

# 青岛沿海石莼属藻类暴发增殖的生物学调查与物种鉴定

王 健<sup>1</sup> 茅云翔<sup>1\*</sup> 孔凡娜<sup>1</sup> 高 珍<sup>2</sup> 郭盛华<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与基因资源利用教育部重点实验室, 青岛 266003)

(<sup>2</sup> 甘肃农业大学, 兰州 730070)

**摘 要** 2009 年 4 月下旬~6 月上旬, 青岛部分内湾发生漂浮绿藻暴发性生长。本文系统调查了绿潮藻华发生的区域, 以青岛湾为观测点估测了生物量, 其高峰期生物量可达 138 t。通过对漂浮绿藻的外观形态和显微结构观察, 鉴定漂浮绿藻的样本为长石莼 *Ulva linza*, 但漂浮绿藻样本与固着生长的长石莼在形态结构上有明显的不同, 主要表现为叶片宽大、细胞壁加厚。为确定其物种, 作者克隆了漂浮绿藻的 18S-28S rDNA 转录间隔区序列 (Internal Transcribed Spacer, ITS) 和 5S rDNA 串联重复间隔区序列 (5S rDNA Spacer Region, 5SS), 采用分子系统学方法确定漂浮绿藻样品为长石莼。本文首次报道了发生在青岛内湾的长石莼藻华, 同时观察到了长石莼为适应漂浮生活在形态结构上发生的适应性变化, 从而为阐释其发生机制提供依据。

**关键词** 长石莼 藻华 形态特征 显微结构 分子鉴定

**中图分类号** S946.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0086-08

## Biological investigation and species identification of *Ulva* bloomed along the coast of Qingdao

WANG Jian<sup>1</sup> MAO Yun-xiang<sup>1\*</sup> KONG Fan-na<sup>1</sup>  
GAO Zhen<sup>2</sup> GUO Sheng-hua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory for Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

**ABSTRACT** During late April to early June, 2009, free-floating green algae broke out in some inner bays of Qingdao. We investigated the coastal areas with green algae and found that the estimated biomass of *Ulva* blooms in Qingdao Bay reached 138 t at its peak time. Through morphological and microscopic examinations, the green algae samples were preliminarily identified as *Ulva linza*, though they possessed wider and longer thalli and thickened cell walls compared to the immobilized *Ulva linza*. PCR amplification and phylogenetic analysis of the 18S-28S rDNA internal transcribed spacer (ITS) and 5S rDNA spacer region (5SS) of the free-floating samples confirmed that the free-floating algae was *Ulva linza*. Morphological changes could help free-floating *Ulva linza* adapt to the new drifting life. This is the first time that the

国家科技支撑计划(2008BAC49B01)、青岛市科技发展计划(08-1-7-20-hy、09-2-5-3-hy)和山东省浒苔灾害应急配套项目共同资助

\* 通讯作者。E-mail: yxmao@ouc.edu.cn, Tel: (0532)82032017

收稿日期: 2010-05-07; 接受日期: 2010-06-09

作者简介: 王 健(1985-), 男, 硕士研究生, 主要从事藻类分子遗传学研究。E-mail: tingwj110@163.com, Tel: (0532)82031817

*Ulva linza* blooms in inner bays of Qingdao was reported.

**KEY WORDS** *Ulva linza* Algae blooms Morphological structure  
Microscopic structure Molecular identification

绿潮(Green tides)是绿藻门(Chlorophyta)大型海藻暴发性增殖,大规模在海面聚集、水中漂浮或岸线堆积,从而导致多方面次生危害的一种生态异常现象。自20世纪70年代初法国布列塔尼沿海首次报道以来,绿潮发生范围已遍及欧洲沿海、美国东西海岸、东亚和东南亚沿海以及澳大利亚等国,已成为世界性的海洋环境问题。能形成绿潮的藻类主要是石莼目 Ulvales 和刚毛藻目 Cladophorales 的藻类,其中石莼属 *Ulva* 藻类居多(Morand *et al.* 2005)。

2007年以来我国黄海中南部连年暴发以浒苔 *Ulva prolifera* 为主的超大规模绿潮,其生物量以百万 t 计,影响海域范围达数十万平方公里。浒苔绿潮一般在5月上旬开始出现于长江口以北的黄海南部海域,随后在风场和海流的作用下向北移动并迅速积累生物量,至6月下旬到达位于黄海中部的青岛沿岸。因此,对山东半岛而言浒苔绿潮为异源性绿潮(Sun *et al.* 2008)。但2009年4月下旬~6月上旬在浒苔绿潮来临之前,本实验室观察到青岛沿海部分内湾水体发生叶片状漂浮绿藻暴发性增殖现象,并在海浪冲积下形成海滩堆积,对海岸环境造成了影响。作者实地调查了发生在青岛海滨内湾的绿潮,估测了生物量,并对绿潮藻的种类进行形态学和分子生物学鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 调查取样与生物量测定

沿青岛市区海岸线开展绿潮发生情况调查,包括胶州湾东南部海岸线和从团岛至石老人的前海海岸线( $36^{\circ}3'2''\sim 36^{\circ}5'15''\text{N}$ ,  $120^{\circ}17'22''\sim 120^{\circ}27'41''\text{E}$ ),选择了10个位点作为重点调查站位(图1),各站位自然环境状况见表1。

在海藻较为密集的青岛湾和台湾路海预宾馆采集了漂浮生长的样本(青岛湾漂浮样本2009年6月9日采集,编号ZQK;海预宾馆漂浮样本2009年6月17日采集,编号TWLK),同时使用了3个地点形态上类似的固着生长的长石莼样本作为对照,分别采集自山东日照灯塔景区( $35^{\circ}23.736'\text{N}$ ,  $119^{\circ}33.714'\text{E}$ ;2009年4月22日采集,编号RZ)、团岛湾(2009年6月17日采集,编号TD)、台湾路海预宾馆(2009年3月12日采集,编号TWL)。

#### 1.1.1 生物量测定方法

测量时间选择在退潮时。在低、中、高潮位各随机选取3个点,用自制取样框收集海藻,去除藻体表面自由水分后称重,计算单位面积的鲜藻生物量;估测暴发绿藻的覆盖面积后与之相乘,即得到该区域绿藻的总生物量。

### 1.2 形态特征观察

采集的样品包括调查站点水体漂浮、岸线堆积和固着生长的绿藻。形态特征观察包括测量藻体的长度、宽度和厚度,观察并测量细胞的形态、排列方式和大小。具体操作方式是挑选形态完整的藻体,以灭菌海水清洗,拍摄并测量藻体长度和宽度;使用Leica CM1850冷冻切片机进行切片,切片厚度 $10\mu\text{m}$ ,用Olympus CX31



绿色图标表示有大量绿藻漂浮堆积的站位,蓝色图标表示未见大规模绿藻堆积的站位  
Green-colored sites are with algal bloom, blue-colored sites are without algal bloom

图1 绿潮发生情况调查站位

Fig. 1 Sites for *Ulva* blooms investigation

表 1 调查站位地理及地质信息

Table 1 Geographic and geological information of the survey sites

调查站点所在区域 Site location	经纬度 Latitude and longitude	岸线地貌特征 Geomorphologic characteristics of the coast
中港 ZG	36°4'53"N, 120°18'36"E	胶州湾内人工岸线, 坡度陡, 外围人工堤坝, 风浪弱
轮渡 LD	36°4'10"N, 120°18'02"E	胶州湾内人工岸线, 坡度陡, 风浪弱
污水处理厂 WT	36°3'47"N, 120°17'22"E	胶州湾内人工岸线, 坡度陡, 风浪弱
团岛湾 TD	36°3'02"N, 120°17'18"E	沙滩礁石, 坡度缓, 半封闭海湾, 海流缓, 常有风浪
青岛湾 QD	36°3'42"N, 120°18'54"E	沙滩礁石, 坡度缓, 半封闭海湾, 海流缓, 常有风浪
汇泉湾 HQ	36°3'01"N, 120°20'25"E	沙滩, 坡度缓, 半开放海湾, 海流缓, 常有风浪
太平湾 TP	36°2'58"N, 120°20'34"E	沙滩, 坡度缓, 半开放海湾, 海流缓, 常有风浪
第三浴场 SY	36°2'58"N, 120°20'41"E	沙滩礁石, 坡度缓, 半开放海湾, 常有风浪
海预宾馆 HY	36°3'32"N, 120°24'26"E	天然沙滩, 坡度平缓, 半开放海湾, 常有风浪
石老人浴场 SLR	36°5'15"N, 120°27'41"E	天然沙滩, 坡度平缓, 开放海湾, 海流大

显微镜进行显微观察并用自带的显微照相系统拍摄。

### 1.3 分子生物学鉴定

本研究选用 18S-28S rDNA 转录间隔区序列(ITS)和 5S rDNA 串联重复间隔区序列(5SS)作为确认物种系统发生位置的靶位点。采用 CTAB 法(Murray *et al.* 1980; Porebski *et al.* 1997)提取 5 个样本的绿藻总 DNA。扩增引物由上海博尚生物技术有限公司合成(表 2)。

PCR 反应体系总体积为 20 $\mu$ l, 各组分包括 ddH<sub>2</sub>O 12 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR Buffer 2 $\mu$ l, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6 $\mu$ l, 2mmol/L dNTPs 1.2 $\mu$ l, 10mmol/L 正反向引物(10mmol/L)各 1 $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶(Transgen)0.2 $\mu$ l, 样本总 DNA 1 $\mu$ l。扩增 ITS 序列的反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min; 变性 94 $^{\circ}$ C 1min, 复性 54 $^{\circ}$ C 1min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 5min。扩增 5SS 序列的反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5min; 变性 94 $^{\circ}$ C 1min, 复性 50 $^{\circ}$ C 1min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30s, 循环 30 次; 最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 5min。

PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离, 使用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒(TaKaRa)回收片段, 与 pMD18-T 载体(TaKaRa)连接并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑选阳性克隆经检测确认后送样测序(北京六合华大基因科技公司)。

采用 NCBI blastn 在线程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行核酸序列同源性分析。多序列对位分析采用 BioEdit(Version 7.0.5.2)包含的 ClustalW package(参数设定为 Gap open penalty=15, Gap extend penalty=6.66)。系统进化树重建采用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)(PHYMLIP 3.68)和邻接法(Neighbor-Joining, NJ)(MEGA 4.0)构建系统树。序列分歧度采用 Lasergene 7.1 中的 Megalign 计算。

## 2 结果

### 2.1 绿藻暴发区域及生物量

与浒苔绿潮暴发时大量藻体浮于海表面的情况不同, 本次调查的绿藻主要悬浮于水体中。高潮位时, 大部分藻聚积悬浮于近岸浅水区, 形成一条宽度约为 40~60m 的“绿藻密集带”, 岸线陆基侧有少量堆积; 退潮时, 整个潮间带均被绿藻所覆盖(图 2)。

表 2 PCR 引物序列

Table 2 Primers for PCR

扩增位点 Locus for amplification	引物序列 Primer sequence
18S-28S rDNA ITS	ITS4; 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ITS5; 5'-GGCAATAACAGGTCTGT-3'
5S rDNA spacer	5S_space_F; 5'-GGTTGGGCAGGATTAGTA-3' 5S_space_R; 5'-AGGCTTAAGTTGCGAGTT-3'



图 2 青岛湾(栈桥东侧)绿藻暴发场景

Fig. 2 Green algae blooms in Qingdao Bay (East of Zhanqiao Pier)

调查的 10 个站位中,有 6 个站位发现较高生物量的薄片状漂浮绿藻,这些站点均位于青岛前海一线的一半封闭海湾内(图 1),具有坡度较缓而宽阔的潮间带;而胶州湾内人工垂直岸线的 3 个站点和海面开阔、海流较大的石老人浴场站点未发现漂浮绿藻。其中青岛湾(QD)栈桥两侧是绿藻分布最为密集的区域(图 2),平均单位面积鲜藻重量可达 1 851. 79g/m<sup>2</sup>,估测总生物量可达 138t 左右(表 3)。

表 3 青岛湾漂浮绿藻生物量(2009 年 6 月 23 日)  
Table 3 Biomass of floating *Ulva* in Qingdao Bay (June 23, 2009)

潮位 Tide zone	单位面积鲜藻 <i>Ulva</i> in unit area (g/m <sup>2</sup> )	覆盖面积 Area (m <sup>2</sup> )	生物量 Biomass (kg)	合计 Total (kg)
高潮带与潮上带 High-tidal and supra-tidal zone	1 033. 69±447. 61	~15 000	15 505. 35	
中潮带 Middle-tidal zone	3 064. 91±545. 93	~30 000	91 947. 30	~138 000
低潮带与潮下带 Low-tidal and sub-tidal zone	1 047. 72±762. 96	~30 000	31 431. 60	

调查发现绿藻的生物量随季节而变化(表 4)。4 月下旬,随着海水温度的逐渐上升,在部分海湾出现漂浮绿藻,随后生物量逐渐增加,至 6 月下旬达到最大生物量

## 2.2 漂浮石莼形态特征

通过外观特征和显微结构观察,初步鉴定漂浮绿藻为长石莼 *U. linza*。但与固着生长的长石莼比较,可以看出二者从外观形态到显微结构均存在明显的差异。

表 4 调查站位绿藻生物量  
Table 4 *Ulva* biomass at different sites

日期 Date	地点 Location									
	SLR	ZG	LD	WS	TD	QD	HQ	TP	SY	HY
04-22	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
05-05	-	-	-	-	++	+	+	+	++	-
05-21	-	-	-	+	+++	++	++	+	++	-
06-07	-	-	-	+	+++	++	++	+	++	-
06-23	-	-	-	+	+++	++	++	+	+++	-

+:有漂浮绿藻,生物量<1 000kg; ++:1 000kg<生物量<10 000kg; +++:生物量>10 000kg;-:未观察到漂浮绿藻

+:Free-floating *Ulva* existed,biomass<1 000kg; ++:1 000kg<biomass<10 000kg; +++:biomass>10 000kg;-:No free-floating *Ulva*

existed

### 2.2.1 外观形态

漂浮绿藻的色泽呈翠绿色,藻体为片状,膜质,倒三角形或披针形,顶部较圆钝,基部尖细,边缘具波状皱褶。这些特征与固着长石莼的典型形态特征相符。但漂浮长石莼叶片的宽度明显宽于固着生长的长石莼,二者长宽比有显著差异,前者为  $2.94 \pm 0.37$ ,而后者为  $7.29 \pm 2.08$ (图 3)。

### 2.2.2 显微结构

显微结构观察显示,漂浮绿藻的细胞近似多边形,直径  $8 \sim 12 \mu\text{m}$ ,排列不规则。横切面观察显示,基部为管状中空单层细胞,由基部向顶部延伸单层细胞逐渐“贴合”到一起成为双层片状结构,边缘则没有完全“贴合”,形成似漏勺的环状结构。这种形态是长石莼 *U. linza* 最显著的特点(Tseng 1983, 马家海等 2009)。

但漂浮与固着长石莼在显微结构上有明显的差别。漂浮长石莼单层叶片厚度、细胞长度明显较固着类型加厚,单层叶片厚度约为后者的两倍,细胞长度约比后者长 20%。所以,相比而言细胞壁的加厚程度是最显著的,测量方法见图 5,具体数据见表 5(漂浮与固着长石莼藻体各取 3 个样本进行测量)。

## 2.3 漂浮绿藻的分子鉴定

### 2.3.1 基于 ITS 序列的聚类结果

将克隆得到的 5 条 ITS 序列与石莼属亲缘关系最近的 6 个种的 20 条 ITS 序列一起构建系统发生树,以狭带藻 *Percursaria percursa* 的 ITS 序列(含 5.8S rDNA)作为外群。结果显示,本研究克隆的 5 条 ITS 序列与 *U. prolifera*、*U. procera* 和 *U. linza* 聚类,构成了 *U. linza-procera-prolifera* 复合枝(LPP complex)(Shimada *et al.* 2008),由此可以初步判定所研究的样本为上述 3 个物种之一。但对漂浮绿藻的种类进行确认则仍需要进一步的研究。

### 2.3.2 基于 5SS 序列的鉴定结果

本研究克隆的 5 条 5SS 序列,与长石莼的 5SS 序列长度相仿,为 260bp 左右,而浒苔的 5SS 序列长度约为 380bp,相差较大;序列分歧度的数据显示,5 条 5SS 序列与长石莼的 5SS 序列平均分歧度仅为 2.20%,而与浒苔的 5SS 序列平均分歧度达到了 10.81%;将这 5 条 5SS 序列与目前公共核酸数据库 GenBank 中所有绿藻的 5SS 序列(长石莼 19 条,浒苔 31 条)一同建立系统发生树,为节省篇幅,本文提供部分 5SS 序列的 NJ 系统树的树型图(图 7)。从图 7 中可以看出浒苔和长石莼分别聚类,而本文研究的 5 个样品均与长石莼组聚到了一起。因此可以确定本文研究的漂浮绿藻不是浒苔;同时,迄今为止未见在我国沿海存在 *U. procera* 的记

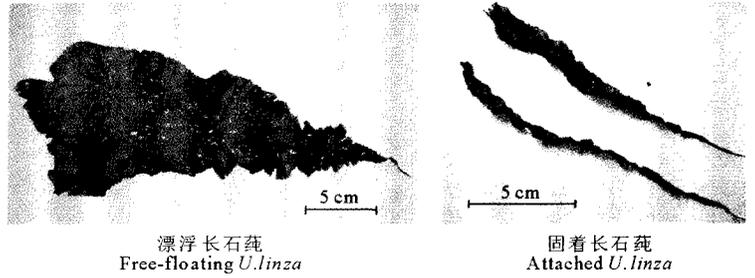


图 3 漂浮长石莼与固着长石莼外观形态比较  
Fig. 3 Morphological comparison between free-floating and immobilized *U. linza*

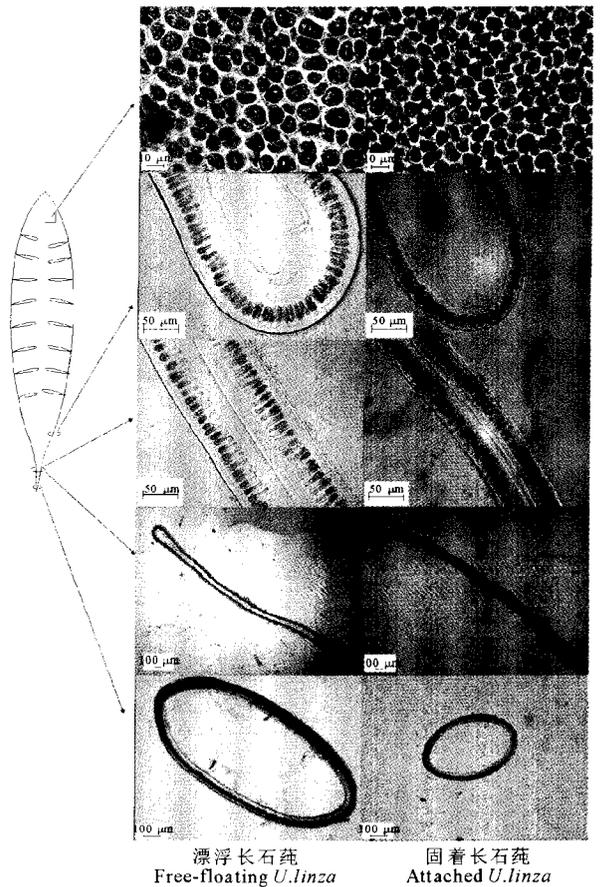


图 4 漂浮长石莼与固着长石莼显微结构比较  
Fig. 4 Micro-morphology comparison between free-floating and immobilized *U. linza*

录(Tseng 1983; 隋战鹰 2005; 刘东艳等 1999; 张耀红 1993; 杨 震等 2009), 另有国外报道提及, *U. pro-cera* 结构与浒苔类似, 是高度分枝的(Tan *et al.* 1999)。因此, 我们基本可以确定 2009 年造成青岛内湾绿藻藻华的物种为长石莼。

### 3 讨论

#### 3.1 长石莼藻华暴发的原因分析

长石莼广泛分布于世界各地, 在许多沿岸地带为生长优势种(王 晗等 2009; 李熙宜等 1987)。研究表明, 长石莼有较强的环境适应能力, 对水温、盐度和光照的适应范围很广, 在 2.5m 水深下仍然能很好的生长, 保证了其在潮间带的较大范围内都能很好的生长繁殖(李 德等 2009)。马家海等(2009)指出长石莼有无性生殖和单性生殖两种繁殖方式, 可以产生数量可观的孢子和配子, 这些孢子和配子能迅速长出新的藻体, 使漂浮藻体数量剧增, 形成绿藻藻华。

石莼科的一些藻类具有较强的异种克生作用, 能够抑制其他藻类的生长及采食者幼虫的发育, 也能显著抑制其表面附生藻类的生长, 同时自身又有很强的抗逆能力(Nelson *et al.* 2003a; 孙修涛等 2008); 长石莼就能显著抑制甚至杀死引发赤潮的东海原甲藻 *Prorocentrum donghaiense* 和赤潮异湾藻 *Heterosigma akashiwo* (Wang *et al.* 2007; 许 妍等 2005)。这种强克生作用, 使长石莼与其他潮间带藻类争夺生存空间时占据了优势, 也是其能大量繁殖的原因之一。

除自身具备较强的适应能力和竞争能力外, 适宜的环境因素也为长石莼藻华暴发提供了客观条件。Hiraoka 等(2004)指出, 少风浪的浅水条件是绿潮暴发的原因之一, 在泥泞或砂质的底质中, 绿潮藻类更易滋生。而青岛内湾在春、夏季节风浪小, 海岸线坡度缓、浅水区大, 聚集海藻最多的栈桥东侧为淤泥和砂石混合底质, 刚好符合这些条件。

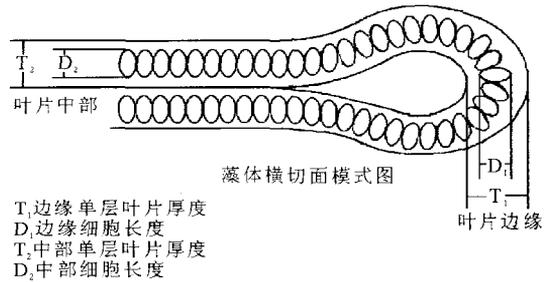
有报道指出, 海水中 N 元素的含量, 是绿潮藻类大量繁殖的限制因素(Morand *et al.* 1996; Nelson *et al.* 2003b; Valiela *et al.* 1997; 夏 斌等 2009), 高 N 水质给绿潮藻类的繁殖提供了条件。积聚藻量最多的栈桥东侧有排污口, 大量富含营养元素的废水排入海中, 风平浪静的环境下使水交换较慢, 造成了栈桥两侧近岸海水局部富营养化, 可能也给长石莼大规模爆发性生长提供了条件。

与异源性浒苔绿潮不同, 长石莼藻华的发生表明青岛近岸局部海域富营养化情况已比较严重, 应采取切实有效的措施减少 N、P 的排放。

#### 3.3 漂浮长石莼形态变异

石莼属藻类在形态上有着很好的可塑性, 能够通过形态的改变适应环境的变化。形态学观察发现, 漂浮长石莼的叶片明显较固着生长的长石莼宽大, 使叶片比表面积明显增大, 这可能有助于其光合作用和营养的吸收(Blomster *et al.* 2002)。

显微结构观察发现, 漂浮长石莼的细胞壁较固着样品明显加厚, 这可能是对于漂浮生活的一种适应。



T<sub>1</sub>: Thickness of marginal part of monostromatic blade  
 T<sub>2</sub>: Thickness of middle part of monostromatic blade  
 D<sub>1</sub>: Cell length of marginal part of monostromatic blade  
 D<sub>2</sub>: Cell length of middle part of monostromatic blade  
 叶片中部: Marginal part of monostromatic blade  
 藻体横切面模式图: Model structure of monostromatic blade (transsection)  
 叶片边缘: Middle part of monostromatic blade

图 5 单层叶片厚度、细胞长度测量方法(横切面)  
 Fig. 5 Measurement of monostromatic blade thickness and cell length (transsection)

表 5 单层叶片厚度、细胞长度测量数据(横切面, 单位: μm)  
 Table 5 Statistics of monostromatic blade thickness and cell length (transsection, unit: μm)

	漂浮长石莼 Free-floating <i>U. linza</i>	固着长石莼 Immobilized <i>U. linza</i>
T <sub>1</sub>	70.16 ± 2.42	32.80 ± 1.68
D <sub>1</sub>	25.81 ± 1.40	19.62 ± 0.47
T <sub>2</sub>	68.82 ± 2.46	40.59 ± 1.23
D <sub>2</sub>	30.65 ± 2.13	24.73 ± 2.03

Callow(2000)指出,浒苔类附着于底质的过程与糖蛋白和其他细胞壁上的小型元件相耦联,表现出了藻细胞生长与附着底质过程的连续性,实际上是细胞壁的衍生性生长过程,据此推测漂浮长石莼细胞壁加厚是由于无法营固着生长而引发的一种代偿性的增生。在正常情况下营固着生长的长石莼发生大规模漂浮生长的原因尚有待深入研究。

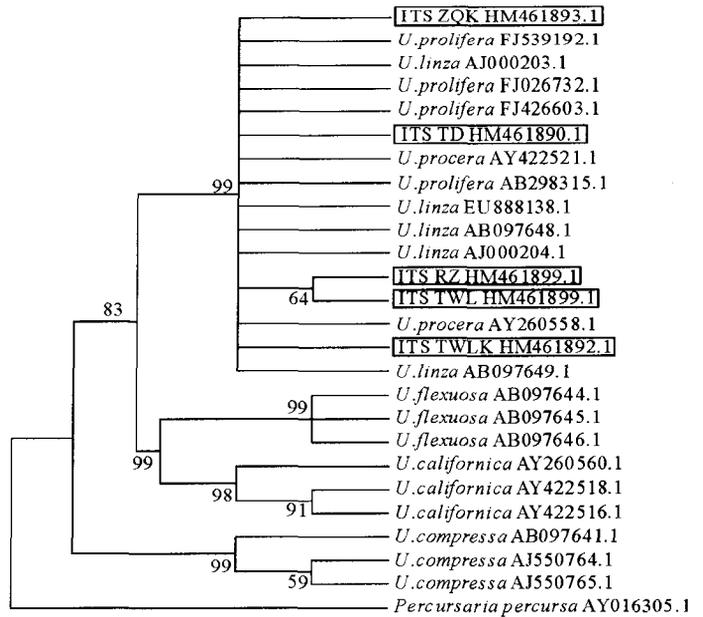
### 3.4 漂浮长石莼的来源推测

长石莼的藻体大部分都是双层片状结构,无法像 2008 年黄海绿潮时管状结构的浒苔那样通过呼吸和光合作用产生的气体在管状结构的内部形成气囊,使自身密度小于海水从而飘浮于水面,仅能随着海浪的翻滚作用从海底上浮,在远离近岸时会因海水的垂直流动减弱而沉降到光线昏暗的水底,使藻体光合作用受到抑制直至死亡,很难随海流进行长距离的漂流运输;虽然在 2008 年黄海绿潮时从海上漂来的浒苔中也发现了少量夹杂的长石莼(马家海等 2009),但其依靠的是周围大量浒苔的承托作用。因此我们认为,这些飘浮生长的绿藻的应该是本地起源的。

### 3.4 绿潮藻分类鉴定

目前绿潮藻类的分类主要采用分子分类方法,原因是形态学分类存在着一些困难,一些石莼属藻类形态接近,在显微镜下一些绿潮藻类的细胞较为接近,比较难以区分。更为困难的是,一些种类在大量繁殖时随着生长环境的不同,形态上会发生较大的变化(Blomster *et al.* 2002; Valiela *et al.* 1997),所以目前主要依靠分子方法对绿潮藻类进行准确的鉴定。在藻类分子鉴定中,ITS 序列被广泛应用于藻类鉴定工作(Blomster *et al.* 2002; Leliaert *et al.*

2009; Shimada *et al.* 2008; Tan *et al.* 1999; 张晓雯等 2008),其特点是变异度高,即使是亲缘关系很近的物种也会有较明显的差异;当然它的缺点也很明显,即变异度太大,不同地区的同种间也会有不同程度的变异(汪文俊等 2008)。本研究中,ITS 序列能够顺利地将 LPP 复合枝中的 3 种绿藻与同属内其他绿藻区分开来,表现出了其在绿藻分子分类学中的重要作用,但对 LPP 复合枝中的物种无法起到很好的辨别作用。所以,本研究还借助于 5SS 序列的帮助,成功地将长石莼和浒苔区分开来。通过遗传距离(Kimura-2-parameter distance)的计算,我们发现长石莼与浒苔的 5SS 序列最小种间遗传距离为 0.098 2,而各自的最大种内遗传距离

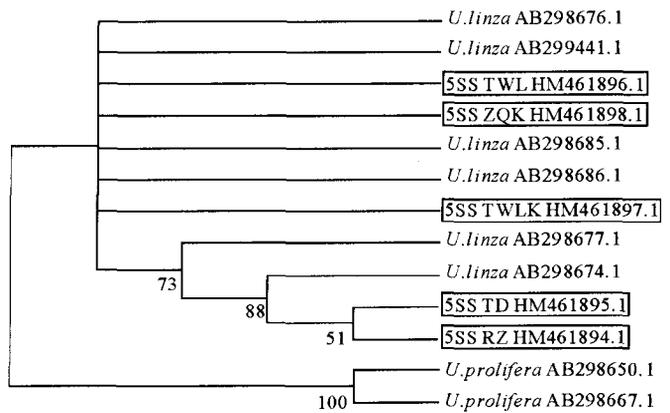


(忽略 Bootstrap 支持度低于 50 的分支)

(Nodes with bootstrap values of less than 50% are not labeled)

图 6 以 ITS 序列构建的 NJ 系统树

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



(忽略 Bootstrap 支持度低于 50 的分支)

(Nodes with bootstrap values of less than 50% are not labeled)

图 7 以 5SS 序列构建的 NJ 系统树

Fig. 7 Phylogenetic tree of 5SS DNA sequences constructed by NJ method

分别为 0.052 6 和 0.028 6, 完全可以达到区分二者的目的。Shimada 等(2008)指出, 5SS 序列的变异度是 ITS 的 10 倍, 结合我们的实践证明, 是一段可以用来鉴定藻种的有用序列。

## 参 考 文 献

- 马家海, 陆勤勤, 嵇嘉民, 徐 韧, 何培民, 张天夫, 王晓坤, 李宇航, 任 松, 许 璞. 2009. 长石莼(缘管浒苔)生活史的初步研究. 水产学报, 33(1): 45~52
- 王 晗, 王宏伟. 2009. 辽宁沿海浒苔属的调查研究. 安徽农业科学, 37(6): 2 676~2 678, 2 710
- 刘东艳, 王梓瑶, 孙 军, 黄泽德, 钱树本. 1999. 青岛市沿岸潮间带底栖海藻群落的初步研究. 海洋湖沼通报, 3: 35~40
- 孙修涛, 王翔宇, 汪文俊, 王飞久, 刘 淇. 2008. 绿潮中浒苔的抗逆能力和药物灭杀效果初探. 海洋水产研究, 29: 130~136
- 许 妍, 董双林, 于晓明. 2005. 缘管浒苔对赤潮异弯藻的克生效应. 生态学报, 25: 2 681~2 685
- 张晓雯, 毛玉泽, 庄志猛, 柳淑芳, 王清印, 叶乃好. 2008. 黄海绿潮浒苔的形态学观察及分子鉴定. 中国水产科学, 15: 822~829
- 张耀红. 1993. 青岛小青岛海区底栖海藻研究. 海洋湖沼通报, 3: 75~82
- 李熙宜, 陈本洲, 卞正和. 1987. 长山列岛底栖海藻的分布和丰盛度. 大连水产学院学报, 11~20
- 李 德, 周 亮, 林东年. 2009. 生态因子对缘管浒苔生长和孢子附着的影响. 现代渔业信息, 24(5): 22~24
- 杨 震, 王 悠, 董开升, 唐学玺, 赵 星. 2009. 青岛潮间带大型底栖海藻群落的研究. 中国海洋大学学报, 39(4): 647~651
- 汪文俊, 王飞久, 陈松林, 孙修涛, 王翔宇, 邢士超, 王 俊. 2008. 浒苔 ITS 区的扩增和分析. 海洋水产研究, 29(5): 124~129
- 夏 斌, 马绍赛, 崔 毅, 陈碧鹃, 陈聚法, 宋云利, 毛玉泽, 蒋增杰. 2009. 黄海绿潮(浒苔)暴发区温盐、溶解氧和营养盐的分布特征及其与绿潮发生的关系. 渔业科学进展, 30(5): 94~101
- 隋战鹰. 2005. 黄、渤海辽宁海区底栖海藻的研究. 海洋湖沼通报, 3: 57~65
- Blomster, J., Back, S., Fewer, D. P., Kiirikki, M., Lehvo, A., Maggs, C. A., and Stanhope, M. J. 2002. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. *Am. J. Bot.* 89: 1 756~1 763
- Callow, J. A., Stanley, M. S., Wetherbee, R., and Callow, M. E. 2000. Cellular and molecular approaches to understanding primary adhesion in *Enteromorpha*: an overview. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 16(2): 141~150
- Hiraoka, M., Ohno, M., Kawaguchi, S., and Yoshida, G. 2004. Crossing test among floating *Ulva* thalli forming 'green tide' in Japan. *Hydrobiologia*, 512: 239~245
- Leliaert, F., Zhang, X., Ye, N., Malta, E., Engelen, A. H., Mineur, F., Verbruggen, H., and De Clerck, O. 2009. Identity of the Qingdao algal bloom. *Phycological Research*, 57: 147~151
- Morand, P., and Briand, X. 1996. Excessive growth of macroalgae: a symptom of environmental disturbance. *Botanica Marina*, 39: 491~516
- Morand, P., and Merceron, M. 2005. Macroalgal population and sustainability. *Journal of Coastal Research*, 21: 1 009~1 020
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4 321~4 326
- Nelson, T. A., Lee, D. J., and Smith, B. C. 2003a. Are "green tides" harmful algal blooms? Toxic properties of water-soluble extracts from two bloom-forming macroalgae, *Ulva fenestrata* and *Ulvaria obscura* (Ulvophyceae). *J. Phycol.* 39: 874~879
- Nelson, T. A., Nelson, A. V., and Tjoelker, M. 2003b. Seasonal and spatial patterns of "green tides" (ulvoid algal blooms) and related water quality parameters in the coastal waters of Washington State, USA. *Botanica Marina*, 46: 263~275
- Porebski, S., Bailey, L., and Baum, B. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8~15
- Shimada, S., Yokoyama, N., Arai, S., and Hiraoka, M. 2008. Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. *J. Appl. Phycol.* 20: 979~989
- Sun, S., Wang, F., Li, C., Qin, S., Zhou, M., Ding, L., Pang, S., Duan, D., Wang, G., and Yin, B. 2008. Emerging challenges: Massive green algae blooms in the Yellow Sea. *Nature Precedings*, hdl:10101/npre.12008.12266.10101
- Tan, I. H., Blomster, J., Hansen, G., Leskinen, E., Maggs, C. A., Mann, D. G., Sluiman, H. J., and Stanhope, M. J. 1999. Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha*. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1 011~1 018
- Tseng, C. K. 1983. *Common seaweeds of China*. Beijing, China: Science Press, 250~266
- Valiela, I., McClelland, J., Hauxwell, J., Behr, P., Hersh, D., and Foreman, K. 1997. Macroalgal blooms in shallow estuaries: controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnology and Oceanography*, 42(2): 1 105~1 118
- Wang, R., Xiao, H., Wang, Y., Zhou, W., and Tang, X. 2007. Effects of three macroalgae, *Ulva linza* (Chlorophyta), *Corallina pilulifera* (Rhodophyta) and *Sargassum thunbergii* (Phaeophyta) on the growth of the red tide microalga *Prorocentrum donghaiense* under laboratory conditions. *J. Sea Research*, 58: 189~197