

2008 年黄海浒苔绿潮 ISSR 标记溯源分析*

刘晨临¹, 王秀良², 刘胜浩¹, 丛柏林¹, 黄晓航¹, 王宗灵¹,
林学政¹, 臧家业¹

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所海洋生态中心, 山东 青岛 266061; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用简单序列重复区间扩增多态性标记 (ISSR), 对 2008 年绿潮暴发期间我国黄海近海漂浮浒苔样品, 以及青岛、大丰和温州等地对虾养殖池塘的浒苔样品进行种群间亲缘关系分析。结果表明青岛海域的漂浮绿潮浒苔与南黄海海域的漂浮绿潮浒苔遗传相似度达到 0.95, 应属于同一种; 此外沿海养殖池塘间尽管存在地理间隔, ISSR 标记分析表明其生长的浒苔亲缘关系很近, 应属于同一种类; 尽管养殖池塘生长的浒苔与暴发漂浮浒苔形态极其相似, 但 ISSR 标记遗传分析显示两者遗传距离较远, 应属于不同种类。因此, 认为暴发绿潮浒苔的最初来源不是对虾养殖池塘内生长的浒苔。

关键词: 绿潮; 浒苔; ISSR; 分子标记溯源

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2011)02-0235-06

2008 年 5 月在黄海南部暴发、6 月中旬开始在青岛沿海高密度聚集的浒苔绿潮是至今我国海域面积最大、危害最为严重的一次绿潮。该次绿潮影响海域面积超过 $2 \times 10^4 \text{ km}^2$, 浒苔总生物量达 $100 \times 10^4 \text{ t}$, 仅青岛近海就打捞超过 $79 \times 10^4 \text{ t}$, 是一次世界少见的严重绿潮事件^[1]。丁兰平等根据该绿藻的形态等特征, 鉴定其为绿藻门石莼目石莼科浒苔属的浒苔, 学名为 *Enteromorpha prolifera*^[2]。它属于广温、广盐、耐干露性强的大型海藻, 为世界性藻类, 生长于世界海洋、河口以及海陆结合部的咸淡水交汇生境中。自然分布于俄罗斯远东海岸、日本群岛、马来群岛和欧洲沿岸等海域。我国各海区均有分布, 属东海海域优势种, 是青岛的习见种^[3]。此前, 绿潮在我国因危害较少未受到重视, 目前关于此次近海绿潮形成原因、暴发过程还不甚明确。因此研究此次绿潮暴发时不同海域浒苔的地理亲缘关系, 将有助于了解绿潮的起源, 为以后的防灾、减灾工作提供帮助。

分子标记的手段已经被广泛地应用于海藻的群体遗传学、生物地理系统学、亲缘关系鉴定、杂种优势和种质鉴定等项研究中。相对于其它分子标记手段, 简单序列重复区间扩增多态性标记 (ISSR) 的技术难度、可重复性以及成本都处于中等水平; ISSR 利用人工合成的 16~18 个核苷酸重复序列作为引物, 在引物的 3' 端或 5' 端加上 2~4 个随机选择但通常是简单的核苷酸, 对简单重复序列之间的 DNA 序列进行 PCR 扩增; 相比较其它 DNA 分子标记方法, ISSR 的引物设计简单, 不需知道所研究目标物种的基因组序列信息即可用引物进行扩增, 具有多态性高、重复性好等特点^[4]。ISSR 分子标记技术在藻类方面已被广泛应用于物种遗传多样性的检测、地理种群变异的分析和种群间的亲缘关系的研究^[5]。

关于黄海绿潮暴发的最初种子来源有许多假设。一些研究倾向于其来源于沿海分布的大量水产养殖池, 这些养殖池通过排水和纳水闸门与外海相连, 提供了绿潮暴发的营养盐等物质条件的同时, 也很可能提供了绿潮种子来源^[6]。刘峰等通过 ITS rDNA 和 *rbcL* 序列分析结合形态学鉴定, 认为从江苏沿海的养殖池塘中发现了与黄海绿潮优势种及其相近甚至完全一致的石莼属海藻, 但他同时表示仍缺乏直接的证据以证

* 收稿日期: 2010-04-14

资助项目: 国家重点基础研究发展计划——我国近海藻华灾害演变机制与生态安全(2010CB428703); 我国近海海洋综合调查与评价专项——生物生态补充调查(908-01-CB23)

作者简介: 刘晨临(1974-), 女, 山东滨州人, 博士, 研究员, 主要从事藻类分子生物学方面研究。

(高 峻 编辑)

明黄海绿潮最初来源于水产养殖池^[6]。我们运用简单序列重复区间扩增多态性标记(ISSR)技术,对我国黄海近海漂浮绿潮浒苔样品,与其它几个沿海区域对虾养殖池塘的浒苔样品进行了遗传相似性研究,拟对2008年暴发的浒苔绿潮进行溯源分析。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验所用材料为2008年绿潮暴发前后在不同地区采集的浒苔样品,样品信息详见表1。样品现场采集后选取颜色鲜绿健康的藻株放入塑料袋中,青岛本地样品采集后立即带回实验室,外地样品采集后,置于加冰袋的保温箱中低温保存,然后送到实验室,所有样品置于-20℃冰箱冻存。

表1 浒苔样品信息
Table 1 The information of *Enteromorpha* sp. samples

样品名称	采样地点	采样时间	样品数量/株
山东省青岛市沿岸样品(QD)	青岛沿岸的栈桥、第一海水浴场、奥帆基地、石老人海水浴场以及大公岛沿岸海区的海上漂浮样品	2008-07 绿潮在青岛沿海大规模暴发时	12
山东省日照市沿岸样品(RZH)	包括日照沿海海上漂浮样品(RZH1)和固着生长在岩石上的样品(RZH2)	2008-06 下旬,绿潮在日照海域还未严重暴发时	13
南黄海区域海上调查样品(LYG)	大丰、连云港海域至胶南海域漂浮样品	2008-07 下旬	16
浙江省宁波市沿岸样品(NB)	宁波市象山港漂浮样品	2008-06 下旬	2
山东省青岛市红岛虾池样品(QDS)	红岛养虾池底沉或漂浮样品	2008-07 下旬	8
江苏省盐城市大丰虾池样品(DFS)	大丰市养殖虾池漂浮样品	2008-07 中旬	10
浙江省温州市虾池样品	温州地区虾池漂浮样品	2008-06 下旬	7

1.2 DNA 提取

每份样品选取单株藻体置入灭菌平皿中,经无菌蒸馏水清洗后,吸水纸吸干,液氮研磨后,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,用于 ISSR 扩增。

1.3 PCR 扩增、条件优化和检测

ISSR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成,从20条引物中筛选出3条扩增条带清晰的引物(表2)。扩增反应使用 Taqmix(北京天根生化科技有限公司):25 μL 反应体系包括 2×Taqmix,12.5 μL,随机引物 1 μL,模板 DNA 1 μL(约20 ng)和双蒸水 10.5 μL,PCR 扩增温度循环:95℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,48℃(或52℃)复性 45 s,72℃延伸 1 min,循环40次;72℃反应 10 min。PCR 扩增产物经质量浓度为 1.5g/L 琼脂糖电泳分离,EB 染色后进行观察并拍照。

表2 选用的 ISSR 引物序列、扩增的条带数目及其退火温度

Table 2 ISSR-selected primers, sequences, numbers of polymorphic amplified loci, and their annealing temperature

引物名称	序列(5'to3')	扩增条带数/多态性条带数	退火温度/℃
P1	(gA) ₇ gT	13/13	48
P7	(Ag) ₈ C	19/19	52
P8	(Ag) ₈ YC	12/12	52

1.4 数据分析

选择扩增清晰的电泳条带进行数据分析,同一引物、同一位点、根据扩增产物的有(1)无(0)得到二元资料,形成 0,1 矩阵。Shannon 指数由软件 POPGENE1.31^[8] 分析得出;用软件 TFPGA^[9] 分析计算浒苔样品局群间的遗传距离和遗传相似度,并通过 UPGMA (unweighted pair-group methods using arithmetic mean) 参数进行聚类,构建的系统树用 TreeView 1.6.6 成像。

2 结 果

2.1 ISSR-PCR 扩增结果

从 20 条引物中筛选出 3 条引物对 68 份浒苔材料进行了 ISSR 多态性检测,3 个引物共扩增出 44 条清晰条带,代表 44 个引物结合位点,平均每个引物扩增了 14.7 条带,44 个位点全部是多态性的,总的多态位点比率为 100.00%(图 1)。

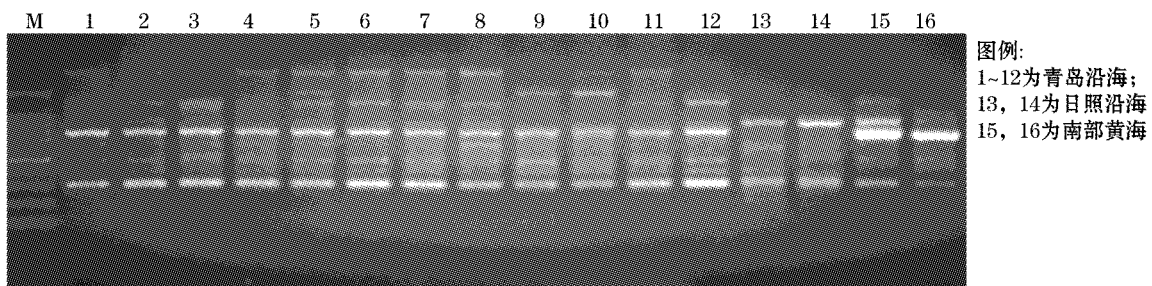


图 1 引物 P8 在浒苔藻体中的扩增结果

Fig. 1 The amplification results for *Enteromorpha* with the P8 primer

2.2 浒苔样品居群水平的遗传多样性分析

除来源于温州沿海虾池(WZH)的浒苔种群,种群内多态性位点数目(31;70.5%)及 Shannon 指数(0.32)较高外,其它各种群的 Shannon 指数介于 0.09~0.21,表明各种群的种群内遗传多样性不高,遗传变异主要来源于各种群之间(表 3)。

表 3 浒苔样品种群内遗传多样性

Table 3 Genetic diversities in *Enteromorpha* sp. intra-populations

样品采集地	多态性位点数目 / 个	多态性位点数的百分比 / %	Shannon 指数
山东青岛红岛虾池(QDS)	20	45.5	0.21
江苏盐城大丰虾池(DFS)	12	27.2	0.14
山东日照沿海漂浮样品(RZH1)	7	15.9	0.09
山东青岛沿海(QD)	13	29.6	0.17
南黄海区域海上(LYG)	15	34.1	0.19
浙江温州沿海(WZH)	31	70.5	0.32
山东日照沿海岩石上样品(RZH2)	8	18.18	0.10

根据样品的不同地理分布将 68 个个体分成 7 个居群。7 个居群间的聚类关系见图 2。7 个种群分成了 2 组,青岛沿海的浒苔样品与应急采样的南黄海海域的浒苔样品,及部分日照海上漂浮样品聚成 1 组,青岛虾池、温州虾池和大丰虾池以及部分日照样品聚成 1 组。

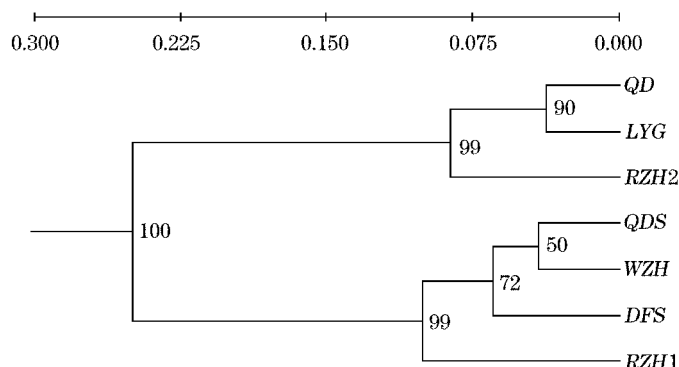


图 2 7 个居群浒苔间 Nei 的遗传距离聚类图

Fig. 2 Nei's genetic distance among the 7 populations of *Enteromorpha*

根据 PCR 扩增产物的电泳结果,按 Nei 的方法计算出浒苔各种群的遗传相似度(I)和遗传距离(D)见表 4。

表 4 7 个居群间的 Nei 的遗传相似度(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)

Table 3 Nei's genetic identity (above the diagonal) and genetic distance (below the diagonal) among the 7 populations

	青岛虾池 (QDS)	大丰虾池 (DFS)	日照 1 (RZH1)	青岛 (QD)	黄海南部 (LYG)	温州虾池 (WZH)	日照 2 (RZH2)
青岛虾池(QDS)		0.895 3	0.884 3	0.714 5	0.763 7		0.650 6
大丰虾池(DFS)	0.110 6		0.868 3	0.669 2	0.727 3		0.636 7
日照 1(RZH1)	0.123 0	0.141 2		0.711 5	0.745 2	0.887 9	0.686 3
青岛(QD)		0.401 7	0.340 4			0.748 2	
黄海南部(LYG)	0.269 5	0.318 4	0.294 1	0.045 9		0.817 3	0.890 0
温州虾池(WZH)	0.065 3	0.062 6	0.118 9	0.290 1	0.201 7		0.698 0
日照 2(RZH2)	0.429 9	0.451 4	0.376 4	0.095 7	0.116 6	0.359 5	

3 讨 论

群体间的遗传相似度和遗传距离揭示了群体遗传分化程度,反映了种内群体间或种间的亲缘关系的远近。Thorpe^[10]分析研究后给出的同科属间的遗传相似度 I 为 0.1~0.5,同属种间的遗传相似度为 0.2~0.8,而同种种群间的遗传相似度为 0.8~0.97(遗传距离为 0.03~0.20)。从表 4 可以看出,青岛沿海浒苔样品与应急采样的连云港海域、部分日照海域样品具有非常高的遗传一致性,分别达到 0.955 1 和 0.908 8,基于 Thorpe^[9]的研究结论,可以认为以上来源的浒苔样品属于同一种。利用 EOS/MODIS 卫星遥感资料,得到黄海绿潮浒苔区的分布及其随时间的变化。发现浒苔密集区在 5 月底位于连云港外海,先向西北移动,到达青岛沿海海域后,再沿山东半岛南部沿海向东移动^[11]。我们利用 ISSR 分子标记分析的结果与遥感资料分析的有关青岛近海浒苔来源的结果是一致的。

青岛虾池、大丰虾池、温州养池和日照部分样品的遗传相似性都在 0.88~0.9,尤其几个虾池的样品达到了 0.93,基于 Thorpe^[10]的研究结论,属于同 1 个物种。尽管在形态上很难区分,绿潮浒苔和养殖池塘浒

苔这 2 个群体间的遗传相似性只有 0.6~0.7,达到了同属间遗传相似度,但不属于同一个种。基于本研究所采集样品的研究结果,认为此次浒苔绿潮暴发的种子来源可能并不是水产养殖池。易俊陶等对盐城沿海 2008 年暴发浒苔绿潮的分析也指出,海水养殖塘口在春季是进水季节,很少有排水的塘口,可以排除从养殖塘口排出的可能^[12]。

Pang 等分析了 26 个样品的 ITS rDNA 和 *rbcL* 序列后,发现 6 个采自养殖池塘的浒苔样品与绿潮优势种聚类在一起,具有非常近的亲缘关系^[6]。通常 *rbcL* 序列不能区分石莼目不同种间的区别,ITS 序列可以用于区分不同种间的系统发育关系,作为石莼目绿藻的种质鉴定和系统进化研究的重要分子依据。而对浒苔属和石莼属存在争议的物种,必须结合其他方面的证据和特征,借助于分子生物学的多重方法进行深入的研究^[15]。我们采用的 ISSR 分析是基于全基因组序列的分子标记技术,在遗传多样性分析方面较单一核酸序列标记更为可靠。

韩晓磊等通过 ISSR 分子标记技术对 6 个不同地区浒苔群体(浙江鳌江、浙江宁波、广东南澳、江苏南通、福建福鼎、浙江南麂岛)进行了遗传多样性分析。结果显示它们之间的遗传相似性系数均在 0.8~0.9,认为浒苔不同地理种群间的遗传多样性较低,且不同地区浒苔的亲缘关系与其地理距离的远近没有相关性^[13]。Blomster 等在对分布于欧洲的浒苔进行研究时同样指出其亲缘关系与地理间隔距离没有直接关系^[14]。我们的研究也证实,尽管青岛、大丰和温州虾池间存在地理间隔,其亲缘关系仍然很近。

参考文献(References):

- [1] Policy-research Office of Qingdao Committee of the Communist Party of China, and Invesigation and Research Office of Qingdao People's Government. A summary of treatment against serious disaster by *Enteromorpha prolifera* bloom in Qingdao[EB/OL]. [2008-09-15]. <http://www.qingdao.gov.cn>. 中共青岛市委政策研究室,青岛市人民政府调查研究室. 青岛市处置罕见浒苔自然灾害综述[EB/OL]. [2008-09-15]. <http://www.qingdao.gov.cn>.
- [2] DING L P, LUAN R X. The taxonomy, habit and distribution of a green alga *Enteromorpha prolifera* (Ulvales, Chlorophyta) [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(1):68-70. 丁兰平, 栾日孝. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)的分类鉴定、习性及其分布[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(1): 69-71.
- [3] QIAO F L, MA D Y, ZHU M Y, et al. Basic conditions of and scientific response to the outbreak of *Enteromorpha* in 2008 Yellow Sea [J]. *Advances of marine Science*, 2008, 26(3): 409-410. 乔方利, 马德毅, 朱明远, 等. 2008 年黄海浒苔暴发的基本状况与科学应对措施[J]. *海洋科学进展*, 2008, 26(3): 409-410.
- [4] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [5] WANG X L, LIU C L, CONG Y Z, et al. Assessment of genetic diversities of selected *Laminaria* (*Laminaria*, Phaeophyta) gametophytes by inter-simple sequence repeat analysis[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47 (6): 753-758.
- [6] 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: 207-215.
- [7] LIU F. Ecophysiological and phylogenetic analysis of the bloom-forming alga species, *Ulva prolifera*, and tracking the origin of green tides in the Yellow Sea[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2010. 刘峰. 黄海绿潮浒苔的生理生态和分子系统学研究和溯源研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2010.
- [8] YEH F C, BOYLE T. Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis 1.31[M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [9] MILLER M P. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data [M]. [S. l.]: Department of Biological Science, Northern Arizona University, 1997.
- [10] THORP J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation, and systematic[J]. *Annual Review Ecology System*, 1982, 13(1): 139-168.
- [11] ZHANG S P, LIU Y C, ZHANG G Q, et al. Analysis on the Hydro-meteorological conditions from remote sensing data for the 2008 algal blooming in the Yellow Sea [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 39(5): 870-876. 张苏平, 刘应辰, 张广泉, 等. 基于遥感资料的 2008 年黄海绿潮浒苔水文气象条件分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 39(5): 870-876.

- [12] YI J T, HUANG J T, SONG L J. Initial understand of *Enteromorpha prolifera* occurred in Yancheng Coastal Waters in 2008 [J]. Marine Environmental Science, 2009, 28(supp 1.):57-58. 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(增刊):57-58.
- [13] HAN X L, XU J R, WANG J H, et al. Study on the genetic diversity of *Enteromorpha Prolifera* by ISSR [J]. Journal of Changshu Institute Technology: Natural Sciences, 2009, 23(10):57-60. 韩晓磊, 徐建荣, 汪洁华, 等. 不同地区浒苔(*Enteromorpha prolifera*) 群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 常熟理工学院学报:自然科学, 2009, 23(10): 57-60.
- [14] BLOMSTER J, MAGGS C A, STANHOPE M J, et al. Molecular and morphological analysis of *Enteromorpha intestinalis* and *E. compressa* (Chlorophyta) in the British isles [J]. Journal of Phycology, 1998, 35(2): 575-586.
- [15] LI Y Y, ZHU L J, SHEN S D, et al. Sequence and phylogeny analysis of ITS region and 5.8S rDNA of several green algae(Ulvales) [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2009, 31(5): 163-168. 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): 163-168.

ISSR Biomolecular Marker Analysis for Original Source of *Enteromorpha* During Green Tide in Yellow Sea in 2008

LIU Chen-lin¹, WANG Xiu-liang², LIU Sheng-hao¹, CONG Bai-lin¹, HUANG Xiao-hang¹,
WANG Zong-ling¹, LIN Xue-zheng¹, ZANG Jia-ye¹

(1. Marine Ecological Centre First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Not only the samples of *Enteromorpha* floating in the offshore water of the Yellow Sea in the algal green tide but also the algal samples collected from shrimp ponds respectively in Qingdao, Dafeng, and Wenzhou are analyzed by means of the simple sequence repeat interval amplified polymorphism marker (ISSR) to study their inter-population genetic relationship. It is shown in the analysis results that the genetic identity of the algae from the offshore water of Qingdao is 0.95 with the algae from the southern Yellow Sea, both belonging to the same species. The biological population relationships of the algae from those shrimp ponds are very close to each other although they are geographically located far apart. All the algae from those ponds belong to another species, which are different from the species for the alga collected during the Qingdao green tide no matter how similar the biological morphology of the both species, as it is shown in the genetic analysis by means of the ISSR marker. Therefore the alga causing the Qingdao green tide does not come from any of the shrimp ponds.

Key words: Green tide; *Enteromorpha*; ISSR; Source tracing

Received: April 14, 2010