

# 基于 26S rDNA D1/D2 区序列分析的 15 株白地霉 分子分类学研究

马 凯, 刘光全, 李金霞, 姚 栗, 程 池\*

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100027)

**摘 要** 采用 26S rRNA 基因 D1/D2 区系统发育分析的方法对 CICC(中国工业微生物菌种保藏管理中心)保藏的 15 株白地霉(*Geotrichum candidum*)菌种进行复核鉴定。系统发育分析结果表明 15 株白地霉属于地霉属的成员,且形成两个系统发育分支,系统发育上最接近 *Galactomyces geotrichum* NRRL Y-17569<sup>T</sup>, 与其同源性为 96.3% ~ 98.3%。15 株白地霉 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列显著不同于地霉属的模式种及其它种,可能代表地霉属的两个新种,但这一结论尚需进一步的实验去证实。

**关键词** :白地霉;分类;系统学;26S rRNA 基因;D1/D2 区

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2007)02-0359-04

白地霉(*Geotrichum candidum*)是一种形态类似小型丝状真菌的酵母菌,由于其菌落呈白色绒毛状而得名。白地霉具有分支的菌丝体,形成单个或成链的节孢子,节孢子呈长筒形或方形,也有椭圆或圆形。其菌体蛋白营养价值很高,广泛用于动物发酵饲料的生产。同时白地霉也可用于白酒生产和有机废水处理<sup>[1,2]</sup>,比如我国传统名酒--汾酒的大曲中就含有相当数量的白地霉。在欧洲白地霉是奶酪加工中重要的菌株,在奶酪的成熟过程中起到重要作用,同时给奶酪提供某些特殊芳香风味<sup>[3,4]</sup>。

分类学上,白地霉属于半子囊菌纲、酵母目、假丝酵母科、地霉属<sup>[5]</sup>,其有性型名称为 *Galactomyces geotrichum*。文献记载有白地霉的同物异名多达几十种<sup>[5]</sup>,比较常见的有 *Oospora lactis* 和 *Endomyces geotrichum*。虽然对白地霉的研究开展较早,在工业上使用也很广泛,但大多数白地霉工业菌种的鉴定仍依赖于表型特征,由于其本身的复杂性和菌株的多样性,运用分子分类方法对工业白地霉菌种准确鉴定分析十分必要。本研究运用 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列系统发育分析的方法研究了 CICC 保藏的 15 株白地霉菌株,旨在把分子生物学技术应用于白地霉分类鉴定,为中心菌种质量控制提供依据和支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源与培养基** :实验所用菌株共 15 株,均为 CICC 保藏,菌株培养所用培养基为 5°Be 麦芽汁培养基<sup>[6]</sup>。各菌株相关信息如表 1 所示。

**1.1.2 主要试剂和仪器** :*Taq* 酶、dNTP、DNAMarker 购自天为时代生物有限公司;GoldView 购自北京塞百盛基因技术有限

公司;Tris、EDTA、SDS、醋酸钾购自北京华绿渊生物科技发展有限公司。凝胶成像仪(GAS7300, Uvipro 公司);PCR 扩增仪(MiniCycler<sup>TM</sup>, J Research 公司)。

### 1.2 菌体培养

将冻干保藏的菌种复活培养后,在平板上划线分离,培养 20h 后挑取单菌落接种到 20mL 液体培养基中,30℃ 200r/min 培养 16 ~ 20h。

### 1.3 PCR 扩增

基因组 DNA 提取参考文献[7,8]。酵母 26SrRNA 基因 D1/D2 区序列扩增引物 NL-1/NL-4<sup>[7]</sup>由上海生工公司合成(正向引物 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3';反向引物 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')。PCR 扩增条件<sup>[7,8]</sup>:94℃ 5min,94℃ 1min,52℃ 1min,72℃ 90s,36 个循环,72℃ 10min。

### 1.4 序列测定

纯化后的 PCR 产物采用 ABI3700 基因测序仪测序。测序工作由上海基康生物工程有限公司完成。

### 1.5 序列分析与系统树的构建

采用序列图谱分析软件 Chromas,参照正、反向序列图谱,对序列进行人工校对;用 Clustal X 进行序列比对(alignment),然后利用 MEGA3.1 的 Neighbor-Joining 法(NJ)构建系统发育树,并进行 1000 次 Bootstraps 检验。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增及序列测定

提取的 DNA 片段大于 23kb,满足 PCR 扩增的需求。提取的基因组 DNA 稀释 50 ~ 100 倍后用作 PCR 扩增的模板,菌株 26S rRNA 基因 D1/D2 区目的扩增条带大小约 600bp。序列测定由上海基康生物工程有限公司完成。

基金项目 :国家自然科学基金资源基础条件平台项目(2005DKA21204)

\* 通讯作者。Tel 86-10-64666552;E-mail :cheng100027@163.com

作者简介 :马 凯(1979-)男,陕西镇安人,博士,主要从事微生物资源及系统发育学研究。E-mail :ubimakai@yahoo.com.cn

收稿日期 :2006-08-22;接受日期 :2006-09-22;修回日期 :2006-12-12

表 1 菌株编号及信息

Table 1 The number and information of strains

Number	CICC number	Collection date	History	Applications
1	1315	1961	←Neimeng Institute of Light Industry← Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences ←Dalian Academy of Sciences	Feed yeast
2	1326	1960	←China National Paper Research Institute ←Soviet Russia	Feed yeast
3	1364	1959	←China National Paper Research Institute ←Soviet Russia	Oleaginous yeast
4	1404	1961	←Wuhan , China	Research
5	1409	1961	←Sun Yat-Sen University	Research
6	1410	1961	← Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences← Institute of Plant Physiology , Chinese Academy of Sciences ←America	Protein feed
7	1443	1968	←Xinjian County , Jiangxi Provence	Feed
8	1720	1979	←Shanghai Institute of Brewing Industry	Research
9	1721	1979	←Shanghai Institute of Brewing Industry ←Wuhan , China	Research
10	1739	1979	← Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries ← Neimeng Institute of Light Industry	Research
11	1740	1979	← Sichuan Academy of Food and Fermentation Industries ← Dongfeng Medicine Factory of Chengdu	Research and produce
12	1742	1979	←Shanghai Institute of Industrial Microbiology	Research
13	1743	1979	←Shanghai Institute of Industrial Microbiology	Research
14	1744	1979	← Jiangmen Sugarcane Chemical factory , Guangdong ← Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences	Research and produce
15	1745	1979	←Neimeng Institute of Light Industry ←Institute of Microbiology , Chinese Academy	Protein feed

2.3 系统发育分析

构建了 15 株白地霉 26S rRNA 基因 D1/D2 区的系统发育树 ,序列一致长度为 529 bp。15 个菌株与白地霉模式菌株 *Galactomyces geotrichum* NRRL Y-17569<sup>T</sup> 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列相似性为 96.3% ~ 98.3%。其中 13 个菌株间(图 1)的序列相似性为 99% ~ 100%(表 1 中菌株 1 和 4 ~ 15) ,与模式菌株 *Galactomyces geotrichum* NRRL Y-17569<sup>T</sup> 的序列相似性为 96.3% ~ 97.1% ,同时与地霉属其它种相似性最高的是 *Galactomyces citri-aurantii* NRRL Y-17913<sup>T</sup> [11] 和 *Galactomyces reessii* NRRL Y-17566<sup>T</sup> [11] ,序列相似性分别为 94.3% ~ 94.5% 和 95.4% ~ 95.6% ,远低于 26S rRNA 基因 D1/D2 区种间相似性 99% 的界限 [8]。另 2 个菌株( CICC 1326 和 CICC 1326 )间相似性为 99.3% ,与模式菌株 *Galactomyces geotrichum* NRRL Y-17569<sup>T</sup> 序列相似性分别为 98.1% 和 98.3% ,也低于 26S rRNA 基因 D1/D2 区种间相似性 99% 的界限。

3 讨论

早期的白地霉分类鉴定主要依据表型特征和生理生化实验 ,本中心的菌种档案对这 15 株白地霉有较为详尽的记录 ,包括 :固体培养特征为菌落直径 30 ~ 50mm ,白色绒毛状、扁平、均匀、有放射线 ,菌落中心突起 ;液体培养宏观特征为液体表面白色绒毛状 ,不浑浊 ,无沉淀产生 ,无气泡产生 ;液体培养显微特征为裂殖的无性生殖方式 ,产节孢子 ,节孢子长方形、椭圆形或圆形 ,呈单个或链状排列 ,节孢子大小为 3 ~ 10.8μm × 6.5 ~ 23.8μm ;假菌丝体有二叉分枝结构 ;碳源同化试验结果为同化葡萄糖、半乳糖、木糖 ,不同化蔗糖、麦芽糖、乳糖、纤维二糖、阿拉伯糖( CICC 1315 同化阿拉伯糖 ) ;氮源同化实验结果为同化硫酸铵和盐酸乙铵 ,不同化硝酸钾。根据这些数据本中心保存的 15 株白地霉符合白地霉的

描述特征 ,在当时的分类手段下这种分类鉴定应该说是准确的。但随着分子生物学手段尤其是 rRNA 序列测定引入到分类学中以后对酵母菌的分类学产生了巨大影响 ,如地霉属的另两个有性型的种 *Galactomyces citri-aurantii* [12] 和 *G. reessii* [13] 起初只是依据与 *G. geotrichum* 很小的表型特征差异而区分为不同的种 ,后来根据 DNA-DNA 杂交 [14]、rRNA 序列分析 [11] 才找到了更充足的分类依据。Peterson 和 Kurtzman [15] (1991) 通过比较部分酵母菌 26S rRNA 基因 D1/D2 区的同源性和 DNA-DNA 杂交值的相关性 ,根据所分析的酵母菌菌株数据 ,提出种内该序列差异小于 1%。Kurtzman 和 Robnett [8] (1998) 研究 500 株子囊菌酵母 26S rRNA 基因 D1/D2 区的系统学后把这一概念扩展到所有的酵母种类中 ,同时依据 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列同源性提出了 55 个酵母的同物异名。目前 26S rRNA 基因 D1/D2 区已经成为酵母分类的主要依据。近年 Pimenta 和 Michael 等主要依据 26S rRNA 基因 D1/D2 区同源性差异提出了白地霉无性型的两个新种 , *Geotrichum silvicola* [16] 和 *Geotrichum vulgare* [17]。

本实验采用 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列分析的方法对 CICC 保藏的 15 株白地霉菌株进行了系统发育学研究 ,结果显示这 15 株白地霉菌株与白地霉模式株 *Galactomyces geotrichum* NRRL Y-17569<sup>T</sup> 的序列相似性较低( 96.3% ~ 98.3% ) [9,10] ,其中 13 株菌株和另外 2 株菌株的相似性也较低( 96.1% ~ 96.3% )。推测这 15 株菌株可能代表了地霉属的两个新种。但是有必要指出 ,目前所说的 *Geotrichum candidum* 或 *Galactomyces geotrichum* 实际上是一个复合种 , Smith (1995) 根据 DNA 杂交提出 *Galactomyces geotrichum* 可能包含 4 个种 ,除 *Galactomyces geotrichum sensu stricto* 外 ,还包括 *Galactomyces geotrichum* group A , group B , group C [14]。CICC 保藏的 15 株白地霉有可能属于 *Galactomyces geotrichum* group A

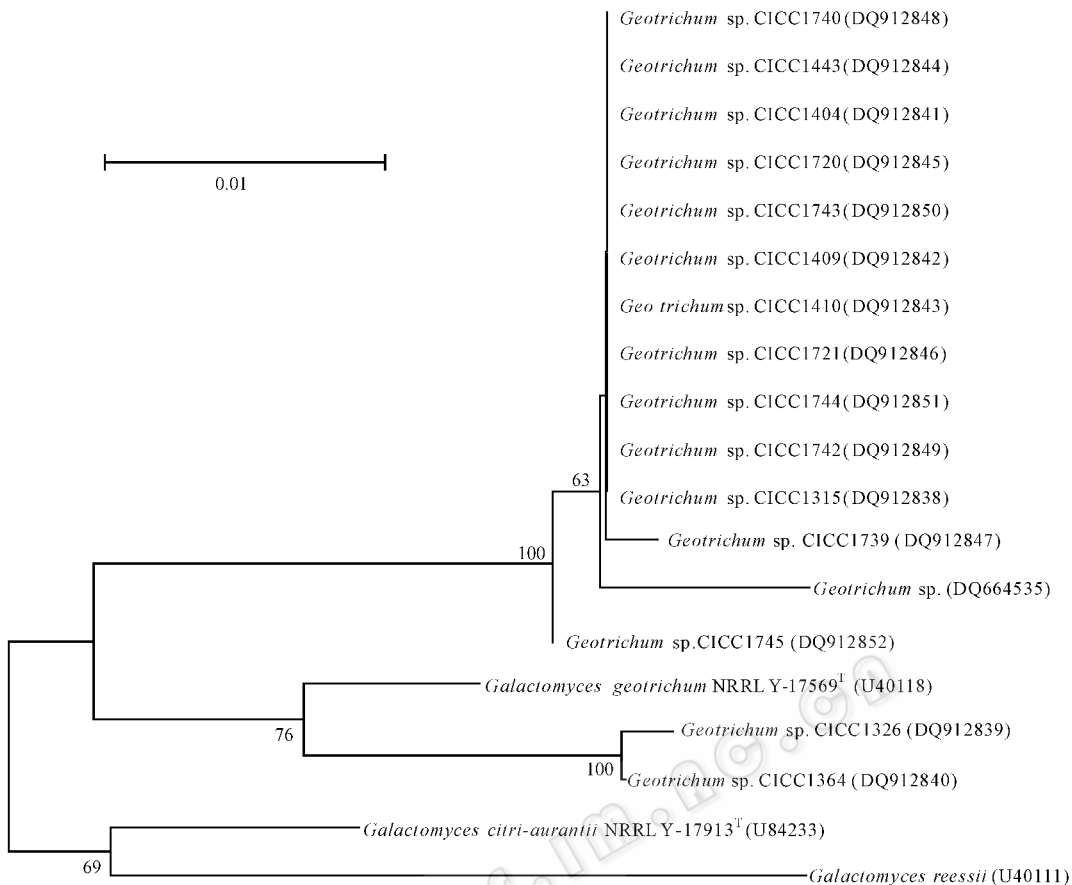


图 1 15 株 CICC 保藏白地霉菌株及相关种 26S rDNA D1/D2 区的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis of the 26S rDNA D1/D2 domain sequences ,depicting the relationships of *Geotrichum* strains from CICC with close relatives in *Galactomyces*.Numbers in parentheses represent the sequence accession number in GenBank.

The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap.Bar 1% sequence divergence.

group B , group C 中的一群。

由于我们采取的是 PCR 产物直接测序 ,所以可以排除由于 rRNA 多态性<sup>[18]</sup>引起的序列差异干扰种的鉴别的现象。但是 ,由于这 15 株菌株生理特征接近白地霉 ,所以选取其它分子标记及生理生化特性对这一研究做必要的补充将有助于进一步阐明这一问题。随着分类学方法的改进 ,我们对物种的分类就会有新的认识 ,所以积极把分子生物学的方法应用于菌种的分类与鉴定十分重要。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所的白逢彦研究员在本文完成过程中给予的帮助。

参 考 文 献

[ 1 ] 刘 玉 ,宋俊梅 ,曲静然 .豆腐酸浆中高产蛋白的白地霉发酵条件的研究 .广州食品工业科技 ,2004 ,2 :14 - 16 .

[ 2 ] 李 然 ,孙小丁 ,张苓花 .解磷微生物的分离筛选及其解磷能力 .大连轻工业学院学报 ,2004 ,2 :85 - 87 .

[ 3 ] Boutroua R ,Guéguenb M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int J Food Microbiol* ,2005 ,102 ( 1 ) :1 - 20 .

[ 4 ] Arfi K ,Landaud S ,Bonnarme P. Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens* . *Appl Environ Microbiol* ,2006 ,72 : 2155 - 2162 .

[ 5 ] Kurtzman CP ,Fell JW. The Yeasts :A Taxonomic Study . 4<sup>th</sup> ed . Netherlands :Elsevier Science Publishers ,1998 .

[ 6 ] 中国工业微生物菌种目录 .食品与发酵工业 ,2001 增刊 ,27 : 20 .

[ 7 ] Fell JW ,Boekhout T ,Fonseca A ,et al . Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/ D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* ,2000 ,50 : 1351 - 1371 .

[ 8 ] Kurtzman CP ,Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit ( 26S ) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* ,1998 , 73 :331 - 381 .

[ 9 ] Kurtzman CP ,Robnett CJ. Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeast like Taxa. *Can J Bot* ,1995 ,73 :S824 - S830 .

[ 10 ] Kurtzman CP ,Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit ( 26S ) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* , 1997 ,35 :1216 - 1223 .

[ 11 ] Naumova ES ,Smith MTh ,Boekhout T ,et al . Molecular differentiation of sibling species in the *Galactomyces geotrichum* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* ,2001 ,80 :263 - 273 .

[ 12 ] Butler E ,Fogle D ,Miranda M. *Galactomyces citri-aurantii* , a newly

- citrus fruit. *Mycotaxon* ,1988 **33** :197 – 212.
- [ 13 ] Redhead SA ,Malloch DW. The Endomycetaceae : new concepts , new taxa. *Can J Bot* ,1977 **55** :1701 – 1711.
- [ 14 ] Smith MTh ,de Cock AWAM ,Poot GA ,*et al.* Genome comparisons in the yeastlike fungal genus *Galactomyces* Redhead et Malloch. *Int J Syst Bacteriol* ,1995 **45** :826 – 831.
- [ 15 ] Peterson SW ,Kurtzman CP. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst Appl Microbiol* ,1990 **14** :124 – 129.
- [ 16 ] Pimenta RS ,Alves PD ,Jr CA ,*et al.* *Geotrichum silvicola* sp. nov. , a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus *Galactomyces* . *Int J Syst Evol Microbiol* ,2005 **55** :497 – 501.
- [ 17 ] Michael W ,Chris B ,Hansjörg P. *Geotrichum vulgare* sp. nov. , a novel asexual arthroconidial yeast. *Int J Syst Evol Microbiol* ,2006 , **56** :301 – 303.
- [ 18 ] Lachance MA ,Daniel HM ,Meyer WW ,*et al.* The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitanae* is unusually polymorphic. *FEMS Yeast Res* ,2003 **4** :253 – 258.

## The phylogenetic analysis of 15 *Geotrichum* strains based on 26S rRNA gene D1/D2 region sequencing

MA Kai , LIU Guang-quan , LI Jin-xia , YAO Su , CHENG Chi\*

( Chinese Industry Culture Collection , China National Research Institute of Food and Fermentation Industries , Beijing 100027 , China )

**Abstract** :The 26S rRNA gene D1/D2 domain sequences of 15 strains originally identified as *Galactomyces geotrichum* from the Chinese Industry Culture Collection ( CICC ) were determined. The results indicated that these strains differed from the type strain of *Galactomyces geotrichum* and other species of the genus remarkably. Two groups were recognized from the 15 strains which possibly represent 2 novel species of *Galactomyces* . Further molecular study is needed to confirm their taxonomic status.

**Keywords** : *Geotrichum* ; *Galactomyces* ; Phylogeny ; 26S rRNA gene D1/D2 region

Foundation item :National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology ( 2005DKA21204 )

\* Corresponding author. Tel 86-10-64666552 ;E-mail :cheng100027@163.com

Received : 22 August 2006 / Accepted : 22 September 2006 / Revised : 12 December 2006 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>