黄海绿潮浒苔的形态学观察及分子鉴定

第15卷第5期

2008年9月

张晓雯,毛玉泽,庄志猛,柳淑芳,王清印,叶乃好 (中国水产科学研究院黄海水产研究所,山东青岛266071)

摘要:2008年6月初,黄海中南部海域出现罕见的大面积的绿潮现象,经初步鉴定,认为造成本次绿潮的种类为浒苔属 (Enteromorpha)藻类,但是其种一级分类地位的确定成为自绿潮爆发以来最有争议的问题之一。本研究采用形态学观 察与分子鉴定相结合的方法,对在黄海海域采集的22个浒苔样品及青岛栈桥海域的漂浮浒苔样品进行了鉴定。结果表 明,不同站位的浒苔样品均具有主枝,且高度分枝,但丝状体的长度及宽度有较大差异;藻体色泽也有较大差异,有深绿 色、鲜绿色和黄绿色之分;藻体细胞大小差异较大;切片观察表明所有样品都具有浒苔典型的管状结构,且细胞位于单 层藻体的中央;ITS及5.8S rDNA序列分析表明23个浒苔样品序列完全一致,由此确定这些浒苔样品均属于同一种浒 苔属浒苔(Enteromorpha prolifera)。[中国水产科学,2008,15(5):822 829]

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<sup>[1]</sup>。绿潮 暴发会带来一系列的次生环境危害,如藻体腐败散 发难闻气味,污染空气;藻类堆积可能为有害昆虫 提供繁殖条件,引起害虫暴发;藻类沉积在海底,会 引起缺氧和底质腐败,改变沉积物的理化性质,导 致水生生物缺氧死亡,对底栖生态系统产生重要影 响等<sup>[2]</sup>。

浒苔属藻类广泛分布在世界范围的海洋中,有 的分布在半咸水或江河中,常生长在潮间带岩石上 或石沼中,或泥沙滩的石砾上,有时也可附生在大 型海藻的藻体上<sup>[3]</sup>。全世界目前已知的浒苔种类 约有 80 余种<sup>[4]</sup>,中国约有 11 种。2008 年 6 月初, 黄海中南部海域出现大面积的绿潮,经初步鉴定认 为,造成本次绿潮的种类为浒苔属 (Enteromorpha) 文章编号:1005 8737-(2008)05 0822 08

藻类。但是由于漂浮浒苔随着分布海域的不同而 在形态、色泽以及藻体大小等方面表现出明显的差 异,根据形态学判断浒苔的分类地位较为困难,在 浒苔种一级分类地位的确定上存在较大争议。针 对这一问题,本研究采集了绿潮暴发海域共23个 不同站位的浒苔样品,从形态学观察及分子鉴定两 个方面对形成本次绿潮的浒苔进行了研究。旨为 确定浒苔的分类地位,为绿潮浒苔的治理提供理论 依据。

## 1 材料与方法

# 1.1 取样站位

2008年7月9日至16日,研究人员跟随"北斗" 号科学考察船对卫星照片显示具有大面积绿潮藻 类出现的黄海海域(33.5-36°N,120.0-122°E)进行 调察,共采集到这一海域中22个站位的浒苔样品, 其中包括20个站位的飘浮浒苔以及2个站位(J13 及J20-1)的拖网样品。青岛的漂浮浒苔样品采自 栈桥潮间带(图1)。

收稿日期: 2008-08-18;修订日期: 2008-08-25.

**基金项目:**国家自然科学基金(40706050,40706048);国家科技支撑计划项目(2006BAD01A13);国家高技术发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z414).

作者简介:张晓雯(1981-),女,助理研究员,主要从事藻类生物学研究.E-mail: Zhangxw@ysfri.ac.cn

通讯作者: 叶乃好, 副研究员 . Tel: 0532-85822957; E-mail: yenh@ysfri.ac.cn





## 1.2 浒苔的形态学观察

第5期

挑选完整藻株,利用 Cannon EOS 350D 相机 拍摄藻体形态,使用镜头为 Cannon EF28-135 mm。 用于切片的浒苔丝状体于 10%福尔马林浸泡 24 h 后,浸入 70%酒精中备用。利用英国山盾公司 ASE-620 恒温冷冻切片机进行切片,切片厚度 7~8 µm。然后用 Ehrlich 氏酸性苏木素染液(苏木素 6 g、96%乙酸 300 mL、丙三醇 300 mL、甲矾 9 g、冰 醋酸 30 mL)25 ℃染色 3 h。最后利用 NIKON 80i, NIKON DXM1200F 显微镜数码成像系统成像。

## 1.3 浒苔的分子鉴定

将浒苔用无菌水清洗 3 遍, 用吸水纸吸干, 利用天根植物全基因组提取试剂盒 (DP320) 提取全基因组 DNA。进行 ITS 扩增的引物 序列根据 Leskinen等<sup>[5]</sup>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 反应总体系为 25 µL, 其中包括: 10×PCR buffer 2.5 µL, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0 µL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 µL, 10 µmol/L 引物 T1 和 T2 各 1 µL, *Taq* DNA 聚合酶 (Promega) 0.2 µL, DNA 模版 1 µL。反应条件为 94 ℃预变性 6 min; 94 ℃变 性 1 min,54 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,循环 30 次;72 ℃继续延伸 10 min,4 ℃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。用于序列分析 及系统进化分析的浒苔及石莼的 ITS 及 5.8S rDNA 序列从 NCBI 数据库中下载。用 ClustalW 软件进行 多序列比对及序列相似性分析。用 Phylip3.65 软件 中的最大简约法 (Maximum likelihood) 和 Mega4.0 软件中的邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统树,重 复 1 000 次计算 Bootstrap 值。

## 2 结果与分析

## 2.1 形态学观察

2.1.1 不同站位浒苔藻株样品的形态学观察 不 同站位的浒苔样品,在形态与色泽上有很大的差 别。在调查海区中分别从南到北,从西到东选取了 有代表性的站位对浒苔的形态和色泽进行了对比 分析。在选取的站位中,站位21位于此次监测的 最南端,向北依次为站位17、13、05、01、29-1和34, 另外站位 19 和 03 分别位于站位 17 和 01 的东部 (图1)。站位21的浒苔颜色最深,呈深绿色,藻体 直立,主枝扁压,宽可达2mm,长可达1.5m,分枝 细小,与主枝差异明显,假根发达,膨胀成发泡状。 在海水中,该形态的浒苔靠其发达的假根漂浮,而 其直立的藻体部分则垂于海水中。站位17的浒苔 形态与站位 21 的浒苔类似,但样品颜色较暗。相 对于站位17,站位19的浒苔样品颜色变浅,主枝 变细,藻体成丝状,略有卷曲。站位13的浒苔样 品呈深绿色,藻体成细丝状,藻体卷曲。站位5的 浒苔有明显的主枝,管状结构明显,且略有卷曲,与 站位21不同,藻体呈翠绿色,分枝呈卷曲的丝状结 构。站位1的浒苔样品较站位5的颜色略有加深, 主枝变细,分枝发达,且蓬松卷曲。站位3的浒苔 与站位1的形态类似,颜色略浅。站位29-1的浒苔 形态与站位21有相似之处,藻体直立,主枝非常明 显,呈扁压状,宽1~2mm,假根发达,但是主枝比站 位 21 的浒苔细且短,颜色呈翠绿色。站位 34 是离 青岛海域最近的一个站位,该站位的浒苔样品与在 青岛栈桥采集的浒苔样品形态非常接近,颜色略发 黄,在所有浒苔样品中颜色最淡,藻体蓬松,主枝成 管状且高度卷曲;分枝发达,高度丝状化且高度卷 曲(图2)。



图 2 不同站位采集的浒苔藻株样品的形态特征 Fig.2 Morphologyical characteristics of *Enteromorpha* colleted in different localities

2.1.2 不同站位单株藻丝的形态观察 不同取样 海域漂浮的浒苔藻体均有主枝而且高度分枝,分枝 的直径小于主枝(图 3-a),有的形成多级分枝(图 3-b)(对这一特征的描述参照文献[6])。在显微 镜下,可以明显的看到新长出的细小分枝结构(图 3-c)。藻体细胞大小差异较大,与藻体的粗细及生 长状态有关。藻体表面细胞呈正方形、长方形或多 边形,细胞排成纵列,其顶部和分枝处细胞呈有圆 角的不规则形状(图 3-d)。



a. 一条完整的浒苔丝状体,长有细小的分枝; b. 浒苔分枝片段,长有多级分枝; c. 发育出细小侧枝的浒苔片段; d. 浒苔不规则形状的细胞. Fig. 3 Morphologic characteristic of *Enteromorpha* thallus a. A complete thallus of *Enteromorpha* with slender brances; b. one segment with multi branches; c. one segment with incipient tiny branches; d. surface view showing irregular cells.

2.1.3 藻丝的切片观察 从浒苔单层细胞纵切及 横切的切面图上可以看出其明显的管状结构。从 纵切图上可以看出,管状的藻体由单层细胞组成, 且细胞在单层藻体的中央。细胞大小不均一,形状 不规则(图4)。



图 4 浒苔丝状体的纵切和横切面观

a、c. 浒苔丝状体纵切,1和1′为1条丝状体的两壁,2和2′ 为另一条丝状体的两壁;b、d. 浒苔丝状体横切.

Fig. 4 Longitudinal and transverse section view of *Enteromorpha* thallus

a, c: Longitudinal section view, 1 and 1' show two sides of one thallus, and 2 and 2' show two sides of another thallus; b, d: transverse section view.

根据上述观察结果,虽然采自不同站位的浒苔样 品在藻丝体长度、主枝宽度、色泽、细胞大小、分枝 情况等外观形态方面具有较大差异,但均具有管状 结构,且管状结构由单层细胞组成,细胞位于单层 藻体的中央,具有浒苔属藻类的典型特征,因此在 形态学上初步确定为浒苔属。

# 2.2 分子鉴定

2.2.1 序列比对 取自23个不同站位浒苔样品的 ITS 序列及 5.8S rDNA 序列的 PCR 片段总长 度为 540 bp,其中 ITS1 长度为 189 bp,5.8S rDNA

全序列长度为 160 bp, ITS2 长度为 181 bp。从序列比对的结果看这 23 个样品的 ITS 序列及 5.8S rDNA 序列完全相同,可以确定是属于一个种,无种内差异(图 5)。将该序列与 NCBI 数据库中下载的石莼属及浒苔属的 ITS 及 5.8S rDNA 的序列进行比对,发现该序列与来自日本的一种浒苔属浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的 ITS 及 5.8S rDNA 序列(NCBI 登录号 AB298314.1)的相似性最高,仅在第5个碱基处缺失 1 个碱基 A。

	1151
	10 20 30 40 50 60 70 80 90
****	
102	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCT C DECCOTOC C CCCT C DEGEGECGAGGCCCCCCTTTACAGATCC CCCGCGCGGGAGCTCC
303	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCT GCGGGGGCTCCCCCT CGGGGGGCGAGGGCCCGCCGTTACAGGATCCCCCCGCGGGGGGGG
J04	GATCAACCAATCAACAGAGCACCTGCGGGGGGGGGGGGG
305	GATCAACCAATCACAGAGCACCTGCGGGGGGGCGCGGGGGGGG
306	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCTECEGECGCT CECTCCCCTCEGEGEGCGAEGGCCCGCCGTTTACAGGATCCECCGGCGCGGTGAECTCC
308	GATCALCCALT CACAGAGCACTE C GEGEGGCTOSCTOCCTO CEGEGGEGALGCO COCOTTACAGATO COCOTTACAGATO C
310	
J13	BAT CAACCAAT CACABABCACCTBCBBBBBCTCBCTCBCCTCCBBBBBBBCSCBBCBCCBCCBTTACABBATCCBCCBCCBCBBCBCCBCB
JIJT	GATCAACCAATCACAGAGCACCTGCGGCGCGCGCGCGGGGGGGG
J17	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCTGCGGGGGGGGGGGGG
319	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCT GCGGGGCGCT CGCCT CGGGGGGGCGAGGGCCCGCCGCTTTACAGGATCCGCCGGCGGGGGGGG
320	GAT CAACCAAT CACAGAGCACTTC CEGEGGCT CGC TCCCTT CEGEGGGCGGAGGGC GCCGTTACAGAGTC CC CGGCCGTGAGTCC
120-170	GATCAACCAATCACAGGACCTCCGCCCCCCCCCCCCCCC
J21	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCTCCCGGGGGGCTCGCCCCCCCGGGGGGGCGGGGGCCGCC
321-1	GATCAACCAATCACASAGCACCTEC599C9CTC3CTCCCCTC595996C5A599CCC39C3PTTACA96ATCC5CC99C3C3PSA6CTCC
J29	GATCAACCAATCACAGAGCACCTGCGGGGGGGCTCGCTCCGGGGGGGG
J29-1	GAT CAACCAAT CACAGAGCACCTEC B98C9C7C7 00CTCCCCT CB98969C6A699CCC09C09TTACA4GATCCCCC09C9C9C9C9TBA6CTCC
133	
035	dar backar tabaada bar abada bar bar bar bar bar bar bar bar bar ba
90	
J01 J02 J03 J05 J05 J05 J06 J00 J01 J03 J03 J03 J03 J03 J03 J03 J03 J03 J03	
	5.8S rDNA
	490 200 210 220 220 240 250 260 270
301	AACTGAGACAACTCTCAACAACGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATT
382	AACTGAGACAACTCTCTAACAACGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAAGGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAGATTGCAGAATT
383	AACTGAGACAACTCTCCAACAACGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCABAATT
.105	A KONG KANG KONG KANG KONG KANG KANG KANG KANG KANG KANG KANG KA
386	ALCTRAGACAACTCTCTAACAAC96ATATCTT96CTCTC9CAAC6AT9A68AC9C68C6AAAT9C6ATAC9TA9T916AAT19C688AAT
308	AACTGAGACAACTCTCCAACAACGGATATCTTGGCTCCCCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTAATTGCAGAATT
J10	AACTGAGACAACTCTCAACAACGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGGAAG
311	AACT6A6ACAACTCTCAACAAC96ATAFCT766CTCTC6CAAC6AT9AA68A69CA6C66AAAT6C6ATA69T49T6AAT79CA6AAT7
313	AACTEMBACAACTETECAACAACBEATATETTEBEETETEGEACBACBACBACBEABAATBEGATACBTAGTUMAATTGCABAATT
.712	A A CRAME AND THE A CALCUMPTER OF THE OF THE ACCOUNT OF A DATA OF
J19	AAC PRAGACAAC TC TCAACAAC 964 TA TC TT 96C TC TC 9CAAC 84 PRASBAAC 9CA9C 84 A T 9C 84 T 9C 84 T 9C 86 A T T
JZO	AKCTGAGACAACTCTCAACAACGGATATCTTGGCTCCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGGAATTGCAGAATT
J20-1	AACTOAGACAACTOCCAACAACOGATATCTTOGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGGAAATGCGATACOTAGTGTGAAATTGCAGAATT
J20-11	ASCRAGASCASCTCTCTAACAACGESTATCTTGECTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGCAGAATTGCAGAATT
321-1	AND TRANSPORT TO TRANSPORT TO TRANSPORT TO SECTION CAN CAN CAN CAN BE AND AND TRANSPORT TO TRANSPORT TO A CAN THE ADDRESS OF ADDRE
J29	AACTOAGACACTCTCAACAACGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCGCGCG
J29-1	AACTGAGACAACTCTCAACAACGGATATCTTGGCTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGGAATTGCAGAATT
333	AACP3AGACAACTCTCAACAAO36ATATCTT96CTC6CAAC6AT9AA6AAO3CA6C6AAAT9C6AAAT9C6ATAO37A9T9GAATT9CA6AATT
333	AACTNAGACAACTCTCAACAACGGGGGGGGGGGGGGGGGG

中国水产科学

								1152	85	
	280	290	300	310	320	330	340	50	360	
70.1	COOTGAGTCATCCAL	TOTTTGA ACON	ACATTORNO	and here here	praggagagag	ACATO COLOR		AATACCOCT	I	
302	COUTGAUTCATOGAA	TOTTTGAACOO	ACATTGCCG	GIOGACECTEC	SALGEAGACC	ACATCTROCTO	ACCOTCOS	AATACCCCCTC	ACGC	
J03	CONTRACTORAL	TCTTTGAACOC	ACATTOCCO	OTOBACTOTTC	99A96A9ACC	ACATCHOCCTO	ABCOTCOS	AATACCCCC	ACOC	
304	COGTGAGTCATCGAA	POPTIGAACGO	ACATTGCCG	GIOGACTCITC)	SGAGGAGACC	ACATCTRCCTO	AGCGTCGG	AATACCCCCTC	ACGC	
386	COSTGASTCATCGAA	PCPTPGAACGC	ACATTOCOS	0703ACTCTTC	33A36A3ACC	ACATCROCCIO	ACCOTCOS	AATACCCCCTC	ACOC	
J08	COSTGASTCATCGAA	TOTTTGAACGO	ACATTGCCG	GTOGACTOTTO	GAGGAGACO	ACATCESCOTO	ABCETCES	AATAOCCCCTC	ACOC	
J10	COOTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCOGGTCGACTCTTCGGAGGAGACCACATCTGCCTCAGCGTCGGAATACCCCCTCACGC									
311	CONTRADICATO MARTOTTT GAAC BOACATT GOOD OF CHACTOTTC GBAGGAGACCACATOT BOOT CABC BT CBAATACCCCC PCACBC CONTGACT CATO GAATCTTT GAAC BOACATT GOOD OF CGACT CTTC GGAGGAGACCACATCT BOOT CABC BT CBAATACCCCC PCACBC									
J13T	COOTGAGTOATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCGGTOGACTCTTCGGAGGAGACCACATCTGCCTCAGCGTCGGAATACCCCCTCACGC									
317	COSTGASTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCC08TCGACTCTTCGBAGGAGACCACATCTGCCTCASCGTCBBAATACCCCCCTCACGC									
J19	CONTRACTOR TO GALL OF THE ACCOUNT OF CONTRACTOR TO TO BARGA GALAGA ACCART TO CONTRACTOR TO THE CONTRACTOR TO THE CONTRACTOR TO THE CONTRACT OF									
J20-1	COBTGASTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCCGGTCGACTCTTCGGAGGAGACCACATCTGCCTCAGCGTCGGAATACCCCCTCACGC									
J20-11	CONTRANTCATOGAATCTTTGAACSCACATTSCOGOTCGACTCTTCSGAGGAGACCACATCTSCCTCASCSTCSGAATACCCCCTCACSC									
J21	CORTEMETER CANCELECATE CONTRACTOR CONTRA									
329	CONTRACTOR CATCONNECT PTONACOCONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR CATCON CONTRACTOR CONT									
J29-1	COSTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCDGGTDGACTCTTCBGAGGAGACCACATCTGCCTCAGCGTCGGAATACCCCCTCACGC									
333	CONTRACTORICGAA	TCTTTGAACOC	ACATTOCCO	0103ACTCTTC	99A96AGACC	ACATCHOCCTO	ABCOTCOS	AATACCCCCC	ACOC	
00	COSTGASTCATCGAS	TCTTTGAACOC	ACATTOCCO	GTOGACTCTTC	33A36AGAGACC	ACATCHOCCIO	ASCETCES	AATACCCCCTC	ACGC	
~										
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	
J01	ACCCCCGCGTGGACC	1000000000	BACECCTCE	000000000000	BOCTGAAATG	CAGAGOCTOP	ececeeco	CATTONTON	ABOOS	
J02	ACCOCOGOGOGOGACO	7660000000	GACOCCTCO	60600066620	GOLTGANATO	CAGAGGCTCG	ececese	CATTOFTGE	COGA	
303	ACCOCOGOGTEGACO	Tegococcocc	GACOCETCO	GOGOCOGGECO	GGCTGAAATG	CAGAGGCTCG.	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	CATTOFICE	COGA	
304	ACCCCCGCGCGTGGACC	76600000000	GACGCCTCG	GOGDCDGGGCD	GCIGAAAIG	CAGAGGCTCG	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	CATTOPTOPTOPT	COGA	
J06	ACCOCOBOBDOBACC	1000000000	BACECCICE	000000000000	BOCTORANTO	CABABBCECO	ececeeco	CATTOSTOSCO	ABODA	
80%	AccocososseeAcc	1000000000	ACOCCTCO	000000000000	BECTBAAADS	CAGAGGCTCG	receceeco	CATECOTOOCO	ABOOK	
310	ACCOCOGOGTGGACC	Tegeccoccce	GACGCCCCG		SOUTGAAATG	CAGAGGOTCE	ececeeco	CATTOFTGECO	COGA	
513	ACCOCC909796ACCT69CCCCC69AC6CCTC69C9CC0966CC86CT6AAAT9CA6A68CTC676C6C6C64T7C676C6CCC67									
J137	ACCCCCGGGGGGGCCGGGGCCGGGCCGGGCCGGGGCCGGGCCGGGCGGGCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGACCGGGGCCGGACGCCGGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGCCGGGCCGGGCCGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCCGGGCGGGCGGGG									
J17	ACCORRECTED DECORRECTED DECORRECTED DE D									
J20	ACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC									
J20-1	ACCOCOGOGTEGACO	Tesecococce	SACRECTCR	GOGOCOGGGCO	GOTGAAATG	CAGAGGETCO	receccecco	CATTOFTGOOD	COGA	
320-17	ACCCC0000T96ACCT09CCCCCC09AC8CCCTC69C9CCC096CC09CTGAAAT9CA6A69CTC676C6C666CCCATTC6T96CCCC0A									
J21-1	ACCOCCEDENTAGENCICESCECCCESCECCCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCESCECCEC									
J29	ACCCCC0009T96ACCT60CCCCCCC06AC6CCTC60C0096CC096CT6AAAT9CA6A69CTC6T6C6C66CCCATTC6T96CCC08A									
J29-1	ACCCCOBCOTOGACC	10300000000	BACOCCTCO	000000000000	BOLDBANADO	CABAGGCTCO.	ececeece	CATTONTONCO	CCGA	
J33 J39	ACCCCCGCGCGTGGACC	169000000000	GACECOTCE	000000000000000000000000000000000000000	SGCTGAAATG SGCTGAAATG	CAGAGGCTCD	ececeeco	CATTCOTGOCC	COGA	
QD	ACCCCOBCOTOBACC	1000000000	ACOCCTCO	000000000000	BOCTOAAATO	CAGAGOCTCO	ececeeco	CATTCOTOOCO	ACOSA	
								285 rL	INA	
	460	470	480	490	500	SL0	520	\$30	540	
201	CTAGGIAGGIAGCTC	PCTACTTCTAP	GOGGTGGCTV	CETEICECET	SCT0705000	CGAAAGGATAI	CAAPCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
302	CTAGOTAGOTAGCTC	SCTACTTCTAS	acaaraacro	caetercecer		COALAGOATA	CAAPCCAT	TCATTOBACCI	TEAS	
103	CTAGGTAGGTAGCTC	GCTACTTCTAG	GOGGTGGCT	Destatescat	CTGTGGGGCC	DGAAAGGATAC	CAAPCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
304	CTAGGIAGGIAGCIC	SCIACIFICIAS	GOGGTGGCT	Gerercecen	010103000	DGAAAGGATAC	CARTCOAT	TCATTOGACCI	GAGT	
J06	CTAGOTAGOTAGOTC	SCIACTICTAS	acaaraacro	caerercecer		CBAAABBATA	CARTCOAT	TCATTOBACCI	TOAD	
and B	CTAGOTAGOTAGCTC!	SCIACITCIAS	acaaraacty	ceetercecet	90 <b>1010</b> 90000	COALAGGATAC	CARPCCAI	TCATTOBACCI	TEAE	
J10	CTARGIAGGIAGCICI CDAGGIAGGIAGCICI	GCTACTTCTAD	GOGGTGGCTV		0070705000	CGALAGGATA!	CAAPCCAS	TCATTOGACCI	MAAGT	
J13	CTASSIAGGIAGCIC	GCTACTTCTAG	GOGGTGGCT	CGGTGTCGCGT	SCIPIOSGCC	CGALAGGATA	CAATCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
J137	CTA99TA99TA9CTC	OCTACTOCTAO	acaaraacty	ceerercecer	SCTETESBCC	COALAGOATAC	CAATCCAT	TCATTOBACCI	TOAD	
J17	CTAGGIAGGIAGCTC	SCTACTICTAS	GOGGIGGOON	OGeneratoecen	CT01010GGCC	OGAAAGGATAI	CAAPCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
J19 J20	CRAGGIAGGIAGCICI CRAGGIAGGIAGCICI	BCTACTTCTAG	GCGGTGGCTV GCGGTGGCTV	Destercecer	C16166600	CGALLGGATAC	CARPOCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
J20-1	CTAOGTAGOTAGOTC	GCTACT7CTAG	GOGGTGGOT	Gerezcecer	CTGTGGGGCC	CGALAGGATA	CAATCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
J20-17	CTAB97A89TA8CTC8CTACTTCTA89039T98CTC9876TC8C8767676980CC8AAA89A7ACCAATCCATTCATTC8ACCT8A8T									
J21	CTAGGIAGGIAGCTCI	OCTACT TOTAO	GOGGTGGCT	CONCIONCICO	CTGTGGGGGC	DGAAAGGATAR	CAAPCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
J29	CTASSTASSTASCIC	SCTACTTCTAS	SCOOTOSCT!	Caetercecer	CT0103000	CGAAAGGATAC	CAAFCCAT	TCATTORACCI	TEAD	
J29-1	CTAGGIAGGIAGCTC	CTACTICTAD	GOGGTGGCT	Cororector		DGAAAGGATA	CAATCCAT	TCATTOGACCI	GAGT	
233	CTASSIASSIASCIC	SCIACITCIAS	acaaraacry	030707000070	0070103000	COAAAOOAZAO	CARDCOAT	PCATTORACCI	TEAD	
0.00	CTAGGTAGGTAGCTC	BOTACTTCTAD	accoursecto accoursecto	03676706067	30787838600	COALABGATA	CAAPCCAT	DEATTOGACCI	TRAP	
-										

图 5 不同站位浒苔样品的 ITS1、5.8S rDNA、ITS2 全序列的比对结果

Fig. 5 Allignment of the ITS sequences (including ITS1 ITS2 and 5.8S gene) from Enteromorpha collected in different sites

2.2.2 系统进化树 为构建系统进化树,从 NCBI 数据库中下载了 14 个浒苔属及 4 个石莼属的 ITS 和 5.8S rDNA 的全序列,并以狭带藻 (*Percursaria percursa*)的 ITS 和 5.8S rDNA 全序列作为外群<sup>[7]</sup>。 采用 Mega4.0 中的邻接 (NJ) 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,仅有 Ulva pertusa 的分枝不同,说明了系统进化树的可靠性。 文中给出的是 NJ 法构建的 ITS 序列的系统树,从 该系统进化树可以看出,本次绿潮浒苔与浒苔属浒 苔 (Enteromorpha prolifera)聚类在一起(图 6)。



图 6 基于 NJ 法构建的 ITS 序列的系统进化树

YS-floating 表示黄海漂浮浒苔样品.节点处数字表示重复1000次的自举检测值.

YS-floating represents free-floating samples in Yellow Sea. Numbers at nodes represent bootstrap values from 1 000 replications.

# 3 讨论

仅从外观形态分析,各站位的浒苔样品虽然存 在明显差异,但也有一定的规律可循。按取样站位 从南到北,从西到东观察,浒苔的颜色逐渐变浅,藻 体逐渐变细,卷曲程度亦逐渐增加。不同站位的环 境因素可能对浒苔形态有一定的影响。值得注意的 是,在站位5和29-1的浒苔样品又出现明显的主枝, 且主枝直立,与位于最南端的站位21的浒苔样品在 形态上最为接近,但是主枝变细,颜色变浅,长度也 变短,出现这种现象的具体原因目前尚不清楚。

确认浒苔分类地位已成为自绿潮爆发以来最 有争议的问题之一。传统的藻类分类方法主要是 依据外部形态、内部构造和生理特征,但仅用传统 的分类学方法不足以确定浒苔的种类。因为形态 学仅能观察叶状体及丝状体的形状、细胞的形状、 细胞的大小、叶状体的厚度、细胞的排列方式、叶绿 体的位置、蛋白核的数量等<sup>[8+9]</sup>。同一种藻类的某 些形态学特征,尤其是叶状体形状及厚度、细胞的 大小等会因藻体生活环境的不同而会出现较大的 变化<sup>[10-13]</sup>,而不同的藻类也可能会具有相似的细胞 超微结构、生理发育特征等<sup>[4]</sup>。

目前对于藻种的鉴定已经越来越多的借助于 分子生物学的方法。真核生物核糖体编码基因 中 18S rDNA,5.8S rDNA 和 28S rDNA 组成一个 转录单位,彼此被转录单元内间隔区 ITS (Internal transcribed spacer)分开。ITS 区包括 ITS1(18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的间隔区)和 ITS2(28S rDNA 和 5.8S rDNA 之间的间隔区)。ITS 不属于

Fig.6 Phylogenetic tree of ITS sequences constructed by NJ method

编码区域,进化速率比编码区域快,即使是亲缘关系十分接近的物种,在该区域也存在核酸差异,而 且随亲缘关系的疏远差异会迅速扩大。ITS的这种 特点决定了它在分类上的重要作用,尤其是作为一 种种内(Intraspecific)系统分析的分子标记区<sup>[14-15]</sup>。 近年来,ITS序列在绿潮藻类及石莼属藻种鉴定方 面起了重要作用<sup>[4,7,13,16-19]</sup>。本次黄海绿潮,从不同 站位采到的浒苔样品,形态观察差异较大,不论是 藻体的颜色、主枝的形态和厚度、以及丝状体的形 态和细胞的大小等均有明显差异,难以确定是否属 于同一种浒苔。通过分子生物学检测发现所有这 些浒苔样品都具有完全一样的ITS序列,从而确定 造成本次黄海浒苔绿潮的浒苔均同为一个种,聚类 分析表明是浒苔属浒苔(Enteromorpha prolifera)。

#### 参考文献:

- [1] Callow M E, Callow J A, Pickett-Heaps J D, et al. Primary adhesion of *Enteromorpha* (Chlorophyta, Ulvales) propagules: quantitative settlement studies and video microscopy [J]. J Phycol, 1997, 33: 938–947.
- [2] 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.
- [3] 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: 1 011– 1 018.
- [4] Guiry M D, Nic Dhonncha E. AlgaeBase[DB/OL].2002.http: //www.algaebase.com/ default.html. 2002.
- [5] Leskinen E, Pamilo P. Evolution of the ITS sequence of ribosomal DNA in *Enteromorpha* (Chlorophyceae) [J]. Hereditas, 1997, 126: 17-23.
- [6] Tseng C K. Common Seaweeds of China [M]. 北京:科学出版 社,1983.
- [7] Shimada S, Hiraoka M, Nabata S, et al. Molecular phylogenetic analysis of the Japanese Ulva and Enteromorpha (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating Ulva[J]. Phycol Res, 2003, 51: 99–108.

- [8] Bliding C. A critical survey of European taxa in Ulvales. II. Ulva, Ulvaria, Monostroma. Kornmannia[J]. Bot Not, 1968, 121: 535-629.
- [9] Koeman R P T, van den Hoek C. The taxonomy of Ulva (Chlorophyceae) in the Netherlands[J]. Br Phycol J, 1981, 16: 9–53.
- [10] Steffensen D A. Morphological variation in Ulva in the Avon-Heathcote Estuary, Christchurch. N. Z. J[J]. Mar Freshw Res, 1976, 10: 329–341.
- [11] Mshigeni K E, Kajumulo A A. Effects of the environment on polymorphism in *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta, Ulvaceae). Bot Mar, 1979, 22: 145–148.
- Tanner C. Investigations of the taxonomy and morphological variation of *Ulva* (Chlorophyta): *Ulva californica* Wille[J].
  Phycologia, 1986, 25: 510–520.
- [13] Malta E J, Draisma S G A, Kamermans P. Free-floating Ulva in the southwest Netherlands: species or morphotypes? A morphological, molecular and ecological comparison[J]. Eur J Phycol, 1999, 34: 443–454.
- [14] Hershkovitz M A, Lewis L A. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region[J]. Mol Biol Evol, 1996, 13 (9): 1 276– 1 295.
- [15] Coleman A W, Mai J C. Ribosome DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness[J]. J Mol Evol, 1997.45 (2): 168–177.
- [16] Coat G, Dion P, Noailles M C, et al. Ulva armoricana (Ulvales, Chlorophyta) from the coasts of Brittany (France). II. Nuclear rDNA ITS sequences analysis[J]. Eur J Phycol, 1998, 33: 81–86.
- [17] Blomster J. Molecular and morphological approaches to the evolutionary history of the *Enteromorpha-Ulva* species complex[J]. W A De Nottbeck Foundation Sci Report, 2000, 20: 1-24.
- [18] Blomster J, Back S, Fewer D P, et al. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides[J]. Am J Bot, 2002, 89(11): 1 756–1 763.
- [19] Hiraoka M, Shimada S, Uenosono M, et al. A new greentide-forming alga, Ulva ohnoi Hiraoka et Shimada sp. Nov. (Ulvales, Ul.vophyceae) from Japan[J]. Phycol Res, 2003, 51: 17-29.

# Morphological characteristics and molecular phylogenetic analysis of green tide *Enteromorpha* sp. occurred in the Yellow Sea

ZHANG Xiao-wen, MAO Yu-ze, Zhuang Zhi-meng, Liu-Shufang, Wang Qing-yin, YE Nai-hao (Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Green tide is one of the major environmental problems over the world. Ulva and Enteromorpha are two of the best known marine green alga genera, which widely distribute in marine, freshwater and brackish environments throughout the world and are responsible for widespread green tides. Approximately 80 species are now included in Enteromorpha genera, of which only 11 species are currently recognized in China. A largescale green tide occurred in the middle and south area of Yellow Sea in June, 2008. The green tide algae were classified as *Enteromorpha* genera from their morphological characteristics, but their taxonomy at species level was uncertain and became the most controversial issue. In this study, molecular data were used in parallel with morphological characters to resolve the taxonomic problems. Twenty-two samples from Yellow Sea and one freefloating sample from Zhanqiao of Qingdao have been studied. The segment selected for molecular phylogenetic analysis were internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and 5.8S rDNA gene. The results show that all samples have typical morphological characters of *Enteromorpha*, such as distinct thalli and branches. And the section view showed that all samples form hollow tubes of one cell thick, and the cells particularly locate in the middle of the tube. But they are different in thallus length and width, cell size and colour which are from dark green to light green, and to yellow-green. Molecular phylogenetic analysis was used to test whether they belong to the same species. All the 23 ITS and 5.8S rDNA sequences are identical and they clustered in the same clade with Enteromorpha prolifera in the phylogenetic tree based on the sequences of ITS and 5.8S rDNA, indicating that they belong to the same species of *Enteromorpha prolifera*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 822-829]

Key words: *Enteromorpha prolifera*; morphological characters; molecular phylogenetic analysis Corresponding author: YE Nai-hao. E-mail: <u>yenh@ysfri.ac.cn</u>