

Analiza gatunków *Ulva* spp. w rejonie Zatoki Puckiej w oparciu o taksonomię klasyczną i molekularną

Chudzik W.*, Zgrundo A.** , Złoch I.***

Uniwersytet Gdański, Instytut Oceanografii, Al. Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia

*w.chudzik.543@studms.ug.edu.pl, **aleksandra.zgrundo@ug.edu.pl, ***ilona.zloch@ug.edu.pl

WPROWADZENIE

Wody Zatoki Puckiej ze względu na duże zróżnicowanie warunków środowiskowych są rejonem potencjalnie bogatym w przedstawicieli rodzaju *Ulva*. Jednak identyfikacja do poziomu gatunku zazwyczaj sprawia trudności z powodu mnogości obserwowanych form morfologicznych. Stąd w ramach pracy podjęto się scharakteryzowania wybranych przedstawicieli *Ulva intestinalis* Linnaeus i *Ulva prolifera* O.F.Müller za pomocą narzędzi taksonomii klasycznej opartej o analizę cech morfologicznych i taksonomii molekularnej bazującej na identyfikacji odpowiednich barkodów. Nowością i kluczowym elementem pracy było przetestowanie loci i starterów wykorzystywanych w światowej literaturze przedmiotu na przedstawicielach rodzaju *Ulva* pochodzących z Zatoki Puckiej.

METODOLOGIA

ETAP 1. ZBIÓR TAKSONÓW

Materiał badawczy w postaci plech *Ulva* spp. zebrano w okresie sierpień-wrzesień 2021r. w strefie przybrzeżnej.

ETAP 2. IDENTYFIKACJA MORFOLOGICZNA

Oczyszczone plechy identyfikowano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse E400 pod powiększeniem 40-100x. Dokumentację zdjęciową wykonywano za pomocą kamery Delta Optical DLT-Cam PRO 20 MP USB 3.0. Wybrane zdjęcia przedstawiono na rys. 1-6.

ETAP 3. IDENTYFIKACJA GENETYCZNA

Z zamrożonego materiału izolowano materiał genetyczny metodą precypitacji.

3a. Na podstawie danych literaturowych wytypowano loci (*tufA*, *rbcL*, 28s, 5s, *rps2*.) o odpowiedniej sile dyskryminacyjnej.

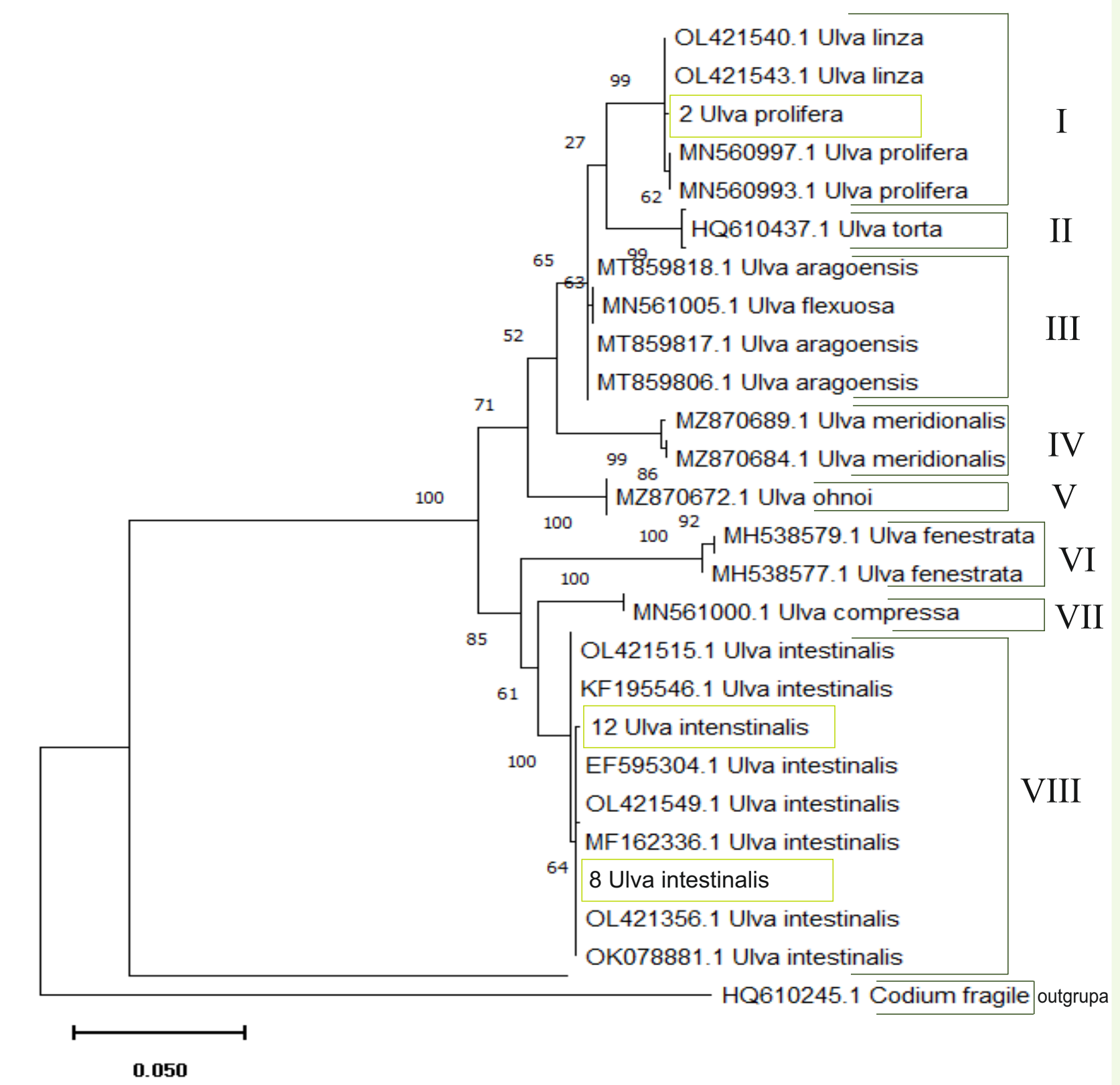
3b. Wykorzystane do badań startery wybrano na podstawie literatury przedmiotu, tj.:

- *tufGF4* x *tufAR* (Saunders i Kucera, 2010; Fama i in., 2002),
- *GrbcL*Fi x 1385R/ *RBCL2* (Saunders i Kucera, 2010; Manhart, 1994)
- 28s_F(LSU-D2/D3)/T16N x 28s_R(LSU-D2/D3)/T24U (Saunders i Kucera, 2010; Harper i Saunders, 2001),
- 5S-F x 5S-R (Shimada i in., 2008)
- *rps2-trnL-F1* x *rps2-trnL-R1* (Liu i in., 2020)

3c. Wyizolowane DNA przesłano do laboratorium zewnętrznego firmy Genomed w celu zrealizowania sekwencjonowania bezpośredniego wytypowanych fragmentów DNA.

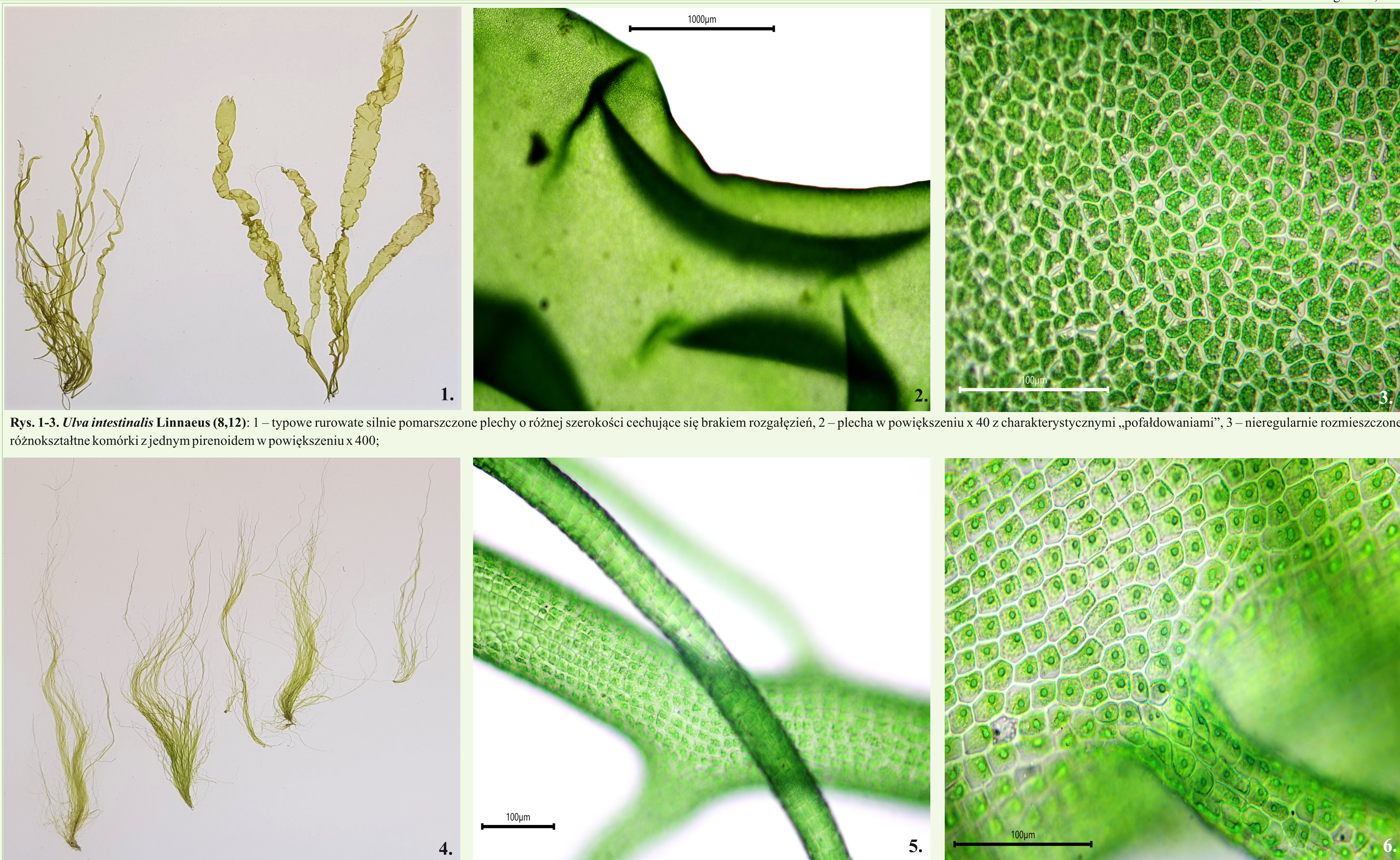
3d. Porównano sekwencje z bazą NCBI. Wykonano drzewa filogenetycznych i wyznaczono kłady dla wytypowanych loci. Wybrane drzewa przedstawiono na rysunku 7-8.

WYNIKI - IDENTYFIKACJA W OPARCIU O BARKODING



Rys. 7. Drzewo filogenetyczne LM oparte na modelu Tamura-Nei dla locus *tufA* dla rodzaju *Ulva*; Oznaczenia kładów: I - k. linza/prolifera, II - k. torta, III - k. flexuosa/aragoensis, IV - k. meridionalis, V - k. ohnoi, VI - k. fenestrata, VII - k. intestinalis

WYNIKI - IDENTYFIKACJA W OPARCIU O CECHY MORFOLOGICZNE



Rys. 1-3. *Ulva intestinalis* Linnaeus (8,12): 1 – typowe rurowate silnie pomarszczone plechy o różnej szerokości cechujące się brakiem rozgałęzień, 2 – plecha w powiększeniu x 40 z charakterystycznymi „pofaldowaniami”, 3 – nieregularnie rozmieszczone różnokształtne komórki z jednym pirenoidem w powiększeniu x 400;

Rys. 4-6. *Ulva prolifera* O.F.Müller (2): 1 – typowe rurowate wąskie plechy z licznymi proliferacjami, 2 – plecha w powiększeniu x 40 z charakterystycznymi proliferacjami, 3 – zazwyczaj regularne prostokątne komórki z jednym pirenoidem rozmieszczone w rzędach w powiększeniu x 400;



Rys. 8. Drzewo filogenetyczne LM oparte na modelu Tamura-Nei dla locus 5s dla rodzaju *Ulva*; Oznaczenia kładów: I - k. prolifera/intestinalis, II - k. linza, III - k. intestinalis, IV - mediterranea;

WNIOSKI

- Na podstawie przeprowadzonych analiz ustalono, że dla bałtyckiej *Ulva* spp. najlepsze barkody umożliwiające bezpośrednią identyfikację taksonomiczną uszeregowane według siły dyskryminacyjnej to 5s>rps2>tufA>28s>rbcL.
- Czynnikiem limitującym w przypadku taksonomii molekularnej może być brak wystarczającej ilości zdeponowanych sekwencji w bazie danych.
- Identyfikowane są wciąż nowe miejsca barkodingowe jak *rps2* (Liu i in., 2020), wzmacniające siłę dyskryminacyjną.
- Obie metody identyfikacji - morfologiczna oraz genetyczna - wzajemnie się uzupełniają, a wykonane w ten sposób oznaczenia zyskują na wiarygodności.

PODZIĘKOWANIA

W. Chudzik składa szczególne podziękowania dla Polskiego Towarzystwa Hydrobiologicznego Oddział Morski w Gdyni za sfinansowanie jej udziału w III Konferencji Polskich Badaczy Morza pt. „Stan i trendy zmian środowiska morskiego” oraz wydruk posteru naukowego.

REFERENCJE

1. Liu, J., Zhao, X., Kang, X., Zhuang, M., Ding, X., Zhao, L., Wen, Q., Zhu, Y., Gu, K., Bao, Q., Yang, X., Zhang, J., He, P., (2020). Good news: we can identify *Ulva* species erupted in the Yellow Sea more easily and cheaply now. *Conserv. Genet. Resour.* 12, 447–449. <https://doi.org/10.1007/s12686-019-01114-x>.
2. Manhart, J.R., (1994). Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences. *Mol. Phylogenet.* Vol. 3, 114–127
3. Saunders, G. W. i Kucera, H., (2010). An evaluation of *rbcL*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamic, Algologie* (4): 487–528.
4. Shimada, S., Yokoyama, N., Arai, S., Hiraoka, M., (2008). Phylogeography of the genus *Ulva* (Ulvoophyceae, Chlorophyta), with special reference to the Japanese freshwater and brackish taxa. *J. Appl. Phycol.* 20, 979–989 doi:10.1007/s10811-007-9296-y
5. Harper, J. T. i Saunders, G. W., (2001). The application of sequences of the ribosomal cistron to the systematics and classification of the florideophyte red algae (Florideophyceae, Rhodophyta). *Cah. Biol. Mar.* (2001) 42: 25–38.
6. Fama, P., Wysoor, B., Kooistra, W. i Zuccarello, G. C., (2002). Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpaceae, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of phycology* 38: 1040–1050a (Caulerpaceae, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. *Journal of phycology* 38: 1040–1050