

黄海北部庄河沿岸米草属植物种类鉴定及防治建议

于彩芬¹, 陈英旭², 陈鹏飞¹, 张帆¹,
姜洋², 刘长安¹

(1.国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 2.大连海洋大学, 辽宁 大连 116023)

摘要:米草属植物是目前我国沿海地区最严重的外来入侵植物, 已经严重威胁海岸带的生物多样性和生态系统的稳定性。为明确我国黄海北部庄河沿岸米草属植物的种类, 提出有针对性的防治措施, 本研究利用分子生物学技术对其进行物种鉴定。以植物新鲜叶片的总 DNA 为模板, 采用引物 S65-F (5'-ACACTACCCTGATCATCCTCT-3') 与 S65-R (5'-TCTGGCTGGATTGTTGTCTGT-3') 进行 PCR 扩增, 采用通用引物 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) 和 ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) 同时进行扩增进而验证鉴定结果, 确定黄海北部庄河沿岸米草属植物种类为大米草 (*Spartina anglica*)。鉴于大米草入侵会对沿海生物多样性和生态系统造成诸多影响, 建议地方政府强化对大米草的防治工作, 采取积极有效的措施对大米草进行综合治理。

关键词:米草属植物; 分子鉴定; 生物入侵; 防治; 黄海北部

中图分类号:S451

文献标识码:A

文章编号:1007-6336(2023)05-0774-06

Molecular identification and control suggestions of *Spartina* in Zhuanghe coastal zone of the Northern Yellow Sea

YU Caifen¹, CHEN Yingxu², CHEN Pengfei¹, ZHANG Fan¹,
JIANG Yang², LIU Chang'an¹

(1.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 2.Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: *Spartina* is the most invasive alien plant along the coast of China, which has seriously threatened the biodiversity and ecosystem stability in coastal zone. In order to identify the species of *Spartina* in Zhuanghe coastal zone of the Northern Yellow Sea, and put forward targeted control measures, in this paper, the species was identified using molecular detection technology. PCR amplification was performed from total DNA of fresh plant leaves using primers S65-F/S65-R and universal primers ITS. Among them, S65 forward primer sequence is 5'-ACACTACCCTGATCATCCTCT-3' and S65 reverse primer sequence is 5'-TCTGGCTGGATTGTTGTCTGT-3'. The universal primers are ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGA). The results showed that *Spartina* was identified as *Spartina anglica* in Zhuanghe coastal zone of the Northern Yellow Sea. It is suggested that local governments should strengthen the prevention and control of *Spartina anglica* and carry out comprehensive management in view of the impacts of *Spartina anglica* invasion on biodiversity and coastal ecosystems.

Key words: *Spartina*; molecular identification; biological invasions; control; Northern Yellow Sea

收稿日期:2022-12-07, 修订日期:2023-03-29

基金项目:科技基础资源调查专项项目(2022FY100300)

作者简介:于彩芬(1988—), 女, 山西大同人, 工程师, 硕士, 研究方向为滨海植物及外来物种入侵, E-mail: yucaifen25@163.com

通信作者:刘长安(1970—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为海洋生态环境保护, E-mail: lcahit@126.com

外来物种入侵是全球生物多样性丧失的主要驱动因素之一,影响生态系统稳定,危害生物和生态安全,威胁全球多个国家和地区^[1-2]。米草属植物隶属于禾本科虎尾草族,多数生长于滨海盐沼和河口区域,具有耐盐和耐淹特性,繁殖力强,根系发达^[3],在其原产地是常见优势种,具有重要的生态功能^[4]。我国基于保滩护岸、促淤造陆等目的,曾先后引入了4种米草^[5],分别是大米草(*Spartina anglica*)、互花米草(*Spartina alterniflora*)、狐米草(*Spartina patens*)和大绳草(*Spartina cynosuroides*)。但只有大米草和互花米草引种成功,目前互花米草已成为我国海岸带最严重的外来入侵植物,并逐步扩张至几乎全部的沿海海岸^[6],而大米草种群正急剧退缩,现在仅个别省份存有,其余两种已无分布。

庄河位于辽东半岛东侧南部,拥有我国黄海北部重要的滨海湿地生态系统,野生动植物资源丰富,是全球濒危物种黑脸琵鹭(*Platalea minor*)在中国境内唯一的繁殖地,同时也是黄嘴白鹭(*Egretta eulophotes*)、海鸬鹚(*Phalacrocorax pelagicus*)、遗鸥(*Larus relictus*)等迁徙水鸟的重要繁殖地和越冬地^[7],生态功能显著,生态地位重要。但近年来,庄河滨海湿地正面临米草属植物入侵的威胁,米草属植物分布面积逐渐增大,挤占了原生盐沼植物芦苇(*Phragmites australis*)和碱蓬(*Suaeda salsa*)的生存空间。若任其发展,将会引发一系列的生态环境问题。然而,目前对庄河沿岸米草属植物种类仍存在争议^[8-9],无法选定针对性防治措施进行治理,故需对其进行种类鉴定。

传统植物鉴定方法主要依靠形态学对比和观察,由于大米草是互花米草的杂交后代^[10],二者在形态上非常难以区分,对鉴定技术要求很高,而且极容易混淆,因此,分子生物学技术成为了鉴别两物种的关键手段。李飞飞等利用高通量简化基因组测序技术(Restriction site associated DNA sequence, RAD-seq),找到了能够稳定区分大米草和互花米草的细胞核染色体组 DNA 片段 S65,设计了相应的 S65 正反向引物,此引物可应用于鉴定大米草、或鉴别大米草和互花米草;若向待检样品的 DNA 中加入 S65 正反向引

物进行扩增,仅有大米草可扩增出 271bp 大小的核苷酸片段,互花米草则无此扩增产物,该方法准确率达 100%^[11]。本研究在此基础上,利用一代(Sanger)测序方法,对黄海北部庄河沿岸的米草属植物种类进行了分子鉴定,研究结果将为制定有针对性的入侵物种防治措施提供理论依据,对保护黄海北部滨海盐沼生态系统健康具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

2022 年 9 月,在黄海北部庄河沿岸滩涂宽阔平坦的米草属植物分布区,用灭菌镊子分别采集了 3 份生长状况良好的新鲜植物叶片,依次放入封口袋封存,编号为 MC1 ~ MC3,做好标记后带回实验室。将已编号的样品保存于装有足量干冰的保温盒内,送至生工生物工程(上海)股份有限公司检测。采样位置如图 1 所示,样品信息见表 1。

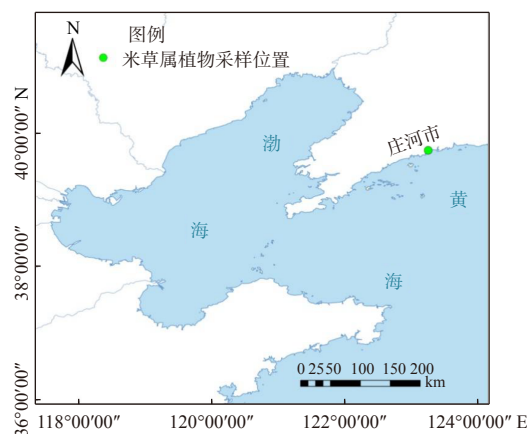


图 1 采样位置

Fig. 1 Sampling location

1.2 分子鉴定

1.2.1 DNA 提取

取 50 ~ 100 mg 的新鲜植物叶片,经液氮充分研磨后,制备成 3×2 份植物样品,用于 DNA 提取。采用 Ezup 柱式植物组织基因组 DNA 抽提试剂盒(B518261)提取样品 DNA,并对提取的 DNA 进行纯度和浓度测定。

1.2.2 PCR 扩增

向包含待检样品 DNA 的 PCR 扩增反应体系中加入 S65 正反向引物进行扩增,其中, S65

表 1 样品信息

Tab.1 Sample information sheet

植物	标号	采集样品量	采集地	经度	纬度
米草属植物	MC1	10 ~ 20 g	庄河	123.254847°E	39.7436194°N
米草属植物	MC2	10 ~ 20 g	庄河	123.254153°E	39.7441639°N
米草属植物	MC3	10 ~ 20 g	庄河	123.253567°E	39.7445944°N

正向引物为: 5'-ACACTACCCTGATCATCCTC T-3', S65 反向引物序列为: 5'-TCTGGCTGGATT GTTGTCTGT-3'^[11]。

PCR 反应体系: DNA 模板 1 μ L, 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 3.7 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ L, dd H₂O 补足到 25 μ L。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

同时, 在相同 PCR 反应体系和程序下, 采用通用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG), ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC) 也进行扩增, 对鉴定结果进行进一步验证。

1.2.3 电泳检测

称取 2 g 琼脂糖于锥形瓶中, 加入 1 $\times$ TAE 100 mL, 于微波炉中加热溶解后, 冷却至约 50 $^{\circ}$ C, 加入 4 μ L 核酸染料(Goldview), 混匀后将凝胶液倒入事先准备好的凝胶成型板中, 用 20 μ L 枪头排除小气泡, 插上梳子。待凝胶凝固后垂直向上拔出梳子, 转入平板电泳槽, 加入 1 $\times$ TAE 至漫过凝胶。取 PCR 扩增产物 5 μ L 上样, 加入 5 μ L Trans 2K Marker, 150 V 稳压电泳 10 ~ 20 min, 至凝胶成像仪紫外光下拍照观察。

1.2.4 Sanger 测序

目标 PCR 条带切胶回收, 对扩增的 PCR 产物进行检测及纯化。使用美国 ABI 公司生产的 3730XL 测序仪对 PCR 产物进行测序。

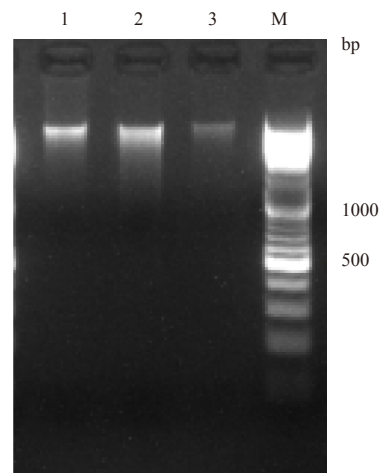
2 结果与讨论

2.1 植物样品特征

本次实验选取的米草属植物秆簇生, 直立; 叶片线形至披针形, 扁平。MC1、MC2、MC3 3 个样品分别采自不同的健康米草属植物, 植物株高分别为 48 cm、70 cm、50 cm, 种群密度分别为 652 株/m²、1320 株/m²、744 株/m²。

2.2 提取的植物总 DNA 质检结果

取 5 μ L DNA 溶液, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳(1 $\times$ TAE 缓冲溶液, 电压 120 ~ 180 V)对提取的 DNA 进行质检, 结果如图 2 所示, DNA 条带较完整清晰, 拖尾不严重, 说明浓度可以满足 PCR 要求, 可进行下一步判断与分析。



注: 1 ~ 3 为 MC1 ~ MC3 米草属植物样品, M 为 Marker SM0331

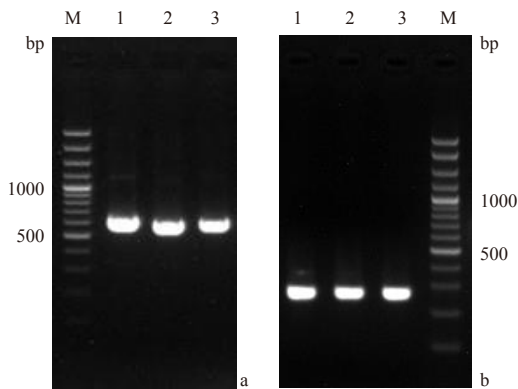
图 2 样品 DNA 提取产物电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of genomic DNA extracted from all samples

2.3 种类鉴定结果

参照李飞飞等^[11]公开的鉴定大米草、鉴别大米草和互花米草的方法, 以样品 MC1、MC2、MC3 的总 DNA 为模板, 采用引物 S65-F 与 S65-R 进行 PCR 扩增, 同时采用通用引物 ITS1 与 ITS4 扩增, 均成功扩增出目标条带(图 3)。对 MC1、MC2、MC3 样品的 ITS1 和 ITS4 扩增片段分别进行测序, 并将所得核苷酸序列在 NCBI 网站进行 BLAST 搜索, 结果如图 4 所示。MC1 样品在 100% 的覆盖率下与互花米草(序列号 MF063665.1)有 97.92% 的相似率, MC2 样品在 100% 的覆盖率下与互花米草(序列号 MF063665.1)有 97.32% 的相似率, MC3 样品在 100% 的覆盖

率下与互花米草(序列号 MF063665.1)有 97.89% 的相似率。



注: a 为引物 ITS1 与 ITS4 扩增结果; b 为引物 S65-F 与 S65-R 扩增结果

图 3 米草属植物样品的 PCR 扩增结果

Fig. 3 Results of PCR amplification for all *Spartina* samples

ITS 测序结果如下:

MC1

TGCGATGCTAACTGAATGCATAAGACT
CTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGG
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGA
GTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCTC
TTGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAC
GCCAAAAGACACTCCCTTGCAATCCTTGTGT
GGGATGTGGTGTTTGGCCTTCCATTGTACCT
ATAATGTGTGGTAGGCTAAAGGAAGTGGCT

GCTGGCTATGGTGGTGGTCACAACACTTGGT
GGATGACACATGTTGTTCTCAAAGTTGTGAC
TTG

MC2

TGCGATGCTAACTGAATGCATAAGACT
CTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGG
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGA
GTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCTC
TTGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCAC
GCCAAAAGACACTCCCTTGCAATCCTTGTGT
GGGATGTGGTGTTTGGCCTTCCATTGTACCT
ATAATGTGTGGTAGGCTAAAGGAAGTGGCT
GCTGGCTACGGTGCCGGTCACAACACTTGG
TGGATGACACATGTTGTTCTCAAAGTTGTGG
CTT

MC3

TGCGATGCTAACTGAATGCATAAGACT
CTCGGCAACGGATATCTTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACCTGG
TGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGA
GTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCTC
TCGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCA
CGCCAAAAGACACTCCCTTGCAATCCTTGTG
TGGGATGTGGTGTTTGGCCTTCCATTGTACC
TATAATGTGTGGTAGGCTAAAGGAAGTGGC
TGCTGGCTATGGTGGTGGTCACAACACTTGG
TGGATGACACATGTTGTTCTCAAAGTTGT

MC 1 *Sporobolus alterniflorus* voucher 2014580 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA ge... *Sporobolus altern...* 584 584 100% 3e-162 97.92% 537 MF063665.1
MC 2 *Sporobolus alterniflorus* voucher 2014580 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA ge... *Sporobolus altern...* 571 571 100% 2e-158 97.32% 537 MF063665.1
MC 3 *Sporobolus alterniflorus* voucher 2014580 internal transcribed spacer 1 partial sequence 5.8S ribosomal RNA ge... *Sporobolus altern...* 573 573 100% 6e-159 97.89% 537 MF063665.1

图 4 MC1~MC3 米草属植物样品通过 NCBI 网站进行 BLAST 结果图

Fig. 4 MC1 ~ MC3 plant samples of the genus *Spartina* were mapped by BLAST through the NCBI website

综上, 在 100% 的覆盖率下, MC1、MC2 和 MC3 3 个植物样品核苷酸序列分别与互花米草(序列号 MF063665.1)核苷酸序列呈现出了不同的相似率, 范围在 97.32% ~ 97.92%, 均达到 97% 以上, 相似率差异极小, 据此鉴定样品 MC1、MC2、MC3 均是互花米草同属但不同种的植物。同时, 依据李飞飞等^[11]通过引物 S65-F 与

S65-R 进行 PCR 扩增, 能够扩增出核苷酸片段的即可鉴定其为大米草的结论, 结合 ITS1 与 ITS4 的 PCR 扩增产物序列 BLAST 结果, 鉴定样品 MC1、MC2、MC3 均为大米草。鉴定结果与苗青等^[9]通过形态学鉴定方法将黄海北部庄河沿岸的米草属植物鉴定为大米草的结果一致。

此方法基于特定的 DNA 片段, 仅通过简单

的PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳结果就能进行大米草种类鉴定,与传统的形态学对比和观察鉴定法相比,其对鉴定人员经验、样品等的要求较低,操作简单,结果准确,这一研究结果为科学有效制定庄河沿岸外来入侵物种的防治方案提供了理论依据。

2.4 危害及分布特征

大米草入侵会对沿海生态环境造成诸多影响。在韩国江华岛(Kanghwa Island),大米草入侵改变了入侵地的水动力条件和沉积特征,导致大型底栖动物的多样性降低^[12]。早在我国福建宁德地区,由于大米草疯长,侵占了原生沿海滩涂植物的生长空间,致使大片红树林消亡,导致贝类、蟹类、藻类、鱼类,甚至弹涂鱼(*Periophthalmus cantonensis*)等多种生物窒息死亡,并且入侵的大米草与海带、紫菜等争夺营养物质,水产品养殖遭到毁灭性打击^[13]。在浙江象山西沪港,大米草的快速增长,使得西沪港内海洋水动力条件和冲淤环境发生根本性改变,造成进港潮流流速减缓、流量减少,港内纳潮量减少,淤积动力增加,滩涂淤积加快,海床逐渐提高,改变了海底地形;不仅如此,由于贝类、藻类、鱼类等无法在长有大米草的滩涂上生存,导致之前以水产养殖、“赶小海”为业的村民难以为继^[14]。黄海北部庄河沿岸滨海湿地生物多样性丰富,海洋贝类资源不仅是当地的经济支柱也是水鸟的食物来源,如今,大米草入侵排挤滨海湿地芦苇、碱蓬等原生盐沼植物生长,影响入侵地区鱼类、贝类、蟹类等生存,致使大量水鸟面临生存压力,造成生物多样性降低和生态系统退化等问题,破坏区域生态平衡。

大米草原产于英国南海岸^[15],是由美国的互花米草与英国本地的海岸米草(*Spartina maritima*)杂交,产生不育种唐氏米草(*Spartina townsendii*),再由唐氏米草经染色体加倍产生。大米草植株高度一般为10~100 cm,生境范围位于潮水能经常到达的潮间带,耐盐、耐淹、耐碱,具有同心圆结构聚生性的特征,植株丛生,常以实生苗或无性繁殖始生苗为中心,边缘根茎向四周蔓延,无性繁殖能力极强^[16],其自身特点决定了大米草具有很强的入侵性。我国于1963年在

部分沿海地区引入大米草^[17],20世纪90年代以前大米草长势很好,分布幅北至辽宁省盘山县、南至广东省茂名市电白区(原电白县),成为我国滨海湿地植被的优势群落之一^[18]。20世纪90年代以后,大米草在我国海岸带出现了严重的自然衰退,主要表现为植株矮化、生长发育极不正常、生物量减少和有性繁殖基本丧失等特征^[19],但在欧洲、韩国及其他许多地方大米草仍然属于入侵性很强的物种^[12,20]。近年来,我国黄海北部庄河沿岸大米草种群分布表现出逐年扩大的趋势,主要分布于英那河、庄河和湖里河入海口区域。

2.5 综合治理

地方政府应充分重视庄河沿岸大米草的防治工作,采取相应措施开展综合治理。第一,开展大米草调查,摸清底数。制定大米草调查工作方案,利用卫星遥感、无人机、实地调查等技术手段,开展现状调查,摸清分布状况,为科学开展大米草综合治理提供基础数据。第二,科学开展大米草综合治理,推进湿地保护。将大米草综合治理列入地方生态保护工程规划、国土空间生态修复、海岸带修复、湿地保护、自然保护地体系建设中。制定大米草防治专项行动实施方案,明确治理具体斑块、范围、面积、治理模式和完成时限等。第三,因地制宜,精准开展大米草除治工作。地方政府优先在庄河沿岸的自然保护地、生态保护红线、国家重要湿地、鸟类重要栖息地内开展大米草除治,利益相关方优先在对渔业经济产生影响的区域开展大米草除治。综合运用物理、生物以及综合防治等方法,面积较小的大米草斑块可通过人工挖(拔)除或深翻耕碎根、覆盖遮阴,面积较大的斑块可采用刈割+旋耕、水淹等方法除治,慎用化学方法,适当恢复本土植物。

3 结论

基于一代测序方法,以植物新鲜叶片的总DNA为模板,利用S65正反向引物和通用引物ITS进行PCR扩增,将黄海北部庄河沿岸米草属植物种类鉴定为大米草。鉴于大米草入侵会对沿海生态环境及渔业经济产生诸多影响,当地政

府及利益相关方应尽快采取有效措施开展大米草综合治理。

参考文献:

- [1] CHAPPLE D G, NAIMO A C, BRAND J A, et al. Biological invasions as a selective filter driving behavioral divergence[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 5996.
- [2] 陈宝雄, 孙玉芳, 韩智华, 等. 我国外来入侵生物防控现状、问题和对策[J]. *生物安全学报*, 2020, 29(3): 157-163.
- [3] MOBBERLEY D G. Taxonomy and distribution of the genus *Spartina*[J]. *Iowa State College Journal of Science*, 1956, 30: 471-574.
- [4] 左平, 刘长安, 赵书河, 等. 米草属植物在中国海岸带的分布现状[J]. *海洋学报*, 2009, 31(5): 101-111.
- [5] CHUNG C H. Forty years of ecological engineering with *Spartina* plantations in China[J]. *Ecological Engineering*, 2006, 27(1): 49-57.
- [6] NIE M, LIU W W, PENNING S C, et al. Lessons from the invasion of *Spartina alterniflora* in coastal China[J]. *Ecology*, 2023, 104(1): e3874.
- [7] 国家林业和草原局. 黑脸琵鹭: 中国海岸“黑面天使”[EB/OL]. [2021-01-20]. <http://www.forestry.gov.cn/main/5462/20210120/194057492144825.html>.
- [8] ZHANG D H, HU Y M, LIU M, et al. Introduction and spread of an exotic plant, *Spartina alterniflora*, along coastal marshes of China[J]. *Wetlands*, 2017, 37(6): 1181-1193.
- [9] 苗青, 翟强, 徐树军, 等. 关于互花米草在辽宁分布的商榷[J]. *植物检疫*, 2022, 36(4): 13-17.
- [10] 仲维畅. 大米草和互花米草种植功效的利弊[J]. *科技导报*, 2006, 24(10): 72-78.
- [11] 李飞飞, 赵彩云, 高珂晓, 等. 一种鉴别大米草和互花米草的方法: 中国, 111235303B[P]. 2021-07-27.
- [12] SHIN W, OH M, HONG J S, et al. Early invasion of common cordgrass (*Spartina anglica*) increases belowground biomass and decreases macrofaunal density and diversity in a tidal flat marsh[J]. *Biological Invasions*, 2022, 24(11): 3615-3629.
- [13] 左平, 刘长安. 中国海岸带外来植物物种影响分析——以大米草与互花米草为例[J]. *海洋开发与管理*, 2008, 25(12): 107-112.
- [14] 宁波日报. 围剿“害人草”西沪港大米草治理迫在眉睫[EB/OL]. [2014-08-29]. <http://news.cnnb.com.cn/system/2014/08/29/008149954.shtml>.
- [15] 穆亚楠, 安树青, 智颖飙, 等. 水位对大米草和藎草种内种间关系的影响[J]. *生态学杂志*, 2018, 37(4): 1010-1017.
- [16] 高志强. 福建滨海滩地米草资源开发利用问题[J]. *福建农业大学学报*, 1996, 25(1): 72-77.
- [17] 郎业广. 大米草的发展现状及其引种栽培技术[J]. *北方水稻*, 1978 (6): 31-39.
- [18] 沈永明, 曾华, 王辉, 等. 江苏典型淤长岸段滩涂盐生植被及其土壤肥力特征[J]. *生态学报*, 2005, 25(1): 1-6.
- [19] 李红丽, 智颖飙, 赵磊, 等. 大米草(*Spartina anglica*)自然衰退种群对N、P添加的生态响应[J]. *生态学报*, 2007, 27(7): 2725-2732.
- [20] NEHRING S, HESSE K J. Invasive alien plants in marine protected areas: the *Spartina anglica* affair in the European Wadden Sea[J]. *Biological Invasions*, 2008, 10(6): 937-950.