

浅部真菌病 中西医结合诊治

主编
范瑞强

- 本书由广东省中医院皮肤科中医药防治皮肤真菌病创新团队的专家教授倾力编写。
- 本书是广东省中医院多年来承担有关浅部真菌病防治科研课题的成果的展现。



人民卫生出版社

浅部真菌病

中西医结合诊治

主 审 禔国维 廖万清 陈达灿

主 编 范瑞强

副主编 陈信生 谢 婷

编 委 范瑞强 陈信生 谢 婷 袁娟娜

贾淑琳 梁海莹 莫冬冬

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

浅部真菌病中西医结合诊治 / 范瑞强主编. —北京: 人民卫生出版社, 2015

ISBN 978-7-117-21681-4

I. ①浅… II. ①范… III. ①皮肤真菌病-中西医结合-诊疗 IV. ①R756

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 259213 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

浅部真菌病中西医结合诊治

主 编: 范瑞强

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京盛通印刷股份有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 710×1000 1/16 印张: 18 插页: 2

字 数: 333 千字

版 次: 2015 年 12 月第 1 版 2015 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-21681-4/R · 21682

定 价: 39.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前 言

临床上真菌感染性疾病按病原真菌侵犯人体组织和器官的不同分为浅部真菌病和深部真菌病两大类。由浅部致病真菌寄生或腐生于表皮角质层、黏膜、毛发和甲板等皮肤黏膜浅表部位引起的疾病属于浅部真菌病。深部真菌病是指病原真菌侵入真皮、皮下组织、内脏组织或器官引起的疾病。

浅部真菌病是临床常见病,中医、中西医结合治疗浅部真菌病有悠久的历史 and 非常丰富的经验。本书的编写目的是为了系统全面总结整理中医、中西医结合治疗浅部真菌病的前人经验、文献资料,以及我们多年来承担广东省和国家有关浅部真菌病防治科研课题的成果,为今后中医、中西医结合防治浅部真菌病的临床和科研提供一本有价值的学习参考书。

本书由广东省中医院皮肤科(国家中医药管理局重点学科、国家卫生计生委临床重点专科)中医药防治皮肤真菌病创新团队的教授专家等编写。主要供中、高级临床医生,尤其是中西医结合皮肤性病科的临床医生阅读使用。高等医学院校的学生和有关疾病患者、医学爱好者亦可参考使用。

本书的病名采用现代西医的皮肤病病名,同时配以中医皮肤病病名。中医病名原则上采用国家技术监督局1997年发布的《中医临床诊疗术语疾病部分》、高等医药院校教材《中医外科学》第5版、第6版以及以往出版皮肤科专著中的中医皮肤病病名。

全书分为上篇、下篇两大部分。上篇总论主要介绍医学真菌学的基础知识,包括真菌的分类与命名;真菌的形态学;医学真菌常用的检查方法;常用的抗真菌药物等。下篇各论主要介绍临床常见浅部真菌病的中西医诊治。并附广东省中医院皮肤科浅部真菌病研究历年发表的主要论文和少量临床彩色照片。

本书编写过程中得到编写者所在单位领导和人民卫生出版社的大力支持,同时在编写过程中我们还大量参考并部分收进了国内外的有关文献资料,对上述专家、领导、单位和有关作者一并致以衷心的感谢!

虽然我们为本书的编写作出了最大的努力,但由于编写人员的水平所限,所以书中难免会出现缺点和错误,恳请读者批评指正。

编 者

2015年1月18日

目 录

上篇 总 论

第一章 概述	2
第二章 真菌的分类与命名	3
第一节 真菌的分类	4
第二节 真菌的命名	18
第三章 真菌的形态学	20
第四章 医学真菌常用的检查方法	25
第一节 标本的采集	25
第二节 标本的检查	25
第五章 常用的抗真菌药物	27
第一节 抗真菌西药	27
第二节 抗真菌治疗常用中药及方剂	46

下篇 各 论

第一章 头癣	86
第二章 手足癣	95
第三章 体股癣	116
第四章 甲真菌病	126
第五章 花斑糠疹	142
第六章 马拉色菌毛囊炎	152
第七章 癣菌疹	162
第八章 皮肤黏膜念珠菌病	168
第九章 外阴阴道念珠菌病	184

附一: 广东省中医院皮肤科浅部真菌病研究发表的主要论文 199

附二: 浅部真菌病临床图片 285

上篇

总 论

第一章 概 述

真菌感染性疾病是临床常见多发病,是皮肤性病学的重要组成部分。临床上真菌感染性疾病按病原真菌侵犯人体组织和器官的不同,传统上将真菌病(真菌感染)分为四大类,即浅表真菌病、皮肤真菌病、皮下组织真菌病和系统性真菌病。浅表真菌病和皮肤真菌病又合称为浅部真菌病,也叫浅部真菌感染,是由病原真菌寄生或腐生于表皮角质层、黏膜、毛发和甲板等皮肤黏膜部位引起;而深部真菌病是指病原真菌侵入真皮、皮下组织、内脏组织或器官引起的疾病,包括皮下组织真菌病和系统性真菌病。目前临床上一般将真菌感染性疾病分为浅部真菌病和深部真菌病两大类。有些真菌如念珠菌,既能侵犯浅表部位又能累及深部组织。在皮肤科临床中,诊治的大多数真菌感染为浅部真菌感染。

本书主要针对浅部真菌感染介绍真菌的分类与命名,真菌的形态学,真菌的实验室检查,常用的抗真菌药物,以及常见浅部真菌病的中西医诊断、治疗方法和研究进展。

(谢 婷 范瑞强)

第二章 真菌的分类与命名

真菌是真核生物中一个多样化的类群,种属繁多,形态各异。真菌的分类和命名是一项浩大的生物工程,估计在世界上真菌有100万~150万个种,在目前通用的2008年第10版《真菌词典》(Dictionary of the Fungi)中,收录并描述了大约10万种真菌;而且有文字记录的真菌名称多达40万,其中包括大量的同物异名,此外,还有上百万种真菌有待于鉴定和分类。真菌分类以真菌关联性为基础,真菌命名以鉴定、分类和交流为目的,二者密切相关,无法分开。

真菌(fungus, fungi)一词来源于拉丁文的sfungus,即蘑菇,同词源的希腊文为sphongis,意思是海绵状物,中文早期称为蕈,后称菌,又称真菌,属于真核生物,没有质体(plasids),营养方式为吸收,无吞噬作用。细胞壁含有甲壳质(chitin)和(1,3)- β -D-葡聚糖。线粒体具有扁平的突起,常有过氧化物体(peroxiomes)、高尔基体。有单细胞或菌丝体和多核细胞单倍体的菌丝体。行有性生殖和无性生殖。双倍体存在的时间很短。营腐生、寄生、共生和超寄生(superparasitic,即真菌寄生于其他真菌上)生活。

现代使用的真菌一词的概念不仅仅包括蘑菇,而是代表着一个既有单细胞个体,又有多细胞的大小型丝状体及大型个体的一个相当庞大的生物类群。由于真菌形态构造和繁殖方式较原核生物复杂、多样,但与高等植物相比形态结构则又简单,因此其分类既不同于原核生物也不能与高等植物相似。回顾对真菌系统研究的历史,其发展经历了古真菌学时期(—1860)、近代真菌学时期(1860—1950)、现代真菌学时期(1950—)三个主要时期。在古真菌学时期,人们在日常生活中认识和利用真菌,人类最初对真菌的分类是依据易于识别的宏观形态特征来鉴别的,使用的是简单的描述性语言。十七世纪中期显微镜的发明促进了真菌的研究由大型真菌转入小型真菌并推动了真菌分类工作在形态结构方面的研究。1859年达尔文进化论的问世、巴斯德发酵实验的研究,为真菌学的进一步发展奠定了理论基础。随后的一百多年中,真菌的分类从形态结构方面深入到了系统演化方面,建立了以系统发育为基础的分类系统,它反映了系统发育的进程,使真菌分类从外表形态上相似和内在本质上的相关联相统一。这一近代真菌学研究的时期,以形态特征为依据进行了反映自然系谱的分类工作,同时以进化的观点研究了真菌的遗传性状和生理性状。大多数真菌对人类有益,只有少数对人类有害。真菌可引起人类、动物的疾病,称为

真菌病(mycosis),还可引起植物的疾病、人类过敏性疾病和真菌毒素中毒症。

第一节 真菌的分类

一、传统的真菌分类

真菌分类的研究,经过较长时间的演变,逐渐形成了以“形态结构特征为主,生理生化、细胞化学和生态等特征为辅”的分类原则。以形态结构为依据是传统(或经典)分类法的基础。以生理生化特征为依据能从多方面研究真菌,但采用的指标较多。另外,不同真菌在形态、营养、繁殖等诸方面对生态因素都有特定的要求和耐受的界限,因此观察真菌时也须考虑到生态性状并将它作为真菌鉴定的辅助性状。在真菌分类领域中,具有进化概念的,有代表性的真菌分类系统主要有De Bary(1884)系统, Gaumann(1926—1964)系统, Martin 等(1950)系统, Whitaker(1969)系统,以Martin为代表提出的4纲分类系统等。

北京大学真菌和真菌病研究中心王端礼主编《医学真菌学-实验室检验指南》一书,较好的对真菌的分类进行了总结。早期的分类将真菌界分为粘菌门和真菌门,真菌门分为接合菌亚门,鞭毛菌亚门,子囊菌亚门,担子菌亚门和半知菌亚门。目前通过对16s类rRNA碱基序列的比较分析,将生物划分为三大超界(Domain),即真核超界(Eukaryotes),细菌超界(Bacteria)和古菌超界(Archaea)。真核超界下面有五个界。即动物界(Animalia)、植物界(Plantae)、真菌界(Fungi)、藻物界(Chromista)、原生生物界(Protozoa)。其营养特性分别为摄食,光合,吸收,光合,吸收,吞噬、光合等作用。藻物界加入了一些菌类,又称管毛生物界。研究真菌,常常涉及藻物界和原生生物界一些菌类,统称为菌物。现代分类只承认真菌界的四个门,即接合菌门(Zygomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、担子菌门(Basidiomycota)和子囊菌门(Ascomycota)。对半知菌未予承认,但仍保留,字首不用大写而用小写,即deuteromycetes,又称为丝裂孢子真菌(mitosporic fungi)。现在正在寻找半知菌的分类地位。并认为半知菌的有性期多为子囊菌和担子菌。目前,医学真菌界有的把壶菌门排除在外,只承认三个门。真菌的分类仍遵循以往的分类名称,但有所改进。

Domain 域,超界

Kingdom 界

Subkingdom 亚界

Phylum, Division 门

Subphylum, Subdivision 亚门

Class	纲
Subclass	亚纲
Order	目
Suborder	亚目
Family	科
Subfamily	亚科
Tribe	族
Subtribe	亚族
Genus	属
Subgenus	亚属
Section	组
Subsection	亚组
Series	系
Subseries	亚系
Species	种
Subspecies	亚种
Variety	变种
Subvariety	亚变种
Form	型
Subform	亚型
Special form	特殊型
Physiologic Race	生理学宗
Individual	个体

二、真菌种的概念

根据形态学特征可将真菌鉴定到种。其中包括以下一些概念:

多形性概念(polythetic concept): 需要合并真菌的各种特征。

生态学概念: 根据真菌的特殊习性。

生物学概念: 如交配试验,用于有性期; 绘图方法,用于无性期。

种系发生概念: 结合分子生物学技术,特别是核苷酸DNA的序列分析来分类种间、种内、种上、种下的各种分类群。

综合上述概念,种系统发生概念又有了发展,目前根据形态学、真菌细胞壁成分、细胞学试验、超微结构、细胞代谢、化石记录、分子生物学技术等来分类。研究证实真菌发生在10亿年前,子囊菌、担子菌和接合菌是在550百万年与壶菌分开的。子囊菌与担子菌是在400百万年之前分开的。

三、常见致病真菌的分类位置

与临床相关的真菌有三类,第一是皮肤癣菌,第二是双相真菌,第三是条件致病菌。致病菌以子囊菌最为多见,其次为丝裂孢子真菌。

(一)子囊菌门(Ascomycota)

包括50%已知真菌种,80%致病菌和条件致病菌。有子囊、菌丝壁双层、外壁电子致密、内壁电子相对透明。有6个纲。致病菌有以下几种。

1. 不整囊菌纲(Plectomycetes) 双相真菌中的球孢子菌、组织胞浆菌、伊蒙菌,皮肤癣菌有性期,青霉、曲霉(烟曲、黄曲、土曲)有性期,还有裂殖酵母、肺孢子虫、部分暗色真菌等。青霉,其中马内菲青霉为致病性,其他偶可致病。甲团囊菌目中有四个科,其中裸囊菌科(Gymnoascaceae)有许多致病菌,如丝囊菌(*Aphenoascus*),无性期有金孢子菌、组织胞浆菌。阿耶罗菌(*Ajellomyces*)的无性期有组织胞浆菌、小伊蒙菌、皮炎芽生菌、粗球孢子菌、副球孢子菌等。节皮菌(*Arthroderma*)中有毛癣菌、小孢子菌、表皮癣菌等。

2. 单囊壁核菌纲(Untunicate Pyrenomycetes) 如小囊菌无性期为帚霉(*Scopulariopsis*),假性阿利什霉(*Pseudallescheria*),无性期为赛多孢子菌(*Scedosporium*),束孢(*Graphium*)。肉座菌目(Hypoceales),有镰刀菌、枝顶孢和木霉等。

3. 囊壁核菌纲(Bitunicate Pyrenomycetes) 其中常见的酵母目(Saccharomycetales)有8个科,75个属,273个种。念珠菌有163个无性期的种,有性期至少有13个属,如毕赤、德巴利等。念珠菌至少有20个种能够致病。近来发现酿酒酵母也能引起免疫受损患者的感染,也可产生假菌丝。

(二)接合菌门(Zygomycota)

虫霉目中的两个菌,冠状耳霉和蛙粪霉可以致病。毛霉目中的根霉、毛霉、犁头霉、根毛霉属可以致病。现又有科克霉(*Cokeromyces*),瓶霉(*Saksenaea*),囊托霉(*Apophysomyces*),厚壁孢子犁头霉(*Chlamydoabsidia*)可以致病。

(三)担子菌门(Basidiomycota)

与子囊菌区别,可有锁状联合,菌落用重氮蓝B染色可染成红色,尿素酶阳性,G+C含量高,TEM细胞壁内壁板层状,也可见桶孔。如红酵母、掷孢酵母和隐球菌属于此门。隐球菌的有性期有线状黑粉菌(*Filobasidium*),线状小黑粉菌(*Filobasidiella*),囊线黑粉菌(*Cytofilobasidium*)。

1. 银耳目(Trimoliales) 毛孢子菌属于此目,与地霉属区别是后者尿素酶阴性,同化糖甚少。马拉色菌(糠秕孢子菌)也属此目。

2. 裂褶菌目(Schizophyllales) 致病菌存普通裂褶菌(*Schizophyllum commune*)。

3. 蘑菇目(Agaricales) 鬼伞(*Copriums*)致病,近来单枝小粘束孢(*Hormo-*

graphiella) 有致病报告。

4. 黑粉菌目(*Ustilaginales*) 红酵母、掷孢酵母属于此目, 有性期为红色孢子菌(*Rhodosporidium*)。

(四) 半知菌

半知菌(*deuteromycetes*) 现称为丝裂孢子真菌(*mitosporic fungus*), 有许多名称, 如不全菌(*fungi imperfecti*), 无性真菌(*asexual fungi*), 分生孢子真菌(*conidial fungi*) 等。无性结构与子囊菌、担子菌相似, 用交配法、分子生物学方法可以证实。种的数目仅次于子囊菌。主要致病菌在丝孢纲内。

四、真菌新分类依据的演变

(一) 真菌分子系统学的产生

传统的真菌分类学(*Taxonomy*), 主要依据真菌形态、生理生化特性及抗原构造等表型特征, 对真菌进行系统分类。这种分类方法敏感性不高, 耗时费力, 对操作人员的专业水平要求较高; 另外, 由于真菌种类繁多, 个体多态性明显, 经常造成分类系统不稳定, 而某些真菌存在趋同进化的现象, 导致无亲缘关系的真菌在同一条件下出现相似的结构, 这就使传统的分类法往往容易出现误判。

近三十多年来, 由于新技术的不断出现和应用, 各门学科的相互渗透, 把真菌学的研究推向了一个新的高峰, 从生理生化方面的研究结果导致了真菌系统发育和进化方面的重大突破, 进入了现代分类时期。由于科学技术的迅速发展, 特别是分子生物学的迅速发展, 给真菌分类学以巨大的推动力, 其中将核酸和蛋白质等分子生物学性状用来探索真菌的种、属、科、目、纲、门等各级分类阶元的进化和亲缘关系应用日趋广泛, 弥补了传统分类的不足, 使人们对真菌系统发育的认识更接近于客观实际, 为真菌分类学的研究开辟了前景。真菌系统学(*systematics*) 是以系统学的方法研究真菌的系统发育。随着生物化学, 分子生物学, 遗传学以及生物信息学等相关学科的发展, 将分子生物学技术引进真菌分类中, 结合系统学方法, 是现代真菌分类学的发展趋势, 即以分子生物学手段为核心, 探索真菌类群间系统发育关系以及进化的过程和机制, 进而对真菌进行分类, 已形成新的学科——真菌分子系统学(*fungus molecular systematic*)。

(二) 真菌分子系统学的理论基础

广义来说, 真菌分子系统学可运用多种分子生物学技术识别真菌的分子性状以代替传统分类系统中的表型发现, 更接近于真菌的本质特征。在方法学方面, 主要包括聚合酶链反应(*polymerase chain reaction, PCR*)、单链构象多态性(*single-strand conformation polymorphism, SSCP*)、限制性片段长度多态性(*PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP*)、扩增片段长度多态性分析(*amplified fragment length polymorphism, AFLP*)、随机扩增多态性DNA 分析

(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、脉冲场凝胶电泳技术(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)以及多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)等。

狭义来说,核酸序列分析是目前真菌分类和命名研究的热点方法和基本手段。核苷酸作为生物遗传信息的基本单位,能够提供大量的直接物种信息,如碱基的转换(transition)与颠换(transversion),核苷酸的变化趋势等。通过核酸序列构建真菌系统发育树,进行系统发育分析,可以快速检测到真菌演化过程中所出现的代表各种分类等级的大量单一支系(monophyletic clades),为建立各分类等级的新分类单元(taxon)提供有力证据。较之DNA杂交和RFLP等分析的结果,核酸序列更加准确稳定,具有广泛的可比性;由于特定基因以“分子钟”机制恒速变异,其序列差异程度能直接反应物种之间的亲缘关系。核酸序列分析需选用合适的靶序列,其必须存在于所有分类单元,并以适当的速率演化;同时,还可检测其碱基组成和密码子偏离。核糖体RNA和一部分管家基因序列广泛存在于所有生物细胞中,其转译产物具有至关重要的生理功能,并以稳定的速率进化。真菌的rRNA为核糖体组成的关键成分,其转录前rDNA在系统发育研究中发挥了重要的作用。真菌rDNA包括5S、5.8S、18S和28S rRNA基因。它们在染色体上头尾相连,串联排列,相互之间由间隔区(internal transcribed spacers, ITS)分隔。rDNA存在广泛,多拷贝,在长期进化中形成了高度的保守性和一定的变异性,可用于不同分类水平的系统学研究。ITS序列不加入成熟核糖体,受到较小的选择压力,进化速率很快,表现出极为广泛的序列多态性,其在种内极为保守和一致,种间差异比较明显。因此ITS序列常用于属内种间和亚种间的分类鉴别。此外,一些相似不同源的蛋白编码基因也被用于真菌的分子系统学分类,如*Gpd*、 *β -tubulin*、*RPB2*、*EF1- α* 基因等,由于不同物种之间DNA进化速率不同,基因树冲突(conflicting gene trees)等原因,仅仅使用长度有限的单基因片段不能准确地对真菌分类。采用多基因位点序列分析,是研究真菌系统学的新趋势。

以下介绍一些常用的新分类方法。

1. DNA中(G+C) mol %的比较 研究资料表明,真菌DNA的(G+C) mol %在酵母菌中可作为分类学的特征之一。酵母菌不同属之间(G+C) mol %具一定的频率分布和变化幅度,可以此作为分类指标,另外从GC值看,真菌的进化(卵菌纲除外)是由GC值递增表现出来的。

2. DNA-DNA DNA-RNA分子杂交:核酸分子杂交技术是认识真菌系统发育和进化的有力工具和较有说服力的手段之一,核酸分子杂交技术可探讨真菌DNA分子中碱基序列的同源程度,以此来表明同一属内各种间和属间的亲缘关系的远近。

3. 蛋白质凝胶电泳 用琼脂、淀粉或聚丙烯酰胺凝胶电泳分析测定蛋白

质种类和含量,在不同真菌之间进行比较,据其异同,来探索他们之间的亲缘关系。实践证明,该法有助于曲霉属(*Aspergillus*)、镰孢属(*Fusarium*)、脉孢菌属(*Neurospora*)、腐霉属(*Pythium*)、青霉属(*Penicillium*)等种的鉴定。同工酶的电泳图谱分析可用于种和种下的分类。以真菌细胞中可溶性蛋白为抗原,利用精密的血清技术可测出物种之间亲缘关系的远近。

4. 脂肪酸的组分分析 真菌脂肪酸的组成在一定培养条件下是相当稳定的,但一些种类中尽管株间相似系数大于96.5%,其仍有一定的聚类层次,因此该成分的组分分析的差别有助于侧孢属、青霉属等的分类。

5. 真菌胞壁碳水化合物的组成分析 通过大量的真菌胞壁组分的研究,发现木糖、鼠李糖和岩藻糖等可作为某些真菌属分类的依据,甘露糖对葡萄糖的比例是区分不同类群的有用特征。

6. 辅酶系统 由于不同种类的真菌特定的辅酶Q(如接合菌纲和半子囊纲为Q9,冬孢纲黑粉菌目为Q10),酵母辅酶系统中辅酶Q5-Q10分布于不同属中,它和GC值及胞壁碳水化合物一起作为酵母分类的重要标志。

7. 真菌的数值分类 数值分类是随计算机科学的发展而兴起的,是分类学由定性向定量发展的一个进步,是对传统分类学的补充和完善。借助电子计算机的功能采用数值分类可更精密地作出种间的类比分析,并可作出某个新标本是否是新种或新属的决定。

8. 核酸杂交技术 核酸杂交技术是认知真菌系统发育和进化的有力工具和较有说服力的手段之一。一般在相同的菌种中,DNA/DNA杂交的成功率高达80%以上,若低于20%基本可考虑为无关菌系,65%~80%之间的菌有较多的同源性,提示为同一属的不同种。但若结果在20%~65%范围时则难以做出判断,应用其他方法分析确定。对属或属以上水平的分类则采用DNA/rRNA杂交,因为rRNA在进化过程中保守性更强。不同真菌的DNA序列是不同的,杂交时互补的程度越高,则其亲缘关系越近。同种异株的真菌基因组DNA序列差异较小,一般认定在35%以内。Kurtzman等首先开展对黄曲霉群中各菌种的DNA关系研究,黄曲霉和寄生曲霉显示79%的DNA杂交率,而集峰曲霉和黄曲霉的DNA杂交率只有39%。Kurtzman根据这些研究结果建议把黄曲霉和寄生曲霉划为黄曲霉的两个变种,而集峰曲霉则划分为一个新种。核酸杂交技术准确性高于(G+C)mol%测定,鉴定的范围可具体到种水平,对于某些亚种、变种也适合,但不能区别群间一级,而且对明显相关的种也不适用。

9. 限制性酶切片段长度多态性分析 即RFLP。在生物进化进程中,DNA碱基序列发生插入、缺失或突变,从而改变了限制性核酸内切酶(RE)的识别位点。因此,同种生物不同个体的DNA分子用同一种RE酶切,会产生不同长度的片段,在凝胶电泳时呈现不同的带型。RFLP的研究对象是基因组DNA和线

粒体DNA。原则上只要内切酶选择合适,对所有真菌均能显示任何分类水平上的多态性和特异性,常用于种以下的分类,一般适用于2~3种菌之间的比较。1987年Scherer等首先将这种方法用于念珠菌的研究。RFLP技术方法简便、影响因素少、稳定性高。这种方法存在的缺点是用RE消化整个基因组DNA产生的酶切图谱往往伴有浓重的背景,使特征性酶切条带在这一背景下较难辨认。另外限制性酶切图谱中特征性的条带主要是基因组DNA中具有高度重复序列的线粒体DNA或rDNA的酶解片段。无论mtDNA或rDNA在生物进化演变过程中均是保守序列。它们产生的RFLP有限,不能完全反映不同菌株间的差异。

10. 随机扩增多态性DNA(RAPD)分析 RAPD分析是一种利用随机合成的单个寡核苷酸引物通过PCR反应扩增靶细胞DNA,扩增产物经凝胶电泳,分析DNA片段大小和数量多态性,从而比较靶基因差异的一种技术。此技术自问世以来,广泛应用于丝状真菌的鉴定、分类研究,适用于遗传背景不清的基因分析。一般而言,RAPD并不适合真菌种间的系统发育及其亲缘关系,而对种以下水平的分类学而言是较好的。RAPD具有用量少、鉴定迅速等优点,在真菌分类中已得到广泛应用,主要用于种内的不同菌株。

11. rDNA序列分析 真菌基因组中编码核糖体的基因包括4种:28 S rDNA、5 S rDNA、18 S rDNA和5.8 S rDNA。它们在染色体上头尾相连、串联排列,相互之间由间隔区分隔。间隔区是位于核糖体大小亚基基因之间的核苷酸序列。位于28 S rDNA的3'端与18 S rDNA的5'端之间的序列称为核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS);位于28 S rDNA的5'端与18 S rDNA的3'端之间的序列称为核糖体基因内间隔区(intergenic spacers, IGS)。真菌的核糖体基因及间隔区有不同的进化程度,有的序列比较保守,有的序列进化较快,5.8 S rDNA、18 S rDNA和28 S rDNA有极大的保守性,存在着广泛的异种同源性。其中5.8 S rDNA片段较短,保守性较高,很少用于真菌的系统发育研究。18 S rDNA存在着保守区和可变区,设计不同的扩增引物,可用于真菌目、科、属等分类单元的研究。28 S rDNA同样存在着保守区和可变区,但是某些结构域比18 S rDNA有更大的变异,选择某一变异较大的结构域对真菌系统发育研究有非常重要的意义,例如在酵母菌中28S rDNA中的D1、D2可变区就常常被用作分类鉴定研究,此种方法也被用在担子菌和部分丝状子囊菌分类鉴定中。ITS区不加入成熟的核糖体,受到的选择压力较小,进化速率很快,其保守性基本表现为种内一致,种间差异比较明显。因此,ITS序列常用作属内种间和亚种间的分类鉴定研究。真菌ITS序列的通用引物为ITS 1、ITS 2、ITS 3和ITS 4,引物ITS1和ITS 2用于扩增18 S rDNA和5.8 S rDNA之间的转录间隔区ITS 1,引物ITS 3和ITS 4用于5.8 S rDNA和28 S rDNA之间的转录间隔区ITS 2。IGS区进化速率最快,曾被用于识别亚种、变种和菌株。但与ITS相比变异过高,不适宜

真菌的种间鉴别。

除此之外,还有一些分子生物学技术应用于真菌的分类研究中,但需要指出的是任何一种好的分类学技术指标仍不能单独用于物种分类,必须结合多个可靠的分类指标,如形态性状、生理性状、生化性状乃至基因水平的指标综合考虑。在此基础上才可能建立符合客观规律的自然分类系统。应正确处理表型研究和基因型研究间的关系,两者的关系应为表型鉴定、基因型证实,基因型是菌种之间存在差异的物质基础。真菌分类其目的在于使人们更为系统地认识真菌,并以此为着眼点更好地认识自然界,从人为分类向自然分类过渡。真菌分类是一个笼统的词,实际上包括了3个内容,即真菌鉴定、真菌分类和真菌系统发育,代表了3种认识水平。真菌鉴定是针对单个真菌个体的比较和分类,因此上述用于真菌分类的分子生物学术大多可用于真菌的鉴定研究(表2-1)。

表2-1 真菌鉴定常用基因靶位

靶基因	应用
ITS	包括ITS1、ITS2和5.8S rRNA,适用于大部分真菌的种属鉴定
D1-D2 Region	28S rRNA 5' 端约600bp的高变区,适用于大部分真菌的种属鉴定
26S rRNA	鉴定镰刀菌和scedosporium种
Actin	鉴定曲霉种
β -tubulin	鉴定曲霉和假性阿利什霉种、青霉
Calmodulin	鉴定曲霉和假性阿利什霉种
Chitin Synthase 2	鉴定lacazia loboi
ElongationFactor 1 α (EF1- α)	鉴定镰刀菌种
Cytochrome b	鉴定曲霉,毛孢子菌和红酵母属下的各种

综上所述可见,真菌分类的最终目标是追求近乎自然的分类系统,近几十年来各种新技术手段不断引入到微生物分类中,使真菌分类技术得到了充实和完善,90年代后的真菌分类已由形态学走向了多学科的综合。

(三)分子系统学推动真菌分类发展

近三十年来,随着真菌分子系统学的蓬勃发展,真菌分类研究进展迅速。真菌分子系统学可用于确定某种或某类真菌的分类地位,认定新种,分析某个类群真菌之间的系统发育关系,确定真菌是有性型还是无性型,探讨真菌进化问题等等。

据不完全统计,2000年以来真菌界发现了1个新亚界(Subkingdom),4个新门(Phylum),7个新亚门(Subphylum),19个新纲(Class),9个新亚纲(Subclass)

和40余个新目(Order)等高级分类单元,进展之快,前所未有。截至2008年,第10版《真菌词典》收录的真菌有97 861种,从1999年至2009年间,平均每年有1196个新种被发现和命名。然而,研究预计,未分类真菌的数量达1 500 000之多,按此速度,完成全部分类还需要1 170年。由于传统的形态学分类方式远远不能满足需要,真菌rRNA与ITS测序的使用率迅速增长,以ITS序列为例,至2011年,GenBank中收录的全长ITS序列就达到了172 000条,其中56%有确定的拉丁命名,包括15 500个种和2500个属。真菌分子系统学促进了真菌分类研究的发展。例如,传统真菌分类学主要依靠真菌的形态与生化特性,这需要真菌的纯培养物,然而并非所有真菌都能够在人工培养基中生长;在多种真菌的混合样品中,也不易分离得到所有的真菌培养物;上述情况显然使分类难以实施。通过PCR扩增环境样本中的DNA进行测序分析,使更多的真菌得以分类。早在2007年,通过Sanger测序法发现的环境中同源rDNA群已经接近基于标本和形态特征描述的物种数,随着高通量基因组测序技术的应用,通过分子技术发现新菌种的数量将进一步增加。环境DNA序列数据可以从公共数据库获得,方便对假设的系统发育进行检验,尤其适用于高通量研究中自动化方法的系统发育分析。序列数据也可用于建立荧光探针观察真菌以及染色体步移技术,是探索真菌多样性的有力工具。

真菌分子系统学使真菌分类研究更加深入。真菌分子系统学除了确定真菌的分类地位之外,可以重建真菌进化过程,更深层次的分析真菌的种属间进化关系。美国自然科学基金环境生物学部成立的真菌生命之树项目(assembling the fungal tree of life, AFTOL),以rDNA、RDP聚合酶基因以及菌丝隔膜孔和细胞核分裂的超微结构的形态学数据,构建真菌系统进化关系,该项目主要研究成果发表于《Nature》杂志,内容包括170种真菌并提出真菌类群的树形演化假说。

(四) 真菌分类和命名的变化

PCR扩增结合DNA测序技术的发展使真菌分类学由表型进入基因分类时代,使以形态学为基础的种属概念向以分子系统学为基础的种属概念转变,部分真菌原有的分类和命名也随之发生改变,使真菌分类系统更加客观和完善。

五、对部分真菌分类的调整

真菌界高阶分类系统(表2-2)作出了重大调整。建立双核真菌亚界,由之前的担子菌、壶菌、接合菌和子囊菌4个门变为壶菌(Chytridiomycota)、新丽鞭毛菌(Neocallimastigomycota)、球囊菌(Glomeromycota)、芽枝霉(Blastocladiomycota)、接合菌(Zygomycota)、子囊菌(Ascomycota)和担子菌(Basidiomycota)7个门及4个其他的亚门。早期的多基因位点分析已经证明壶菌门和接合菌门真菌是多起源的,在新分类系