



## 珊瑚病原微生物鉴定及其分子诊断技术进展

杨思悦<sup>1,3</sup> 龙昊<sup>3</sup> 章翔<sup>1,3</sup> 蔡晓霓<sup>1,3</sup> 谢珍玉<sup>\*1,2,3</sup>

1 南海海洋资源利用国家重点实验室 海南 海口 570228

2 海南省热带水生生物技术重点实验室 海南 海口 570228

3 海南大学海洋学院 海南 海口 570228

**摘要:** 珊瑚礁生态系统是热带海洋最突出、最具代表性的生态系统, 具有极高的生态价值和经济价值, 然而由珊瑚疾病引起的珊瑚礁退化已经成为珊瑚礁生态系统的主要威胁之一。许多微生物(主要包括细菌、真菌、病毒)被认为与珊瑚疾病发生密切相关, 确定珊瑚疾病的病原并建立其快速诊断的方法是开展珊瑚疾病流行病学调查和制定防控措施的必由之路。本文主要综述珊瑚疾病的病原微生物及其分子诊断技术的研究进展。

**关键词:** 珊瑚礁, 病原, 分子诊断

## Progress in characterization of microbial pathogens of coral diseases and their molecular diagnosis techniques

YANG Si-Yue<sup>1,3</sup> LONG Hao<sup>3</sup> ZHANG Xiang<sup>1,3</sup> CAI Xiao-Ni<sup>1,3</sup> XIE Zhen-Yu<sup>\*1,2,3</sup>

1 State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Haikou, Hainan 570228, China

2 Key Laboratory of Tropical Aquatic Biotechnology of Hainan Province, Haikou, Hainan 570228, China

3 College of Marine Science, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

**Abstract:** The coral reef ecosystem with extremely high value of ecology and economy are the most prominent and representative ecosystem in the tropical ocean. However, coral reef degradation caused by coral diseases has become one of the major threats of coral reef ecosystems. Many microbial pathogens (including bacteria, fungi, and virus) are thought to be closely related to coral disease. Identification of coral pathogens and establishing their rapid detection methods are crucial for epidemiological investigation and formulating of prevention and control measures of coral diseases. This paper mainly reviews the related microbial pathogens of coral diseases and research progress in molecular diagnosis techniques for coral pathogens.

**Keywords:** Coral reef, Pathogens, Molecular diagnosis

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41466002, 31660744); Marine Economic and Innovative Demonstration City Project of State Oceanic Administration (HHCL201802, HHCL201813)

**\*Corresponding author:** E-mail: xiezyscuta@163.com

**Received:** 08-04-2019; **Accepted:** 14-06-2019; **Published online:** 09-07-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(41466002, 31660744); 国家海洋局海洋经济创新示范城市项目(HHCL201802, HHCL201813)

**\*通信作者:** E-mail: xiezyscuta@163.com

**收稿日期:** 2019-04-08; **接受日期:** 2019-06-14; **网络首发日期:** 2019-07-09

在世界热带和亚热带海洋生态系统中, 珊瑚礁具有重要的生态价值和经济价值<sup>[1]</sup>。珊瑚礁在海洋中的覆盖率不足千分之一, 却生存着超过四分之一的海洋鱼类, 因此珊瑚礁生态系统被誉为“海洋中的热带雨林”<sup>[2-3]</sup>。全球珊瑚礁生态系统在社会、经济、文化发展等方面所提供的直接和潜在价值超过 1 万亿美元, 5 亿人因此受益<sup>[4-5]</sup>。

然而, 在过去几十年里, 世界范围内的珊瑚因疾病减少了约 30%<sup>[6]</sup>, 并且珊瑚疾病对珊瑚礁的威胁仍在持续扩大<sup>[7]</sup>。到目前为止, 全球范围内已出现了约 40 种不同的珊瑚疾病, 其中仅有施罗氏弧菌(*Vibrio shilonii*)、溶珊瑚弧菌(*V. coralliilyticus*)、杀珊瑚橙色单胞菌(*Aurantimonas coralicida*)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、聚多曲霉(*Aspergillus sydowii*)、欧文斯氏弧菌(*V. owensii*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)通过了科赫法则验证, 为确定的珊瑚病原, 仍有很多珊瑚疾病的致病因子尚未确定。目前珊瑚疾病的诊断主要是基于现场宏观病灶的观察, 然而这种观察病灶的方式对于疾病的诊断并不可靠, 它可能会导致同一种疾病因发病地点或感染宿主的不同而被重复定义<sup>[8-9]</sup>。

众所周知, 疾病的发生与流行通常是宿主-病原-环境相互作用的结果, 病原微生物引发的疾病已被确定为全球珊瑚礁的主要威胁之一, 对珊瑚疾病病原的调查与研究有助于揭示珊瑚疾病发生和流行的真正原因<sup>[7]</sup>。许多研究表明细菌、真菌和病毒与珊瑚疾病的发生密切相关, 但是迄今为止仅有少量的微生物经科赫法则验证并确定为珊瑚病原。因此, 确定珊瑚疾病的病原对于珊瑚疾病的诊断和防治至关重要。同时, 建立珊瑚病原的快速检测方法可以准确诊断并提前预警珊瑚疾病, 有利于采取合理的措施保护珊瑚礁生态系统。基于分子技术的特定病原检测被认为是疾病诊断的有效方式, 目前, PCR、荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, Q-PCR)、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等分子技术被逐渐引入珊瑚疾病诊断领

域<sup>[10-14]</sup>, 有效地推动了珊瑚疾病诊断领域的发展。本文主要综述与珊瑚疾病相关的病原微生物种类、感染对象、流行规律以及部分病原的分子检测技术。

## 1 珊瑚疾病的病原微生物

Squires<sup>[15]</sup>将深海冷水珊瑚 (*Madrepora kauaiensis*) 骨骼生长异常增大的现象命为“瘤”, 这是最早关于珊瑚疾病的报道。随着研究的深入, 报道的珊瑚疾病不断增加, 而且新症状不断出现, 珊瑚的外观病灶通常成为珊瑚疾病命名的主要依据。近年来, 南中国海的普哥滨珊瑚 (*Porites pukoensis*)、扁枝滨珊瑚 (*Porites andrewsi*)、蔷薇珊瑚 (*Montipora* spp.)、杯形珊瑚 (*Pocillopora* spp.)、鹿角珊瑚 (*Acropora* spp.)、菊花珊瑚 (*Goniastrea* spp.)、澄黄滨珊瑚 (*Porites lutea*) 和滨珊瑚 (*Porites* spp.) 等共 14 种珊瑚也陆续出现了白化病、白斑病、黑化病、黄色炎症样病症、粉红颗粒状综合症等 9 种不同症状的疾病 (图 1)<sup>[9]</sup>。在 20 世纪 90 年代, 施罗氏弧菌 (*Vibrio shilonii*, 曾用名 *V. shiloi*) 首次被证明是大西洋枇杷珊瑚 (*Oculina patagonica*) 白化的病原<sup>[16-17]</sup>, 随后, 珊瑚病原学的研究开始兴起, 截至目前有许多病原微生物被认为与珊瑚疾病密切相关 (表 1)。

### 1.1 细菌性病原

#### 1.1.1 施罗氏弧菌 (*V. shilonii*)

*V. shilonii* 作为第一个被确定的珊瑚疾病病原, 其致病机理的研究也最为透彻, *V. shilonii*/*O. patagonica* 模型清晰地阐释了珊瑚白化的机制<sup>[42-43]</sup>, 其步骤如下: (1) 趋化和黏附: 温度在 25–30 °C 时, *V. shilonii* 可与健康珊瑚表面黏液的  $\beta$ -半乳糖受体结合; (2) 渗透进入珊瑚表皮细胞; (3) 侵入珊瑚细胞并增殖 24–48 h, 细菌浓度达到  $10^8$  CFU/cm<sup>3</sup> 后进入活的不可培养 (viable but non-culture, VBNC) 状态; (4) 产生富含脯氨酸的胞外毒素 (PYPVYPPVVP), 抑制虫黄藻的光合作用并使之漂白和裂解。

然而, Rosenberg 等<sup>[44]</sup>在对 *V. shilonii* 进行追踪研究时发现: (1) 2002 年之前可从白化的 *O. patagonica* 中分离到 *V. shilonii*, 并且 *V. shilonii* 可使健康的珊瑚白化; (2) 2004 年之后, 再也无法从白化的 *O. patagonica* 中分离到 *V. shilonii*, 同时, 以往实验室保存的 *V. shilonii* 菌株再也无法感染自然环境中的 *O. patagonica*。2006 年 Reshef 等<sup>[45]</sup>提出益生菌假说: 珊瑚组织及其黏液具有大量的微

生物, 其微生物群落会随着环境条件的改变而迅速变化, 这种改变会帮助它抵御病原并适应改变的环境。随后, Mills 等<sup>[46]</sup>发现, 经抗生素处理的健康 *O. patagonica* 抵御 *V. shilonii* 侵染能力下降, 同时发现从 *O. patagonica* 中分离的菌株 EM3 可抑制 *V. shilonii* 对珊瑚的侵染, 因此推测抗生素可杀死珊瑚共生的益生菌, 从而使珊瑚更容易被 *V. shilonii* 侵染, 这契合了益生菌假说。

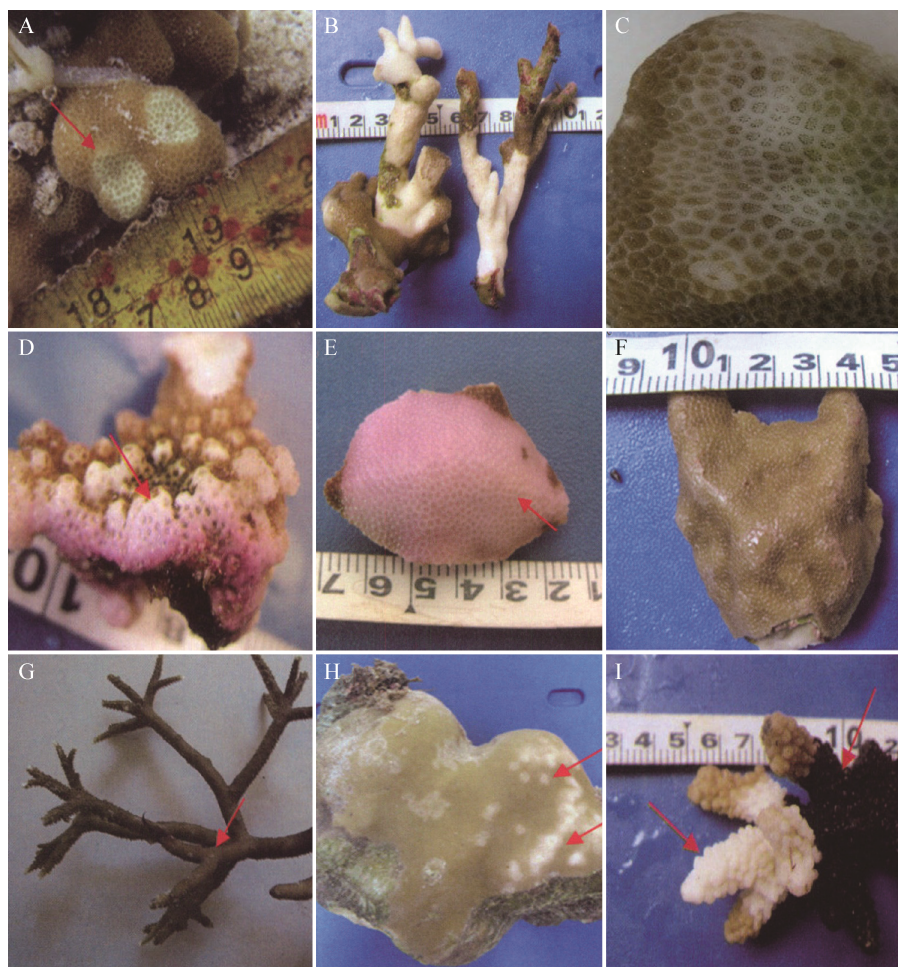


图 1 典型珊瑚疾病示例

Figure 1 Examples of typical coral diseases

注: A: 普哥滨珊瑚溃烂病; B: 扁枝滨珊瑚白化; C: 菊花珊瑚白化; D: 杯形珊瑚粉带病症; E: 滨珊瑚粉化; F: 澄黄滨珊瑚粉红颗粒综合症; G: 美丽鹿角白斑病; H: 滨珊瑚白斑; I: 杯形珊瑚黑化和白化。

Note: A: *Porites pukoensis* ulceration; B: *Porites andrewsi* bleaching; C: *Goniastrea* spp. bleaching; D: *Pocillopora* spp. pink band disease; E: *Porites* spp. pink disease; F: *Porites lutea* pink syndrome; G: *Acropora pulchra* white pox; H: *Porites* spp. white pox; I: *Pocillopora* spp. blackening and bleaching.

表 1 常见珊瑚疾病的相关病原

Table 1 Related pathogens of common coral diseases

珊瑚疾病	主要宿主	相关病原	科赫法则	参考文献
Coral disease	Main hosts	Related pathogens	Koch's postulates	References
白化病	枇杷珊瑚	施罗氏弧菌	是	[16-17]
Bleaching	<i>O. patagonica</i>	<i>V. shilonii</i>	Yes	
珊瑚组织损失	鹿角杯形珊瑚	溶珊瑚弧菌	是	[18-19]
Coral tissue loss	<i>Pocillopora damicornis</i>	<i>V. coralliilyticus</i>	Yes	
黄斑/带病	圆菊珊瑚	弧菌团	否	[20-21]
Yellow pox/band	<i>Montastrea</i> spp.	<i>V. consortium</i>	No	
	同双星珊瑚	病毒样颗粒	否	
	<i>Diploastrea heliopora</i>	Virus-like particles, VLPs	No	
	石芝珊瑚			
	<i>Fungia</i> spp.			
	绕石珊瑚			
	<i>Herpolitha</i> spp.			
白化综合症	蔷薇珊瑚	欧文斯氏弧菌	是	[22-26]
White syndrome	<i>Montipora capitata</i>	<i>V. owensii</i>	Yes	
		溶珊瑚弧菌		
		<i>V. coralliilyticus</i>		
	浪花鹿角珊瑚	溶珊瑚弧菌	是	
	<i>Acropora cytherea</i>	<i>V. coralliilyticus</i>	Yes	
	扁枝滨珊瑚	溶藻弧菌	是	
	<i>Porites andrewsi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	Yes	
白带病	鹿角珊瑚	哈维氏弧菌	否	[27-28]
White band disease	<i>Acropora</i> spp.	<i>V. harveyi</i>	No	
黑带病	鹿角珊瑚	脱硫弧菌	否	[29-32]
Black band disease	<i>Acropora</i> spp.	<i>Desulfovibrio</i> spp.	No	
	蔷薇珊瑚	硫细菌		
	<i>Montipora</i> spp.	<i>Beggiatoa</i> spp.		
	蜂巢珊瑚	弧菌		
	<i>Favia</i> spp.	<i>Vibrio</i> spp.		
	圆菊珊瑚			
	<i>Montastraea</i> spp.			
	滨珊瑚			
	<i>Porites</i> spp.			
白色瘟疫	椭圆星珊瑚	杀珊瑚橙色单胞菌	是	[33]
White plague	<i>Dichocoenia stokesii</i>	<i>Aurantimonas coralicida</i>	Yes	
白点	掌叶鹿角珊瑚	黏质沙雷氏菌	是	[34-35]
White pox	<i>Acropora palmata</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Yes	
曲霉病	柳珊瑚	聚多曲霉	是	[36-40]
Aspergillosis	<i>Gorgonia</i> spp.	<i>A. sydowii</i>	Yes	
异常生长	蜂巢珊瑚	病毒	否	[41]
Anomalous growths	<i>Platygyra</i> spp.	Virus	No	
	蔷薇珊瑚			
	<i>Montipora</i> spp.			
	鹿角珊瑚			
	<i>Acropora</i> spp.			

### 1.1.2 溶珊瑚弧菌(*V. coralliilyticus*)

溶珊瑚弧菌是一种分布范围广、危害严重的细菌性病原, 被认为与多种热带珊瑚疾病密切相关<sup>[47-50]</sup>。溶珊瑚弧菌对宿主的致病性与温度高度相关, Ben-Haim 等<sup>[18-19]</sup>研究发现, 22 °C 以下时溶珊瑚弧菌无法感染鹿角杯形珊瑚, 温度为 24–26 °C 时鹿角杯形珊瑚会逐渐漂白, 而温度上升到 27–29 °C 时鹿角杯形珊瑚组织会发生快速溶解。Garren 等<sup>[51-52]</sup>的研究进一步揭示了温度与溶珊瑚弧菌致病力的关系: (1) 二甲基巯基丙酸内盐(dimethylsulfoniopropionate, DMSP)是溶珊瑚弧菌的趋化因子; (2) 高温会使珊瑚分泌大量的DMSP, 当温度从 22 °C 上升至 31 °C 时珊瑚黏液中DMSP 含量会增加 5 倍, 从而导致溶珊瑚弧菌的趋化能力提高 2 倍; (3) 高温会使溶珊瑚弧菌产生锌金属蛋白酶, 该酶对珊瑚组织有裂解作用。

### 1.1.3 溶藻弧菌

溶藻弧菌广泛分布于热带海洋环境中, 它既可作为某些鱼类病原(*Aeromonas salmonicida*、*V. anguillarum* 和 *V. ordalii*)的益生菌<sup>[53-54]</sup>, 也常常被认为是鱼类、甲壳类和人类疾病的病原<sup>[55]</sup>。Cervino 等<sup>[56]</sup>研究发现溶藻弧菌与其他弧菌协同作用可使健康的圆菊珊瑚(*Montastrea* spp.)患上黄斑/带病(yellow blotch/band disease, YBD), 但是单独的溶藻弧菌无法使其重现 YBD 症状。随后, Xie 等<sup>[26]</sup>从南中国海白化的扁枝滨珊瑚分离出溶藻弧菌 XSBZ14, 并且通过科赫法则验证该菌株是扁枝滨珊瑚白化综合征(*Porites andrewsi* white syndrome, PAWS)的病原, 同时该研究也发现溶藻弧菌的不同菌株毒力差异很大, 从白化珊瑚分离所有的溶藻弧菌中仅有菌株 XSBZ14 可重现白化综合征病灶。近年来, 我们尝试用溶藻弧菌 XSBZ14 在水族馆的珊瑚养殖缸中感染鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)和丛生盔形珊瑚(*Galaxea fascicularis*), 但均未出现疾病病灶, 因此推测该病原的致病性与宿主和环境高度相关。

### 1.1.4 欧文斯氏弧菌(*V. owensii*) 和 *Pseudoalteromonas piratica*

蔷薇珊瑚(*Montipora* spp.)的白化综合征(*Montipora* white syndrome, MWS)是夏威夷海域珊瑚礁的主要威胁, 它是一种组织损伤性的疾病, 有慢性白化综合征(chronic *Montipora* white syndrome, cMWS)和急性白化综合征(acute *Montipora* white syndrome, aMWS)之分。2012 年 Ushijima 等<sup>[22]</sup>发现菌株 OCN002 可使蔷薇珊瑚患上慢性白化综合征(cMWS), 然后通过对菌株 OCN002 进行 16S rRNA 基因测序、代谢表征和多位点序列分析, 最终确定菌株 OCN002 为欧文斯氏弧菌, 这也是欧文斯氏弧菌首次作为确定的珊瑚病原被报道。后来根据 Beurmann 等<sup>[57]</sup>研究表明 *P. piratica* OCN003 可诱导蔷薇珊瑚由 cMWS 向 aMWS 转变。

### 1.1.5 杀珊瑚橙色单胞菌(*A. corallicida*)

Richardson 等<sup>[58]</sup>最早于 1998 年对细菌所引起的珊瑚白瘟 II 型疾病(white plague type II, WPT II)进行报道, 最初该细菌性病原被认为是鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.), 后来 Denner 等<sup>[33]</sup>对珊瑚白瘟 II 型疾病病原 WP1T 进行更为严格的分类鉴定, 主要包括外观形态表征、生理生化鉴定以及 16S rRNA 基因鉴定, 最终确定 WP1T 为杀珊瑚橙色单胞菌(*A. corallicida*)。

### 1.1.6 黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*)

20 世纪 90 年代, 白痘病(white pox, WP)对加勒比海域的鹿角珊瑚危害严重。Patterson 等<sup>[34]</sup>从患病的鹿角珊瑚中分离出黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*) PDL100C, 并且经科赫法则验证 PDL100C 为鹿角珊瑚白痘病(也可称为 *Acroporid serratiosis*, APS)病原。2011 年 Sutherland 等<sup>[35]</sup>从人类污水中筛选出黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*) PDR60, 并且用该菌株在水族箱中对鹿角珊瑚进行人工感染, 4–5 d 内就会出现 APS 疾病病灶, 这表明人类活动可能会对海洋生物生存造成威胁。

### 1.1.7 其他细菌

除了上述少量细菌经科赫法则验证为确定的珊瑚病原体外, 仍有许多其他细菌虽未经科赫法则验证, 但仍被认为与珊瑚疾病密切相关。如脱硫弧菌属(*Desulfovibrio* spp.)可导致多种珊瑚患黑带病(black band disease, BBD)<sup>[59]</sup>, 松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)对角蜂巢珊瑚(*Favites abdita*)有潜在威胁<sup>[60]</sup>。Cervino 等<sup>[56]</sup>在园菊珊瑚(*Montastrea* spp.)的 YBD 疾病研究中发现, *V. rotiferanus*、*V. harveyi*、*V. alginolyticus*、*V. proteolyticus* 单独感染园菊珊瑚均不能引起 YBD, 而混合感染园菊珊瑚可重现 YBD 病灶, 该结果表明珊瑚疾病的发生可能是多种致病菌协同作用的结果。

### 1.2 真菌性疾病

迄今为止, 聚多曲霉(*A. sydowii*)是唯一确定的珊瑚疾病真菌性病原。由聚多曲霉引发的柳珊瑚曲霉病最初是在巴哈马加勒比等海域被发现, 该病原至少可以感染 8 种以上珊瑚<sup>[36-37]</sup>。聚多曲霉的感染机制尚不清楚, 但有研究表明聚多曲霉含有 *dddP* 基因, 该基因编码的酶可以代谢珊瑚黏液中的 DMSP 而产生二甲基硫(dimethylsulfide, DMS), 这说明聚多曲霉可利用珊瑚黏液分泌物供自身生存<sup>[61]</sup>。Kim 等<sup>[38]</sup>对 1997–2003 年发生珊瑚曲霉病的调研中发现, 6 年间珊瑚曲霉病的发生呈持续下降的趋势, 并推测环境的改变、珊瑚宿主的抗性增加等原因会导致聚多曲霉感染率下降, 这表明病原的致病能力与环境与宿主高度相关。Soler-Hurtado 等<sup>[39]</sup>在对太平洋厄瓜多尔地区珊瑚礁监测过程中发现了 *A. sydowii* 和其他潜在病原的存在, 因此可以推测该地区珊瑚礁生态系统仍然面临着珊瑚疾病的威胁。

### 1.3 病毒性疾病

珊瑚组织中的病毒群落具有高度多样性<sup>[62-63]</sup>, 显示出病毒具有感染珊瑚共生体(holobiont)中各种生物的能力<sup>[64]</sup>。至今虽然没有证据显示病毒与珊

瑚疾病有直接因果关系, 但是越来越多的研究表明病毒与珊瑚白化等疾病密切相关。同种珊瑚中, 患白化综合征的珊瑚组织中 VLPs 密度显著高于健康珊瑚组织<sup>[65]</sup>; 患 WP 疾病的珊瑚组织中单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)病毒含量丰富, 而在健康珊瑚组织中没有检测到该病毒<sup>[66]</sup>; 研究发现噬菌体可将毒力基因整合到与珊瑚共生的细菌中增加其毒力, 从而对珊瑚白化以及白化综合征的发生有促进作用<sup>[67]</sup>。Thurber 等<sup>[66]</sup>提出因病毒导致的珊瑚礁退化机制主要有两种: (1) 病毒直接侵染珊瑚细胞及其组织而导致珊瑚宿主死亡; (2) 病毒可以改变珊瑚礁环境中可溶性或颗粒状物质的含量, 这种物质含量的改变会导致珊瑚礁生态系统处于非健康状态, 同时破坏珊瑚礁的功能和完整。

## 2 分子诊断技术

虽然珊瑚疾病对珊瑚礁生态系统构成严重威胁, 但是人们对珊瑚疾病病因、传播动力学等方面的知识仍然知之甚少, 确定珊瑚疾病的病原并建立其准确、快速的诊断方法是开展珊瑚疾病研究的前提<sup>[68]</sup>。目前, PCR、Q-PCR、LAMP 等分子技术被应用于珊瑚疾病诊断领域。这些分子技术可直接针对珊瑚疾病病原进行检测, 具有特异性强、灵敏度高等优点。同时, 利用这些检测技术可以在珊瑚疾病暴发前对其进行监测, 为珊瑚疾病预防措施的制定提供可能。

### 2.1 PCR 技术

PCR 检测主要是基于特异引物对靶序列的扩增, 可特异灵敏地检测病原, 其成本低廉, 被广泛应用于病原性疾病的诊断(表 2)。针对特定珊瑚疾病病原, 建立其快速准确的检测方法在珊瑚疾病诊断领域已经被逐渐推广和应用。PCR 检测技术的关键在于引物设计, Polson 等对 4 种杀珊瑚橙色单胞菌(*A. coralicida*)、黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*)、施罗氏弧菌(*V. shilonii*)、溶珊瑚弧菌(*V. coralliilyticus*)的 16S rRNA 基因序列进行比对分

表 2 珊瑚病原分子诊断技术  
Table 2 Summary of coral pathogen molecular diagnostics

Technique	Advantages	Disadvantages	References
PCR	High sensitivity	1. Not quantitative 2. High contamination risk	[9,11]
Q-PCR	1. High sensitivity 2. High specificity 3. Low contamination risk quantitative results	1. High cost 2. Requires specialized thermocycler	[12,14,69]
LAMP	1. High sensitivity 2. High specificity 3. Doesn't require thermocycler	1. Not quantitative 2. High contamination risk	[13]

析, 设计 4 对引物构建针对这 4 种病原菌的多重 PCR 检测方法, 这是最早有关珊瑚疾病病原检测的记录<sup>[10]</sup>。Li 等<sup>[11]</sup>针对 PAWS 病原菌株 XSBZ03 的 IGS<sup>AG</sup> 序列设计了特异引物, 从而构建了该病原菌株的 PCR 检测方法, 并且将该诊断方法应用于珊瑚移植领域, 结果显示通过移除检测呈阳性的珊瑚, 使得两处珊瑚移植的存活率分别从 82.95% 和 87.18% 提高到 93.90% 和 95.71%。杨思悦等<sup>[70]</sup>以珊瑚病原菌株 XSBZ03 单拷贝基因 *SI* 和 XSBZ14 的单拷贝基因 *SI* 为靶序列分别设计引物, 从而构建了 XSBZ03 和 XSBZ14 双重 PCR 检测方法, 可同时检测珊瑚病原 XSBZ03 和 XSBZ14, 且检测极限分别为  $6 \times 10^3$  CFU/mL 和  $8 \times 10^3$  CFU/mL。

2.2 荧光定量 PCR 技术

Q-PCR 技术衍生于普通 PCR 技术, 但相较于普通 PCR, Q-PCR 具有更高的灵敏度(是普通 PCR 的 10–1 000 倍), 而且可对检测目标进行准确定量。其定量的原理是: 荧光定量仪器可收集反应过程中产生的荧光信号, 而荧光信号强度可反映扩增程度。Q-PCR 根据其荧光信号产生原理的不同又可细分为 TaqMan 探针法和 SYBR Green I 染料法。TaqMan 探针法除了一对扩增引物外还需要一条被荧光基团和淬灭基团修饰的寡核苷酸探针, 扩增过程本质上是不断水解寡核苷酸探针而释放荧光信号, 该过程不可逆。SYBR Green I 染料法原理是利用 SYBR Green I 染料只有与 DNA 小沟结合后才能释放强烈的荧光信号。早在 2010 年 Pollock 等<sup>[14]</sup>以溶珊瑚弧菌的

*dnaJ* 基因为靶序列设计引物和探针, 建立了珊瑚病原溶珊瑚弧菌的检测方法, 该方法对海水样品中溶珊瑚弧菌的检测灵敏度可达 1 CFU/mL, 对被溶珊瑚弧菌侵染珊瑚样品的检测灵敏度可达  $10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>。锌-金属蛋白酶被认为是溶珊瑚弧菌的毒力因子, Wilson 等<sup>[12]</sup>以其编码的 *vcpA* 基因为靶序列设计合适引物, 建立了该病原菌的 Q-PCR 检测方法。Chimetto Tonon 等<sup>[69]</sup>基于弧菌的 16S rRNA 基因和溶珊瑚弧菌的 *pyrH* 基因建立了一套 Q-PCR 检测方法, 该方法可检测珊瑚组织及其环境中弧菌总数和溶珊瑚弧菌数量。

2.3 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增(LAMP)技术是由日本学者 Notomi 等发明的, 是在 PCR 的基础上建立起来的一种新型核酸扩增技术, 其原理是利用具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶通过 4–6 条引物在 60–65 °C 下对靶序列进行快速扩增, LAMP 技术最大的优点是等温、快速、可视化。自 LAMP 技术发明以来, 就被广泛应用于各种人畜致病菌、寄生虫病和流感病毒的快速检测。杨艺滢等<sup>[13]</sup>首次将 LAMP 技术用于珊瑚病原施罗氏弧菌(*V. shilonii*)的检测, 其操作方法简单、方便、无需昂贵仪器, 适用于野外现场珊瑚致病菌施罗氏弧菌的快速检测。

3 问题与展望

当前, 珊瑚病原的分离面临着固有技术难题和物种保护问题。技术难题包括: (1) 珊瑚共生体(holobiont)包含水螅体、虫黄藻以及微生物群落,

这种复杂的组成结构增加了珊瑚病原分离纯化的难度；(2) 珊瑚病原往往是一种条件致病菌，对环境和宿主具有高度的选择性，实验室的条件可能无法满足致病性研究的要求。物种保护问题：大部分珊瑚种类已经被列入国家或世界保护动物名录，导致珊瑚样本采集变得极为困难，这也阻碍了珊瑚疾病研究的开展。要解决目前珊瑚疾病研究面临的困境，必须善于利用各种新兴技术，增强对珊瑚疾病的研究能力。例如：利用具有高分辨率的 16S rRNA 基因芯片技术比较健康珊瑚和患病珊瑚微生物群落的差异，从而分析出可能的致病因子<sup>[71]</sup>；使用宏基因组技术评估环境压力下细菌群落结构和功能基因丰度的变化<sup>[72]</sup>；还可以利用转录组技术去研究毒力基因如何控制珊瑚疾病的进程。这些新兴技术的运用可以帮助研究人员更好地确定珊瑚疾病相关病原以及相关毒力基因。

同时，特定珊瑚病原的检测面临的问题包括：(1) 珊瑚共生体组成的复杂性会导致研究人员无法从中稳定、重复地获取高纯度的目标 DNA，再加上珊瑚样本中可能存在高浓度的 PCR 抑制剂(如盐和 DNA 酶等)，这些都将严重影响珊瑚病原的检测<sup>[68]</sup>；(2) 细菌菌株中靶基因拷贝数的变异以及水平转移也会影响珊瑚病原的检测和定量<sup>[68]</sup>。在珊瑚微生物 DNA 提取上，建议采用 Weber 等<sup>[73]</sup>优化的珊瑚微生物 DNA 提取方法，该方法对不同珊瑚中微生物的 DNA 均有较高的提取效率，并且可以有效降低 PCR 抑制剂。在珊瑚病原靶基因的选择上，建议使用其特有毒力基因和具有菌种/株特异性的单拷贝基因，以减少假阳性检测结果的产生。相较于其他检测技术而言，Q-PCR 技术因其较高的特异性、灵敏度和可准确定量的优点有着更好的应用前景，而且针对不同的珊瑚病原可建立多重 Q-PCR 检测技术，可同时检测多种珊瑚病原并且监测它们的丰度变化。

珊瑚病原的确定可以帮助研究人员制定相应的防治措施，保护珊瑚礁生态系统，一些生物防

治手段被初步使用去应对珊瑚疾病：如 Jacquemot 等<sup>[72]</sup>通过噬菌体疗法可减轻由溶珊瑚弧菌引起的珊瑚疾病，Rypien 等<sup>[74]</sup>使用特定珊瑚病原的拮抗菌去防治该疾病。珊瑚病原检测方法可应用于珊瑚疾病的诊断、珊瑚病原的监测以及无特定病原的珊瑚健康移植，如 Chimetto Tonon 等<sup>[69]</sup>建立的溶珊瑚弧菌检测方法对珊瑚及其生境中的病原菌具有良好的效果，Li 等<sup>[11]</sup>建立的珊瑚病原 XSBZ03 检测方法有效提高了珊瑚移植成功率。相信随着研究人员对珊瑚疾病的关注以及各种新技术的应用，更多的珊瑚病原将被确定，同时这些病原相应的检测方法将被建立，这将为珊瑚疾病防控以及珊瑚礁保护措施的制定奠定基础。

## REFERENCES

- [1] Obura D, Geiger E, Day JC, et al. Impacts of climate change on World Heritage coral reefs: A first global scientific assessment[R]. Paris, France: UNESCO World Heritage Centre, 2017
- [2] Spalding M, Ravilious C, Green EP. World Atlas of Coral Reefs[M]. Berkeley: University of California Press, 2001
- [3] Ormond RFG, Gage JD, Angel MV. Marine Biodiversity: Patterns and Processes[M]. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1997
- [4] Hoegh-Guldberg O. Reviving the ocean economy: the case for action-2015[R]. Gland, Switzerland: WWF International, 2015
- [5] Costanza R, de Groot R, Sutton P, et al. Changes in the global value of ecosystem services[J]. Global Environmental Change, 2014, 26: 152-158
- [6] Rosenberg E, Kellogg CA, Rohwer F. Coral microbiology[J]. Oceanography, 2007, 20(2): 146-154
- [7] Tout J, Siboni N, Messer LF, et al. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 432
- [8] Roder C, Arif C, Bayer T, et al. Bacterial profiling of White Plague Disease in a comparative coral species framework[J]. The ISME Journal, 2014, 8(1): 31-39
- [9] Zhu ZX, Zhou YC, Ke SW, et al. The survey and preliminary research on main diseases of stony coral in Xisha Archipelago[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2012, 34(6): 195-204 (in Chinese)  
朱志雄, 周永灿, 柯韶文, 等. 西沙群岛造礁石珊瑚主要疾病调查与初步研究[J]. 海洋学报, 2012, 34(6): 195-204
- [10] Polson SW, Higgins JL, Woodley CM. PCR-based assay for

- detection of four coral pathogens[A]//Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium[C]. Florida: Fort Lauderdale, 2008: 247-251
- [11] Li HY, Zhang X, Long H, et al. *Vibrio alginolyticus* 16S-23S intergenic spacer region analysis, and PCR assay for identification of coral pathogenic strain XSBZ03[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2018, 129(1): 71-83
- [12] Wilson B, Muirhead A, Bazanella M, et al. An improved detection and quantification method for the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81800
- [13] Yang YY, Chen C, Luo P, et al. Detection of *Vibrio shilonii* by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Microbiology China, 2018, 45(9): 1871-1880 (in Chinese)
- 杨艺滢, 陈偿, 罗鹏, 等. 环介导等温扩增技术快速检测施罗氏弧菌(*Vibrio shilonii*)[J]. 微生物学通报, 2018, 45(9): 1871-1880
- [14] Pollock FJ, Morris PJ, Willis BL, et al. Detection and quantification of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* by real-time PCR with TaqMan fluorescent probes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(15): 5282-5286
- [15] Squires DF. Neoplasia in a coral?[J]. Science, 1965, 148(3669): 503-505
- [16] Kushmaro A, Loya Y, Fine M, et al. Bacterial infection and coral bleaching[J]. Nature, 1996, 380(6573): 396
- [17] Kushmaro A, Rosenberg E, Fine M, et al. Bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio* AK-1[J]. Marine Ecology Progress Series, 1997, 147: 159-165
- [18] Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 309-315
- [19] Ben-Haim Y, Zicherman-Keren M, Rosenberg E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 4236-4242
- [20] Cervino JM, Thompson FL, Gomez-Gil B, et al. The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(5): 1658-1671
- [21] Sweet MJ, Bythell JC, Nugues MM. Algae as reservoirs for coral pathogens[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69717
- [22] Ushijima B, Smith A, Aeby GS, et al. *Vibrio owensii* induces the tissue loss disease *Montipora* white syndrome in the Hawaiian reef coral *Montipora capitata*[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46717
- [23] Aeby GS, Ross M, Williams GJ, et al. Disease dynamics of *Montipora* white syndrome within Kaneohe Bay, Oahu, Hawaii: distribution, seasonality, virulence, and transmissibility[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2010, 91(1): 1-8
- [24] Pollock FJ, Krediet CJ, Garren M, et al. Visualization of coral host-pathogen interactions using a stable GFP-labeled *Vibrio coralliilyticus* strain[J]. Coral Reefs, 2015, 34(2): 655-662
- [25] Ushijima B, Videau P, Poscablo D, et al. Mutation of the *toxR* or *mshA* genes from *Vibrio coralliilyticus* strain OCN014 reduces infection of the coral *Acropora cytherea*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(11): 4055-4067
- [26] Xie ZY, Ke SW, Hu CQ, et al. First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* white syndrome in the South China Sea[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75425
- [27] Gignoux-Wolfsohn SA, Marks CJ, Vollmer SV. White Band Disease transmission in the threatened coral, *Acropora cervicornis*[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 804
- [28] Gil-Agudelo DL, Smith GW, Weil E. The white band disease type II pathogen in Puerto Rico[J]. Revista De Biología Tropical, 2006, 54: 59-67
- [29] Munn CB. The role of vibrios in diseases of corals[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0006-2014
- [30] Arotsker L, Siboni N, Ben-Dov E, et al. *Vibrio* sp. as a potentially important member of the Black Band Disease (BBD) consortium in *Favia* sp. corals[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2009, 70(3): 515-524
- [31] Cooney RP, Pantos O, Le Tissier MDA, et al. Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(7): 401-413
- [32] Frias-Lopez J, Klaus JS, Bonheyo GT, et al. Bacterial community associated with black band disease in corals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(10): 5955-5962
- [33] Denner EBM, Smith GW, Busse HJ, et al. *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(4): 1115-1122
- [34] Patterson KL, Porter JW, Ritchie KB, et al. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(13): 8725-8730
- [35] Sutherland KP, Shaban S, Joyner JL, et al. Human pathogen shown to cause disease in the threatened elkhorn coral *Acropora palmata*[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23468
- [36] Nagelkerken I, Buchan K, Smith GW, et al. Widespread disease in Caribbean sea fans: I. Spreading and general characteristics[A]//Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium[C]. Panama: Smithsonian Tropical Research Institute, 1997: 679-682
- [37] Nagelkerken I, Buchan K, Smith GW, et al. Widespread disease in Caribbean sea fans: II. Patterns of infection and

- tissue loss[J]. Marine Ecology Progress Series, 1997, 160: 255-263
- [38] Kim K, Harvell CD. The rise and fall of a six-year coral-fungal epizootic[J]. The American Naturalist, 2004, 164(S5): S52-S63
- [39] Soler-Hurtado MM, Sandoval-Sierra JV, Machordom A, et al. *Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in Gorgonian Octocorals of the Ecuadorian Pacific[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165992
- [40] Kim K, Rypien K. Aspergillosis of Caribbean Sea fan corals, *Gorgonia* spp.[A]//Woodley CM, Downs CA, Bruckner AW, et al. Diseases of Coral[M]. Hoboken, NJ: Wiley, 2015: 236-241
- [41] Zhang Y, Sun J, Mu HW, et al. Molecular pathology of skeletal growth anomalies in the brain coral *Platygyra carnosa*: a meta-transcriptomic analysis[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 124(2): 660-667
- [42] Rosenberg E, Falkovitz L. The *Vibrio shiloi*/*Oculina patagonica* model system of coral bleaching[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 143-159
- [43] Israely T, Banin E, Rosenberg E. Growth, differentiation and death of *Vibrio shiloi* in coral tissue as a function of seawater temperature[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2001, 24(1): 1-8
- [44] Rosenberg E, Kushmaro A, Kramarsky-Winter E, et al. The role of microorganisms in coral bleaching[J]. The ISME Journal, 2009, 3(2): 139-146
- [45] Reshef L, Koren O, Loya Y, et al. The coral probiotic hypothesis[J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(12): 2068-2073
- [46] Mills E, Shechtman K, Loya Y, et al. Bacteria appear to play important roles in both causing and preventing the bleaching of the coral *Oculina patagonica*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2013, 489: 155-162
- [47] Ben-Haim Y, Rosenberg E. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*[J]. Marine Biology, 2002, 141(1): 47-55
- [48] Tout J, Siboni N, Messer LF, et al. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 432
- [49] Sussman M, Willis BL, Victor S, et al. Coral pathogens identified for white syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific[J]. PLoS One, 2008, 3(6): e2393
- [50] Ushijima B, Videau P, Burger AH, et al. *Vibrio coralliilyticus* strain OCN008 is an etiological agent of acute *Montipora* white syndrome[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2102-2109
- [51] Garren M, Son K, Raina JB, et al. A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals[J]. The ISME Journal, 2014, 8(5): 999-1007
- [52] Garren M, Son K, Tout J, et al. Temperature-induced behavioral switches in a bacterial coral pathogen[J]. The ISME Journal, 2016, 10(6): 1363-1372
- [53] Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, et al. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18(1): 93-96
- [54] Gomez-Gil B, Roque A, Velasco-Blanco G. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*[J]. Aquaculture, 2002, 211(1/4): 43-48
- [55] George MR, John KR, Iyappan T, et al. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* isolated from shrimp farms by PCR fingerprinting[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40(5): 369-372
- [56] Cervino JM, Hayes RL, Polson SW, et al. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(11): 6855-6864
- [57] Beurmann S, Ushijima B, Videau P, et al. *Pseudoalteromonas piratica* strain OCN003 is a coral pathogen that causes a switch from chronic to acute *Montipora* white syndrome in *Montipora capitata*[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188319
- [58] Richardson LL, Goldberg WM, Kuta KG, et al. Florida's mystery coral-killer identified[J]. Nature, 1998, 392(6676): 557-558
- [59] Sato Y, Civiello M, Bell SC, et al. Integrated approach to understanding the onset and pathogenesis of black band disease in corals[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(3): 752-765
- [60] Divya S, Thinesh T, Kiran GS, et al. Emergence of a multi host biofilm forming opportunistic pathogen *Staphylococcus sciuri* D26 in coral *Favites abdita*[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 120: 204-212
- [61] Kirkwood M, Todd JD, Rypien KL, et al. The opportunistic coral pathogen *Aspergillus sydowii* contains *dddP* and makes dimethyl sulfide from dimethylsulfoniopropionate[J]. The ISME Journal, 2010, 4(1): 147-150
- [62] Glynn PW. Coral reef bleaching: facts, hypotheses and implications[J]. Global Change Biology, 1996, 2(6): 495-509
- [63] Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, et al. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene[J]. Science, 2018, 359(6371): 80-83
- [64] Buerger P, van Oppen MJH. Viruses in corals: hidden drivers of coral bleaching and disease?[J]. Microbiology Australia, 2018. DOI: 10.1071/MA18004
- [65] Patten NL, Harrison PL, Mitchell JG. Prevalence of virus-like particles within a staghorn scleractinian coral (*Acropora muricata*) from the Great Barrier Reef[J]. Coral Reefs, 2008, 27(3): 569-580
- [66] Thurber RV, Payet JP, Thurber AR, et al. Virus-host interactions and their roles in coral reef health and disease[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(4): 231-243

- 205-216
- [67] Soffer N, Brandt ME, Correa AM, et al. Potential role of viruses in white plague coral disease[J]. The ISME Journal, 2014, 8(2): 271-283
- [68] Pollock FJ, Morris PJ, Willis BL, et al. The urgent need for robust coral disease diagnostics[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(10): e1002183
- [69] Chimetto Tonon LA, Thompson JR, Moreira APB, et al. Quantitative detection of active vibrios associated with white plague disease in *Mussismilia braziliensis* corals[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2272
- [70] Yang SY, Fu YN, Long H, et al. Duplex PCR assay for detection of coral pathogenic strains XSBZ03 and XSBZ14[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(7): 1266-1274 (in Chinese)
- 杨思悦, 符亚楠, 龙昊, 等. 珊瑚病原菌株 XSBZ03 和 XSBZ14 双重 PCR 检测方法的建立[J]. 微生物学报, 2019; 59(7): 1266-1274
- [71] Sunagawa S, DeSantis TZ, Piceno YM, et al. Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*[J]. The ISME Journal, 2009, 3(5): 512-521
- [72] Jacquemot L, Bettarel Y, Monjol J, et al. Therapeutic potential of a new jumbo phage that infects *Vibrio coralliilyticus*, a widespread coral pathogen[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2501
- [73] Weber L, DeForce E, Apprill A. Optimization of DNA extraction for advancing coral microbiota investigations[J]. Microbiome, 2017, 5(1): 18
- [74] Rypien KL, Ward JR, Azam F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(1): 28-39