

青岛近海球形棕囊藻的宏条形码分析*

王一奇^{1, 2, 3, 4} 丁翔翔^{1, 2, 3, 4} 宋会银^{1, 2, 3, 5} 陈楠生^{1, 2, 3}

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 崂山实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 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; 5. 江汉大学 湖北武汉 430056)

摘要 自 1997 年球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)赤潮首次在我国南海海域暴发以来, 该赤潮在我国南海和渤海的多个海域频繁暴发, 表明球形棕囊藻在我国海域的分布比较广泛。尽管如此, 在此之前开展的分类和生态调查研究均未发现我国海域球形棕囊藻的存在。近年来基于分子标记扩增和高通量测序的宏条形码分析检测到了球形棕囊藻, 显示出宏条形码分析对球形棕囊藻鉴定的优势。然而, 由于包括球形棕囊藻在内的定鞭藻的 18S rDNA 序列具有较高的 G(Guanine, 鸟嘌呤)C(Cytosine, 胞嘧啶)含量等特点, 导致针对球形棕囊藻的宏条形码分析结果在很大程度上依赖分子标记的选择或 PCR 扩增引物的选择。以青岛栈桥海域样本为研究对象, 评估了扩增通用分子标记 18S rDNA V4 的两套常用 PCR 引物(即 Stoeck 引物和 Song 引物)对球形棕囊藻的宏条形码分析结果的影响, 并利用 Song 引物对青岛近海 2021 年冬季突发性球形棕囊藻赤潮样本开展了宏条形码分析。分析发现不同引物对定鞭藻门物种的分析结果具有显著影响。利用 Stoeck 引物的宏条形码分析没有获得任何对应的定鞭藻的 ASV(amplicon sequence variant, 扩增子序列变异); 与此相比, 利用 Song 引物的宏条形码分析鉴定了 76 个定鞭藻 ASVs, 说明 Song 引物能够有效扩增定鞭藻的 18S rDNA V4 序列。利用 Song 引物对青岛栈桥海域 2021 年 9 月逐日样本展开的宏条形码分析发现了两个注释为球形棕囊藻的 ASVs (ASV_2 和 ASV_6), 表明青岛栈桥海域不仅存在球形棕囊藻, 而且具有一定的遗传多样性。利用 Song 引物对青岛近海 2021 年冬季突发性球形棕囊藻赤潮样本的宏条形码分析也发现了 ASV_2 和 ASV_6, 并且发现这两种 ASVs 的相对丰度显示出不同的时间变化过程, 表明它们代表了不同的球形棕囊藻株系。其中 ASV_2 代表的球形棕囊藻株系随着西海岸赤潮暴发呈现出先增加后减少的趋势, 相对丰度较高, 而 ASV_6 代表的球形棕囊藻株系变化幅度较小, 相对丰度较低, 表明 ASV_2 所代表的球形棕囊藻株系是青岛近海 2021 年冬季球形棕囊藻赤潮暴发过程中的主要贡献者。研究表明, 引物的选择对基于常用分子标记 18S rDNA V4 展开的针对球形棕囊藻的宏条形码分析非常重要; 选择合适的引物不仅可以有效跟踪球形棕囊藻和其他浮游植物, 还能够区分和跟踪不同球形棕囊藻株系的动态变化过程。

关键词 球形棕囊藻; 赤潮; 分子标记; PCR 引物; 宏条形码分析

中图分类号 Q949.2 doi: 10.11693/hyhz20230100014

隶属于定鞭藻门(Haptophyta)的棕囊藻属(*Phaeocystis* Lagerheim)物种在包括极地和温带海域在内的全球海域广泛分布, 既是重要的初级生产者,

也是构成海洋生态系统的基础, 为浮游动物提供食物(齐雨藻等, 2001)。棕囊藻属物种具有重要的生态功能, 不仅能够合成和降解二甲基巯基丙酸(DMSP),

* 国家自然科学基金项目, 42176162 号; 中国科学院战略性先导科技专项(B类), XDB42000000 号; 中国科学院率先行动“百人计划”; 泰山学者特聘专家计划。王一奇, 硕士研究生, E-mail: wangyiqi@qdio.ac.cn

通信作者: 陈楠生, 博士生导师, 研究员, E-mail: chenn@qdio.ac.cn

收稿日期: 2023-01-20, 收修改稿日期: 2023-07-14

释放二甲基硫(DMS)在气候调节中起重要作用(沈萍萍等, 2018), 而且可以引起赤潮, 在包括欧洲北海沿岸海域、荷兰沿海、挪威海等海域频繁暴发, 产生灰白色泡沫, 给海洋环境和渔业造成极大危害(齐雨藻等, 2002)。自 1997 年 10 月球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)赤潮首次在我国东南沿海海域大规模暴发以来, 球形棕囊藻赤潮在包括福建、广东、广西、海南、河北及天津等省市海域在内的多个海域都频繁暴发(Wang *et al.*, 2021)。

由于球形棕囊藻具有复杂的异型生活周期(heteromorphic life cycle), 既包括游离具有鞭毛的单细胞形态, 也具有囊体形态, 不同形态具有不同的生理和生态特征(Rousseau *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2021), 加上球形棕囊藻细胞很小(直径约 3~9 μm), 增加了基于形态特征的检测和鉴定的难度。1997 年球形棕囊藻赤潮首次在我国海域暴发时, 曾经根据其形态特征鉴定为波切棕囊藻(*Phaeocystis pouchetii*) (何家苑等, 1999), 后来通过分子生物学方法确认为球形棕囊藻(王宁等, 2000), 表明分子生物学方法的辅助鉴定大大提升了鉴定的敏感性和准确性。在球形棕囊藻赤潮首次在我国海域暴发时, 赤潮原因种曾被鉴定为一个新纪录种(陈菊芳等, 1999)。不过由于其细胞小, 在浮游植物调查研究中可能被忽视, 因此并不能排除它本来就是我国海域的一个常见物种, 只是长期没有得到准确鉴定。

基于通用分子标记扩增子高通量测序的宏条形码分析(metabarcoding analysis)越来越广泛地应用于鉴定特定海洋生态环境中浮游植物的组成并跟踪浮游植物的时空动态变化(陈楠生, 2020)。与其他种类分子标记相比, 针对海洋浮游植物和赤潮物种的宏条形码分析中应用最多的分子标记 18S rDNA V4 具有较高的分辨率, 其长度(~380 bp)也适于 DNA 二代测序技术, 而且参考序列最丰富(Guillou *et al.*, 2013)。不过, 由于包括球形棕囊藻在内的定鞭藻物种的 18S rDNA 均具有较高的 GC 含量, 使得基于不同引物的 PCR 扩增结果出现了不利于定鞭藻物种的扩增偏好性, 导致宏条形码分析容易遗漏掉大量的定鞭藻物种(Liu *et al.*, 2009)。这些研究表明扩增引物的选择对针对定鞭藻物种的宏条形码分析的重要性。为了评估 18S rDNA V4 不同扩增引物对球形棕囊藻宏条形码分析结果的影响, 我们利用青岛栈桥海域的水样, 比较分析了 18S rDNA V4 扩增引物对宏条形码分析结果的影响。本研究比较分析了 18S rDNA V4 两组常

用扩增引物: (1) 由 Stoeck 等开发的扩增引物(简称 Stoeck 引物), 包括 V4F: CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGTAATTCC 和 V4R: ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A (Stoeck *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2021); (2) 由宋伦等开发的扩增引物(简称 Song 引物), 包括 V4-F: GCGTAATTCCAGCTCCAAT 和 V4-R: GATCCCC HWACTTTCGTTCTTGA(宋伦等, 2016)。除此之外, 还比较分析了 2021 年冬季青岛近岸海域(西海岸)首次暴发的球形棕囊藻赤潮(Li *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2022; 张清春等, 2022)样本的球形棕囊藻及其时间动态变化。

1 材料与方法

1.1 样品采集

为了比较分析通用分子标记 18S rDNA V4 的扩增引物选择对针对球形棕囊藻的宏条形码分析结果的影响, 我们在青岛栈桥海域系统开展了时间序列的采样。从 2021 年 9 月 1 日至 30 日, 于青岛栈桥定点(图 1)完成了 30 天不间断的连续逐日采样。采集时间为每天上午 10 点, 每次采集表层海水 5 L, 采用 200 μm 筛绢于现场完成藻细胞过滤, 去掉大型的浮游动物和浮游植物, 保留藻细胞样本, 带回实验室进行第 2 次过滤, 采用 0.2 μm 的聚碳酸酯膜(Millipore, USA) 对 1.5 L 海水进行过滤, 携带藻细胞的滤膜迅速放入液氮罐中冷冻保存。除了采集藻细胞, 还于现场完成了温度和盐度的测量, 并于实验室完成了对海水样本进行叶绿素和营养盐测量(附表 1)。

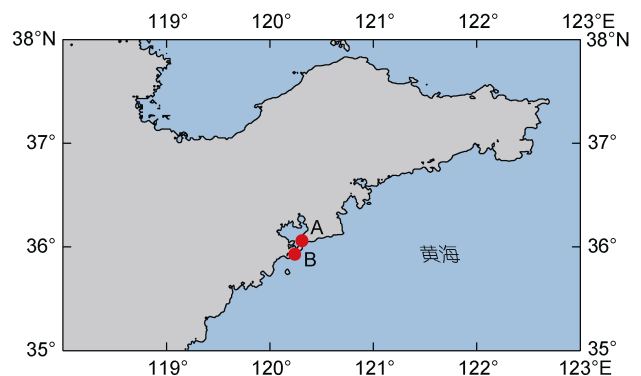


图 1 本研究采样位点示意图

Fig.1 Locations of sampling sites in this study

注: 采样点 A: 青岛栈桥; 采样点 B: 青岛西海岸

青岛近海于 2021 年冬季(12 月)突然暴发了一次球形棕囊藻赤潮, 我们对此赤潮事件也进行了时间序列的采样。采样站位于青岛鲁海丰海洋牧场(图 1),

共完成了 7 次采样, 包括 12 月 3 日、12 月 8 日、12 月 11 日、12 月 16 日、12 月 21 日、12 月 26 日和 12 月 31 日采样。赤潮暴发期间, 海水中的球形棕囊藻囊体很多, 肉眼可见(附图 1), 最后一次采集样品时肉眼可见的囊体很少且没有完整的形态。每次采集 1.5 L 表层海水, 为避免过滤掉囊体, 现场直接采集表层海水, 未经筛绢过滤, 后续的采样流程与青岛栈桥海域时间序列的采样流程相同。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

滤膜细胞的 DNA 提取方法参照文献(Liu *et al.*, 2020)。为了比较由于引物选择对分子标记 18S rDNA V4 扩增结果的影响, 分别利用 Stoeck 引物和 Song 引物对栈桥海域样本的 DNA 进行了扩增。

针对西海岸赤潮海域样本, 利用 Song 引物进行了扩增。

扩增结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物的长度, 检测合格后将产物送至北京诺禾致源科技股份有限公司, 使用 Illumina 公司 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 文库试剂盒进行文库的构建, 构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测, 合格后, 使用 NovaSeq 6000 PE250 模式进行上机测序。

1.3 生物信息学分析

利用 R 包 DADA2 对扩增子测序结果展开宏条形码分析(Callahan *et al.*, 2016, 2017), 分析参数设置如下: maxEE = c(2,2), minLen = 200, truncLen = c(220,220), minBoot = 80, and Min overlap = 12。运行得到 ASV 丰度信息以及各个 ASV 的 PR² 注释结果。为保证各样本测序深度的可比性, 使用 R 包 Vegan(Dixon, 2003)按照 ASV 丰度表格中样本的最低数据量抽平, 并采用 0.01% 的阈值进行丰度筛选。接着对各个 ASV 进行进一步的 blastn 注释, 设置 PID 大于 99%, Coverage 大于 95%, 合并 PR² 注释结果和 blastn 注释结果。通过 Mega 11.0 软件的最大似然法构建了 ASV 和代表序列之间的遗传进化树(Tamura *et al.*, 2021), Bootstrap 值为 1 000。各 ASV 之间的 TCS 遗传网络图是借助 PopART v1.7 构建的(Leigh *et al.*, 2015)。利用 R 包 corrplot(Wei *et al.*, 2017)和 psych(Revelle, 2021)完成了 ASV 与环境因子的相关性分析。利用 R 包 Vegan(Dixon, 2003)完成了对测序数据的稀释曲线分析。

1.4 基于 18S rDNA V4 的遗传多样性分析

把从宏条形码分析结果中筛选出注释为球形棕

囊藻的 18S rDNA V4 ASV 序列, 以及从不同海域分离到的代表性球形棕囊藻株系的 18S rDNA V4 序列一起构建系统发育树。这些代表性球形棕囊藻株系包括: CNS00062(北部湾)、CNS00063(北部湾)、CNS00069(北部湾)、CNS00073(北部湾)、CNS00076(北部湾)、CNS00082(越南)、CNS00093(越南)、CNS00254(越南)、CNS00079(泰国)、CNS01609(青岛西海岸赤潮暴发海域)和 Pg-G(A)(欧洲北海)。

2 结果

2.1 评估 18S rDNA V4 扩增引物对球形棕囊藻宏条形码分析结果的影响

本研究中, 每一个样本的 18S rDNA V4 扩增子通过二代测序获得约 5 万条 reads(图 2)。稀释曲线分析(附图 2a, 2b)表明测序深度基本达到饱和, 足够用于分析样本中浮游植物的组成。通过对不同扩增引物(Stoeck 引物和 Song 引物)获得的测序结果进行宏条形码分析, 获得了绿藻, 隐藻, 甲藻, 定鞭藻等浮游植物门的组成信息(图 2)。利用 Stoeck 引物(Stoeck *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2021)的扩增结果开展宏条形码分析获得的甲藻门(Dinoflagellata)、棕鞭藻门(Ochrophyta, 包括硅藻)、定鞭藻门(Haptophyta)、绿藻门(Chlorophyta)和隐藻门(Cryptophyta)的 ASV(amplicon sequence variant, 扩增子序列变异)数目分别为 479、244、0、43 和 21 个; 利用 Song 引物(宋伦等, 2016)的扩增结果开展宏条形码分析获得的甲藻门、棕鞭藻门、定鞭藻门、绿藻门和隐藻门分别为 581、293、76、49 和 26 个。比较两种引物的分析结果发现差异主要体现在定鞭藻门上, 利用 Stoeck 引物的宏条形码分析没有发现任何鉴定为定鞭藻门的 ASV, 而利用 Song 引物的宏条形码分析发现了 76 个鉴定为定鞭藻门的 ASVs(图 3a, 3c)。因此, Song 引物能够更好地实现对 18S rDNA V4 的扩增, 从而能够更好地扩增出定鞭藻物种, 更适于针对定鞭藻的宏条形码分析。

2.2 宏条形码分析可以成功鉴定球形棕囊藻并且能够鉴定球形棕囊藻的遗传多样性

通过对青岛栈桥海域的 30 个逐日样本的宏条形码分析得到的全部 ASVs 进行物种注释, (图 4a)发现了两个 ASVs(ASV_2 和 ASV_6)注释为球形棕囊藻, 这两个 ASVs 可能代表两个球形棕囊藻株系。这两个 ASVs 在所有 30 个栈桥海域样本中都出现了(图 5d, 5e, 5f), 并且具有相对稳定的水平, 表明青岛海域中存在球形棕囊藻, 并且存在一定的遗传多样性, 是青岛

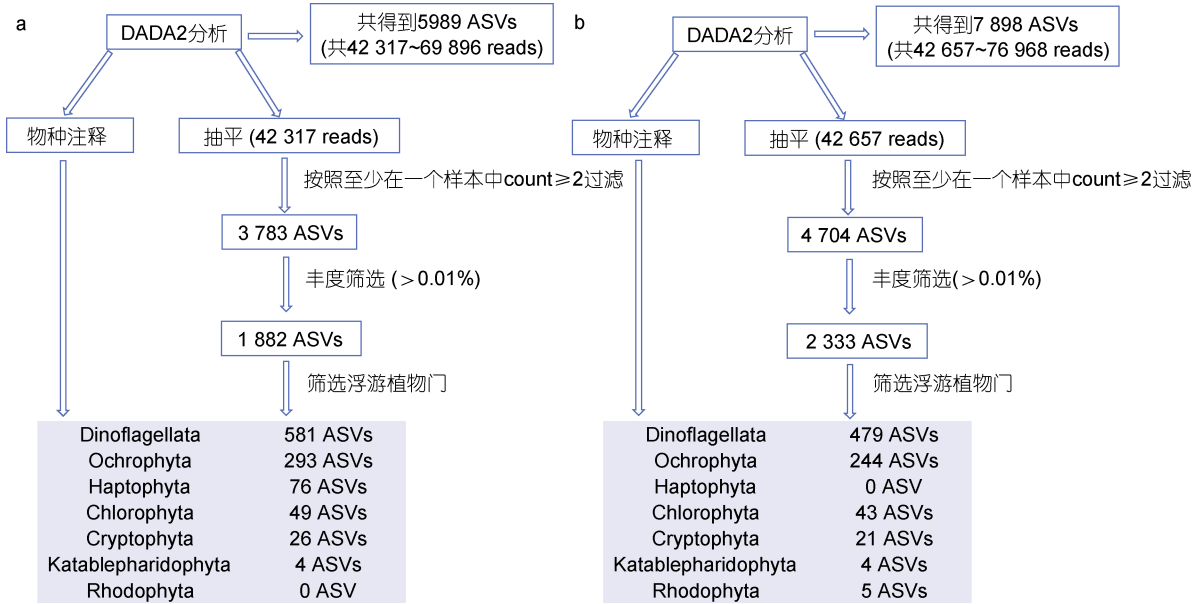


图 2 栈桥海域样本的宏条形码分析流程

Fig.2 Metabarcoding analysis of the samples collected in Zhanqiao Pier, Qingdao
注: a 图展示的是基于 Song 引物的分析流程; b 图是基于 Stoeck 引物的分析流程

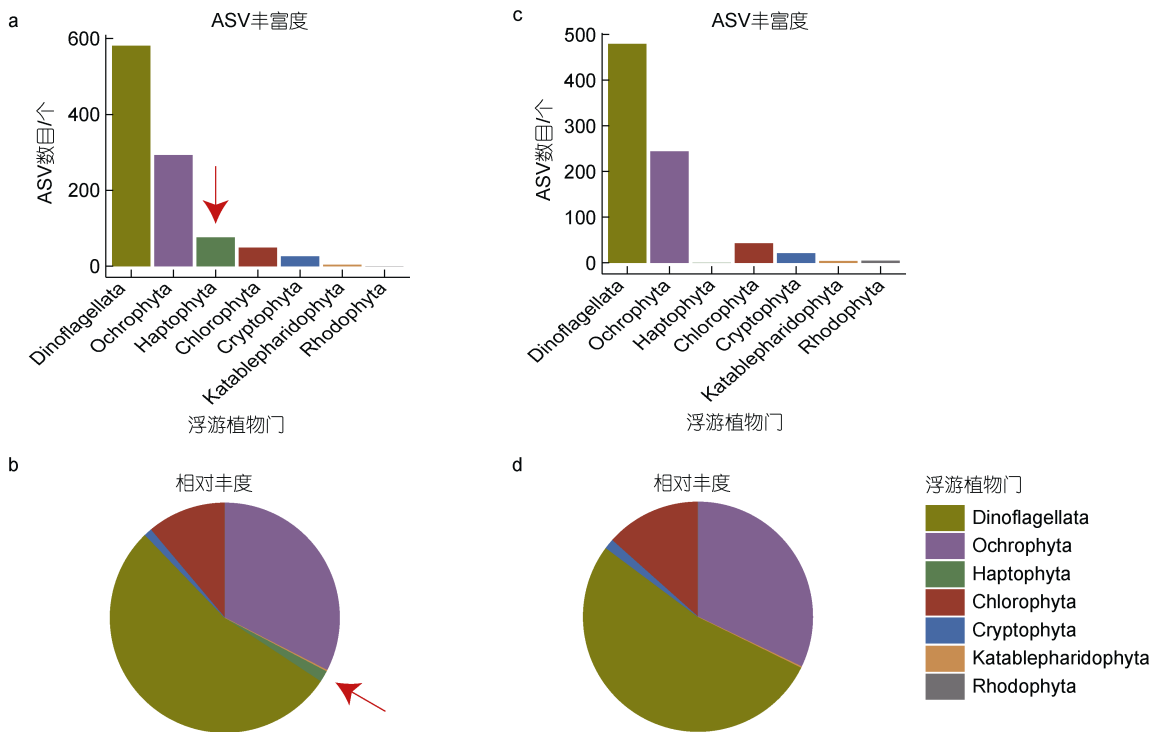


图 3 青岛栈桥海域样本宏条形码分析结果

Fig.3 Results of metabarcoding analysis of the samples collected in Zhanqiao Pier, Qingdao
注: a 和 b 图分别展示基于 Song 引物的 ASVs 丰富度和相对丰度结果; c 和 d 图是基于 Stoeck 引物的 ASVs 丰富度和相对丰度结果。图中的红色箭头标注的是定鞭藻门(Haptophyta)

近海的本地株系。本研究表明 Song 引物不仅可以成功扩增球形棕囊藻的 18S rDNA V4, 并且扩增结果可以揭示球形棕囊藻的遗传多样性。

利用 Song 引物对青岛近海 2021 年冬季(12 月)突发性球形棕囊藻赤潮暴发期间采集的时间序列样本的宏条形码分析也发现了这两个 ASVs 的信息, 并

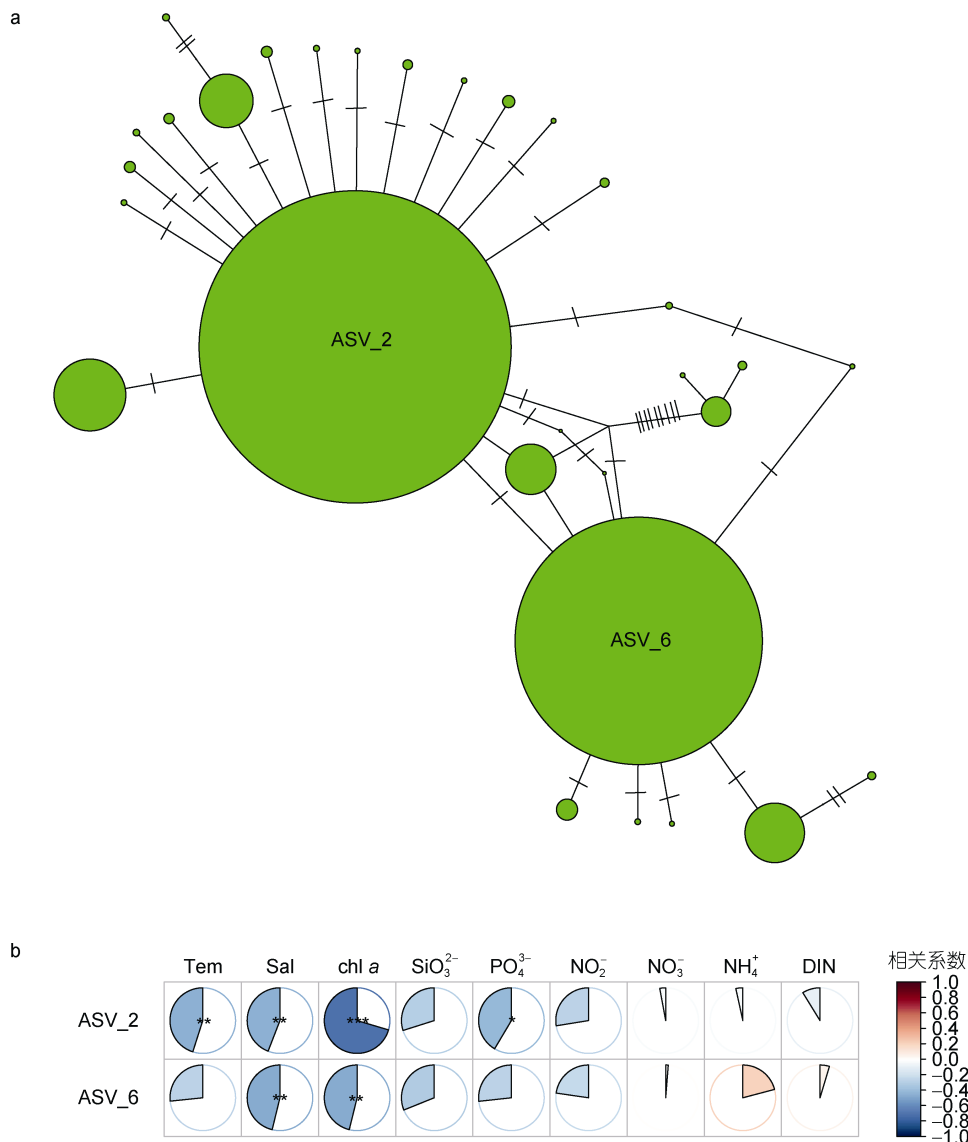


图4 球形棕囊藻 ASVs 之间的遗传多样性及其与环境因子相关性分析

Fig.4 TCS network display of ASVs annotated as *P. globosa* and their correlation with environmental factors

注: a 图 TCS 网络图显示了注释为球形棕囊藻的 ASVs, 其中 ASV_2 和 ASV_6 是主要的 ASVs, 每个绿色小球的大小代表 ASV 丰度的多少, 每个 ASV 之间连线上的短杠代表两个相邻 ASV 之间的碱基差异数。b 图展示 ASV_2 和 ASV_6 与环境因子之间的相关性, *表示 P 值 < 0.05, **表示 P 值 < 0.01, ***表示 P 值 < 0.001。图中 Tem 代表温度, Sal 代表盐度, chl *a* 代表叶绿素 *a*, SiO₃²⁻ 代表硅酸盐, PO₄³⁻ 代表磷酸盐, NO₂⁻ 代表亚硝酸盐, NO₃⁻ 代表硝酸盐, NH₄⁺ 代表铵盐, DIN 代表无机氮

且比较分析发现两种 ASVs 的相对丰度显示出不同的时间变化规律(图 5)。在从青岛西海岸球形棕囊藻赤潮暴发过程中采集到的样本中, ASV_2 代表的球形棕囊藻株系在赤潮暴发高潮期间的相对丰度较高, 并在赤潮暴发过程中显示出较强的丰度变化, 随着赤潮的消退逐步降低(图 5a)。与 ASV_2 代表的株系相比, ASV_6 代表的球形棕囊藻株系的相对丰度较低, 并在赤潮暴发过程中显示出较弱的丰度变化, 基本

维持在接近本底的水平(图 5b)。此外, 在球形棕囊藻赤潮暴发高峰期 ASV_2 的丰度也高于 ASV_6 (图 5c)。这说明以 ASV_2 和 ASV_6 为代表的两类球形棕囊藻在西海岸赤潮暴发中扮演着不同的角色: 以 ASV_2 为代表的球形棕囊藻随着西海岸赤潮暴发呈现出先增加后减少的趋势, 且在西海岸赤潮起主要作用, 而以 ASV_6 为代表的球形棕囊藻变化较小。

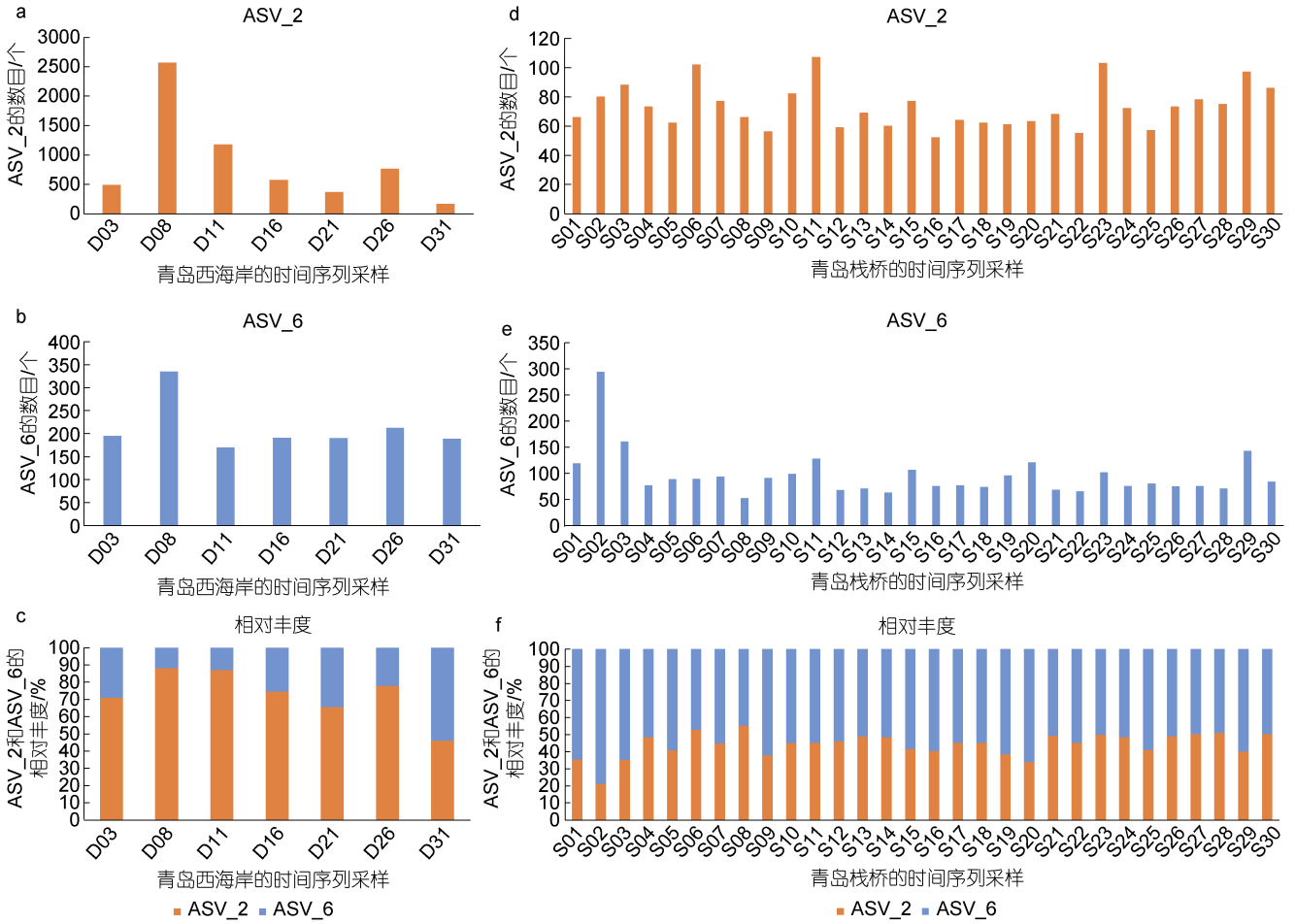


图5 ASV_2 和 ASV_6 在青岛西海岸(a, b, c)与青岛栈桥样本(d, e, f)中的时间动态变化

Fig.5 Dynamic changes of ASV_2 and ASV_6 in Xihaiian region, Qingdao (a, b, c) and Zhanqiao Pier region, Qingdao (d, e, f)
注: a、b、c 图中的横坐标 D 代表青岛西海岸海域; d、e、f 图中的横坐标 S 代表青岛栈桥海域。

ASV_2 和 ASV_6 与青岛海域的环境因子的相关性分析(图 4b)表明, 与 ASV_6 相比, ASV_2 与海水温度呈显著负相关($P < 0.01$), 说明 ASV_2 代表的是一类耐低温的球形棕囊藻株系, 在环境条件适宜时造成此次赤潮暴发。

2.3 基于 18S rDNA V4 的球形棕囊藻遗传多样性分析
前期的研究表明球形棕囊藻具有较高的遗传多样性(Song *et al.*, 2020, 2021, 2022; Wang *et al.*, 2021)。为了探索本研究中发现的 ASV_2 和 ASV_6 所代表的球形棕囊藻与前期报道的球形棕囊藻的遗传多样性之间的关系, 我们将 ASV_2 和 ASV_6 序列与 11 株从不同海域分离的球形棕囊藻株系的 18S rDNA V4 序列进行了遗传进化分析(图 6)。发现这些 18S rDNA V4 序列可以聚成两个不同的分支, 球形棕囊藻代表性株系的 18S rDNA V4 序列要么与 ASV_2 聚在一起, 要么与 ASV_6 聚在一起(图 6), 表明根据 18S rDNA

V4 可以将球形棕囊藻株系区分为两类。此外, ASV_2 序列还与 CNS01609 株系(在青岛西海岸赤潮暴发海域分离)聚在一起。本研究表明, 宏条形码分析中常用的通用分子标记(即可以用于扩增广谱性物种)18S rDNA V4 不仅可以鉴定到球形棕囊藻, 还可以用于初步区分球形棕囊藻的遗传差异。

3 讨论

3.1 通用分子标记 18S rDNA V4 的 PCR 扩增引物选择对宏条形码分析结果的准确性很重要
通过比较针对分子标记 18S rDNA V4 的两套不同 PCR 扩增引物(即 Stoeck 引物和 Song 引物)发现, 这两套针对 18S rDNA V4 的扩增引物得到的宏条形码分析结果显示出巨大不同。尽管基于两套引物的宏条形码分析均鉴定出大部分门类的浮游植物组成, 包括甲藻、棕鞭藻、绿藻和隐藻(图 3)。然而只有基

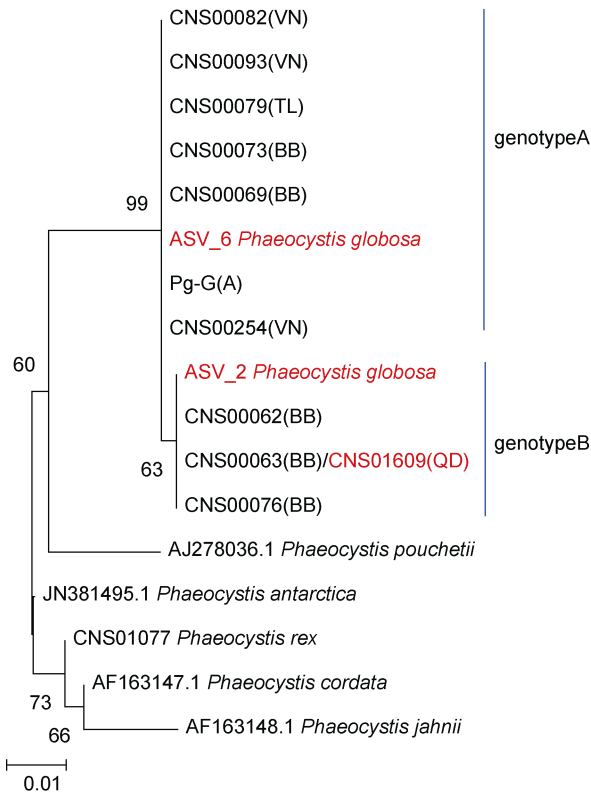


图 6 基于通用分子标记 18S rDNA V4 序列的遗传进化分析

Fig.6 Phylogenetic analysis of the common molecular marker 18S rDNA V4

注: 括号里表示不同地理位置的缩写, BB: 北部湾; TL: 泰国海域; VN: 越南海域; QD: 青岛海域。Pg-G(A)代表欧洲北海株系, 图中的红色字体代表青岛海域的球形棕囊藻株系

于 Song 引物的宏条形码分析获得了定鞭藻信息(76 个 ASVs), 基于 Stoeck 引物的宏条形码分析没有检测到任何定鞭藻信息。本研究结果与宋伦等(2016)的分析结果基本相符。此外, 本研究结果进一步明确了 18S rDNA V4 扩增引物的选择对研究结果的准确性很重要。

3.2 青岛近岸海域存在当地球形棕囊藻株系

本研究发现在青岛近岸海域中可以鉴定到球形棕囊藻信息, 并且该分子生物学鉴定结果与形态学鉴定结果(附图 1)相符, 因球形棕囊藻单细胞尺寸很小, 分子生物学的快速鉴定显示出方法的优势。此外, 针对野外样本的宏条形码分析得到的球形棕囊藻序列 ASV_2 与 2021 年冬季青岛西海岸球形棕囊藻赤潮爆发海域分离到的球形棕囊藻株系 CNS01609 的 18S rDNA V4 序列完全一致(图 6), 进一步证实青岛近岸海域存在本底球形棕囊藻株系。不仅如此, 经分子生物学鉴定分析发现在青岛栈桥海域和西海岸赤潮暴

发海域中均出现了两类不同的球形棕囊藻株系(即由 ASV_2 和 ASV_6 代表的两类株系)。ASV_2 和 ASV_6 在 2021 年 9 月栈桥海域的整月采样过程中相对比较稳定, 没有受到潮汐的显著影响(图 5)。利用 18S rDNA V4 (Liu *et al*, 2020)针对 2019 年 1 月胶州湾海域样本的宏条形码分析以及利用高分辨率分子标记 *pgcp1* (Song *et al*, 2020, 2022)和 *cox1* (Song *et al*, 2021, 2022)针对 2019 年 1 月胶州湾海域样本的分子分析也鉴定到球形棕囊藻的存在, 与本研究结果相符, 表明青岛海域不仅存在本底球形棕囊藻, 还具有一定的遗传多样性。

3.3 不同球形棕囊藻株系对青岛海域突发性赤潮具有不同的贡献

本研究基于 18S rDNA V4 的宏条形码分析发现, 于 2021 年冬季(12 月)在青岛近海突然暴发的球形棕囊藻赤潮样本中可以分辨出两个主要 ASVs, 即 ASV_2 和 ASV_6。其中 ASV_2 的相对丰度较高, 并随赤潮的变化呈现显著的动态变化, 随着赤潮消退呈现下降趋势(图 5)。说明造成此次赤潮的致灾基因型是以 ASV_2 所代表的这类球形棕囊藻株系。由此可以判断, 不同株系对球形棕囊藻赤潮的形成具有不同的贡献。从该赤潮爆发海域分离到的球形棕囊藻株系 CNS01609 的 18S rDNA V4 序列与 ASV_2 序列在系统发育树中聚在一起(图 6), 表明代表 ASV_2 的球形棕囊藻株系在赤潮样本中大量存在。

4 结论

18S rDNA V4 是迄今宏条形码分析中最常用的分子标记(陈楠生, 2020)。本研究比较了两对不同的 18S rDNA V4 引物在扩增球形棕囊藻时的差别, 包括常用引物(即 Stoeck 引物)和球形棕囊藻特异性引物(即 Song 引物)。比较分析表明在展开宏条形码分析时, 选择合适的引物对于分析结果至关重要。宏条形码分析结果表明, 青岛近岸海域存在本底球形棕囊藻, 尽管相对丰度不高, 但是具有一定的遗传多样性, 主要有两种, 分别由 ASV_2 和 ASV_6 所代表。其中 ASV_2 所代表的球形棕囊藻株系更可能是造成此次赤潮暴发的致灾基因型, 表明不同球形棕囊藻株系在球形棕囊藻赤潮爆发过程中的贡献不同。此外, 两种代表 ASVs 与环境因子的相关性分析表明, ASV_2 所代表的球形棕囊藻株系与温度呈显著负相关。本研究表明利用 Song 引物扩增分子标记 18S rDNA V4 在鉴定其他大量浮游植物的同时, 不仅可以检测到青

岛近岸海域存在本底球形棕囊藻, 还可以鉴定出 2 种基因型的球形棕囊藻(ASV_2 和 ASV_6)。因此, 在考虑选择合适的引物开展针对球形棕囊藻以及其他定鞭藻的宏条形码分析时, 建议选择 Song 引物(宋伦等, 2016)开展基于 18S rDNA V4 的宏条形码研究。不过, 如果研究目标只是球形棕囊藻的遗传多样性, 可以选择利用高分辨率分子标记 *pgcp1*(Song *et al.*, 2020) 或 *cox1*(Song *et al.*, 2021)。

参 考 文 献

- 王宁, 陈月琴, 屈良鹤, 等, 2000. 1997 粤东海域棕囊藻赤潮原因种 18S rDNA 基因分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 39(1): 127-128.
- 齐雨藻, 沈萍萍, 王艳, 2001. 棕囊藻属(*Phaeocystis*)的分类与生活史(综述)[J]. 热带亚热带植物学报, 9(2): 174-184.
- 齐雨藻, 徐宁, 王艳, 等, 2002. 中国赤潮研究的新进展——球形棕囊藻赤潮及其产硫的研究[J]. 中国基础科学, (4): 25-30.
- 何家苑, 施之新, 张银华, 等, 1999. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析[J]. 海洋与湖沼, 30(2): 172-179.
- 沈萍萍, 齐雨藻, 欧林坚, 2018. 中国沿海球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)的分类、分布及其藻华[J]. 海洋科学, 42(10): 146-162.
- 宋伦, 吴景, 刘卫东, 等, 2016. 渤海长兴岛海域微型和微微型浮游植物多样性[J]. 环境科学研究, 29(11): 1635-1642.
- 张清春, 向玲, 王锦秀, 等, 2022. 南黄海首次暴发“巨囊”生态型球形棕囊藻藻华[J]. 海洋与湖沼, 53(5): 1098-1107.
- 陈菊芳, 徐宁, 江天久, 等, 1999. 中国赤潮新记录种 球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 20(3): 124-129.
- 陈楠生, 2020. 有害藻华的宏条形码分析: 机会与挑战[J]. 海洋科学, 44(7): 116-134.
- CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, HOLMES S P, 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis [J]. The ISME Journal, 11(12): 2639-2643.
- CALLAHAN B J, MCMURDIE P J, ROSEN M J, *et al.*, 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data [J]. Nature Methods, 13(7): 581-583.
- DIXON P, 2003. VEGAN, a package of R functions for community ecology [J]. Journal of Vegetation Science, 14(6): 927-930.
- GUILLOU L, BACHAR D, AUDIC S, *et al.*, 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR²): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy [J]. Nucleic Acids Research, 41(D1): D597-D604.
- LEIGH J W, BRYANT D, 2015. POPART: full feature software for haplotype network construction [J]. Methods in Ecology and Evolution, 6(9): 1110-1116.
- LI D M, XUE Y, SONG Q S, *et al.*, 2022. First report on large-scale *Phaeocystis globosa* bloom in the southern Yellow Sea, China [J]. Frontiers in Marine Science, 9: 880984.
- LIU S Y, GIBSON K, CUI Z M, *et al.*, 2020. Metabarcoding analysis of harmful algal species in Jiaozhou Bay [J]. Harmful Algae, 92: 101772.
- LIU H, PROBERT I, UITZ J, *et al.*, 2009. Extreme diversity in noncalcifying haptophytes explains a major pigment paradox in open oceans [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(31): 12803-12808.
- LIU S Y, ZHANG M J, ZHAO Y F, *et al.*, 2021. Biodiversity and spatial-temporal dynamics of *Margalefidinium* species in Jiaozhou Bay, China [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(21): 11637.
- REVELLE W, 2021. psych: Procedures for psychological, psychometric, and personality research (Version 2.1.9). Illinois, USA: Northwestern University, Evanston.
- ROUSSEAU V, CHRÉTIENNOT-DINET M J, JACOBSEN A, *et al.*, 2007. The life cycle of *Phaeocystis*: state of knowledge and presumptive role in ecology [J]. Biogeochemistry, 83(1/2/3): 29-47.
- SONG H Y, CHEN Y, GIBSON K, *et al.*, 2021. High genetic diversity of the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* revealed using the molecular marker *COX1* [J]. Harmful Algae, 107: 102065.
- SONG H Y, LIU F, LI Z L, *et al.*, 2020. Development of a high-resolution molecular marker for tracking *Phaeocystis globosa* genetic diversity through comparative analysis of chloroplast genomes [J]. Harmful Algae, 99: 101911.
- SONG H Y, WANG Y Q, DING X X, *et al.*, 2022. Genetic analysis of a large-scale *Phaeocystis globosa* bloom offshore Qingdao, China [J]. Microorganisms, 10(9): 1723.
- STOECK T, BASS D, NEBEL M, *et al.*, 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water [J]. Molecular Ecology, 19(S1): 21-31.
- TAMURA K, STECHER G, KUMAR S, 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. Molecular Biology and Evolution, 38(7): 3022-3027.
- WANG X D, SONG H Y, WANG Y, *et al.*, 2021. Research on the biology and ecology of the harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa* in China: Progresses in the last 20 years [J]. Harmful Algae, 107: 102057.
- WEI T, SIMKO V, 2017. R package “corrplot”: Visualization of a correlation matrix (Version 0.84). <https://github.com/taiyun/corrplot>.

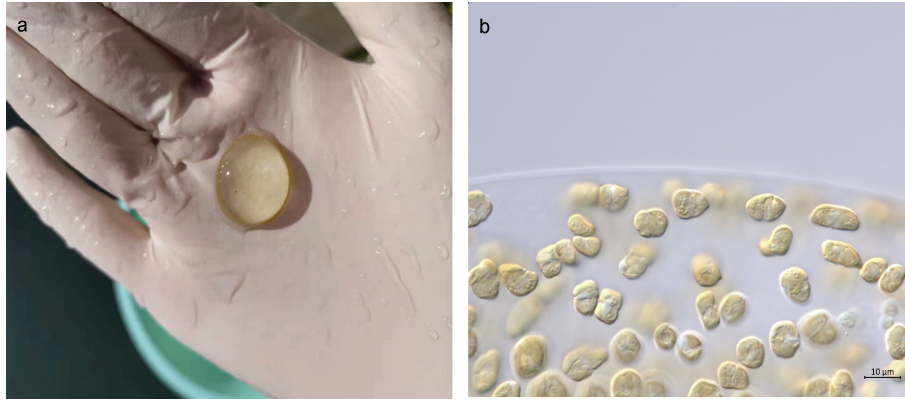
METABARCODING ANALYSIS OF *PHAEOCYSTIS GLOBOSA* IN QINGDAO COASTAL REGIONS

WANG Yi-Qi^{1, 2, 3, 4}, DING Xiang-Xiang^{1, 2, 3, 4}, SONG Hui-Yin^{1, 2, 3, 5}, CHEN Nan-Sheng^{1, 2, 3}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Functional Laboratory for Marine Ecology and Environmental science, Laoshan Laboratory, 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; 5. Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

Abstract Since the first occurrence of *Phaeocystis globosa* bloom in the South China Sea in 1997, *P. globosa* blooms have been occurring frequently in various ocean regions in China including the South China Sea and the Bohai Sea, suggesting that *P. globosa* is a widely distributed harmful algal bloom species in the coastal regions of China. However, neither previous morphology-based taxonomical studies nor ecology-based investigations has detected the presence of *P. globosa* in Chinese ocean regions. In recent years, metabarcoding analysis based on molecular marker amplification and high-throughput sequencing has detected *P. globosa*, demonstrating the competitive advantages of metabarcoding analysis for identification of *P. globosa*. However, due to the high G (Guanine) C (Cytosine) content of the 18S rDNA sequences of Haptophyta species including *P. globosa*, metabarcoding analysis for *P. globosa* highly depends on the selection of molecular marker or PCR primers. Using sea water samples collected from Zhanqiao Pier, Qingdao, the influence of two sets of PCR primers was evaluated for amplifying the universal molecular marker 18S rDNA V4 (*i.e.*, the Stoeck primers and the Song primers) for the metabarcoding analysis of *P. globosa*. Then Song primers were utilized for metabarcoding analysis conducted on samples collected from the sudden *P. globosa* bloom in the Qingdao coastal regions in winter of 2021. Comparative analysis showed that different primers affected greatly on the analysis results for Haptophyta species. When using the Stoeck primers for metabarcoding analysis, no ASV corresponding to Haptophyta were found. In contrast, 76 Haptophyta ASVs were identified in metabarcoding analysis using the Song primers, which explaining that the Song primers could effectively amplify the sequences of 18S rDNA V4 of Haptophyta. Two ASVs (ASV_2 and ASV_6) annotated as *P. globosa* were found in daily samples from Zhanqiao Pier waters in September 2021 by using the Song primers, indicating not only the presence of *P. globosa* in Qingdao ocean region, but the presence of *P. globosa* genetic diversity. Metabarcoding analysis using the Song primers on samples collected from the sudden *P. globosa* bloom in the Qingdao coastal regions in winter of 2021 also detected ASV_2 and ASV_6, and found that the relative abundance of these two ASVs showed different time courses, suggesting that they represent different *P. globosa* strains. The *P. globosa* strain represented by ASV_2 showed a trend of first increase followed by a decrease, and high relative abundance, while the *P. globosa* strain represented by ASV_6 showed minor changes and low relative abundance. These results suggest that the *P. globosa* strain represented by ASV_2 was responsible for the outbreak of *P. globosa* bloom in the Qingdao coastal regions in 2021 winter. This study showed that primer selection is important for conducting metabarcoding analysis targeting *P. globosa* when using 18S rDNA V4 that is a universal molecular marker. The selection of appropriate primers can not only effectively track *P. globosa*, but also distinguish and track the dynamic change process of different *P. globosa* strains.

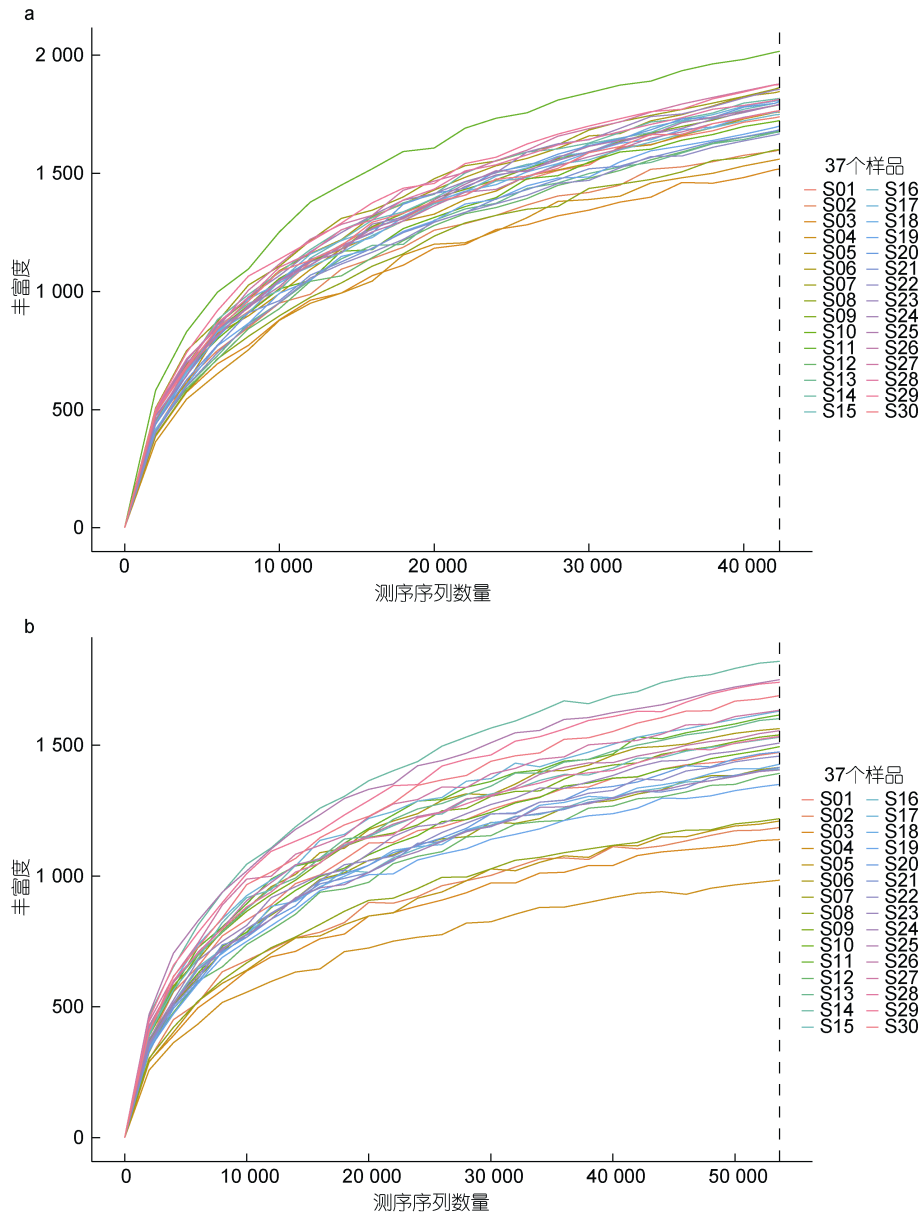
Key words *Phaeocystis globosa*; bloom; molecular marker; PCR primers; metabarcoding analysis

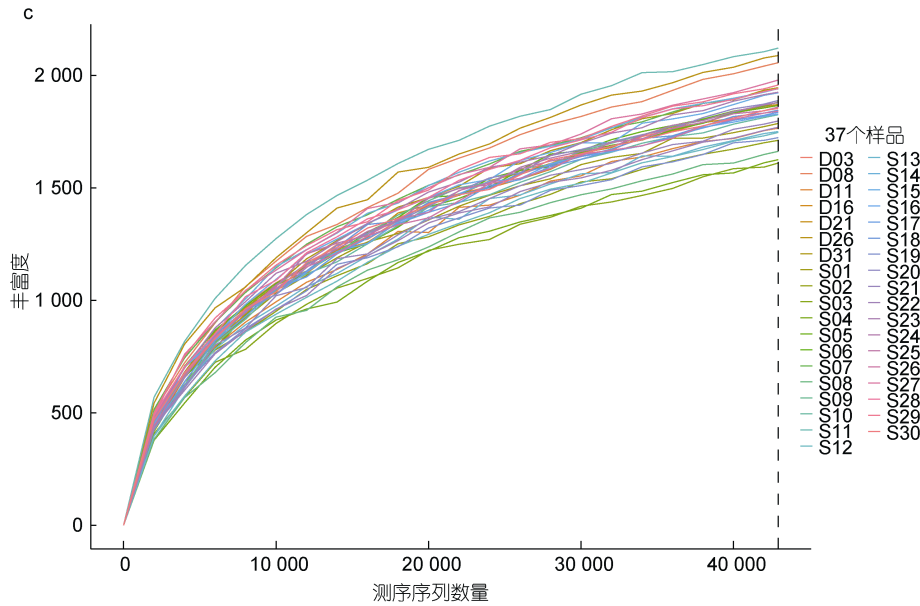


附图 1 西海岸赤潮暴发时球形棕囊藻的形态图(Song *et al.*, 2022)

Supplementary Fig.1 Morphology of *P. globosa* during bloom in Xihaian, Qingdao (Song *et al.*, 2022)

注: a: 西海岸赤潮暴发时拍摄到的囊体图片; b: 利用蔡司显微镜拍摄的囊体细胞; 图中右下角标注的比例尺为 10 μm





附图 2 稀释曲线

Supplementary Fig.2 The rarefaction curves

注: 右侧图例中 S 代表栈桥样本, D 代表西海岸样本。a 图是基于宋引物的栈桥海域 30 个样本的稀释曲线, b 图是基于 Stoeck 引物的栈桥海域 30 个样本的稀释曲线, c 图是基于栈桥和西海岸 37 个样本的稀释曲线。图例中 D 代表从青岛西海岸海域采集的 30 个时间序列的样品; S 代表从青岛栈桥海域采集的 7 个时间序列的样品, 累计 37 个样品

附表 1 采集到的 37 个海水样本中的叶绿素 a 和营养盐参数

Supplementary Tab.1 List of all 37 samples and corresponding chlorophyll a and nutrient factors.

样本	水温/°C	盐度	PO ₄ ³⁻ /(μg/L)	NO ₃ ⁻ /(μg/L)	NO ₂ ⁻ /(μg/L)	NH ₄ ⁺ /(μg/L)	SiO ₃ ²⁻ /(μg/L)	chl a/(μg/L)
S01	24.3	29.40	24.05	138.25	41.04	67.88	165.36	1.142
S02	25.3	29.10	34.80	274.96	50.66	211.40	285.84	3.735
S03	26.2	29.30	25.46	213.93	47.38	115.57	243.47	3.636
S04	24.5	29.40	19.00	105.28	26.14	36.62	96.78	6.523
S05	23.7	29.00	27.30	191.28	58.72	95.04	190.88	8.663
S06	24.6	29.40	29.44	275.88	64.36	101.28	254.90	2.265
S07	23.8	29.40	30.78	196.30	53.46	68.26	199.62	3.694
S08	24.4	29.60	25.36	207.48	53.18	56.08	172.98	6.194
S09	25.3	29.60	20.08	166.13	41.61	37.57	130.98	5.714
S10	25.5	29.50	20.55	136.81	36.71	28.64	87.75	12.516
S11	25.8	29.30	19.18	102.54	31.99	19.97	91.36	12.415
S12	26.7	29.50	21.84	115.64	28.74	30.18	93.73	9.218
S13	25.6	29.10	18.94	79.56	25.23	21.20	104.82	6.213
S14	27	29.50	17.28	86.78	17.52	39.32	135.19	25.553
S15	25.1	29.70	11.75	38.48	12.72	43.25	49.33	4.773
S16	24.7	29.90	18.98	65.33	19.97	54.60	59.41	8.949
S17	25	29.60	10.57	22.71	8.37	31.02	84.94	10.391
S18	23.9	29.80	18.58	48.23	14.70	32.18	45.38	13.894
S19	24.3	29.70	20.13	69.69	17.68	71.13	61.54	10.408
S20	24.1	29.20	19.57	72.29	15.21	77.40	83.16	10.558
S21	24.2	29.10	16.03	66.20	10.92	81.68	81.89	5.072
S22	24.5	29.50	18.15	56.12	12.44	70.39	73.84	5.909
S23	24.6	29.70	15.12	57.75	15.60	72.04	83.06	4.482

续表

样本	水温/°C	盐度	PO ₄ ³⁻ /(μg/L)	NO ₃ ⁻ /(μg/L)	NO ₂ ⁻ /(μg/L)	NH ₄ ⁺ /(μg/L)	SiO ₃ ²⁻ /(μg/L)	chl <i>a</i> /(μg/L)
S24	24.7	30.00	16.43	72.03	20.10	50.09	90.05	4.021
S25	23.1	29.90	21.19	110.97	29.35	59.85	149.12	6.869
S26	23	29.90	16.03	67.34	18.68	29.20	82.49	4.308
S27	22.9	29.50	20.63	112.61	27.91	67.80	124.64	1.048
S28	23	29.70	17.28	90.18	24.15	30.63	95.99	0.957
S29	23.2	29.70	17.18	90.94	25.52	21.44	92.67	1.195
S30	24.2	29.60	11.83	25.44	7.17	16.00	30.20	4.338
D03	12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D08	11.9	29.30	5.05	65.40	7.47	48.49	17.37	0.954
D11	11	28.20	3.78	63.74	2.29	47.26	6.82	1.095
D16	10.8	28.20	5.01	86.03	4.24	61.34	19.22	0.37
D21	9.4	27.00	5.07	47.96	7.47	161.97	12.16	0.665
D26	6.6	29.60	5.33	70.27	2.00	33.24	18.12	0.388
D31	6.8	28.40	7.42	90.78	3.90	50.22	20.27	0.477

注: NA 代表数据缺失。样本列中 S 代表栈桥样本, D 代表西海岸样本