

丛生盔形珊瑚共附生可培养真菌多样性分析

徐佳¹ 陈彬^{2,3} 雷晓凌^{1*} 余志刚² 肖碧红¹

(1. 广东海洋大学 食品科技学院 广东 湛江 524025)

(2. 中山大学 化学与化学工程学院 广东 广州 510275)

(3. 西藏高原生物研究所 西藏 拉萨 850001)

摘要: 旨在研究珊瑚共附生可培养真菌多样性。运用稀释平板法和基于 ITS-rDNA 基因序列的系统发育分析对珊瑚共附生可培养真菌多样性进行研究, 将所得到的基因序列与 NCBI 数据库 GenBank 中的序列进行相似性比较并构建系统发育树。实验中从丛生盔形珊瑚表面和内部共分离得到 19 株菌落形态各异的真菌。ITS-rDNA 序列分析及形态学鉴定表明, 丛生盔形珊瑚共附生真菌主要包括曲霉菌 *Aspergillus* sp.、枝孢霉菌 *Cladosporium* sp.、炭角菌 *Xylariales* sp.、青霉菌 *Penicillium* sp.、葡萄穗霉菌 *Stachybotrys* sp.、赤霉菌 *Gibberella moniliformis*、镰刀霉菌 *Fusarium* sp. 等。分离得到的菌株中, 4-13 与 GenBank 中已报道的基因序列的相似性仅为 89%。结果表明, 与丛生盔形珊瑚共附生的可培养真菌较为丰富, 是潜在的新的微生物菌种资源, 具有进一步研究的价值。

关键词: 丛生盔形珊瑚, 共附生, 可培养, 多样性, 系统发育分析

Phylogenetic diversity analysis of cultured symbiotic fungi of *Galaxea fascicularis* L.

XU Jia¹ CHEN Bin^{2,3} LEI Xiao-Ling^{1*} SHE Zhi-Gang² XIAO Bi-Hong¹

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

(2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

(3. Tibetan Plateau Institute of Biology, Lhasa, Tibet 850001, China)

Abstract: To study the diversity of cultured symbiotic fungi isolated from *Galaxea fascicularis* L. in the South China Sea. By dilution plate technique and ITS-rDNA sequence analysis to research the diversity of the cultured symbiotic fungi with the coral, determined sequences data were submitted to GenBank and compared with those known sequences. Phylogenetic tree were built up with MEGA 4.0 program. 19 different morphological strains were isolated from surface and inner of the coral *Galaxea fascicularis*. ITS-rDNA sequences analysis showed that, symbiosis cultured fungi mainly included *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Xylariales* sp., *Penicillium* sp., *Stachybotrys* sp., *Gibberella monili-*

基金项目: 广东海洋大学基金项目(No. E09095)

* 通讯作者: Tel: 86-759-2362247; 邮箱: leixl-19@126.com

收稿日期: 2010-12-15; 接受日期: 2011-04-06

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

formis, *Fusarium* sp. etc. The similarity of strain 4-13 sequence to the most closely related sequences in GenBank was only 89%. It is concluded that there are diverse fungal symbionts with coral *Galaxea fascicularis*, which have potential new microorganism resources, deserved for further study.

Keywords: *Galaxea fascicularis*, Fungal symbionts, Cultured, Diversity, Phylogenetic analysis

珊瑚上共附着大量微生物,生物多样性极丰富^[1-2]。与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^[3]。Groweiss 等从八放珊瑚的一个新品系中分离到 6 种新结构化合物 Solenolides A-F, 对鼻病毒、脊髓灰质炎病毒 III、疱疹病毒等有不同抑制效果^[4]。Romero F. 从柳珊瑚 *Pacifigorgia* sp. 表面分离的一株链霉菌能产生寡霉素-A 的 20-羟衍生物、肠菌素的 5-脱氧衍生物、以及两种全新的细菌化合物 Octalactins A 和 B, 又从软珊瑚上生长的一株小孢囊菌属新种的培养物中发现抗肿瘤的新缩肽物质 Thiocoraline^[5]。通过对珊瑚共附生微生物大规模培养可以生产出大量药物原料。目前对珊瑚共附生微生物的研究中,共附生真菌还鲜有报道。因此研究珊瑚微生物的多样性,以期能够获得微生物新种属,得到产生活性物质的菌株。本试验以广东省湛江徐闻地区珊瑚自然保护区丛生盔形珊瑚(*Galaxea fascicularis* L.)为研究对象^[6],采用多种培养基配方,分离其共附生真菌,并根据 ITS-rRNA 基因序列特征进行鉴定和系统发育分析,以获得珊瑚共附生可培养真菌多样性信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 珊瑚活体样本采集自湛江徐闻珊瑚自然保护区。水下采样,用镐子和铁锤分不同部位取 4 块,每块大概 2-4 cm²。水下装入封口袋中,避免被空气环境中的微生物污染。置于冰盒中保存 24 h 内送往实验室,于 4 °C 保存^[7-8]。

1.1.2 培养基: 选用 5 种分离培养基,分别是麦芽膏培养基、淀粉培养基、CDA 培养基、马丁氏培养基、PDA 培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器: 真菌 DNA 提取试剂盒,

Omega; *rTaq* 酶, TaKaRa; dNTP, TaKaRa; 凝胶电泳琼脂糖, 西班牙 Biowest; λ DNA/*Hind* III Marker (50 次), DL2000 DNA Marker, Tiangen。

电泳仪, 北京六一仪器厂。凝胶成像分析仪, 美国 Alpha Innotech; 温度梯度 PCR 仪, SensoQuest LabCycler, Seno, 德国; 低温高速离心机, Sigma。

1.2 珊瑚共附生微生物分离和计数

将珊瑚样品用灭过菌的研钵和研杵在室温无菌环境条件下研磨至泥浆状,采用稀释涂布平板法^[9],以稀释度为 10⁻²、10⁻³ 的珊瑚稀释液涂布平板分离珊瑚共附生真菌,每一处理设 3 个平行,涂布后置 25 °C 温箱内培养,4 d 后,对长出的菌落进行统计、编号、分离、纯化、保存。将纯化菌株接种 PDA 固体培养基上,每隔 24 h 观察菌落形态、颜色、培养基颜色,用载玻片培养法^[10]观察产孢结构和分生孢子形态。

1.3 ITS-rDNA 的扩增

1.3.1 DNA 提取: 在无菌条件下将菌株转接到 1.5 mL 大试管中,放入摇床 180 r/min 28 °C 培养 3 d 至对数生长期,用真菌 DNA 提取试剂盒按操作说明严格操作,提取菌株的基因组。

1.3.2 扩增 ITS-rDNA 的引物: ITS1F: 5'-CTTG GTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; ITS4: 5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'^[11]。引物均由英潍捷基(上海)有限公司合成。

1.3.3 ITS-rDNA 扩增: 采用 50 μ L 反应体系,反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 52 °C 50 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

1.4 ITS-rDNA 序列分析

PCR 扩增产物经纯化后,送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。所有的序列均已上传到 GenBank,登录号为 HQ316558-HQ316575 及 HQ428123。在 NCBI 网站上通过在线比对引擎 BLAST,将测得的基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对分

析, 并从数据库获得最相近的典型菌株的基因序列, 用 ClustalX 按照最大同源性的原则进行排序, 应用 MEGA 4.0 软件, 采用 Kimura2^[12]计算核苷酸差异值, 并用 Neighbor-Joining^[13]法构建系统进化树, 自展数(Bootstrap)为 1 000。

1.5 种群多样性分析

定义 ITS-rDNA 序列同源性大于 97% 作为同一分类单元^[14], 采用 Shannon-Wiener 指数(H), 均匀度指数(E), 计算多样性^[15]。

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$E = H / \ln S \quad (2)$$

式中 S 为分类单元, P_i 是第 i 种的多度比例, 可以用 $P_i = n_i / N$ 求出。 n_i 是第 i 个分类单元的菌株数, $N = \sum n_i$, N 是所有菌株数总和。

2 结果与分析

2.1 丛生盔形珊瑚共附生的真菌

对分离培养基上培养 4–10 d 长出的真菌首先进行宏观形态的观察, 相同培养基上宏观形态类似的真菌再进行微观形态观察。微观形态也相似的菌则作为重复的菌株进行排除。统计不同培养基来源菌株数情况如表 1 所示。

表 1 5 种培养基分离得到的菌株数量及所占比例
Table 1 Quantity and percentages of fungi from 5 culture mediums

培养基名称 Name of media	分离得到的菌株 Isolated strains	菌株数 Number of isolates	比例 Percentage (%)
马铃薯培养基 PDA medium	4-1, 4-2, 4-3, 4-6, 4-9	5	26.3
麦芽膏培养基 Malt extract medium	4-22	1	5.2
查氏培养基 CDA medium	4-5, 4-4, 4-16	3	15.7
马丁氏培养基 Martin medium	4-7, 4-13, 4-21	3	15.7
淀粉培养基 Starch medium	4-8, 4-10, 4-11, 4-12, 4-17, 4-19, 4-20	7	36.8

从表 1 看出, 淀粉培养基分离得到的菌株最多, 达到了 7 株; 其次是 PDA 培养基, 为 5 株; 马丁氏培养基和 CDA 培养基次之, 均为 3 株; 麦芽膏培养基 1 株, 分离出菌株的种类最少, 但却也是其它 4

种培养基未能分离出的, 这表明在实验中选用的 5 种培养基较好地实现了营养组分互为补充以分离更多种真菌。

2.2 丛生盔形珊瑚共附生真菌的多样性分析

对 19 株菌进行了 ITS-rDNA 序列测定, 将获得的序列通过在线比对引擎 BLAST 与 GenBank 数据库中已报道的 ITS-rDNA 序列进行相似性比对分析。其中 18 株与 GenBank 中已报道菌株具有较高的相似性($\geq 97\%$), 1 株相似性较低, 只有 89%(表 2)。定义 ITS-rDNA 相似性低于 97% 时作为不同的分类单元进行多样性计算, 分离自丛生盔形珊瑚的 19 个菌株, 可以划分为 12 个不同分类单元, Shannon 多样性指数为 2.425 8, 均匀度指数为 0.9781。结果表明, 多样性指数和均匀指数均较高。

2.3 丛生盔形珊瑚共附生真菌的系统发育学分析

得到测序结果的 19 株菌, 在 NCBI 网站上通过在线比对引擎 BLAST, 发现其中的一株菌与 GenBank 中已报道菌株的序列相似性低于 97%, 仅为 89%, 可能是目前还尚未发现的种属; 其余 18 株菌在真菌分类学上隶属于 2 个门 8 个目 11 个属或种, 如图 1 所示。这 11 个属种分别是 *Aspergillus* sp.、*Cladosporium* sp.、*Xylariales* sp.、*dothideomycete* sp.、*Massarina* sp.、*Penicillium* sp.、*Eurotium rubrum*、*Stachybotrys* sp.、*Gibberella moniliformis*、*Curreya austroafricana* 和 *Fusarium* sp.。

3 讨论

3.1 丛生盔形珊瑚共附生真菌的培养条件

海洋中蕴藏着目前尚无法估量的微生物未知种群和资源, 具有海洋热带雨林之称的珊瑚, 其共附生微生物群落组成也非常复杂, 分离菌株的数量直接影响其多样性的研究。由于培养基和培养条件的限制, 目前通过实验室人工培养方法已经被分离、描述的微生物种类和数量仅占估计数量的 1%–5%, 而其余 95%–99% 微生物种群仍然未被分离^[16]。本试验在分离时采用 5 种培养基: 麦芽膏培养基、淀粉培养基、CDA 培养基、马丁氏培养基和 PDA 培养基, 力求最大限度地分离珊瑚共附生的真菌, 共分离菌株 19 株。但由于人为限定了一些培养条件, 5

表 2 丛生盔形珊瑚分离出的 19 株独立菌株 ITS-rRNA 序列与其最相似菌序列信息
Table 2 Phylogenetic information of ITS-rRNA of 19 independent isolates from coral *Galaxea fuscularis*

真菌属种 Phylogenetic group (Genus)	真菌登录号 (本实验) Strains isolate accession No.	同属真菌数量 Number of strains in OTU*	最相近真菌登录号 Nearest type strain accession No. (GenBank)	相似度 Sequence identity (%)
<i>Aspergillus</i> sp.	HQ316558	4-1	FJ770064	100
	HQ316559	4-2	GQ229082	99
	HQ316565	4-9	GU232767	100
<i>Cladosporium</i> sp.	HQ316560	4-3	EU729711	100
	HQ316563	4-6	GU017505	100
	HQ316573	4-20	FJ037773	99
<i>Xylariales</i> sp.	HQ316561	4-4	EF060424	99
	HQ316570	4-16	EF060424	99
<i>Fusarium</i> sp.	HQ316562	4-5	FJ008989	100
<i>Dothideomycete</i> sp.	HQ316564	4-7	EU680546	99
	HQ316575	4-22	EF060633	99
<i>Curreya austroafricana</i>	HQ428123	4-8	EU552116	100
<i>Massarina</i> sp.	HQ316566	4-10	FJ770077	99
<i>Penicillium</i> sp.	HQ316567	4-11	KH00315	100
<i>Eurotium rubrum</i>	HQ316568	4-12	HM116370	99
<i>Arthrinium</i> sp.	HQ316569	4-13	UFMGCB 908	89
<i>Stachybotrys</i> sp.	HQ316571	4-17	EU301655	99
	HQ316572	4-19	EU301652	100
<i>Gibberella moniliformis</i>	HQ316574	4-21	EU364856	98

种培养基的营养组分无法全面反映微生物生长的自然条件,造成某些微生物的富集生长,而另一些微生物缺失,导致部分真菌资源遗漏。培养基分离培养微生物本身就存在很多这样那样的问题和缺陷,也就不能保证这 5 种培养基对部分难培养菌的可培养性。在培养条件上也主要针对好氧、中温菌进行培养,分离获得的菌株有限。因此进一步通过优化分离、培养技术并运用多相分类方法,才能获取环境中可培养真菌的更加全面的信息。

3.2 丛生盔形珊瑚共附生真菌种群的多样性

珊瑚共附生微生物的研究目前才刚刚起步。最早见于 2002 年, Rohwer 等对跟珊瑚相关的细菌的多样性和分布进行了研究,对来源于 3 种常见类型珊瑚的 1 000 余株细菌进行测序,其中 430 株是不同的类型,有一半的菌株是新发现的属种,出新率比其他海洋样品都高^[17]; Eugene Rosenberg^[1]在 2007 年的“Nature reviews”发表了“微生物在珊瑚健康、疾病和进化中的作用”一文,说明珊瑚微生物学是一个新出现的领域,珊瑚是微生物的一个动态的组合,包括:珊瑚虫、虫黄藻、石内生的海藻、原生动

物、细菌、古菌和病毒等。目前珊瑚微生物的研究以细菌居多。

本试验研究所用的珊瑚样品采集自广东湛江徐闻西部沿岸海区,保存有目前大陆最好、种类最多、面积最大的连片珊瑚^[6],且珊瑚共附生微生物资源尚未被研究。在本试验中共鉴定出 11 个属的真菌,绝大多数属于半知菌亚门和子囊菌亚门真菌,其中曲霉属和枝孢霉属为优势菌群,葡萄穗霉菌属、炭角菌属、座囊菌属为常见种。Shannon 多样性指数为 2.425 8。本研究在分离时采用了 5 种培养基,淀粉培养基分离出的菌株种类、数量最多,说明淀粉培养基与其它 4 种培养基相比模拟的菌株生存环境与原生存环境最为相似。2007 年 Toledo-hernandez C. 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,其中有一株菌属于新种属^[18]。2008 年, Wang 等人^[19]从夏威夷 Coconut 岛采集的海绵 *Mycale armata* 所分离到的菌分属于 6 个属,而其研究的另外一种海绵 *Halicionacaerulea* 所分离到的菌株为 8 个属。相比之下,丛生盔形珊瑚种群多样性还是较丰富的。

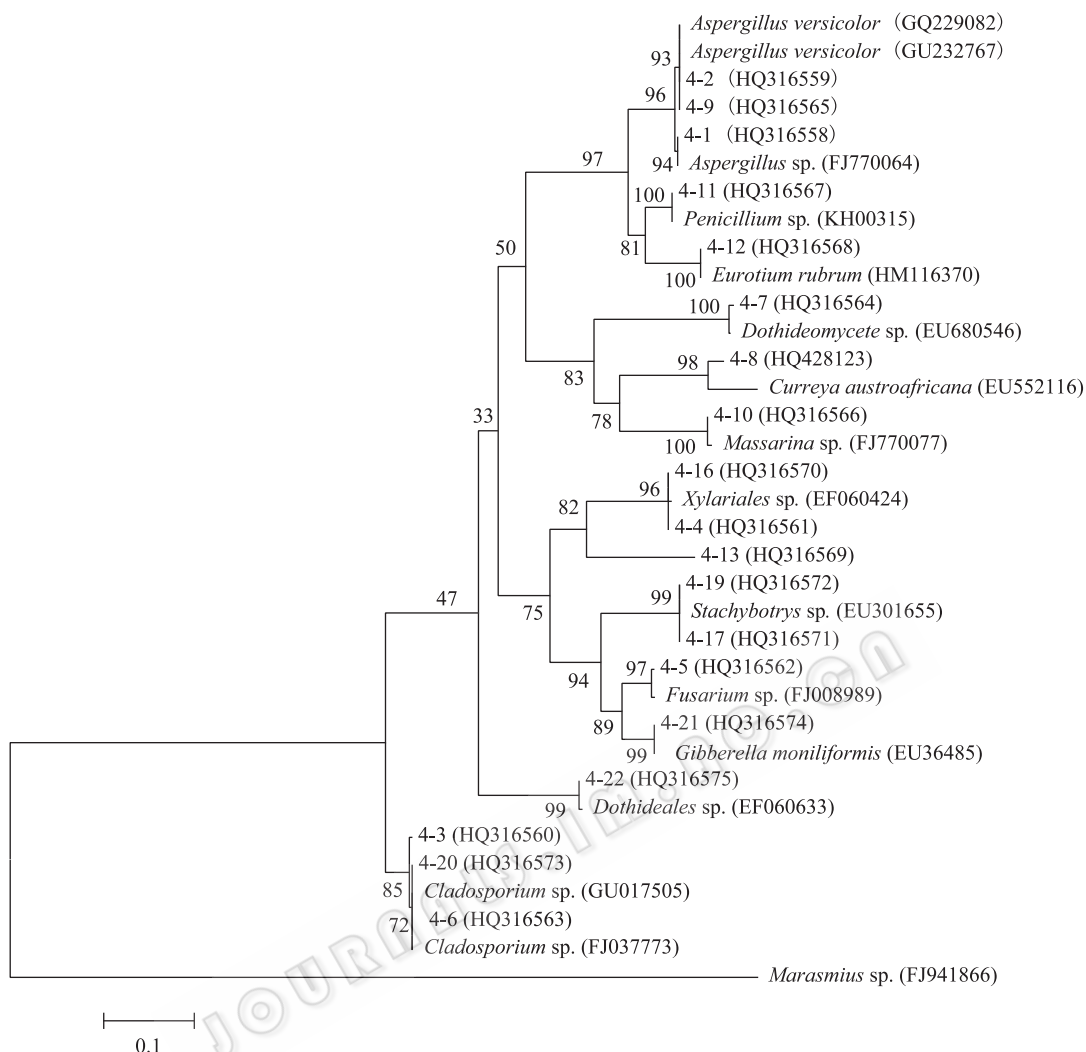


图 1 基于 ITS-rRNA 序列同源性的丛生盔形珊瑚共附生真菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strains isolated from *Galaxea fascicularis* based on ITS-rDNA sequences

Note: Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among ITS-rDNA gene sequences (accession number from HQ316558 to HQ316575 and HQ428123) of symbiotic fungi of *Galaxea fascicularis* L. and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets. The scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of ITS-rDNA gene sequence.

3.3 丛生盔形珊瑚共附生真菌种群中潜在的新的物种资源

到 2000 年为止, 被描述过的高等海洋真菌仅有 444 种, 还不到陆地真菌总数(约 5 万种)的 1%^[20-21]。Beman 等^[22]认为, 海洋微生物至今只有不到 5% 获得培养或鉴定。所以, 海洋真菌对于人类而言, 仍是一座未被了解的资源库。珊瑚具有生物群落聚集功能, 包含大量多种多样的生物, 生物的多样性可比得上雨林。因此, 与珊瑚共附生的微生物存在新种

的可能性极大。在本次研究中, 菌株 4-13 的 ITS-rDNA 序列与 GenBank 中已报道序列相似性较低(<97%), 仅为 89%。这就显示出珊瑚共附生微生物种群中存在新的物种资源。

本研究首次对丛生盔形珊瑚可培养真菌群落结构进行研究, 分离得到 19 株真菌。初步揭示了丛生盔形珊瑚共附生真菌种群的分布特征, 但还存在一定的局限性。由于自然界中只有 0.1%–1% 的微生物通过常规方法能被培养, 仅占自然界中微生物

种类的极小部分,应用传统的微生物分离培养方法研究微生物种群构成导致了严重的微生物多样性丢失^[23]。因此非常有必要应用不依赖纯培养的分生物学的方法来研究共生盔形珊瑚共附生未培养或不能培养的真菌,以更全面地获取共生盔形珊瑚共附生真菌多样性信息。

致谢:感谢广东徐闻珊瑚礁国家级自然保护区管理局对珊瑚采样提供的大力支持,感谢廖宝林助理研究员对采样工作及珊瑚样品分类提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] Rosenberg E, Koren O, Reshef L, et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(5): 355–362.
- [2] Weil E, Rogers CS. Coral reef diseases in the Atlantic-Caribbean[J]. *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*, 2011, 5: 465–491.
- [3] Lima OC, Figueiredo CC, Pereira BA, et al. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(5): 651–657.
- [4] Groweiss A, Look SA, Fenical W. Solenolides, new antiinflammatory and antiviral diterpenoids from a marine octocoral of the genus *Solenopodium*[J]. *J Org Chem*, 1988, 53: 2401–2406.
- [5] Romero F. Thiocoarline a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine Micromonospora I Taxonomy fermentation isolation and biological activities[J]. *Journal of Antibiotics*, 1997, 50: 734–737.
- [6] 卢伙胜, 何秀玲, 陈春亮, 等. 广东徐闻西部沿岸海区“珊瑚类”的物种及其分布[J]. *台湾海峡*, 2003, 22(4): 445–448.
- [7] Wegley L, Edwards R, Rodriguez-Brito B, et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(11): 2707–2719.
- [8] Nissimov J, Rosenberg E, Munn CB. Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 292(2): 210–215.
- [9] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [10] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [11] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2): 113–118.
- [12] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111–120.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [14] McCaig AE, Glover LA, Prosser JI. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1721–1730.
- [15] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2003, 27(5): 30–34.
- [16] Ludwig W. Ribosomal RNA2 targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(5): 5552–5651.
- [17] Rohwer F, Seguritan V, Azam F, et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 2002, 243: 1–10.
- [18] Toledo-hernández C, Bones-González A, Ortiz-Vázquez OE, et al. Fungi in the sea fan *Gorgonia ventalina*: diversity and sampling strategies[J]. *Coral Reefs*, 2007, 26(3): 725–730.
- [19] Li QZ, Wang GY. Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges[J]. *Microbiol Res*, 2009, 164(2): 233–241.
- [20] 李淑彬, 杨劲松, 钟英长, 等. 抗真菌抗生素 179M 产生菌的分离鉴定和生理特性研究[J]. *菌物系统*, 2001, 20(3): 362–367.
- [21] 梁剑光, 王晓飞, 陈义勇, 等. 海洋真菌及其活性代谢产物研究进展[J]. *氨基酸和生物资源*, 2004, 26(4): 1–3.
- [22] Bernan VS, Greenstein M, Maiese WM. Marine microorganisms as a source of new natural products[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 1997, 43: 57–90.
- [23] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3 片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45(2): 201–204.