



假丝酵母属的分类学研究进展

白逢彦

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

假丝酵母属(*Candida* Berkhout)是酵母菌中最大的一个属,现包括200多种,约占目前已知酵母菌总种数的三分之一^[1]。由于假丝酵母的经济重要性及其在整个酵母菌中所占的比重,对该属的分类研究作为其他各方面研究的基础,一直是一个颇为活跃的领域。研究手段不断改进,分类系统不断更新。近10多年来该属的定义已经过两次重大修订^[2,3],分子分类学方法在该属的分类学研究中已经由辅助手段变为常用指标。

1 假丝酵母属的建立及其定义的演变

假丝酵母属是Berkhout于1923年建立的^[4]。Yarrow和Meyer^[2]把球拟酵母属(*Torulopsis* Berlese)与假丝酵母属合二为一,把前者变为后者的异名,对假丝酵母属的定义作了较大的修订,使这样一个本来就不自然的类群更加异源化,在同一属内包括了子囊菌和担子菌两类酵母的无性型。因此随后就有人依靠下述分类技术的进步对假丝酵母属进行了清理工作。

1) 用透射电镜对酵母菌细胞壁的超微结构进行观察的结果发现担子菌酵母的细胞壁为多层结构,而子囊菌酵母的细胞壁则为双层结构。担子菌酵母为全壁芽殖型,而子囊菌酵母则为内壁芽殖型^[5]。

2) 在细胞壁水解物单糖组成上,子囊菌酵母与担子菌酵母也有明显差异,子囊菌酵母以甘露糖占优势,不含鼠李糖,岩藻糖和木糖;担子菌酵母则可分为两类:一类含有木糖及少量的甘露糖,另一类含有岩藻糖和/或鼠李糖及相当数量的甘露糖^[6]。

3) 子囊菌酵母与担子菌酵母在细胞壁超微结构及其水解物单糖组成上的差异,与DBB(Diazonium Blue B salt)颜色反应和尿素酶试验具有很好的对应性,前者均为阴性而后者均为阳性。这样,子囊菌酵母与担子菌酵母就可以通过简单的颜色反应而区别开来。

Weijman等^[3]主要根据上述相关性特征对假丝酵母属进行了重新定义,把假丝酵母属局限于只包含子囊菌酵母无性型的范围内,把原来包括在该属内的属于担子菌酵母无性型的种分别移入经过相应修订的红酵母属(*Rhodotorula* Harrison)和隐球酵母属

(*Cryptococcus* Kützing)中,从而使假丝酵母属多少呈现为一个较为自然的分类群。

但是,根据目前这一最新定义,假丝酵母属仍存在一定程度的异源性,表现在该属内泛醌(CoQ)系统的不均一性,包括具Q-6至Q-9四种类型的种。该属的异源性还表现在可以把子囊菌的内孢霉目(Endomyce-tales)中四个科酵母菌的无性型放入假丝酵母这一个属内。但是根据目前的分类技术与方法,除rRNA/rDNA序列分析外,尚难以把这四个科酵母菌的无性型区分开。因此,假丝酵母属更进一步自然化的处理,有赖于该属内各个种与相应的有性型酵母菌的rRNA/rDNA序列的比较分析。

2 假丝酵母属的常规和化学分类方法的建立与进展

2.1 常规分类方法的建立与标准化:1970年在Lodder主编的《酵母菌的分类学研究》第二版^[7]中,采纳了Wickerham和Burton^[8]以及Wickerham^[9]的同化反应测试方法并使其标准化,从而建立了包括假丝酵母属在内的酵母菌常规分类的标准方法。

但是,假丝酵母属的常规分类方法所测试的只是表型性状,并不一定反映种间的进化关系。只靠个别生理生化性状的差异作为不同假丝酵母菌种的鉴别依据有时是不可靠的。为了弥补常规分类方法的不足,新的技术与方法不断地被应用于假丝酵母属的分类学研究中。

2.2 免疫学及其它化学分类方法的应用:Tsuchia等从假丝酵母属的几个种着手开始了血清学方法在酵母菌分类中的应用研究,分别于1965年和1974年对其研究结果作了总结,并提出了一个与传统分类完全不同的分类系统^[10,11]。Spencer和Gorin^[12]用核磁共振技术对假丝酵母属作了专门的研究。他们的某些研究结果,如指出了用能否产生假菌丝来区分假丝酵母属和球拟酵母属的不可靠性,对该类酵母菌的分类学研究产生了积极的影响。

Yamada及其同事从70年代初开始研究酵母菌的泛醌(Ubiquinone或CoQ)系统及其分类学意义。大量的研究表明,CoQ类型具属内专一性。Yamada和Kondo^[13]发现根据当时的概念,假丝酵母属的CoQ系统很不一致,包括Q-6至Q-10五种类型,从一个侧面反映出该属为一极端异源化的属。

3 假丝酵母属的分子分类学

3.1 DNA碱基组成:大量研究表明,假丝酵母属内种的GC含量变化范围在30%~60%之间^[14,15],属内差异高达30%,是所有酵母菌属内GC值差异最大的,进一步反映了这个属的异源性。因为从已测定的酵母菌各属内GC含量来看,属内差异多在10%以内^[16]。用GC值可将假丝酵母属内的种分为两组:一组的GC值低于50%,伴随着尿素酶反应阴性;另一组的GC值高于50%,尿素酶反应则为阳性。这两组分别为子囊菌酵母和担子菌酵母的无性型。

DNA碱基组成的分类学意义主要是肯定性的。若两株酵母菌间的GC值差异超过1.0%~1.5%(浮力密度法)或超过2.0%~2.5%(热变性法),则表明二者不可能为同一种^[16,17]。但具有相同或相近GC值的菌株却不一定为同一种或具有相近的亲缘关系。

3.2 DNA-DNA(或DNA-RNA)同源性:DNA同源性或相关性能够比DNA碱基组成更精确地反映菌株间DNA碱基序列的相似程度,因此比后者具有更大的分类学价值,尤其适用于GC值相近的菌种间的分类。Price等^[17]根据他们的研究结果建议DNA同源率在80%以上的菌株应视为同一种。但DNA同源率在60%~80%之间的菌株亦常在以后的研究中遇到。因此目前酵母菌分类学者一般认为,DNA同源率在80%以上的菌株可以确认为属于同一种,在65%~80%之间的代表同一种内分化较远的菌株,在20%以下则被视为代表不同的种。

3.3 rRNA/rDNA序列分析:核糖体RNA(rRNA)或其模板核糖体DNA(rDNA)的序列分析正被广泛地运用于酵母菌的系统学研究中^[18]。Barns等^[19],Hendricks等^[20]以及Ohkuma等^[21]分析了部分假丝酵母菌的小亚基rRNA/rDNA序列并据此构建了系统树。Suzuki^[22]等测定了20种细胞水解液中含半乳糖的假丝酵母菌的小亚基rRNA基因序列,并与该属内部分不含半乳糖的种进行了比较分析。结果发现这两组菌在系统树上形成了两个独立的分支,表明酵母细胞水解液中单糖组成可以反映亲缘关系。

最近Kurtzman和Robnett^[23]分析了假丝酵母属内所有已知种的大亚基rRNA基因(LSU rDNA)5'端的部

分碱基序列(约600bp),并以此研究了该属内种间亲缘关系。结果表明这一区域具有足够的多变性,从而可以将假丝酵母属内的所有种清楚地区分开,但种内差异却不超过2个bp。而且这一区域内种间序列差异与DNA同源性具有很好的对应性。因此他们认为该段序列可以作为假丝酵母菌种间鉴别的可靠依据。

3.4 脉冲电泳核型分析:利用一个新发展起来的电泳技术,即脉冲电场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis),简称PFGE技术,可以在琼脂糖凝胶中分离完整的酵母染色体DNA分子,从而估测酵母细胞染色体条数及其大小^[24]。这一被称为脉冲电泳核型分析或分子核型分析的技术已被越来越多地应用于酵母菌的分类学研究中^[25]。在假丝酵母属的分类中也已经做了许多成功的研究工作。

Iwaguchi等^[26]和Doi等^[27]分析了*C. albicans*等8种临床常见病原假丝酵母菌的电泳核型,并估算出了每个种的平均染色体条数及整个基因组大小。各个种内不同菌株间存在染色体条数及大小的变化,但其变化幅度远小于种间差异,每种都具有独自的种内特异性核型。Lee等^[28,29]在用CHEF脉冲电泳系统比较分析一些假丝酵母菌模式菌株的电泳核型时发现具有相似或相同核型的种间也具有很高的DNA同源率。

白逢彦^[30]分析了克鲁斯假丝酵母(*C. krusei*),郎比可假丝酵母(*C. lambica*)和粗状假丝酵母(*C. valida*)的模式菌株的电泳核型,发现这三种表型性状相似的假丝酵母菌却具有互不相同的染色体DNA分子带型,为其分类学研究提供了更可靠的鉴别依据。白逢彦^[31]用脉冲电泳核型分析结合DNA碱基组成研究证明季也蒙假丝酵母(*C. guilliermondii*)为一异源性的种,其异名*Torula fermentati* Saito代表一个完全不同的种,因此作者以后者为基源异名建立了一个新组合:发酵假丝酵母*Candida fermentati*(Saito) Bai comb. nov..

3.5 多聚酶链反应(PCR)及其它技术的应用:Lehmann等^[32]和Williams等^[33]应用随机扩增DNA片段(random amplified polymorphic DNA, RAPD)的多态性以及PCR产物的限制性内切酶片段多态性等方法探讨了临床常见假丝酵母种间或菌株间基因型上的区别及其快速鉴定。Millán等^[34]用同功酶电泳图谱结合RAPD方法也发现*C. guilliermondii*为一异源性的种,并为*C. guilliermondii*和*C. fermentati*之间的区分提供了更多更简便的鉴别特征和方法。

4 结语

分子分类学原理与方法在假丝酵母属分类学研究中日益广泛的应用,在很大程度上改变了以前关于属,

种等的分类学概念。许多用常规方法建立起来的种,需要用分子分类学方法来证实。分子分类学方法已成为酵母菌分类学研究中不可或缺的手段。但是,常规方法仍是不可替代的基础。任何新技术与方法的应用,依然并且继续要以传统分类方法为依托。

参 考 文 献

- [1] Kreger - van Rij N J W ed. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V. 1984.
- [2] Yarrow D, Meyer S A. *Int J Syst Bact*, 1978, 28: 611~615.
- [3] Weijman A C M, Rodrigues de Miranda L, van der Walt J P. *Anton Leeuwenh*, 1988, 54: 545~553.
- [4] Berkhout C M. *De Schimmelgeslachten Monolia, Oidium, Oospora en Torula*. Thesis, Utrecht, 1923.
- [5] Kreger - van Rij N J W. In Rose A H, Harrison J S eds. *The Yeasts, Vol. 1, Biology of Yeasts*. London, Academic Press, 1987, 5~61.
- [6] Weijman A C M, Rodrigues de Miranda L. *Anton Leeuwenh*, 1988, 54: 535~540.
- [7] Lodder J ed. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam, North - Holland Publishing Company, 1970.
- [8] Wickerham L J, Burton K A. *J Bacteriol*, 1948, 56: 363~371.
- [9] Wickerham L J. *Taxonomy of Yeasts*. Techn. Bull. 1029, U.S. Dept. Agr., Washington, D.C. 1951.
- [10] Tsuchia T, Fukazawa Y, Kamakita S. *Mycopath Mycol Appl*, 1965, 26: 1~15.
- [11] Tsuchia T, Fukazawa Y, Taguchi M et al. *Mycopath Mycol Appl*, 1974, 53: 77~91.
- [12] Spencer J F J, Gorin P A J. *Anton Leeuwenh*, 1971, 37: 75~88.
- [13] Yamada Y, Kondo K. *Proc. 2nd. Int. Spec. Symp. Yeasts*, Tokyo, 1972. 63~69.
- [14] Nakase T, Komagata K. *J Gen Appl Microbiol*, 1971a, 17: 161~166.
- [15] Nakase T, Komagata K. *J Gen Appl Microbiol*, 1971b, 17: 259~279.
- [16] Kurtzman C P, Phaff H J. In Rose A H, Harrison J S eds. *The Yeast, Vol. 1, Biology of Yeasts*. London, Academic Press. 1987, 63~94.
- [17] Price C W, Fuson G B, Phaff H J. *Microbiol Rev*, 1978, 42: 161~193.
- [18] Kurtzman C P. *Yeast*, 1994, 10: 1727~1740.
- [19] Barns S M, Lane D J, Sogin M L et al. *J Bacteriol*, 1991, 173: 2250~2255.
- [20] Hendricks L, Goris A, Van de Peer Y et al. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 1223~1230.
- [21] Ohkuma M, Hwang C W, Masuda H N et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57: 1793~1794.
- [22] Suzuki M, Suh S O, Nakase T. In Nakase T, Takeo K eds. *Asian International Mycological Congress '96 Proceedings*, Chiba, Japan, 1996. 167.
- [23] Kurtzman C P, Robnett C J. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1216~1223.
- [24] Schwartz D C, Cantor, C R. *Cell*, 1984, 37: 67~75.
- [25] Boekhout T, Renting M, Scheffers W A et al. *Anton Leeuwenh*, 1993, 63: 157~163.
- [26] Iwaguchi S I, Homma M, Tanaka K. *J Gen Microbiol*, 1990, 136: 2433~2442.
- [27] Doi M, Homma M, Chindamporn A et al. *J Gen Microbiol*, 1992, 138: 2243~2251.
- [28] Lee C F, Lee F L, Hsu W H et al. *Can J Microbiol*, 1993, 39: 864~867.
- [29] Lee C F, Lee F L, Hsu W H. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 839~844.
- [30] 白達彦, 贾建华. *微生物学报*, 1996, 36: 329~334.
- [31] Bai F Y. *Syst Appl Microbiol*, 1996, 19: 178~181.
- [32] Lehmann P F, Lin D, Lasker B A. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 3249~3254.
- [33] Williams D W, Wilson M J, Lewis M A O et al. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2476~2479.
- [34] Millán R M S, Wu L C, Salkin I F et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, 47: 385~393.