

一株桑沟湾赤潮藻的分子鉴定

徐娜^{1,2}, 逢少军¹, 刘峰¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 2011年5月山东荣成桑沟湾近海海域暴发赤潮, 其规模在桑沟湾历史上罕见, 较严重地影响了该海域水产动物的人工养殖。本文作者分离得到了赤潮暴发过程中海水里的一株优势种, 并对其核糖体 18S rDNA 基因(18S rDNA)和转录单元内间隔区(ITS)进行了序列扩增和分析。依据这两种序列构建的系统进化树都显示这株藻与卡罗藻 *Karlodinium veneticum*(=*K. micrum*)完全聚在一起, 因此推断出其应为 *K. veneticum*, 是一种常见有害赤潮藻。本文是卡罗藻在桑沟湾海域暴发的首次报道。

关键词: 桑沟湾; 赤潮; 卡罗藻; 分子鉴定

中图分类号: Q178.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)04-0013-06

桑沟湾位于山东半岛最东端, 是一个面向黄海的半封闭型海湾, 水域广阔, 是北方重要的海珍品和大型藻类养殖基地。2011年5月开始, 桑沟湾养殖区暴发较大规模赤潮, 一直持续到8月上旬台风“梅花”来袭才完全消亡。赤潮高密度暴发区海水呈黄棕色, 透明度明显下降。赤潮使养殖区的鲍鱼摄食大大减少。据当地养殖户描述这种大规模赤潮在桑沟湾历史上非常少见。桑沟湾养殖区环境质量优良, 目前还没有关于桑沟湾暴发赤潮的文献记载。这次罕见的赤潮对桑沟湾环境及养殖业都造成了较大影响。作者采集了赤潮暴发区的海水, 分离得到了一株优势种赤潮藻并对其进行了鉴定。

赤潮藻类个体微小, 传统的鉴定主要通过显微镜下观察其形态学特征, 这需要鉴定人员有丰富的经验。此外一些有害赤潮藻种和无害物种形态相似, 光学显微镜下难以分辨, 需要电子显微镜下的细节观察^[1], 而电镜观察需要设备条件及熟练的样品处理能力。因此传统的形态学鉴定方法受到一定的限制。基于DNA分子序列对物种的鉴定是一种简单、准确而高效的分析方法, GenBank数据库中也收录了越来越多可供比对的分子序列, 其中大部分信息较为可靠, 因此非专业的藻类分类工作者易于通过分子序列完成对微藻的鉴定。18S rDNA和ITS序列是藻类分子鉴定和分类中最常用的分子指标^[2]。本研究分离得到的赤潮藻在光学显微镜观察下初步判断为裸甲藻类似种, 由于藻细胞固定时易变形, 且电镜观察条件暂难满足, 因此作者以18S rDNA和ITS分子序列为依据鉴定这株藻。

1 材料与方法

1.1 水样的采集和种质的分离培养

2011年6月于桑沟湾养殖区赤潮发生水域(37.14N, 122.55E)采集水样1L, 装入洁净的聚乙烯塑料瓶置于低温环境下带回实验室。水样加入灭菌海水配制的f/2培养液^[3-4](不添加硅酸盐), 在依据采集地环境设定的条件下进行富集培养。对观察到的优势藻在显微镜下进行藻种分离纯化。定期观察, 得到纯的藻种后扩大培养。培养温度为20℃, 以白炽灯为光源, 光照强度为5000 lx, 光照周期控制在12L:12D。

1.2 分子鉴定

取50 mL处于对数生长期的纯种藻液, 7000 g离心5 min, 弃上清收集藻细胞。用试剂盒提取基因组DNA。18S rDNA序列的扩增采用真核生物18S通用引物SSU-F/SSU-R^[5]。扩增ITS序列(包括ITS1、5.8S rDNA和ITS2)的引物为ITS1/ITS2^[2]。PCR反应体积50 μL, 体系包括: 模板基因组DNA 2.5 μL, 引物(20 μmol/L)各1.25 μL, Taq酶预混合的PCR反应液25 μL, ddH₂O 20 μL。18S序列扩增循环程序为:

收稿日期: 2011-07-21; 修回日期: 2011-11-25

基金项目: 国家科技基础条件平台——水产种质资源平台运行项目(2006DKA30470_017); 中国科学院野生生物种质库海藻种质库平台运行项目

作者简介: 徐娜(1985-), 女, 山东泰安人, 博士研究生, 研究方向: 海洋微藻, 电话: 82898831, E-mail: xuna07@qdio.ac.cn; 逢少军, 通信作者, E-mail: sjpang@qdio.ac.cn

94℃预变性 10 min; 之后 94℃变性 30 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s, 循环 32 次; 最后 72℃延伸 10 min^[5]。ITS 序列扩增程序为: 95℃预变性 5 min; 之后 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 30 次, 最后 72℃延伸 5 min^[2]。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的片段, 连接到 pMD19-T 载体, 并转化感受态 *Escherichia coli* DH-5 α , 用蓝白斑法筛选阳性克隆。用菌液 PCR 检测白斑菌落, 重组成功的菌落扩增培养后送至上海博尚测序公司测序。

将测得的序列在 NCBI 用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源检测, 找出与其最相近的物种。在 Genbank 下载其他相关物种的 18S rDNA 序列及 ITS 序列, 与该藻株的序列一起用 BioEdit 软件的 Clustal W^[6]程序进行多序列对位分析。后用 MEGA

4^[7]的 Kimura 2-parameter 模型计算遗传距离, 采用邻接法(neighbor-joining/NJ)^[8]构建系统进化树, 用自展检验(bootstrap)^[9]估计系统树分支节点的置信度, 自举数据集为 1000 次。

2 结果与分析

2.1 形态学特点

分离纯化得到的这株藻记录为 SGW201106-1。生长状态良好的藻液呈黄褐色。在显微镜下观察, 活跃的游动细胞长 10~15 μm , 宽 7~12 μm , 游动较迅速。细胞横沟明显, 将细胞分为基本同样大小的上下两部分(图 1)。鞭毛两条, 一条从细胞基部伸出, 另一条从中间的横沟处伸出。加入固定液后, 细胞容易变形。根据形态特点初步判断这株藻为裸甲藻类似种。

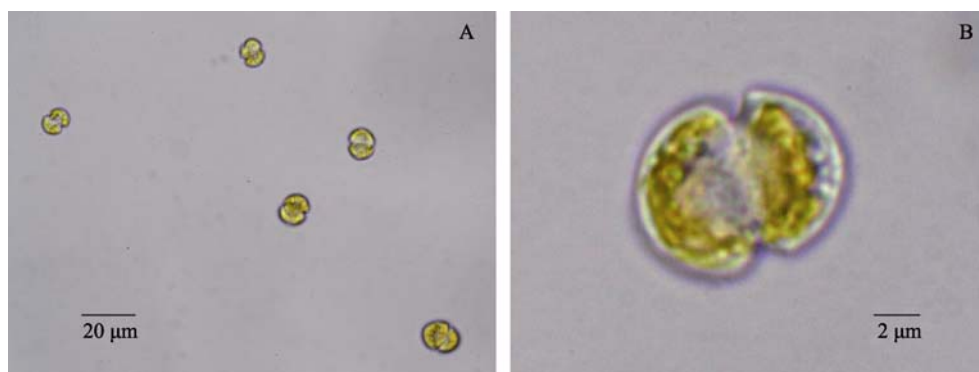


图 1 甲藻 SGW201106-1 的形态特征

Fig. 1 Light microscopic photos of strain SGW201106-1

A. 40 倍物镜下的多个藻细胞(标尺=20 μm); B. 100 倍油镜下的单个藻细胞, 长略大于宽, 横沟明显(标尺=2 μm)

A. a group of living cells (bar=20 μm); B. a single cell, showing the cell shape and the obvious cingulum (bar=2 μm)

2.2 基因序列分析

2.2.1 18S rDNA 序列

经 PCR 扩增后测序得到的藻株 SGW201106-1 的 18S rDNA 序列长度为 1 783 bp, 将序列提交 GenBank, 得到序列索引号为 JN986577。

将此 18S rDNA 序列经 BLASTn 搜索, 与之比对得分最高的是卡罗藻 *K. micrum*(=*K. veneficum*, 见下文讨论部分), 并与 GenBank 中收录的 11 条 *K. micrum* 18S rDNA 序列的最大相似性都为 99%。用 MEGA 4 以邻接法(NJ)构建的 18S rDNA 系统进化树见图 2, 建树所用的外类群为甲藻门塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)。图 2 表明, SGW201106-1 与 11 株 *K. micrum* 和 1 株 *K. veneficum* 聚为一支, 再与同为凯伦藻科(Karenaceae)的达卡藻属(*Takayama*)聚在一起, 与同科的凯伦藻属(*Karenia*)亲缘关系相

对稍远。

经 Clustal W 对位分析比较, SGW201106-1 的 18S rDNA 与索引号为 EF492506 的 *K. micrum* 只在 1 783 bp 序列的第 343 个位点有一个碱基替换的差异。

2.2.2 ITS 序列

PCR 扩增后获得 SGW201106-1 的 ITS 序列长度为 687 bp, 去除两端多余 rDNA 序列后实际长 595 bp, 其中 ITS1 为 218 bp, 中间 5.8S rDNA 159 bp, ITS2 序列 218 bp, 后提交至 GenBank 获得序列索引号 JN986578。

ITS 序列经 BLASTn 搜索, 与之比对得分最高的前 17 条序列都是 *K. micrum* 和 *K. veneficum*, 与之相似性都高于 97%, 最高为 100%。依据 ITS 序列构建的系统进化树(图 3)中, SGW201106-1 与 GenBank 中的 11 株 *K. micrum* 和 6 株 *K. veneficum* 完全聚在一

起, 支持率 99%, 后与 *Karodinium* 属另一种 *K. ar-miger* 聚为一支。这一支与同为 Kareniaceae 科的 *Takayama* 属聚在一起, 最后再与同科的另一属 *Karenia* 聚合。

经 Clustal W 对位分析比较, SGW201106-1 的 ITS 序列与 GenBank 索引号为 AJ557026 的 *K. micrum* 只在 595 bp 的序列中第 415、416 位点有两个碱基插入的差异, 位于 ITS2 区。

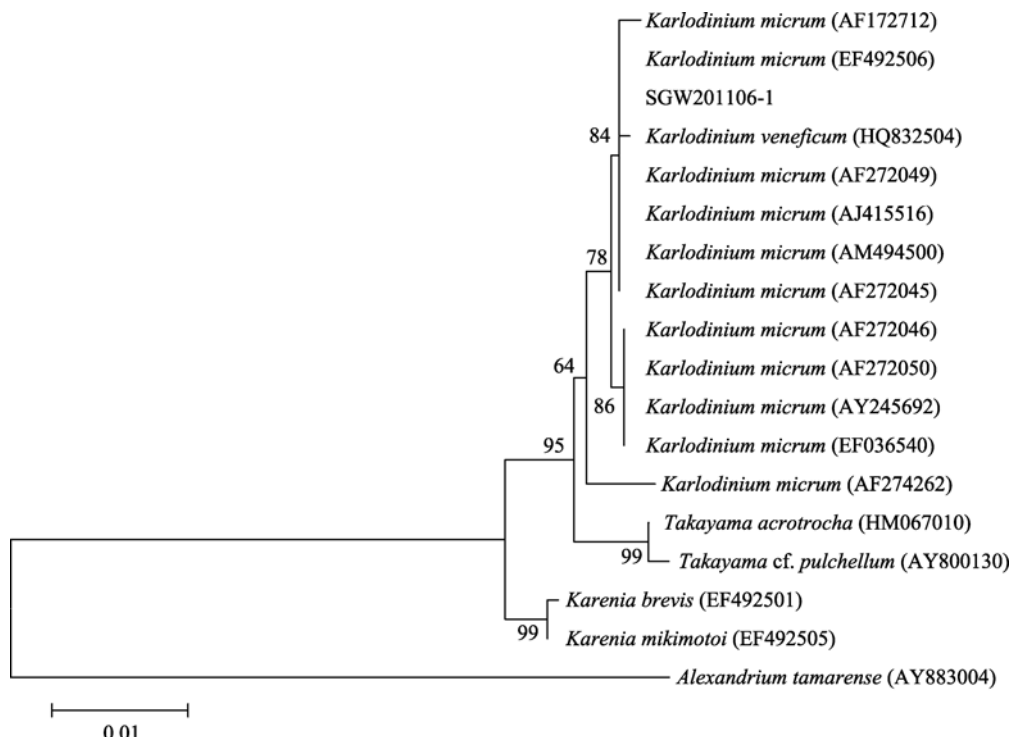


图 2 依据 18S rDNA 序列通过邻接法构建的系统树(重复 1000 次计算 bootstrap 值), 以 *Alexandrium tamarense* 为外类群
Fig. 2 The neighbor-joining tree of 18S rDNA sequences. Bootstrap values (%) of 1000 replicates are given adjacent to each node. *Alexandrium tamarense* is used as outgroup

以上结果表明, SGW201106-1 的 18S rDNA 和 ITS 序列与 GenBank 中的 *K. veneficum*/*K. micrum* 非常接近, 而 *K. micrum* 与 *K. veneficum* 是同种异名, 已被修订为 *K. veneficum*^[10]。因此, 本文中在桑沟湾赤潮水样中的分离得到的这株优势种甲藻为卡罗藻 *Karodinium veneficum*, 属于裸甲藻目 (Gymnodiniales), 凯伦藻科 (Kareniaceae), 卡罗藻属 (*Karodinium*)。

3 讨论

K. veneficum 是一种常见的赤潮甲藻, 它的分类名称曾有多种, 后经研究证实有几种与它相近的甲藻都是同种异名。Daugbjerg 等^[11]将 *Gymnodinium galatheanum*, *Gymnodinium micrum*, *Gyrodinium galatheanum* 都修正为 *K. micrum*, 并认为与 *K. veneficum* 是同属不同种。而 Bergholtz 等^[10]则通过形态学比较和核糖体大亚基基因 (LSU rDNA) 分析, 认

为 *K. micrum* 与 *K. veneficum* 是同一种, 将 *K. micrum* 修正为 *K. veneficum*。Garcés 等^[12]的研究也表明 *K. micrum* 与 *K. veneficum* 的色素组成一致, 支持 Bergholtz 的结论, 认为二者应该为同一种。目前大多研究人员已接受 *K. micrum* 与 *K. veneficum* 为同一种的说法^[13-18]。因此过去所有报道中用到的名称(包括 *Gymnodinium galatheanum*, *Gymnodinium micrum*, *Gyrodinium galatheanum*, *Karodinium micrum*, *Karodinium galatheanum*, *Gymnodinium veneficum*)都应当修正为 *K. veneficum*。*K. veneficum* 之前广被接受的中文译名是微小卡罗藻, 由 *K. micrum* 翻译而来, 修正为 *K. veneficum* 后, 国内有一篇中文文章将其译为剧毒卡尔藻^[19]。

K. veneficum 属于裸甲藻目 (Gymnodiniales), 是一种世界广布性的赤潮甲藻且能产生卡罗藻毒素^[20-21], 曾被报道在欧洲、非洲和北美洲等很多地方引起赤潮并导致鱼类死亡^[22]。在中国, 关于 *K. ve-*

neficum 引发赤潮的正式报道较少, 其曾在中国香港海域发生过赤潮, 但没有相关鱼类死亡的报道^[23-24]。另有文章提到 2005 年 6 月 *K. veneficum* 与其他藻一起在

洞头东海海域引发赤潮, 但其不是主要优势种; 2007 年 6 月, *K. veneficum* 在象山湾的一个虾池中大量暴发^[25]。

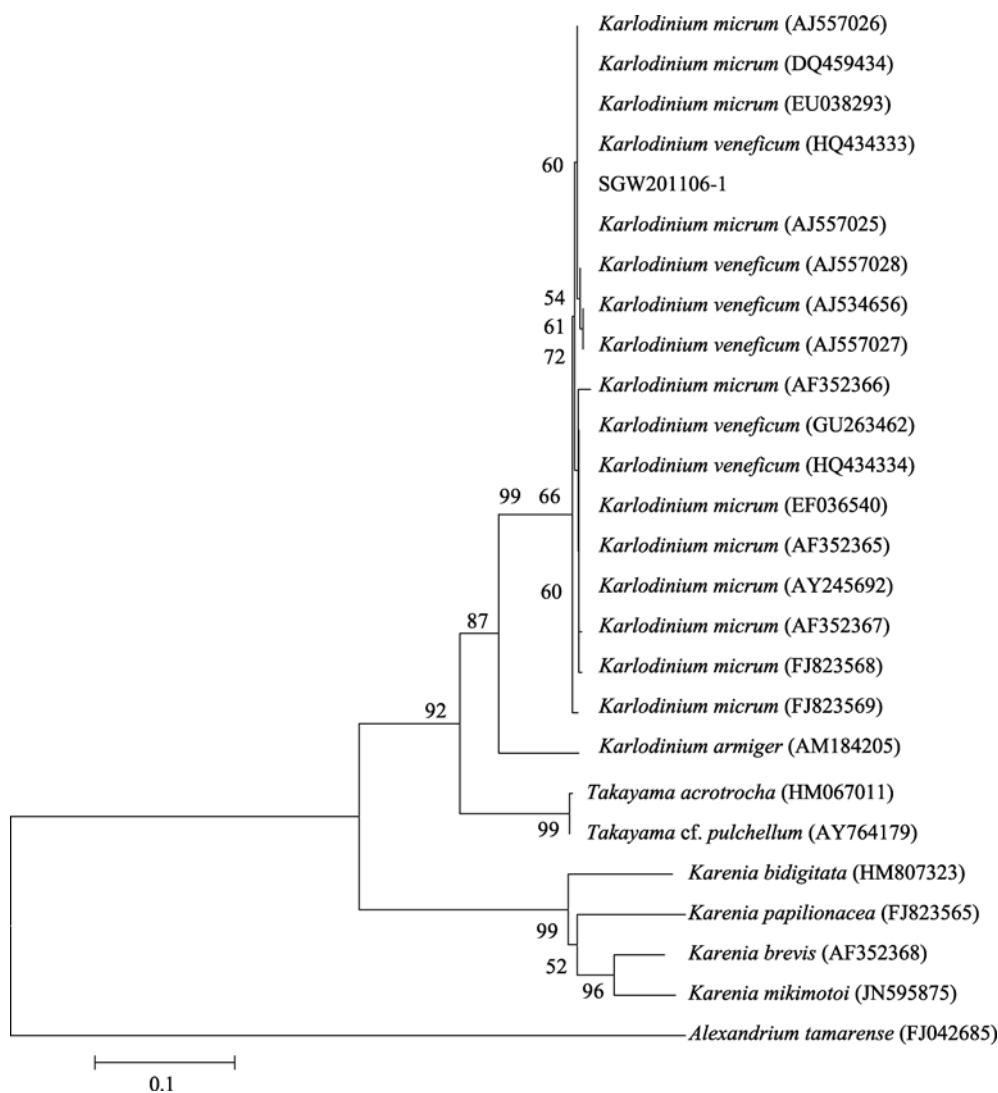


图 3 依据 ITS 序列通过邻接法构建的系统树(重复 1000 次计算 bootstrap 值), 以 *Alexandrium tamarense* 为外类群
Fig. 3 The neighbor-joining tree of ITS sequences. Bootstrap values (%) of 1000 replicates are given adjacent to each node. *Alexandrium tamarense* is used as outgroup

桑沟湾是中国北方地区历史悠久的水产养殖湾之一, 其养殖区环境优良^[26], 大型海藻海带养殖规模很大, 其中也夹杂着部分牡蛎、扇贝以及鲍鱼的筏式混养。桑沟湾被认为是海水水产动物和植物养殖搭配合理的典范。因此其水质中营养盐基本保持平衡, 多年来鲜有大规模赤潮发生。2011 年 5 月份的这次赤潮规模在桑沟湾历史上比较罕见。另外, 先前科研人员对桑沟湾浮游植物优势种调查结果中都没有发现卡罗藻 *K. veneficum*^[27-29]。因此不排除 *K. veneficum* 来自桑沟湾以外水域环境的可能。鲍鱼和

龙须菜在我国福建养殖区和桑沟湾的季节性互移养殖^[30-31]都有可能将新的物种从南方水域带入桑沟湾。*K. veneficum* 在桑沟湾被发现是否属于这种情况需要进一步的数据支持。桑沟湾有丰富的营养物质基础及适宜的环境条件, 外来种一旦遇到这些适宜的条件, 容易暴发性增长。桑沟湾海区溶解无机氮和活性磷酸盐的浓度在夏秋季高于春冬季, 夏秋季陆源丰水期河流径流水携带大量的工农业废水和城市生活污水中所含氮、磷化合物进入该湾^[32], 而 5、6 月份湾内养殖的大量海带、裙带菜等大型藻类多已

采收完毕,对海水中营养盐的消耗减少,因此此时的高营养水平是赤潮暴发的物质基础。另外此时恰逢高温期,风力小,为赤潮暴发和蔓延提供了最适宜的条件。赤潮暴发后,对当地的养殖业带来较大影响,本项研究的结果将为今后桑沟湾海区环境监测和赤潮预防提供有价值的信息。

致谢:感谢山东荣成市蚬江水产有限责任公司的工作人员在水样采集集中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 于志刚,米铁柱,姚鹏等. 赤潮藻鉴定与定量检测方法进展[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(5): 1067-1076.
- [2] 罗立明,胡鸿钧,李夜光,等. 东海原甲藻的分子鉴定[J]. 海洋学报, 2006, 28(1): 127-131.
- [3] Guillard R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1962, 8(2): 229-239.
- [4] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates[C]//Smith W L, Chanley M H. Culture of Marine Invertebrate Animals. New York: Plenum Press, 1975: 26-60.
- [5] 王波,米铁柱,吕颂辉,等. 五种/株原甲藻核糖体小亚基 18S rRNA 基因克隆及序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 450-456.
- [6] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673-4680.
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1596-1599.
- [8] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [9] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [10] Bergholtz T, Daugbjerg N, Moestrup Ø, et al. On the identity of *Karlodinium veneficum* and description of *Karlodinium armiger* sp. nov. (Dinophyceae), based on light and electron microscopy, nuclear-encoded LSU rDNA, and pigment composition [J]. J Phycol, 2005, 42: 170-193.
- [11] Daugbjerg N, Hansen G, Larsen J, et al. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates [J]. Phycologia, 2000, 39 (4): 302-317.
- [12] Garcés E, Fernandez M, Penna A, et al. Characterization of NW Mediterranean *Karlodinium* spp. (Dinophyceae) strains using morphological, molecular, chemical and physiological methodologies [J]. J Phycol, 2006, 42: 1096-1112.
- [13] Glibert P, Alexander J, Meritt D W, et al. Harmful algae pose additional challenges for oyster restoration: impacts of the harmful algae *Karlodinium veneficum* and *Prorocentrum minimum* on early life stage of the oysters *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* [J]. Journal of Shellfish Research, 2007, 26(4): 919-925.
- [14] Adolf J E, Bachvaroff T, Place A R. Can cryptophyte abundance trigger toxic *Karlodinium veneficum* blooms in eutrophic estuaries? [J] Harmful Algae, 2008, 8: 119-128.
- [15] Galimany E, Place A R, Ramón M, et al. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. Harmful Algae, 2008, 7: 91-98.
- [16] Salas M F, Laza-Martínez A, Hallegraeff G M. Novel unarmed dinoflagellates from the toxigenic family Kareniaceae (Gymnodiniales): five new species of *Karlodinium* and one new *Takayama* from the Australian sector of the Southern Ocean [J]. J Phycol, 2008, 44: 241-257.
- [17] Bachvaroff T R, Adolf J E, Place A R. Strain variation in *Karlodinium veneficum* (Dinophyceae): toxin profiles, pigments, and growth characteristics[J]. J Phycol, 2009, 45: 137-153.
- [18] Calbet A, Bertos M, Fuentes-Grünewald C, et al. Intraspecific variability in *Karlodinium veneficum*: Growth rates, mixotrophy, and lipid composition[J]. Harmful Algae, 2011, 10: 654-667.

- [19] 王红霞, 陆斗定, 黄海燕, 等. 东海剧毒卡尔藻的形态特征及其系统进化分析[J]. 植物学报, 2011, 46 (2): 179-188.
- [20] Deeds J R, Terlizzi D E, Adolf J E, et al. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae)—a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility[J]. Harmful Algae, 2002, 1: 169-189.
- [21] Kempton J W, Lewitus A J, Deeds J R, et al. Toxicity of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) associated with a fish kill in a South Carolina brackish retention pond [J]. Harmful Algae, 2002, 1(2): 233-241.
- [22] Tengs T, Bowers H A, Ziman A P, et al. Genetic polymorphism in *Gymnodinium galatheanum* chloroplast DNA sequences and development of a molecular detection assay [J]. Molecular Ecology, 2001, 10: 515-523.
- [23] 朱鹏, 游玉容, 褚椒江, 等. 微小卡罗藻 (*Karlodinium micrum*) 共附生微生物抗菌与细胞毒活性[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 1044-1050.
- [24] Lam J Y G, Liu J H. Marine water quality in Hongkong in 2004[R]. Hongkong: Environmental Protection Department Report, 2005: 8-16.
- [25] Zhou C X, Fernández N, Chen H M, et al. Toxicological studies of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) isolated from East China Sea [J]. Toxicon, 2011, 57: 9-18.
- [26] 国家海洋局. 2009 年中国海洋环境质量公报[M]. 北京: 海洋出版社, 2010.
- [27] 刘慧, 方建光, 董双林, 等. 莱州湾和桑沟湾养殖海区浮游植物的研究 [J]. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 20-28.
- [28] 慕建东, 董玮, 陈碧鹃, 等. 桑沟湾浮游植物生态特征[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 91-96.
- [29] 李超伦, 张永山, 孙松, 等. 桑沟湾浮游植物种类组成、数量分布及其季节变化[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(4): 1-8.
- [30] 李钧, 林祥志, 谢双如, 等. 贝类养殖技术之一 皱纹盘鲍南北接力养殖技术研究[J]. 中国水产, 2007, 11: 46-47.
- [31] 张学成, 费修纭. 全国水产原良种审定委员会审定品种——981 龙须菜及其栽培技术介绍[J]. 科学养鱼, 2008, 6: 21-22.
- [32] 孙丕喜, 张朝晖, 郝林华, 等. 桑沟湾海水中营养盐分布及潜在性富营养化分析[J]. 海洋科学进展, 2007, 25(4): 436-445.

Molecular identification of a bloom-forming species isolated from Sanggou Bay in Shandong Province

XU Na^{1,2}, PANG Shao-jun¹, LIU Feng¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Jul., 21, 2011

Key words: Sanggou Bay; red tide; *Karlodinium*; molecular identification

Abstract: A seldom seen red tide occurred in Sanggou Bay, Shandong province, China in May, 2011 and the local shellfish aquaculture was greatly affected. During this event, we have isolated a dominant alga strain and we augmented and analyzed its 18S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequences. The phylogenetic trees based on the two sequences both revealed that this species clusters with *Karlodinium veneficum* (= *K. micrum*). So it is identified as *K. veneficum*, one of harmful algal bloom species reported in the Southern Sea of China previously. This is the first report of this alga to appear in bloom in Sanggou bay.

(本文编辑: 梁德海)