

黄海绿潮浒苔的形态学观察及分子鉴定

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]

关键词: 浒苔;形态学观察;分子鉴定

中图分类号: S917.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0822-08

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^[1]。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^[2]。

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^[3]。全世界目前已知的浒苔种类约有80余种^[4],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*)

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。旨在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个站位的漂浮浒苔以及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

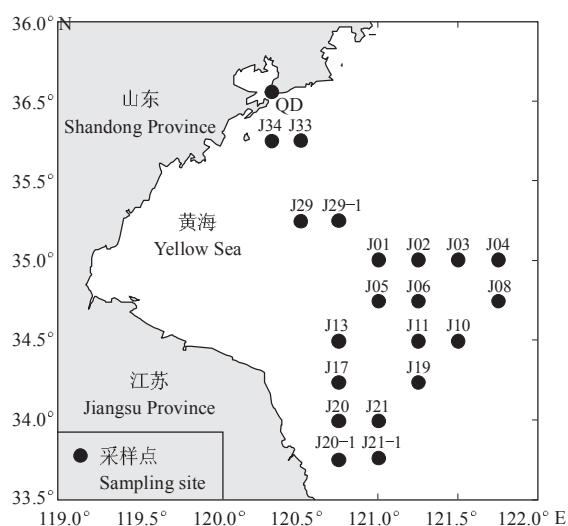


图1 采样站位示意图

QD 为青岛栈桥采样点, J01-J34 为“北斗”号科学考察船的采样点。

Fig. 1 Sketch map showing the green-tide sample collecting locations

QD for Zhanqiao sampling site of Qingdao, and J01-J34 for the sampling sites of “Beidou” vessel.

1.2 浒苔的形态学观察

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、甲酚 9 g、冰醋酸 30 mL) 25 $^{\circ}\text{C}$ 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^[5]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 μL , 其中包括: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL , 2.0 mmol/L MgCl_2 2.0 μL , 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 6 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变

性 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 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。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 2 mm, 长可达 1.5 m, 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 1~2 mm, 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)。

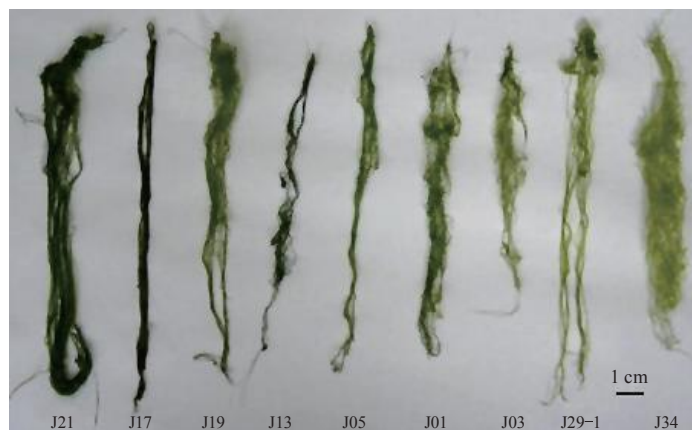


图2 不同站位采集的浒苔藻株样品的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of *Enteromorpha* collected 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)。

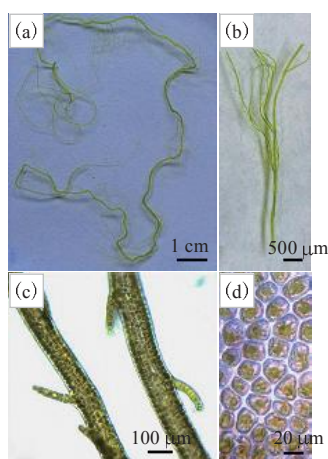


图3 浒苔单株丝状体的观察

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 branches; 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)。

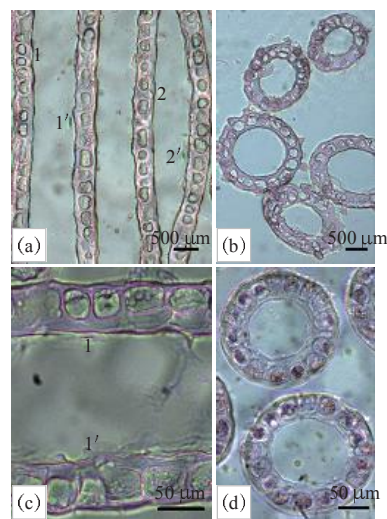


图4 浒苔丝状体的纵切和横切面观

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

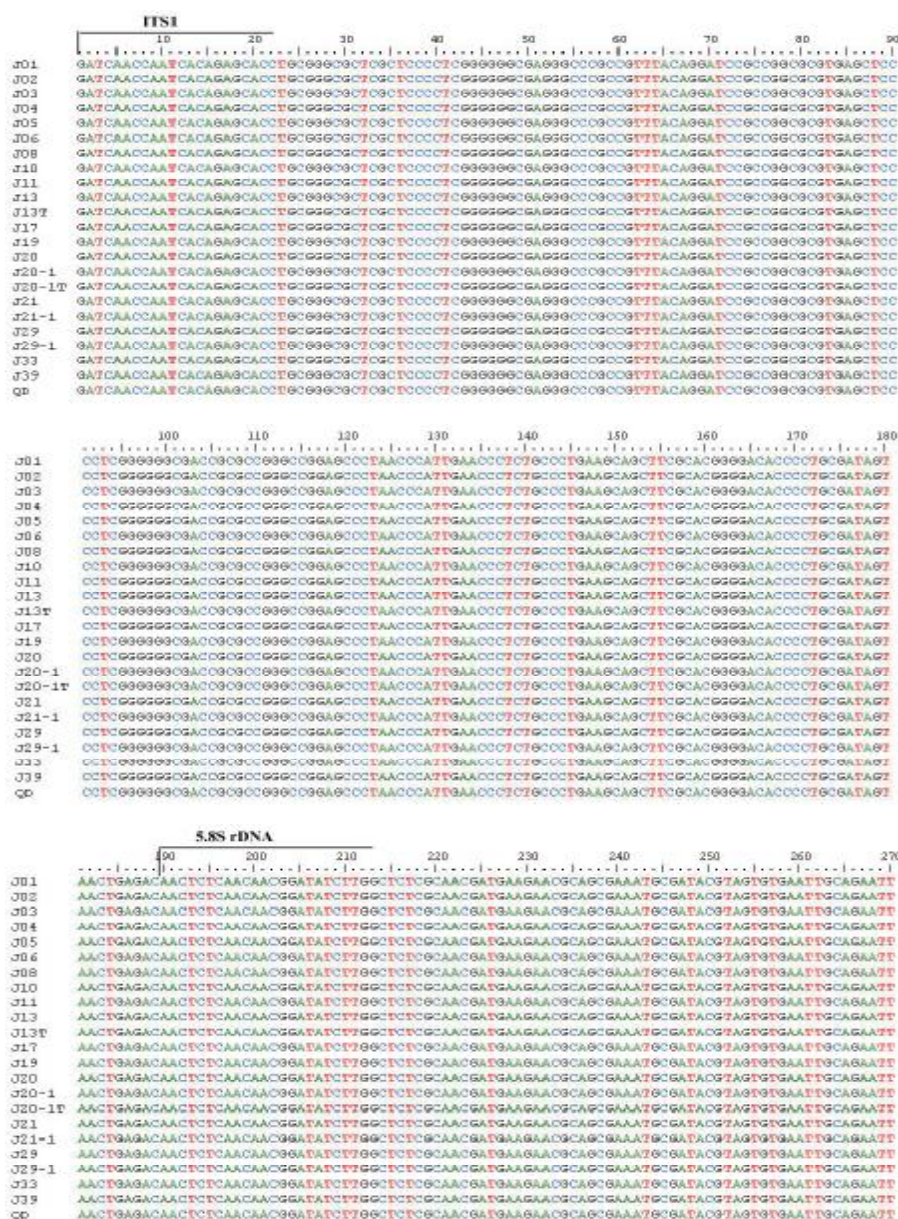
a, c: Longitudinal section view, 1 and 1' show two sides of one thallus, and 2 and 2' show two sides of another thallus; b, d: transverse section view.

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 个不同站点浒苔样品的 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。



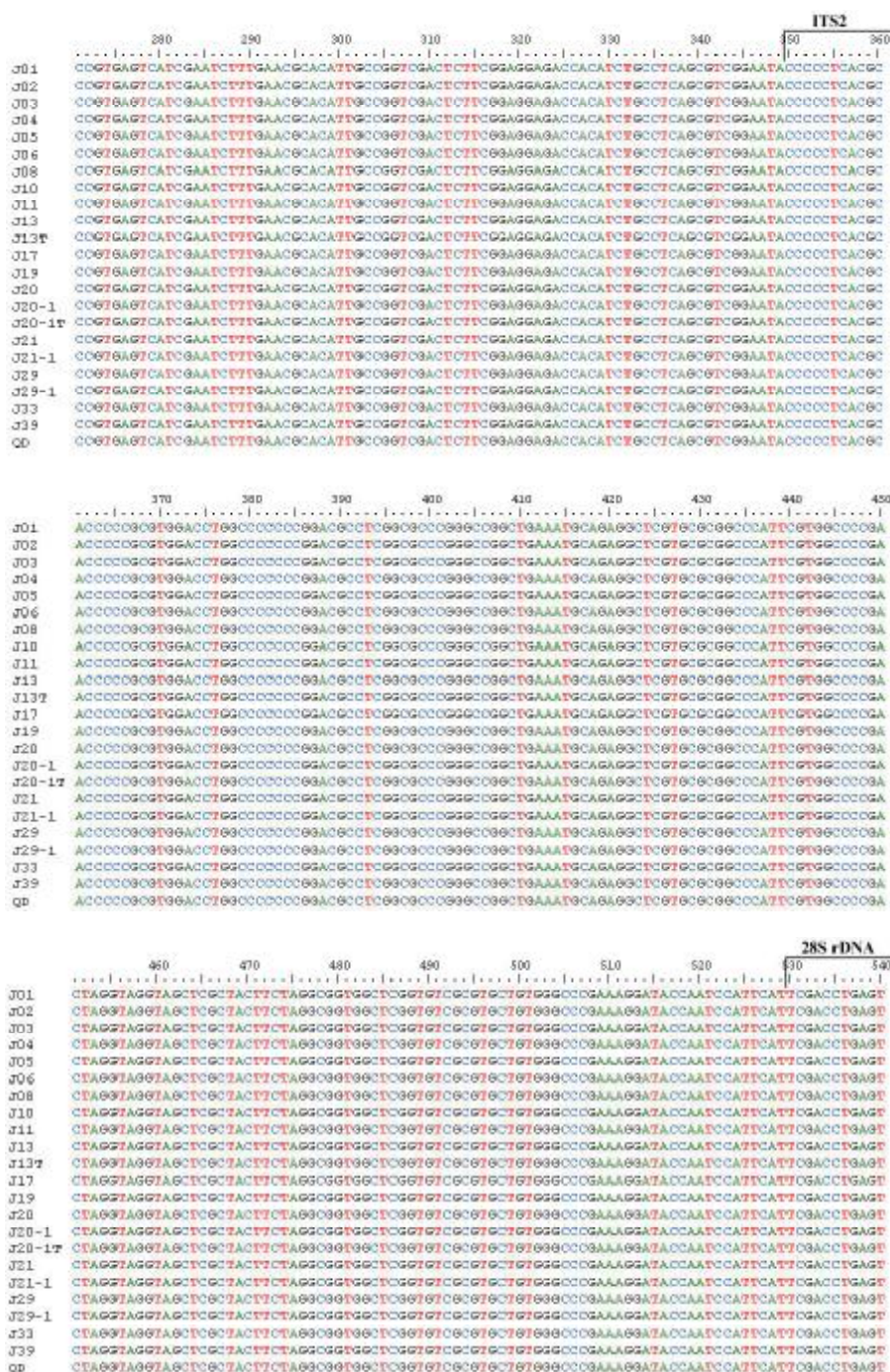


图5 不同站位浒苔样品的ITS1、5.8S rDNA、ITS2全序列的比对结果

Fig. 5 Alignment 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 percura*)的ITS和5.8S rDNA全序列作为外群^[7]。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)。

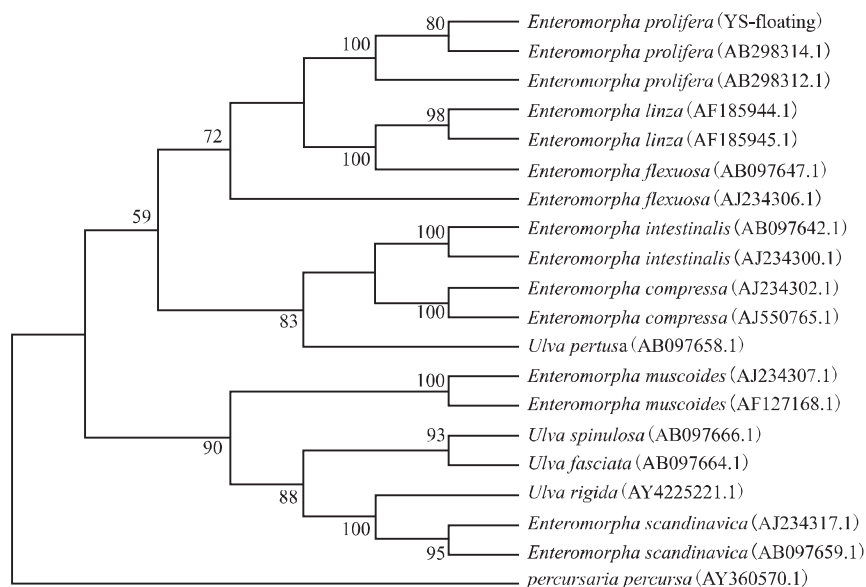


图6 基于NJ法构建的ITS序列的系统进化树

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。

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

YS-floating represents free-floating samples in Yellow Sea. Numbers at nodes represent bootstrap values from 1000 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^[8-9]。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^[10-13],而不同的藻类也可能具有相似的细胞超微结构、生理发育特征等^[4]。

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

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^[14-15]。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^[4,7,13,16-19]。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.
- [12] 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 green-tide-forming alga, *Ulva ohnoi* Hiraoka et Shimada sp. Nov. (Ulvales, Ulvophyceae) 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 large-scale 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 free-floating 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: yenh@ysfri.ac.cn