

# 青海东部土壤中酵母物种多样性研究

徐美鑫<sup>1</sup> 刘天明<sup>1\*</sup> 相茂功<sup>2</sup> 刘波<sup>1</sup> 尹雪利<sup>1</sup> 曾阳<sup>3</sup>

(1. 山东轻工业学院 山东 济南 250353)

(2. 山东大学药学院 山东 济南 250014)

(3. 青海师范大学地理与生命科学学院 青海 西宁 810008)

**摘要:** 从青海的互助、民和、门源等 10 个州县收集土样分离得到 98 株酵母菌, 利用 26S rDNA D1/D2 区域序列分析并结合形态学和生理生化特性对这些菌株进行了分类学研究, 探讨了青海东部土壤中酵母的物种多样性及其分布。共鉴定出 10 属 13 种(其中有两个疑似新种), 其中 *Galactomyces geotrichum* 和 *Rhodotorula mucilaginosa* 为该地的优势种。

**关键词:** 酵母菌, 26S rDNA D1/D2 区, 物种多样性, 青海

## Species Diversity of Yeasts Isolated from Soil Samples Collected in the East Part of Qinghai Province of China

XU Mei-Xin<sup>1</sup> LIU Tian-Ming<sup>1\*</sup> XIANG Mao-Gong<sup>2</sup> LIU Bo<sup>1</sup>  
YIN Xue-Li<sup>1</sup> ZENG Yang<sup>3</sup>

(1. School of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan, Shandong 250353, China)

(2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan, Shandong 250014, China)

(3. College of Geographical and Life Science, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008, China)

**Abstract:** 98 yeast strains were isolated from soil samples collected from 10 counties in the east part of Qinghai Province. These strains were identified mainly based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis and morphological and physiological characterization. Diversity and distribution of the yeast species in the soil samples were analysed. Among them, 13 species belonging to 10 genera were recognized (two strains might represent two new species). The dominant species identified were *Galactomyces geotrichum* and *Rhodotorula mucilaginosa*.

**Keywords:** Yeast, 26S rDNA D1/D2 region, Species diversity, Qinghai province

青海位于青藏高原东北部, 地域辽阔, 以干旱寒冷地区居多, 年降雨量少, 光照强, 日温差大。其地理位置东接黄土高原西缘, 北临新疆塔克拉玛干沙漠, 内有柴达木盆地, 西高东低, 生态类型复杂, 是西北生态特征的缩影。许多著名的江河均发源于此, 孕育了许多独特的动植物和微生物, 因此青海

独特的气候和地理环境也极有可能蕴藏了许多独特的野生酵母资源。目前, 我国对酵母菌资源的开发利用大多集中在东部沿海地区, 而对青海野生酵母资源的系统研究较少<sup>[1-4]</sup>。基于此, 我们重点从青海东部地区收集土样, 分离和鉴定酵母资源的物种多样性。

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(No. Y2005D15); 国家 863 项目(No. 2001AA214011)

\* 通讯作者: ✉ liutm2008@163.com

收稿日期: 2008-07-29; 接受日期: 2008-10-17

传统的酵母菌鉴定方法主要依赖于形态特征和生理生化特性, 已经成为酵母鉴定的经典指标, 但这些指标繁杂, 耗时多, 并且表型特征会随菌体生长环境和鉴定时操作细节的变化而有所改变, 造成菌株鉴定结果有时发生偏差<sup>[5]</sup>。近年来, 随着 DNA 序列分析技术的日趋成熟和简易化, rDNA 基因及其转录间区(ITS)的序列分析已经被广泛应用于酵母菌的鉴定。Kurtzman 和 Robnett<sup>[6]</sup>以及 Fell 等<sup>[7]</sup>的研究表明酵母核糖体大亚基基因(26S rDNA)中的 D1/D2 区域能将绝大部分子囊菌酵母和担子菌酵母的种类区分开来, 而种内不同菌株间 D1/D2 区域序列差异一般在 1% 以内, 因此同源率在 99% 以上就可以认为是同一个种。目前几乎所有已知酵母菌种模式菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列已经被测定并公布于 GenBank 等国际核酸序列数据库, 使酵母的分类鉴定更加快捷和准确。本研究利用 26S rDNA D1/D2 序列分析, 并结合形态及生理生化特性, 探讨了东部青海野生酵母的物种多样性及其分布。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集和酵母菌分离

1.1.1 样品采集: 于 2007 年 6~8 月在青海西宁、民和、互助、门源、循化等地采集果园或耕地土样 35 份, 样品抵达实验室后立即分离酵母菌。

1.1.2 菌株分离和保藏: 菌株分离采用酵母富集培养基<sup>[8]</sup>和分离纯化培养基<sup>[9]</sup>。菌株分离方法: 称取土样 3 g, 加入 50 mL 的液体富集培养基(内含 30 mg/L 的亚硫酸)中, 25°C 摇床培养 48 h 后, 转接至另一 50 mL 的液体富集培养基中, 25°C 摇床继续培养 48 h。不同梯度稀释后涂布于分离纯化平板上, 25°C 培养 48 h 后, 挑单菌落经多次平板划线纯化, 获得纯培养物(菌株)。纯化菌株保存于 15% 甘油管中, 存于 -20°C 冰箱备用。

1.2 形态学和生理生化特性鉴定: 根据酵母菌分类学鉴定标准方法<sup>[10]</sup>对供试菌株进行鉴定。

1.3 酵母菌株 26S rDNA D1/D2 区基因的扩增及测序

1.3.1 基因组 DNA 的提取: 采用玻璃珠法<sup>[11]</sup>, 实验所用试剂均购于 TaKaRa 公司。

1.3.2 PCR 扩增与测序: 正向引物 NL1 :5'-GCATA TCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', 反向引物 NL4 : 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'。PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mol/L) 5 μL,

P<sub>1</sub> (NL1) 5 μL, P<sub>2</sub> (NL4) 5 μL, 模板 DNA 3 μL, *Taq* 酶 0.5 μL, 最后 ddH<sub>2</sub>O 补足到 50 μL。PCR 扩增程序: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 1 min 20 s, 36 个循环; 72°C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳确认目标产物有无及效果。

1.3.3 PCR 扩增产物的测序: 所得 PCR 产物由上海申能博彩生物科技公司纯化并测序。

### 1.4 酵母多样性分析

供试菌株 26S rDNA D1/ D2 区序列经校正, 将所获得的序列在国际核酸数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行同源序列的搜索, 比较供试菌株与已知酵母菌种模式菌株相应序列的相似度, 并结合形态学和生理学特征分析对其做出鉴定。供试菌株序列应用 Clustal X 进行多序列匹配比对<sup>[12]</sup>, 采用邻接法获得分支系统树。通过自举分析进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次, 生成的系统树用 Treeview 显示<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌基因组 DNA 提取及 26SrDNA D1/D2 区扩增

采用玻璃珠法从供试酵母菌株中提取基因组 DNA, 其纯度、浓度和完整性能满足 PCR 扩增反应和测序要求。扩增产物经电泳检测片段在 500 bp~750 bp 之间, 符合酵母菌 26S rDNA D1/D2 区理论预期值(约为 600 bp)。

### 2.2 酵母菌类群

从青海西宁、互助、民和、门源、玉树州、化隆、循化、青海湖、果洛和大通采集果园或耕地土样 35 份, 共分离得到酵母菌 98 株。依据形态学特征将分离株划为 7 大类, 每类中选代表性菌株对其进行 26S rDNA D1/D2 区序列分析及形态、生理生化特性鉴定, 表 1 展示了分子鉴定结果。由表 1 可见, 酵母分离株经鉴定归为 10 个属, 分别为假丝酵母属 *Candida*、隐球酵母属 *Cryptococcus*、德巴利酵母属 *Debaryomyces*、地霉属 *Galactomyces*、有孢汉逊酵母属 *Hanseniaspora*、伊萨酵母属 *Issatchenkia*、毕赤酵母属 *Pichia*、有孢圆酵母属 *Torulaspora*、红酵母属 *Rhodotorula* 和 *Zygowilliopsis* 属, 共有 13 个种, 其中包括两个疑似新种(另文发表)。这些地区的酵母无明显优势属, *Cryptococcus* 属有 3 个种, *Hanseniaspora* 属有 2 个种, 其余各属仅鉴定出一个种。 *Galactomyces geotrichum* 和 *Rhodotorula mucic*

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

*laginosa* 为该地区的优势种, 分别占总菌株数的 20.4%和 13.3%。这一结果显示, 青海东部地区含有相对丰富的酵母种类和少数形态独特的酵母类型。

### 2.3 酵母种类的地理分布

本文重点考察了西宁、民和、互助、门源等十个地区的酵母资源, 各个地方分离到的属种见表 1 和表 2。表 2 表明, 上述各地区具有基本相似的酵母菌多样性分布, 大部分属在不同地区都有广泛分布, 如 *Cryptococcus* 属和 *Hanseniaspora* 属在这 10 个地区均有分布; 而优势种 *Galactomyces geotrichum* 均可在这 10 个地区分离到; 疑似新种分离自互助州, 菌落和细胞特征与白地霉相似, 但其 26S rDNA D1/D2 区序列与 *Cryptococcus kuetzingii* 的 26S

rDNA D1/D2 区序列同源相似率最高为 90.5%, 菌落色分别呈灰色和棕黄色, 但两者间细胞形态差异较大, 生化特性也有区别(另文发表)。

### 2.4 酵母系统学发育分析

为显示供试菌株与已知酵母种的模式菌株之间的亲缘关系及其系统地位, 根据同源序列搜索结果下载同源率高的相关模式株的 26S rDNA D1/D2 区域序列与已鉴定菌株的 D1/D2 区域序列构建系统发育树(图 1), 在基于 26S rDNA D1/D2 区域序列分析绘制的系统树上, 相同的种被归在一个主分枝内, 表明它们具有较近的亲缘关系, 而不同的种却位于不同的亚分枝上, 显示它们在 D1/D2 区域序列上具有明显区别。系统发育树的结果与 26S rDNA D1/D2 序列的分类鉴定结果相一致。

表 1 青海酵母分离株依据 26S D1/D2 序列鉴定结果  
Table 1 Identification of the yeast strains isolated from Qinghai based on sequence analysis of the 26S D1/D2 region

属 Genera	种 Species	菌株 Strain	与模式菌株的序列相似性(%) Sequence similarity to typ strain	GenBank accession number	菌株来源 The source of strains
<i>Candida</i>	<i>C. saitoana</i>	QMM	99.1	EU684962	民和马营果园
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. aerius</i>	QBZ10	99.7	EU684959	北山扎龙沟耕地
	<i>C. albidosimilis</i>	QDC1	99.6	EU684960	大通耕地
	<i>C. uzbekistanensis</i>	QLS2	100	EU642635	互助浪士当耕地
	<i>C. uzbekistanensis</i>	QBS3	98.9	EU642619	青海果洛林场
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>	QXM1	98.4	EU642624	门源仙米林场
<i>Galactomyces</i>	<i>G. geotrichum</i>	QBZ9	99.4	EU642621	北山扎龙沟耕地
	<i>G. geotrichum</i>	QPA1	99.0	EU642640	平安耕地
	<i>G. geotrichum</i>	QDT1	99.1	EU642623	大通耕地
	<i>G. geotrichum</i>	QXS2	99.4	EU642628	西宁西山耕地
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. occidentalis</i>	QMG6	100	EU642637	民和古鄯耕地
	<i>H. uvarum</i>	QMC2	100	EU684961	民和川口耕地
	<i>H. uvarum</i>	QMC4	99.3	EU642636	民和川口耕地
<i>Issatchenkia</i>	<i>I. terricola</i>	QGL2	99.1	EU642627	果洛耕地
<i>Pichia</i>	<i>P. kluyver</i>	QHH2	99.4	EU642629	青海湖附近耕地
	<i>P. kluyver</i>	QXM1	99.3	EU642622	门源仙米林场
<i>Torulopsis</i>	<i>T. delbrueckii</i>	QXN2	99.3	EU684963	西宁耕地
<i>Rhodotorula</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	QYS1	99.2	EU642630	玉树州耕地
	<i>R. mucilaginosa</i>	QXH2	97.9	EU642620	循化耕地
	<i>R. mucilaginosa</i>	QYS3	99.0	EU642632	玉树州耕地
	<i>R. mucilaginosa</i>	QHL1	99.1	EU642631	化隆耕地
	<i>R. mucilaginosa</i>	QMM1	99.1	EU642638	民和马营果园
<i>Zygowilliopsis</i>	<i>Z. californica</i>	QJD10	99.2	EU642633	互助嘉定果园
	<i>Z. californica</i>	QJD11	99.1	EU642634	互助嘉定果园
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. kuetzingii</i>	QJD6	90.5	疑似新种	互助嘉定耕地
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. kuetzingii</i>	QBZ7	90.5	疑似新种	互助北山林场

注: 同源相似率低于 99% 的菌株, 已经进行生理生化鉴定。

Note: Physiological and biochemical characteristics of the strains with less than 99% sequence similarities to the type strains were determined.

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

表 2 青海东部地区酵母种类及其地理分布  
Table 2 Distribution of yeast species in the eastern Qinghai of China

种名 Species	互助 Hu u	民和 Mi he	西宁 Xin g	门源 Meny an	玉树 Yu shuzi	化隆 Hualong	循化 Xun ua	青海湖 Qin hai	果洛 G o-lo	大通 Datong
<i>Candida saitoana</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus aerius</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Issatchenkia terricola</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Zygowillia californica</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Two new species	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: +: 该地区有分布; -: 未分离到。

Note: +: The species was isolated from the area; -: The species was not isolated from the area.

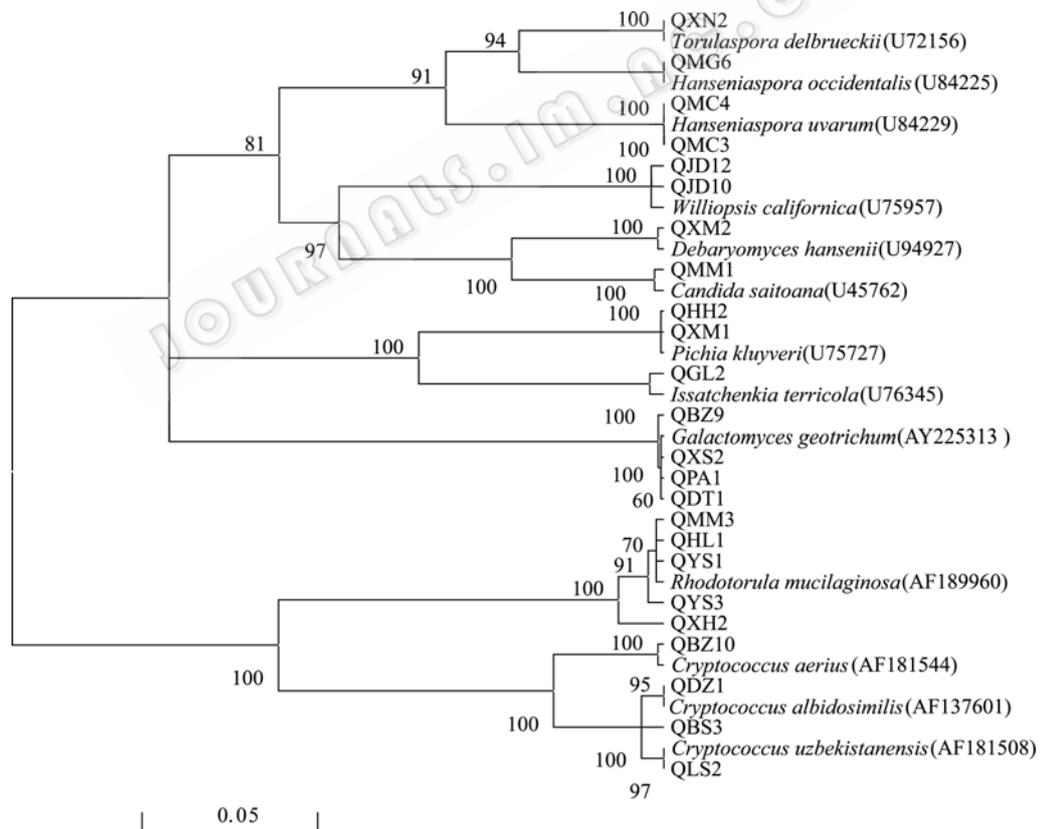


图 1 基于 26S rDNA D1/D2 区序列构建的系统树(示供试酵母菌株与相应种模式菌株的关系)

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed from neighbor-joining analysis of the 26S rDNA D1/D2 domain sequences, depicting the relationships of the yeast strains studied with type strains of related species

### 3 讨论

在青海东部酵母菌广泛分布的州县,如互助、民和等,土样颜色较深,多为黑色肥沃土,而酵母菌分布较少的地区,如大通的土样颜色较浅为黄色,较贫瘠。表明土壤越肥沃,其酵母的种类越丰富。本文是国内首次对青海土壤中酵母菌进行较系统分类研究,为今后深入研究利用当地酵母资源奠定了基础。

青海东部是中国黄土高原与青藏高原的地质过渡带,是海拔梯度急剧变化和气候、地貌、土壤类型多样地域。按照 Smith 等<sup>[14]</sup>生态学家的观点,物种分布边缘是一个物种形成最活跃的区域。生态过渡带周界种群对未来物种形成有潜在重要性,特别是定向选择可能是引起交接带种群变异的强大驱动力<sup>[15]</sup>。特有的高原大陆性气候表现为太阳辐射强、光照充足、平均气温低、降水量少、地域差异大等特点。在此独特的环境下,野生酵母菌受到严酷自然条件的选择,保留了大量的子囊酵母菌(如 *Candida*、*Debaryomyces*、*Hanseniaspora*、*Issatchenkia*、*Torulaspora* 等属)。子囊酵母菌在不利条件下产生的有性后代,具有较强的抗逆性和变异性,可抵御干旱、高温和紫外线等不利因素。尽管青海地区生态环境较为严酷,但仍有较为丰富的酵母资源。总体说来每份土样中的酵母类型相对于陕西和甘肃一带黄土高原中心区的酵母种类少。生理生化特性鉴定和发酵特性评价发现,大多数菌株对高温、高盐、高碱、高 SO<sub>2</sub> 耐受力强,其中这些酵母菌株的耐碱特性与苏俊等<sup>[16]</sup>分离自新疆的野生酵母有共同之处,但一些菌株的生长速率低、发酵力相对较弱,仅有少数菌株能产 1%~2%(V/V)的乙醇。

青海拥有的特殊地理环境和气候,以及许多著名的江河均发源于此,孕育了许多独特的动植物和微生物<sup>[17]</sup>。本研究也在青海发现了两个表型独特、与 GenBank 已有模式菌株序列同源率低的酵母菌株 QJD6 和 QBZ7,与 *Cryptococcus aerius* CBS155(AF075486)同源相似率为 90.3%,与 *Cryptococcus kuetingii* CBS922(AF181504)的同源率为 90.5%左右。根据 Kurtzman 酵母种类划分依据,同源相似率低于 99%不能划归为同一个种,因此对于这两个待鉴定的菌株可以初步认定它是一个新种甚至是另外一个新属,有待进一步的形态、生殖方式及生理生化鉴定结果考证。

### 参 考 文 献

- [1] 陆惠中,王启明,贾建华,等. 秦岭地区子囊菌酵母物种多样性研究. 菌物学报, 2004, 23 (2): 183-187.
- [2] 许超德,李绍兰,杨丽源,等. 几株云南野生隐球酵母菌的分类研究. 云南大学学报(自然科学版), 2004, 26(2): 75-79.
- [3] 倪慧娟,包松华,孙天松,等. 新疆地区酸马奶中酵母菌的鉴定及其生物多样性分布. 微生物学报, 2007, 47(4): 578-582.
- [4] 王 慧,张立强,刘天明,等. 葡萄果粒表皮酵母菌多样性研究. 微生物学通报, 2008, 35(1): 10-14.
- [5] 白逢彦,梁慧燕,贾建华. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 2002, 21(1): 27-32.
- [6] Kurtzman C, Robnett C. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts for analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(4): 331-371.
- [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(3):1351-1371.
- [8] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 2002, p.98.
- [9] 冯克宽,王明谊,曾家豫. 酵母菌的分离及鉴定. 西北师范大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 56-59.
- [10] Yarrow D, Kurtzman CP, Fell JW. The Yeasts, a Taxonomic Study(4th edn). Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998, pp.77-100.
- [11] 澳斯柏 F, 金斯顿 RE, 塞德曼 JG 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, pp.522-523.
- [12] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882 .
- [13] Page RDM. Review: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*, 1996, 12(4): 357-358.
- [14] Smith TB, Kark S, Schneider CJ, et al. Biodiversity hotspots and beyond: the need for preserving environmental transitions. *Trends in Ecology and Evolution*, 2001, 16(8): 431.
- [15] 陈昌笃,王庆田. 甘肃省麦积山景区. 生态学报, 2007, 17(1): 1-15.
- [16] 苏 俊,冯新忠,古丽斯玛依·艾拜都拉,等. 两株耐碱酵母的 pH 耐受实验观察. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1114-1117.
- [17] 林超峰,陈占全,薛泉宏,等. 青海三江源地区风沙土养分及微生物区系. 应用生态学报, 2007, 18(1): 101-106.