

桃花水母的核糖体 RNA 基因 ITS 区序列分析及物种鉴定

迟艳红¹, 陈华增¹, 杨翠华¹, 孙玉苗², 齐继光¹, 刘光兴³, 王 玮¹

(1. 青岛海产博物馆, 山东 青岛 266003; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 中国海洋大学环境科学与工程学院, 山东 青岛 266100)

摘要: 利用 PCR 扩增和 DNA 测序技术, 获得了青岛野外采集到的桃花水母(*Craspedacusta*) 核糖体 RNA 基因 ITS 区序列。序列比对以及系统进化分析显示, 在青岛采集到的桃花水母与索氏桃花水母(*Craspedacusta sowerbyi*)的 ITS 区序列相似度最高, 同源性在 93%以上; 同时, 在系统发育树中也与索氏桃花水母聚为一支。研究结果表明, 青岛采集到的桃花水母为索氏桃花水母, 这也是青岛地区桃花水母的新记录。

关键词: 桃花水母(*Craspedacusta*); 核糖体 RNA 基因 ITS 区; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)02-0035-06

doi: 10.11759/hyqx20150305001

桃花水母(*Craspedacusta*)是一类原始的无脊椎动物, 隶属于刺胞动物门(Cnidaria)水螅纲(Hydrozoa)淡水水母目(Limnomedusae)笠水母科(Olindiidae)桃花水母属(*Craspedacusta*)。桃花水母不仅具有极高的观赏价值, 且其作为生物进化历程中的关键物种, 具有重要的研究价值。目前国内外共记述桃花水母 11 种, 除最早发现于英国的索氏桃花水母(*Craspedacusta sowerbyi*, 1880)^[1]和日本的伊氏桃花水母(*Craspedacusta iseanum*, 1922)^[2]外, 其余 9 种均发现于中国, 分别为宜昌桃花水母(*Craspedacusta kawaii*, 1907)^[3]、中华桃花水母(*Craspedacusta sinensis*, 1939)^[4]、乐山桃花水母(*Craspedacusta kiatingi*, 1939)^[5]、杭州桃花水母(*Craspedacusta hangzhouensis*, 1980)^[6]、信阳桃花水母(*Craspedacusta xinyangensis*, 1980)^[6-7]、四川桃花水母(*Craspedacusta sichuanensis*, 1984)^[8]、秭归桃花水母(*Craspedacusta ziguiensis*, 1985)^[9]、楚雄桃花水母(*Craspedacusta chuxiongensis*, 2000)^[10]和短手桃花水母(*Craspedacusta brevinea*, 2002)^[11]。目前, 国内专家主要通过依据桃花水母的外部形态特征对其进行分类, 但由于桃花水母的形态会因发育时期、生活环境差异等因素而发生变化, 且对一些重要分类依据如触手数目、着生方式、刺丝囊排列方式、生殖腺形状和颜色等特征缺乏明确的规范性描述, 从而给桃花水母的分类工作带来了困难^[12]。分子生物学技术的发展为生物物种分类提供了高、精、准的方法, 其中将聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术和 DNA 测序

分析技术结合应用到生物分类中, 具有不受发育时期及环境差异的影响、准确度高、多态性强等特点, 目前已经被广泛应用于生物物种的分类学研究领域当中^[13-14]。将生物的形态特征和 DNA 序列有效结合起来, 能够达到更加精准地鉴定生物物种的目的。

核糖体 RNA 基因(ribosomal RNA gene, 简称 rDNA)作为生物体重要遗传物质, 其结构由一个个串联重复序列组成。序列自 5'至 3'依次为: 非转录区(non-transcribed sequence, NTS)、外部转录间隔区(external transcribed spacer, ETS)、18S rDNA、内部转录间隔区 1 (internal transcribed spacer, ITS1)、5.8S rDNA、内部转录间隔区 2(ITS2)和 28S rDNA。核糖体 RNA 基因中的 18S、5.8S 和 28S 序列在大部分生物中均具有较高的保守性, 而作为非编码区的 ITS 区, 其所承受的条件选择压力较小, 因此进化速率较快, 核苷酸替换率较高, 能够提供较为丰富的生物学变异信息, 该区域碱基的序列特征在不同物种当中存在着较显著的差异^[15-17]。同时, ITS 区位于高度保守的 18S、5.8S 和 28S rDNA 序列之间, 便于进行引物的设计以完成对 ITS 区序列的 PCR 扩增和 DNA 测序, 因此利用 ITS 区序列分析能够方便有效

收稿日期: 2015-03-05; 修回日期: 2015-07-08

基金项目: 科技基础性工作专项项目(2012FY112200)

[Foundation: Special Foundation of Science and Technology Basic Research (2012FY112200)]

作者简介: 迟艳红(1987-), 女, 山东潍坊人, 助理工程师, 硕士, 主要从事生物分类鉴定, 电话: 0532-82864949, E-mail: chiyanhonglucky@163.com

地进行物种分类鉴定。目前 ITS 区序列分析已普遍应用于刺胞动物物种的分类鉴定当中^[18-20]。本研究对在青岛采集的桃花水母 ITS 区序列进行了基因克隆和 DNA 测序,并对所获得的序列进行相关生物信息学分析,结合采集水母外部形态特征,进而完成桃花水母的物种分类鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用标本是 2013 年 8 月采自青岛市海尔工业园人工湖的水母,保存于 80%乙醇中。

1.2 实验方法

1.2.1 采集水母的外部形态特征观察

利用体式显微镜对所采集水母首先进行外部形态特征观察,如伞体形态、有无胃柄、触手类型、辐管数目和位置、平衡囊类型、生殖腺形状和位置、刺胞分布等,初步确定采集水母的分类地位。

1.2.2 桃花水母总 DNA 的提取

从 80%乙醇保存的水母样本中随机取出 10 只,经酒精梯度过渡, ddH₂O 清洗数遍,用无菌滤纸将水分充分吸干,置于 1.5 mL 高温灭菌的离心管中。加入 100 μL TE 缓冲液后,用研磨棒将样品充分研磨破碎,再加入 2% SDS 和 2.5 μL 蛋白酶 K,置于 65 °C 恒温水浴锅中 2 h 进行完全消化。再经酚-氯仿抽提两次后利用无水乙醇进行沉淀,用 70%乙醇漂洗 2 次后置于室温下充分晾干,最后加入 TE 缓冲液溶解 DNA。所获得的总 DNA 利用 NanoDrop 分光光度计进行定量检测分析,再经过琼脂糖凝胶电泳,确认 DNA 完整无降解后,置于-20°C 保存备用。

1.2.3 引物的合成和 PCR 扩增

根据 GenBank 中已有的桃花水母 ITS 区序列,结合相关文献确定扩增目的基因序列的特异性引物,其正向引物为 ITSC-F1(5'-GTCGTAACAAGGTTTC CGTAGG-3'),反向引物为 ITSC-R1(5'-GGTAGTCT TGCCTGATCTGAGG-3')^[21],并由上海生工生物技术有限公司合成。通过 PCR 扩增获得 rDNA-ITS 区序列目的片段。PCR 反应体系如下: 1 μL DNA 模板, 1×reaction 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 2 mmol/L 正向引物, 2 mmol/L 反向引物以及 1.25 U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa), ddH₂O 补足到 25 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 变性 4 min, 1 个循环; 94 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C

延伸 10 min, 1 个循环。

1.2.4 PCR 产物的回收纯化, 目的基因的克隆及鉴定

PCR 产物在 1%的琼脂糖凝胶中进行电泳,使用凝胶成像系统(VDS)观察照相后,切下特异性目的条带,并利用 DNA 胶回收试剂盒(上海生工公司)对目的片段进行回收,然后克隆到 pMD19-T 载体(大连宝生物公司)。重组质粒转化至大肠杆菌 TOP10 菌株,产生的阳性克隆经 PCR 验证后进行测序。

1.2.5 生物信息学分析

所获得的 DNA 序列利用 Vector 软件进行基因组成分分析,并使用 NCBI BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行序列同源性比对以及相似性分析,采用 Clustal W 软件对不同种,不同来源的桃花水母核糖体 RNA 基因 ITS 区序列进行多序列比对分析,并以淡水水母亚纲微水螅属的 *Microhydrula limosicola* 作为外类群,利用 MEGA 4.0 软件进行系统发生和进化的分析,系统树采用 Neighbor-joining 方法构建。

2 结果

2.1 采集水母的主要形态特征描述

所采集水母体具有桃花水母主要形态特征: 有很发达伞缘刺胞环; 无胃柄; 4 条简单辐管; 无向心管; 生殖腺囊状, 仅悬在辐管上; 缘触手只有 1 种, 均匀分布于伞缘上; 关闭型的平衡囊位于缘膜内, 形成向心管状。而桃花水母种间的重要分类依据如触手数目、刺丝囊疣形状、生殖腺形状和颜色等因个体大小或发育时期不同,在所采集的桃花水母的不同个体之间均存在部分差异,从而无法将其准确定义到种。

2.2 桃花水母 ITS 区基因的 PCR 扩增结果

以所提取的桃花水母 DNA 为模板,以 ITSC-F1/ITSC-R1 特异性引物进行 PCR 扩增。扩增产物经过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示: 此次 PCR 扩增获得了长 750 bp 左右的目的产物(图 1)。测序结果显示: 该次 PCR 扩增所得的目的基因片段共 771 bp。Vector 软件分析显示: 该目的基因包括 18S rDNA 的部分片段 44 bp、235 bp 的 ITS1、161 bp 的 5.8S rDNA、304 bp 的 ITS2 以及 28S rDNA 的部分片段 27 bp。

2.3 桃花水母 ITS 区基因同源序列比对分析

同源基因多序列比对显示, ITS 区序列在不

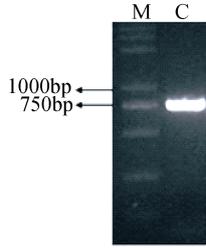


图 1 桃花水母 ITS 区基因目的片段的检测

Fig. 1 The target fragment of the *ITS* region in *Craspedacusta* collected in Qingdao

M. DNA 分子 Marker; C. 特异性引物扩增获得的 ITS 区基因目的片段
M. DNA Marker; C. The target fragment of the *ITS* region

同种类的桃花水母中具有较高的保守性。BLAST 比对结果显示, 本次采集的桃花水母 ITS 区序列与各地的索氏桃花水母(*C. sowerbyi*)ITS 区碱基序列具有很高的相似度, 同源性均在 93%以上, 如与香山采集的索氏桃花水母(AY513629.1)ITS 区序列有 100% 相似度, 与濮阳采集的索氏桃花水母(AY513628.1) ITS 区序列存在 99%相似度, 与株洲采集的索氏桃花

水母 (AY513634.1) ITS 区序列有 98%的相似度, 与横溪采集的索氏桃花水母 (AY513625.1) ITS 区序列相似度为 97%, 与平阳采集的索氏桃花水母 (JN874928.1)ITS 区序列同源性为 93%; 而与其他种类的桃花水母同源性在 70%~80%之间, 与四川桃花水母(*C. sichuanensis*)(AY513620.1)和乐山桃花水母(*C. kiatingi*)(AY513619.1)的 ITS 区序列相似度均为 77%, 与秭归桃花水母(*C. ziguiensis*)(AY513637.1)ITS 区序列相似度为 80%, 与中华桃花水母(*C. sinensis*)(AY730677.1)和短手桃花水母(*C. brevinema*)(AY513614.1)相似度均为 76%。作者利用 MEGA 4.0 软件, 将来自 23 个不同地区的桃花水母 ITS 区序列进行系统学分析, 构建了系统发育树(图 4)。分析结果表明, 不同种类的桃花水母亲缘关系远近不同, 相同种类不同地区的桃花水母在分子水平上也存在一定差异, 系统发育树结果显示本次实验采集的桃花水母与各地索氏桃花水母聚为一支。综合以上结果推断, 在青岛采集到的桃花水母应是索氏桃花水母(*C. sowerbyi*)。

```

1  GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGATAGACCGTCGTG 60
61  AAACCACTGTGAATGGTATTGGACCGTGCAGGGTGGCCAATGAGTCAGAGGTAGCCGCT 120
121 TAAATGCAGTCTCAGCGATGAGCTGCGGCCCGCACGAGTCGACTGGTTGTTCCACAGA 180
181 CTTTTGCGGGCTGTATTTCGAATTGAAAAAGCAGAACTGAAGTACCTTATAGTTTCCGTTG 240
241 GGTGTCTCATAGAGCACAAACGAAAGATGGTTTAAACGAACAACCTTCTAACGGTGGATCT 300
301 CTTGGCTCGTGCATCGATGACGAACGTAGCCAGTTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA 360
361 TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATTGCGCTCTCTGGATCCCCAGGGAGCATG 420
421 TCTGTCTGAGTGTGCGAACGAAAACTGACACACTTCGGTGTGAGAGTGGGTGCTCGGG 480
481 TTAGGGCTCGATGCTCAAGACCCGTCACCTAAGTGCATGGATGGACCGGATCGCAGCCT 540
541 AAACGAGAAATTTTAGCGTATTAATAAATCCCGTCTGGAAGGCTCTGAGTTATATGTGCAT 600
601 GTTTACTTGAACGGAGTTTCTGTAACTGGGGCGGCAACCTGACCTTCTCAGACATCAA 660
661 GGGATAAGAAAAAGGCTCGGTTCGGTGGCGAAGTTATTAAGCGAGAGGTGTCATATCAATG 720
721 TGTTATATATGCCTGTGTTGCGAATTTGACCTCAGATCAGGCAAGACTACC 771
    
```

图 2 桃花水母核糖体 RNA 基因 ITS 区序列

Fig. 2 The sequence of the *ITS* region of *Craspedacusta* from Qingdao

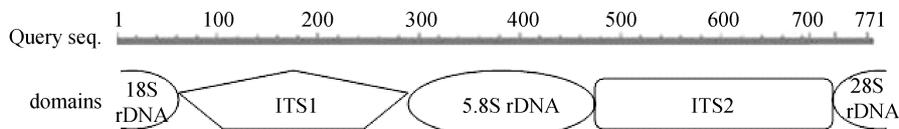


图 3 桃花水母核糖体 RNA 基因 ITS 区序列保守结构域

Fig. 3 The conserved domains of the *ITS* region of *Craspedacusta* from Qingdao

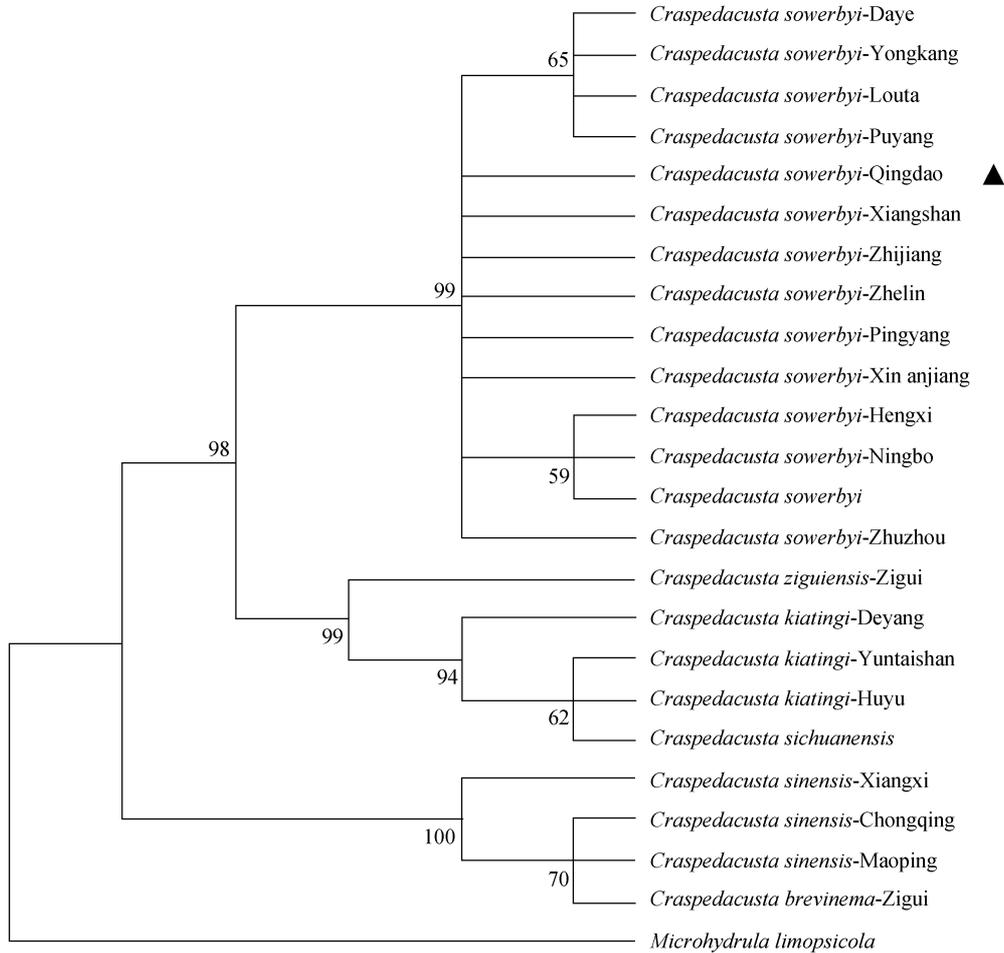


图 4 青岛采集桃花水母 ITS 区序列与其他桃花水母 ITS 区序列构建的系统发育树

Fig. 4 A phylogenetic tree based on the sequences of the *ITS* region from different *Craspedacusta* species

3 讨论

桃花水母作为一类珍稀的淡水水母，在生态学和生物学研究中具有重要意义。目前对桃花水母的相关研究主要集中于物种分类、生活史、地理分布及生态学影响等方面。桃花水母的分类鉴定工作在生物和生态学研究起着较为重要的作用。目前对桃花水母的物种分类主要依据其外部形态特征，如平衡囊的数目和形状、触手的数目和着生方式、生殖腺的颜色和形状、刺丝囊疣的形状及排列方式等^[22]。而相关研究表明，桃花水母在不同发育时期其外部形态特征具有较大的差异，不同的生活环境也有可能带来形态特征的变化；此外，作为桃花水母重要分类依据的部分形态特征尚缺乏规范描述，个人主观因素的存在对外部形态的理解有可能造成分类偏差等等。上述情况的存在，均为分类工作带来了一定的困难。DNA 作为生物遗传信息的载体，在不同发

育时期和环境中的变异几率微小，具有遗传性、保守性、稳定性及差异性等特点。因此，利用 DNA 分子技术进行桃花水母物种鉴定可以较好地弥补形态学分类的不足。目前，分子生物技术已被国内外的学者们广泛应用于桃花水母的物种分类鉴定当中，如通过对 18S rRNA 基因、核糖体 RNA 基因 ITS 区序列、COI 等基因序列分析进行了不同地区桃花水母的物种鉴定^[21, 23]。

核糖体 RNA 基因中的 18S rDNA、5.8S rDNA 和 28S rDNA 序列高度保守，变异信息主要积累于作为非编码区 ITS 区，从而使其具有种间区分的特异性，因此研究中常利用 ITS 区序列分析进行生物属种间以及亚种层次上的物种鉴定工作。本研究成功获得了桃花水母核糖体 RNA 基因 ITS 区序列，并且多物种同源基因比对显示，ITS 区在不同种类的桃花水母中具有较高的保守性。本次实验采集的桃花水母 ITS 区序列与各地的索氏桃花水母 ITS 区序列具

有最高的相似度, 同源性均在 93%以上, 而与其他种类的桃花水母同源性为 70%~80%。通过系统发育树分析也能明显看出桃花水母与索氏桃花水母聚为一类。综合以上分析结果可以得出, 此次采集到的桃花水母即是索氏桃花水母。

目前, 我国关于桃花水母的分类研究主要依据外部形态特征。由于传统分类技术手段的局限以及知识认知上的差异, 国外研究学者对我国国内报道的一些桃花水母属的物种分类存在争议。为了精益求精, 科研工作者们继续通过改进形态学特征研究和分子标记的探索以达到更加精准地进行分类鉴定的目的。中国科学院水生生物所通过建立形态度量学参数: 触手密集度和平衡囊密集度, 对桃花水母进行分类比较分析所得结果认为短手桃花水母与中华桃花水母为同一物种^[24]。本研究通过系统进化分析显示, 短手桃花水母与中华桃花水母同源性非常高, 达 99%, 且在系统进化树中聚为一支。通过以上形态学特征和分子生物学的综合分析, 认为这两种水母有可能为同一个物种。同理, 四川桃花水母与乐山桃花水母 ITS 区序列相似度也非常高, 为 99%, 在系统学树中聚为一支, 因此认为这两种水母有同为一个物种的可能, 但具体是否为同一物种还需进一步分析定论。目前分子生物学技术逐渐应用于桃花水母的生物生态学研究当中^[25], 日趋完善的生物信息学平台, 如索氏桃花水母 cDNA 文库的建立^[26]、索氏桃花水母线粒体 DNA 基因组的确定^[27]以及各地各种桃花水母分子标记的获得等, 为以后桃花水母的生长发育、系统进化分析以及分类鉴定等研究奠定了坚实的基础。对于目前国内存在的桃花水母同物异名现象^[12, 28], 还有待于结合形态学和分子生物学做进一步地研究, 使桃花水母的分类鉴定工作更加准确而有效。

参考文献:

- [1] Lankester E R. On a new jelly-fish of Order Trachomedusae, living in freshwater [J]. Nature, 1880, 22: 147-148.
- [2] Oka A, Hara M. On a new species of Limnocodium from Japan[J]. Annot Zool Jap, 1922, 10(7): 83-87.
- [3] Oka A. Eine neue süßwasser-medusaeaus China [J]. Annot Zool Jap, 1907, 6(3): 219-227.
- [4] Gaw H Z, Kung L H. Fresh-water medusae found in Kiating, Szechuen, China[J]. Science, 1939, 90(2335): 299.
- [5] 高尚荫, 公立华. 四川嘉定的淡水水母[J]. 武汉大学理科报, 1939, 1-4.
Gao Shangyin, Gong Lihua. A species of freshwater medusa from Jiading in SICHUAN[J]. Sciences journal of Wuhan University, 1939, 1-4.
- [6] 和振武. 我国发现两个新亚种淡水水母[J]. 新乡师范学院学报, 1980, 1: 71-77.
He Zhenwu. Two new subspecies freshwater medusa from China[J]. Journal of Xinxiang Normal University, 1980, 1: 71-77.
- [7] 和振武. 河南淡水水母一新亚种[J]. 动物分类学报, 1980, 5 (3): 221-223.
He Zhenwu. A new species of freshwater medusa from HENAN[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1980, 5 (3): 221-223.
- [8] 和振武, 寇志通. 四川淡水水母一新种[J]. 动物分类学报. 1984 9 (4): 340-342.
He Zhenwu, Kou Zhitong. A new species of freshwater medusa from SICHUAN[J]. Acta Zootaxonomica Sinica. 1984 9 (4): 340-342.
- [9] 和振武, 许人和. 湖北淡水水母一新种(淡水水母目: 笠水母科)[J]. 动物分类学报, 1985, 10 (4): 341-343.
He Zhenwu, Xu Renhe. A new species of freshwater medusa from HUBEI (Limnomedusae: Olindiadae)[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 1985, 10 (4): 341-343.
- [10] 和振武, 许人和, 聂思明. 云南淡水水母一新种(淡水水母目: 笠水母科)[J]. 动物分类学报, 2000, 25(2): 139-141.
He Zhenwu, Xu Renhe, Nie Siming. A new species of freshwater medusa from YUNNAN(Limnomedusae: Olindiadae)[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2000, 25(2): 139-141.
- [11] 和振武, 许人和. 中国淡水水母一新种(淡水水母目: 笠水母科) [J]. 动物分类学报, 2002, 27(1): 33-35.
He Zhenwu, Xu Renhe. A new species of freshwater medusa from China(Limnomedusae: Olindiadae)[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2002, 27(1): 33-35.
- [12] 苏春分, 王丹丽. 桃花水母的分类研究[J]. 水产科学 2009, 28(3): 167-170.
Su Chunfen, Wang Danli. On the taxonomy of Crapedacusta [J]. 2009, 28(3): 167-170.
- [13] Kim D H, Heber D, Still D W. Genetic diversity of Echinacea species based upon amplified fragment length polymorphism markers[J]. Genome, 2004, 47: 102-111.
- [14] Nakamura K, Ozaki A, Akutsu T, et al. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Molecular genetics and genomics, 2001, 265: 687-693.
- [15] Ainouche M L, Bayer R J. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. Genome, 1997, 40: 730-743.
- [16] Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 1992, 1: 3-16.
- [17] Hadjiolova K V, Georgiev O I, Nosikov V V, et al. Localization and structure of endonuclease cleavage

- sites involved in the processing of the rat 32S precursor to ribosomal RNA[J]. *Biochem J*, 1984, 220: 105-116.
- [18] Beauchamp K A, Powers D A. Sequence variation of the first internal spacer (ITS-1) of ribosomal DNA in ahermatypic corals from California[J]. *Molecular marine biology and biotechnology*, 1996, 5: 357-362.
- [19] Odorico D M, Miller D J. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): patterns of variation consistent with reticulate evolution[J]. *Molecular biology and evolution*, 1997, 14: 465-473.
- [20] Oppen M J, Willis B L, Vugt H W, et al. Examination of species boundaries in the *Acropora cervicornis* group (Scleractinia, cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses[J]. *Molecular ecology*, 2000, 9: 1363-1373.
- [21] 邹秀, 王丹丽, 徐善良, 等. 浙江 4 地桃花水母的 rDNA-ITS 序列分析[J]. *生物学杂志*, 2012, 29(3): 6-10.
Zou Xiu, Wang Danli, Xu Shanliang, et al. Sequences analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Craspedacusta* from four regions in Zhejiang[J]. *Journal of biology*, 2012, 29(3): 6-10.
- [22] He Z W. A revision of the genus *Craspedacusta* in China (Limnomedusae, Olindidae)[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2003, 28(1): 20-23.
- [23] 徐善良, 周剑君, 王丹丽, 等. 浙江省桃花水母 18S rRNA 基因序列分析及物种鉴定[J]. *淡水渔业*, 2010, 40(2): 14-18.
Xu Shanliang, Zhou Jianjun, Wang Danli, et al. Sequence analysis of 18S rRNA gene of *Craspedacusta sowerbyi* in Zhejiang province[J]. *Freshwater Fisheries*, 2010, 40(2): 14-18.
- [24] 高谦, 张立强, 姚卫建, 等. 两个新的桃花水母形态度量学参数的建立及其在种类区分上的应用[J]. *水生生物学报*, 2007, 31(1): 78-82.
Gao Qian, Zhang Liqiang, Yao Weijian, et al. Establishment of two new morphometrical parameters of *Craspedacusta* (Limnomedusae: Olindidae) with their application in the species validation[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(1): 78-82.
- [25] Hroudova M, Vojta P, Strnad H, et al. Diversity, phylogeny and expression patterns of Pou and Six homeodomain transcription factors in hydrozoan jellyfish *Craspedacusta sowerbyi*[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e36420.
- [26] 陈金华. 索式桃花水母全长 cDNA 文库的构建[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(15): 7776-7778.
Chen Jinhua. Construction of Full-length cDNA Library of *Craspedacusta sowerbyi*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(15): 7776-7778.
- [27] Schierwater B, Zou H, Zhang J, et al. Mitochondrial Genome of the Freshwater Jellyfish *Craspedacusta sowerbyi* and Phylogenetics of Medusozoa[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e51465.
- [28] Zhang L Q, Wang G T, Yao W J, et al. Molecular systematics of medusae in the genus *Craspedacusta* (Cnidaria: Hydrozoa: Limnomedusae) in China with the reference to the identity of species[J]. *Journal of Plankton Research*, 2009, 31: 563-570.

Sequence analysis of the ribosomal RNA gene *internal transcribed spacer* region and species identification of *Craspedacusta*

CHI Yan-hong¹, CHEN Hua-zeng¹, YANG Cui-hua¹, SUN Yu-miao², Qi Ji-guang¹, LIU Guang-xing³, WANG Wei¹

(1. Qingdao Marine Product Museum, Qingdao 266003, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. College of Environmental Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, China)

Received: Mar., 5, 2015

Key words: *Craspedacusta*; ITS region; Gene cloning; Sequence analysis

Abstract: The ribosomal RNA gene *internal transcribed spacer* (ITS) region of *Craspedacusta* from Qingdao was isolated using the polymerase chain reaction followed by sequencing. Homology and phylogenetic analyses revealed that the ITS region of *Craspedacusta* showed a high similarity with *Craspedacusta sowerbyi* (>93%). Simultaneously, our results showed that this region is closely related to *C. sowerbyi* using a phylogenetic tree. The present data suggest that the *Craspedacusta* from Qingdao are closely related to *C. sowerbyi*. This is a new study about *Craspedacusta* in Qingdao.

(本文编辑: 康亦兼)