

分子生物学与形态学相结合鉴定盐生海芦笋内生真菌Salicorn 15

曹娜, 湛东锐, 李连强, 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: 从盐生海芦笋中分离出一株内生真菌(Salicorn 15), 采用分子生物学与形态学观察相结合对其鉴定。提取该菌的基因组DNA后分别对其18S rDNA和ITS区域进行PCR扩增并进行单克隆测序分析, 在NCBI上进行同源性分析, 进而构建系统发育树, 再结合形态学观察, 将菌株Salicorn 15鉴定为层出镰刀菌*Fusarium proliferatum*。

关键词: 海芦笋; 18S rDNA; ITS rDNA; 鉴定

Identification of Halophilic Endophytic Fungus Salicorn 15 Isolated from *Salicornia bigelovii* Using Molecular Biology Combined with Morphology

CAO Na, ZHAN Dong-rui, LI Lian-qiang, WANG Hui, LIU Tian-xing, XIN Zhi-hong*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: An endophytic fungus designated as Salicorn 15 was isolated from halophilic *Salicornia bigelovii* and identified by molecular biology techniques combined with morphological observation. Genomic DNA from Salicorn 15 was extracted and its 18S rDNA and ITS region were amplified by PCR and sequenced for sequence homology analysis using NCBI BLAST. Based on phylogenetic analysis combined with morphological observation, Salicorn 15 was identified as *Fusarium proliferatum*.

Key words: *Salicornia bigelovii*; 18S rDNA; ITS-rDNA; identification

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0180-04

海芦笋(*Salicornia bigelovii*)又称海蓬子、海鹿茸、海虫草、富贵菜等, 属于海蓬子属^[1]。海芦笋嫩茎口感脆嫩、天然咸味, 含多种人体必需的氨基酸、微量元素、维生素, 营养丰富^[2]。研究表明^[3], 海芦笋种子中油脂含量26%~33%, 蛋白质30%~33%, 超过了大豆和向日葵等。海芦笋油脂含有丰富的不饱和脂肪酸, 亚油酸含量高达74%, 亚麻酸含量2.5%, 还含有天然的植物碱和植物盐, 食用后与人体内的酸中和可降低血液的酸性, 并具有降血脂、降胆固醇、促进脂肪代谢和肝细胞再生的作用, 对冠心病、高血压等有药效作用^[4]。因此, 海芦笋极富开发价值和广阔的市场前景。

嗜盐菌(*Halophiles*)指在高盐条件下生长的极端微生物, 主要生长在海洋、盐湖、盐场以及腌制食品等高盐环境中, 特殊的生存环境使嗜盐菌在长期的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, 因此, 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^[5-6]有广泛的应用。嗜盐菌包括嗜盐古菌、嗜盐细菌^[7]和嗜盐真菌。目前, 有关嗜盐菌的研究, 大多集中在嗜盐古菌和嗜盐细菌的分类鉴定与应用方面, 对嗜盐真菌的研究相对较少。

本研究采用平板划线分离、斜面分离纯化技术从盐生海芦笋中分离得到一株编号为Salicorn 15的内生真菌, 通过18S rDNA和ITS rDNA序列分析, 在NCBI上进行序列比对和构建系统发育树, 并且结合传统的形态学观察对其进行分类鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌种来源与分离培养

菌株Salicorn 15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。菌株分离培养采用PDA

收稿日期: 2012-06-22

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项目

作者简介: 曹娜(1990—), 女, 本科生, 研究方向为生物工程。E-mail: 18409129@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

固体培养基, 配方为: 土豆200g/L、葡萄糖20g/L、琼脂20g/L、食盐30g/L, 自来水配制。在无菌操作下, 取一根野生海芦笋, 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, 无菌吸水纸干燥。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℃恒温培养至茎末端长出菌丝, 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, 备用。

1.2 仪器与设备

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; ECLIPSE TE2000-S荧光倒置显微镜 日本Nikon株式会社。

1.3 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, 记录生长速率。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。

1.4 菌株耐盐度实验

在真菌发酵用液体培养基(土豆200g/L、麦芽糖20g/L、甘露醇20g/L、葡萄糖10g/L、味精5g/L、蛋白胨5g/L、酵母膏3g/L, pH6.0)中分别添加3、6、9、12、15、18g/100mL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 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OMEGA真菌基因组试剂盒(Fungal DNA Kit 50)进行。称取40mg新鲜样品至2mL离心管, 加600μL FG1, 玻璃棒研磨4min; 加5μL 20mg/mL RNase, 以最大速率振荡1min, 65℃水浴20min; 加140μL FG2, 13000×g离心10min; 吸600μL上清液至1个新的2mL离心管, 加300μL FG3和600μL 无水乙醇, 振荡混匀; 将全部溶液移至HiBind DNA管, 10000×g离心1min, 弃废液。换一新2mL收集管, 加700μL DNA Wash Buffer(已加乙醇), 10000×g离心1min, 弃废液。将HiBind DNA管放入1.5mL离心管, 加50μL Elution Buffer, 室温放置5min, 10000×g离心1min, 收集DNA滤液。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℃环境下长期保存。

1.6 18S rDNA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反应条件为预

变性94℃、4min, 变性94℃、45s, 退火50℃、1min, 延伸72℃、1min45s, 共35个循环, 最后延伸72℃、10min^[8]。

1.7 ITS rDNA基因片段的PCR扩增

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'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'), PCR反应条件为预变性94℃、2min, 变性94℃、30s, 退火59℃、30s, 延伸72℃、90s, 共35个循环, 最后延伸72℃、7min^[9]。

1.8 18S rDNA序列克隆测序

采用TaKaRa 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。在-70℃保存的100μL感受态细胞*E.coli* DH5α中加入10μL连接产物, 冰中放置30min, 取出后42℃热激90s, 加入890μL LB液体培养基37℃振荡培养1h。菌液涂布于含氨苄青霉素AMP(100μg/mL)的LB培养基平板, 倒置过夜培养, 挑取白色单菌落培养。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 polymerase (5U/μL) 0.25μL。

1.9 ITS rDNA序列克隆测序

采用TaKaRa DNA提取试剂盒Ver3.0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。在-70℃保存的100μL感受态细胞*E.coli* DH5α中加入10μL连接产物, 冰中放置30min, 取出后42℃热激90s, 加入890μL LB液体培养基37℃振荡培养1h。菌液涂布于含氨苄青霉素AMP(100μg/mL)的LB培养基平板, 倒置过夜培养, 挑取白色单菌落培养。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 polymerase (5U/μL) 0.25μL。

1.10 目的DNA序列的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, 将18S rDNA基因序列在NCBI中进行BLAST比对, 下载不用菌属的菌株序列, 每个属选择1~2个具有代表性的菌株序列, 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。同理, 将ITS序列在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, 每个种选择2个具有代表性的菌株序列, 利用

ClustalX软件进行序列的多重比对, 利用MEGA5.0软件N-J方法构建系统发育树, 以*Alternaria alternata*为外类群, 自展数为1000。

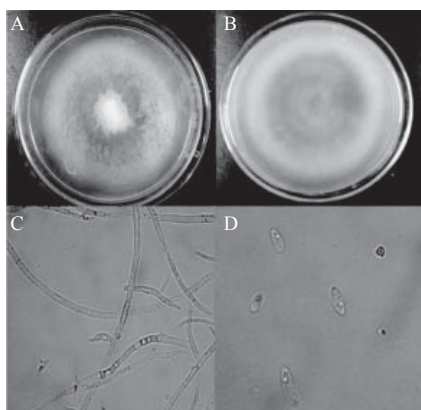
2 结果与分析

2.1 菌株的耐盐性

耐盐度实验结果显示菌株Salicorn 15在含有3~9g/100mL NaCl的液体培养基中生长良好, 在9~18g/100mL 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, 属于嗜盐真菌。

2.2 菌株的形态学鉴定

在28℃ PDA培养基中培养4~5d, 菌落直径为7.85cm, 菌落为白色絮状, 菌丝微泛粉色背面为橘黄色。气生菌丝发达, 后期可布满整个培养皿, 如图1A、B所示。由图1C、D可知, 在倒置显微镜下, 分生孢子梗无色且分枝, 大型分生孢子镰刀形, 腹背弯曲, 细长, 足跟明显, 3~5分隔, 多为3分隔。



A、B分别是在PDA培养基上28℃培养4d后的菌落正面形态和反面形态; C: 菌丝及分生孢子梗(×400); D: 分生孢子(×1000)。

图1 内生真菌Salicorn 15的菌落特征

Fig.1 Morphological characteristics of Salicorn 15

2.3 系统发育学分析

菌株Salicorn 15经PCR扩增获得的18S rDNA序列全长为1700bp左右, 如图2A所示, 在NCBI中进行BLAST比对, 该菌株18S序列与镰刀菌属(*Fusarium* spp.)的18S序列同源性最高, 相似性达99%。获得的菌株ITS序列全长为550bp左右, 如图2B所示, 在NCBI中进行BLAST比对, 该菌株ITS序列与*Fusarium proliferatum*的ITS序列同源性最高, 相似性达100%。根据18S rDNA序列和ITS序列分别构建系统发育树(图3), 因此, 通过18S rDNA和ITS序列所构建的系统发育树分析, 并与真菌鉴定手册^[10]标准菌株形态学对照, 最终将菌株Salicorn 15鉴定为层出镰刀菌(*F. proliferatum*)。

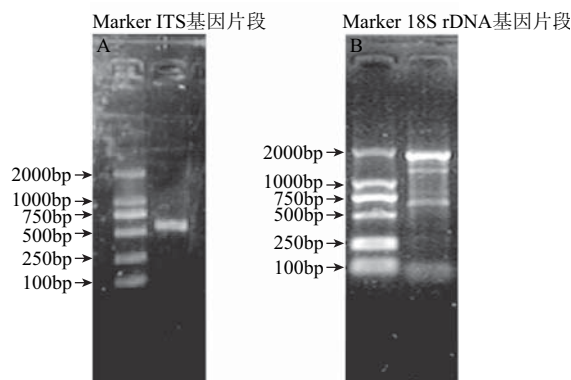


图2 ITS基因和18S rDNA基因片段扩增图谱

Fig.2 PCR amplified products of 18S rDNA and ITS

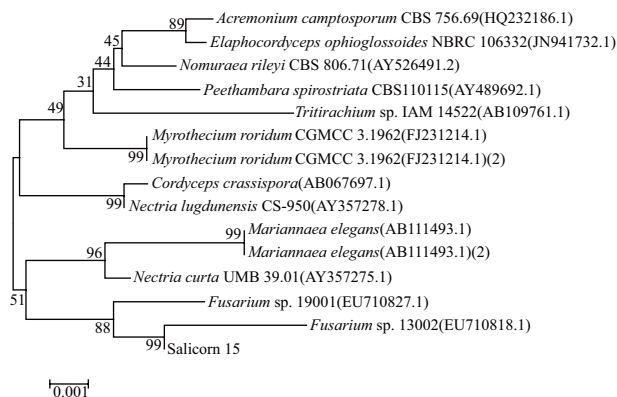


图3 基于18S rDNA基因序列构建的系统发育树

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

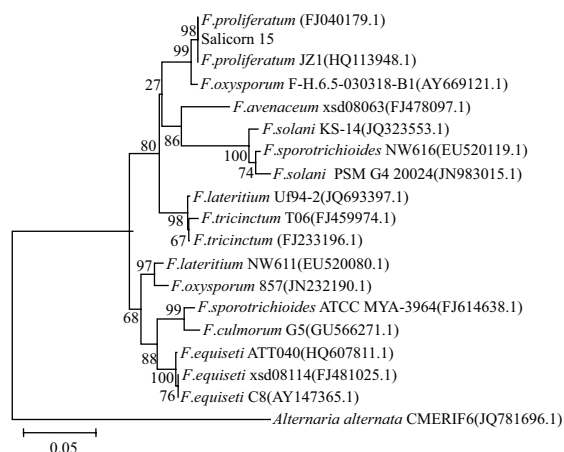


图4 基于ITS基因序列构建的系统发育树

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

3 讨论

真菌种类繁多, 形态复杂, 仅依靠形态、生化等表形特征来鉴定真菌既需要丰富的真菌鉴定工作经验又需

要较长的检验时间,尤其对于那些生长条件特殊、形态相似的菌株要通过传统的表型特征鉴定方法来加以鉴别显得非常困难。随着分子生物学的发展,通过提取真菌DNA基因组分别进行PCR扩增18S和ITS rDNA片段,基因测序并进行同源性分析,进而构建系统发育树,确定菌株的属种地位,成为现代真菌鉴定的快速有效方法。此方法相比于传统的形态学分析更加简便快捷,并且准确性高,目前已经广泛应用于真菌的属种间及部分种内菌群水平的系统研究^[11-12]。

目前,镰刀菌是土壤真菌中一类能引起植物和昆虫病害的病原菌,同时又是可利用的资源菌。镰刀菌在土壤、淡水、海水中广泛存在,可侵袭各种农作物、瓜果和蔬菜等,引起萎蔫病、腐烂病等。本实验分离鉴定的这株镰刀菌为层出镰刀菌(*F. proliferatum*),目前国内外关于层出镰刀菌的报道较少,国内主要集中在该菌对农作物的病害方面,常见如玉米^[13]、杨树^[14]、郁金香^[15]等病害,镰刀菌会引起玉米穗腐病、杨树湿心病、郁金香种球枯萎病等。国外研究主要集中在层出菌分泌的各种毒素和酶等方面^[16-17],据报道,层出镰刀菌(*F. proliferatum*)能够产生内酯酶,胞内和胞外均可产生,内酯酶可以很容易地与其他醇或胺等亲核试剂缩合形成多种羟基酯、羟基酰胺等衍生物,是重要的化工原料和医药中间体,在精细化工和制药行业有广泛用途^[18]。层出镰刀菌在发酵中,其发酵产物提取物有抑菌能力,不仅对多种常见植物病原真菌具有较强的抑菌活性,而且对多种植物病原细菌也有良好的抑制作用,表现为光谱抗菌的特点,有必要进行有针对性的深入研究,为了充分、合理利用植物资源,以及进一步开发新型抗菌剂提供依据^[19]。

总之,在玉米、郁金香、杨树等植物中均有相关层出镰刀菌的研究,但还未见有关盐生海芦笋中分离出层出镰刀菌的报道,今后将对该菌的致病性以及代谢产物的作用做进一步的分析与研究,更深入的了解盐生海芦笋中分离鉴定出的层出镰刀菌的相关特性和利用价值,同时,该株真菌也属于嗜盐真菌,迄今为止,源于盐生海芦笋的嗜盐真菌研究甚少,今后将对该菌株的发酵产物进行分离和鉴定,研究发酵产物的特性,并且进一步深入了解嗜盐真菌和蔬菜之间的关系及其所起的作用。

参考文献:

- [1] 周祥, 骆江兰, 蔡金龙, 等. 海芦笋的高效栽培技术[J]. 长江蔬菜, 2008(2): 27-28.
- [2] 陆东和, 张懋, 蔡金龙, 等. 海芦笋营养价值及其采后品质变化[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 303-305.
- [3] 蔡金龙, 骆江兰, 周祥, 等. 海芦笋的开发应用初探[J]. 现代农业科技, 2007(20): 66.
- [4] ANWAR F, BHANGER M I, NASIR M K, et al. Analytical characterization of *Salicornia bigelovii* seed oil cultivated in Pakistan[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(15): 4210-4214.
- [5] 吕爱军, 胡斌, 温洪宇, 等. 极端嗜盐菌的特性及其应用前景[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(2): 65-68.
- [6] 刘铁汉, 周培瑾. 嗜盐微生物[J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 232.
- [7] OREN A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms[J]. Environ Technol, 2010, 31(8/9): 825-834.
- [8] LIANG Xiaohui, CAI Yujie, LIAO Xiangru, et al. Isolation and identification of a new hypocrellin A-producing strain *Shiraia* sp. SUPER-H168[J]. Microbiol Res, 2009, 164(1): 9-17.
- [9] 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, 18(10): 1958-1961.
- [10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [11] IWEN P C, HINRICHS S H, RUPP M E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens[J]. Med Mycol, 2002, 40(1): 87-109.
- [12] 张志华, 洪葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(2): 39-43.
- [13] 卢维宏, 黄思良, 陶爱丽, 等. 玉米穗腐病样品中层出镰刀菌的分离与鉴定[J]. 植物保护学报, 2011, 38(3): 233-239.
- [14] 晁龙军, 孙福在. 引起杨树湿心材的一种病原真菌: *Fusarium proliferatum* (Matsushima)Nirenberg[J]. 林业科学, 1998, 34(5): 69-73.
- [15] 常瑾, 郭新军. 郁金香种球枯萎病研究[J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2011, 14(4): 17-20.
- [16] JURADO M, MARIN P, CALLEJAS C, et al. Genetic variability and Fumonisin production by *Fusarium proliferatum*[J]. Food Microbiol, 2010, 27(1): 50-57.
- [17] KOHUT G, ADAM A L, FAZEKAS B, et al. N-starvation stress induced FUM gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*[J]. Int J Food Microbiol, 2009, 130(1): 65-69.
- [18] 张仙, 潘江, 许建和. 内酯酶产生菌的筛选及其催化拆分手性内酯的性能[J]. 催化学报, 2008, 29(10): 997-1002.
- [19] 龙建友, 夏建荣. 玉兰植物内生真菌的分离筛选及活性菌株研究[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2011, 10(5): 38-42.