

造礁石珊瑚共生藻的分子分类研究*

刘 丽 陈育盛 申玉春 刘楚吾

(广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增殖广东省普通高校重点实验室 湛江 524025)

提要 通过 nlsrDNA (nuclear large-subunit ribosomal DNA)及 nssrDNA (nuclear small- subunit ribosomal DNA)的 PCR-RFLP 研究广东徐闻地区 8 科 15 属 25 种 62 个造礁石珊瑚样本的共生藻。结果表明, 共生藻 nlsrDNA 的 *Rsa* I 酶切基因型只存在一种, 属于 C 系群共生藻; 而 nssrDNA 的 *Mob* I 和 *Taq* I 两种酶切都存在两种基因型。实验进一步通过 PCR 直接测序法得到 62 个造礁石珊瑚样品的共生藻 ITS 序列, 与 GenBank 上的 4 种虫黄藻 ITS 序列构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 结果表明该区的造礁石珊瑚共生两种不同种类(亚系群)的共生藻, 分别为 C1 亚系群与 C15 亚系群共生藻, 两个亚系群间的遗传距离为 0.019。广东徐闻地区造礁石珊瑚共生藻多样性偏低, 暗示该地区珊瑚礁生态系统应对环境变化的能力可能较弱。

关键词 造礁石珊瑚, 共生藻, 分子分类

中图分类号 Q789

虫黄藻是与海洋无脊椎动物共生的一类单细胞藻类, 能吸收宿主代谢产生的二氧化碳、硝酸盐和磷酸盐等进行光合作用为宿主提供营养物质。在造礁石珊瑚的成礁过程中, 虫黄藻具有促进钙化的作用。此外, 许多研究表明虫黄藻的种类是影响造礁石珊瑚应对外界环境变化的主要因素之一(Chen *et al.*, 2005; Toller *et al.*, 2001)。

海水环境恶化导致了全球范围的珊瑚礁都发生了不同程度的白化、退化。研究发现环境因素导致的珊瑚白化死亡与其珊瑚体内虫黄藻种类有密切关系, 如共生藻密度和色素的下降与减少、光合抑制作用(Brown *et al.*, 2000; Ben *et al.*, 1999)等。所以, 虫黄藻的分类对于研究珊瑚礁生态系统应对海洋环境变化的变化机制有非常重要的意义。

由于虫黄藻在不同的生命周期有不同的形态特征, 而且受虫黄藻体外培养技术的限制, 分类问题不准确一直未得到很好的解决。近代分子生物技术的发展, 为解决虫黄藻分类问题提供了新技术。Rowan 等(1991a)首次通过 nssrDNA 基因的 PCR-RFLP 分析,

发现 16 种刺细胞动物共生着 6 种不同 nssrDNA 基因型的虫黄藻; 并比较造礁石珊瑚共生藻属与营自由生活的裸甲藻的 nssrDNA 基因序列, 发现有明显差异。Carlos 等(1999)利用 18S rRNA 基因将共生藻分为 A、B、C、D 四个系群; LaJeunesse(2001)通过 5.8S rDNA 序列将共生藻分为 A、B、C、D、E、F 六类。国内研究造礁石珊瑚共生藻的分子分类的报道较少, 董志军等(2008a, b)利用 28S rDNA 5'端序列的 PCR-RFLP 分析表明三亚鹿回头造礁石珊瑚共生藻以 C 系群为优势系群, 结合 ITS 序列分析发现福建东山岛海域 3 种优势种造礁石珊瑚共生藻都属于 C1 亚系群。

徐闻珊瑚礁国家级保护区由于地处偏僻, 针对该地区的造礁石珊瑚及其共生藻相关研究相当缺乏。本研究通过 nlsrDNA 和 nssrDNA 基因的 PCR-RFLP 结合 ITS 序列, 分析广东湛江徐闻珊瑚礁国家级自然保护区 8 科、15 属、25 种造礁石珊瑚的共生藻类群, 以期填补该区虫黄藻分类的研究空白, 为进一步加强该区珊瑚礁保护提供理论依据。

* 国家海洋公益性行业科研专项, 201105012 号; 广东省自然科学基金项目, S2011010000269 号; 广东省海洋渔业科技推广专项, A200908F01 号; 刘 丽, 副教授, E-mail: zjoulili@163.com

通讯作者: 刘楚吾, 教授, E-mail: liucw5206@163.com

收稿日期: 2010-12-25, 收修改稿日期: 2011-04-12

1 材料与方 法

1.1 造礁石珊瑚样品采集

实验所用的 8 科、15 属、25 种造礁石珊瑚样品来自广东湛江徐闻珊瑚礁国家级自然保护区, 见表 1。每种珊瑚样品数 1—5 个, -20℃ 保存。

1.2 总 DNA 提取

总 DNA 的提取主要参照卢圣栋(1999)的苯酚/氯仿法, 将珊瑚组织剪碎后消化过夜, 通过苯酚/氯仿抽提 3 次, 沉淀用无水乙醇冲洗 1 次, 干燥后溶于适量 T.E, 4℃ 保存。

1.3 nlsrDNA 5'端扩增及其 RFLP 分析

以总 DNA 为模板, 引物 5S: 5'-GCCGACCCGCTGAATTCAAGCATAT-3'和 D23zoox: 5'-TGTGGCAYGTGACGCGCAAGCTAAG-3' (Chen *et al.*, 2005), 体系为 25μl, 其中 10×Buffer 2.5μl, dNTP 2μl, 上下游引物各 1μl, *Taq* 酶 0.15μl, 模板 DNA 2μl, 补超纯水 16.35μl。PCR 程序为: 95℃ 变性 3min; 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 共 30 个循环; 最后

72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

取 10μl PCR 扩增产物, 用限制性内切酶 *Rsa* I 在 37℃ 酶切 4h。酶切产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 nssrDNA 扩增及其 RFLP 分析

以总 DNA 为模板, 引物 ss5z: 5'-GCAGTTATARTTTATTTGATGGTYRCTGCTAC-3'和 ss3z: 5'-AGCACTGCGTCAGTCCGAATAATTCACCGG-3' (Chen *et al.*, 2005), 体系同 1.3。PCR 程序为: 94℃ 变性 1min, 55℃ 退火 2min, 72℃ 延伸 3min, 共 30 个循环。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

取 10μl PCR 扩增产物, 用限制性内切酶 *Mob* I 和 *Taq* I 在 37℃ 酶切 4h。酶切产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 ITS 扩增和测序

以总 DNA 为模板, 引物 5'-CCGGTGAATTATTCGGACTGACGCAGTGCT-3'和 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (董志军等, 2008b), 体系同 1.3。PCR 程序为: 94℃ 变性 1min, 50℃ 退火 2min, 72℃ 延伸 3min,

表 1 本实验采集造礁石珊瑚样品
Tab.1 Scleractinia coral samples in the study

科	属	种	样品数	
滨珊瑚科 Poritidae	滨珊瑚属 <i>Porites</i>	澄黄滨珊瑚 <i>Porites lutea</i>	4	
		普哥滨珊瑚 <i>Porites pukoensis</i>	2	
	角孔珊瑚属 <i>Goniopora</i>	柱形角孔珊瑚 <i>Goniopora columna</i>	2	
		细角孔珊瑚 <i>Goniopora gracilis</i>	2	
		斯氏角孔珊瑚 <i>Goniopora stutchburyi</i>	3	
		标准蜂巢珊瑚 <i>Favia speciosa</i>	3	
蜂巢珊瑚科 Faviidae	蜂巢珊瑚属 <i>Favia</i>	多弯角蜂巢珊瑚 <i>Favites flexuosa</i>	2	
		秘密角蜂巢珊瑚 <i>Favites abidita</i>	2	
	角蜂巢珊瑚属 <i>Favites</i>	五角角蜂巢珊瑚 <i>Favites pentagona</i>	4	
		精巧扁脑珊瑚 <i>Platygyra daedalea</i>	3	
		多孔同星珊瑚 <i>Plesiastrea versipora</i>	2	
	扁脑珊瑚属 <i>Platygyra</i>	曲同星珊瑚 <i>Plesiastrea curta</i>	2	
		刺星珊瑚属 <i>Cyphastrea</i>	锯齿刺星珊瑚 <i>Cyphastrea serailia</i>	3
		刺孔珊瑚属 <i>Echinopora</i>	薄片刺孔珊瑚 <i>Echinopora lamellosa</i>	2
		菌珊瑚科 Agariciidae	牡丹珊瑚属 <i>Pavona</i>	球形牡丹珊瑚 <i>Pavona cactus</i>
	叶形牡丹珊瑚 <i>Pavona frondifera</i>			2
鹿角珊瑚科 Acroporidae	鹿角珊瑚属 <i>Acropora</i>	繁枝鹿角珊瑚 <i>Acropora acuminata</i>	1	
裸肋珊瑚科 Merulinidae	刺柄珊瑚属 <i>Hydnophora</i>	粗野鹿角珊瑚 <i>Acropora humilis</i>	1	
		邻基刺柄珊瑚 <i>Hydnophora contignatio</i>	2	
木珊瑚科 Dendrophylliidae	陀螺珊瑚属 <i>Turbinaria</i>	盾形陀螺珊瑚 <i>Turbinaria peltata</i>	3	
		不规则陀螺珊瑚 <i>Turbinaria irregularis</i>	5	
		稀杯盔形珊瑚 <i>Galaxea astreata</i>	4	
枇杷珊瑚科 Oculinidae	盔形珊瑚属 <i>Galaxea</i>	丛生盔形珊瑚 <i>Galaxea fascicularis</i>	2	
		顶枝珊瑚属 <i>Acrhelia</i>	顶枝珊瑚 <i>Acrhelia horrescens</i>	1
	铁星珊瑚科 Siderastreidae	筛珊瑚属 <i>Coscinaraea</i>	吞蚀筛珊瑚 <i>Coscinaraea exesa</i>	2

共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 8min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)有限公司测序。测回序列经 NCBI 比对, 用 DNAMAN 软件进行拼接, 用 MEGA4.0 进行基因序列分析, 并基于 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

2 结果

2.1 nlsrDNA 和 nssrDNA 基因的 PCR-RFLP

见图 1、图 2。实验中 62 个样品的 nlsrDNA 的 *Rsa* I 酶切基因型只有一种(图 1b), 图谱显示有两条位于 100bp 和 500bp 之间的特征亮带。

nssrDNA 的 *Mob* I 和 *Taq* I 两种酶切结果都显示有两种基因型存在, 如图 2 所示, 2b 与 2d 为一种基因型, 2c 与 2e 为一种基因型, 提示可能存在两种虫黄藻类型。

2.2 ITS 序列分析

在 GenBank 上选择分属不同系群或亚系群的 4

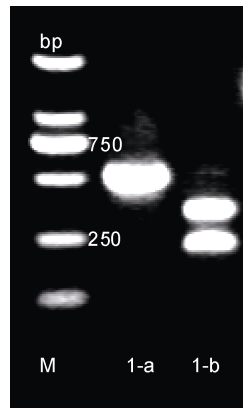


图 1 nlsrDNA 目的片段扩增带和 *Rsa* I 酶切图
Fig.1 Amplification of target fragment of nlsrDNA and PCR products of nlsrDNA were digested with *Rsa* I
注: a. 目的片段扩增带, b. *Rsa* I 酶切图, M. Marker DL2000

种虫黄藻 ITS 基因做外群, 利用 MEGA4.0 软件, 构建徐闻 25 种石珊瑚共生藻 Neighbor-Joining 系统发育树(同种石珊瑚有多个样品共生同种虫黄藻时只取其一建树)(图 3), 结果显示: 实验中的共生藻分别与 C1 亚系群和 C15 亚系群聚为两大分支, 而与 A 系群、D 系群亲缘关系较远。本实验中虫黄藻 ITS 序列 NCBI 登记号为: JQ291253—JQ291280。

3 讨论

造礁石珊瑚共生藻一般共生于珊瑚组织的内皮层细胞的液泡里, 它与造礁石珊瑚之间的共生关系早已被证实(Trench *et al.*, 1987)。当环境变化超过其共生体系的耐受极限时, 会导致珊瑚体内共生藻密度下降或者共生藻色素的减少, 或者二者同时发生, 导致共生体系崩溃, 从而引起珊瑚白化现象(Brown *et al.*, 2000; Ben *et al.*, 1999; Hoegh-Guldberg, 1999)。有研究发现, 造礁珊瑚应对环境变化所产生的一些物质是由共生藻合成的(Markell, 1995)¹⁾, 不同种类的共生藻对外界环境的敏感程度也不相同, 这暗示造礁石珊瑚共生藻共生体系应对外界环境变化的能力可能取决于共生藻。

RFLP 是研究种间关系或者种上系统发育的一种重要遗传标记, 已有研究将其应用于造礁石珊瑚共生藻分子分类, 并取得成果(Rowan *et al.*, 1991a, b; 董志军等, 2008a, b), 一般将虫黄藻分为不同系群(A、B、C、D、E、F 系群等)。本研究的 8 科 15 属 25 种造礁石珊瑚 62 个样本通过 nlsrDNA 基因的 PCR-RFLP 分析发现其共生藻类型都属于 C 系群。目前的研究表明 A、B 和 F 系群的共生藻常见于较高纬度(23—35°N)海域, 而 C 系群的共生藻多分布于印度太平洋海域(Baker, 1999²⁾; LaJeunesse *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2001), 本研究结果与这一结论相一致。在南沙群岛渚碧礁、西沙群岛附近海域以及三亚鹿回头都发现大部分造礁石珊瑚能单独与 C 系群共生藻共生, 且部分与 D 系群共生, 或同时共生 C、D 系群虫黄藻(董志军等, 2008a, b)。

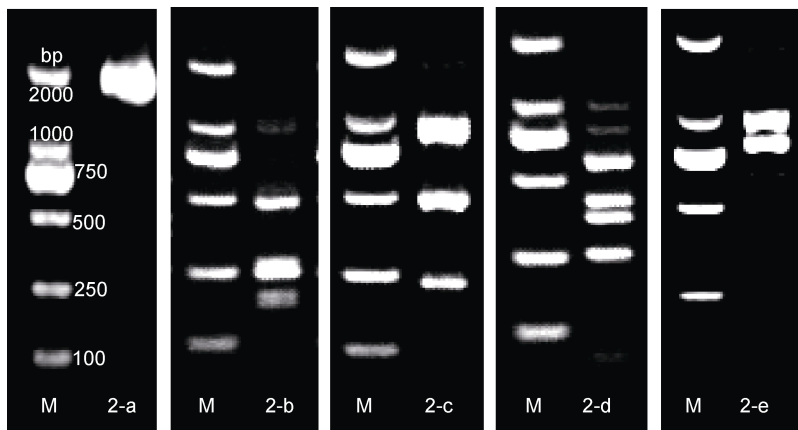


图 2 nssrDNA 目的片段扩增带、*Mob* I 酶切图、*Taq* I 酶切图

Fig.2 Amplification of target fragment of nssrDNA, PCR products of nssrDNA were digested with *Mob* I and *Taq* I
注: a. 目的片段扩增带, b、c. *Mob* I 酶切图, d、e. *Taq* I 酶切图, M. Marker DL2000

1) Markell D A, 1995. Macromolecules exuded by dinoflagellates in symbiosis: A biochemical and cellular analysis of specificity. Ph.D. thesis University of California at Santa Barbara, 1—144

2) Baker A C, 1999. The symbiosis ecology of reef building corals. Ph.D. thesis University Miami (USA), 1—120

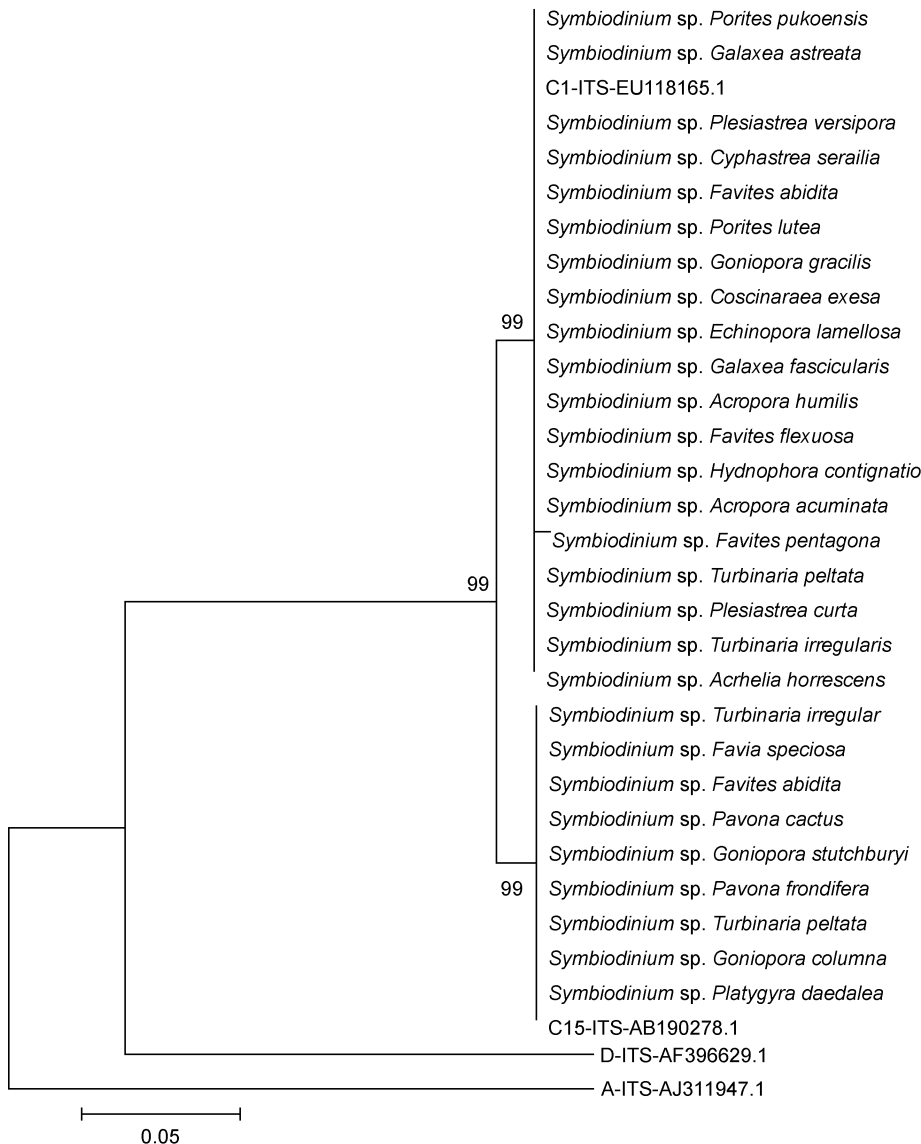


图3 基于 ITS 基因构建 25 种徐闻造礁石珊瑚的共生藻 NJ 树

Fig.3 NJ trees of *Symbiodinium* in 25 Sclerantinia corals of Xuwen reconstructed using NJ based on ITS sequences

根据王道儒等(2011)对雷州半岛珊瑚虫补充来源的初步研究显示徐闻地区的珊瑚幼虫补充主要来自于海南岛南部和西沙海域,而且大部分造礁石珊瑚共生藻的母系传递方式(Elizabeth, 1997), 后者的 D 系群或者其它种类的虫黄藻, 应该出现在徐闻海域的造礁石珊瑚虫体内。但是在徐闻海域本次研究并未发现在这三个海域所发现的单独与 D 系群共生藻共生, 或者同时与 C 和 D 系群共生的造礁石珊瑚。有研究表明造礁石珊瑚遭受环境压力后在恢复过程中 D 系群虫黄藻占优势地位(Toller *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2004), 暗示该区珊瑚礁可能在白化退化后的修复能力较弱。

本实验另外研究了共生藻 nssrDNA 基因的 PCR-RFLP 以及 ITS 序列, 实验结果显示, 在所研究的 62 个样本中, C 系群可以进一步细分为 C1 和 C15 亚系群, 其中 7 科 12 属 19 种 43 个样本共生 C1 亚系群的共生藻; 4 科 6 属 9 种 19 个样本共生 C15 亚系群的共生藻。两个亚系群的遗传距离是 0.019。C1 亚系群是东太平洋和印度洋海域的广布种群, Remier(2006a, b) 认为它不仅可与众多种类宿主共生, 并且可以适应不同的环境。有研究认为在正常条件下造礁石珊瑚选择与 C1 亚系群共生藻共生可提高其生长能力, 但这是以降低对环境变化耐受能力为前提的(董志军等, 2008b)。而 LaJeunesse 等(2003) 发现对于温度胁迫的耐受能力, C15 亚系群要高于 C1 亚系群。

本研究的造礁石珊瑚种类共有 8 科、15 属、25 种, 并未覆盖徐闻珊瑚礁国家级保护区的所有珊瑚种类, 但具有一定的代表性。造成该海域造礁石珊瑚共生藻种类较少的原因之一可能是该区海域位于内海湾, 各种海洋运动较为缓和, 海水环境相对稳定, 因此大部分造

礁石珊瑚通过自然选择与 C 系群(尤其是与 C1 亚系群)共生的造礁石珊瑚最多, 这可能与该区域是中国大陆架唯一一块正在发育的珊瑚礁有密切关系。

参 考 文 献

- 王道儒, 王华接, 李元超等, 2011. 雷州半岛珊瑚幼虫补充来源初步研究. 热带海洋学报, 30(2): 26—32
- 董志军, 黄 晖, 黄良民等, 2008a. 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. 生物多样性, 16(5): 498—502
- 董志军, 黄 晖, 黄良民等, 2008b. 福建东山附近海域造礁石珊瑚共生藻的分子系统分类和遗传多样性研究. 台湾海峡, 27(2): 135—140

- Baker A C, Starger C J, McClanahan T R *et al*, 2004. Corals' adaptive response to climate changes. *Nature*, 430: 471
- Ben Haim Y, Banim E, Kushmaro A *et al*, 1999. Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shilo*. *Environmental Microbiology*, 1: 223—229
- Brown B E, Dunne R P, Warner M E *et al*, 2000. Damage and recovery of photosystem II during a manipulative field experiment on solar bleaching in the coral *Goniastrea aspera*. *Marine Ecology Progress Series*, 195: 117—124
- Carlos A A, Baillie B K, Kawachi M *et al*, 1999. Phylogenetic position of symbiodinium (Dinophyceae) isolates from tridacnids (Bivalvia), cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. *Journal of Phycology*, 35: 1054—1062
- Chen C A, Yang Y W, Wei N Y *et al*, 2005. Symbiont diversity in the scleractinian corals from tropical reefs and non-reef communities in Taiwan. *Coral Reef*, 24: 11—22
- Elizabeth G, 1997. Histological analysis of reproductive trends of three *Porites* species from Kane 'ohe Bay, Hawaii' I. Reproduction in Reef Corals: Results of the 1997 Edwin W. Pauley Summer Program in Marine Biology. Hawaii Institute of Marine Biology Technical Report 42, HIMB, Kaneohe, Hawaii, 1997: 8—21
- Hoegh-Guldberg O, 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine and Freshwater Research*, 50: 839—866
- LaJeunesse T C, 2001. Investigating the biodiversity, ecology and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: In search of a "species" level marker. *Journal of Phycology*, 37: 866—880
- LaJeunesse T C, Loh W K W, Hoegh-Guldberg O *et al*, 2003. Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean. *Limnology and Oceanography*, 48: 2046—2054
- LaJeunesse T C, Trench R K, 2000. Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biology Bulletin*, 199: 126—134
- Remier J D, Takishita K, Maruyama T, 2006a. Molecular identification of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) from *Palythoa* spp. (Anthozoa: Hexacorallia) in Japan. *Coral Reefs*, 25: 521—527
- Remier J D, Takishita K, Ono S *et al*, 2006b. Latitudinal and intracolony ITS-rDNA sequence variation in the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium* (Dinophyceae) in *Zoanthus sansibaricus* (Anthozoa: Hexacorallia). *Phycological Research*, 54: 122—132
- Rodriguez L M, Loh W, Carter D, 2001. Latitudinal variability in symbiont specificity within the widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora*. *Marine Biology*, 138: 1175—1181
- Rowan R, Powers D A, 1991a. A molecular genetic identification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science*, 251: 1348—1351
- Rowan R, Powers D A, 1991b. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine Ecology Progress Series*, 71: 65—73
- Toller W W, Rowan R, Knowlton N, 2001. Zooxanthellae of the *Montastraea annularis* species complex: Patterns of distribution of four taxa of *Symbiodinium* on different reefs and across depths. *Biological Bulletin*, 201: 348—359
- Trench R K, Blank R J, 1987. *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *S. goreauii* sp. nov., *S. kawaguti* sp. nov. and *S. pilosum* sp. nov.: Gymnodinoid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. *Journal of Phycology*, 23: 469—481

MOLECULAR TAXONOMY OF SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES IN SCLERACTINIAN CORALS

LIU Li, CHEN Yu-Sheng, SHEN Yu-Chun, LIU Chu-Wu

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal, Regular High Education Institution of Guangdong Province, Zhanjiang, 524025)

Abstract Scleractinian corals-symbiotic dinoflagellates is one of the most important symbiotic systems in coral reefs, investigating the classification of symbiotic dinoflagellates is important in understanding how coral reefs will respond to environmental changes. This experiment investigated the composition of the dinoflagellate genus *Symbiodinium* of 25 species of scleractinian corals from 15 genera and 8 families in coral reefs of Xuwen through PCR-RFLP analysis of nlsrDNA (nuclear large-subunit ribosomal DNA), found the dinoflagellate genus *Symbiodinium* in 62 samples belong to clade C; using ITS (internal transcribed spacers) sequence analysis and PCR-RFLP of nssrDNA (nuclear small-subunit ribosomal DNA) confirms clade C can be further divided into two sub-clades. The results showed the diversity of the dinoflagellate genus *Symbiodinium* in scleractinian corals in Xuwen is relatively low, and suggested the ability of coral reefs ecosystem to respond to environmental changes is relatively poor.

Key words Scleractinian corals, Symbiotic dinoflagellates, Molecular taxonomy