

徐闻牡丹珊瑚共附生真菌分离鉴定及多样性分析

雷晓凌, 李军, 肖胜蓝, 钟敏

(广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东普通高等学校水产品深加工重点实验室, 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524025)

摘要: 本文以牡丹珊瑚为原料, 选用 2 种培养基, 采用平板涂布法培养分离菌株, 对照真菌鉴定手册, 根据菌株的菌落大小、颜色、生长速率等菌落形态以及菌丝体和孢子的个体形态进行分离鉴定, 并根据 ITS-rRNA 基因序列特征进行分子鉴定, 依照测序结果建立系统发育树并进行种群多样性分析。结果显示从该样品中共分离到 10 株共附生真菌, 分属于 5 个属, 其中曲霉属有 3 株、肉座菌属有 3 株、有 2 株属于青霉属、1 株顶枝孢属及 1 株白腐菌属。说明曲霉属和肉座菌属是牡丹珊瑚上的优势菌属。牡丹珊瑚与其它种类珊瑚比较分离到的真菌数量较少, 但均匀度比较高。从牡丹珊瑚上分离到的肉座菌属和白腐菌属在海洋真菌的研究中未见报道。

关键词: 牡丹珊瑚; 内生真菌; 分离; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2013)8-1766-1769

Isolation and Identification of Endophytic Fungi Associated with *Pavona Lamarck* of Xuwen Natural Reserve

LEI Xiao-ling, LI Jun, XIAO Sheng-lan, ZHONG Min

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Key Laboratory of Advanced Processing of Aquatic Products of Guangdong Higher Education Institution, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: To study the diversity of fungi derived from *Pavona lamarck*, spread-plate method and two different media were used to cultivate and isolate the strains. The strains was identified from the colony morphology, the individual form of mycelium and spores referring to fungi identification manual. Molecule was identified according to the ITS-rRNA gene sequence features. Based on the result of sequencing, a phylogenetic tree was build for population diversity analysis. 10 symbiotic fungus were isolated from the *Pavona lamarck*, belonging to 5 generas including 3 *Aspergillus* spp., 3 *Hypocrea* spp., 2 *Penicillium* spp., 1 *Cladosporium* spp. and 1 *Phlebia* spp., indicating that *Aspergillus* and *Hypocrea* were the dominant fungi. Compared to other corals, the fungus isolated from *Pavona lamarck* were fewer, but had a high degree of uniformity. There was no report on marine fungus.

Key words: coral; associated fungi; isolation; phylogenetic analysis

珊瑚是海洋无脊椎动物, 属于腔肠动物门, 种类繁多, 约占海洋生物的 22.4%^[1]。珊瑚与其共附生微生物共同在海洋中进化几亿年, 它们之间形成了复杂的共生机制。这些微生物的存在对于珊瑚有重要意义。珊瑚上发现的微生物几乎覆盖了目前所有已报道的微生物种类。基于 DNA 序列分析的研究显示, 绝大多数的海洋微生物并未能获得纯培养, 因此从珊瑚上还有大量微生物有待发现。

近年对珊瑚研究主要围绕珊瑚疾病发生的微生物

收稿日期: 2013-04-26

基金项目: 广东海洋大学基金(E09095); 广东省科技计划项目(2010B020316008)

作者简介: 雷晓凌(1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物活性物质

因素, Shu-Fen Chiou^[2]等认为不同珊瑚上积聚的微生物菌群具有显著的不同, 在不同的地域采集到的同种珊瑚上也分布着不一样的菌群; Wang^[3]等从中国南海海域柳珊瑚上分离得到 53 株共附生真菌, 除常见种属外还分离到链格孢属、黑孢霉、及 *Nectria* sp. 等。另外珊瑚共附生的微生物菌株能够产生大量具有药用价值的天然活性物质, 具有抑菌、抗肿瘤等活性。这表明珊瑚共生真菌是开发新型药物的重要来源。

国内对珊瑚的研究主要集中在珊瑚活性物质的相关研究, 对珊瑚共附生真菌种群多样性的研究较少。徐闻珊瑚礁省级自然保护区是我国大陆架面积最大、品种最多、保护最完好的珊瑚礁区, 整个海区以石珊瑚种类最多, 占种数的 57%^[4]。鉴于徐闻珊瑚礁区水质、温度、溶解氧等理化因素适合珊瑚礁生长发育,

现生珊瑚礁中以滨珊瑚、块状蜂巢珊瑚、鹿角珊瑚、角蜂巢珊瑚、牡丹珊瑚等为主要优势种^[5]。本文为了了解珊瑚共附生真菌种群多样性,以广东徐闻国家级珊瑚礁保护区优势种之一牡丹珊瑚为研究对象,首次从牡丹珊瑚中分离其共附生真菌,再进行形态鉴定及分子鉴定,研究牡丹珊瑚上海洋真菌的多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

采集自湛江徐闻珊瑚自然保护区的滨珊瑚活体样本。水下采样,用镐子和铁锤取每种珊瑚样本取2~3块,水下装入封口袋中,以避免环境中的微生物污染。样品于冰盒中保存,24 h内送往实验室,于4℃保存。

样品鉴定:由本校水产学院海洋生物研究所鉴定:*Pavona Lamarck*。

1.1.2 培养基

马丁氏培养基 g/L: 蛋白胨 5 g, 酵母浸出粉 2 g, 葡萄糖 20 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 琼脂粉 14 g; PDA 培养基 g/L: 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂粉 15 g。以上培养基均用取自湛江东海岛的海水配制,海水放于阴凉处 2 d 备用。

1.2 珊瑚共附生真菌的分离及形态学鉴定

1.2.1 样品处理方法(珊瑚原料处理)

无菌海水快速清洗3次→用灭菌的剪刀、解剖刀、研磨棒在无菌操作台内将珊瑚样品磨碎,放入灭菌的研钵内研磨至浆状,灭菌的药匙取10 g左右于90 mL 无菌海水中→玻璃珠振荡3 min→静置20 min→取上清液制成多个梯度的稀释液^[6]

1.2.2 珊瑚共附生真菌分离、编号及保存真菌分离

吸取100 μL 各个样品中稀释度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的稀释液,用灭菌涂布棒均匀涂布到相应的分离培养基平板上,于28℃恒温培养箱培养3~5 d,直至肉眼能观察到真菌菌落,反复纯化3次。真菌保存:挑取菌丝转接到新鲜PDA琼脂平板上培养,待纯化后制成斜面于4℃保存。分离纯化菌种的编号为3-x,3为同批次采样的3号样品,x为分离菌株的编号。

1.2.3 珊瑚共附生真菌形态学观察

对分离所得菌株的菌落形态特征进行观察和记录。观察其菌落表面纹饰、大小、形态、高度、颜色等,借助显微镜观察菌丝的形态,孢子的有无、孢子囊、孢子梗、孢子器等的长短、形状、颜色等,结合真菌鉴定手册进行形态鉴定^[7]。

1.3 珊瑚共附生真菌的分子鉴定

1.3.1 真菌 DNA 提取和 ITS-rDNA 扩增

采用CTAB方法^[8]对纯化后的真菌菌株进行基因组DNA的提取。以提取的基因组DNA为模板,采用通用引物ITS1、ITS4^[9]对核糖体转录间隔区ITS进行PCR扩增,获得的PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测后,送上海英潍捷基(上海)有限公司进行序列测定。引物均由上海生工生物公司合成。

1.3.2 PCR 反应体系

选用25 μL反应体系。其中模板DNA 1 μL, ITS1 (10 μmol/L) 1 μL, ITS4 (10 μmol/L) 1 μL, Master Mix 12.5 μL, 补充ddH₂O至25 μL。Master Mix^[10]购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3.3 PCR 反应条件

94℃变性5 min; 94℃变性50 s, 58℃退火50 s, 72℃延伸60 s, 循环30次; 最后72℃延伸10 min。扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测, TAE为电泳缓冲液, 上样4 μL。将测序得到的ITS序列提交到GenBank核酸序列数据库并得到登录号,应用BLAST程序对所测得的内生真菌ITS序列进行相似性比对。采用软件ClustalX 2.0进行多序列的比较, 比对结果采用MEGA 5.0软件进行系统进化树的构建。

1.3.4 种群多样性分析

将测定得到的ITS-rDNA基因序列与GenBank数据库中的序列进行比对分析, 同源性大于97%的定义为同一分类单元, 以Shannon-wiener指数(H), Pielou均匀度指数(E), 作为计算多样性的标准。其中

$$H = -\sum_{i=1}^n P_i \ln P_i$$

$$\text{其中 } P_i = N_i / N$$

$$E = H / H_{\max}$$

注: H为实际求得的物种多样性指数, P_i 是第*i*种的多度比例, 可以用 $P_i = N_i / N$ 求出, N_i 是每一个属中的菌株数, N 是每个样品中菌株总数; H_{\max} 为最大的物种多样性指数, $H_{\max} = \ln S$, S 为群落中的总物种数。

2 结果与分析

2.1 徐闻牡丹珊瑚共附生真菌的鉴定

2.1.1 形态学鉴定

本试验用2种培养基从牡丹珊瑚样品上共分离到10株珊瑚共附生真菌, 其中在PDA培养基上分离得到6株, 在Martin培养基上分离得到4株。分离的真菌经显微镜下观察真菌的形态结构, 发现牡丹珊瑚样

品上分布有 2 株青霉属、3 株曲霉属和 3 株肉座菌属，说明曲霉属和肉座菌属是牡丹珊瑚上的优势菌属。

2.1.2 分子生物学鉴定

(1) 利用 ITS 通用引物 ITS1F 和 ITS4 经 PCR 分别从珊瑚共附生真菌基因组 DNA, 得到长约 600 bp 的单一 PCR 片段, 扩增结果可见电泳图(图 1), 对纯化的 PCR 产物进行 DNA 测序分析。将 ITS 序列提交到 GenBank 数据库, 登录号为 JQ717351-JQ717360, 并进行 BLAST 检索, 都能找到相似度达到 97% 的匹配序列, 调取同源性较高的数据, 用 ClustalX 软件进行多序列对比并进行人工校正, 运用软件 MEGA 5.0 按照 N-J 法聚类构建系统发育树 (图 2)。

表 1 牡丹珊瑚分离出的 10 株独立菌株 ITS-rDNA 序列与其最相似菌序列信息

Table 1 Phylogenetic information of ITS -rDNA of 10 independent isolates from *Pavona Lamarck*

登录号	菌株编号	相关种属 BLAST	Cover Score	Similarity %
JQ717351	C3-1	<i>Hypocreaceae sp.</i>	1000	94 100%
JQ717360	C3-2	<i>Phlebia sp.</i>	1022	99 100%
JQ717354	C3-3	<i>Aspergillus sp.</i>	989	100 100%
JQ717357	C3-4	<i>Aspergillus sp.</i>	1020	100 99%
JQ717352	C3-5	<i>Hypocreaceae sp.</i>	798	96 99%
JQ717353	C3-6	<i>Penicillium spinulosum</i>	1057	100 99%
JQ717355	C3-7	<i>Aspergillus sp.</i>	1026	100 100%
JQ717356	C3-8	<i>Penicillium spinulosum</i>	1014	99 99%
JQ717359	C3-9	<i>Acremonium sp.</i>	1037	99 99%
JQ717358	C3-10	<i>Hypocreaceae sp.</i>	798	96 99%

(2) ITS 扩增产物电泳图谱

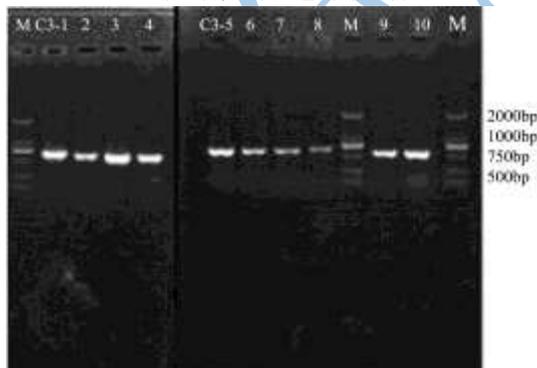


图 1 牡丹珊瑚 1-10 号菌株的 ITS 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of ITS amplified products of isolates from *Pavona Lamarck*

注:泳道编号代表菌株编号, M 代表 DL2000 DNA Marker。

2.2 徐闻牡丹珊瑚共附生真菌的多样性分析

图 2 为牡丹珊瑚共附生真菌系统发育树, 聚为 5

大类。Hypocreaceae 属中, XC23-10、XC23-5 聚为一类, 与 AF502849、EF694655 及 GU055997 的支持率高于 70%, 认为这两株菌属于 Hypocreaceae sp, 但是同源性在 86~91%之间, 需要通过进一步研究确定其种分类单位; 3-4 和 3-1 聚在一起, 与 DQ682584 一个 99%的末端形成聚类, 同源性在 66~99%之间, 也需要进一步确定种分类单位, 在 Hypocreaceae 属中可能有新的种级别的分支。Penicillium 属中 3-8 与 GU980968 支持率为 100%, 3-7 与 HE08807 支持率为 100%; 3-2 与 AB210077 支持率为 99%, 3-6 与 3-2 聚为一类, 支持率为 98%, 将这两株菌鉴定为 *Phlebia sp.*

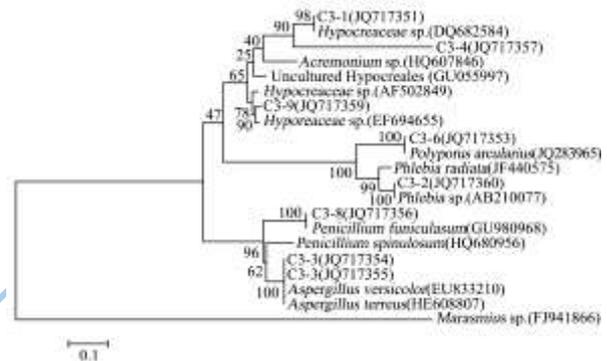


图 2 牡丹珊瑚共附生真菌系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of partial ITS -rDNA sequences of fungal strains from *Pavona Lamarck*

表 2 牡丹珊瑚种群多样性

Table 2 Diversity parameter of fungi associated with three geogonian saples

样品序号	样品名称	H	H _{max}	E
03	牡丹珊瑚 <i>Pavona Lamarck</i>	1.504	1.609	0.935

根据多样性指数的比较 (表 2), 牡丹珊瑚共附生真菌多样性指数为 1.504, 均匀度指数为 0.9781。徐佳^[11]等研究从生盔型珊瑚共附生真菌多样性指数为 2.4258, 均匀度指数为 0.9781。将牡丹珊瑚与本课题组取得珊瑚样品比较, 牡丹珊瑚样品上菌株种类较少, 但菌体的个体数在某些种属上并无大量富集的现象, 因此均匀度比较高。

3 结论

3.1 在本研究中牡丹珊瑚样品上分离的共附生真菌种类虽少, 较为特殊, 其中肉座菌属 *Hypocreaceae sp.* 和白腐菌属 *Phlebia sp.* 在海洋真菌的研究中未见报道, 而 *Phlebia sp.* 多分离自腐木、老树皮^[12]等。这表明同种珊瑚上真菌种类既有相同也存在显著不同。目前研究的海洋真菌中发现大部分海洋真菌均可从陆地发现, 从 2007 年 Toledo-hernandez^[13]等研究柳珊瑚真

菌多样性的实验中共分离得到 14 株菌,分属于 7 个属,多数为青霉属和曲霉属,并发现一株新种。本研究中也分离到 3 株曲霉和 2 株青霉,这表明牡丹珊瑚上存在常见的海洋真菌。Koh^[14]等研究了新加坡附近柳珊瑚真菌多样性,青霉属、曲霉属、枝孢属和木霉属最为常见,还有少量白色念珠菌 *Tritirachium* sp.、粘鞭霉属 *Gliomastix* sp. 和齿梗孢属 *Scolecobasidium* sp.。本研究中没有分离到木霉属、白色念珠菌等,这表明牡丹珊瑚上分离的真菌种类较为特殊。

3.2 牡丹珊瑚共附生真菌多样性指数为 1.504,均匀度指数为 0.9781。徐佳^[11]等研究丛生盔型珊瑚共附生真菌多样性指数为 2.4258,均匀度指数为 0.9781。通过比较表明牡丹珊瑚样品上菌株种类不及已报道的珊瑚样品上的菌株种类,但菌体的个体数在某些种属上并无大量富集的现象,因此均匀度比较高。

参考文献

- [1] 滕宪存,庄以彬,王义,等.花刺柳珊瑚共生真菌 *Penicillium* sp. gx wz406 的次生代谢产物研究[J].中国海洋药物杂志, 2010,8(29):11-13
Teng X C, Zhuang Y B, Wang Y. Secondary Metabolites from *Penicillium* sp. gxwz406 Symbiotic with the Gorgonian *Echinogorgia flora* [J]. Chin J Mar Drugs, 2010, 8(29): 11-13
- [2] Shu-Fen Chiou, Jimmy Kuo, Tit-Yee Wong. Analysis of the coral associated bacterial community structures in healthy and diseased corals from off-shore of southern Taiwan [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2010, 45(5):408-415
- [3] Ya-Nan Wang, Chang-Lun Shao, Cai-Juan Zheng. Diversity and Antibacterial Activities of Fungi Derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea [J]. Marine Drugs, 2011, 9, 1379-1390
- [4] 黄晖,练健生,王华接,等.徐闻珊瑚礁及其生物多样性[M].北京:海洋出版社,2007
Huang H, Lian J S, Wang H J. Coral and Biodiversity of Xuwen [M]. Beijing: Ocean Press, 2007
- [5] 刘苗苗,沈建伟,王月,等.雷州半岛徐闻西岸珊瑚岸礁造礁珊瑚群落结构及其演变[Q].海洋地质与第四纪地质, 2011, 6
Liu M M, Shen J W, Wang Y. Structure and Succession of Scleractinia Coral Communities Along the West Seashore of Xuwen County, Leizhou Bandao [Q]. Marine Geology and Quaternary Geology, 2011, 06
- [6] 钱存柔,黄仪秀.微生物学实验[M].北京大学出版社,1985
Qian C R, Huang Y X. Microbiology Experiment Course [M]. The Peking University Publishing House, 1985
- [7] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979
Wei J C. Identification of Fungi [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979
- [8] 殷明亮.湛江红树林滩涂真菌群落的分离鉴定和资源调查研究[D].湛江,广东海洋大学,2010
Yin M L. Study on Identification and Resource Investigation Research of Mangrove Fungus from Zhanjiang [D]. Zhanjiang, Guangdong Ocean University, 2010.
- [9] GARDES M, BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. Molecular Ecology, 1993, 2: 113-118
- [10] 周康,张霞,张凤丽,等.中国南海海绵共附生真菌种群多样性及抑菌活性[J].中国海洋药物杂志,2011,8(30):7-11
Zhou K, Zhang X, Zhang F L. Community Diversity and Antimicrobia Activity of Fungi Associated with the South China Sea Sponges [J]. Chin J Mar Drugs, 2011, 8(30): 7-11
- [11] 徐佳,陈彬,雷晓凌,等.丛生盔形珊瑚共附生可培养真菌多样性分析[J].微生物学通报,2011, 38(8): 1193-1198
Xu J, Chen B, Lei X L, et al. Phylogenetic Diversity Analysis of Cultures Symbiotic Fungi of *Galaxea fascicularis* L. [J]. Microbiology China., 2011, 38(8): 1193-1198
- [12] N Arhipova, T Gaitnieks, J Donis. Butt rot incidence, causal fungi, and related yield loss in *Picea abies* stands of Latvia [J]. Canadian Journal of Forest Research, 2011, 41(12): 2337-2345
- [13] C Toledo-Hernández, A Bones-González, O E Ortiz-Vázquez, et al. Fungi in the sea fan *Gorgonia ventalina*: diversity and sampling strategies [J]. Coral Reefs, 2007, 26(3): 725-730
- [14] L L Koh, T K Tan, L M Chou. Fungi associated with gorgonians in Singapore [A]. Proceedings 9Th International Coral Reef Symposium [C]. Bali, 2000, 10: 23-27