

绿潮爆发后青岛海域石莼属绿藻的多样性分析

梁成伟¹, 张晓雯², 宿烽¹, 叶乃好²

(1. 青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 绿潮爆发后在青岛沿海潮间带采集了12株石莼属绿藻, 形态学结合分子生物学手段对这些绿藻进行多样性鉴定。经过PCR扩增获得了12株藻的核糖体转录间隔区(ITS)序列以及完整的5.8S rDNA序列。经过序列分析发现, 不同藻株的ITS区域在序列长度上存在差异; G+C含量也存在差异, 但是都处于较高的水平, 最高的接近72%。ITS区域多序列比对结果及系统发育分析显示这些藻株存在种的多样性, 而且由分子鉴定得出的多样性与形态上呈现的多样性并不完全一致。本研究结果显示在青岛海域绿潮爆发后石莼藻类仍然存在较好的多样性。

关键词: 石莼属; ITS序列; 多样性

中图分类号: Q949.21¹3; Q16

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2010)05-0540-06

Analysis of diversity of *Ulva* in Qingdao after the largest macroalgal bloom

LIANG Cheng-wei¹, ZHANG Xiao-wen², SU Feng¹, YE Nai-hao²

(1. Chemical Engineering College, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Morphology combined with molecular biology were used to study the diversity of 12 strains of *Ulva* collected from Qingdao intertidal belt after largest macroalgal bloom in 2008. The nuclear-encoded ITS and associated 5.8S rDNA regions were obtained and sequenced. Sequence analysis revealed the ITS regions from different strains showed different patterns in length and G+C content. Furthermore, the frequencies of nucleotides G and C in ITS regions were at high level in all algal strains, and some were close to 72%. The results of alignment and phylogenetic tree showed these strains had diversity at species taxon. However, the polymorphism showed by morphology and molecular sequence was not consistent completely. In conclude, the results in this study revealed the diversity of *Ulva* algae in Qingdao belt after green tide.

Keywords: *Ulva*; ITS sequence; diversity

石莼属(*Ulva*)属于绿藻门(Chlorophyta)、石莼科(Ulvaceae)的一属, 多数种类分布在温带至亚热带海洋中; 生长在高潮带至低潮带和大干潮线附近岩石上或石沼中, 目前发现约有100个种包括在这个属内^[1]。绿潮(Green tide)是世界沿海各国普遍发生的生态异常现象, 在欧洲、亚洲、北美洲和澳大利亚均有记录, 主要发生在河口、内湾、潟湖和城市密集的海岸。造成绿潮的主要生物种类是石莼(*Ulva* sp.)和浒苔(*Enteromorpha* sp.), 以石莼居多^[2]。近两年来在山东地区的海域也频频暴发绿潮。2008

年6月在黄海中南海域爆发的绿潮藻, 经鉴定为浒苔, 并且造成本地绿潮藻并不是本地海域藻类的大量繁殖, 而是由其他地区的海域漂浮而来的^[3]。由于此次绿潮的爆发引起社会各界对漂浮浒苔高度关注, 同时藻类学家在浒苔生理习性、繁殖周期及分子鉴定等方面也开展了一系列研究, 并取得了一定的进展^[4-6]。但是与此相比, 对于石莼的研究主要集中在其生长发育、营养成分及在渔业方面的应用^[7-9], 而对于某一特定海域中石莼的分类多样性研究的较少; 青岛海域石莼绿藻种类多样性也未见报道。

收稿日期: 2009-08-25; 修订日期: 2009-12-26

基金项目: 青岛市公共领域科技支撑计划项目(09-2-5-8-hy); 山东省自然科学基金面上项目(ZR2009EM013, Y2008D03); 国家转基因专项(2009ZX08009-019B); 化学工程山东省强化建设学科(青岛科技大学)开放基金; 青岛市科技计划项目(08-1-3-27-jch)

作者简介: 梁成伟(1979—), 女, 讲师, 主要研究方向: 藻类分子生物学。电子邮箱: liangchengwei@qust.edu.cn

通讯作者: 叶乃好, 电子邮箱: yehn@ysfri.ac.cn

因此, 青岛海域在绿潮爆发以后, 当地相关藻类的多样性如何引起我们的关注。

本研究通过形态学和分子生物生物学方法首次在绿潮爆发后对青岛海域范围内石莼藻类进行了系统发育关系和种质多样性分析, 为青岛本土海域的绿藻资源提供一定的实验数据, 同时, 为今后绿潮藻的来源分析和爆发机制的研究提供一定的帮助。

1 材料与方法

1.1 样本的采集

在 2009 年 4 月对山东青岛(市区、胶南、红岛、即墨)沿岸进行石莼藻的采集并制作标本。

1.2 模板 DNA 的提取

将采集的藻类用无菌水清洗3遍, 用吸水纸吸干, 在液氮冷冻条件下将样品研磨成粉末状, 利用天根植物全基因组提取试剂盒(DP320) 提取全基因组DNA。

1.3 IST 序列的扩增

用 PCR 方法进行从石莼样本中获得的 ITS1-5.8S-ITS2 序列。进行 ITS 扩增的引物序列根据 Leskinen 等^[10] 的结果设计, 分别为 T1(5'-TCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') 和 T2(5'-TTCCTTCCGCTTATTGATATGC-3'), 由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应总体积为 25 μ L, 其中包括: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.0 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L, 10 μ mol/L 引物 T1 和 T2 各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶(Promega) 0.2 μ L, DNA 模版 1 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 6 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物进行琼脂糖电泳, 将目的条带回收纯化之后, 送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.4 数据分析

将获得 ITS 序列用 BLAST 与 NCBI 数据库中序列进行比对。并从 NCBI 数据库中下载选代表性的物种的 ITS 及 5.8S rDNA 序列用于序列分析及系统进化分析, 选用序列的登录号及对应的物种如下: AY422521 (*U. Procera*)、AB097648 (*U. linza*)、FJ002301 (*U. proliferna*)、AB097662 (*U. armoricena*)、AJ234316 (*U. fenestrata*)、AY260560

(*U. californica*)、AB097644 (*U. flexuosa*)、AB298457 (*Ulva* sp.)、FJ194957 (*Ulva* sp.)、AF013981 (*U. Compressa*)。另外, 加入由本实验室获得的青岛地区爆发的绿潮浒苔的 ITS 及 5.8S rDNA 序列和外群序列 AY360570 (*P. percursea*)。用 Clustal X^[11] 软件进行多序列比对及序列相似性分析。我们采用选取不同的方法(距离邻接算法 NJ、最大简约性算法 MP 和最大似然性算法 ML) 分别构建系统发育树, 上述建树过程是在 MEGA 4.0^[12] 和(或) PHYLIP 软件包中实现的。系统发育树的可靠性是通过 Bootstrap 方法重抽样 1 000 次进行的。

2 结果

2.1 不同藻株的形态及分布

从山东海域潮间带采集石莼样本在形态、色泽存在较大的差别, 石莼样本的形态见图 1。从外观可以看出, 所采集的样本在形态上存在多样性。有些样本为膜状体, 呈宽叶片状或裂成许多小叶片, 如 SH107、SH102、SH105; 有些石莼样本呈狭长的丝带状, 如 SH101、SH104、SH108、SH106; 有些石莼样本呈管状, 并且分枝, 藻体基部生出假根丝, 形成固着器, 如 SH103、SH202、SH204; 还有些石莼藻株成簇成长, 如: SH201 和 SH203。

2.2 ITS 序列分析

PCR 产物经测序获得 600 bp 左右的序列片段, 包括部分 18S rDNA 和完整的 ITS1 序列, 5.8S rDNA 序列、ITS 2 序列和部分 28S rDNA 序列。不同的藻株 ITS1 长度不等(表 1), SH105 藻株的 ITS1 序列最短, 只有 152bp, 而 SH104、SH106 和 SH108 三株藻的 ITS 区域较长, 有 196bp。SH202、SH204、SH101、SH102 和 SH107 具有相同长度的 ITS1 区域, 长度为 189 bp。5.8S rRNA 基因大小差别不大, 除了 SH203 以外, 其余藻株的 5.8S rDNA 的长度都是 160 bp。通过比较 ITS2 区域的长度, 发现具有最短 ITS1 区域的 SH105 藻株, 却具有最长的 ITS2 区域, 为 199 bp, 而其他的藻株 ITS2 区域长度范围从 175 bp 到 187 bp。

对 ITS 1, 5.8S rDNA 和 ITS 2 区域的核苷酸组分分析, 发现在 ITS 区域均具有较高的 G+C 含量, 范围大约在 62% 到 70% 之间。而 5.8S rDNA 的 G+C 的含量基本上都接近 50% (表 1)。

2.3 多序列比对

从序列比对的结果来看(图 2),在核糖体 RNA 编码区(包括 18S、5.8S、28S)是比较保守的,但是在 ITS 区域不同物种序列比对时会产生很多间隙(gaps)。并且,在 ITS1 区域内序列差异较大,

由比对产生的间隙也较多。在藻株 SH105 ITS 1 序列中,产生长达 13 个碱基的比对间隙。在 ITS2 中,虽然核苷酸之间的差异也较大,但是产生比对空隙的区域较少。

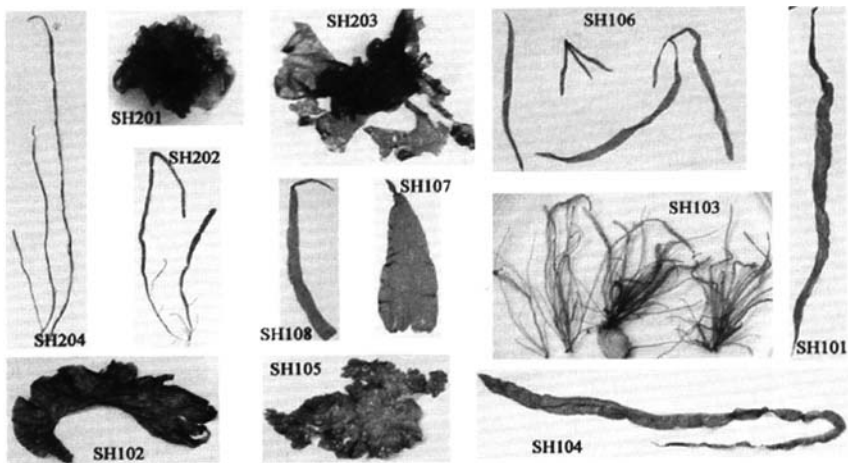


图1：青岛潮间带采集的石莼藻株样品的形态特征
Fig 1. Morphological characteristics of *Ulva* collected from the intertidal belt in Qingdao

表 1 不同藻株 ITS 1, 5.8S rDNA 和 ITS 2 区域的长度(n=核酸的数目)和 GC 含量
Tab. 1 . Length (n=number of nucleotides) and GC% of ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 in different *Ulva* algae

| 藻株 | ITS 1 | | 5.8S rDNA | | ITS 2 | |
|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|
| | n/bp | GC/% | n/bp | GC/% | n/bp | GC/% |
| SH202 | 189 | 69.85 | 160 | 50.00 | 186 | 66.84 |
| SH201 | 183 | 63.39 | 160 | 47.50 | 187 | 65.24 |
| SH203 | 181 | 61.87 | 158 | 46.83 | 179 | 56.43 |
| SH204 | 189 | 69.32 | 160 | 49.38 | 180 | 68.89 |
| SH101 | 189 | 69.32 | 160 | 49.38 | 180 | 68.89 |
| SH102 | 189 | 69.32 | 160 | 49.38 | 180 | 68.89 |
| SH103 | 178 | 70.22 | 160 | 49.38 | 181 | 70.27 |
| SH104 | 196 | 66.83 | 160 | 49.38 | 177 | 67.73 |
| SH105 | 152 | 65.13 | 160 | 49.38 | 199 | 71.86 |
| SH106 | 196 | 67.34 | 160 | 40.00 | 178 | 62.60 |
| SH107 | 189 | 69.85 | 160 | 49.38 | 180 | 68.89 |
| SH108 | 196 | 65.81 | 160 | 46.26 | 175 | 62.28 |

2.4 藻株的分子鉴定与系统发育分析

为构建系统进化树,从 NCBI 数据库中下载了 10 个石莼属的 ITS 和 5.8S rDNA 的全序列,并以狭带藻(*Percursaria percura*) 的 ITS 和 5.8S rDNA 全序列作为外群^[13]。采用 Mega4.0 中的邻接法及

Phylip3.65 软件中的最大简约法构建了 ITS 及 5.8S rDNA 的系统进化树,两棵进化树具有类似的拓扑结构,说明了系统进化树的可靠性。文中给出的是 NJ 法构建的系统树,从该系统进化树可以看出(图 3),采集到的石莼藻株在系统发育树上聚为 5 个

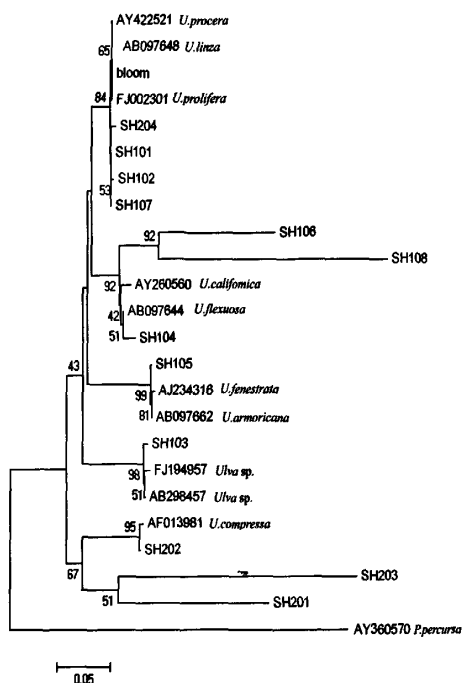


图 3 利用 NJ 法构建的 ITS 序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ITS sequences constructed by Neighbor-Joining Method

3 讨论

真核生物基因组中编码核糖体的基因包括 3 种: 28S rDNA, 18S rDNA 和 5.8 S rDNA。它们在染色体上头尾相连、串联排列, 相互之间由间隔区分隔。间隔区是位于核糖体大小亚基基因之间的核苷酸序列。位于 18S rDNA 的 3' 端与 5.8S rDNA 的 5' 端之间的序列称为核糖体内转录间隔区 1 (internal transcribed spacer 1, ITS1) 位于 5.8S rDNA 的 3' 端与 28S rDNA 的 5' 端之间的序列称为核糖体内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2)。28S rDNA 的 3' 端与 18S rDNA 的 5' 端之间的序列称为核糖体转录间隔区 (internal genic spacer, IGS)。这 3 种核糖体基因及间隔区有不同的进化程度, 有的序列比较保守, 有的序列进化较快, 因此, 可以根据它们的序列, 将藻类鉴定到属、种、亚种、变种的水平。

由于藻类随着分布海域的不同而在形态、色泽以及藻体大小等方面会表现出明显的差异, 仅仅根据形态学判断藻类的分类地位较为困难, 所以现在

通常借助于分子标记在种一级分类地位上进行确定。在本文中, 我们扩增得到了青岛海域石莼 (*Ulva*) 藻 ITS 序列包括 5.8S rDNA 序列, 通过比较 ITS 序列的多态性结合了藻类的形态特征首次研究了在生长在青岛海域的石莼类藻的多样性。通过比较 ITS 序列的长度和 GC 含量发现, 这些不同的藻株在 ITS 区域序列长度差异较大, 其中 ITS 1 序列长度差可达到 44 bp, 通过多序列比对, 也发现 ITS1 区域内存在较多的间隙, 说明 ITS 区域在进化过程中插入或删除事件是很普遍发生的。核苷酸组分分析发现, 所采集的藻类的 ITS 区域的 G+C 含量也存在一定差异 (表 1), 但是都处在较高水平。通常情况下, ITS 1 和 ITS 2 区域虽然中间间隔 5.8S rDNA, 但具有相近的 G+C 含量^[14]。植物中, ITS 区域的 G+C 含量从 50% 左右到水稻中高达 75%^[15,16], 在以前的文献中也报道其他的绿藻 ITS 中的 G+C 含量都低于 60%, 接近 50%^[17]。与 ITS 系列不同, 在我们所测的样品中, 5.8S rDNA 中 G+C 含量与其他的高等植物或绿藻中的含量较接近。在石莼属绿藻中 ITS 区域的高 G+C 含量, 可能是由于进化过程中受到碱基突变压力, 或受到高 G+C 含量的选择或者其他因素的影响。ITS 序列长度及核苷酸组分都显示了这些藻类在分子水平上呈现了多态性。

根据 ITS 序列构建系统发育树结果显示, 采集的藻类在系统发育树上聚在 5 个不同的分支上, 说明它们在种的水平上存在多样性, 甚至存在种内多样性, 例如藻株 SH106 和 SH108, 很可能呈现出来是种内的多样性。从系统发育进化树来看, 在分子水平上呈现的多样性并不完全与形态上呈现的多样性一致, 对两种方法存在的差异进行了比较 (图 4)。例如, 藻株 SH103、SH202、SH204 在形态上比较接近 (图 1), 但是它们分别位于不同的进化支上。SH104、SH108、SH106 在形态上比较接近, 它们在系统发育树上也呈现出较近的亲缘关系。SH101、SH102、SH107、SH204 与青岛地区绿潮爆发藻类具有较近的亲缘关系。从分子鉴定结果可以看出在浒苔绿潮爆发之后, 在青岛海边并没有发现定生的黄海漂浮浒苔, 而且对当地石莼属藻类的多样性影响不大。本研究首次对青岛海域石莼属藻类多样性的进行研究, 今后将会对绿潮藻的鉴定及来源分析提供一定的帮助。

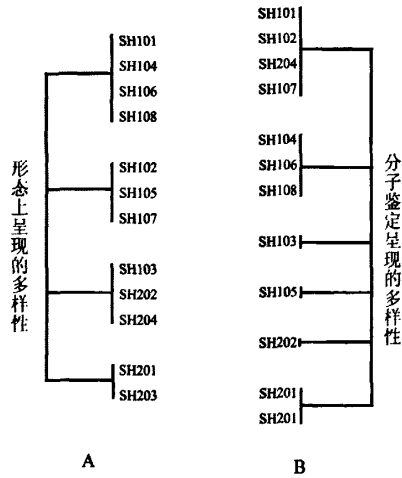


图 4 分子鉴定得出的多样性与形态上呈现的多样性的比较
(A 图中分支代表藻类具有相似的形态；B 图中分支代表在系统发育树中处于同分支)

Fig. 4 Comparison of the morphology diversity and the diversity presented by molecular identification. The branch represents the similar morphology among different strains in figure A; the branch in figure B represents the different strains clade in the phylogenetic tree.

参考文献：

[1] Guiry M D, Guiry G M. AlgaeBase version 4.2. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org/search> on 14 March 2007.

[2] Callow M E, Callow J A, Pickett-Heaps J D, et al. Primary *Enteromorpha* adhesion of Chlorophyta Ulvaes propagules quantitative settlement studies and video microscopy [J]. J Phycol, 1997, 33:938-947.

[3] Liu D Y, Keesing J K, Xing Q G, et al. World's largest macroalgal bloom caused by expansion of seaweed aquaculture in China [J]. Marine Pollution Bulletin, 2009, 58(6): 888-895.

[4] Leliaert F, Zhang X W, Ye N H, et al. Identity of the Qingdao algal bloom [J]. Phycological Research, 2009, 57: 147-151.

[5] Lin A, Shen S D, Wang J W et al. Reproduction Diversity of *Enteromorpha prolifera*. Journal of Integrative Plant Biology

[J].2008, 50 (5): 622-629.

[6] 张晓雯, 毛玉洋, 庄志鹏, 等. 黄海绿潮浒苔的形态学观察及分子鉴定 [J]. 中国水产科学, 2008, 15: 822-829.

[7] Hiraoka M, Dan A, Shimada S, et al. Different life histories of *Enteromorpha prolifera* (Ulvaes, Chlorophyta) from four rivers on Shikoku Island [J]. Phycologia, 2003, 42:275-284.

[8] Dan A, Hirose A, Makino K, et al. Observation on the effect of salinity and photon fluency rate on the induction of sporulation and rhizoid formation in the green alga, *Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Agardh (Chlorophyta, Ulvaes) [J]. Fish Sci, 2002, 68:1182-1188.

[9] 邵官利, 冯亚非, 孔东梅, 等. 南海条浒苔和裂片石莼的油脂提取及其脂肪酸分析 [J]. 食品科技, 2008, 33: 186-189.

[10] Leskinen E, Pamilo P. Evolution of the ITS sequence of *Enteromorpha* ribosomal DNA in Chlorophyceae [J]. Hereditas, 1997, 126: 17-23.

[11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4 876-4 882.

[12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1 596-1 599.

[13] Shimada S, Hiraoka M, Nabata S, et al. Molecular phylogenetic analysis of the Japanese and Ulvaes *Ulvaophyceae* with special reference to the free-floating Ulva [J]. J Phycol Res, 2003, 51: 99-108.

[14] Baldwin B, Sanderson M J, Porter J M , et al. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Ann. Missouri Bot Gard, 1995, 82: 247-277.

[15] Torres R A, Ganai M, Hemleben V. GC balance in the internal transcribed spacers ITS 1 and ITS 2 of nuclear ribosomal RNA genes [J]. J Mol Evol, 1990, 30: 170-181.

[16] Takaiwa R, Oono K, Sugira M. Nucleotide sequence of the 17S -25S spacer region from rice rDNA [J]. Plant Mol. Biol, 19 854: 355-364.

[17] Leskinen E, Pamilo P. Evolution of the ITS sequences of ribosomal DNA in *Enteromorpha* (Chlorophyceae). [J]. Hereditas, 1997, 126: 17-23.