

文章编号: 1674 - 5566(2013)02 - 0189 - 05

## 绿潮漂浮种的一种营养增殖方式的初步研究

陈斌斌<sup>1</sup>, 马家海<sup>1</sup>, 高嵩<sup>1</sup>, 孙彬<sup>1</sup>, 胡翔<sup>2</sup>, 杨建强<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源发掘利用重点实验室, 上海 201306; 2. 国家海洋局北海分局, 山东 青岛 266033)

**摘要:** 对所采集筛选的漂浮绿藻进行了定性和定量培养实验, 并对筛选的绿潮漂浮种进行了 ITS 序列分析。根据实验结果, 并未见有孢子或配子产生; 对漂浮种的定期形态学显微观察也未见有成熟孢子囊或配子囊形成, 但藻体的生物量一直处于增加状态。在实验条件下, 生物量在 30 d 内增加约 31 倍。ITS 序列系统进化树显示, QF1 和 QF2 均被分在 LPP 复合体中, 且亲缘关系较近, 应属同一种类, 但在外形上相差甚大。藻体的生长增殖一般情况下被并入自然生长, 属于藻体自身长大。但实验藻体如其他绿潮优势种一样, 均具有大量的分枝。分枝在从母体断裂或脱落后, 成为新的母体进而进行增殖。这应当作为自体营养繁殖而成为绿潮漂浮种的另一种增殖方式, 也是漂浮绿藻在适宜条件下生物量急剧增加的重要原因。

**研究亮点:** 以漂浮绿潮藻为研究对象, 试从其他角度对绿潮现象进行探究, 结合形态特征和分子生物学的方法对绿潮漂浮种的一种营养增殖方式进行了探讨, 首次指出绿潮藻的这种自体营养繁殖类型是除繁殖特性外绿潮藻的另一种重要的增殖方式, 在绿潮爆发过程中具有重要的贡献度。

**关键词:** 漂浮种; 自体营养繁殖; ITS; 绿潮; 石莼属

**中图分类号:** S 932.7

**文献标志码:** A

2007 - 2011 年连续 5 年在我国的黄海以及东海的局部海域发生了由石莼属 (*Ulva* L.) 绿藻大量增殖引起的绿潮, 其中 2008 年在青岛附近海域发生的绿潮引起了广泛的关注。如此大规模的浒苔海藻, 其覆盖面积与密度在世界上也属少见<sup>[1-2]</sup>。石莼属海藻广泛分布于我国南北沿海各地, 有的分布在半咸水中, 常生长在潮间带岩石上或石沼中, 有时也可附生在大型海藻的藻体上<sup>[3-4]</sup>。石莼属海藻全年都能生长, 成熟期一般为夏季, 某些种类在各个季节都能繁殖。由于漂浮绿潮藻极易生长繁殖, 若大量生长在养殖池塘内会严重影响鱼虾贝类的产量, 成为鱼虾养殖的大害藻。如果海水富营养化, 浒苔大量生长并聚集于海边, 还会发生绿潮, 严重影响海区景观。因此浒苔既是非常有价值的经济海藻, 又是造成养殖虾贝减产和海洋绿潮的一大危害<sup>[5-6]</sup>。

漂浮绿藻在短时间内生物量的大量增加, 包括其藻体的快速生长以及迅速大量的繁殖, 是绿潮爆发的主要原因, 而其中生物量增长的主要方式则是漂浮绿藻的大量繁殖。绿潮漂浮浒苔的繁殖方式包括单性生殖、有性生殖和无性生殖<sup>[7-9]</sup>, 而且漂浮绿藻主要以单性生殖和无性生殖为主要繁殖方式, 配子无需经过接合, 直接附着后发育, 这种繁殖方式更增加了绿潮藻的繁殖速度和数量。绿潮藻在短时间内快速增加生物量的原因, 除了其具有高效的生殖方式外, 与漂浮藻体自身的生长增殖也具有极大关系。本文对所采集筛选的漂浮绿藻进行了定性的和定量的培养实验, 并试从漂浮绿藻的自身生长增殖角度说明绿潮藻在适宜条件下生物量急剧增加的又一原因。为绿潮藻的爆发和溯源研究提供基础资料。

收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-09-19

基金项目: 国家海洋局海洋公益性行业科研专项 (201205010); 科技部国家科技支撑计划 (2012BAC07B03); 国家海洋局东海分局赤潮重点实验室开放研究基金 (MATHAB00000000)

作者简介: 陈斌斌 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为环境藻类生物学。E-mail: binbch@163.com

通信作者: 马家海, E-mail: jhma@shou.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料采集与amp;处理

本实验所用的藻体采自 2010 年 7 月 4 日青岛石老人海水浴场的海上漂浮绿藻,经阴干处理后带回实验室。藻体经复壮培养后筛选,挑选健康单株藻体进行培养。

### 1.2 培养与amp;观察

挑选的单株藻体命名为 QF1 和 QF2,于 500 mL 三角烧瓶内培养。培养条件:18 ℃,海水盐度 26.9(每 1 L 海水中添加 PES 20 mL),光照强度 150  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 左右,光照周期 12L:12D。选取生长状况良好的单株藻体,设置 3 个平行培养:CG-01 ~ CG-03。藻体在增殖后及时扩大培养。定期观察并记录藻体的孢子释放及生长状况,采用 Hangping 电子天平称量藻体重量,用 Motic 图像分析仪进行显微拍摄记录。

### 1.3 浒苔基因组 DNA 提取

取单株藻体,尽可能地去除分枝,经 30% 双氧水及无菌去离子水清洗阴干后取样约 30 mg,按 DNA 提取试剂盒(OMEGA, B. E. Z. N. A Plant DNA Mini Kit)说明书要求提取样品基因组 DNA,最终洗脱后定溶于 TE 溶液(100 ng/ $\mu\text{L}$ ),-4 ℃ 保存备用。依据 GenBank 中相关物种的 ITS 序列设计 PCR 扩增引物如下,EPITSF:5'-GTAACAA GGTCTCCGTA GGTG-3'; EPITSR:5'-AGTTCA GCGGGTA GCCTCAC-3'。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.4 PCR 扩增与amp;测序

以所提取的浒苔基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增出 ITS 片断,扩增 50  $\mu\text{L}$  反应体系,组成:DNA 模板 2 ng,50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3),1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,0.2 mmol/L dNTP,0.2  $\mu\text{mol}/\text{L}$  EPITSF 以及 EPITSR,0.3 U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件如下:94 ℃ 变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,ITS 片断序列由上海生工生物技术有限公司测定。

### 1.5 序列与amp;数据分析

序列的比对与校正使用 BioEdit 软件,用 MEGA 4 构建 Neighbor-joining (N-J) 系统进化关

系树(Bootstrap 重复 1 000 次)。为进行石莼属绿藻的序列长度及系统进化关系分析,从 GenBank 中下载了以下序列: *Enteromorpha flexuosa* (AB097646)、*U. prolifera* (GQ202117) 1、*U. prolifera* (FJ026732) 2、*Enteromorpha compressa* (AJ550764)、*U. compressa* (HM046596)、*U. procera* (AY422521)、*U. linza* (EU888138)、*U. linza* (AB299440); 以及外群序列: *Blidingia minima* (AJ000206)、*B. dawsonii* (DQ001139)。

## 2 结果

### 2.1 培养观察

根据 30 d 的单株培养观察,所得藻体的生长状况如图 1 所示。

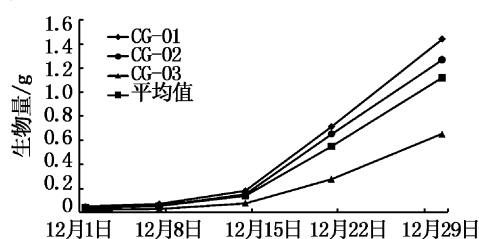


图 1 单株培养的藻体在 30 d 内的生物量增加  
Fig. 1 Biomass increasing of individual cultured in 30 days

藻体培养过程中,生物量不断增长。在 30 d 内,单株藻体的培养重量从 0.036 g 增加到 1.123 g,藻体阴干后的生物量在 30 d 内增加了约 31 倍。其中在第 21 天测量时,藻体的平均阴干重量为 0.549 g,相对于 14 日的测量结果,生物量出现剧增。

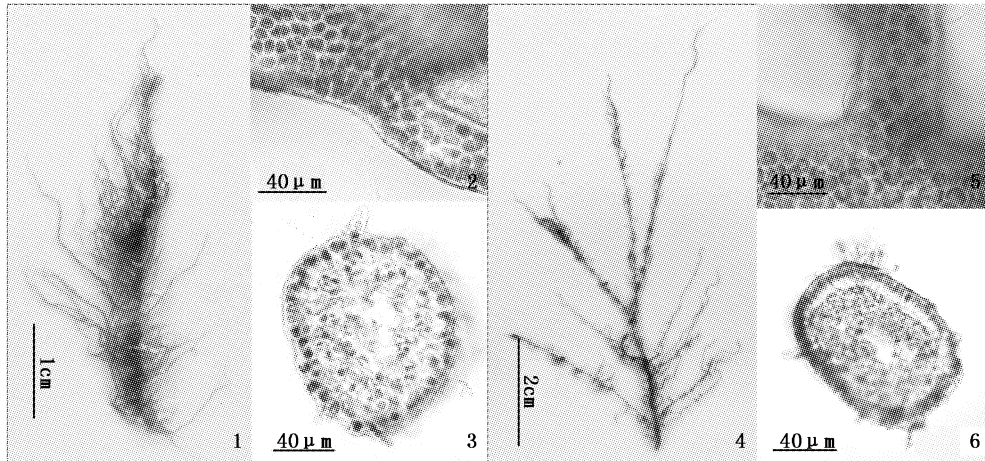
### 2.2 漂浮藻体的形态特征

从所培养的各组成绿藻中,均能分出形态特征具有明显差别的两个类型:QF1 和 QF2 (图版)。

从整体外形上看,QF1 藻体具有细密的分枝,主干由于分枝细密而不明显(图版),而 QF2 藻体具有较为突出的主干。QF1 和 QF2 藻体均呈黄绿色或嫩绿色,具有真分枝。藻体偶见有表面皱褶或扭曲,不具有气囊结构。QF1 藻体的表面细胞形状不规则,排列疏松,纵裂不明显,叶绿素基本充满,蛋白核一般一个;QF2 藻体表面可见细胞形状近椭圆形,排列疏松,纵裂不明显,但叶绿素不充满(三分之一左右),蛋白核一般一个。QF1 和 QF2 藻体的分枝横切观均可见空腔

内充满细胞,但细胞不具有叶绿体或只有少量的叶绿体存在,横断面中空面积所占的比例较小<sup>[10]</sup>。分枝横切面观可见真分枝的芽基。在

藻体形态显微观察过程中,QF1 和 QF2 藻体均未观察到具有假根丝细胞的假分枝<sup>[11]</sup>。



图版 QF1 和 QF2 藻体的形态学特征

Plate Morphological characteristics of QF1 and QF2

1-3. 样品 QF1 藻体外形、真分枝及其横切面观; 4-6. 样品 QF2 藻体形态、真分枝及其横切。

从 QF1 和 QF2 藻体的形态学特征可以看出,培养藻体如其他绿潮优势种一样,均具有大量的一次、二次分枝,甚至多次分枝,但没有生殖细胞形成。分枝的生长成为藻体生物量增加的主要原因。藻体在生长过程中,分枝断裂从母体脱落后,可以成为新的藻体继续增长,并形成更多的新的分枝。这种由绿潮藻通过藻体自身长大而增加生物量的过程是一种营养增殖方式。

### 2.3 分子生物学分析

对 QF1 和 QF2 样品的 ITS 序列测序结果结合从 GenBank 中得到的 10 个序列构建 N-J 系统进化树(图 2)。

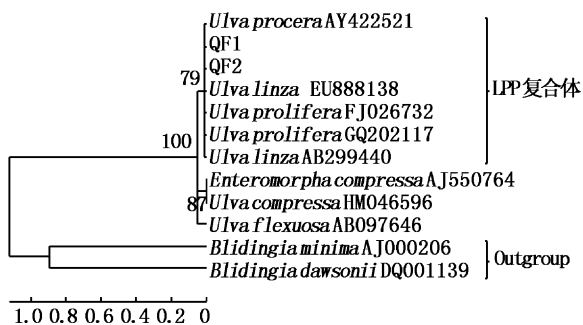


图 2 ITS 序列系统进化树(N-J 树)

Fig. 2 N-J tree from ITS data of *Ulva L. floating species*

聚类结果表明,QF1 和 QF2 均被分在了 *Ulva linza-procera-prolifera* (LPP 复合体)<sup>[11-12]</sup> 的大分枝中,且亲缘关系较近,应属于同一种类。在此 N-J 系统进化树中,*Ulva flexuosa* 和 *Ulva compressa* 与 LPP 复合体很清楚地被分离在不同的进化枝中。

### 3 讨论与分析

在此次实验中,QF1 和 QF2 在外形上相差较大。但 ITS 序列系统进化分析结果显示为同一种类,同时归入 LPP 复合体中,且种类难以区分。从形态学上看,QF1 和 QF2 除了外形之外,其他形态学和解剖学特征与 *Ulva prolifera* 十分相近,但传统的形态学分类方法已难以适用于有关绿潮优势种的种类问题的研究<sup>[12-14]</sup>。

绿潮漂浮种的增殖问题,是绿潮爆发和溯源问题研究的基础之一。绿潮漂浮浒苔的繁殖方式包括单性生殖、有性生殖和无性生殖<sup>[7-10]</sup>;而且,漂浮绿藻主要以单性生殖和无性生殖为主要繁殖方式,在漂浮绿藻繁殖高峰期,平均每株藻体能产生千万数量级的配子或孢子,配子无需经过接合,直接附着后发育,这种繁殖方式更增加了绿潮藻的繁殖速度和数量,有利的环境条件和绿潮漂浮种强大的繁殖力是漂浮绿藻生物量迅

速增长并难以控制从而引发绿潮的主要原因之一<sup>[8]</sup>。漂浮绿藻在短时间内生物量的大量增长,包括其藻体的快速生长以及迅速大量的繁殖,是绿潮爆发的主要原因,而其中生物量增长的主要方式则是漂浮绿藻的大量繁殖。根据繁殖策略和自然选择理论,种群在稳定的环境中,往往进行 *K*-选择而能更好地利用环境承载力,而在波动的环境中,一般进行 *r*-选择而具有较高的繁殖能力。*r*-策略者是新生境的开拓者,很容易出现“突然的爆发和猛烈的破产”;而 *K*-策略者是稳定环境的维护者<sup>[15-17]</sup>。从绿潮藻的繁殖特性上看,绿潮优势漂浮种应属于 *r*-策略者,能在短时间内大量增殖而迅速成为影响上万平方公里的绿潮<sup>[18]</sup>。

但在此次实验中,并未见有孢子或配子产生,对漂浮种的定期形态学显微观察也未见有成熟孢子囊或配子囊形成。但藻体的生物量一直处于增加状态,而且在实验条件下,生物量在 30 d 内增加 30 多倍。如果在大面积绿潮爆发过程中也会达到相近的数量级,其影响是相当可观的。藻体的生长增殖,一般情况下被并入自然生长,属于藻体自体长大。但实验藻体如其他绿潮优势种一样,均具有大量的一次、二次分枝,甚至多次分枝。分枝在从母体断裂或脱落后,成为新的母体进而进行增殖。这应当归为绿潮藻的自体营养繁殖类型而成为绿潮漂浮种的另一种增殖方式。

#### 参考文献:

- [1] 李大秋,贺双颜,杨倩,等. 青岛海域浒苔来源与外海分布特征研究[J]. 环境保护, 2008, 402(8B): 45-46.
- [2] LIU D, KEESING J K, XING Q, et al. World's largest macroalgal bloom caused by expansion of seaweed aquaculture in China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2009, 586:88-95.
- [3] TAN I H, BLOMSTER J, HANSEN G, et al. Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of green seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha* [J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16: 1011-1018.
- [4] 曾呈奎,张峻甫. 黄海和东海经济海藻区系[J]. 海洋与湖沼, 1959,2(1):43-52.
- [5] PANG S J, LIU F, SHAN TF, et al. Tracking the origin of the *Ulva* bloom in the yellow sea by a combination of molecular and physiological analyses [J]. Marine Environmental Research, 2010,69(4):207-215.
- [6] 王文娟,赵宏,米锴,等. 大型绿藻浒苔属植物研究进展[J]. 湖南农业科学,2009(8):1-4.
- [7] 王晓坤,马家海,叶道才,等. 浒苔(*Enteromorpha prolifera*)生活史的初步研究[J]. 海洋通报, 2007, 26(5): 112-116.
- [8] 张华伟,马家海,胡翔,等. 绿潮漂浮浒苔繁殖特性的研究[J]. 上海海洋大学学报,2011, 20(4):600-605.
- [9] 马家海,嵇嘉民,徐韧,等. 长石莼(缘管浒苔)生活史的初步研究[J]. 水产学报, 2009, 33(1): 45-52.
- [10] 曾呈奎,张德瑞,张峻甫,等. 中国经济海藻志[M]. 北京:科学出版社,1962.
- [11] 马家海,张天夫,王金辉,等. 对有分枝长石莼(缘管浒苔)的研究[J]. 水产学报,2010,34(9):1357-1364.
- [12] LELLAERT F, ZHANG X W, YE N H, et al. Research note: identity of the Qingdao algal bloom[J]. Phycological Research, 2009, 57(2): 147-151.
- [13] 田晓玲,霍元子,陈丽平,等. 江苏如东近海绿潮藻分子检测与类群演替分析[J]. 科学通报,2011,56(4/5):309-317.
- [14] 穆新武,陆勤勤,胡传明,等. 江苏沿岸大型绿藻主要物种及其季节性变化[J]. 南京大学学报:自然科学版, 2011, 47(4): 470-480.
- [15] 李博. 生态学[M]. 北京:高等教育出版社,2000: 76-83.
- [16] 王伯荪,李鸣光,彭少麟. 植物种群学[M]. 广州:广东高等教育出版社,1995:31-84.
- [17] RICKLEFS R E. Ecology [M]. 3rd ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1990:473-506.
- [18] REEDD C, AMSLER C D, EBELING A W. Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competency[J]. Ecology, 1992, 73(5): 1577-1585.

## Preliminary studies on certain autologous nutrition proliferation pattern of floating species in green tide

CHEN Bin-bin<sup>1</sup>, MA Jia-hai<sup>1</sup>, GAO Song<sup>1</sup>, SUN Bin<sup>1</sup>, HU Xiang<sup>2</sup>, YANG Jian-qiang<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. North China Sea Branch of the State Oceanic Administration, Qingdao 266033, Shandong, China)

**Abstract:** The acquisitions of green tide floating algae were screened and used into qualitative and quantitative culture experiment. Then ITS sequences analysis was carried out. According to the results of the experiments, neither spores nor gametes production was observed according to the regularly morphological or microscopic observation, as well as mature sporangium and gametangium. But on experimental conditions, algae biomass was increasing, and the biomass increased about 31 times in 30 days. The ITS sequence evolutionary tree shows that QF1 and QF2 were all included in LPP complex clade and had close genetic relationship. This showed they should belong to a same species. But the forms of the two differed from each other. The growth and proliferation of algae were usually incorporated into natural growth which was frond-self growing up. As other dominant floating species, the algae in our experiment had plenty of branches. When branches fell off or broke, a new alga formed and began multiplying. This should be considered as autologous nutrition proliferation pattern of green tide algae which belonged to another way of proliferation. This self-proliferation of green algae was another important reason of sharp biomass increasing of green tide on suitable conditions.

**Key words:** floating species; autologous nutrition proliferation; ITS; green tide; *Ulva*