

一株来源于土壤的耐盐酵母菌鉴定及其与植物互作研究

毛慧芳^{1,2}, 彭杰娣², 杨荣博³, 周毅峰², 田国政², 刘晓鹏², 唐巧玉¹, 方庆^{1,2,*} (1. 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 2. 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000; 3. 湖北民族学院科技学院, 湖北恩施 445000)

摘要 [目的] 鉴定一株来源于土壤的耐盐酵母菌并探讨其与植物的互作关系。[方法] 对分离自恩施市龙洞河附近的马尾松根部土壤的一株真菌 YSTEn005 进行鉴定, 并研究盐胁迫下其与植物的互作关系。[结果] 条件生长试验表明, YSTEn005 对 NaCl 的最高耐受水平可达 10%, 而对高浓度的 K⁺ 不敏感。YSTEn005 最适生长温度为 28 ℃, 在含 4% 盐的液体培养基中生长最快; 其对 pH 耐受范围较宽, 可在 pH 4.0~9.0 条件下生长。显微镜下观察 YSTEn005 是单细胞形态, 菌体呈椭圆形, 并能够行类似酵母的出芽生殖。克隆其 18S rDNA, 序列分析表明该真菌与高耐盐酵母——汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 的亲缘关系最近, 推测 YSTEn005 很可能是汉逊德巴利酵母的一株变异种。该菌和拟南芥幼苗共培养显示, YSTEn005 的增殖可显著降低植株在盐胁迫下的存活率。[结论] 试验得到一株耐盐酵母菌 YSTEn005, 该菌不能改善植物对盐分的耐受性能。

关键词 真菌; 耐盐酵母菌; 汉逊德巴利酵母; 土壤

中图分类号 S154.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)21-0004-03

Identification of A Strain of Salt-tolerance Halophilic Yeast from Soil and Its Interaction with Plant

MAO Hui-fang^{1,2}, PENG Jie-di², YANG Qi-bo³, FANG Qing^{1,2,*} et al (1. Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization of Hubei Province, Enshi, Hubei 445000; 2. College of Biological Science and Technology, Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000; 3. Science and Technology College of Hubei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

Abstract [Objective] The aim was to identify a strain of salt-tolerance halophilic yeast from soil and study its interaction with plant. [Method] A halophilic yeast YSTEn005 was isolated from the *Pinus massoniana* rhizosphere soil in Enshi, and its interaction with plant was explored under salt stress. [Result] YSTEn005 could grow on the medium supplemented with up to 10% NaCl, and it appeared to be sensitive to K⁺; the optimum growth temperature of YSTEn005 was 28 ℃, and growth rate was higher in medium with 4% NaCl than other series of degrees; YSTEn005 was tolerant to wide pH relatively, which ranged from 4.0 to 9.0. YSTEn005 was single cell pattern under microscope, and displayed budding similar to that of yeast. Cloning its 18S rDNA and analysis of the sequence indicated that the YSTEn005 was evolutionarily close to *Debaryomyces hansenii*, which is a halophilic yeast, suggesting that YSTEn005 was from this genus. When co-cultured with plants, YSTEn005 growth promoted *Arabidopsis* seedlings dying significantly under salt stress conditions. [Conclusion] A strain of halophilic yeast YSTEn005 is obtained from soil, and the YSTEn005 growth is not helpful to plants tolerant to salt stress.

Key words Fungi; Halophilic yeast; *Debaryomyces hansenii*; Soil

真菌种属多样, 分布广泛。目前, 人们将真菌分为子囊菌门、结合菌门、担子菌门和壶菌门 4 个主要的类群。每个类群的种类繁多, 但被人们所了解的总数很少。据估计, 生物圈中真菌数量达百万种, 但目前被人类所鉴定的不超过 15 万 (种)^[1-4]。真菌是土壤生态系统的重要组成部分, 其在土壤中的活动 (如分解有机质、促进矿物质的转化、土壤污染修复等) 有利于农、林植物的健康生长、抵御干旱等逆境^[5-10]。分离和鉴定土壤真菌, 有助于深入了解其在维系土壤生态平衡和提供微生物资源等方面的作用和潜力。

特殊生境 (如盐碱土壤、沼泽湿地) 对真菌的类群有重要影响。长期生态适应, 真菌类群很可能变化较大^[2,5,8,11]。针对该地域的土壤, 筛选真菌具有重要意义。恩施地处鄂西南山地, 境内土壤多由灰质岩母岩风化而来^[12], 植物种类繁多, 其中马尾松分布较广。笔者采集湖北省恩施市龙洞河附近的马尾松根部土壤, 进行土壤真菌筛选, 获得了一株耐盐真菌, 并研究了其与植物的互作关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品。菌株筛选土样取自湖北省恩施市龙洞河附近的马尾松根部 5~8 cm 深的土壤。

1.1.2 培养基。菌株筛选采用马丁氏培养基: 磷酸二氢钾 1.0 g/L, 七水硫酸镁 0.5 g/L, 蛋白胨 5.0 g/L, 葡萄糖 10.0 g/L, 琼脂 20.0 g/L, NaCl 0~12%, pH 6.5; 条件生长试验采用马丁氏液体培养基; 大肠杆菌 DH5 α 培养采用 LB 培养基。

1.1.3 分子克隆试剂。TE buffer, 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0; PCR 扩增用 *Taq* (Promega), T₄ DNA ligase 与克隆载体 pMD18-T [TaKaRa (大连) 公司]; ddH₂O; 扩增引物 (江苏南京金斯瑞公司) (上游引物: GTAGTCATATGCTTGCT; 下游引物: CTTCCGTC AATTCCTT-TAAG)。

1.2 方法

1.2.1 土壤悬液制备与菌株筛选。90.0 mL 无菌水悬浮土样 10 g, 于 250 mL 三角烧瓶中, 150 r/min 振荡摇匀, 25 ℃ 培养 24 h; 按照 10⁻⁶ 至 10⁻¹ 梯度稀释培养后的土壤溶液, 取样品稀释液 0.1 mL 涂布于马丁氏培养基中 (含 NaCl 浓度分别为 2%、4%~12%), 28 ℃ 培养 2~3 d; 选取在含 4%~10% NaCl 的马丁氏培养基上生长的菌落, 划线分离单菌落, 对分离单菌落再次进行耐盐性鉴定。

1.2.2 耐受 NaCl 和 KCl 能力分析。将筛选出的 YSTEn005

基金项目 湖北民族学院博士启动基金项目 (4148013); 国家自然科学基金项目 (31360498)。

作者简介 毛慧芳 (1995—), 女, 河南驻马店人, 本科生, 专业: 生物工程。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事植物逆境生理学研究。

鸣谢 试验过程中得到湖北民族学院生物科学与技术学院张驰、郑小江、周志等教授的帮助, 谨此致谢。

收稿日期 2017-05-22

菌株用无菌水悬浮,点 1 μL 于含不同浓度 NaCl 和 KCl 的马丁氏固体培养基上,放入生化培养箱中培养 3 ~ 5 d。

1.2.3 条件生长试验。初始接种量保持相同,分别在不同温度(25、28、37 $^{\circ}\text{C}$)、pH(4.0 ~ 9.0)及含不同浓度的 NaCl(2% ~ 11%)等条件下振荡培养(200 r/min) YSTEn005,每隔 12 h 取样并检测 OD₆₀₀。

1.2.4 形态观察。取样品用生理盐水稀释,涂片后进行显微镜观察。

1.2.5 基因组 DNA 抽提。离心收集 3 mL 过夜培养的菌体,TE 溶液洗涤 2 次后,加入 200 μL TE 悬浮菌体,沸水浴 10 min,收集上清,异丙醇沉淀 DNA,并用 75% 乙醇洗涤 1 次后,晾干后加入 ddH₂O 溶解。

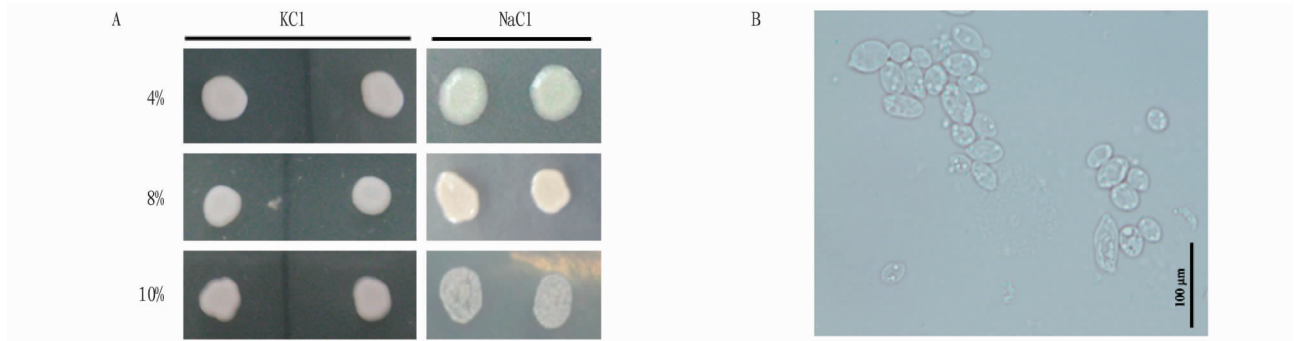
1.2.6 18S rDNA 克隆。以真菌基因组 DNA 为模板,采用真菌引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:引物(上、下游混合) 1 μL ,DNA 模板 3 μL ,*Taq* 酶 10 μL ,加入 6 μL 无菌水定容至 20 μL 。PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 32 个循环。

1.2.7 序列分析。序列测定由金斯瑞公司(南京)完成;NCBI 在线 Blast, DNAMAN 序列比对,使用 MEGA 6.0 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

1.2.8 菌-植共培养。培养无菌拟南芥幼苗,置于涂布有 YSTEn005(菌液浓度 OD₆₀₀ = 0.02)的 1/4 MS 培养基上,培养(22 $^{\circ}\text{C}$ 18 h 光照、20 $^{\circ}\text{C}$ 6 h 黑暗)3 d。

2 结果与分析

2.1 耐盐能力与菌体形态 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,挑取 19 个能够在 4% ~ 10% 盐生长的单菌落进行二次筛选,其中 1 株(命名为 YSTEn005)能够在较高盐浓度下生长。分别在含不同浓度的 KCl、NaCl 培养基上进行耐性鉴定,如图 1A 所示,该菌可在 4% ~ 10% KCl 条件下生长,并且菌斑大小无明显差异,表明 YSTEn005 可能对 K⁺ 不敏感;YSTEn005 可在 10% 的盐浓度下生长,但相较 4% NaCl 情况下,菌体生长明显变慢,表明 10% NaCl 浓度对 YSTEn005 细胞增殖抑制明显;使用油镜观察发现,该真菌是单细胞形态,菌体呈椭球体形,并且行出芽生殖(图 1B)。



注:A. 不同 KCl 和 NaCl 条件下培养 3 d;B. 油镜观察 YSTEn005 细胞形态

Note: A. Culture for 3 days with different contents of KCl and NaCl; B. The cell morphology of YSTEn005 under microscopy with oil lens

图 1 耐盐性能与细胞形态

Fig. 1 The tolerance to salt stress and cell morphology

2.2 条件生长试验结果 测定在不同温度、NaCl 浓度、pH 等条件下的细胞增殖情况。结果表明,YSTEn005 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下细胞增殖最快(图 2A);在 4% NaCl 浓度下菌体生长最快,其次是 2% NaCl(图 2B),表明液体培养条件下其最适的盐

浓度为 4%;其对 pH 的耐受范围较宽,可在 pH 为 4.0 ~ 9.0 的液体培养基中生长,但是在 pH 5.0 的条件下细胞增殖最快(图 2C)。

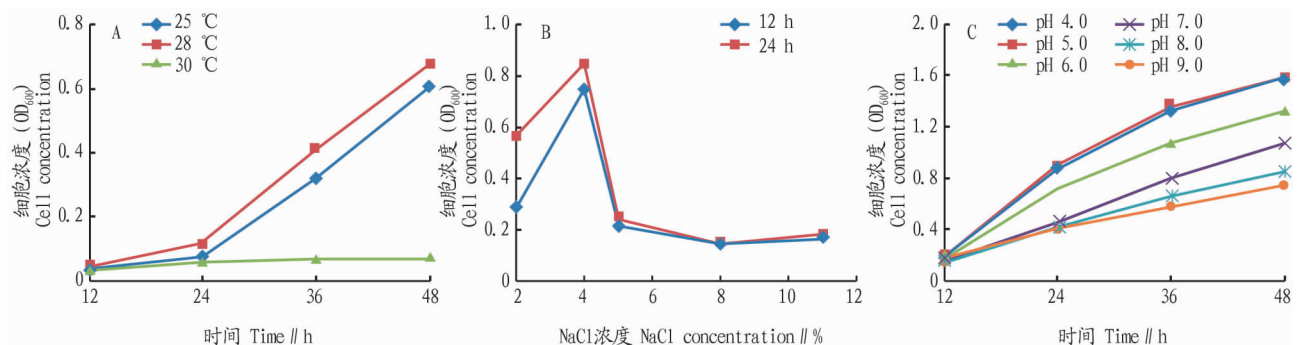


图 2 条件生长试验结果

Fig. 2 The result of growth test under restricted conditions

2.3 系统发育分析 扩增 18S rDNA,测序与 NCBI 在线 Blast 等序列分析,目标片段与汉逊德巴利酵母(*D. hansenii*)^[13-16](如 HQ717147)的 18S rDNA 序列相似性最高;构建

系统发育树,表明该耐盐菌 YSTEn005 来源于汉逊德巴利酵母属(图 3),其很可能是汉逊德巴利酵母的一个变种。

2.4 YSTEn005 与植物幼苗互作关系 采用平板共培养方

法研究 YSTEn005 和植物之间的互作关系,结果表明,在不添加盐分(NaCl)的平板上,相较于对照组(-N-Y),该菌增殖降低了植物的存活率,表明 YSTEn005 增殖对植物生长产生影响(图4, -N-Y, -N+Y);而在0.8% NaCl的条件下,有

YSTEn005 增殖的平板中幼苗存活率降低70%左右(图4, +N-Y, +N+Y)。YSTEn005 增殖情况下幼苗存活率锐减,表明该菌增殖显著加剧,植物在盐胁迫下死亡。

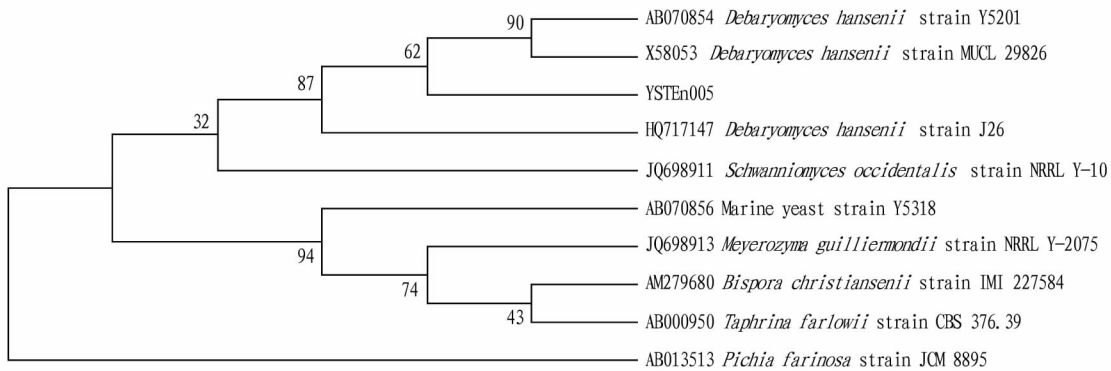
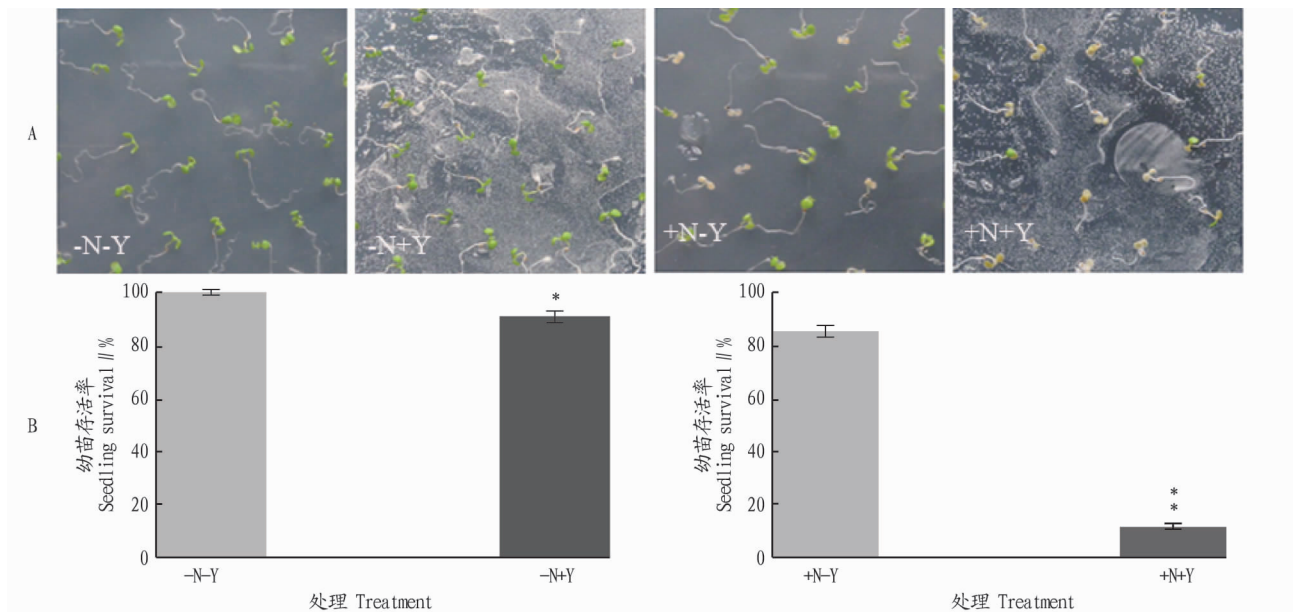


图3 系统发育分析

Fig.3 The phylogenetic analysis



注:A.培养14 d的幼苗;-N-Y.培养基中无NaCl,无菌;-N+Y.加入0.8% NaCl,有菌;+N-Y.加入0.8% NaCl,无菌;+N+Y.加入0.8% NaCl,有菌。B.“*”表示差异显著,“***”表示差异极显著(*t*检验, $n=40$)

Note:A. Growth of *Arabidopsis* seedlings in the medium with or without YSTEn005 (-Y/+Y) and with or without 0.8% NaCl added (-N/+N); B. “*” indicated significant variance by *t*-test, and “***” indicated very significant difference by *t* test ($n=40$)

图4 YSTEn005 与植物互作关系

Fig.4 The interaction between YSTEn005 and *Arabidopsis* seedlings

3 结论与讨论

马尾松在鄂西恩施地区分布较广,生长良好。本研究从恩施市龙洞河附近的马尾松根部土壤中分离出一株耐盐真菌 YSTEn005。显微观察、18S rDNA 序列分析及条件生长试验表明,YSTEn005 很可能是汉逊德巴利酵母的一个变种。汉逊德巴利酵母对高盐浓度胁迫具有自然的耐受性能,其耐受机制逐渐受到重视^[13-14,17],成为研究真核微生物细胞耐盐的重要模式种。另外,汉逊德巴利酵母潜在的生物技术应用能力受到关注,如特殊糖醇的发酵生产、果品保藏、废水处理等^[18-20]。

我国土壤盐碱化情况不容乐观,盐碱土壤的含盐量在

0.6%~10.0%,即对植物生产造成较大危害^[21-23]。该试验条件下,发现 YSTEn005 与拟南芥幼苗共培养,加剧了盐胁迫下幼苗的死亡。以上表明,该菌过度繁殖并未改善植物耐盐性能。可能是植物受到该菌的侵染,诱发植物凋亡。模拟土壤中该菌和植物互作关系,从而进一步研究实际条件下该菌的调节方式,将有助于揭示特殊生境中真菌对土壤生态系统的功能。

参考文献

- [1] HAWKSWORTH D L. Global species numbers of fungi: Are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? [J]. Biodiversity and conservation, 2012, 21(9): 2425-2433.

(下转第 187 页)

府因地制宜,相继放开糖、粮政策,优化农业发展模式,专注水产养殖^[14],因此,基塘用地面积也随之增加,相应的耕地面积有一定的减少。

2.2.4 政策因素。在我国,政策因素对区域的土地利用变化的响应最为明显,可成为土地利用变化的直接决定性因素。一直以来,中山市政府切实为人民生活谋福利,致力于生态环境保护,在城市生态规划建设方面位于中国城市的前列。1990—2013年中山市的经济高速发展,但其林地的覆盖率减少缓慢,所占的总土地利用面积的比例变化不大。这是因为中山市非常重视五桂山生态环境保护,鼓励农民种植经济林,加强生态建设,提高五桂山的森林覆盖率,保护其郁闭度,林地的景观结构较为稳定。2016年12月,深中通道项目正式动工,此工程建成后将成为珠江东西两岸重要的交通枢纽^[15]。机遇与挑战并存,中山市可借此推动产业结构升级、吸纳人才、实现珠三角区域经济一体化,但不可避免会改变土地利用结构,更多的耕地、基塘用地演变成建设用地,围海造陆,这给当地生态环境带来严峻的考验。

3 结论

该研究借助 ENVI、ArcGIS 等软件工具,分类解译中山市 1990、2000 和 2013 年 3 个时期的遥感影像数据,分析其土地利用变化过程,并利用转移矩阵方法,剖析各土地利用类型间的转换关系,得出中山市的土地利用的时空变化特征,进一步分析影响和制约土地利用的驱动因素。

1990—2013 年中山市土地利用类型在结构、数量和变化率上发生巨大变化,建设用地需求激增,耕地资源骤减。耕地下降达 40.96%,主要转出到建设用地和基塘用地。林地占有量稍有下降,变化不大。在空间分布上,增加的建设用

地主要由耕地和基塘用地转入,集中在靠近江门市区和佛山市顺德区的西北部地区、中山市城区周边地区以及靠近珠海市区的南部地区,西北部基塘用地的几何中心也逐步朝中西部、南部及东部转移,并在南朗镇沿海处出现大面积的鱼塘。人口增长、社会经济发展和政府政策等驱动是影响中山市土地利用变化的主要机制。

参考文献

- [1] 刘纪远. 国家资源环境遥感宏观调查与动态监测研究[J]. 遥感学报, 1997, 1(3): 225-230.
- [2] 刘志军, 方元, 刘卫芳. 中山市 1990~2007 年生态价值动态变化分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 13026-13027, 13080.
- [3] 许阳萍. 中山市土地利用/覆被变化对景观格局及生态安全的影响[D]. 广州: 广州大学, 2009.
- [4] 中山市人民政府办公室. 中山市自然地理[DB/OL]. [2017-02-11]. <http://www.zs.gov.cn/main/about/content/index.action?id=39165>.
- [5] 林媚珍, 冯荣光, 纪少婷. 中山市基塘农业模式演变及景观格局分析[J]. 广东农业科学, 2014, 41(24): 184-189.
- [6] 林媚珍, 葛志鹏, 纪少婷, 等. 中山市土地利用变化及其生态风险响应[J]. 生态科学, 2016(5): 96-104.
- [7] 朱会义, 李秀彬, 何书金, 等. 环渤海地区土地利用的时空变化分析[J]. 地理学报, 2001, 56(3): 253-260.
- [8] 程胜龙. 城市化对兰州气温变化影响的定量分析[J]. 气象, 2005, 31(6): 29-34.
- [9] 王秀兰. 土地利用/土地覆盖变化中的人口因素分析[J]. 资源科学, 2000, 22(3): 39-42.
- [10] 陈世清, 陈锡冰, 陈红跃, 等. 中山市自然保护区规划[J]. 中南林业调查规划, 2001, 20(6): 86-93.
- [11] 林晓东, 余启沃. 中山市地貌特征及发育过程[J]. 热带地理, 1989, 9(1): 39-47.
- [12] 杨爽, 冯晓明, 陈利顶. 土地利用变化的时空分异特征及驱动机制: 以北京市海淀区、延庆县为例[J]. 生态学报, 2009, 29(8): 4501-4511.
- [13] 刘坚, 黄贤金, 赵彩艳, 等. 江苏省城市化发展与土地利用程度变化相关性研究[J]. 水土保持研究, 2006, 13(2): 198-201.
- [14] 林媚珍, 许阳萍, 高玉玲, 等. 中山市近 18 年土地利用/覆被变化特征研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(29): 14279-14281.
- [15] 蓝志威, 吴旗韬, 周智勇. 深圳—中山跨珠江通道对珠江三角洲地区可达性的空间效应[J]. 热带地理, 2016, 36(6): 1019-1025.
- [16] PRISTA C, LOUREIRO-DIAS M C, MONTIEL V, et al. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*[J]. FEMS Yeast Res, 2005, 5(8): 693-701.
- [17] PRISTA C, MICHÁN C, MIRANDA I M, et al. The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts[J]. Yeast, 2016, 33(10): 523-533.
- [18] BREUER U, HARMS H. *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential[J]. Yeast, 2006, 23(6): 415-437.
- [19] AGGARWAL M, MONDAL A K. Role of N-terminal hydrophobic region in modulating the subcellular localization and enzyme activity of the bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*[J]. Eukaryot Cell, 2006, 5(2): 262-271.
- [20] 付物, 杨传平, 刘桂丰, 等. 酵母耐盐机制的研究进展[J]. 遗传, 2003, 25(6): 757-761.
- [21] 张丽丽, 廖德芳, 丁重阳, 等. 汉逊德巴利酵母发酵葡萄糖生产 D-阿拉伯糖醇[J]. 工业微生物, 2010, 40(4): 47-52.
- [22] SINGH D, SHARMA R R, SAMUEL D V K, et al. Enhancing the bio-efficacy of *Debaryomyces hansenii* with sodium salts for reducing the blue mould rot in apples[J]. Indian phytopathology, 2011, 62(4): 478-483.
- [23] 成细瑶, 杨波, 刘志刚, 等. 利用氨基酸废水发酵生产饲料用汉逊德巴利酵母的研究[J]. 饲料工业, 2014(S1): 102-105.
- [24] 赵百锁, 杨礼富, 宋蕾, 等. 中度嗜盐菌在生物技术中的应用[J]. 微生物学通报, 2009, 34(2): 359-362.
- [25] 周和平, 张立新, 禹锋, 等. 我国盐碱地改良技术综述及展望[J]. 现代农业科技, 2007(11): 159-161, 164.
- [26] 王多兵, 任伟, 张富春, 等. 盐穗木根际土壤中耐盐菌 B6 的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 957-960, 969.

(上接第 6 页)

- [2] O' BRIEN H E, PARRENT J L, JACKSON J A, et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples[J]. Appl Env Microbiol, 2005, 71(9): 5544-5550.
- [3] HAWKSWORTH D L. The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited[J]. Mycol Res, 2001, 105(12): 1422-1432.
- [4] HAWKSWORTH D L, ROSSMAN A Y. Where are all the undescribed fungi? [J]. Phytopathology, 1997, 87(9): 888-891.
- [5] ZEILINGER S, GUPTA V K, DAHMS T E S, et al. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants[J]. FEMS microbiology reviews, 2016, 40(2): 182-207.
- [6] HARDOIM P R, VAN OVERBEEK L S, BERG G, et al. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2015, 79(3): 293-320.
- [7] 梁昌聪, 肖艳萍, 赵之伟. 云南会泽废弃铅锌矿区植物丛枝菌根和深色有隔内生真菌研究[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(6): 811-817.
- [8] 张晶, 张惠文, 李新宇, 等. 土壤真菌多样性及分子生态学研究进展[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1957-1962.
- [9] 王芳, 图力古尔. 土壤真菌多样性研究进展[J]. 菌物研究, 2014, 12(3): 178-186.
- [10] PUSZTAHELYI T, HOLB I J, PÓCSI I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions[J]. Frontiers in plant science, 2015, 6: 573.
- [11] TRESEDER K K, LENNON J T. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2015, 79(2): 243-262.
- [12] 李明龙, 杨延安, 杨良策, 等. 湖北恩施州农业地质条件及工作方法探讨[J]. 资源环境与工程, 2014, 28(6): 915-918.