

# 我国新记录绿潮物种 *Ulva laetevirens* 的比较 叶绿体基因组学研究\*

王 静<sup>1, 2, 3</sup> 王毅超<sup>1, 2, 3, 4</sup> 王洪淑<sup>1, 2, 3</sup> 刘 峰<sup>1, 2, 3</sup> 陈楠生<sup>1, 2, 3</sup>

(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 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 青岛 266237; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

**摘要** 在全球范围内广泛暴发的石莼属绿潮既包括大规模暴发的跨海域绿潮, 也包括小规模暴发的局地绿潮。我国有关绿潮致灾物种的研究对象主要集中于黄海绿潮浒苔, 而针对局地绿潮致灾物种的研究尚处于起步阶段。针对局地绿潮物种的鉴定和分布调查是有效预防和监测潜在大规模绿潮暴发的重要环节。本文对 2020 年 11 月初于山东烟台第一海水浴场暴发的石莼属绿潮进行了初步研究。经随机采样获得了 12 株藻体, 根据 *tufA* 分子标记初步将其中 11 株鉴定为 *Ulva laetevirens*。本研究完成了 *U. laetevirens* 的一个代表性株系 CNS00533 的叶绿体基因组构建和解析。叶绿体基因组为 110 889 bp, 含有 71 个蛋白编码基因、27 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因(*rrl*、*rrn* 和 *rrn5*)。烟台海域 *U. laetevirens* 株系叶绿体基因组基因组成和排列顺序与爱尔兰海域 *U. laetevirens* 株系 MT179351 完全一致, DNA 序列相似性为 99.8%, 进一步证明 CNS00533 为 *U. laetevirens*。此外, *U. laetevirens* 的烟台株系与爱尔兰株系的叶绿体基因组也存在差异, 烟台株系比爱尔兰株系多了 5 个 I 型内含子和 1 个 II 型内含子, 导致叶绿体基因组长度增加 7 kb。CNS00533 与 *U. rigida* MT179352 叶绿体基因组之间存在多个不同的长片段插入序列(763—2 346 bp), DNA 序列相似性也较低(93.1%); 与 *U. australis* MT179348 相比差异更大, 存在一个较大(覆盖 45 个基因)的基因组反转事件。在基于 71 个蛋白编码基因的遗传进化树中, CNS00533 与 *U. laetevirens* MT179351 聚类在一枝, 与 *U. rigida* MT179352 遗传距离较近, 与 *U. australis* MT179348 的遗传距离很远, 表明 *U. laetevirens*、*U. rigida* 和 *U. australis* 为石莼属的 3 个不同物种。2020 年 11 月烟台海域局地绿潮事件的原因种 *U. laetevirens* 在我国近海绿潮事件中首次报道, 本研究对该物种的分子进化分析将有助于对我国近海绿潮监测、物种鉴定提供数据支持和理论依据。

**关键词** 局地绿潮; 石莼; 叶绿体; 分子进化

中图分类号 X173; P76 doi: 10.11693/hyhz20210200045

绿潮(green tide)在全球范围内频繁暴发, 欧洲、北美、澳洲和亚洲等海域均有报道。欧洲北亚得里亚海(Runca *et al.*, 1996)、波罗的海(Bäck *et al.*, 2000)、德国瓦登海(Kolbe *et al.*, 1995)等, 美国罗得岛州

\* 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项, 2018SDKJ0504-2 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; 源头创新计划(人才发展专项-第五批创业创新领军人才研发补助(19-3-2-16-zhc)); 中国科学院前沿科学重点研究项目, QYZDB-SSW-DQC023 号; 山东省重大科技创新工程项目, 2019JZZY020706 号。王 静, 助理研究员, E-mail: wangjing2019@qdio.ac.cn

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

收稿日期: 2021-02-09, 收修改稿日期: 2021-03-04

(Guidone *et al.*, 2013)、华盛顿州(Nelson *et al.*, 2003)、亚洲中国(Liu *et al.*, 2013)、日本(Shimada *et al.*, 2003)、菲律宾(Largo *et al.*, 2004)等国的海域, 均发生过大规模的绿潮事件。近些年, 全球范围内绿潮呈现出常态化的暴发趋势, 对经济和社会活动造成了严重的负面影响, 对致灾海域的生态环境、群落结构、生物多样性以及水产养殖也造成极大的破坏性影响(Lyons *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020)。绿潮暴发的原因种主要包括绿藻门石莼科的石莼属(*Ulva*)(Smetacek *et al.*, 2013)、硬毛藻属(*Chaetomorpha*)(De Paula Silva *et al.*, 2008)和刚毛藻属(*Cladophora*)(De Paula Silva *et al.*, 2013), 其中石莼属绿藻占主要部分(Fletcher, 1996; Smetacek *et al.*, 2013; Fort *et al.*, 2020)。石莼属绿潮物种中, 部分物种能够形成跨境侵袭的大规模绿潮灾害, 譬如中国黄海绿潮; 部分仅在局部海域暴发, 譬如美国纳拉甘塞特海湾连年发生的扁浒苔(*Ulva compressa*)-硬石莼(*U. rigida*)绿潮(Guidone *et al.*, 2013)、韩国济州岛东海岸绿潮(Lee *et al.*, 2019), 以及我国渤海自 2015 年连续暴发的浒苔绿潮(Song *et al.*, 2019)。我国黄海浒苔绿潮在 2007 年暴发之前, 浒苔物种或绿潮事件在我国并未引起广泛关注, 暴发之后投入大量的科研工作致力于浒苔绿潮的相关研究, 这恰恰警示我们对潜在的绿潮物种和局地规模的绿潮事件应给予高度关注。调查和了解石莼属绿潮物种生物地理分布和局地规模的绿潮事件是预防和监测大规模绿潮暴发的首要工作之一。

我国在局地绿潮方面的研究报道相对较少。马元庆等(2010)报道了 2007 年烟台金沙滩海域石莼(*U. lactuca*)绿潮事件相关的理化条件; Song 等(2019)研究发现秦皇岛海域自 2015 年连年暴发的绿潮原因种是羽藻(*Bryopsis plumosa*)和浒苔(*U. prolifera*), 经巡航观测和对沿岸定生样本的分子标记 *rbcL* 分析发现, 这两个原因种只在海草床中被发现, 最终确定海草床中的羽藻和浒苔是渤海绿潮的原因种。总体而言, 我国在局地绿潮的相关研究工作正处于起步阶段。

我国海域石莼属物种的记录自 20 世纪 60 年代由曾呈奎等生态学前辈系统整理开始, 一直处于不断地补充和修正中。1963 年董美龄(1963)报道我国海域的“浒苔属”(*Enteromorpha*)绿藻有 11 个种。2015 年丁兰平等(2015)整理的中国海洋绿藻门新分类系统中“浒苔属”有 10 个种, “石莼属”有 14 个种。2020 年 Xie 等(2020)报道了我国海域的 6 个新记录物种 *U.*

*simplex*、*U. splitiana*、*U. partita*、*U. meridionalis*、*U. tepida* 和 *U. chaugulli*, 后三者为绿潮物种。此外, 还有一株淡水石莼物种 *U. shanxiensis* (Chen *et al.*, 2015) 和 一株 浒 苔 亚 种 *U. prolifera* subsp. *Qingdaoensis* (Cui *et al.*, 2018) 被鉴定。这说明我国海域可能还有更多的石莼属物种(包括石莼属绿潮物种)有待发现。由于石莼属部分近缘物种间形态十分相近, 并且具有形态可塑性, 基于形态进行石莼属物种鉴定难度较大。随着分子生物技术的发展, 分子标记的开发和利用对石莼属物种的鉴定起了重要的推动作用(Hayden *et al.*, 2003)。目前, 应用于石莼属物种鉴定的通用单基因分子标记是 *ITS*、*rbcL* 和 *tufA* (Gary *et al.*, 2010; Mudassar *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2018)。然而, 尽管这些通用分子标记使用广泛, 但是由于它们的分辨率比较有限, 在部分情况下无法做到准确定种。相对单基因分子标记, 细胞器基因组可以作为串联基因标记提供更可靠的分类依据。

本研究针对 2020 年 11 月初烟台第一海水浴场局地绿潮事件, 采用分子标记和叶绿体基因组比较分析对此次绿潮事件的原因种进行物种鉴定和分析, 确定该局地绿潮原因种为 *U. laetevirens*, 系该物种在我国海域的首次绿潮记录。同时, 探索了三者之间的遗传进化关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与处理

2020 年 11 月 2 日于山东省烟台市第一海水浴场的石莼绿潮事件(121°24'59"E, 37°32'6"N, 图 1a)中随机采集了 11 株石莼属绿藻, 分别编号 CNS00533、CNS00592—CNS00601。现场采集的藻体置于内含无菌海水的离心管, 无菌海水中含有 f/2 培养基、0.5% GeO<sub>2</sub>、50 μg/mL 敌百虫和五种复合抗生素(50 μg/mL 链霉素, 66.6 μg/mL 庆大霉素, 20 μg/mL 环丙杀星, 2.2 μg/mL 氯霉素, 100 μg/mL 氨苄青霉素)(Shibl *et al.*, 2020)。采样后低温保存, 24 h 内运输回实验室。藻体样本到达实验室后, 立即用无菌海水冲洗藻体表面。最后, 将藻体置于含有 30 mL 培养液的培养皿中, 内含 f/2 培养基、0.5% GeO<sub>2</sub>、50 μg/mL 敌百虫和上述五种复合抗生素, 置于光照培养箱进行培养, 培养条件 18 °C, 100—120 μmol photons/(m<sup>2</sup>·s), L:D = 12 h: 12 h。待镜检无其他微藻、浮游动物等杂质, 即可用于后续实验。

## 1.2 DNA 文库制备与测序

藻体 DNA 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305, 北京天根) 进行提取, 所提取的 DNA 经 Covaris S220 超声破碎仪进行片段化, 获得读长为 350 bp 的 DNA 序列; 经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 及产物富集。文库质量分别采用 NGS3K/Caliper 和 real-time PCR (Qubit 3.0 fluorometer, 美国 Invitrogen) 进行文库大小分布评估和定量分析。质量合格的文库采用美国 Illumina NovaSeq PE150 (北京诺禾致源科技股份有限公司) 进行测序。

## 1.3 分子标记 *tufA* 的序列获取及系统发育树构建

烟台绿潮 11 个藻体样本的分子标记 *tufA* 序列信息通过软件 BWA v0.7.17 (Li *et al.*, 2010)、samtools v1.9 (Li *et al.*, 2009) 和 SPAdes v3.14.0 (Bankevich *et al.*, 2012) 从上述全基因组测序数据中筛选组装获得, 所采用的参考序列来自于 *U. laetevirens* 叶绿体基因组 MT179351 注释的 *tufA* 基因全长序列。将 11 个样品和来自 GenBank 的 *tufA* 序列通过 Clustal W 进行多重比对分析 (Thompson *et al.*, 1997), 并辅以手工校正。通过 Mega 7.0 软件的最大似然法构建进化树 (Kumar *et al.*, 2016)。Bootstrap 值为 1 000。

## 1.4 叶绿体基因组组装与注释

采用 GetOrganelle 软件 (Jin *et al.*, 2020) 从头组装获得叶绿体基因组序列, 其中使用的组装软件为 SPAdes (3.10.1) (Bankevich *et al.*, 2012), 分析过程中使用的 seed 参考序列为 NCBI 登录序列 MT179351 (*Ulva rigida* 叶绿体基因组) (Fort *et al.*, 2021)。组装后的叶绿体基因组序列通过 BWA v0.7.17 软件的 MEM 运算法对所构建的叶绿体基因组序列进行质检 (Li *et al.*, 2010), 并通过 IGV v2.8.12 进行可视化比对分析 (Robinson *et al.*, 2011)。本研究采用在线软件 MFannot (<https://megasun.bch.umontreal.ca/RNAweasel/>) 和 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) 对叶绿体基因组进行注释。

## 1.5 共线性分析

将 CNS00533 分别与 *U. laetevirens* MT179351、*U. rigida* MT179352 和 *U. australis* MT179348 进行共线性分析, 采用 circos-0.69 进行作图 (Krzywinski *et al.*, 2009)。

## 1.6 遗传进化分析

对 19 株石莼属绿藻叶绿体基因组的 71 个蛋白编码基因的氨基酸序列进行遗传进化分析。氨基酸序列

采用 MAFFT (默认参数) 比对 (Katoh *et al.*, 2013), 然后通过 PhyloSuite 进行串联 (Smith *et al.*, 2008), 以基因的位置对串联后的序列进行分区, 每个分区的最适氨基酸替代模型通过 ModelFinder 确定 (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), 以 IQ-TREE (默认参数) 构建基于氨基酸序列的遗传进化树 (Trifinopoulos *et al.*, 2016), bootstrap 值设置为 1 000。硅藻 *Lithodesmium undulatum* (KC509525) 和 *Odontella sinensis* (Z67753) 的叶绿体基因组作为外类群。

## 2 结果

### 2.1 2020 年 11 月烟台局地绿潮原因种的鉴定

2020 年 11 月 2 日于山东省烟台市第一海水浴场暴发了局地绿潮, 浴场沿岸水体充斥绿色藻体碎片, 在海浪的作用下大量的藻体残留海滩 (图 1b)。该绿藻藻体呈叶片状, 多孔、双层基质; 因藻体破碎无法辨别不同部位且未见假根, 难以从形态水平鉴别物种 (Mao *et al.*, 2014) (图 1c)。

为鉴定此次烟台绿潮物种, 随机采集了 12 株藻体样本, 对其构建了基于 *tufA* 的单基因遗传进化树 (图 1d)。结果显示, 其中 11 株 CNS00533、CNS00592—CNS00601 序列完全一致, 且与 *U. rigida* 和 *U. laetevirens* 的参考序列聚类在一个 clade 中; 在 NCBI 数据库中, 11 株藻的 *tufA* 全长序列 (1 224 bp) 与 *U. laetevirens* (MT179351) (Fort *et al.*, 2021) 的 *tufA* 序列 (1 224 bp) 100% 相同。另外 1 株 CNS00602 与 *U. australis* 参考序列聚类在一个 clade 中, 且与 *U. australis* MT160640 (Fort *et al.*, 2021) 完全一致。综上所述, 除 CNS00602 株系以外的 11 株可以初步鉴定为同一物种——*U. laetevirens*, 在烟台绿潮的物种组成中占绝对优势, 是造成此次局地绿潮的原因种; 而 CNS00602 可以初步鉴定为 *U. australis*。

### 2.2 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 叶绿体基因组特征

相较于单基因分子标记, 集合多基因的叶绿体基因组信息可能提供更高的分辨率, 能够更准确地反映烟台绿潮原因种的分类地位, 进一步确定 *U. laetevirens*、*U. rigida* 以及 *U. australis* 的遗传进化关系。为此, 本研究构建并深入解析了烟台绿潮物种的叶绿体基因组。本研究共完成了 4 个株系 CNS00533、CNS00392、CNS00396 和 CNS00398 叶绿体基因组的组装, 4 个叶绿体基因组碱基组成完全一致。以 CNS00533 叶绿体基因组 (图 2) 为参考, 比较分析了

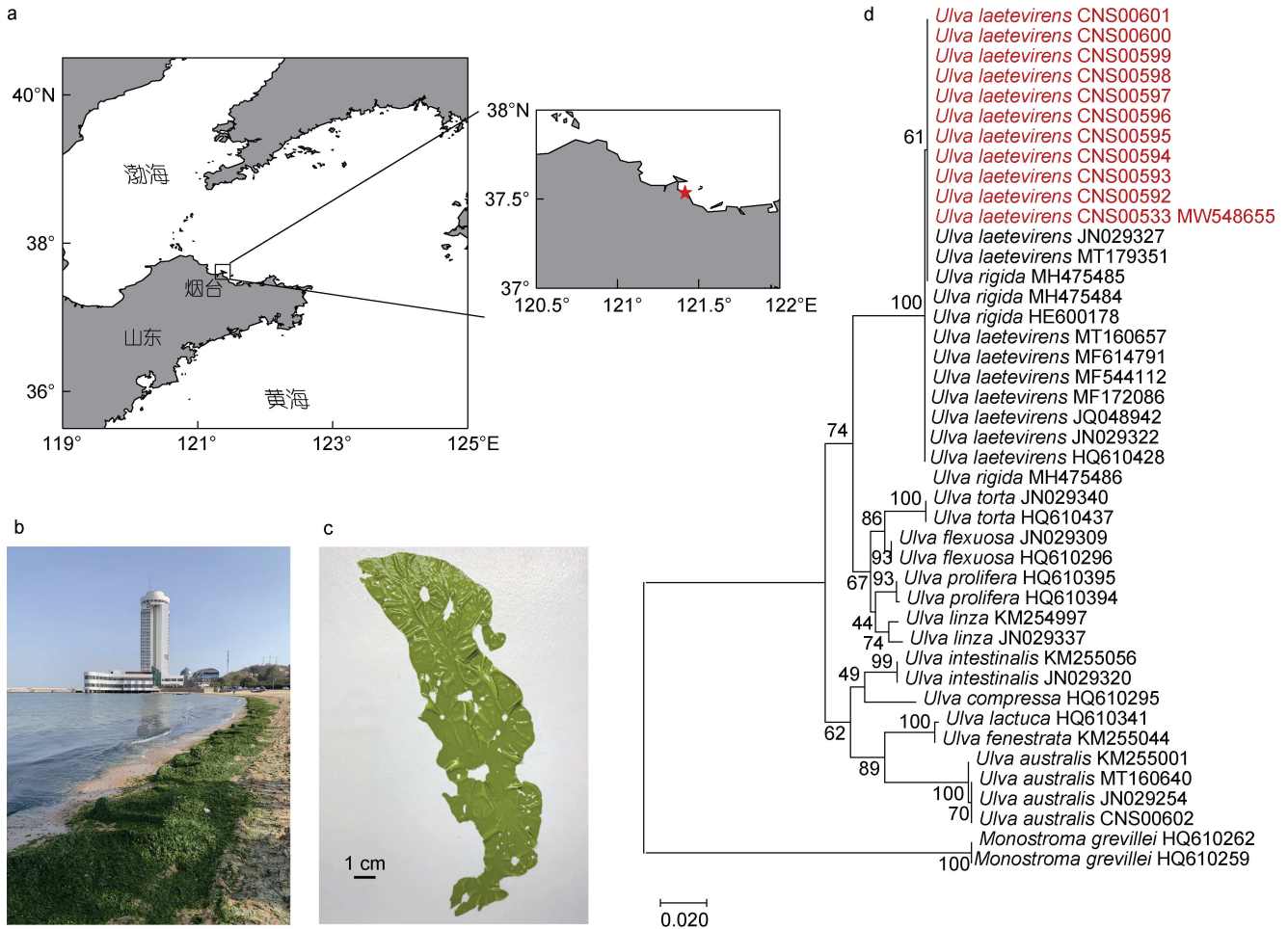


图1 烟台局地绿潮及其致灾物种的形态和分子鉴定

Fig.1 A green tide in Yantai coast and the morphological and molecular analysis of the causative species

注: a. 烟台局地绿潮暴发地, 星号标记为绿潮暴发地点; b. 2020年11月烟台第一海水浴场绿潮现场; c. 物种形态; d. 基于 *tufA* 基因构建的系统进化树; 红色字体为本文采集的11株 *U. laetevirens*

11个株系之间的遗传多样性, 仅发现一个单碱基变异位点, 进一步表明从烟台绿潮中分离得到的这11个株系是同一个株系克隆繁殖的结果。后续分析仅以CNS00533为代表。

CNS00533的叶绿体基因组为110 889 bp, 与 *U. laetevirens* (MT179351, 103 444 bp)、*U. rigida* (MT179352, 96 673 bp)和 *U. australis* (MT179348, 99 820 bp)三个叶绿体基因组相比略长(表1)。CNS00533叶绿体基因组的AT含量与 *U. laetevirens* (MT179351)比较相近, 74.4%—74.6%, 比 *U. australis* 与 *U. rigida* 的AT含量(分别为74.8%和75.4%)略低。四个叶绿体基因组共有71个蛋白编码基因、3个rRNA基因(*rrl*、*rrs*和*rrn5*)和26个tRNA基因。CNS00533与 *U. laetevirens* (MT179351)的叶绿体基因组的tRNA基因完全相同, 它们比 *U. australis* 多了

一个tRNA基因 *trnF* (aaa)。同时, *U. rigida* 相比其他三个叶绿体基因组多了一个 *trnR* (ucu)。总体而言, CNS00533与 *U. laetevirens* (MT179351)的叶绿体基因组的基因组成完全一致, 进一步支持上述对CNS00533的物种鉴定。

### 2.3 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 叶绿体基因组共线性分析

为比较分析CNS00533与其他3个近缘物种叶绿体基因组的相似度, 本研究将烟台 *U. laetevirens* 株系CNS00533 (MW531676)分别与 *U. laetevirens* (MT179351)、*U. rigida* (MT179352)、*U. australis* (MT179348)进行基因组共线性分析(图3)。结果显示, CNS00533与 *U. laetevirens* (MT179351)的叶绿体基因组基因数目和基因排列顺序完全一致(图3a)。CNS00533与 *U. rigida* 的叶绿体基因组相比, *trnR* 基

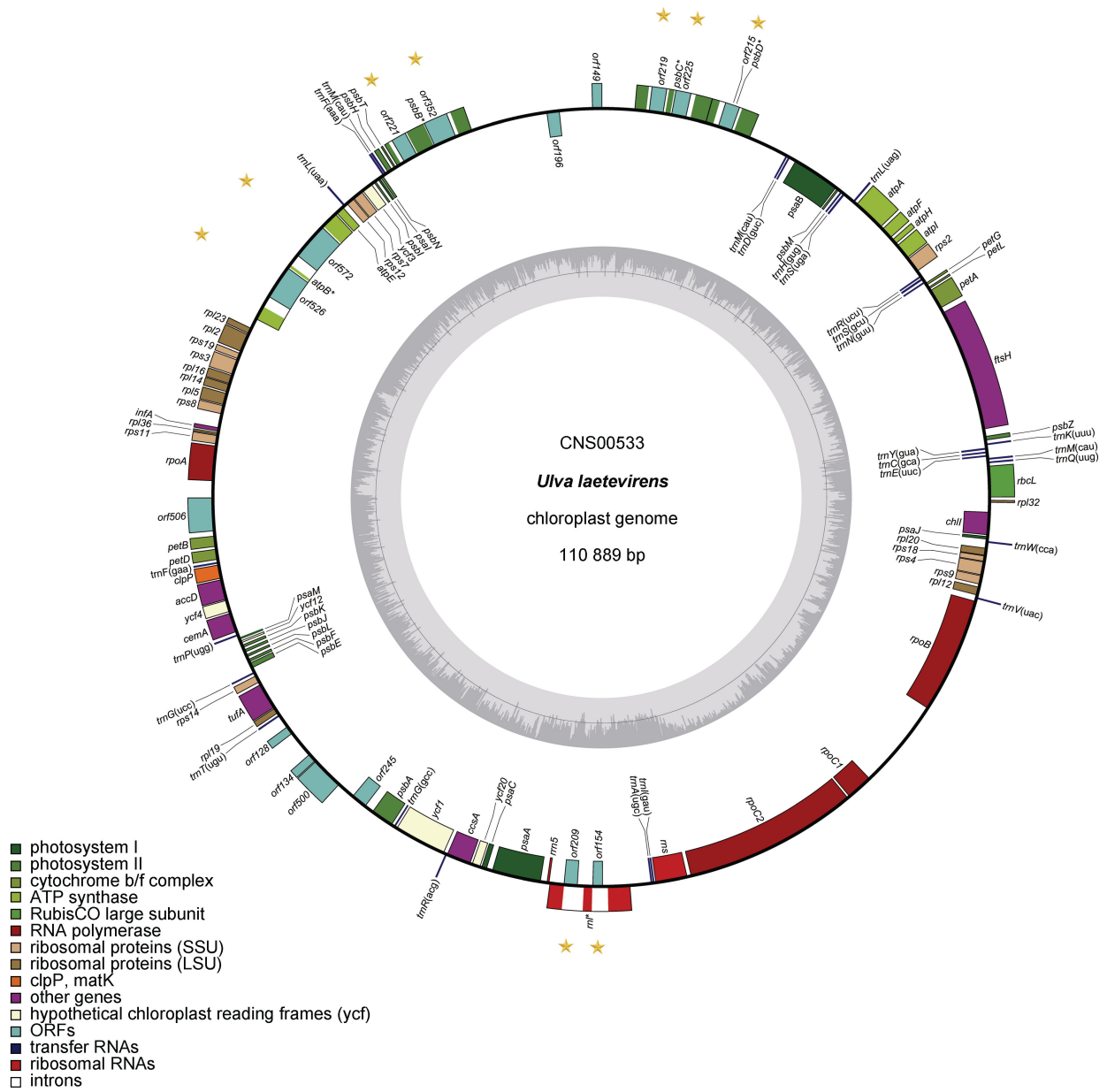


图 2 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 叶绿体基因组

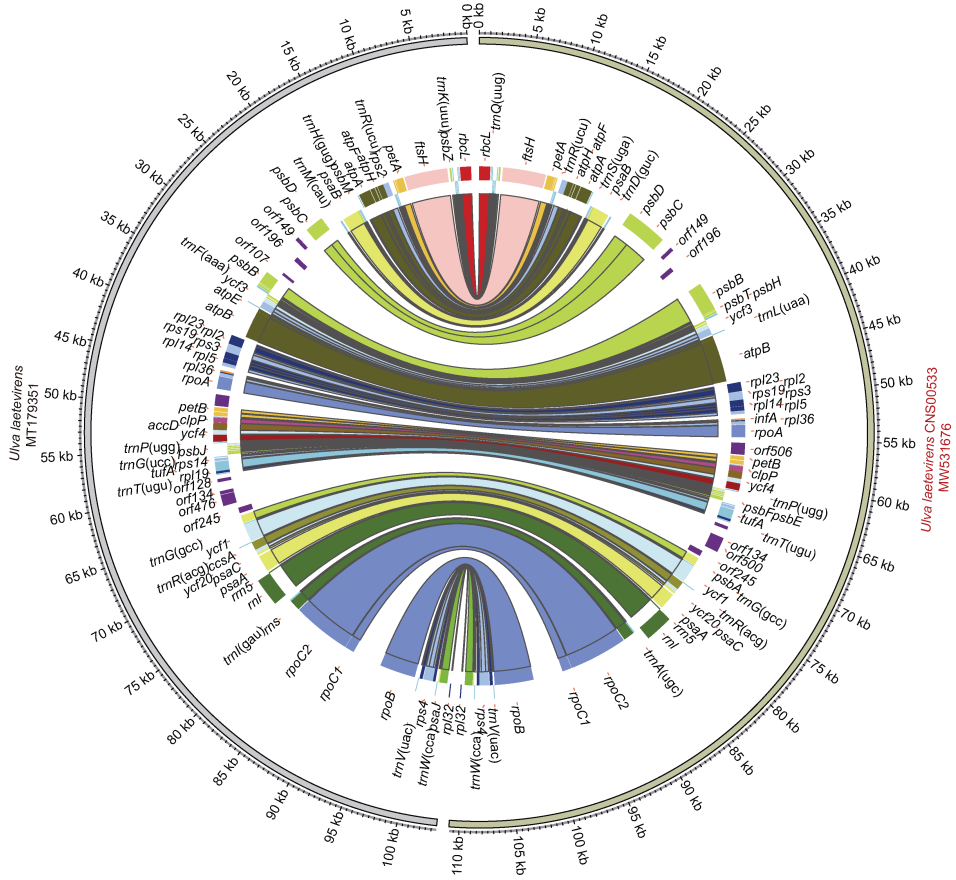
Fig.2 The chloroplast genome of *U. laetevirens* CNS00533 in the local green tide in Yantai  
注: 黄色星号标记指示基因组中内含子所在位置。

表 1 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 与近缘物种 *U. laetevirens*(MT179351)、*U. rigida*(MT179352)、*U. australis*(MT179348)的叶绿体基因组特征

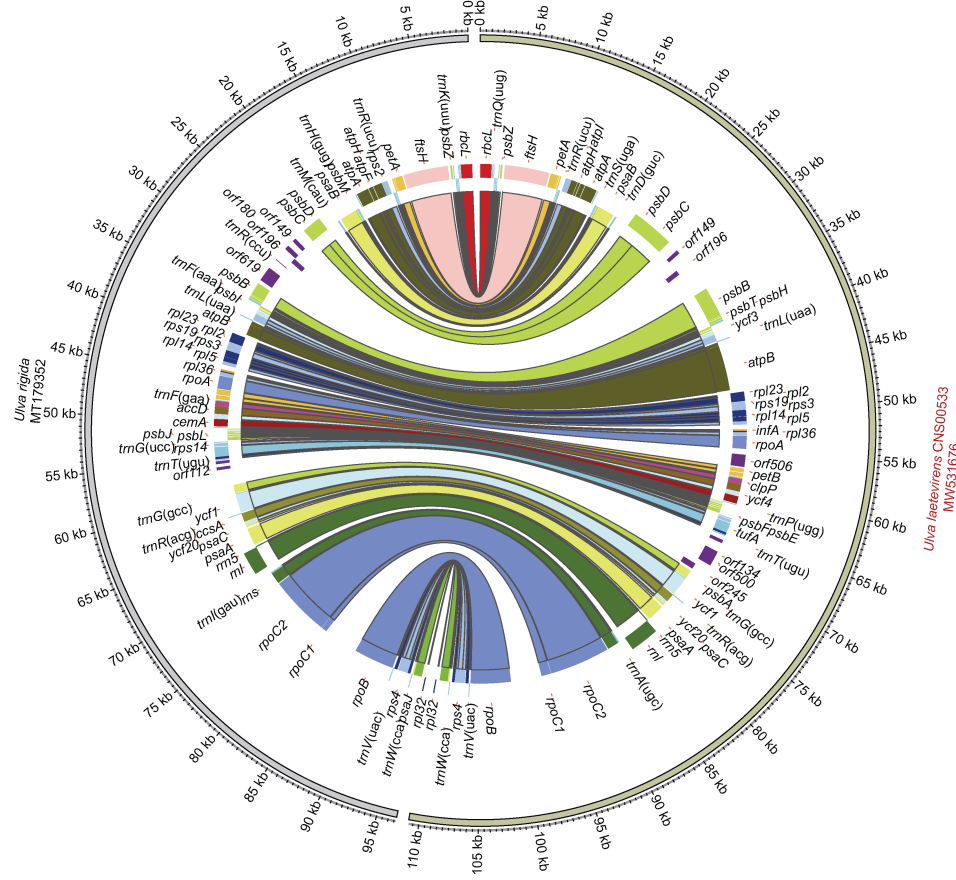
Tab.1 Characteristics of chloroplast genomes of *U. laetevirens* CNS00533 (MW531676), *U. laetevirens* (MT179351), *U. rigida* (MT179352) and *U. australis* (MT179348)

物种株系	<i>U. laetevirens</i> CNS00533 MW531676	<i>U. laetevirens</i> MT179351	<i>U. rigida</i> MT179352	<i>U. australis</i> MT179348
基因组大小(bp)	110 889	103 444	96 673	99 820
AT 含量(%)	74.4	74.6	75.4	74.8
共有/特异蛋白编码基因	71/0	71/0	71/0	71/0
共有/特异 tRNA 基因	26/1	26/1	26/2	26/0
rRNA 基因	<i>rrl-rrs-rrn5</i>	<i>rri-rrs-rrn5</i>	<i>rri-rrs-rrn5</i>	<i>rri-rrs-rrn5</i>
参考文献	本文	Fort, 2020	Fort, 2020	Fort, 2020

a



b



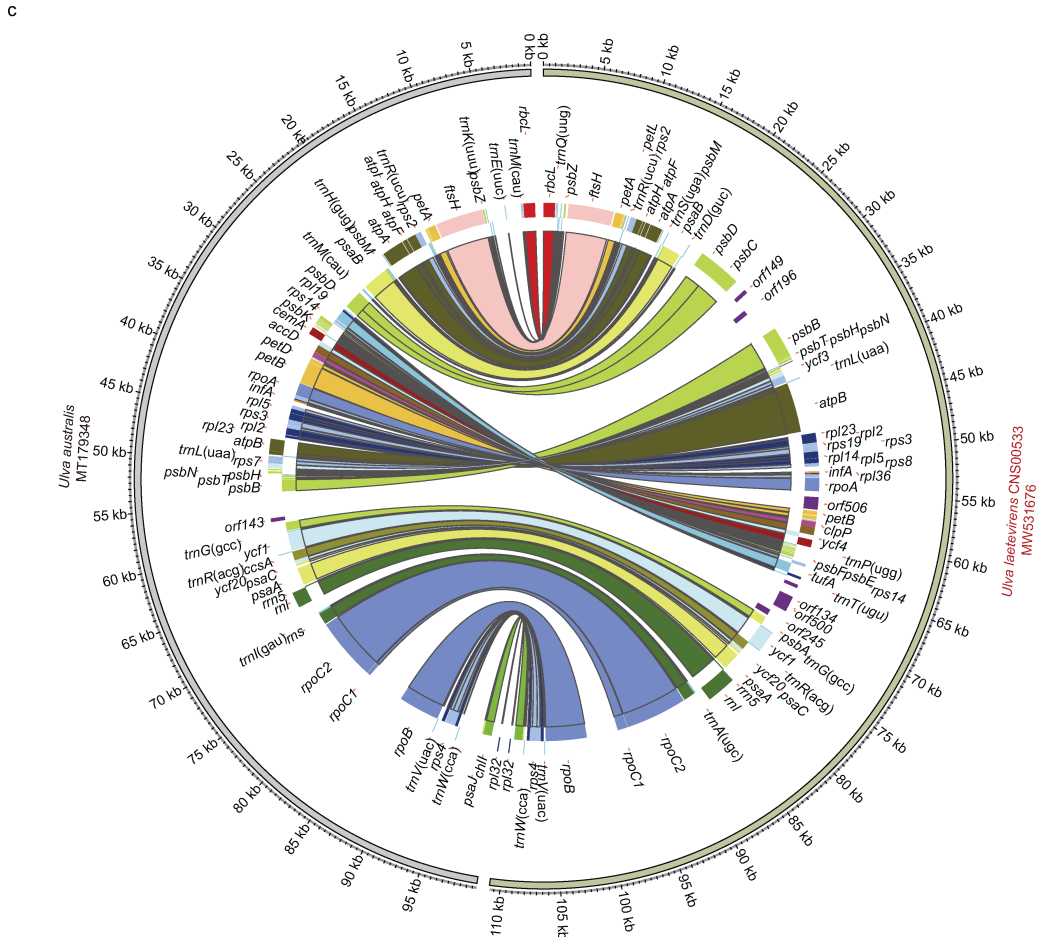


图3 *U. laetevirens* CNS00533 (MW531676)与 *U. laetevirens* (MT179351)(a)、*U. rigida* (MT179352)(b)、*U. australis* (MT179348)(c)叶绿体基因组共线性分析

Fig.3 Synteny analysis of chloroplast genomes of *U. laetevirens* CNS00533 MW531676 vs. *U. laetevirens* MT179351 (a), *U. laetevirens* CNS00533 MW531676 vs. *U. rigida* MT179352 (b), and *U. laetevirens* CNS00533 MW531676 vs. *U. australis* MT179348 (c)

因为 *U. rigida* 的叶绿体基因组特有(图 3b)。CNS00533 与 *U. australis* 的叶绿体基因组存在显著的差异,二者之间存在一个包括 45 个基因的基因组反转(inversion)事件(图 3c)。同时,相比于 *U. australis* 的叶绿体基因组, CNS00533 还多一个基因 *trnF* (aaa)。因此,共线性分析也支持 CNS00533 作为 *U. laetevirens* 的鉴定。

#### 2.4 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 的进化分析

为了探究烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 的遗传进化关系,本研究针对已发表的 19 株石莼绿藻和 CNS00533 的叶绿体基因组,构建了基于蛋白质编码基因氨基酸序列的遗传进化树(图 4)。结果显示,石莼属物种聚类为 4 个大的 clade,分别是 *Ulva lactuca-ohnoi-laetevirens-rigida-gigantea*、*Ulva linza-*

*prolifera-flexuosa*、*Ulva australis-fenestrata-pseudorotundata* 和 *Ulva compressa*。烟台绿潮原因种 CNS00533 聚类到 *Ulva lactuca-ohnoi-laetevirens-rigida-gigantea*, 且与 *U. laetevirens* 遗传进化距离更近。同时,该结果也表明 *U. laetevirens* 与 *Ulva australis* 遗传进化关系较远,不是同一物种,与 Hughey 等(2021)的结论相反。

#### 2.5 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 与近缘物种大片段差异序列和内含子组成分析

上述关于分子标记(*tufA*)、基因组成、共线性分析和遗传进化关系等多方面的分析表明 CNS00533 是 *U. laetevirens* 的一个株系。比较分析 CNS00533 和 *U. laetevirens* (MT179351)的叶绿体基因组 DNA 序列发现,相较于 *U. laetevirens* MT179351, CNS00533 叶绿体基因组(MW531676)多出 6 个较长的插入序列(表

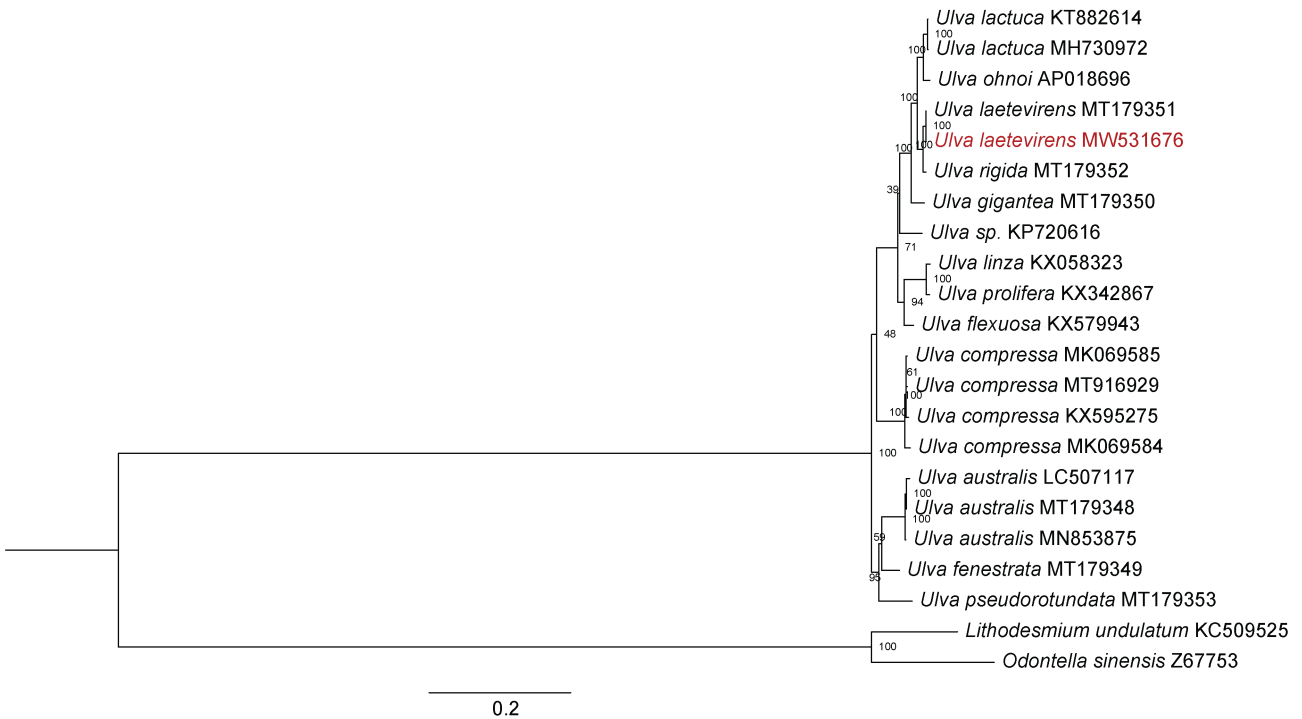


图4 针对 *U. laetevirens* CNS00533 和其他石莼属叶绿体蛋白质编码基因氨基酸序列的遗传进化树

Fig.4 The phylogenetic tree based on concatenated amino acid sequences of chloroplast protein-coding genes of *U. laetevirens* CNS00533 and other *Ulva* species.

注: 基于 71 个蛋白编码基因氨基酸水平建立的最大似然法遗传进化树, 以硅藻 *Lithodesmium undulatum* 和 *Odontella sinensis* 为外类群; 红色字体为本文的研究对象 *U. laetevirens* CNS00533 MW531676

表2 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533 叶绿体基因组中相比于 *U. laetevirens* MT179351 和 *U. rigida* MT179352 的大片段插入序列统计

Tab.2 The long sequences in the chloroplast genome of *U. laetevirens* CNS00533 but not in *U. laetevirens* MT179351 or *U. rigida* MT179352

序号	插入位置	长度/bp	覆盖区域类型
1	21 550—22 605	1 056	<i>psbD</i> 内含子
2	23 615—24 602	988	<i>psbC</i> 内含子
3	24 778—25 704	927	<i>psbC</i> 内含子
4	35 832—37 130	1 299	<i>psbB</i> 内含子
5	37 883—38 822	940	<i>psbB</i> 内含子
6	45 740—47 944	2 205	<i>atpB</i> 内含子
7	41 779—44 142	2 346	<i>atpB</i> 内含子
8	54 877—57 108	2 232	<i>orf506</i> 及其邻近非编码区
9	66 132—67 019	888	<i>orf128</i> 及其邻近非编码区
10	82 733—83 495	763	<i>rri1</i> 内含子

2, 序号 1—6), 长度范围 1—2 kb。这 6 个插入序列分别对应 6 个完整的内含子(表 3, 5 个 I 型和 1 个 II 型内含子)。比较分析 CNS00533 和 *U. rigida* (MT179352) 的叶绿体基因组发现, CNS00533 叶绿体基因组多了 10 个插入序列(表 2)。其中 1—6 号插入序列与上面的 6 个插入序列相同, 其他 4 个插入序列分别是基因组 *atpB*、*rri1* 基因内的 1 个 II 型和 1 个 I 型内含子。为

了验证不同物种间非插入序列的相似性, 本研究分析发现 CNS00533 MW531676 与 *U. laetevirens* MT179351 插入序列之外的序列相似性达到 99.8%。与此相比, CNS00533 MW531676 与 *U. rigida* MT179352 的 DNA 序列相似性只有 93.1%。

本研究进一步统计分析了 *U. laetevirens* CNS00533、*U. laetevirens* (MT179351)和 *U. rigida*



表 3 烟台绿潮物种 *U. laetevirens* CNS00533、*U. laetevirens* (MT179351)和 *U. rigida* (MT179352)叶绿体基因组内含子分布情况

Tab.3 The intron contents in chloroplast genomes of *U. laetevirens* CNS00533, *U. laetevirens* (MT179351) and *U. rigida* (MT179352)

物种株系	内含子个数	包含内含子的基因	内含子长度	内含子类型	内含子内的 ORF	ORF 长度
<i>U. laetevirens</i> CNS00533 MW531676	9	<i>psbD</i>	1 055	I	<i>orf215</i>	647
		<i>psbC</i>	987	I	<i>orf225</i>	677
		<i>psbB</i>	926	I	<i>orf219</i>	659
		<i>psbB</i>	1 298	I	<i>orf352</i>	1058
		<i>psbB</i>	939	I	<i>orf221</i>	665
		<i>atpB</i>	2 363	II	<i>orf572</i>	1718
		<i>atpB</i>	2 204	II	<i>orf526</i>	1580
		<i>rri1</i>	952	I	<i>orf209</i>	629
		<i>rri1</i>	762	I	<i>orf154</i>	464
<i>U. laetevirens</i> MT179351	3	<i>atpB</i>	2 383	II	<i>orf572</i>	1718
		<i>rri1</i>	952	I	<i>orf209</i>	629
		<i>rri1</i>	762	I	<i>orf154</i>	464
<i>U. rigida</i> MT179352	1	<i>rri1</i>	952	I	<i>orf209</i>	629

(MT179352)叶绿体基因组内含子的分布情况(表 3)。结果显示, *U. rigida* (MT179352)只有 1 个 I 型内含子, 位于其 *rri1* 基因内; *U. laetevirens* (MT179351)有 1 个位于 *atpB* 基因内的 II 型内含子和 2 个位于 *rri1* 基因内的 I 型内含子; 相对而言, CNS00533 含有 7 个 I 型内含子(位于 *psbD*、*psbC*、*psbB* 和 *rri1* 基因内)和 2 个 II 型内含子(位于 *atpB* 基因内), 远远多于前两者。

综上, CNS00533 与 *U. rigida* (MT179352)叶绿体基因组的差异体现在内含子组成和基因编码区, 差异较大; 而 CNS00533 与 *U. laetevirens* (MT179351)叶绿体基因组基因编码区差异较小, 内含子组成是其种内差异的主要方面。

### 3 讨论

#### 3.1 *U. laetevirens* 的形态和分子鉴定

根据文献报道, *U. laetevirens* 具有掌状叶片、浅裂、不规则分叉、不规则的边缘突起和二层细胞基质等等, 这些形态特征与其他石莼属叶状藻体有不同程度的相似性, 特别是与其近缘的 *U. rigida* 极易混淆(Steinhagen *et al.*, 2019b)。Sfriso 发现 *U. rigida* 的根状体细胞相比 *U. laetevirens* 更厚、更暗(Sfriso, 2010)。Sfriso (2010)的研究还发现 *U. laetevirens* 的假根和基部边缘没有突起。此外, 石莼属物种具有形态可塑性, 不同的营养环境、光照以及共附生菌均会影响其形态(Taylor *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2008)。总体而言, 仅仅基

于形态学的描述, 难以实现对包括 *U. laetevirens* 在内的石莼属物种进行准确的鉴定。

分子学方法已成为物种分类的一个有效手段, 可以在形态学鉴定的基础上, 更加准确地鉴定石莼属物种。但是, 分子学方法的准确鉴定仍然依赖于分子标记的选择。在已报道的研究中, *U. laetevirens*、*U. rigida* 和 *U. australis* 分类存在争议。Batista 等(2018)基于分子标记 ITS 和 *rbcL* 的分析结果认为 *U. laetevirens* 和 *U. rigida* 区分不开。Steinhagen 等(2019b)甚至基于此在其研究中将 *U. laetevirens* 和 *U. rigida* 作为同一物种。Hughey 等(2021)根据分子标记 *rbcL* 分析结果确定 *U. laetevirens* 与 *U. australis* 为同一物种。Lee 等(2019)在分析韩国济州岛的样品时, 尽管采用 *tufA* 和 *rbcL* 联合建树分析, 但由于其参考序列中没有 *U. rigida* 相关序列作为参考, 所以分析结果并没有说明其建树方式能有效区分 *U. laetevirens* 和 *U. rigida*。Fort 等(2021)的研究中对欧洲海域采集的 110 株叶状石莼进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分析, 结果明确聚类为 6 个 clade, 基于分子标记 ITS 和 *rbcL* 的结果, 6 个 SNP-clade 分别对应 6 个物种, 其中包括 *U. laetevirens* 和 *U. rigida*, 其后续研究均视 *U. laetevirens* 和 *U. rigida* 为两个物种, 且细胞器基因组均显示二者种间差异极大, 种内差异极小。

此外, Fort 等(2021)比较了 *tufA*、*rbcL* 的单基因

进化树以及线粒体、叶绿体的全部蛋白编码序列的进化树,结果显示这四种方式的分类效果基本一致,*tufA*的bootstrap支持率相对高于*rbcL*,认为单分子标记*tufA*足以区分叶状石莼属物种。本研究为了鉴定烟台株系 CNS00533,对其*tufA*进行分析,结果(图 1d)显示 CNS00533 与 *U. laetevirens* 和 *U. rigida* 的参考序列聚类在一个 clade 中,NCBI 比对发现仅与 *U. laetevirens* (MT179351)(Fort *et al*, 2021)的*tufA*序列(1 224 bp) 100%一致。另外,根据石莼属内物种的叶绿体基因组蛋白编码基因的进化树(图 4),CNS00533 与 *U. laetevirens* 有更近的遗传进化关系。此外,为了排除叶绿体基因组中可能的插入序列的影响,本研究剔除了 CNS00533 与 *U. laetevirens* (MT179351)、*U. rigida* (MT179352)参考叶绿体基因组彼此间的长片段插入序列后发现,CNS00533 与 *U. laetevirens* 相似度达到 99.8%,与 *U. rigida* 相似度只有 93.1%。Fort 等(2021)在进行 6 个石莼属物种间、种内叶绿体基因组多样性分析时,发现种间蛋白编码区单核苷酸变异(single nucleotide variant, SNV)位点至少 391 个,而 *U. laetevirens* 种内只有 36 个 SNV 位点。本研究比较分析了 CNS00533 与爱尔兰 *U. laetevirens* 的叶绿体基因组全序列,发现仅有 51 个 SNV 位点,进一步说明二者为种内差异。以上分子标记、叶绿体蛋白编码基因遗传进化分析和全序列比对的结果,均表明烟台株系 CNS00533 为 *U. laetevirens*。

### 3.2 *U. laetevirens* 烟台株系与爱尔兰株系间的异同

同一物种的不同株系之间可能存在遗传变异,包括大尺度的遗传变异。截至目前已公布的记录中,仅有爱尔兰海域和中国烟台海域的 *U. laetevirens* 株系的叶绿体基因组[MT179351 (Fort *et al*, 2021)和 MW531676]被构建和解析。经比较发现,二者的叶绿体基因组的基因种类、数量和排列顺序完全一致,包括 71 个蛋白编码基因、27 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因(图 2, 3)。Fort 等(2021)的研究结果显示欧洲海域 *U. laetevirens* 种内差异极低,主要体现在种内仅 0.6 SNVs/kb 编码序列。本研究的结果显示烟台株系与爱尔兰株系之间 SNV 也极低。同时,烟台株系的叶绿体基因组比爱尔兰株系长 7 445 bp,这个长度差异在于二者内含子的组成差异,前者比后者多了 6 个完整的内含子序列(表 2, 3)。种内内含子差异显著的现象并不例外,本研究在整理 NCBI 数据库的所有石莼属物种内含子分布情况时发现,*U. compressa* 不同株系的叶绿体基因组中内含子相差较大, MK069584

[*U. mutabilis* 更名为 *U. compressa* (Steinhagen *et al*, 2019a)]含有 10 个内含子,而 KX595275 只有 4 个内含子。另外,在已报道的两株 *Metschnikowia santaceciliae* 线粒体中,二者之间仅 *cob* 基因含有的内含子个数就相差 6 个(Lee *et al*, 2020)。对于 *U. laetevirens* 烟台株系和爱尔兰株系间的内含子差异,可能是不同地理环境压力下自然选择的结果。

### 3.3 *U. laetevirens* 是我国新记录石莼属(绿潮)物种

截至 2021 年 1 月,根据已有记载信息,我国海域共记录 29 个石莼属物种(丁兰平等, 2015; Xie *et al*, 2020),其中 11 个物种已在全球有引发绿潮的报道,包括 *U. australis*、*U. chaugulli*、*Ulva clathrata*、*U. compressa*、*U. flexuosa*、*U. intestinalis*、*U. linza*、*U. meridionalis*、*U. prolifera*、*Ulva rigida*、*U. tepida* (Guidone *et al*, 2013; Smetacek *et al*, 2013; Gao *et al*, 2018; Golubkov *et al*, 2018; Xie *et al*, 2020)。本研究报道的烟台 *U. laetevirens* 是我国绿潮事件中该物种的首次记录。该物种于 1854 年在澳大利亚维多利亚的菲利普港首次采集并记录,现已在北美长岛湾、加拿大、爱尔兰、法国、荷兰、葡萄牙、突尼斯和韩国均有采集记录(Kirkendale *et al*, 2013; Mao *et al*, 2014; Miladi *et al*, 2018; Lee *et al*, 2019; Fort *et al*, 2021)。此外,本研究发现在 NCBI 数据库中 *U. laetevirens* CNS00533 的 ITS 序列与我国研究者 Miao 等提交的 8 个标记“*Ulva* sp.”的 ITS 序列(KY446828 等,未发表)一致,说明该物种在我国其他地区也有分布。*U. laetevirens* 在澳洲、美洲、欧洲和亚洲海域均已有绿潮暴发记录,该物种快速增殖和分布广泛的特征需要我们持续关注和监管。

## 4 结论

本研究聚焦了 2020 年 11 月初在烟台第一海水浴场发生的绿潮事件,通过比较叶绿体基因组学分析证明该石莼属绿藻为 *U. laetevirens*,该物种在我国海域尚属首次记录。本研究构建了烟台株系 *U. laetevirens* CNS00533 的叶绿体基因组(MW531676),相比于爱尔兰株系 *U. laetevirens* (MT179351)二者之间蛋白编码基因、tRNA 基因和 rRNA 基因的种类和数目一致,仅有 51 个 SNV 位点,序列组成差异在于烟台株系的叶绿体基因组的 4 个基因 *psbD*、*psbC*、*psbB* 和 *atpB* 中共多了 6 个内含子。*U. laetevirens* 烟台株系与爱尔兰株系可能存在其他潜在的差异,包括核基因组和线粒体基因组的组成差异等,这些需

要进一步解析以期理解我国 *U. laetevirens* 绿潮暴发机制提供分子理论支持。对我们海域石莼属绿潮物种(包括新记录种)的全面调查和生物地理分布研究,将是对我国石莼绿潮实施有效监管和可靠预测的必要工作之一。

### 参 考 文 献

- 丁兰平, 黄冰心, 栾日孝, 2015. 中国海洋绿藻门新分类系统. 广西科学, 22(2): 201—210
- 董美龄, 1963. 中国浒苔属植物地理学的初步研究. 海洋与湖沼, 4(1): 46—51
- 马元庆, 邢红艳, 宋秀凯等, 2010. 烟台金沙滩绿潮爆发的基本状况与应对措施. 齐鲁渔业, 27(4): 10—12
- Bäck S, Lehto A, Blomster J, 2000. Mass occurrence of unattached *Enteromorpha intestinalis* on the Finnish Baltic Sea coast. *Annales Botanici Fennici*, 37: 155—161
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D *et al*, 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5): 455—477
- Batista M B, Cunha R L, Castilho R *et al*, 2018. Sea lettuce systematics: lumping or splitting?. *BioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/413450>
- Chen L, Feng J, Xie S L, 2015. *Ulva shanxiensis* (Ulvaceae), a new species from Shanxi, China. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 23(4): 397—405
- Cui J J, Monotilla A P, Zhu W R *et al*, 2018. Taxonomic reassessment of *Ulva prolifera* (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on specimens from the type locality and Yellow Sea green tides. *Phycologia*, 57(6): 692—704
- De Paula Silva P H, Paul N A, de Nys R *et al*, 2008. Integrating filamentous 'green tide' algae into tropical pond-based aquaculture. *Aquaculture*, 284(1/4): 74—80
- De Paula Silva P H, Paul N A, de Nys R *et al*, 2013. Enhanced production of green tide algal biomass through additional carbon supply. *PLoS One*, 8(12): e81164
- Fletcher R L, 1996. The Occurrence of "green tides"—a review. In: Schramm W, Nienhuis P H eds. *Marine Benthic Vegetation: Recent Changes and the Effects of Eutrophication*. Berlin, Heidelberg: Springer, 7—43
- Fort A, Mannion C, Fariñas-Franco J M *et al*, 2020. Green tides select for fast expanding *Ulva* strains. *Science of the Total Environment*, 698: 134337
- Fort A, McHale M, Cascella K *et al*, 2021. Foliose *Ulva* species show considerable inter-specific genetic diversity, low intra-specific genetic variation, and the rare occurrence of inter-specific hybrids in the wild. *Journal of Phycology*, 57(1): 219—233
- Fu G, Yao J T, Liu F L *et al*, 2008. Effect of temperature and irradiance on the growth and reproduction of *Enteromorpha prolifera* J. Ag. (Chlorophycophyta, Chlorophyceae). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26(4): 357—362
- Gao G, Beardall J, Bao M L *et al*, 2018. Ocean acidification and nutrient limitation synergistically reduce growth and photosynthetic performances of a green tide alga *Ulva linza*. *Biogeosciences*, 15(11): 3409—3420
- Gary W, Hana K, 2010. An evaluation of *rbcl*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie Algologie*, 31: 487—528
- Golubkov S M, Berezina N A, Gubelit Y I *et al*, 2018. A relative contribution of carbon from green tide algae *Cladophora glomerata* and *Ulva intestinalis* in the coastal food webs in the Neva Estuary (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 126: 43—50
- Guidone M, Thornber C S, 2013. Examination of *Ulva* bloom species richness and relative abundance reveals two cryptically co-occurring bloom species in Narragansett Bay, Rhode Island. *Harmful Algae*, 24: 1—9
- Hayden H S, Blomster J, Maggs C A *et al*, 2003. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. *European Journal of Phycology*, 38(3): 277—294
- Hughey J R, Gabrielson P W, Maggs C A *et al*, 2021. Taxonomic revisions based on genetic analysis of type specimens of *Ulva conglobata*, *U. laetevirens*, *U. pertusa* and *U. spathulata* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycological Research*, 69(2): 148—153
- Jin J J, Yu W B, Yang J B *et al*, 2020. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes. *Genome Biology*, 21(1): 241
- Kalyaanamoorthy S, Minh B Q, Wong T K F *et al*, 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6): 587—589
- Katoh K, Standley D M, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772—780
- Kirkendale L, Saunders G W, Winberg P, 2013. A molecular survey of *Ulva* (Chlorophyta) in temperate Australia reveals enhanced levels of cosmopolitanism. *Journal of Phycology*, 49(1): 69—81
- Kolbe K, Kaminski E, Michaelis H *et al*, 1995. Macroalgal mass development in the Wadden sea: first experiences with a monitoring system. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 49(1): 519—528
- Krzywinski M, Schein J, Biro I *et al*, 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, 19(9): 1639—1645
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870—1874
- Largo D B, Sembrano J, Hiraoka M *et al*, 2004. Taxonomic and ecological profile of 'green tide' species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) in central Philippines. *Hydrobiologia*, 512(1): 247—253
- Lee D K, Hsiang T, Lachance M A *et al*, 2020. The strange mitochondrial genomes of *Metschnikowia* yeasts. *Current Biology*, 30(14): R800—R801

- Lee H W, Kang J C, Kim M S, 2019. Taxonomy of *Ulva* causing blooms from Jeju Island, Korea with new species, *U. pseudo-ohnoi* sp. nov. (Ulvales, Chlorophyta). *Algae*, 34(4): 253—266
- Li H, Durbin R, 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5): 589—595
- Li H, Handsaker B, Wysoker A *et al*, 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16): 2078—2079
- Liu F, Pang S J, Chopin T *et al*, 2013. Understanding the recurrent large-scale green tide in the Yellow Sea: Temporal and spatial correlations between multiple geographical, aquacultural and biological factors. *Marine Environmental Research*, 83: 38—47
- Liu C Y, Xu G B, Deng X *et al*, 2020. Changes in concentrations of biogenic sulfur compounds in coastal waters off Qingdao, China during an *Ulva prolifera* bloom. *Marine Pollution Bulletin*, 152: 110940
- Lyons D A, Arvanitidis C, Blight A J *et al*, 2014. Macroalgal blooms alter community structure and primary productivity in marine ecosystems. *Global Change Biology*, 20(9): 2712—2724
- Mao Y X, Kim J K, Wilson R *et al*, 2014. The appearance of *Ulva laetevirens* (Ulvophyceae, Chlorophyta) in the northeast coast of the United States of America. *Journal of Ocean University of China*, 13(5): 865—870
- Miladi R, Manghisi A, Armeli Minicante S *et al*, 2018. A DNA barcoding survey of *Ulva* (Chlorophyta) in Tunisia and Italy reveals the presence of the overlooked alien *U. ohnoi*. *Cryptogamie Algologie*, 39(1): 85—107
- Mudassar A K, Monica G K, Veerendra V S, 2016. Morphological and molecular characterization of *Ulva chaugulii* sp. nov., *U. lactuca* and *U. ohnoi* (Ulvophyceae, Chlorophyta) from India. *Phycologia*, 55(1): 45—54
- Nelson T A, Lee D J, Smith B C, 2003. Are “green tides” harmful algal blooms? Toxic properties of water-soluble extracts from two bloom-forming macroalgae, *Ulva fenestrata* and *Ulvaria Obscura* (Ulvophyceae). *Journal of Phycology*, 39(5): 874—879
- Robinson J T, Thorvaldsdóttir H, Winckler W *et al*, 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1): 24—26
- Runca E, Bernstein A, Postma L *et al*, 1996. Control of macroalgal blooms in the Lagoon of Venice. *Ocean & Coastal Management*, 30(2/3): 235—257
- Sfriso A, 2010. Coexistence of *Ulva rigida* and *Ulva laetevirens* (Ulvales, Chlorophyta) in Venice Lagoon and other Italian transitional and marine environments. *Botanica Marina*, 53(1): 9—18
- Shibl A A, Isaac A, Ochsenkühn M A *et al*, 2020. Diatom modulation of select bacteria through use of two unique secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(44): 27445—27455
- Shimada S, Hiraoka M, Nabata S *et al*, 2003. Molecular phylogenetic analyses of the Japanese *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Ulvophyceae), with special reference to the free-floating *Ulva*. *Phycological Research*, 51(2): 99—108
- Smetacek V, Zingone A, 2013. Green and golden seaweed tides on the rise. *Nature*, 504(7478): 84—88
- Smith S A, Dunn C W, 2008. Phyutility: a phyloinformatics tool for trees, alignments and molecular data. *Bioinformatics*, 24(5): 715—716
- Song W, Wang Z L, Li Y *et al*, 2019. Tracking the original source of the green tides in the Bohai Sea, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 219: 354—362
- Steinhagen S, Barco A, Wichard T *et al*, 2019a. Conspecificity of the model organism *Ulva mutabilis* and *Ulva compressa* (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 55(1): 25—36
- Steinhagen S, Karez R, Weinberger F, 2019b. Cryptic, alien and lost species: molecular diversity of *Ulva sensu lato* along the German coasts of the North and Baltic Seas. *European Journal of Phycology*, 54(3): 466—483
- Taylor R, Fletcher R L, Raven J A, 2001. Preliminary studies on the growth of selected ‘green tide’ algae in laboratory culture: effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate. *Botanica Marina*, 44(4): 327—336
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F *et al*, 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24): 4876—4882
- Trifinopoulos J, Nguyen L T, von Haeseler A *et al*, 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1): W232—W235
- Xie W F, Wu C H, Zhao J *et al*, 2020. New records of *Ulva* spp. (Ulvophyceae, Chlorophyta) in China, with special reference to an unusual morphology of *U. meridionalis* forming green tides. *European Journal of Phycology*, 55(4): 412—425

## COMPARATIVE CHLOROPLAST GENOME ANALYSIS OF NEW-GREEN TIDE CAUSATIVE SPECIES IN CHINA: *ULVA LAETEVIRENS*

WANG Jing<sup>1,2,3</sup>, WANG Yi-Chao<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Hong-Shu<sup>1,2,3</sup>, LIU Feng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Nan-Sheng<sup>1,2,3</sup>

(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, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), 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)

**Abstract** Green tides caused by *Ulva* species have occurred for many years in the world. Some of them are large in scale across different ocean regions, while others are local. A green tide event occurred in early November, 2020 in the No.1 Bathing Beach, Yantai, Shandong, East China was investigated. Twelve algae samples were randomly collected, of which 11 were identified as *Ulva laetevirens* according to the molecular marker *tufA*. The full-length chloroplast genome of *U. laetevirens* CNS00533 was constructed. The genome is 110 889 bp in size, containing 71 protein coding genes, 27 tRNA genes, and 3 rRNA genes (*rri*, *rrn*, and *rrn5*). The chloroplast genome of CNS00533 and the *U. laetevirens* MT179351 genome have high sequence identity (99.8%). They also have identical number of genes and perfect colinearity, and showed substantial differences of genome between two *U. laetevirens* strains. The chloroplast genome of CNS00533 had five type-I introns and one type-II intron that are absent in the Irish strain, resulting in an increase of 7 kb in chloroplast genome length difference in-between. In contrast, the chloroplast genome of CNS00533 and the *U. rigida* MT179352 chloroplast genome had low sequence identity (93.1%) and large number of long insertion/deletion (ranging 763—2 346 bp). Large genomic differences were observed between the chloroplast genome of CNS00533 and *U. australis* (MT179348), including an inversion that covered 45 genes. In the phylogenetic tree based on 71 protein coding genes of *Ulva* species, CNS00533 and *U. laetevirens* MT179351 joined in one cluster, while *U. rigida* MT179352, and *U. australis* MT179348 were clearly in another clade, indicating that *U. laetevirens*, *U. rigida*, and *U. australis* are three different species of the *Ulva* genera. Therefore, *U. laetevierens* was found to be a new green-tide causative species in China ocean regions. The molecular evolution analysis of this species presented in this paper enriched our findings and shall help effective monitoring green tides in coastal waters of China.

**Key words** local green tide; *Ulva*; chloroplast; molecular evolution