

克鲁斯假丝酵母及其近似种的脉冲电泳核型分析

白逢彦 贾建华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 用钳位均匀电场脉冲电泳(CHEF)系统分析了克鲁斯假丝酵母(*Candida 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, 发现这三种表型相似的假丝酵母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可靠的鉴别依据。在常规分类学研究的基础上, 测定了 AS 2.75(原定种名为(*C. inconspicua*), AS 2.1182(原定种名为 *C. lambica*)和 AS 2.1772(未定种)等三株假丝酵母的 G+C 含量和脉冲电泳核型。通过对已报道的 *C. inconspicua* 的 G+C 含量及上述三种假丝酵母模式菌株的脉冲电泳核型的比较分析证明, AS 2.75 和 AS 2.1772 为粗状假丝酵母(*C. valida*), AS 2.1182 为克鲁斯假丝酵母(*C. krusei*)。

关键词 脉冲电泳核型, G+C 含量, 假丝酵母属, 分类

传统的酵母菌分类, 是以形态特征和生理生化特性等表型性状为基础的。但这些表型性状只反映了很有限的遗传信息^[1,2]。有些酵母菌不仅细胞形态可以改变^[3,4], 而且生理生化性状(如对某些糖类的发酵及同化能力)也会发生变异^[5,6]。因此, 只靠个别表型性状的差异作为不同酵母菌种的鉴别依据有时是不可靠的。为了弥补传统分类方法的不足, 新的技术与方法不断地被引入酵母菌的分类学研究中, 尤其是应用现代分子生物学技术而发展起来的分子分类学方法, 为酵母菌的分类学研究提供了更为可靠的手段^[7]。

作者比较分析了克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)及其相似种郎比可假丝酵母(*C. lambica*)和粗状假丝酵母(*C. valida*)等在脉冲电泳核型上的差异, 并分析了这些差异在分类学上的意义。在形态及生理生化性状研究的基础上, 测定了中国普通微生物菌种保藏中心(CGMCC)所藏假丝酵母属内原鉴定分别为平常假丝酵母(*C. inconspicua*)和郎比可假丝酵母(*C. lambica*)的两个菌株(AS 2.75, AS 2.1182)及一未定种菌株(AS 2.1772)的 G+C 含量和脉冲电泳核型, 并以此为依据对它们进行了重新鉴定。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和常规鉴定

供试的 7 株假丝酵母来源见表 1。常规的形态观察及生理生化性状测定按照 van der Walt 和 Yarrow 描述的酵母菌分类标准方法进行^[8]。

1.2 DNA 提取和纯化

基本按照 Marmur 的方法^[9]进行,但作如下改进:细胞壁用解壁酶(Lyticase, Sigma) 破解,DNA 粗提液用 RNA 酶 A(国产)和 α -淀粉酶(国产)去 RNA 和多糖,再用蛋白酶 E(Proteinase E, Merck)去蛋白,纯化后的 DNA 溶于 $0.1 \times \text{SSC}$ 缓冲液中用紫外分光光度计检测其纯度,若所测 DNA 溶液的紫外吸收比值与下述理想比值: $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = 1.86$, $\text{OD}_{230} / \text{OD}_{260} < 0.5$ ^[10]的偏差大于 0.05 时,则重复相应的纯化步骤,直至达到要求。

表 1 供试菌株及其来源

Table 1 The sources of the strains studied

种名	菌株 [*]	分离来源
Species	Strain	Isolation source
克鲁斯假丝酵母	AS 2.1182	不详 unknown
<i>Candida krusei</i>	CBS 573 ^{**}	痰 sputum
郎比可假丝酵母	CBS 1876 ^{**}	啤酒 lambic beer
<i>Candida lambica</i>		
粗状假丝酵母	AS 2.75	不详 unknown
<i>Candida valida</i>	AS 2.1772	树胶 tree exudate
	CBS 638 ^{**}	酒 wine
东方伊萨酵母	NRRL Y5376 ^{**}	果汁 fruit juice
<i>Issatchenkia orientalis</i>		

^{*} AS. 中国科学院微生物研究所;CBS. 荷兰菌种保藏中心;NRRL. 美国农业部北方应用研究所发酵部。

^{**} 模式菌株。

^{*} AS. Institute of Microbiology, Academia Sinica; CBS. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Natherlands; NRRL. Fermentation Section, Northern Utilization Research Branch, U.S.Department of Agriculture, Illinois, USA.

^{**} Type strain.

1.3 DNA 溶解温度(Tm)的测定及 G+C 含量的计算

根据 Marmur 和 Doty 的方法^[11]在 $0.1 \times \text{SSC}$ 缓冲液中测定 DNA 样品的 Tm 值,以从拟平滑假丝酵母(*Candida parapsilosis*)的模式菌株 JCM 1785(=CBS604)中提取的 DNA 作为标准校正所测菌株的 Tm 值。在 $0.1 \times \text{SSC}$ 中,JCM1785 的 $T_m = 70.6^{\circ}\text{C}$ ^[12]。用 Owen 等^[13]给出的公式: $\text{mol}\% \text{G+C} = 2.08T_m - 106.4$ 计算 G+C 含量。

1.4 脉冲电泳核型分析

完整酵母菌染色体 DNA 样品的制备按 Schwartz 和 Cantor 的方法^[14]进行。脉冲电泳用 CHEF-DR II 型(Bio-Rad)脉冲电泳仪进行。琼脂糖浓度为 0.8%,电泳液为 $0.5 \times \text{TBE}$,电泳程序设置为:100V,360s 脉冲间隔电泳 30h,然后 90V,720s 间隔电泳 40h,电泳液温度维持在 $12^{\circ}\text{C} \sim 14^{\circ}\text{C}$ 。电泳后胶块在溴化乙锭水溶液($0.5\mu\text{g} / \text{ml}$)中染色 30min,然后在蒸馏水中脱色,放在 302nm 紫外灯下观察并照相,以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的染色体

DNA 分子量标样 (Bio-Rad) 作为参照标准计算每条带的分子量。

2 结果

2.1 形态及生理生化性状比较

C. krusei, *C. lambica*, *C. valida* 和 *C. inconspicua* 等四种假丝酵母的形态及生理生化特性很相似: 发酵能力较弱, 不发酵或只发酵葡萄糖, 同化能力也较弱, 在常规测试中只能同化 27 种碳源化合物中的 3~5 种 (见表 2)。因此, 用传统方法有时难以将它们清楚地区分开。

表 2 三菌株的部分性状和 GC 值与其相关种标准描述的比较

Table 2 Comparison of selected properties and G+C contents among the three strains and the standard descriptions of the species concerned

菌株或种名 Strain or species	醭膜形成 Pellicle formation	发酵葡萄糖 Fermentation of glucose	同化木糖 Assimilation of xylose	同化甘油 Assimilation of glycerol	同化乳酸 Assimilation of lactate	同化琥珀酸 Assimilation of succinate
AS 2.75	+	+W	-	+	-	-
AS 2.1772	+	+VW	-	+	-	-
<i>C. valida</i>	+	+s	-	+	+, -	+, -
<i>C. inconspicua</i>	-	-	-	+	+	+
AS 2.1182	+	+	-	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	+	-	+	+	+
<i>C. lambica</i>	+	+	+	+	+	+

菌株或种名 Strain or species	同化柠檬酸 Assimilation of citrate	无维生素生长 Growth in vitamin-free medium	37℃ 下生长 Growth at 37℃	42℃ 下生长 Growth at 42℃	G+C 含量 mol% G+C
AS 2.75	-	+	-	-	44.4
AS 2.1772	-	+	-	-	44.9
<i>C. valida</i>	-	+, -	-	-	44.4*
<i>C. inconspicua</i>	-	-	+	-	36.7*
AS 2.1182	-	+	+	+	41.5
<i>C. krusei</i>	+, -	+	+	+	39.6*
<i>C. lambica</i>	-	-	+W	-	42.4~43.2*

* 引自 Meyer 等^[15]
From Meyer et al.^[15]

在对保藏于中国普通微生物菌种保藏中心的约 70 株假丝酵母进行生理生化性状的重新测试后发现, 原鉴定为 *C. inconspicua* 的 AS 2.75 菌株和原鉴定为 *C. lambica* 的 AS 2.1182 菌株的生理生化特性与它们各自原定种名的标准描述不符 (见表 2)。AS 2.75 在

醌膜的形成,葡萄糖发酵,在无外源维生素培养基中的 37℃ 下的生长情况与 *C. inconspicua* 的标准描述完全不同。该菌株的上述四项性状和其他性状却与 *C. valida* 的标准描述完全相符。因此,AS 2.75 的正确种名似应为 *C. valida*。

AS 2.1182 与其原定种名 *C. lambica* 标准描述的区别也有四项:木糖同化,柠檬酸同化,在无外源维生素培养基中的生长情况以及在 42℃ 下的生长情况。该菌的这四项特性和其他生理生化特性却与 *C. krusei* 的标准描述相同。因此,AS 2.1182 应属于 *C. krusei*,而不是 *C. lambica*。

在常规分类中发现一株未定种的假丝酵母菌株 AS 2.1772 的表型性状与 *C. valida* 最相近,但不完全相同,在葡萄糖的发酵上与 *C. valida* 的标准描述略有差异(见表 2)。

为确保 AS 2.75、AS 2.1182 和 AS 2.1772 这三株假丝酵母鉴定的正确性,又测定了它们的 G+C 含量和脉冲电泳核型。

2.2 G+C 含量比较

C. krusei、*C. lambica*、*C. valida* 和 *C. inconspicua* 四种菌的 GC 值均已有报道(见表 2)。在这四个种中,*C. inconspicua* 的 GC 值最低,为 36.7mol%,其他三种的较高,为 40% 左右,但中间差异不太大。测定的 AS 2.75、AS 2.1182 和 AS 2.1772 的 GC 值见表 2。AS 2.75 的 GC 值(44.4mol%)与其原定种 *C. inconspicua* 相差 7.7%,这一数据排除了该菌株是 *C. inconspicua* 的可能性。因为已有大量的研究结果证明,在酵母菌中,同一种内不同菌株间的 GC 值差异不会大于 2.0%~2.5%^[7]。AS 2.75 和 AS 2.1772 两株菌的 GC 值均与 *C. valida* 最接近,误差不大于种内变化范围。AS 2.1182 的 GC 值(41.5mol%)与 *C. krusei* 和 *C. lambica* 均较接近,因此用 GC 值尚不易判断该菌株的归属。

2.3 脉冲电泳核型分析

用 GC 值虽然可以将 *C. inconspicua* 和 *C. krusei*、*C. lambica*、*C. valida* 区分开,但后三者之间的区别不是太明显,在 GC 值上不存在具有说服力的差异,因此又进一步研究了它们的脉冲电泳核型。

如图 1 所示,*C. krusei*、*C. lambica* 和 *C. valida* 这三种在表型及 GC 值上相似的种,在脉冲电泳核型上却具有明显的差异。*C. krusei* 及其有性型 *Issatchenkia orientalis* 的模式菌株 CBS 573 和 NRRL Y5396 均可分辨出两条带,大小为 1.6mb~3.2mb,*C. lambica* 的模式菌株 CBS 1876 有 5 条带,大小范围为 1.7mb~3.7mb,*C. valida* 的模式株 CBS 638 可见 2 条

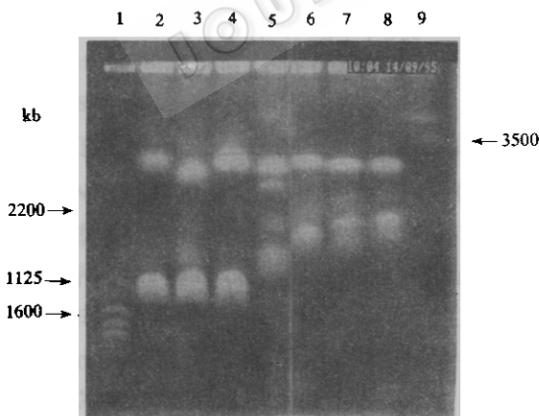


图 1 供试菌株的脉冲电泳核型

Fig.1 Electrophoretic karyotypes of the strains studied.

1. *S. cerevisiae*; 2. CBS 573; 3. NRRL Y5376; 4. AS 2.1182; 5. CBS 1876; 6. CBS 638; 7. AS 2.75; 8. AS 2.1772; 9. *Schiz. pombe*.

带,大小分别为 2.1mb 和 3.1mb。AS 2.1182 的带型与 *C. krusei* 及其有性型相同,而与 *C. lambica* 相差很大。AS 2.75 与 AS 2.1772 均与 *C. valida* 的核型最相似。

3 讨论

GC 值在酵母菌分类学研究中的价值主要是排他性的,如果两株酵母菌在 GC 值上存在显著差异,则可排除它们具有相同或相似基因序列的可能性,因而不可能具有相近的亲缘关系^[2]。大量的 DNA-DNA 同源性研究结果证实,若两株酵母菌的 GC 值差异大于 1.0%~1.5% (用浮力密度法测定)或大于 2.0%~2.5% (用热变性温度法测定),则表明它们不可能属于同一个种^[2,7]。

脉冲电泳核型在酵母菌的分类学研究中则具有一定的肯定性意义。脉冲电泳是一种可在琼脂糖凝胶中将不同大小的完整染色体 DNA 分子分离开的技术。用该技术可以推测出一种酵母菌所具有的染色体条数及每条染色体的大小。虽然酵母菌中存在种内染色体长度多态性 (chromosomal length polymorphisms)^[16],但一般来说,一种酵母菌的染色体条数及其大小是稳定的,因而同种酵母菌的不同菌株会具有相同或相似的脉冲电泳核型。脉冲电泳核型分析技术在酿酒酵母属 *Saccharomyces* 等酵母菌的分类学研究中已有不少成功的应用^[17~19]。

在本研究所涉及的 4 种表型性状相似的假丝酵母菌中,用 GC 值可清楚地证明 AS 2.75 不属于其原定种 *C. inconspicua*。脉冲电泳核型分析结合生理生化性状则确证了 AS 2.75 和 AS 2.1772 均属于 *C. valida*。AS 2.1182 与 *C. krusei*、*C. lambica* 的模式菌株的脉冲电泳核型比较分析也清楚地证明该菌的正确种名应为 *C. krusei*。AS 2.1182 为耐高温产香酵母,其种名的正确鉴定,表明可以在属于 *C. krusei* 的菌株中寻找更好的产香酵母菌,因而具有一定的生产意义。

参 考 文 献

- [1] Barnett J A. Biochemical differentiation of taxa with special reference to the yeasts. In Ainsworth G C *et al* ed. The Fungi, III. The fungal population. New York: Academic Press, 1968. 557~595.
- [2] Price C W, Fuson G B, Phaff H J. *Microbiol Rev*, 1978, **42**: 161~193.
- [3] Lindegren C C, Lindegren G. *J Gen Microbiol*, 1951, **5**: 885~893.
- [4] Townsend G F, Lindegren C C. *J Bacteriol*, 1954, **67**: 480~483.
- [5] Scheda R, Yarrow D. *Arch Mikrobiol*, 1966, **55**: 209~225.
- [6] Scheda R, Yarrow D. *Arch Mikrobiol*, 1968, **61**: 310~316.
- [7] Kurtzman C P, Phaff H J. Molecular taxonomy. In: Rose A H *et al* ed. The Yeasts, 1, Biology of Yeasts. London: Academic Press, 1987. 63~94.
- [8] Van der Walt J P, Yarrow D. Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In: Kreger-van Rij N J W ed. The Yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984. 45~104.
- [9] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, **3**: 208~218.
- [10] Kurtzman C P, Smiley M J, Johnson C J *et al*. *Int J System Bacteriol*, 1980, **30**: 208~216.
- [11] Marmur J, Doty P. *J Mol Biol*, 1962, **5**: 109~118.
- [12] Smith M Th, Poot G A, Kull T. *Stud Mycol*, 1989, **31**: 171~176.
- [13] Owen R J, Hill L P, Lapage S P. *Biopolymers*, 1969, **7**: 503~516.
- [14] Schwartz D C, Cantor C R. *Cell*, 1984, **37**: 67~75.

- [15] Meyer S A, Ahearn D G, Yarrow D. *Candida* Berkhout. In: Kreger-van Rij N J W ed. The Yeasts, a taxonomic study, 3rd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1984. 585~844.
- [16] Boekhout T, Renting M, Scheffers W A *et al.* *Anton Leeuwenh*, 1993, **63**: 157~163.
- [17] Vaughan-Martini A, Martini A, Cardinali G. *Anton Leeuwenh*, 1993, **63**: 145~156.
- [18] Cardinali G, Martini A. *Int J System Bacteriol*, 1994, **44**: 791~797.
- [19] Naumov G I, Naumova E S, Korhola M. *System Appl Microbiol*, 1995, **18**: 103~108.

THE SIGNIFICANCE OF ELECTROPHORETIC KARYOTYPES IN THE CLASSIFICATION OF *CANDIDA KRUSEI* AND RELATED SPECIES

Bai Fengyan Jia Jianhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract The electrophoretic karyotypes of the type strains of *Candida krusei* (CBS 573), *C. lambica* (CBS 1876), and *C. valida* (CBS 638) were examined by using the CHEF (contour-clamped homogenous electric field) system for pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The chromosomal DNA banding patterns of the three phenotypically similar taxa were shown to be clearly different. Among the *Candida* strains preserved in China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC), two strains, AS 2.75 and AS 2.1182, were originally identified as *C. inconspicua* and *C. lambica*, respectively. However, on the basis of morphological and physiological recharacterization and G+C content determination, AS 2.75 with 44.4 mol% G+C and AS 2.1182 with 41.5 mol% G+C were reidentified as *C. valida* and *C. krusei*, respectively. The reidentification of them was confirmed by comparative electrophoretic karyotyping of the two strains and the type strains of *C. krusei*, *C. lambica*, and *C. valida*, which indicates that a) AS 2.75 and CBS 638 have similar chromosomal DNA banding patterns consisted of two to three bands ranging in size from 2.1 to 3.1mb; b) AS 2.1182 and CBS 573 have almost identical electrophoretic karyotypes composed of two bands with molecular sizes ranging from 1.6 to 3.2 mb; and c) CBS 1976 has an unique karyotype with at least five chromosomal DNA bands ranging in size from 1.7 to 3.7 mb. A formerly unidentified strain AS 2.1772 was likewise classified as *C. valida* based on its morphological and physiological properties, its G+C content, and its electrophoretic karyotype.

Key words G+C content, Electrophoretic karyotype, *Candida krusei*, Classification