

## 一株耐盐植物内生真菌的筛选与鉴定

孙海彦<sup>1,2</sup>, 尹慧祥<sup>1,2</sup>, 陈惠琴<sup>1</sup>, 王琪<sup>1</sup>, Marilyn Roossinck<sup>3</sup>, Regina S Redman<sup>4</sup>, Rusty Rodriguez<sup>4</sup>,包晓东<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571011; 2. 海南省热带微生物资源重点实验室, 海南海口 571011;

3. 宾夕法尼亚州立大学, 美国 16802; 4. 华盛顿大学, 美国 98195)

**摘要** [目的]研究盐田原生态系统中的耐盐植物内生真菌。[方法]对38株从海南省莺歌海盐场和东方盐场分离的菌株进行耐盐生长测试。[结果]发现了1株在8%NaCl浓度下生长较好的真菌,并根据其形态特征,ITS扩增序列聚类进化树分析,显示其分类地位为黑酵母菌(*Hortaea werneckii*)。经过高效液相色谱分析其代谢产物,发现该真菌在0.2%、4%、8%NaCl浓度下的发酵产物均有所不同。[结论]盐田生境中存在特殊的植物内生真菌区系,其中黑酵母菌*Hortaea werneckii*具有一定代表性,有深入研究的价值。

**关键词** 盐田;黑酵母;聚类进化树;高效液相色谱

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)19-0108-03

## The Screening and Identification on an Endophytic Fungi of Halotolerant

SUN Hai-yan<sup>1,2</sup>, YIN Hui-xiang<sup>1,2</sup>, CHEN Hui-qin<sup>1</sup> et al (1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571011; 2. Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Haikou, Hainan 571011)

**Abstract** [Objective] To study the endophytic fungi of halotolerant in the original ecosystem of saltern. [Method] Salt stress tests were conducted on the endophytic fungi isolated from Yingehai Saltern and Dongfang Saltern in Hainan Province, to discover the halotolerant fungi among them. [Result] One isolate was further identified according to morphological and ITS sequence-based phylogenetic analyses, which suggested it belongs to *Hortaea werneckii*, a black yeast species, in taxonomy. The ferment substance under 0.2%, 4%, 8% of sodium chloride of this isolate was studied with HPLC finger printing approach, and differential metabolites according to salt concentrations were observed. [Conclusion] The solar salterns may be occupied by idiographic microflora of endophytes, included *Hortaea werneckii* observed in this study, which maybe representative of further studies.

**Key words** Saltern; Black yeast; Phylogenetic tree; HPLC

耐盐微生物是一种重要的微生物资源,不仅在生命起源、进化和生物适应极端环境等多方面具有重要的理论意义,而且在工农业生产、食品加工和环境污染治理等多个领域具有一定的应用价值。例如耐盐微生物菌可改良盐碱地,用于加工传统腌制食品和酱油,同时利用含耐盐微生物的活性污泥处理高盐废水会大幅度提高处理效率。

海南省西部地区气候干湿分明,夏季日照充足,蒸发量大,降雨少,适合盐田生产。除了历史上的洋浦千年古盐田,目前还有莺歌海盐场、东方盐场和榆亚盐场等大型日晒盐生产基地。盐场内的高盐环境,有利于形成独特的微生物区系<sup>[1]</sup>,笔者对前期从盐场分离出的植物内生真菌进行筛选,并对一株在8%盐浓度下生长较好的真菌进行分析和鉴定。

## 1 材料与方 法

**1.1 真菌菌株** 研究所用真菌内生菌株分离于海南省盐生环境中采集的活体植株。植物样本于2014—2015年从乐东市莺歌海盐场(18.52°N, 108.75°E)及东方市东方盐场(19.23°N, 108.64°E)采集获得。菌株经PDA分离纯化后置于甘油管中于-80℃保藏备用。

**1.2 嗜盐内生真菌的筛选** 将供试菌株从甘油管中取出后,在0.2倍浓度的葡萄糖马铃薯琼脂培养基(含有50 μg/mL 氨苄青霉素、50 μg/mL 链霉素及25 μg/mL 四环

素)上于室温下活化培养3~7 d,对新长出的真菌菌落,经显微镜检测与原菌株形态一致后,从平板上菌丝活跃生长的部位,取直径为6 mm的圆形琼脂块,分别接种于含0%、2%、4%、8%NaCl的PDA上室温培养,接种后连续5 d每24 h测量平板上的菌落直径。

**1.3 基因组DNA的提取、PCR扩增及序列分析** 将纯化后的菌株接种入葡萄糖马铃薯水培养基中,在室温下摇床培养数天后收集菌丝,冷冻干燥后在液氮中研磨冻干菌丝直至粉末状,称取50~100 mg,使用CTAB法提取总DNA<sup>[2]</sup>。使用Biometra TProfessional梯度PCR仪(Aanalytik Jena,德国)扩增ITS片段,所用引物为ITS5(5'-GGAAGTAAAGTCG-TAACAAAG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),50 μL反应体系中包含20 ng模板DNA,5 μL 10×PCR缓冲液,0.2 mmol/L dNTPs,ITS5及ITS4引物0.4 μmol/L,1 U TaKaRa Taq<sup>®</sup> DNA聚合酶(TaKaRa,日本);反应条件为95℃ 1 min;95℃ 30 s,56℃ 30 s及72℃ 1 min,30个循环;最后72℃延伸10 min。反应产物经过1.5%琼脂糖电泳验证后直接送至华大基因广州分公司进行测序。测序序列通过BioEdit<sup>[3]</sup>拼接后,在GenBank中使用Blast进行同源性搜索,随后下载同源性最高物种及其亲缘种ITS序列10条,与测序序列一并使用ClustalW进行比对,再通过jModelTest<sup>[4]</sup>选择核苷酸替换模型,导入PAUP<sup>[5]</sup>中以Maximum Likelihood方法构建系统进化树,并使用Bootstrap方法计算可靠性;另外使用MrBayes<sup>[6]</sup>独立分析进化树及后验概率,并与PAUP中的结果相互验证。

**1.4 菌液发酵及色谱分析** 取活化后的菌株接种于PDB

**基金项目** 海南省国际合作项目(KJHZ2015-21);国家木薯产业技术体系岗位科学家项目(CARS-11-HNSHY);中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630052016007, 1630052016008)。

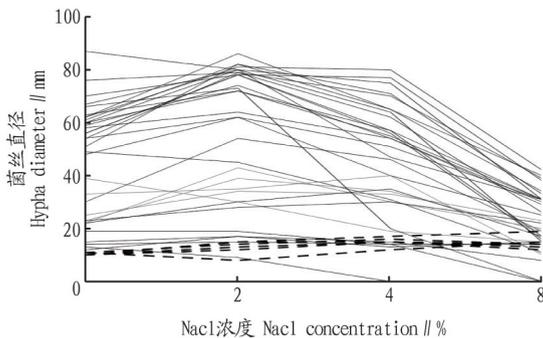
**作者简介** 孙海彦(1979—),女,河南三门峡人,博士,从事微生物发酵工程工作。\*通讯作者,博士,从事微生物资源与利用工作。

**收稿日期** 2018-03-26

液体培养基中,室温下振荡培养3 d 作为种子液,分别接种于盐浓度为0%、2%、4%、8%的大米固体培养基中,在室温下静置培养50 d。发酵结束后按前述方法进行提取和分离<sup>[7]</sup>。HPLC 条件:Kromasil-C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×150 mm,5 mm),流动相乙腈-水(体积比40:60),分析时间30 min,流速1.0 mL/min,进样量20 mL,检测波长254 nm,柱温为25℃。

## 2 结果与分析

**2.1 形态学特征** 在受试的38株真菌中,以菌落直径为指标,4株真菌在不添加NaCl的培养基上生长最好,25株真菌在2%NaCl浓度下生长速度最快,6株真菌在4%NaCl浓度下生长速度最快,2株真菌在8%NaCl浓度下生长速度最快,1株在各浓度NaCl下生长无明显差别(图1)。在4%和8%NaCl浓度条件下生长最好的8株真菌中,6株菌生长速度、菌落及菌丝形态接近,表现为生长速度缓慢,菌落正面呈灰黑色至黑色,菌落背面呈青黑色至黑色,显微镜下菌丝有分隔,呈淡灰至褐色,末端有深色芽生孢子,孢子大小为 $[5.2\sim 10.5(15.3)]\mu\text{m}\times(2.8\sim 4.5)\mu\text{m}$ ,其中尤以Lyc29菌株在8%NaCl浓度下生长速度最快,但菌落颜色较浅,菌丝疏松,提示NaCl浓度可能诱导其生理变化(图1,2)。



注: *Hortaea werneckii* 各菌株用粗虚线表示,其他菌株用连续线表示

Note: The strains of *Hortaea werneckii* are represented by a thick dotted line, other strains are represented by continuous lines

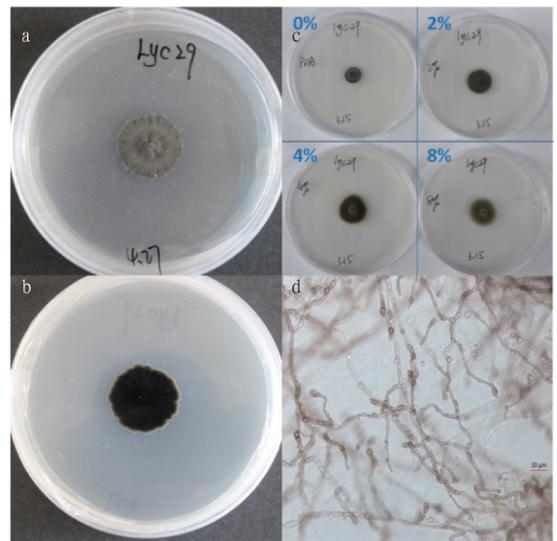
图1 受试真菌在不同NaCl浓度下的生长速度

Fig. 1 The growth speed of tested fungal isolate against different concentrations of NaCl

**2.2 聚类学分析** 将Lyc29和其他5株近似菌的ITS rDNA扩增片段通过Blast在GenBank中进行分析,发现与已知*Hortaea werneckii*的序列相似度最高,因此通过数据库下载*H. werneckii*、*H. thailandica*、*H. acidophila*及*Teratosphaeria hortaea*的ITS序列共10条,合并测序序列后,以*T. hortaea*及*H. acidophila*为外群构建进化树,发现Lyc29及其他5株此次分离的菌株(Fmq5、Fmq15、Fmq25、Fmq26、Fmq28)在进化树上与其他*H. werneckii*都位于同一高可靠性的分枝内(图3)。综合考虑形态学证据,Lyc29等菌株的分类学地位应属于*H. werneckii*。

**2.3 发酵产物的HPLC图谱** 利用HPLC指纹图谱分析不同NaCl浓度下Lyc29的发酵产物,发现NaCl浓度对*H. werneckii*的代谢产物具有较大影响,而当NaCl浓度达4%以后,

代谢产物的产生类型趋于稳定,其中最具代表性的如图4所示, $t = 12.1\text{ min}$ 的峰只在2%NaCl浓度发酵中产生, $t = 13.4\text{ min}$ 的峰只在4%NaCl浓度及更高浓度的发酵中产生。



注:a. 平板菌落正面;b. 平板菌落反面;c. 不同NaCl浓度下的菌落;d. 菌丝显微形态

Note:a. The front of plate colonies;b. The back of plate colonies;c. The colony under different NaCl concentrations;d. Hyphae microscopic morphology

图2 Lyc29菌株在PDA上的形态

Fig. 2 The morphology of isolate Lyc29 on PDA

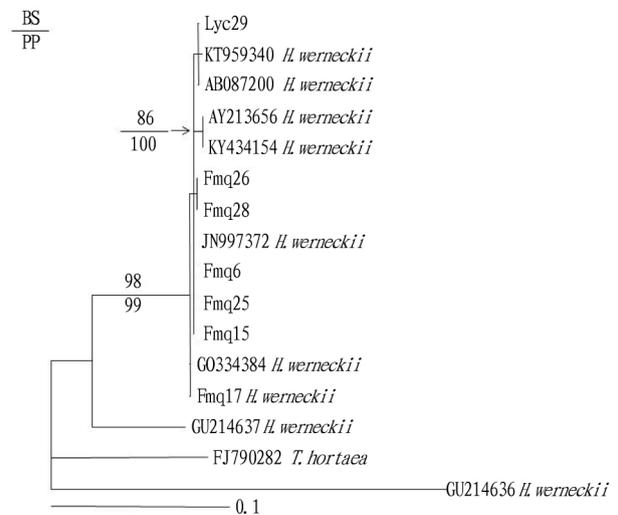


图3 菌株Lyc29的系统进化树

Fig. 3 A phylogenetic tree with isolate Lyc29

## 3 结论与讨论

该研究通过对前期在盐场分离的内生真菌进行耐盐筛选,发现了以菌株Lyc29为代表的一组在4%~8%NaCl浓度下生长较好的真菌,HPLC指纹图谱分析表明在该NaCl浓度下,Lyc29产生了与低盐条件下不同的代谢产物。经过形态学和以ITS序列为基础的进化树聚类分析,该株真菌的分类学地位应属于*H. werneckii*<sup>[8]</sup>。

目前有部分资料将*H. werneckii*错误地等同为威尼克外

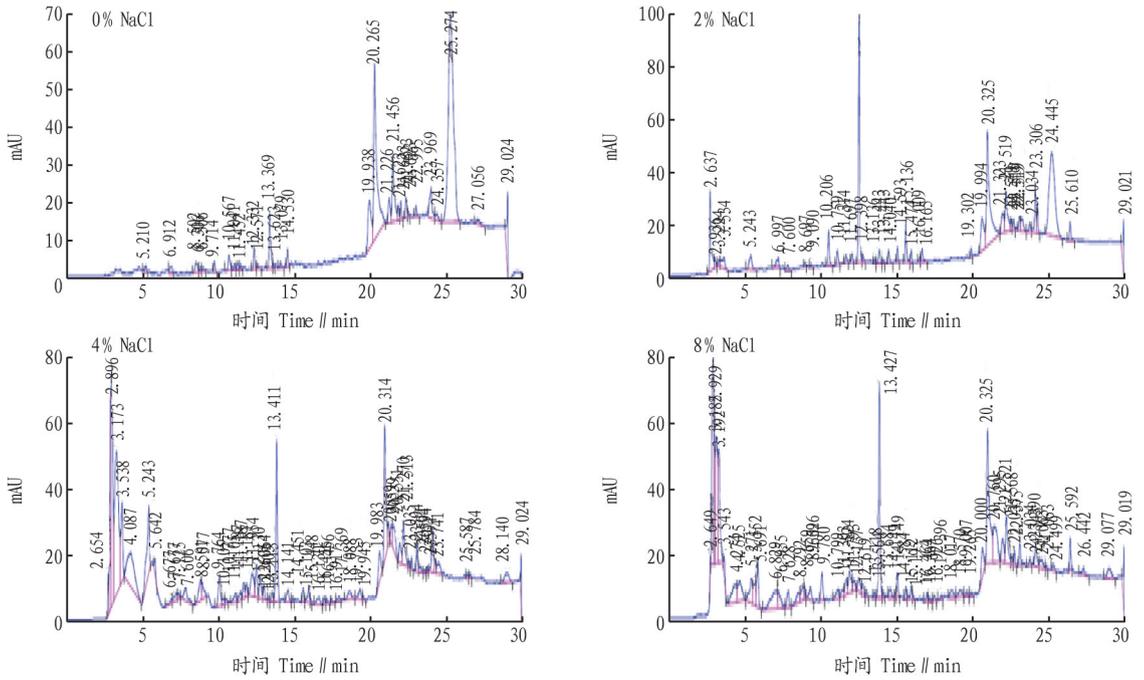


图4 菌株 Lyc29 的 HPLC 指纹图谱分析 (254 nm 检测)

Fig. 4 The HPLC finger printings from isolate Lyc29 (wavelength 254 nm)

瓶霉 (*Exophiala werneckii*), 可能是由于该菌形态上与外瓶霉属真菌接近, 但 *H. werneckii* 混合产生合轴孢子和环痕孢子, 而外瓶霉仅产生环痕孢子<sup>[9]</sup>。 *Hortaea* 属目前从属于座囊菌纲煤炱目, 而 *Exophiala* 属从属于刺盾炱纲刺盾炱目, 两者在 rDNA 序列上有较大的差异。因此该研究使用中国海洋微生物种保藏管理中心的中文译名, 即威尼克何德霉。

*H. werneckii* 属于一类在细胞内积累黑色素的酵母状真菌, 也称黑酵母。黑酵母在生长过程中除了产生酵母类细胞, 还可以产生真菌丝、假菌丝、念珠状菌丝等不同结构, 在较强的渗透胁迫下, 还可能形成可吸附酵母状细胞<sup>[10]</sup>。 *H. werneckii* 是黑酵母中研究较多的一种真菌, 除了作为人类和动物病原菌外, 也常在盐场等高盐环境下被发现, 在 10% NaCl 浓度范围以下, 其生长速度和甘油积累随盐浓度提高而提高<sup>[11]</sup>。随盐胁迫的增强, *H. werneckii* 细胞内不饱和脂肪酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等代谢产物积累亦会增加<sup>[12]</sup>。

Chen 等<sup>[13]</sup> 曾报道了 1 株自海南红树林植物桐花树上分离的 *H. werneckii* 内生真菌, 发现其最适生长 NaCl 浓度为 5%。该研究中的 6 株 *H. werneckii* 真菌, 4 株在 4% NaCl 浓度生长最快, 2 株在 8% NaCl 浓度下生长更好, 与 Chen 等的结果接近。黑酵母在盐田中广泛存在, 与酵母相比具有较独特的耐盐机制。 *H. werneckii* 作为研究微生物耐盐机制的模式物种, 在国外已有少量研究基础, 国内对黑酵母的研究非常有限, 该研究将有利于此领域后续工作的开展。

## 参考文献

- [1] ZAJC J, ZALAR P, PLEMENITAŠ A, et al. The mycobiota of the salterns [J]. *Prog Mol Subcell Biol*, 2012, 53: 133–158.
- [2] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15.
- [3] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98.
- [4] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, et al. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nat Methods*, 2012, 9 (8): 772.
- [5] SWOFFORD D L. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods) [M]. Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2000.
- [6] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754–755.
- [7] 陈惠琴, 朱剑梅, 王佩, 等. 红树植物角果木内生真菌 *Penicillium* sp. J54 的次生代谢产物研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(4): 341–345.
- [8] YURLOVA N A, DE HOOG S, VAN DEN ENDE B G. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera [J]. *Studies in mycology*, 1999, 43: 63–69.
- [9] NISHIMURA K, MIYAJI M. Further studies on the phylogenesis of the genus *Exophiala* and *Hortaea* [J]. *Mycopathologia*, 1985, 92: 101–109.
- [10] 李炳学, 李颖. 产黑色素酵母状真菌 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(11): 1791–1796.
- [11] PLEMENITAŠ A, GUNDE-CIMERMAN N. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* to high environmental salinity [M] // GUNDE-CIMERMAN N, OREN A, PLEMENITAŠ A. *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Dordrecht: Springer Verlag, 2005.
- [12] TURK M, MÉJANELLE L, ŠENTJURC M, et al. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi [J]. *Extremophiles*, 2004, 8(1): 53–61.
- [13] CHEN J, XING X K, ZHANG L C, et al. Identification of *Hortaea werneckii* isolated from mangrove plant *Aegiceras comiculatum* based on morphology and rDNA sequences [J]. *Mycopathologia*, 2012, 174: 457–466.