

基于 ITS1 DNA 序列分析的几种酵母菌的分子分类*

吴冰¹ 蔡俊鹏² M. D. Collins³

(华南理工大学 测试中心¹, 食品与生物工程学院² 广州 510641)

(BBSRC, Institute of Food Research, Reading Laboratory, Reading, RG6 2EF, UK)³

摘要: 采用 ITS1 序列分析的手段, 对来自 *Dekkera/Brettanomyces/Eeniella* 的 15 株菌株进行了分子分类学的研究。研究结果支持 4 个 *Dekkera/Brettanomyces* 种类的确证: *D. anomala/B. anomalus*, *D. bruxellensis/B. bruxellensis*, *D. custersiana* 和 *D. naardenensis*, 以及把 *E. nana* 合并于 *Brettanomyces* 属的建议。此外, 研究也揭示了 ITS1 在酵母分子分类学中的价值。

关键词: 酵母, *Dekkera*, *Brettanomyces*, ITS1, 分子分类

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0041-05

MOLECULAR SYSTEMATICS AMONG SPECIES OF GENERA *DEKKERA*, *BRETTANOMYCES* AND *EENIELLA* AS REVEALED BY THE ITS1 SEQUENCE ANALYSIS

WU Bing¹ CAI Jun-Peng² M. D. Collins³

(Analysis and test Center¹, College of Food Science and Biotechnology²,

The South China University of Technology, Guangzhou 510641)

(BBSRC, Institute of Food Research, Reading Laboratory, Reading, RG6 2EF, UK)³

Abstract: By employing ITS1 DNA sequence analysis, the molecular interrelationships among 15 strains of yeast belonging to the genera of *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella* were investigated. Data obtained supported the recognition of 4 separate species, viz: *D. anomala/B. anomalus*, *D. bruxellensis/B. bruxellensis*, *D. custersiana* and *D. naardenensis*, and the suggestion of including *E. nana* in the genus *Brettanomyces*. In addition, results also revealed the value of ITS1 sequence analysis in the molecular systematic studies of yeast.

Key words: Yeast, *Dekkera*, *Brettanomyces*, *Eeniella*, ITS1, Systematics

有性型的 *Dekkera* 属及其无性型的 *Brettanomyces* 拥有如下几个特征, 即无性繁殖为多边芽殖 (Multipolar budding), 能代谢生成醋酸, 存在有负巴斯德效应 (negative Pasteur effect), 以及拥有辅酶 Q9 作为其主要的泛醌^[1]。有性型的 *Dekkera* 属及其无性型的 *Brettanomyces* 的区别只在于前者拥有有性生殖的生活史, 有帽形的子囊孢子 (ascospore) 产

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070591)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30070591)

教育部留学回国人员科研启动基金资助项目 (No.2000-367)

收稿日期: 2001-04-25, 修回日期: 2001-09-25

生,而在后者的生活史中则尚未观察到这一现象。传统上,它们种类的区分主要依赖于表征。1984年, Van der Walt 和 Johannsen^[2]只确认, *Dekkera* 属有两个种, *D. bruxellensis* 和 *D. intermedia*, 而 *Brettanomyces* 属则有9种, 它们是 *B. abstinens*, *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. clausenii*, *B. custersianus*, *B. custersii*, *B. intermedius*, *B. lambicus*, *B. naardenensis*。在随后的研究中发现, 许多 *Brettanomyces* 都有其相应的有性型的存在, 如此也就形成了多个 *Dekkera/Brettanomyces* 有性型/无性型对。到了最近, 基于 DNA-DNA 杂交^[3], 细胞同工酶电泳^[3] 以及小亚单位 rRNA 基因的限制性内切酶的分析^[4], 只有4个 *Dekkera/Brettanomyces* 有性型/无性型对获得认可: *D. anomala* Smith et van Grinsven/*B. anomalus* Custer, *D. bruxellensis/B. bruxellensis* Kufferath et van Laer, *D. custersiana* Lee et Jong/*B. custersianus* van der Walt, *D. naardenensis* Jong et Lee/*B. naardenensis* Kofschoten et Yarrow。其它很多种类则被认为是以上种类的同名 (synonym)。1994年, 基于部分 18S 和 28S rRNA 基因序列分析的结果, Boekhout 等^[5] 建议把亲缘关系与 *Brettanomyces* 密切相关的 *Eeniella nana* 重新定为 *Brettanomyces nanus*, 而 Yamada 等^[6] 则建议把 *D. custersiana* 从 *Dekkera* 属中分出去。

最近, 采用 18S rRNA 全基因序列分析的手段, CAI^[7] 对酵母菌 *Dekkera* 和 *Brettanomyces* 进行了较为精确的分子分类研究。研究结果在证明了 *Dekkera/Brettanomyces* 属有4个有性型/无性型对的同时, 也揭示了 *Dekkera*、*Brettanomyces* 和 *Eeniella* 是一组稳定的、相对独立于其它酵母的类群, 从而支持把 *Eeniella nana* 重新定为 *Brettanomyces nanus* 的建议, 并指出了把 *D. custersiana* 从 *Dekkera* 属中分出去的矛盾。但由于这些种类的 18S rRNA 基因序列的相似性很高 (达 99% 以上), 因此有些种或菌株的区分仍然比较困难。最近有人报道^[8], 由于位于 18S 和 28S 之间的区域, 即 ITS1 和 ITS2 它们进化得比前两者都快, 故可用来区分 18S 和/或 28S 所无法区分的菌株。因此, 为了能从根本上区分 *Dekkera* 和 *Brettanomyces* 的各个种类以及相关菌株, 本研究以 ITS1 序列分析为手段, 对酵母菌 *Dekkera* 和 *Brettanomyces*, 以及和它们亲缘关系很近的 *Eeniella* 进行更深入的分子分类研究。

1 材料与方法

1.1 菌种来源及培养

本研究所用菌株来自英国国家酵母保藏室 (the National Collection of Yeast Cultures, Norwich, United Kingdom, 简写成 NCYC) 或荷兰酵母保藏室 (the Centraalbureau voor Schimmel-cultures, Delft, The Netherland, 简写成 CBS)。所有菌株均用液体 YM 培养基在 25℃ 温度下培养 3d, 随后离心收集菌体, 用于染色体 DNA 的提取^[7]。

1.2 酵母染色体 DNA 的提取

详细方法见文献 [7]。

1.3 ITS1 区域的 PCR 扩增及 PCR 产物的纯化

用于扩增 ITS1 区域的 PCR 引物是位于 18S rRNA 3' 端的 F 引物 5' -ACCGATGAATGGCTTAGTGA-3', 和位于 5.8S rRNA 的 R 引物 5' -ATGAC (G/A) CTCAAACAGGCAT (G/A) C-3'。除此以外, PCR 反应条件以及 PCR 产物的纯化方法详细见文献 [7]。

1.4 ITS1 DNA 序列分析

方法与文献 [7] 相同。简单地说, 应用 PILEUP 程序使所得到的 ITS1 基因序列排

列好,再采用 NEIGHBOR-JOINING, UPGMA, DNAPARS 3种进化树的建造方法获得3种进化树,最后应用 BOOTSTRAP 程序对进化树进行可信度分析。为了获得它们 ITS1 DNA 序列的相似值 (similarity values), 程序 SIMILARITY 被用来处理所得的原始数据。

1.5 EMBL 基因库的登陆号码 (Accession number)

ITS1 基因经测序后,就库存于 EMBL 基因库。其登陆号码见表 1。

表 1 所用菌株的来源、ITS1 长度及 EMBL 登陆号码

菌种名	菌号	长度 (bp)	EMBL 登陆号码
<i>Brettanomyces abstinentis</i>	CBS 6055 ^T	111	Z84707
<i>Brettanomyces anomalus</i>	NCYC 449 ^T	129	Z84650
<i>Brettanomyces anomalus</i>	NCYC 615	128	Z84703
<i>Brettanomyces anomalus</i>	NCYC 749	128	Z84696
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	NCYC 362	111	Z84663
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	NCYC 370 ^T	111	Z84689
<i>Brettanomyces clausenii</i> var. <i>clausenii</i>	CBS 76 ^T	128	Z84631
<i>Brettanomyces custersii</i>	CBS 5512 ^{NT}	111	Z84691
<i>Brettanomyces lambicus</i>	CBS 75 ^T	111	Z84680
<i>Dekkera anomala</i>	CBS 8139 ^T	128	Z84686
<i>Dekkera bruxellensis</i>	NCYC 823 ^T	107	Z84633
<i>Dekkera custersiana</i>	NCYC 4805 ^T	116	Z84681
<i>Dekkera intermedia</i>	CBS 4914 ^T	111	Z84671
<i>Dekkera naardenensis</i>	CBS 6042 ^T	188	Z84705
<i>Eeniella nana</i>	CBS 1945 ^T	147	Z84632

注: T Type strain, NT Neotype strain, bp base pair

2 结果与讨论

我们共测序了 15 株菌株的 ITS1, 包括 5 株 *Dekkera* 种类, 1 株 *Eeniella* 种类, 和 9 株 *Brettanomyces* 种类 (表 1)。从表 1 我们可以发现, ITS1 的长度是特定种类所拥有的特征, 不同种类其 ITS1 长度各不相同。3 株 *B. anomalus* 及其有性型 *D. anomala* 均显示出相似的 ITS1 长度, 即 128 ~ 129 bp (base pair)。另外, *B. clausenii* var. *clausenii* 的 ITS1 长度也是 128bp。2 株 *B. bruxellensis* 的 ITS1 长度为 111bp, 虽然比其有性型 *D. bruxellensis* 的 (107bp) 稍长, 但却与 *B. abstinentis*, *B. custersii*, *B. lambicus*, *D. intermedia* 的相同。在剩下的 3 株菌株中, *D. custersiana* 的最短, 仅有 116bp, 而最长的则是 *D. naardenensis*, 为 188bp, *E. nana* 的则为 147bp。

在获得 ITS1 的 DNA 序列后, 我们应用 SIMILARITY 的程序对这 15 株菌株 ITS1 序列的相似程度进行了比较 (表 2), 同时也运用 NEIGHBOUR-JOINING, UPGMA, DNAPARS 3 种进化树建造方法构造进化树。由于所得的进化树基本一致, 因此在本文中只介绍用 UPGMA 方法所构造的树 (图 1)。

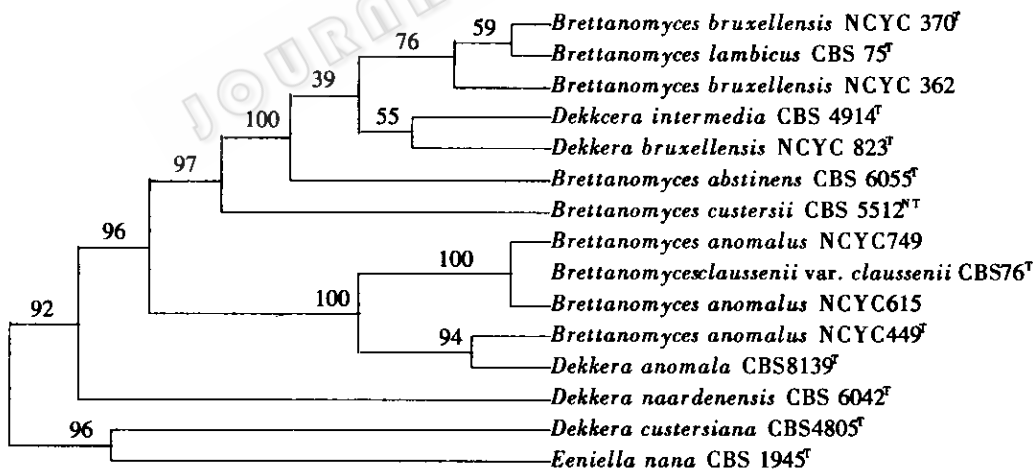
正如表 2 所示, 3 株 *B. anomalus* (NCYC 449^T, NCYC 615 和 NCYC 749) 显示出 94.5% ~ 99.2% 的相似值。虽然它们与其对应的有性型 *D. anomala* 的相似值只有 90.5% ~ 95.3%, 但与 *B. clausenii* var. *clausenii* 却显示出更高层次的相似值 (95.3% ~ 100%)。2 株 *B. bruxellensis* (NCYC 362 和 NCYC 370^T) 之间所展现出的相似值 (99.1%) 要比它们与其对应的有性型 *D. bruxellensis* 要高 (96.3% ~ 97.2%)。此外, 2 株 *B. bruxellensis* 与 *B. lambicus* 也表现出相当高的相似值 (99.1% ~ 100%)。 *B. abstinentis*

与2株 *B. bruxellensis*, *B. lambicus* 以及 *D. intermedia* 的相似值 (96.4% ~ 97.3%) 要比与 *D. bruxellensis* 高 (94.4%)。与 *B. custersii* 最为相似的是 *B. bruxellensis* NCYC 370^T 和 *B. lambicus* CBS 75^T (91%)。 *D. intermedia* 与 *D. bruxellensis* 表现出最大的相似值 (97.2%)，与 *B. abstinens*, *B. bruxellensis* NCYC 370^T, 和 *B. lambicus* 的相似值则稍差 (96.4%)。其它3株菌株, 即 *D. custersiana*, *D. naardenensis* 和 *E. nana*, 它们间的相似值为 47% ~ 62%，而它们与其余的菌株的相似值则为 41% ~ 56%。

表2 菌株间 ITS1 序列的相似值 (%)

序	菌种名称及菌号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>B. abstinens</i> CBS 6055 ^T	100												
2	<i>B. anomalus</i> NCYC 449 ^T	70.3	100											
3	<i>B. anomalus</i> NCYC 615	69.4	95.3	100										
4	<i>B. anomalus</i> NCYC 749	64.9	94.5	99.2	100									
5	<i>B. bruxellensis</i> NCYC 362	96.4	71.2	69.4	67.6	100								
6	<i>B. bruxellensis</i> NCYC 370 ^T	97.3	72.1	69.4	67.6	99.1	100							
7	<i>B. clausenii</i> var. <i>clausenii</i> CBS 76 ^T	67.6	95.3	100	100	67.6	67.6	100						
8	<i>B. custersii</i> CBS 5512 ^{NT}	89.2	70.3	79.3	82.0	90.1	91.0	82.9	100					
9	<i>B. lambicus</i> CBS 75 ^T	97.3	72.1	69.4	67.6	99.1	100	67.6	99.1	100				
10	<i>D. anomala</i> CBS 8139 ^T	74.8	95.3	91.3	90.5	74.8	75.7	91.3	74.8	75.7	100			
11	<i>D. bruxellensis</i> NCYC 823 ^T	94.4	71.0	74.8	65.4	96.3	97.2	66.4	87.9	97.2	74.8	100		
12	<i>D. custersiana</i> CBS 4805 ^T	47.8	56.0	45.7	44.0	46.0	46.9	44.8	50.5	46.9	51.7	53.3	100	
13	<i>D. intermedia</i> CBS 4914 ^T	96.4	68.5	66.7	64.0	95.5	96.4	64.0	87.4	96.4	73.9	97.2	50.5	100
14	<i>D. naardenensis</i> CBS 6042 ^T	55.9	58.9	57.0	55.5	44.1	45.1	56.3	48.7	45.1	53.9	51.9	52.6	45.1
15	<i>E. nana</i> CBS 1945 ^T	46.9	46.5	46.5	45.3	47.8	47.8	46.1	46.0	47.8	51.6	47.7	51.7	45.1

注: T Type strain, NT Neotype strain, bp base pair



注: 树枝上的数字代表统计学上的可信度(从 500 株树计算所得)。

图1 应用 UPGMA 法构建的 *Dekkera*/*Brettanomyces* 分子进化树

从图1我们所构造的 UPGMA 进化树中, 可以看出, 这 15 株 *Dekkera*/*Brettanomyces* 菌株可分成 3 大类群, 而且每一类群的组成都具有统计学上的意义。这 3 大类群是 *D. anomala*, 3 株 *B. anomalus* (NCYC 449^T, NCYC 615 和 NCYC 749) 以及 *B. clausenii* var. *clausenii* 组成第一类群; *B. abstinens*, 2 株 *B. bruxellensis* (NCYC 362 和 NCYC 370^T), *B. custersii*, *B. lambicus*, *D. bruxellensis*, 和 *D. intermedia* 组成第二类群; *D. custersi-*

ana 和 *E. nana* 组成第三类群。*D. naardenensis* 虽然独自形成一类, 但是却深深地植根于 *Dekkera/Brettanomyces* 的进化群中。在 *D. anomala* 类群中, *D. anomala* 和 *B. anomalus* NCYC 449[†] 组成一小群, 两者可以被区分开来; 其余的菌株则组成另一小群, 但它们彼此间无法区分。在第二类群中, *B. custersii* 独立出来, 而其余的菌株则组成一个具有统计学意义的小群。在这小类群中, 除了 *B. bruxellensis* NCYC 370[†] 和 *B. lambicus* 外, 其余的菌株均可区分开来。虽然 *D. custersiana* 和 *E. nana* 组成第三类群, 但是它们的亲缘关系却并非那么的紧密, 彼此形成一条长长的根 (stalk)。

以上结果显示, *Dekkera/Brettanomyces* 的进化群中具有 5 个可以明显区分开来的、在统计学上有重要意义的单位类群: *D. anomala/B. anomalus*, *D. bruxellensis/B. bruxellensis*, *D. custersiana*, *D. naardenensis*, 和 *E. nana*。这 5 个单位类群与 *Dekkera/Brettanomyces* 有性型/无性型属中的种类以及 *E. nana* 种类相互对应。通过本项研究, 我们再一次证明了 Boekhout 等^[5] 建议把 *Eeniella nana* 重新定为 *Brettanomyces nanus* 的合理性, Yamada 等^[6] 把 *D. custersiana* 从 *Dekkera* 属中分出去的提议是错误的。

与 Cai 等^[7] 的 18S rRNA 全基因序列研究比较, 基于 ITS1 的序列分析更有辨别力, 能更好地区分各个菌株, 从而展示了 ITS1 在分子系统学上的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 2nd ed. Cambridge: University Press, 1990.
- [2] Van de Walt J P, Johannsen E. Chapter III, Genus 8. *Dekkera van der Walt*. In *Kreger-van Rij*, The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd ed, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984, 146 ~ 150.
- [3] Smith M T, Yamazaki M, Poot G A. Yeast, 1990, 6: 299 ~ 310.
- [4] Molina F I, Shen P, Jong S C. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43: 32 ~ 35.
- [5] Boekhout T, Kurtzman C P, O' Donnell K, et al. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 781 ~ 786.
- [6] Yamada Y, Matsuda M, Maeda K, et al. Biosci Biotechnol Biochem, 1994, 58: 1803-1808.
- [7] Cai J, Roberts I N, Collins M D. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 542 ~ 549
- [8] James S A, Collins M D, Roberts I N. Int J Syst Bacteriol, 1997, 46: 189 ~ 194.