

西藏圆齿红景天茎内曲霉属真菌系统发育分析

向明学¹, 金鹏杰², 段双全¹, 许鹏辉¹, 拉多^{1*} (1. 西藏大学, 西藏拉萨 850000; 2. 拉萨北京实验中学, 西藏拉萨 850000)

摘要 [目的] 对从健康的新鲜西藏景天科植物圆齿红景天茎内分离得到的曲霉属菌株进行形态学观察以及从分子生物学水平进行分离鉴定。[方法] 用载片培养法进行菌株的判定和生物学特性的试验, 利用 rRNA 基因 ITS 间隔区建立进化树分析法, 进行该真菌的系统发育阐明。[结果] 菌落在改良型 KB 培养基上和 PDA 培养基上形态表现一致, 起初菌落为白色绒毛状, 边缘列片状, 浓密而不透明, 基部菌丝体厚、平坦, 具沟纹、绒毛状质地, 菌株为无性型。通过分子生物学的 rRNA 基因 ITS 间隔区系统发育建立进化树的方法鉴定分离出的菌株为曲霉属黄绿组真菌。[结论] 通过对菌落外部形态的观察、分析以及从分子生物学角度的无性型 rRNA 基因 ITS 间隔区系统发育分析, 得知分离得到的菌株属于半知菌亚门曲霉属黄绿组真菌的一种。

关键词 圆齿红景天; 曲霉属黄绿组; 系统发育; ITS 间隔分析; 西藏
中图分类号 S567.23 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)05-0117-03

Phylogenetic Analysis of *Aspergillus* Fungus in the Stem of *Rhodiola crenulata* of Tibet
XIANG Ming-xue¹, JIN Peng-jie², DUAN Shuang-quan¹ et al (1. Tibet University, Lhasa, Tibet 850000; 2. Lhasa Beijing Experimental Middle School, Lhasa, Tibet 850000)

Abstract [Objective] The morphological observations of *Aspergillus* strains isolated from the stem of the healthy fresh Tibet crassulaceae plants were studied and the separation and identification were conducted from the molecular biological level. [Method] The determination of the strains and the biological characteristics of the strain were carried out with the method of carrying plate culture, and the evolution tree analysis was established using the rRNA gene ITS interval region, and the system development of the fungus was elucidated. [Result] Colony in modified form KB medium and form was consistent in PDA medium, at first colony for white villous, edge column flake, dense and opaque, mycelium thick at base flat provides quality, grooving villous strains for asexual. The isolated strain of the evolutionary tree were identified as the yellow-green group fungus of *Aspergillus* by the molecular biology of the rRNA gene ITS interval regional system development. [Conclusion] Through the observation and analysis of the external morphology of the colony and the phylogenetic analysis of the ITS spacer region of the asexual rRNA gene from the point of view of molecular biology, it is known that the isolated strain belongs to the fungus of the yellow-green group of *Aspergillus*.

Key words *Rhodiola crenulata*; Yellow and green groups of *Aspergillus*; Phylogeny; ITS interval analysis; Tibet

圆齿红景天(*Rhodiola crenulata*), 为蔷薇目景天科(Cras-sulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.) 多年生的草本植物, 其主要分布在青藏高原, 在我国四川、甘肃、云南等地也都有分布^[1]。其根和茎多数可以入药, 据《四部医典》记载红景天有治疗心血管疾病和肺结核的功效, 现代医学研究表明, 红景天还具有抗缺氧、抗疲劳的功效^[2-3], 但对其植物内生菌的研究甚少。该试验基于健康的新鲜西藏圆齿红景天茎内曲霉属黄绿组真菌的鉴定, 采用形态学观察与分子生物学 rRNA 基因 ITS 间隔区系统发育分析的方法相结合, 并对其生态特征进行鉴定, 有助于进一步鉴定圆齿红景天生菌种类和真菌的次生代谢产物的作用以及产物的理化性质的分析, 从而为红景天药用价值的开发与利用提供微生物学上的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。试验样品为健康的新鲜西藏景天科圆齿红景天植株, 来自西藏自治区林芝地区工布江达县米拉山东坡, 海拔 5 013 m。

1.1.2 培养基。PDA 培养基: 葡萄糖 10 g、土豆 200 g、琼脂 15 g、蒸馏水, 定容到 1 000 mL。改良型 KB 培养基: 葡萄糖 10 g、蛋白胨 10 g、酵母膏 1 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、琼脂 20 g; 定容到 1 000 mL^[3-4]。

作者简介 向明学(1991—), 男, 四川遂宁人, 硕士研究生, 研究方向: 植物学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事生态学研究。
收稿日期 2017-12-07

1.1.3 分子生物学试剂。DNA 提取试剂: PBS 缓冲液、Lyti-case(sigmaL4025)、DNA 快速提取试剂盒(货号 DN1112)。PCR 扩增试剂: ITS1 和 ITS4 引物、2XTaq MasterMix 测序试剂盒、1.2% 琼脂糖、ABI BigDye Terminator v3.1 测序试剂盒、扩增 50 μL 体系。引物序列为: ITS1 TCCGTAGGTGAACCT-GCGG; ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理和培养方法。将样品用自来水洗净之后, 在无菌接种通风箱中, 用巴氏消毒液反复冲洗样品表面, 并放入接种箱内紫外灭菌 30 min; 然后取样品的茎切成长 3~4 cm, 再纵向对切, 并放入盛有次氯酸钠溶液的烧杯中 10 min; 再依次用硫代硫酸钠、乙醇、无菌水冲洗, 接入改良型 KB 培养基和 PDA 培养基中, 将接种后的 2 种培养基放入 25℃ 恒温培养箱中连续培养 12 d。

1.2.2 菌株的分离纯化。12 d 后取 2 种培养基, 在无菌接种通风箱中, 用灭菌后的接种环将 2 种培养基所得的菌落挑取、接种到新的改良型 KB 培养基和 PDA 培养基中, 接种完毕后放入 25℃ 恒温培养箱中连续培养 12 d。以此培养方法重复多次, 直至所得菌株形态、颜色一致, 并无其他杂菌混入, 那么所得菌株即为目的菌株。

1.2.3 菌株及菌株孢子形态观察方法。将从西藏圆齿红景天茎内分离得到的目的菌株接种于改良型 KB 培养基和 PDA 培养基上, 观察其菌丝的生长状态、孢子的颜色以及改良型 KB 培养基和 PDA 培养基基质的颜色^[4]。

挑取少许目的菌株, 以点接的方式接入到配置好的 PDA 和改良型 KB 培养基中, 放入 23~25℃ 智能温控培养箱培

养;观察到培养基表面菌丝刚开始生长时,用已消毒好的医用手术刀切取长宽为 2 cm×2 cm 的培养基移到灭菌的载玻片上并盖上盖玻片^[5],放入智能温控培养箱中,湿度控制在 60%~80% 继续培养,在显微镜下 2 d 观察一次孢子的发育情况。

1.2.4 PCR 试验。

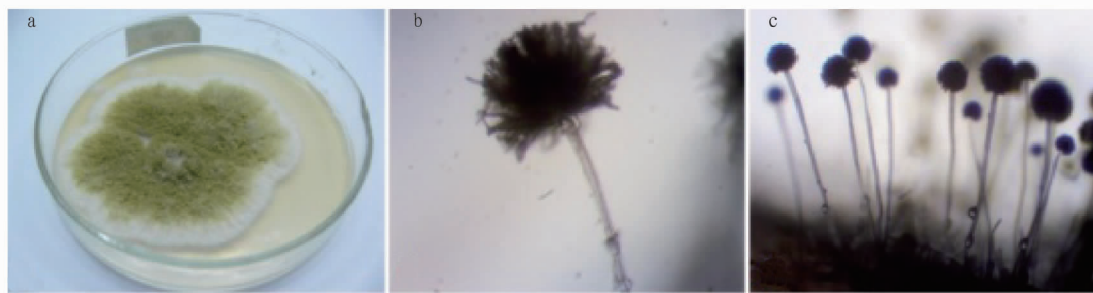
1.2.4.1 菌株 DNA 的提取。挑取真菌菌丝,加到 PBS 缓冲液中,加入 100 μL 的 Lyticase (sigma I4025),37 ℃ 破壁处理 30 min。然后用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒 (货号 DN1112) 提取基因组 DNA,提取的 DNA 用于基因扩增。

1.2.4.2 rRNA 基因 ITS 区间片段的扩增。使用 2XTaq MasterMix 扩增 (ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG;ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC;引物由北京博迈德基因技术有限公司提供);扩增 50 μL 体系:10×buffer 5 μL,dNTPs 4 μL,上下游引物各 2 μL,加入模板 2 μL,rTaq 酶 0.25 μL,最后加超纯水至 50 μL。反应条件为 94 ℃ 预变性 300 s;94 ℃ 变性 50 s;58 ℃ 退火 50 s;72 ℃ 延伸 60 s;如此循环 30 次,最后 72 ℃ 补齐 10 min。

1.2.4.3 rRNA 基因 ITS 区间片段序列的测定。配置 1.2% 的琼脂糖 DNA 胶,对得到的扩增产物进行凝胶电泳鉴定,条带涌动到合适位置时,在凝胶成像中找到目的条带并进行回收。对回收到的目的条带送往北京博迈德基因公司进行 DNA 序列测定。

2 结果与分析

2.1 菌株形态 在 25 ℃ 恒温培养箱中培养连续 12 d 后,



注:a.曲霉属菌株菌落;b.菌丝孢子头(100倍);c.菌丝形态(100倍)

Note:a. *Aspergillus* strains colonies; b. Mycelial spore head (100 times); c. Mycelial morphology (100 times)

图1 菌落及孢子形态

Fig.1 Colonies and spore morphology

2.2 rRNA 基因 ITS 区间片段的系统发育分析 测得的 ITS 序列提交到 NCBI 网站,登录号为 KT831451,运用 BLAST 进行在线比对,得到许多相似性序列,并下载相似性较高的作为参考序列,运用 Clustal_X2.0 软件进行比对排定;利用生物进化数据分析方法及进化树软件对进化距离(1 000 bp)进行计算并建立系统发育的进化树。

使用 BLAST 在线相似性比对引擎,对序列做相似性分析。对无法人工判定的高覆盖率和高相似度比对结果,采用 *Aspergillus* sp. BM6 KJ567461 做外群比对,运用 MEGA5.0 和 Clustal_X2.0 软件构建系统发育树,得到菌株的聚类分析情况(图 3)。从图 3 可以看出,该菌株(X01 KT831451)属于曲

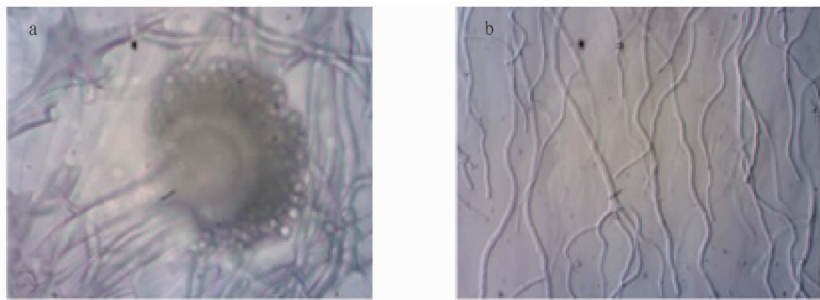
霉属 PDA 培养基和改良型 KB 培养基中得到的 2 种菌株在颜色、形态、气味上均一致,故该试验用改良型 KB 培养基分离纯化所得的菌株为主要研究对象。其分离纯化所得的菌株形态有以下特征:①菌株菌落呈现绿色而且略带黄色菌落,菌落整体较为疏松,表面有部分已经分化产生孢子,所以出现浅淡黄绿色粉末,散发出较淡的霉味(图 1a)。②分生孢子头主要有辐射形或柱形 2 种,颜色以较浅的黄绿色为主,同时呈现渐进变化,由菌落边缘至中心颜色逐渐加深(这与菌落老化后的代谢物以及菌落本身的性质有关),呈现出由浅到深的状态(图 1b)。③分生孢子头顶囊呈圆形,多以球状出现,其梗部由两部分组成,第 1 部分位于外层,第 2 部位于内层,其外层为未完全成熟的分生孢子,类似于放射线的形式较均匀地在顶囊排布,而外层表面大都为基本成熟且即将脱落的分生孢子,以链状为主(图 2)。④分生孢子梗茎透明,表面常有细小绒毛状凸起或凹陷不光滑,但有少数壁光滑,顶囊圆形或者不规则的球形,少数会呈现特殊的圆柱状,大多数均可产生具有生殖能力的分生孢子。⑤分生孢子的产生较为复杂,与大多数单一的双层产孢有差异,其孢子有单层又有双层,即使在一个顶囊,也有较大的差异,其产孢结构既可单双兼有又可只具其一。⑥少数菌由于次生代谢物以及生境或者其他较复杂的因素影响甚至会产生菌核。⑦菌株气生菌丝形成的梗茎不分枝,表面光滑透明、长度为 65 μm,宽 1.2 μm;分生孢子头黑色,外形为疏松柱状,平均直径为 12 μm(图 1c、图 2)。

霉属的真菌。

3 讨论

对比中国真菌志(第五卷)中,将该菌株归属到曲霉属黄绿组真菌的一种。然而,在梗基和瓶梗形态上的描述,与常规的模式物种不尽相同。从不同的分类学方法进行分析,该菌株可以被定位在不同的进化位置,若从真菌的超微形态进行分类,该菌株可以归类于一种淡色孢科曲霉属真菌^[6];若从普通真菌学出发,该菌株则被归类于丛梗孢科曲霉属真菌^[7];在中国菌物中也将其归类到半知菌类丝孢纲丝孢目淡色孢科曲霉属真菌的一种^[8]。该菌株是从健康的新鲜西藏圆齿红景天茎内分离得到的曲霉属真菌,通过分

子生物学的 rRNA 基因 ITS 间隔区系统发育分析,最终确立所研究菌株在系统进化上的确定位置,即曲霉属黄绿组真菌。但是其具体所属种还得做进一步的生理生化试验进行鉴定。



注:a. 菌株孢子头顶囊(400 倍);b. 菌株繁殖菌丝(400 倍)
Note:a. Top sac of strain spore head(400 times) ; b. Reproductive mycelium of strain of mycelial growth (400 times)

图 2 繁殖菌丝
Fig.2 Reproductive mycelium

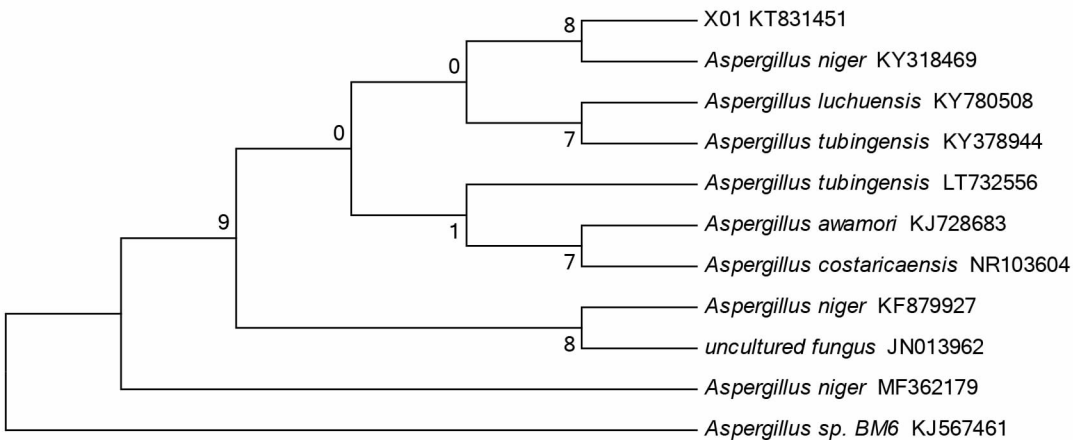


图 3 系统发育分析树
Fig.3 Phylogenetic tree analysis

参考文献

[1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志:第 2 卷[M]. 北京: 科学出版社,1983:68 – 69.

[2] 倪志诚. 西藏经济植物[M]. 北京:北京科学技术出版社,1990:250 – 261.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社,2002:178 – 179.

[4] 段双全,邢顺林,许鹏辉. 西藏龙胆根内寄生附球霉属真菌菌株特性研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(29):14168 – 14171.

[5] 邢顺林,段双全,许鹏辉. 冬青卫矛茎内寄生链格孢属真菌生物学特性分析[J]. 广东农业科学,2012,39(19):131 – 133.

[6] 康振生,黄丽丽,李金玉. 植物病原真菌超微形态[M]. 北京:中国农业出版社,1997:168 – 169.

[7] 邢来君,李明春,魏东盛. 普通真菌学[M]. 北京:高等教育出版社, 2010:172 – 175.

[8] 林晓明,李振岐,侯军,等. 中国菌物[M]. 北京:中国农业出版社,2007: 155 – 158.

科技论文写作规范——标点符号

标点符号按照 GB/T 15834—2011 执行,每个标点占 1 格(破折号占 2 格)。外文中的标点符号按照外文的规范和习惯。注意破折号“——”、一字线“—”(浪纹线“~”)和短横线“-”的不同用法。破折号又称两字线或双连划,占 2 个字身位置;一字线占 1 个字身位置,短横线又称半字线或对开划,占半个字身位置。破折号可作文中的补充性说明(如注释、插入语等),或用于公式或图表的说明文字中。一字线“—”(浪纹线“~”)用于表示标示相关项目(如时间、地域等)的起止。例如 1949—1986 年,北京—上海特别旅客快车。参考文献范围号用“-”。短横线用于连接词组,或用于连接化合物名称与其前面的符号或位序,或用于公式、表格、插图、插图、型号、样本等的编号。外文中的破折号(Dash)的字身与 m 宽,俗称 m Dash,其用法与中文中的破折号相当。外文的连接符俗称哈芬(hyphen)。其中,对开哈芬的字身为 m 字身的一半,相当于中文中范围号的用法;三开哈芬的字身为 m 字母的 1/3,相当于中文中的短横线的用法。