



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110506674 A

(43)申请公布日 2019. 11. 29

(21)申请号 201910752895.7

(22)申请日 2019.08.15

(71)申请人 广西大学

地址 530004 广西壮族自治区南宁市大学
东路100号

(72)发明人 黄雯 刘旭 俞小鹏 吴志强
余克服 王永刚

(74)专利代理机构 南宁智卓专利代理事务所
(普通合伙) 45129

代理人 邓世江

(51)Int.Cl.

A01K 61/00(2017.01)

G01N 21/84(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

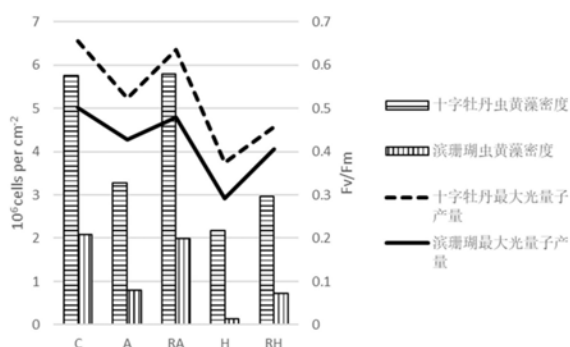
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种评估珊瑚耐热性的方法

(57)摘要

本发明公开了一种评估珊瑚耐热性的方法,属于海洋环境生态修复领域,该方法以造礁石珊瑚表型特征,共生虫黄藻密度,光合速率,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、和天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase3)等为指标,评估珊瑚耐热性,本发明具有多参数、精度高、可量化比较等优点,可用于指导珊瑚移植修复,为珊瑚礁生态系统保护提供基础。该方法操作简单、快捷、易于上手,能够快速地评估珊瑚的耐热性,通过分析造礁石珊瑚表型特征,可以比较不同种珊瑚的耐热性,用于珊瑚养殖和珊瑚移植修复时的选种;也可比较同种珊瑚驯化前后的耐热性,用于评价驯化效果,还可以比较不同种珊瑚驯化的效果,用于科研或珊瑚移植修复时的选种。



1. 一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:

步骤1:选择生长状态良好的健康珊瑚作为样本,珊瑚缸设置为强光的寡营养条件,定期检测水质,待水质均达到适合珊瑚生长条件,即可进行下一步骤;

步骤2:将珊瑚样品放入珊瑚缸,采用梯度升温的方式缓慢升温,根据不同种珊瑚选取亚致死或致死温度为胁迫温度,胁迫时间设置为2-3d;

步骤3:测定珊瑚样品的最大光量子产量并记录;

步骤4:用0.22微孔滤膜过滤海水冲洗部分珊瑚组织,取冲洗液离心后,取离心液上清保存在-80℃超低温冰箱,用于超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶活性测定;

步骤5:继续冲洗珊瑚组织,用300目的网筛过滤冲洗液,将滤液离心,反复镜检离心至虫黄藻干净后4%甲醛固定用于后期计数,珊瑚骨骼置于鼓风干燥箱干燥,用于后期虫黄藻计数;

步骤6:测定超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶的活性,虫黄藻的计数,根据超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶的活性、虫黄藻的计数和最大光量子产量评估珊瑚的耐热性。

2. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤1中,强光的寡营养条件为:T:26℃、KH:7.0±0.3、pH:8.2±0.1、Ca²⁺:400±15ppm、Mg²⁺:1400±20ppm、PO₄³⁻<0.03ppm、NH₄⁺<0.15ppm、NO₂⁻<0.1ppm、NO₃⁻≈0ppm,设置12/12h光照,采用250W金属卤素灯+4T5H0。

3. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤2中,胁迫温度为34℃,梯度升温的方式为12h升高1℃,升高至目标温度后驯化3天。

4. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤4中,冲洗液不超过10ml,选取冲洗液于4℃,1500g离心15min。

5. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤5中,滤液取50ml 4000g 4℃低温离心10min。

6. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤6中测定超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶的活性的具体过程为:超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性采用南京建成总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒,和过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒,分别采用使用羟胺法和可见光法进行测定,蛋白质浓度采用生工生物BCA蛋白质定量检测试剂盒进行测定,天冬氨酸蛋白水解酶活性测定采用凯基生物Caspase-3分光光度法检测试剂盒。

7. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤6中虫黄藻的计数的具体过程为:用血球计数板在显微镜下计数共生藻密度(个/ml),珊瑚表面共生藻密度用以下公式计算: $D = (C/90\% * V) / (M/G)$,式中:V:冲洗液体积,C:共生藻浓度,90%:固定液中原液比例,M:包裹在珊瑚样品外的该铝箔重量,G:铝箔单位面积重量,铝铂纸的密度一定,铝铂纸的面积与重量成正比,通过测量包裹在珊瑚表面铝铂纸的重量而间接估算珊瑚的表面积。

8. 根据权利要求1所述的一种评估珊瑚耐热性的方法,其特征在于:所述步骤6中,分析造礁石珊瑚表型特征,共生虫黄藻密度,光合速率,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、和天冬氨酸

酸蛋白水解酶的活性,根据上述分析所测数据的波动幅度准确判断珊瑚的耐热性,评估同种珊瑚驯化前后的耐热性,同时评估不同种珊瑚驯化的效果。

一种评估珊瑚耐热性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及海洋环境生态修复领域,尤其涉及一种评估珊瑚耐热性的方法。

背景技术

[0002] 珊瑚礁是全球物种多样性最高、资源最丰富的生态系统,被誉为“海洋中的热带雨林”。它是全球生态系统的重要组成部分,可向人类提供食物、海岸防护和药物等资源。然而,近50年来,在人类活动和全球变暖的影响下,全球珊瑚礁受到不同程度的威胁,且处于快速退化中。如南海三亚鹿回头岸礁覆盖率从1960年的80%~90%下降为2009年的12%;大堡礁珊瑚礁覆盖率从1985年的28.0%下降为2012年的13.8%。最近大自然保护协会(TNC)指出如果全球气温较工业化之前的气温上升1.5℃,70-90%的珊瑚礁会遭到严重破坏,如果升高2℃,则99%的珊瑚礁会死亡。

[0003] 随着化石燃料的大量使用和森林的大面积破坏,大气中二氧化碳和其他温室气体含量的增多,导致全球气候变暖。珊瑚对温度非常敏感,海水升温对珊瑚虫来说是非常危险的。海水升温会使珊瑚虫释放掉其体内的虫黄藻。虫黄藻是珊瑚的共生藻,其光合产物的80%以上提供给珊瑚,同时还给珊瑚带来了丰富的色彩,因此虫黄藻被释放后珊瑚就会出现不同程度的“白化”。

[0004] 虽然珊瑚礁的生态修复一直没有特别行之有效的方法,但是在过去的十几年里,珊瑚移植还是在珊瑚礁的恢复中发挥了很大的作用,成为修复珊瑚礁的主要手段。珊瑚移植的主要研究工作就是把珊瑚整体或是部分移植到退化区域,改善退化区的生物多样性。

[0005] 尽管珊瑚移植已经被看作是恢复珊瑚礁生态的主要方法,但是这种方法需要大量的可移植珊瑚,并且珊瑚片断如果只是简单的固定,存活率很不确定。而且不同种珊瑚在移植后的存活率不同。因此有必要对现有的技术进行改进,发明一种检验珊瑚耐热性的方法,来解决珊瑚移植时的选种问题。从而提高珊瑚移植的存活率,避免珊瑚资源的浪费。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种评估珊瑚耐热性的方法,解决现有珊瑚人工养殖驯化后的珊瑚礁修复时选种的技术问题。

[0007] 一种评估珊瑚耐热性的方法,所述方法包括如下步骤:

[0008] 步骤1:选择生长状态良好的健康珊瑚作为样本,珊瑚缸设置为强光的寡营养条件,定期检测水质,待水质均达到适合珊瑚生长条件,即可进行下一步骤;

[0009] 步骤2:将珊瑚样品放入珊瑚缸,采用梯度升温的方式缓慢升温,根据不同种珊瑚选取亚致死或致死温度为胁迫温度,胁迫时间设置为2-3d;

[0010] 步骤3:测定珊瑚样品的最大光量子产量并记录;

[0011] 步骤4:用0.22微孔滤膜过滤海水冲洗部分珊瑚组织,取冲洗液离心后,取离心液上清保存在-80℃超低温冰箱,用于超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶活性测定;

[0012] 步骤5:继续冲洗珊瑚组织,用300目的网筛过滤冲洗液,将滤液离心,反复镜检离心至虫黄藻干净后4%甲醛固定用于后期计数,珊瑚骨骼置于鼓风干燥箱干燥,用于后期虫黄藻计数;

[0013] 步骤6:测定超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶的活性,虫黄藻的计数,根据超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶的活性、虫黄藻的计数和最大光量子产量评估珊瑚的耐热性。

[0014] 进一步地,所述步骤1中,强光的寡营养条件为:T:26℃、KH:7.0±0.3、pH:8.2±0.1、Ca²⁺:400±15ppm、Mg²⁺:1400±20ppm、PO₄³⁻<0.03ppm、NH₄⁺<0.15ppm、NO₂⁻<0.1ppm、NO₃⁻≈0ppm,设置12/12h光照,采用250W金属卤素灯+4T5H0。

[0015] 进一步地,所述步骤2中,胁迫温度为34℃,梯度升温的方式为12h升高1℃,升高至目标温度后驯化3天。

[0016] 进一步地,所述步骤4中,冲洗液不超过10ml,选取冲洗液于4℃,1500g离心15min。

[0017] 进一步地,所述步骤5中,滤液取50ml 4000g 4℃低温离心10min。

[0018] 进一步地,所述步骤6中测定超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和天冬氨酸蛋白水解酶的活性的具体过程为:超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性采用南京建成总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒,和过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒,分别采用使用羟胺法和可见光法进行测定,蛋白质浓度采用生工生物BCA蛋白质定量检测试剂盒进行测定,天冬氨酸蛋白水解酶活性测定采用凯基生物Caspase-3分光光度法检测试剂盒。

[0019] 进一步地,所述步骤6中虫黄藻的计数的具体过程为:用血球计数板在显微镜下计数共生藻密度(个/ml),珊瑚表面共生藻密度用以下公式计算: $D = (C/90\% * V) / (M/G)$,式中:V:冲洗液体积,C:共生藻浓度,90%:固定液中原液比例,M:包裹在珊瑚样品外的该铝箔重量,G:铝箔单位面积重量,铝铂纸的密度一定,铝铂纸的面积与重量成正比,通过测量包裹在珊瑚表面铝铂纸的重量而间接估算珊瑚的表面积。

[0020] 进一步地,所述步骤6中,分析造礁石珊瑚表型特征,共生虫黄藻密度,光合速率,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、和天冬氨酸蛋白水解酶的活性,根据上述分析所测数据的波动幅度准确判断珊瑚的耐热性,评估同种珊瑚驯化前后的耐热性,同时评估不同种珊瑚驯化的效果。

[0021] 本发明采用了上述技术方案,本发明具有以下技术效果:

[0022] (1) 本发明方法操作简单、快捷、易于上手,能够快速地评估珊瑚的耐热性,通过分析造礁石珊瑚表型特征,可以比较不同种珊瑚的耐热性,用于珊瑚养殖和珊瑚移植修复时的选种;也可比较同种珊瑚驯化前后的耐热性,用于评价驯化效果,还可以比较不同种珊瑚驯化的效果,用于科研或珊瑚移植修复时的选种。

[0023] (2) 本发明具有多参数、精度高、可量化比较等优点,可用于指导珊瑚移植修复,为珊瑚礁生态系统保护提供基础。

附图说明

[0024] 图1是本发明的不同处理组珊瑚共生虫黄藻密度和最大光量子产量图。

[0025] 图2是本发明的不同处理组珊瑚表型特征图。

[0026] 图3是本发明的不同处理组珊瑚CAT活性图。

[0027] 图4是本发明的不同处理组珊瑚Caspase3活性图。

[0028] 图5是本发明的不同处理组珊瑚SOD活性图。

[0029] 图中C为空白组;A为驯化组;RA为驯化后恢复组;H为胁迫组;RH为驯化后恢复胁迫组。

具体实施方式

[0030] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下参照附图并举出优选实施例,对本发明进一步详细说明。然而,需要说明的是,说明书中列出的许多细节仅仅是为了使读者对本发明的一个或多个方面有一个透彻的理解,即便没有这些特定的细节也可以实现本发明的这些方面。

[0031] 实施例1

[0032] 以澄黄滨珊瑚(*Porites lutea*)和十字牡丹珊瑚(*Pavona decussata*)为例,包括以下三个步骤:

[0033] (1)选取理想生长状态下珊瑚,设置对照组养殖缸水质条件(T:26℃、KH:7.0±0.3、pH:8.2±0.1、Ca²⁺:400±15ppm、Mg²⁺:1400±20ppm、PO₄³⁻<0.03ppm、NH₄⁺<0.15ppm、NO₂⁻<0.1ppm、NO₃⁻≈0ppm、光照采用250W Metal halogen lamp+4T5HO, ODYSSEA),将采集的珊瑚个体至于养殖缸中适应20天,每周喂食两次刚孵化的丰年虾(*Artemia salina*);

[0034] (2)将珊瑚样品放入珊瑚缸,适应恢复10-14d。

[0035] (3)设置胁迫温度为34℃,热胁迫采用梯度升温,12h升高1℃,升高至目标温度后驯化3天;

[0036] (4)采用Diving-PAM underwater fluorometer(潜水PAM水下荧光计)(WALZ, Germany)测定最大光量子产量(Chlorophyll fluorescence)并记录;

[0037] (5)用0.22微孔滤膜过滤海水冲洗部分珊瑚组织,取冲洗液于4℃,1500g离心15min后,取离心液上清保存在-80℃超低温冰箱,用于SOD, CAT和Caspase3活性测定。SOD和CAT活性采用南京建成总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(羟胺法)和过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法)进行测定,蛋白质浓度采用生工生物BCA蛋白质定量检测试剂盒进行测定,Caspase3活性测定采用凯基生物Caspase-3分光光度法检测试剂盒。将滤液取50ml 4000g 4℃低温离心10min,反复镜检离心至虫黄藻干净后4%甲醛固定用于后期计数。

[0038]

温度	虫黄藻密度	最大光量子产量	CAT	SOD	Caspase3
26℃	2.090666667	0.515	0.644098293	0.093473785	0.053466667
34℃	0.136533333	0.2915	1.886873875	0.664119767	0.131216667

[0039] 表1为澄黄滨珊瑚不同温度时的测定数据表

[0040]

温度	虫黄藻密度	最大光量子产量	CAT	SOD	Caspase3
26℃	5.750303333	0.656	0.242501171	0.065711843	0.051576667
34℃	2.182866667	0.374722222	0.333433655	0.118689918	0.057333333

[0041] 表2为十字牡丹珊瑚不同温度时的测定数据表

[0042] 表1结果表明:在34℃胁迫后,澄黄滨珊瑚的共生虫黄藻密度和最大光量子产量分

别下降了93.4%和43.4%，在经过34℃温度胁迫之后澄黄滨珊瑚的SOD,CAT和Caspase3活性分别升高了710%,292%和245%。

[0043] 表2结果表明,在经过34℃温度胁迫之后十字牡丹珊瑚的共生虫黄藻密度和最大光量子产量低分别下降了62%和42.8%，在经过34℃温度胁迫之后十字牡丹珊瑚的SOD,CAT和Caspase3活性分别升高180%,137%和111%。

[0044] 通过表1和表2的比较,明显在受到相同温度胁迫时澄黄滨珊瑚比十字牡丹珊瑚适应性差,从而推论出澄黄滨珊瑚比十字牡丹珊瑚的耐热性差。

[0045] 实施例2

[0046] 以澄黄滨珊瑚(*Porites lutea*)和十字牡丹珊瑚(*Pavona decussata*)为例,包括以下三个步骤:

[0047] (1) 选取理想生长状态下珊瑚,设置对照组养殖缸水质条件(T:26℃、KH:7.0±0.3、pH:8.2±0.1、Ca²⁺:400±15ppm、Mg²⁺:1400±20ppm、PO₄³⁻<0.03ppm、NH₃⁺<0.15ppm、NO₂⁻<0.1ppm、NO₃⁻≈0ppm、光照采用250W Metal halogen lamp+4T5H0,0DYSSEA),将采集的珊瑚个体至于养殖缸中适应20天,每周喂食两次刚孵化的丰年虾(*Artemia salina*);

[0048] (2) 设置驯化缸温度32℃进行驯化,热胁迫采用梯度升温,12h升高1℃,升高至目标温度后驯化3天;

[0049] (3) 转移至26℃养殖缸,水质指标同对照组养殖缸,恢复14天后进行二次胁迫;

[0050] (4) 设置二次胁迫温度为34℃,热胁迫采用梯度升温,12h升高1℃,升高至目标温度后驯化3天;

[0051] (3) 对整个实验过程珊瑚样本进行拍照记录,用于后期分析不同条件珊瑚表型特征;

[0052] (4) 采用Diving-PAM underwater fluorometer (WALZ,Germany)测定最大光量子产量(Chlorophyll fluorescence);

[0053] (5) 用0.22微孔滤膜过滤海水冲洗部分珊瑚组织,取冲洗液于4℃,1500g离心15min后,取离心液上清保存在-80℃超低温冰箱,用于SOD,CAT和Caspase3活性测定。SOD和CAT活性采用南京建成总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(羟胺法)和过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法)进行测定,蛋白质浓度采用生工生物BCA蛋白质定量检测试剂盒进行测定,Caspase3活性测定采用凯基生物Caspase-3分光光度法检测试剂盒。将滤液取50ml 4000g 4℃低温离心10min,反复镜检离心至虫黄藻干净后4%甲醛固定用于后期计数。

[0054] 图2结果表明:在二次胁迫后,两种珊瑚都呈现出,未驯化珊瑚出现明显白化特征,与驯化珊瑚存在显著差异,表明热驯化对提高珊瑚热耐受性具有明显效果。

[0055] 图1结果表明:在二次胁迫后,两种珊瑚都呈现出,未驯化珊瑚不同健康状况的珊瑚共生虫黄藻密度和最大光量子产量,并且变化趋势与表型差异一致,表明热驯化对提高珊瑚热耐受性具有明显效果,并且一致性较好。澄黄滨珊瑚驯化后胁迫组比空白组的共生虫黄藻密度和最大光量子产量分别下降了65.4%和21.1%,而十字牡丹珊瑚驯化后胁迫组比空白组的共生虫黄藻密度和最大光量子产量分别下降了48.4%和30.2%。

[0056] 图3-5结果表明,SOD,CAT和Caspase3是生物体内关键酶类,它们协调工作,防止细胞内活性氧水平过高,统称保护酶系统。在二次胁迫后,两种珊瑚都呈现出,驯化组珊瑚的SOD,CAT和Caspase3活性显著低于未驯化组。澄黄滨珊瑚驯化后胁迫组比空白组的SOD,CAT

和Caspase3活性分别升高了342.2%,167.5%和148.7%,十字牡丹珊瑚驯化后胁迫组比空白组的SOD,CAT和Caspase3活性分别升高了41.5%,111.3%和106.2%。

[0057] 综上,驯化导致两种珊瑚热耐受性增加,而且十字牡丹的驯化效果优于澄黄滨珊瑚的驯化效果。

[0058] 以上结果表明通过检测分析造礁石珊瑚表型特征,共生虫黄藻密度,光合速率,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、和天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase3)等关键酶,来评估珊瑚耐热性的方法科学可靠,不仅可以应用于珊瑚礁保护,而且可以指导珊瑚人工移植母体的培育,对珊瑚礁资源调查和珊瑚人工移植成活率有重大意义。

[0059] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以作出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

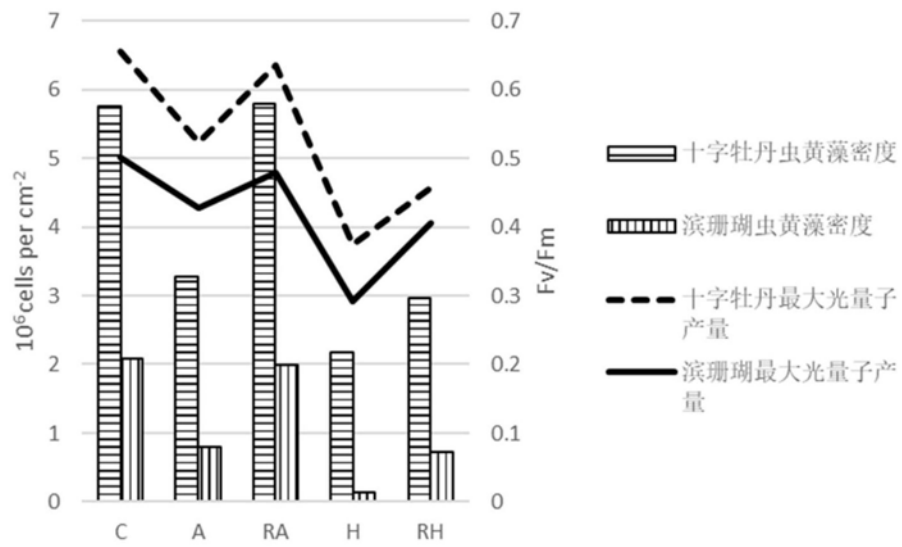


图1

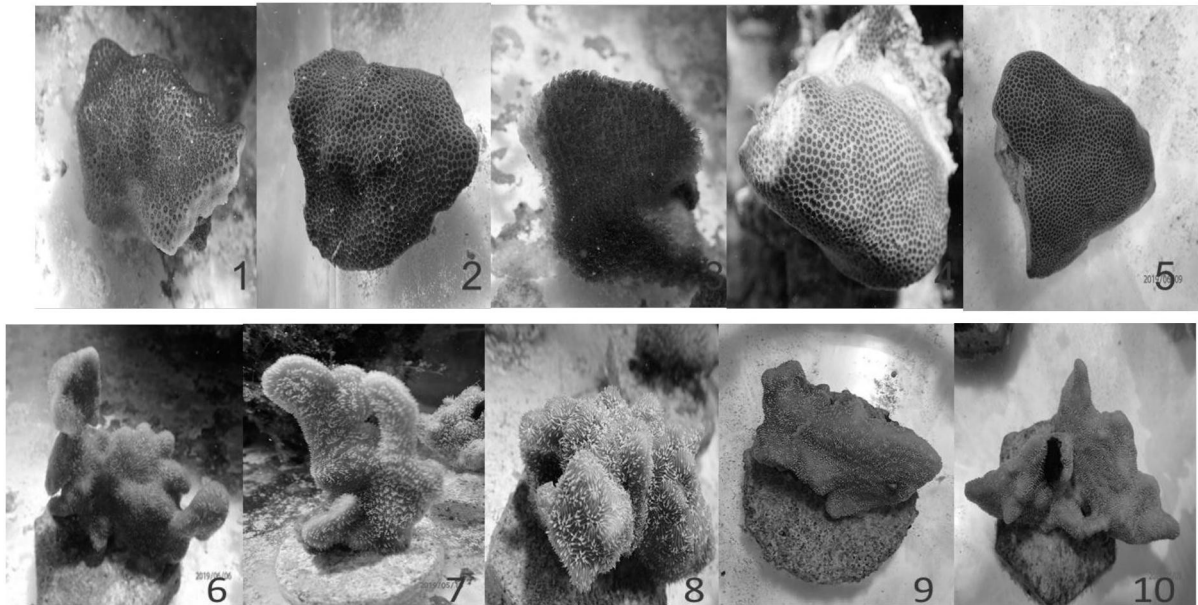


图2

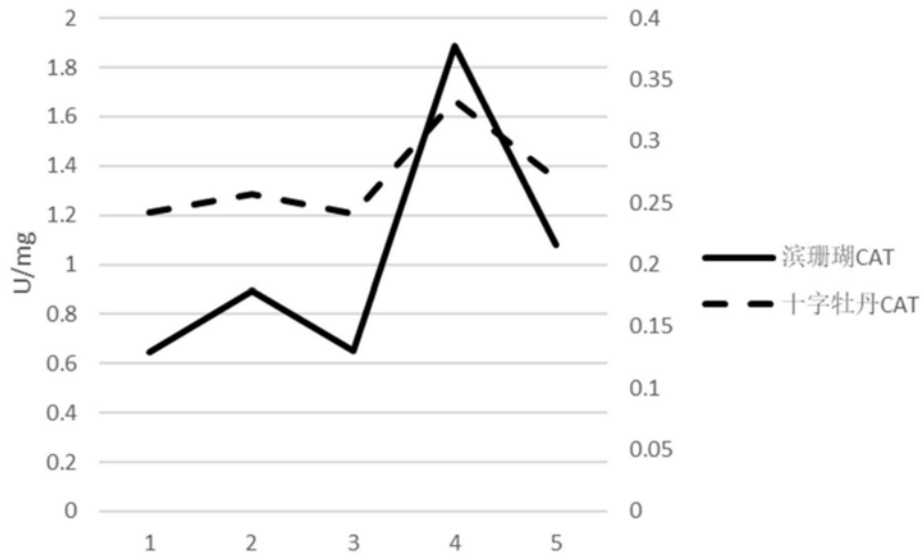


图3

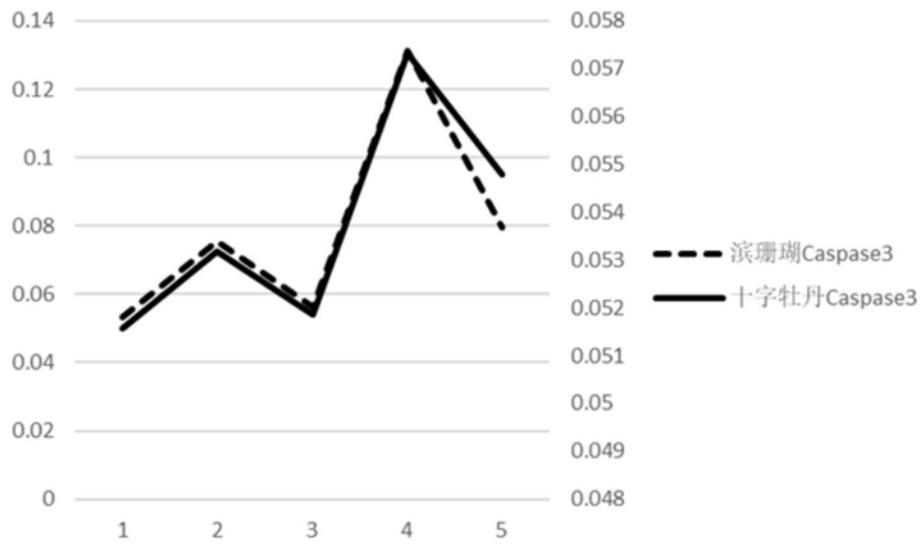


图4

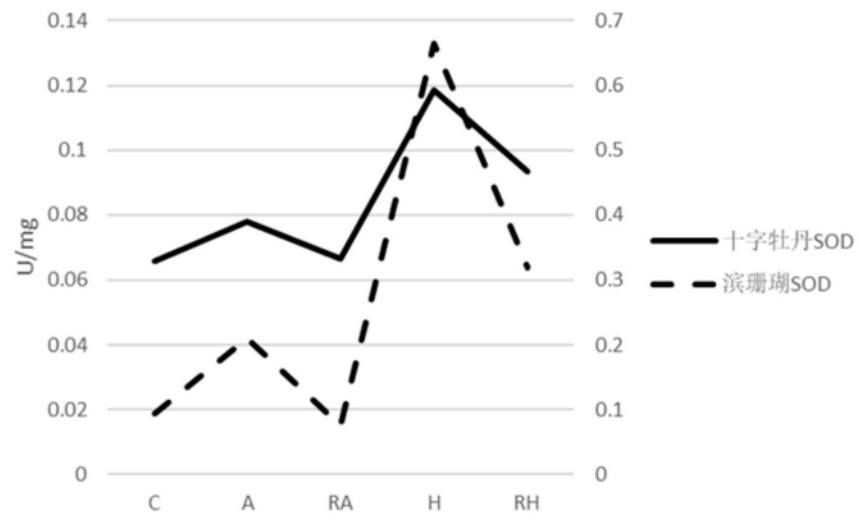


图5

专利名称(译)	一种评估珊瑚耐热性的方法		
公开(公告)号	CN110506674A	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201910752895.7	申请日	2019-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学		
申请(专利权)人(译)	广西大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学		
[标]发明人	黄雯 刘旭 俞小鹏 吴志强 余克服 王永刚		
发明人	黄雯 刘旭 俞小鹏 吴志强 余克服 王永刚		
IPC分类号	A01K61/00 G01N21/84 G01N33/535		
CPC分类号	A01K61/00 G01N21/84 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种评估珊瑚耐热性的方法，属于海洋生态环境修复领域，该方法以造礁石珊瑚表型特征，共生虫黄藻密度，光合速率，超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、和天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase3)等为指标，评估珊瑚耐热性，本发明具有多参数、精度高、可量化比较等优点，可用于指导珊瑚移植修复，为珊瑚礁生态系统保护提供基础。该方法操作简单、快捷、易于上手，能够快速评估珊瑚的耐热性，通过分析造礁石珊瑚表型特征，可以比较不同种珊瑚的耐热性，用于珊瑚养殖和珊瑚移植修复时的选种；也可比较同种珊瑚驯化前后的耐热性，用于评价驯化效果，还可以比较不同种珊瑚驯化的效果，用于科研或珊瑚移植修复时的选种。

