

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17429

PCR-DGGE 指纹图谱技术分析发病龙须菜附生菌菌群组成

裴鹏兵^{1,3}, 陈洋¹, 邓绍鸿¹, 刘晓娟¹, 钟名其¹, 林琪³, 杜虹^{1,2}

1. 汕头大学 理学院 生物系, 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东 汕头 515063;
2. 汕头大学 理学院, 汕头大学-马尔凯理工大学藻类联合研究中心, 广东 汕头 515063;
3. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013

摘要: 本研究以 07-2 品系龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)为实验材料, 提取自然条件下代表不同病变程度的健康、病间、白化藻体的附生菌 DNA, 经 PCR 扩增 16S rDNA 基因的 V3 可变区并进行变性梯度凝胶电泳(DGGE), 分离 V3 片段, 再对目的条带进行克隆鉴定。实验结果经数据化后计算龙须菜附生菌数目并比较附生菌菌群多样性, 通过非度量多维尺度分析(nMDS)及多元梯度分析(RDA)来比较附生菌菌群组成相似性及优势菌群。实验结果表明, 随着龙须菜病变程度的加深, 附生菌菌落数及菌群多样性逐渐增加($P < 0.05$)。nMDS 分析结果表明, 健康藻体与白化藻体在附生菌菌群组成上存在差异, 病间藻体在附生菌菌群组成上与健康藻体更为接近。RDA 分析结果表明, 龙须菜健康藻体附生菌可能的优势菌群是海洋单胞菌属(*Marinomonas*), 病间藻体附生菌可能的优势菌群是单胞菌属(*Alteromonas*)、红杆菌科(*Rhodobacteraceae*)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*), 白化藻体附生菌可能的优势菌未能鉴定到, 而白化残留藻体附生菌鉴定到的优势菌有 *Maribacter*、红杆菌科、玫瑰变色菌属(*Roseovarius*)。从上述结果可以看出, 龙须菜健康藻体与发病藻体在附生菌菌群组成及优势菌上存在较大差异, 而介于两者之间的藻体在菌群组成上更偏向于健康藻体。

关键词: 龙须菜; 白化病; 附生菌菌群; 变性梯度凝胶电泳; 优势菌

中图分类号: S917, Q935

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-1040-11

藻类在生长过程中不断向周围环境释放胞外产物, 使藻细胞周围形成一个独特的微环境, 称为“藻际微环境”^[1]。在藻际微环境中, 生存着大量的微生物, 这些藻际微生物具有独特的结构和功能^[2-3]。微生物与海藻之间具有复杂的相互作用关系, 当环境条件改变时, 藻类主要通过释放活性物质的方式调整微生物的群落组成, 其中潜在的致病菌很容易引发藻类疾病^[4]。龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)隶属于江蓠属, 原产于中国黄海海域, 日本海及南非均有分布^[5]。为了发展中国产琼胶海藻栽培业, 研究人员对龙须菜进行了系统的遗传学研究, 成功实施了龙须菜在中国南方海域

栽培^[6]。近年来, 龙须菜养殖出现了大规模病害, 给养殖业造成巨大的经济损失^[7]。微生物作为大型海藻体内不可或缺的一部分, 其群落组成的改变与大型海藻病害的发生有着密切联系^[8]。研究藻际微生物可以为大型海藻病害防治奠定研究基础。

藻类附生菌菌群多样性的研究是了解附生菌与藻类相互作用的基础, 也是研究大型海藻病变机制的前提。目前对藻类附生菌菌群组成的瞬时变化知之甚少^[9], 传统研究手法主要依赖于细菌的纯培养及生化鉴定, 其多样性丢失难以反映实际菌群组成变化情况。随着分子生物学技术的发

收稿日期: 2017-12-1; 修订日期: 2018-01-24.

基金项目: 广东省海洋渔业科技与产业发展专项项目(A201405B06); 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室开放课题基金项目(2016fjscq02).

作者简介: 裴鹏兵(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生环境保护与修复. E-mail: peipengbing1990@126.com

通信作者: 杜虹(1976-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事藻类生理及生态修复方面的研究. E-mail: hdu@stu.edu.cn

展以及系统发育分析方法的应用, 16S rRNA 序列分析越来越多地用于研究复杂生态系统的微生物群落组成^[10-11], 而 16S rDNA 基因的 PCR 扩增片段通过变性梯度凝胶电泳(denature gradient gel electrophoresis, DGGE)的方法被广泛用于分析微生物群落组成变化^[12-13]。原核生物 16S rDNA 基因有 9 个大小不等的可变区, 其中 V3 区约为 200 bp, 适用于 DGGE 分离以及后续分析鉴定^[14]。

本研究通过提取不同发病程度的龙须菜藻体表面附生菌基因组 DNA, 并采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)技术研究龙须菜发病过程中附生菌菌群组成的变化, 以期找到与病害相关的病原菌, 有助于深入了解大型藻类病变的复杂机制, 对病害发生起到一定程度的检测、预警和防治。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品采集 健康及发病龙须菜均选自广东省汕头市汕头大学南澳深澳湾临海实验站龙须菜养殖海区, 深澳湾是营养盐浓度较低的海区, 尤其是 N 营养, 当硝酸盐浓度只有 0.611 $\mu\text{mol/L}$, 磷酸盐浓度仅为 0.124 $\mu\text{mol/L}$ 时, 养殖海区的龙须菜就会出现大面积的“绿化”现象^[15], 随着夏季来临, 龙须菜藻体会慢慢白化^[16]。这是藻体发病症状。所用品系为 07-2, 采集时间为 2014 年 11 月。样品装在盛有适量海水的密封袋内, 置于冰盒中运回实验室, 再用过滤海水漂洗 3 次, 洗掉杂质、淤泥、浮游动物等^[17]。

1.1.2 主要试剂和引物 德国 Biometra TGradient 梯度 PCR 仪, 美国 C.B.S. 公司生产的 DGGE-2001 基因突变检测仪, 多酶清洗液(3M 中国公司)等。

引物设计如下:

338 F-GC: 5'-CGCCCGCCGCGCGGCGGCGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCA G-3'

338 F: 5'-ACGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

534 R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

以上引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 龙须菜附生菌洗脱 龙须菜发病部位通常呈现向两端发散的趋势, 将预处理过的藻样分成 3 种类型, 依次代表龙须菜藻体的不同病变程度: 生长正常、未发病的呈褐红色的藻体, 定义为健康藻体(healthy, H); 发病早期、发病后期、藻体呈淡绿色或者白色且具有一定韧性和强度的藻体, 定义为白化藻体(bleached, B); 健康与白化过渡部位的藻体, 定义为病间藻体(adjacent, A)。用无钙镁离子的海水(calcium-and-magnesium-freesewater, CMFSW, 含 0.45 mol/L NaCl、10 mmol/L KCl、7 mmol/L Na_2SO_4 、0.5 mmol/L NaHCO_3 以及 10 mmol/L EDTA)来去除藻体表面附着疏松的微生物以及微藻。再将藻体切成 3~4 cm 长的小段, 健康与白化毗邻部位比较短, 切成 1~2 cm, 用吸水纸充分吸干表面水分, 称取(0.25 \pm 0.01) g 藻体。用 250 mL 锥形瓶装取 100 mL 灭菌的 CMFSW, 再加入 1 mL 多酶清洗液(多酶清洗液: 灭菌的 CMFSW=1:100)。然后置于摇床中 100 r/min 室温孵育 3 h。超声清洗 10 min, 50 W, 5 s/5 s。上清液 12000 r/min 离心收集沉淀。同时, 将洗脱之后的藻体分批装进改装后的 DNA 提取吸附柱中 12000 r/min 离心(将原装的硅胶膜换成滤纸片), 收集沉淀^[17], 定义为残留藻体(attached, a)。残留藻体共分为健康残留藻体(Ha)、白化残留藻体(Ba)和病间残留藻体(Aa)。

1.2.2 龙须菜附生菌菌群总 DNA 提取 DNA 提取采用 CTAB 法: 加 50 μL TE 缓冲液充分悬浮沉淀, 60 μL 10%的 SDS 溶液, 10 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K。温和混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。加入 100 μL 5 mol/L 的 NaCl 溶液, 80 μL CTAB/NaCl 溶液, 温和混匀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 10 min。加入 700 μL 氯仿/异戊醇(24:1), 温和混匀, 12000 r/min 离心 2 min。上清加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 温和混匀, 12000 r/min 离心 2 min。上清加入 2 倍体积冰冷的无水乙醇沉淀 DNA, 温和混匀, 沉淀时间至少 3 h。12000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15~20 min, 用 300 μL 70%预冷的乙醇洗涤沉淀, 12000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 彻底去除乙醇, 超净台风干 10 min。沉淀溶于 50 μL TE 缓冲液中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[18]。

1.2.3 附生菌 16S rDNA V3 区片段 PCR 扩增及纯化 PCR 反应体系(25 μL): $2\times\text{Taq Mix}$ 10 μL , 引物(10 pmol/ μL)各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 补足 25 μL 。采用降落式 PCR, 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 65~55 $^{\circ}\text{C}$ (每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$)30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 再进入以下循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (20 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。反应结束后取 2 μL 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测。取全部样品用 3% 琼脂糖凝胶电泳(100 V, 30 min), 紫外灯下切胶回收纯化, 测定 DNA 浓度^[19]。

1.2.4 变性梯度凝胶电泳及测序 应用 DGGE-2001 基因突变检测仪分离 PCR 产物。使用 8%(W/V)的丙烯酰胺凝胶(37.5:1), 变性梯度 40%~60%, 变性剂含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺(V/V)。电泳缓冲液为 $1\times\text{TAE}$, 电压 75 V, 60 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 14 h^[20]。电泳结束后 EB 染色 30 min, 转移至凝胶成像系统成像, 挑选具有代表性条带并编号, 在凝胶回收仪紫外光照射下迅速用 10 μL tip 头扎条带, 再转移至含有双蒸水的 PCR 管中, 反复吹打^[21]。按照 25 μL 体系加入不含 GC 夹子的 338F 和 518R 引物、 $2X$ Premix PCR, 扩增程序与 1.2.3 相同。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测至出现单一条带, 用离心柱法回收纯化。连接到 TaKaRa 公司的 pMD18-TVector 进行克隆, 导入 DH5 α 感受态细胞, 筛选重组子并进行菌落 PCR, 阳性克隆送至广州华大基因公司进行测序。测序结果在 GenBank 以及 RDP 数据库进行同源性分析^[22]。

1.2.5 附生菌群菌落形成单位计数 用 3221E 平板菌落计数法对不同病变程度的龙须菜表面附生菌群菌落进行计数, 各计数结果取以 10 为底的对数, 以此计算附生菌群菌落形成单位(CFU)^[23]。

1.3 数据处理与分析

DGGE 电泳胶图用 Quantity One 软件做数据化处理, 采用轨迹定量法, rolling disk size 选择 10 去除背景。Trace Qty 值小于 0.3 的条带去除掉。对泳道条带编号^[24]。用 UPGMA(Unweighted Pair Group Method Analysis)算法建树比较泳道之间相似性。选择平均峰密度值作为指标, 用 Matlab 计算样本多样性指数, 包括香农指数、丰度指数、均匀度指数。用 SPSS 对数据进行非度量多维尺度分析(non-metric Multidimensional Scaling, nMDS), 用 Canoco 软件进行多元梯度分析(Redundancy Analysis, RDA)。测序结果在 RDP 数据库中比对, 选择相似度最高的序列构建系统发育进化树^[25]。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 提取

按照上述 1.2.2 方法提取龙须菜各藻体基因组总 DNA, 其大小推测在 20 kb 左右(图 1)。细菌基因组大小也在 20 kb 左右, 实验结果与预期结果相符。图 1 显示, 从健康藻体到病间藻体再到白化藻体, 基因组电泳条带信号逐渐增强, 表明随着龙须菜藻体病变程度的加深, 提取到 DNA 的量逐渐增加, 且健康藻体与病间藻体经洗脱之

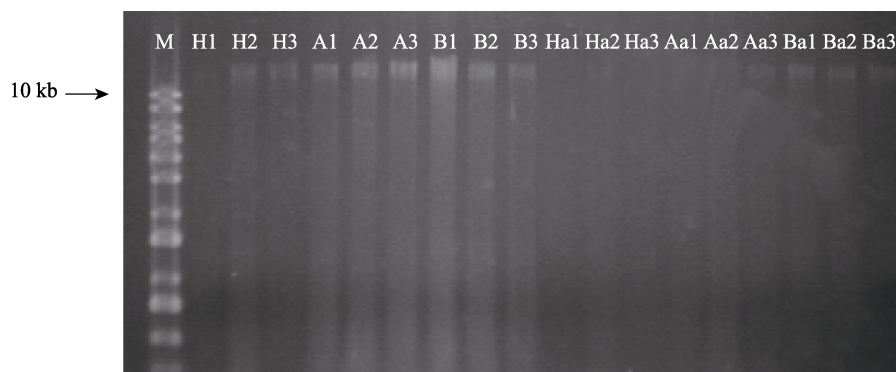


图 1 藻体不同部位附生菌基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

H: 健康藻体; A: 病间藻体; B: 白化藻体; Ha: 健康残留藻体; Aa: 病间残留藻体; Ba: 白化残留藻体.

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of epiphyte genomic DNA of different algae fronds

H: healthy; A: adjacent; B: bleached; Ha: healthy attached; Aa: adjacent attached; Ba: bleached attached.

后残留的 DNA 极少, 而白化藻体经洗脱离心后仍有部分残留的 DNA。

2.2 16S rDNA V3 区片段 PCR 扩增

按照 1.2.3 的方法扩增得到的 V3 区目的片段

约为 200 bp(见图 2), 与预期结果相符。从图 2 可以看出, 健康藻体、病间藻体、白化藻体和白化残留藻体均能扩增到目的片段, 而健康残留藻体与病间残留藻体未能扩增到目的片段。

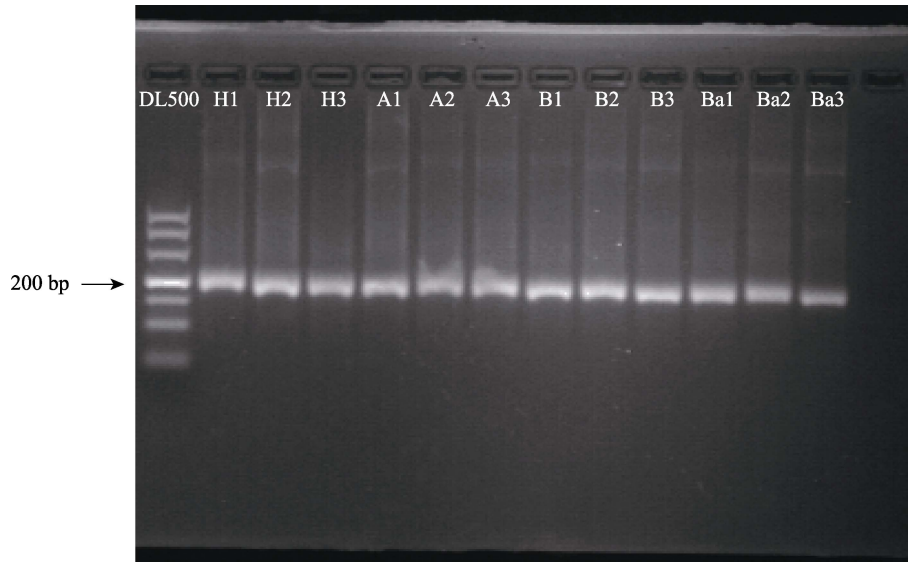


图 2 附生菌 16S rDNA V3 片段 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳图

H: 健康藻体; A: 病间藻体; B: 白化藻体; Ha: 健康残留藻体; Aa: 病间残留藻体; Ba: 白化残留藻体。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification from the V3 region of 16S rDNA gene of epiphyte

H: healthy; A: adjacent; B: bleached; Ha: healthy attached; Aa: adjacent attached; Ba: bleached attached.

2.3 DGGE 指纹图谱数据化及聚类分析

按照 1.2.4 的方法进行 DGGE 电泳, 染色结果如图 3 所示。健康藻体、病间藻体、白化藻体及白化残留藻体电泳条带的位置和数目差异不大, 选出亮度较为清晰的 23 条电泳条带(条带编号见图 3)。图 3 显示, 各组 3 个平行重复性较好。以第 5 条电泳条带为例, 通过观察发现, 同一水平线上不同藻体均有条带存在, 表明该细菌均存在于各个藻体中。健康藻体电泳条带信号强度最强, 病间藻体和白化藻体电泳条带信号强度相当, 而白化残留藻体电泳条带信号强度最弱, 表明不同藻体电泳条带信号强度有所不同。某一电泳条带信号的强弱代表着对应细菌丰度的高低, 电泳条带信号越强, 表明细菌丰度越高。其他电泳条带也表现出类似的规律, 这就表明, 不同藻体附生菌菌群丰富度是不同的。

利用非度量多维尺度(nMDS)方法^[26]对不同病变程度下龙须菜藻体附生菌菌群组成的差异和相似性进行分析, 其中 stress 值和 RSQ 值分别为

0.042、0.9957。如图 4 所示, H1、H2、H3、A1、A2 处于同一区域, B1、B2、B3、A3 处于同一区域, B2a、B3a 及 B1a 又处于另外两个不同的区域。从各样本分布的区域可以看出, 健康藻体(H1、H2、H3)与白化藻体(B1、B2、B3)在附生菌菌群组成上存在差异。由于病间藻体毗邻于健康藻体和白化藻体之间, 因此在附生菌菌群组成上, 健康藻体与病间藻体(A1、A2)较为相似, 白化藻体与病间藻体(A3)较为相似, 其中健康藻体与病间藻体在附生菌菌群组成上更为接近。而白化残留藻体(B2a、B3a 及 B1a)与健康藻体、病间藻体、白化藻体在附生菌菌群组成上存在较大差异。

2.4 菌落计数及多样性指数分析

2.4.1 稀释平板菌落计数 健康、病间及白化藻体稀释平板菌落计数结果如图 5 所示, 健康藻体、病间藻体、白化藻体附生菌平均数量分别为 7.67×10^5 CFU/mL、 1.03×10^7 CFU/mL、 2.07×10^8 CFU/mL, 健康藻体与病间藻体、白化藻体在附生菌数量上存在极显著性差异($P < 0.01$)。随着龙须菜藻体

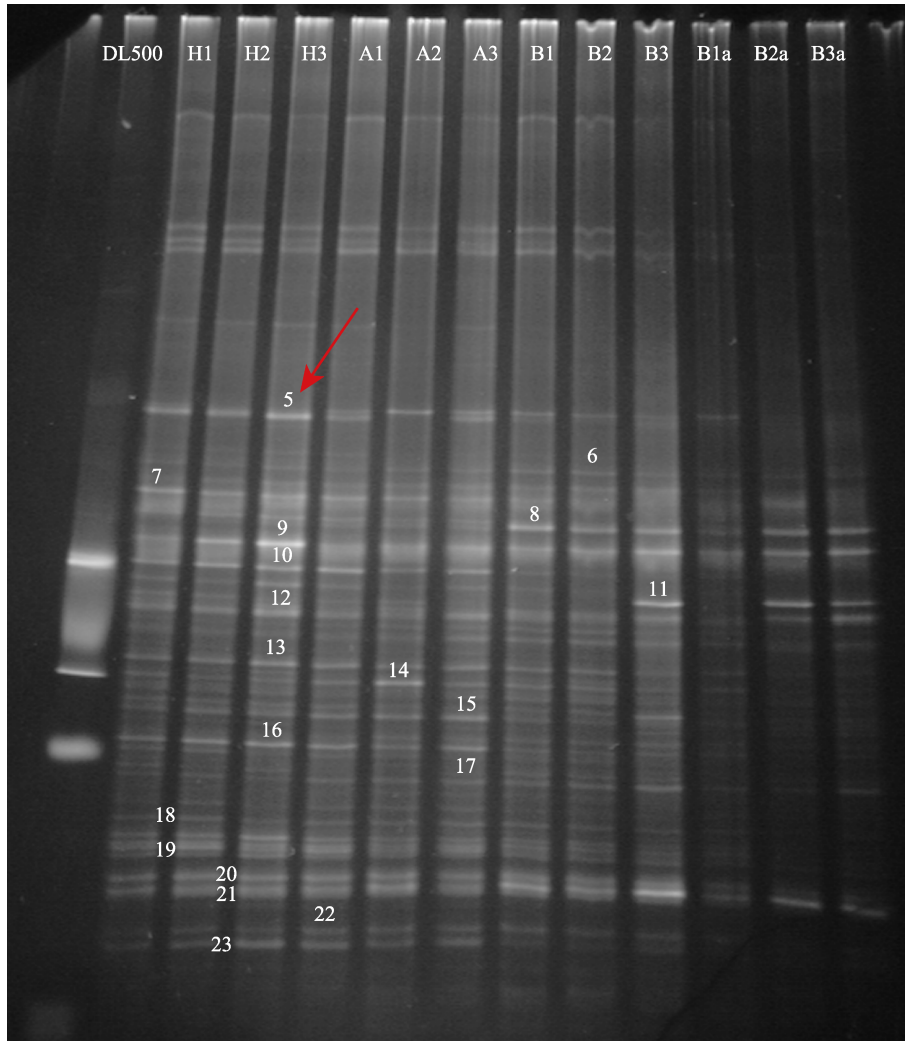


图 3 不同样品 16S rDNA V3 片段 DGGE 电泳胶图和未加权聚类分析

H: 健康藻体; A: 病间藻体; B: 白化藻体; Ha: 健康残留藻体; Aa: 病间残留藻体; Ba: 白化残留藻体.

Fig. 3 DGGE electrophoresis profile and UPGMA for V3 region of 16S rRNA gene from different samples

H: healthy; A: adjacent; B: bleached; Ha: healthy attached; Aa: adjacent attached; Ba: bleached attached.

病变程度的加深, 附生菌数量依次增加 1~2 个数量级。

2.4.2 多样性指数分析 表 1 显示, 健康藻体、病间藻体、白化藻体附生菌菌群 Shannon-Wiener 指数依次上升, 且白化藻体附生菌菌群 Shannon-Wiener 指数均显著高于健康藻体和病间藻体 ($P < 0.05$)。结果表明, 随着龙须菜藻体病变程度的加深, 其体表附生菌菌群多样性逐渐增高。在丰富度指数方面, 病间藻体附生菌菌群丰富度指数最高。在优势度指数方面, 白化残留藻体附生菌菌群优势度指数最高。

2.5 附生菌菌群组成分析

回收条带 TA 克隆测序后在 NCBI 以及 RDP

数据库进行比对鉴定, RDP 分类工具菌属置信度阈值为 80%。由表 2 可知, 克隆测序共鉴定到 20 株菌, 其中 α -变形菌纲 (α -Proteobacteria) 占据多数, 主要包含根瘤菌属 (*Rhizobium*)、红杆菌科 (Rhodobacteraceae)、玫瑰变色菌属 (*Roseovarius*)、鲁杰氏菌属 (*Ruegeria*)、*Seohaecicola* 等。属于 γ -变形菌纲 (γ -Proteobacteria) 的有海洋单胞菌属 (*Marinomonas*)、单胞菌属 (*Alteromonas*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 等。另外, 还有拟杆菌门 (Bacteroidetes) 中属于黄杆菌纲的有黄杆菌细菌 (*Flavobacteria bacterium*)、螳螂杆状体科 (Cryomorphaceae) 和 *Maribacter*, 属于拟杆菌纲的有拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和未培养的腐螺旋菌 (uncultured

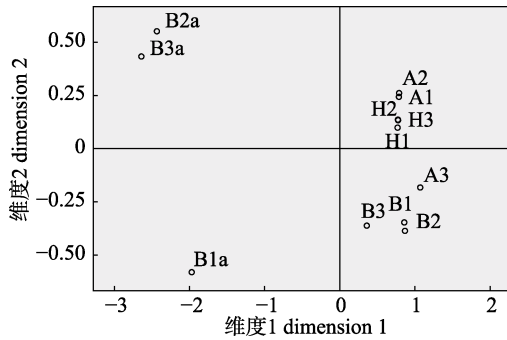


图 4 不同藻体附生菌 16S rDNA V3 片段非度量多维尺度分析

H: 健康藻体; A: 病间藻体; B: 白化藻体; Ha: 健康残留藻体; Aa: 病间残留藻体; Ba: 白化残留藻体.

Fig. 4 Non-metric multidimensional scaling of V3 region of 16S rDNA gene from epiphyte of different fronds
H: healthy; A: adjacent; B: bleached; Ha: healthy attached; Aa: adjacent attached; Ba: bleached attached.

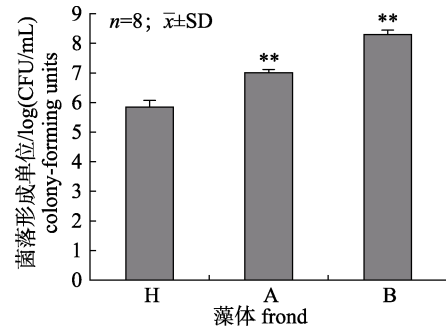


图 5 健康、病间及白化龙须菜藻体稀释平板菌落计数(CFU)

H 代表健康藻体; A 代表病间藻体; B 代表白化藻体; **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 5 Dilution plate count for healthy, adjacent and bleached *Gracilaria lemaneiformis* fronds
H: healthy; A: adjacent; B: bleached; ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

表 1 不同藻体附生菌菌群多样性分析

Tab. 1 Diversity analysis of epiphytic bacteria community from different fronds

$n=5; \bar{x} \pm SD$

分组 group	香农-维纳指数 Shannon-Wiener index, H'	丰富度指数 richness index, R	均匀度指数 evenness index, E	优势度指数 dominance index, D
H	3.47±0.01	29.00±4.36	1.01±0.02	0.037±0.001
A	3.51±0.01	33.33±0.58	1.00±0.005	0.035±0
B	3.75±0.1*	29.67±2.31	0.98±0.03	0.04±0.005
Ba	2.09±0.31*	8.30±1.52*	0.99±0.001*	0.139±0.04*

注: * 表示差异显著($P<0.05$); H 代表健康藻体; A 代表病间藻体; B 代表白化藻体; Ba 代表白化残留藻体.

Notes: * indicates significant difference ($P<0.05$); H means healthy; A means adjacent; B means bleached; Ba means bleached attached.

表 2 DGGE 目的条带测序比对结果

Tab. 2 The sequencing results of the DGGE target bands from the V3 region of 16S rRNA gene

条带 band	序列长度/bp sequence size	GenBank 最相似菌属 closest relative genus in the GenBank	GenBank 登录号 access number	相似性/% similarity
1	201	未培养的腐螺旋菌 uncultured <i>Saprosiraceae</i> bacterium	KF786864.1	97
2	166	未培养细菌 uncultured bacterium	LN681284.1	99
4	190	单胞菌 <i>Alteromonas</i> sp.	KF560344.1	99
8	179	假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	KP301110.1	98
10	192	黄杆菌细菌 <i>Flavobacteria</i> bacterium	AB496666.1	100
11	192	<i>Maribacter</i>	KJ814582.1	100
13	166	红杆菌科 Rhodobacteraceae	HE981566.1	98
14	192	拟杆菌属 <i>Bacteroides</i>	KF986715.1	88
16	171	海洋单胞菌 <i>Marinomonas</i> sp.	AY730245.1	97
20	194	螳螂杆状体科 Cryomorpaceae	FN678437.1	98
21	205	<i>Seohaecicola</i> sp.	KF312716.1	99
24	175	根瘤菌 <i>Rhizobium</i> sp.	KM020940.1	99
26	196	红杆菌科 Rhodobacteraceae	JX984075.1	99
29	170	玫瑰变色菌 <i>Roseovarius</i> sp.	FJ868590.1	98
31	170	红杆菌科 Rhodobacteraceae	KP001553.1	99
34	188	红杆菌科 Rhodobacteraceae	KP662554.1	99
35	168	玫瑰变色菌属 <i>Roseovarius</i>	KP261821.1	100
36	168	鲁杰氏菌 <i>Ruegeria</i> sp.	LC053425.1	100
37	168	<i>Sulfitobacter</i>	KP272159.2	100
38	168	鲁杰氏菌属 <i>Ruegeria</i>	KF911338.1	100

Saprospiraceae bacterium)等。

用 MEGA5.1 软件构建系统发育进化树, 采用 Test Neighbor-Joining Tree 算法^[25], Bootstrap Replications 设为 1000。由图 6 可知, 同属于 γ -变形菌纲的交替单胞菌(*Alteromonas* sp.)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)以及海洋单胞菌(*Marinomonas* sp.)聚为一类, 它们与拟杆菌门下的拟杆菌(*Bacteroidetes bacterium*)、未培养的腐螺旋菌(uncultured *Saprospiraceae bacterium*)以及黄杆菌细菌(*Flavobacteria bacterium*)、*Maribacter* 进化关系较为接近。

探究样本之间不同的优势菌菌群组成, 选择单峰模型对模型进行 DCA 分析, 特征值 <3 , 因此采用线性模型 RDA 分析^[27]。图 7 显示, 大部分细菌均处于健康藻体和病间藻体这两个环境因子之间, 且更靠近病间藻体, 少数细菌处于病间藻体和白化藻体这两个环境因子之间。这一结果表明, 大部分细菌与健康藻体、病间藻体附生菌菌群相关性较高, 尤其与病间藻体附生菌菌群相关性更高, 而极少数细菌与白化藻体附生菌菌群有相关性。大部分细菌与健康藻体和病间藻体附生菌菌群有较高的相关性, 但这并不意味着它们不存在于白化藻体中。已鉴定到的细菌中, 健康藻体附生菌优势菌群可能是海洋单胞菌属(*Marinomonas*,

编号 16)等。病间藻体附生菌优势菌群可能是单胞菌属(*Alteromonas*, 编号 4)、红杆菌科(Rhodobacteraceae, 编号 26)、假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*, 编号 8)等。白化藻体附生菌可能的优势菌及编号为 18、22、25 的条带未能鉴定到, 而白化残留藻体附生菌鉴定到的优势菌有 *Maribacter* (编号 11), 红杆菌科(Rhodobacteraceae, 编号 13), 玫瑰变色菌属(*Roseovarius*, 编号 29)。 α -变形菌纲的根瘤菌属(*Rhizobium*, 编号 24)、红杆菌科(Rhodobacteraceae, 编号 13、31、34)、玫瑰变色菌属(*Roseovarius*, 编号 35)、鲁杰氏菌属(*Ruegeria*, 编号 36、38)、*Seohaecicola*(编号 21)等菌属广泛分布于健康藻体和病间藻体这两个环境因子之间, 它们可能不是优势菌群, 但对维持龙须菜体表附生菌菌群的稳定起着重要作用。

3 讨论

3.1 龙须菜体表附生菌菌群多样性

本研究参考徐永健等^[3]研究龙须菜体表附生菌的分离方法, 尽量不破坏藻体以减少对体表附生菌的影响。采用多酶清洗液、超声清洗及离心的方法提取龙须菜体表附生菌 DNA 并扩增其 16S rRNA 基因 V3 区, 发现只有白化藻体有残留, 说明本研究的洗脱方法能较为彻底地将未发病龙须

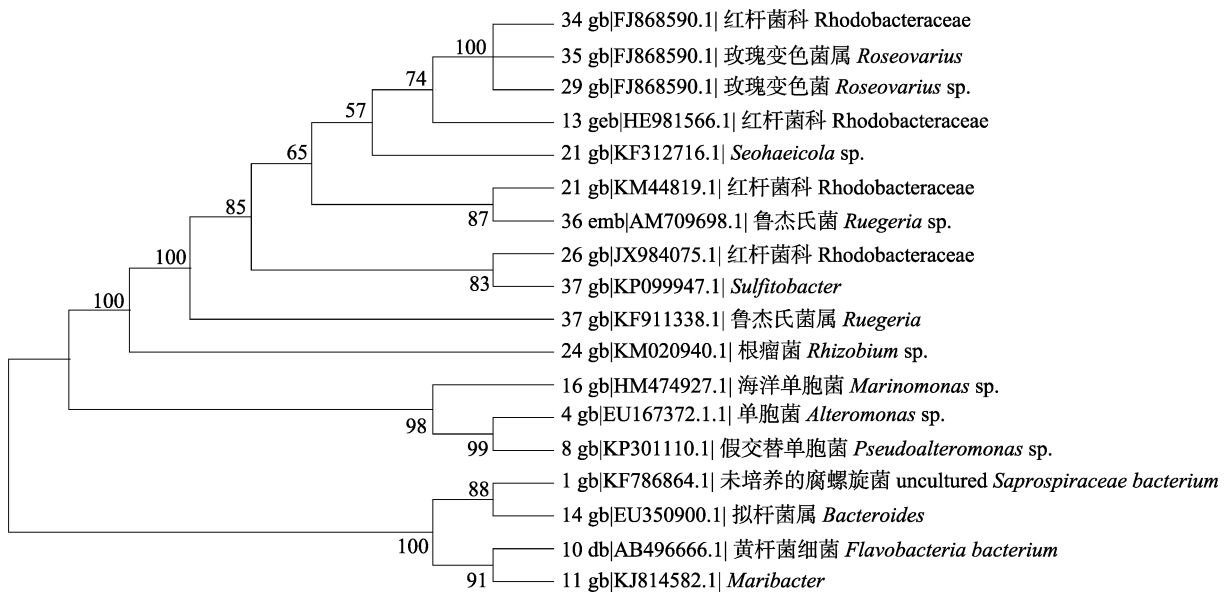


图 6 NJ 法构建 DGGE 条带序列系统发育进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of sequences (DGGE bands) constructed by NJ method

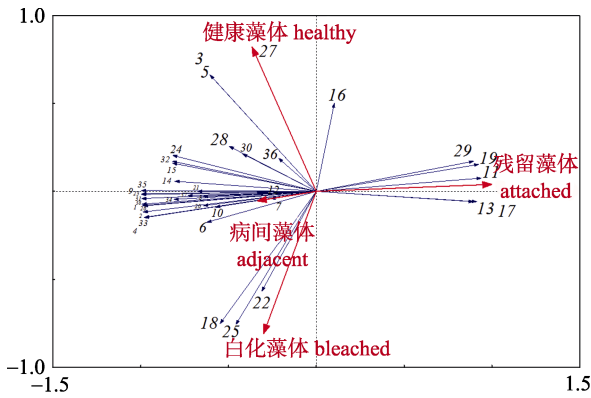


图 7 DGGE 条带 RDA 分析

Fig. 7 The redundancy analysis of DGGE bands

菜体表上的附生菌洗脱下来。尽管如此, 白化藻体仍有部分菌没有被洗脱下来, 说明这些菌与藻体结合非常紧密。Weinberger 等^[23]研究藻类 *Gracilaria conferta* 体表附生菌时发现, 60%的细菌比较敏感, 与藻体附着比较疏松, 而藻体在发病后期迅速降解, 释放过多的有机碳源会损坏藻体细胞细胞壁结构, 附生细菌更容易进入藻体内部, 加速藻体腐烂^[28]。正是因为附生细菌进入了藻体内部, 采用这种物理洗脱法很难将发病龙须菜附生细菌洗脱彻底。此外, 比较健康藻体、病间藻体及白化藻体附生细菌数量时发现, 白化藻体附生细菌数量极显著高于健康藻体($P < 0.01$), 且病间藻体附生细菌数量也极显著高于健康藻体($P < 0.01$)。鉴于大型海藻藻际微环境的特殊性, 附生菌与藻体黏附紧密, 白化藻体释放的有机碳源更多^[23], 这将有利于藻体附生菌的大量繁殖^[29]。在附生菌菌群多样性方面, 白化藻体附生菌菌群 Shannon-Wiener 指数显著高于健康藻体和病间藻体($P < 0.05$), 并且病间藻体附生菌菌群 Shannon-Wiener 指数高于健康藻体, 这也间接说明了龙须菜发病程度的加深会导致其体表附生菌菌群多样性提高。有研究表明^[30], 在海洋红藻 *Delisea pulchra* 白化个体中, 其辛普森多样性指数显著低于健康个体($P < 0.05$)。本研究中, 龙须菜藻体从健康到病间再到白化的过程中, 附生菌的多样性及丰度都显著增加。这可能与藻体表面附着的条件致病菌有关^[30], 藻体腐烂而释放的有机碳源会使这些条件致病菌大量繁殖^[29], 附生菌的多样性及丰度会相应地增加。此外, 白化残留藻体附生菌菌群 Shannon-

Wiener 指数显著低于健康藻体和病间藻体($P < 0.05$), 而白化残留藻体附生菌菌群优势度指数显著高于健康藻体、病间藻体和白化藻体($P < 0.05$), 这说明残留下来的附生菌数量很少, 而且种类比较单一。

3.2 龙须菜体表附生菌菌群

已有诸多研究证实, 大型海藻体表附生菌菌群组成整体上具有种属偏向性的特点^[31-33]。Mancuso 等^[31]对海洋褐藻 *Cystoseira compressa* 附生菌菌群多样性及时间动态变化进行研究, 发现变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门、疣微菌门(Verrucomicrobia)、放线菌门(Actinobacteria)和蓝细菌门(Cyanobacteria)为主要细菌门类, 包括红色细菌科(Rhodobacteriaceae)、黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、Sapropiraceae、疣微菌科(Verrucomicrobiaceae)和叶杆菌科(Phyllobacteriaceae)。Burke 等^[32]研究海洋绿藻 *Ulva australis* 附生菌菌群组成时发现, α -变形菌纲和拟杆菌门占据多数, 特别是红色细菌科、鞘脂单胞菌科(Sphingomonadaceae)、黄杆菌科和 Sapropiraceae。本研究结果显示, 鉴定到的 20 株龙须菜体表附生细菌主要属于 α -变形菌纲, 包括根瘤菌属、红杆菌科、玫瑰变色菌属、鲁杰氏菌属和 *Seohaecicola*。结合前人的研究发现, 大型海藻体表附生菌菌群整体上偏向于 α -变形菌纲, 但具体到菌属层面, 不同海藻体表附生菌菌群又有所差异。研究不同藻体附生菌菌群组成变化对预防藻体发病起着重要作用。Kitts^[34]用 T-RFLP 的方法研究海洋红藻 *Delisea pulchra* 病害藻体附生菌菌群组成时发现, 病害藻体附生菌菌群组成中的红杆菌目和鲁杰氏菌属未在健康藻体中鉴定到, 而健康藻体附生菌菌群组成中根瘤菌属的丰度远远高于病害藻体。另据 Compbell 等^[26]研究该红藻时发现, 白化藻体附生菌菌群组成与健康藻体附生菌菌群组成不同, 白化藻体附生菌作为温度调节菌对外界温度有着较为敏感的反应。本研究结果表明, 龙须菜健康藻体附生菌在菌群组成上与白化藻体附生菌存在差异, 病间藻体与白化藻体相比较, 病间藻体附生菌在菌群组成上与健康藻体附生菌更为接近。

许多珊瑚^[35]、海绵^[36-37]、大型海藻^[38]等海洋

生物附生菌菌群多样性系统发育分析结果均表明, 附生菌的繁殖具有选择性特征, 这些选择性附生菌一部分会形成优势菌群, 并且能够反映海洋生物的生长状况。有研究表明, 海洋红藻 *Delisea pulchra* 发病藻体体表附生菌优势菌群以红杆菌属(*Rhodobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、腐螺旋菌科(Saprosiraceae)较为丰富, 特别发现短小杆菌科(Parvularculaceae)是健康藻体体表附生菌的优势菌群, 而 *Colwelliaceae* 只出现在白化藻体体表附生菌菌群中^[39]。在本研究结果中, 龙须菜健康藻体附生菌优势菌群可能是海洋单胞菌属, 病间藻体附生菌优势菌群可能是单胞菌属、红杆菌科、假交替单胞菌属, 白化藻体附生菌可能的优势菌未能鉴定到, 而白化残留藻体附生菌鉴定到的优势菌有 *Maribacter*, 红杆菌科, 玫瑰变色菌属。这说明龙须菜在发病过程中, 其体表附生菌优势菌群发生了改变, 可能出现了致病菌。结合前人的研究发现, 龙须菜病间藻体以单胞菌属、红杆菌科及假交替单胞菌属为最优势菌群, 龙须菜病害的发生可能与这一类菌属有着密切联系。此外, 有研究证实^[40-41], 与大型海藻相关的病原菌主要集中在弧菌属(*Vibrio*)、单胞菌属、噬细胞菌属(*Cytophaga*)、黄杆菌属以及假交替单胞菌属或与之进化关系相近的菌属之中。

笔者后期鉴定到白化藻体的病原菌有 γ -变形菌纲下的白色噬琼胶菌(*Agarivorans albus*)、单胞菌属和假交替单胞菌属。这些病原菌均具有较强的琼胶酶活性, 可以降解江蓠属藻体细胞壁中含有的大量琼胶, 琼胶的降解可能与龙须菜病害的发生有关。Desikan 等^[42]发现, 假交替单胞菌属产生的 β -琼胶酶就能直接导致细基江蓠 *Gracilaria gracilis* 出现病症, 而由琼胶降解产物诱导的氧迸反应或超敏反应在江蓠属病害研究中也有关报道^[23]。因此, 当藻体表面附生菌优势菌群中含有此类细菌时, 很可能会导致藻体病害的发生。病原菌与藻类疾病表型上存在着一定的因果关系, 病原菌的空间分布可能是解开病害发生机制的关键^[40]。

本研究初步分析了龙须菜发病过程中其表面附生菌菌群组成及优势菌群的变化, 然而健康藻

体以及白化藻体还有很多优势菌群并未鉴定到, 要想更准确地反映藻体病变过程中菌群组成的变化情况, 还需要鉴定到更多菌属信息。PCR-DGGE 技术可以建立不依赖常规分离培养的病原菌分子诊断技术以及优势菌群组成分析, 其灵敏度较高, 分离效果较好, 但也存在着 PCR 放大误差、杂合、信息丢失以及优势菌群半定量等问题。利用微生物宏基因组学有可能弥补这些缺陷, 有助于深入研究大型海藻的病害机制。

参考文献:

- [1] Kirkman H, Kendrick G. Ecological significance and commercial harvesting of drifting and beach-cast macro-algae and seagrasses in Australia: a review[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1997, 9(4): 311-326.
- [2] Ramanan R, Kim B H, Cho D H, et al. Algae-bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(1): 14-29.
- [3] Xu Y J, Yue G Z, Zhang Y P. Comparison with several methods to isolate epiphytic bacteria from *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta)[J]. *Microbiology China*, 2007, 34(1): 123-126. [徐永健, 乐观宗, 张友平. 龙须菜体表附生细菌的几种分离方法比较[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(1): 123-126.]
- [4] Phillips J. Marine macroalgal biodiversity hotspots: why is there high species richness and endemism in southern Australian marine benthic flora[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2001, 10: 1555-1577.
- [5] Zhang X C, Fei X G, Wang G C, et al. Genetic studies and large scale cultivation of *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(5): 947-954. [张学成, 费修纭, 王广策, 等. 江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(5): 947-954.]
- [6] Meng L, Xu D, Chen W Z, et al. Selection and characterization of a new strain of *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(9): 94-98. [孟琳, 徐涤, 陈伟洲, 等. 龙须菜新品系 07-2 的筛选及性状分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(9): 94-98.]
- [7] Yang Y F, Fei X G. Prospects for bioremediation of cultivation of large-sized seaweed in eutrophic mariculture areas[J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2003, 33(1): 53-57. [杨宇峰, 费修纭. 大型海藻对富营养化海水养殖区生物修复的研究与展望[J]. *青岛海洋大学学报*, 2003, 33(1): 53-57.]
- [8] Qian F J, Chen H M, Yan X J, et al. Recent advances in algae immune defence[J]. *Marine Sciences*, 2013, 37(5): 108-113. [钱火箭, 陈海敏, 严小军, 等. 藻类免疫防御的研究进展[J]. *海洋科学*, 2013, 37(5): 108-113.]
- [9] Longford S R. The ecology of epiphytic bacteria on the marine red alga *Delisea pulchra*[D]. Sydney: University of New South Wales, 2007.
- [10] Bobrava O, Kristoffersen J B, Oulas A, et al. Metagenomic

- 16S rRNA investigation of microbial communities in the Black Sea estuaries in south-west of Ukraine[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2016, 63(2): 315-319.
- [11] Mikhailov I S, Zakharova Y R, Galachyants Y P, et al. Similarity of structure of taxonomic bacterial communities in the photic layer of lake baikal's three basins differing in spring phytoplankton composition and abundance[J]. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2015, 465(1): 413-419.
- [12] Hollants J, Leliaert F, De Clerck O, et al. What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 83(1): 1-16.
- [13] Mühling M, Woolven-Allen J, Murrell J C, et al. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2008, 2: 379-392.
- [14] Nakatsu C H, Torsvik V, Vreas L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2000, 64(4): 1382-1388.
- [15] Wang S J, Du H, Zhang Q F, et al. The influence of the cultivation of *Gracilaria lemaneiformis* on the pCO₂ in surface waters of Shengao Bay[J]. *Ecological Science*, 2017, 36(5): 152-159. [王首吉, 杜虹, 张清芳, 等. 龙须菜养殖对深澳湾表层水体 pCO₂ 的影响[J]. *生态科学*, 2017, 36(5): 152-159.]
- [16] Zhang Q F, Feng Y Q, Wen J Y, et al. The effects of light intensity and nitrogen on the physiology of the red macroalgae *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1065-1071. [张清芳, 冯颖琪, 温金燕, 等. 光照强度和氮营养盐浓度对龙须菜生理代谢的影响[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1065-1071.]
- [17] Fernandes N D. Molecular studies on the role of bacteria in marine algal disease[D]. Sydney: University of New South Wales, 2011.
- [18] Burke C, Kjelleberg S, Thomas T. Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 252-256.
- [19] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1): 127-141.
- [20] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology[J]. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2000, 1(2): 743-769.
- [21] Qi X L, Li B, Song S, et al. A kind of simple and efficient DNA recovery method from polyacrylamide gel[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(18): 214-217. [漆雪琳, 李博, 宋顺, 等. 一种简单高效的聚丙烯酰胺凝胶 DNA 回收方法[J]. *中国农业通报*, 2011, 27(18): 214-217.]
- [22] Cole J R, Wang Q, Cardenas E, et al. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(1): 141-145.
- [23] Weinberger F, Friedlander M. Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading ephytes[J]. *Journal of Phycology*, 2000, 36(6): 1079-1086.
- [24] Fernandes N, Steinberg P, Rusch D, et al. Community structure and functional gene profile of bacteria on healthy and diseased thalli of the red seaweed *Delisea pulchra*[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e50854.
- [25] Watanabe T, Hosen Y, Agbisit R, et al. Changes in community structure of methanogenic archaea brought about by water-saving practice in paddy field soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 58: 235-243.
- [26] Campbell A H, Harder T, Nielsen S, et al. Climate change and disease: bleaching of a chemically defended seaweed[J]. *Global Change Biology*, 2011, 17(9): 2958-2970.
- [27] Ai C, Liang G Q, Sun J W, et al. Different roles of rhizosphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 57(3): 30-42.
- [28] Lavilla-Pitogo C R. Agar-digesting bacteria associated with 'rotten thallus syndrome' of *Gracilaria* sp.[J]. *Aquaculture*, 1992, 102(1-2): 1-7.
- [29] An X L, Qi Z L, Li X M, et al. A review on ecological characteristics of sea weed *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Fisheries Science*, 2009, 28(2): 109-112. [安鑫龙, 齐遵利, 李雪梅, 等. 大型海藻龙须菜的生态特征[J]. *水产科学*, 2009, 28(2): 109-112.]
- [30] Kumar V, Zozaya-Valdes E, Kjelleberg S, et al. Multiple opportunistic pathogens can cause a bleaching disease in the red seaweed *Delisea pulchra*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3962-3975.
- [31] Mancuso F P, Hondt S D, Willems A, et al. Diversity and temporal dynamics of the epiphytic bacterial communities associated with the canopy-forming seaweed *Cystoseira cornpressa* (Esper) Gerloff and Nizamuddin[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(16): 476-486.
- [32] Burke C, Thomas T, Lewis M, et al. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(4): 590-600.
- [33] Hempel M, Blume M, Blindow I, et al. Epiphytic bacterial community composition on two common submerged macrophytes in brackish water and freshwater[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 58.
- [34] Kitts C L. Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics[J]. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2001, 2(1): 17-25.
- [35] Bourne D G, Munn C B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the great barrier reef[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(8): 1162-1174.
- [36] Taylor M W, Schupp P J, Nys R D, et al. Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(3): 419-433.
- [37] Lee O O, Wong Y H, Qian P Y. Inter- and Intraspecific variations of bacterial communities associated with marine sponges from San Juan Island, Washington[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3513-3521.
- [38] Beleneva I A, Zhukova N V. Bacterial communities of some

- brown and red algae from peter the Great Bay, the sea of Japan[J]. Microbiology, 2006, 75(3): 348-357.
- [39] Longford S R, Tujula N A, Crocetti G R, et al. Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2007, 48(3): 217-229.
- [40] Correa J A, Sanchez P A. Ecological aspects of algal infectious diseases[J]. Hydrobiologia, 1996, 326-327(1): 89-95.
- [41] Goecke F, Labes A, Wiese J, et al. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria[J]. Marine Ecology Progress Series, 2010, 409: 267-299.
- [42] Desikan R, Soheila A H, Hancock J T, et al. Regulation of the arabidopsis transcriptome by oxidative stress[J]. Plant Physiology, 2001, 127(1): 159-172.

Analysis of the bacterial community composition of the epiphytes on diseased *Gracilaria lemaneiformis* using PCR-DGGE fingerprinting technology

PEI Pengbing^{1,3}, CHEN Yang¹, DENG Shaohong¹, LIU Xiaojuan¹, ZHONG Mingqi¹, LIN Qi³, DU Hong^{1,2}

1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China;
2. Inauguration of STU-UNIVPM Joint Algal Research Center, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China;
3. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China

Abstract: *Gracilaria lemaneiformis*, one of the important sources of agar, is the third most widely cultivated seaweed in China, after *Laminaria* and *Laver*. In recent years, there has been a large-scale decrease in the cultivation of *G. lemaneiformis*, resulting in huge economic losses for the seaweed cultivation industry. Epiphytes grow as an integral part on the surfaces of large algae, and the variations in the seaweed-associated microbial community compositions are typically associated with disease occurrence. In this study, the *G. lemaneiformis* 07-2 strain was used as experimental material. DNA of epiphytes from the healthy, adjacent, and bleached fronds was extracted, and the V3 variables amplified from 16S rDNA genes were carried out by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Finally, the 23 objective bands were cloned and identified. The number and diversity index of the bacterial community of the epiphytes from the three fronds were calculated after digitization of the experimental results. The similarity among the dominant species in the bacterial communities were compared by non-metric multidimensional scaling (nMDS) and redundancy analysis (RDA). The results show that the colony forming units and bacterial community diversity increased gradually with the aggravation in the degree of lesion in *G. lemaneiformis* ($P < 0.05$). The nMDS results indicate that the bacterial community composition of the epiphytes varies between the healthy and bleached fronds, while the composition of adjacent fronds is closer compared with that between healthy fronds. The RDA results reveal that the potential dominant bacteria of the epiphytes of the healthy and adjacent fronds are *Marinomonas* and *Alteromonas*, *Rhodobacteraceae*, and *Pseudoalteromonas*, respectively. However, the potential dominant bacteria of the epiphytes of the bleached fronds were not identified. The dominant bacteria of the epiphytes of the bleached attached fronds were *Maribacter*, *Rhodobacteraceae*, and *Roseovarius*. It can be seen from the above results that there is a significant difference between the healthy fronds and the diseased fronds of *G. lemaneiformis* in terms of the bacterial community composition and dominant bacteria of the epiphytes, while the epiphytic bacterial community composition of the adjacent fronds was more similar than that of the healthy fronds.

Key words: *Gracilaria lemaneiformis*; bleached disease; bacterial community of epiphyte; DGGE; dominant bacteria

Corresponding author: DU Hong. E-mail: hdu@stu.edu.cn