有规律的冷刺激对短指软珊瑚共生真菌影响的初步研究

翁洁畅 陈福慧 符保珍 周女婉 杨大顺 *
海南省生态环境监测中心，中国·海南 海口 571126

摘 要：本研究选取短指珊瑚作为研究对象，采用高通量测序法，通过 OTU 和多样性分析，研究冷刺激对目标珊瑚共生真菌的影响。研究结果得知：不规律的温度，容易导致珊瑚中的共生真菌出现死亡，而有规律的低温驯化可以加强珊瑚共生真菌系统的稳定性。

关键词：珊瑚礁；低温驯化；真菌多样性

Regular Cold Stimulation of Symbiotic Fungi on Soft Coral Brachydactylia a Preliminary Research of the Impact

Jiechang Weng Fuhui Chen Baozhen Fu Nvwan Zhou Dashun Yang*
Hainan Provincial Ecological and Environmental Monitoring Center, Haikou, Hainan, 571126, China

Abstract: In this study, brachydactyl coral was selected as the research object, and the effects of cold stimulation on symbiotic fungi of target coral were studied through OTU and diversity analysis by high-throughput sequencing method. The results show that irregular temperature can easily lead to the death of symbiotic fungi in corals, and regular low temperature domestication can strengthen the stability of the symbiotic fungal system in corals.

Keywords: coral reef; low temperature acclimation; fungal diversity

1 概述

1.1 珊瑚礁的生态学研究

珊瑚礁作为海洋中一类极为特殊且庞大的生态系统，被誉为“海洋中的热带雨林”[1]“蓝色沙漠中的绿洲”。珊瑚礁生态系统良好的生态环境和可持续性，让其更好的为整个生态系统服务，从全球角度来看，气候和海洋环境的变化是造成珊瑚礁退化和死亡的主要原因[2]。一些科学家以及环境保护者为了更好地对珊瑚进行保护，对珊瑚的多个层面展开一系列的研究。

1.2 珊瑚和共生真菌的生物学研究

海洋中的微生物不计其数，它们在海洋生态系统中的能量流动、物质循环等各方面都发挥着重要作用，而海洋真菌是海洋微生物的重要成员之一，它有耐高压、高盐、低温、低光照等特点[3]，这些特点都是陆地真菌所不具备的。在物种演化过程中，珊瑚的体内或者在珊瑚体表上的共生微生物真菌参与着珊瑚次生成分的合成，还可以对珊瑚次生代谢产物进行转化并产生次生代谢产物[4]，可见天然产物它主要来源于共生微生物[5]。

在微生物研究发展中，科学家们对软珊瑚、石珊瑚等提取物进行了大量的研究，在提取物中发现了抑菌活性。很多研究也表明从珊瑚个体中分离出来的真菌菌株具有抑菌活性[6]。这也说明珊瑚所具有的抑菌活性与其共生真菌有着直接关系。

1.3 高通量测序技术在珊瑚研究中的应用

近年来，高通量测序方法在海洋微生物生态学中的研究应用越来越多。对于珊瑚来说，由于珊瑚样品本身基因组资源有限，而高通量基因测序技术则只需要少量的样本组织便可获得大量的有效数据信息。在该技术的支持下，本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，利用技术对低温胁迫下的短指软珊瑚进行引物筛选，通过一系列的分析，研究在温度胁迫下珊瑚共生真菌 OTU 的丰度，了解物种丰富程度，进一步研究珊瑚生态系统产生的活性物质与共生真菌之间的关系。

2 实验设计

2.1 材料

本实验采集的珊瑚样本位于海南省三亚市西瑁岛东边 3~5m 深的边缘礁上。我们通过对其 28s，msh1 基因扩增比对和其骨针形态对比，确定物种为南海短指软珊瑚。同时，将恢复活力后的珊瑚进行切割，并用标本胶水将切割好的珊瑚粘于原型珊瑚底座，最后分别放置于编号为 1、2、3、4 号的养殖缸中进行驯化养殖。

2.2 温差驯化

参考了泰国斯米兰岛海域海水温差范围，我们选取三组温度对软珊瑚进行温度胁迫实验，将温差梯度设置为 22℃ ~26℃，18℃为低温胁迫，22℃为常温胁迫，同时设置一个恒温为 26℃的实验对照组。

1 号养殖缸为实验对照组，采用 26℃恒温对水温进行控制，持续 31 天都在该条件状态下，31 天后再提取样本，分别编号 S_0_1、S_0_2、S_0_3。

2 号养殖缸是设置保持 26℃的恒温持续 30 天后，对其进行突然降温至 18℃维持 1 天，再提取样本分别编号 S_1_1、S_1_2、S_1_3。

3 号养殖缸是每日通过使用冷水机控制，将缸内温度从 26℃降至 22℃保持 12h，随后停止降温，让水温上升恢复至 26℃，保持 12h，按上面操作持续 31 天后，再提取样本分别编号 S_2_1、S_2_2、S_2_3。

4 号养殖缸同样是每日通过冷水机控制，将缸内温度从 26℃降至 22℃保持 12h，随后让水温恢复至 26℃保持 12h，如此重复实验操作 30 天后，对其突然降温至 18℃维持 1 天，再提取样本分别编号 S_3_1、S_3_2、S_3_3。

通过以上操作来模拟泰国斯米兰岛海域曾经出现的大规模寒潮来袭现象。

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，通过对序列数据、操作分类单元 OTU[7] 以及分类学分析，来研究有规律的冷刺激对目标软珊瑚中共生真菌的影响。

技术路线如下：

采取样本→分析培养并切割处理→冷刺激处理→ DNA 提取→引物设计→ PCR 扩增→高通量测序→序列数据分析→ OTU 聚类分析→分类学分析→共生真菌的数据分析。

3 冷刺激对短指软珊瑚共生真菌的影响

对于多样性指数分析通常利用一系列统计指标（如香农，辛普森，埃斯和查尔）来反映生物群落的丰富性和多样性。一般利用群落丰富度指数来估计生态系统的物种总数，值越大，物种总数越大 [8]；利用群落多样性指数来估计样本中的生物多样性 [9]。

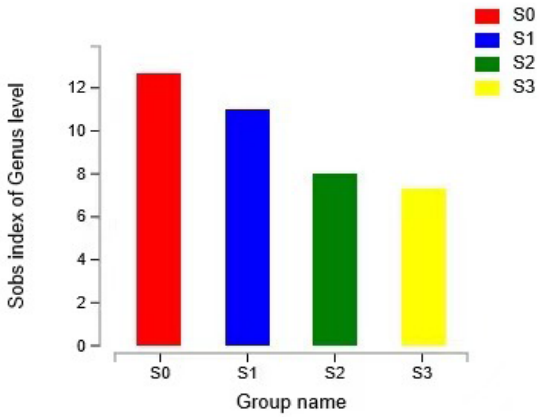

图 1 属水平 OTUsobs 指数图

OTUsobs 指数是表示物种的丰富度，由图 1 可推断随着温度的降低，共生真菌的实际丰富度也逐渐降低。

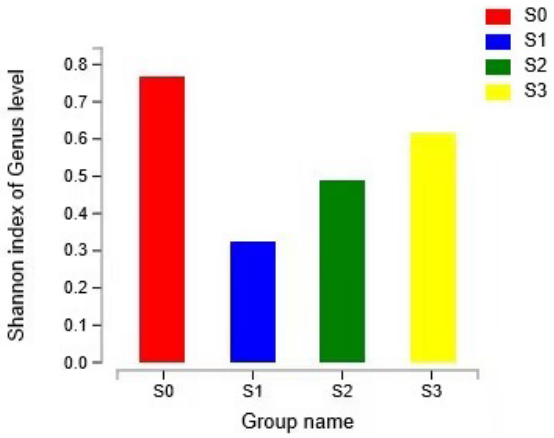

图 2 属水平香农指数分析图

如图 2 可得，S0 中共生真菌的群落多样性最高，从常温 26℃急剧下降到 18℃维持 1 天时，由于很多真菌微生物不能适应低温环境，导致 S1 实验组中共生真菌的群落多样性降至最低；在 S2 中 26℃降温至 22℃，停止降温后又恢复为原来的 26℃，这使得 S2 的群落多样性属于中等水平；而在 S3 中，随着温度从 26℃降温到 22℃，持续 30 天，使得该群落逐渐适应该温度后，产生了耐寒性，所以再次温度降低时，对群落影响并不大，因此 S3 在 S2 的基础上多样性明显增高。

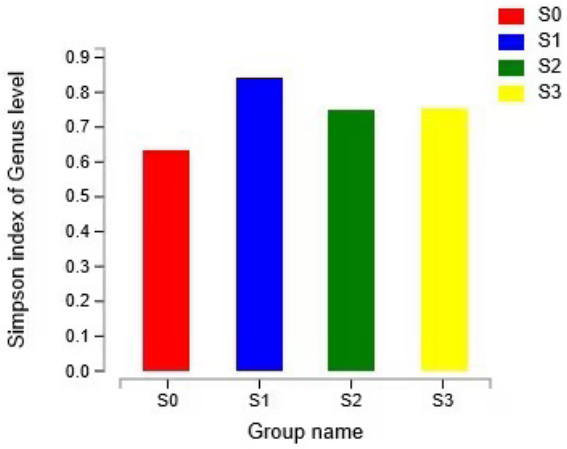

图 3 属辛普森 Simpson 指数图

通常根据辛普森指数来测量真菌均匀度，指数越高，说明群落多样性越好。由图 3 可得知在常规温度 26℃下，S0 对照组的均匀度最低，而经过寒流模拟后，突然降温到 18℃，则 S1（实验组）的均匀度最高。

4 结论

本研究采用高通量测序技术对短指软珊瑚进行 DNA 测序，在研究共生真菌群落的丰富度和多样性指数时运用 OTU 聚类分析。

结合图 1，面对突然低温的胁迫，致使一些常温下生长

的真菌死亡，留下在低温下可生长的真菌，可见每种真菌的适应温度都不同。此外，经过温差驯化后的实验组，突然极温处理后导致真菌死亡的趋势也有所降低。说明了真菌的丰富度受温度影响变化较大，在常规温度 26℃下的 S0 对照组中的物种总数最大，可见低温是影响共生真菌丰富度的一个重要因素。

为了估算共生真菌的多样性，结合图 2 分析，在 26℃的 S0 样本中香浓指数最大，即 S0 真菌群落多样性最高，从 26℃急剧下降到 18℃维持 1 天时，由于很多共生真菌不能适应低温环境导致 S1 样本中群落多样性降至最低。根据辛普森指数测量均匀度，指数越高，说明群落多样性越好。结合图 3 分析，经过寒流模拟降温至 18℃，其中 S1 均匀度最高。由此可发现长期在常规 26℃温度下生长的珊瑚，突然有寒流袭来，会适当改变群落的均匀度，提高物种多样性。而在 S2、S3 中，先降温再恢复常温或者继续降温，对群落的均匀度影响不大，但是比在常规温度下的均匀度要高。所以证明短暂的冷刺激对珊瑚有一定的益处，可以提高珊瑚共生真菌种群的多样性。

综上研究，在真菌方面，对照组真菌多样性很低，但是其含量较高。经过冷刺激驯化后，真菌多样性明显升高，但是其含量减少。由此推断正常温度下生长的珊瑚，突然有寒流袭来，会适当改变群落的均匀度，提高物种多样性。上述这些变化也许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。

参考文献：

[1] 赵金发,刘永,李纯厚,等.应用高通量测序技术研究永乐环礁和东岛鱼卵种类组成和分布[J].热带海洋学报,2023(6):127-136.

[2] 蔡榕硕,郭海峡,ABD-ELGAWAD Amro,等.全球变化背景下暖水珊瑚礁生态系统的适应性与修复研究[J].应用海洋学学报,2021,40(1):14.

[3] 汪天虹,肖天,朱汇源,等.海洋丝状真菌生物活性物质研究进展[J].海洋科学,2001(6):25-27.

[4] 徐佳.珊瑚共附生可培养真菌菌群多样性及其生物活性研究[D].湛江:广东海洋大学,2011.

[5] 肖胜蓝.徐闻3种石珊瑚共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.

[6] Shnit-Orland M, Kushmaro A. Coral mucus – associated bacteria: a possible first line of defense[J]. Fems Microbiology Ecology,2010, 67(3):371-380.

[7] 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.

[8] Trisuwan K, Rukachaisiriku lV, Sukpondma Y, et al. Furo[3,2-]isochroman, furo[3,2-]isoquinoline, isochroman, phenol, pyranone, and pyrone derivatives from the sea fan-derived fungus Penicillium sp. PSU-F40[J]. Tetrahedron,2010,66(25):4484-4489.

[9] Drohan A F, Thoney D A, Baker A C. Synergistic effect of high temperature and ultraviolet-B radiation on the gorgonian Eunicea tourneforti (Octocorallia: Alcyonacea: Plexauridae)[J]. Bulletin of Marine Science -Miami,2005,77(2):257-266.

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