



关于用暂定名称记载未完全描述的原核生物的建议及讨论

张 帆 岳莹玉 陶天申

(武汉大学生命科学院微生物学及免疫学系 武汉 430072)

由于单个原核生物为人类肉眼所不可见,人们对其分类鉴定的研究及其多样性的评估滞后于高等动植物,尤其对那些暂时还不能培养因而未获得完全描述的原核生物更为如此。另一方面,由于各种因素的影响,原核生物与其他生物一样,其多样性正面临不断增加的威胁^[1]。为减轻生物多样性的全球性损失,许多国家签署了1992年联合国环境与发展大会的《生物多样性公约》(Convention on Biological Diversity),该公约要求各签约国制订国家战略,同时采取多种措施,开展更多工作,有效地拯救世界生物资源^[2]。

为了正确了解和评估原核生物的多样性,迫切需要记载用各种技术方法发现的确定为原核生物的分类单元(taxon; taxa)。若它们可以培养,则有足够的证据,可按照《国际细菌命名法规》(International Code of Nomenclature of Bacteria,以下简称《法规》)进行正式命名(formal naming);若它们暂时还不能培养,其特异性仅由极有限的资料如基因组的一小部分核苷酸序列而定,《法规》则不能为之提供合理的命名规则,于是Murray和Schleifer^[3]向国际系统细菌学委员会(International Committee on Systematic Bacteriology, ICSB)提出建议,要求“裁决委员会(The Judicial Commission)考虑使用一法定的形式来记载一类不能培养、核酸序列分析和形态鉴定皆表明是一属水平上新分类单元但要对其合格命名却缺乏足够描述的原核生物”,即用暂定名称(*Candidatus*)记载那些推断的分类单元^[3]。

Murray和Schleifer是根据后面的分析提出上述建议的。利用现代分子生物学技术和方法,已能够鉴别迄今还不能培养的原核生物中有系统发育意义的基因,即那些普遍存在,一直在起重要生物学作用,相当保守且易于提取、便于比较的核酸序列,其中研究得较多的是16SrRNA的基因。方法是从环境中提取DNA,用PCR技术将其扩增,克隆扩增产物,使这些序列单一化,然后进行序列分析,并与已确立的属或种比较相关性。Murray和Schleifer发现,分类学工作者在未作足够鉴定的情况下,仅以特异性序列作为《法规》中规则18a要求的模式,已命名了许多新属和新种^[3]。然而他们认为用上述方法从环境中获得的一段新序列仅表明它可能来源于该环境中单一的有机体;有些时候序列分析和体外扩增错误可能得到所谓的新序列,而实际上它们并不存在或者是种内多样性;另外,新序列也可能来源于实验场所原来没有生长过的一类有机体;况且用于测定系统发育数据的核酸序列仅仅来自基因组的一小部分,而系统发育上相关联的原核生物可以有不同的生理特征,反之,生理特征相似的原核生物可能存在于不同的系统发育世系(phylogenetic lineages)。可见新序列并非一定来源于新属或新种,对这些不能培养的生物仅依特异序列就提出合格命名,他们认为证据不足。

尽管如此,运用分子生物学技术已可设计并制作与新序列特定区域互补的探针,以此来

进行原位探测 (in situ detection), 并对可以从其中提取该新序列的有机体进行鉴定^[4-6]; 这样就可判定该有机体的形态、密度及其在某区域的分布情况, 甚至还可测定其生长速度和生理活动^[7]; 进一步, 用各种染色方法和电子显微镜观察可收集更详尽的资料。尽管可能是新属或新种的原核生物缺乏活的纯培养物, 通过上述方法仍能获取有关它们的一些资料, 虽然这些资料很有限, 但对于生态学及生物学的无限多样性研究都将非常有意义。以此为开端, 可着手探寻培养方法, 鉴定表型特征, 完成足够的分类描述以便进行合格命名。为此, Murray 和 Schleifer^[3]建议, 在未获得完全描述之前, 先用一暂定名称 (*Candidatus*) 来记载这些以序列分析为基础的原核生物潜在的分类单元; 同时建议制订一条规则来反映描述任何新分类单元的最低或基本标准。

国际系统细菌学委员会 (ICSB) 于 1994 年 7 月在捷克布拉格召开会议^[8], 期间讨论了 Murray 和 Schleifer 的提议^[3]。会后, Murray 和 Stackebrandt^[9]撰文“为未完全描述的原核生物确立一个暂定名称”, 他们报道了会议就有关问题的讨论情况。该会委员们认为确立原核生物暂定名称十分必要, 因为在鉴定不易培养的原核生物时使用序列分析技术产生了日益增多的混乱。另外, 随着现代科学技术与方法的改进, 《国际细菌命名法规》也应进一步完善。虽然《法规》允许在分类描述中包括那些只能在原位鉴别的特征, 但现在已不提倡将比较核苷酸序列而确定的系统发育地位作为唯一的分类依据。学者们还详细讨论了在下列几种情形中要对原核生物潜在的新属或新种进行合格命名还缺乏足够的描述。

(1) 核酸排列顺序仅来源于对直接从天然样品中分离出来的 DNA 克隆产物进行分析;

(2) 用特定序列 PCR 引物再次扩增 DNA 因而证明环境中确实存在该遗传物质, 但用显微技术或分离培养并不能证明包含这种 DNA 的细胞存在;

(3) 来自活细胞的遗传物质被检测证明存

在于天然样品中, 但用原位杂交 (in situ hybridization) 没有证明寄主中细菌细胞的存在;

(4) 用原位杂交检测证明来自活细胞的遗传物质存在于天然样品中, 但有关该有机体的形态及生理特征而不是系统发育地位的资料缺乏时。

在上述情形中, 若用原位探测或细胞鉴定技术证明原核细胞的真实性, 且它们与最临近的生物之间的亲缘关系已定, 就可用暂定名称作为其可能的分类名, 再通过进一步研究, 以获得表型特征的资料, 并把它们作为完全描述和合格命名的依据。讨论者们还补充完善了关于这些暂定分类单元 (Provisional taxon) 法定的特征记录项目, 除用于决定系统发育地位的核酸序列外, 其他所有资料, 包括结构、代谢和繁殖特征, 甚至用原位杂交或类似细胞鉴定技术可以鉴定的该有机体的生存环境都应记载于其中。

由于越来越多地运用分子生物学方法评估自然界原核生物的多样性以及研究复杂的共生现象, 已记载了大量暂定名称的例证。

据最新的报道, Snel, Heinen 和 Blok 等人^[10]通过比较分析从鸡、大鼠和小鼠中分离的断裂丝状细菌 (Segmented Filamentous Bacteria, SFB) 的 16S rRNA 核苷酸排列顺序, 提议了梭菌亚门中的一个暂定分类单位, 即 “*Candidatus Arthomitus*”。

SFB 是一类附着在很多脊椎动物和一些非脊椎动物肠壁上的非病原细菌, 它们至今不能离体培养, 没有正式的分类名。前不久, 人们还只能根据形态特征和寄居地来认识这类生物, 它们是 G^+ 细菌, 形成内生孢子, 通过固着器与肠壁的上皮细胞相连; 即使在缺乏免疫力的动物体内也无致病性; 不同种动物中的 SFB 常具有很相似的形态特征; SFB 有寄主专一性^[11]。

Snel 等人通过无菌小鼠中对 SFB 进行纯培养, 已测定出编码 SFB 16S rRNA 的基因的核苷酸顺序^[12], 比较分析 16S rRNA 序列表

明,小鼠中分离的 SFB 与梭菌属存在系统发育相关性。进一步,他们在 16S rRNA 序列资料基础上制作了小鼠专一性 SFB 寡核苷酸探针,以此来探测混杂菌群中的 SFB。首先,他们用盐溶液冲洗小肠样品,肠壁上大多数未附着的细菌被除去,而 SFB 因附着在小肠上皮细胞上而保留下来,成为样品中主要的生物,这样获得了鸡和大鼠中 SFB 的 DNA;然后将这些 DNA 作为 16S rRNA 通用引物 PCR 扩增的模板,在体外扩增 SFB 的 16S rDNA,将扩增产物克隆;最后用小鼠专一性 SFB 寡核苷酸探针与这些 16S rDNA 做点印迹杂交 (a dot blot hybridization),便可测定不同寄主中的 SFB 与小鼠专一性 SFB 的核酸同源程度,以此进行系统发育分析。研究结果显示,鸡、大鼠中 SFB 与小鼠中 SFB 的 16S rRNA 基因非常相似,三者可组成梭菌亚门中的一个自然群,群内 16S rRNA 相关性值大于 97%,在系统发育上,这些 SFB 构成一个与狭义上的梭菌(即早先 Johnson 和 Francis^[13]确定的梭菌同源群 I)有一定程度亲缘关系的独特类群。更精确的计算表明,小鼠与大鼠中的 SFB 相关性值为 98.7%,两者与鸡中的 SFB 相关性值为 97.2%~97.7%,且这三者核酸差异程度比同一种内不同菌株的差异大,说明三种不同寄主中的 SFB 虽在系统发育上有相关性,但应为不同的种,尽管 16S rRNA 序列差异与种的差异之间不可能精确地相关;同时也说明系统发育资料补充完善了 Snel 等人以前的分析结果^[11]。

因为 SFB 不能离体培养,目前仅能主要依据系统发育和形态学进行描述,Snel 等^[10]建议给这类细菌一个暂定名称 (*Candidatus*) 并命属名为 *Arthromitus*。“*Candidatus Arthromitus*”为梭菌亚门中相当于属水平上的一个单独亚系。进一步,以寄主专一性和 16S rRNA 序列为依据,这群细菌又可分为不同的种,他们建议将

从小鼠、鸡和大鼠中分离的 SFB 分别命名为“*Candidatus Arthromitus galli*”、“*Candidatus Arthromitus muris*”和“*Candidatus Arthromitus rattu*”。按《法规》要求以上的名称不能被正式认可,因此应写在引号之内。一旦进一步的研究提供了足够资料,便可完全描述和对其进行可有效发表的合格命名,此时引号及 *Candidatus* 一词就应删去。

上述有关原核生物暂定名称的建议和讨论,值得我国研究原核生物分类及多样性的科技工作者参考和注意。

参 考 文 献

- [1] Malcolm CM B, Lindsay GR, Linn A K. AMBIO—人类环境杂志, 1994, 23: 497~502.
- [2] Mohammed H I D, Jorge M N. AMBIO—人类环境杂志, 1994, 23: 491~496.
- [3] Murray R G E, Schleifer K H. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 174~176.
- [4] Angert E R, Clements K D, Pace N R. Nature (London), 1993, 362: 239~241.
- [5] Delong E F, Wickham G S, Pace N R. Science, 1989, 243: 1360~1363.
- [6] Spring S, Amann R R I, Ludwig W. et al. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 2397~2403.
- [7] Poulsen L K, Ballard G, Stahl D A. Appl Environ Microbiol, 1993, 59: 1354~1360.
- [8] Judicial Commission of the ICSB. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 195~196.
- [9] Murray R G E, Stackebrandt E. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 186~187.
- [10] Snel J, Heinen P P, Blok H J. et al. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45: 780~782.
- [11] Tannock G W, Miller J R, Savage D C. Appl Environ Microbiol, 1984, 47: 441~442.
- [12] Snel J, Blok H J, Kengen H M P. et al. Syst Appl Microbiol, 1994, 17: 172~179.
- [13] Collins M D, Lawson P A, Willems A. et al. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 812~826.