

湛江红树林滩涂可培养真菌种群多样性分析

徐婧^{1,2} 于莉^{2*} 刘可杰¹ 李赤² 王燕³

(1. 辽宁省农业科学院植物保护研究所 辽宁 沈阳 100161)

(2. 广东海洋大学 农学院 广东 湛江 524025)

(3. 广东湛江红树林国家级自然保护区管理局 广东 湛江 524088)

摘 要:【目的】明确湛江地区红树林滩涂海洋真菌的种类及其分布,为海洋真菌的开发利用研究奠定基础。【方法】运用稀释平板法从湛江市高桥及特呈岛红树林滩涂不同的潮位带(低、中、高)和不同树种(白骨壤、桐花树、木榄、红海榄)采集淤泥样品 550 份,采用真菌形态学和 ITS 序列分析技术进行多样性研究。【结果】分离获得海洋真菌 274 株,共鉴定出 19 属 39 种真菌,以曲霉属 *Aspergillus*、青霉属 *Penicillium* 和木霉属 *Trichoderma* 真菌分离频率高,为湛江红树林滩涂优势真菌种类,尤其在中潮位带真菌种类最多。此外,分离获得真菌 *Talaromyces helicus*, 为中国新记录种。【结论】湛江红树林滩涂海洋真菌的种类十分丰富,具有潜在的开发和利用前景。

关键词: 红树林, 真菌鉴定, rDNA ITS 分析, 真菌多样性

Diversity of marine culturable fungal population in mangrove wetlands of Zhanjiang

XU Jing^{1,2} YU Li^{2*} LIU Ke-Jie¹ LI Chi² WANG Yan³

(1. Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Institute of Plant Protection, Shenyang, Liaoning 100161, China)

(2. College of Agricultural, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

(3. Zhanjiang Municipal Administration of the National Nature Reserve of Mangroves, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study is to define the species and distribution of

基金项目: 广东省科技厅项目湛江红树林滩涂微生物资源调查与资源库建设(No. 2009B060600008)

*通讯作者: Tel: 86-24-88455636; 信箱: yuli2362@hotmail.com

收稿日期: 2012-05-14; 接受日期: 2012-07-04

the fungi in mangrove wetlands, and to lay the foundation for the development and utilization of marine fungi. **[Methods]** Five hundred fifty soil samples were collected from different soil types of trees (*Avicennia marina*, *Aegiceras corniculatum*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Rhizophora stylosa*) and tidal zone (low, middle, high). The fungal isolate was isolated by dilution plate technique from the soil samples. Fungal diversity and species identification was carried out by based on the fungal morphology and rDNA ITS analysis. **[Results]** A total of 274 fungal isolates were isolated from the soil samples. Among the 274 isolates, 39 fungal species in 19 genera were found. The dominant fungal genera within Zhangjiang mangrove tidal-flat area were *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*. In addition, the fungal species of *Talaromyces helicus* was a new record specie in China. **[Conclusion]** There is a wide variety of fungal species in mangrove wetlands of Zhanjiang, and with potential prospects off development and utilization.

Keywords: Mangroves, Fungi identification, rDNA ITS analysis, Fungal diversity

红树林滩涂位于热带和亚热带海湾、河口潮间带滩涂, 是一种特殊的生态交错带, 包含着功能各异的海洋生物和陆地生物类群。微生物是红树林滩涂最主要的还原者, 对于红树林滩涂的物质循环和能量流动起着重要的推动作用^[1], 红树林滩涂是以松软的沙质或泥质沉积物为基质, 并含有大量被水浸泡的红树林根、茎和枝条等植物体, 生态环境中滋生着丰富的真菌和细菌资源, 也是海洋真菌的第二大类群^[2]。与陆生真菌相比较, 红树林滩涂海洋真菌能够耐受高盐、强酸等极端环境条件, 因而生态环境导致其在物种、基因组成和生态功能上的多样性。

世界上许多国家的学者对海洋真菌, 尤其是红树林土壤真菌产生浓厚的兴趣, 开展了大量的研究工作, 取得了重要的研究成果, 但不同地区获得的真菌种类及优势类群不尽相同。最早于1958年开始对东非红树林土壤真菌群落进行研究^[3]。随后印度、巴基斯坦等国学者对其国内红树林土壤真菌种群进行了较为系统的研究^[4-6]。我国对于红树林滩涂真菌资源的多样性研究资

料较少, 特别是湛江地区, 至今未见系统研究报道。本研究采用常规真菌学和分子生物学相结合的技术手段, 对湛江红树林滩涂海洋生境真菌资源进行收集、鉴定和整理, 明确湛江红树林滩涂海洋真菌种群多样性, 筛选珍稀种类, 为丰富我国微生物资源库, 挖掘和利用微生物资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源及采集方法

供测样本来源于广东省湛江市高桥(21°37' N, 110°17' E)及特呈岛(21°9' N, 110°26' E)红树林国家自然保护区。样本采集参照孟庆恒等^[7]方法进行, 采用五点采样法, 分别采集高潮位的木榄(*Bruguiera gymnorrhiza*)和红海榄(*Rhizophora stylosa*)、中潮位的桐花树(*Aegiceras corniculata*)和低潮位白骨壤(*Avicennia marina*)的不同深度(0-5 cm、5 cm-10 cm、10 cm-15 cm)根际淤泥作为供试样本。所有泥土样品按照同一潮位带、同一树种混合均匀, 处理后将土样自然风干, 4 °C保存, 备用。

1.2 真菌的分离及培养

采用稀释平板分离法^[8], PDA 培养基均用天然海水配置。取 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 稀释度的土壤悬液 200 μ L, 涂布, 每稀释度涂 3 个平板, 27 $^{\circ}$ C 培养, 定时观察菌落生长状况。不同菌株分别在 PDA 培养基平板上划线稀释, 于高倍体式镜下进行单孢分离, 纯化、编号保存。用海水制片或插片法观察各个菌株的形态特征^[9], 进行形态学鉴定。

1.3 ITS-rDNA 的扩增

1.3.1 DNA 提取: 供试真菌菌株采用液体静置培养法培养^[10]、收集菌体, -110 $^{\circ}$ C 冷冻干燥 2-3 d, 待菌丝体充分干燥后磨成粉末, 备用。应用真菌 DNA 提取试剂盒提取各菌株 DNA。

1.3.2 PCR 扩增: ITS 序列通过引物 ITS1 (5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCT CCGCTTATTGATATGC-3') 进行扩增。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。程序结束后进入 10 $^{\circ}$ C 状态。

1.4 rDNA ITS 序列分析

PCR 产物由北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。在 GenBank 中搜索同源序列, 绘制最简约系统发育树。

2 结果与分析

2.1 红树林滩涂海洋真菌鉴定结果

通过真菌的 ITS 序列分析和形态学鉴定, 供试的 274 株红树林滩涂海洋真菌分别属于 19 属 39 种(表 1), 已确定种 35 个, 包括 1 个中国新记录种, 即 *Talaromyces helicus*, 有 4 个菌株仅鉴定到属。有 3 株尚不知其确切的种类, 有待进一步鉴定。从高、中、低 3 个潮位带看, 不同潮位带

分布的真菌种类、数量不同, 以中潮位带真菌数量和种类居多, 有 18 属 25 种真菌, 以青霉属和篮状菌属的真菌居多。高潮位带分布真菌种类和数量次之, 有 9 个属 20 种真菌, 以曲霉属、镰孢菌属和未知的真菌种类居多。低潮位带中的真菌种类和数量最少, 仅有 4 属 10 种, 主要为青霉属和曲霉属的真菌。由此可见, 湛江红树林海洋真菌种群多样性极为丰富, 有进一步研究和开发潜力。

2.2 红树林滩涂海洋真菌的系统发育学分析

将 274 株红树林滩涂海洋真菌的 rDNA-ITS 序列进行了测定, 参照 Waalwijk 等^[11]方法将获得的序列剪切和比对后, 结合菌株形态特征鉴定, 菌株形态学相似、ITS 序列完全相同的多个菌株视为同一种类, 保留其一。经整理比对后, 共得到 40 个不同的 ITS 序列结果。将 40 个不同的 ITS 序列在 GenBank 中进行同源比对, 并选同源性较高代表菌株与其进行序列聚类分析, 用 MEGA version 4.0 中的 NJ (Neighbor-Joining) 方法生成系统树, 结果见图 1。

研究结果表明, 40 个不同供试菌株的 ITS 序列与 GenBank 中的菌株序列聚类的自展支持率在 68%-100%, 可确定为 19 个属 39 个种。其中 G17 在 GenBank 中的同源序列为 AF502815, 目前还未确定种类。G45 与 AF033397 的自展支持率最低为 68%, 但经形态鉴定可以确定为 *Penicillium aculeatum*。在发育树中 T92、G12 和 *Penicillium verruculosum* 共同处在同一分支, 但结合形态鉴定和在 GenBank 中进行同源比对, 确定 T92 为 *Talaromyces flavus*, G12 为 *Penicillium verruculosum*, 其原因可能是因为 *Talaromyces flavus* 的无性态为青霉属真菌, 其亲缘关系较近。

表 1 供试菌株种类鉴定结果
Table 1 The indentifacation of fungial spicies withen tested strains

真菌属 Fungal genera	菌株数 Isolates	分离频率 Frequency (%)	种类 Fungal species	形态鉴定 Morphology	ITS 同源性 Similarity (%)	GenBank accetion No.
<i>Acremonium</i>	1	0.4	<i>A. sp.</i>	Y	100	AY633563
<i>Aspergillus</i>	64	23.4	<i>A. niger</i>	Y	100	EF136365
			<i>A. japonicus</i>	Y	99.6	GQ129211
			<i>A. flavus</i>	Y	99.8	GU565573
			<i>A. ochraceus</i>	Y	100	FJ797698
			<i>A. sydowii</i>	Y	100	FJ461692
			<i>A. terreus</i>	Y	100	GQ461911
			<i>A. sp.</i>	N	99.5	FJ797698
<i>Bipolaris</i>	3	1.1	<i>B. hawaiiensis</i>	Y	100	EF540752
			<i>B. australiensis</i>	Y	100	AJ853762
<i>Cladosporium</i>	23	8.4	<i>C. Cladosporioides</i>	Y	100	EF577236
			<i>C. sphaerospermum</i>	Y	100	GU017501
			<i>C. sp.</i>	N	—	FJ755820
<i>Curvularia</i>	2	0.7	<i>C. lunata</i>	Y	82.3	DQ836798
<i>Fusarium</i>	23	8.4	<i>F. oxysporum</i>	Y	100	GU565571
			<i>F. chlamydosporum</i>	Y	93.1	EU556725
			<i>F. solani</i>	Y	91.3	AY633746
<i>Gliomastix</i>	3	1.1	<i>G. murorum</i>	Y	94.8	EU326188
<i>Hortaea</i>	9	3.3	<i>H. werneckii</i>	Y	100	AY213656
<i>Microsphaeropsis</i>	1	0.4	<i>M. arundinis</i>	N	100	FJ037774
<i>Mycosphaerella</i>	1	0.4	<i>M. sp.</i>	N	100	FJ037771
<i>Nigrospora</i>	1	0.4	<i>N. oryzae</i>	Y	—	—
<i>Penicillium</i>	62	22.6	<i>P. restrictum</i>	Y	91.3	AY373928
			<i>P. aculeatum</i>	Y	100	AF033397
			<i>P. verruculosum</i>	Y	100	HM049911
			<i>P. glabrum</i>	Y	92.6	EU644087
			<i>P. citrinum</i>	Y	100	GU566273
<i>Pestalotiopsis</i>	8	2.9	<i>P. microspora</i>	Y	100	GU171385
			<i>P. palmarum</i>	Y	100	GQ888738
<i>Phoma</i>	1	0.4	<i>P. betae</i>	Y	97.6	EU594572
<i>Pichia</i>	4	1.5	<i>P. guilliermondii</i>	Y	100	EU568967
<i>Rhizopus</i>	2	0.7	<i>R. oryzae</i>	Y	100	AB181317
<i>Scedosporium</i>	4	1.5	<i>S. apiospermum</i>	Y	100	AY213683
<i>Talaromyces</i>	20	7.3	<i>T. helicus</i>	Y	100	AF033396
			<i>T. stipitatus</i>	Y	100	L14514
			<i>T. flavus</i>	Y	100	EU021596
			<i>T. trachyspermus</i>	Y	100	GQ365160
<i>Trichoderma</i>	33	12.0	<i>T. harzianum</i>	Y	100	FJ459971
			<i>T. erinaceum</i>	Y	100	EU280106
Unknow species	3	1.1		N	—	—

注: Y: 已确定种类; N: 未确定种类.

Note: Y: Determined species; N: Undetermined species.

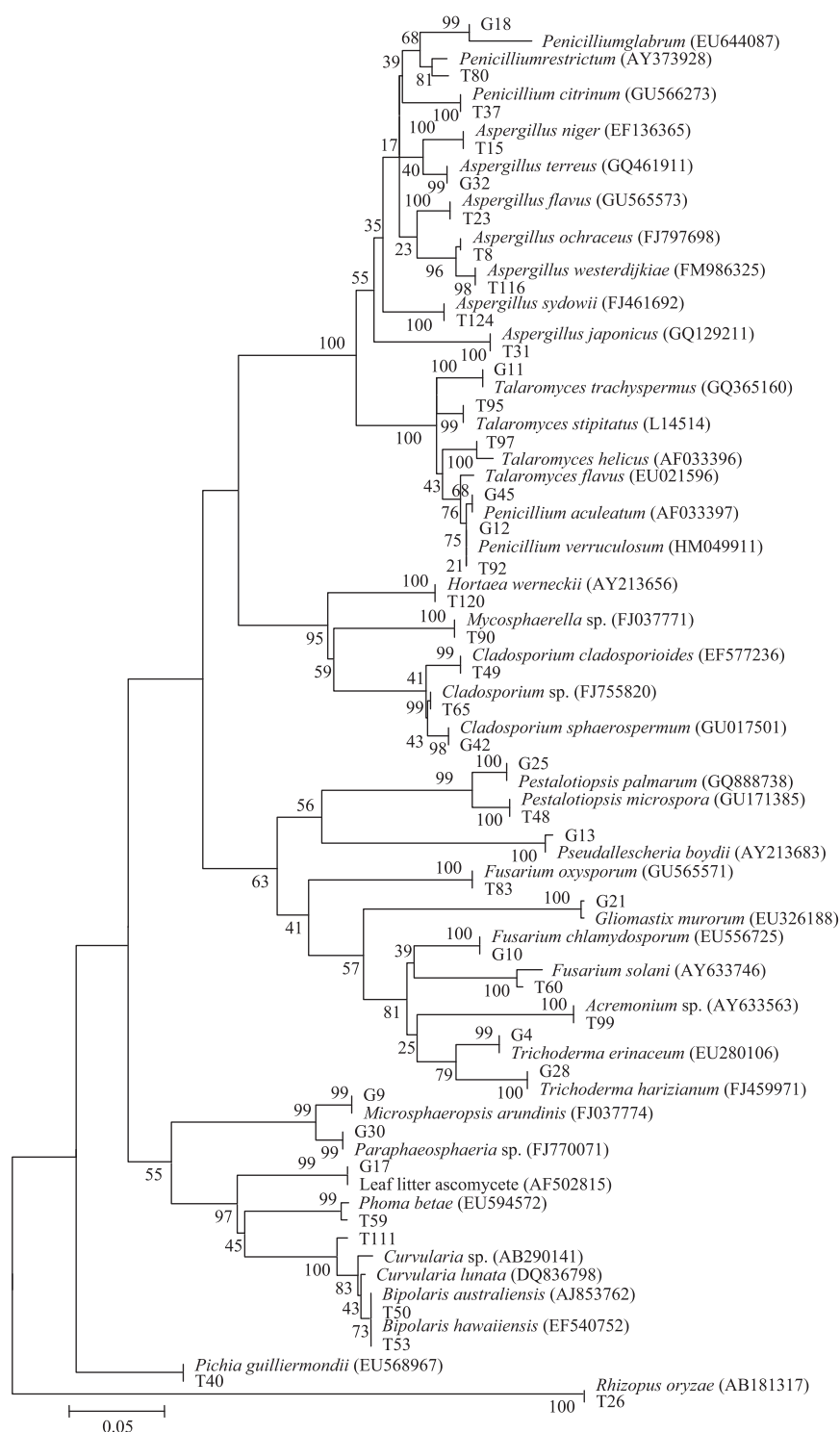


图 1 红树林滩涂海洋真菌及其近缘属、种基于 rDNA-ITS 序列的 NJ 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of rDNA-ITS gene sequences of the fungal isolates and relational strains

Note: Neighbor-Joining tree shows the phylogenetic relationships among rDNA-ITS gene sequences of marine culturable fungi of mangrove wetlands and their closely related sequences downloaded from GenBank. The numbers at the nodes represents the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample data sets. The scale bar indicates 5% nucleotides.

3 结论与讨论

本研究比较全面地了解湛江红树林滩涂海洋真菌的种类和分布规律,同时获得数量可观的真菌资源,为红树林滩涂海洋真菌开发与利用提供了重要的基础材料。采用真菌形态学和分子生物学鉴定技术进行鉴定,获得的274个菌株涵盖19个属39个种真菌,其中包括篮状菌属的一个中国新纪录种 *Talaromyces helicus*。此外,有3个菌株比较特殊,尚未确定其种类,其分类地位还有待进一步鉴定。由此可见,湛江红树林滩涂海洋真菌的种类十分丰富,具有潜在的开发和利用前景。

湛江红树林滩涂淤泥中以曲霉属 *Aspergillus* (23.4%)、青霉属 *Penicillium* (22.6%)、木霉属 *Trichoderma* (12.0%)等真菌分离频率最高,为优势种群。该研究结果与国外许多研究结果相一致^[1,7,12-14]。研究中发现不同潮位带中真菌种类和数量存在明显差别,这可能与真菌对环境的适应性有关,中潮位带和低潮位带出现频率高的种类则对海洋环境的适应性更强,特别是低潮位带滩涂几乎常年被海水浸泡,其真菌种类虽然与陆生种类相似,但已经适应了海洋的环境条件,可以断定已经从陆生真菌转变为兼性海洋真菌。

湛江红树林滩涂海洋真菌中未发现毛霉属 (*Mucor*)和链格孢属(*Alternaria*)的真菌,可能与该地区红树林滩涂的地理位置、红树林种类、温度、基质、海水的盐度等因素有关^[15]。红树林滩涂通过水体、土壤与浅海、入海河流及陆地的生态系统建立了交流的通道,形成一个开放的系统^[1]。研究中发现的优势真菌种类都是陆生真菌的常见种类,可能来自陆地,并通过红树林的开放系统进入,从高潮位随着潮水进入到中潮位、低潮位,适应了红树林滩涂环境,成为其优势种类,按照 Kohlmeier 等^[3]对海洋真菌的定义,这些种类为

兼性海洋真菌。从本实验的结果可以推测陆生真菌适应海洋环境后,成为红树林中的兼性海洋真菌,因此红树林滩涂淤泥真菌资源多样性与陆地和海洋都有差异。对于红树林滩涂真菌的优势种类适应了高盐、低营养等极端环境后与陆地相同种类是否在遗传、代谢产物等方面存在着差异还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 何斌源, 范航清, 王瑁, 等. 中国红树林湿地物种多样性及其形成[J]. 生态学报, 2007, 11(27): 4860-4870.
- [2] Sarma VV, Vittal BPR. Biodiversity of mangrove fungi on different substrata of *Rhizophora apiculata* and *Avicennia* spp. from Godavari and Krishna deltas, east coast of India[J]. Fungal Diversity, 2000, 5: 23-41.
- [3] Kohlmeier J, Kohlmeier E. Marine Mycology: The higher fungi[M]. New York San Francisco London: Academic Press, 1979.
- [4] Rai JN, Tewari JP. *Pseudoeurotium globosum* n. sp., a new ascomycete from Indian soils[J]. Mycopathologia, 1962, 16(1): 90-96.
- [5] Tubaki K. Marine fungi from Japan, Lignicolous group I[J]. Transactions of the Mycological Society of Japan, 1966, 7: 73-87.
- [6] Rai JN, Tewari JP, Mukerji KG. A new *Aspergillus* from Indian soils: *A. striatus* spec. nov.[J]. Canadian Journal of Botany, 1964, 42(11): 1521-1524.
- [7] 孟庆恒, 张皓, 张晶. 渤海驴驹河水域海洋真菌的分离及初步鉴定[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2007, 27(1): 28-31.
- [8] 陆俊锟. 华南三地红树林土壤微生物区系及 PGPR 多样性研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2008.
- [9] 金静, 张天宇, 李宝笃. 渤海、黄海海域山东沿岸海洋木生真菌的分类研究[D]. 泰安: 山东农业大

- 学博士学位论文, 2004.
- [10] 张明会, 姜钰, 徐秀德. 玉米大斑病菌培养与 DNA 提取方法[J]. 农业科技通讯, 2009(1): 42-44.
- [11] Waalwijk C, Baayen RP, de Koning JRA, et al. Ribosomal DNA analyses challenge the status of *Fusarium* Sections *Liseola* and *Elegans*[J]. Sydowia, 1996, 48(1): 90-104.
- [12] Newell SY. Mangrove fungi: the succession in the mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings[A]// Jones EBG. Recent Advances in aquatic Mycology[M]. London: Elek Science, 1976: 51-91.
- [13] Schmit JP, Shearer CA. Geographic and host distribution of lignicolous mangrove microfungi[J]. Botanica Marina, 2005, 47(6): 496-500.
- [14] Sarma VV, Hyde KD. A review on frequently occurring fungi in mangroves[J]. Fungal Diversity, 2001, 8: 1-34.
- [15] Schmit JP, Shearer CA. A checklist of mangrove associated fungi their geographical distribution and known host plant[J]. Mycotaxon, 2003, 85: 423-477.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课课堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsP14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华璐等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p.521)