

研究报告

系统聚类分析在镰刀菌鉴定中的应用

李多川 沈崇尧

(北京农业大学植保系, 北京 100094)

摘要 根据 Nelson, Toussoun & Marasas (1983) 的分类系统, 选取在 PDA 和 CLA 培养基上的 50 个编码性状, 利用系统聚类分析的平均连锁法, 初步建立了 30 种镰刀菌属 (*Fusarium*) 真菌为基础的计算机鉴定系统。用这个系统对玉米穗粒腐病上的三个未知菌株 (*Fusarium* sp. 1, *F.* sp. 2, *F.* sp. 3) 进行鉴定的结果表明, *F.* sp. 1 为 *F. graminearum*, *F.* sp. 2 为 *F. moniliforme*, *F.* sp. 3 为 *F. proliferatum* 或 *F. subglutinans*。从而证明此鉴定系统具备比较、鉴定性能。

关键词 镰刀菌属; 系统聚类分析; 计算机鉴定系统

数值分类法引入微生物研究领域是英国细菌学家 Sneath 50 年代开创的。60 年代他又建立了很多分类分析方法, 为微生物数值分类奠定了基础^[1]。1964 年, Procter & Kendrick 首次把数值分类法运用到半知菌研究^[2]。由于数值分类法是根据尽可能多的性状、状态所反映的信息, 借助于数学方法和计算机技术进行比较分析, 因此它在分类关系的估价、类元的建立、分类单位的鉴定和分类性状的评价上是客观的、明确的和可重复的。数值分类法已作为一个新的手段被许多真菌学家所接受。

真菌中的镰刀菌属 (*Fusarium*) 是半知菌中分类鉴定最困难和经济意义最大的属之一。由于镰刀菌形态复杂, 又易受外界环境的影响而发生变异, 致使镰刀菌的分类和鉴定具有很大的人为性。不同的学者在鉴定同一菌株时会产生不同的结果。有鉴于此, 国内外对镰刀菌的分类和鉴定应用了很多新的方法, 但尚未见到用数值分类法进行研究的报道^[3]。为使镰刀菌的分类和鉴定客观、快速、简便、准确, 本文以 Nelson, Toussoun & Marasas (1983) 的分类系统为基础^[4], 用数值分类方法, 对 30 种常见镰刀菌的计算机鉴定系统和应用进行了初步研究。

材料和方法

(一) 供试菌种

已知菌种选自 Nelson 等描述的 30 个种,

未知菌种由作者从玉米穗粒腐病上分离获得, 共 36 个运筹分类单位 (Operational Taxonomic Unit, 简称为 OTU) (表 1)。

表 1 供试的 36 个运筹分类单位

编号	学名	编号	学名
1	<i>Fusarium aquaeductum</i>	19	<i>F. reticulatum</i>
2	<i>F. merismoides</i>	20	<i>F. sambucinum</i>
3	<i>F. dimerum</i>	21	<i>F. culmorum</i>
4	<i>F. decemcellulare</i>	22	<i>F. graminearum</i>
5	<i>F. nivale</i>	23	<i>F. crookwellense</i>
6	<i>F. poae</i>	24	<i>F. lateritium</i>
7	<i>F. tricinctum</i>	25	<i>F. moniliforme</i>
8	<i>F. sporotrichioides</i>	26	<i>F. proliferatum</i>
9	<i>F. chlamyosporum</i>	27	<i>F. subglutinans</i>
10	<i>F. graminum</i>	28	<i>F. anthophilum</i>
11	<i>F. avenaceum</i>	29	<i>F. oxysporum</i>
12	<i>F. semitectum</i>	30	<i>F. solani</i>
13	<i>F. camptoceras</i>	31	<i>F.</i> sp. 1
14	<i>F. equiseti</i>	32	<i>F.</i> sp. 1
15	<i>F. scirpi</i>	33	<i>F.</i> sp. 2
16	<i>F. acuminatum</i>	34	<i>F.</i> sp. 2
17	<i>F. longipes</i>	35	<i>F.</i> sp. 3
18	<i>F. heterosporum</i>	36	<i>F.</i> sp. 3

(二) 性状选取、测定和编码

已知菌种的性状来源于 Nelson 等的专著, 未知菌种的性状由作者根据 Nelson 等介绍的方法测得。为了估计种内和种间相似性值, 每个未知菌种用同一单胞菌系的两个菌株。根据

Nelson 等分类系统中的分类性状, 确定了 20 个性状。其中二态性状 7 个, 多态性状 10 个, 数量性状 3 个 (表 2)。二态性状用二元性状编码, 多态性状转化成二态性状后再按二元性状编码, 数量性状分等级后用数值表示。上述性状编码后, 即得到一个 36 (运筹分类单位) \times 50 (编码性状) 的原始数据矩阵。

(三) 系统聚类分析

首先对原始数据矩阵进行标准化, 得标准化数据矩阵; 相似性系数用欧氏距离, OTU 间按欧氏距离计算, 得到 OTU 间距离矩阵; 最后对各 OTU 进行聚类。本研究采用系统聚类分析中应用最广泛的类平均法。运算过程用 Basic 语言编写程序, 在长城 0520 型计算机上运算。

表 2 运筹分类单位的鉴定性状及性状状态

编号	性状	编码类型	性状状态
1	菌丝生长速度	数量性状	小于 3cm, 大于 3cm 小于 7cm, 大于 7cm
2	气生菌丝有无	二态性状	有, 无
3	气生菌丝颜色	多态性状	白色, 白色到淡桔黄色, 黄褐色到褐色, 胭脂红色, 淡紫色
4	菌落底部颜色	多态性状	无色到奶油色, 奶油色到鲜桔黄色, 黄褐色到胭脂红色, 黄褐色到褐色, 黄褐色到桔黄色, 胭脂红色, 淡紫色到深紫色
5	分生孢子座有无	二态性状	有, 无
6	孢子堆分布	多态性状	分散在整个菌落表面, 集中在菌落中心
7	孢子堆颜色	多态性状	奶油色, 黄褐色, 桔黄色, 红褐色, 奶油色到黄色, 苍白色到桔黄色, 黄褐色到桔黄色, 蓝绿色到蓝色
8	大孢子隔膜数	数量性状	1-2 隔, 3-7 隔, 8-9 隔
9	大孢子宽度	数量性状	小于 5 μ m, 大于 5 μ m
10	厚壁大孢子有无	二态性状	有, 无
11	大孢子弯曲度	多态性状	直, 弯曲, 强烈弯曲
12	纺锤形大孢子有无	二态性状	有, 无
13	顶细胞形状	多态性状	鞭毛状, 乳头状, 钩状
14	基细胞形状	多态性状	足形, 乳头状
15	小孢子有无	二态性状	有, 无
16	小孢子着生方式	多态性状	成链, 假头式
17	小孢子小形状	多态性状	球形, 卵圆形, 梨形, 椭圆形, 棒形, 纺锤形
18	多瓶梗有无	二态性状	有, 无
19	厚壁孢子有无	二态性状	有, 无
20	厚壁孢子着生方式	多态性状	单生, 串生

结 果

36个 OTU's 的聚类分析结果(表3, 图1)显示:

1. 种内聚类的最大相似性值为 1.3844, 种间聚类的最小相似性值为 1.5000, 平均为 1.4422. 因此, 种内相似性距离小于 1.4422, 种间相似性距离大于 1.4422.

2. 36个 OTU's 明显地分为 12个表观群: A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L. 它们分别与 Nelson et al. 分镰刀菌为 12个组的系统相对应.

3. 来自玉米穗粒腐病上的三个未知菌株, *F. sp. 1* (OTU31和 OTU32) 处在 G 表观群

中, 属于色变组 (*Discolor*) 的成员, 与它最相似的种是 *F. graminearum* (OTU22). 它们之间的相似性值小于 1.4422, 表现出种内聚类的关系. *F. sp. 2* (OTU33和 OTU34) 处在 H 表观群中, 属于李瑟组 (*Liseola*) 的成员, 与它最相似的种是 *F. moniliforme* (OTU25). 它们之间的相似性值小于 1.4422, 表现出种内聚类的关系. *F. sp. 3* (OTU35和 OTU36) 也处在 H 表观群中, 与它最相似的种是 *F. proliferatum* 和 *F. subglutinans*, 它们之间的相似性值小于 1.4422, 表现出种内聚类的关系.

4. *F. proliferatum* (OTU26) 和 *F. subglutinans* (OTU27) 的相似性距离为 1.2247, 小于 1.4422, 表现出种内聚类的关系.

表3 36个运筹分类单位系统聚类分析结果

聚类的 OTU's	聚类距离	聚类关系	聚类的 OTU's	聚类距离	聚类关系
32 22	1.0900	种 内	13 12	2.2361	种 间
34 25	1.0000	种 内	20 18	2.3004	种 间
35 26	1.0000	种 内	7 6	2.4495	种 间
27 26	1.2247	种 间	15 14	2.4495	种 间
31 22	1.2247	种 内	30 29	2.4495	种 间
33 25	1.2247	种 内	2 1	2.4749	种 间
36 26	1.3844	种 内	16 14	2.7386	种 间
3 2	1.5000	种 间	29 25	2.8118	种 间
22 20	1.6330	种 间	18 10	3.0259	种 间
26 25	1.6771	种 间	14 10	3.1820	种 间
11 10	1.7321	种 间	25 24	3.3279	种 间
21 20	1.7321	种 间	12 10	3.3621	种 间
23 20	1.7889	种 间	24 4	3.3979	种 间
8 7	2.0000	种 间	10 6	3.4118	种 间
17 16	2.0000	种 间	5 1	3.5237	种 间
28 25	2.0089	种 间	6 1	4.0008	种 间
19 18	2.0616	种 间	4 1	4.4049	种 间
9 6	2.2361	种 间			

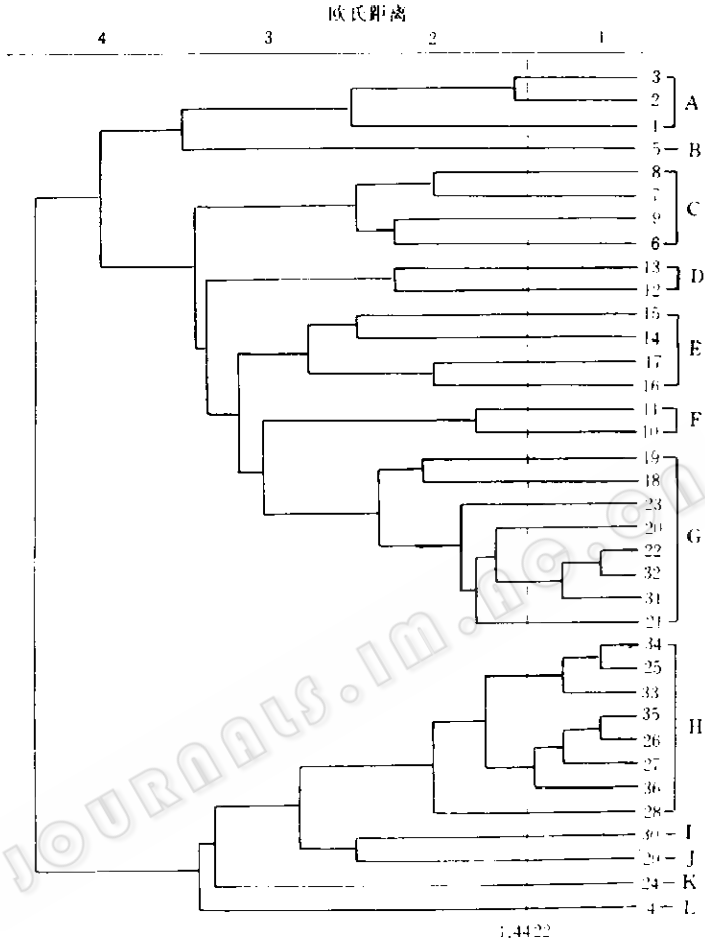


图1 聚类分析树状图

讨 论

1. 鉴定系统评价: Nelson, Toussoun & Marasas (1983) 提出的以 30 种常见镰刀菌为代表的分类系统, 吸取了目前镰刀菌各系统的先进内容, 并结合他们 20 多年从事镰刀菌研究所积累的资料而形成的。该系统将常见的镰刀菌组织在 12 组 30 种内, 种下不设变种和专化型。种的概念简明扼要, 鉴定方法简便实用, 很适合于种的鉴定。因此, 笔者选用他们的分类系统作为本文的研究基础。研究表明, 我

们建立的 30 种常见镰刀菌计算机鉴定系统与

他们建立的分类系统是一致的。30 种镰刀菌在聚类分析树状图上的 12 个表观群与他们划分镰刀菌为 12 个组相对应。因此, 该鉴定系统正确地反应了 Nelson 等的分类系统。

2. 鉴定系统对未知菌株的鉴别能力: 本研究组建起来的计算机鉴定系统显示出对未知菌株较强的比较、鉴别能力, 而且具有客观、准确、快速的优点。从理论上讲, 当某一待鉴菌株与鉴定系统中的已知种具有相同的分类信息时, 它们之间就表现出种内聚类的关系; 而某

一待鉴菌株与鉴定系统中的已知菌具有不同的分类信息时,它们之间就表现出种间聚类的关系。这种聚类关系可由相似性值予以确定。本鉴定系统将玉米穗粒腐病上的三个未知菌株分别鉴定为 *F. graminearum*, *F. moniliforme* 和 *F. Proliferatum* 或 *F. subglutinans*, 与前人报道的玉米穗粒腐病病原菌种类基本一致,进一步验证了该鉴定系统的正确性。

3. 关于 *F. proliferatum* 和 *F. subglutinans* 的鉴定: 根据 Nelson 等的观点, *F. proliferatum* 和 *F. subglutinans* 可根据小孢子的着生方式很容易区别开。*F. proliferatum* 小孢子串生和假头生共存。*F. subglutinans* 小孢子假头生, 无串生。它们的其它性状基本相同。作者数值分类的研究结果表明, *F. proliferatum* 与 *F. subglutinans* 是同一种。这就是数值分类法与传统分类法的不同点。传统分类中, 小孢子着生方式与其它性状是不等权的, 只要小孢子着生方式不同就可认为是不同的种。而在数值分

类中, 小孢子的着生方式与其它性状是等权的。由于 *F. proliferatum* 和 *F. subglutinans* 的其它性状基本相同, 造成它们之间的相似性距离很小, 从而表现为种内聚类的特点。所以, 作者建立的鉴定系统不能将 *F. proliferatum* 和 *F. subglutinans* 区别开。如果要将它们区别开, 必须在该鉴定系统中对小孢子着生方式这个性状进行加权。作者正在探索这方面的问题。

参 考 文 献

1. Sneath P H A & R Sokal: Numerical Taxonomy — The principle and practice of numerical classification, W H Freeman and Company, 1973.
2. Procter J R & W B Kendrick: *Can. J. Bot.*, **42**: 65-90, 1964.
3. Carol E W: *Phytopathology*, **81** (9): 31-38, 1991.
4. Nelson P E, Toussoun T A & W F Marasas: *Fusarium species — An illustrated manual for identification*, Univ. Park and London, Pennsylvania State Univ. Press, 1983.

(1993-04-06 收稿)

THE APPLICATION OF HIERACHICAL CLUSTER ANALYSIS TO IDENTIFICATION OF THE GENUS *FUSARIUM*

Li Duochuan Shen Chongyao

(Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Based on the taxonomic system of Nelson et al. (1993), a preliminary computerized identification system with groupaverage method of hierachical cluster analysis for the genus *Fusarium* was established. Three unidentified isolates, *Fusarium* sp. 1 *F.* sp. 2 and *F.* sp. 3 from *Zea mays* L., were identified by use of this analysis. The results clearly showed that *F.* sp. 1 was identified as *F. graminearum*, *F.* sp. 2 as *F. moniliforme* and *F.* sp. 3 as *F. subflutinans* or *F. proliferatum*. The facts proved its applicability to comparison and identification of *Fusarium*.

Key words: *Fusarium*; Hierachical cluster analysis; Computerized identification system