

一株不产生孢子的盐生海芦笋内生真菌鉴定

王晓敏, 王 惠, 刘天行, 辛志宏*
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 对分离自盐生海芦笋的一株代号为Sal54的内生嗜盐真菌进行核糖体18S rDNA及ITS序列克隆测定, 获得长度为1715bp的18S rDNA序列和长度为544bp的ITS序列, 其ITS序列在GenBank的登录号为JX292134。获得的基因序列在NCBI数据库上进行同源性比对, 构建18S rDNA和ITS系统发育树, 并进行系统发育分析, 将该菌鉴定为甜菜蛇眼茎点菌*Phoma betae*。

关键词: 不产孢真菌; 鉴定; 18S rDNA基因; ITS基因; 系统发育分析

Identification of Sterile Endophytic Fungus Isolated from *Salicornia bigelovii*

WANG Xiao-min, WANG Hui, LIU Tian-xing, XIN Zhi-hong*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The sequences of 18S rDNA and ITS gene of a fungal strain named Sal54 isolated from *Salicornia bigelovii* were cloned and sequenced, and a 18S rDNA gene sequence of 1715 bp in length and an ITS gene sequence of 544 bp in length were obtained. The accession number of the ITS gene sequence in GenBank was JX292134. Homology analysis was conducted. A phylogenetic tree was constructed by using these sequences and the neighbor-joining method. Phylogenetic analysis revealed that the isolated strain was identified as *Phoma betae*.

Key words: sterile fungi; identification; 18S rDNA gene; ITS gene; phylogenetic analysis

中图分类号: TS255.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)17-0146-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201317032

海芦笋(*Salicornia bigelovii*)又称海蓬子、海鹿茸、海虫草等, 为草本盐生植物, 多见于盐沼地、盐湖旁及海滩^[1]。近年来, 海芦笋人工引种栽培成功, 利用天然海水灌溉, 不施农药化肥, 是一种无公害的绿色新型海水蔬菜^[2]。研究表明海芦笋具有抗心律失常, 软化血管, 降血糖血脂、抗氧化、抗衰老、增加机体免疫力等作用^[3-5]。

嗜盐菌是指在大于0.5mol/L(约3g/100mL)NaCl质量浓度下生长最佳的微生物^[6], 嗜盐菌主要包括嗜盐古菌、嗜盐细菌和嗜盐真菌, 依据其嗜盐程度不同, 嗜盐菌分为弱嗜盐菌(约3g/100mL NaCl)、中度嗜盐菌(3~15g/100mL NaCl)、极端嗜盐菌(约25g/100mL NaCl)和边缘极端嗜盐菌(至少需要12g/100mL NaCl)^[7]。目前, 对于嗜盐菌的研究大多集中在对嗜盐细菌和嗜盐古菌的研究方面^[8], 对嗜盐真菌的研究仅有少量报道。Nazareth等^[9]首次从死海中分离出了专性嗜盐真菌曲霉菌*Aspergillus unguis*, 并测定了其耐盐范围, 结果表明, *Aspergillus unguis*在盐质量浓度5~20g/100mL条件下均可生长, 而且在15g/100mL

盐质量浓度条件下生长最好。Tong Shangliang等^[10]从中国对虾(*Penaeus chinensis*)的心脏内分离出一株克鲁维酵母(*Kluyveromyces penaeid*), 它在低盐量虾肉提取物的培养基中不能生存, 但在50%海水虾肉提取物的培养基中生长良好, 提示该菌为嗜盐菌。Schubert等^[11]从南美黄松针叶上发现了*Cladosporium*属的两个新种*C. chubutense*和*C. pini-ponderosae*, 又在哥伦比亚地区的蒲苇叶上分离出其相似类群*Cladosporium colombiae*。嗜盐菌由于生长在高盐环境中, 在长期进化过程中形成独特的代谢机制, 表现在其能够产生结构新颖、活性独特的天然活性物质, 对嗜盐菌的研究在环境生物治理、生物电子和医药工业、食品工业等领域有广泛的应用。因此, 嗜盐真菌是一类亟待开发的微生物资源。

传统的真菌鉴定方法主要是基于菌株在培养基中的生长形态、颜色、质地、生长速度等情况结合显微镜形态观察, 确定真菌的种属地位, 但是这种鉴定方法的前提条件是待鉴定菌株必须产生孢子, 但是有些真菌在人

收稿日期: 2012-07-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31071586); 2011年国家大学生创新训练计划项目(111030739);

江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 王晓敏(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品营养与化学。E-mail: 2011108040@njau.edu.cn

*通信作者: 辛志宏(1974—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与化学。E-mail: xzhfood@njau.edu.cn

工培养基上难以产生或不产生孢子,就无法利用形态学对菌株进行鉴定,而且,形态学鉴定常常耗时费力,需要有经验的专业人员,对于形态相似的菌种,还容易引起误鉴。现代分子生物学的发展,为不产生孢子的真菌提供了新的鉴定手段^[12]。

本研究采用微生物平板分离纯化技术,得到一株内生嗜盐真菌,并通过对其核糖体小亚基18S rDNA和ITS(internal transcribed spacer, 内转录间隔区)基因序列进行分析,从对应于核糖体基因的分子水平上确定其种属地位。

1 材料与方法

1.1 内生真菌的分离培养与保存

菌株Sal54是从采自江苏省盐城市大丰港海滩的野生盐生海芦笋中分离得到。在无菌操作下,取一根植株,依次经过75%乙醇、1%次氯酸钠、75%乙醇各浸泡1min,然后用无菌水漂洗3次,无菌吸水纸吸干其表面水分。用灭菌后的剪刀将其剪成7~9mm小段,放在PDA平板上,每板3~5根,于28℃恒温培养至植物组织内部长出菌丝。将真菌转移到新的平板培养基上划线分离得到单个菌落,然后转移到PDA斜面试管中,4℃保存。

1.2 真菌分离纯化与发酵培养基

PDA分离培养基(g/L): 土豆200、葡萄糖20、琼脂20、食盐30,自来水配制。

液体发酵培养基(g/L): 土豆200、麦芽糖20、甘露醇20、葡萄糖10、味精5、蛋白胨5、酵母膏3, pH6.0。

1.3 试剂与仪器

Taq酶及PCR相关试剂(包括dNTP与PCR Buffer等)上海天根生化科技(北京)有限公司; OMEGA真菌基因组试剂盒(Fungal DNA Kit 50)及引物(ITS1/ITS4/NS1/NS8)上海捷瑞生物工程有限公司; 其他分析纯试剂 南京寿德试剂器材有限公司。

ECLIPSE TE2000-S荧光倒置显微镜 日本Nikon株式会社; Microfuge 22R台式微量冷冻离心机 美国Beckman公司; TP600型梯度PCR仪 日本TaKaRa公司; DYCP-31DN电泳仪 北京市六一仪器厂; JS-380C全自动数码凝胶成像分析仪 上海培清科技有限公司。

1.4 菌株的耐盐度实验

在真菌发酵用液体培养基中分别添加30、60、90、120、150、180g/L的NaCl,接种后于28℃、150r/min培养7d,观察生长情况,每组实验平行3次。

1.5 菌株的形态学观察

从保藏菌种的斜面培养基中挑取菌丝转接到PDA平板培养基中间位置,28℃培养4~5d,观察菌落大小、颜色、质地等形态特征。挑取菌落边缘菌丝,制作水浸片,在光学显微镜下观察菌丝体、孢子、孢子梗等。

1.6 基因组DNA的提取

从保藏菌种的斜面培养基中挑取菌丝转接到PDA平板上,28℃培养4~5d。基因组DNA的提取采用真菌基因组试剂盒(Fungal DNA Kit 50),严格按照说明书操作。提取的基因组DNA在1%琼脂糖凝胶中电泳检测(120V, 30min),溴化乙锭(EB)染色。4℃保存备用,或于-20℃中长期保存。

1.7 18S rDNA和ITS基因片段的PCR扩增

18S区域的扩增选择真核生物18S rDNA的通用扩增引物NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')/NS8(5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'),PCR反应条件为94℃预变性4min,94℃变性45s,50℃退火1min,72℃延伸1min45s,共35个循环,最后72℃延伸10min^[13]。

ITS区域的扩增选择真核生物ITS通用扩增引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[14],PCR反应条件为94℃预变性2min,94℃变性30s,59℃退火30s,72℃延伸90s,共35个循环,最后72℃延伸7min^[15]。

PCR扩增采用50μL的反应体系,包括ddH₂O 33.75μL,PCR Buffer(×10, Mg²⁺ plus)9μL, dNTP(2.5mmol/L) 4μL, Primer-F(20μmol/L)0.5μL, Primer-R(20μmol/L) 0.5μL, DNA 2μL, Taq聚合酶(5U/μL) 0.25μL。

PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后4℃保存备用。

1.8 18S rDNA序列克隆测序

采用DNA提取试剂盒Ver.3.0回收PCR产物,纯化的PCR产物与pMD19-T载体连接,然后转化至大肠杆菌DH5α制备的感受态细胞中,使用选择性培养基LB琼脂平板筛选白色单菌落培养。取0.5μL菌液直接做PCR,引物为M13RV和M13-47,电泳检测是否含有目的片段。PCR采用25μL的反应体系,包括ddH₂O 13.75μL,PCR Buffer(×10, Mg²⁺ plus) 7.5μL, dNTP(2.5mmol/L each) 2μL, Primer-F(20μmol/L)0.5μL, Primer-R(20μmol/L) 0.5μL, DNA 0.5μL, Taq聚合酶(5U/μL)0.25μL。

1.9 目的DNA序列测序和系统发育学分析

将18S rDNA和ITS rDNA的单克隆PCR产物交由上海美吉生物有限公司进行测序。获得序列后,在NCBI中进行BLAST比对,下载与供试菌株序列同源性相近的菌株序列利用ClustalX软件进行序列的多重比对,利用MEGA5.0软件Neighbor-Joining(N-J)方法构建系统发育树,自展数为1000。

2 结果与分析

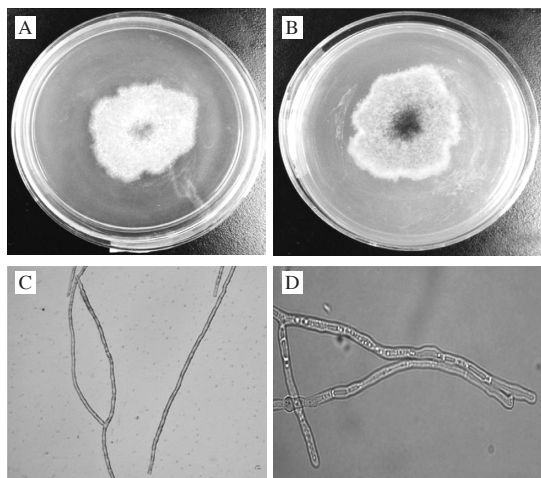
2.1 菌株的耐盐性

结果显示,该菌株在含有30~60g/L NaCl的液体培

培养基中生长良好, 90~120g/L NaCl的液体培养基中仍生长, 但生长量依次减少, 说明该菌有较强的耐盐能力。

2.2 菌株的形态学鉴定

形态学鉴定主要是通过观察菌落形态以及使用显微镜观察真菌的微观形态, 来对菌株进行鉴定。分离菌株在PDA培养基上28℃培养5d后, 菌落深绿间白色, 长绒毛状, 反面褐色, 中央略显黑色, 如图1A、B所示。光学显微镜下, 营养菌丝有横隔, 如图1C、D所示。由于该菌在常规人工培养条件下只形成营养菌丝而不产生繁殖体和繁殖孢子, 因而仅仅利用形态学是无法对该菌进行分类鉴定的^[17]。



A、B分别为在PDA培养基上28℃培养5d后的菌落正面和背面形态; C、D分别为菌丝放大400倍和放大1000倍形态。

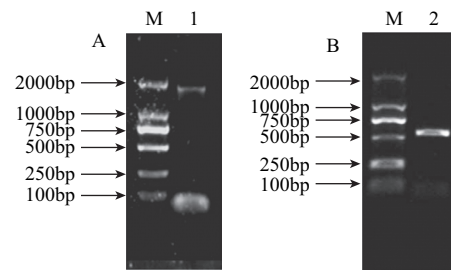
图1 内生真菌的菌落特征

Fig.1 Morphological characteristics of the endophytic fungi

2.3 系统发育学分析

系统发育树是基于共同祖先原则, 用于描述生物传代谱系的常用表达方式, 可以直观地表达分类群(物种或基因)之间的亲缘关系和进化方向^[18]。

菌株经PCR扩增获得的18S rDNA序列全长为1715bp, 如图2A所示, 在NCBI中进行BLAST比对, 与茎点菌属的18S序列同源性最高, 相似性达99%。根据18S序列构建系统发育树可以看出, 每一个属都形成一个独立的分枝, 且菌株Sa154与*Phoma betae* (EU754079.1)和*Phoma betae* (EU754080.1)处于同一分枝, 亲缘关系最近, 如图3所示。获得的菌株ITS序列全长为544bp, 如图2B所示, 该序列已提交GenBank注册, 登录号为JX292134, 在NCBI中进行BLAST比对, 该菌株ITS序列与*Phoma betae*的ITS序列同源性较高, 相似性达94%。根据ITS序列构建系统发育树, 以*Dothiorella gregaria*为外类群, 可以看出每一个种都形成一个独立的分枝, 且菌株Sa154与*Phoma betae* 17(EU594572)和*Phoma betae* CBS 264.55(GU128540)聚为一枝, 自展支持率为100, 表现出非常近的亲缘关系(图4)。



1. 18S rDNA基因片段扩增产物; 2. ITS基因片段扩增产物; M. DNA分子质量标准。

图2 18S rDNA基因(A)和ITS基因片段(B)扩增图谱

Fig.2 18S rDNA and ITS gene fragments of PCR products

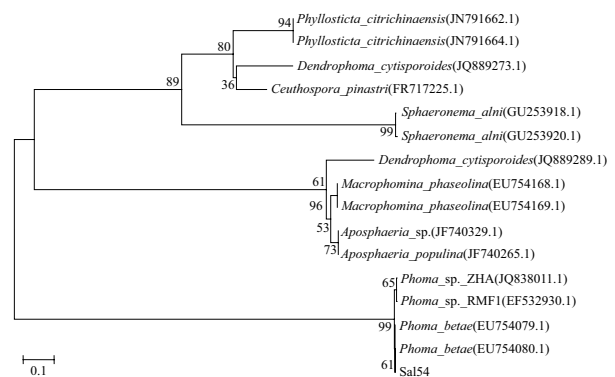
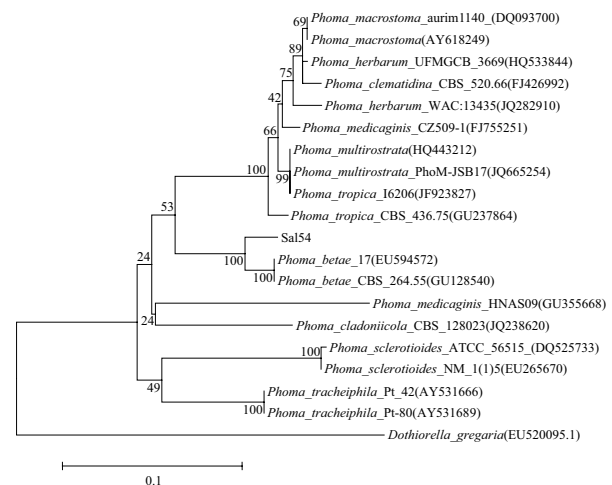


图3 基于18S rDNA基因序列构建的邻接树

Fig.3 Neighbor-joining tree based on 18S gene sequences



以*Dothiorella gregaria*为外类群。

图4 基于ITS基因序列构建的邻接树

Fig.4 Neighbor-joining tree based on ITS gene sequences

综合菌落、显微形态特征和18S rDNA和ITS rDNA基因序列分析结果, 将菌株Sa154鉴定为半知菌类Fungi imperfecti、球壳孢目 Sphaeropsidales、球壳孢科 Sphaeropsidaceae、茎点菌属*Phoma*、甜菜蛇眼茎点菌*Phoma betae*^[16]。

3 讨论

传统的真菌鉴定方法主要是以形态特征为依据,即通过培养后观察菌落形态和镜下特征,或辅以生理、生化或营养实验,然而真菌种类繁多、形态特征复杂,且少数形态特征和生理生化指标随着环境的变化而不稳定,给分类鉴定工作带来不便,尤其对于不产孢子的真菌,仅仅利用传统的形态学是难以对其分类鉴定的。随着分子生物学的发展,DNA测序技术的日趋成熟,利用DNA序列分析对真菌进行鉴定成为有效的手段并有了广泛的应用。基于真菌18S rDNA和ITS rDNA核酸序列已经成为真菌鉴定中最常使用的方法^[19-20]。18S rDNA是编码真核生物核糖体小亚基(18S rRNA)的DNA序列,它在进化上比较保守^[21],同一属的菌株18S rDNA序列碱基差异很小,因此在系统发育研究中可鉴定到属级以上。内源转录间隔区ITS是指位于rRNA编码基因18S、5.8S和28S之间的小基因片段,整个序列的长度在600~800bp,利用rDNA通用引物能够很容易被扩增出来,ITS区相对容易扩增进行过稀释或严重退化的DNA样本,它进化较快,在真菌的种间存在着丰富的变异,而在种内不同菌株间却高度保守,因此可以利用它鉴定到种级及种级以下水平^[22-24]。

本研究采用形态学观察与分子生物学相结合的方法,对分离自盐生海芦笋中的内生真菌Sal54进行鉴定。提取该菌基因组DNA后,分别PCR扩增18S rDNA和ITS基因片段并测序,测序结果与NCBI数据库中的已知真菌序列进行同源性比对,构建18S和ITS基因序列进化树。根据进化树分析结果,结合形态学观察,将Sal54鉴定为甜菜蛇眼茎点菌*Phoma betae*。

传统形态学分类法是真菌鉴定的基础,然而该方法需要有经验的专业人员且用时较长,鉴定过程复杂,而且这种方法难以鉴定不产生孢子的真菌,因此,具有一定的局限性。随着遗传学、分子生物学以及生物信息学等相关学科的迅速发展,极大的推动了真菌的分类。使用分子生物学手段来探索真菌的种、属、科、目、纲、门等各级分类阶元的进化和亲缘关系的应用日趋广泛,弥补了传统分类学上的不足,使人们对真菌系统发育的认识更接近于客观实际,鉴定结果更加准确可靠。因此,发展一些分子生物学的鉴定方法来鉴定真菌具有重要意义。本研究采用了分子生物学方法,并辅以前形态学,对真菌进行快速鉴定,避免了仅仅依靠传统的形态学指标鉴定真菌可能带来的误鉴。

目前关于甜菜蛇眼茎点菌的研究报道极少,有研究指出该菌可引起典型甜菜黑脚病症状,造成幼苗出土前腐烂或出土后猝倒,病组织呈暗褐色或黑色干腐^[25-26],但对于其致病机理,仍然未知。Oikawa等^[27]对其发酵产物的化学成分进行了研究,结果表明甜菜蛇眼茎点菌能产生大量的二萜类物质。Oikawa等^[28]采用P-450抑制剂对甜菜蛇眼茎点菌的菌丝进行处理,得到阿菲迪霉素生物合成萜,并对其结构进行了分析测定,表明该菌具有产生萜类和生物转化萜类物质的能力。

生活在极端环境中的嗜盐菌由于高盐环境的胁迫,某些沉默基因被激活,能够产生特殊的活性酶类,并由酶催生结构新颖、活性独特的次级代谢产物。因此,对于嗜盐真菌尤其是对高盐环境下的嗜盐真菌进行微生物资源调查,包括新种的发现,分离纯化其代谢产物,了解其结构与功能,是嗜盐菌未来发展的主导方向之一。

参考文献:

- [1] ATTIA F M, ALSOBAYEL A A, KRIADEES M S, et al. Nutrient composition and feeding value of *Salicornia bigelovii* torr meal in broiler diets[J]. Animal Feed Science and Technology, 1997, 65(1): 257-263.
- [2] 赵育卉, 杨海燕, 辛志宏. 盐生海芦笋来源真菌Salcoli6发酵产物抗肿瘤活性成分研究[J]. 食品科学, 2011, 32(21): 6-11.
- [3] KIM Y A, KONG C S, UM Y R, et al. Evaluation of *Salicornia herbacea* as a potential antioxidant and anti-inflammatory agent[J]. J Med Food, 2009, 12(3): 661-668.
- [4] JANG H S, KIM K R, CHOI S W, et al. Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated *Salicornia herbacea* extracts[J]. Ann Nutr Metab, 2007, 51(2): 119-125.
- [5] KONG C S, KIM J A, QIAN Z J, et al. Protective effect of isorhamnetin 3-O-beta-D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage[J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 1914-1920.
- [6] KUNTE H J, TRÜPER H G, STAN-LOTTER H. Halophilic microorganisms[M]. Astrobiology, 2002: 185-199.
- [7] MARGESIN R, SCHINNER F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology[J]. Extremophiles, 2001, 5: 73-83.
- [8] SEPCIC K, ZALAR P, GUNDE-CIMERMAN N. Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi[J]. Mar Drugs, 2011, 9: 43-58.
- [9] NAZARETH S, GONSALVES V, NAYAK S. A first record of obligate halophilic aspergilli from the dead sea[J]. Indian J Microbiol, 2012, 52(1): 22-27.
- [10] TONG Shangliang, MIAO Hongzhi. A new species of marine yeast *Kluyveromyces penaeid* isolated from the heart of penaeid shrimp *Penaeus chinensis*[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1999, 79: 559-561.
- [11] SCHUBERT K, GRESLEBIN A, GROENEWALD J Z, et al. New foliicolous species of *Cladosporium* from South America[J]. Persoonia, 2009, 22: 111-122.
- [12] GUO L D, HUANG G R, WANG Y. Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*[J]. Mycol Res, 2003, 107(6): 680-688.
- [13] LIANG Xiaohui, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Isolation and identification of a new hypocrellin A-producing strain *Shiraia* sp. SUPER-H168[J]. Microbiological Research, 2009, 164(1): 9-17.
- [14] MCCULLOUGH M J, CLEMONS K V, MCCUSKER J H, et al. Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(4): 1035-1038.
- [15] 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008(10): 1958-1961.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 405-419.
- [17] 郭春秋, 罗永兰, 张志元. 几种真菌的诱导产孢试验[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2003, 21(1): 74-77.
- [18] 韩凤侠. 共同祖先原则和系统发育树的解读[J]. 生物学通报, 2008, 43(9): 14-15.
- [19] HUNT J, BODDY L, RANDERSON P F. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils[J]. Microbial Ecology, 2004, 47: 385-395.
- [20] STEINER G, MÜLLER M. What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny[J]. J Mol Evol, 1996, 43: 58-70.
- [21] 吴清平, 黄龙花, 杨小兵, 等. 核酸序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(4): 959-961.
- [22] 黄龙花, 杨小兵, 胡惠萍, 等. rDNA部分序列在食用菌进化关系研究中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1607-1610.
- [23] 陈剑山, 郑服丛. ITS序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785-3786.
- [24] LAREÑA I, SALAZAR O, GONZÁLEZ V, et al. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 75: 187-194.
- [25] 李红霞, 李国英, 任毓忠, 等. 新疆甜菜苗期病害病原种群的鉴定[J]. 中国糖料, 2001(2): 25-29.
- [26] WARREN R C. The effect of pollen on the fungal leaf microflora of *Beta vulgaris* L. and on infection of leaves by *Phoma betae*[J]. Neth J Pl Path, 1972, 78: 89-98.
- [27] OIKAWA H, TOSHIMA H, OHASHI S, et al. Diversity of diterpene hydrocarbons in fungus *Phoma betae*[J]. Tetrahedron Letters, 2001, 42: 2329-2332.
- [28] OIKAWA H, OHASHI S, ICHIHARA A. Biosynthesis of diterpenoid aphidicolin: isolation of intermediates from P-450 inhibitor treated mycelia of *Phoma betae*[J]. Tetrahedron, 1999, 55: 7541-7554.