

冷刺激对南海短指软珊瑚中共生细菌影响的初步研究

翁洁畅 杨大顺 蒙健娇 杨一* 罗文
海南省生态环境监测中心, 中国·海南 海口 571126

摘要: 本研究选取南海短指珊瑚, 作为研究对象, 采用高通量测序法, 通过操作分类单元 OTU 和 sobs 分析, 研究冷刺激对目标软珊瑚共生细菌的影响。结果表明: 在冷刺激驯化后, 能够影响珊瑚共生细菌的结构组成, 提高共生细菌应对环境的适应性。

关键词: 短指珊瑚; 珊瑚白化; 共生菌; 温差驯化

Preliminary Research on the Effect of Cold Stimulation on Symbiotic Bacteria in Short Fingered Soft Corals in the South China Sea

Jiechang Weng Dashun Yang Jianjiao Meng Yi Yang* Wen Luo

Hainan Provincial Ecological Environment Monitoring Center, Haikou, Hainan, 571126, China

Abstract: This research selected the South China Sea short fingered coral as the research object, and used high-throughput sequencing to study the effect of cold stimulation on the symbiotic bacteria of the target soft coral by analyzing the operating taxonomic units OTU and Sobs. The results indicate that after cold stimulation domestication, it can affect the structural composition of coral symbiotic bacteria and improve their adaptability to the environment.

Keywords: short fingered coral; coral bleaching; symbiotic bacteria; temperature domestication

1 引言

1.1 珊瑚礁的生态科学研究

珊瑚礁生态系统是海洋三大生态系统之一, 具有很多不可替代的功能和作用^[1]。但近年来, 珊瑚白化的现象经常出现, 对于珊瑚白化的原因, 生物科学家们研究的有温度升高、化学污染物等^[2], 在所有可能导致珊瑚白化因素中, 他们却忽视了低温和细菌感染这两个因素。随着研究的逐步深入, 科学家们发现珊瑚的共生微生物在珊瑚个体中为宿主的能量供给、物质转化等都发挥着极其重要的作用。因此, 研究珊瑚中共生微生物的变化对保护珊瑚礁有着很大的帮助。

1.2 珊瑚与共生细菌的生物学研究

作为珊瑚共生微生物中最重要的共生藻类和共生细菌, 它们与宿主珊瑚之间的相互作用影响关系非常密切。与珊瑚相关的共生细菌主要集中在它们自己的黏液和身体中, 当珊瑚白化时, 它所产生的粘液中一些具有固氮作用的细菌可以代替虫黄藻为珊瑚供给营养, 以帮助珊瑚度过丧失虫黄藻的白化期^[3]。共生细菌不仅对珊瑚的适应性和生存能力很重要, 而且在维持珊瑚健康和稳定微生物群落结构方面同样发挥着重要作用。

1.3 高通量测序技术在珊瑚研究中的应用

高通量测序技术, 对于珊瑚而言, 有着很高的应用价值^[4]。在高通量测序二代技术中, OTU 聚类分析是反映微生物丰度的重要环节。OTU 聚类通过设置分类单元, 并通过序列的分类单元来分析样本中测序结果的信息, 而分类

单元又是由各个 OTU 组成, 根据序列的相似性聚类在同一个 OTU, 最后将这些 OTU 进行统计成表格来对物种丰度的进行分析。论文研究选取南海短指软珊瑚作为研究对象, 在实验室其他因子可控的情况下, 对珊瑚提取的 DNA 进行细菌的 16s 序列^[5]进行扩增并采用高通量测序技术法, 通过 sobs (丰富度实际观察值) 和种类多样性分析, 研究冷刺激对软珊瑚中共生细菌的丰度、群落结构和多样性的影响, 间接的研究珊瑚应对冷刺激的适应性变化机制。

2 实验设计

2.1 材料

在三亚市西瑁岛东侧 3~5m 深的边缘礁上采集实验珊瑚样品材料, 采完后将样本移入实验室进行培养使其恢复活力, 养殖过程维持 30 天以上。通过对其 28s, msh1 基因扩增比对和其骨针形态比对, 鉴定为短指软珊瑚物种。同时, 将恢复活力后的珊瑚进行切片, 切好的珊瑚用标本胶水粘于原型珊瑚底座并置于 4 个养殖缸中, 分别编号为 1 号、2 号、3 号和 4 号。

2.2 实验过程

参考泰国斯米兰岛海域的海水温差范围, 将 4 个养殖缸整个驯化过程中的温差梯度设置为 22℃~26℃, 其中 1 号为 26℃ 的恒温实验对照组, 其他 3 个养殖缸的降温由冷水机控制, 每日降温与升温次数各为 2 次。按以下的步骤进行 30 天的驯化后, 将对照组和温差驯化组同时进行急性降温处理, 使水温短时间内到达 18℃ 并维持 24h, 通过该操作

来模拟泰国斯米兰岛海域曾出现的大规模寒潮来袭现象。

具体驯化过程如下：

1 号缸为实验对照组，养殖周期为 31 天，均控制水温保持在 26℃ 的恒温，并对样本编号为 S_0_1、S_0_2、S_0_3。

2 号缸养殖过程中，持续 30 天都是保持在 26℃ 恒温进行养殖，然后第 31 天突然急速将其降温至 18℃ 并维持 1 天，样本编号为 S_1_1、S_1_2、S_1_3。

3 号缸每日都将缸内的温度由 26℃ 降温至 22℃ 并保持 12h，随后停止降温后让水温恢复至 26℃ 并维持 12h，每日都进行循环的温差操作，这个过程维持 31 天，样本编号为 S_2_1、S_2_2、S_2_3。

4 号缸每日都将缸内温度在 26℃~22℃ 的梯度内循环并维持 30 天，然后第 31 天突然急速将其降温至 18℃ 并维持 1 天，样本编号为 S_3_1、S_3_2、S_3_3。

2.3 技术路线

本研究选取来源于同一母本的 30~40 个短指珊瑚子代个体进行养殖，稳定恢复后进行不同方式的冷刺激处理。处理后的样品，采用高通量测序法，通过 sobs 的数据和群落结构分析，来研究冷刺激对软珊瑚共生细菌的影响。

技术路线如下：

海域采样→分析室培养并切片处理→冷刺激处理→DNA 提取→引物设计→PCR 扩增→Illumina MiSeq 的高通量测序→OTU 聚类分析→共生细菌数据分析。

3 冷刺激对短指软珊瑚共生细菌的影响

3.1 sobs 指数分析

通过 MISEQ 对样本进行测序，对所有样品的优质序列的序列长度进行统计，结果序列长度多集中在 200bp 左右，最后在优质序列中相似度 97% 的水平进行 OTU 归类，将 OTU 分别到门、纲、目、科、属及种的数量中统计分类。

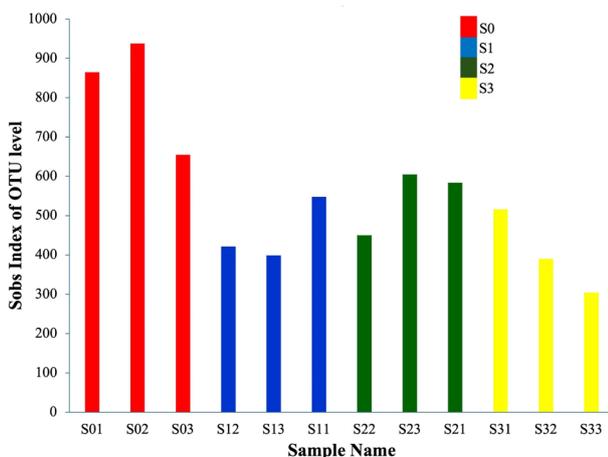


图 1 样本测序 OTUsobs 指数比较分析

如图 1 所示，在样本测序 OTUsobs 指数比较分析中，S_0_1--S_0_3 明显比 S_1_1--S_3_3 样本数值高，同样在属

级和种级的 sobs 指数比较分析中，S0 中的三组数据相比其他几组数据都偏高，说明不论是本级、属级还是种级，常温下的细菌种类数量要比在低温下的细菌种类数量多。

3.2 alpha 多样性分析

表 1 alpha 多样性分析指数统计表

Sample/ Estimators	sobs	shannon	simpson	ace	chao
S_0_1	383	4.28	0.035	393.69	415.5
S_0_2	381	4.29	0.036	392.22	397.7
S_0_3	279	4.23	0.028	284.25	288.1
S_1_1	286	2.66	0.144	331.58	322.4
S_1_2	255	2.58	0.131	317.32	315.2
S_1_3	228	2.32	0.182	257.14	251.8
S_2_1	275	2.69	0.172	291.87	293.4
S_2_2	241	2.52	0.202	251.72	262
S_2_3	278	3.48	0.080	286.04	287.2
S_3_1	312	4.53	0.027	317.49	315.5
S_3_2	220	3.78	0.074	222.87	225
S_3_3	197	4.32	0.026	202.23	209

香农指数 (shannon index) 和辛普森多样性 (Simpson index) 指数都是用来估算样本中微生物多样性的指数之一，在生态学中常用来定量描述一个区域的生物多样性。通常，香农指数值越大，说明群落多样性越高；而和香农指数刚好相反的辛普森多样性指数，其值越大，说明群落多样性越低^[7]。在表 1 中，我们可以看到 S0、S3 香农指数相对 S1、S2 高，说明 S0、S3 的细菌群落多样性较高，且两者多样性比较相近。但对于辛普森指数而言，S0、S3 的样本指数较低，表示细菌群落多样性较高，这与香农指数的结果一致。

Chao 指数^[8]和 Ace 指数^[9]都是生态学中用来估计物种总数常用的指数。本研究通过 Chao 和 Ace 来估算群落中 OTU 的总数目。如表 1 所示，可看出在 Chao 指数中，S0 的均值为 367.13，比 S1 的均值高出 70 左右，而 S2 比 S3 高出 30 左右，说明经过温差驯养的珊瑚遭受低温后细菌群落丰富度的降低会有所减缓。

同样，在 Ace 指数中，S0 与 S1 具有物种丰富度下降的趋势，S2 与 S3 也是同样的经过低温后细菌的丰富度减少，但其下降的幅度不如 S0 与 S1，说明经过温差驯化之后珊瑚共生细菌丰富度的下降趋势能有效减缓，这和 Chao 指数结果一致。

4 结语

根据 Alpha 多样性结合分析估算器得到的四个缸的 sobs (丰度实际指数) 种类数量总数。结合图 1 可见，对照组 S0 和实验组 S1、S2、S3 可得知在属级和种级的 sobs 指数数据比较分析中，对照组 S0 比其他几组数据偏高，说明常温下的细菌种类比在低温下的细菌种类要多，低温不利于一些细菌的存活，甚至会导致细菌的死亡出现。

结合表 1 的香农指数和辛普森指数的数据分析可见,说明 S0、S3 的细菌群落多样性较高。同时,通过 Chao 指数和 Ace 指数的物种总数数据分析,可以一致看出在这四组样本组中他们具有相同的下降趋势,但 S2 与 S3 经过低温后细菌丰富度下降的幅度不如 S0 与 S1 大,说明经过温差驯化之后,能有效减缓珊瑚共生细菌丰富度的下降趋势。

综上所述,通过有规律的冷刺激驯化后,珊瑚共生细菌结构会适当改变群落的均匀度,提高物种的多样性。上述这些变化也许正是珊瑚在冷刺激驯化状态下为应对外界影响作出的内在应对反应。本研究为珊瑚的生物学探讨和珊瑚白化或死亡现象提供部分参考。

参考文献:

- [1] Peter F S. Management of coral reefs: Where we have gone wrong and what we can do about it[J]. Marine Pollution Bulletin,2008(56):805-809.
- [2] Ove, Hoegh-Guldberg. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs[J]. Marine and Freshwater Research,1999,50(8):839-866.
- [3] 柴兴云,唐力英,雷辉,等.柳珊瑚化学成分与生物活性研究新进展[J].中国中药杂志,2012,37(5):667-685.
- [4] 秦楠,栗东芳,杨瑞馥.高通量测序技术及其在微生物学研究中的应用[J].微生物学报.2011(4):13.
- [5] 黄晖,张浴阳,练健生,等.徐闻西岸造礁石珊瑚的组成及空间分布[J].生物多样性,2011,19(5):505-510.
- [6] 邓飞龙.微生物16S rRNA基因序列分类单元(OTUs)聚类算法的设计与实现[D].成都:四川农业大学,2016(5).
- [7] 黄亚新.富营养化湖泊中颗粒有机物C、N、P浓度分布及其对细菌群落结构的影响[D].南京:南京农业大学,2016.
- [8] 薛乃雯.旱地麦田夏闲期覆盖及绿肥种植对土壤水分、养分及后作冬小麦生长的影响[D].晋中:山西农业大学,2018.
- [9] 李立峰.Fe(II)添加对水稻土细菌与自养固碳菌群落多样性的影响[D].南京:南京农业大学,2017.

作者简介:翁洁畅(1988-),女,硕士,工程师,从事海洋环境调查监测与生态学研究和海洋环境质量管理研究。