

# 浒苔(*Ulva prolifera*)共附生细菌群落结构分析的引物优化

刘晓杰<sup>1,2,3,4</sup>, 赵瑾<sup>1,2,3</sup>, 郭扬<sup>1,2,3,4</sup>, 吴春辉<sup>1,2,3,4</sup>, 陈华新<sup>1,2,3</sup>, 姜鹏<sup>1,2,3</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院 海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 海藻共附生细菌密切参与宿主的生长发育、营养吸收等重要过程, 浒苔(*Ulva prolifera*)是构成黄海绿潮的唯一优势种, 对其共附生细菌开展群落结构分析, 有望为成灾机制研究提供重要线索。由于植物叶绿体基因组同时具备原核特征和高拷贝数, 会严重干扰共附生细菌基于 16S rDNA 的序列扩增。高等植物中开发了通用引物 799F, 利用其 3'末端与植物同源区的非配对双碱基, 可实现对细菌来源序列的特异性扩增。本文针对多个浒苔群体样本, 首次评价了引物 799F 在藻类中的适用性, 发现 799F 的 3'末端与浒苔叶绿体同源区仅存在非配对单碱基, 其扩增仍会受到浒苔叶绿体严重干扰。在引物 799F 的基础上, 设计了新引物 800F, 与通用反向引物 1492R 配对扩增细菌 16S rDNA 中具高分辨率的 V5-V9 可变区, 配合使用具热启动功能、同时不具校对功能的 DNA 聚合酶, 可基本完全避免浒苔叶绿体来源序列的扩增, 并阐明了方法的原理。优化的引物扩增方案可用于浒苔共附生细菌群落结构分析。

**关键词:** 16S rDNA; 共附生细菌; 浒苔(*Ulva prolifera*); 叶绿体; 引物

中图分类号: Q938.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)12-0035-07

DOI: 10.11759/hyqx20190711002

细菌既可附生在海洋藻类表面, 也可在藻类细胞内共生<sup>[1]</sup>。海藻与其共附生细菌之间存在着复杂的相互作用, 一方面, 海藻分泌的有机物质可被细菌利用<sup>[2]</sup>, 另一方面, 细菌也密切参与藻类的营养吸收、生长发育等重要过程<sup>[3-5]</sup>。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 藻类共附生细菌群落结构的研究得以较广泛地开展<sup>[6]</sup>, 普遍认为, 共附生细菌的群落组成与藻类宿主之间具有一定的特异性和功能相关性<sup>[7-12]</sup>, 这为深入研究重要菌群的生态功能、揭示藻菌相互作用机制提供了重要背景。

目前, 相关研究主要针对的是藻类体表的附生菌, 方法是首先通过物理或酶解手段从藻体分离得到附生菌体, 再制备 DNA 模板, 利用 16S rDNA 通用引物进行扩增测序与分析<sup>[7, 9-10]</sup>。相较外附生细菌, 藻类内生菌的生态功能更加引人关注<sup>[12-14]</sup>, 但由于目前仍缺乏普遍适用的内生菌分离富集的方法, 因此, 针对内生或共附生细菌群落结构的研究, 只能制备宿主与共附生细菌的混合 DNA 模板进行扩增。研究发现, 在利用细菌通用引物 27F/1492R 进行扩增时, 由于宿主叶绿体基因组编码的 16S rDNA 具备原核特征和高拷贝数, 往往在扩增产物中占据较高

比例, 对后续菌群结构分析带来严重影响。为此, Chelius 等设计了引物 799F, 利用引物 3'末端与玉米叶绿体同源序列之间存在两个碱基的差异, 使用 799F/1492R 引物对, 扩增细菌 16S rDNA 中具高分辨率的 V5-V9 可变区, 成功避免了玉米叶绿体的干扰<sup>[15]</sup>。引物 799F 在大米等多种高等植物中也获得成功<sup>[16-17]</sup>, 但在拟南芥、柑橘中效果并不理想<sup>[18-19]</sup>, 原因尚未深入分析。

浒苔(*Ulva prolifera*)属大型绿藻, 是形成黄海绿潮的优势种<sup>[20]</sup>, Liu 等通过物理方法分离浒苔表面附生菌开展了多样性分析<sup>[21]</sup>。我们前期研究发现, 浒苔中还存在着内共生细菌<sup>[22]</sup>, 对其共附生细菌合并开展群落结构分析有望为成灾机制研究提供重要线索。绿藻相关研究中同样面临叶绿体干扰的严重影响<sup>[23]</sup>,

收稿日期: 2019-07-11; 修回日期: 2019-07-21

基金项目: 国家自然科学基金(41776153); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室开放基金(QNLM2016ORP0303)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41776153; Open Fund of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No. QNLM2016ORP0303]

作者简介: 刘晓杰(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事海藻共附生细菌研究, E-mail: liuxiaojieyx@126.com; 姜鹏(1973-), 通信作者, 男, 研究员, 博士, 电话: 0532-82898500, E-mail: jiangpeng@qdio.ac.cn

但尚未对引物 799F 开展评价。本文以大型绿藻浒苔为材料,研究了引物 799F 的适用性,通过比较和优化,建立了可应用于浒苔共附生细菌群落结构分析的扩增体系,并阐明了原理。

## 1 材料与方 法

### 1.1 浒苔样本

浒苔(*U. prolifera*)样本 Up1 于 2014 年采集于江苏外海(N33.1°, E122.5°), 样本 Up2 于 2007 年采集于青岛沿海, 样本 Up3 于 2011 年采集于连云港沿岸。用 105℃ 灭菌 30 min 的海水冲洗藻体以去除污染, Up1 单株于 -20℃ 冻存, Up2、Up3 单株于 VSE 培养液中增殖培养。

### 1.2 DNA 聚合酶

Taq 酶、Taq Hot Start Version、Ex Taq 均系 TaKaRa (大连, 中国)产品。Taq Hot Start Version 是基于 Taq 酶的热启动 Taq 酶,二者均不具 3'-5'外切酶活性。Ex Taq 是具 3'-5'外切酶活性的 DNA 聚合酶,具有更高的保真性。

### 1.3 浒苔叶绿体 16S rDNA 片段的获得

CTAB 法制备浒苔总 DNA 模板<sup>[24]</sup>, 由于叶绿体编码的 16S rDNA 具有原核特征与高拷贝数<sup>[23]</sup>, 因此, 利用通用引物对 27F/1492R(表 1)进行扩增, 程序为: 94℃ 预变性 10 min 后进行 30 个循环(94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min), 最后 72℃ 进行 5 min 延伸。PCR 产物经胶回收试剂盒(天根)纯化后, 连接 pGEM-T Easy 载体(Promega)构建克隆文库, 挑选有效插入克隆在上海桑尼公司测序, 测序结果经序列比对与邻接法(Neighbor Joining, NJ)建树分析, 从而确定浒苔叶绿体 16SrDNA 序列片段。

表 1 本文使用的所有引物及其序列

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	长度 (bp)	引物序列(5'-3')	参考文献
27F	19	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	[25]
515F	19	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	[26]
799F	19	AACAGGATTAGATACCCTG	[15]
800F	20	AACAGGATTAGATACCCTGG	*
806R	20	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	[26]
926R	20	CCGYCAATTYMTTTRAGTTT	[27]
1100R	16	AGGGTTGCGCTCGTTG	[28]
1492R	19	GGTTACCTGTTCACGACTT	[25]

\*引物 800F 系本文设计

### 1.4 浒苔叶绿体来源扩增产物的鉴定方法

利用藻菌混合 DNA 扩增 16S rDNA 片段构建克隆文库时, 需要建立快速鉴定的方法, 以判断浒苔叶绿体来源序列的占比。为此, 将测得的浒苔叶绿体 16S rDNA 序列与 20 条来自蓝藻门以及 64 条来自 31 个细菌门类(Proteobacteria、Bacteroidetes、Planctomycetes、Caldiserica、Deinococcus、Fusobacteria、Tenericutes、Thermodesulfobacteria、Verrucomicrobia、Armatimonadetes、Actinobacteria、Chlamydiae、Chlorobi、Chrysiogenetes、Deferribacteres、Nitrospirae、Spirochaetes、Synergistetes、Thermotogae、Dictyoglomi、Elusimicrobia、Gemmatimonadetes、Ignavibacteriae、Cloacimonetes、Nitrospinae、Aquificae、Microgenomates、Acidobacteria、Marinimicrobia、Poribacteria、WPS-2 类群)的同源序列进行比对, 选择 799-1492 区域, 用 Primer 5.0 分析限制性内切酶的酶切位点, 寻找并验证可在浒苔叶绿体序列中切割产生特征性带型的限制性内切酶。

之后, 针对引物对 799F/1492R 或 800F/1492R (表 1)扩增产物的克隆文库, 我们挑选克隆, 以 pGEM-T Easy 克隆载体的通用引物对 SP6/T7 进行扩增, 一方面判断是否有预期大小片段的插入, 同时对扩增产物进行限制性内切酶酶切, 利用上述酶切指纹图谱快速判断是否为浒苔叶绿体来源; 针对引物对 799F/1100R 的扩增产物, 因片段较短, 仍通过测序方法判断其序列的来源。

### 1.5 共附生细菌 16S rDNA 片段扩增体系的优化

共使用三条细菌 16S rDNA 通用引物(799F、1100R、1492R)与一条新设计引物(800F)用于共附生细菌 16S rDNA 片段扩增(表 1)。根据表 2, 针对三对配对引物、三个浒苔样本、两个退火温度和三类 DNA 聚合酶, 共设计 10 组 PCR 扩增试验组合, 扩增程序为: 94℃ 预变性 10 min 后进行 30 个循环, 94℃ 变性 1 min, 52℃(或 56℃)退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 进行 5 min 延伸。扩增产物回收与构建克隆文库同 1.3, 使用通用引物对 SP6/T7 检测阳性克隆。利用 1.4 方法鉴定并统计叶绿体来源克隆在所有阳性克隆中的占比。

## 2 结果

### 2.1 浒苔叶绿体 16S rDNA 片段克隆与测序

利用 16S rDNA 通用引物对 27F/1492R 扩增浒苔

总 DNA 模板, 获得产物经挑选克隆测序, 5 个克隆获得一致序列, 经构建系统发育树, 该序列(标注为 *Ulva prolifera*)与绿藻叶绿体 16S rDNA 聚在一类(图 1), 提示所有克隆序列全部为浒苔叶绿体来源, 无一来自细菌的同源序列。序列比对结果显示, 该序列具有与细菌同源序列高度相似的可变区、保守区结构特征。进一步比对发现, 该序列与细菌 16S rDNA 通用引物 27F、515F、806R、926R、1492R(表 1)的序列均完全匹配。除了 27F/1492R, 我们还评价了 515F/806R、515F/926R 等引物对的扩增效果, 发现与 27F/1492R 的表现基本一致, 结果表明, 使用不经优化的细菌通用引物进行扩增, 会受到叶绿体同源序列的强烈干扰, 难以获得高丰度的来自细菌的扩增产物。

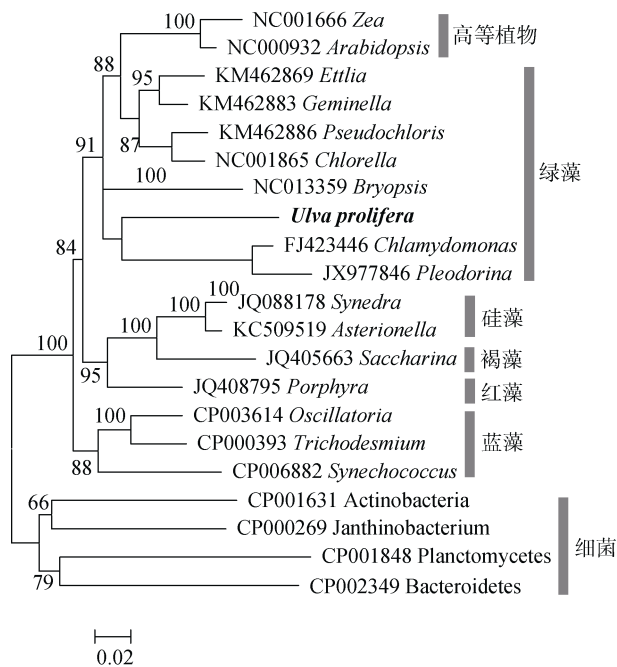


图 1 NJ 法构建高等植物、藻类和细菌 16S rDNA 进化树; 粗体示本文获得的浒苔叶绿体编码 16S rDNA 部分序列

Fig. 1 Phylogenetic tree of 16S rDNA sequences from plants, algae, and bacteria: Boldface indicates the partial 16S rDNA sequence from the chloroplast genome of *U. prolifera*

## 2.2 浒苔叶绿体来源扩增产物的酶切鉴定方法

将获得的浒苔叶绿体 16S rDNA 序列与 20 条来自蓝藻门和 64 条来自 31 个细菌门类的同源序列进行比对与酶切位点分析, 发现在引物对 799F/1492 或 800F/1492 的扩增范围内, 限制性内切酶 *Hha* I 和

*Sma* I 理论上可切割叶绿体编码序列产生不同于细菌门类的特征性带型。其中, *Hha* I 酶切应产生约 410 bp 与 460 bp 两条带, 而 *Sma* I 酶切应产生约 510 bp、190 bp 与 170 bp 三条带。

接下来酶切检验的结果完全验证了上述分析。从引物对 799F/1492R 或 800F/1492R 扩增产物的克隆文库中挑选克隆, 以 pGEM-T Easy 克隆载体的通用引物对 SP6/T7 进行扩增, 对扩增片段分别进行 *Hha* I 或 *Sma* I 酶切, 结果表明, 获得特征性指纹图谱的经测序均为叶绿体来源序列(图 2), 而其余克隆经测序均为细菌来源序列(图 3)。图 2 中, 所有扩增产物来自浒苔叶绿体, 两种酶的指纹图谱表现均非常稳定; 图 3 中, 扩增产物全部来自细菌的不同克隆, 具有明显的多态性, 且均与浒苔叶绿体的特征图谱明显不同。该方法后续用于快速鉴定引物对 799F/1492R 或 800F/1492R 扩增产物克隆文库中浒苔叶绿体来源的序列。

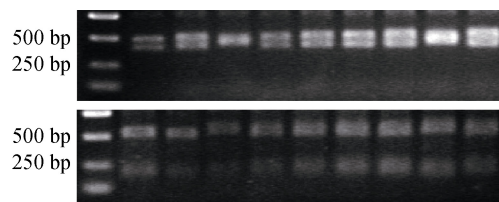


图 2 浒苔叶绿体来源扩增产物 *Hha* I(上)和 *Sma* I(下)的酶切带型; 最左为 DNA Marker, 其余泳道为样本。上、下图的对应泳道使用同一 PCR 产物

Fig. 2 Restriction patterns of amplified products from *Ulva* chloroplast digested by *Hha* I (upper) and *Sma* I (lower): The leftmost lane is the DNA marker, and the other lanes are samples. The corresponding lanes of upper and lower figures are the same PCR product digested by *Hha* I and *Sma* I, respectively

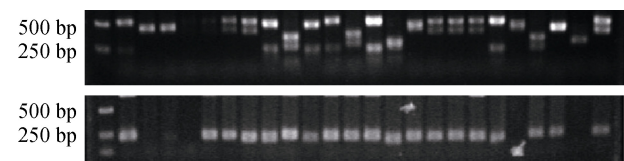


图 3 浒苔共附生细菌扩增产物 *Hha* I(上)和 *Sma* I(下)的酶切带型; 最左为 DNA Marker, 其余泳道为样本。上、下图的对应泳道使用同一 PCR 产物

Fig. 3 Restriction patterns of amplified products from *Ulva*-associated bacteria digested by *Hha* I (upper) and *Sma* I (lower): The leftmost lane is the DNA marker, while the other lanes are samples. The corresponding lanes of upper and lower figures are the same PCR product digested by *Hha* I and *Sma* I, respectively

### 2.3 共附生细菌 16S rDNA 片段扩增体系的优化

序列比对发现, 引物 799F 在 3'最末端与浒苔叶绿体 16S rDNA 序列仅存在一位差异碱基(图 4), 799F 为鸟嘌呤(G), 而叶绿体序列为腺嘌呤(A)。以藻菌总



图 4 引物与浒苔叶绿体 16S rDNA 匹配示意图; cp 示叶绿体, 序列方向为 5'-3'

Fig. 4 Alignment of primers and 16S rDNA sequence of *U. prolifera* chloroplast; cp represents chloroplast, the sequence direction is 5'-3'

DNA 为模板, 引物 799F 的检验与优化结果见表 2。结果表明, 无论使用普通 Taq 酶还是具热启动活性的 Taq Hot Start Version, 甚至将退火温度自 52℃ 提升至 56℃, 引物对 799F/1492R 在浒苔样本中的表现均不佳, 经酶切鉴定, 总计 3 组中高达 83.3%-100% 的扩增克隆为叶绿体来源, 表明 799F/1492R 几乎无法获得来自共附生细菌的 16S rDNA 扩增产物。

与反向通用引物 1100R 序列比对发现, 其 3'最末端与浒苔叶绿体序列也存在单碱基差异(图 4), 1100R 为鸟嘌呤(G), 而叶绿体序列为腺嘌呤(A)。组合使用 799F/1100R 引物对, 用 Taq 酶扩增 Up1 模板, 叶绿体来源序列占比下降至 60%; 改用 Taq Hot Start Version, 占比可进一步下降至 50%, 优化程度仍无法满足对共附生菌群落结构分析的要求。

表 2 不同扩增条件下的叶绿体来源克隆占比

Tab. 2 Percentage of amplified products of from *Ulva* chloroplast using different PCR conditions

引物对	DNA 模板	退火温度	DNA 聚合酶	鉴定克隆数	叶绿体来源克隆占比
799F/1492R	Up1	52℃	Taq 酶	24	100%
799F/1492R	Up1	56℃	Taq 酶	20	90%
799F/1492R	Up1	52℃	Taq Hot Start Version	24	83.3%
799F/1100R	Up1	52℃	Taq 酶	20	60%
799F/1100R	Up1	52℃	Taq Hot Start Version	24	50%
800F/1492R	Up1	52℃	Taq 酶	24	41.7%
800F/1492R	Up1	52℃	Ex Taq	20	100%
800F/1492R	Up1	52℃	Taq Hot Start Version	24	0%
800F/1492R	Up2	52℃	Taq Hot Start Version	24	0%
800F/1492R	Up3	52℃	Taq Hot Start Version	24	8.3%

在引物 799F 的基础上, 向 3'方向延伸 1 位与模板配对的碱基鸟嘌呤(G), 设计了新引物 800F(图 4)。使用 800F/1492R 引物对, 用 Taq 酶扩增 Up1 模板, 叶绿体来源序列的占比可显著下降至 41.7%。为了评估不同类型 DNA 聚合酶对扩增特异性的影响, 分别比较了具 3'-5'外切酶活性的高保真 Ex Taq 与 Taq Hot Start Version。使用前者替换 Taq 酶, 叶绿体来源序列的占比反而高达 100%, 而用后者替换 Taq 酶, 发现可完全消除叶绿体干扰, 而且相同扩增体系同样适用于浒苔 Up2 样本的模板, 使用 Up3 模板, 叶绿体来源序列的占比也仅为 8.3%, 可完全满足共附生细菌群落结构分析的试验要求。

### 3 讨论

引物的 3'末端序列对于 PCR 反应的延伸至关重要。引物 799F 在某些高等植物中可完全避免叶绿体

来源序列的扩增, 从而满足其共附生菌群结构分析的需要。其原理可能在于, 799F 的 3'最末端往往与高等植物叶绿体 DNA 存在两个非配对碱基, 二者退火结合后, 两个非配对的摆动碱基会导致 DNA 聚合酶难以进一步聚合延伸<sup>[15]</sup>。

本文使用 27F/1492R 引物对扩增得到浒苔叶绿体 16S rDNA 片段。比对发现, 引物 799F 的 3'最末端与浒苔叶绿体序列仅存在单碱基差异, 这可能是导致引物 799F 在浒苔中扩增特异性不强、叶绿体干扰严重的主要原因。即使提高退火温度, 引物 799F 仍可以与叶绿体 DNA 模板退火结合, 且 3'末端未发生配对的单一碱基不能阻止以叶绿体 DNA 为模板的非特异性扩增, 由于叶绿体基因组具有高拷贝数, 使得扩增产物中叶绿体来源序列占比超过 80%, 这一结果表明, 高等植物中通用引物对 799F/1492R 的扩增体系不能直接应用于浒苔共附生细菌群落结构

的分析。

通用引物 1100R 在 3'最末端与浒苔叶绿体序列也存在一个单碱基差异。与 799F/1492R 中仅 799F 具有选择性不同,引物对 799F/1100R 中两端的扩增引物均能发挥一定程度的选择性,理论上有利于明显降低叶绿体的干扰。但实验结果显示,这一策略仅能够使扩增产物中浒苔叶绿体来源序列的比例下降到 50-60%。这说明,引物 3'末端仅保留 1 位不匹配碱基是无法显著提升扩增特异性、避免叶绿体干扰的。

我们设计的新引物 800F 与通用引物 1492R 的配对取得了理想的效果。引物 800F 系由 799F 向 3'末端延伸了一位碱基鸟嘌呤(G),这一碱基与浒苔叶绿体及细菌同源序列中该位置的碱基匹配。使用 Taq 酶进行扩增,叶绿体来源序列占比进一步降至 41.7%,较引物对 799F/1492R(占比 100%)有明显优化。我们推测其原因在于,800F 与叶绿体同源序列退火结合时,由于 3'端倒数第二位存在非配对碱基 G,导致最末端的匹配碱基 G 也不能与叶绿体同源序列退火结合,从而产生了一个双碱基的摆动末端 GG,使得 DNA 聚合酶难以进一步聚合延伸;但在升降温过程中低于退火温度的条件下,800F 的 3'端仍可能与叶绿体同源序列发生完全退火,使得延伸得以进行,从而产生非特异的叶绿体来源的扩增产物。

为了验证这一假设并进一步优化,我们比较了具有 3'-5'外切酶活性的 Ex Taq 以及具热启动活性的 Taq Hot Start Version,结果完全符合预期。当引物 800F 与叶绿体模板非特异性结合时,由于 Ex Taq 存在校对功能,推测其对引物 800F 的游离双碱基 3'末端进行了加工剪切,从而使得延伸得以进行,最终产生了 100%的叶绿体来源序列。而 Taq Hot Start Version 由于不具备校对功能,并且可抑制低温条件下引物 800F 的非特异性扩增,从而基本完全避免了叶绿体的干扰。

综上所述,我们在引物 799F 的基础上,设计了新引物 800F,与通用引物 1492R 配对,使用具热启动功能、同时不具校对功能的 DNA 聚合酶,扩增细菌 16S rDNA 中具高分辨率的 V5-V9 可变区,可完全满足浒苔共附生细菌多样性组成分析的试验需求。

#### 参考文献:

[1] Lewis J, Kennaway G, Franca S, et al. Bacterium- dino-flagellate interactions: investigative microscopy of *Alexandrium* spp. (Gonyaulacales, Dinophyceae)[J]. *Phycologia*, 2001, 40: 280-285.

[2] Sieburth J M. Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1969, 3: 290-309.

[3] Berg G M, Repeta D J, Laroche J. Dissolved organic nitrogen hydrolysis rates in axenic cultures of *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae): Comparison with heterotrophic bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 401-404.

[4] Croft M T, Lawrence A D, Raux-Deery E, et al. Algae acquire vitamin B-12 through a symbiotic relationship with bacteria[J]. *Nature*, 2005, 438: 90-93.

[5] Marshall K, Joint I, Callow M E, et al. Effect of marine bacterial isolates on the growth and morphology of axenic plantlets of the green alga *Ulva linza*[J]. *Microbial Ecology*, 2006, 52: 302-310.

[6] Goecke F, Labes A, Wiese J, et al. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2010, 409: 267-299.

[7] Staufenberger T, Thiel V, Wiese J, et al. Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*[J]. *FEMS Microbiol Ecology*, 2008, 64: 65-77.

[8] Wiese J, Thiel V, Nagel K, et al. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11: 287-300.

[9] Nylund G M, Persson F, Lindegarh M, et al. The red alga *Bonnemaisonia asparagoides* regulates epiphytic bacterial abundance and community composition by chemical defence[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71: 84-93.

[10] Burke C, Thomas T, Lewis M, et al. Composition uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *ISME Journal*, 2011, 5: 590-600.

[11] Burke C, Steinberg P, Rusch D, et al. Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *PNAS*, 108: 14288-14293.

[12] Mei X Y, Wu C H, Zhao J, et al. Community structure of bacteria associated with drifting *Sargassum horneri*, the causative species of golden tide in the Yellow Sea[J]. *Front Microbiology*, 2019, 10: 1192.

[13] Aires T, Serrao E A, Kendrick G, et al. Invasion is a community affair: Clandestine followers in the bacterial community associated to green algae, *Caulerpa racemosa*, track the invasion source[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8: e68429.

[14] Hollants J, Leliaert F, Verbruggen H, et al. Host specificity and coevolution of Flavobacteriaceae endosymbionts within the siphonous green seaweed *Bryopsis*[J].

- Molecular Phylogenetics and Evolution, 2013, 67: 608-614.
- [15] Chelius M K, Triplett E W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L[J]. Microbial Ecology, 2001, 41: 252-263.
- [16] Sun L, Qiu F, Zhang X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis[J]. Microbial Ecology 2008, 55: 415-424.
- [17] Rastogi G, Tech J J, Coaker G L, et al. A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments[J]. Journal Microbiological Methods, 2010, 83: 127-132.
- [18] Bodenhausen N, Horton M W, Bergelson J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. PLoS ONE, 2013, 8: e56329.
- [19] Sagaram U S, DeAngelis K M, Trivedi P, et al. Bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus, using PhyloChip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing[J]. Applied Environmental Microbiology, 2009, 75: 1566-1574.
- [20] Zhao J, Jiang P, Liu Z Y, et al. The Yellow Sea green tides were dominated by one species, *Ulva* (*Enteromorpha*) *prolifera*, from 2007 to 2011[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58: 2298-2302.
- [21] Liu M, Dong Y, Zhao Y, et al. Structures of bacterial communities on the surface of *Ulva prolifera* and in seawaters in an *Ulva* blooming region in Jiaozhou Bay, China[J]. World Journal Microbiology and Biotechnology, 2011, 27: 1703-1712.
- [22] Fu H H, Jiang P, Zhao J, et al. Comparative genomics of *Pseudomonas* sp. strain SI-3 associated with macroalga *Ulva prolifera*, the causative species for green tide in the Yellow Sea[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1458.
- [23] Aires T, Marba N, Serrao E A, et al. Selective elimination of chloroplastial DNA for metagenomics of bacteria associated with the green alga *Caulerpa taxifolia* (Bryopsidophyceae)[J]. Journal of Phycology, 2012, 48: 483-490.
- [24] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
- [25] Lane D J, 16S/23S rRNA sequencing. in Nucleic acid techniques in bacterial systematics. eds Stackebrandt E. and Goodfellow M. New York, John Wiley and Sons, 1991, 115-175.
- [26] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. PNAS, 2011, 108: 4516-4522.
- [27] Parada A E, Needham D M, Fuhrman J A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples[J]. Environmental Microbiology, 2015, 18: 1403-1414.
- [28] Turner S, Pryer K M, Miao V P W, et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1999, 46: 327-338.

# Primers modification for analysis of *Ulva prolifera*-associated bacterial community

LIU Xiao-Jie<sup>1, 2, 3, 4</sup>, ZHAO Jin<sup>1, 2, 3</sup>, GUO Yang<sup>1, 2, 3, 4</sup>, WU Chun-Hui<sup>1, 2, 3, 4</sup>,  
CHEN Hua-Xin<sup>1, 2, 3</sup>, JIANG Peng<sup>1, 2, 3</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Jul. 11, 2019

**Key words:** 16S rDNA; associated bacteria; *Ulva prolifera*; chloroplast; primer

**Abstract:** Macroalgal-associated bacteria play key roles in terms of algal growth and nutrition acquisition. *Ulva prolifera* is the only dominated species of green tides in the Yellow Sea. The study of the community structure of associated bacteria would contribute to reveal bacteria's key function in the blooming of their host. Due to a prokaryotic origin and high copy numbers, the genomic DNA of plant chloroplast usually interferes with the amplification of 16S rDNA fragments from associated bacteria. To overcome this issue in higher plants, a universal primer 799F, which has a two-bp mismatched 3' end with chloroplast DNA was developed to specifically amplify fragments only from bacteria. In this study, for the first time, the primer 799F was evaluated in seaweed considering different strains of *U. prolifera*. However, the failure of bacteria-bias amplification was revealed and attributed to only one-bp mismatched 3' end of primer 799F with determined *U. prolifera* chloroplast DNA. According to the comparison and modification, a new primer 800F was designed based on 799F. Coupled with the universal reverse primer 1492R, the V5–V9 region from the 16S rDNA of bacteria could be amplified without almost any interference from *Ulva* chloroplast when hot-start and non-proofreading DNA polymerase were used. This study clarifies the principle of modified profile with new primer, which can be applied to the analysis of community structure of *U. prolifera*-associated bacteria.

(本文编辑: 赵卫红)