科学通报 2013 年 第 58 卷 第 17 期: 1596 ~ 1603
专题: 南海珊瑚生物学与珊瑚礁生态学 论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

三亚湾壮实鹿角珊瑚组织内共附生固氮菌多样性分析

陈蕾[①②③], 张燕英[①②], 董俊德[①②*], 凌娟[①②③], 潘虎[①④], 张偲[①], 龙丽娟[①]

① 中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室, 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 中国科学院研究生院, 北京 100049;
④ 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410128
* 联系人, E-mail: dongjunde@vip.163.com

2012-04-20 收稿, 2012-05-17 接受, 2012-08-02 网络版发表
国家科技支撑计划(2009BAB44B03)、国家高技术研究发展计划(2012AA092104)、国家自然科学基金(41006069, 40676091)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-EW-G-12)

摘要 以海南省三亚鹿回头珊瑚礁自然保护区中一种常见的壮实鹿角珊瑚(*Acropora robusta*)为研究对象, 用 PCR-RFLP 方法研究其组织内共附生固氮微生物固氮酶 *nifH* 基因的多样性; 用 *Taq* Ⅰ和 *Hinf* Ⅰ这两种限制性内切酶对所获得的 196 个阳性克隆子进行 RFLP 分析, 得到 24 个不同的 OTUs (operational taxonomic units), 文库覆盖率为 87.65%. 利用 Clustal W 与 Mega 软件对 *nifH* 基因构建的系统进化树聚成了 3 大类: 变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和绿菌门(*Choloria*), 大部分的文库序列(70.83%)与变形菌门的 α 亚簇和 β 亚簇具有较高的相似性, 其中 α-变形菌簇占 66.67%, 是本文库中的优势种; 次优势类群为厚壁菌门, 占整个文库 OTUs 的 16.67%; 绿菌门仅占 12.5%. 此外, 在这株珊瑚样本中获得的 24 个克隆子中有 13 条 *nifH* 基因序列与它们最相近序列的相似性小于 97%. 综上结果表明该壮实鹿角珊瑚组织内的共生固氮菌的具有较高的多样性, 而且还可能含有大量未被培养的新的固氮基因.

关键词
壮实鹿角珊瑚
固氮菌
固氮酶基因 *nifH*
PCR-RFLP
多样性

造礁石珊瑚主要生活在氮素缺乏的寡营养热带海域, 珊瑚虫直接从周围海水或捕获的食物中获取的有机氮源非常有限[1,2]. 然而珊瑚礁生态系统作为海洋 4 大高效的生态系统之一, 具有极高的生物量和丰富的生物多样性[2], 因此珊瑚礁生态系统这种不但能维持自身氮素需求还能满足栖居海洋生物氮素需要的现象受到了广大学者的关注[3]. 研究表明, 珊瑚礁自身具有高效的内部氮素循环系统和保护机制[4,5]的同时, 还有大量的固氮菌共附生于珊瑚礁中[4~6]. 尤其在不同种属的活体珊瑚虫中, 固氮菌以较高的丰度和多样性存在于珊瑚虫的黏液[7,8]、组织[8,9]和骨骼[5]中, 当海水中的氨和硝酸盐供给不足时, 它们在固氮酶的作用下将溶解于水中的无机氮气 N_2 转化为有机氮源氨, 不仅为珊瑚共附生体利用[6], 而且还可为整个珊瑚礁生态系统提供约 6%的有机氮素[10].

由于珊瑚虫生活于清澈温暖的寡营养海域, 其独特的生态环境决定了珊瑚共附生固氮菌也将不同于其他生态系统中的固氮菌. 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鲜有报道. 因此本研究以我国三亚海域珊瑚礁区系常见的一株壮实鹿角珊瑚[11]为例, 利用聚合酶连锁反应和限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法, 通过对其组织内固氮酶基因 *nifH* 的多样性和系统发育进行分析和探索研究, 探讨我国南海海域中壮实鹿角珊瑚组织内共附生固氮细菌的多样性. 对共附生于珊瑚虫组织中固氮生物

引用格式: 陈蕾, 张燕英, 董俊德, 等. 三亚湾壮实鹿角珊瑚组织内共附生固氮菌多样性分析. 科学通报, 2013, 58: 1596–1603
Chen L, Zhang Y Y, Dong J D, et al. Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in diazotrophic bacteria associated with corals in Sanya Bay (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 1596–1603, doi: 10.1360/972012-51

多样性的研究, 加深了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

(ⅰ) 样品采集. 2011 年 4 月于海南三亚鹿回头岸礁采集壮实鹿角石珊瑚样品, 采样处的海水深度为 5 m, 用已经过消毒处理的锤子和凿子进行取样, 样品间相距约 4 m, 共获得珊瑚样本 3 份. 截取的珊瑚样本(4~6 cm)放入贴标签的无菌标本袋后, 立即置于船上的冰盒内保存[12].

(ⅱ) 样品处理. 回到实验站立即处理样品. 用经 0.22 μm 滤膜过滤紫外线灭菌的无菌海水反复冲洗珊瑚样品表面, 直至冲洗液无色透明、无杂质且无黏性[12], 随后 2675×*g* 离心以去除黏液[13], 最后将珊瑚组织样品用无菌锡箔纸包好, 放入有标签的无菌袋中–20℃保存直至实验室分析[12~14].

(ⅲ) 基因组 DNA 的提取以及固氮基因 *nifH* 的 PCR 扩增. 首先参照张燕英[15]的方法对样品进行去腐殖酸处理, 然后使用 EZgene^{TM} 土壤 gDNA 提取试剂盒(Biomiga)进行珊瑚组织总 DNA 的提取[13]; 采用 Olson 等人[14]设计的固氮基因 *nifH* 引物进行扩增. 引物序列为: 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′, 扩增出约 338 bp 大小的片段[14]. PCR 反应体系(25 μL)含 1×PCR 缓冲液(TaKaRa), 200 μmol L^{-1} dNTPs (TaKaRa), 1 μmol L^{-1} 引物(上海英骏生物技术有限公司合成), 4% BSA (Sigma), 10% DMSO (Sigma)和 2.0 U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa). PCR 扩增程序为: 95℃预变性 5 min; 95℃, 40 s, 55℃, 40 s, 72℃, 40 s, 30 个循环; 最后 72℃延伸 6 min. PCR 产物经 1.5%琼脂糖电泳检测后, 采用纯化回收试剂盒(TaKaRa)将目的条带进行纯化回收后, 置于–20℃备用.

(ⅳ) 扩增产物的克隆和 RFLP 分析. 将 *nifH* 基因片段与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接后转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(TaKaRa)中, 通过蓝白斑筛选初筛, 然后采用载体的特异性扩增引物 M13/RV (上海英骏生物技术有限公司合成)对菌落进行 PCR 扩增以检测阳性克隆[16]. PCR 反应体系(25 μL)和扩增程序同(ⅲ). 将所获得的阳性克隆进行限制性内切酶 *Taq* Ⅰ(TaKaRa)和 *Hin*f Ⅰ(TaKaRa)酶切[17,18], 酶切产物经过 3.0%的琼脂糖凝胶电泳检测后分析带型.

(ⅴ) 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 OUTs (operational taxonomic units), 每个 OUT 挑取一个典型代表克隆子交送给上海美吉医药科技有限公司测序. 然后在 BLAST 软件 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. 最后利用 Clustal W 和 Mega 软件中的邻接法(Neighbor-Joining)建立 *nifH* 基因的系统发育树, 其支长代表了分歧度, 各支上的自举值为 1000, 表示 1000 次 bootstrap 重复样分析的支持百分比. 同时将测序后的基因序列直接递交给 GenBank 数据库, 24 个序列均成功递交, 序列号为 JQ023566~JQ023589.

2 结果与分析

2.1 壮实鹿角珊瑚组织内共生微生物总 DNA 提取及固氮酶 *nifH* 基因片段的扩增

目前提取珊瑚虫内共附生微生物总 DNA 的方法主要有两种: 一种为传统的手提法, 如 CTAB 法[12]和酶裂解法[19]等; 另一种为试剂盒抽提方法, 由于目前还没有专门针对珊瑚虫总 DNA 的试剂盒, 因此主要选用的是动物组织提取试剂盒[14]和土壤提取试剂盒[8,12,20], 其中用土壤提取试剂盒抽提的珊瑚组织内共附生微生物总 DNA 无论是利用克隆文库技术还是宏基因组学, 都取得了非常好的效果. 本实验样品经脱腐殖质处理后用 EZgene^{TM} 土壤 gDNA 提取试剂盒亦可以较好地提取到珊瑚组织内共附生微生物总 DNA. 固氮生物多种多样, 但其生物固氮作用均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[16,21,22], 因此本研究选择固氮酶 *nifH* 基因的保守区段作为分子标记, 构建壮实鹿角珊瑚组织内共附生固氮菌的克隆文库.

2.2 插入片段的 *nifH* 酶切图谱分析

将扩增回收后的 *nifH* 扩增片段进行连接、转化和培养后, 从克隆文库中随机挑选了 288 个克隆子做菌落 PCR, 阳性率为 85.76%. 最终挑取了 196 个 *nifH* 基因克隆子, 用 *Hin*f Ⅰ和 *Taq* Ⅰ限制性内切酶进行文库的 RFLP 酶切图谱分析, 根据酶切位条带的大小和

片段数目将 *nifH* 文库分为 24 种带型, 代表了 24 个不同的 OTUs, 文库的多样性覆盖率为 87.76%. 实验所得的部分克隆子的酶切图谱如图 1 所示, *Taq* Ⅰ和 *Hin*f Ⅰ的部分酶切图片分别列于图 1(a)和(b)中, *Taq* Ⅰ能很好地切割 *nifH* 基因, 而 *Hin*f Ⅰ识别 *nifH* 的保守区[17], 酶切条带非常一致, 不利于进行多样性分析.

该样品中有个明显的优势种群 SYA11, 占克隆子数的 27.55%, 同时还有 3 个次要的优势种群: SYA6 (16.33%), SYA20 (14.29%)和 SYA7 (12.24%). 样品中具有 3 个以上克隆数目的 OTUs 占据了总 OTUs 数的 45.83%, 克隆子数高达 87.76%. 而只有 2 个克隆子或单克隆子的 OTUs 占据了总 OTUs 数的 54.17%, 克隆子数仅占总数的 12.24%. 这说明大部分的 OTUs 是由少量的克隆数产生的.

2.3 克隆文库的序列比对和遗传多样性分析

根据固氮酶 *nifH* 基因文库 RFLP 分析所得结果, 挑取了 24 个克隆进行了测序分析, 将测得的序列与 GenBank 数据库中的序列进行相似性比对. 结果发现, 54.17%的克隆序列与数据库中已知的序列相似性大于 97%, 37.5%的克隆序列相似性介于 90%~97%, 8.33%的克隆序列相似性介于 85%~90%. 其中 75%的克隆序列与已发布的数据库中的未培养固氮细菌的相似性最高, 仅有 25%的克隆序列与数据库中的可培养的固氮菌有较高的相似性, 而且与可培养的固氮菌相似序列高于 97%的克隆子也仅占 16.67%, 表明文库中这 24 条 *nifH* 基因序列绝大部分为首次发现的新基因序列, 国内外还未被报道. 该结果与先前报道的共附生于珊瑚中的固氮菌大多为未知不可培养细菌[14,23]的研究结果相一致. 我们推测, 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作与协同作用, 形成了一个复杂但又紧密联系的功能复合体[23], 因此这些菌很难通过传统的可培养方法被单独培养.

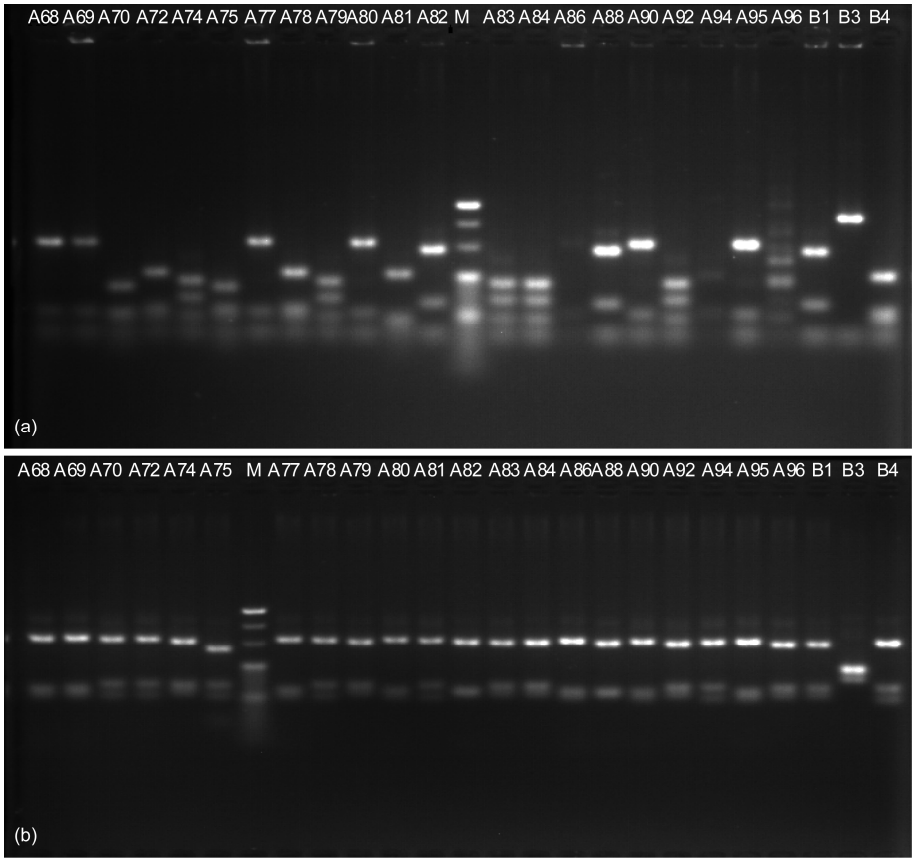


图 1 部分克隆子的 *Taq* Ⅰ (a)和 *Hin*f Ⅰ (b)酶切图谱

M, 20 bp DNA ladder (TaKaRa), 条带大小由上到下分别为 500, 400, 300, 200 和 100 bp

以 *nifH* 基因序列分析构建的系统发育树将 24 条 *nifH* 基因片段序列构建成了 3 个大的系统发育分支, 其中变形菌门(*Proteobacteria*)占 17 个, 涵盖了α亚门(16 个)和β亚门(1 个); 厚壁菌门(*Firmicutes*) 4 个以及绿藻门(*Choloria*) 3 个, 系统进化树详见图 2.

SYA11, SYA20, SYA50, SYA28, SYA75 和 SYB29 与从墨西哥甘蔗中分离到的不可培养的固氮菌的 *nifH* 基因相似性为 92%~99%, 它们在系统发育分类上与 *α-proteobacteria* 最相似(表 1). 这 5 个 OTUs 所包含的克隆子数占到了整个文库 47.96%, 是整个文库中的优势类群. SYA24, SYA81 与 SYB50 同高粱根际土壤中分离到的固氮菌相似性为 93%和 94%, 推测这些序列与已知的微生物具有一定的亲源关系[24].

SYA16, SYA70, SYB60, SYC51 和 SYC91 与切萨皮克湾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. Rohwer 等人[20]在研究 *Diploria strigosa*, *Porites astreoides* 和 *Montastraea franksi* 这 3 种珊瑚组织内共附生细菌多样性时亦发现, 有许多共附生细菌的 16S rDNA 序列与已知的有固氮功能的细菌的相似性非常高, 并且其最近源序列多来自于海域环境, 这表明珊瑚组织中可能存在一类广泛分布于海洋环境的固氮菌, 它们对环境具有较强的适应性, 在珊瑚礁生态系统氮素的生物地球化学循环中起着重要的作用.

SYB23, SYA17, SYA6 和 SYA7 在系统发育树中与 *Paenibacillus durus* 菌聚在了厚壁菌门的分支内,

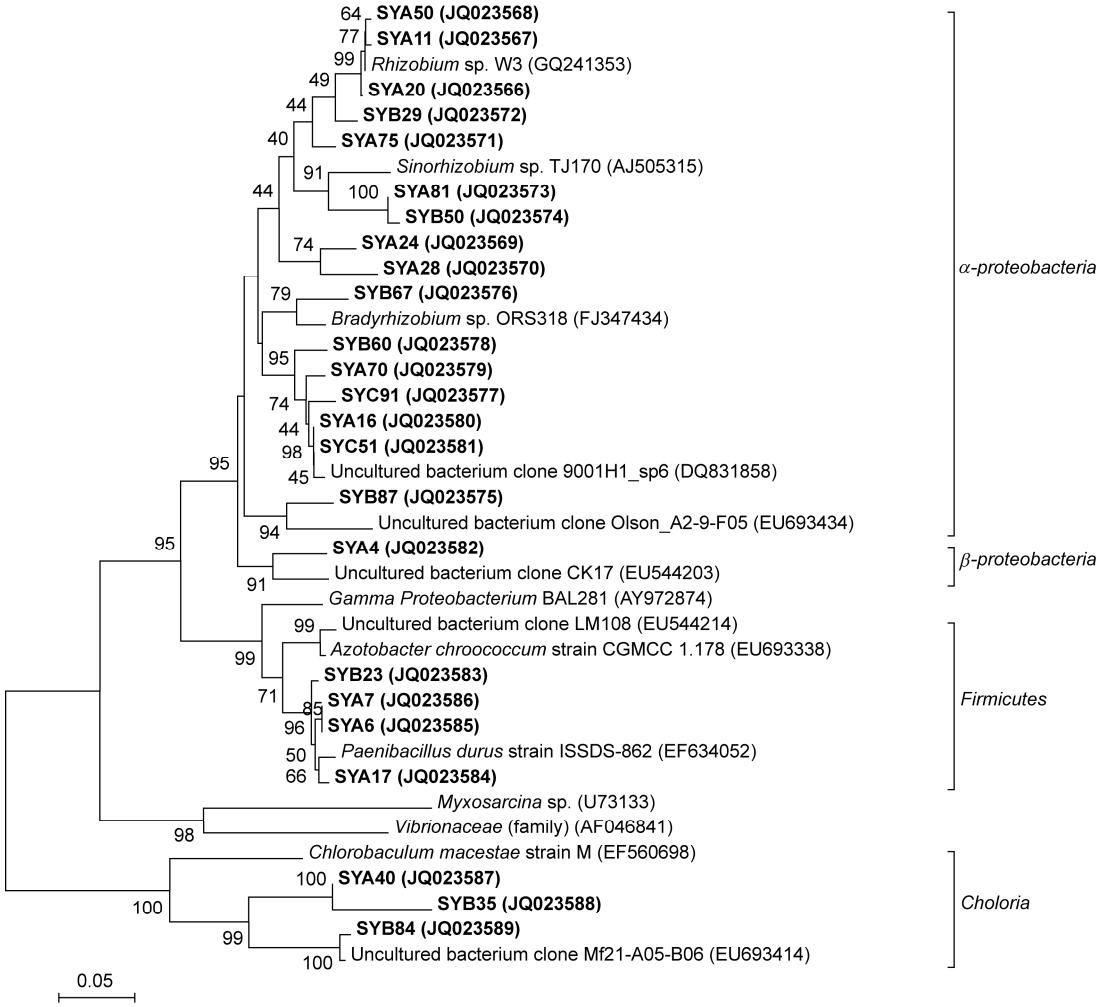


图 2　三亚湾壮实鹿角珊瑚组织内共生固氮菌群固氮酶 *nifH* 基因构建的系统发育分析

标尺长度代表了 5%分歧程度. 各节点的数字表示自展致信值, 其基于 1000 次 bootstrap 重抽样分析的支持百分比, 括号内的字母和数字编号为 GenBank 登录号

相似性高达 97%~98%. *P. durus* 为革兰氏阳性, 可形成孢子[25], 它是热带地区根际作物中一类常见的、对作物生长有促进作用的兼性厌氧固氮菌[26]. 该菌具有较强的固氮活性, 即使在硝酸盐存在的情况下, 它们仍然能进行固氮作用. 本文库中该类群虽仅有 4 个 OTUs, 但克隆子数占到了整个文库的 32.14%, 仅次于最大群落, 这似乎预示着该类群在珊瑚组织内有较强的固氮能力.

SYA4 是本文库中唯一聚在*β-proteobacteria* 中的序列, 它与 *Pelomonas saccharophila* 相似性为 93%, 显示了较高的相似性. *P. saccharophila* 又名嗜糖假单胞菌(*Pseudomonas saccharophila*), 是丛毛单胞菌科 *Rubrivivax-Roseateles* 分支中的一种细菌, 先后在番茄[27]、水稻[28]、烟草根际土壤[29]中发现具有固氮活性. 由于珊瑚礁生活于寡营养海域, 珊瑚虫从周围海水获取的溶解无机氮素非常有限, 因此珊瑚虫为了获取足够的氮素, 便主动从水体中捕获固氮菌[20]. 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并被珊瑚虫捕获后, 最终适应了珊瑚组织中与植物体内相似的内环境.

SYA40, SYB35 和 SYB84 同来自夏威夷的蔷薇珊瑚属(*Montipora*)组织的共附生细菌中的克隆子 Mf21-A05-B06 聚在了绿菌门(*Choloria*), 它们与 *Chlorobaculum macestae* 的 *nifH* 基因的相似性分别为 83%, 80%和 80%. *C. macestae* 是 2008 年发现的绿硫细菌(Green sulphur bacteria)新种, 革兰氏阳性, 专性厌氧, 能进行不产氧的光合作用和固氮作用, 它能利用各种形式的碳素和氮素作为自己的碳源和氮源[30]. 在珊瑚组织细胞内无氧有光的环境下, 推断这类细菌可能同时兼顾了光合作用和固氮作用的双重任务. 该文库 24 个 OTUs 中, 与绿硫细菌 *nifH* 基因序列相似的 OTUs 就有 3 个, 占总文库的 12.5%, 夏威夷的

表 1 固氮基因序列 *nifH* 的特性总结

代表克隆编号	克隆子数	最相似的序列与相似性(%)	近源序列来源
SYA20 (JQ023566)	28	Uncultured bacterium clone Mex69-290_H05 (FN665903) 99	Mexico *Saccharum* spp. host root
SYA11 (JQ023567)	54	Uncultured bacterium clone Mex69-290_H05 (FN665903) 99	Mexico *Saccharum* spp. host root
SYA50 (JQ023568)	3	Uncultured bacterium clone Mex69-290_H05 (FN665903) 99	Mexico *Saccharum* spp. host root
SYA24 (JQ023569)	4	Uncultured bacterium clone IS43 (EU048101) 94%	rhizospheric soil of sorghum
SYA28 (JQ023570)	2	Uncultured bacterium clone Mex69-290_D08 (FN665910) 92	Mexico *Saccharum* spp. host root
SYA75 (JQ023571)	3	Uncultured bacterium clone Mex69-290_H06 (FN665908) 94	Mexico *Saccharum* spp. host root
SYB29 (JQ023572)	2	Uncultured bacterium clone Mex69-290_H06 (FN665908) 96	Mexico *Saccharum* spp. host root
SYA81 (JQ023573)	2	Uncultured bacterium clone IS113 (EU048169) 93	rhizospheric soil of sorghum
SYB50 (JQ023574)	3	Uncultured bacterium clone IS113 (EU048169) 93	rhizospheric soil of sorghum
SYB87 (JQ023575)	2	Uncultured bacterium Olson_A2-9-F05 (EU693434) 92	Hawaiian *Montipora* Corals
SYB67 (JQ023576)	2	*Bradyrhizobium denitrificans* strain LMG 8443 (HM047125) 96	Arachis hypogaea and Lablab purpureus
SYC91 (JQ023577)	2	Uncultured bacterium Clone 9001H1 sp6 (DQ831858) 96	North Pacific Ocean water column
SYB60 (JQ023578)	2	Uncultured bacterium Clone 9001H1 sp6 (DQ831858) 96	North Pacific Ocean water column
SYA70 (JQ023579)	2	Uncultured bacterium Clone 9001H1 sp6 (DQ831858) 97	North Pacific Ocean water column
SYA16 (JQ023580)	1	Uncultured bacterium Clone 9001H1 sp6 (DQ831858) 99	North Pacific Ocean water column
SYC51 (JQ023581)	2	Uncultured bacterium Clone 9001H1 sp6 (DQ831858) 99	North Pacific Ocean water column
SYA4 (JQ023582)	5	*Pelomonas saccharophila* (AB188120) 93	/
SYB23 (JQ023583)	2	*Paenibacillus durus* strain ISSDS-862(EF634052) 97	agricultural soil
SYA17 (JQ023584)	7	*Paenibacillus durus* strain ISSDS-862(EF634052) 98	agricultural soil
SYA6 (JQ023585)	32	*Paenibacillus durus* strain ISSDS-862(EF634052) 98	agricultural soil
SYA7 (JQ023586)	24	*Paenibacillus durus* strain ISSDS-862(EF634052) 98	agricultural soil
SYA40 (JQ023587)	9	Uncultured bacterium Clone Mf21-C10-C09 (EU693444) 88	Hawaiian *Montipora* Corals
SYB35 (JQ023588)	1	Uncultured bacterium clone Mf21-A05-B06 (EU693414) 85	Hawaiian *Montipora* Corals
SYB84 (JQ023589)	2	Uncultured bacterium clone Mf21-A05-B06 (EU693414) 98	Hawaiian *Montipora* Corals

蔷薇珊瑚属(*Montipora* sp.)中这个类群也占到了4.8%的比例[14], 似乎暗示了珊瑚组织中存在一定比例的绿硫细菌. 与其他蓝细菌和异养固氮菌依赖虫黄藻的光合作用产物才能进行固氮不同[23], 绿硫细菌可以利用自己的光合产物进行固氮, 这种方式大大提高了珊瑚内部固氮效率. 珊瑚共附生体中存在一定比例的绿硫细菌, 从而很好地解释了珊瑚礁系统内可获得高效氮素的原因. 我们推测这可能也是珊瑚共附生体应对危机的补偿机制, 即外界环境胁迫下, 珊瑚虫宿主在短时间内失去大量的内共生虫黄藻发后, 珊瑚共附生体仍能通过绿硫细菌获取有机氮源, 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. 绿硫细菌这种潜在的固氮特性表明, 它们极有可能是珊瑚礁获得有机氮素的另一重要途径.

3 结论

珊瑚礁作为海洋中的“热带雨林”, 是典型的海洋近岸生态系统, 具有丰富的生物多样性和较高的生产力水平[31]. 三亚湾鹿回头位于南海的海南南部热带海湾, 属海洋热带季风气候, 适宜珊瑚生长, 其珊瑚礁生态系统具有典型代表性, 我国近 85%的珊瑚礁种类都有在该湾的区域内发现[32]. 三亚湾水域较低的氮素含量[33]表明, 该海域的生物固氮在整个氮素循环供给中起着重要的作用. 之前我们对与三亚湾珊瑚礁生态系统固氮菌相关的研究已报道[34,35], 但用分子生物学方法探究我国珊瑚礁的珊瑚虫组织内共附生固氮菌多样性的研究还未有报道.

在本研究中, 采用分子生物学方法对三亚湾鹿回头的壮实鹿角珊瑚组织内的共生固氮菌的固氮酶基因 *nifH* 进行多态性分析, 克隆文库的覆盖率为87.76%, 能够较好地反映出壮实鹿角珊瑚组织内共附生的固氮细菌丰度和固氮菌群落结构. 文库中75%的克隆子的最相近序列均为不培养固氮细菌, 它们和来自于多种环境暂不可培养的固氮菌的遗传相似性要远大于已经筛选培养的固氮细菌的遗传相似性, 且它们之间的相似性在 85%~97%之间, 表明这些序列具有高度的遗传多样性, 并且还可能含有大量的新固氮基因, 我们推测壮实鹿角珊瑚组织内可能蕴含着丰富的未被培养的固氮菌资源.

固氮酶中最保守的固氮酶 *nifH* 亚基, 常用于了解固氮微生物的物种和分布[21], *Hin*f Ⅰ切割固氮 *nifH* 基因的保守区, 一般用于确定 *nifH* 基因起源[17]. 本研究中不同 OUTs 经由 *Hin*f Ⅰ酶切带型的相似度高达 90%, 说明珊瑚组织中的固氮菌可能有共同的起源, 或者协调进化[23]. 从系统发育进化树看, 在该珊瑚组织内共生固氮细菌主要分为3个大类群: 变形菌门、厚壁菌门以及绿菌门, 其中变形菌门为优势种. 尽管国外已有的研究表明, 珊瑚组织内部普遍存在能够固氮的弧菌[8]和蓝细菌[9], 但本次研究中并未发现与弧菌属相似度较高的序列. 推测原因可能有: (1) 由于我国珊瑚礁的特性引起的, 该结果可能反映了我国珊瑚礁共附生微生物的菌群特征与世界其他区域的珊瑚礁的不同之处, 或反映了不同种类珊瑚礁的共附生固氮菌群的差异性; (2) 方法的局限性, Wegley 等人[8]通过宏基因组学的方法从 *P. astreoides* 珊瑚中发现了大量的弧菌和蓝细菌, Lesser 及其同事[9]利用荧光原位杂交技术(FISH)发现了 *Montastrea cavernosa* 珊瑚表面的优势菌为具有固氮酶蛋白的蓝细菌, 而 Olson 等人[14]使用 PCR-RFLP 技术也仅发现了少量的弧菌和蓝细菌, 表明不同的方法有其偏好性; (3) 数据库中与弧菌和蓝细菌的固氮基因相关的序列有限, 尤其是目前研究珊瑚组织内共附生固氮菌基因有限. 具体原因有待进一步研究探索.

本研究采用 PCR-RFLP 技术克服了传统培养方法的缺陷, 可以有效避免在传统培养、分离等过程中造成微生物遗传信息多样性的丢失, 因此比可培养方法能够更全面和真实地反映菌群结构的特点[36]. 通过构建固氮酶基因 *nifH* 克隆文库研究壮实鹿角珊瑚菌群结构的特点, 为将来进一步研究固氮菌在我国珊瑚礁生态系统中的氮循环功能提供重要基础信息, 同时也可根据文库检测的珊瑚组织内共附生固氮菌的多样性特点, 优化难培养微生物的培养条件及检测手段. 但是由于 PCR 引物和 PCR 扩增的偏好性, 以及限制性内切酶的偏好性, 通过 RFLP 方法获得的基因信息也有一定的局限性, 因此要加深对造礁石珊瑚组织内共附生固氮菌的多样性认识, 还需要采用更多的方法和技术.

致谢 感谢中国科学院南海海洋研究所赵美霞博士在珊瑚鉴定方面给予的指导以及中国科学院海洋微生物研究中心数据库与信息系统协助.

参考文献

1 Muscatine L, Delia C F. The uptake, retention, and release of ammonium by reef corals. Limnol Oceanogr, 1978, 23: 725–734
2 Piniak G A, Lipschultz F, McClelland J. Assimilation and partitioning of prey nitrogen within two anthozoans and their endosymbiotic zooxanthellae. Mar Ecol Prog Ser, 2003, 262: 125–136
3 Alongi D M, Pfitzner J, Trott L A. Deposition and cycling of carbon and nitrogen in carbonate mud of the lagoons of Arlington and Sudbury Reefs, Great Barrier Reef. Coral Reefs, 2006, 25: 123–143
4 Davey M, Holmes G, Johnstone R. High rates of nitrogen fixation (acetylene reduction) on coral skeletons following bleaching mortality. Coral Reefs, 2008, 27: 227–236
5 Crossland C J, Barnes D J. Acetylene reduction by coral skeletons. Limnol Oceanogr, 1976, 1: 153–156
6 Wilkinson C R, Williams D M, Sammarco P W, et al. Rates of nitrogen fixation on coral reefs across the continental shelf of the central Great Barrier Reef. Mar Biol, 1984, 80: 255–262
7 Chimetto L A, Brocchi M, Thompson C C, et al. *Vibrios* dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. Syst Appl Microbiol, 2008, 31: 312–319
8 Wegley L, Edwards R, Rodriguez-Brito B, et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. Environ Microbiol, 2007, 9: 2707–2719
9 Lesser M P, Mazel C H, Gorbunov M Y, et al. Discovery of symbiotic nitrogen-fixing *cyanobacteria* in corals. Science, 2004, 305: 997–1000
10 Williams W M, Viner A B, Broughton W J. Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with the living coral *Acropora variabilis*. Mar Biol, 1987, 94: 531–535
11 Zhang Q M. The biodiversity of coral reefs of Luhuitou of Sanya in danger. Sci News, 2003, 9: 24–25
12 Rohwer F, Breitbart M, Jara J, et al. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. Coral Reefs, 2001, 20: 85–91
13 Koren O, Rosenberg E. Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. Appl Environ Microbiol, 2006, 72, 5254–5259
14 Olson N D, Ainsworth T D, Gates R D, et al. Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian *Montipora* corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. J Exp Mar Biol Ecol, 2009, 371: 140–146
15 张燕英. 南海三亚湾海洋生物固氮效率及固氮生物多样性研究. 博士学位论文. 北京: 中国科学院研究生院, 2008. 59
16 Wang H F, Zhu W Y, Yao W, et al. DGGE and 16S rDNA sequencing analysis of bacterial communities in colon content and feces of pigs fed whole crop rice. Anaerobe, 2007, 13: 127–133
17 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. Res Microbiol, 2001, 152: 95–103
18 Zamora M L G, Romero E M. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). J Biotechnol, 2001, 91: 117–126
19 Bourne D, Iida Y, Uthicke S, et al. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. ISME J, 2008, 2: 350–363
20 Rohwer F, Seguritan V, Azam F, et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. Mar Ecol Prog Ser, 2002, 243: 1–10
21 Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A crosssystem comparison. Environ Microbiol, 2003, 5: 539–554
22 孙傲雪, 徐凤花, 刘洋, 等. 实时荧光定量 PCR 在固氮酶基因检测中的应用. 生物技术通报, 2011, 3: 82–85
23 Fiore C L, Jarett J K, Olson N D, et al. Nitrogen fixation and nitrogen transformations in marine symbioses. Trends Microbiol, 2010, 18: 455–463
24 Mehta M P, Butterfield D A, Baross J A. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 960–970
25 Seldin L, Van Elsas J D, Penido E G C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. Int J Syst Bacteriol, 1984, 34: 451–456
26 Seldin L, Rosado A S, da Cruz D W, et al. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 3860–3868

27 Terakado-Tonooka J, Ohwaki Y, Yamakawa H, et al. Expressed *nifH* Genes of endophytic bacteria detected in field-grown sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.). Microbes Environ, 2008, 23: 89–93
28 廖春雨. 固氮内生菌 HMLR8 和 HMLR13 对水稻的促生效应的研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2010. 20
29 Li X L, Penttinen P, Gu Y F, et al. Diversity of *nifH* gene in rhizosphere and non-rhizosphere soil of tobacco in Panzhihua, China. Ann Microbiol, 2011, doi: 10.1007/s13213-011-0339-x
30 Keppen O I, Berg I A, Lebedeva N V, et al. *Chlorobaculum macestae* sp. nov., a new green sulfur bacterium. Microbiology, 2008, 77: 69–77
31 张乔民, 施祺, 陈刚, 等. 海南三亚鹿回头岸礁监测与健康评估. 科学通报, 2006, 51(增刊Ⅱ): 71–77
32 施祺, 赵美霞, 张乔民, 等. 海南三亚鹿回头造礁石珊瑚碳酸盐生产力的估算. 科学通报, 2009, 54: 1471–1479
33 王汉奎, 董俊德. 三亚湾氮磷比值分布及其对浮游植物生长的限制. 热带海洋学报, 2002, 21: 33–39
34 张燕英, 董俊德, 张偲, 等. 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, 4: 46–50
35 凌娟, 董俊德, 张燕英, 等. 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: 962–968
36 王春香, 田宝玉, 吕睿瑞, 等. 西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌(*Acidobacteria*)群体结构和多样性分析. 微生物学通报, 2010, 37: 24–29

Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen-fixing (*nifH*) genes in diazotrophic bacteria associated with corals in Sanya Bay

CHEN Lei[1,2,3], ZHANG YanYing[1,2], DONG JunDe[1,2], LING Juan[1,2,3], PAN Hu[1,4], ZHANG Si[1] & LONG LiJuan[1]

[1] *Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, 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 Vniversity of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*
[4] *College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China*

This study aimed to investigate the molecular diversity and perform phylogenetic analysis of nitrogen-fixing bacteria associated with the coral tissues of *Acropora robusta* in the Luhuitou fringing reef of Sanya Bay, Hainan Province, China. To measure the nitrogen-fixing gene (*nifH*) fragment, diverse PCR products were analyzed by cloning, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and sequencing. The results showed that 196 clones and 24 different RFLP patterns were obtained from the sample, which were digested by the restriction enzymes *Taq*I and *Hinf*I. The clone library coverage was 87.65%. The phylogenetic tree was constructed using Clustal W and Mega software. A total of 24 sequences could be subdivided into 3 clusters in the phylogenetic tree, and the majority (70.83%) had high sequence similarity to *α-proteobacteria* and *β-proteobacteria*. *α-proteobacteria* (66.67%) were the significant dominant group. The second largest group of sequences found was most closely related to the bacterial phylum *Firmicutes* (16.67%) with four sequences being representative of this division. Additionally, three sequences (12.5%) were obtained from the phylum *Chlorobia*. Thirteen *nifH* gene sequences had a similarity of less than 97% to the closest relatives known in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. This result demonstrated that there is a high diversity among the N_2-fixing bacteria and that they contain a large number of unstudied nitrogen-fixing genes associated with the reef building coral *Acropora robusta*, in Sanya Bay, South China Sea.

***Acropora robusta*, N_2-fixing bacteria, *nifH*, PCR-RFLP, phylogenetic analysis**

doi: 10.1360/972012-51