

研究报告

不同发育阶段的黄癣蜂巢珊瑚共生虫黄藻多样性

徐建军¹ 谢子强² 肖逸林¹ 杨小东² 张凤丽¹ 廖宝林² 肖宝华² 李志勇^{1*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

(2. 广东海洋大学深圳研究院 广东 深圳 518120)

摘要:【背景】黄癣蜂巢珊瑚是我国南海主要的造礁石珊瑚之一，但至今未见对其共生虫黄藻的相关研究报道。【目的】研究黄癣蜂巢珊瑚不同发育阶段的共生虫黄藻多样性，探讨其获取途径。【方法】用荧光显微镜观察黄癣蜂巢珊瑚卵子、浮浪幼虫以及珊瑚成体中的共生虫黄藻。基于 ITS2 序列的克隆文库技术分析珊瑚卵子、浮浪幼虫、成体中共生虫黄藻的多样性。【结果】荧光显微镜观察结果显示，黄癣蜂巢卵子及发育至第 4 天的浮浪幼虫中均无共生虫黄藻。没有在黄癣蜂巢珊瑚卵子及 4 d 浮浪幼虫中检测到虫黄藻 ITS2 序列，但是在黄癣蜂巢珊瑚成体中检测到共生虫黄藻序列，系统发育分析提示为 C1 型虫黄藻。【结论】成体黄癣蜂巢珊瑚中发现了共生虫黄藻，而卵子、浮浪幼虫阶段均未发现虫黄藻，提示黄癣蜂巢珊瑚中的虫黄藻可能是后期从海水中水平转移而来，而不是由母体垂直遗传的。

关键词: 黄癣蜂巢珊瑚，虫黄藻，多样性，水平转移

Diversity of *Symbiodinium* associated with *Favia fava* at different life stages

XU Jian-Jun¹ XIE Zi-Qiang² XIAO Yi-Lin¹ YANG Xiao-Dong² ZHANG Feng-Li¹
LIAO Bao-Lin² XIAO Bao-Hua² LI Zhi-Yong^{1*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. Shenzhen Institute of Guangdong Ocean University, Shenzhen, Guangdong 518120, China)

Abstract: [Background] *Favia fava* is one of the main reef-building corals in the South China Sea. To our knowledge, to date no study has been performed on the symbiotic zooxanthellae in *F. fava*. [Objective] To investigate the phylogenetic diversity of the *Symbiodinium* in *F. fava* at different life stages, and to gain insights into potential acquisition mode of the *Symbiodinium*. [Methods] Fluorescence microscopy was used to detect the presence of symbiotic zooxanthellae in the eggs, larvae and adults of *F. fava*, respectively. Meanwhile, the clone library based on ITS2 sequence was constructed to assess the diversity of *Symbiodinium*. [Results] By means of direct examination with

Foundation item: National Major Scientific Research Program of China (2013CB956103)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34204036; E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

Received: April 24, 2018; Accepted: May 28, 2018; Published online (www.cnki.net): July 13, 2018

基金项目: 国家重大科学计划(2013CB956103)

*通信作者: Tel: 86-21-34204036; E-mail: zyli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-24; 接受日期: 2018-05-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-07-13

fluorescence microscopy, zooxanthellae was absent in the eggs and larvae but present in the adults of *F. favus*, which was assigned to *Symbiodinium* type C1 based on the ITS2 sequence analysis.

[Conclusion] Only *Symbiodinium* type C1 was present in adults rather than eggs and larvae, suggesting that the symbiotic zooxanthellae in *F. favus* were probably acquired by horizontal transmission from the environment instead of vertical transmission.

Keywords: *Favia favus*, Zooxanthellae, Diversity, Horizontal transmission

珊瑚礁是海洋生态系统中生物多样性最丰富的生态系统。造礁石珊瑚是形成珊瑚礁的基石,在珊瑚礁生态系统中具有最重要的地位^[1]。虫黄藻与造礁石珊瑚形成共生关系,虫黄藻能为珊瑚宿主提供营养物质来源,并参与珊瑚骨骼的形成^[2]。目前基于核糖体 DNA 可将虫黄藻划分为 9 个类型(A-I)^[3],每种类型又根据转录间隔区 ITS2 序列划分为更多亚型的虫黄藻(如 C1、D1 等)^[4],A、B、C、D 型虫黄藻是造礁石珊瑚主要的共生虫黄藻^[5]。珊瑚可能只与一种虫黄藻形成严格的共生关系或者与多种不同类型及亚型的虫黄藻共生^[6]。

珊瑚获取虫黄藻的方式有两种:一种是垂直遗传,珊瑚在繁殖时排出含有虫黄藻的卵子或者幼虫,直接将虫黄藻从母体转移至下一代^[7-9];另一种是水平转移,珊瑚排出的卵子或幼虫里不含有虫黄藻,子代在浮浪幼虫时期或附着幼虫时期通过摄取海水环境中的虫黄藻来获得共生虫黄藻^[10-14]。少数珊瑚能同时通过垂直遗传、水平转移两种方式获取虫黄藻^[15]。相对于水平转移获取的虫黄藻,垂直遗传来源的虫黄藻被认为与珊瑚具有更紧密的特异性共生关系^[16]。水平转移获取虫黄藻的方式可以使珊瑚更有机会获取新的虫黄藻类型,从而可能对环境变化产生更强的适应性^[17],因此在研究珊瑚与环境、气候变化适应关系方面具有重要意义。

目前,有关成体珊瑚虫黄藻多样性的研究报道比较多^[18-20],但是对于不同发育阶段珊瑚的共生虫黄藻多样性变化以及早期珊瑚虫黄藻获取方式的研究还很少。黄癣蜂巢珊瑚是我国南海主要

的造礁石珊瑚之一,至今未见对其共生虫黄藻的相关报道。本研究采用荧光显微镜、克隆文库技术比较黄癣蜂巢珊瑚卵子、浮浪幼虫和成体中的虫黄藻,探究其共生虫黄藻来源途径。对不同发育阶段珊瑚虫黄藻获取方式及群落结构动态变化的研究将有助于理解珊瑚与虫黄藻的共生关系,同时也有利于评估珊瑚共生藻群落与宿主或环境的关系。

1 材料与方法

1.1 珊瑚产卵与浮浪幼虫附着

在中国广东省深圳市鹅公湾海域(114°29'19"E, 22°29'18"N)采集 8 株黄癣蜂巢珊瑚,在海水池中暂养 2 个星期,等待珊瑚产卵。4 月中旬在海水池中静置悬挂 200 个 4 cm×4 cm 的陶瓷板,待产卵后诱导珊瑚幼虫附着使用。2017 年 6 月 9 日 20 时一株黄癣蜂巢珊瑚排出卵包,将卵包收集至孵化装置里进行人工授精。受精卵发育 1 d 后,将早期浮浪幼虫转移至珊瑚幼虫孵化缸中,在孵化缸中加入母株黄癣蜂巢珊瑚小块和珊瑚幼虫附着板。当大量浮浪幼虫栖息至附着基时(4 d),对浮浪幼虫进行收集并固定。珊瑚养殖所用的海水均为原位海水。

1.2 样本的收集及处理

取黄癣蜂巢珊瑚卵子、4 d 浮浪幼虫及成体,用无菌原位海水冲洗 3 遍,用 RNAlater 固定。黄癣蜂巢珊瑚卵子、4 d 浮浪幼虫、成体用 4%多聚甲醛固定 6 h (4 °C),随后用 PBS 清洗 5 次,每次 5 min,转入 100%甲醇,−20 °C 长期保存。

1.3 主要试剂和仪器及培养基

蛋白酶 K、甘氨酸,生工生物工程(上海)股份

有限公司; RNAlater, 广州东盛生物科技有限公司; DAPI 荧光染料, 北京索莱宝科技有限公司; QIAGEN Plant Mini Kit, 上海新睿生物科技有限公司; *ExTaq*、胶回收试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; pEASY-T5 Zero Clone Kit、大肠杆菌 Trans1-T1, 北京全式金生物技术有限公司。荧光显微镜, Nikon 公司; 石蜡切片机, Leica 公司; 生物电泳图像分析系统, 上海复日科技有限公司。LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 琼脂粉 15 (固体培养基)。

1.4 荧光显微镜观察

1.4.1 黄癣蜂巢珊瑚卵子、浮浪幼虫样本制备及荧光显微镜观察

甲醇固定的样本用 PBS 清洗 2 次(5 min), 10 mg/mL 的蛋白酶 K 工作液消化处理 15 min, 0.2% 甘氨酸清洗 2 次(5 min), 1% 三乙醇胺洗 1 次(5 min), 6 μ L/mL 的乙酸胺/1% 三乙醇胺液洗 1 次(5 min), 12 μ L/mL 乙酸胺/1% 三乙醇胺洗 1 次(5 min), PBS 洗 2 次(5 min), 4% 多聚甲醛再固定(30 min), PBS 洗 2 次(5 min)。黄癣蜂巢珊瑚卵子直接水封片并进行压片后观察, 黄癣蜂巢珊瑚 4 d 浮浪幼虫在载玻片孔中滴加 DAPI 工作液(1 μ g/mL) 10 μ L, 暗处放置反应 10 min, ddH₂O 清洗 2 次, 封片及进行压片观察。荧光显微镜使用的激发光均为 DAPI 激发光。

1.4.2 黄癣蜂巢珊瑚成体样本制备及荧光显微镜观察

黄癣蜂巢珊瑚成体解冻后, 用镊子将其中的螅体取出, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛再固定 2 h, 常规乙醇梯度脱水, 二甲苯透明处理, 65 $^{\circ}$ C 浸蜡, 石蜡切片机切片(8–10 μ m)。切片烘干后进行烤片, 浸入二甲苯, 梯度复水, PBS 清洗, 0.2 mol/L HCl 室温处理 10 min, 0.2% 甘氨酸清洗 2 次(5 min), 4% 多聚甲醛再固定 15 min。PBS 清洗 2 次(5 min), 水封片观察。荧光显微镜使用的激发光为 DAPI 激发光。

1.5 克隆文库构建与测序

1.5.1 总 DNA 提取

用 QIAGEN Plant Mini Kit 提取黄癣蜂巢珊瑚卵子、4 d 浮浪幼虫和成体样本的总基因组 DNA。加入 10 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 进行消化处理, 其余步骤均按试剂盒步骤操作, 提取出的产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5.2 ITS2-PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为模版, 使用虫黄藻特异性引物 ITSintfor2 (5'-GAATTGCAGAACTCCG TG-3')和 ITS2-reverse (5'-GGATCCATATGCTTAAG TTCAGCGGGT-3')^[21]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): TaKaRa *ExTaq* 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 基因组 DNA 1 μ L, ddH₂O 补足。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5.3 建立克隆文库及 ITS2 测序

将 ITS2 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 割胶回收目标条带(320 bp 左右)。用 TaKaRa 胶回收试剂盒进行回收纯化。PCR 纯化产物与 T5-Zero 载体连接, 用大肠杆菌 Trans1-T1 进行转化, 转化液涂布在含 100 μ g/mL 氨苄的 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 所得 ITS2 克隆子送上海桑尼公司进行测序。ML (Maximum likelihood)法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 虫黄藻的荧光显微镜观察分析

黄癣蜂巢珊瑚卵子、4 d 浮浪幼虫和成体的荧光显微镜观察结果如图 1 所示。图 1A、B、C 均为在 DAPI 激发光下显示的结果, 只有在黄癣蜂巢成体珊瑚中观察到虫黄藻。图 1C 中黄癣蜂巢珊瑚宿主在 DAPI 激发光下呈蓝色, 箭头所示为虫黄藻, 显示为橙色。虫黄藻的自发荧光是强于珊瑚本身的背景荧光, 因此可以区分珊瑚体内的虫黄藻。黄癣蜂巢珊瑚卵子、幼虫除了珊瑚本身背景的蓝色荧光外, 并没有显橙色的虫黄藻信号。

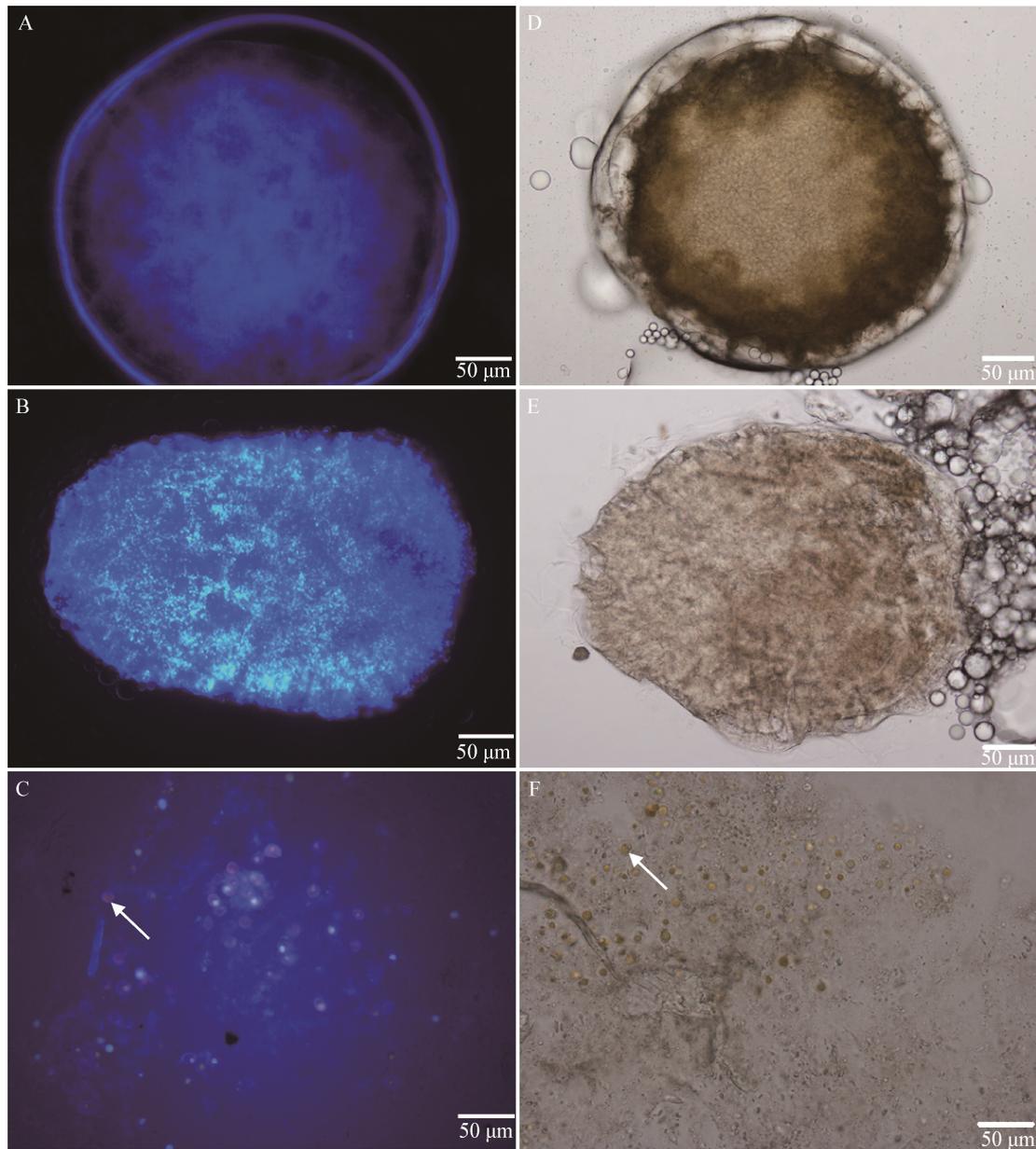


图 1 荧光显微镜观察

Figure 1 Fluorescence microscope observation

注: A、D: 黄癣蜂巢珊瑚卵子; B、E: 黄癣蜂巢珊瑚 4 d 浮浪幼虫; C、F: 黄癣蜂巢珊瑚成体.

Note: A, D: *Favia favus* egg; B, E: *Favia favus* 4d-larva; C, F: *Favia favus* adult.

2.2 珊瑚卵子、幼虫、成体虫黄藻的 ITS2 克隆文库分析

黄癣蜂巢珊瑚卵子总基因组 DNA 提取后, 利用虫黄藻特异性引物对 ITSintfor2/ITS2-reverse 进行 PCR 扩增, 目的片段的电泳条带在 320 bp 左右,

克隆文库一共有 22 个克隆子(图 2)。22 个克隆子序列在 NCBI 中 BLAST 比对结果均为黄癣蜂巢珊瑚的 ITS2 序列, 代表序列 SH-HX-C-11 在系统进化树中并未与虫黄藻聚在一起(图 3)。克隆文库结果显示黄癣蜂巢珊瑚卵子中没有共生虫黄藻, 与荧光显

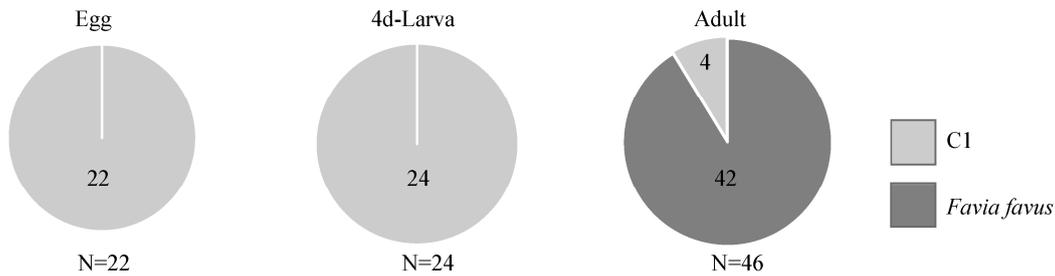


图 2 克隆文库统计分析

Figure 2 Clone library statistical analysis

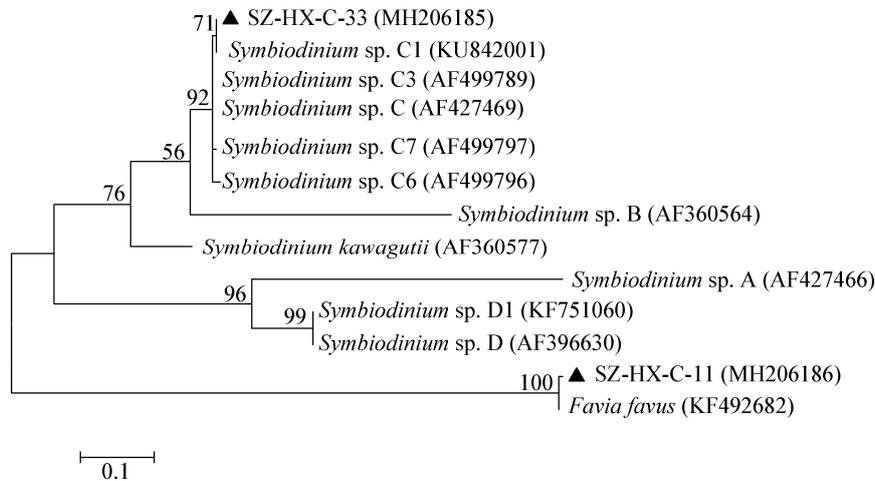


图 3 基于最大似然法的 ITS2 代表序列的系统发育树分析

Figure 3 Phylogenetic analysis of ITS2 DNA sequences using maximum likelihood (ML)

注：括号内为虫黄藻 ITS2 序列在 GenBank 中的序列登录号；刻度 0.1 代表该长度下的进化距离；分支点处仅显示大于 50% 的节点值。

Note: GenBank accession numbers are shown in parentheses; The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position; Bootstrap values higher than 50% are shown at branching points.

显微镜观察结果一致。

黄癣蜂巢珊瑚 4 d 浮浪幼虫和成体的 ITS2 克隆文库结果如图 2 所示，代表序列 SZ-HX-C-33 和 SZ-HX-C-11 的 GenBank 登录号分别为 MH206185 和 MH206186，最大似然法构建的系统发育树见图 3。4 d 浮浪幼虫克隆文库结果中无虫黄藻序列，黄癣蜂巢珊瑚成体一共 46 个克隆子，42 个为 *Symbiodinium* sp. C1 (SZ-HS-C-33)，4 个为黄癣蜂巢珊瑚 ITS2 序列。

黄癣蜂巢珊瑚的卵子和 4 d 的浮浪幼虫中均未检测到虫黄藻，黄癣蜂巢珊瑚成体检测到 C 型虫黄藻 (*Symbiodinium* sp. C1)，因此排除了垂直遗传的获取途径，提示黄癣蜂巢珊瑚虫黄藻可能是从环境中获取的。

3 讨论与结论

本研究通过荧光显微镜检测及克隆文库分析发现，黄癣蜂巢珊瑚的虫黄藻可能在珊瑚浮浪幼虫时期或者附着幼虫时期通过水平转移获得。Schwarz 等^[10]发现椭圆形石芝珊瑚在浮浪幼虫形成开口之后(3–4 d)才会获取海水中虫黄藻。Adams 等^[11]研究巨锥鹿珊瑚时发现在含有藻类基质的环境中，浮浪幼虫获取虫黄藻的时间(3 d)比海水环境中的获取时间早 6 d。Nitschke 等^[12]发现多孔鹿角珊瑚、石松鹿角珊瑚附着的幼虫在含有珊瑚母株以及藻类基质下的环境更容易获取虫黄藻。本研究中浮浪幼虫的培养环境是含有藻类附着基的海水环境并且提

供了小块的黄癣蜂巢珊瑚母株, 黄癣蜂巢珊瑚 4 d 浮浪幼虫已形成开口, 但是未在第 4 天的浮浪幼虫中检测到虫黄藻, 提示不同的珊瑚在早期发育中通过水平转移首次获取虫黄藻的时间并不一致, 可能具有一定的宿主特异性, 而且环境中的藻类附着基质以及珊瑚母株并没有促进浮浪幼虫对虫黄藻的获取。

刘丽等^[18]调研了徐闻珊瑚礁保护区中 25 种珊瑚共生虫黄藻群落均为 C 系群, 其中 19 种为 C1 类群, 包括标准蜂巢珊瑚(蜂巢珊瑚属)。Keshavmurthy 等^[19]研究了东沙群岛 20 种珊瑚的共生虫黄藻群落, 其中大部分珊瑚共生藻为 C 类群。董志军等^[20]研究了三亚鹿回头岸礁 22 种造礁石珊瑚共生藻的组成, 发现 18 种珊瑚的共生藻群落为 C 系群, 在黄癣蜂巢珊瑚中也发现 D 型虫黄藻。Zhou 等^[22]在芽状鹿角珊瑚早期发育过程中发现 6 d 附着幼虫的主要虫黄藻类群为 C2r, 而 31 d 附着幼虫主要虫黄藻类群转变为 D17。

本研究揭示黄癣蜂巢珊瑚共生藻群落为 C1 型虫黄藻, 黄癣蜂巢珊瑚并没有通过垂直遗传将虫黄藻转移至子代, 而是可能通过水平转移从海水环境中摄取虫黄藻。这种机制使珊瑚更有机会获得不同的虫黄藻类型, 从而解释珊瑚可能会在早期通过改变虫黄藻群落来适应未来环境变化。

REFERENCES

- [1] Connell JH. Diversity in tropical rain forests and coral reefs[J]. *Science*, 1978, 199(4335): 1302-1310
- [2] Falkowski PG, Dubinsky Z, Muscatine L, et al. Light and the bioenergetics of a symbiotic coral[J]. *BioScience*, 1984, 34(11): 705-709
- [3] Pochon X, Gates RD. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawaii[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 56(1): 492-497
- [4] LaJeunesse TC. "Species" radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(3): 570-581
- [5] Pochon X, Pawlowski J. Evolution of the soritids-*Symbiodinium* symbiosis[J]. *Symbiosis*, 2006, 42: 77-88
- [6] van Oppen MJH, Palstra FP, Piquet AMT, et al. Patterns of coral-dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of *Symbiodinium* strains and host-symbiont selectivity[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2001, 268(1478): 1759-1767
- [7] Hirose M, Kinzie R, Hidaka M. Timing and process of entry of zooxanthellae into oocytes of hermatypic corals[J]. *Coral Reefs*, 2001, 20(3): 273-280
- [8] Huang JY, Huang H, Zhang YY, et al. Embryonic and larval development of *Montipora turgescens* and *Acropora robusta*[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2011, 30(2): 67-73 (in Chinese)
黄洁英, 黄晖, 张浴阳, 等. 膨胀蔷薇珊瑚与壮实鹿角珊瑚的胚胎和幼虫发育[J]. *热带海洋学报*, 2011, 30(2): 67-73
- [9] Padilla-Gamiño JL, Pochon X, Bird C, et al. From parent to gamete: vertical transmission of *Symbiodinium* (Dinophyceae) ITS2 sequence assemblages in the reef building coral *Montipora capitata*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38440
- [10] Schwarz JA, Krupp DA, Weis VM. Late larval development and onset of symbiosis in the scleractinian coral *Fungia scutaria*[J]. *The Biological Bulletin*, 1999, 196(1): 70-79
- [11] Adams LM, Cumbo VR, Takabayashi M. Exposure to sediment enhances primary acquisition of *Symbiodinium* by a symbiotic coral larvae[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2009, 377: 149-156
- [12] Nitschke MR, Davy SK, Ward S. Horizontal transmission of *Symbiodinium* cells between adult and juvenile corals is aided by benthic sediment[J]. *Coral Reefs*, 2016, 35(1): 335-344
- [13] Cumbo VR, Baird AH, Van Oppen MJH. The promiscuous larvae: flexibility in the establishment of symbiosis in corals[J]. *Coral Reefs*, 2013, 32(1): 111-120
- [14] Gómez-Cabrera MDC, Ortiz JC, Loh WKW, et al. Acquisition of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) by juveniles of the coral *Acropora longicyathus*[J]. *Coral Reefs*, 2008, 27(1): 219-226
- [15] Byler KA, Carmi-Veal M, Fine M, et al. Multiple symbiont acquisition strategies as an adaptive mechanism in the coral *Stylophora pistillata*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59596
- [16] Thornhill DJ, Fitt WK, Schmidt GW. Highly stable symbioses among western Atlantic brooding corals[J]. *Coral Reefs*, 2006, 25(4): 515-519
- [17] Abrego D, Van Oppen MJH, Willis BL. Highly infectious symbiont dominates initial uptake in coral juveniles[J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(16): 3518-3531
- [18] Liu L, Chen YS, Shen YC, et al. Molecular taxonomy of symbiotic dinoflagellates in scleractinian corals[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 718-722 (in Chinese)
刘丽, 陈育盛, 申玉春, 等. 造礁石珊瑚共生藻的分子分类研究[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 718-722
- [19] Keshavmurthy S, Tang KH, Hsu CM, et al. *Symbiodinium* spp. associated with scleractinian corals from Dongsha Atoll (Pratas), Taiwan, in the South China Sea[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e2871
- [20] Dong ZJ, Huang H, Huang LM, et al. PCR-RFLP analysis of large subunit rDNA of symbiotic dinoflagellates in scleractinian corals from Luhuitou fringing reef of Sanya, Hainan[J]. *Biodiversity Science*, 2008, 16(5): 498-502 (in Chinese)
董志军, 黄晖, 黄良民, 等. 运用 PCR-RFLP 方法研究三亚鹿回头岸礁造礁石珊瑚共生藻的组成[J]. *生物多样性*, 2008, 16(5): 498-502
- [21] LaJeunesse T. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs[J]. *Marine Biology*, 2002, 141(2): 387-400
- [22] Zhou GW, Cai L, Yuan T, et al. Microbiome dynamics in early life stages of the scleractinian coral *Acropora gemmifera* in response to elevated pCO_2 [J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(8): 3342-3352