

基于DNA条形码技术的舟山海域石莼附生动物的 分子生物学鉴定

刘金林^{1,2}, 夏菁¹, 赵莉娟¹, 谷凯¹, 康新宇¹,
丁晓玮¹, 赵晓惠¹, 庄旻敏^{1,3}, 张建恒¹, 何培民¹

(1.上海海洋大学 海洋生态与环境学院, 上海 201306; 2.国家海洋局北海环境监测中心, 山东 青岛 266033; 3.华东师范大学 河口海岸学国家重点实验室, 上海 201306)

摘要:我国绿潮暴发已持续 10 余年, 对生态环境、旅游业等造成了严重影响。本文于 2018 年 10 月在舟山市枸杞岛附近海域采集石莼附生动物, 并使用 DNA 条形码技术对其开展物种鉴定, 旨在给绿潮暴发的生态防治提供数据参考。鉴定结果显示: 附生动物主要分为麦秆虫亚目以及钩虾亚目, 部分样品无法鉴定出具体种类, 存在出现新种的可能性。优势种包括 *Caprella scauroides* 和 *Ampithoe lacertosa* 等, 其中 *Ampithoe lacertosa* 在中国近海为首次记录。在上述基础之上, 我们进一步探讨了各季节钩虾亚目不同物种对于藻类的取食偏好性, 阐明了端足类生物在维持生态系统稳定性中发挥的重要作用, 为防控绿潮暴发提供了新的思路。

关键词: 绿潮; 石莼; 附生动物; *Cox 1*; DNA 条形码

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2020)06-0874-06

Species identification of epizoans from *Ulva lactuca* in Zhoushan sea area by using the DNA barcode technology

LIU Jin-lin^{1,2}, XIA Jing¹, ZHAO Li-juan¹, GU Kai¹, KANG Xin-yu¹,
DING Xiao-wei¹, ZHAO Xiao-hui¹, ZHUANG Min-min^{1,3},
ZHANG Jian-heng¹, HE Pei-min¹

(1.College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2.North China Sea Environmental Monitoring Center, State Oceanic Administration, Qingdao 266033, China; 3.State Key Lab of Estuarine & Coastal Research, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Green algal blooms have occurred along the coast of China for more than 10 years, resulting in tremendous economic loss due to the destruction of marine ecosystems and damage to ecological service functions. This research was conducted to explore the biodiversity of epizoans attached on the green tide algae, *Ulva lactuca*. In October 2018, *Ulva lactuca* was collected from the sea area near Gouqi island, Zhoushan, and DNA barcode technology was used to carry out species identification. The results showed that the epizoans were mainly divided into the Caprellidea and Gammaridea. Some samples could not be identified, so there was the possibility of the emergence of new species. The dominant species included *Caprella scauroides* and

收稿日期: 2019-07-03, 修订日期: 2020-01-03

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项(2018YFD0901500); 国家自然科学基金(41576163); 国家海洋局公益性科研专项(201205010); 上海市青年科技英才扬帆计划(17YF1407900); 骆肇尧科创基金(A1200400201307, A1200400201328)

作者简介: 刘金林(1996—), 男, 江苏南通人, 博士, 主要从事藻类生态学研究, E-mail: 15721539745@139.com

通讯作者: 张建恒(1987—), E-mail: jh-zhang@shou.edu.cn

何培民(1959—), E-mail: pmhe@shou.edu.cn

Ampithoe lacertosa, etc, and *Ampithoe lacertosa* was recorded in the offshore of China for the first time. On the basis of the above, we further discussed the important role played by amphipods in maintaining the stability of the ecosystem, and clarified that it will be of great application value to study the feeding preference of different Gammaridea species in different seasons, which provides a new idea for the prevention and control of green tide outbreaks.

Key words: green tide; *Ulva lactuca*; epizoans; *Cox 1*; DNA barcode

绿潮(green tides)是一种在世界各国沿岸普遍易发的有害藻华^[1],是由海水富营养化造成石莼属 *Ulva* 等藻类大量增殖引起的生态现象^[2-4],通常发生在河口、海湾和城市海岸等富营养化程度较高的水域^[5]。绿潮暴发给生态环境造成巨大破坏,给旅游观光业带来重大经济损失,同时也对核电站的安全造成潜在威胁,影响极其严重^[6]。例如在加拿大的佩恩湾、美国的纳拉甘西特湾以及中国的厦门集美海域等处暴发的规模性绿潮^[7-9],其主要优势绿潮物种均为石莼。另外,在全球气候持续变暖的情况下,富营养化及水温升高驱动的绿潮暴发频率会增加^[10-11]。通过增加生态系统中消费者数量的方式以减少藻类的生物量,可有效控制藻华的暴发规模^[12],因此研究石莼的附生动物有重要生态学意义。当前国内外主要针对绿潮优势种浒苔 *Ulva prolifera* 开展生理生态、分子机制和防控等研究^[13],关于绿潮构成物种石莼虽有所研究^[14],但关注度欠佳。

我国海藻资源丰富,广布于南麂列岛、枸杞岛和荣成海藻场等,已有研究表明枸杞岛海藻场存在大量石莼生物资源^[15]。大规模的贻贝养殖等造成枸杞岛海域营养盐含量较高^[16],这也为大型海藻的生长提供了充足的养分,岛屿潮间带和贻贝养殖区中的泡沫浮球等也为石莼生长提供了固着空间,而大型海藻又是众多小型无脊椎动物和鱼类良好的索饵场、栖息地和庇护所^[17-18],生态地位极其重要。

DNA 条形码是一种有足够变异且易于扩增的相对较短的标准 DNA 片段。由于线粒体基因组具备结构简单、母系遗传且进化速率快等特征,目前已成为研究近缘种物种进化关系等的有效工具^[19]。*Cox 1*、*Cox 2* 和 *Cox 3* 基因较为保守,是研究物种分子水平的系统进化以及分类关系的有效基因之一^[20],当前相关研究主要采用 *Cox 1* 基因片段作为 DNA 条形码鉴定节肢动物等^[21]。

研究通过使用形态学和基于 *Cox 1* 基因条形码技术对石莼附生动物进行物种鉴定、邻接法(neighbor-joining, NJ)系统发育树聚类分析以及 ABGD(automatic barcode gap discovery)遗传学分类验证,探讨石莼的附生动物对渔业资源保护及防控大型藻类暴发的相关启示。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2018 年 10 月,于浙江省舟山市枸杞岛贻贝养殖区附近海域(30.74 °N, 122.83 °E)采集样品。选取 6 处不同位置的石莼,将摘取的海藻放入 0.15 mm 孔径的筛绢网中,使用经过抽滤后灭菌的海水将石莼表面的附生动物冲洗至网内,对于附着较为紧密的生物则小心剥离取样。收集附生动物并将其置入离心管内,用 75 % 酒精溶液固定,将石莼样品一并带回实验室。

经形态学鉴定,确认本实验采集的海藻团均为石莼(图 1)。依照形态学相似度对附生动物进行初始分类,之后对样品编号并进行形态学摄影记录(图 2),使用无水乙醇保存动物样品,便于后续开展 DNA 提取。



图 1 石莼形态学图片

Fig. 1 Morphology of *Ulva lactuca*



图 2 附生动物形态图(同一比例尺)

Fig. 2 Morphology of epizoans (under the same scale)

1.2 线粒体 DNA 提取

使用购自上海生工生物技术有限公司的 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA(操作详见试剂盒说明书),将 DNA 保存至

-80 ℃ 冰箱备用。

1.3 PCR 扩增及测序

使用一对通用引物开展相应 PCR 扩增: *Cox* 1-F(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-

3')及 *Cox 1*-R(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA
AAATCA-3')^[22]。40 μ L 的 PCR 反应体系包含:
0.1 μ L 的 DNA, 20 μ L 的 PCR-mix, 上下游引物
各 1 μ L 以及 17.9 μ L 的 dd-H₂O。PCR 扩增程序
为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、45 $^{\circ}$ C 复
性 30 s 及 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 共计 30 次循环; 最终
在 72 $^{\circ}$ C 下延长 5 min 并以 4 $^{\circ}$ C 低温保存^[23]。使
用琼脂糖凝胶电泳染色检验 PCR 产物质量, 将
电泳条带清晰且无杂带的 PCR 产物送至上海生
工生物技术有限公司开展 Sanger 一代测序。

1.4 分析方法及数据处理

使用 BioEdit 等软件检查序列是否准确, 对不
合格的碱基进行人工校对。在 NCBI (National
Center for Biotechnology Information) 数据库中进行
比对得到各序列对应的物种信息; 运用 Mega
7.0 软件^[24] 并采用邻接法, 使用适用于开展节肢动
物进化关系分析的 Kimura 双参数模型 (Kimura-2-
parameter, K₂P) 重复 1000 次 Bootstrap 构建发育
树^[25], 选取与研究对象亲缘关系较近的端足类物

种 *Amphipoda voucher* 的同源序列 (MH826052) 作
为外群。

采用基于遗传距离的 ABGD 分析方法对样
本分类进行检验^[26]。将序列上传到 ABGD 数据
库 (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>)。数据
库中具体的参数设置如下: P min=0.001, P max=
0.1, Steps=25, X (relative gap width)=1, Nb bins
(for distance distribution)=25。

2 结果与讨论

2.1 附生动物的物种组成

本研究共获得 36 条长度为 649 bp 的条形码序
列。石莼附生动物由端足目 2 个亚目的物种组成:
麦秆虫亚目 Caprellidea 及钩虾亚目 Gammaridea,
这与刘书荣等在枸杞岛海域开展的大型海藻附生
动物基础调查研究结果相一致^[27]。另外, 2019 年秋
季石莼附生动物的优势物种包括: 麦秆虫科
Caprellidae 的 *Caprella scauroides* 和藻钩虾科
Ampithoidae 的 *Ampithoe lacertosa* 等 (表 1)。

表 1 样品的 NDA 条形码鉴定结果

Tab.1 DNA barcode identification results of samples

样品编号	亚目	科名	种名
1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16	麦秆虫亚目	麦秆虫科	<i>Caprella scauroides</i>
3, 11, 13, 15	麦秆虫亚目	未知	未知
17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	钩虾亚目	藻钩虾科	<i>Ampithoe lacertosa</i>
25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36	钩虾亚目	未知	未知

其中, *Ampithoe lacertosa* 在中国近海为首次
记录。截至目前, 全球共发现藻钩虾属 *Ampithoe*
物种近 90 个^[28], 而在中国海域内仅记录到 4 种^[29],
该 4 种藻钩虾属物种主要发现于南海海域, 本研
究在东海枸杞岛海域发现了第 5 种藻钩虾属生
物 *Ampithoe lacertosa*, 这进一步表明, 中国海域
内的藻钩虾属物种多样性研究依旧存在较大空
间。

另外, 有 16 个样品无法在 NCBI 数据库中
比对到种名。以中国已发现的近 400 种钩虾亚
目物种为例^[29], 其中多数物种属于中国特有种且
未能建立起条形码信息, 这也进一步导致该
16 个样品无法通过 NCBI 等数据库确定物种名
称。当然, 样品中也存在出现新种的可能性^[30],
这有待进一步开展深入的研究。

2.2 附生动物分子分类结果及其生态学意义

Cox 1 基因是线粒体基因组中编码细胞色
素 C 氧化酶的重要基因之一, 其保守程度适用于
种间及种以上阶元的分类分析与研究。Kimura
双参数模型构建的附生动物的分子系统树显示
(图 3), 本研究涉及的 36 个样品可分为 4 种, 均
属于端足目生物。ABGD 分类方式中的递归划
分及初始划分值最终也支持将 36 个样品分为
4 个物种 (图 4)。其中, 两种可确定到物种名称
(*Caprella scauroides*; *Ampithoe lacertosa*), 另两种
虽无法确定种名, 但种间区分明显 (Group1;
Group 2)。

端足目生物生长周期短, 繁殖速度快, 在近
海生态系统食物网中属于非常重要的营养级, 也
是优质的海洋动物饵料, 例如, 花鲈 (*Lateolabrax*

maculatus)、褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)等重要经济鱼类的生存都极其依赖端足目生物^[31]。自 2011 年始,枸杞岛附近海域已多次暴发小规模绿潮,以 2012 年 5 月为例,枸杞岛附近海域暴发的绿潮对当地生态环境造成了严重影响^[32],同时也影响到旅游业的发展。若未来枸杞岛等海域再次暴发由外来或本地物种引发的规模性绿潮,依靠常规的绿潮藻清理方式只会影响小型无脊椎动物和鱼类的栖息地、食物来源及饵料,且会对当地渔业资源的可持续发展造成重大影响。

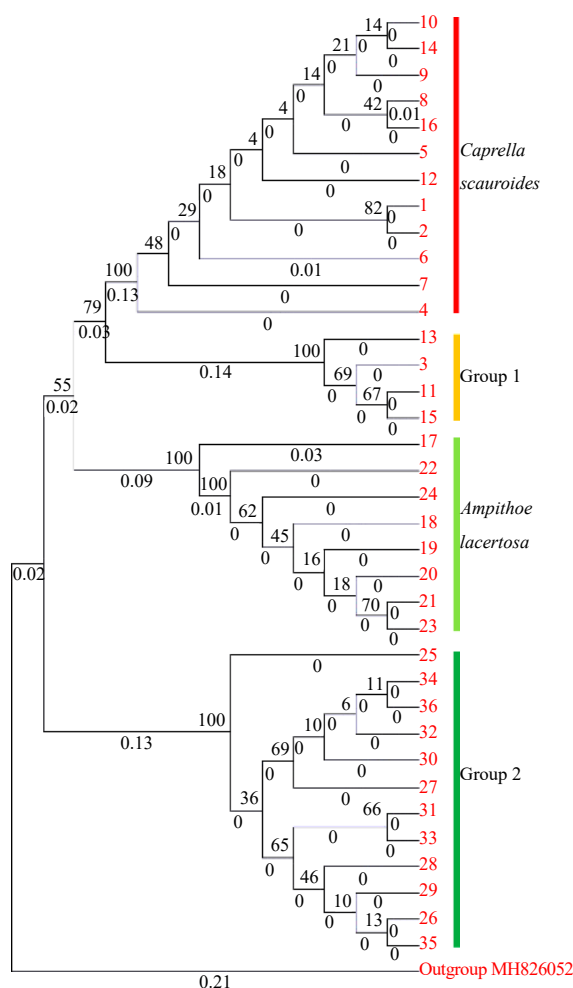


图 3 基于 Kimura 双参数法构建的石莼附生动物 Cox 1 基因片段的 NJ 系统发育树

Fig. 3 The NJ phylogenetic tree based on the Cox 1 gene sequences of epizoans from *Ulva lactuca* constructed by kimura-2-parameter method

钩虾亚目种类与麦秆虫亚目种类对大型藻类的利用方式不同^[33],导致两者的种间竞争强度

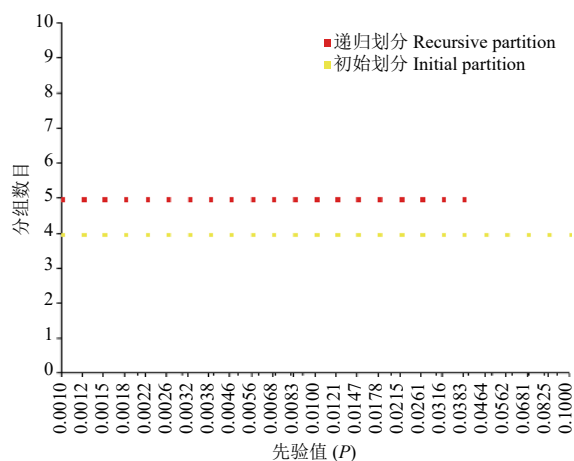


图 4 以 0.001~0.1 为先验值区间对 36 个样本进行 ABGD 划分

Fig. 4 Automatic partition results of ABGD in 36 samples based on prior intraspecific divergence range of 0.001~0.1

较弱,其中钩虾亚目种类主要以大型海藻(如石莼)作为栖息地和营养来源,而麦秆虫亚目种类主要以大型海藻为栖息地^[27]。这进一步说明,钩虾亚目种类在控制绿藻生物量及保持区域内生态系统稳定的过程中能够发挥重要作用,例如藻钩虾科物种等^[34];另外,该科物种在食物源选择上也有所区分,虽然其大多以石莼属藻类等为食,但对于藻类物种的选择具备一定的取食偏好性^[35]。我们认为,未来研究钩虾亚目种类在各季节对于不同藻类的取食偏好性具有重要的应用价值,在当前全球气候变暖及富营养化加剧的情况下,如果枸杞岛等海域再次暴发绿潮,在暴发初期进行适量打捞,与此同时,引入与之相关的消费者可起到生态防控作用。上述举措将会更好地保持当地生态系统的多样性与稳定性,具有明显的生态学意义。

3 结 论

(1)根据 2018 年 10 月对枸杞岛海域 6 处不同位置的石莼附生动物开展的调查,结合相关历史资料,认为其附生动物由端足目两个亚目的物种组成:麦秆虫亚目以及钩虾亚目。秋季附生石莼的优势物种包括:麦秆虫科的 *Caprella scaurooides* 和藻钩虾科的 *Ampithoe lacertosa* 等。其中 *Ampithoe lacertosa* 为首次在中国近海被记录。

(2)本研究涉及的两个物种未确定物种名,可能为新种或未能建立起与之相应的条形码数据库信息,中国海域内的端足目物种多样性研究依旧存在较大空间,可开展系统、完善的季节性采样调查。

(3)端足目生物在维持生态系统稳定性中发挥重要作用。此外,藻钩虾科物种对于石莼属生物具备一定取食偏好性,研究钩虾亚目不同物种在各季节对于不同藻类的取食偏好性等具备潜在的应用价值,这为防控绿潮暴发提供了新的思路及解决方法,也能更好地保持当地海域的生态稳定性,缩短生态自我修复所需的时间。

参考文献:

- [1] BLOMSTER J, BÄCK S, FEWER D P, et al. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides[J]. *American Journal of Botany*, 2002, 89(11): 1756-1763.
- [2] LIU F, PANG S J, CHOPIN T, et al. Understanding the recurrent large-scale green tide in the Yellow Sea: temporal and spatial correlations between multiple geographical, aquacultural and biological factors[J]. *Marine Environmental Research*, 2013, 83: 38-47.
- [3] ZHANG J H, HUO Y Z, ZHANG Z L, et al. Variations of morphology and photosynthetic performances of *Ulva prolifera* during the whole green tide blooming process in the Yellow Sea[J]. *Marine Environmental Research*, 2013, 92: 35-42.
- [4] LIU J L, ZHAO X H, KANG X Y, et al. Good news: we can identify *Ulva* species erupted in the Yellow Sea more easily and cheaply now[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2019, .
- [5] 陈月华, 何培民, 杨金权. 基于DNA条形码的如东海域浒苔附着鱼卵的物种鉴定[J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(1): 1-7.
- [6] 张朝文, 关春江, 徐鹏, 等. 辽东湾东部海域核电冷源取水区的风险生物分析[J]. *海洋环境科学*, 2019, 38(1): 41-45.
- [7] VAN ALSTYNE K L. Seasonal changes in nutrient limitation and nitrate sources in the green macroalga *Ulva lactuca* at sites with and without green tides in a northeastern Pacific embayment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 103(1/2): 186-194.
- [8] GUIDONE M, THORNBURGH C S. Examination of *Ulva* bloom species richness and relative abundance reveals two cryptically co-occurring bloom species in Narragansett Bay, Rhode Island[J]. *Harmful Algae*, 2013, 24: 1-9.
- [9] 曹英昆, 郭玉清, 李鹏, 等. 厦门集美海域近岸绿潮藻浒苔属生长规律研究[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2016, 21(2): 94-98.
- [10] GAO G, CLARE A S, ROSE C, et al. Eutrophication and warming-driven green tides (*Ulva rigida*) are predicted to increase under future climate change scenarios[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 114(1): 439-447.
- [11] MALAVENDA S, MAKAROV M, RYZHIK I, et al. Occurrence of *Ulva lactuca* L. 1753 (Ulvaceae, Chlorophyta) at the Murman coast of the Barents Sea[J]. *Polar Research*, 2018, 37(1): 1503912.
- [12] BRANCH G M, BUSTAMANTE R H, ROBINSON T B. Impacts of a 'black tide' harmful algal bloom on rocky-shore intertidal communities on the West Coast of South Africa[J]. *Harmful Algae*, 2013, 24: 54-64.
- [13] 王宗灵, 傅明珠, 肖洁, 等. 黄海浒苔绿潮研究进展[J]. *海洋学报*, 2018, 40(2): 1-13.
- [14] 王健. 青岛沿海绿潮藻类鉴定技术研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 1-69.
- [15] 刘雨蒙, 章守宇, 周曦杰, 等. 枸杞岛海藻场大型海藻凋落物碳氮稳定同位素分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(3): 438-444.
- [16] 王旭, 赵旭, 章守宇, 等. 枸杞岛贻贝养殖水域碳氮磷分布格局[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1650-1664.
- [17] 蒋日进, 章守宇, 毕远新, 等. 枸杞岛海藻场小型无脊椎动物的食物来源[J]. *水产学报*, 2015, 39(10): 1487-1498.
- [18] QUILLIEN N, NORDSTROM M C, LE BRIS H, et al. Green tides on inter- and subtidal sandy shores: differential impacts on infauna and flatfish[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2018, 98(4): 699-712.
- [19] 常抗美, 李焕, 吕振明, 等. 中国沿海7个长蛸(*Octopus variabilis*)群体COI基因的遗传变异研究[J]. *海洋与湖泊*, 2010, 41(3): 307-314.
- [20] 管成林, 李继姬, 郭宝英. 基于线粒体COI基因比较分析野生与养殖厚壳贻贝种群的遗传多样性[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(13): 7660-7662.
- [21] HAJIBABAEI M, SINGER G A C, HEBERT P D N, et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics[J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(4): 167-172.
- [22] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [23] YUAN T P, HUANG Y P, MIAO S Y, et al. Genetic diversity and population structure of *Capitulum mitella* (Cirripedia: Pedunculata) in China inferred from mitochondrial DNA sequences[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 67: 22-28.