

## 论著

基于内转录间隔区和 $\beta$ -微管蛋白部分基因及相关序列扩增多态性分子标记技术推断红曲霉系统发育关系王美美<sup>1</sup>, 张建中<sup>2</sup>, 李凤琴<sup>1</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206)

**摘要:**目的 基于内转录间隔区(ITS)、 $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tubulin)部分基因和相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记技术结合形态学鉴定方法,推断不同种红曲霉的系统发育关系,寻找快速、准确鉴定红曲霉的方法。方法 以红曲霉基因组为模板,聚合酶链式反应(PCR)扩增红曲霉 ITS、 $\beta$ -tubulin 部分基因,利用 Mega 7.0 软件中最大似然树法构建进化树,扩增 SRAP 分子标记技术的特征结合序列,利用 R 软件 phangorn 包中的 FigTree 软件进行建树,使用除权配对(UPGMA)法进行聚类分析,通过分析不同种红曲霉系统发育关系,找寻快速、准确的鉴定方法。结果 利用 ITS 和  $\beta$ -tubulin 部分基因可将 31 株供试菌株分为两大类,而 SRAP 分子标记技术可将供试菌株分为四大类,结合表型分析和 3 种分子鉴定方法,参照 15 株红曲霉参考菌株将 16 株未鉴定到种的红曲霉分别鉴定为安卡红曲霉、橙色红曲霉和紫色红曲霉。结论 SRAP 分子标记技术具有更多的分类依据,结合表型分析能够帮助更快、更精确的将红曲霉鉴定到种。

**关键词:** 内转录间隔区;  $\beta$ -微管蛋白; 相关序列扩增多态性分子标记技术; 红曲霉; 系统发育; 菌种鉴定

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2018)06-0563-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.06.003

### Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using internal transcribed space, partial $\beta$ -tubulin gene and sequence-related amplification polymorphism markers

WANG Meimei<sup>1</sup>, ZHANG Jianzhong<sup>2</sup>, LI Fengqin<sup>1</sup>

(1. NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

**Abstract: Objective** Based on the sequence-related amplification polymorphism (SRAP) technology and the sequence similarity of internal transcribed space (ITS),  $\beta$ -tubulin and combined with morphological identification method, the phylogenetic relationships of different species of *Monascus* were inferred and a reliable method for rapid and accurate identification of *Monascus* was developed. **Methods** Using the *Monascus* genome as template, ITS and partial  $\beta$ -tubulin gene sequence were amplified and sequenced. Phylogenetic tree was constructed by using the maximum likelihood method with Mega 7.0 software. SRAP specific binding sequences were also amplified and the phylogenetic tree was built by using unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) algorithm with FigTree software in R phangorn package. A rapid and reliable identification method was built by analyzing the phylogenetic relationships of different species of *Monascus*. **Results** Combined with phenotypic analysis and two molecular identification method, 16 strains of *Monascus* was identified as *Monascus anka*, *Monascus aurantiacus* and *Monascus purpureus*. **Conclusion** SRAP identification method had more detailed classification basis and could identify *Monascus* species quickly and accurately when combined with phenotypic analysis.

**Key words:** Internal transcribed space;  $\beta$ -tubulin; sequence-related amplification polymorphism technology; *Monascus*; phylogeny; species identification

红曲霉在亚洲应用十分广泛,常被用于生产红曲米,该产品以红曲为名被人熟知。红曲霉产生的次级代谢产物(色素、莫纳可林、 $\gamma$ -氨基丁酸、固醇类、异黄酮、不饱和脂肪酸等)还可作为食品添加剂、保健品、药品及化妆品应用于各个行业<sup>[1-4]</sup>。依

收稿日期:2018-11-14

作者简介:王美美 女 助理研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: wangmeimei@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

据培养表型特征,约有9种红曲霉[丛毛红曲霉(*M. pilosus*)、红色红曲霉(*M. ruber*)、紫色红曲霉(*M. purpureus*)、佛罗里达红曲霉(*M. floridanus*)、早生红曲霉(*M. eremophilus*)、苍白红曲霉(*M. pallens*)、血红红曲霉(*M. sanguineus*)、新月弯孢红曲霉(*M. lunisporas*)、阿根廷红曲霉(*M. argentinensis*)]被国际广泛认可<sup>[5-10]</sup>,然而文献中所记录的红曲霉已多达20种<sup>[11]</sup>。至今红曲霉的分类仍然没有明确标准,特别是属以下种的分类,且国内很多应用广泛的种并未被国际熟知认可,某些独立的种仍有争议。为了促进红曲霉属内新菌种的发现和管理,保护红曲霉育种权利,急需建立一套完善的红曲霉鉴定分类方法体系。

分子生物学技术是十分有效的鉴定真菌分类的手段,也是对传统形态学和生化方法的鉴定补充。目前应用于红曲霉分子生物学鉴定的主要技术包括聚合酶链式反应(PCR)扩增红曲霉 rRNA 大亚基(large subunit, LSU)基因的 D1/D2 区<sup>[12]</sup>,通过同源性比较分类鉴定;PCR 扩增红曲霉内转录间隔区(internal transcribed space, ITS)<sup>[13]</sup>;红曲霉 $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tubulin)、钙调蛋白(CaM)管家基因的同源性比对<sup>[14]</sup>;随机扩增多态性 DNA 标记(polymerase chain reaction, RAPD)、简单重复序列多态性(inter-simple sequence repeat, ISSR)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplification polymorphism, SRAP)的分子标记技术<sup>[15-16]</sup>。传统的形态学鉴定技术受培养条件影响较大,而利用分子生物学技术对红曲霉进行属内种间鉴定仍存较大争议,单纯使用一种方法对红曲霉进行分类鉴定仍然无法满足红曲霉的鉴定需求,特别是红曲霉食药菌种数目和种类的扩增成为红曲霉分类鉴定的有力挑战,因此综合多种技术选取准确、快速的分类鉴定方法,对完善红曲霉的分类鉴定具有重要意义。

本研究以形态学分类鉴定为基础,利用 ITS、 $\beta$ -tubulin 部分基因和 SRAP 分子标记技术分析 31 株红曲霉的系统发育关系及物种多样性,并将其中实验室保藏的 16 株红曲霉鉴定到种,通过比较各方法的分类结果,寻找快速鉴定红曲霉的方法,为红曲霉的分类鉴定提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

本研究所涉及的 31 株红曲霉菌株(见表 1)分别来自国家菌种保藏单位(表中编号为 1~15 的菌株)和科研机构、生产厂家赠送(表中编号为 16~31

的菌株,共 16 株未鉴定到种),表 1 中编号为 32~41 的菌株为美国国立生物技术信息中心(NCBI)发布 ITS 序列对应菌株,编号为 42~46 的菌株为 NCBI 发布  $\beta$ -tubulin 序列对应菌株。大肠埃希菌感受态 DH5 $\alpha$  及载体 pMD18-T 均购自日本 Takara。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 仪、电泳仪均购自美国 Bio-Rad,核酸测定仪、凝胶成像仪均购自德国 Eppendorf,研磨仪,培养箱,显微镜。

DNA 聚合酶(北京全式金生物),DNA Marker、DNA 纯化试剂盒均购自天根生化科技公司,植物基因组提取试剂盒(德国凯杰),DNA 连接酶(日本 Takara),引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,测序由赛默飞世尔科技有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株培养及表型观察

制备马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)固体试管斜面,接种适量红曲霉孢子,28℃培养7~10d,待孢子长满斜面,每个试管加入3ml孢子洗液,将洗脱下的孢子(约6ml)接种到50ml/瓶葡萄糖酵母浸膏(MPPY)菌丝生长培养基中,28℃150r/min于摇床中培养48h。

将纯化的红曲霉测试菌株分别点种麦芽汁(Wa)、查氏酵母琼脂(CYA)和甘油硝酸盐琼脂(G25N)平板培养基,25℃培养7d,观测其表型形态及显微形态,参照《红曲菌的形态与分类学》<sup>[11]</sup>进行表型鉴定。

#### 1.2.2 基因组 DNA 的提取

利用布氏漏斗抽干菌丝体,取适量菌丝体通过研磨仪破碎(菌丝量湿重以 $\leq 1$ g为宜),参照植物基因组提取试剂盒方法,利用硅胶膜离心柱,制备红曲霉基因组 DNA,将所提 DNA 经全自动核酸测定仪分析其浓度。

#### 1.2.3 PCR 及 DNA 测序

ITS 及  $\beta$ -tubulin 部分基因序列的扩增引物见表 2,ITS 的扩增采用通用引物 ITS1/ITS4,扩增体系 25  $\mu$ l,反应体系为 DNA 模板 1  $\mu$ l, 2  $\times$  SuperMix Buffer 12.5  $\mu$ l,引物各 1  $\mu$ l,最后以 ddH<sub>2</sub>O 补齐总体积至 25  $\mu$ l。反应条件为:94℃预变性 3 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 90 s, 共 35 个循环;72℃延伸 5 min,于 4℃保存。 $\beta$ -tubulin 部分基因序列的引物设计及扩增参照文献<sup>[14]</sup>,体系各组分分配比与 ITS 相同,扩增条件为:94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 2 min, 72℃延伸 2 min, 共 30 个循环;72℃延伸 5 min,于 4℃保存。

表1 菌株及相应序列信息

Table 1 Strains and corresponding sequence information

编号	菌株	种	来源/分离源	ITS 序列号	β-tubulin 序列号
1	CGMCC 3. 4452	巴克红曲霉 ( <i>M. barkeri</i> )	日本,—	MK087171	MK091718
2	CGMCC 3. 5834	巴克红曲霉 ( <i>M. barkeri</i> )	法国,—	MK087173	MK091721
3	CGMCC 3. 4617	安卡红曲霉 ( <i>M. anka</i> )	中国,大麴	MK087172	MK091719
4	CGMCC 3. 4811	安卡红曲霉 ( <i>M. anka</i> )	中国,红曲米	MK087145	MK091720
5	CGMCC 3. 15740	火红色红曲霉 ( <i>M. rutilus</i> )	中国,大麴	MK087174	MK091722
6	CGMCC 3. 0888	火红色红曲霉 ( <i>M. rutilus</i> )	中国,大麴	MK087166	MK091710
7	CGMCC 3. 0897	丛毛红曲霉 ( <i>M. pilosus</i> )	中国,大麴	MK087168	MK091711
8	CICC 40710	丛毛红曲霉 ( <i>M. pilosus</i> )	中国,食品	MK087175	MK091723
9	CGMCC 3. 2160	烟色红曲霉 ( <i>M. fuliginosus</i> )	中国,发酵醪	MK087170	MK091715
10	CGMCC 3. 1098	烟色红曲霉 ( <i>M. fuliginosus</i> )	中国,茅台酒曲	MK087169	MK091713
11	CGMCC 3. 2839	锈色红曲霉 ( <i>M. rubiginosus</i> )	中国,—	MK087147	MK091716
12	CGMCC 3. 2093	烟灰色红曲霉 ( <i>M. fumeus</i> )	中国,发酵醪	MK087146	MK091714
13	CGMCC 3. 4384	橙色红曲霉 ( <i>M. aurantiacus</i> )	中国,大麴	MK087149	MK091717
14	CGMCC 3. 978	紫色红曲霉 ( <i>M. purpureus</i> )	中国,—	MK087150	MK091712
15	GMCC 3. 568	发白红曲霉 ( <i>M. albidulus</i> )	中国,小麦麴	MK087167	MK091709
16	SJS-1	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087151	MK091724
17	SJS-2	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087152	MK091725
18	SJS-3	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087165	MK091726
19	SJS-6	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087153	MK091727
20	SJS-8	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087154	MK091728
21	SJS-11	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087148	MK091729
22	SJS-12	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087155	MK091730
23	SJS-13	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087156	MK091731
24	SJS-14	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087157	MK091732
25	SJS-15	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087158	MK091733
26	SJS-16	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087159	MK091734
27	SJS-17	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087160	MK091735
28	SJS-18	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087161	MK091736
29	SJS-19	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087162	MK091737
30	SJS-20	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087163	MK091738
31	SJS-21	红曲霉 ( <i>Monascus</i> sp.)	实验室保藏	MK087164	MK091739
32	JCM 22619	紫色红曲霉 ( <i>M. purpureus</i> )	JCM	JN942661	—
33	JCM 22614	红色红曲霉 ( <i>M. ruber</i> )	JCM	JN942658	—
34	CBS 135. 60	红色红曲霉 ( <i>M. ruber</i> )	CBS	KY635850	—
35	<i>M. anka</i>	安卡红曲霉 ( <i>M. anka</i> )	韩国,—	AF458473	—
36	CBS 286. 34	丛毛红曲霉 ( <i>M. pilosus</i> )	CBS	KY635852	—
37	<i>M. fumeus</i> N1	烟灰色红曲霉 ( <i>M. fumeus</i> )	中国,汾酒大曲	FJ974048	—
38	<i>M. fumeus</i>	烟灰色红曲霉 ( <i>M. fumeus</i> )	中国,—	JF776162	—
39	<i>M. fuliginosus</i> MY11	烟色红曲霉 ( <i>M. fuliginosus</i> )	中国,大麴	HM188446	—
40	<i>M. fuliginosus</i> Q5	烟色红曲霉 ( <i>M. fuliginosus</i> )	中国,大麴	HM188443	—
41	IMI 82587	佛罗里达红曲霉 ( <i>M. floridanus</i> )	中国,—	AY629418	—
42	BCRC 33309	巴克红曲霉 ( <i>M. barkeri</i> )	BCRC	—	DQ299895
43	BCRC 33310	佛罗里达红曲霉 ( <i>M. floridanus</i> )	BCRC	—	DQ299896
44	ATCC 16384	红色红曲霉 ( <i>M. ruber</i> )	ATCC	—	AY498592
45	CICC 40269	紫色红曲霉 ( <i>M. purpureus</i> )	CICC	—	KP259286
46	CICC F1B	丛毛红曲霉 ( <i>M. pilosus</i> )	CICC	—	KT075275

注:—表示无参考信息;CGMCC:中国普通微生物菌种保藏管理中心;CICC:中国工业微生物菌种保藏管理中心;JCM:日本微生物保藏中心;CBS:荷兰微生物菌种保藏中心;BCRC:台湾生物资源保存及研究中心;ATCC:美国典型菌种保藏中心

将扩增得到的产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测条带大小,DNA 纯化试剂盒纯化后连接载体 pMD18-T 并转化大肠埃希菌 DH5α,挑选阳性转化子送样测序,序列信息提交至 GenBank,相关序列号见表 1。

1.2.4 ITS 和 β-tubulin 部分基因序列比对及进化树构建

应用 Mega 7.0 软件中 Alignment Explorer 模块

的 Align by ClustaW 对 ITS 与 β-tubulin 部分基因进行多序列比对,去除比对结果 5' 和 3' 端未比对上的区域,采用最大似然树(maximum likelihood, ML)法构建系统发育树。

1.2.5 SRAP 的扩增及数据分析

依据表 2 中所列 SRAP 正反向引物,采用其中 7 对(me1-em2、me1-em4、me1-em5、me2-em4、me3-

表2 ITS、 $\beta$ -tubulin 部分基因及 SRAP 多态性扩增的引物序列

Table 2 Primer sequence used for ITS, partial  $\beta$ -tubulin gene and SRAP amplification

引物名称	序列(5'-3')
ITS1	CCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	CCTCCGCTTATTGATATGC
$\beta$ -tubulin-F	CAACTGGGCTAAGGGTCATT
$\beta$ -tubulin-R	GTGAACCTCCATCTCGTCCATA
me1	TGAGTCCAAACCGGATA
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
me4	TGAGTCCAAACCGGACC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
em2	GACTGCGTACGAATTTGC
em4	GACTGCGTACGAATTTGA
em5	GACTGCGTACGAATTAAC
em6	GACTGCGTACGAATTGCA

注:me1~me5为正向;em2、em4~em6为反向

em2、me3-em6、me4-em4)引物组合<sup>[17]</sup>,以31株(表1中编号为1~31的菌株)红曲霉基因组DNA为模板扩增,扩增体系:模板2  $\mu$ l,引物各1  $\mu$ l,2  $\times$  SuperMix Buffer 12.5  $\mu$ l,并以ddH<sub>2</sub>O补齐体系至25  $\mu$ l。扩增条件:94  $^{\circ}$ C预变性5 min,94  $^{\circ}$ C变性1 min,35  $^{\circ}$ C退火1 min,72  $^{\circ}$ C延伸1 min反应5个循环,94  $^{\circ}$ C变性1 min,50  $^{\circ}$ C退火1 min,72  $^{\circ}$ C延伸1 min反应35个循环,随后72  $^{\circ}$ C延伸10 min,并于4  $^{\circ}$ C保存。以1.5%的琼脂糖凝胶电泳,120 V电泳1 h,凝胶成像仪观测条带情况。

经琼脂糖凝胶电泳检测,选取特征条带较多的引物组合进行总条带和特征条带数统计,相同引

物扩增的产物中电泳迁移位置相同的条带认为属于相同结合位点,胶图中不同泳道位置相同的条带(强带或重复性好的弱带)赋值为1,无带赋值为0,依次记录电泳带谱,建立矩阵数据表,将图形信息转化为数据信息。红曲霉SRAP分析利用R软件phangorn包中的FigTree软件进行建树,使用除权配对(UPGMA)法对其进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 红曲霉的表型观察

对Wa、CYA和G25N固体平板25  $^{\circ}$ C培养7 d的菌落形态特征及Wa固体平板25  $^{\circ}$ C培养7 d的40倍显微镜下形态特征(分生孢子,闭囊壳,子囊孢子)进行观测,结果见表3。16株未鉴定到种的红曲霉经不同培养条件表型分析发现,红曲霉SJS-1、SJS-2、SJS-8、SJS-11~SJS-21与参考菌株CGMCC 3.978在Wa培养基培养条件下菌落直径约为25~30 mm,菌落平坦且有辐射纹,气生菌丝毡状,菌落中间橙色边缘白色,分生孢子球型或倒梨型,闭囊壳球状,子囊孢子椭圆形,大小约为6~7  $\mu$ m  $\times$  5~5.5  $\mu$ m,结合其在CYA和G25N培养基培养条件的形态学观察发现符合紫色红曲霉的形态学特征,因此初步认定上述菌株为紫色红曲霉。以相同的分析方法,红曲霉SJS-3与参考菌株CGMCC 3.4811符合安卡红曲霉的形态学特征,红曲霉SJS-6与参考株CGMCC 3.4384符合橙色红曲霉的形态学特征,因此初步认定16株未鉴定到种的菌株属于紫色红曲霉、安卡红曲霉和橙色红曲霉。

表3 16株红曲霉基于菌落形态特征的聚类结果

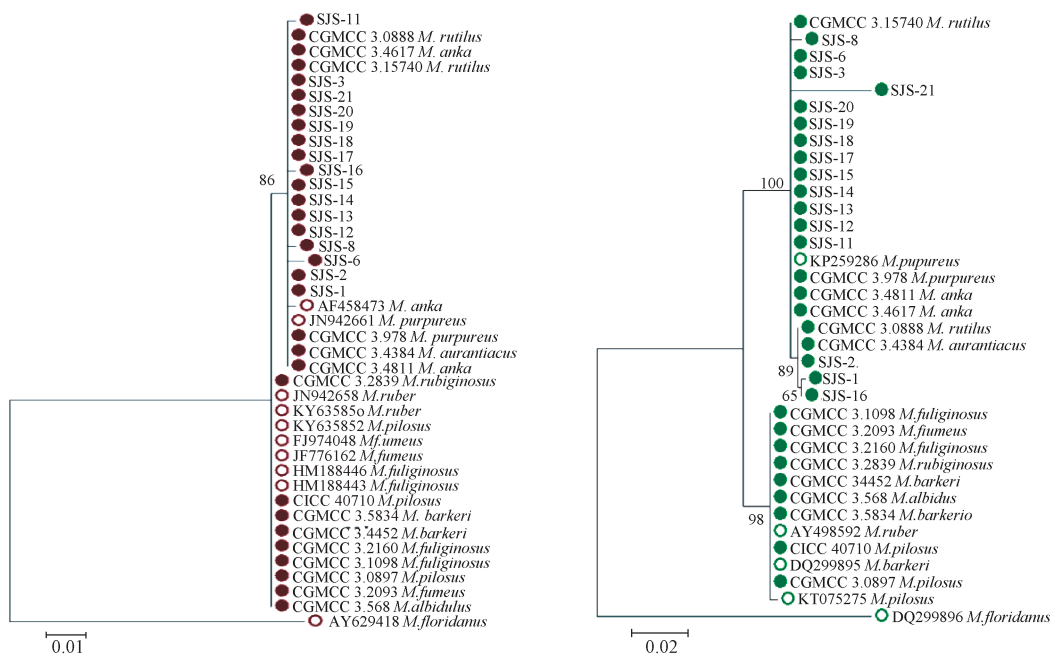
Table 3 Cluster results of 16 strains of *Monascus* based on morphological characteristics

菌株名称	种	菌落形态(25 $^{\circ}$ C培养7 d)			微观形态(Wa, 25 $^{\circ}$ C培养7 d)		
		Wa	CYA	G25N	分生孢子	闭囊壳	子囊孢子
SJS-1、SJS-2、SJS-8、SJS-11~SJS-21、CGMCC 3.978	紫色红曲霉 ( <i>M. purpureus</i> )	直径:25~30 mm 形状:平坦、有辐射纹 气生菌丝:毡状 颜色:中间橙色边缘白色	直径:17~20 mm 形状:平坦 气生菌丝:稀疏 颜色:白色或淡红色	直径:18~20 mm 形状:平坦 气生菌丝:丛卷毛状 颜色:白色	形状:倒梨型或球型 气生菌丝:单生或成链	形状:球状 颜色:无色或红色	形状:椭圆形 大小:6~7 $\mu$ m $\times$ 5~5.5 $\mu$ m
SJS-3、CGMCC 3.4811	安卡红曲霉 ( <i>M. anka</i> )	直径:18~22 mm 形状:疮疤状 气生菌丝:稀疏 颜色:落霞红或覆盆子红	直径:17 mm 形状:平坦 气生菌丝:稀疏 颜色:粉红色	直径:14 mm 形状:平坦 气生菌丝:稀疏 颜色:红色或深红色	形状:倒梨型或球型 气生菌丝:单生或成链 颜色:无色或红色	形状:球状 颜色:红色或橘色	形状:椭圆形 大小:6~7 $\mu$ m $\times$ 4~5 $\mu$ m
SJS-6、CGMCC 3.4384	橙色红曲霉 ( <i>M. aurantiacus</i> )	直径:33 mm 形状:隆起、中央开裂 气生菌丝:少量 颜色:浅铬黄色	直径:26~28 mm 形状:平坦 气生菌丝:丛卷毛状 颜色:白色	几乎不生长	形状:倒梨型 气生菌丝:单生	形状:球状	形状:卵形 大小:6~7 $\mu$ m $\times$ 4~5.5 $\mu$ m

## 2.2 ITS 和 β-tubulin 基因的数据统计与分析

利用 ITS1/ITS4 通用引物扩增获得 31 株红曲霉 ITS 序列,经琼脂糖凝胶电泳参照 DNA Marker 估算分子量大小约为 520 bp(胶图未展示),测序后利用 ML 法对 31 株供试菌株及 10 株来自 GenBank 数据库(表 1 中编号为 32 ~ 41 的菌株序列)中的 ITS 序列聚类分析,并构建系统发育树,见图 1(左)。4 145 个 ITS 数据集的平均遗传距离(D)为 0.010,由进化树结果分析发现,41 株红曲霉 ITS 序列分为 3 个大簇:红曲霉 SJS-1 ~ SJS-3、SJS-6、SJS-8、SJS-11 ~ SJS-21,火红色红曲霉 CGMCC 3.15740、CGMCC 3.0888,安卡红曲霉 CGMCC 3.4617、CGMCC 3.4811、AF458473,紫色红曲霉 CGMCC 3.978、JN942661,橙色红曲霉 CGMCC 3.4384 聚为

一簇,说明这 24 株红曲霉的亲缘关系较为相近,红曲霉 SJS-1 ~ SJS-3、SJS-6、SJS-8、SJS-11 ~ SJS-21 可能为紫色红曲霉、火红色红曲霉、安卡红曲霉和橙色红曲霉其中一种;红色红曲霉 JN942658、KY635850,丛毛红曲霉 KY635852、CICC 40710、CGMCC 3.0897,烟灰色红曲霉 FJ974048、JF776162、CGMCC 3.2093,烟色红曲霉 HM188446、HM188443、CGMCC 3.2160、CGMCC 3.1098,发白红曲霉 CGMCC 3.568,巴克红曲霉 CGMCC 3.4452、CGMCC 3.5834 和锈色红曲霉 CGMCC 3.2839 聚为一簇,说明上述菌株亲缘关系较近;而佛罗里达红曲霉 AY629418 单独聚为一簇,说明佛罗里达红曲霉相对其他两簇内红曲霉而言,亲缘关系相对较远。



注:实心圆为本试验供试菌株;空心圆为 NCBI 中的参考菌株

图 1 基于 ITS(左)和 β-tubulin(右)序列构建的 ML 系统发育树

Figure 1 Maximum likelihood phylogenetic tree based on ITS(left) and spartial β-tubulin(right) sequence tree

31 株红曲霉 β-tubulin 的部分基因通过 PCR 扩增获得,凝胶电泳(胶图未展示)显示片段大小约为 1 000 bp,通过 Mega 7.0 软件,采用与 ITS 的相同算法,对 31 株供试菌株和 5 株(表 1 中编号为 42 ~ 46 菌株序列)来自 GenBank 数据库中的红曲霉 β-tubulin 序列进行建树分析,结果见图 1(右)。35 个 β-tubulin 数据集的平均遗传距离为 0.018,其分类与 ITS 分类相似,同样分为 3 大类:红曲霉 SJS-1 ~ SJS-3、SJS-6、SJS-8、SJS-11 ~ SJS-21,火红色红曲霉 CGMCC 3.15740、CGMCC 3.0888,安卡红曲霉 CGMCC 3.4617、CGMCC 3.4811,紫色红曲霉 CGMCC 3.978、KP259286,橙色红曲霉 CGMCC 3.4384 聚为一簇;第二大类除包含与 ITS 第二类相

同的 9 株供试菌株外,还包括作为参考菌株的丛毛红曲霉 KT075275、巴克红曲霉 DQ299895 和红色红曲霉 AY498592;参考株佛罗里达红曲霉 DQ299896 作为簇外组,同样聚于两簇之外。

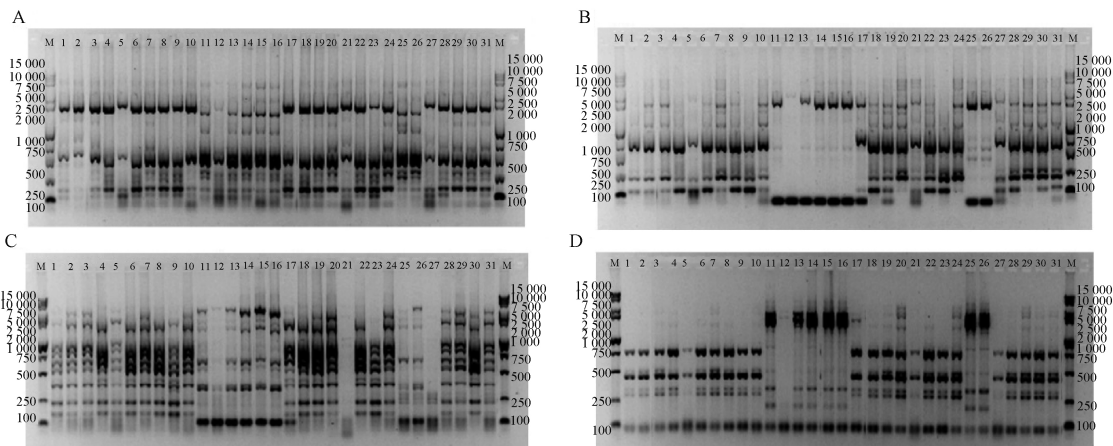
PARK 等<sup>[12]</sup>利用 ITS 和 β-tubulin 部分基因分析安卡红曲霉、紫色红曲霉、丛毛红曲霉和红色红曲霉的遗传进化关系发现,丛毛红曲霉和红色红曲霉尽管形态学上有明显差异,但分子生物学手段倾向于将两个种聚为一类,而安卡红曲霉和紫色红曲霉聚为另一类,这与本研究结果一致。图 1 的进化树结果虽然能够将不同种红曲霉分组,但相同种红曲霉(形态学上)仍然无法很好的聚为一簇或有更为相近的进化距离,由于环境压力和极端温度会增

加突变的几率,影响基因的多样性<sup>[17-18]</sup>,一些基因层面的突变并不能完全展现在表型上,红曲霉的分类可能存在表型和基因型鉴定不一致的情况,因此需建立更为精细和完善的红曲霉分类鉴定方法以利于将红曲霉鉴定到种。

### 2.3 SRAP 和基因多样性分析

利用筛选的 7 对 SRAP 引物对 31 株红曲霉基

因组进行扩增,扩增结果见图 2(部分结果展示),由图 2 结果计算得出 7 对引物扩增的条带大小分布在 100 ~ 7 500 bp 之间,经统计扩增的总条带数为 74 条,其中多态性条带为 63 条,多态性比率为 85.14%,每对引物平均可以扩增得到 10 个条带,说明所筛选的特征引物能够获得较多的多态性条带,可用于红曲霉指纹图谱的进一步分析。



注:A、B、C、D 分别为引物 me1-em2、me1-em4、me2-em4、me3-em6 产生的扩增图谱;M 为 DNA Marker;泳道 1、11~17、21、22、25~29 分别为参照菌株 CGMCC 3.4384、CGMCC 3.1098、CGMCC 3.0897、CGMCC 3.4452、CGMCC 3.5834、CGMCC 3.2160、CGMCC 3.568、CICC 40710、CGMCC 3.4811、CGMCC 3.15740、CGMCC 3.2839、CGMCC 3.2093、CGMCC 3.4617、CGMCC 3.0888 和 CGMCC 3.978;泳道 2~10、18~20、23~24、30~31 分别为红曲霉 SJS-14~SJS-16、SJS-3、SJS-18、SJS-19、SJS-21、SJS-8、SJS-17、SJS-1、SJS-13、SJS-20、SJS-6、SJS-2、SJS-11、SJS-12

图 2 31 株红曲霉基于 SRAP 分子标记技术的 PCR 扩增产物

Figure 2 Amplification products generated from tested strains with SRAP markers

扩增得到的指纹图谱用于进一步聚类分析,31 株供试菌株的 SRAP 利用 R 软件 phangorn 包中的 FigTree 软件进行建树,结果见图 3。由图 3 分析发现,利用 SRAP 分子标记技术可将 31 株供试菌株分为 4 个大簇,其中簇 I 包含了 2 株安卡红曲霉 (CGMCC 3.4811、CGMCC 3.4617) 和红曲霉 SJS-3,说明 SJS-3 可能为安卡红曲霉。簇 II 包含两个亚类,第一亚类包含红曲霉 SJS-6 和橙色红曲霉 CGMCC 3.4384,说明 SJS-6 可能为橙色红曲霉;第二亚类包含了火红色红曲霉 CGMCC 3.0888、CGMCC 3.15740,紫色红曲霉 CGMCC 3.978,及红曲霉 SJS-1、SJS-2、SJS-8 和 SJS-11~SJS-21,说明红曲霉 SJS-1、SJS-2、SJS-8 和 SJS-11~SJS-21 可能为火红色红曲霉或紫色红曲霉。簇 III 包含丛毛红曲霉 CICC 40710、CGMCC 3.0897。簇 IV 包含了巴克红曲霉 CGMCC 3.5834、CGMCC 3.4452,发白红曲霉 CGMCC 3.568,烟色红曲霉 CGMCC 3.2160、CGMCC 3.1098,锈色红曲霉 CGMCC 3.2839 和烟灰色红曲霉 CGMCC 3.2093,进化关系上显示簇 III 和簇 IV 菌株进化距离较为相近,且该簇结果与 ITS 和  $\beta$ -tubulin 基因聚类得到的结果较为一致。

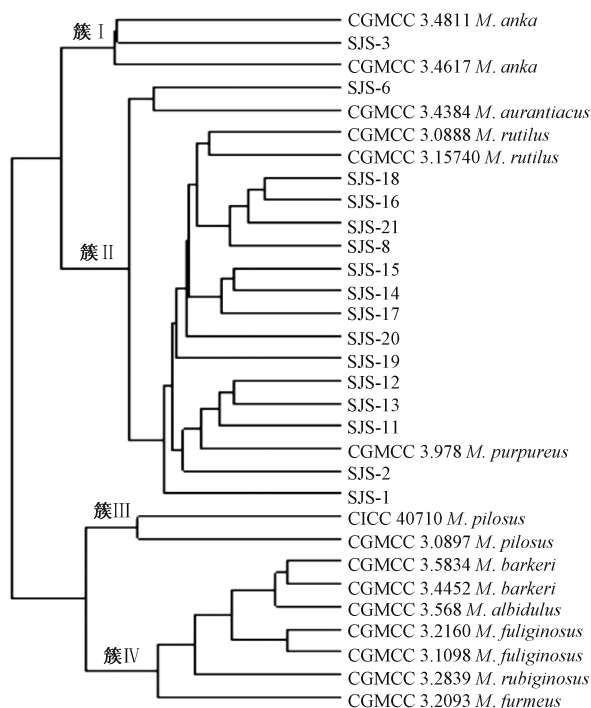


图 3 31 株供试菌株 SRAP 聚类分析图

Figure 3 Dendrograms of 31 *Monascus* strains based on simple matching matrix from SRAP markers

### 3 讨论

利用分子标记技术辅助形态学分类一直是真菌鉴定分类行之有效的手段,本研究采用两大分类技术4种方法,研究了31株红曲霉的遗传多样性,并将其中16株食品工业用红曲霉鉴定到种,通过表型研究表明,16株食品工业用红曲霉可能属于红曲霉属内的紫色红曲霉、安卡红曲霉和橙色红曲霉,经ITS和 $\beta$ -tubulin部分基因同源序列聚类分析发现,16株待鉴定菌株的确聚于含有火红色红曲霉、安卡红曲霉、紫色红曲霉和橙色红曲霉参照菌株的分类组中。利用SRAP分子标记技术聚类分析进一步确证了上述分析结果,红曲霉SJS-3与安卡红曲霉CGMCC 3.4811和CGMCC 3.4617聚为簇I,说明SJS-3为安卡红曲霉;红曲霉SJS-6与橙色红曲霉CGMCC 3.4384聚为簇II的其中一簇,说明SJS-6为橙色红曲霉;剩余的14株待鉴定菌株与紫色红曲霉CGMCC 3.978和火红色红曲霉CGMCC 3.0888、CGMCC 3.15740聚为簇II的另一簇,结合表型分析该14株红曲霉均被鉴定为紫色红曲霉。

依据ITS、 $\beta$ -tubulin部分基因和SRAP分子标记技术构建的进化树分析红曲霉的亲缘关系和遗传多样性发现:紫色红曲霉、橙色红曲霉、火红色红曲霉和安卡红曲霉在遗传进化关系上较为相近,聚在簇II的紫色红曲霉虽然都被鉴定为紫色红曲霉,但仍然进一步分为不同的三个亚簇,分析可能是因为菌株的地域来源不同,导致其种内的分子分型出现差异;烟色红曲霉、烟灰色红曲霉、发白红曲霉、锈色红曲霉、红色红曲霉、巴克红曲霉、丛毛红曲霉在亲缘关系上距离较近,红曲霉这两大簇的划分与SHAO等<sup>[19]</sup>利用SRAP和ISSR分子标记技术对红曲霉进行分类的结果一致;而佛罗里达红曲霉与这两簇红曲霉亲缘距离较远。

综上所述,利用ITS和 $\beta$ -tubulin部分基因可将31株红曲霉依据亲缘关系远近分为两大类,而同样基于PCR扩增的SRAP分子标记技术可将31株红曲霉分为4个大簇,其分类精细度要高于依赖于ITS和 $\beta$ -tubulin管家基因的分子生物学分类方法,且对红曲霉属内种的分类更为精细、准确,可能由于相较依赖某一基因或转录间区,基因组DNA范围内更多的特异性基因被标记并用于参与统计分类,因此SRAP分子标记技术具有更多的分类依据,结合表型分析能够帮助更快、更精确的将红曲霉鉴定到种。

### 参考文献

[1] ERDOĞRUL Ö, AZIRAK S. Review of studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*) [J]. Turkish Electronic J

Biotechnol, 2004, 2(1):37-49.

[2] LU W, XU X M. Research status and application prospects of *Monascus* sp. [J]. Agric Sci Technol, 2015, 16(1):192-196.

[3] SHAO Y C, LEI M, MAO Z J, et al. Insights into *Monascus* biology at the genetic level [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(9):3911-3922.

[4] CHEN W P, HE Y, ZHOU Y X, et al. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics [J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2015, 14(5):555-567.

[5] HAWKSWORTH D L, PITT J I. A new taxonomy for *Monascus* species based on cultural and microscopical characters [J]. Aust J Bot, 1983, 31(1):51-61.

[6] BARNARD E L, CANNON P F. A new species of *Monascus* from pine tissues in Florida [J]. Mycologia, 1987, 79(3):479-484.

[7] HOCKING A D, PITT J I. Two new species of xerophilic fungi and a further record of *Eurotium halophilicum* [J]. Mycologia, 1988, 80(1):82-88.

[8] UDAGAWA S I, BABA H. *Monascus unisporas*, a new species isolated from mouldy feeds [J]. Cryptogam Mycol, 1998, 19(4):269-276.

[9] CANNON P F, ABDULLAH S K, ABBAS B A, et al. Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to known species of the genus [J]. Mycol Res, 1995, 99(6):659-662.

[10] STCHIGEL A M, CANO J F, ABDULLAH S K, et al. New and interesting species of *Monascus* from soil, with a key to the known species [J]. Stud Mycol, 2004, 50(2):299-306.

[11] 李钟庆, 郭芳. 红曲菌的形态与分类学 [M]. 北京:中国轻工业出版社, 2003.

[12] PARK H G, JONG S C. Molecular characterization of *Monascus* strains based on the D1/D2 regions of LSU rRNA genes [J]. Mycoscience, 2003, 44(1):25-32.

[13] 杨成龙, 陈章娥, 吴小平, 等. 基因组ITS序列分析鉴定红曲霉菌株 [J]. 核农学报, 2015, 29(2):252-259.

[14] PARK H G, STAMENOVA E K, JONG S C, et al. Phylogenetic relationships of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial  $\beta$ -tubulin gene [J]. Bot Bull Acad Sin, 2004, 45(4):325-330.

[15] LIU L W, ZHAO L P, GONG Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers [J]. Sci Hort, 2008, 116(3):240-247.

[16] YANG C L, WU X P, CHEN B Z, et al. Comparative analysis of genetic polymorphisms among *Monascus* strains by ISSR and RAPD markers [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 97(2):636-640.

[17] KISHONY R, LEIBLER S. Environmental stresses can alleviate the average deleterious effect of mutations [J]. Journal of Biology, 2003, 2(2):14.

[18] SGRÒC M, HOFFMANN A A. Effects of temperature extremes on genetic variances for life history traits in *Drosophila melanogaster* as determined from parent-offspring comparisons [J]. J Evol Biol, 1998, 11(1):1-20.

[19] SHAO Y C, XU L, CHEN F S. Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers [J]. Mycoscience, 2011, 52(4):224-233.