

文章编号:1000-0615(2009)02-0215-05

我国近海浒苔漂浮种类 ITS 与 18S rDNA 序列相似性分析

应成琦¹, 张 婷¹, 李信书¹, 田千桃¹, 霍元子¹,
马家海¹, 徐 韧², 王金辉², 何培民¹

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 国家海洋局东海环境监测中心, 上海 200137)

摘要:2008年6-7月在青岛近海海域再次发生大量浒苔漂浮现象,并且江苏连云港、如东近海海域也发生了浒苔漂浮现象。实验分别对青岛、连云港、如东海域采集样本进行了 nrDNA 的 ITS 全长序列和 18S rDNA 序列分析及相似性比对。结果表明,青岛、连云港、如东海域主要漂浮种类 QD-01(青岛)、QD-02(青岛)、QD-03(青岛)、LY-01(连云港)、RD-02(如东)5个样品的 ITS 全长序列相似性为 100%,表明青岛、连云港、如东三地沿海浒苔漂浮主要种类为同一种浒苔。18S rDNA 序列分析结果也支持这个判断。根据相似性比对和 BLAST 分析结果,如东海域浒苔漂浮种类还发现少量另外 2 种绿藻(RD-01 和 RD-03),其中 RD-01 为浒苔属。浒苔主要漂浮种类与目前采集到的三地定生浒苔样本 ITS 全长序列比对存在一定差异,歧化度小于 0.3%。

关键词:浒苔漂浮种类;ITS;18S rDNA;序列;相似性

中图分类号:S 917

文献标识码:A

绿潮 (green tide) 主要由浒苔 (*Enteromorpha*)、石莼 (*Ulva*)、硬毛藻 (*Chaetomorpha*) 和刚毛藻 (*Cladophora*) 等底栖绿藻过度漂生长导致沿海岸形成一片绿带的现象^[1]。目前绿潮已成为世界性海洋富营养化棘手问题,欧洲、美洲、亚洲等许多国家均出现过绿潮^[2]。在法国 Brittany 海区每年绿藻大规模爆发,当地政府每年 3-4 月中打捞绿藻可达 85 000 m³^[3]。日本从 20 世纪 70 年代起每年均有不同程度绿潮爆发,仅横滨市,每年花费在收集聚集海滩上的绿潮费用就达 4 000 万日元^[1]。2007 年 7 月,我国青岛近海海域曾发生过浒苔漂浮现象,并动用人力和船只共打捞出 7 000 多吨浒苔。2008 年 6-7 月青岛近海海域再次发生大量浒苔漂浮现象,浒苔漂浮涉及海域面积达 2.9 万多平方公里,据初步估计浒苔漂浮生物量达 100 多万吨。此外在江苏如东和连云港近海海域也相继发现了

浒苔漂浮现象。迄今为止,对于我国海域爆发的浒苔漂浮现象相关的研究报道仍然十分有限;漂浮浒苔的生物地理分布、种类组成以及不同海域的漂浮浒苔是否有联系等一系列问题仍有待解决。为此,本实验分别从青岛、如东和连云港近海海域采集了浒苔漂浮样品进行分析,旨在研究青岛海域浒苔漂浮种类与江苏如东和连云港近海海域漂浮种类是否存在一定的联系,并为将来进一步预防和治理浒苔漂浮现象奠定基础。在青岛海域采集的浒苔漂浮种类样品与江苏如东和连云港近海海域采集的漂浮种类样品在形态上存在较大差异,但由于浒苔属绿藻藻体形态和细胞结构极其相似,种内又可能表现出较大的差异性,仅仅靠观察形态很难区分和判断,而位于细胞核 rDNA 上的 Internal Transcribed Spacer(ITS)序列进化较快,可以反映种与种内水平的变化,此外,18S rDNA 序列也是分子系统学研究中最为广泛

收稿日期:2008-08-03 修回日期:2008-10-14

资助项目:上海市科委浦江人才计划项目(05PJ14086);上海市科委“长三角联合攻关”项目(062358101);上海市水生生物学重点学科资助项目(S30701)

通讯作者:何培民, Tel:021-61900457, E-mail:pmhe@shou.edu.cn

的分子指标之一。为此,本文进一步采用 ITS 全长序列和 18S rDNA 序列分析对浒苔主要漂浮种类相似性进行分子鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于 2008 年夏季在青岛及江苏如东、连云港近海海域采集浒苔样本(表 1),藻体用煮沸过的冷却海水冲洗 3~4 次,去除泥沙、附着物和杂藻,根据藻体形态将藻体分类,并挑选健康的单棵藻体用 VSE 培养液进行单棵充气培养,藻体培养条件:光照强度为 35~45 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,温度 15 $^{\circ}\text{C}$,光照周期为 12L:12D,充气培养,每隔 4~5 d 更新藻体培养液。具体方法参考文献[4]中的方法。

1.2 基因组总 DNA 的提取与 ITS 及 18S 序列的获得

基因组总 DNA 的提取方法采用 CTAB 方法,具体步骤参考文献[5]中的方法。

扩增 ITS1, 5.8S, ITS2 全长序列以及 18S rDNA 部分序列的 PCR 引物设计和反应条件参照文献[6-7]中的方法。将 PCR 产物送华大基

因生物公司测序。

1.3 序列相似性分析与 ITS 歧化度分析

在 NCBI 网站使用在线程序 bl2seq (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>) 对三地漂浮的浒苔样品的 ITS 全长序列以及 18S rDNA 序列分别进行两两之间的 BLAST 分析。

将得到的漂浮浒苔样品与定生浒苔样品的 ITS 全长序列采用 ClustalX (ver 1.83) 进行序列比对与对齐剪切^[8],采用 Mega 4.0 软件包中 Kimura 2-parameter 模型计算序列歧化度^[9]。

2 结果与分析

青岛、连云港、如东近海海域浒苔漂浮种类样品 18S rDNA 序列相似性分析结果表明,青岛、连云港、如东近海海域浒苔主要漂浮种类 QD-01(青岛)、QD-02(青岛)、QD-03(青岛)、LY-01(连云港)、RD-01(如东)、RD-02(如东)等 6 个样品的 18S rDNA 序列相似性达到 100%,而 RD-03(如东)18S rDNA 序列与上述样品的相似性只有 59.94%,表明 RD-03 为不同属藻类(表 2)。

表 1 浒苔样本采样信息

Tab.1 Detailed information for *Enteromorpha* samples

样品编号	采集地	生态类型	种群类型	采集时间
QD-01	青岛 Qingdao	漂浮 free-floating	优势种 dominat species	2008-07-04
QD-02	青岛 Qingdao	漂浮 free-floating	优势种 dominat species	2008-07-04
QD-03	青岛 Qingdao	漂浮 free-floating	优势种 dominat species	2008-07-04
QD-04	青岛 Qingdao	定生 attached		2008-07-23
LY-01	连云港 Lianyungang	漂浮 free-floating	优势种 dominat species	2008-07-01
LY-02	连云港 Lianyungang	定生 attached		2008-07-21
RD-01	如东 Rudong	漂浮 free-floating		2008-06-26
RD-02	如东 Rudong	漂浮 free-floating	优势种 dominat species	2008-06-26
RD-03	如东 Rudong	漂浮 free-floating		2008-06-26
RD-04	如东 Rudong	定生 attached		2007-03-20

青岛、连云港、如东近海海域浒苔漂浮种类样品 ITS 全长序列相似性分析结果见表 3。其结果

表明,青岛、连云港、如东近海海域浒苔主要漂浮种类样品 QD-01(青岛)、QD-02(青岛)、QD-03

(青岛)、LY-01(连云港)、RD-02(如东)等 5 个样品的 ITS 序列相似性达到 100%,其中,QD-02(青岛)、LY-01(连云港)和 RD-02(如东)样品分别为漂浮浒苔的主要种类(优势种群),由此判断青岛、连云港、如东近海海域浒苔主要漂浮种类为同一个种。另外,如东漂浮绿藻样品中还存在少量

其它种类 RD-01 和 RD-03,其 ITS 全长序列与如东主要漂浮种类 RD-02 相比存在较大差异,其相似性分别为 99.27% 和 45.41%,表明 RD-01 为同属浒苔,而 RD-03 为不同属藻类。根据 BLAST 比对分析结果,RD-03 与盘苔(*Blidingia dawsonii*)相似性最高。

表 2 浒苔样品 18S rDNA 全长序列的相似性分析

Tab. 2 Analysis of 18S rDNA sequence similarity between samples of the free-floating *Enteromorpha* sp.

	QD-01	QD-02	QD-03	LY-01	RD-01	RD-02	RD-03
QD-01		100%	100%	100%	100%	100%	59.94%
QD-02			100%	100%	100%	100%	59.94%
QD-03				100%	100%	100%	59.94%
LY-01					100%	100%	59.94%
RD-01						100%	59.94%
RD-02							59.94%
RD-03							

表 3 浒苔样品 ITS 全长序列的相似性分析

Tab. 3 Analysis of ITS sequence similarity between samples of the free-floating *Enteromorpha* sp.

	QD-01	QD-02	QD-03	LY-01	RD-01	RD-02	RD-03
QD-01		100%	100%	100%	99.27%	100%	45.06%
QD-02			100%	100%	99.26%	100%	45.22%
QD-03				100%	99.27%	100%	45.06%
LY-01					99.27%	100%	44.84%
RD-01						99.27%	43.15%
RD-02							45.41%
RD-03							

将青岛、连云港、如东近海海域浒苔主要漂浮种类与定生浒苔种类的样品 ITS 全长序列进行序列歧化度分析,研究结果表明:青岛、连云港、如东

近海海域浒苔主要漂浮种类样本序列之间的歧化度为 0,与定生浒苔种类样本之间歧化度为 0.3% (表 4)。

表 4 浒苔样本 ITS 全长序列之间的歧化分析

Tab. 4 Pairwise sequence divergency matrix of full-length ITS of the samples

	QD-01	LY-01	RD-02	QD-04	LY-02	RD-04
QD-01		0.000	0.000	0.000	0.003	0.003
LY-01			0.000	0.000	0.003	0.003
RD-02				0.000	0.003	0.003
QD-04					0.003	0.003
LY-02						0.000
RD-04						

本实验通过 ITS 全长序列和 18S rDNA 序列分析对浒苔主要漂浮种类相似性进行分子鉴定,确定了青岛、连云港、如东近海海域浒苔主要漂浮种类是同一个种,这就为将来进一步研究三地近海海域浒苔主要漂浮种类的生物地理分布以及爆

发的原因等提供了证据。

Tan 等^[10]对浒苔和石莼分子系统学进行过研究;杨君等^[5]对浒苔属和石莼属进行了 RAPD 分析;Hayden 等^[6]对近 30 种浒苔和石莼的 ITS nrDNA 进行了系统发生分析;Shimada 等^[11]也对

多种浒苔和石莼进行了 ITS 序列分析;上海海洋大学王晓坤等^[12]、何培民等^[13]在浒苔生活史、细胞发育与育苗^[14]、浒苔光合作用与生态因子^[15]、浒苔能源^[16-18]等方面进行了研究。但总体来说,关于浒苔生物学与分子生物学研究较少。

浒苔作为一种大型经济海藻,其产品清香独特,具有抗癌及抗溃疡等药用价值。在日本及韩国已大规模栽培生产^[19],我国南方也已开始栽培生产。浒苔藻体生长很快,其日相对生长率可高达 10%~50%^[13],具有快速吸收氮磷改善水质等生态修复功能^[20]。但近年来由于海洋富营养化现象越来越严重,以浒苔和石莼等大型绿藻形成的“绿潮”发生的频率不断增加,这既是大自然对人类活动的一种警示,也是一种海洋自我生态修复作用现象^[20],目前只能依靠打捞方法控制浒苔漂浮现象,浒苔生物质综合利用将是今后主要研究任务。

参考文献:

- [1] Hiraoka M, Ohno M, Kawaguchi S, *et al.* Crossing test among floating *Ulva thalli* forming 'green tide' in Japan [J]. *Hydrobiologia*, 2004, 512: 239 - 245.
- [2] Merceron M, Antoine V, Aubry I, *et al.* In situ growth potential of the subtidal part of green tide forming *Ulva* spp. stocks [J]. *Science of the Total Environment*, 2007, 384: 293 - 305.
- [3] Maze J, Morand P, Potokyl P. Stabilisation of 'Green tides' *Ulva* by a method of composting with a view to pollution limitation [J]. *Journal of Applied Phycology*, 1993, 5: 183 - 190.
- [4] 何培民, 吴庆磊, 吴维宁, 等. 条浒苔蛋白核超微结构和 Rubisco 及其活化酶分子定位[J]. *水产学报*, 2004, 28 (3): 255 - 260.
- [5] 杨君, 安利佳, 王茜, 等. 石莼属(*Ulva*)和浒苔属(*Enteromorpha*)绿藻的 RAPD 分析[J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(4): 408 - 413.
- [6] Hayden H S, Blomster J, Maggs C A, *et al.* Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera [J]. *European Journal of Phycology*, 2003, 38: 277 - 294.
- [7] Medlin L, Elwood H J, Stickel S, *et al.* The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions [J]. *Gene*, 1988, 71(2): 491 - 499.
- [8] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* ClustalW and ClustalX version 2 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947 - 2948.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596 - 1599.
- [10] Tan I H, Blomster J, Hansen G, *et al.* Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha* [J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(8): 1011 - 1018.
- [11] Shimada S, Hiraoka M, Nabata S, *et al.* Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales: Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva* [J]. *Phycol Res*, 2003, 51: 99 - 108.
- [12] 王晓坤, 马家海, 叶道才, 等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生活史的初步研究[J]. *海洋通报*, 2007, 26 (5): 112 - 116.
- [13] 何培民, 秦松, 严小军, 等. 海藻生物技术及其应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2007. 84 - 85.
- [14] 张寒野, 吴望星, 宋丽珍, 等. 条浒苔海区试栽培及外界因子对藻体生长影响[J]. *中国水产科学*, 2006, 13 (5): 781 - 786.
- [15] 王兰刚, 徐姗姗, 何文辉, 等. 海洋大型绿藻条浒苔对微藻三角褐指藻相生相克作用的研究[J]. *海洋渔业*, 2007, 29 (2): 103 - 108.
- [16] 李祯, 王爽, 徐姗姗, 等. 大型海藻浒苔热解特性与动力学研究[J]. *生物技术通报*, 2007, 188 (3): 159 - 164.
- [17] 王爽, 王宁, 于立军, 等. 海藻的热解特性分析[J]. *中国电机工程学报*, 2007, 27 (14): 102 - 106.
- [18] Wang S, Jiang X M, Wang N, *et al.* Research on pyrolysis characteristics of seaweed [J]. *Energy and Fuels*, 2007, 21(6): 3723 - 3729.
- [19] Ohma M. Recent developments in the seaweed cultivation and industry in Japan [M]// Phang S M, Critchley A T, Ang O P, eds. *Advances in seaweed cultivation and utilization in Asia*. Malaya: University of Malaya Maritime Research Center, 2006: 1 - 20.
- [20] 徐姗姗, 何培民. 我国赤潮频发现象分析与海藻栽培生物修复作用[J]. *水产学报*, 2006, 30(4): 554 - 561.

Analysis of the similarity on ITS and 18S rDNA sequence of the main species from free-floating *Enteromorpha* along Chinese coast

YING Cheng-qi¹, ZHANG Ting¹, LI Xin-shu¹, TIAN Qian-tao¹, HUO Yuan-zi¹,
MA Jia-hai¹, XU Ren², WANG Jin-hui², HE Pei-min¹

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. East China Sea Environment Monitoring Center, State Ocean Administration, Shanghai 200137, China)

Abstract: In June and July, 2008, a large number of free-floating *Enteromorpha* were found in Qingdao coast, and it also happened in Lianyungang coast and Rudong coast, Jiangsu Province. The *Enteromorpha* samples were collected from Qingdao, Lianyungang and Rudong coasts, and their ITS and 18S rDNA genes were cloned and sequenced. Based on the sequence data of ITS and 18S rDNA, the molecular phylogenetic analysis was carried out. The result of the ITS sequence analysis showed that the similarity of ITS sequence between 5 samples (QD-01, QD-02, QD-03, LY-01, RD-02) was 100%. It indicated that main free-floating *Enteromorpha* species from Qingdao coast, Lianyungang coast and Rudong coast were the same species. The result was also supported by 18S rDNA sequence analysis. According to sequence similarity and BLAST analysis, there were another 2 species in free-floating *Enteromorpha* in Rudong. RD-01 belonged to *Enteromorpha*. The results of pairwise sequence divergency analysis showed that there was no difference between the main free-floating species from Qingdao, Lianyungang and Rudong coasts, and the values were very low (0.3%) between the free-floating *Enteromorpha* species and attached *Enteromorpha* species from Qingdao, Lianyungang and Rudong coasts.

Key words: free-floating *Enteromorpha*; ITS; 18S rDNA; sequence; similarity