

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15038

4 种大型水母类 ITS-5.8S rDNA 序列分析及其在钵水母类系统分析中的应用

李玉龙, 董婧, 孙明, 王彬, 王文波

辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋生物资源与生态学重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 由于钵水母类生物地理学研究的缺乏以及不同时期形态变异较大等原因, 对其分类鉴定比较混乱和困难。为弥补形态学分类的缺陷, 采用通用引物 PCR 扩增法, 测定了分布于黄海北部和辽东湾海域海蜇(*Rhopilema esculentum*)、沙蜇(*Nemopilema nomurai*)、海月水母(*Aurelia* sp.)、白色霞水母(*Cyanea nozakii*) 4 种大型水母的 ITS-5.8S rDNA 序列, 同时利用 GenBank 数据库中已有的钵水母纲(Scyphomedusae) *ITS1*(the Ribosomal First Internal Transcribed Spacer)同源序列对其进行序列分析并构建系统树, 分析 *ITS1* 序列片段在大型水母种类鉴定方面的可行性及其在钵水母类系统及演化中的应用。结果显示, 4 种水母的 ITS-5.8S rDNA 序列变异较大且具有明显的序列长度多态性, 序列长度范围 675~833 bp。钵水母纲很多种类的 *ITS1* 序列具有种内长度多态性现象, 这种长度多态性主要是由于微卫星重复次数不同所造成的。钵水母纲科间遗传距离为 0.295~0.491, 种间遗传距离为 0.024~0.812; 除白色霞水母和海蜇外, 种内个体间遗传距离为 0.000~0.099。采用 ML 法(maximum likelihood)和贝叶斯法(Bayesian)构建的分子系统树拓扑结构不完全相同且与形态分类学的观点不太一致。研究表明, *ITS* 基因序列在钵水母纲不同阶元间变异较大, 适合于钵水母纲种类鉴定和属内种间水平的系统进化研究。

关键词: 钵水母; ITS-5.8S rDNA; 长度多态性; 物种鉴定; 系统关系

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1278-11

水母是一类海洋胶质类浮游生物, 是海洋生态系统中的重要组成部分, 在海洋生态系统物质、能量传递过程中具有重要作用^[1]。近年来, 在全球多处海域出现了水母类生物特别是大型水母的种群暴发现象, 导致一系列的经济和社会问题, 也给海洋生态系统健康造成很大影响^[2-3]。大型水母暴发对海洋渔业造成巨大负面影响, 同时破坏了海洋生态系统平衡, 水母暴发问题已成为研究者关注的热点领域^[1-10]。

黄渤海水域分布的大型水母种类既有经济价值较高的食用水母海蜇(*Rhopilema esculentum*), 也有近年来在东亚水域大范围暴发的灾害水母优

势种——沙蜇(*Nemopilema nomurai*)、白色霞水母(*Cyanea nozakii*)和海月水母(*Aurelia* sp.)^[4]。这 4 种水母在分类学上都隶属于刺胞动物门(Cnidaria)、钵水母纲(Scyphomedusae), 具有水螅体世代、水母体世代交替出现的世代交替生活史。由于钵水母复杂的生活史以及不同时期形态变异较大等原因, 加上浮浪幼虫、螅状体、碟状体阶段个体微小(百微米至毫米级)以及不同种间的螅状体、碟状体形态相似且样品不易保存等原因, 依据传统方法进行分类鉴定和形态研究十分繁琐和费时, 也容易导致分类鉴定错误。分子生物学的发展为解决上述困难提供了契机。利用合适的分子标

收稿日期: 2015-01-27; 修订日期: 2015-05-04.

基金项目: 国家 973 项目(2011CB403601); 海洋公益性行业科研专项(20140505010).

作者简介: 李玉龙(1981-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事海洋生物分子生物学及渔业资源增殖放流研究. E-mail: liyudragon@126.com

通信作者: 董婧, 研究员. E-mail: dj660228@tom.com

记对大型水母的分类及系统发生关系进行研究,可以在帮助快速鉴定种类的同时能够对钵水母类系统发生关系有更加全面准确的认识。

目前,利用分子技术对大型水母进行的研究主要集中在物种分子鉴定、系统分析及群体遗传等方面^[11-17],所用的分子标记主要是线粒体基因片段如 *CO I*、16S 等以及核基因如 18S rDNA、28S rDNA 等。线粒体基因方面主要有张姝等^[11]利用 16S rRNA 和 *CO I* 基因片段对我国的两种大型水母海蜇和沙蜇进行了分子鉴定; Bayha 等^[12]和 Ki 等^[13]分别利用 Taqman 探针法和基因芯片技术基于线粒体 16S rRNA 和 *CO I* 基因对美国墨西哥湾和韩国沿岸的几种常见水母进行了种类鉴定和检测研究; 王建艳等^[14]以我国近海海域常见的海月水母为目标生物,利用线粒体 16S rRNA、*CO I* 分子标记建立了其鉴定和检测技术。核基因方面,高祥刚等^[15]采用 AFLP 技术研究了辽宁沿海海蜇和沙蜇野生群体和养殖群体的遗传多样性; 孙国华等^[16]利用 *ITS* (the Ribosomal Internal Transcribed Spacer) 序列对烟台莱州湾和江苏海州湾自然海区海蜇捕获群体及威海养殖群体进行了序列分析; Bayha 等^[17]利用 18S rDNA 和 28S rDNA 序列分析了钵水母类 48 个种的系统关系。

ITS 为非编码区多拷贝基因,包括 *ITS1* 和 *ITS2*,其在细胞中以一种协同方式进化^[18-19],进化速率较快。*ITS* 序列在不同类型动物种间甚至种内地理群体间的变化很大,在很多种类如甲壳类、昆虫类、鱼类中都曾发现 *ITS* 片段具有种间、种内甚至个体内序列长度多态性现象^[20-24],且这

一片段具有丰富的信息变异位点,适合进行物种鉴定及系统分析,已被成功地应用于多种生物种类鉴定及系统发生关系研究^[24-27]。目前对钵水母纲种类 *ITS* 序列的研究较少,尚无利用 *ITS* 作为分子标记对钵水母纲进行分子鉴定及系统分析方面的相关报道。本研究以辽宁沿海 4 种常见大型水母螳状体、碟状体以及水母体为研究对象,对其 ITS-5.8S rDNA 片段进行比较分析,探究该片段在大型水母种类鉴定方面的可行性,并利用 GenBank 数据库中同源序列对钵水母纲的系统进化关系进行研究,探讨 *ITS* 片段在钵水母类系统及演化中的应用。

1 材料与方法

1.1 样品采集

研究所用大型水母样品均采自辽宁沿海,其中海蜇螳状体采自营口市顺发水产品养殖场,沙蜇螳状体为 2006 年 10 月自辽宁省大连旅顺外海域(38°46'N, 121°30'E)捕获亲体进行繁殖所得,海月水母螳状体亲体采自黄海北部黑石礁湾,白色霞水母螳状体为 2004 年 9 月在辽东湾捕获白色霞水母亲体进行人工繁殖所得,螳状体培养于辽宁省海洋水产科学研究院水母生态实验室,碟状幼体为实验室培养的螳状体释放所得,除白色霞水母外的其他 3 种大型水母水母体均采自辽东湾北部海域。根据董婧等^[4]列出的 4 种大型水母螳状体的特征差别(表 1)及样品图谱(图 1),对研究所用螳状体样品进行了形态分类鉴定,以确保样本采集的准确性。

表 1 4 种钵水母类螳状体形态特征^[4]
Tab. 1 Morphological characteristics of four jellyfish polyps

物种 species	触手数量 number of tentacles	形态 morphology	触手表面刺胞丛 nematocyst battery	无性生殖 asexual reproduction	横裂生殖 strobilation
海蜇 <i>Rhopilema esculentum</i>	16	高脚杯形柄长、吻长	分节,节上具纤毛,刺胞丛凸起明显	足囊	多碟
沙蜇 <i>Nemopilema nomurai</i>	16	圆锥形柄长度中等吻长	互生排列,具纤毛,刺胞丛凸起略明显	足囊	多碟
海月水母 <i>Aurelia</i> sp.	16	圆锥形柄短,口盘阔,吻短	分节,具纤毛刺胞丛凸起明显	螳状体匍匐茎芽	多碟(偶见单碟)
白色霞水母 <i>Cyanea nozakii</i>	16	圆锥形柄短,口盘阔,吻短	分节,具纤毛刺胞丛凸起明显	足囊匍匐茎芽	单碟

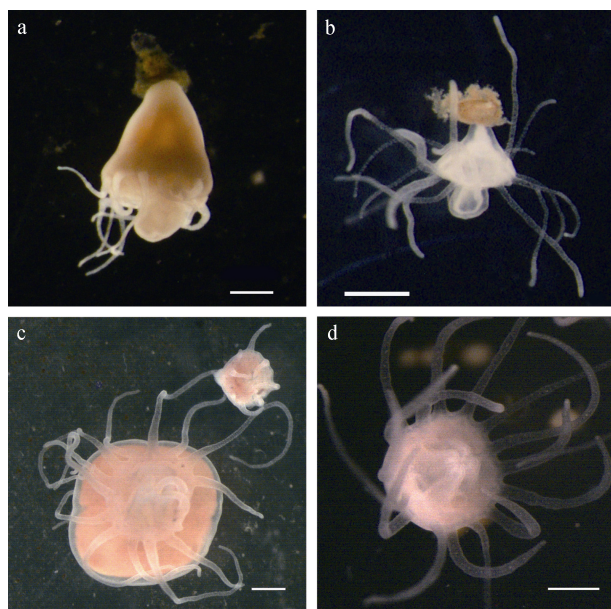


图 1 4 种钵水母蛸状体的形态差异^[4]

a. 沙蜉蛸状体; b. 海蜉蛸状体; c. 海月水母蛸状体; d. 白色霞水母蛸状体. 标尺 0.5 mm.

Fig. 1 Morphological characteristics differences of four jellyfish polyps^[4]

a. *Nemopilema nomurai*; b. *Rhopilema esculentum*; c. *Aurelia* sp.; d. *Cyanea nozakii*. Bar=0.5 mm.

1.2 DNA 提取、扩增及测序

采用 CTAB 法提取基因组 DNA, PCR 扩增在 Eppendorf AG 型 PCR 仪上进行, 扩增引物序列均为: JF-18F1750 5'-AAAGTCGTAACAAGGTTTC CG-3' 和 JF-28R765 5'-TTGGTCCGTGTTTCAA GACG-3'^[10]. 25 μ L 反应体积, 包括: 0.2 mmol/L 每种 dNTPs, 0.2 μ mol/L 每种引物, 1 μ L DNA 模板, 1 U *Taq*, 2.0 mmol/L $MgCl_2$, 2.5 μ L 10 $\times$ 缓冲液, 灭菌超纯水补足剩余体系。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 49~55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 运行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。扩增产物克隆后每个个体随机挑取 1~2 个单克隆进行双向测序[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 序列下载

从 GenBank 数据库中下载 15 种钵水母纲水母的 *ITS1* 基因序列, 与本研究测定的 4 种大型水母的基因同源序列一起分析。所分析水母种类的 *ITS1* 基因序列及其相关信息见表 2。

1.4 数据分析

对测定的 ITS-5.8S rDNA 序列进行 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>)检索, 确定序列为目的片段。应用 CLUSTAL X 1.8 软件^[28]对序列进行比对及相似性分析。通过 MEGA 3.0^[29]统计碱基含量、变异位点和简约信息位点, 采用 Kimura 双参数模型计算种间、属间、科间的遗传距离。用 PAUP 4.0^[30]构建 ML (Maximum Likelihood) 系统发育树, 其参数设置为树二等分再连接 (tree-bisection-reconnection, TBR) 的分支交换法, 利用 Modeltest 3.7^[31]选择基于 Akaike Information Criterion (AIC 标准) 的最适进化模型 (best-fit evolutionary models), 并将其不变位点的比例和 GAMMA 形状的参数应用于 PAUP 软件, ML 系统树采用自展检验法 (bootstrap, 250~300 次) 检验分子系统树各分支的置信度。同时用 MrBayes 3.1.2^[32]构建贝叶斯系统发育树, MrModeltest 2.1 选择最适模型, 其他设置如下: 起始树设为随机树 (random), 马尔科夫链的蒙特卡罗方法 (Markov chain Monte Carlo process, MCMC) 设置为 4 条链, 包括 3 条热链、1 条冷链, 同时运行 100 万代, 每 1000 代取样一次。将运行过程中所得的对数似然值 (log-likelihood scores) 与相应的代数进行作图, 找到对数似然值达到饱和的位置, 舍弃老化样本后 (Burnin=2500) 根据剩余的样本构建一致树。为了检测运行是否稳定, 贝叶斯推断同时进行 3 次以确保 MCMC 的收敛。

2 结果与分析

2.1 碱基组成及序列变异

结果显示 4 种水母 ITS-5.8S rDNA 序列长度为 675~833 bp (GenBank 序列号分别为海蜉: KR338964、KR338965、KR338966; 沙蜉: KR338967; 海月水母: KR338968; 白色霞水母: KR338969), 不同种间 *ITS* 序列存在明显的长度多态性, 序列变异较大; 比对后序列长度 886 bp, 其中变异位点 507 个, 简约信息位点 197 个, 变异位点及长度多态性主要产生在 *ITS* 片段部分。碱基组成无规律, 根口水母目 (Rhizostomeae) 的海蜉与沙蜉

表 2 用于本研究的钵水母纲水母类 *ITS1* 序列相关信息
Tab. 2 Information of *ITS1* of Scyphomedusae jellyfish samples in this study

中文名和物种名 valid name	分类地位 taxonomic statue	碱基含量%				长度/bp length	卫星位点 microsatellite loci	GenBank 序列号 GenBank access. No.	参考文献 reference
		A	T	G	C				
1. 海月水母亚种 I <i>Aurelia</i> sp. I	洋须水母科 Ulmaridae	27.5	32.8	22.4	17.3	271~272	-	KR338968 EU276014 EU332745~332744 AY935204 AY935213~935207, AY935217~935216 AY935206~935205	this study [10]
2. 海月水母亚种 2~10 <i>Aurelia</i> sp. 2~sp. 10		25.3	30.9	23.4	20.4	264~374	-		
3. 海月水母 <i>Aurelia aurita</i>		28.6	33.6	19.5	18.4	274~286	-		[10]
4. 月属 <i>Aurelia labiata</i>		27.0	34.0	19.4	19.7	315	-	AY935202	
5. 海月属 <i>Aurelia limbata</i>		26.1	31.8	21.9	20.1	283	-	AY935215	
6. 白色霞水母 <i>Cyanea nozakii</i> (I)	霞水母科 Cyaneidae	23.3	27.7	26.2	22.7	313~317	(CG) ₃ , (TG) ₃ , (CGT) ₃	AB377554~377551	[33]
7. 白色霞水母 <i>Cyanea nozakii</i> (II)		24.3	25.7	26.9	23.1	270	-	KR338969	this study
8. 霞水母属 <i>Cyanea annaskala</i>		23.4	25.3	26.0	25.4	326~337	(TG) ₃ , (AGT) ₄	AY903065~903061	
9. 玫瑰红霞水母 <i>Cyanea rosea</i>	游水母科 Pelagiidae	22.9	25.8	25.8	25.6	334~352	(CG) ₃ , (AGT) ₄ , (TG) ₃ , (CT) ₃ , (GA) ₃ , (TCTACA) ₁₋₂	AY903060~903057	[34]
10. 发形霞水母 <i>Cyanea capillata</i>		25.6	26.7	24.1	23.6	306~331	(TGC) ₄ , (GTA) ₁₋₄ , (TATC) ₁₋₄	AY903056~903053, U65481	[35]
11. 夜光游水母 <i>Pelagia noctiluca</i>		23.6	29.5	24.5	22.3	237	-	HM358357~358359 JX235419~235427 GQ368906~369006	
12. 金黄水母 <i>Chrysaora fulgida</i>		26.3	28.0	24.7	21.0	300	-	HM348774~348773	-
13. 沙蜚 <i>Nemopilema nomurai</i>	根口水母科 Rhizostomatidae	20.7	27.7	27.9	23.7	329	-	AB377548 KR338967	[33], this study
14. 海蜇 <i>Rhopilema esculentum</i> (I)		20.5	28.6	26.2	24.7	332	-	AB377586~377585	[33]
15. 海蜇 <i>Rhopilema esculentum</i> (II)		21.2	31.0	23.7	24.1	332~365	(TTGA) ₄ , (GT) ₃ , (CGTT) ₂₋₄ , (GCAC) ₁₋₄	AB377589~377587 KR338964~KR338966	[33], this study
16. 桶水母 <i>Rhizostoma pulmo</i>	端棍水母科 Catostylidae	25.7	30.6	22.5	21.2	325~373*	(AT) ₃ , (CT) ₃ , (CA) ₃ , (TTCGTTTCGAA) ₁₋₂	GQ99578~999573 HQ902072~902091	[36]
17. 端棍水母属 <i>Catostylus tagi</i>		24.0	31.2	23.4	21.5	321	-	KM519755	-
18. 马赛克水母 <i>Catostylus mosaicus</i>		14.9	28.5	28.2	28.4	334~379	(CTG) ₃ , (GCTG) ₃ , (TGGCTTGC) ₁₋₃ , (GT) ₁₋₂ , (GT) ₅₋₆	AY737183~737174	[37]

C+G 含量略高于旗口水母目(Semaeostomeae)的白色霞水母和海月水母(表 3)。经过序列比对, 本研究中亲本来自中国辽东湾和黄海北部的沙蜇与日本沿岸采集的越前水母(*Nemopilema nomurai*) (AB377548)序列完全一致; 海月水母 rDNA 序列与韩国沿海的海月水母样品(EU276014、EU332744、EU332745)基因序列仅有一个碱基差异, 推断中国辽东湾和黄海北部的海月水母为 *Aurelia* sp.1^[10]。

结合 GenBank 中钵水母纲已有 *ITS1* 序列, 对已有 5 科共 15 个种核糖体 *ITS1* 片段进行了序列分析。钵水母类核糖体 *ITS1* 片段具有明显的序列长度多态性, 变异幅度较大, 去掉两侧 18S rRNA

与 5.8S rRNA 基因序列, *ITS1* 长度为 264~379 bp, 长度多态性大多是微卫星位点重复所致。在钵水母纲 *ITS1* 序列中基本都发现存在多种类型微卫星位点(表 2), 根据目前已有的 *ITS1* 序列, 其中有一些微卫星位点如(CG)₃, (TG)₃, (GT)₃, (AGT)₄ 存在于多个种中, 但有一些微卫星位点只存在于特定的种中, 例如, (TCTACA)_{1~2} 只存在于 *Cyanea rosea* 中, (GTA)_{1~4}、(TATC)_{1~4} 只存在于 *Cyanea capillata* 中, (CGTT)_{2~4}、(GCAC)_{1~4} 是海蜇的特有位点, (TTCGTTTCGAA)_{1~2} 是 *Rhizostoma pulmo* 的特有位点, (TGGCTTGC)_{1~3} 只存在于 *Catostylus mosaicus* 中, 这是否可以作为鉴定种的分子标记还需要更多的数据加以证实。

表 3 ITS-5.8S rDNA 序列长度、碱基组成、GC 含量
Tab. 3 Information of the length and base composition of ITS-5.8S rDNA from 4 jellyfish species

物种 species	个体数量 number of individual	核酸型数 number of genotype	ITS1 片段长度 /bp length of ITS1	5.8S rDNA 长度 /bp length of 5.8S rDNA	ITS2 片段长度 /bp length of ITS2	ITS-5.8S rDNA	A(%)	T(%)	C(%)	G(%)	GC(%)
海蜇 <i>R. esculentum</i>	5	3	357~365	158	298~310	813~833	22.1	27.5	25.3	25.2	50.5
沙蜇 <i>N. nomurai</i>	2	1	330	158	358	846	20.3	24.8	26.1	28.8	54.9
海月水母 <i>Aurelia</i> sp.	2	1	271	158	278	707	25.7	27.5	22.2	24.6	46.8
白色霞水母 <i>C. nozakii</i>	2	1	270	158	247	675	24.6	26.4	23.3	25.8	49.1

2.2 遗传距离

表 4~表 6 列出了基于 *ITS1* 基因序列的钵水母纲各阶元的遗传距离。钵水母纲 5 个科两两间的遗传距离平均值为 0.392, 最大值为根口水母科(Rhizostomatidae)和端棍水母科(Catostylidae)间的 0.491, 最小值为游水母科(Pelagiidae)和霞水母科(Cyaneidae)间的 0.295(表 4)。钵水母纲 15 个种两两间的遗传距离见表 5, 最小值出现在海月水母 *Aurelia* sp.1 和 *Aurelia limbata* 之间(0.024), 最大值出现在沙蜇和 *Catostylus tagi* 之间(0.812), 两两间遗传距离平均值为 0.354。同时我们计算了钵水母纲不同种类的种内 K2P 遗传距离(表 6), 发现除白色霞水母和海蜇外, 种内个体间的平均遗传差异均小于 0.1, 种内遗传距离平均值为 0.011, 种间遗传距离是种内的 32 倍, 有利于种的鉴定。

白色霞水母和海蜇的种内遗传距离差异较大, 其中白色霞水母遗传差异为 0~0.458, 平均值为 0.222; 海蜇种内遗传距离为 0~0.662, 平均值为 0.298。经序列比对分析发现, 来自辽东湾的白色霞水母样品与日本沿海的白色霞水母样品间遗传差异较大, 平均遗传距离为 0.424, 而来自中国的样品间序列完全一致, 日本的样品间序列差异为 0.03~0.079; 同样的现象也出现在海蜇个体间, 海蜇的 *ITS1* 序列具有两种类型, 类型 I 两条序列完全一致(AB377586~377585), 类型 II 不同序列差异为 0~0.08, 但两种类型间序列差异极大, 类型间平均遗传距离为 0.64, 甚至大于不同科间的遗传距离。两种类型序列, 类型 I 与越前属亲缘关系较近, 类型 II 与根口水母属具有较高的相似性。

表 4 钵水母纲 *ITS1* 序列的科间遗传距离

Tab. 4 Genetic distance of inter-family of Scyphomedusae jellyfish species based on the *ITS1* sequences

种类 species	1	2	3	4	5
1	—	—	—	—	—
2	0.339	—	—	—	—
3	0.315	0.295	—	—	—
4	0.490	0.484	0.476	—	—
5	0.331	0.338	0.356	0.491	—

注: 1. 洋须水母科; 2. 霞水母科; 3. 游水母科; 4. 根口水母科; 5. 端棍水母科.

Note: 1. Ulmaridae; 2. Cyaneidae; 3. Pelagiidae; 4. Rhizostomatidae; 5. Catostylidae.

表 5 钵水母纲 *ITS1* 序列种间遗传距离

Tab. 5 Genetic distance of inter-species for Scyphomedusae jellyfish species based on the *ITS1* sequences

种类 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1																	
2	0.170																
3	0.099	0.196															
4	0.073	0.173	0.100														
5	0.024	0.186	0.100	0.086													
6	0.349	0.408	0.334	0.419	0.388												
7	0.306	0.307	0.232	0.252	0.323	0.168											
8	0.306	0.339	0.259	0.295	0.344	0.124	0.161										
9	0.359	0.363	0.291	0.328	0.385	0.171	0.167	0.114									
10	0.304	0.341	0.255	0.291	0.341	0.142	0.137	0.084	0.055								
11	0.282	0.316	0.249	0.323	0.284	0.274	0.270	0.257	0.286	0.288							
12	0.333	0.372	0.332	0.335	0.351	0.325	0.306	0.326	0.374	0.364	0.216						
13	0.754	0.763	0.725	0.725	0.767	0.720	0.689	0.761	0.654	0.641	0.669	0.662					
14	0.184	0.316	0.230	0.218	0.215	0.347	0.270	0.290	0.315	0.279	0.279	0.282	0.586				
15	0.651	0.664	0.679	0.697	0.714	0.681	0.641	0.673	0.628	0.574	0.651	0.600	0.282	0.557			
16	0.247	0.326	0.299	0.270	0.281	0.326	0.252	0.329	0.325	0.320	0.333	0.280	0.617	0.113	0.591		
17	0.230	0.371	0.254	0.299	0.231	0.377	0.358	0.344	0.377	0.352	0.307	0.420	0.812	0.199	0.754	0.281	
18	0.305	0.352	0.303	0.326	0.341	0.370	0.332	0.312	0.338	0.333	0.357	0.357	0.555	0.312	0.661	0.353	0.260

注: 1~18 所代表的钵水母种类见表 2.

Note: It is showed in Tab.2 that the numbers from 1 to 18 representing Scyphomedusae jellyfish species.

表 6 钵水母纲 *ITS1* 序列种内个体间遗传距离的比较

Tab. 6 Comparison of the genetic distance of intra-species for Scyphomedusae jellyfish species based on the *ITS1* sequences

种类 species	遗传差异最大值 maximum divergence	遗传差异最小值 minimum divergence	平均遗传差异 mean divergence
海月水母亚种 1 <i>Aurelia</i> sp.1	0	0	0
白色霞水母 <i>Cyanea nozakii</i>	0.458	0	0.222
白色霞水母(日本) <i>Cyanea nozakii</i> (Japan)	0.079	0.030	0.051
白色霞水母(中国) <i>Cyanea nozakii</i> (China)	0	0	0
霞水母属 <i>Cyanea annaskala</i>	0.009	0	0.004
玫瑰红霞水母 <i>Cyanea rosea</i>	0.009	0.003	0.006
发形霞水母 <i>Cyanea capillata</i>	0.099	0	0.039
<i>Chrysaora fulgida</i>	0	0	0
夜光游水母 <i>Pelagia noctiluca</i>	0.013	0	0.002
沙蜇 <i>Nemopilema nomurai</i>	0	0	0
海蜇 <i>Rhopilema esculentum</i>	0.662	0	0.298
海蜇(日本) <i>Rhopilema esculentum</i> (Japan)	0.084	0	0.029
海蜇(中国) <i>Rhopilema esculentum</i> (China)	0	0	0
桶水母 <i>Rhizostoma pulmo</i>	0	0	0
马赛克水母 <i>Catostylus mosaicus</i>	0.006	0	0.003

2.3 分子系统分析

对于各种方法构建分子进化树的准确性, Hall^[38]认为贝叶斯的方法最好, 其次是最大似然法(maximum likelihood), 因此本研究采用这两种方法构建了 15 种钵水母类的分子进化树(图 2)。结果显示, 基于 *ITS1* 片段构建的 15 种钵水母类 ML 树(图 2-a)与贝叶斯树(图 2-b)的拓扑结构图并不一致, 不同之处主要体现在端棍水母科的 2 个种, ML 树中端棍水母科与根口水母科的种类聚在一起形成根口水母目, 而贝叶斯树中端棍水母科种类与洋须水母科(Ulmaridae)的种类聚枝, 与形态学分类结果相差较大。本研究测定的旗口水母目海月水母与 GenBank 中的 *Aurelia* sp.1 聚在一

起构成一个单系枝并得到了较高的支持率; 而白色霞水母并未与 GenBank 中的白色霞水母构成一个单系枝, 仅与霞水母属其他种类聚在一起。根口水母目的沙蜚与日本的越前水母聚在一起并构成一个单系枝; 海蜇首先与 GenBank 中的 4 条同源序列聚在一起形成一个单系枝再与越前属聚枝, 但 GenBank 中的 2 条海蜇 *ITS1* 序列未与海蜇属种类聚在一起而与根口水母属种类聚枝(贝叶斯树)。关于其他的水母种类, 根口水母目的端棍水母科种类、根口水母科的种类分别聚在一起, 旗口水母目霞水母科以及游水母科的水母分别聚在一起, 洋须水母科的水母并不聚为一个单系枝, 且各科分支间的支持率都很低。

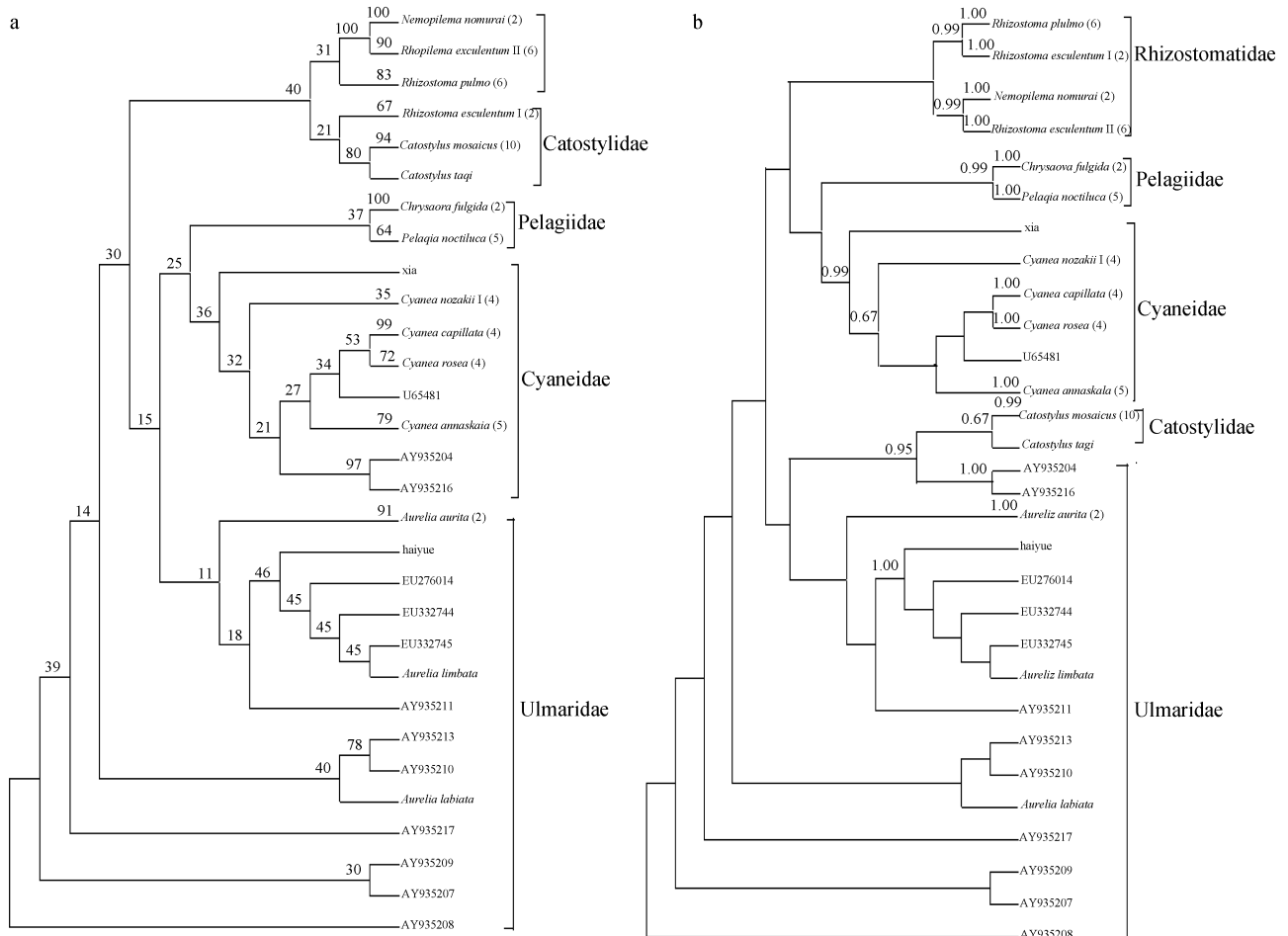


图 2 基于 *ITS1* 片段构建的 15 种钵水母类 ML (a)系统树与 BI (b)系统树

分支节点上数值分别为 ML 系统树的 Bootstrap 支持率(百分比)和 BI 系统树的后验概率(只显示大于 0.50 的数值)

Fig. 2 Phylogenetic tree of the class Scyphomedusae

The tree was inferred from ML (a) and Bayesian (b) methods using *ITS1* gene sequences.

The numbers above the nodes are bootstrap values (percentage) for internal branches of the ML trees and posterior probabilities in which PP values above 0.50 are indicated at each node.

3 讨论

3.1 钵水母纲 *ITS1* 序列分析

ITS1 序列长度多态性现象在鱼类、甲壳类、昆虫类等很多动物种类中都存在^[20-24], 在一些钵水母纲种类中也有报道^[16, 39]。形态分类相近的不同物种中, *ITS1* 序列在有些种类间一致性很高, 几乎没有变异, 而在有些种类间则具有明显的长度多态性现象^[22, 40]。本研究, 15种钵水母纲种类间也存在这种现象, 大部分种类都存在明显的种内序列长度多态性, 而一些种类如夜光游水母(*Pelagia noctiluca*)其 *ITS1* 序列具有很高的-致性, 不同个体的 *ITS1* 序列几乎完全一致。具有种内 *ITS1* 序列长度多态性的钵水母纲种类, 微卫星位点的重复次数不同是长度多态性产生的主要原因(表2), 这些重复序列(微卫星位点)在不同的种中并不一致, 有一些特殊的微卫星位点只存在于特定的种中, 这种现象在其他海洋动物如对虾科的不同种类间也被观测到, 可以作为鉴定种的分子标记。15种钵水母类 *ITS1* 序列长度变化范围较大, 碱基组成无规律, 插入或缺失区域很少位于重复区, 其遗传变异主要是突变造成的而不是微卫星重复引起。这种现象在瓢虫科(Coccinellidae)种类的 *ITS1* 序列中也存在。von der Schulenburg等^[20]认为其产生的原因也是由于重复序列引起的, *ITS1* 序列在进化过程中产生大量较长的重复片段, 同时重复区的进化速率较快从而导致系列间变异较大。钵水母纲不同种间显著的 *ITS1* 序列长度多态性现象与其漫长的进化历史息息相关。水母是一较古老的类群, 起源于5亿多年前的寒武纪^[41-42], 其起源与分化都很早, *ITS1* 序列在钵水母纲种类中进化速度又较快, 能够积累足够的变异位点, 所以钵水母纲相距较远的种类间序列差异较大。

3.2 物种鉴定及可能存在的新种

目前已知的钵水母纲有效种为202种, 其中有22~25种是通过分子生物学的方法发现的^[43-45], 但Baxevanis等^[40]认为仍有40%~50%的钵水母种类未被发现。由于 *ITS1* 序列具有较高的变异速率, 所以适用于物种鉴定及群体水平的研究。Chu等^[21]分析了多种甲壳类动物的 *ITS1* 序列, 其研究结果

表明, *ITS1* 序列在甲壳类不同种间的差异明显, 适合于作为甲壳类动物种、群体水平的分子标记。本研究中所分析的15种钵水母类的 *ITS1* 基因序列的种间遗传距离平均值是种内的32倍, 符合Hebert等^[46-47]提出的作为DNA条形码进行物种鉴定的标准要求, *ITS1* 基因序列适合于近缘种的物种鉴定。本研究中, 辽东湾白色霞水母样品与日本白色霞水母样品的平均遗传距离为0.424, 远大于种内个体间的差异; 海蜇两种类型的 *ITS1* 序列平均遗传距离为0.64, 类型间序列差异远大于类型内个体间的差异。导致这一现象出现的原因可能有两种, 一是可能存在“隐种”(cryptic species, 指形态上几乎完全相同但遗传组成存在显著分化的物种); 二是实验样本的采集鉴定错误导致研究结果有所差异, 虽然这个问题的解决还需要更明确的样品和利用更多的DNA标记加以分析确定, 但也表明 *ITS1* 序列适合于钵水母纲种类的物种鉴定。

3.3 *ITS1* 在钵水母纲系统进化研究中的适用性

对许多物种而言, 核糖体 *ITS1* 片段长度适宜, 进化速率快, 具有良好的系统发育信息, 且容易扩增, 常用于种、属水平的系统进化研究^[21-27, 40], 但Álvarez等^[48]认为进行分子系统分析所用的基因序列应避免序列碱基组成不均匀及长度多态性等不利因素的影响, 因此利用 *ITS1* 序列作为分子标记分析钵水母纲系统发生关系时可能具有风险。本研究应用 *ITS1* 基因分析了钵水母纲2个目5科间的系统关系, 结果表明 *ITS1* 基因变异极大且长短不一, 用不同方法构建的系统树拓扑结构不一致且与形态分类结果有差异, 因此核糖体 *ITS1* 序列可能并不适合钵水母类高分阶元的系统发生关系研究。但用ML法(maximum likelihood)和贝叶斯法构建的系统发育树表明同种的不同个体, 亲缘关系较近的不同种各自聚枝, 表明 *ITS1* 片段仍可用于钵水母纲某些种类属内种间水平的系统进化研究。结合形态学特征及其他分子标记, 这一片段将有助于研究者对钵水母纲种类系统进化关系以及物种分类有一个更加全面准确的了解。

参考文献:

- [1] Zhang F, Sun S, Li C L. Research progress of marine jellyfishes ecology[J]. Progress in Natural Science, 2009, 19(2): 121-130. [张芳, 孙松, 李超伦. 海洋水母类生态学研究进展[J]. 自然科学进展, 2009, 19(2): 121-130.]
- [2] Sun S. Challenges in the jellyfish bloom research[J]. Advances in Earth Science, 2012, 27(3): 257-261. [孙松. 水母暴发研究所面临的挑战[J]. 地球科学进展, 2012, 27(3): 257-261.]
- [3] Sun S. New perception of jellyfish bloom in the East China Sea and Yellow Sea[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(3): 406-410. [孙松. 对黄、东海水母暴发机理的新认知[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(3): 406-410.]
- [4] Dong J, Jiang L X, Sun M, et al. Bionomics of the edible jellyfish in Bohai Sea and north of Yellow Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 2013. [董婧, 姜连新, 孙明, 等. 渤海与黄海北部大型水母生物学研究[M]. 北京: 海洋出版社, 2013.]
- [5] Zhong X M, Tang J H, Liu P T. A study on the relationship between *Cyanea nozakii* Kishinouye breaking out and ocean ecosystem[J]. Modern Fisheries Information, 2004, 19(3): 15-17. [仲霞铭, 汤建华, 刘培廷. 霞水母(*Cyanea nozakii* Kishinouye)的暴发与海洋生态之关联性探讨[J]. 现代渔业信息, 2004, 19(3): 15-17.]
- [6] Cheng J H, Li S F, Ding F Y, et al. Primary Analysis on the jellyfish blooms and its cause in the East China Sea and the Yellow Sea[J]. Modern Fisheries Information, 2004, 19(5): 10-12. [程家骅, 李圣法, 丁峰元, 等. 东、黄海大型水母暴发现象及其可能成因浅析[J]. 现代渔业信息, 2004, 19(5): 10-12.]
- [7] Uye S, Ueta U. Recent increase of jellyfish populations and their nuisance to fisheries in the Inland Sea of Japan[J]. Bull Jpn Soc Fish Oceanogr, 2004, 68(1): 9-19.
- [8] Kawahara M, Uye S, Kohzoh O, et al. Unusual population explosion of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in East Asian waters[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2006, 307: 161-173.
- [9] Purcell J E. Environmental effects on asexual reproduction rates of the scyphozoan, *Aurelia labiata*[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2007, 348: 183-196.
- [10] Ki J S, Hwang D S, Shin K, et al. Recent moon jelly (*Aurelia* sp.1) blooms in Korean coastal waters suggest global expansion: examples inferred from mitochondrial CO I and nuclear ITS-5.85 rDNA sequences[J]. ICES J Mar Sci, 2008, 65(3): 443-452.
- [11] Zhang S, Zhang F, Liu Y, et al. Molecular identification of two macro-jellyfish in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2009, 40(1): 94-101. [张姝, 张芳, 刘媛, 等. 我国海域两种大型水母的分子鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2009, 41(1): 94-101.]
- [12] Bayha K M, Graham W M. A new Taqman[®] PCR-based method for the detection and identification of scyphozoan jellyfish polyps[J]. Hydrobiologia, 2009, 616(1): 217-228.
- [13] Ki J S, Hwang D S, Lee J S. Simultaneous detection of *Aurelia* and *Chrysaora* scyphozoan jellyfish on a DNA microarray[J]. J Mar Biol Assoc UK, 2010, 90(6): 1111-1117.
- [14] Wang J Y, Zhen Y, Wang G S, et al. Molecular identification and detection of moon jellyfish (*Aurelia* sp.) based on partial se sequencing of mitochondrial 16S rDNA and CO I[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(3): 847-852. [王建艳, 甄毓, 王国善, 等. 基于 mt-16S rDNA 和 mt-COI 基因的海月水母分子生物学鉴定方法和检测技术[J]. 应用生态学报, 2013, 24(3): 847-852.]
- [15] Gao X G, Cao J, Dong J, et al. AFLP analysis in jellyfish populations of *Rhopilema esculentum* and *Nemopilema nomurai* in Liaoning Coast[J]. Fisheries Science, 2009, 28(2): 75-78. [高祥刚, 曹洁, 董婧, 等. 辽宁沿海海蜇与沙海蜇遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 水产科学, 2009, 28(2): 75-78.]
- [16] Sun G H, Liu X Q, Yang J M, et al. Genetic diversity of ITS sequences in farmed and natural *Rhopilema esculentum* populations[J]. Marine Sciences, 2010, 34(10): 90-95. [孙国华, 刘相全, 杨建敏, 等. 海蜇养殖群体及自然捕获群体 ITS 序列遗传分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(10): 90-95.]
- [17] Bayha K M, Dawson M N, Collins A G, et al. Evolutionary relationships among scyphozoan jellyfish families based on complete taxon sampling and phylogenetic analyses of 18S and 28S ribosomal DNA[J]. Integr Comp Biol, 2010, 50(3): 436-455.
- [18] Brown D D, Wensink P C, Jordan E. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes[J]. J Mol Biol, 1972, 63(1): 57-64, IN5-IN7, 65-73.
- [19] Dover G A. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated[J]. Trends Genet, 1986, 2: 159-165.
- [20] von der Schulenburg J H G, Hancock J M, Pagnamenta A, et al. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae)[J]. Mol Biol Evol, 2001, 18(4): 648-660.
- [21] Chu K H, Li C P, Ho H Y. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in Crustacea[J]. Mar Biotechnol, 2001, 3(4): 355-361.
- [22] Mukha D, Wiegmann B M, Schal C. Evolution and phylogenetic information content of the ribosomal DNA repeat

- unit in the Blattodea (Insecta)[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(9): 951–960.
- [23] Xu H, Li J, Kong X Y, et al. Phylogenetic relationship and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of Cynoglossinae species[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2008, 39(1): 35–41. [徐晖, 李军, 孔晓瑜, 等. 6 种舌鳎亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及系统分析[J]. *海洋与湖沼*, 2008, 39(1): 35–41.]
- [24] Tang B P, Zhou K Y, Song D X. Application of sequences of nrDNA ITS to molecular systematics of invertebrates[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2002, 37(4): 67–73. [唐伯平, 周开亚, 宋大祥. 核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学中的应用[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(4): 67–73.]
- [25] Jansen G, Devaere S, Weekers P H H, et al. Phylogenetic relationships and divergence time estimate of African anguilliform catfish (Siluriformes: Clariidae) inferred from ribosomal gene and spacer sequences[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38(1): 65–78.
- [26] Chen C A, Chen C P, Fan T Y, et al. Nucleotide sequences of ribosomal internal transcribed spacers and their utility in distinguishing closely related *Perinereis* polychaetes (Annelida; Polychaeta; Nereididae)[J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4(1): 17–29.
- [27] Wanna W, Chotigeat W, Phongdara A. Sequence variations of the first ribosomal internal transcribed spacer of *Penaeus* species in Thailand[J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2006, 331(1): 64–73.
- [28] 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(24): 4876–4882.
- [29] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5(2): 150–163.
- [30] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods), version 4[Z]. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.
- [31] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817–818.
- [32] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [33] Chow S, Ueno Y, Toyokawa M, et al. Preliminary Analysis of Length and GC Content Variation in the Ribosomal First Internal Transcribed Spacer (ITS1) of Marine Animals[J]. *Mar Biotechnol*, 2009, 11(3): 301–306.
- [34] Dawson M N. *Cyanea capillata* is not a cosmopolitan jellyfish: morphological and molecular evidence for *C. annaskala* and *C. rosea* (Scyphozoa, Semaestomeae, Cyaneidae) in southeast Australia[J]. *Invertebr Syst*, 2005, 19(3): 361–370.
- [35] Stopar K, Ramsak A, Trontelj P, et al. Lack of genetic structure in the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) across European seas[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 57(1): 417–428.
- [36] Ramsak A, Stopar K, Malej A. Comparative phylogeography of meroplanktonic species, *Aurelia* spp. and *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa) in European Seas[J]. *Hydrobiologia*, 2012, 690(1): 69–80.
- [37] Dawson M N. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia[J]. *Invertebr Syst*, 2005, 32(3): 515–533.
- [38] Hall B G. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences[J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(3): 792–802.
- [39] Ramšak A, Stopar K, Malej A. Comparative phylogeography of meroplanktonic species, *Aurelia* spp. and *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa) in European Seas[J]. *Hydrobiologia*, 2012, 690(1): 69–80.
- [40] Baxevanis A D, Kappas I, Abatzopoulos T J. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 40(3): 724–738.
- [41] Hagadorn J W, Dott R H Jr, Damrow D. Stranded on a Late Cambrian shoreline: Medusae from central Wisconsin[J]. *Geology*, 2002, 30(2): 147–150.
- [42] Chen J Y, Schopf J W, Bottjer D J, et al. Raman spectra of a Lower Cambrian ctenophore embryo from southwestern Shaanxi, China[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(15): 6289–6292.
- [43] Kramp P L. Synopsis of the medusae of the world[J]. *J Mar Biol Assoc UK*, 1961, 40: 1–469.
- [44] Daly M, Brugler M R, Cartwright P, et al. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus[J]. *Zootaxa*, 2007, 1668: 127–182.
- [45] Appeltans W, Ah Yong S T, Anderson G, et al. The magnitude of global marine species diversity[J]. *Curr Biol*, 2012, 22(23): 2189–2202.
- [46] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc R Soc B-Biol Sci*, 2003, 270: 313–322.
- [47] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proc R Soc B-Biol Sci*, 2003, 270: S96–S99.
- [48] Álvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 29(3): 417–434.

ITS-5.8S rDNA sequences of four Scyphomedusae jellyfish species and their applicability as a phylogenetic analysis marker

LI Yulong, DONG Jing, SUN Ming, WANG Bin, WANG Wenbo

Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecology, Dalian 116023, China

Abstract: The class Scyphomedusae currently comprises 5 orders, 19 families, and about 202 species. These jellyfish are important pelagic predators at the center of concern about the “rise in gelatinous zooplankton” and degradation of coastal ecosystems. Previous phylogenetic relationship studies among Scyphomedusae species relied primarily on morphological data. However, morphology-based phylogeny and classification of this group are difficult due to the high diversity of morphological characters, and the topic remains controversial. Large molecular level advancements have yielded interesting results among the Scyphomedusae taxa. *Nemopilema nomurai*, *Rhopilema esculentum*, *Cyanea nozakii*, and *Aurelia* sp. are four common macro-jellyfish species in the Bohai and Yellow seas. In this study, the nuclear ITS-5.8S rDNA gene fragments from polyps, ephyrae, and adults of these species were amplified using polymerase chain reaction techniques. Homologous sequences of other Scyphomedusae jellyfish from GenBank were also included in this study. The genetic information indices, including base composition, sequence variation, and Kimura two-parameter genetic distance were examined. Phylogenetic trees were constructed based on the maximum-likelihood and Bayesian inference methods to determine the phylogenetic relationships among Scyphomedusae jellyfish. Significant length variations in the ITS-5.8S rDNA region were observed (length, 675–833 bp). A total of 886 aligned base pairs, with 507 variable sites and 197 parsimony informative sites, were detected in the four jellyfish species. Inter-individual internal transcribed spacer region (ITS)1 polymorphisms were observed in most of the Scyphomedusae jellyfish species (four families and nine species). Repeats in microsatellite ITS loci play an important role in length heteroplasmy. The genetic distances among families, species, and individuals were 0.295–0.491, 0.024–0.812, and 0–0.099, respectively. The phylogenetic analysis showed that the topologies of the maximum-likelihood and Bayesian inference trees were somewhat different and different from morphological taxonomy. In conclusion, ITS is an appropriate barcoding tool to identify jellyfish species and classify young jellyfish. Furthermore, ITS1 was highly divergent among different Scyphomedusae jellyfish and could be an appropriate marker for molecular systematic studies at the species level. Additional in-depth studies with more samples are needed to further clarify the position of Scyphomedusae jellyfish in jellyfish taxonomy.

Key words: Scyphomedusae; ITS-5.8S rDNA; length variation; species identification; phylogenetic relationship

Corresponding author: DONG Jing. E-mail: dj660228@tom.com