

# 利用 RAPD 分子标记研究酵母菌的亲缘关系\*



徐 勇, 张 博, 勇 强, 黄敏仁, 余世袁

(南京林业大学 化学工程学院, 江苏 南京 210037)

XU Y

**摘 要:** 采用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记对 6 个属的 21 个酵母菌株的基因组 DNA 的多态性进行了研究, 并采用聚类分析法评价它们之间的亲缘关系。研究表明, RAPD 能够检测出酵母种内微小的遗传学差异, 以其特征谱带作为酵母菌种鉴定的特征标记。聚类分析结果显示, 休哈塔假丝酵母与热带假丝酵母之间亲缘较近, 遗传距离为 0.114, 它们与毕赤树干酵母之间遗传距离为 0.493, 粟酒裂殖酵母与卡斯伯酒香酵母的亲缘关系较近, 遗传距离为 0.322, 嗜单宁管囊酵母与克鲁斯假丝酵母间的亲缘较近, 遗传距离为 0.383, 它们与酿酒酵母间的遗传距离达到 0.443, 与产朊丝酵母聚类的遗传距离是 0.471。除假丝酵母属外, 大多数酵母属、种间的分类结果与经典形态学分类结果相符。

**关键词:** 酵母; 分子标记; 分类与鉴定; 亲缘关系

中图分类号: TQ920.1; Q819 文献标识码: A 文章编号: 0253-2417(2005)01-0001-04

## ANALYSIS OF POLYGENETIC AFFINITIES AMONG YEAST STRAINS WITH RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA ANALYSIS

XU Yong ZHANG Bo YONG Qiang HUANG Min-ren YU Shi-yuan

(College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract** The genotypic polymorphism and polygenetic affinities of intergenus, interspecies and intraspecies among 21 strains from 6 yeast genus were studied with random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis. The results showed that the minor differences of intraspecies in genetics could be distinguished and particular electrophoretic bands were selected as characteristic markers in the classification and identification of yeast with RAPD. The genetic distance between *Candida shehatae* and *C. tropicalis* was 0.114, and the genetic distance between them and *Pichia stipitis* reached 0.493. The genetic distance between *Schizosaccharomyces pombe* and *Bettanomyces custersii* was 0.322, the genetic distance between *Pachysolen tanophilus* and *C. krusei* was 0.383 and the genetic distance between them and *Saccharomyces cerevisiae* reached 0.443. The genotypic classification of species except *Candida* seemed to be consistent with traditional morphological classification.

**Key words** yeast molecular marker classification and identification polygenetic affinities

酵母菌是一种重要的微生物资源, 其分类与鉴定是人类利用的基础。传统的酵母菌分类与鉴定是一项复杂而细致的工作, 需要在形态学和生理学方面做大量的试验。由于酵母的形态和生理学特点受培养条件的影响很大, 得出的鉴定结果往往不够稳定; 同时受到环境因素的影响, 某些酵母菌属、种在形态学和生理学方面的差异极不显著, 采用传统分类法也相当困难, 如菌种水平的鉴定一般需要进行 50 ~ 100 次检测<sup>[1]</sup>。近年来, 分子标记技术的引入给微生物分类鉴定带来了巨大的推动作用, 使分类鉴定工作由一般的表型特征鉴定深化到分子水平和遗传型特性的鉴定<sup>[2]</sup>。

分子标记技术是指能够提供分子标记的分子生物学技术, 即直接或间接地检测生物大分子的一级

\* 收稿日期: 2004-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770601, 30070636)

作者简介: 徐 勇 (1971-), 男, 湖北安陆人, 讲师, 博士生, 从事林产生物化工研究。

结构,在基因组上寻找多态位点,用以指示个体间或居群间的遗传变异或评估种间的亲缘关系<sup>[3]</sup>。其中,应用于酵母菌鉴定的 DNA 指纹技术 (DNA fingerprint) 主要有内切酶作用片段多态性 (restriction enzyme fragment polymorphism, REFP)、限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphism DNA, RAPD) 等<sup>[4]</sup>。

基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 的 RAPD 采用随机的寡聚核苷酸为引物,可检测到生物体的整个基因组 DNA,因而大大简化了技术过程和工作强度,在菌种的鉴定、基因遗传图谱制作、数量性状基因研究、自然群体中遗传变异及种间杂交的研究、流行病学调查和菌株鉴别上均发挥了重要的作用<sup>[5]</sup>。与 REFP 和 RFLP 相比, RAPD 对样本 DNA 要求的量少,质量要求不高,操作简便迅速,成本也比较低廉,因而 RAPD 适于在微生物分子标记技术中应用<sup>[6]</sup>,且其在酵母菌分类与鉴定中的研究活跃。本研究选取 21 个酵母菌株,采用 RAPD 分子标记对它们进行了鉴定,并就其亲缘关系进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

共选取假丝酵母属 *Candida*、管囊酵母属 *Pachysoles*、毕赤酵母属 *Pichia*、酒香酵母属 *Brettanomyces*、裂殖酵母属 *Schizosaccaromyces* 和酵母属 *Saccharomyces* 等 6 个属的 21 个酵母菌株,其中大部分酵母菌株可用于木糖或植物纤维水解液发酵。

### 1.2 RAPD 扩增反应及电泳检测

酵母菌基因组 DNA 提取采用玻璃珠破菌法<sup>[7]</sup>。PCR 引物为 Operon 公司产品,引物长度为 10 bp,采用 MJ220 型 PCR 扩增仪。RAPD 的扩增反应体系为 20  $\mu$ L,其中酵母 DNA 模板量 20 ng 左右,引物 1  $\mu$ mol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 1 $\times$  buffer, Taq 酶 1 U, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L。PCR 扩增反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 再循环 38 轮 (94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 40  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 90 s), 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

RAPD 扩增产物电泳检测: 1% 琼脂糖凝胶 [加入微量溴化乙锭 (EB)], 3 V/cm 泳动 3 h, 采用 BD-RAD 凝胶成像系统采集电泳图谱。

### 1.3 RAPD 分析

遗传距离估算采用 Popgene1.31 软件, 聚类分析采用 SAS 软件。

## 2 实验结果

### 2.1 RAPD 扩增结果

加入不同用量的模板 DNA 进行 PCR 扩增, 通过比较确定了 PCR 扩增体系中的最佳模板 DNA 浓度为 20 ng 左右。在此基础上, 对 90 个 RAPD 引物进行了筛选, 共筛选出 33 个扩增产物电泳谱带清晰、多态性高的引物, 共扩增出 498 条谱带, 平均每个引物可扩增出 15.1 条谱带, 其中多态位点高达 90% 以上。引物 AV19 和 Q09 的 RAPD 结果如图 1 所示。

由图 1 可见, 酵母属和种间的 RAPD 结果差异十分显著, 属、种间的多态性较高。一般认为, RAPD 分子标记技术适应于研究种内 (种下) 水平的遗传变异, 但目前已被逐渐引入到酵母的种和属间关系的鉴定<sup>[7]</sup>。本研究结果进一步表明, RAPD 可用于酵母属和种间关系的鉴定。其中, 某些酵母菌的 RAPD 特征谱带十分突出, 如引物 AV19 和 Q09 所获得的酵母菌 1、13 和 20 的, 这些特征谱带可作为酵母菌鉴定的特征分子标记。

### 2.2 聚类分析

通过人工读带 (删除模糊不清和强度低的电泳谱带), 将 RAPD 的电泳图谱转换成二元矩阵, 以 Nei 遗传距离采用非加权配对算术平均法 (unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA) 对 21 个酵母菌株的 RAPD 结果进行聚类分析, 得到的聚类分析树状谱如图 2 所示。

表 1 实验所采用的酵母菌株

Table 1 Strains of yeast analyzed with RAPD

序号 No	菌株名称 strain names	菌株来源 source of strains	典型生理特征 description
OB1	产朊假丝酵母 <i>C. utilis</i>	ATCC22023	发酵木糖 xylose fermentation
OB2	假丝酵母 <i>C. sp</i> Berkh	XF217	发酵木糖 xylose ferm.
OB3	假丝酵母 <i>C. sp</i> Berkh	X024	利用木糖 xylose ferm.
OB4	热带假丝酵母 <i>C. tropicalis</i>	AS2 402	同化五碳糖 pentose assimilation
OB5	热带假丝酵母 <i>C. tropicalis</i>	USA	造纸废液发酵 pulping waste ferm.
OB6	嗜单宁管囊酵母 <i>P. tanophilus</i>	ATCC32691	发酵戊糖 pentose ferm.
OB7	嗜单宁管囊酵母 <i>P. tanophilus</i>	NRRL Y-2461	发酵戊糖 pentose ferm.
OB8	休哈塔假丝酵母 <i>C. shehatae</i> NL 05	南京林业大学, NFU	发酵木糖 xylose ferm.
OB9	休哈塔假丝酵母 <i>C. shehatae</i> NL 01	南京林业大学, NFU	发酵木糖 xylose ferm.
OB10	休哈塔假丝酵母 <i>C. shehatae</i> NL 02	南京林业大学, NFU	发酵木糖 xylose ferm.
OB11	毕赤树干酵母 <i>P. stipitis</i> NL 03	南京林业大学, NFU	发酵木糖 xylose ferm.
OB12	毕赤树干酵母 <i>P. stipitis</i> NL 04	南京林业大学, NFU	发酵木糖 xylose ferm.
OB13	卡斯伯酒香酵母 <i>B. auersi</i>	ATCC37774	
OB14	粟酒裂殖酵母 <i>S. panbe</i>	ATCC26192	发酵 D-木糖 D-xylose ferm.
OB15	克鲁斯假丝酵母 <i>C. Krusei</i>	NCYC872	分解纤维素 cellulose utilization
OB16	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> H annsen	USA	酿酒 ethanol ferm.
OB17	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> H annsen	AS2 541	植物酿酒 plant util
OB18	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> H annsen	Y47	木屑酿酒 lignocellulose util
OB19	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> H annsen	Poland 33 paca	造纸废液发酵 pulping waste ferm.
OB20	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i> H annsen	南京林业大学, NFU	造纸废液发酵 pulping waste ferm.
OB21	面包酵母 <i>S. cerevisiae</i> Baker	南京林业大学, NFU	

由图 2 可知, 尽管同种异株酵母间的距离很小, 相似性系数极高, 但借助 RAPD 分子标记技术仍然可以检测出它们在遗传学上的差异, 将它们鉴定出来, 如: 1) 酿酒酵母 16 17 18 和 19 的遗传距离在 0.100 以下, 相似性系数在 90% ~ 95% 之间; 2) 休哈塔假丝酵母 *C. shehatae* NL 05 和 *C. shehatae* NL 01 的遗传距离为 0, 相似系数为 1, 即 RAPD 标记技术将二者视为同一种酵母菌株。它们与 *C. shehatae* NL 02 之间的遗传距离也仅为 0.010, 相似系数达到 0.990。3) 2 个假丝酵母 *C. sp* Berkh 的种内遗传距离仅为 0.020, 3 个嗜单宁管囊酵母 *P. tanophilus* 的种内遗传距离为 0.035, 2 个毕赤树干酵母的种内遗传距离为 0.052。而采用传统的形态学和生理学分类法, 这些酵母种内 (或种下) 的各菌株间差异难以鉴定, 或需要大量细致的分类和鉴定实验才能做出相应的判断 (未发表)。

通过 RAPD 聚类分析不仅能够表征各酵母属、种间的亲缘关系, 而且还可以定量表征各菌株彼此之间的遗传距离和相似性系数的大小 (相似性系数数据表略)。在标记的酵母菌中: 1) 休哈塔假丝酵母与热带假丝酵母之间亲缘较近, 遗传距离为 0.114, 它们与毕赤树干酵母之间遗传距离为 0.493; 2) 粟酒裂殖酵母与卡斯伯酒香酵母的亲缘关系较近, 遗传距离为 0.322, 嗜单宁管囊酵母与克鲁斯假丝酵母间的亲缘较近, 遗传距离为 0.383, 它们聚类后与酿酒酵母间的遗传距离达到 0.443, 再与产朊丝酵母聚类的遗传距离是 0.471; 3) 假丝酵母 *C. sp* Berkh 与上述其它酵母的亲缘关系较远, 遗传距离达到 0.567。本研究建立的酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、嗜单宁管囊酵母、毕赤树干酵母和休哈塔假丝酵母的聚类分析结果与基于 rRNA 测序所得到的进化树基本一致<sup>[8]</sup>, 但对假丝酵母属的分类却与传统的形态学不相符<sup>[9]</sup>。

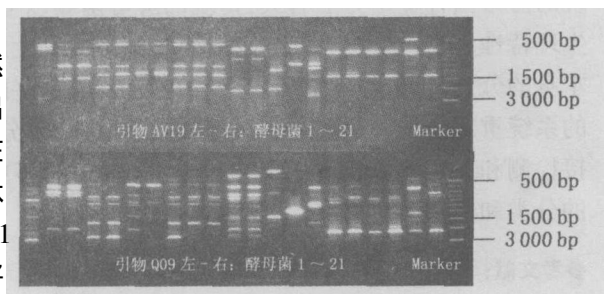


图 1 引物 AV19 和 Q09 对 21 个酵母菌株的 RAPD 扩增结果

Fig 1 Random amplified polymorphism DNA products of 21 strains of yeast by primer AV19 and primer Q09

### 3 结论

3.1 RAPD 能够检测出酵母种内微小的遗传学差异, 可利用 RAPD 的特征谱带作为酵母菌种鉴定的特征标记。

3.2 RAPD 聚类分析可以定量表征出酵母菌属、种间和种下的遗传距离和相似性系数, 评价酵母菌种之间的亲缘关系。休哈塔假丝酵母与热带假丝酵母之间亲缘较近, 遗传距离为 0.114, 它们与毕赤树干酵母之间遗传距离为 0.493, 粟酒裂殖酵母与卡斯伯酒香酵母的亲缘关系较近, 遗传距离为 0.322, 嗜单宁管囊酵母与克鲁斯假丝酵母间的亲缘较近, 遗传距离为 0.383, 它们与酿酒酵母间的遗传距离达到 0.443, 与产朊丝酵母聚类的遗传距离是 0.471。

3.3 在本研究中, 大多数属、种基因组 DNA 分类结果与形态学分类结果相符, 部分酵母菌的分类结果也与 rRNA 的分析结果基本一致, 但假丝酵母属却例外。产朊假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、热带假丝酵母和休哈塔假丝酵母、假丝酵母 *Berkh* 之间的关系似乎超出了种间的等级范围, 与 Lodder (1970) 的形态学的假丝酵母属的分类结果不相符<sup>[9]</sup>。前期的分子标记研究也发现了类似的结果<sup>[9-11]</sup>。这首先与传统的酵母菌种鉴定方法有关: 传统的酵母菌属以上的分类单位划分是以形态特点为主, 而种的鉴定则以生理特性为主, 这些均属于表型性状, 并不能完全反映酵母菌在遗传学上的关系; 同时也与假丝酵母属本身的分类有关: 假丝酵母属为半知菌亚门, 这些酵母如果一旦发现其有性阶段, 就应该按其有性阶段的系统重新分类, 并且假丝酵母属的有性世代也分属于不同的属。与之相比, 采用分子标记可直接或间接检测和鉴定遗传相对稳定的基因组 DNA, 能够更准确地反映酵母菌种间的亲缘关系, 因而在酵母菌的分类和鉴定上更具有优越性。

#### 参考文献:

- [1] 无锡轻工业大学. 微生物学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990
- [2] MARTIN I A V. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine [J]. *Inter Microb* 2003, 6(3): 175-182
- [3] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 [M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [4] SCHOFELD M A. Difference of brewing yeast strains by DNA fingerprinting [J]. *J Ins Brewing* 1995, 101(4): 75-78
- [5] BALEIRAS C M, VAN D V J M, HORSIRA H H, *et al*. RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts [J]. *Int J Food Microbiol* 1994, 24(1): 249-260
- [6] TORNA IL J, DLAUCHY D D. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques [J]. *Inter J Food Microbiol* 2000, 62(1): 37-45
- [7] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 523.
- [8] JEFFRES T W, KURTAMAN C P. Strain selection taxonomy and genetics of xylose-fermenting yeasts [J]. *Enzyme Microbiol Technol* 1994, 16(10): 922-932
- [9] 张纪忠. 微生物分类学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990
- [10] 李冬梅, 王端礼, 李世荫. 致病酵母基因组多态性及亲缘关系的研究 [J]. *微生物学报*, 1997, 37(2): 135-141
- [11] 白彦彦, 贾建华, 梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及基分类学意义 [J]. *菌物系统*, 2002, 21(1): 27-

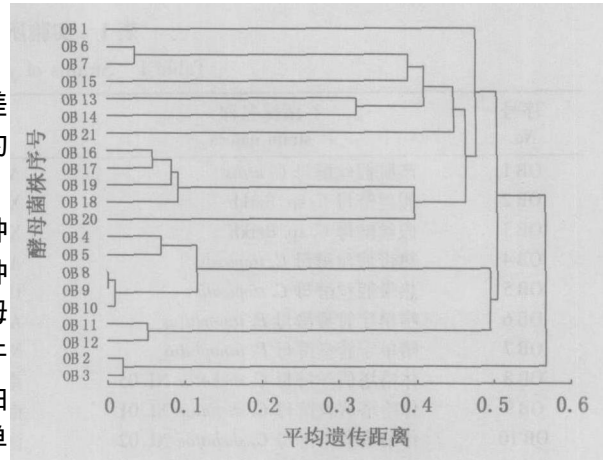


图 2 酵母菌株 RAPD 的聚类分析树状谱

Fig 2 The clustering dendrogram based Nei's genetic distance by RAPD in 21 strains of yeast