

DOI: 10.5846/stxb201301250159

黄小芳, 陈蕾, 张燕英, 凌娟, 龙丽娟, 张 偲, 董俊德. 基于 RFLP 技术的鹿角杯形珊瑚共附生固氮菌多样性分析. 生态学报, 2014, 34(20): 5875-5886.

Huang X F, Chen L, Zhang Y Y, Ling J, Long L J, Zhang S, Dong J D. Diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* analyzed by PCR-RFLP. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(20): 5875-5886.

基于 RFLP 技术的鹿角杯形珊瑚 共附生固氮菌多样性分析

黄小芳^{1,2,3}, 陈 蕾^{1,2,3}, 张燕英^{1,2}, 凌 娟^{1,2}, 龙丽娟¹, 张 偲¹, 董俊德^{1,2,*}

(1. 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301;

2. 中国科学院南海海洋研究所海南热带海洋生物实验站, 三亚 572000; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要:对三亚湾鹿回头与西沙石岛的常见鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)的固氮酶 *nifH* 基因多样性进行了分析,并对其进行共附生固氮微生物多样性进行了比较。利用 *TaqI* 和 *HaeIII* 两种限制性内切酶分别对三亚湾珊瑚的粘液(SYN)、组织(SYZ)和西沙珊瑚组织(XSZ)的阳性克隆子进行聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析,得到了 23, 25 和 13 个 OTUs, 文库的覆盖率分别为 90.3%, 87.5% 和 94.1%, 多样性指数 Shannon-Wiener 指数(*H*)分别为 2.28, 3.02 和 2.08, Evenness 指数(*E*)分别为 0.5, 0.65 和 0.56。研究结果表明:1) 3 个文库重要组成部分都是绿菌门(*Chlorobia*)和变形菌门(*Proteobacteria*) α -亚门、 γ -亚门、 δ -亚门细菌;2) 3 个文库绝大部分 OTUs 的最相似序列来自珊瑚礁、海绵、水体、沉积物等环境中的不可培养细菌,反映鹿角杯形珊瑚组织和粘液可能蕴含着丰富的尚未被培养的固氮菌资源;3) 发现了两大重要的类群——分别与绿菌门和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)细菌序列最相似的类群,它们通过为珊瑚共生体提供有机氮源参与到珊瑚白化的调节或恢复过程中,在珊瑚共生体营养物质的循环中充当重要角色;4) 从多样性指数分析可以看出,SYZ 的固氮微生物多样性高于 SYN, SYZ 的固氮微生物多样性高于 XSZ,反映了鹿角杯形珊瑚生活的地理位置不同,固氮菌共附生的生态位不同(如珊瑚粘液、组织等不同部位),都将导致珊瑚共附生固氮菌多样性的差异。

关键词:鹿角杯形珊瑚;固氮菌;固氮酶基因 *nifH*;PCR-RFLP;生物多样性

Diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* analyzed by PCR-RFLP

HUANG Xiaofang^{1,2,3}, CHEN Lei^{1,2,3}, ZHANG Yanying^{1,2}, LING Juan^{1,2}, LONG Lijuan¹, ZHANG Si¹, DONG Junde^{1,2,*}

1 CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

2 National Experiment Station of Tropical Marine Biology, Sanya 572000, China

3 Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Coral reef ecosystem is known as “tropical rainforest of the ocean” due to its high biodiversity and primary productivity. Bacteria are known to be abundant and active in different coral niches, including coral surface mucus layer, coral tissue, and surrounding reef waters. Coral-associated bacteria play important roles in resisting pathogen, cycling of

基金项目:国家自然科学基金项目(41276113, 41276114, 41006069); 国家高技术研究发展计划项目(2012AA092104, 2013AA092901, 2013AA092902); 中国科学院战略性先导科技专项 A(XDA11020202); 三亚市地地科技合作项目(2013YD74); 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室开放基金(201304)

收稿日期:2013-01-25; 网络出版日期:2014-03-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: dongjunde@vip.163.com

nitrogen, carbon and sulfur in coral reef ecosystem. Previous studies on coral microbiology in China mainly focused on the genetic diversity of zooxanthellae and their ecological and physiological roles in corals, and so far few investigations have been made in regard to the diversity of coral-associated bacteria, especially coral-associated diazotrophic bacteria. This research aimed to elucidate the *nifH* gene diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with *P. damicornis*, and compare the nitrogen-fixing bacteria diversity. Three samples (mucus, tissue of coral *P. damicornis* from Sanya Bay and tissue of coral *P. damicornis* from Xisha Islands) were investigated, which were named as SYN, SYZ and XSZ, respectively. The nitrogenase gene *nifH* diversity of three coral samples were assessed using clone library construction in combination with Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Different operational taxonomic unit (OTU) groups (RFLP patterns) were recovered from the different coral samples after digested by the restriction enzymes *TaqI* and *HaeIII*, respectively. As a result, 23 OTUs were recovered from 155 clones of SYN, 25 OTUs were recovered from 120 clones of SYZ, while 13 OTUs were recovered from 102 clones of XSZ with clone coverage was 90.3%, 87.5% and 94.1%, Shannon-Wiener index (*H*) was 2.28, 3.02 and 2.08, Evenness index (*E*) was 0.5, 0.65 and 0.56, respectively. The findings of this study showed that 1) Clone libraries demonstrated that the majority of retrieved sequences from coral mucus and tissue libraries were identified to be *Chlorobia* and *Proteobacteria* (including α -, γ - and δ -*Proteobacteria*). 2) Most of OTUs were related to those *nifH* gene sequences of uncultured bacteria from a variety of habitats in marine environments, such as coral reef, sea sponges, ocean water column and marine sediment, which indicated coral *P. damicornis* might harbored a large number of new diazotroph resources that had not yet been cultured. 3) The study also found two bacterial group- OTUs related to *Chlorobia* and *Desulfovibrio*, which may not be only as pathogenic bacteria as described in the previous reviews, but also played important roles in nutrient cycles, defending of coral symbionts, they were suspected to resist coral bleaching by fixing nitrogen. 4) Shannon-Wiener index indicated that the diazotrophic diversity of SYN was lower than that of SYZ, and diazotrophic diversity associated with XSZ was lower than that of SYZ, showing that the community diversity of diazotroph associated with coral differed based on the geographic location and specific environment characteristics of the coral.

Key Words: *Pocillopora damicornis*; nitrogen-fixing bacteria; *nifH*; PCR-RFLP; biodiversity

珊瑚礁具有较高的生物多样性和高效的生产力,故素有“海洋中的热带雨林”之称,造礁石珊瑚主要生存在氮素营养贫乏的海域中,生产力水平通常受到可利用氮素营养的限制,原核生物的生物固氮作用被认为是珊瑚礁海域可利用氮素的主要来源^[1-2]。固氮菌是珊瑚虫共附生体中一类重要的功能微生物,它们可以通过生物固氮作用固定无机氮素,从而为珊瑚虫及其共生体提供重要的有机氮源。这些有机氮不仅能为珊瑚共生体提供氮营养,而且还可为整个珊瑚礁生态系统提供约 6% 的可利用氮源^[3-4]。通过现代分子生物学方法,如荧光原位杂交 (FISH)、变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE)、限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 等手段,发现固氮菌以较高的丰度和多样性共附生于珊瑚虫的粘液层、组织以及骨骼^[5-8]中,而且绝大部分序列是利用非可培养手段获得的序列,表明其蕴含着丰富的尚未实现纯

培养的固氮菌资源。

我国珊瑚礁主要集中分布于西沙群岛以及三亚海域。西沙群岛等南海诸岛珊瑚群落通过北迁繁衍而对我国沿岸珊瑚礁的形成具有重要影响,是海南岛、广东省和广西省沿岸珊瑚幼虫的补充源地^[9-10]。三亚湾与西沙群岛的珊瑚礁生态系统目前却受到了不同程度的人类干扰:三亚湾是旅游胜地,大量的生活污水的排入以及人类生产作业甚至是潜水旅游,都对珊瑚礁的生长产生了极大的影响;西沙群岛远离人类居住地,总体上受到人类的干扰较小,更能代表珊瑚栖居的自然状态。我国珊瑚微生物学研究还处于初级阶段,对造礁石珊瑚内共附生固氮菌的多样性研究还鲜有报道。因此本论文选取在西沙石岛和三亚湾鹿回头都普遍存在的鹿角杯形珊瑚 (*Pocillopora damicornis*) 为研究对象^[11],利用 PCR-RFLP 的方法对其组织和粘液内的固氮酶基因 *nifH*

多样性和系统发育进行分析和研究,探究其共附生固氮菌的群落结构组成以及地理位置和人类干扰对固氮菌多样性的影响。旨在加深对珊瑚虫共附生功能体的认知,为我国的造礁石珊瑚固氮菌的微生物学以及珊瑚礁生态系统的氮素供给和可持续发展研究提供了重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

鹿角石珊瑚样品分别采集于海南三亚鹿回头岸礁(18°13'30" N, 109°29'15" E)和西沙群岛石岛(16°21'45" N, 120°21'30" E)。具体采用方法如下,每个采样点采集样本(湿重约 1 Kg)3 份,样品间相距 5 m 左右。截取珊瑚样品 4—6 cm,放入无菌标本袋,标记后立即置于 4 °C 冰盒内保存^[12]。

1.2 样品处理

珊瑚样品表面用无菌海水轻轻漂洗 3—4 次,以除去表面泥沙等附着物,随后 2 675×g 离心收集粘液,将珊瑚组织样品再次冲洗后用无菌锡箔纸包好,放入无菌袋中-20 °C 保存^[2,12-13]。本研究选取了三亚湾珊瑚样品的组织和粘液以及西沙珊瑚样品的组织,分别标记为 SYZ, SYN 和 XSZ。

1.3 基因组 DNA 的提取以及固氮基因 *nifH* 的 PCR 扩增和纯化回收

由于珊瑚样品中含有大量结构比较复杂的腐殖酸,它们会极大的降低基因组 DNA 的得率,因此需要先对样品进行去腐殖酸预处理^[14],然后使用 BIOMIGA 的 EZgene™ 土壤 gDNA 提取试剂盒进行珊瑚组织(5 g)和粘液(500 μL)总 DNA 的提取,采用 Olson N.D. 设计的固氮酶基因 *nifH* 简并引物(正向引物 5'-ATG TCG GYT GYG AYC CSA ARG C-3',反向引物 5'-ATG GTG TTG GCG GCR TAV AKS GCC ATC AT-3')进行扩增^[2],目的片段约 387—389 bp。PCR 反应体系(25 μL)包括:premix Taq 12.5 μL,引物(1 μmol/L) 0.5 μL,BSA(1%) 0.5 μL,DMSO(10%) 1 μL;PCR 扩增程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 40 s,55 °C 40 s,72 °C 40 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 6 min。构建文库时,选取同一样品的 3 份重复,分别抽提总 DNA 后进行固氮酶 *nifH* 基因的扩增,将这些目的基因的 PCR 产物混合后,采用 DNA 纯化回收试剂盒(TAKARA)将目的条带进行纯化,

置于-20 °C 备用。

1.4 扩增产物的克隆和 RFLP 分析

将 *nifH* 基因片段与 pMD18-T 载体连接后转入大肠杆菌 DH5α 中,通过蓝白斑筛选初筛,使用载体的特异性扩增引物 M13/RV 对菌落进行 PCR 扩增以检测阳性克隆^[15]。PCR 反应体系(25 μL)和扩增程序同 1.3。将所获得的阳性克隆分别进行限制性内切酶 *Taq* I 和 *Hae* III 酶切^[16-17],酶切产物经过 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后做分析带型。

1.5 3 个文库的固氮细菌的多样性指数分析

本文采用 Shannon-Wiener 指数(H),Evenness 指数(E)来分析和反映鹿角杯形珊瑚共附生固氮菌的多样性。计算公式分别为:

$$H = -\sum (P_i) (\ln P_i)$$

式中, $P_i = N_i / N$, N_i 指各个 OTU 的克隆子数, N 指文库的总阳性克隆子数。

$$E = H / H_{\max}$$

式中, H 为 Shannon-Wiener 指数, $H_{\max} = \ln S$, S 指每个文库的总 OTU 数。 H 可估算群落多样性的高低, E 用来描述文库中个体的均一度^[18]。

1.6 固氮酶基因序列系统发育分析

将具有相同酶切带型的克隆子归为一个 OTU (Operational Taxonomic Units),每个 OTU 挑取一个代表送上海美吉医药科技有限公司测序;然后通过 BLAST 软件在 GenBank 数据库进行序列比对分析,获取相近典型菌株的 *nifH* 基因序列;最后使用 Clustal W 和 Mega 5.0^[19] 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)建立 *nifH* 基因的系统进化发育树,自举值为 1000^[16]。

2 结果与分析

2.1 固氮酶 *nifH* 基因的文库以及 RFLP 分析

将扩增回收后的 *nifH* 基因片段进行连接、转化和培养。随机挑取白色菌落,经过菌落 PCR 阳性检测后,分别选取了 SYN,SYZ 和 XSZ 3 个文库的 155, 120 和 102 个阳性克隆子进行限制性内切酶 *Taq* I 和 *Hae* III 酶切分析。根据酶切条带的大小和数目进行谱带分型,并计算其文库覆盖率(用 C 表示),计算公式为:

$$C = [1 - (n1 / N)] \times 100\%$$

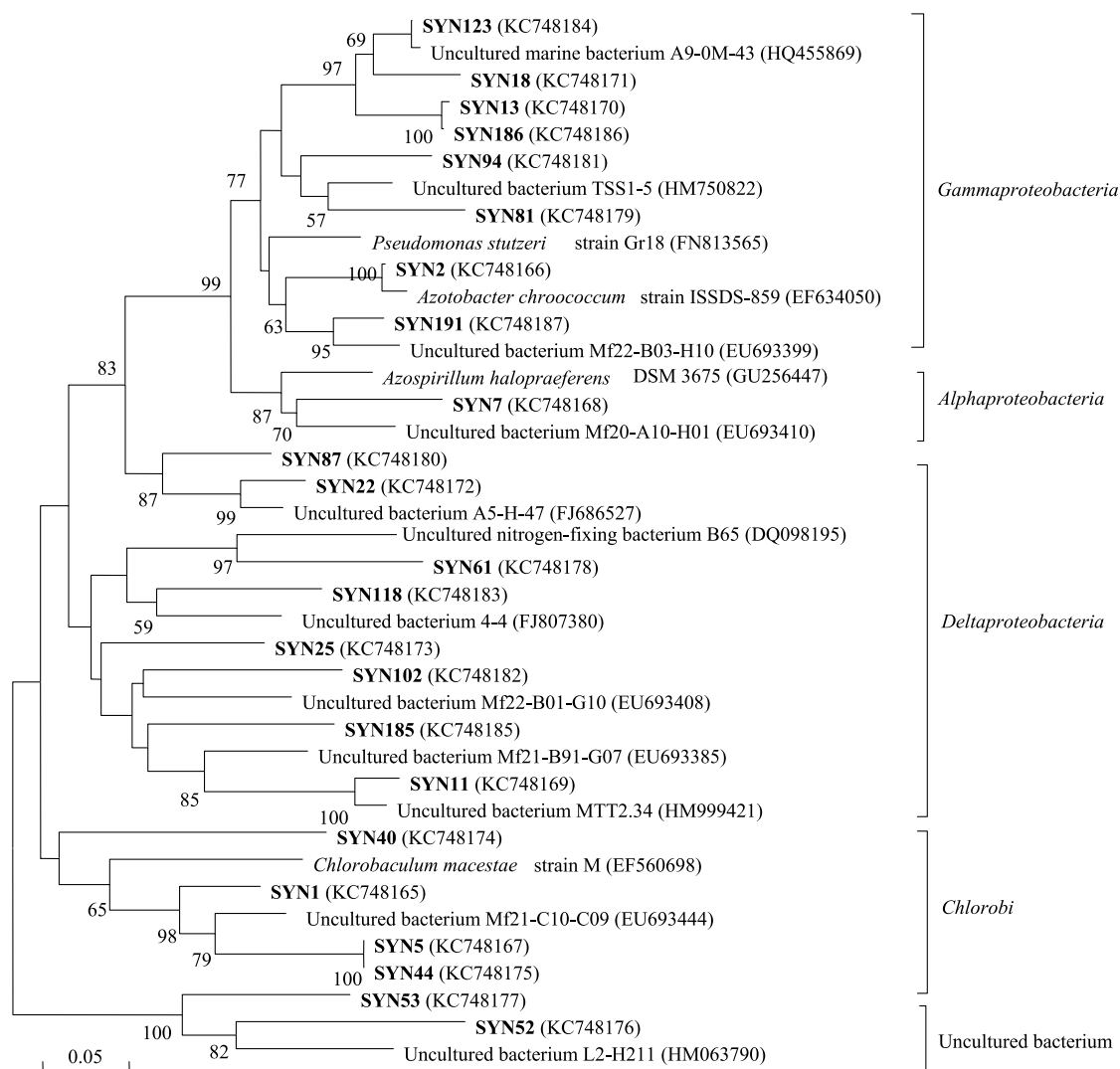
式中, N 代表阳性克隆子数, $n1$ 代表在文库中仅出现

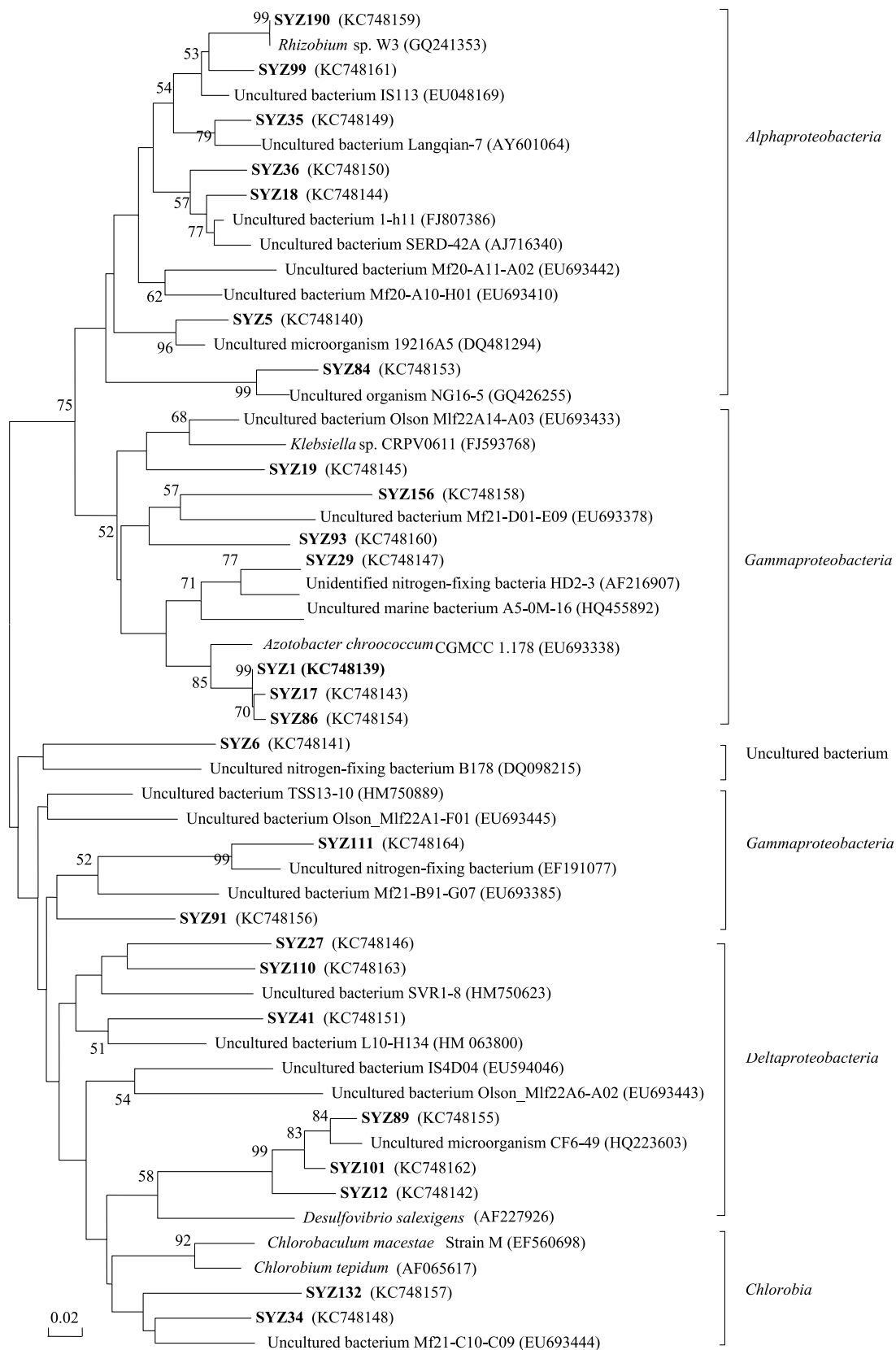
一次的 OTU 数量^[20]。SYN 文库有 23 种谱带类型, SYZ 文库有 25 种谱带类型, XSZ 文库得到 13 种 RFLP 谱带类型, 即分别代表了 23、25、13 种 OTUs, 其中 SYN、SYZ 和 XSZ 这 3 个文库的 $n1$ 分别为 15、15 和 6, 覆盖率分别为 90.3%、87.5% 和 94.1%, 表明这 3 个文库固氮菌多样性覆盖程度能够较完整的反映珊瑚粘液和组织内共附生的固氮细菌丰度和固氮菌群落结构组成。

2.2 *nifH* 基因的测序结果和系统发育分析

固氮生物多种多样, 但其生物固氮作用都需要共同的固氮酶基因 *nifH* 的参与, 该基因高度保守但也存在可变的 DNA 序列区, 并且 *nifH* 基因的系统发育与 16S rDNA 具有一致性^[21-24], 表明 *nifH* 基因是研究固氮微生物群落结构很好的标记。因此通过对鹿角杯形珊瑚共附生固氮菌的 *nifH* 基因序列进行系统发育对比, 来了解珊瑚的固氮菌多样性和群落结构组成。

将每个 OTU 的代表克隆子 *nifH* 基因序列在 GenBank 数据库进行对比分析, 通过 Clustal W 和 Mega 5.0 软件以邻接法 (Neighbor-Joining) 构建 *nifH* 基因的系统进化发育树 (图 1), 并利用 OriginPro8 软件分析了各文库含固氮类群的百分组成 (图 2)。从系统进化树可以发现, 这 3 个文库中均包含了绿菌门细菌和变形菌门 α -、 γ -和 δ -亚门细菌, 但多样性差异明显: SYN 文库中共有 16 个 OTUs 属于变形菌门 γ -、 δ -亚门, 绿菌门的克隆子数占到了克隆子总数的 78.7%, 为绝对优势类群; SYZ 文库中变形菌门 α -、 γ -和 δ -亚门的 OTUs 分布比较均一, 分别为 7、9 和 6 个, 其中变形菌门 α -、 γ -亚门的克隆子数占到了克隆子总数的 87.5%, 为绝对优势类群; XSZ 文库中变形菌门 α -亚门的 OTUs 有 8 个, 占了整个文库的 61.5%, 而变形菌门 γ -亚门的克隆子数占到了克隆子总数的 70.6%, 为绝对优势类群。





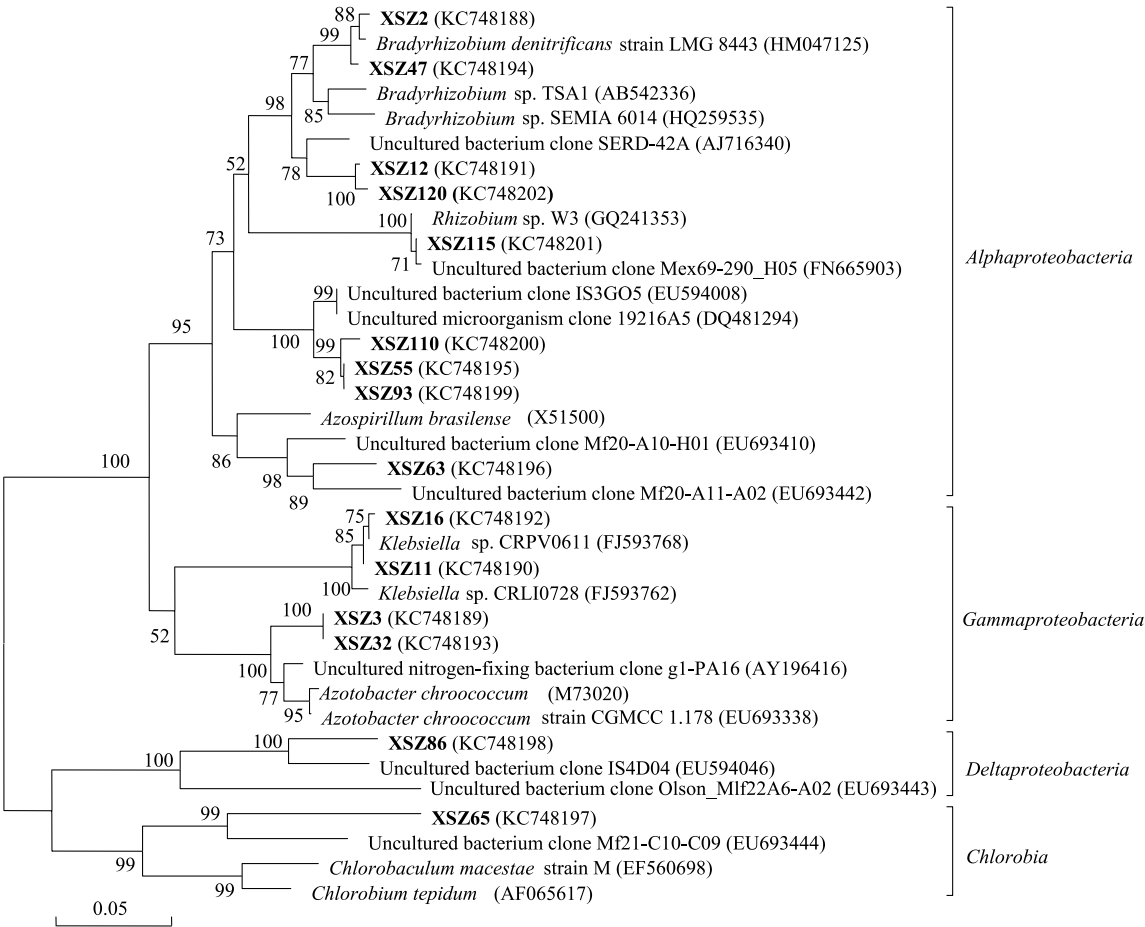


图 1 3 个鹿角杯形珊瑚样品的 *nifH* 型固氮细菌克隆文库的系统进化树分析
Fig.1 Phylogenetic analysis of *nifH*-containing clones from SYN, SYZ and XSZ of *P. damicornis*

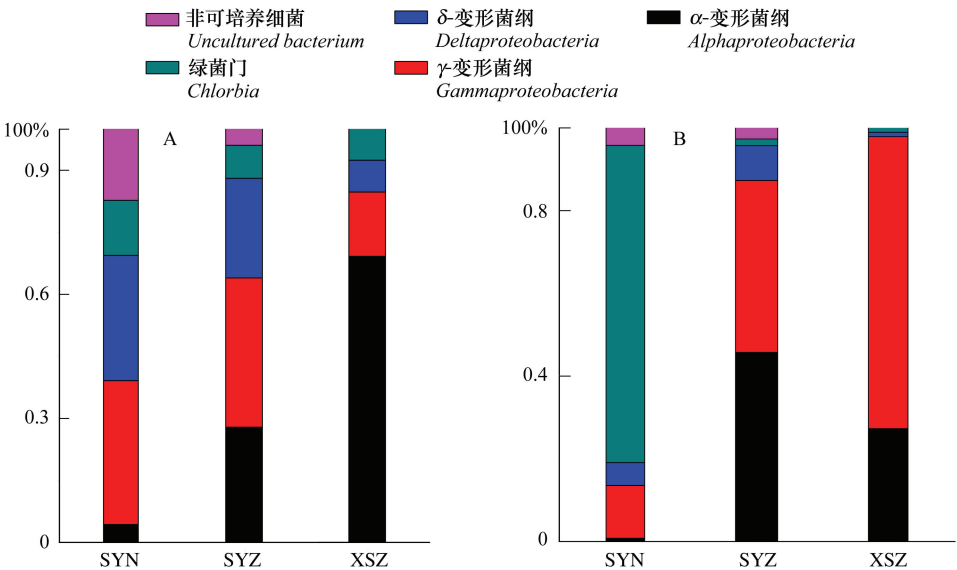


图 2 鹿角杯形珊瑚共附生固氮菌 *nifH* 基因克隆文库落所含类群的百分比
Fig.2 Percents of different phylum in *nifH* clones of N_2 -fixing bacteria communities associated with *P. damicornis*

A: 基于克隆文库 OTU 数目; B: 基于克隆子数; SYN: 三亚湾珊瑚粘液样品编号, SYZ: 三亚湾珊瑚组织样品编号, XSZ: 西沙珊瑚组织样品编号

与 3 个克隆文库 *nifH* 基因序列的遗传相似性最高的序列,绝大部分为非可培养手段获取的序列,其样品来源非常广泛,不仅涉及到了海洋领域如海水水域、海水沉积物,也有陆地土壤,甚至还包括了植物根系和动物,只有很少数的克隆子与可培养的细菌具有较高同源性(图 1 和表 1),反映鹿角杯形珊瑚组织和粘液可能蕴含着丰富的尚未被培养的固氮菌资源。通过对比发现,SYN 文库中与数据库中可培养细菌相似性最高的克隆子数最少,仅占整个克隆文库的 3.9%;5 个克隆子与从土壤中分离到的圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)相似性为 98%;克隆子 SYN102 与日本慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)的相似性仅为 89%。SYZ 文库中约有 36.3%的克隆子数与文献报道的可培养细菌近缘,在 3 个文库中的比例最高;SYZ18 克隆子与反硝化慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium denitrificans*)的相似性为 96%;36 个克隆子与圆褐固氮菌有 98%的相似性;6 个克隆子与坚韧类芽孢杆菌(*Paenibacillus durus*)表现出 98%的相似性。XSZ 文库中有 21.6%的克隆子的近缘序列来源于可培养细菌;11 个克隆子与反硝化慢生根瘤菌表现出 98%的相似性;另有 11 个克隆子与克雷伯氏菌(*Klebsiella* sp.)表现出 99%的相似性。在这些可培养细菌中,发现圆褐固氮菌同时存在于三亚湾鹿回头的珊瑚组织和粘液中,但是在西沙珊瑚组织中却并未检测到该种细菌。圆褐固氮菌具有较强的固氮能力,它能独立进行固氮作用^[25]。这可能是由于三亚湾受到岛内陆生环境的影响,陆源固氮菌被冲刷到海水后,适应了珊瑚组织的内环境。在三亚湾和西沙的珊瑚组织中都检测到了反硝化慢生根瘤菌,说明这一类固氮细菌可能对环境具有较强的适应性,能够抵抗变化的环境。

在优势固氮细菌类群方面,SYN,SYZ 和 XSZ 文库也表现出很大的差异(表 1)。SYN 的固氮细菌克隆文库中有两个优势的菌种:SYN1 和 SYN5 与夏威夷蔷薇珊瑚(*Hawaiian Montipora* corals)非可培养克隆子 Mf21-C10-C09 的相似性为 88%—90%,在系统发育分类上与绿菌门(*Chloria*)细菌最相似,其中 SYN1 为绝对优势菌种(94 个克隆子,60.6%),SYN5 则占到了整个克隆文库的 16.8%(26 个克隆子),这 2 个 OTU 所包含的克隆子数占到了整个克隆文库的 77.4%,是整个文库中的优势类群。SYZ 克隆文库中

也有 2 个优势的菌种,占了整个文库克隆子数的 65%;其中 SYZ5(49 个克隆子)代表着最大一类优势菌种,与海绵(*marine sponge*)中的一种共附生固氮菌 clone IS3D01 有 97%的相似性;另外一类代表编号为 SYZ1 的优势菌种(29 个克隆子)与从农田中分离到的可培养的圆褐固氮菌表现出 98%的相似性。相比之下,XSZ 组织中的固氮细菌的多样性虽没有前两个文库高,但有 4 个优势的菌种,占整个克隆子文库数量的 90.2%,分别是:1)XSZ3(61 个克隆子)与土壤中的非可培养自生固氮菌 clone g1-PA16 相似性约 94%—95%;2)XSZ11,XSZ16(11 个克隆子)与切叶蚁 *Acromyrmex echinator* 内可培养细菌克雷伯氏菌 *Klebsiella* sp. CRPV0611 具有 99%的相似性;3)XSZ12(11 个克隆子)与镍矿中的发现的非可培养细菌 clone SERD-42A 有 95%的相似性,这类细菌在对镍矿先锋植物的生长有促进作用;4)XSZ47(9 个克隆子)与华南地区豆科植物中共生的根瘤菌属反硝化慢生根瘤菌有 98%的相似性。

这 3 个文库中都有一类克隆子,其最相似的序列均来源于夏威夷蔷薇珊瑚(*Hawaiian Montipora* corals)组织(表 1)。它们唯一共有的克隆子(SYN1,SYZ34,XSZ65)均与夏威夷珊瑚组织中的克隆子 Mf21-C10-C09(EU693444)聚类到了绿菌门(*Chlorobia*),相似性达 78%—99%。绿菌门细菌是一类能进行不产氧的专性厌氧光合细菌,同时也具有固氮作用,因此能利用各种形式的碳素和氮素作为自己的碳源和氮源^[26]。这表明绿菌门细菌可能普遍存在于珊瑚共附生微生物中,其丰度随附生珊瑚的种类或部位不同而发生变化。绿菌门细菌有可能在珊瑚白化阶段,虫黄藻大量排出体外后,为珊瑚健康的恢复发挥了巨大的作用。它们同时具备光合作用和固氮作用的功能,因此就大大降低了对光合作用和固氮作用的依赖性。当虫黄藻排出珊瑚虫体外后,此时珊瑚共附生体仍能通过绿菌门细菌获取有机氮源和氮源,这也为游离的虫黄藻重新回到宿主体内,珊瑚恢复健康创造条件。同时还发现这 3 个文库的 δ -亚门克隆子均与脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* sp.)的发育地位最相近,相似性为 78%—86%。目前普遍认为脱硫弧菌是一类致病菌,是珊瑚黑带病的病原体之一^[27-28],在本次研究中发现了一类具有固氮潜能的与脱硫弧菌属细菌最相近的 δ -亚门克隆子,这有力

的揭示了脱硫弧菌在珊瑚中的角色并不仅仅限于致病菌,他们极有可能通过如固氮作用为珊瑚虫提供营养和次级代谢产物,参与珊瑚共生体营养物质的循环,与宿主珊瑚间建立着互惠互利的共生关系^[2,29]。近年来,三亚旅游业的快速发展和周围养殖场的增多导致了大量的生活污水和污染物排放入海域中,这导致珊瑚礁生态系统生活于高营养(高浓

度溶解氧,磷或有机质)负荷下的压力环境^[30],这种外界环境的压力极有可能使这些脱硫弧菌转化为条件致病菌,通过竞争取代先前优势种群而占据统治地位从而使珊瑚患病。因此需要通过研究珊瑚共附生脱硫弧菌的动态变化来监测珊瑚的健康状况,从而为保护珊瑚礁生态系统起到理论指导和技术支持。

表 1 3 个珊瑚共附生固氮酶基因 *nifH* 的克隆文库序列的来源和比较

Table 1 Homologous comparison of bacterial <i>nifH</i> sequence and sequence comparison of the SYN, SYZ, XSZ clone							
克隆文库 Clone libraries						最相似序列 Similarity	
SYN		SYZ		XSZ		序列号 GenBank accession number	来源 Origins
OTU (Operational Taxonomic Unit) 编号	克隆子数 Number of clones	OTU 编号	克隆子数 Number of clones	OTU 编号	克隆子数 Number of clones		
SYN123	1						
SYN18	3						
SYN13	5						
SYN186	1	SYZ29	1	—	—	HQ455869	中国南海
SYN94	1	—	—	—	—	HM750822	盐沼地植物根际
—	—	SYZ27	1	—	—	HM750623	
—	—	SYZ110	1	—	—	HM750623	
SYN81	1	—	—	—	—	FJ807378	红树林根际
SYN118	1	SYZ91	3	—	—	FJ807380	
—	—	SYZ111	1	—	—	EF191077	
SYN2	5	SYZ1	29	—	—	EF634050	农田土壤
—	—	SYZ17	1	—	—		
—	—	SYZ86	6	—	—	EF634052	
SYN191	2	—	—	—	—	EU693399	夏威夷蔷薇珊瑚
SYN7	1	—	—	—	—	EU693410	
SYN25	1	—	—	—	—	EU693408	
SYN185	1	—	—	—	—	EU693385	
SYN40	1	—	—	—	—	EU693380	
SYN1	94						
SYN5	26	SYZ34	1	XSZ65	1	EU693444	
SYN44	1						
—	—	SYZ156					
—	—	SYZ93	5	—	—	EU693378	
—	—	—	—	XSZ63	1	EU693442	
SYN87	1	—	—	—	—	HM063813	中国南海沉积物
SYN52	1	—		—	—	HM063790	
—	—	SYZ41	1	—	—	HM063800	
—	—	SYZ101	1	—	—	HQ223603	
SYN22	2	—	—	—	—	FJ686527	胶州湾沉积物
SYN61	1	—	—	—	—	FJ686502	
SYN102	1	—	—	—	—	GQ289583	稻田土壤
SYN11	1	SYZ132	1	—	—	HM999421	加勒比海珊瑚
SYN53	3	—	—	—	—	EF174829	<i>Montastraea cavernosa</i> 大堡礁

续表

SYN		克隆文库 Clone libraries				最相似序列 Similarity	
		SYZ		XSZ		序列号	来源
OTU (Operational Taxonomic Unit) 编号	克隆子数 Number of clones	OTU 编号	克隆子数 Number of clones	OTU 编号	克隆子数 Number of clones	GenBank accession number	Origins
—	—	SYZ190	1	—	—	FN665896	非豆科植物根际
—	—	—	—	XSZ115	1	FN665903	
—	—	SYZ99	1	—	—	EU048169	高粱根际
—	—	SYZ35	1	—	—	AY601064	青藏高原土壤
—	—	SYZ36	1	—	—	AJ716402	矿区废弃地
—	—	SYZ18	1	XSZ2 XSZ47	2 9	HM047125	落花生和紫花扁豆根际
—	—	SYZ5	49	—	—	EU593995	佛罗里达海绵
—	—	—	—	XSZ55	2	EU593996	
—	—	—	—	XSZ86	1	EU594002	
—	—	—	—	XSZ110	1	EU594008	
—	—	SYZ84	1	—	—	GQ426255	热泉
—	—	SYZ19	4	—	—	GU193141	海洋微生物垫
—	—	SYZ6	3	—	—	DQ098215	切萨皮克海湾
—	—	SYZ89 SYZ12	4 2	—	—	AF227935	巴哈马群岛珊瑚礁
—	—	—	—	XSZ12 XSZ120	11 1	AJ716340	镍矿区植物根际
—	—	—	—	XSZ16 XSZ11	11	FJ593768	切叶蚁共生体
—	—	—	—	XSZ3	61	AY196416	土壤自生固氮菌

SYN: 三亚湾珊瑚粘液样品编号,SYZ: 三亚湾珊瑚组织样品编号,XSZ: 西沙珊瑚组织样品编号

由于鹿角杯形珊瑚生活的地理位置不同(SYZ 与 XSZ),以及固氮菌共附生的生态位不同(如珊瑚粘液、组织等不同部位)(SYN 与 SYZ),导致共附生固氮微生物多样性之间的差异。将本研究所得的 3 个文库中固氮细菌的多样性指数进行比较(表 2):SYZ 文库的 H 指数和 E 指数均高于 SYN,其中 SYZ 的 H 指数为 3.02,SYN 的 H 指数为 2.28,表明三亚珊瑚组织内的固氮细菌的多样性高于三亚珊瑚粘液中的共附生固氮菌。可能是由于造礁石珊瑚的粘液具有免疫防线的作用,这些由珊瑚虫分泌的粘多糖和蛋白质等组成的粘液是珊瑚的第一道免疫防线,具有抗菌抑菌的作用,因此珊瑚粘液中的共附生微生物数量较少^[31]。比较三亚组织和西沙组织的固氮菌多样性,发现西沙珊瑚组织中的固氮菌多样性明显低于前者,其中 SYZ 的 H 指数、 E 指数分别为 3.02,0.65;而 XSZ 的 H 指数、 E 指数仅为 2.08,0.56。这可能与它们生活的环境有关系。在正常的自然不受人类干扰的状态下,共附生于珊瑚组织中的固氮

菌是一类数量不多的细菌,但是由于受到了外界环境的干扰,陆源固氮菌被冲刷到三亚湾的海水中,珊瑚虫为了获取足够的氮素,便主动从周围水体、沉积环境中捕获固氮菌^[32],导致珊瑚组织内附生细菌与周围海水、沉积物甚至是与其同为腔肠动物的海绵共附生固氮菌直接进行了交流,这些外源固氮菌进入珊瑚组织内部,适应了珊瑚组织内环境。这种固氮菌多样性的增加,有利于提高对珊瑚共附生体氮素营养的供应,尤其是为虫黄藻提供足够的氮源氨,提高其光合作用效率。这有利于提高珊瑚共附生体对外界环境适应性和抵御能力。

SYN 固氮功能基因 *nifH* 克隆文库的克隆子与 NCBI 数据库中最相近序列的相似度为 81%—99%,平均相似度为 89.9%;SYZ 克隆子与其最相近序列的相似度达 83%—100%,平均值为 92.2%;XSZ 克隆子与其最相近序列的相似度达 85%—99%,平均值相似度值是这 3 个文库中最高的,但也仅为 95.1%。综合这 3 个文库的分析结果,可以看出许

多克隆子与 GenBank 中最相近序列的相似性都很低,说明珊瑚共附生固氮细菌不仅种类丰富,还可能含有许多尚未被培养的新种,这些共附生的固氮微生物在珊瑚虫组织内长期的进化过程中,与珊瑚虫及其共附生体保持高度的互动与协同作用,形成了

一个复杂但又紧密联系的功能复合体^[33],因此这些菌很难通过传统的可培养方法被单独培养,多样性较高的固氮细菌群落在整个珊瑚礁生态系统的生物地球化学循环中发挥着重要作用。

表 2 SYN、SYZ 与 XSZ 固氮细菌多样性指数分析

Table 2 Summary of RFLP analysis of *nifH* gene fragments from N₂-fixing bacteria communities in SYN, SYZ and XSZ comparison of diversity

分布地区 Location	样品位点 Station	文库 OTU (Operational Taxonomic Unit)	香农多样性指数(<i>H</i>) Shannon's diversity index (<i>H</i>)	均一度指数(<i>E</i>) Evenness index(<i>E</i>)
		总数(<i>S</i>)		
		Total OTUs (<i>S</i>)		
三亚湾 Sanya bay	SYN	23 (155)	2.28	0.50
三亚湾 Sanya bay	SYZ	25 (120)	3.02	0.65
西沙群岛 Xisha island	XSZ	13 (102)	2.08	0.56

SYN: 三亚湾珊瑚粘液样品编号,SYZ: 三亚湾珊瑚组织样品编号,XSZ: 西沙珊瑚组织样品编号

3 小结

本课题组曾对海南省三亚湾潮间带典型的海洋近岸生态系统的固氮活性进行了研究,结果显示了微藻垫生物群落、海草生态系统和珊瑚礁生态群落固氮活性均高于沿岸水域系统的固氮活性,说明固氮微生物在该海域的氮素循环供给中起着重要的作用^[14,34-35]。对珊瑚礁生态系统而言,珊瑚虫共附生固氮菌的固氮作用对维持整个珊瑚礁生态系统的稳定和增长也起到了至关重要的作用。本研究选取了广泛分布于我国南海海域的鹿角杯形珊瑚,对其三亚珊瑚样品的粘液(SYN)和组织(SYZ)以及西沙珊瑚样品的组织(XSZ)的共附生固氮菌的固氮酶基因 *nifH* 进行多态性分析。结果显示:

(1)在文库覆盖率能较好反映共附生的固氮细菌丰度和固氮菌落结构的情况下,发现这 3 个文库中的绝大部分序列来自尚未实现纯培养的细菌,表明珊瑚礁生态系统中可能栖息着大量的新的固氮微生物。

(2)这 3 个克隆文库中多数的固氮酶 *nifH* 基因的相近序列来源于其他海域的珊瑚虫共附生固氮菌,这表明有一类普适性固氮菌在大多数的珊瑚虫中均发挥着重要的固氮作用,通过为珊瑚虫提供可利用的氮素营养从而实现了珊瑚虫宿主和微生物共附生体的互惠互利关系。还发现了另一类克隆子与海绵、海洋水体及其海洋沉积物中不可培养的固氮

菌具有较高(96%—99%)的相似性,系统发育地位相近。这意味着珊瑚虫共附生固氮微生物与其周围的环境有着密切的联系,它们之间能够互相交流和转移,从而更好的发挥其在珊瑚礁生态系统的氮素生物地球化学循环中的重要作用。

(3)通过对 3 个文库的比对分析,本研究发现了两大类重要的种群:分别与绿菌门(*Chlorobia*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)细菌序列最相似的类群。绿菌门的固氮菌在我国南海海域的鹿角珊瑚的组织和粘液中均有发现,尤其在 SYN 文库中它以 78%的比率占到了绝对优势。结合此前在夏威夷的蔷薇珊瑚组织的共附生固氮微生物亦有发现,绿菌门细菌可能是活体珊瑚中的一类重要的固氮微生物。在本次研究中发现了一类具有固氮潜能的与脱硫弧菌属细菌最相近的 δ -亚门克隆子,这有力的证明了脱硫弧菌在珊瑚中的角色并不仅仅限于致病菌,它们极有可能通过如固氮作用为珊瑚虫提供营养和次级代谢产物,参与珊瑚共生体营养物质的循环与宿主珊瑚间建立着互惠互利的共生关系。

(4)虽然这些样品都是同一种造礁石珊瑚,但是随着造礁石珊瑚生活的地理位置不同,固氮菌共附生的部位不同,都导致了这些共附生固氮菌多样性的差异。通过对三亚珊瑚样品的粘液和组织的 *nifH* 基因文库的比较可发现,珊瑚虫组织和粘液中的共附生固氮菌的群落组成是不一致的,该鹿角珊瑚虫粘液中的优势菌群聚类到了绿菌门中,而珊瑚虫组

织中的优势菌为变形菌门细菌;而对三亚珊瑚组织 SYZ 文库与西沙珊瑚组织 XSZ 文库比较发现,其共附生固氮菌也存在较大的差异,前者的多样性明显高于后者,表明珊瑚共附生固氮菌多样性与鹿角杯形珊瑚生活的地理位置有着密切的关系,相比远离大陆的西沙群岛而言,三亚湾的旅游、生活等人类活动更大程度的影响着珊瑚礁生态系统共附生固氮菌的生境,由于受到了人类的干扰,导致珊瑚组织内附生细菌与周围海水、沉积物共附生固氮菌直接进行了交流,这些外源固氮菌进入珊瑚组织内部,导致了固氮菌多样性的增加,这在一定程度上提高了对珊瑚共附生体氮营养的供给,也是珊瑚共附生体面对外界不良环境时的抵御机制之一。

References:

- [1] Gregory A, Lipschultz P F, McClelland J. Assimilation and partitioning of prey nitrogen within two anthozoans and their endosymbiotic zooxanthellae. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 262: 125-136.
- [2] Olson N D, Ainsworth T D, Gates R D, Takabayashi M. Diazotrophic bacteria associated with *Hawaiian Montipora* corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2009, 371(2):140-146.
- [3] Wilkinson C R, Williams D M, Sammarco P W, Hogg R W, Trott L A. Rates of nitrogen fixation on coral reefs across the continental shelf of the central Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 1984, 80(3):255-262.
- [4] Williams W M, Viner A B, Broughton W J. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with the living coral *Acropora variabilis*. *Marine Biology*, 1987, 94(4): 531-535.
- [5] Crossland C J, Barnes D J. Acetylene reduction by coral skeletons. *Limnology and Oceanography*, 1976, 1:153-156.
- [6] Chimetto L A, Brocchi M, Thompson C C, Martins R C, Ramos H R, Thompson F L. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Systematic and Applied Microbiology*, 2008, 31(4): 312-319.
- [7] Wegley L, Edwards R, Rodriguez-Brito B, Liu H, Rohwer F. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environmental Microbiology*, 2007, 9 (11): 2707-2719.
- [8] Lesser M P, Mazel C H, Gorbunov M Y, Falkowski P G. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science*, 2004, 305(5686): 997-1000.
- [9] Wang D Y, Wang H J, Li Y C, Yang Y, Liang W. Preliminary study of coral larvae supplementary source around Leizhou Peninsula. *Journal of Tropical Oceanography*, 2011, 30(2): 26-32.
- [10] Huang H, You F, Lian J S, Yang J H, Li X B, Dong Z J, Zhang C L, Yuan T. Species diversity and distribution of scleractinian coral at Xisha Islands, China. *Biodiversity Science*, 2011, 19(6): 710-715.
- [11] Zhang Q M. The biodiversity of coral reefs of Luhuitou of Sanya in danger. *Science News*, 2003, 9: 24-25.
- [12] Rohwer F, Breitbart M, Jara J, Azam F, Knowlton N. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs*, 2001, 20(1):85-91.
- [13] Koren O, Rosenberg E. Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(8): 5254-5259.
- [14] Zhang Y Y. Marine Nitrogen Fixation Rates and the Diversity of Marine Nitrogen-Fixing Microorganism in Sanya Bay, South China[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2008: 59.
- [15] Trower M K. In vitro mutagenesis protocols//Methods in Molecular Medicine. Totowa NJ: Humana Press, 1996, 57: 157-165.
- [16] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 2001, 152 (1): 95-103.
- [17] Widmer F, Shaffer B T, Porteous L A, Seidler R J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a douglas fir forest site in the oregon cascade mountain range. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 374-380.
- [18] Magurran A E. Population differentiation without speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 1998, 353(1366): 275-286.
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10): 2731-2739.
- [20] Wagner M, Loy A. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(3):218-227.
- [21] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, Steward G F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(7): 539-554.
- [22] Steward G F, Jenkins B D, Ward B, Zehr J P. Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (3): 1455-1465.

- [23] Young J P W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms//Stacy G, Burris R H, Evans H J, eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992: 43-86.
- [24] Young J P W. Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives//Palacios R, Mora J, Newton W E, eds. New Horizons in Nitrogen Fixation. London: Kluwer Academic Publishers, 1993: 587-592.
- [25] Ashby S F. Some observations on the assimilation of atmospheric nitrogen by a free living soil organism-*Azotobacter chroococcum* of beijerinck. Journal of Agricultural Science, 1907, 2(1): 35-51.
- [26] Keppen O I, Berg I A, Lebedeva N V, Taisova A S, Kolganova T V, Slobodova N V, Bulygina E S, Turova T P, Lvanovskii R N. *Chlorobaculum macestae* sp. nov., a New Green Sulfur Bacterium. Microbiology, 2008, 77(1): 69-77.
- [27] Kuta K G, Richardson L L. Ecological aspects of black band disease of corals: relationships between disease incidence and environmental factors. Coral Reefs, 2002, 21(4): 393-398.
- [28] Frias-Lopez J, Zerkle A L, Bonheyo G T, Fouke B W. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2214-2228.
- [29] Bourne D G, Munn C B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. Environmental Microbiology, 2005, 7(8): 1162-1174.
- [30] Zhao M X, Yu K F, Zhang Q M, Shi Q. Spatial pattern of coral diversity in Luhuitou fringing reef, Sanya. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(4): 1419-1428.
- [31] Rosenberg E, Kellogg C A, Rohwer F. Coral microbiology. Oceanography, 2007, 20(2): 146-154.
- [32] Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Marine Ecology Progress Series, 2002, 243: 1-10.
- [33] Fiore C L, Jarett J K, Olson N D, Lesser M. Nitrogen fixation and nitrogen transformations in marine symbioses. Trends in Microbiology, 2010, 18(10): 455-463.
- [34] Zhang Y Y, Dong J D, Zhang S, Wang Y S, Wang H K, Huang L M. Studies on nitrogen fixation physiology of marine cyanobacteria *Calothrix* sp. strain MCT1 and *Lyngbya* sp. strain MCT6. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(4): 46-50.
- [35] Ling J, Dong J D, Zhang Y Y, Cai C H, Wang Y S, Zhang S. Isolation and characterization of a N₂-fixing bacterium from coral reef-seagrass ecosystem. Microbiology, 2010, 37(7): 962-968.

参考文献:

- [9] 王道儒, 王华接, 李元超, 杨毅, 梁文. 雷州半岛珊瑚幼虫补充来源初步研究. 热带海洋学报, 2011, 30(2): 26-32.
- [10] 黄晖, 尤丰, 练健生, 杨剑辉, 李秀保, 董志军, 张成龙, 袁涛. 西沙群岛海域造礁石珊瑚物种多样性与分布特点. 生物多样性, 2011, 19(6): 710-715.
- [14] 张燕英. 南海三亚湾海洋生物固氮效率及固氮生物多样性的研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2008: 59.
- [30] 赵美霞, 余克服, 张乔民, 施祺. 三亚鹿回头石珊瑚物种多样性的空间分布. 生态学报, 2008, 28(4): 1419-1428.
- [34] 张燕英, 董俊德, 张偲, 王友绍, 王汉奎, 黄良民. 海洋固氮蓝藻 *Calothrix* sp. 与 *Lyngbya* sp. 固氮生理的研究. 热带海洋学报, 2006, 25(4): 46-50.
- [35] 凌娟, 董俊德, 张燕英, 蔡创华, 王友绍, 张偲. 一株珊瑚礁-海草床复合生态系统固氮菌的分离与鉴定. 微生物学通报, 2010, 37(7): 962-968.