Trichoderma harzianum 及其近缘种的 分子系统学研究

章初龙 徐 同*

(浙江大学农业与生物技术学院生物技术研究所, 杭州 310029)

(中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学开放研究实验室, 北京 100080)

摘要: *Trichoderma harzianum* 是木霉属内最常见的一个“集合种”。本研究对来源不同的 *T. harzianum* 及其相似种的 46 个菌株进行了 ITS 序列测定, 将其 ITS1-5.8S-ITS2 序列与来自 EMBL 的参考菌株的序列进行比较, 并进行系统发育分析, 此外对其中的 18 个菌株进行了 RAPD 多态性分析, 试图明确 *T. harzianum* 的多样性以及与其相似种之间的关系。ITS 结果表明, *T. harzianum* 及其相似种可分成 2 个群(A、B): A 群由 *T. hamatum*、*T. asperellum*、*T. atroviride*、*T. koningii* 和 *T. viride* 组成, 并形成 2 个分支, 表明 *T. viride* 和 *T. koningii*、*T. atroviride* 的亲缘关系较近, 而与 *T. hamatum*、*T. asperellum* 较远; B 群由 *T. spirale*、*T. hamatum*、*T. inhamatum*、*T. harzianum* 和 *T. anam. Hypocrea vinosa* 组成, 并形成 6 个分支。*T. inhamatum* 可分成 2 个群(Ti1、Ti2), *T. harzianum* 至少可分成 5 个群(Th1、Th2、Th4、Th5、Th6)。结果还表明 *T. hamatum* 的遗传差异较大, *T. hamatum* 的模式菌株归属于 A 群, 而其他的 *T. hamatum* 的菌株归属于 B 群。RAPD 结果与 ITS 的结果基本一致。

关键词: 系统发育, ITS, RAPD

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1005-0094(2003)01-0010-10

Molecular phylogenetic analysis of *Trichoderma harzianum* and its related species

ZHANG Chu-Long, XU Tong*

1 Institute of Biotechnology, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029

2 Systematic Mycology & Lichenology Laboratory, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 10080

Abstract: *Trichoderma harzianum* is one of the most common aggregate species of the genus. Based on different molecular characterizations, strains of *T. harzianum* have been divided into different subgroups, which has created confusion. We reexamined reference strains representing different subgroups under the name *T. harzianum* and its related species. Phylogenetic analysis using the NEIGHBOR program in the PHYLIP package based on ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence data distributed the tested strains among two phylogenetic groups (A and B), which was supported by high bootstrap values. Group A contains *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. koningii* and *T. viride*, and is divided into two clades. *T. viride* is more closely related to *T. koningii* and *T. atroviride* than to *T. hamatum* and *T. asperellum*. Group B contains *T. spirale*, *T. hamatum*, *T. inhamatum*, *T. harzianum* and *T. anam. Hypocrea vinosa*, and is divided into six clades. *T. inhamatum* is further divided into two subgroups (Ti1 and Ti2), and *T. harzianum* comprises at least five subgroups (Th1, Th2, Th4, Th5 and Th6). The phylogenetic analysis of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence also indicated the heterogeneity of *T. hamatum*, since a neotype of *T. hamatum* is located in group A but other strains of *T. hamatum* are located in group B. The RAPD analysis of 18 strains representing *T. harzianum* and its related species coincided with phylogeny based on sequence analysis of the ITS regions.

Key words: phylogeny, ITS, RAPD

基金项目: 国家自然科学基金(39970002)和中科院微生物研究所真菌地衣系统学开放研究实验室基金(907)

收稿日期: 2002-03-19; 接受日期: 2002-06-22

作者简介: 章初龙, 男, 1971 年出生, 讲师, 博士研究生, 专业为真菌学和植物病理学

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xutong@zju.edu.cn.

木霉(*Trichoderma*)是一类普遍存在的真菌,常见于土壤中,是土壤微生物的重要群落。有些木霉具有活性很强的纤维素酶、几丁质酶等水解酶类,可用于生产纤维素酶和微生物源的糖蛋白以及用于植物病害的生物防治。此外,少数木霉种能使蘑菇等物种致病。鉴于木霉在工农业生产中具有很大的应用潜力,正确鉴定木霉种就显得尤为重要。但是迄今为止,对木霉的分类仍存在很大的分歧(章初龙,徐同 2000)。

哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)是 Rifai (1969)提出的 9 个集合种之一,与绿色木霉(*T. viride*)相比,*T. harzianum* 的分生孢子光滑、较小,瓶梗较短、排列更规则,分生孢子梗呈复杂树状分枝。Bissett(1991a,b)将它归入 *Pachybasium* 组,并将非钩状木霉(*T. inhamatum*)作为其异名处理。Gams & Bissett(1998)修订后,*T. harzianum* 同时作为 *Pachybasium* 组和 *Trichoderma* 组的种处理,在 *Pachybasium* 组又恢复了 *T. inhamatum*。研究证明,*T. harzianum* 是一个复合种,依据它们在抗生素产生上的差异可分成 2 型(type I 和 type II)(Fujimori & Okuda, 1994)。根据 RFLP 和 RAPD(Muthumeenakshi *et al.*, 1994)将它们分成 4 个独立的群(TH1、TH2、TH3、TH4),TH1、TH2、TH4 亲缘关系较近,很多用作生物防治的 *T. harzianum* 大多归属于 TH1,引起蘑菇绿霉病的 *T. harzianum* 属于 TH2 或 TH4,而 TH3 则与康宁木霉(*T. koningii*)和 *T. viride* 亲缘关系较近(Muthumeenakshi *et al.*, 1998)。由于建立 *T. harzianum* 的模式标本已经丢失,Gams & Meyer(1998)将菌株 CBS226.95 定为新模式菌株,并根据 ITS、rDNA RFLP 和 ITS1 序列分析将包括 *T. harzianum*、*T. inhamatum*、*T. viride* 和 *T. atroviride* 在内的这些木霉分成 2 个群:第 1 个群包括 TH1、TH2、*T. inhamatum* 模式菌株、*T. harzianum* 新模式菌株和 Fujimori & Okuda 的 type II;第 2 个群包括 *T. viride*、*T. atroviride* 和 Fujimori & Okuda 的 type I。还有研究认为 TH1、TH2 和 TH4 分别是一个单独的种(Hermosa *et al.*, 2000; Dodd *et al.*, 2000; Kindermann *et al.*, 1998),TH3 与 *T. atroviride* 是同一个种(Dodd *et al.*, 2000; Ospina-Giraldo *et al.*, 1998, 1999)。Gams & Meyer(1998)研究表明 TH1 与 *T. inhamatum* 在 ITS 序列上有一定的差异。种名及分群的不断变化混淆了 *T. harzianum* 的含义,

也容易引起误解。鉴于 *T. harzianum* 是木霉属内最常见的一个集合种(Rifai, 1969),用作植病生物防治的木霉菌株很多属于这个集合种(Kullnig *et al.*, 2001),因此这个集合种的系统发育关系研究对于整个木霉属的系统发育关系的确定有着重要意义。

本文对不同来源的 46 个 *T. harzianum* 及其近缘种的菌株进行了 ITS rDNA 的序列测定,并与各个种或群的参考菌株结合进行系统发育分析,此外对部分菌株进行了 RAPD 多态性分析,试图明确 *T. harzianum* 种内群体的多样性,以及 *T. harzianum* 及其近缘种之间的关系。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及鉴定

供试的 *T. harzianum* 及其近缘种 46 个菌株的形态鉴定及来源见表 1。所有菌株均按照 Gams & Bissett(1998)的分类系统并参考最新的分类研究成果鉴定到种。序列系统发育分析中应用的参考菌株见表 2。

1.2 基因组 DNA 提取

采用氯化苄法(朱衡等,1994)提取基因组 DNA,略有改动。加入 500 μ L 提取液(100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 40 mM EDTA pH 8.0);用无菌牙签刮取 PDA 平皿培养物置于装有提取液的 eppendorf 管中,振荡混匀;加入 100 μ L 10% SDS, 300 μ L 氯化苄,剧烈振荡,使管内混合物呈乳状;50℃保温 1 小时,每隔 10 min 振荡混匀 1 次;加入 300 μ L 预冷的 3M NaAc (pH 5.2),混匀,冰浴 15 min;11 000 rpm 室温离心 15 min 后取上清;11 000 rpm 重新离心 1 次,取上清,加入等体积异丙醇,颠倒混合,室温沉淀 10 min;11 000 rpm 室温离心 15 min;沉淀用 70% 乙醇洗 1 次,晾干后溶于 200 μ L TE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0);加 RNase(10 μ g/ μ L) 1 μ L,混匀,37℃保温 10 min;加入等体积的氯仿/异戊醇抽提至中间白色层消失;取上层水层,加入 1/10 体积的 3 M NaAc (pH 5.2),混匀,冰浴 15 min 后加入等体积的异丙醇,颠倒混合,室温沉淀 10 min;11 000 rpm 室温离心 15 min;沉淀用 70% 乙醇洗 1 次,晾干后溶于 50 μ L TE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0)。-20℃保存备用。

1.3 ITS 序列测定与分析

1.3.1 PCR 扩增、扩增产物纯化与序列测定

ITS1-5.8S-ITS2 片段用通用引物 ITS4 和 ITS5 (White *et al.* , 1990) 扩增。反应体系为 100 μ L , 含 1 $\times$ PCR 反应缓冲液、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.2 mM dNTPs、0.5 μ M 的 1 对引物、100 ng 模板 DNA 和 5U Taq DNA 聚合酶。扩增反应在 MJ Research 公司的 Minicycler PTC-150 型 PCR 仪上进行 , 反应参数为 : 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min , 然后为 30 轮循环 , 每个循环在 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒 , 55 $^{\circ}$ C 退火 30 秒 , 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒 , 30 轮循环后 , 在 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min , 最后在 4 $^{\circ}$ C 停止反应。

PCR 产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒进行纯化。吸取 PCR 反应液置于 1.5 mL eppendorf 管中 , 加 5 倍体积的 PB 缓冲液 , 涡旋混匀 ; 将上述混合液加入至 QIAquick 微型柱中 , 13 000 rpm 离心 30 ~ 60 秒 ; 倒掉收集管中的废液 , 将微型柱重新放入收集管中 , 加 0.75 mL PE 缓冲液至微型柱中 , 13 000 rpm 离心 30 ~ 60 秒 ; 倒掉收集管中的废液 , 将微型柱重新放入收集管中 , 14 000 rpm 离心 1 min ; 将微型柱放在一个新的 eppendorf 管中 , 加 30 μ L EB 缓冲液或水 , 静置 1 min 后 13 000 rpm 离心 1 min。纯化后的 PCR 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

PCR 纯化产物直接进行双向测序 , 测序引物为 ITS4 和 ITS5。测序用 Pharmacia 公司的 Mega-BACE1000 分析系统 , 在浙江大学分析测试中心生物大分子实验室进行。

1.3.2 序列分析

DNA 序列用 CLUSTAL X 序列对准 , 如有必要用肉眼进行校正。系统发育分析用 PHYLIP 3.57c 软件包 (Felsenstein , 1989) 中的 SEQBOOT 程序生成自举 (bootstrap) 数据集 , 用 DNADIST 程序 (Kimura 双参数公式) 产生距离矩阵 , 用 NEIGHBOR 程序 (Neighbor joining 法) 构建 NJ 树 , 采用 CONSENSE 程序获得多数一致树 (majority-rule consensus tree)。

1.4 RAPD 分析

1.4.1 RAPD 反应

参考国外对木霉的 RAPD 研究 (Fujimori & Okuda , 1994 ; Zimand *et al.* , 1994 ; Turoczy *et al.* , 1996) 选用 6 个有效的随机引物 : S6 (TGCTCTGCC)、S7 (GGTGACGCAG)、S10 (CTGCTGGGAC)、S23 (AGTCAGCCACC)、S31 (CAATCGCCGT)、S33 (CAGCACCAC)。反应体系为 25 μ L , 含 1 $\times$ PCR 反应缓冲液、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.2 mM dNTPs、0.5 μ M 的随机引物、1 ng/ μ L 模板 DNA 和 1U Taq DNA 聚

合酶。扩增反应在 MJ Research 公司的 Minicycler PTC-150 型 PCR 仪上进行 , 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后 92 $^{\circ}$ C 变性 1 min , 34 $^{\circ}$ C 退火 1 min , 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30s , 循环 40 次 , 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。Marker 为 GeneRulerTM DNA Ladder Mix (片段长度 : 10 000 , 8000 , 6000 , 5000 , 4000 , 3500 , 3000 , 2500 , 2000 , 1500 , 1200 , 1031 , 900 , 800 , 700 , 600 , 500 , 400 , 300 , 200 , 100 bp)。

1.4.2 RAPD 结果的数据处理

以某一 DNA 片段在某样品中出现赋值“ 1 ”, 不出现赋值“ 0 ”为依据产生二态性状集 , 用 RAPDistance 程序将扩增片段的二态数据转换成距离数据 , 计算出的距离矩阵用 PHYLIP 3.57c 程序包中的 NEIGHBOR 程序 (UPGMA 法) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列测定

46 个供试菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 序列长度 511 ~ 533 bp (表 1) , 其中 5.8S 序列是保守序列 , 没有变化 ; ITS2 序列长度从 168 ~ 178 , G + C 含量 63.84% ~ 67.24% , 变化不大 ; 序列长度变化最大的是 ITS1 , 其序列长度 180 ~ 203 bp、G + C 含量 54.19% ~ 57.21%。

2.2 序列分析

根据 ITS 区域序列构建的系统树 (图 1) 将这些菌株分成 2 个群 (A , B) : A 群由 *T. hamatum*、*T. asperellum*、*T. atroviride*、*T. koningii* 和 *T. viride* 组成 ; B 群由 *T. spirale*、*T. hamatum*、*T. inhamatum*、*T. harzianum* 和 *T. anam. Hypocrea vinosa* 组成。

A 群由 2 个分支组成。其中 *T. hamatum* 新模式菌株 DAOM167057、11 个 *T. asperellum* 菌株 (T152、T013、T012、T028、IMI20179、T-203、T010、CBS433.97、T017 和 IMI20268) 和 1 个 *Hypocrea* sp. 菌株 (T261) 构成 1 个分支 , 可见 *T. hamatum* 与 *T. asperellum* 亲缘关系很近 , 同时也表明 *T. asperellum* 也有一定的分化 , 并且表明有性型 T261 菌株与 *T. asperellum* 在 ITS 序列上非常相似。另 1 个分支是由 *T. atroviride*、*T. koningii* 和 *T. viride* 的菌株构成的 , *T. atroviride* DAOM165782 与其他的包括模式菌株 (CBS351.93) 在内的 *T. atroviride* 菌株有一定的差异 , 并且有性型 T260 菌株与 *T. atroviride* 在 ITS 序列上非常相似 ; *T. koningii* T314 与其他的包括模

表 1 供试 *Trichoderma harzianum* 及相似种菌株来源及分子特征

Table 1 Source and molecular characteristics of strains of *Trichoderma harzianum* and the related species

菌株 Strain	种名 Species	来源 Source	序列号 GenBank accession number	ITS1		ITS2		ITS regions	
				GC 含量	碱基数	GC 含量	碱基数	GC 含量	碱基数
				GC content (%)	(bp)	GC content (%)	(bp)	GC content (%)	(bp)
T010	<i>T. asperellum</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408119	55.49	182	64.37	174	55.84	514
T012	<i>T. asperellum</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408122	55.00	180	64.94	174	55.86	512
T013	<i>T. asperellum</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408123	54.95	182	64.94	174	55.84	514
T017	<i>T. asperellum</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408117	55.19	183	64.37	174	55.73	515
T028	<i>T. asperellum</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408128	56.04	182	65.50	171	56.36	511
T152	<i>T. asperellum</i>	中国浙江 Zhejiang ,China	AF408126	55.49	182	64.94	174	56.03	514
T261	<i>Hypocrea</i> sp.	中国云南 Yunnan ,China	AF408120	55.19	183	64.37	174	55.73	515
T291	<i>T. viride</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408138	55.49	182	63.84	177	55.71	517
T217	<i>T. atroviride</i>	中国 Hebei ,China	AF408137	55.68	185	65.54	177	56.35	520
T224	<i>T. atroviride</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408129	55.19	183	65.17	178	56.07	519
T236	<i>T. atroviride</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408133	55.43	187	65.54	177	56.26	519
T260	<i>Hypocrea</i> sp.	中国云南 Yunnan ,China	AF408130	55.43	184	65.17	178	56.15	520
T288	<i>T. koningii</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408139	55.74	183	64.20	176	55.9	517
T289	<i>T. koningii</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408141	55.74	183	64.00	175	55.81	516
T314	<i>T. koningii</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408143	55.74	183	64.57	175	56.01	516
T182	<i>Hypocrea nigricans</i>	美国 USA	AF408083	55.50	200	64.94	174	56.02	532
T186	<i>Hypocrea nigricans</i>	美国 USA	AF408080	55.78	199	64.37	174	55.93	531
T187	<i>Hypocrea nigricans</i>	美国 USA	AF408084	55.22	201	64.94	174	55.91	533
T204	<i>T. anam. Hypocrea vinosa</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408063	57.21	201	67.24	174	57.41	533
T208	<i>T. anam. Hypocrea vinosa</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408064	56.28	199	67.05	173	56.98	530
T202	<i>T. inhamatum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408095	55.78	199	64.74	173	56.04	530
T203	<i>T. inhamatum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408090	55.78	199	65.34	176	56.29	533
T230	<i>T. inhamatum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408092	55.50	200	64.94	174	56.02	532
T231	<i>T. inhamatum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408094	55.50	200	64.74	173	55.93	531
T005	<i>T. harzianum</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408079	55.50	200	64.37	174	55.91	533
T039	<i>T. harzianum</i>	中国浙江 Zhejiang ,China	AF408074	55.78	199	65.52	174	56.31	531
T060	<i>T. harzianum</i>	未知 Unknown	AF408072	55.78	199	64.94	174	56.12	531
T209	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408075	55.22	201	64.94	174	55.91	533
T212	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408077	55.22	201	65.32	173	56.02	532
T214	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408071	55.78	199	64.94	174	56.12	531
T220	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408088	54.95	202	64.74	173	55.72	533
T221	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408085	55.22	201	64.74	173	55.83	532
T233	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408069	55.33	197	64.94	174	55.95	529
T239	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408068	55.78	199	64.94	174	56.12	531
T240	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408076	55.50	200	65.32	173	56.12	531
T245	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408073	55.78	199	64.16	173	55.85	530
T248	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408066	56.06	198	64.94	174	56.23	530
T249	<i>T. harzianum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408067	55.78	199	64.94	174	56.12	531
T251	<i>T. harzianum</i>	中国西藏 Tibet ,China	AF408078	55.22	201	65.12	172	55.93	531
T253	<i>T. harzianum</i>	中国西藏 Tibet ,China	AF408070	55.78	199	65.14	175	56.2	532
T337	<i>T. harzianum</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408065	56.93	202	66.28	172	56.95	532
T238	<i>T. hamatum</i>	中国河北 Hebei ,China	AF408098	54.19	203	64.33	171	55.26	532
T308	<i>T. hamatum</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408081	55.50	200	65.12	172	56.04	530
T312	<i>T. hamatum</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408082	55.30	200	64.74	173	55.93	531
T031	<i>T. spirale</i>	喀麦隆 Cameroon	AF408103	56.63	196	64.29	168	56.13	522
T274	<i>T. spirale</i>	中国云南 Yunnan ,China	AF408104	55.72	201	64.71	170	55.95	529

图1 根据 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列由 PHYLIP 3.57c 中的 NEIGHBOR 程序计算产生的系统树。在分支处的百分数是 BOOTSTRAP 值 (50% 以上的 BOOTSTRAP 值)。* 号代表模式菌株。
Fig. 1. Phylogenetic tree generated by ITS1-5.8S rDNA-ITS2 sequence analysis using NEIGHBOR program of PHYLIP 3.57c. Numbers above branches indicate the percentages with which the given branch was supported in 1000 bootstrap replications. Type strains are indicated by an asterisk.

表 2 ITS 区域序列分析中的参考菌株
Table 2 Reference strains used in sequence analysis of ITS

菌株 Strain	登录号 EMBL	种名 Species	说明 Comments
CBS 258.85 * DAOM 167654 * = IMI 192654 = ATCC 13631	Z31017 Z31016	<i>T. citrinoviride</i> <i>T. reesei</i>	ex type of <i>T. citrinoviride</i> ex type of <i>T. reesei</i>
CBS 816.68 * = ATCC 18648	Z31019	<i>T. longibrachiatum</i>	ex type of <i>T. longibrachiatum</i>
95-39	AF057602	<i>T. inhamatum</i>	<i>T. inhamatum</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999)
CBS226.95 * = 95-43	AF057606	<i>T. harzianum</i>	ex neotype of <i>T. harzianum</i> ; <i>T. harzianum</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> 1c (Gams & Bissett , 1998)
T-203	AF278789	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i> (Kullnig <i>et al.</i> , 2001)
ATCC48131 = CECT2413	AF278790	<i>T. harzianum</i> Th1	<i>T. harzianum</i> (Kullnig <i>et al.</i> , 2001)
ATCC74058	AF278794	<i>T. atroviride</i>	<i>T. atroviride</i> (Kullnig <i>et al.</i> , 2001)
IMI352940 = 24	AJ224006	<i>T. harzianum</i>	<i>T. inhamatum</i> / <i>T. harzianum</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; b (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI352941 = 11	AJ224008	<i>T. atroviride</i>	<i>T. viride</i> / <i>T. atroviride</i> + <i>T. kongingii</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 2b (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI281112 = 2923	AJ224009	<i>T. atroviride</i>	<i>T. viride</i> / <i>T. atroviride</i> + <i>T. kongingii</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 2a (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI296235 = 2925	AJ224011	<i>T. inhamatum</i>	<i>T. inhamatum</i> / <i>T. harzianum</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 1b (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI298371 = 2926	AJ224012	<i>T. harzianum</i>	<i>T. inhamatum</i> / <i>T. harzianum</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 1a (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI304057 = 2931	AJ224017	<i>T. harzianum</i> Th1	<i>T. inhamatum</i> / <i>T. harzianum</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 3 (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI20179 = 3	AJ224020	<i>T. asperellum</i>	<i>T. hamatum</i> / <i>T. asperellum</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 2a (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
IMI20268 = ThVa	AJ224021	<i>T. asperellum</i>	<i>T. hamatum</i> / <i>T. asperellum</i> (Hermosa <i>et al.</i> , 2000) ; 1a (Grondona <i>et al.</i> , 1997)
CBS433.97 * = BBA70684 = Tr3	AJ230668	<i>T. asperellum</i>	ex neotype of <i>T. asperellum</i> (Samules <i>et al.</i> , 1999)
Th4-12	U78877	<i>T. harzianum</i> Th4	<i>T. harzianum</i> Th4 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> Th4P1 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998)
Th4-36	U78878	<i>T. harzianum</i> Th4	<i>T. harzianum</i> Th4 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> Th4P2 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998)
Th3-61	U78879	<i>T. atroviride</i>	<i>T. harzianum</i> Th3 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> Th3 I (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998)
Th2-63	U78880	<i>T. harzianum</i> Th2	<i>T. harzianum</i> Th2 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> Th2 I (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998)
Th1-65	U78881	<i>T. harzianum</i> Th1	<i>T. harzianum</i> Th1 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> Th1 I (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998)
Th4-92	U78882	<i>T. harzianum</i> Th4	<i>T. harzianum</i> Th4 (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> Th4C (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998)
CBS240.63	X93979	<i>T. viride</i>	Mass-ascospore isolate of <i>Hypocrea rufa</i> ; <i>T. viride</i> 2a (Gams & Meyer , 1998)
ATCC64262	X93983	<i>T. koningii</i>	<i>T. koningii</i> (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS396.92 = ATCC32173	Z48811	<i>T. atroviride</i>	<i>T. atroviride</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> / <i>atroviride</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998) ; <i>T. ‘ harzianum ’</i> 2c (Gams & Meyer , 1998) ; <i>T. harzianum</i> B/ <i>atroviride</i> (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS398.92 = ATCC42831	Z48811	<i>T. atroviride</i>	<i>T. atroviride</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999) ; <i>T. harzianum</i> / <i>atroviride</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998) ; <i>T. ‘ harzianum ’</i> 2c (Gams & Meyer , 1998) ; <i>T. harzianum</i> B/ <i>atroviride</i> (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)

表 2(续) Table 2 (continued)

菌株 Strain	登录号 EMBL	种名 Species	说明 Comments
CBS391.92 = ATCC36042	Z48812	<i>T. atroviride</i>	<i>T. atroviride</i> (Kullnig <i>et al.</i> , 2001); <i>T. atroviride</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999); <i>T. harzianum</i> /atroviride (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1998); <i>T. ' harzia-num ' 2c</i> (Gams & Meyer , 1998); <i>T. harzianum</i> B/atroviride (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
DAOM167057 * CBS351.93 * = DAOM165779	Z48816	<i>T. hamatum</i>	ex neotype of <i>T. hamatum</i> ; <i>T. hamatum</i> B (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
= ATCC28036 = 95-41	Z48817	<i>T. atroviride</i>	ex type of <i>T. atroviride</i> ; <i>T. atroviride</i> (Ospina-Giraldo <i>et al.</i> , 1999); <i>T. atro-viride 2c</i> (Gams & Meyer , 1998); <i>T. atroviride</i> Ta1 (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
DAOM165782	Z48818	<i>T. atroviride</i>	<i>T. atroviride</i> Ta2 (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS273.78 * = IMI287526	Z68187	<i>T. inhamatum</i>	ex type of <i>T. inhamatum</i> ; <i>T. inhamatum</i> 1b (Gams & Meyer , 1998); <i>T. in-hamatum</i> Ti1 (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS518.18	Z68188	<i>T. inhamatum</i>	<i>T. inhamatum</i> Ti2 (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS819.68 = ATCC18647 = LCP84.3414	Z68189	<i>T. harzianum</i> Th1	<i>T. harzianum</i> 1d (Gams & Meyer , 1998); <i>T. harzianum</i> A (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS185.69	Z68190	<i>T. koningii</i>	<i>T. harzianum</i> ' 2b (Gams & Meyer , 1998); <i>T. harzianum</i> B (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)
CBS459.96 * = GJS 96-120	Z79628	<i>T. koningii</i>	ex neotype of <i>T. koningii</i> ; <i>T. koningii</i> (Kuhls <i>et al.</i> , 1997)

* 代表模式菌株 Type strains are indicated by an asterisk.

式菌株(CBS459.96)在内的 *T. koningii* 菌株也有一定的差异 ;*T. viride* 和 *T. koningii*、*T. atroviride* 的亲缘关系较近 ,而与 *T. hamatum* 和 *T. asperellum* 较远。

B 群由 6 个分支组成。除了 *T. spirale* 分支以外 ,*T. hamatum* T238 与另外 2 个 *T. hamatum* 菌株 (T312、T308)也表现出一定的差异。包括模式种在内的 *T. inhamatum* 的 Ti1 群、*Hypocrea nigricans* 的 2 个菌株(T187、T182)与 *T. harzianum* 的 Th5 群构成 1 个分支 ;*T. inhamatum* 的 Ti2 群构成 1 个分支 ;*T. anam. Hypocrea vinosa* 的 2 个菌株(T208、T204)与 *T. harzianum* 的 Th2 群、Th4 群构成 1 个分支 ;*T. harzianum* 的 Th1 群、Th6 群与 1 个 *Hypocrea nigri-cans* 菌株(T186)构成 1 个分支。表明 *T. harzianum* 28 个菌株分别分布于 B 群的不同分支中。

2.3 RAPD 结果

6 个随机引物对 18 个 *T. harzianum* 菌株扩增的基因组 DNA 指纹图谱谱带清晰 ,平均扩增 3.4 ~ 5.9 个片段 ,绝大多数片段在 0.1 ~ 2.0 kb 之间(图 2)。其中 S6 扩增的片段在 2 ~ 11 个之间 ,共扩增出 106 个条带 ,平均每个菌株 5.9 条 ;S7 扩增的片段在 2 ~ 8 个之间 ,共扩增出 81 个条带 ,平均每个菌株 4.5 条 ;S10 扩增的片段在 1 ~ 6 个之间 ,共扩增出 83 个条带 ,平均每个菌株 4.6 条 ;S23 扩增的片段在 1 ~ 7 个之间 ,共扩增出 61 个条带 ,平均每个菌株 3.4 条 ;S31 扩增的片段在 1 ~ 6 个之间 ,共扩增出 68 个

条带 ,平均每个菌株 3.8 条 ;S33 扩增的片段在 2 ~ 8 个之间 ,共扩增出 92 个条带 ,平均每个菌株 5.1 条。

从 18 个菌株的聚类图(图 3)可见 ,*T. harzia-num* 及其近缘种菌株分为两大类 :第一类由 *Hypo-crea nigricans* 的 3 个菌株(T187、T186、T182)组成 ;其余的 *Trichoderma* 菌株组成第二类。在第二类中 ,*T. inhamatum* 的 Ti2 聚为一类 ;*T. anam. Hypocrea vinosa* 的 2 个菌株(T208、T204)聚在一起 ,并与 *T. harzianum* 的 Th2 再聚为一类 ;*T. harzianum* Th1 的 3 个菌株(T005、T212、T251)、Th6 的 2 个菌株 (T039、T209)分别聚成一类 ;*T. harzianum* Th5 的 2 个菌株(T220、T221)和 Th1 的 1 个菌株(T240)聚为一类。

从聚类图可知 ,*Hypocrea nigricans* 与 *T. harzia-num*、*T. anam. Hypocrea vinosa* 的遗传距离较远 ,并且 *T. harzianum* 在遗传上是有分化的。

3 讨论

Rifa(1969)将分生孢子梗顶端部分不育和形成典型成簇的矮胖瓶状产孢细胞的木霉描述为 *T. hamatum*。Bissett(1991a ,b)将 *T. hamatum* 归入 *Pachybasium* 组 ,仅含产生钩状不育菌丝的种 ,新建 10 个种。rDNA 序列证明 *T. hamatum* 可区分为 2 个群 ,这 2 个群的序列差异非常大 ,包括新模式菌株 (DAOM 167057)的群与 *Trichoderma* 组的 *T. konin-gii*、*T. viride*、*T. atroviride*相近 ;而另外一个群则与

图2 6个引物的 RAPD 图谱。从左至右分别为: Marker、water、T337、T208、T204、T187、T182、T220、T221、T230、T202、T231、T203、T212、T251、T005、T186、T240、T039、T209、Marker

Fig.2 RAPD patterns of six primes. Lanes left to right represent: Marker、water、T337、T208、T204、T187、T182、T220、T221、T230、T202、T231、T203、T212、T251、T005、T186、T240、T039、T209, and Marker, respectively.

图3 根据 RAPD 结果由 RAPDistance 转换成距离矩阵, 由 PHYLIP 3.62 中的 NEIGHBOR 程序 (UPGMA 法) 计算产生的系统树

Fig.3 Phylogenetic tree generated by RAPDistance program and NEIGHBOR program of PHYLIP 3.62

Pachybasium 组的 *T. virens* 相近(Kuhls *et al.* , 1997)。同工酶分析也证明 ,具钩状不育菌丝的 *T. hamatum* 与 *T. virens* 相近(Stasz *et al.* , 1989)。Samuels *et al.* (1999)研究发现 *T. hamatum* 的新模式种 DAOM167057 与 *T. asperellum* 亲缘关系很近。本研究证实 *T. hamatum* 的新模式菌株 DAOM167057 与 *T. asperellum* 亲缘关系很近 ,并且与 *Trichoderma* 组的 *T. koningii*、*T. viride*、*T. atroviride* 归于同一个群(A 群) ,因此应将具钩状不育菌丝的 *T. hamatum* 归属于 *Trichoderma* 组 ,或将 *T. asperellum*、*T. koningii*、*T. viride*、*T. atroviride* 都归于 Pachybasium 组。有性型 T261 培养产生的无性型菌株也具有钩状不育菌丝延长物 ,培养性状和形态特征与其他 *T. asperellum* 的菌株有较大差异 ,而类似于 *T. hamatum* ,ITS 序列与 *T. asperellum* 的模式标本和其他的 *T. asperellum* 的菌株很近。由此可见 , ITS 区域的序列不足以区分 *T. hamatum* 与 *T. asperellum* ;不同种的菌株可能存在很相近的 ITS 序列 ,为达到区分种的目的还需探索更为可靠的分子性状。

Rifaï(1969)将形成复杂树状分枝和产生椭圆形至长方形分生孢子的木霉描述为 *T. koningii*。Bissett(1991)将 *T. koningii* 归入 *Trichoderma* 组 ,并强调了它的遗传异质性。Lieckfeldt *et al.*(1998)通过形态和分子特征(PCR 指纹、rDNA RFLP、rDNA ITS1 和 ITS2 序列)分析了从土壤分离的 4 个菌株 ,并指定 CBS 457. 96 为新模式 ,同时发现它与 *Trichoderma* 组的 *T. atroviride*、*T. viride* 相近。本研究证实 *T. hamatum* 的遗传异质性 ,菌株 T314 与 *T. hamatum* 存在一定的差异。

T. atroviride 的分生孢子梗分枝方式、瓶梗形状和大小与 *T. viride* 和 *T. asperellum* 相似 ,但 *T. atroviride* 的分生孢子光滑 ,而 *T. viride* 和 *T. asperellum* 的分生孢子有纹饰 ,与 *T. harzianum* 的分生孢子相似 ,但 *T. atroviride* 以分生孢子梗弯曲而区别于 *T. harzianum*。有性型 T260 培养产生的无性型也具有钩状不育菌丝延长物 ,培养性状和形态特征与其他 *T. atroviride* 菌株有较大的差异 ,而 ITS 则与包括模式标本 CBS351. 93 在内的 *T. atroviride* 的菌株很近。同时还发现 *T. atroviride* 菌株 DAOM165782 与其他包括模式种在内的 *T. atroviride* 菌株在 ITS 上也存在一定的差异 ,这反映出 *T. atroviride* 的遗传异

质性。

T. harzianum 存在很大的遗传差异 ,在承认 *T. harzianum* TH3 与 *T. atroviride* 是同一个种(Dodd *et al.* , 2000 ; Ospina-Giraldo *et al.* , 1998 , 1999)的情况下 , *T. harzianum* 的菌株在 ITS 序列上至少可归属于 5 个不同的群。对这些菌株的 RAPD 研究也得到了基本一致的结果 ,显示出 *T. harzianum* 在遗传上的异质性。研究同时认为包括新模式在内的 *T. harzianum* Th5 与 *T. inhamatum* 的模式在内的 Ti1 群及 *Hypocrea nigricans* 的菌株在 ITS 系统树上处于同一分支中 ,而 RAPD 则显示有性型 *Hypocrea nigricans* 的菌株与其他 *T. harzianum* 菌株较远 ,因此这三者是不同的 ,但亲缘关系较近。而 *T. inhamatum* Ti2 群在 RAPD 和 ITS 上均形成在一个单独分支中 ,因此认为 *T. inhamatum* 也存在一定的遗传多样性。*T. harzianum* Th2、*T. harzianum* Th4 和 *T. anam. vinosa* 在 ITS 系统树上处在同一分支中 ,表明这三者的相似性。同样认为 *T. harzianum* Th1 和 *T. harzianum* Th6 和 *Hypocrea nigricans* 的 1 个菌株在 ITS 系统树上处于同一分支中 ,而 RAPD 则显示有性型 *Hypocrea nigricans* 的菌株与其他 *T. harzianum* 菌株较远 ,因此这三者是不同的 ,但亲缘关系较近。综上所述 , *T. harzianum* 是一个复合种 ,存在着很高水平的遗传多样性。同时 ITS、RAPD 还不足以提供足够的信息来解释 *T. harzianum* 复合种各个群体与相似种 *T. inhamatum*、*T. anam. Hypocrea vinosa* 的系统发育关系 ,需要更多的分子标记来补充 rDNA 序列信息的不足 ;同时对由分子数据产生的系统树必须进行相合性(congruence)研究(Dodd 2000) ,以提供充分的信息来解决 *T. harzianum* 及近缘各种的系统发育关系问题。

参考文献

Bissett J, 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II . In-frageneric classification. *Canadian Journal of Botany*, **69**: 2357 ~ 2372
Bissett J, 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III . Section Pachybasium. *Canadian Journal of Botany*, **69**: 2373 ~ 2417
Dodd S L, R N Crowhurst, A G Rodrigo, G J Samuels, R A Hill and A Stewart, 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, **104**(1): 23 ~ 34
Felsenstein J, 1989. PHYLIP-Phylogeny Inference Package

- (Version 3.2). *Cladistics*, **5**: 164 ~ 166
- Fujimori F and T Okuda, 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. *The Journal of Antibiotics*, **47**: 173 ~ 182
- Gams W and J Bissett, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: C P Kubicek and G E Harman (eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (Vol. 1): *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis Ltd., London, 3 ~ 34
- Gams W and W Meyer, 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*? *Mycologia*, **90**: 904 ~ 915
- Grondona I, R Hermosa, M Tejada, M D Gomis, P F Mateos, P D Bridge, E Monte and I Garcia-Acha, 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (8): 3189 ~ 3198
- Hermosa M R, I Grondona, E A Iturriaga, J M Diaz-Minguez, C Castro, E Monte and I Garcia-Acha, 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (5): 1890 ~ 1898
- Kindermann J, T El-Ayouti, G Samuels and C P Kubicek, 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology*, **24** (3): 298 ~ 309
- Kuhls K, E Lieckfeldt, G J Samuels, W Meyer, C P Kubicek and T Borner, 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, **89**: 442 ~ 460
- Kullnig C M, T Krupica, S L Woo, R L Mach, M Rey, T Benitez, M Lorito and C P Kubicek, 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, **105**: 770 ~ 772
- Lieckfeldt E, G J Samuels, T Borner and W Gams, 1998. *Trichoderma koningii*: neotypification and *Hypocrea* teleomorph. *Canadian Journal of Botany*, **76**: 1507 ~ 1522
- Muthumeenakshi S, P R Mills, A E Brown and D A Seaby, 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, **140**: 769 ~ 777
- Muthumeenakshi S, A E Brown and P R Mills, 1998. Genetic comparison of the aggressive weed mould strains of *Trichoderma harzianum* for mushroom compost in North America and the British Isles. *Mycological Research*, **102**: 385 ~ 390
- Ospina-Giraldo M D, D J Royse, X Chen and C P Romaine, 1998. Phylogenetic relationships of *Trichoderma harzianum* causing mushroom green mold in Europe and North America to other species of *Trichoderma* from world-wide sources. *Mycologia*, **90**: 76 ~ 81
- Ospina-Giraldo M D, D J Royse, X Chen and C P Romaine, 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotypes of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. *Phytopathology*, **89**: 308 ~ 313
- Rifai M A, 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, **116**: 1 ~ 56
- Samuels G J, E Lieckfeldt, H I Nirenberg, 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia*, **51**(1): 71 ~ 88
- Stasz T E, K Nixon, G E Harman, N F Weeden and G A Kuter, 1989. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. *Mycologia*, **81**: 391 ~ 403
- Turocz G, C Fekete, Z Kerenyi, R Nagy, A Pomazi and L Horvok, 1996. Biological and molecular characterization of potential biocontrol strains of *Trichoderma*. *Journal of Basic Microbiology*, **36**: 63 ~ 72
- White T J, T Bruns, S Lee and J Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M A Innis, D H Gelfand, J J Sninsky and T J White(eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 315 ~ 322
- Zhang C-L(章初龙) and T Xu(徐同), 2000. Development of the research of classification of *Trichoderma* Pers. *Journal of Yunnan Agricultural University*(云南农业大学学报), **15**(3): 269 ~ 274 (in Chinese)
- Zimand G, L Valinsky, Y Elad, I Chet and S Manulis, 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research*, **98**(5): 531 ~ 534
- Zhu H(朱衡), F Qu(瞿峰), L H Zhu(朱立煌), 1994. Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), **13**: 34 ~ 40. (in Chinese)

(责任编辑:时意专)