

核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用进展

许超德 李绍兰*

(云南大学微生物研究所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

摘要: 阐述了 rDNA/rRNA 序列分析法、RFLP 分析法和 RAPD 分析法 3 种核酸分子系统学方法的相关概念及其在酵母菌分类中的应用和进展, 并对这些方法作了简要的比较。

关键词: 核酸分子系统学, 酵母菌, 分类

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0126-04

分子系统学 (molecular systematics) 是检测、描述并解释生物在分子水平的多样性及其演化规律的学科, 这是一门综合性很强的交叉学科。其研究历史可分成 3 个阶段: 20 世纪前半世纪是以血清学方法和小分子化合物为主, 60 年代至 80 年代以蛋白质的各种方法为主, 最近十几年是以核酸的各种方法为主。这是因为核酸具有信息含量大、可供选择的片段 (分子) 类型多、易于确定同源关系、材料易得、易于利用计算机进行分析、贮存及管理等优点^[1]。

近年来, 在酵母菌分类中应用较多的核酸分子系统学方法主要有 rDNA/rRNA 序列分析法、RFLP 分析法、RAPD 分析法等。本文主要阐述这些方法在酵母菌分子系统学中的应用。

1 DNA/rRNA 序列分析法

rRNA (ribosomal RNA) 即核糖体 RNA, 酵母菌细胞质核糖体的 RNA 通常由于沉降系数不同而分为大亚基 rRNA (23 ~ 28 S rRNA)、小亚基 rRNA (16 ~ 18 S rRNA)、5.8 S rRNA 和 5 S rRNA。它们都有相应的编码基因, 编码 rRNA 的基因及其相关的间隔区 (spacer) 统称为核糖体 DNA (rDNA)。间隔区包括内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)、外转录间隔区 (external transcribed spacer, ETS) 等, 其中在酵母菌分子系统学中应用较多的是内转录间隔区。

rDNA/rRNA 序列分析法比较精确可靠, 并且有日益完善的 Internet 数据库和序列分析软件作为支撑, 因而已成为酵母菌主要的分类方法, 但该法相对较为复杂, 当菌株数量很多时就有些费时。

1.1 大亚基 rDNA/rRNA 序列分析 Guadet 等 (1989) 和 O' Donnell (1993) 开创了通过大亚基 rDNA D1/D2 区序列分析来鉴定真菌的方法。

Fell 等通过大亚基 rDNA D1/D2 区序列分析对 300 多株担子菌酵母和酵母状真菌进行了分子系统学研究。结果表明, 这些酵母菌种和属在系统发育上分布在 3 个纲的 11 个进化枝中。其中 *Bensingtonia*、*Cryptococcus*、*Rhodotorula* 和 *Sprobolomyces* 等属是多系的, 而 *Bullera*、*Cystofilobasidium*、*Fellomyces* 等其它一些属则是单系的。此外, 他们发现尽管区分紧密相关的种时需要运用 ITS 区, 但是大多数种都可以运用 D1/D2 区序列分析

* 联系人 Tel: 0871-5033539, E-mail: shilli@ynu.edu.cn

收稿日期: 2003-06-02, 修回日期: 2003-07-28

鉴定出来。这是对所有已知的担子菌酵母的大亚基 rDNA D1/D2 区序列的首次研究^[2]。

Kurtzman 等测定了子囊菌酵母的几乎所有已知种模式菌株的大亚基 rDNA D1/D2 区的碱基序列 (500 ~ 600 bp)，他们认为，酵母菌同一个种的不同菌株大亚基 rDNA D1/D2 区核苷酸替换率一般不超过 1%，而属于不同种的菌株其核苷酸替换率则一般较大，根据这一标准，可以将绝大部分种区分开^[3]。

对根据常规形态和生理生化性状难以确定分类学地位的 8 株假丝酵母菌，白逢彦等进行了以大亚基 rDNA D1/D2 区的碱基序列分析为依据的分子分类学研究，并确定了各个菌株的归属^[4]。

现在，所有已描述的酵母菌种的大亚基 rDNA D1/D2 区序列都可以在 Internet 的核酸序列数据库上（如 GenBank、EMBL 等）查询到，因而，通常仅根据其 D1/D2 区序列就可以鉴定一个菌株到种。而只要得到一个纯化的酵母菌菌株，两天之内就可以运用免 DNA 提取、直接扩增 D1/D2 区的方法，得到该菌株的 D1/D2 区序列。

总的来说，大亚基 rDNA D1/D2 区序列分析结果与 DNA 杂交结果及标准表型分析结果相一致，但有时具有相同 D1/D2 区序列的菌株，杂交遗传学和标准表型特征却表明它们不属于同一个种。

1.2 小亚基 rDNA/rRNA 序列分析 酵母菌小亚基 rRNA 存在不同保守程度序列的镶嵌现象（从高保守区到半保守区到高可变区），使得该分子可以用来衡量较远的亲缘关系，亦适用于较近的亲缘关系。

Suh & Nakase 分析了 *Bullera* 和 *Udeniomyces* 属几个种的小亚基 rDNA 全序列，证实了把 *Udeniomyces* 属与 *Bullera* 属分开的合理性。并发现 *Bullera* 属的异源性^[5]。

Cai 等运用小亚基 (18S) rRNA 基因序列分析方法对子囊菌酵母 4 个属的 28 个菌株进行了分子系统学研究。序列分析表明，*Brettanomyces/Dekkera* 和 *Debaryomyces* 属显示了一定的同源性，而 *Kluyveromyces* 属则具有显著的异源性^[6]。

除了单独运用大亚基或小亚基 rDNA/rRNA 进行酵母菌分子系统学研究外，也有不少文献把二者结合起来进行研究。Gueho 等利用小亚基和大亚基 rRNA 序列分析法研究了无性型酵母 *Sterigmatomyces* 和 *Fellomyces* 属，他们认为，根据序列相似性，*Sterigmatomyces* 属由两个种组成，而 *Fellomyces* 属则包括 3 个种。与相关有性型比较表明，*Fellomyces* 与 *Sterigmatosporidium* 紧密相关，而 *Sterigmatomyces* 则与 *Leucosporidium* 关系稍为密切。这可能是小亚基和大亚基 rRNA 部分序列在担子菌酵母分类研究中的首次应用^[7]。

1.3 ITS 序列分析 对酵母菌及其它真核生物而言，ITS 区位于小亚基和大亚基 rRNA 基因之间，该区可分为 ITS1 区和 ITS2 区。当比较紧密相关的种时，ITS1 区序列相似性相近或略低于 ITS2 区。有人认为，基于二者之一的菌株鉴定是没有意义的，只有全 ITS 区才能确保鉴定的正确性。若两个菌株整个 ITS 区序列相似性超过 99% 则可认为是同一个种。原则上讲，ITS 区在确定密切相关种间的亲缘关系时是引人注目的，因为与 18S rRNA 基因相比，ITS 区具有较高的差异率。

ITS 区序列往往与其它序列相结合，应用于酵母菌分子系统学研究中。James 等分析了 *Torulasporea* 和 *Zygosaccharomyces* 两个属小亚基 rRNA 基因序列和两个内转录间隔区，即 ITS1 和 ITS2 序列，认为这两个属在系统发育上是相互混杂的。基于小亚基 rRNA、ITS1 和 ITS2 的系统树虽有微小差异，但总的来讲，3 种系统树是一致的。这两个属种间的 ITS2 序列比小亚基 rRNA 序列存在大得多的种间差异，因而在衡量紧密的系统发育

关系时优于小亚基 rRNA。尽管一些种 ITS 序列存在株间差异,但在两个 ITS 区域有可能识别出能区分种的保守区^[8]。

1.4 5 SrDNA/rRNA 序列分析 Walker 和 Doolittle 等曾应用 5SrRNA 序列比较来进行酵母菌的分类研究,然而,由于 5 S rRNA 只有大约 120 个核苷酸,其作用很有限,故而现在很少有人将其用于酵母菌的分类研究中。

2 RFLP 分析法

RFLP 即限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism),是指用限制性内切酶 (restriction enzyme, RE) 消化不同个体的同源 DNA 分子,经电泳分离后表现的限制性片段长度差异。RFLP 分析主要取决于所用 RE 的种类和数量。应用 RE 的目标是获得 RE 识别位点的准确位置,这些特征可用于说明 DNA 序列本身的特征,为群体及物种的进化和系统发育提供信息^[1]。Bosten 等在 1980 年最早用此法对菌种及菌株进行鉴定。

RFLP 分析法技术方法简便,影响因素少,稳定性高。其缺点是用 RE 消化整个基因组 DNA 产生的酶切图谱往往伴有浓重的背景,使特征性酶切条带在这一背景下较难辨认。

在酵母菌分类研究中,线粒体 DNA (mtDNA) 的 RFLP 分析得到广泛应用,这是因为 mtDNA 较小,适于进行限制性酶切分析,而且不同的种具有种内独特的 mtDNA 限制性图谱,尽管存在种内差异,但种内限制性图谱显示高度的相似性。很明显,限制性酶切分析法在区分酵母菌种方面有一定的应用潜力,也是酵母菌系统学有用的手段。

Su 等对代表 *Candida* 属的 7 个种和 *Lodderomyces elongispora* 的 19 株菌进行了 mtDNA 限制性内切酶酶切分析,结果出现了似乎呈现种特异性的不同的断裂图谱,极少有明显的共同限制性片段,8 株 *Candida parapsilosis* 菌株,包括模式菌株以及一度被认为是 *C. parapsilosis* 有性型的 *Lodderomyces elongispora* 具有不同的限制性内切图谱,这为两个种的区别又提供了一个证据^[9]。

此外, rDNA 的 RFLP 分析也屡见报道。Molina 等 PCR 扩增了 *Dekkera* 属及其无性型 *Brettanomyces* 属的 11 个模式菌株的小亚基 rRNA 基因的编码序列,并用一系列核酸内切酶消化,聚类分析产生了 4 个不同的产子囊孢子类群。结果与同工酶电泳分析和 DNA 同源分析具有一致性,并证实了以前报道的无性-有性型对和属内同名^[10]。

Esteve-Zarzoso 等认为 rDNA 的 RFLP 分析法是鉴定酵母菌的一个新的快捷而简便的方法^[11]。

3 RAPD 分析法

RAPD 是随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA) 的简称, RAPD 分析是一种利用随机合成的单个寡核苷酸引物通过 PCR 反应扩增靶细胞 DNA,扩增的产物通过电泳分析而获得凝胶电泳图谱,分析 DNA 片段数量和大小的多态性,从而比较受试菌株间基因的差异。广义 RAPD 包括狭义 RAPD、AP-PCR (arbitrary primer PCR, 任意引物 PCR) 和 AFLP (amplification fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性),它们分别由 Williams 等^[12] (1990)、Welsh 等 (1992)、Geatano-Anolles 等 (1991) 创立,三者本质上都是任意引物的随机扩增,只是所用引物的长度不同而已。RAPD 标记的发

现,允许在事先不清楚DNA序列的情况下检测基因组中存在的多态性,大大方便和拓宽了对基因组DNA变异的研究,这一技术一出现就首先被用于分子系统学研究中^[1]。

RAPD分析法快速、简便、通用性好,对DNA的需要量少、质量要求低。缺点是法尚未标准化,结果往往不明确,重复性较差。

Messner等用RAPD分析排除了*Sporobolomyces antarcticus*、*Sterigmatomyces aphidis*和*Tilletiopsis*属中相关种是同种的可能性,证实了*Mrakia*属内两对同种和*Sterigmatomyces*属内一对同种。他们还认为,RAPD分析法是一种简便、高度灵敏的方法,可用于DNA水平上种的区分,可用以替代nDNA-nDNA杂交实验进行酵母菌种的鉴定、特征描述及界定^[13]。

Herzberg等用RAPD-PCR和rDNA D1/D2区序列分析方法鉴定了采自中欧的多种植物花蜜中的66个酵母菌株,并比较和评价了这两种方法在鉴定和比较担子菌和子囊菌酵母方面的适用性,认为RAPD-PCR重复性差,通过该法所获得的信息显然不如序列分析获得的信息那么精确,大量的不确定因素使得RAPD-PCR分析至少作为生态研究中酵母菌鉴定的手段不可靠,由于RAPD-PCR分析标准方法及带型图谱公用数据库的缺乏,使其不可能用于鉴定酵母未知菌株和确认新种,相反,D1/D2区序列分析是鉴定酵母菌种的一个快速可靠的方法,而且是发现新种的一个十分有用的手段^[14]。

4 结语

上述3大分子系统学方法在酵母菌分类中都得到了广泛而较为成功的应用,但是,我们应该看到,它们各有其优缺点,因而,在分类研究中,应尽量做到3种方法结合运用,互为参照。此外,虽然分子系统学已在酵母菌分类中占据主导地位,但我们仍不能忽略生理生化方法、化学方法以及数值方法等传统方法的运用,只有多种方法综合分析所得出的结论才更加令人信服。

简便、快捷并能反映自然的亲缘关系是酵母菌分类研究追求的目标,分子生物学技术和计算机技术的快速发展、Internet数据库的日益完善以及相关软件的日趋成熟必然带动核酸分子系统学的发展,而核酸分子系统学的发展必然使酵母菌的分类逐步进入理想的境界。

参考文献

- [1] 黄原. 分子系统学——原理、方法和应用. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [2] Fell J W, Boekhout T, Fonseca A, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 1351 ~ 1371.
- [3] Kurtzman C P. Food Technol Biotechnol, 1998, 36: 261 ~ 265.
- [4] 白逢彦, 贾建华, 梁慧燕. 菌物系统, 2002, 21 (1): 27 ~ 32.
- [5] Suh S O, Nakase T. Microbiology, 1995, 141: 901 ~ 906.
- [6] Cai J P, Roberts I N, Collins M D. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 542 ~ 549.
- [7] Gueho E, Kurtzman C P, Peterson S W. Int J Syst Bacteriol, 1990, 40: 60 ~ 65.
- [8] James S A, Collins M D, Roberts I N. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46: 189 ~ 194.
- [9] Su C S, Meyer S A. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41: 6 ~ 14.
- [10] Molina F I, Shen P, Jong S C. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43: 32 ~ 35.
- [11] Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, et al. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 329 ~ 337.
- [12] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. Nucleic Acids Res, 1990, 22: 6531 ~ 6535.
- [13] Messner R, Prillinger H, Altmann F, et al. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 694 ~ 703.
- [14] Herzberg M, Fischer R, Titze A. Int J Syst Evol Microbiol, 2002, 52: 1423 ~ 1433.