

专论与综述

真菌分类技术的进展

刘 钢 周与良

(南开大学微生物系, 天津 300071)

真菌的亲缘关系或系统性的研究是建立生物资源预期价值信息存取系统不可缺少的内容。真菌分类学也是进行真菌遗传学、种群学以及流行病学研究的基础。两个世纪以来, 真菌分类一直是以形态学为主。但近几十年来, 随着生理生化特性、遗传变异特点、血清学反应、酶学、分子生物学技术以及计算机技术等新的分类依据不断地被引入微生物分类当中, 真菌分类技术也将不可避免地得到充实和完善。90年代的真菌分类已经由形态学走向了多学科的综合。

1 真菌的组织化学

1.1 脂肪酸的组分分析

研究发现, 在一定培养条件下脂肪酸的组成是相当稳定的。在深红酵母(*Rhodotorula rubra*)的长链脂肪酸研究中, 发现尽管菌株间相似系数都大于96.5%, 但仍显示出一定的聚类层次^[1]。对假丝酵母(*Candida*)的脂肪酸测定可验证表观性状分析的结果^[2]。伞菌担子果脂肪酸的组分分析有助于伞菌目的分科。脂肪酸的组分差别也有助于长喙壳属(*Ceratocystis*)^[3]、侧孢属(*Sporotrichum*)^[4]以及青霉属(*Penicillium*)^[5]等的分类, 而且具有可重复性。

1.2 真菌胞壁碳水化合物的组成

真菌胞壁的结构和化学组成在分类群间具有差异。研究发现, 异担子菌酵母荚膜多糖的单体组成是同其系统发育一致的。酵母胞壁的碳水化合物组成可以分为两类: 第一类包括葡萄糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺和半乳糖; 第二类包括木糖、果糖和鼠李糖^[6]。通过大量的真菌胞壁组分的研究, 发现木糖、鼠李糖和岩藻糖等可作为某些真菌属的分类依据。甘露糖对葡

萄糖的比例是区分不同类群的有效特征^[7]。酵母菌胞壁中的碳水化合物在不同条件下虽然量上有差别, 但在组成成分上却很稳定。Hanjorg等^[8]将酵母细胞壁归纳为七种不同类型: 酵母(*Saccharomyces*)型、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)型、原囊菌(*Protomyces*)型、微孢(*Microbotryum*)型、黑粉菌(*Ustilago*)型、花耳(*Dacrymyces*)型和银耳(*Tremella*)型。此外, 酵母菌胞壁甘露聚糖的核磁共振氢谱(PRA)也有助于鉴定不同的酵母菌^[9]。

1.3 辅酶系统

辅酶Q作为线粒体上电子转移系统的一部分, 广泛存在于各类真菌当中。不同种类的真菌都有一特定的辅酶Q: 接合菌纲和半子囊菌纲为 Q_8 ; 部分不整囊菌纲和冬孢纲的黑粉菌目为 Q_{10} ; 部分不整囊菌纲、腔囊菌纲、盘菌纲、丝孢菌纲和腔孢菌纲为 $Q_{10}(2H)$; 核菌纲为 $Q_{10}(4H)$ ^[10]。在同一分类群内, 如果辅酶系统分散, 则此分类群很可能是异源的^[6]。辅酶系统在酵母菌的现代分类中具有重要意义, 辅酶 Q_5 — Q_{10} 分布于不同属中, 它和酵母胞壁碳水化合物组成以及GC值一起成为酵母分类和系统发育的重要标志^[7]。通过高压液相色谱(HPLC)对辅酶系统外的微量泛醌的检测发现, 它在属的鉴定上也具有重要意义^[11]。

2 真菌的分子系统

真菌分类的最终目标是追求近乎自然的分类系统。分子生物学技术的应用更新了系统学, 核酸和蛋白质分析可用以区分物种和评价亲缘间系统发生的关系。DNA作为遗传物质要比表型特征更为真实地反应真菌的系统发

育。蛋白质作为基因的表达产物,也从一定水平上反应了真菌的亲缘关系。

2.1 蛋白质

可溶性蛋白的电泳图谱已经广泛应用于真菌分类中。蛋白质电泳对解决疑难种的鉴定、异名的处理等分类学问题是较为简单易行的方法,它在解决什么是种内形态变异和什么是种间性状交叉问题时成为一个很重要的依据^[12]。Vancanneyt 等^[13]证明利用可溶性蛋白的一级电泳图谱对酵母菌的种内及种间分类很有意义。

同工酶作为一类蛋白质,其结构是由基因决定的。酶的电泳图谱是在分子水平反应细胞中各种酶的结构。由于同工酶结构的相似性反应了生物间的亲缘关系,因此酶谱分析可应用于种和种下的分类^[14]。对担子菌八个不同属种间漆酶谱带分析,可见它们之间各自的谱带特征,初步可以看出属间的一些差异,而且发现它对种的区分也是有价值的^[15]。利用等电聚焦电泳技术对香菇(*Lentinus*)的8种同工酶进行分析证明同工酶对香菇属的种间分类也是有效的^[16]。

以真菌细胞中的可溶性蛋白为抗原,利用精密的血清学技术可以测出物种之间亲缘关系的远近。血清学的方法已被广泛应用于酵母和酵母状真菌的研究^[17]。其中,免疫荧光法是近几十年来发展起来的一门较先进的技术,它具有免疫学的特异性和敏感性,又能在显微镜下清晰地看到染色对象的形态特征,从而显著地提高了结果判断的可靠性。用血清学的荧光抗体法可以区别镰刀菌属(*Fusarium*)的不同种^[18]。

此外,真菌蛋白质一级结构的相似性^[19]等也为真菌分类和系统发育提供了新的证据。

2.2 核酸

核酸分析是在真菌学的系统发育和群体研究方面迅速发展起来的新技术。

核酸的碱基组成(GC值)已经成为细菌分类学有价值的工具,并已作为常规列入分类群的属性。真菌的GC值具有一个与细菌相

似的范围。从GC值看,真菌的进化(卵菌纲除外)是由GC值递增表现出来的^[20]。

在酵母菌的分类中,GC值已经成为分类学上的常规工具^[21]。实验中,一般多用溶解温度(T_m)来测定核酸的GC值。研究发现用反相高压液相色谱仪直接测定核酸的GC值,其重复性更好^[22]。此外,以等密度梯度离心来测定GC值也很方便。

除上述外,不同种类的真菌单倍体细胞中DNA的含量存在差别^[23]。通过荧光显微检测技术能够得到细胞中核DNA的含量。根据核DNA的含量和辅酶系统,可以将白冬孢酵母(*Leucosporidium scottii*)分成四组,而且通过核DNA含量表明白冬孢酵母中存在非整倍体^[23]。

用分子杂交的方法可以找到DNA的同源序列。两种生物之间的亲缘关系越近,它们之间所共有的多核苷酸的相同序列就越多,即同源百分率越高。DNA同源序列用于区分一般形态学方法不易鉴定的真菌种类是有价值的,不但能区分不同的种类,还可进一步找出亲缘关系^[24]。DNA-RNA杂交的研究与DNA-DNA重组相比较,给基因组中已知类群RNA的顺反子计数提供了可能性,这样的研究也为分类学和系统发育的分析提供了一个很好的工具^[25]。对四株郎比可假丝酵母(*C. lambica*)同源序列的研究发现其同源性均在60%以上,虽然存在分化较大的菌株,但基本还属于同一种^[25]。

建立在Southern杂交基础上的真菌的DNA限制性片段多态性(RFLPs)研究是在种、种内以及种群水平上进行分类研究的有效手段^[26]。RFLPs可以对大量的DNA样品进行有效的分析。真菌的线粒体DNA(mtDNA)相对较小,可以作完整分析。在自然界中丝状真菌的线粒体基因组很少经历重组过程,因而为分子系统进化的研究提供了方便的工具^[26]。同时由于mtDNA的分子进化速度比核DNA快,因而mtDNA分子的分析对真菌种内和种间的分类会灵敏得多。另外,核糖体RNA基

因在线粒体基因组中的位置和长度因物种的不同而有差异。通过线粒体上的 rRNA 基因限制性片段多态性发现核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 存在种内的异源性^[27]。核糖体存在于所有的生物细胞中,而且几乎有一个共同的起源,从而有可能确定所有生物的分类地位。此外,某些 rRNA 序列对所有的同源生物是相当保守的。以此为参照,可以找出存在的不同序列来寻求进化路线。真菌同其它真核生物一样,具有 25—28S、18S、5.8S 和 5S 等 4 种不同沉降系数的 rRNA。18S 和 26S rRNA 的部分核苷酸序列已用来研究厚皮孢属 (*Sporophythermia*) 的系统发育^[28]。rDNA 的限制性片段多态性也已用来区分真菌种间和种下的不同以及亲缘关系^[29]。

多聚酶链式反应 (PCR) 的出现为真菌 DNA 的扩增提供了更为方便和准确的方法。通过 PCR 扩增具有种间特异性的 DNA 片段从而决定种间的不同,已在真菌的分类研究中得到了部分应用^[30]。PCR 的出现也为 mRNA 的研究提供了方便。同时,PCR 扩增产物的限制性分析,使 RFLPs 分析免去了 Southern 印迹或放射自显影的麻烦。由 PCR 发展而来的随机扩增多型性 DNA (RAPD) 适用于种下水平的分类学研究。RAPD 具有用样量少、鉴定迅速、具有可重复性等特点。Richard 等利用 RAPD 鉴定了禾顶囊壳 (*Gaeumannomyces graminis*) 的亚种,发现欧洲亚种同北美亚种具有相同的遗传图谱,从而证实了北美亚种是由欧洲引入北美大陆的^[31]。RAPD 也可用于决定依靠形态分类类群间的遗传亲和性^[32]。

核型分析是真菌分类的另一方法。真菌多为多核的菌丝体,其基因组大小在 $6-30 \times 10^9$ d 范围内。核型分析得到的 DNA 带数可以被近似地认为是真菌核内最少具有的染色体数,DNA 带的密度也从一定水平上反应了核内 DNA 的含量以及 DNA 分子的大小。脉冲电场凝胶电泳 (PFGE) 得到的核型图谱能够用于香菇属^[33]、疫霉属 (*Phytophthora*)^[34] 以及酵母菌^[35] 的种间鉴定。

3 真菌的超微结构

由于电子显微镜的出现,尤其是扫描电子显微镜的问世,使人们获得了很多有关真菌超微结构的知识:游动孢子的 9 + 2 鞭毛结构、膜边体和壳质体、脉孢菌胞壁的四层结构、担子菌复杂的桶孔隔膜、细胞核的细微结构、孢子的诱人纹饰以及吸器与宿主的关系等^[36]。目前,真菌的超微结构研究主要包括:有性孢子的结构、芽痕的超微结构及其排列方式、细胞壁和隔膜的超微结构等^[37]。

4 真菌的数值分类

在具备了真菌物种之间鉴别标志的编码后,人们不仅可以利用经典的分叉或聚类检索表来识别一个新标本的正确地位,同时也可以采用数值分类法,特别是聚类分析法,借助电子计算机的功能从而更精密地作出种间的类比分析,并作出某个新标本是否是新种或新属的决定^[38]。

数值分类是随计算机科学的发展而兴起的,是分类学由定性向定量发展的一个进步,是对传统分类学的补充和完善。在真菌中,最初应用数值分类的是小层轮枝孢霉 (*Verticillium diella*)^[39],随后在假丝酵母属^[40]和蜡蘑属 (*Laccaria*)^[41] 中也先后引入了数值分类。对假丝酵母的聚类分析和代谢活性的研究表明:某些传统鉴定方法中的鉴定指标不能代表类群的特征,而另外一些指标似乎更具有类群的特征性^[42]。对红酵母属的聚类分析证明了它是一个高度异源的属^[43]。

除上述几个方面外,从个体发育角度来看,菌丝体的不相容性以及融合不育性都能够在种间和种内作为分类的性状^[44]。真菌的生态习性和地理分布也可作为分类鉴定的辅助性状^[45]。发展成套的鉴定卡,不仅对区分种;而且对致病系、产毒菌系的鉴定都有用。目前,对特殊毒素的诊断卡已问世。

综上所述,真菌现代分类系统的发展基于对多种独立性状的分析。在以相似性为基础的分类或以系统发育为目标的分子系统学中,通常需要分析每一类型的性状,然后做相互比较。

分子性状会增加我们对形态学性状进化的了解,同时表型性状可以用来验证某一分子性状对真菌分类的价值。此外,还必须同时研究更多的形态学特征、超微结构和组织化学等性状。可以看出,真菌的分类正走向多学科的综合。

参 考 文 献

- [1] 史国利,周与良. 真菌学报, 1993, 12(2): 131—137.
- [2] 史国利,吕宪禹,周与良. 真菌学报, 1992, 11(2): 150—157.
- [3] Dart. Microbio Letter, 1976, 2(5): 47.
- [4] Dart. Trans Brit Mycol SOC, 1976, 67(2): 327.
- [5] Blomquist G, B Andersson, K Andersson, *et al.* J Microbio Methods, 1992, 16: 59—68.
- [6] Boekhout T, A Fonseca, J Psampaio. Can J Microbiol, 1993, 39: 276—290.
- [7] Sugiyama J, M Fukagawa, SW Chiu, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 1985, 31: 519—550.
- [8] Hansjorg P, F oberwinkler, C Umile, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 1993, 39: 1—34.
- [9] 李明霞,付秀辉,卢怀乡. 微生物学通报, 1992, 19(2): 117—121.
- [10] Kuraishi H, Sugiyama J, Yokoyama T. IMC 3 Abstract, 1983, 152.
- [11] Genevieve Billon-Grand. J Gen Appl Microbiol, 1987, 33: 381—390.
- [12] 马国忠,余永年. 真菌学报, 1991, 10(3): 217—222.
- [13] Vancanneyt M, R Coopman, R Tytgat, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 1992, 38: 363—377.
- [14] Hanson LC. Mycologia, 1991, 83: 446—454.
- [15] 方自若,侯文英,郑美媛. 真菌学报, 1985, 4(3): 174—179.
- [16] Zervakis G, J Dabareve. J Gen Microbiol, 1992, 138: 635—645.
- [17] Banik MT, J A Paul, H H Burdsall, *et al.* Mycologia, 85(4): 605—611.
- [18] 王玉香,陈月华,王富宝,等. 南开大学学报(自然科学), 1985, 2: 81—87.
- [19] Kohn L M. Mycologia, 1992, 84(2): 139—153.
- [20] 周与良,邢来君. 微生物学通报, 1982, 9(5): 216—220.
- [21] Hamamoto M, F Sugiyama, K Komagata. J Gen Appl Microbiol, 1987, 32: 215—223.
- [22] Murrin. Exp Mycol, 1986, 10: 67—75.
- [23] Sung QS, Tkuroiwa, J Sugiyama. J Gen Appl Microbiol, 1993, 39: 295—302.
- [24] Fusson G B, HL Presly, H J Phaff. Int J Syst Bacteriol, 1987, 37: 371—379.
- [25] 王红梅,周与良. 真菌学报, 1989, 8(4): 304—308.
- [26] Taylor J W. Exp Mycol, 1986, 10: 259—269.
- [27] Kohn L M. Phytopathology, 1991, 81: 480—485.
- [28] Yamada Y, K Maeda, T Nagahama, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 1992, 38: 179—183.
- [29] Molina F I, P Shen, SC Jong. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43: 32—35.
- [30] Gargas A, JW Taylor. Mycologia, 1992, 84(4): 589—592.
- [31] Hamelin CR, GB Ouellette, L Bernier. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1752—1755.
- [32] Strongman D B, R M Mackay. Mycologia, 1993, 85(1): 65—70.
- [33] Sagawa. J Gen Appl Microbiol, 1992, 38: 47—52.
- [34] Tooley PW. Exp Mycol, 1992, 16: 188—196.
- [35] Torok. J Gen Appl Microbiol, 1992, 38: 313—325.
- [36] Moore RT. Botanica Marina, 1980, 23: 361—373.
- [37] Mueller GM. Mycologia, 1993, 85(6): 890—893.
- [38] 裴维著. 真菌学报, 1991, 10(2): 81—84.
- [39] Kendrick. Phenetic and Phylogenetic Classification, 1964, 105—114.
- [40] Campbell. J Gen Microbiol, 1975, 90: 125—132.
- [41] Mueller GM. Mycologia, 1985, 77(1): 121—129.
- [42] 史国利,周与良. 真菌学报, 1991, 10(4): 318—325.
- [43] Darmono TW, HH Burdsall. Mycologia, 1992, 84(3): 367—375.
- [44] Petersen R H, D Bermudes. Mycologia, 1992, 84(2): 209—213.