

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01399

# 微生物的遗传多样性

李娟, 张克勤

云南大学生物资源保护与利用重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 昆明 650091

**摘要:** 微生物是生物圈中不可或缺的重要组成部分, 维系着自然界生态平衡。随着分子生物学技术的发展, 微生物遗传多样性的研究从形态学水平、蛋白水平进入到了 DNA 水平。而高通量测序技术和宏基因组技术的发展, 不仅为我们理解微生物的遗传多样性提供了更加丰富的信息和有力的证据, 也对于合理利用生物资源、保护生态平衡等方面具有重要意义。文章就微生物遗传多样性研究的相关内容, 如物种的分离鉴定、微生物群体遗传结构、物种形成以及系统发育和进化等方面的研究进展进行综述。

**关键词:** 遗传多样性; 分子标记; 群体遗传; 物种形成; 系统发育与进化

## Genetic diversity of microorganisms

LI Juan, ZHANG Ke-Qin

*Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, and Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China*

**Abstract:** Microorganisms are important components of the biosphere in maintaining the ecological balance. With the development of molecular biology techniques, researches on the microbial genetic diversity have been developed from morphological and/or protein levels to molecular level. The development of high-throughout sequencing and metagenomics technology not only provide more abundant information and powerful evidence for understanding microbial diversities, but also have great significance for rational utilization and protection of biological resources. The advances in research on genetic diversity of microorganisms, such as separation and identification, population genetic structure, speciation, phylogeny, and evolution of microorganisms, were discussed in this paper.

**Keywords:** Genetic diversity; Molecular marker; Population genetic structure; Speciation; Phylogeny and evolution

微生物包括细菌、真菌、放线菌、病毒等, 是生物圈中不可或缺的重要组成部分, 维系着自然界生态平衡。与高等动植物相比, 微生物具有许多独特的多样性, 包括分布的广泛性、生长繁殖速度的

多样性、营养代谢类型的多样性以及生活方式的多样性等等。由于微生物个体微小, 不像动植物特别是珍稀动植物那样引人注目, 加之人类对微生物多样性认识的不足, 长久以来, 微生物多样性的保护

收稿日期: 2012-08-07; 修回日期: 2012-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31100894), 云南省应用基础研究计划青年项目(2012FD006), 中国烟草总公司资助项目(编号: 110201002023)和中国烟草总公司云南省分公司科技计划合作专项(编号: 2010YN17)资助

作者简介: 李娟, 助理研究员, 博士, 研究方向: 微生物系统发育与进化。Tel: 0871-5033805; E-mail: liuxulj\_530@yahoo.com.cn

通讯作者: 张克勤, 教授, 博士, 研究方向: 微生物分子生物学。Tel: 0871-5034878; E-mail: kqzhang111@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-10-24 05:07:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121024.1707.004.html>

问题一直未受到足够重视。然而,保护生物多样性不仅能维系整个生物圈生态平衡,对我们全面认识生物界,揭示物种的起源与进化历史,贯彻人类可持续发展战略等诸多方面更是具有重要的理论和现实意义。而对于一些特殊环境中的微生物多样性的研究无疑将给人类带来巨大的效益,对解决现实社会中存在的诸多问题也具有重要意义。

只有准确对微生物多样性进行评价,才能够更好地实现保护的目。遗传多样性不仅作为评价生物资源多样性的重要依据,更是物种多样性和生态系统多样性的基础。因此,对微生物遗传多样性的研究不仅有助于人们更清楚地认识现有微生物的资源状况,还能为合理保护和利用现有微生物资源提供理论指导。由于遗传信息储存在 DNA 序列中,故 DNA 水平的遗传多样性长期以来一直受到关注。随着 DNA 分子标记技术的飞速发展以及生物基因组计划的开展,大大加快了微生物遗传多样性研究的步伐。

## 1 微生物遗传多样性的研究方法及其保护

### 1.1 微生物遗传多样性研究方法

遗传多样性的研究方法是随着生物学研究层次的不断提高和实验手段的不断改进而逐步发展起来的。较早时候,人们主要依赖形态学特征的认知,并通过大量个体杂交实验研究微生物的多样性。随后,同工酶电泳分析技术的发展,让人们从蛋白质水平对物种遗传多样性进行探讨。但进行蛋白电泳分析对样品的要求较高,且分辨率具有一定的限度,无法检测编码蛋白基因的同义突变。因此,使用蛋白电泳技术对物种遗传多样性的研究越来越少。随着分子生物学技术日新月异的发展, DNA 水平的遗传多样性研究则越来越受到青睐,这使得微生物遗传多样性的研究技术从形态学水平、蛋白质水平深入到了 DNA 水平。

目前,分子水平的遗传多样性研究方法经历了三代分子标记技术的发展,包括限制性片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)<sup>[1]</sup>,随机扩增多态性DNA (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)<sup>[2]</sup>,扩增片段长度多态性 AFLP (Amplified fragment length polymorphism,

AFLP)<sup>[3-4]</sup>,变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)和温度梯度凝胶电泳(Temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)<sup>[5-7]</sup>,微卫星DNA(Microsatellite DNA)<sup>[8]</sup>,单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP)<sup>[9]</sup>等方法。这些方法都被广泛用于微生物遗传多样性研究中,并取得了不少的成果。而且已有不少综述性论文对上述研究方法的原理及研究进展进行了详尽的介绍,为我们认识遗传多样性及其生物学意义提供有价值的信息<sup>[10-12]</sup>。但是,任何一种检测遗传多样性的方法都存在各自的优点和局限,迄今为止还找不到一种可以完全取代其他方法的技术。

随着高通量测序技术的发展,如Roche公司的454 技术、Illumina公司的Solexa技术和ABI公司的SOLID技术,人们可以用更低的测序费用获得更多的序列信息。这使得微生物的研究逐步从单个或者多个基因的研究层面拓展到了“组学”层面。而随着研究微生物的重要价值和意义逐渐被人们所认识,国际上许多国家纷纷制订微生物基因组研究计划,为人们探索微生物世界提供了前所未有的契机。其中最为受到关注的当属人体微生物组计划(Human microbiome project, HMP)<sup>[13]</sup>和地球微生物组计划(Earth microbiome project, EMP)<sup>[14]</sup>。由中国科学家发起的“万种微生物基因组计划”(http://www.genomics.cn/navigation/show\_navigation?nid=1625)标志着我国在微生物基因组研究领域中也占据了一定的国际地位,同时也为我国自主知识产权的微生物基因资源的开发和产业化奠定了基础。完整基因组数据的获得为我们理解和评价微生物的遗传多样性提供了丰富的信息和有力的证据。

在组学层面研究微生物方法中,宏基因组技术(Metagenome)无疑是目前发展最为迅速的一种方法<sup>[15-17]</sup>。该方法不依赖于人工培养的微生物基因组分析,而是通过从特定环境样本中直接分离微生物群体的总DNA,然后将DNA酶切或者超声打断处理,获得大片段的DNA,并与载体连接,克隆到宿主细胞中进行表达,接着根据研究目的,筛选相应克隆测序,并进行序列分析。该方法极大的拓展了我们对生命的了解,能最大限度地挖掘微生物资源,目前已经成为国际上生命科学研究和开发的热点和前沿。截至目前为止,已有上百种来自不同环境,如,土

壤、海洋、一些极端环境等的样品被宏基因组测序,为微生物多样性研究提供了强大的数据支持。我国科学家对于宏基因组学的研究虽有所涉猎,但仍需要拓宽研究领域,发展相关研究策略和技术,开展广泛的国际合作,使我国在宏基因组学研究领域中有所作为。

目前,宏基因组学技术中最大缺陷是文库的表达问题,由于目前普遍采用的宏基因组文库载体包括粘粒、质粒和细菌人工染色体等,这些载体要么插入片段小,无法完整克隆复杂的基因簇,要么由于拷贝少而无法将所有的宏基因组DNA表达出来,从而降低了筛选的效率,因此,目前常采用富集培养手段来提高筛选效率。而序列分析技术和生物信息学工具,如MEGAN等<sup>[18]</sup>的不断进步以及一系列数据库的建立,为宏基因组的数据分析提供便利。此外,长期以来人们无法对测得的宏基因组数据进行解析而区别开每种物种基因组DNA序列,而美国华盛顿大学Virginia Armbrust及其同事最近研发出了一种从宏基因组样本中将某单一基因组解析出来的方法,并通过该方法组装出一种古菌(*Euryarchaeota*)物种的基因组序列,而这种微生物人们从未能够在实验室中培养<sup>[19]</sup>。这一技术为整个微生物群落如何工作打开了一扇窗户,对发现还未培养的微生物在环境中所扮演的不同作用有极大帮助。相信宏基因组学研究必然成为今后若干年自然科学研究的一个重要领域。

## 1.2 评价和保护微生物多样性

对于微生物多样性的评价,包括对微生物的种类及丰富度进行评价,但最终仍是对其遗传多样性进行评价。因此,正确评价微生物多样性离不开对其遗传多样性的认识,以上所介绍的研究方法正是认识其遗传多样性必不可少的手段。

保护微生物多样性存在两个方向,一是保护微生物的生活环境;二是对纯培养的微生物菌种(株)进行保藏。保护微生物的生活环境无疑是可以长期保护其多样性的唯一可行的方法。目前,在所建立的动植物多样性保护区已经包括了微生物的生存环境,所以不必特别建立微生物保护区,但正是需要人们共同努力保护生态环境,才能使微生物的多样性得以存在。此外,人们还可以通过挑选微生物的

优良菌种,并创造一个适合其长期休眠的环境条件,如干燥、低温、避光、缺氧、缺少营养等环境对不同的微生物菌(毒)株进行保藏。目前常用的菌种保藏方法有冻干保存法、超低温冻存法、低温保存法、传代培养保存法、砂土保存法等<sup>[20, 21]</sup>。此外,对保藏菌种,如形态学特征、采集地、培养史等方面进行准确的档案记录也是不可缺少的环节<sup>[20]</sup>。正是由于微生物保存技术的发展,许多国家都为菌种保藏设有专门的机构,如美国的典型菌种保藏中心(ATCC),英国的国家典型菌种保藏所(NCTC)和中国的中国微生物菌种保藏委员会(CCCCM),另外还有一些国际性的菌种保藏机构,如世界菌种保藏中心(WFCC)、亚洲微生物资源保藏和可持续利用联盟(ACM)等。保存微生物的目的,不仅是保护微生物多样性的重要手段,也可以使微生物菌株以活的生命状态保存下来,方便后人更好的研究和开发微生物,造福人类,具有重要现实意义。

## 2 用于分子标记的 DNA 序列

大多数的分子标记技术都是通过对特定类型或特定位置的 DNA 序列进行检测分析而了解其多样性特征的。在这些研究中,从浩如烟海的序列中选择合适的 DNA 片段作为研究目标是最基础、最关键的一步。微生物的基因组包括核基因组和线粒体基因组,在遗传多样性研究中,这两种基因组序列都已得到了运用。

### 2.1 核基因序列标记

由于核基因组结构大而复杂,大部分核基因中又存在直系同源基因(Orthologous gene)和旁系同源基因(Paralogous gene),使得核基因的应用复杂化。在众多的核基因分子标记中,使用率极高的是核糖体 rRNA。

#### 2.1.1 核糖体 rRNA

核糖体是一个致密的核糖核蛋白颗粒,广泛分布于现存的所有生物,执行着蛋白质合成的功能,它由几十种蛋白质和 rRNA 组成。在真核微生物中,核糖体转录区的重复单位包括 5S、5.8S、18S 和 28S rRNA。位于 18S 和 5.8S 之间的 ITS1 区和位于 5.8S 和 28S 之间的 ITS2 区一起构成内转录间隔区 ITS(Internal transcribed spacer)。18S、5.8S、28S rRNA

基因序列进化缓慢而相对保守, 其中 18S 比 28S 基因更保守, 常常作为种级以上阶元的良好标记; 5.8S 基因高度保守, 为真菌 rRNA PCR 扩增的通用引物的设计提供了极大的方便; ITS 序列受到的选择压力较小, 进化速率较快, 序列长度适中, 含足够量的遗传信息, 在绝大多数的真核生物中表现出了极为广泛的序列多态性, 因此被广泛用于物种的分子鉴定以及属内物种间或种内差异较明显的微生物群间的系统发育关系分析。White 等<sup>[22]</sup>为真菌 rRNA 基因的 ITS 设计了 3 对特异引物, 即 ITS1、ITS4 和 ITS5, 可用于大多数担子菌和子囊菌的 ITS 扩增。Gardes 等<sup>[23]</sup>则分别为真菌和担子菌设计了具有更高特异性的引物 ITS1-F 和 ITS4-B。

在原核微生物中, 核糖体转录区的重复单位包括 5S、16S 和 23S 三种。其中 5S rRNA 信息量少, 不适合分析; 23S rRNA 分子大, 但碱基突变速率要比 16S rRNA 快得多, 对于较远的亲缘关系不适用; 16S rRNA 大小在 1 500 bp 左右, 具有良好的时钟性质, 在结构与功能上具有高度的保守性, 素有“细菌化石”之称<sup>[24]</sup>。目前, 16S rRNA 基因序列分析已广泛应用于微生物多样性的研究<sup>[25-26]</sup>。此外, 利用 16S rRNA 基因序列分析发现了不少新的微生物物种, 尤其是古细菌的发现, 更是奠定了有关古细菌、真细菌和真核生物“三界”理论的基础<sup>[27]</sup>。在现实研究中, 除了选择 16S rRNA 作分子标记进行比较外, 还可利用 ITS、16S rRNA-23S rRNA 序列及某些发育较为古老而序列又较稳定的特异性酶的基因作序列分析进行遗传多样性分析<sup>[28-30]</sup>。

### 2.1.2 其他核基因标记

除了核糖体 rRNA 序列外, 一些核基因序列, 如  $\beta$ -微管蛋白基因( $\beta$ -tubulin)、转录延长因子  $\alpha$  (Elongation factor 1- $\alpha$ , EF1 $\alpha$ )、RNA 聚合酶 II 大亚基(RNA polymerase II largest subunit, RPB1)、RNA 聚合酶 II 第二大亚基(RNA polymerase II second largest subunit, RPB2)、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)等也常被用来进行物种遗传多样性分析。这些序列无一例外的都具有保守的序列结构, 但又能在各级分类水平上将物种有效区分开来, 反映出物种的系统进化关系。在众多序列中,  $\beta$ -微管蛋白基因( $\beta$ -tubulin)使用频率较高。该

基因序列具有高度保守的外显子, 已经被广泛用于真菌各级分类水平上的系统发育研究和在分子生物学研究中被用作内参基因, 并且发现其无论在低分类阶元的系统发育研究中还是复合种研究中, 甚至对种内不同地域菌株间的亲缘关系均具有重要意义<sup>[31]</sup>。

随着测序速度的加快和成本的降低, 人们在进行遗传多样性分析时, 有时并非基于一条序列进行分析, 而是通过 PCR 扩增多个基因序列(通常为持家基因), 通过对序列进行遗传变异分析, 从而了解物种的遗传特征, 该方法也被称为多位点序列分型技术(Multilocus sequence typing, MLST)。目前, 该方法已经广泛运用到各类微生物的遗传多样性研究中, 极大的推动了人类对微生物遗传多样性的认识<sup>[32-36]</sup>。此外, 基于多个位点序列进行分析, 还能对微生物的系统发育及演化提供更加充分的信息, 帮助人们更加客观准确的认知微生物的进化历程。例如, James 等就利用 18S rRNA、28S rRNA、ITS、EF1 $\alpha$ 、RPB1 和 RPB2 六条序列, 对接近 200 个真菌物种进行系统发育构建, 探讨真菌的演化历史, 他们发现在真菌的演化过程中发生了至少 4 次鞭毛的独立丢失事件。而游动孢子的消失与气生孢子的出现是同步的。另外, 通过分析该作者还认为一直饱受争议的微孢子虫在真菌进化的早期起源于一种内寄生壶菌的祖先<sup>[37]</sup>。

### 2.2 线粒体 DNA 序列

目前, 以线粒体 DNA(mtDNA)序列作为分子标记进行微生物遗传多样性的研究大都集中在真菌领域。对真菌线粒体基因组的分子生物学研究结果显示, 真菌线粒体 DNA 分子进化的速度介于动物和植物之间, 真菌线粒体 DNA 变异丰富, 能为真菌的系统发育及系统演化的研究提供大量的信息<sup>[38]</sup>。

对真菌线粒体 DNA 的多态性分析已被普遍用于真菌种群学及进化生物学的研究<sup>[39-41]</sup>。例如, Foury 等<sup>[42]</sup>和 Lopez 等<sup>[43]</sup>就利用线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因 *COX1* 的多态性作为酵母菌株遗传多样性分析的工具; Hamari 等<sup>[44]</sup>对曲霉属 *Aspergillus* 的两个种 *Aspergillus japonicus* 和 *Aspergillus aculeatus* 的分子特征与表型特征之间的关系作了分析, 他们通过对这两个种的菌株进行线粒体 DNA 的 RFLP 分析,



获得 7 个线粒体DNA酶切片段群; Oudemans 和 Coffey<sup>[45]</sup>对疫霉属*Phytophthora*真菌的 6 个种的线粒体DNA进行RFLP分析, 发现线粒体DNA不仅可以对种进行有效划分, 还可以用于区别种以下的分类单元—亚群。

但应注意到, 线粒体DNA作为一种核外遗传物质, 它所含的遗传信息量有限, 若能将线粒体DNA信息与基因组DNA结合分析, 将对物种遗传多样性、分类以及系统进化研究提供更多的信息。

### 3 微生物遗传多样性相关研究内容

#### 3.1 物种分离鉴定与分类

对于微生物物种的分离鉴定是认识微生物多样性的主要内容之一。传统的分离鉴定方法是通过纯培养获得菌株后, 依据其外表形态、生理生化反应和细胞组成成分结构的观察的特性对其进行鉴定。对于某些能够纯培养的微生物, 生长、生理生化特征会随着环境的变化而不稳定, 个体多态性明显。因此, 仅依赖表型的认知并不能完全或真实反映微生物的种属特征, 将两个相似种鉴定为同一物种(异种同名), 或将形态学略有差异的同一物种鉴定为两个种(同种异名)的事件时有发生, 例如, Hu等<sup>[46]</sup>根据分生孢子特殊的形态结构而将一株捕食线虫真菌定义为新种, 并命名为多次生节丛孢(*Arthrobotrys multisecondarius*), 而Li等<sup>[47]</sup>根据ITS序列和 $\beta$ -tubulin基因序列同源性分析, 发现多次生节丛孢与小舟单顶孢(*Monacrosporium microscaphoides*)具有极高的序列相似性(>99%), 从而认为多次生节丛孢是小舟单顶孢的自发突变种。所以, 除了形态学及生理生化特征外, 注意其遗传信息的多样性将能更准确的对微生物物种进行分离鉴定。目前, rRNA同源序列分析技术结合形态学特征已基本上取代了传统的分类研究, 显示出其主导性的作用。

#### 3.2 未培养微生物

自 19 世纪科赫(Koch)创立微生物纯培养技术以来, 已有数千种细菌、病毒和约 10 万种真菌在实验室中得到了纯培养。然而, 越来越多的证据表明, 由于受现有技术的限制, 自然界中绝大部分的微生物是目前人们还无法纯培养的, 甚至是还不曾认识的, 这些还不能被纯培养的微生物就叫未培养的微生物

(Uncultured microorganisms)<sup>[48, 49]</sup>。未培养的微生物是一个巨大的微生物资源库, 其中蕴藏着丰富的新基因。对其进行深入研究开拓了微生物学研究的新领域, 可充分认识微生物物种的多样性, 了解生物进化及微生物系统发育学信息。

人们可以通过分子生物学的手段绕过培养障碍对未培养的微生物进行研究, 从而了解人类未知的微生物世界。核糖体 rRNA基因序列分析、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、RFLP分析技术等等都曾广泛应用于不可培养微生物多样性的研究<sup>[50-52]</sup>。埃克斯特大学研究人员最近通过对环境样品DNA(SSU)检测和DNA荧光探针技术发现了从池塘水体样品中发现了一类特殊、古老的真菌类群, 将其命名为Cryptomycota(“隐秘菌物”)。这类真菌与现有的真菌类群有显著差异, 遗传多样性也极为丰富, 而且细胞壁缺少甲壳素(Chitin)成分, 从而将该类群建立一个新的真菌门(Phylum)<sup>[53]</sup>。而近年来发展的宏基因组技术在挖掘和利用未培养微生物资源, 促使人类了解许多未培养微生物的基因组序列及其功能产物, 筛选新颖生物活性物质方面更是具有广泛的应用<sup>[54]</sup>。

#### 3.3 微生物群体遗传结构

群体遗传结构是指遗传变异在物种或群体中的一种非随机分布, 即遗传变异在群体内、群体间的分布样式以及在时间上的变化。群体遗传结构能反映遗传变异在群体内、群体间以及物种间的分布样式以及在时间上的变化, 从而理解该物种或群体的进化史及演化潜能。研究发现, 许多因素, 诸如种群大小、变异、生殖方式、基因流和选择作用等均能影响微生物群体遗传结构的演化。因此, 要阐明物种的遗传变异和分化过程, 必须首先探讨生物群体遗传变异的大小, 遗传结构及其变化规律以及影响群体遗传结构的各种因素等。

近些年, 对于为微生物的群体遗传结构研究, 科学家们也逐渐掌握了一些规律, 如, 就种群大小而言, 一般认为气流传播的微生物比土传的微生物有效群体大, 高基因流的比低基因流的的有效群体大<sup>[55]</sup>。通常情况下, 病毒尤其是RNA病毒的突变率比真菌和细菌的高, 核基因组的突变率比线粒体基

基因组突变率高<sup>[56]</sup>。就基因重组而言,几乎所有真菌都能通过有性生殖产生基因重组,而细菌则可通过转化、接合和转导产生重组。病毒则可通过重组和重排完成遗传交换<sup>[57]</sup>;通常情况下,远距离扩散(如通过气流或昆虫作为载体)的微生物比短距离扩散(如通过雨水作为载体、土传、种传)的微生物发生基因交流的可能性高等等。但目前对于微生物群体遗传结构的大部分研究工作都局限在对群体的遗传多样性及地理分布进行简单分析,而很少探讨群体遗传结构的时空动态及其进化机制<sup>[56]</sup>,这将是今后群体遗传研究需要注重的。

### 3.4 微生物的物种形成

理解微生物的物种形成过程对于认识物种的起源与进化,理解微生物遗传多样性具有重要的意义。微生物的物种形成与其生活方式和地理分布紧密相关。此外,生殖模式也是影响微生物物种形成的重要因素。真菌是研究真核生物的物种形成模式的良好材料。首先,许多真菌能在实验室条件下得到短期培养,并且完成杂交。其次,真菌具有不同的生活史方式和地理分布。另外,在真菌中有许多已知的复合种,这些复合种内包含许多近期分化的姊妹种<sup>[58-60]</sup>,这使得研究物种形成的早期过程中的遗传分化成为可能。

近年来,报道的真菌物种形成模式主要有异地物种形成、同地物种形成、杂交物种形成等等。异地物种形成是指在不同的地方发现同一物种的不同隐存种。同地物种形成主要来自于病原真菌对不同寄主的选择性适应。如,小麦的病原真菌 *Mycosphaerella graminicola* 是从野生草类的寄生物种中随着小麦在人工驯化过程的不断积累,通过同地物种分化形成的<sup>[61]</sup>。杂交物种形成则是由于许多真菌并不是完全的不育,从而给个体间的杂交带来了机会。在草类的内寄生真菌属 *Epichloe* 中,通过杂交产生无性阶段的 *Neotyphodium* 属的真菌能寄生草类,而 *Epichloe* 属的真菌则不能<sup>[62]</sup>。此外,染色体重排在真菌的物种形成中也起重要作用,如在子囊菌 *Sordaria macrospora* 和担子菌 *Coprinus cinereus* 中,种内的同宗配合使得物种体内含有不同的染色体组型,为后代自我繁殖提供了机会<sup>[63]</sup>。除了生殖隔离在物种形成中发挥重要作用外,也有学者认为生态

因素可能在共同生存的生物体的物种形成过程中起重要作用。Rundle 和 Nosil<sup>[64]</sup> 将生态学物种形成定义为,由生态的分化选择引起的种群间基因流隔离的过程。在生态学物种形成过程中,群体间生殖隔离的进化是分化的性选择和生物体对特定环境适应的结果<sup>[64,65]</sup>。但这种生态学物种形成的理论目前在真菌中还没有得到足够证据。

### 3.5 微生物系统发育与进化

近年来,现代分子生物学技术,尤其是 rRNA 基因同源性分析方法在微生物系统发育及进化研究中发挥了巨大的作用。在分子和基因水平上获得大量分类单元尤其是种的遗传信息后,来推断和重建微生物类群的演化历史和演化关系克服了传统的微生物分离培养方法的限制,极大地促进了人们对生物多样性乃至物种进化的理解。在遗传信息同源性分析基础上得出的微生物系统发育多样性不但可以作为微生物多样性评价的手段,而且为多样性的保护提供依据。分析微生物系统发育路径,推测其演化历史,重建微生物类群的演化关系,成为认识生物多样性必不可少的内容之一。

对于微生物的系统发育与进化研究,对学术界冲击最大的当属“三界学说”理论的提出。1977 年,Woese 等<sup>[27]</sup>通过对 200 多种原核生物的 16S rRNA 和真核生物的 18S rRNA 的多核苷酸序列进行分析,提出了生命体系的“三界学说”,即原核生物应分为两界:古细菌和真细菌,这两界彼此不同。古细菌、真细菌和真核生物三者之间不存在谁起源于谁的问题,而是相互平行的,三者都起源于共同的祖先,这一祖先称为原始细胞。而产甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)的全基因组序列测定更是为“三界学说”提供了可信的证据<sup>[66]</sup>。“三界学说”和生命之树的定量化为研究微生物生物多样性提供了一种全新的视点,并暗示大多数微生物都具有遗传多样性<sup>[67]</sup>。然而,随着更多微生物基因组数据的分析,许多学者对“三界学说”也提出了一些质疑。例如,他们认为并不是所有基因的进化都以相同的速度和方式进行,所以基于某一个基因分析得到的进化树与另一个基因得到进化树很可能不同。另外,即使系统发育树是正确的,当回溯到早期细胞进化时,也无法完美的解释为什么在真核生物的 34 个科中,只有 8 个科

与古生菌表现出更大的相似性, 而有 17 个科的蛋白质似乎是来自细菌<sup>[68, 69]</sup>。

随着科学技术的发展以及更多微生物物种基因组测序的完成, 使得微生物学家们能够从数据中挖掘含有更多与物种进化历史相关联的系统发育标记, 结合对应分析方法的发展将克服传统分子系统发育研究中存在的诸多难题, 使人们提高对微生物的遗传特征的理解, 对微生物乃至生命的进化能有一个更系统、更准确的理解。

#### 4 结语与展望

以人类基因组计划为代表的生物体基因组研究成为整个生命科学研究的前沿, 而微生物基因组研究又是其中的重要分支。从 1995 年国际上第一个细菌流感嗜血杆菌全基因组测定完成, 数以千计的微生物的测序工作已经完成或正在进行, 意味着微生物的研究已经全面进入基因组时代。海量的微生物基因组序列信息不仅能使人们从更加广阔的空间和全新的视角对微生物的致病机制、重要代谢和调控机制进行研究, 还能在此基础上发展一系列与我们的生活密切相关的基因工程产品, 如疫苗、新药、诊断试剂和应用于工农业生产的各种特殊酶制剂等, 全面促进微生物工业时代的来临。

此外, 高通量的 DNA 测序技术及相应计算机分析软件的开发将使得核苷酸多态性的检测研究应用于更加广泛的物种和更多的位点, 为更加深入地研究微生物遗传多样性奠定良好的基础。而且通过分析和应用这些数据资源, 会极大地促进功能基因组学及相关进化问题的研究。基因组时代的到来, 将一个崭新的、全面的和内在的微生物世界展现在人们面前。相信越来越多的基因组信息的积累和分析, 将为认知微生物多样性提供更丰富的信息和更有力的证据, 为保护生物多样性做出应有的贡献。

#### 参考文献(References):

- [1] Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol*, 2000, 2(1): 39–50. DOI
- [2] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(24): 7213–7218. DOI
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van De Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407–4414. DOI
- [4] 王伟伟, 齐小辉, 刘军, 马玉超, 周东坡. AFLP技术在微生物分类鉴定, 基因标定及遗传多样性方面的应用. *生物技术*, 2003, 13(5): 42–43. DOI
- [5] Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695–700. DOI
- [6] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans ADL, van Elsas JD, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, 1–2: 743–769.
- [7] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE技术及其在微生物分子生态学中的应用. *微生物学报*, 2004, 44(6): 845–848. DOI
- [8] Takezaki N, Nei M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 1996, 144(1): 389–399. DOI
- [9] Nikiforov T, Karn J, Goelet P. Ligase/polymerase-mediated genetic bit analysis of single nucleotide polymorphisms and its use in genetic analysis. Google Patents, 1999. DOI
- [10] Fisher MC, White TJ, Taylor JW. Primers for genotyping single nucleotide polymorphisms and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Mol Ecol*, 1999, 8(6): 1082–1084. DOI
- [11] Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(6): 431–440. DOI
- [12] 胡婷婷, 蒋承建, 梁璇, 隆文杰, 武波. 碱性土壤微生物基因的克隆和多样性分析. *2006*, 28(10): 1287–1293. DOI
- [13] Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*, 2007, 449(7164): 804–810. DOI
- [14] Gilbert JA, Meyer F, Jansson J, Gordon J, Pace N, Tiedje J, Ley R, Fierer N, Field D, Kyrpides N, Glöckner FO, Klenk HP, Wommack KE, Glass E, Docherty K, Gallery R, Stevens R, Knight R. The Earth Microbiome Project: Meeting report of the “1st EMP meeting on sample selec-



- tion and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6th 2010. *Stand Genomic Sci*, 2010, 3(3): 249–253. [DOI](#)
- [15] Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(6): 2541–2547. [DOI](#)
- [16] Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 68(4): 669–685. [DOI](#)
- [17] Arjun JK, Harikrishnan K. Metagenomic analysis of bacterial diversity in the rice rhizosphere soil microbiome. *Biotechnol Bioinf Bioeng*, 2011, 1(3): 361–367. [DOI](#)
- [18] Huson D, Richter DC, Mitra S, Auch AF, Schuster SC. Methods for comparative metagenomics. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(Suppl. 1): S12. [DOI](#)
- [19] Iverson V, Morris RM, Frazar CD, Berthiaume CT, Morales RL, Armbrust EV. Untangling genomes from metagenomes: Revealing an uncultured class of marine euryarchaeota. *Science*, 2012, 335(6068): 587–590. [DOI](#)
- [20] Halliday J, Baker D. Technologies to maintain microbial diversity. *OTA Commissoined Paper*, 1985.
- [21] Malik KA. Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. *J Microbiol Methods*, 1990, 12(2): 117–124. [DOI](#)
- [22] White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 315–322. [DOI](#)
- [23] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*, 1993, 2(2): 113–118. [DOI](#)
- [24] Dr Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner M, Schleifer KH. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review). *Electrophoresis*, 1998, 19(4): 554–568. [DOI](#)
- [25] 都立辉, 刘芳. 16S rRNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用. *乳业科学与技术*, 2006, (5): 207–209. [DOI](#)
- [26] Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(4): 1563–1589. [DOI](#)
- [27] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(11): 5088–5090. [DOI](#)
- [28] Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(1): 139–147. [DOI](#)
- [29] Boyer SL, Flechtner VR, Johansen JR. Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(6): 1057–1069. [DOI](#)
- [30] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade WG. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 795–799. [DOI](#)
- [31] Msiska Z, Morton JB. Isolation and sequence analysis of a  $\beta$ -tubulin gene from arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 2009, 19(7): 501–513. [DOI](#)
- [32] Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw DJ, Gow NAR, Odds FC. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(5): 1469–1477. [DOI](#)
- [33] Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou JJ, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6): 3140–3145. [DOI](#)
- [34] Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing—it’s not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(4): 351–356. [DOI](#)
- [35] Boers SA, van der Reijden WA, Jansen R. High-throughput multilocus sequence typing: Bringing molecular typing to the next level. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39630. [DOI](#)
- [36] Simwami SP, Khayhan K, Henk DA, Aanensen DM, Boekhout T, Hagen F, Brouwer AE, Harrison TS, Donnelly CA, Fisher MC, Joseph H. Low diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus sequence types from Thailand are consistent with an ancestral African origin. *PLoS Pathog*, 2011, 7(4): e1001343. [DOI](#)
- [37] James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V,



- Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'ourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüller A, Longcore JE, O'onnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Bückel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 2006, 443(7113): 818–822. [DOI](#)
- [38] Kurland CG. Problems and paradigms. Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code. *Bioessays*, 1992, 14(10): 709–714. [DOI](#)
- [39] Paquin B, Laforest MJ, Forget L, Roewer I, Wang Z, Longcore J, Lang BF. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr Genet*, 1997, 31(5): 380–395. [DOI](#)
- [40] 熊庆, 刘作易, 喻子牛. 线粒体DNA的研究与应用. 西南农业学报, 2002, 15(3): 111–115. [DOI](#)
- [41] 曾凡亚, 张义正. 食用真菌线粒体DNA的直接分析. 微生物学通报, 1998, 25(1): 5–9. [DOI](#)
- [42] Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1998, 440(3): 325–331. [DOI](#)
- [43] López V, Fernández-Espinar MT, Barrio E, Ramón D, Querol A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int J Food Microbiol*, 2003, 81(1): 63–71. [DOI](#)
- [44] Hamari Z, Kevei F, Kovács É, Varga J, Kozakiewicz Z, Croft JH. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1997, 72(4): 337–347. [DOI](#)
- [45] Förster H, Oudemans P, Coffey MD. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Exp Mycol*, 1990, 14(1): 18–31. [DOI](#)
- [46] Hu W, Li Y, Mo M, Zhang K. A new nematode-trapping hyphomycete of *Arthrobotrys*. *Mycotaxon*, 2006, 95: 181–184.
- [47] Li J, Yang JK, Liang LM, Zhang KQ. Taxonomic revision of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys multisecondaria*. *J Microbiol*, 2008, 46(5): 513–518. [DOI](#)
- [48] Colwell RR, Grimes DJ, ed. Nonculturable microorganisms in the environment. Washington DC: ASM Press, 2000. [DOI](#)
- [49] Wagner M. Deciphering functions of uncultured microorganisms. *ASM News-Am Soc Microbiol*, 2004, 70(2): 63–70. [DOI](#)
- [50] Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, 345(6270): 63–65. [DOI](#)
- [51] Polz MF, Cavanaugh CM. A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on *in vitro* transcription of 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(3): 1028–1033. [DOI](#)
- [52] Head IM, Saunders JR, Pickup RW. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol*, 1998, 35(1): 1–21. [DOI](#)
- [53] Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, Richards TA. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature*, 2011, 474(7350): 200–203. [DOI](#)
- [54] Li X, Qin L. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(11): 539–543. [DOI](#)
- [55] Gherman A, Chen PE, Teslovich TM, Stankiewicz P, Withers M, Kashuk CS, Chakravarti A, Lupski JR, Cutler DJ, Katsanis N. Population bottlenecks as a potential major shaping force of human genome architecture. *PLoS Genet*, 2007, 3(7): e119. [DOI](#)
- [56] 祝雯, 詹家绥. 植物病原物的群体遗传学. 遗传, 2012, 34(2): 157–166. [DOI](#)
- [57] Tugume AK, Mukasa SB, Kalkkinen N, Valkonen JPT. Recombination and selection pressure in the ipomovirus Sweet potato mild mottle virus (Potyviridae) in wild species and cultivated sweetpotato in the centre of evolution in East Africa. *J Gen Virol*, 2010, 91(4): 1092–1108. [DOI](#)
- [58] Fournier E, Giraud T, Albertini C, Brygoo Y. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 2005, 97(6): 1251–1267. [DOI](#)
- [59] Johnson JA, Harrington TC, Engelbrecht C. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Cera-*

- tocystis fimbriata* complex. *Mycologia*, 2005, 97(5): 1067–1092. [DOI](#)
- [60] Pringle A, Baker DM, Platt JL, Wares JP, Latgé JP, Taylor JW. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution*, 2005, 59(9): 1886–1899. [DOI](#)
- [61] Stukenbrock EH, Banke S, Javan-Nikkhah M, McDonald BA. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(2): 398–411. [DOI](#)
- [62] Schardl CL, Leuchtmann A, Chung KR, Penny D, Siegel MR. Coevolution by Common Descent of Fungal Symbionts (*Epichloë* spp.) and Grass Hosts. *Mol Biol Evol*, 1997, 14(2): 133–143. [DOI](#)
- [63] Pöggeler S, Masloff S, Jacobsen S, Kück U. Karyotype polymorphism correlates with intraspecific infertility in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *J Evol Biol*, 2000, 13(2): 281–289. [DOI](#)
- [64] Rundle HD, Nosil P. Ecological speciation. *Ecol Lett*, 2005, 8(3): 336–352. [DOI](#)
- [65] Schluter D. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol Evol*, 2001, 16(7): 372–380. [DOI](#)
- [66] Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NSM, Weidman JF, Fuhrmann JL, Nguyen D, Utterback TR, Kelley JM, Peterson JD, Sadow PW, Hanna MC, Cotton MD, Roberts KM, Hurst MA, Kaine BP, Borodovsky M, Klenk HP, Fraser CM, Smith HO, Woese CR, Venter JC. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1996, 273(5278): 1058–1073. [DOI](#)
- [67] Wolf YI, Rogozin IB, Grishin NV, Koonin EV. Genome trees and the tree of life. *Trends Genet*, 2002, 18(9): 472–479. [DOI](#)
- [68] Forterre P, Philippé H. Where is the root of the universal tree of life? *Bioessays*, 1999, 21(10): 871–879. [DOI](#)
- [69] Pennisi E. Genome data shake tree of life. *Science*, 1998, 280(5364): 672–674. [DOI](#)

## • 综合信息 •

### 中国微生物基因组研究

作者：喻子牛，邵宗泽，孙明

ISBN: 9787030357236 定价：190 开本：16 装帧：平装 页码：692

初版时间：2012-10-1 专业分类：微生物学

**读者对象：**《中国微生物基因组研究》内容属微生物学科前沿领域，可供从事医学、农业、工业、环境、生态、动物医学、植物病原微生物研究的研究人员、教师和研究生参考。

**内容介绍**

《中国微生物基因组研究》由我国从事微生物基因组研究的专家们结合自己的研究领域撰写的综述论文组成，反映了我国微生物基因组研究的过去、现在，并指出了未来尚需研究的方向。共分为真细菌基因组(包括人畜病原真细菌、农用真细菌、环境真细菌、冶金、食品真细菌基因组)、古生菌基因组、真核微生物基因组、病毒基因组、微生物基因组研究方法五个部分。

**作译者介绍**

喻子牛 华中农业大学教授、博士生导师，国家级专家，“973”计划农业领域咨询专家。长期从事微生物学教学和科学研究，主要承担微生物农药——苏云金芽胞杆菌方面国内外科研项目50余项。获国家和省部级奖励10余项。发表学术论文300余篇，其中SCI论文120余篇。出版专著、教材和译著10余部。获国内外专利授权20余项。培养博士、博士后和硕士180余人。在任国家重点学科负责人期间，将部级实验室升格为“农业微生物学国家重点实验室”，创建了“微生物农药国家工程研究中心”和“农业部微生物产品质检中心”。被国内外50余个单位聘任，在国内外微生物农药界颇具影响。创办了“全国微生物基因组学学术研讨会”。

---

科学出版社 科学销售中心 联系人：周文宇  
电话：010-64022646, 010-64017321 E-mail: [zhouwenyu@mail.sciencep.com](mailto:zhouwenyu@mail.sciencep.com)