake W E. Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast [J]. Genetics, 1993, 133(1): 29 - 38.

[8] Clutterbuck A J. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans* [J]. Genetics, 1969, 63(2): 317 - 327.

[9] Adams T H, Boylan M T, Timberlake W E. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans* [J]. Cell, 1988, 54(3): 353 - 362.

[10] Prade R A, Timberlake W E. The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development [J]. The EMBO Journal, 1993, 12(6): 2439 - 2447.



方框表示该菌不属于该目；不同的符号代表不同的纲
图1 子囊菌门 *brlA* 基因家族的系统发育树

- [11] Andrianopoulos A, Timberlake W E. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic Switch to control development [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(4): 2503 – 2515.
- [12] Marshall M A, Timberlake W E. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore – specific gene expression [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(1): 55 – 62.
- [13] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and*

Evolution, 2013, 30(12): 2725 – 2729.

- [14] 贺新生.《菌物字典》第10版菌物分类新系统简介[J]. *中国食用菌*, 2009, 28(6): 59 – 61.
- [15] 刘 静, 李中元, 王军娥, 等. 丝状真菌产孢机制及其相关基因研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2009, 37(4): 81 – 84.
- [16] Eriksson O E, Baral H O, Currah R S, et al. Outline of Ascomycota [J]. *Myconet*, 2004(10): 1 – 99.
- [17] Eriksson O E, Winka K. Supraordinal taxa of Ascomycota [J]. *Myconet*, 1997, 1(1): 1 – 16.