

# 三亚湾珊瑚来源虫黄藻不同株系微环境中微生物群落结构的差异比较分析

黄思军<sup>1,2</sup>, 邱晨<sup>1,3</sup>, 龙超<sup>1,2</sup>, 龙丽娟<sup>1,2,4</sup>

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, 广东 广州 510301;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458;

3. 中国科学院大学, 北京 100049;

4. 三亚海洋生态环境工程研究院, 海南 三亚 572000

**摘要:** 虫黄藻、细菌和造礁石珊瑚有着密切的共生关系, 但虫黄藻藻际细菌群落尚未得到广泛研究。本研究对 5 个属的 6 株虫黄藻进行了离体培养, 其中 2 株为悬浮型虫黄藻(E 型), 4 株为贴壁型虫黄藻(A—D 型)。通过采集藻株培养物 3 种粒径的样本开展细菌群落分析, 分别为 0.2~3 $\mu\text{m}$ (自由生活)、>3 $\mu\text{m}$ (附着于藻体或颗粒物)与 Settling(沉底贴壁藻体上)。结果发现, 2 种生活方式的藻株藻际细菌群落具有显著差别, 贴壁型藻株细菌群落的物种丰富度显著高于悬浮型藻株。发现 7 个属的细菌广泛存在于所有的藻株中, 它们代表了 A—E 型虫黄藻藻际细菌的核心类群。对 3 种粒径样本的核心细菌群落比较发现, 自由生和颗粒附着生的核心细菌群落十分相似, 但均与沉底贴壁样本差异明显。

**关键词:** 虫黄藻; 珊瑚; 共生关系; 藻际细菌群落; 藻株

中图分类号: Q938

文献标识码: A

文章编号: 1009-5470(2022)06-0090-15

## Phycosphere microbial communities of zooxanthellae cultures isolated from corals in Sanya Bay, South China Sea

HUANG Sijun<sup>1,2</sup>, QIU Chen<sup>1,3</sup>, LONG Chao<sup>1,2</sup>, LONG Lijuan<sup>1,2,4</sup>

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

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4. Sanya Institute of Ocean Eco-Environmental Engineering, Yazhou Scientific Bay, Sanya 572000, China

**Abstract:** Zooxanthellae, bacteria, and reef-building corals have a close symbiotic relationship, but the phycosphere bacterial community of zooxanthellae is poorly studied. In this study, six strains of zooxanthellae from five genera were cultured in vitro, among which two were free-living zooxanthellae strains (type E) and four were anchorage-dependent living zooxanthellae strains (type A—D). Bacterial community analysis was performed by collecting three different particle size fractions (0.2–3 $\mu\text{m}$ , >3 $\mu\text{m}$ , and settling algae cells). Results showed that the phycosphere bacterial communities between the two lifestyle algal strains were significantly different. The bacterial species richness in anchorage-dependent living strains was

收稿日期: 2022-01-23; 修订日期: 2022-03-29。林强编辑

基金项目: 国家自然科学基金项目(41576126); 国家自然科学基金项目(42176116); 广东省自然科学基金(2017A030306020); 中国科学院南海海洋研究所“南海新星”项目(NHXX2019ST0101); 中国科学院青年创新促进会会员(2018377)

作者简介: 黄思军(1982—), 男, 福建省光泽县人, 项目研究员, 从事海洋微生物生态学研究。email: huangsijun@scsio.ac.cn

通信作者: 黄思军。email: huangsijun@scsio.ac.cn

**Received date:** 2022-01-23; **Revised date:** 2022-03-29. Editor: LIN Qiang

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (41576126); National Natural Science Foundation of China (42176116); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2017A030306020); Rising Star Foundation of the South China Sea Institute of Oceanology (NHXX2019ST0101); Youth Innovation Promotion Association CAS (2018377)

**Corresponding author:** HUANG Sijun. email: huangsijun@scsio.ac.cn

significantly higher than that in free-living strains. Seven bacterial genera were observed to be present in all the algal strains, representing the core bacterial communities of zooxanthellae. Comparing the core bacterial communities in three particle size samples, we found that the core bacterial communities in  $>3\mu\text{m}$  samples and in  $0.2\text{-}3\mu\text{m}$  samples are highly similar, but both were significantly different from the “Settling” samples.

**Key words:** symbiodinium; coral; symbiotic relationship; phycosphere bacterial community; algae strain

珊瑚礁生态系统是地球上生物多样性最高的生态系统之一,以不到 1% 的海洋表面积维持着约 25% 的海洋生物的生存和繁衍(Spalding et al, 2001)。珊瑚依赖于与虫黄藻的共生关系,使其在寡营养的环境中也能得以生存(Muscatine et al, 1977)。在这种共生关系中,虫黄藻可为珊瑚提供高达 95% 的碳源,而珊瑚则为虫黄藻提供无机碳进行光合作用(Muscatine, 1990)。虫黄藻在较长时间内被认为是一个单一物种——小亚德里亚共生藻(*Symbiodinium microadriaticum*) (Freudenthal, 1962),但随着对虫黄藻超微结构的进一步研究,发现不同虫黄藻藻株在宿主识别(Schoenberg et al, 1980)、形态学(Blank et al, 1989; Trench et al, 1995)、染色体数目和体积(Blank et al, 1985)、类菌胞素氨基酸(mycosporine-like amino acids, MAAs) (Banaszak et al, 2000)等方面具有明显差异。后来遗传方法的应用,如比较核糖体小亚基 rRNA 序列(Rowan et al, 1991)、大亚基 rRNA 序列(van Oppen et al, 2001)、转录间隔区(ITS1、ITS2)(Pochon et al, 2001; Rodriguez-Lanetty et al, 2004)、叶绿体 *psb* 基因(Moore et al, 2003)、线粒体 *COX 1* 基因(Takabayashi et al, 2004)等,加速了虫黄藻分类学的发展。之后,随着进化枝 I 的发现,*Symbiodinium* 属被分为 9 个谱系(Clade A—I) (Pochon et al, 2010)。Lajeunesse 等(2018)提出将 *Symbiodinium* 属提升为 Symbiodinaceae 科,将之前的 9 个进化枝细分为 15 个谱系(相当于属),并正式描述了其中的 7 个。

虫黄藻与珊瑚的研究已获得了重要的认识。Bongaerts 等(2010)发现珊瑚宿主的基因型与虫黄藻的组成密切相关,珊瑚也可以与多种虫黄藻共生(Blackall et al, 2015)。Mizuyama 等(2020)推测虫黄藻的基因型可能会影响珊瑚宿主的生态差异,这可能有助于珊瑚适应复杂的生存环境。然而,珊瑚共生功能体(holobiont)并不仅限于虫黄藻和珊瑚,极其多样的珊瑚细菌群落的作用也不容忽视(Rohwer et al, 2001)。众多研究已表明珊瑚可能具有特异性的细菌群落(Rohwer et al, 2002; Wegley et al, 2007; Morrow et al, 2012; Sharp et al, 2012; Bayer et al, 2013; Bosch, 2013),一些细菌在珊瑚系统的硫循环

和碳循环中扮演着重要的角色(Raina et al, 2010; Rädicker et al, 2015),另一些则有利于珊瑚的健康,如珊瑚粘液中发现的具有抵抗致病菌弧菌的细菌(Nissimov et al, 2009)。在全球变暖的背景下,研究人员发现珊瑚白化过程伴随着虫黄藻的离开及细菌群落的显著变化(Bourne et al, 2008; Grottoli et al, 2018; Yang et al, 2021)。这些都表明珊瑚、虫黄藻与细菌群落之间的关系密不可分(Bourne et al, 2016)。

虽然珊瑚—细菌,虫黄藻—珊瑚的关系已被广泛研究,但虫黄藻与细菌之间的关系却长期被忽视(Matthews et al, 2020)。藻细胞可以产生有机分子在其周围形成藻际环境,生存于藻际环境的细菌被称为藻际细菌(Seymour et al, 2017)。藻菌之间的关系是既密切又复杂的,且可以长期保持稳定。藻吸引过来的有益细菌可以通过消耗氧来缓解藻生长过程中的氧气压力,或矿化有机物为藻提供无机营养盐,甚至可以为藻类提供维生素,但细菌的大量繁殖反过来也会抑制藻的生长(张增虎等, 2018)。早期 Ainsworth 等(2015)通过采集珊瑚不同部位的样本揭示了共生虫黄藻所在的内胚层与上皮细胞及表面黏液层细菌群落的显著差异,但虫黄藻所在环境还包含了其他生物存在,所以原位采样并不能准确得到虫黄藻密切相关的细菌群落。因此目前研究虫黄藻藻际微生物群落主要通过离体培养的方法(Lawson et al, 2018; Camp et al, 2020; Maire et al, 2021)。随着核心微生物组的概念被提出(Turnbaugh et al, 2007),也逐渐应用在珊瑚领域(Ainsworth et al, 2015; Lawson et al, 2018; Pootakham et al, 2021)。珊瑚的核心微生物组一般被定义为出现频率 30%~100% 的微生物类群(Hernandez-Agreda et al, 2017),核心的定义可以是对于几种珊瑚共有的微生物类群而言,也可以是对于某种珊瑚时间尺度上持续存在的微生物类群而言(Shade et al, 2012)。探寻不同属虫黄藻的藻际核心微生物群落具有重要的意义,这些微生物可能对虫黄藻提供关键功能。

近年来,南海三亚湾鹿回头海域珊瑚礁在人类活动和全球变化的共同影响下,覆盖率已经下降了 70% 左右(Zhao et al, 2012)。我国学者对该地区珊瑚共附生微生物进行了大量的研究: Zhou 等(2011)对

该区域 44 种珊瑚的虫黄藻类型做了详细的调查,发现主要为 C、D 型虫黄藻;李淑等(2011)发现虫黄藻密度整体呈现夏季低、冬季高的特点;Li 等(2014)揭示了澄黄滨珊瑚的黏液、组织和骨骼的细菌群落的变化;吴家法等(2015)发现放线菌门、 $\alpha$ -变形菌纲、 $\gamma$ -变形菌纲、厚壁菌门和拟杆菌门为四种珊瑚来源的主要菌群。然而,尚未有文献对该珊瑚礁区域分离的虫黄藻进行藻际细菌群落的系统分析。本研究对该区域珊瑚组织分离出的 5 个属的 6 株虫黄藻进行了离体培养,旨在研究不同株系虫黄藻藻际细菌群落结构的差异,并找出与虫黄藻相关的核心细菌类群。

## 1 材料与方法

### 1.1 虫黄藻纯系藻株的获得、培养、DNA 提取和测序

6 株虫黄藻(表 1)从中国海南省三亚鹿回头海域(109°28'26"E, 18°12'43"N)的 4 种珊瑚的骨骼表面组织中分离纯化获得。珊瑚样本的初处理和虫黄藻纯

系的获取按照 Yang 等(2020)描述的方法进行。经纯化后的藻细胞置于装有 IMK 培养基的玻璃培养瓶,在盐度 34‰、温度 23℃、光照强度为 60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、明暗周期为 14h:10h 的环境下培养。待指数生长期时取藻液离心去除上清液得到藻细胞,使用 E.Z.N.A.® HP Plant DNA kit (Omega Bio-Tek, USA)试剂盒提取基因组 DNA。藻株的 ITS2 序列使用引物 ITS intfor2 (5'-GAATTGC AGAACTCCGTG-3')和 ITS2 CLAMP (5'-GGG ATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Qin et al, 2019)PCR 扩增得到,PCR 产物由上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。另外,依据培养过程中虫黄藻对玻璃基质培养瓶的附着能力差异,分为悬浮型虫黄藻(SYSC-2-8、SYSC-14-11)和贴壁型虫黄藻(SYSC-2-1、SYSC-17-3、SYSC-24-3、SYSC-28-9):贴壁型虫黄藻大部分藻细胞在培养瓶底部贴壁生活,小部分存在于藻液中;悬浮型虫黄藻则绝大部分藻细胞悬浮生活,几乎无藻细胞贴壁。

表 1 虫黄藻藻株来源及分类信息

Tab. 1 Source and taxonomic information of zooxanthellae strains

藻株	宿主拉丁文名(中文名)	ITS2 基因型	藻株分类(属级)
SYSC-2-1	<i>Acropora tenuis</i> (柔枝鹿角珊瑚)	C1	<i>Cladocopium</i> (C 型)
SYSC-2-8	<i>Acropora tenuis</i> (柔枝鹿角珊瑚)	E101	<i>Effrenium</i> (E 型)
SYSC-14-11	<i>Galaxea fascicularis</i> (丛生盔形珊瑚)	E101	<i>Effrenium</i> (E 型)
SYSC-17-3	<i>Galaxea fascicularis</i> (丛生盔形珊瑚)	A6	<i>Symbiodinium</i> (A 型)
SYSC-24-3	<i>Platygyra verwyi</i> (小叶扁脑珊瑚)	D1	<i>Durusdinium</i> (D 型)
SYSC-28-9	<i>Pavona decussate</i> (十字牡丹珊瑚)	B1	<i>Breviolum</i> (B 型)

### 1.2 虫黄藻分类鉴定

藻株的 ITS2 基因型在非冗余虫黄藻 ITS2 数据库 Sym-ITS2 (<http://sym-its2.marinegenomics.cn>)进行匹配得到(Shi et al, 2021)。再结合 NCBI 核苷酸数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)ITS2 序列比对的结果(Altschul et al, 1990)以及系统发育分析对虫黄藻分类进行进一步的确认。系统发育分析所需的参考序列选自 NCBI 核苷酸数据库中与本实验 6 株虫黄藻相近的 23 株虫黄藻(A—E 型)的 ITS2 序列,选择甲藻 *Ansanella granifera* 作为外群。系统发育树由 MEGA X 软件中的最大似然法构建(Kumar et al, 2018),使用 Hasegawa—Kishino—Yano (HKY)模型计算,可信度检测 1000 次,并通过在线可视化工具(EvolView v3)进行可视化(Subramanian et al, 2019)。

### 1.3 实验设计

实验在纯系藻株培养半年后开展,期间定期将培养物转移至新的培养基以保持虫黄藻活性。此时虫黄藻藻际细菌群落已经稳定,且与虫黄藻密切相关的细菌类群被保留下来(Behringer et al, 2018; Mönnich et al, 2020)。为了比较虫黄藻不同株系微生物群落的差异,取指数生长期的 6 株虫黄藻培养至平台期并收集藻液,藻培养条件同上,实验设置 3 个生物学重复。参照 Liu 等(2019)对颗粒粒径的分类方法,使用 3 $\mu\text{m}$  的孔径将培养物藻液中的细菌分成两类:自由生细菌和颗粒附着生细菌。藻液用注射器挤压的方式依次通过装有 3 $\mu\text{m}$  和 0.2 $\mu\text{m}$  聚碳酸酯膜(PC, 25mm, Millipore, United States)的可更换膜过滤器(25mm, Whatman, UK),并收集 3 $\mu\text{m}$  和 0.2 $\mu\text{m}$  滤膜,即 3 $\mu\text{m}$  和 0.2 $\mu\text{m}$  样本。预实验已验证 3 $\mu\text{m}$  滤

膜可完全截留所有的藻细胞, 因此 3 $\mu\text{m}$  滤膜上的细菌主要为藻液中附着藻细胞颗粒的细菌, 图中标记为“3 $\mu\text{m}$ ”。0.2 $\mu\text{m}$  滤膜上的细菌主要为自由生细菌, 图中标记为“0.2 $\mu\text{m}$ ”。对于贴壁型虫黄藻(4 株), 还额外采集了沉底贴壁的培养物——Settling 样本(将上层藻液倒尽后, 用无菌刀片刮取获得), 图中标记为“Settling”, Settling 样本的细菌主要附着在沉底贴壁的藻细胞上。0.2 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$  和 Settling 样本代表着藻际细菌群落的三类细菌。所有样本( $n=48$ ): 虫黄藻的 3 $\mu\text{m}$  和 0.2 $\mu\text{m}$  样本各 6 株( $n=36$ , 包含三个生物学重复), 以及 4 株贴壁型藻的 Settling 样本( $n=12$ , 包含三个生物学重复), 均液氮速冻储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱直至 DNA 提取。

#### 1.4 DNA 提取和 16S rRNA 基因测序

为避免试剂盒带来的误差, 所有样本的 DNA 均使用 DNeasy PowerSoil Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA)提取, 液氮速冻后立即储存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待分析。选择 515FmodF-806RmodR 引物 (Walters et al, 2015)对细菌 16S rRNA 基因的 V4 高变区进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增, 该过程在 ABI GeneAmp@9700 (applied biosystems, thermofisher scientific)仪器上进行。每个反应包含 10ng DNA 模板、0.8 $\mu\text{L}$  正向引物 ( $5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、0.8 $\mu\text{L}$  反向引物( $5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、5 $\times$ transStart FastPfu 缓冲液 4 $\mu\text{L}$ 、0.2 $\mu\text{L}$  BSA、2 $\mu\text{L}$  dNTPs ( $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、0.4 $\mu\text{L}$  FastPfu Polymerase, 添加无核酸酶水(thermofisher)至总体积为 20 $\mu\text{L}$ 。每个样本设置 3 个 PCR 重复。PCR 条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 3min,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 45s, 30 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10min, 产物最后在  $10^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上检测, 然后用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 回收 290~310bp 的 PCR 产物。用 Quantus Fluorometer 定量后, 根据每个样本的测序量要求, 将样本按对应比例混合。每个样本的 PCR 纯化产物的扩增子文库由 NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit (Bioo Scientific, United States)按照标准程序制备, 利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。

#### 1.5 16S rRNA 基因序列分析

16S rRNA 基因序列选择 QIIME2 v 2021.2 (Bolyen et al, 2019)进行分析, 具体步骤按 Maire 等 (2021)的方法进行, 得到扩增子序列变异(amplicon sequence variant, ASV)表及代表序列。基于与

SILVA 138 (Quast et al, 2013)数据库中 16S rRNA 基因的 V4 区域 70% 的相似性, 利用 feature-classifier 插件通过预先训练的朴素贝叶斯分类器进行代表序列的注释。过滤掉线粒体和叶绿体序列, 得到最后的注释表。测序原始序列及处理过程见附表 S1, 将样本元数据文件、ASV 表、注释表导入 R 进行统计分析。

#### 1.6 统计分析

细菌群落分析使用 R 版本 4.1.1 和 phyloseq、vegan、ggplot2、tidyverse、indicspecies、yyplot、ggBubbles、VennDiagram、UpSetR 包进行统计和绘图。对所有样本序列进行抽平(按照所有样本中最小的序列数)后, 每个样本含有 27069 条序列, 该深度足以捕获样本间的多样性。选取 Chao1 指数、Shannon 指数和 Pielou 指数作为  $\alpha$  多样性指标,  $\alpha$  多样性数据两组间的差异用 Mann-Whitney U 检验进行比较。群落组成( $\beta$  多样性)的差异使用 Bray-Curtis 相异矩阵计算, 整体差异的显著性通过相似性分析 (ANOSIM)进行检验, 两两之间的显著性则在整体差异显著后用置换多元方差分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)进一步确定, 使用多维尺度变换 (non-metric multidimensional scaling, NMDS)进行排序分析。16S rRNA 基因数据都具有 3 个生物学重复。物种组成分析时丰度取 3 个重复的平均值作为结果, 其余需要统合分析时将至少在两个生物学重复中出现的 ASV 定义为该样本的 ASV 再进行分析。参照 Maire 等(2021)对细菌核心属的定义, 把存在于所有藻株的属定义为核心属, 得到 A—E 型虫黄藻的核心属, 以及 3 种粒径样本各自的核心属。

## 2 结果

### 2.1 虫黄藻的分类鉴定

选取本实验中的 6 株虫黄藻的 ITS2 序列和 23 株相近的虫黄藻序列进行系统发育树重建(图 1)。结合虫黄藻的 ITS2 基因型, 得到藻株的分类结果: SYSC-17-3 属于 *Symbiodinium* 属(A6 型, ITS2)、SYSC-28-9 属于 *Breviolum* 属(B1 型), SYSC-2-1 属于 *Cladocopium* 属 (C1 型), SYSC-24-3 属于 *Durusdinium* 属(D1 型), SYSC-2-8 与 SYSC-14-11 属于 *Effrenium* 属(E101 型), 用 MEGA X 软件进行序列比对后发现 SYSC-2-8 和 SYSC-14-11 的 ITS2 序列相似度为 100%。

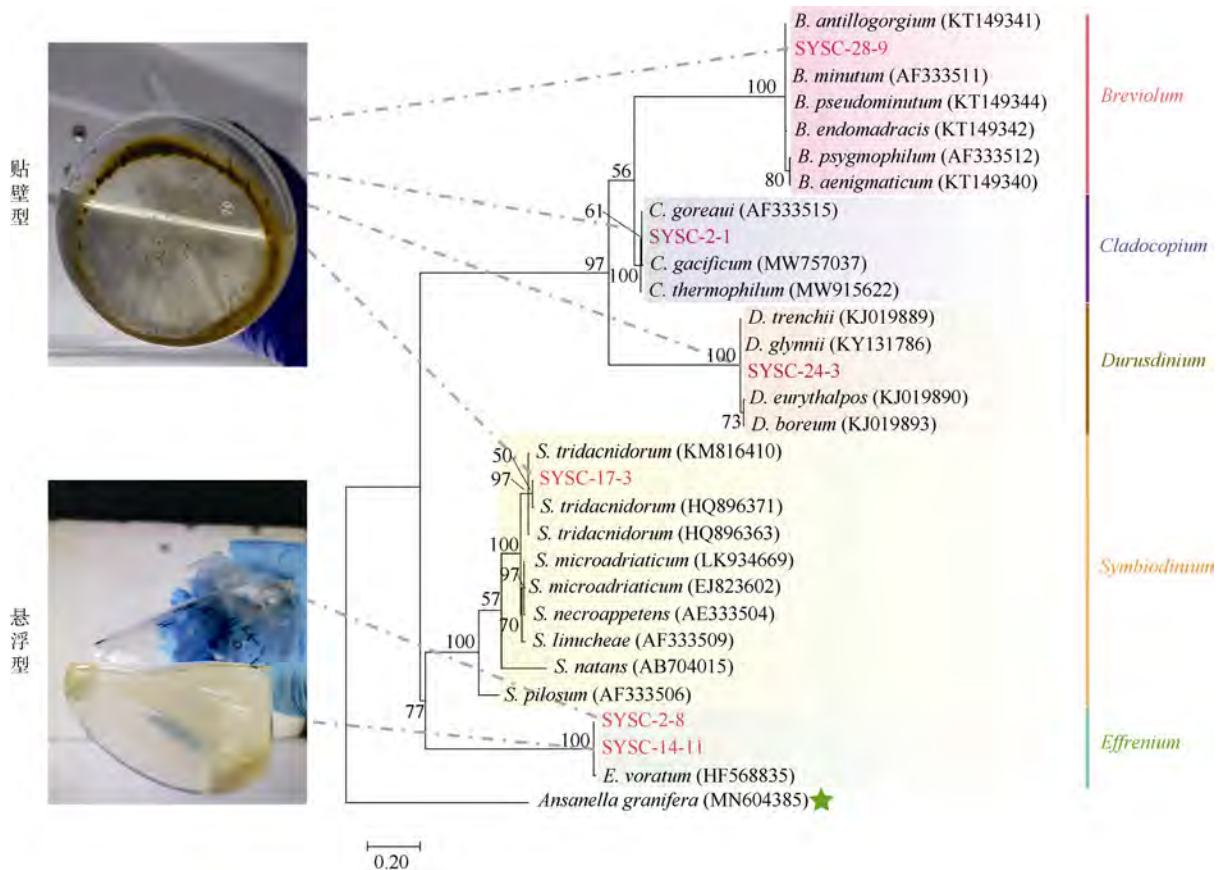


图 1 基于 ITS2 序列构建的系统发育树(ML 法)

本实验的 6 株虫黄藻用红色字体标注。Ansanella granifera 为外类群。支上的数字为 1000 次自展支持率(%)。6 株虫黄藻被分为贴壁型(SYSC-2-1, SYSC-17-3, SYSC-24-3, SYSC-28-9)和悬浮型(SYSC-2-8 和 SYSC-14-11)

Fig. 1 Maximum-likelihood phylogenetic tree based on ITS2 sequences. The six strains of zooxanthellae in this experiment are marked in red. Ansanella granifera is used as the outgroup. The bootstrap value (%) with 1000 replicates is shown above the branch. The six zooxanthellae strains are classified into anchorage-dependent living lifestyle (SYSC-2-1, SYSC-17-3, SYSC-24-3, SYSC-28-9) and free-living lifestyle (SYSC-2-8 and SYSC-14-11), as indicated in the pictures

## 2.2 虫黄藻藻际细菌的多样性和组成

序列抽平后共有 629 个 ASVs 进入到之后的  $\alpha$  和  $\beta$  多样性分析。所有样本中古菌的序列占比均小于 0.133%，由于其相对丰度极低，本研究中的以下结果将描述为“细菌群落”。

Chao1 指数可以指示物种丰富度, Pielou 指数反映群落中物种的均一程度, Shannon 指数则反映群落的整体多样性。基于这 3 种  $\alpha$  多样性指数对这 6 株藻的平台期样本细菌群落进行比较, 两两之间显著性差异采用 Mann-Whitney U 检验。发现  $3\mu\text{m}$  和  $0.2\mu\text{m}$  样本中贴壁型虫黄藻细菌群落的 Chao1 指数均显著高于悬浮型藻( $P < 0.05$ , 图 2a;  $P < 0.001$ , 图 2b), 其 Settling 样本菌群的 Chao1 指数也显著大于悬浮型虫黄藻的  $3\mu\text{m}$  样本菌群( $P < 0.01$ , 图 2b、c)。这说明贴壁型虫黄藻不论在自由生细菌( $0.2\mu\text{m}$ )还是附着藻细菌( $3\mu\text{m}$  和 Settling)物种丰富度均显著大于悬浮型虫黄藻。 $3\mu\text{m}$  样本中贴壁型虫黄藻的 Shannon

指数也显著高于悬浮型虫黄藻( $P < 0.01$ , 图 2h), 但这可能是由于 Chao1 指数的巨大差异造成的, 因为 Pielou 指数无显著差异。

基于 NMDS 分析发现, 3 株贴壁型虫黄藻(A、B、D 型)的细菌群落结构相似, 且按 3 种粒径的样本聚类, 而同为贴壁型的 C 型虫黄藻的细菌群落则明显独立于其他藻株。另外 2 株悬浮型藻株(E 型)在 NMDS 图中位置相近, 说明二者具有类似的细菌群落。统计分析表明, 首先, 假设藻际细菌群落包含  $3\mu\text{m}$ 、 $0.2\mu\text{m}$  以及 Settling 样本(贴壁型虫黄藻特有), 不考虑 3 种样本之间细菌比例影响, 则 6 株虫黄藻藻际细菌群落结构整体之间具有显著差异(ANOSIM,  $P = 0.001$ ); 其次, 除了 3 株虫黄藻(A、B、D 型)两两之间无明显差异, 6 株虫黄藻细菌群落两两之间均存在显著差异(PERMANOVA,  $P < 0.05$ , “bh”法校正); 另外, 对于任意一株贴壁型虫黄藻, 其 3 种粒径样本整体上存在显著差异(ANOSIM,  $P \leq 0.01$ )(图 3)。



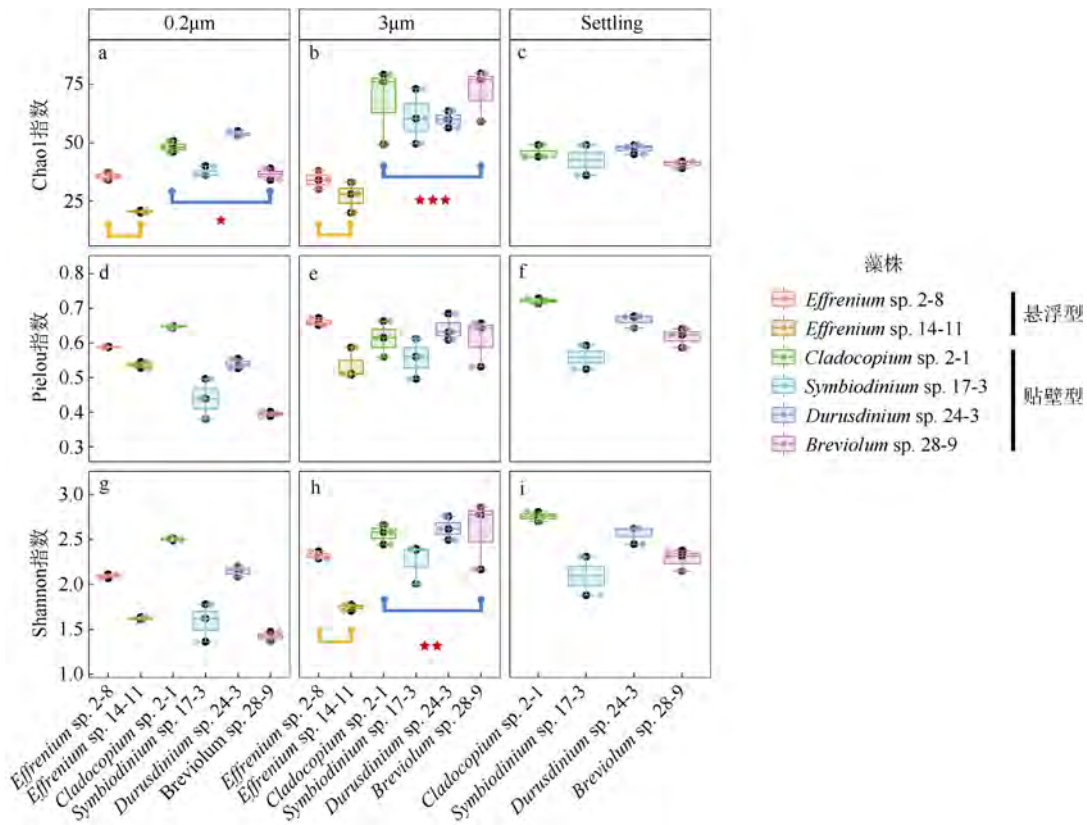


图2 6株虫黄藻藻际细菌群落的 Alpha 多样性(Chao1、Pielou、Shannon 指数)

包括所有虫黄藻藻株的  $3\mu\text{m}$  和  $0.2\mu\text{m}$  样本, 及 4 株贴壁型藻的 Settling 样本。显著性标记\*\*\*表示  $P < 0.001$ ; \*\*表示  $P < 0.01$ ; \*表示  $P < 0.05$

Fig. 2 The  $\alpha$  diversity indices (Chao1, Shannon, Pielou) of phycosphere bacterial communities in six zooxanthellae strains, including  $3\mu\text{m}$  and  $0.2\mu\text{m}$  samples of all zooxanthellae strains, as well as “Settling” samples of four anchorage-dependent living algae. Significance code: \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$

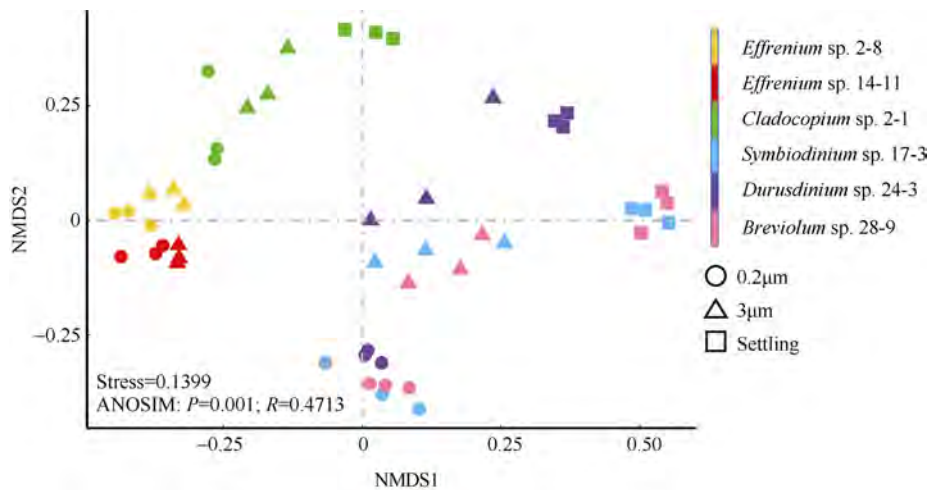


图3 基于 Bray-Curtis 相异指数的虫黄藻藻际细菌群落的非度量多维标度(NMDS)分析

ANOSIM 分析指示 6 株虫黄藻藻际细菌群落的整体差异

Fig. 3 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis based on the Bray-Curtis dissimilarity among bacterial community of zooxanthellae. Three types of samples are represented by different shapes (circles for  $0.2\mu\text{m}$  samples, triangles for  $3\mu\text{m}$  samples, and squares for Settling samples). The ANOSIM analysis indicates the overall similarity among the six algal strains

依据与非冗余 SILVA 数据库比对得到的注释结果, 对虫黄藻不同株系 3 种粒径样本的细菌群落进行分析。在门水平上,  $\alpha$ -变形菌(Alphaproteobacteria)

在所有样本中均占主导地位(>25%); 按  $0.2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$  以及 Settling 的顺序,  $\alpha$ -变形菌占比逐渐降低, Myxococcota 门占比逐渐升高, 这说明不同菌群对

自由生活或是附着生活的选择不同; 不论是自由生细菌(0.2 $\mu\text{m}$ )或是附着藻细菌(3 $\mu\text{m}$ 和Settling), 悬浮型虫黄藻的 $\alpha$ -变形菌的比例均明显高于贴壁型虫黄藻, 而浮霉菌(Planctomycetes)和 Myxococcota 门的相对丰度则显著低于贴壁藻株(Mann—Whitney U test  $P < 0.01$ ); 除藻株 14-11( $< 1\%$ )外, 拟杆菌门(Bacteroidota)在所有虫黄藻样本中均有一定的相对丰度(6%–38%)(图 4a)。在属水平上, 所有藻株的 0.2 $\mu\text{m}$  和 3 $\mu\text{m}$  样本均含有较高比例的大洋柄菌属(*Oceanicaulis*,  $> 9\%$ )细菌, 但在贴壁型藻的 Settling 样本中占比则极低( $< 1\%$ ), 其更倾向于浮游生活。悬浮型虫黄藻与贴壁型虫黄藻在 0.2 $\mu\text{m}$  样本细菌属差异显著, 除了共有的大洋柄菌属(*Oceanicaulis*), 悬

浮型虫黄藻以拉布伦茨氏菌属(*Labrenzia*,  $> 10\%$ )和红杆菌科未分类菌属(UC Rhodobacteraceae,  $> 22\%$ )为主, 而贴壁型虫黄藻主要以海命菌属(*Marivita*, 除藻株 2-1 外丰度 $> 57.17\%$ )为主。我们对悬浮型虫黄藻的主要附着藻细菌(3 $\mu\text{m}$ )与贴壁型虫黄藻的主要附着藻细菌(Settling)进行比较, 发现悬浮型虫黄藻主要附着藻细菌类群为大洋柄菌属(*Oceanicaulis*,  $> 24\%$ )、红杆菌科未分类菌属(UC Rhodobacteraceae,  $> 12\%$ )和海杆菌属 (*Marinobacter*,  $> 7\%$ ), 而贴壁型虫黄藻的主要附着藻细菌为拉布伦茨氏菌属(*Labrenzia*,  $> 15\%$ )、nannocystaceae 科未分类属(UC nannocystaceae,  $> 6\%$ )和 *Ekhidna*( $> 11\%$ )。贴壁型虫黄藻的 3 $\mu\text{m}$  样本菌群兼具了 0.2 $\mu\text{m}$  和 Settling 样本

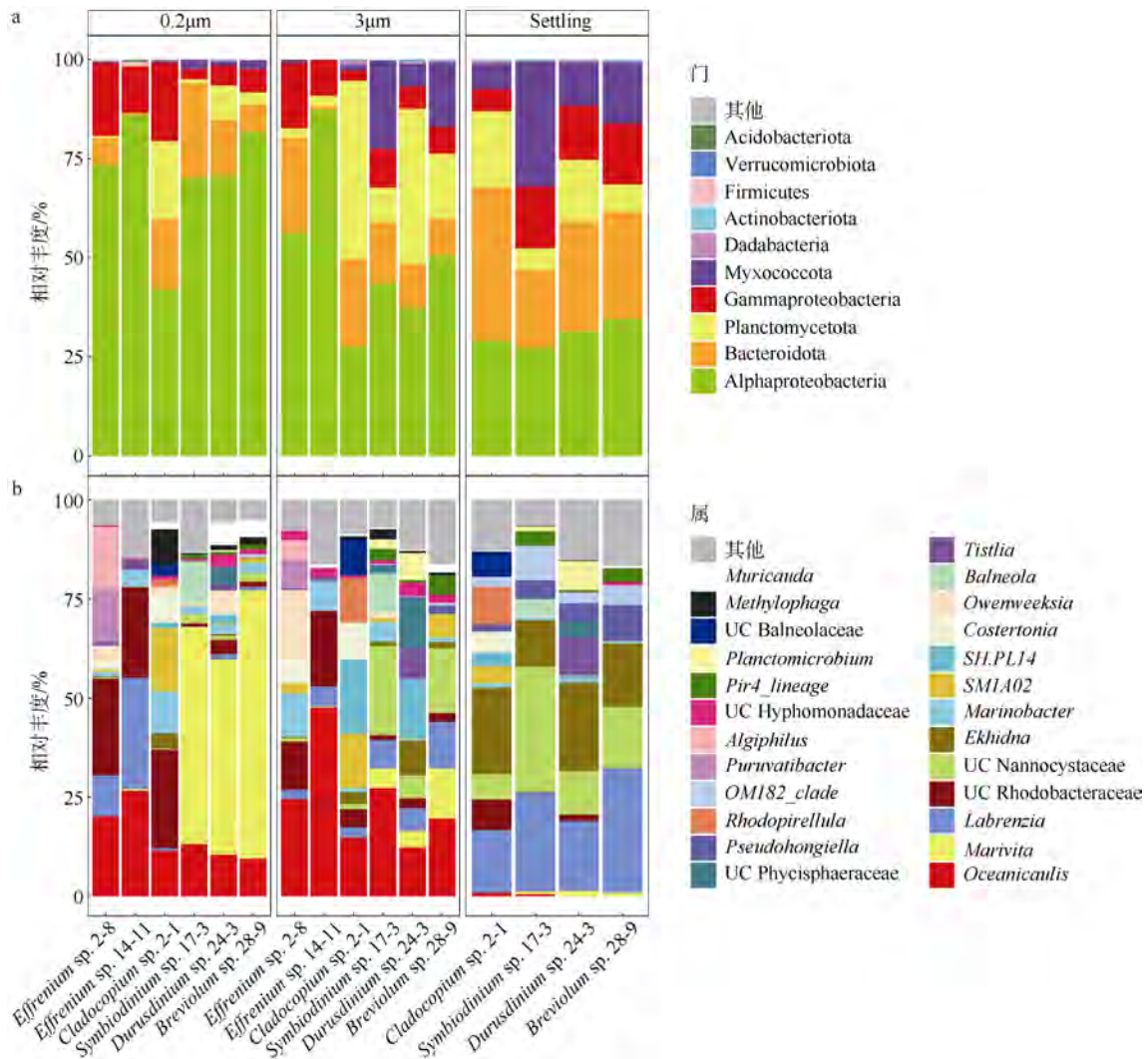


图 4 虫黄藻藻际细菌群落不同样本中的组成

a. 门水平的虫黄藻藻际细菌群落物种组成, 在所有样本中总相对丰度 $< 0.01\%$ 的属归为其他, 其中变形菌门细分为 $\alpha$ -变形菌、 $\beta$ -变形菌和 $\gamma$ -变形菌; b. 属水平的虫黄藻藻际细菌群落组成图, 相对丰度 $< 1\%$ 归为其他

Fig. 4 Zooxanthellae associated bacteria community composition profiles in different samples(3  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$ , Settling). (a) Bacteria community composition profiles at phylum level. Relative abundance  $< 0.01\%$  was classified into others. Phylum Proteobacteria was subdivided into  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria and  $\gamma$ -Proteobacteria. (b) Bacteria community composition profiles at genus level. Relative abundance  $< 1\%$  was classified into others

菌群的特征: 含有 0.2 $\mu\text{m}$  样本的大洋柄菌属 (*Oceanicaulis*) 和海命菌属 (*Marivita*), 及 Settling 样本的拉布伦茨氏菌属 (*Labrenzia*) 和 nannocytastaceae 科未分类属 (UC nannocytastaceae)。藻株 2-1 (C 型) 的细菌群落似乎介于悬浮型藻与贴壁型藻的特征之间, 其 Settling 样本具有明显的贴壁型藻株特征 (主要菌群相似), 但 0.2 $\mu\text{m}$  样本菌群缺少海命菌属 (*Marivita*), 反而具有悬浮型藻株的优势菌群红杆菌科未分类属 (UC Rhodobacteraceae)。两株 *Effrenium* 属的虫黄藻虽然优势菌群相似, 但在嗜青霉属 (*Algiphilus*)、*Pyruvatabacter* 属、*Owenweeksia* 等属上具有显著差异 (图 4b)。

### 2.3 虫黄藻藻际细菌群落之间的共享及核心群落的鉴定

为了减小杂质 ASVs 的影响, 将至少出现在两个重复中的 ASV 定义为该藻样品的 ASV。原本 629 个 ASVs, 筛选过滤后得到 120 个 ASVs (19.1%) 用于之后的分析。对于任意的一株藻: 其不同粒径样本中共有的 ASVs 比例不低于 75%, 3 $\mu\text{m}$  样本的 ASVs 数最多, 几乎所有来自 Settling 样本的 ASVs 都与 3 $\mu\text{m}$  样本共享 (图 5)。从藻株之间 ASVs 的共享来看, 所有藻株只共享 4 个 ASVs, 藻株 2-1 含有最高比例的特有 ASVs (28.85%), 藻株 2-8 则没有特有 ASVs (图 6)。两株藻之间共有的 ASVs 占两株藻全

部 ASVs 的比例范围在 12.33%~46.05%, 悬浮型藻和贴壁型藻同组内部藻株之间的共享 ASVs 占比较二者组间明显更高 (表 2)。所有藻株均含有 7 个属的细菌: 川西氏菌 (*Henriciella*)、拉布伦茨氏菌属 (*Labrenzia*)、海杆菌属 (*Marinobacter*)、大洋柄菌属 (*Oceanicaulis*)、生丝单胞菌科未分类菌属 (UC Hyphomonadaceae)、红杆菌科未分类菌属 (UC Rhodobacteraceae) 和 nannocytastaceae 科未分类属 (UC nannocytastaceae), 它们代表了 A—E 型虫黄藻藻际核心细菌类群。之后, 我们比较了不同粒径样本各自的核心属, 发现 0.2 $\mu\text{m}$  样本和 3 $\mu\text{m}$  样本的核心属组成非常相似: 3 $\mu\text{m}$  样本总共 6 个核心属与 0.2 $\mu\text{m}$  样本共享了 5 个, 且共享的属丰度比例也极其接近。Settling 样本核心属与 0.2 $\mu\text{m}$  样本和 3 $\mu\text{m}$  样本有较大的差异, 例如在大洋柄菌属 (*Oceanicaulis*)、海杆菌属 (*Marinobacter*) 上丰度较小, 而在拉布伦茨氏菌属 (*Labrenzia*)、*Reichenbachiella*、假洪吉氏菌属 (*Pseudohongiella*)、*OM182\_clade*、*Ekhidna* 上拥有较高的丰度 (图 7)。

## 3 讨论

珊瑚共附生细菌群落的研究已有相当丰富的史料, 但虫黄藻与细菌之间的关系往往被忽视, 而珊瑚组织中的细菌群落中有一部分是与虫黄藻密切相

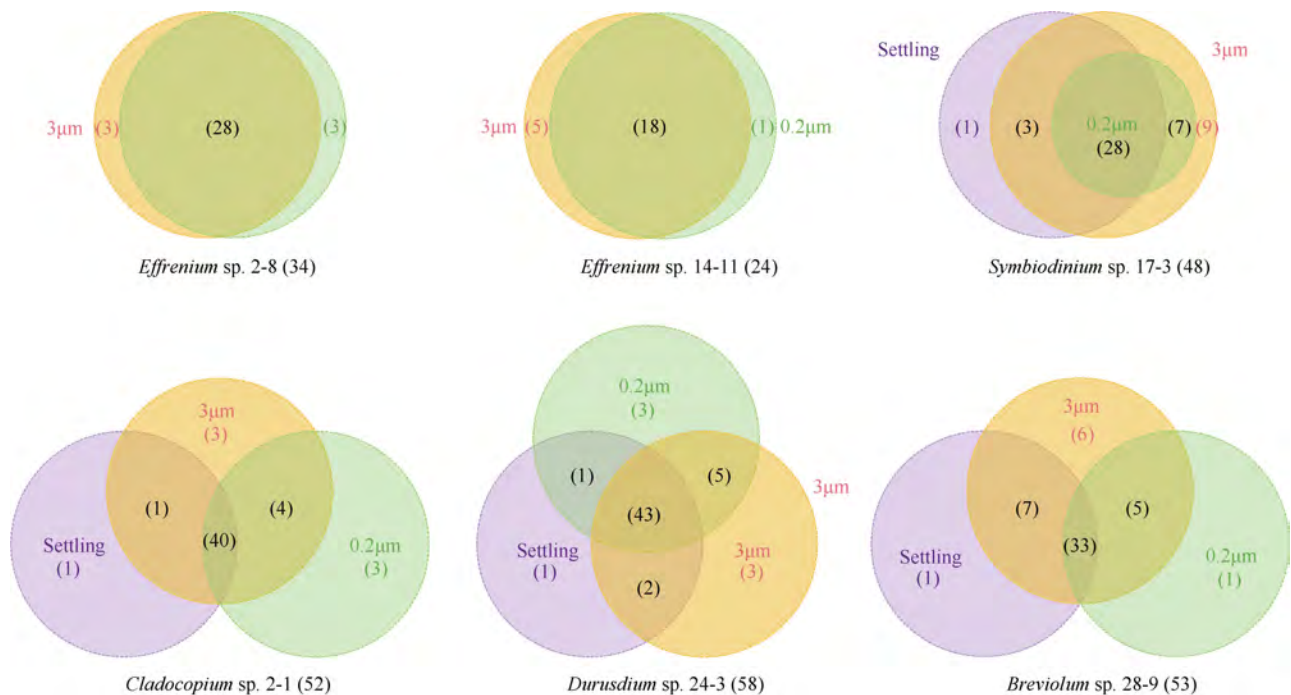


图 5 虫黄藻藻际细菌基于 ASV 水平在不同样本 (3 $\mu\text{m}$ 、0.2 $\mu\text{m}$  和 Settling) 中的共享情况

Fig. 5 Shared ASVs in different samples [3  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$  and Settling (specific to anchorage-dependent living algae)] in each zooxanthellae strain



表 2 不同虫黄藻株两两之间共享 ASVs 比例

Tab. 2 The ratio of shared ASVs between different zooxanthellae strains

藻株 1	藻株 2	两藻株共有 ASVs 数(取交集)/两藻株总 ASVs 数(取并集)	所占比例/%
24-3	28-9	35/76	46.05
17-3	24-3	33/73	45.21
17-3	28-9	30/71	42.25
2-8	14-11	16/42	38.10
2-1	28-9	23/82	28.05
2-1	24-3	24/86	27.91
17-3	2-1	20/80	25.00
14-11	2-1	14/62	22.58
2-8	24-3	15/71	21.13
14-11	28-9	11/66	16.67
2-8	24-3	13/79	16.46
14-11	17-3	10/62	16.13
14-11	24-3	11/71	15.49
2-8	28-9	10/77	12.99
2-8	17-3	9/73	12.33

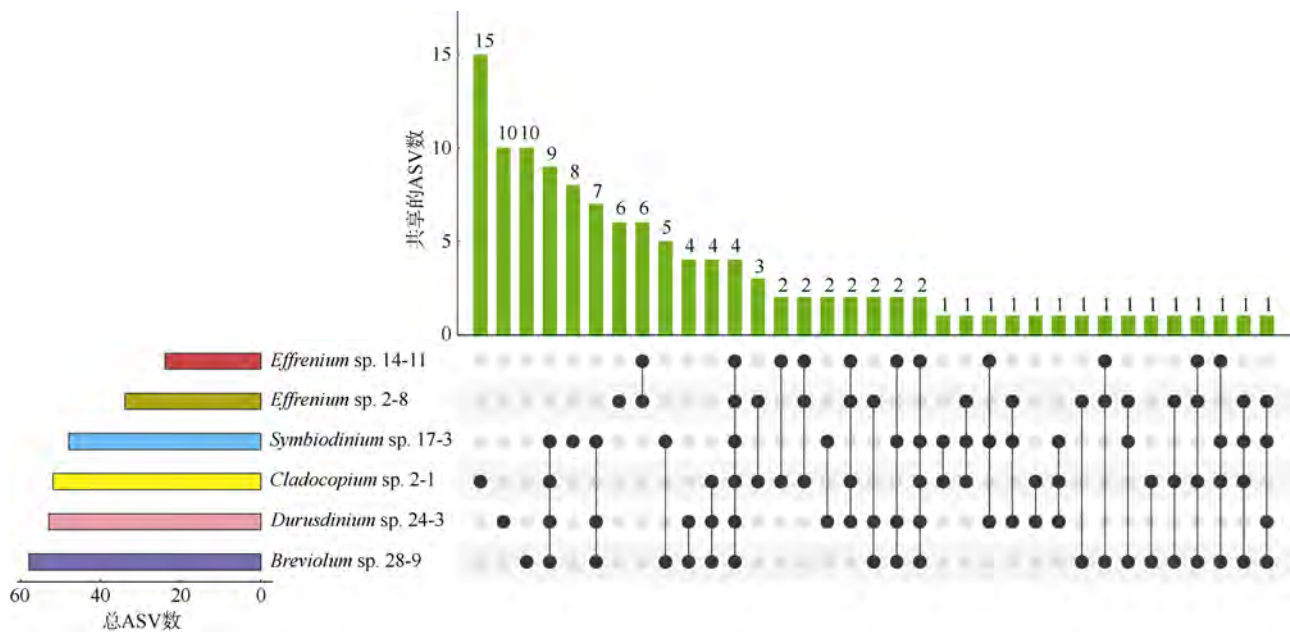


图 6 不同虫黄藻细菌群落之间共享 ASVs 的情况

Fig. 6 The UpSet diagram showing the shared ASVs between different zooxanthellae strains

关的。我们的研究通过离体培养的方法把虫黄藻与细菌联系起来，藻株包括了悬浮型和贴壁型虫黄藻，涵盖了 5 个属，而类似研究并未包含 *Effrenium* 属 (Lawson et al, 2018; Maire et al, 2021)。同时，对藻株培养物 3 种粒径(0.2~3 $\mu$ m, 自由生活; >3 $\mu$ m, 附着于藻体或颗粒物; Settling, 沉底贴壁藻体上)的样本进行了细菌群落分析, 0.2~3 $\mu$ m 粒径的细菌被认为是自由生细菌, >3 $\mu$ m 粒径的细菌被认为是吸附藻或颗粒物的细菌(Grossart et al, 2005), Settling 样本的细

菌主要与沉底贴壁藻密切相关。

本研究的 6 株虫黄藻均分离自珊瑚组织。悬浮型藻株 2-8 和 14-11 为 *Effrenium* 属虫黄藻, 该属虫黄藻被认为是营自由生活的, 且目前仅有一个物种 (Lajeunesse et al, 2018)。另外四株藻为贴壁型虫黄藻: 藻株 17-3 为 A6 型(ITS2), 目前该型只在砗磲组织中被发现或分离(Ishikura et al, 2004; Lajeunesse et al, 2004); 藻株 28-9、2-1、24-3 分别属于 B1、C1 和 D1 型, B1、C1 和 D1 型虫黄藻均有被报道存在于珊

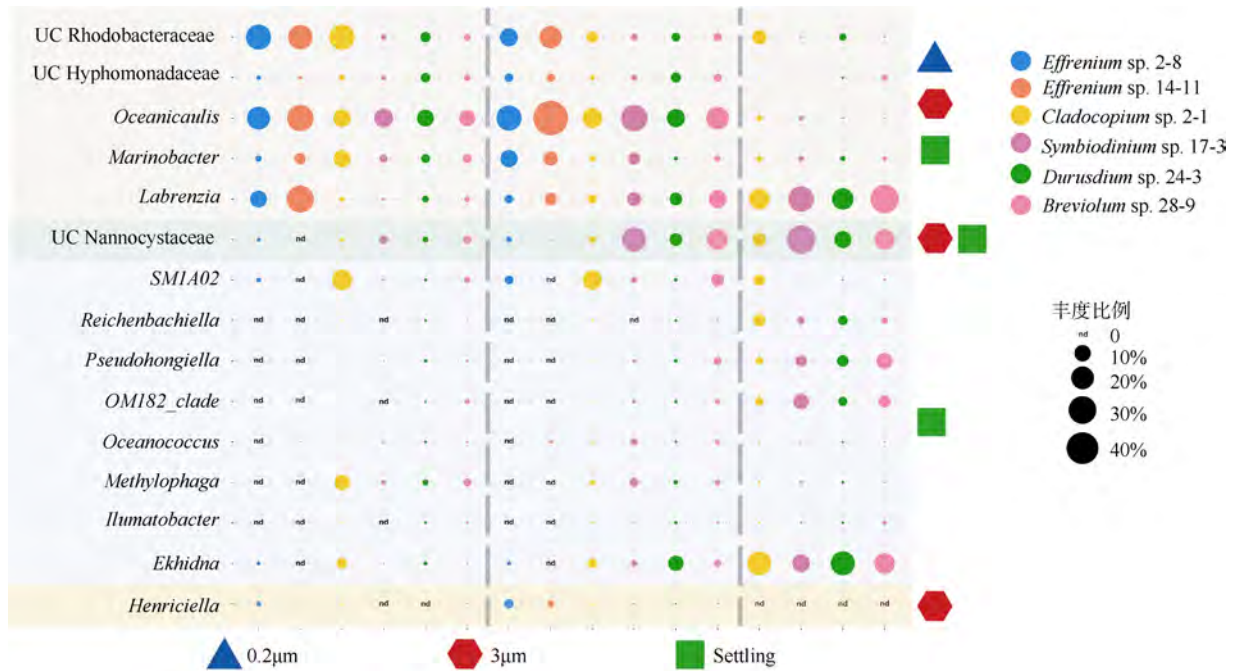


图 7 6 株藻 0.2 $\mu$ m、3 $\mu$ m、Settling 样本核心属之间的比较

四个不同颜色的区域块对应着四种类型的核心属, 自上而下依次是: 0.2 $\mu$ m、3 $\mu$ m 和 Settling 样本的核心属; 3 $\mu$ m 和 Settling 样本的核心属; Settling 样本的核心属; 3 $\mu$ m 样本的核心属

Fig. 7 Comparing the core genera in 0.2 $\mu$ m, 3 $\mu$ m, and Settling samples of 6 zooxanthellae strains. Four different colored area blocks correspond to 4 types of core genera, from top to bottom: core genera of 0.2  $\mu$ m, 3  $\mu$ m and Settling samples; core genera of 3 $\mu$ m and Settling samples; core genera of Settling samples; core genera of 3 $\mu$ m samples

瑚组织中(Garren et al, 2006; Zhou et al, 2012; Reichman et al, 2014; Ng et al, 2016; Gardner et al, 2017)。对该区域珊瑚内共生虫黄藻的 ITS2 主要基因型进行核查, 发现我们分离出的虫黄藻类型往往不是珊瑚的优势类群, 如十字牡丹珊瑚的虫黄藻主要是 C1 型(Zhou et al, 2011), 但我们却只分离出了 B1 型虫黄藻。海南岛周边丛生盔型珊瑚虫黄藻类型主要是 C、D 混合型(Zhou et al, 2017), 但我们却分离出了 A 和 E 型。这说明由于操作和培养的种种原因影响, 没有达到预期的分离结果。藻株可能是珊瑚背景种或共附生于珊瑚。有研究指出珊瑚内共生的虫黄藻往往不可培养或难培养, 所以分离得到的常为易培养的藻株(Hirose et al, 2008)。

本研究中的虫黄藻藻际细菌群落的 Chao1 和 Shannon 指数显著低于相关虫黄藻离体培养的报道结果(Lawson et al, 2018; Camp et al, 2020)。这与分离培养的方法、藻株培养时间的长短等都有关系。培养基、温度等因素会影响藻和细菌的生长(Sakamoto et al, 1997; Xiang et al, 2013), 分离时带入的污染杂菌也会对虫黄藻细菌群落造成影响; 随着培养时间的增长, 在操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)水平上一部分细菌会丢失, 但在属水平上仍

能保持高度的保守性(>1a), 因此我们进行长时间的培养从而得到虫黄藻密切相关的细菌类群(Behringer et al, 2018; Mönnich et al, 2020)。另外我们发现 *Effrenium* 属虫黄藻的细菌物种丰富度要显著低于其他属, 该属虫黄藻被发现可以以蓝藻(*Synechococcus* spp.)等细菌以及小型微藻为食, 这可能会降低其藻际细菌物种的相对丰富度(Jeong et al, 2012)。

我们的研究表明, 变形杆菌( $\alpha$ ,  $\gamma$ )为虫黄藻藻际环境的主要菌群(在 3 $\mu$ m、0.2 $\mu$ m 和 Settling 样本丰度均>25%), 这与培养研究的结果相近(Lawson et al, 2018), 但现场采集的珊瑚内共生群落则放线菌相对丰度更高(Ainsworth et al, 2015)。这可能是由于原位环境并非只包括虫黄藻一类生物, 因此原位采样的结果并不能准确关联虫黄藻相关的细菌群落。我们发现, 悬浮型和贴壁型藻株对细菌的选择具有明显差异: 拉布伦茨氏菌属(*Labrenzia*)大量存在于悬浮型藻株的 0.2 $\mu$ m 样本中, 而贴壁型藻株中比例却很小; 海命杆菌属(*Marivita*)则基本只存在于贴壁型藻中。这不太可能是培养基营养物质变化导致, 因为培养基的营养物质基本是过量的。最大可能是由于虫黄藻分泌的有机物类型不同(Gordon et al, 2010), 导致其形成了不同的藻际细菌群落。恰巧的是 E 型

虫黄藻(悬浮型)被认为是不可共生的,而 A—D 型虫黄藻(贴壁型)被认为是可共生的,或许共生关系与藻际细菌也存在关联。另外来自 *Effrenium* 属的两株藻 2-8 和 14-11 为同种虫黄藻,但分离自不同珊瑚,其优势菌属基本相似,这表明细菌—虫黄藻之间可能是物种特异性的(Eigemann et al, 2013; Krohn- Molt et al, 2017; Kimbrel et al, 2019),并不随珊瑚宿主改变。悬浮型虫黄藻自由生细菌与藻附着细菌群落相似,这与类似的藻研究结果一致(Eigemann et al, 2013)。但对于任意的一株贴壁型虫黄藻,其细菌群落 3 种粒径样本整体存在显著差异,特别是自由生细菌和沉底贴壁细菌之间的差异。但造成这种差异的原因不是菌群的不同,事实上 3 种粒径样本之间共享了绝大部分的 ASVs, 差异的 ASVs 所占比例较小,各菌群相对丰度的差异才是导致同株藻不同样本细菌群落差异的原因。对于不同藻株之间的差异则可以用藻之间 ASV 种类差异来解释,两株藻共享的 ASVs 比例越高,其细菌群落结构也越接近。

虫黄藻藻际细菌中的川西氏菌(*Henriciella*)、拉布伦茨氏菌属(*Labrenzia*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、大洋柄菌属(*Oceanicaulis*)、生丝单胞菌科未分类菌属(UC Hyphomonadaceae)、红杆菌科未分类属(UC Rhodobacteraceae)和 nannocytastaceae 科未分类属(UC nannocytastaceae)广泛存在于本研究平台期样本以及过往研究的培养物中(Lawson et al, 2018; Camp et al, 2020; Maire et al, 2021),表明它们可能是虫黄藻藻际细菌的核心类群。但着色杆菌科未分类属(UC Chromatiaceae)和 *Endozoicomonas* 这两个比较常见的属并未在我们的研究中发现(Neave et al, 2017; Lawson et al, 2018)。拉布伦茨氏菌属(*Labrenzia*)在悬浮型藻的自由生细菌和贴壁型藻的沉底贴壁样本中聚集,而先前的研究表明其倾向于依附藻生活(Maire et al, 2021),其具有产生和分解 DMSP 的能力(Curson et al, 2017),并可能对虫黄藻受胁迫下产生的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)具有清除作用(Sunda et al, 2002)。海杆菌属(*Marinobacter*)被发现可以产生一种低亲和力的双柠檬酸铁载体 vibrioferrin(VF)以提高虫黄藻利用铁的能力(Amin et al, 2009)。大洋柄菌属(*Oceanicaulis*)在浮游细菌中比例较高,其不仅参与合成维生素 B,还能在寡营养的条件下有效地吸收磷元素(Guidi et al, 2018),可能作为虫黄藻的营养储备长期存在于藻际环境中。红杆菌科是海洋环境最丰富的异养菌

之一,可占据海洋浮游细菌的 20%,对多种有机物进行降解,在生物地球循环中起到重要作用(Wagner-Döbler et al, 2006; Sharpe et al, 2020)。鼠尾菌属(*Muricauda*, 6 株藻中 4 株含有)能产生玉米黄素,一种具有清除活性氧(ROS)能力的类胡萝卜素,已知可增加虫黄藻对光照和温度的耐受程度(Motone et al, 2020)。此外,令人惊讶的是在 *Effrenium* 属的两株实验藻株的 3 $\mu$ m 和 0.2 $\mu$ m 样本中发现了可能存在于虫黄藻胞内的罗尔斯通菌属(*Ralstonia*)。我们对 6 株藻 0.2 $\mu$ m、3 $\mu$ m 和 Settling 样本的核心细菌群落比较发现,0.2 $\mu$ m 和 3 $\mu$ m 样本的核心菌属结构相似,这与最近的一项研究结果基本一致(Maire et al, 2021),而与贴壁沉底样本有较大差异,这可能是由于 3 $\mu$ m 和 0.2 $\mu$ m 样本细菌群落之间交互更密切。我们注意到 3 $\mu$ m 样本的细菌群落拥有最多的 ASV 种数,它涵盖了绝大多数自由生和附着生细菌类群。在珊瑚礁中,游离的虫黄藻会附着在珊瑚上参与钙化过程(Frommlet et al, 2015),因为海水作用而脱离附着的虫黄藻可能会吸引一些其他的细菌,最后再次附着在珊瑚上,由此来增加珊瑚礁细菌群落的多样性。

#### 4 结论

本文以中国南海三亚鹿回头海域分离的 A—E 型虫黄藻进行离体培养,通过采集三种不同粒径样本对其平台期的细菌群落进行比较分析,并找寻虫黄藻藻际细菌群落的核心类群,获得如下结论:

1) 贴壁型藻(A—D 型)具有比悬浮型藻(E 型)更具多样性的细菌群落。两种生活类型的虫黄藻对细菌的选择具有显著差异,如贴壁型藻的 Myxococota 门细菌远远大于悬浮型藻,但  $\alpha$ -变形菌相对丰度则小于悬浮型虫黄藻。

2) 悬浮型藻(E 型)的 3 $\mu$ m 和 0.2 $\mu$ m 样本中细菌优势菌群相似,而贴壁型藻(A—D 型)的三种粒径样本(3 $\mu$ m、0.2 $\mu$ m 和 Settling)则表现出整体显著差异。对于任意的一株藻,不同样本的 ASVs 高度共享,且不同样本细菌群落的差异主要是由于各组分细菌丰度差异导致,而不同藻株藻际细菌群落差异则可以用细菌类群差异解释。

3) 本实验的 A—E 型虫黄藻的核心属为 *Henriciella*、拉布伦茨氏菌属(*Labrenzia*)、海杆菌属(*Marinobacter*)、大洋柄菌属(*Oceanicaulis*)、UC Hyphomonadaceae、红杆菌科未分类属(UC Rhodobacteraceae)、UC Nannocystaceae,自由生与颗

粒附着生的核心细菌群落很相似, 但与沉底贴壁样本有明显差异。

## 参考文献 References

- 李淑, 余克服, 陈天然, 等, 2011. 珊瑚共生虫黄藻密度的季节变化及其与珊瑚白化的关系——以大亚湾石珊瑚为例[J]. 热带海洋学报, 30(2): 39–45. LI SHU, YU KEFU, CHEN TIANRAN, et al, 2011. Seasonal patterns of densities of symbiotic zooxanthellae in scleractinian corals from Daya Bay, northern South China Sea, and relation to coral bleaching[J]. Journal of Tropical Oceanography, 30(2): 39–45 (in Chinese with English abstract).
- 吴家法, 李洁, 张懿, 2015. 鹿回头岸礁区 4 种造礁珊瑚中可培养细菌的多样性[J]. 广东农业科学, 42(2): 146–151. WU JIAFA, LI JIE, ZHANG SI, 2015. Diversity of culturable bacteria associated with four scleractinian corals located in Luhuitou fringing reef[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 42(2): 146–151 (in Chinese with English abstract).
- 张增虎, 唐丽丽, 张永雨, 2018. 海洋中藻菌相互关系及其生态功能[J]. 微生物学通报, 45(9): 2043–2053. ZHANG ZENGHU, TANG LILI, ZHANG YONGYU, 2018. Algae-bacteria interactions and their ecological functions in the ocean[J]. Microbiology China, 45(9): 2043–2053 (in Chinese with English abstract).
- AINSWORTH T D, KRAUSE L, BRIDGE T, et al, 2015. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts[J]. The ISME Journal, 9(10): 2261–2274.
- ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al, 1990. Basic local alignment search tool[J]. Journal of Molecular Biology, 215(3): 403–410.
- AMIN S A, GREEN D H, HART M C, et al, 2009. Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(40): 17071–17076.
- BANASZAK A T, LAJEUNESSE T C, TRENCH R K, 2000. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 249(2): 219–233.
- BAYER T, NEAVE M J, ALSHEIKH-HUSSAIN A, et al, 2013. The microbiome of the red sea coral *Stylophora pistillata* is dominated by tissue-associated *Endozoicomonas* bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 79(15): 4759–4762.
- BEHRINGER G, OCHSENKÜHN M A, FEI CONG, et al, 2018. Bacterial communities of diatoms display strong conservation across strains and time[J]. Frontiers in Microbiology, 9: 659.
- BLACKALL L L, WILSON B, VAN OPPEN M J H, 2015. Coral—the world's most diverse symbiotic ecosystem[J]. Molecular Ecology, 24(21): 5330–5347.
- BLANK R J, HUSS V A R, 1989. DNA divergency and speciation in *Symbiodinium* (*Dinophyceae*) [J]. Plant Systematics and Evolution, 163(3): 153–163.
- BLANK R J, TRENCH R K, 1985. Speciation and symbiotic dinoflagellates[J]. Science, 229(4714): 656–658.
- BOLYEN E, RIDEOUT J R, DILLON M R, et al, 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. Nature Biotechnology, 37(8): 852–857.
- BONGAERTS P, RIGINOS C, RIDGWAY T, et al, 2010. Genetic divergence across habitats in the widespread coral *Seriatopora hystrix* and its associated *Symbiodinium* [J]. PLoS One, 5(5): e10871.
- BOSCH T C G, 2013. Cnidarian-microbe interactions and the origin of innate immunity in metazoans[J]. Annual Review of Microbiology, 67: 499–518.
- BOURNE D, IIDA Y, UTHICKE S, et al, 2008. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event[J]. The ISME Journal, 2(4): 350–363.
- BOURNE D G, MORROW K M, WEBSTER N S, 2016. Insights into the coral microbiome: underpinning the health and resilience of reef ecosystems[J]. Annual Review of Microbiology, 70: 317–340.
- CAMP E F, KAHLKE T, NITSCHKE M R, et al, 2020. Revealing changes in the microbiome of Symbiodiniaceae under thermal stress[J]. Environmental Microbiology, 22(4): 1294–1309.
- CURSON A R J, LIU JI, MARTÍNEZ A B, et al, 2017. Dimethylsulfoniopropionate biosynthesis in marine bacteria and identification of the key gene in this process[J]. Nature Microbiology, 2(5): 17009.
- EIGEMANN F, HILT S, SALKKA I, et al, 2013. Bacterial community composition associated with freshwater algae: species specificity vs. dependency on environmental conditions and source community[J]. FEMS Microbiology Ecology, 83(3): 650–663.
- FREUDENTHAL H D, 1962. *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: taxonomy, life cycle, and morphology[J]. The Journal of Protozoology, 9(1): 45–52.
- FROMMLET J C, SOUSA M L, ALVES A, et al, 2015. Coral symbiotic algae calcify *ex hospite* in partnership with bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(19): 6158–6163.
- GARDNER S G, RAINA J B, NITSCHKE M R, et al, 2017. A multi-trait systems approach reveals a response cascade to bleaching in corals[J]. BMC Biology, 15(1): 117.
- GARREN M, WALSH S M, CACCONI A, et al, 2006. Patterns of association between *Symbiodinium* and members of the *Montastraea annularis* species complex on spatial scales ranging from within colonies to between geographic regions[J]. Coral Reefs, 25(4): 503–512.
- GORDON B R, LEGGAT W, 2010. *Symbiodinium*-invertebrate symbioses and the role of metabolomics[J]. Marine Drugs, 8(10): 2546–2568.
- GROSSART H P, LEVOLD F, ALLGAIER M, et al, 2005. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities[J].



- Environmental Microbiology, 7(6): 860–873.
- GROTTOLI A G, MARTINS P D, WILKINS M J, et al, 2018. Coral physiology and microbiome dynamics under combined warming and ocean acidification[J]. PLoS One, 13(1): e0191156.
- GUIDI F, PEZZOLESI L, VANUCCI S, 2018. Microbial dynamics during harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* growth: bacterial succession and viral abundance pattern[J]. MicrobiologyOpen, 7(4): e00584.
- HERNANDEZ-AGREDA A, GATES R D, AINSWORTH T D, 2017. Defining the core microbiome in corals' microbial soup[J]. Trends in Microbiology, 25(2): 125–140.
- HIROSE M, REIMER J D, HIDAKA M, et al, 2008. Phylogenetic analyses of potentially free-living *Symbiodinium* spp. isolated from coral reef sand in Okinawa, Japan[J]. Marine Biology, 155(1): 105–112.
- ISHIKURA M, HAGIWARA K, TAKISHITA K, et al, 2004. Isolation of new *Symbiodinium* strains from tridacnid giant clam (*Tridacna crocea*) and sea slug (*Pteraeolidia ianthina*) using culture medium containing giant clam tissue homogenate[J]. Marine Biotechnology, 6(4): 378–385.
- JEONG H J, YOO Y D, KANG N S, et al, 2012. Heterotrophic feeding as a newly identified survival strategy of the dinoflagellate *Symbiodinium*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(31): 12604–12609.
- KIMBREL J A, SAMO T J, WARD C, et al, 2019. Host selection and stochastic effects influence bacterial community assembly on the microalgal phycosphere[J]. Algal Research, 40: 101489.
- KROHN-MOLT I, ALAWI M, FÖRSTNER K U, et al, 2017. Insights into microalga and bacteria interactions of selected phycosphere biofilms using metagenomic, transcriptomic, and proteomic approaches[J]. Frontiers in Microbiology, 8: 1941.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, et al, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 35(6): 1547–1549.
- LAJEUNESSE T C, BHAGOOI R, HIDAKA M, et al, 2004. Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients[J]. Marine Ecology Progress Series, 284: 147–161.
- LAJEUNESSE T C, PARKINSON J E, GABRIELSON P W, et al, 2018. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts[J]. Current Biology, 28(16): 2570–2580.e6.
- LAWSON C A, RAINA J B, KAHLKE T, et al, 2018. Defining the core microbiome of the symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium*[J]. Environmental Microbiology Reports, 10(1): 7–11.
- LI JIE, CHEN QI, LONG LIJUAN, et al, 2014. Bacterial dynamics within the mucus, tissue and skeleton of the coral *Porites lutea* during different seasons[J]. Scientific Reports, 4: 7320.
- LIU MIN, LIU LEMIAN, CHEN HUIHUANG, et al, 2019. Community dynamics of free-living and particle-attached bacteria following a reservoir *Microcystis* bloom[J]. Science of the Total Environment, 660: 501–511.
- MAIRE J, GIRVAN S K, BARKLA S E, et al, 2021. Intracellular bacteria are common and taxonomically diverse in cultured and *in hospite* algal endosymbionts of coral reefs[J]. The ISME Journal, 15(7): 2028–2042.
- MATTHEWS J L, RAINA J B, KAHLKE T, et al, 2020. Symbiodiniaceae-bacteria interactions: rethinking metabolite exchange in reef-building corals as multi-partner metabolic networks[J]. Environmental Microbiology, 22(5): 1675–1687.
- MIZUYAMA M, IGUCHI A, IJIMA M, et al, 2020. Comparison of Symbiodiniaceae diversities in different members of a *Palythoa* species complex (Cnidaria: Anthozoa: Zoantharia)—implications for ecological adaptations to different microhabitats[J]. PeerJ, 8: e8449.
- MÖNNICH J, TEBBEN J, BERGEMANN J, et al, 2020. Niche-based assembly of bacterial consortia on the diatom *Thalassiosira rotula* is stable and reproducible[J]. The ISME Journal, 14(6): 1614–1625.
- MOORE R B, FERGUSON K M, LOH W K W, et al, 2003. Highly organized structure in the non-coding region of the *psbA* minicircle from clade C *Symbiodinium*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(Pt 6): 1725–1734.
- MORROW K M, MOSS A G, CHADWICK N E, et al, 2012. Bacterial associates of two Caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability[J]. Applied and Environmental Microbiology, 78(18): 6438–6449.
- MOTONE K, TAKAGI T, ABURAYA S, et al, 2020. A zeaxanthin-producing bacterium isolated from the algal phycosphere protects coral endosymbionts from environmental stress[J]. mBio, 11(1): e01019-19.
- MUSCATINE L, PORTER J W, 1977. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments[J]. BioScience, 27(7): 454–460.
- MUSCATINE L, 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals[J]. Ecosystems of the World, 25: 75–87.
- NEAVE M J, RACHMAWATI R, XUN LIPING, et al, 2017. Differential specificity between closely related corals and abundant *Endozoicomonas* endosymbionts across global scales[J]. The ISME Journal, 11(1): 186–200.
- NG T Y, ANG P, 2016. Low symbiont diversity as a potential adaptive strategy in a marginal non-reefal environment: a case study of corals in Hong Kong[J]. Coral Reefs, 35(3): 941–957.
- NISSIMOV J, ROSENBERG E, MUNN C B, 2009. Antimicrobial properties of resident coral mucus bacteria of *Oculina patagonica*[J]. FEMS Microbiology Letters, 292(2): 210–215.
- POCHON X, PAWLOWSKI J, ZANINETTI L, et al, 2001. High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans[J]. Marine Biology, 139(6): 1069–1078.
- POCHON X, GATES R D, 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i[J].

- Molecular Phylogenetics and Evolution, 56(1): 492–497.
- POOTAKHAM W, MHUANTONG W, YOOCHA T, et al, 2021. Taxonomic profiling of Symbiodiniaceae and bacterial communities associated with Indo-Pacific corals in the Gulf of Thailand using PacBio sequencing of full-length ITS and 16S rRNA genes[J]. Genomics, 113(4): 2717–2729.
- QIN ZHENJUN, YU KEFU, CHEN BIAO, et al, 2019. Diversity of Symbiodiniaceae in 15 coral species from the southern South China sea: potential relationship with coral thermal adaptability[J]. Frontiers in Microbiology, 10: 2343.
- QUAST C, PRUESSE E, YILMAZ P, et al, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools[J]. Nucleic Acids Research, 41(D1): D590–D596.
- RÄDECKER N, POGOREUTZ C, VOOLSTRA C R, et al, 2015. Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning?[J]. Trends in Microbiology, 23(8): 490–497.
- RAINA J B, DINSDALE E A, WILLIS B L, et al, 2010. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations?[J]. Trends in Microbiology, 18(3): 101–108.
- REICHMAN J R, VIZE P D, 2014. Separate introns gained within short and long soluble peridinin-chlorophyll *a*-protein genes during radiation of *Symbiodinium* (Dinophyceae) clade A and B lineages[J]. PLoS One, 9(10): e110608.
- RODRIGUEZ-LANETTY M, KRUPP D A, WEIS V M, 2004. Distinct ITS types of *Symbiodinium* in Clade C correlate with cnidarian/dinoflagellate specificity during onset of symbiosis[J]. Marine Ecology Progress Series, 275: 97–102.
- ROHWER F, BREITBART M, JARA J, et al, 2001. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*[J]. Coral Reefs, 20(1): 85–91.
- ROHWER F, SEGURITAN V, AZAM F, et al, 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria[J]. Marine Ecology Progress Series, 243: 1–10.
- ROWAN R, POWERS D A, 1991. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae)[J]. Marine Ecology Progress, 71(1): 65–73.
- SAKAMOTO T, BRYANT D A, 1997. Growth at low temperature causes nitrogen limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. Archives of Microbiology, 169(1): 10–19.
- SCHOENBERG D A, TRENCH R K, 1980. Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. III. Specificity and infectivity of *Symbiodinium microadriaticum*[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 207(1169): 445–460.
- SEYMOUR J R, AMIN S A, RAINA J B, et al, 2017. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships[J]. Nature Microbiology, 2(7): 17065.
- SHADE A, HANDELSMAN J, 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome[J]. Environmental Microbiology, 14(1): 4–12.
- SHARP K H, DISTEL D, PAUL V J, 2012. Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*[J]. The ISME Journal, 6(4): 790–801.
- SHARPE G C, GIFFORD S M, SEPTER A N, 2020. A model *Roseobacter*, *Ruegeria pomeroyi* DSS-3, employs a diffusible killing mechanism to eliminate competitors[J]. mSystems, 5(4): e00443-20.
- SHI TUO, NIU GAOFENG, KVITT H, et al, 2021. Untangling ITS2 genotypes of algal symbionts in zooxanthellate corals[J]. Molecular Ecology Resources, 21(1): 137–152.
- SPALDING M D, RAVILIOUS C, GREEN E P, 2001. World atlas of coral reefs[M]. Berkeley: University of California Press.
- SUBRAMANIAN B, GAO SHENGHAN, LERCHER M J, et al, 2019. Evolview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees[J]. Nucleic Acids Research, 47(W1): W270–W275.
- SUNDA W, KIEBER D J, KIENE R P, et al, 2002. An antioxidant function for DMSP and DMS in marine algae[J]. Nature, 418(6895): 317–320.
- TAKABAYASHI M, SANTOS S R, COOK C B, 2004. Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta)[J]. Journal of Phycology, 40(1): 160–164.
- TRENCH R K, THINH L V, 1995. *Gymnodinium linucheae* sp. nov.: the dinoflagellate symbiont of the jellyfish *Linuche unguiculata*[J]. European Journal of Phycology, 30(2): 149–154.
- TURNBAUGH P J, LEY R E, HAMADY M, et al, 2007. The human microbiome project[J]. Nature, 449(7164): 804–810.
- VAN OPPEN M J H, PALSTRA F P, PIQUET A M T, et al, 2001. 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, 268(1478): 1759–1767.
- WAGNER-DÖBLER I, BIEBL H, 2006. Environmental biology of the marine *Roseobacter* lineage[J]. Annual Review of Microbiology, 60: 255–280 .
- WALTERS W, HYDE E R, BERG-LYONS D, et al, 2015. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4–5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys[J]. mSystems, 1(1): e00009-15.
- WEGLEY L, EDWARDS R, RODRIGUEZ-BRITO B, et al, 2007. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*[J]. Environmental Microbiology, 9(11): 2707–2719.
- XIANG TINGTING, HAMBLETON E A, DENOFRIO J C, et al, 2013. Isolation of clonal axenic strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* and their growth and host specificity[J]. Journal of Phycology, 49(3): 447–458.
- YANG FANGFANG, LONG CHAO, WEI ZHANGLIANG, et al, 2020. Optimization of medium using response surface methodology to enhance the growth of *Effrenium voratum* (Symbiodiniaceae, Dinophyceae)[J]. Journal of Phycology, 56(5): 1208–1215.

- YANG QINGSONG, ZHANG YING, AHMAD M, et al, 2021. Microbial community structure shifts and potential *Symbiodinium* partner bacterial groups of bleaching coral *Pocillopora verrucosa* in South China Sea[J]. *Ecotoxicology*, 30(5): 966–974.
- ZHAO MEIXIA, YU KEFU, ZHANG QIAOMIN, et al, 2012. Long-term decline of a fringing coral reef in the Northern South China Sea[J]. *Journal of Coastal Research*, 28(5): 1088–1099.
- ZHOU GUOWEI, HUANG HUI, 2011. Low genetic diversity of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) in scleractinian corals from tropical reefs in southern Hainan Island, China[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(6): 598–605.
- ZHOU GUOWEI, HUANG HUI, LIAN JIANGSHENG, et al, 2012. Habitat correlation of *Symbiodinium* diversity in two reef-building coral species in an upwelling region, eastern Hainan Island, China[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 92(6): 1309–1316.
- ZHOU GUOWEI, CAI LIN, LI YUANCHAO, et al, 2017. Temperature-driven local acclimatization of *Symbiodinium* hosted by the coral *Galaxea fascicularis* at Hainan Island, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2487.