

doi:10.3969/j.issn.2095-1736.2016.01.039

## 绿潮暴发期间我国青岛漂浮铜藻的分子鉴定

陈 军<sup>1,2</sup>, 王寅初<sup>1,2</sup>, 余秋瑢<sup>3</sup>, 毕燕会<sup>4</sup>, 何培民<sup>4</sup>, 刘正一<sup>1</sup>, 秦 松<sup>1</sup>

- (1. 中国科学院烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003;  
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 曲阜师范大学 生命科学学院, 山东 曲阜 273165;  
4. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

**摘 要** 2013年6月份,我国黄海连续第7年暴发绿潮灾害,同时出现了漂浮褐藻规模聚集现象,进一步增大了山东半岛绿潮防控工作的难度。为了对漂浮褐藻进行分子鉴定,采用PCR扩增和序列测定的方法,获得了漂浮褐藻的5.8S rDNA-ITS序列。通过与已经报道的其他马尾藻属5.8S rDNA-ITS序列比对及系统发育分析,对绿潮暴发期间山东青岛近海出现的漂浮褐藻样品进行了分子鉴定。结果表明:该漂浮褐藻的5.8S rDNA-ITS基因序列全长1366 bp,其中ITS1序列长度为647 bp,5.8S rDNA序列长度为155 bp,ITS2序列长度为717 bp。序列比对分析显示2013年绿潮暴发期间青岛海域的漂浮褐藻与我国浙江省和韩国江陵海区分布的铜藻样品遗传相似度高达99%。系统发育分析为马尾藻属铜藻(*Sargassum horneri*)。

**关键词** 漂浮铜藻; 5.8S rDNA-ITS; 分子鉴定; 青岛

中图分类号 Q949.28

文献标识码 A

文章编号 2095-1736(2016)01-0039-04

## Molecular phylogenetic analysis of floating *Sargassum horneri* associated with green tides in coastal area of Qingdao

CHEN Jun<sup>1,2</sup>, WANG Yin-chu<sup>1,2</sup>, YU Qiu-rong<sup>3</sup>, BI Yan-hui<sup>4</sup>,  
HE Pei-min<sup>4</sup>, LIU Zheng-yi<sup>1</sup>, QIN Song<sup>1</sup>

- (1. Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;  
3. College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165;  
4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract** In the Yellow Sea, large-scale green tides had broken out consecutively for seven years from 2007 to 2013. However, a small scale of floating brown algae appeared at the same time in coastal area of Shandong Peninsula, which gave more pressures including environmental impacts and economic losses. The 5.8S rDNA-ITS spacer regions of samples collected during the green tide were sequenced and analyzed. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis were performed to reveal the affinity between a Qingdao sample and four reported *Sargassum* samples. Results indicated that the genetic identity of the algae from the green tide was of 99% similarity with *Sargassum horneri* from the coastal area of Zhejiang province and Jiangling, Korea. Phylogenetic analysis revealed that the floating sample clustered with *Sargassum horneri* closely, which proved the floating brown algae in Qingdao accompanied with green tides, was *Sargassum horneri*.

**Keywords** floating *Sargassum horneri*; 5.8SrDNA-ITS; molecular phylogenetic analysis; Qingdao

铜藻(*Sargassum horneri*)属于褐藻门(Phaeophyta) 墨角藻目(Fucales)马尾藻属(*Sargassum* C. Agar-

收稿日期: 2015-06-02; 修回日期: 2015-07-22

资助项目: 国家自然科学基金项目(41176144, 41376139); 国家科技支撑计划(2013BAB01B01)资助; 中国科学院战略性先导科技专项(XDA1102040300)

作者简介: 陈 军, 硕士, 藻类分子生态学, E-mail: junchen@yic.ac.cn; 王寅初, 博士, 助理研究员, 主要从事藻类分子进化; 陈军和王寅初共同为本文第一作者;

通信作者: 秦 松, 研究员, 博士生导师, 主要从事分子藻类学, E-mail: sqin@yic.ac.cn.

dh)<sup>[1]</sup> ,是一种常见的大型海洋藻类 ,主要分布在我国浙闽地带<sup>[2]</sup> 。铜藻多生长在潮下带 -4 m 浅海岩礁或低潮带石沼 ,藻株高大 ,枝叶繁茂 ,气囊呈圆柱状。适温的季节里 ,铜藻借气囊漂浮于水面 ,在强光条件下 ,生长迅速。种群样方调查显示 ,它以有性生殖为主 ,藻体片段营养繁殖藻株约占种群总数的 5%<sup>[3]</sup> ,因此铜藻具有在一定条件下大面积漂浮生长的可能。

2008年6月下旬 ,我国黄海海域暴发大规模由浒苔引起的绿潮现象。监测绿潮过程中发现 ,在盐城海域出现一些浒苔团块中夹杂着少量褐藻<sup>[4]</sup> 。由于漂浮褐藻生物量较小 ,当时并未引起人们关注。2013年6月下旬 ,黄海海域连续第7年暴发绿潮灾害。海域中不仅出现大量漂浮生长的浒苔藻体 ,而且还夹杂着一些漂浮褐藻 ,其中青岛局部海域褐藻的分布数量约占浒苔数量的 20% ( <http://www.ncsb.gov.cn/n1/n70003/n70707/n70710/c84311/content.html> )。漂浮褐藻的出现进一步加大了山东半岛绿潮防控的难度。目前 ,国内外研究主要集中在对绿潮浒苔的发生机制、遗传起源等方面<sup>[5-7]</sup> ,对绿潮发生期间漂浮褐藻的研究仍然较少。

本研究中以 2013 年绿潮暴发期间采自我国青岛近海漂浮褐藻样品为材料 ,对其 5.8S rDNA-ITS 区进行了扩增、测定和分析 ,并与已报道的马尾藻属样品进行了遗传相似度的比较以及系统发育学分析 ,拟通过对 2013 年青岛绿潮期间出现的漂浮褐藻进行分子生物学鉴定 ,为漂浮褐藻的监测和控制提供参考信息。

## 1 材料和方法

采集样品后 ,利用相机(佳能 600D)拍摄藻体形态。然后取样品叶片或气囊 ,加液氮进行研磨 ,随后采用植物基因组试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA。经凝胶电泳检测合格后 ,分别采用 4 对引物对其 5.8S rDNA-ITS 扩增、测序、拼接。进行扩增的引物序列分别为 P<sub>1</sub>(F):(5'-CGAGTGGGCG-GAGGCTTTTTGTCT-3') 和 P<sub>1</sub>(R):(5'-ATCGCTGCGT-TCTTCATCGTTGTGG-3') ,P<sub>2</sub>(F):(5'-GCGACGGAT-GTCTTGGCT-3') 和 P<sub>2</sub>(R):(5'-CTTGCTT-GATCGGGGGA-3') ,P<sub>3</sub>(F):(5'-GCGAAGAAGCCGA-CAACCT-3') 和 P<sub>3</sub>(R):(5'-CTCCTCCTCCCCGA-CAAGC-3') ,P<sub>4</sub>(F):(5'-TACTGCCTGTTCGTCCTCCCTG-3') 和 P<sub>4</sub>(R):(5'-GGCTTCCTTCGCTTCCCTT-3')。

将测得的青岛漂浮褐藻样品序列和已报道的铜藻<sup>[8-9]</sup> 以及从美国国立生物技术信息中心(NCBI)下载的马尾藻属其他物种(海蒿子 *Sargassum confusum* ,灰白马尾藻 *Sargassum pallidum* ,海黍子 *Sargassum muticum* ,鼠尾藻 *Sargassum thunbergii* ,山德氏马尾藻 *Sargassum sandei*) 的 5.8S rDNA-ITS 序列用 Clustal W2 软

件<sup>[10]</sup> 进行比对分析 ,然后采用 MEGA 5.2.1 软件<sup>[11]</sup> 中的邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树 ,Bootstrap 值设定为 1000。

## 2 结果与分析

本研究观察了漂浮褐藻的形态特征 ,见图 1。藻体黄褐色 ,主杆圆柱形。叶基部的边缘向中肋处深裂 ,向上至叶尖则逐渐浅裂并变狭窄 ,叶尖微钝。气囊长纺锤形 ,两端尖细 ,从形态学上初步鉴定为马尾藻属铜藻<sup>[1]</sup>。



图 1 漂浮褐藻样品的形态特征

Fig 1 Morphological characteristics of floating brown algae collected in this study

本研究中青岛漂浮褐藻样品 5.8S rDNA-ITS 序列保守区域总长度为 1366 bp ,其中 ITS1 序列长度为 647 bp ,5.8S rDNA 序列长度为 155 bp ,ITS2 序列长度为 717 bp。通过序列比对分析发现 ,青岛漂浮褐藻样品的 5.8S rDNA-ITS 序列与文献中报道的分布在中国浙江海域的铜藻样品(DT01 和 HKA01)<sup>[8]</sup>、韩国江陵市海域铜藻样品(GenBank 登录号为 AY149998.1)序列并无明显区别 ,相似度达 99% ,与韩国仁川市海域铜藻样品(Genbank 登录号为 AY149999.1)序列也有较高的相似度(98%)。其中 ,青岛漂浮褐藻样品序列与样品 DT01 序列比对发现 ,共有 4 个变异位点(图 2)。由系统发育树(图 3)可见 ,青岛漂浮褐藻与参考序列 DT01 先聚为一枝 ,然后与参考序列 HKA01 聚为一枝。

蔡一凡等<sup>[8]</sup> 分别在浙江南麂岛、枸杞岛、洞头岛共采集养殖型、野生型、漂浮型铜藻 44 株。调查中发现分布于浙江枸杞岛的野生型铜藻和洞头岛的漂浮型铜藻以及南麂岛的养殖型铜藻和部分野生型铜藻 5.8S rDNA-ITS 序列完全一致 ,并将其命名为 DT01 ,而部分分布在浙江南麂岛的野生型铜藻基因型出现变异 ,其

序列命名为 HKA01。根据系统发育树聚类结果,青岛漂浮褐藻应为马尾藻属铜藻 (*Sargassum horneri*)。

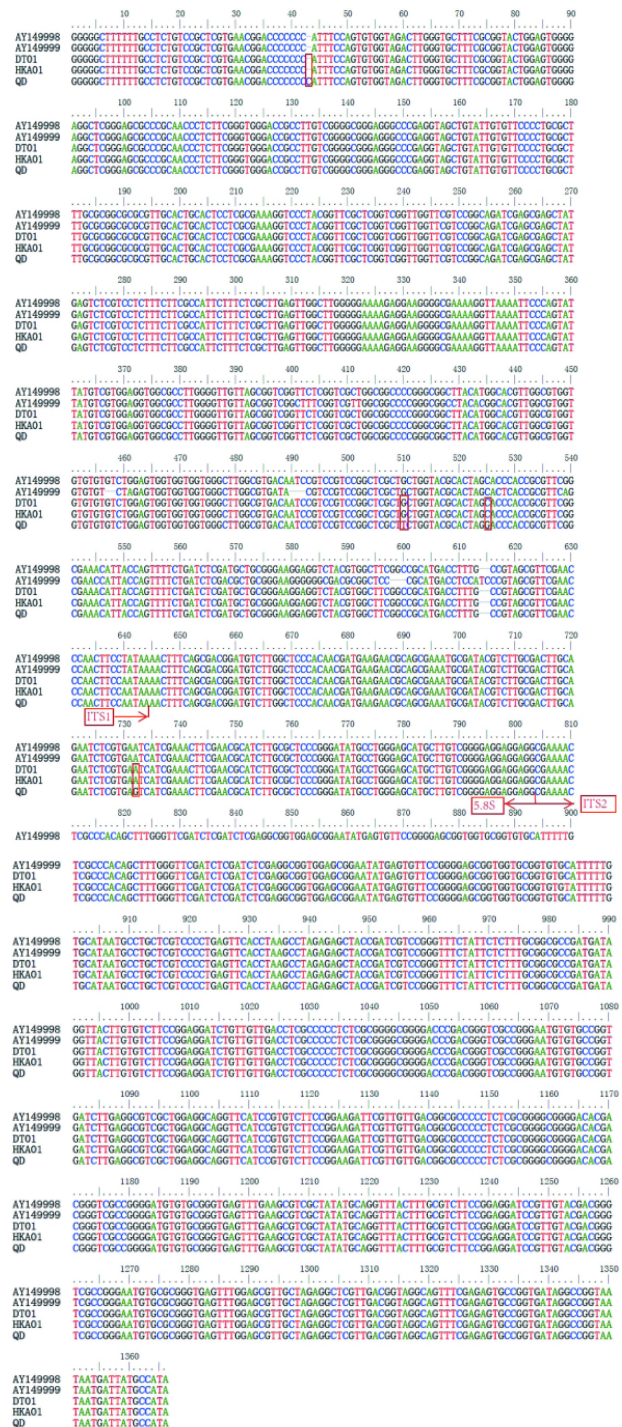


图2 青岛漂浮褐藻与已报道的铜藻 5.8S rDNA-ITS 序列比对结果  
Fig 2 Alignment of the 5.8S rDNA-ITS sequence from floating brown algae and *Sargassum horneri* reported

### 3 讨论

在海藻的分类系统上,由于海洋的开放环境和人类活动等因素影响,仅仅依靠藻体的形态、结构特征很难得到统一的结论,因此利用分子标记辅助进行海藻

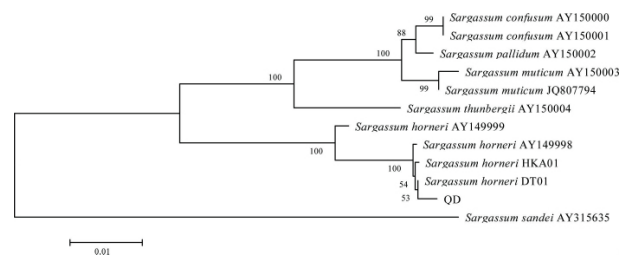


图3 基于 NJ 法构建的 5.8S rDNA-ITS 序列的系统进化树

Fig 3 Phylogenetic tree of 5.8S rDNA-ITS sequences constructed by NJ method  
QD 代表绿潮暴发期间青岛漂浮褐藻样品; 节点处数字代表重复 1000 次的自检值。

分类显得尤为重要<sup>[13-15]</sup>。ITS 序列包括 3 部分,分别为 18~5.8S 核糖体 RNA 基因之间的 ITS1、5.8S 以及 5.8S 与 28S 核糖体 RNA 基因之间的 ITS2 序列总和。该序列在种间水平上变异较大,能够提供比较丰富的变异位点,已被广泛用于马尾藻属等样品的物种鉴定及系统进化等研究<sup>[8-9, 16-17]</sup>。蔡永超等<sup>[18]</sup>基于 ITS2 序列对 2013 年 5 月在绿潮暴发期间采自我国江苏近海的漂浮褐藻进行了分子鉴定,发现该漂浮褐藻也为铜藻。我们利用本研究中的 ITS2 序列与蔡永超等<sup>[18]</sup>报道的我国江苏近海的漂浮铜藻 ITS2 序列比对分析,发现二者至少存在 8 个变异位点,说明 ITS 序列也可以作为马尾藻属种内系统发生研究的分子标记。由此也提示我们关注我国近海不同海区漂浮铜藻的种内遗传变异现象。

Hu 等<sup>[19]</sup>基于铜藻线粒体 *cox III* 对西北太平洋地区铜藻的生物地理分布及分布影响因子的研究中,提出在中国黄渤海、东海、南海地区的洋流及沿岸流的影响下,分布在 3 个海洋区系内的铜藻形成狭窄的遗传结构,不具备明显的异质性。同时, Komatsu<sup>[20-21]</sup>等通过 GPS 定位绑有漂浮藻类的浮标观测发现,春季到初夏期间,我国东海区域位于黑潮锋和大陆架之间的区域常有大片漂浮铜藻出现,进一步观察发现浮标于 5 月 4 日可到达日本九州东侧海域,另一处浮标则于 6 月 17 日到达韩国济州岛南端。由此引发我们思考,2013 年青岛漂浮铜藻的出现可能受黑潮影响。建议在今后的研究中,结合途经我国近海的海流分布,对地理范围分布更广的不同居群间的样品做进一步分析,探讨绿潮暴发期间青岛漂浮铜藻的发生原因及其遗传起源,为我国近海绿潮防控工作提供更多参考信息。

### 参考文献:

- [1] 曾呈奎, 陆保仁. 中国海藻志(第三卷褐藻门第二册墨角藻目) [M]. 北京: 科学出版社, 2000, 43-44.
- [2] 孙建璋, 庄定根, 王铁杆, 等. 南麂列岛铜藻的研究 [J]. 现代渔业信息, 2009, 24(5): 19-21.
- [3] 孙建璋, 陈万东, 庄定根, 等. 中国南麂列岛铜藻 *Sargassum horneri* 实地生态学的初步研究 [J]. 南方水产, 2008, 4(3): 58-63.



- [4] 易俊陶, 黄金田, 宋建联. 对盐城市沿海 2008 年浒苔发生情况的初步认识 [J]. 海洋环境科学, 2009, 28( S1 ): 57 - 58.
- [5] Ye N H, Zhang X W, Mao Y Z, et al. 'Green tides' are overwhelming the coastline of our blue planet: taking the world's largest example [J]. Ecological Research, 2011, 26( 3 ): 477 - 485.
- [6] Liu D Y, Kessing J K, He P, et al. The world's largest macroalgal bloom in the Yellow Sea, China: formation and implications [J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2013, 129: 2 - 10.
- [7] Pang S J, Liu F, Shan T F, et al. Tracking the algal origin of the *Ulva* bloom in the Yellow Sea by a combination of molecular, morphological and physiological analysis [J]. Marine Environmental Research, 2010, 69( 4 ): 207 - 215.
- [8] 蔡一凡, 张鹏, 王铁杆, 等. 基于 5.8S rDNA-ITS 序列的我国浙江沿海铜藻群体遗传多样性分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21: 147 - 154.
- [9] Oak J H, Suh Y, Lee I K. Phylogenetic relationships of *Sargassum* subgenus *Bactrophyucus* (Sargassaceae, Phaeophyceae) inferred from rDNA ITS sequences [J]. Algae, 2002, 17: 235 - 247.
- [10] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23( 21 ): 2947 - 2948.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28( 10 ): 2731 - 2739.
- [12] Ho C L, Phang S M, Pang T. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales) [J]. European Journal of Phycology, 1995, 30( 4 ): 273 - 280.
- [13] Ho C L, Phang S M, Pang T. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers [J]. Journal of Applied Phycology, 1995( 7 ): 33 - 41.
- [14] 李艳燕, 朱立静, 沈颂东, 等. 石莼目几种绿藻的 ITS 区和 5.8S rDNA 的序列及系统发育分析 [J]. 海洋学报, 2009, 31( 5 ): 162 - 166.
- [15] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2005, 360: 1889 - 1895.
- [16] 丁兰平, 马元元, 黄冰心. DNA 条形码技术在大型海藻学研究中的应用及前景 [J]. 海洋科学, 2012, 36( 11 ): 103 - 110.
- [17] 蔡永超, 孙彬, 马家海, 等. 我国南黄海海域漂浮铜藻的分子生物学鉴定 [J]. 海洋渔业, 2014, 36( 2 ): 102 - 106.
- [18] Hu Z M, Uwai S, Yu S H, et al. Phylogeographic heterogeneity of the brown macroalga *Sargassum horneri* (Fucales) in the northwestern Pacific in relation to late pleistocene glaciation and tectonic configurations [J]. Molecular Ecology, 2011, 20( 18 ): 3984 - 3999.
- [19] Komatsu T, Tatsukawa K, Filippi J B, et al. Distribution of drifting seaweeds in eastern East China Sea [J]. Journal of Marine Systems, 2007, 67: 245 - 252.
- [20] Komatsu T, Matsunaga D, Mikami A, et al. Abundance of drifting seaweeds in eastern East China Sea [J]. Journal of Applied Phycology, 2008, 20( 5 ): 801 - 809.

(上接 38 页)

- [3] Uppugundla N, da Costa Sousa L, Chundawat S P S, et al. A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX™ pretreated corn stover [J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 72.
- [4] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation [J]. Bioresource Technology, 2010, 101( 13 ): 4744 - 4753.
- [5] Saha B C, Nichols N N, Qureshi N, et al. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation [J]. Bioresource Technology, 2015, 175: 17 - 22.
- [6] Zhu J, Yang J, Zhu Y, et al. Cause analysis of the effects of acid-catalyzed steam-exploded corn stover prehydrolyzate on ethanol fermentation by *Pichia stipitis* CBS 5776 [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37( 11 ): 2215 - 2222.
- [7] Cavka A, Jönsson L J. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates using sodium borohydride [J]. Bioresource Technology, 2013, 136: 368 - 376.
- [8] Lee K M, Kim K Y, Choi O, et al. In situ detoxification of lignocellulosic hydrolysate using a surfactant for butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 [J]. Process Biochemistry, 2015, 50( 4 ): 630 - 635.
- [9] Jansson L J, Alriksson B, Nilvebrant N O. Bioconversion of lignocelluloses: inhibitors and detoxification [J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6( 1 ): 16.
- [10] 宋晓川, 储秋露, 朱均均, 等. 碳水化合物降解产物对酿酒酵母乙醇发酵的影响 [J]. 林产化学与工业, 2011, 31( 1 ): 9 - 12.
- [11] Limtong S, Sumpradit T, Kitpreechavnic V, et al. Effect of acetic acid on growth and ethanol fermentation of xylose fermenting yeast and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The Kasetsart Journal ( Natural Sciences ), 2000, 34( 1 ): 64 - 73.
- [12] 朱均均, 朱圆圆, 程婷, 等. 玉米秸秆乙酰基水解产物对乙醇发酵的影响及去除策略 [J]. 林产化学与工业, 2014, 34( 1 ): 1 - 7.
- [13] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition [J]. Bioresource Technology, 2000, 74( 1 ): 25 - 33.
- [14] Nishikawa N K, Sutcliffe R, Saddler J N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1988, 27( 5 ): 549 - 552.
- [15] Tran A V, Chambers R P. Lignin and extractives derived inhibitors in the 2,3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986, 23( 3 ): 191 - 197.
- [16] Ballesteros I, Ballesteros M, Cara C, et al. Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning [J]. Bioresource Technology, 2011, 102( 11 ): 6611 - 6616.
- [17] 陈尚钡, 勇强, 徐勇, 等. 玉米秸秆稀酸预处理的研究 [J]. 林产化学与工业, 2009, 29( 2 ): 27 - 32.
- [18] 朱均均, 陈尚钡, 勇强, 等. 玉米秸秆生物炼制燃料乙醇的研究 [J]. 林产化学与工业, 2011, 31( 6 ): 35 - 40.