

南海4种珊瑚附生可培养真菌多样性分析

郭双双^{1,2}, 徐 炜¹, Siti Aisyah Alias³, 何高阳¹, 骆祝华¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所、国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005; 3. 马来西亚大学海洋与地球科学研究所, 马来西亚 吉隆坡 50603)

摘要:本研究利用从南海采集的4种珊瑚分离附生真菌,并通过菌株的分类鉴定及系统发育分析获得珊瑚附生可培养真菌的多样性信息. 选用酵母麦芽糖琼脂培养基(YM)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马丁氏培养基(Martin)、察氏琼脂培养基(CDA)和孟加拉红培养基(RBM)等5种培养基,采用平板涂布法培养分离附生真菌,基于ITS-rRNA基因序列对真菌菌株进行鉴定和系统发育分析. 从4种珊瑚上共分离获得10个属的120株真菌,分别是:青霉属(*Penicillium*)56株、曲霉属(*Aspergillus*)25株、枝顶孢属(*Acremonium*)2株、枝孢属(*Cladosporium*)5株、毕赤酵母属(*Meyerozyma*)14株、隔孢伏革属(*Peniophora*)2株、拟茎点霉属(*Phomopsis*)1株、裂褶菌属(*Schizophyllum*)1株、梗孢酵母属(*Sterigmatomyces*)13株、篮状菌属(*Talaromyces*)1株. 通过对不同珊瑚品种分离获得的附生真菌的比较,发现小叶鹿角珊瑚(*Acropora microphthalmia*)和花鹿角珊瑚(*Acropora florida*)上分离到的菌株多样性最高,包含6属10种. 进一步的分析发现不同珊瑚样品上真菌种类分布有较大差异,隔孢伏革属和裂褶菌属真菌均分离自小叶鹿角珊瑚,梗孢酵母属和篮状菌属均分离自角孔珊瑚(*Goniopora* sp.),扁脑珊瑚(*Platygyra* sp.)上则分离到拟茎点霉属. 同时还发现不同培养基分离真菌的能力不同,YM培养基分离的菌株最多,CDA培养基分离真菌的多样性最多. 以上的研究表明,南海珊瑚上存在大量且丰富的真菌资源,可以为后续生物活性物质的开发利用提供良好的菌种资源.

关键词:海洋生物学;珊瑚;附生真菌;多样性;南海

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 01. 004

中图分类号:P735

文献标识码:A

文章编号:2095-4972(2018)01-0035-10

珊瑚礁是一类由珊瑚、浮游生物、底栖生物、鱼类和藻类等多种生命形式组成的海洋生态系统^[1]. 自然灾害和气温升高使全球范围内的珊瑚礁正面临着严重退化. 珊瑚作为珊瑚礁生态系统中重要的组成生物,其疾病的发生也会在某种程度上危害珊瑚礁生态系统健康,进而导致珊瑚资源的减少. 在目前有关珊瑚疾病病原菌的研究中,已经有越来越多的研究将珊瑚疾病与其上的附生微生物建立了联系. 珊瑚附生微生物包括了生长在珊瑚粘液层、骨架以及组织中的微生物,如细菌、古菌、病毒和真菌等. 与原核微生物相比,真菌相对高等,代谢能力更强. 一些研究者通过分离比较全球不同海域健康和患病珊

瑚样品上的附生真菌种类,确定了聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*)和杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)是引起珊瑚曲霉病的主要原因^[2-4]. 它们可以直接感染,也可以通过如舌头海蜗牛(*Cyphoma gibbosum*)的间接转移使健康珊瑚患病^[5]. 此外,环境因素如海水温度的升高可以提高曲霉属真菌对珊瑚的侵染能力,从而加剧珊瑚患病^[6]. 这些研究成果在一定程度上激发了人们对于珊瑚附生真菌的研究兴趣.

目前国内外对珊瑚附生真菌的研究主要集中在真菌多样性和天然活性物质开发方面. 国外有关珊瑚附生真菌多样性的研究有巴拿马海域的滨珊瑚(*Porites*)^[7]、爪哇海北部海域的短指软珊瑚(*Sinu-*

收稿日期:2017-03-21

基金项目:国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项资金资助项目(海三科 2015020,海三科 2016039);国家国际科技合作专项资助项目(2015DFA20500)

作者简介:郭双双(1989~),女,硕士研究生;E-mail:gss109@163.com

通讯作者:骆祝华(1977~),男,研究员;E-mail:luozhuhua@tio.org.cn

larialia)^[8]、东太平洋^[9]和新加坡^[10]的柳珊瑚(*Gorgonian*)、大堡礁南部的鹿角珊瑚(*Acropora*)^[11]、加勒比海域的环圆菊珊瑚(*Montastrea annularis*)^[12]和印度洋海域的澄黄滨珊瑚(*Porites lutea*)、角孔珊瑚(*Goniopora* sp.)、蔷薇珊瑚(*Montipora*)等^[13]。国内有关珊瑚附生真菌多样性研究主要集中在广东徐闻珊瑚礁自然保护区的蜂巢珊瑚(*Faviidae*)、盔形珊瑚(*Galaxea*)、角孔珊瑚、肉芝软珊瑚(*Sarcophyton*)、滨珊瑚和牡丹珊瑚(*Pavona lamarckii*)^[14-16]和南海的柳珊瑚、滨珊瑚和黑珊瑚(*Antipathes dichotoma*)^[17-22]等。这些长期附生在珊瑚上的真菌不仅能够参与合成珊瑚成分,也参与了珊瑚次生代谢产物的物质合成。周静等(2012)曾从西沙海域的网刺柳珊瑚(*Echinogorgia* sp.)上分离到1株隔孢伏革属(*Peniophora* sp.)真菌,并从其发酵产物中分离获得了7个具有较强卤虫致死活性和鱼毒活性的甾体化合物。而且网刺柳珊瑚中的主要代谢产物也是甾体化合物^[23]。目前从珊瑚来源真菌的代谢产物中分离获得的化合物有157个^[24],不仅具有包括生物碱^[25]、聚酮^[26]、内酯^[27]、葱醌类^[28]、萜类^[29]、肽类^[30]等多种化学结构类型,还具有包括抗菌^[31]、抗肿瘤^[32]、抗污损^[28]等多种生物活性。

南海地处热带和亚热带,蕴藏着丰富的珊瑚资源。本研究运用5种不同的固体真菌培养基,对南海海域的扁脑珊瑚(*Platygyra* sp.)、角孔珊瑚(*Goniopora* sp.)、小叶鹿角珊瑚(*Acropora microphthalmia*)和花鹿角珊瑚(*Acropora floride*)等4种珊瑚上的附生真菌进行分离,旨在提高现有对南海珊瑚上可培养真菌多样性的认识,也为后续利用珊瑚来源的真菌生产活性代谢产物提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品信息

珊瑚样品采集自海南三亚珊瑚礁自然保护区(18°12'45"N, 109°28'29"E)。4种珊瑚经鉴定为扁脑珊瑚、角孔珊瑚、小叶鹿角珊瑚和花鹿角珊瑚。样品采集后立即装入无菌封口袋中,并置于冰盒中保存,尽快送往实验室进行真菌的分离操作。

1.2 分离培养基

采用5种培养基(表1),在115℃高压灭菌30 min,冷却至45℃左右,加入过滤除菌的青霉素和硫酸链霉素溶液,使二者最终浓度均达到0.5 g/dm³,用于抑制细菌生长。

表1 5种分离培养基及成分

Tab. 1 Composition and concentrations of five isolation media

培养基	成分(1 dm ³ 中的含量)
马丁氏培养基(Martin)	蛋白胨 5.0 g, 酵母粉 2.0 g, 葡萄糖 20.0 g, K ₂ HPO ₄ 1.0 g, 琼脂粉 14.0 g
马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)	马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂粉 15.0 g
酵母麦芽糖琼脂培养基(YM)	蛋白胨 5.0 g, 麦芽提取物 3.0 g, 酵母提取物 3.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 琼脂粉 15.0 g
孟加拉红培养基(RBM)	蛋白胨 5.0 g, 葡萄糖 10.0 g, KH ₂ PO ₄ 1.0 g, MgSO ₄ 0.5 g, 孟加拉红 0.033 g, 琼脂粉 15.0 g
察氏琼脂培养基(CDA)	NaNO ₃ 3.0 g, K ₂ HPO ₄ 1.0 g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO ₄ 0.01 g, 蔗糖 30.0 g, 琼脂粉 15.0 g

1.3 真菌分离培养

将珊瑚样品用无菌海水清洗3次后,用灭过菌的研钵和研杵在超净工作台中研磨至匀浆状。用经灭菌的药匙取1 g左右于10 cm³无菌海水中,涡旋振荡5 min制成样品原液。再用无菌海水将原液稀释成1 × 10⁻¹、1 × 10⁻²浓度梯度的稀释液。用无菌玻璃涂布棒在相应培养基表面轻轻地涂布均匀。4种珊瑚的3个浓度梯度的涂布液在每种培养基上重复3次。平板涂布完成后封口,放置在25℃恒温培养箱中培养。待菌落长出,对分离培养长出的菌株进行形态观察,去除同种珊瑚同种培养基上菌株形态(菌丝长短、生长密度大小)、颜色等明显类似的重

复菌株。挑取排重后的菌株转接到新的PDA培养基平板上,做好标记。对转移到新的PDA平板上的菌株进行纯化,并用质量分数为25%的甘油进行保种, -80℃保存。

1.4 真菌的显微特征观察

将丝状真菌划线涂布在CMA固体平板培养基上,然后用镊子夹一张无菌盖玻片斜插入平板内的培养基中,插入深度为盖玻片高度的二分之一或三分之一。密封后于室温下培养,至合适时,取出盖玻片,以灭菌海水为浮载剂进行压片。将玻片置于倒置显微镜(Olympus IX51)下观察,选取有代表性的显微结构进行拍照保存。

1.5 真菌 DNA 的提取、纯化及 ITS 序列扩增

本研究采用热裂解法^[33]提取海洋真菌基因组 DNA,并将提取获得的 DNA 通过引物 ITS1/ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增. 扩增反应条件为:95℃ 预变性 4 min;95℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 40s,共 32 个循环;72℃ 最后延伸 7 min. 使用 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 回收试剂盒对 PCR 扩增产物进行纯化,送至上海美吉公司测序.

1.6 真菌 ITS 序列的进化分析

根据测序峰图,用 BioEdit Sequence Alignment Editor 软件将 ITS 序列中前后不准确的序列剔除. 然后在 NCBI 数据库中,将去除杂峰后的 ITS 序列进行 Blastn 分析. 从 Blastn 结果中挑选每种真菌最相近的真菌 ITS 序列作为参考序列,用 Clustal W 进行完全比对,然后通过 MEGA 软件,采用邻接法构建系统发育树,并选择使用 1 000 次重复的自展值分析来检验系统发育进化树的可信度.

1.7 数据处理

采用索伦森相似系数 (Sorenson Similarity Coef-

ficient, CS)^[34] 比较样品之间附生真菌种属组成的相似程度:

$$CS = \frac{2A}{(B + C)}$$

式中:A 为两种样品共有种数或属数,B 为样品 B 的附生真菌物种数或属数,C 为样品 C 的附生真菌物种数或属数.

2 结果与讨论

2.1 珊瑚附生真菌的分离结果

从采集到的 4 种珊瑚样品中共分离菌株 120 株,分属于 10 个属(表 2),分别是 56 株青霉属 (*Penicillium*)、25 株曲霉属 (*Aspergillus*)、5 株枝孢属 (*Cladosporium*)、2 株枝顶孢属 (*Acremonium*)、14 株毕赤酵母属 (*Meyerozyma*)、2 株隔孢伏革属 (*Peniophora*)、1 株裂褶菌属 (*Schizophyllum*)、13 株梗孢酵母属 (*Sterigmatomyces*)、1 株篮状菌 (*Talaromyces*)、1 株拟茎点霉属 (*Phomopsis*). 其中,青霉属数量最多,共 54 个菌株,占分离菌株总数的 46.7%,为优势种属. 不同属的真菌在 PDA 培养基上的菌落形态与显微形态如表 2.

表 2 4 种珊瑚样品中不同属真菌的菌落形态及显微形态

Tab. 2 Colony and microscopic morphology of different fungi genus isolated from four corals

真菌	菌株数/株	占比/%	平板培养形状	显微特征
青霉属 (<i>Penicillium</i>)	56	46.7	菌落初为白色,最终为蓝绿色,绒状,菌落反面淡黄色,表面有粉末状孢子粉	菌丝无色,有隔膜;分生孢子梗,有隔膜,在顶端附近分枝,末端帚状枝;分生孢子无色,单胞,球形,成团时带有各种颜色,形成干燥向基的链
曲霉属 (<i>Aspergillus</i>)	25	20.83	菌落初为白色,最终为黑色,黄色或绿色,菌落反面淡黄色至浅褐色	菌丝透明或呈明亮的颜色,光滑或粗糙;分生孢子梗直立,在顶端球形或棍棒形膨大,顶部着生小梗或自整个表面放射;分生孢子,单胞,球形,成团时带有各种颜色,成干燥向基的链
枝孢属 (<i>Cladosporium</i>)	5	4.17	菌落橄榄色、褐色,绒状、平展或隆起,菌落反面淡褐色	分生孢子梗,暗色,小枝在顶部附近成簇或单生;分生孢子,暗色,椭圆形,常成简单的或分枝的向顶的链
枝顶孢属 (<i>Acremonium</i>)	2	1.67	菌落白色,绒状,中间稍隆起,菌落反面褐色	菌丝无色透明,具隔膜;分生孢子梗光滑,球形,无色;分生孢子暗色,单胞,卵圆形
拟茎点霉属 (<i>Phomopsis</i>)	1	0.83	菌落灰白色,丛卷毛状,菌落反面黑色	菌丝光滑,无色;分生孢子梗无色,有隔膜;分生孢子,无色,椭圆形
篮状菌属 (<i>Talaromyces</i>)	1	0.83	菌落黄白色,绒状,边缘放射状,菌落反面褐色	分生孢子梗,光滑,顶端不膨大;分生孢子椭圆形,无间隔,光滑
隔孢伏革属 (<i>Peniophora</i>)	2	1.67	菌落灰白色,蜡质,边缘不规则,菌落反面黄色	菌丝光滑;分生孢子梗侧生;分生孢子,卵圆形,光滑,有隔膜,顶端着生
裂褶菌属 (<i>Schizophyllum</i>)	1	0.83	菌落圆形,白色,扁平,绒状,菌丝白色,细长,密集,辐射状生长,菌落边缘雪花状	菌丝无色,有隔膜,分生孢子梗粗糙;孢子长圆形
梗孢酵母属 (<i>Sterigmatomyces</i>)	13	10.83	菌落乳白色,湿润,质地粘稠,易被挑起,反面米黄色	-
毕赤酵母属 (<i>Meyerozyma</i>)	14	11.67	菌落米白色,湿润,粘稠,易被挑起,菌落反面米黄色	-

2.2 珊瑚附生真菌的组成和分布

各样品上珊瑚附生真菌分离结果如表 3 所示,小叶鹿角珊瑚分离到的菌株数量和种类最多,为 45 株(10 种),占分离总数的 37.5%。角孔珊瑚上分离到 37 株(10 种),扁脑珊瑚上分离到 27 株(7 种)。花鹿角珊瑚上分离的菌株最少,仅 11 株(4 种)。从表 3 可以看出,不同珊瑚样品上真菌种类分布有较大差异,橘青霉(*Penicillium citrinum*)在 4 种珊瑚样

品上较为常见,都有分离得到。而其他真菌仅在部分珊瑚样品中分离得到,如黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)、群集裂褶菌(*Schizophyllum commune*)和隔孢伏革属均来源于小叶鹿角珊瑚。焦曲霉(*Aspergillus ustus*)、篮状菌属(*Talaromyces verruculosus*)和梗孢酵母属真菌只在角孔珊瑚上分离得到。拟茎点霉属仅在扁脑珊瑚上分离得到。

表 3 三亚 4 种珊瑚样品上附生真菌的分布

Tab. 3 Diversity and distribution of fungi isolated from four corals in Sanya

真菌种类	真菌数量/株			
	扁脑珊瑚	角孔珊瑚	小叶鹿角珊瑚	花鹿角珊瑚
枝顶孢属(<i>Acremonium</i> sp.)	1	-	-	1
黄曲霉(<i>Aspergillus flavus</i>)	-	-	2	-
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	3	3	-	-
焦曲霉(<i>Aspergillus ustus</i>)	-	1	-	-
杂色曲霉(<i>Aspergillus versicolor</i>)	-	-	16	-
枝孢属(<i>Cladosporium halotolerans</i>)	2	3	-	-
季也蒙毕赤酵母(<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	-	7	1	6
产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)	-	10	1	1
橘青霉(<i>Penicillium citrinum</i>)	1	1	6	3
梅花状青霉(<i>Penicillium herquei</i>)	14	1	2	-
菌核青霉(<i>Penicillium sclerotiorum</i>)	5	7	2	-
隔孢伏革属(<i>Peniophora</i> sp.)	-	-	2	-
拟茎点霉属(<i>Phomopsis</i> sp.)	1	-	-	-
群集裂褶菌(<i>Schizophyllum commune</i>)	-	-	1	-
梗孢酵母属(<i>Sterigmatomyces</i> sp.)	-	1	12	-
篮状菌属(<i>Talaromyces verruculosus</i>)	-	1	-	-
分离菌株数(种类)	27(7)	37(10)	45(10)	11(4)

通过相似性系数的结果比较(表 4),可以发现角孔珊瑚与扁脑珊瑚、角孔珊瑚与小叶鹿角珊瑚之间的相似性系数均大于 0.5,说明它们之间的附生真菌菌群有较高的相似性。其他珊瑚样品之间分离

获得的附生真菌菌群的相似性系数均小于 0.5,反映出它们之间附生真菌多样性水平差异较大,相近程度较低。

表 4 4 个珊瑚样品之间真菌群落结构相似性系数

Tab. 4 Similarity coefficient of fungal community associated with four different coral samples

珊瑚名称	扁脑珊瑚	角孔珊瑚	小叶鹿角珊瑚	花鹿角珊瑚
扁脑珊瑚	1.000 0	0.588 2	0.352 9	0.363 6
角孔珊瑚	0.588 2	1.000 0	0.600 0	0.428 6
小叶鹿角珊瑚	0.352 9	0.600 0	1.000 0	0.428 6
花鹿角珊瑚	0.363 6	0.428 6	0.428 6	1.000 0

2.3 5 种培养基对珊瑚附生真菌分离能力的比较

本研究采用 5 种培养基对珊瑚附生真菌进行分离培养,结果如表 5 所示,这 5 种培养基都可以分离培养得到珊瑚附生真菌,但其分离得到的真菌的种类和数量是有区别的.其中,YM 培养基和 CDA 培养基上分离得到的菌株数量最多,分别为 35 株(12 种)和 32 株(12 种),累计占分离总菌数量的 55.83%.其次,Martin 培养基上分离到 20 株,7 个种类的真菌菌株.RBM 培养基和 PDA 培养基分离得

到的菌株数量最少,分别为 17 株(9 种)和 16 株(7 种).有 4 种真菌杂色曲霉、橘青霉、梅花状青霉(*Penicillium herquei*)和菌核青霉(*Penicillium sclerotiorum*)可以同时从 5 种培养基上分离得到.此外,有 3 株真菌篮状菌属、焦曲霉属和拟茎点霉属真菌只在 CDA 培养基上分离到,体现了珊瑚附生真菌对培养基的偏好性.由此可见,本研究中选用的 5 种培养基较好的实现了营养组分互为补充.YM 和 CDA 培养基最适于分离珊瑚附生真菌.

表 5 5 种培养基上珊瑚附生真菌的分布

Tab.5 Distribution of coral symbiotic fungi on five media

真菌种类	真菌数量/株				
	YM	PDA	Martin	CDA	RBM
枝顶孢属(<i>Acremonium</i> sp.)	-	-	-	1	1
黄曲霉(<i>Aspergillus flavus</i>)	1	-	-	1	-
黑曲霉(<i>Aspergillus niger</i>)	2	1	2	-	2
焦曲霉(<i>Aspergillus ustus</i>)	-	-	-	2	-
杂色曲霉(<i>Aspergillus versicolor</i>)	2	2	2	9	1
枝孢属(<i>Cladosporium halotolerans</i>)	2	-	-	3	-
季也蒙毕赤酵母(<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	3	3	4	-	4
产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)	7	-	-	4	1
橘青霉(<i>Penicillium citrinum</i>)	2	1	1	4	3
梅花状青霉(<i>Penicillium herquei</i>)	3	3	5	4	2
菌核青霉(<i>Penicillium sclerotiorum</i>)	4	3	4	1	2
隔孢伏革属(<i>Peniophora</i> sp.)	1	-	-	1	-
拟茎点霉属(<i>Phomopsis</i> sp.)	-	-	-	1	-
群集裂褶菌(<i>Schizophyllum commune</i>)	1	-	-	-	-
梗孢酵母属(<i>Sterigmatomyces</i> sp.)	7	3	2	-	1
篮状菌属(<i>Talaromyces verruculosus</i>)	-	-	-	1	-
分离菌株数(种类)	35(12)	16(7)	20(7)	32(12)	17(9)

2.4 真菌 ITS-rRNA 序列进化分析

通过 Blastn 分析,确定了 16 种具有代表性的真菌种属.所有真菌都与 NCBI 数据库中已知的真菌的 ITS 序列相似度在 99%~100% 之间.具体序列比对鉴定结果如表 6 所示.16 种真菌在真菌分类学上

隶属于 6 个真菌纲.在所有的 6 个真菌纲中,散囊菌纲的真菌多样性最高,有 10 种真菌.其余的真菌纲分离获得的菌株种类分别为:伞菌纲(2 种)、伞型束梗孢菌纲(1 种)、座囊菌纲(4 种)、酵母纲(1 种)和粪壳菌纲(2 种).

表 6 基于 ITS 序列比对分析的三亚珊瑚附生真菌鉴定结果

Tab.6 Identification of coral symbiotic fungi from Sanya based on ITS sequence analysis

菌株编号	登录号	NCBI 中最相近真菌种属及登录号	真菌纲	相似度/%	真菌数量/株
SY1	KY651184	枝孢属(<i>Cladosporium halotolerans</i>), KU059910	座囊菌纲	100	5
SY2	KY651185	隔孢伏革属(<i>Peniophora</i> sp.), JN198493	伞菌纲	99	2

续表 6

菌株编号	登录号	NCBI 中最相近真菌种属及登录号	真菌纲	相似度/%	真菌数量/株
SY3	KY651186	篮状菌属 (<i>Talaromyces verruculosus</i>), KM278101	粪壳菌纲	100	1
SY4	KY651187	产黄青霉 (<i>Penicillium chrysogenum</i>), KU847864	散囊菌纲	100	12
SY5	KY651188	枝顶孢属 (<i>Acremonium</i> sp.), GU973795	粪壳菌纲	99	2
SY6	KY651189	黄曲霉 (<i>Aspergillus flavus</i>), KT989426	散囊菌纲	100	2
SY7	KY651190	橘青霉 (<i>Penicillium citrinum</i>), KP992928	散囊菌纲	100	11
SY8	KY651191	杂色曲霉 (<i>Aspergillus versicolor</i>), KX254916	散囊菌纲	100	16
SY9	KY651192	季也蒙毕赤酵母 (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>), KY104257	酵母纲	100	14
SY10	KY651193	群集裂褶菌 (<i>Schizophyllum commune</i>), KX555525	伞菌纲	100	1
SY11	KY651194	拟茎点霉属 (<i>Phomopsis</i> sp.), FJ233186	粪壳菌纲	100	1
SY12	KY651195	焦曲霉 (<i>Aspergillus ustus</i>), AY373877	散囊菌纲	100	2
SY13	KY651196	梅花状青霉 (<i>Penicillium herquei</i>), JQ863240	散囊菌纲	100	17
SY14	KY651197	梗孢酵母属 (<i>Sterigmatomyces</i> sp.), FJ770079	伞型束梗孢菌纲	100	13
SY15	KY651198	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>), LC195003	散囊菌纲	100	6
SY16	KY651199	菌核青霉 (<i>Penicillium sclerotiorum</i>), KT959297	散囊菌纲	100	14

本研究所获得的可培养真菌的 ITS 序列在 GenBank 的登录号是 KY651184 - KY651199. 选取每种真菌 GenBank 数据库中相似度最高的 ITS 参照序列, 与获得的 16 种真菌 ITS 序列一起, 以 Neighbor-Joining 构建系统进化树 (图 1), 进化树显示所有分离得到的真菌, 担子菌门真菌种类仅有 SY2、SY10 和 SY14 等 3 种真菌类型. 其余均为子囊菌门真菌.

2.5 讨论

根据已开展的南海珊瑚可培养附生真菌多样性的研究^[17-22], 目前已报道的珊瑚附生真菌属包括: 青霉属、曲霉属、枝孢属、枝顶孢属、拟茎点霉属、裂褶菌属、链格孢属 (*Alternaria*)、黑孢霉属 (*Nigrospora*)、丛赤壳属 (*Nectria*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、德巴利氏酵母属 (*Debaryomyces*)、赤霉菌属 (*Gibberella*)、细脚棒束孢属 (*Isaria*)、透孢黑团壳属 (*Massarina*)、拟叉壳属 (*Microsphaeropsis*)、茎点霉属 (*Phoma*)、漆斑霉属 (*Myrothecium*)、黑孢属 (*Nigrospora*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、铁艾酵母属 (*Tilletiopsis*)、枝氯霉属 (*Ramichloridium*)、木霉属 (*Trichoderma*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*)、鬼伞属 (*Coprinellus*)、散囊菌属 (*Eurotium*)、节菱孢属 (*Arthrinium*)、葡萄穗霉菌属 (*Stachybotrys*)、木霉属 (*Trichoderma*)、麦轴梗霉属 (*Tritirachium*)、肉座菌属 (*Hypocrea*)、旋孢腔菌属 (*Cochliobolus*)、弯孢聚壳属 (*Eutypella*)、硬孔菌属 (*Rigidoporus*)、壳多孢属 (*Stagonospora*)、明脐霉属

(*Exserohilum*)、*Didymellaceae*、*Peyronella*、*Purpureocillium*、*Lecanicillium*、*Myrmecridium*、*Teratosphaeria*、*Cochliobolus*、*Leptosphaerulina*、*Stachybotrys* 等种类丰富的海洋真菌. 本研究从 4 种珊瑚上分离鉴定的 120 株真菌中, 除了分离到与上述研究中共有的真菌种类以外, 还分离到了篮状菌属、隔孢伏革属、梗孢酵母属和毕赤酵母属这些并未在南海珊瑚上分离到的真菌种类. 此外, 本研究中所涉及的 4 种珊瑚, 除了角孔珊瑚以外, 其他 3 种珊瑚并未有附生真菌的相关报道. 肖胜蓝等 (2001) 从徐闻珊瑚礁自然保护区采集的斯氏角孔珊瑚 (*Goniopora stutchburyi*) 和二异角孔珊瑚 (*Goniopora duofasciata*) 上分离到了包括曲霉属、枝孢属、镰刀菌属、木霉属和青霉属真菌^[14]. 本研究从角孔珊瑚上分离到了包括曲霉属、枝孢属、青霉属、梗孢酵母属、篮状菌属和毕赤酵母属真菌. 通过比较珊瑚附生真菌多样性的研究, 发现相同海域或者不同地区的珊瑚上的附生真菌的多样性不尽完全相同, 推测可能是由珊瑚种类或者珊瑚生存的环境差异导致的, 比如水质、水温、水流、营养物质和含氧量等. 但是这些区域的主要类群以青霉、曲霉、枝孢属真菌为主, 这种相似性又表明了不同海域之间可能存在某些相同的环境因子. 但是这些环境因子还有待我们进一步发掘.

本研究尝试采用 5 种不同的真菌培养基力求最大程度的对 4 种珊瑚上的附生真菌进行分离培养,

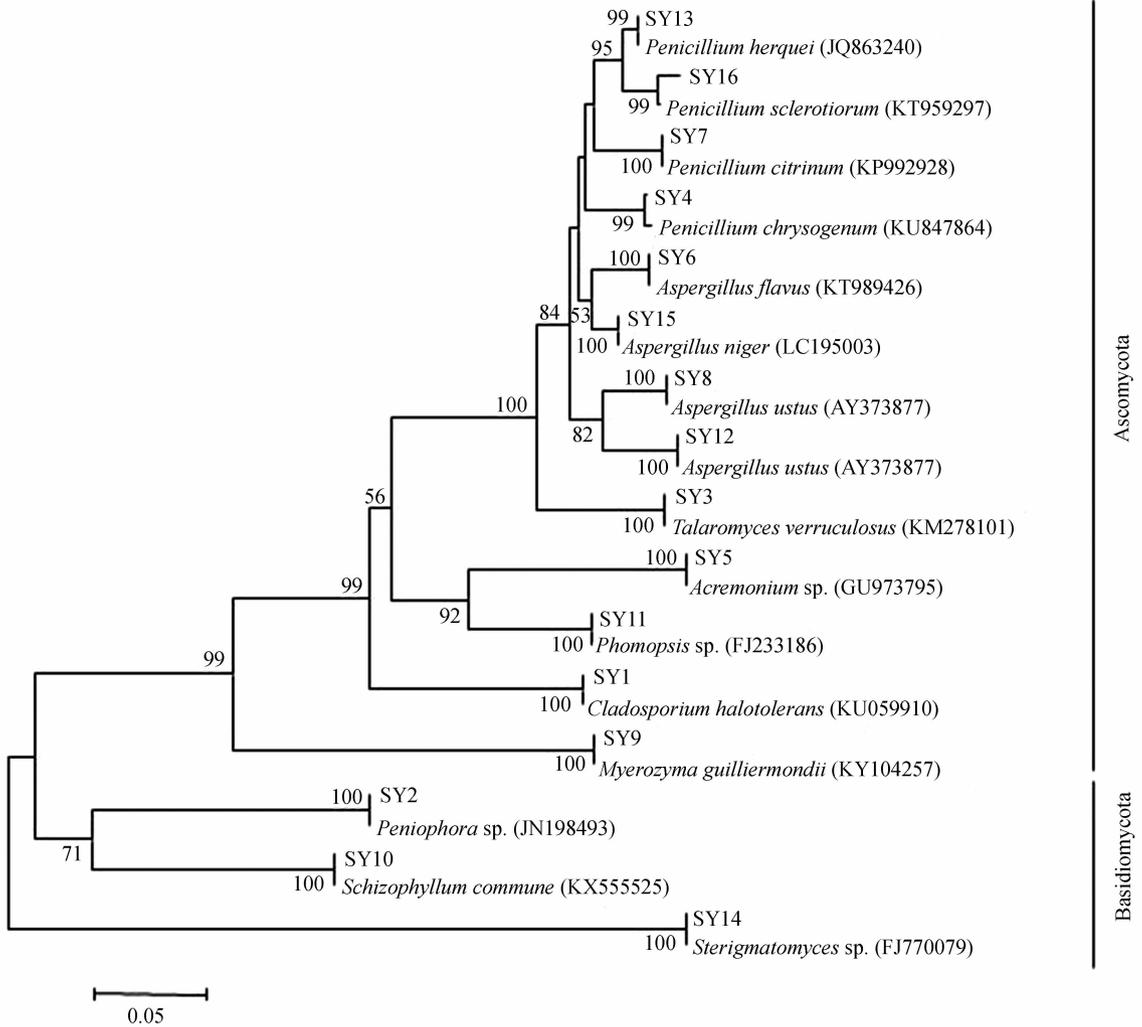


图 1 采用邻接法构建的基于 ITS 序列的珊瑚附生真菌系统进化树

Fig. 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree of coral symbiotic fungi from ITS sequence analysis

结果显示一些真菌如橘青霉、杂色曲霉、梅花状青霉和菌核青霉 4 种真菌可以同时从 5 种培养基上分离得到。而另一些真菌仅在 1 种培养基中分离到,如篮状菌属、拟茎点霉属和焦曲霉属真菌只在 CDA 培养基上分离到,体现了真菌分离培养基具有对菌株形态、生理生化特性的偏好性。尽管通过分离培养的方法在珊瑚上获得了大量附生真菌,但由于可培养的方法限定了一些培养条件,导致这些真菌在其它的海洋环境或陆地环境的基质上也都被分离得到,且与数据库中的真菌种类具有极高的相似度,不能全面反映珊瑚附生真菌多样性的真实信息。近年来也有一些研究报道了通过免培养方法来获取珊瑚附生真菌群落结构多样性信息。Wegley 等(2007)使用宏基因组学的方法对微孔珊瑚进行微生物分析,发现真菌约占珊瑚基因组的 38%,这些真菌属于子囊菌门,担子菌门和壶菌门。其中子囊菌门在其中具有优势地位(约占真菌总量的 97%),包括了 4 个纲,分

别是粪壳菌纲、散囊菌纲、酵母纲和裂殖酵母纲^[7]。Amended 等(2011)用高通量测序的方法对鹿角珊瑚中附生真菌的多样性进行研究,发现这些免培养的真菌属于黑粉菌纲、散囊菌纲、伞菌纲和座囊菌纲等 4 个真菌纲^[35]。本研究从 4 个珊瑚样品中并未分离到壶菌门真菌。而且本研究从鹿角珊瑚上分离得到的锤舌菌纲,囊担菌,微球黑粉菌纲,银耳纲和伞型束梗孢菌纲真菌并未在高通量测序结果中检测到。由于两种方法都各有优缺点,因此非常有必要将分离培养技术和免培养分子生物学技术(如直接提取珊瑚总基因组 DNA 进行高通量测序)结合起来研究珊瑚上的共附生真菌多样性。值得一提的是, Toledo-Hernandez 等(2008)在研究柳珊瑚附生真菌的多样性时,指出样品的处理方法也会造成真菌多样性的差异,如样品大小、组织处理与收集方法、较小的组织碎片都会对真菌数量和多样性造成影响^[36]。

3 结论

通过分离培养结合 ITS 序列测定的方法,我们对南海的扁脑珊瑚、角孔珊瑚、小叶鹿角珊瑚和花鹿角珊瑚上附生真菌多样性进行研究. 所有珊瑚样品上都分离到了大量种类丰富的真菌,除了分离到占有优势地位的青霉属和曲霉属真菌以外,还有很多之前并未在南海珊瑚上分离得到的真菌种类. 本研究不仅提高了现有对中国南海珊瑚上可培养共生真

菌资源多样性的认识,也为后续利用珊瑚来源的真菌生产活性代谢产物提供了种质资源. 此外,由于本研究中仅用了 ITS 基因作为分子标记基因进行真菌的分类鉴定,对于 ITS 基因差异小的菌株,如某种属复合体,ITS 就不适合同一属内种的鉴定,此时选择多样性的分子标记基因(18S、28S rRNA 基因)或者结合形态学和生理生化特征将有助于进一步明确分离获得真菌的种属地位.

参考文献:

- [1] 周进,晋慧,蔡中华. 微生物在珊瑚礁生态系统中的作用与功能[J]. 应用生态学报,2014,25(3):919-930.
- [2] Nagelkerken I K, Smith G W, Bonair K. Widespread disease in Caribbean sea fans; II. Patterns of infection and tissue loss [J]. Marine Ecology Progress Series, 1997, 160:255-263.
- [3] Geiser D M, Taylor J W, Ritchie K B, et al. Cause of sea fan death in the West Indies[J]. Nature, 1998, 6(394):137-138.
- [4] Alker A P, Smith G W, Kiho K. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals[J]. Hydrobiologia, 2001, 460(1/3):105-111.
- [5] Preedanon S, Phongpaichit S, Rungjindama N, et al. *Aspergillus* of the gorgonian sea fan *Annella* sp. after the 2004 tsunami at Mu Ko Similan National Park, Andaman Sea, Thailand[J]. Coral Reefs, 2006, 25(2):296.
- [6] Rypien K L, Baker D M. Isotopic labeling and antifungal resistance as tracers of gut passage of the sea fan pathogen *Aspergillus sydowii*[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2009, 86(1):1-7.
- [7] Wegley L, Edwards R, Rodriguez-Brito B, et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Poritesastreoides*[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(11):2 707-2 719.
- [8] Putri D A, Radjasa O K, Pringgenies D. Effectiveness of marine fungal symbiont isolated from soft coral *Sinularia* sp. from Pangang Island as antifungal[J]. Procedia Environmental Sciences, 2015, 23:351-357.
- [9] Canosa B J, Duenas L F, Sanchez J A. Isolation of potential fungal pathogens in gorgonian corals at the Tropical Eastern Pacific [J]. Coral Reefs, 2013, 32(1):35-41.
- [10] Toledo-Hernández C, Zuluaga-Montero A, Bones-González A, et al. Fungi in healthy and diseased sea fans (*Gorgonia ventalina*): is *Aspergillus sydowii*, always the pathogen? [J]. Coral Reefs, 2008, 27(3):707-714.
- [11] Yarden O, Ainsworth T D, Roff J, et al. Increased prevalence of ubiquitous Ascomycetes in an acroporid coral (*Acroporaformosa*) exhibiting symptoms of brown band syndrome and skeletal eroding band diseases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(8):2 755-2 757.
- [12] Ramosflores T. Lower marine fungus associated with black line disease in star corals (*Montastrea annularis*, E and S)[J]. Biological Bulletin, 1983, 165(2):429-435.
- [13] Raghukumar C, Raghukumar S. Fungal invasion of massive corals[J]. Marine Ecology, 1991, 12(3):251-160.
- [14] 肖胜蓝,雷晓凌,徐佳,等. 徐闻 8 种珊瑚附生真菌的分离及初步鉴定[J]. 广东海洋大学学报:自然科学版,2011, 31(6):91-95.
- [15] 肖胜蓝. 徐闻 3 种石珊瑚附生可培养真菌多样性及其抗菌活性的研究[D]. 湛江:广东海洋大学,2012.
- [16] 徐佳,陈彬,雷晓凌,等. 丛生盔形珊瑚附生可培养真菌多样性分析[J]. 微生物学通报,2011,38(8):1 193-1 198.
- [17] 王亚楠. 中国南海柳珊瑚附生微生物多样性与抗菌作用研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2012.
- [18] Zhang X Y, Bao J, Wang G H, et al. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of the South China Sea gorgonians[J]. Microbial Ecology, 2012, 64(3):617-627.
- [19] Wang Y N, Shao C L, Zheng C J. Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekeka* from the South China Sea[J]. Marine Drugs, 2011, (9):1 379-1 390.
- [20] Li J, Zhong M, Lei X, et al. Diversity and antibacterial activities of culturable fungi associated with coral *Porites pukoensis* [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2014, 30(10):2 551-2 558.
- [21] Zhang X Y, Sun Y L, Bao J, et al. Phylogenetic survey and antimicrobial activity of culturable microorganisms associated with the South China Sea black coral *Antipathes dichotoma*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2012, 336(2):122-130.
- [22] 张丹,蒋群,李英新,等. 中国南海海绵和珊瑚共附生真菌多样性及其抑菌活性研究[J]. 中国海洋药物,2015,34(2):1-

9.

- [23] 周静,陈敏,李筠,等.一株网刺柳珊瑚 *Echinogorgia* sp. 共附生真菌 *Peniophora* sp. 次级代谢产物研究[J]. 中国海洋药物,2012,31(4):8-13.
- [24] 刘楠,李英新,李志勇,等.珊瑚来源真菌天然产物及其活性的研究进展[J]. 中国海洋药物,2014,33(4):73-84.
- [25] Zhang D, Satake M, Fukuzawa S, et al. Two new indole alkaloids, 2-(3,3-dimethylprop-1-ene)-costaclavine and 2-(3,3-dimethylprop-1-ene)-epicostaclavine, from the marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Journal of Natural Medicines, 2012, 66(1):222-226.
- [26] Khamthong N, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S, et al. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51 [J]. Tetrahedron, 2012, 68(39):8 245-8 250.
- [27] Shao C L, Wu H X, Wang C Y, et al. Potent antifouling resorcylic acid lactones from the gorgonian-derived fungus *Cochliobolus lunatus*[J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(4):629-633.
- [28] Bao J, Sun Y L, Zhang X Y, et al. Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023 [J]. Journal of Antibiotics, 2013, 66(4):219-223.
- [29] Bao J, Zhang X Y, Xu X Y, et al. New cyclic tetrapeptides and asteltoxins from gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076 [J]. Tetrahedron, 2013, 69(9):2 113-2 117.
- [30] Zhuang Y, Teng X, Wang Y, et al. Cyclopeptides and polyketides from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4 [J]. Tetrahedron, 2011, 67(37):7 085-7 089.
- [31] Wei M Y, Li D, Shao C L, et al. (±)-Pestalachloride D, an antibacterial racemate of chlorinated benzophenone derivative from a soft coral-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. [J]. Marine Drugs, 2013, 11(4):1 050-1 060.
- [32] Tseng W R, Huang C Y, Tsai Y Y, et al. New cytotoxic and anti-inflammatory steroids from the soft coral *Klyxum flaccidum* [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(14):3 253-3 257.
- [33] Zhang Y J, Zhang S, Liu X Z, et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(1):114-118.
- [34] Zhang T, Wei X L, Wei Y Z, et al. Diversity and distribution of cultured endolichenic fungi in the Ny-Alesund Region, Svalbard (High Arctic) [J]. Extremophiles, 2016, 20(4):461-470.
- [35] Amended A S, Barshis D J, Oliver T A. Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages [J]. International Society for Microbial Ecology, 2011, 6(7):1 291-1 301.
- [36] Toledo-Hernández C, Bones-González A, Ortiz-Vázquez O E, et al. Fungi in the sea fan *Gorgonia ventalina*: diversity and sampling strategies [J]. Coral Reefs, 2007, 26(3):725-730.

Diversity of cultivable fungi associated with four coral species from the South China Sea

GUO Shuang-shuang^{1,2}, XU-Wei¹, Siti Aisyah Alias³, HE Gao-yang¹, LUO Zhu-hua¹

(1. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resource, Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China;

2. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3. Institute of Ocean and Earth Science, University of Malaya, Kuala Lumpur 50603, Malaysia)

Abstract: The diversity of culturable fungi derived from four coral species from the South China Sea were investigated in this study. By spread plate method, YM, PDA, Martin, CDA, RBM media were used to isolate coral-associated fungi. Identification and phylogenetic analysis of coral-associated fungi were conducted based on ITS-rRNA gene sequencing. A total of 120 fungi strains were isolated from 4 corals (*Platygyra* sp., *Goniopora* sp., *Acropora microphthalma* and *Acropora florida*) and these fungi strains belong to 11 genera, including *Penicillium* (56 strains), *Aspergillus* (25 strains), *Acremonium* (2 strains), *Cladosporium* (5 strains), *Meyerozyma* (14 strains), *Peniophora* (2 strains), *Phomopsis* (1 strain), *Schizophyllum* (1 strain), *Sterigmatomyces* (13 strains) and *Talaromyces* (1 strain). The most diverse coral species was *Acropora microphthalma* and *Acropora florida*, both including 6 genus and 10 species. Fungal species distribution varied among different coral species.

Peniophora sp. and *Schizophyllum commune* were only recovered from the coral species *Acropora microphthalma*, while *Sterigmatomyces* sp. and *Talaromyces verruculosus* were only present in the coral species *Goniopora* sp. . Only one strain *Phomopsis* sp. was obtained from coral *Platygyra* sp. Total number and species of culturable fungal strains recovered from the five media. YM media recovered the highest amount of fungal strains, accounting for 29.17% of the total strains. CDA media recovered the most diverse fungal species. These results suggest that there are diverse fungal symbionts associated with corals collected from the South China Sea, which are important sources for marine bioactive compounds.

Key words: marine biology; coral; fungi; diversity; the South China Sea

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2018. 01. 004

(责任编辑:方建勇)