

北部湾涠洲岛红色赤潮藻的分子鉴定

徐轶肖^{1,2}, 何喜林^{1,2}, 张 腾^{1,2}, 赵志娟³, 韦光领^{1,2}

(1. 南宁师范大学 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室, 广西 南宁 530001; 2. 南宁师范大学 广西地表过程与智能模拟重点实验室, 广西 南宁 530001; 3. 南宁师范大学 环境与生命科学学院, 广西 南宁 530001)

摘要: 为了弄清北部湾涠洲岛 6 株疑似红色赤潮藻(*Akashiwo sanguinea*)株的种类, 作者采用光学显微镜和荧光显微镜对其进行形态学初步鉴定; 并对藻株 SSU rDNA、LSU rDNA 和 ITS 序列测序, 利用最大似然法构建系统发育树。结果表明, 北部湾涠洲岛 6 株藻与红色赤潮藻形态特征基本符合; 3 种序列系统发育树分析均发现北部湾涠洲岛 6 株藻与不同海域来源的红色赤潮藻聚在同一分支上, 自展值高达 99、100、100; 与来自亚洲海域的韩国安山株、新加坡株、中国厦门港株序列差异最小, 亲缘关系最近, 而与其他地理来源的红色赤潮藻序列差异大, 亲缘关系较远。红色赤潮藻 SSU、LSU、ITS 种内遗传距离分别为 0.001~0.008、0.003~0.025 和 0.045~0.406, 明显小于该藻与其他裸甲藻科(*Gymnodiniaceae*)藻属下的种间遗传距离 0.032~0.072、0.165~0.222 和 0.589~1.559, 因此可确定北部湾涠洲岛 6 株藻均为红色赤潮藻。研究结果将为北部湾海域赤潮生物来源与组成、赤潮的发生与管理提供基础信息。

关键词: 红色赤潮藻(*Akashiwo sanguinea*); 分子鉴定; 系统发育树; 遗传距离; 北部湾

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)09-0063-11

DOI: 10.11759/hyxx20191106008

红色赤潮藻(*Akashiwo sanguinea*)原名红色裸甲藻(*Gymnodinium sanguineum*), 中文又译作血红哈卡藻, 隶属于甲藻门(Dinophyta)、甲藻纲(Dinophyceae)、裸甲藻目(Gymnodiniales)、裸甲藻科(Gymnodiniaceae)、赤潮藻属(*Akashiwo*), 是广温、广盐性种类, 藻细胞呈五角形, 可形成休眠孢子, 具有分布广的特点^[1]。2000 年 Daugbjerg^[2] 等借助分子生物学方法指出红色赤潮藻与其他裸甲藻进化关系较远, 因此独立出来成立 1 个新属, 即赤潮藻属(*Akashiwo*), 并把该种命名为 *Akashiwo sanguinea*。目前在赤潮藻属下尚未命名其他新种, 所以普遍认为赤潮藻属只有 1 种, 即红色赤潮藻。

红色赤潮藻赤潮暴发时海水颜色为褐色或红褐色, 迄今没有该藻产毒的报道, 但是红色赤潮藻大量繁殖引起的赤潮能够引发鱼虾类、海洋无脊椎生物的大量死亡^[3]。1922 年在日本 Kozusa-ura Gokasho Bay 首次记录到由红色赤潮藻引起的大规模赤潮^[4], 随后在英国、新西兰、美国大西洋和太平洋沿岸也发现该藻赤潮事件。1998 年 8 月中旬~9 月中旬在中国烟台四十里湾第一次记录到由红色赤潮藻暴发的大规模赤潮, 面积约 100 km²^[5], 之后在中国南方沿

海多处出现, 夏秋季多发, 现已成为中国东南沿海常见的赤潮种^[6-7]。

近年来, 北部湾藻华发生频次、规模、有害赤潮种类呈增加趋势^[8], 特别是北部湾经济区开发后, 藻华发生的种类发生了明显变化。2000 年前, 藻华种主要为蓝藻门(Cyanophyta)的微囊藻(*Microcystis*), 2001~2010 年间为蓝藻、甲藻(Dinophyta)和硅藻(Bacillariophyta), 2011 年至今主要为定鞭藻门(Haptophyta)的球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)^[9]。但 2016 年 5 月北部湾钦州海域曾发生约 20 km² 的红色

收稿日期: 2019-11-06; 修回日期: 2020-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41976155, 41506137); 广西自然科学基金资助项目(2016GXNSFBA380037); 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室和广西地表过程与智能模拟重点实验室开放基金资助项目(GTEU-KLOP-K1803)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41976155, 41506137; Natural Science Foundation of Guangxi, No. 2016GXNSFBA380037; The Opening Foundation of Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Ministry of Education and Guangxi Key Laboratory of Earth Surface Processes and Intelligent Simulation, No. GTEU-KLOP-K1803]

作者简介: 徐轶肖(1977-), 女, 浙江兰溪人, 副研究员, 博士, 主要从事海洋有毒有害藻与海产品安全研究, E-mail: xuyixiao_77@163.com

赤潮藻赤潮^[10],同一时间在防城港海域发现红色赤潮藻水色异常事件,细胞密度高达 3.44×10^5 个/L^[11]。遗憾的是,两次事件均只是文字报道,缺乏形态学和分子生物学数据。由于红色赤潮藻活细胞体形易变,固定后细胞易被破坏而难以识别其形态,是裸甲藻中较难鉴定的种类之一。分子标记技术的发展,使海洋微藻鉴定从形态学上升到 DNA 分子水平,基于 SSU rDNA、LSU rDNA、ITS 的 DNA 序列鉴定及分子系统学研究是区分变种、地理株、物种的有效手段,前人已成功将这些方法应用于红色赤潮藻的分子鉴定中^[2, 12-13]。

涠洲岛作为北部湾最大的岛屿,是中国地质年龄最年轻的火山岛,因其独特的地势特征及民俗风情,有着非常高的旅游价值和地位^[14]。但涠洲岛也是北部湾藻华事件的“热点”区域,1985—2017年,北部湾发生的 39 次藻华中,涠洲岛占了 15 次(38.5%)^[9]。藻华可能破坏海洋渔业资源和海洋生态环境,带来严重的经济损失,考虑到红色赤潮藻是世界分布种,中国沿海多个海域包括北部湾都曾发生过由该藻引起的赤潮事件,有必要弄清分离自涠洲岛形态疑似红色赤潮藻的种类。作者对涠洲岛海

域非赤潮期间的 6 株疑似红色赤潮藻种应用 SSU rDNA、LSU rDNA、ITS 特征序列进行分子鉴定,结果可为今后北部湾及涠洲岛赤潮和海洋环境安全研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 藻种来源

2019 年 6 月非赤潮期间,在广西涠洲岛周围 S1~S8 站位采集海水(图 1),具体样品采集、贮存、运输参照《海洋监测规范》(GB17378.1—2007)^[15]。样品带回实验室,在倒置显微镜(TS100-Nikon)下,根据文献报道的红色赤潮藻典型形态特征^[16]:细胞长 $55 \mu\text{m}$ ~ $77 \mu\text{m}$ 、宽 $40 \mu\text{m}$ ~ $50 \mu\text{m}$ 、上锥部钟状、下锥部具两只底角、具横沟和纵沟、纵沟未伸入上锥部、细胞核位于细胞中间。用毛细管分离法从水样中挑选疑似红色赤潮藻藻株洗涤分离并培养,培养条件为减富 K 培养基^[17]、 22°C 、光强 $150 \mu\text{E}/(\text{m}^2/\text{s})$ 、光暗比 12 h : 12 h。本研究共在 S2 和 S7 站位分离获得 6 株疑似红色赤潮藻纯培养株,编号为 S2-2019-Ak-1、S2-2019-Ak-2、S2-2019-Ak-3、S2-2019-Ak-4、S7-2019-Ak-1、S7-2019-Ak-2。

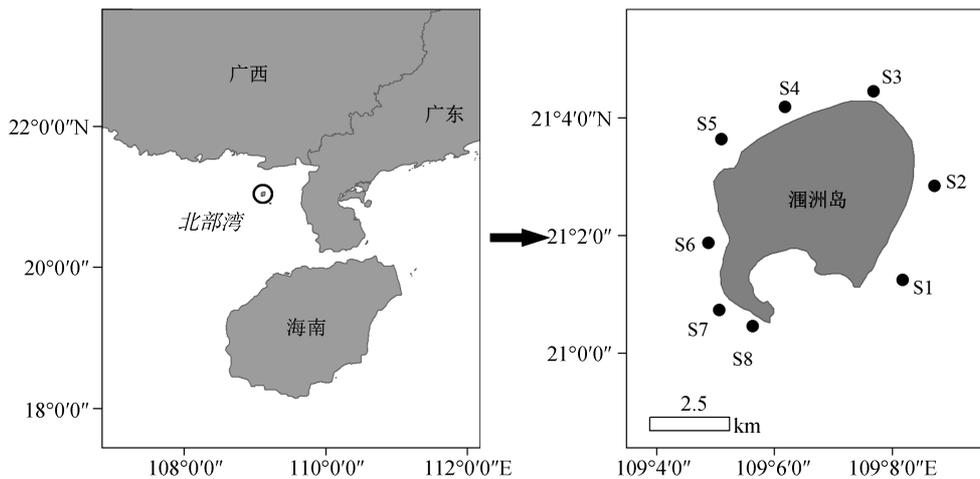


图 1 采集地点
Fig. 1 Sampling sites

1.2 藻体形态观察

取指数生长期的疑似红色赤潮藻细胞藻液。(1)因红色赤潮藻为裸甲藻中的一种,易变形,不适合固定后观察,故直接吸取适量藻液在载玻片上,光学显微镜(TS100, Nikon)下观察活体藻细胞并用拍照软件拍照(NIS-Elements D 4.50.00);(2)吸取适量藻液在

载玻片上,并加入适量的 SYBR Green1 荧光染料(上海源叶生物科技有限公司)对细胞核染色,在荧光显微镜(NI-SS, Nikon)下观察并拍照。

1.3 DNA 的提取和扩增

取指数生长期藻液, $7\ 000 \text{ g}/\text{min}$ 离心 1 min, 倒掉上清液, 运用杭州博日 BioFastSpin 植物基因组 DNA 提

取试剂盒对红色赤潮藻提取 DNA, 以提取的总 DNA 为模板进行 SSU rDNA、LSU rDNA、ITS 特征片段 PCR 扩增, 具体引物序列见表 1, 其中 ITS 为简并引物。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 然后 94℃ 变性 30 s, 56℃

退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物送到北京擎科新业生物技术有限公司测序, 共获得 6 条 SSU rDNA、6 条 LSU rDNA、6 条 ITS 序列, 所有序列均已提交至 GenBank(表 2)。

表 1 引物序列信息

Tab. 1 Primer sequence information

序列	引物名称	引物序列	参考文献
SSU rDNA	18PI	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	[18]
	18PIIR	5'-TGATCCTTCYGCAGGTTAC-3'	
LSU rDNA	D1R	5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3'	[19]
	D2C	5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA-3'	
ITS	A	5'-CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGG(ACT)TCCGTAGGT-3'	[20]
	B	5'-CCTGCAGTCGACA(TG)ATGCTTAA(AG)TTCAGC(AG)GG-3'	

注: ITS 括号内碱基表示简并碱基

表 2 红色赤潮藻 SSU rDNA、LSU rDNA 和 ITS 基因序列

Tab. 2 SSU rDNA, LSU rDNA and ITS sequences of *Akashiwo sanguinea*

基因序列	藻	株系	来源地	登录号
SSU rDNA	红色赤潮藻	CCMP1593	美国纳拉干西特湾	DQ779987
	红色赤潮藻	CCMP1837	美国哈灵顿海峡	DQ779988
	红色赤潮藻	CCMP13215	美国大南湾	AY831412
	红色赤潮藻	GnSg02_5	韩国长木	AY831410
	红色赤潮藻	GnSg03_5	韩国长木	AY831411
	红色赤潮藻	GSW0207	韩国安山	AY421770
	红色赤潮藻	Gsakor11	韩国安山	AY421771
	红色赤潮藻	MBIC11145	日本	AB183672
	红色赤潮藻		日本	AB232670
	红色赤潮藻		中国烟台	KP976596
	红色赤潮藻		中国烟台	MF726966
	红色赤潮藻		挪威	AJ415513
	红色赤潮藻		美国切萨皮克海湾	AF276818
	红色赤潮藻	ASNP6	美国长岛海峡	KJ728857
	红色赤潮藻	CCMP1740	美国	EF492486
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-1	中国涠洲岛	MN633286
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-2	中国涠洲岛	MN633287
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-3	中国涠洲岛	MN633288
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-4	中国涠洲岛	MN633289
	<i>Akashiwo</i> sp.	S7-2019-Ak-1	中国涠洲岛	MN633290
<i>Akashiwo</i> sp.	S7-2019-Ak-2	中国涠洲岛	MN633291	

续表

基因序列	藻	株系	来源地	登录号
LSU rDNA	红色赤潮藻	CCMP1593	美国纳拉干西特湾	DQ779987
	红色赤潮藻	CCMP1837	美国哈灵顿海峡	DQ779988
	红色赤潮藻	CCMP13215	美国大南湾	AY831412
	红色赤潮藻	GnSg02_5	韩国长木	AY831410
	红色赤潮藻	GnSg03_5	韩国长木	AY831411
	红色赤潮藻	ASNP2	美国长岛海峡	KF533111
	红色赤潮藻	ASNP5	美国长岛海峡	KF533112
	红色赤潮藻	ASNP6	美国长岛海峡	KF533113
	红色赤潮藻	GT6	新加坡	DQ156229
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-1	中国涠洲岛	MN633299
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-2	中国涠洲岛	MN633300
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-3	中国涠洲岛	MN633301
	<i>Akashiwo</i> sp.	S2-2019-Ak-4	中国涠洲岛	MN633302
	<i>Akashiwo</i> sp.	S7-2019-Ak-1	中国涠洲岛	MN633303
	<i>Akashiwo</i> sp.	S7-2019-Ak-2	中国涠洲岛	MN633304
	ITS	红色赤潮藻	CCMP1593	美国纳拉干西特湾
红色赤潮藻		CCMP1837	美国哈灵顿海峡	DQ779988
红色赤潮藻		CCMP13215	美国大南湾	AY831412
红色赤潮藻		GnSg02_5	韩国长木	AY831410
红色赤潮藻		GnSg03_5	韩国长木	AY831411
红色赤潮藻		GSXM02	中国厦门港	MF182632
红色赤潮藻		ASXM01	中国厦门港	MF182631
红色赤潮藻		AC215	法国巴斯诺曼底	FJ823503
红色赤潮藻		ITS-AS	中国珠江	KF435122
<i>Akashiwo</i> sp.		S2-2019-Ak-1	中国涠洲岛	MN633429
<i>Akashiwo</i> sp.		S2-2019-Ak-2	中国涠洲岛	MN633430
<i>Akashiwo</i> sp.		S2-2019-Ak-3	中国涠洲岛	MN633431
<i>Akashiwo</i> sp.		S2-2019-Ak-4	中国涠洲岛	MN633432
<i>Akashiwo</i> sp.		S7-2019-Ak-1	中国涠洲岛	MN633433
<i>Akashiwo</i> sp.		S7-2019-Ak-2	中国涠洲岛	MN633434

1.4 数据分析

将获得的 6 株疑似红色赤潮藻 LSU rDNA、SSU rDNA、ITS 基因序列与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 的 GenBank 数据库进行 BLAST 同源性分析, 下载同源性较高的序列作为参考序列, 其中藻株 CCMP1593、CCMP1837、CCMP13215、GnSg02_5、GnSg03_5 同时具有上述 3 种序列(表 2)。应用软件 MEGA7 中的最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构

建系统发育树并计算序列间遗传距离。ML 分析时采用启发式搜索(heuristic), 建树进行 1 000 次随机重复取样, 通过自展分析检验分支置信度, 抽样自展值>90% 时为极显著, 70%~90%为较显著, <70%为不显著。

2 结果

2.1 藻体形态特征

光学显微镜下观察到涠洲岛疑似红色赤潮藻株

营单细胞游泳生活, 游动时像落叶一样飘旋。藻细胞长 $69 \pm 4.2 \mu\text{m}$ 、宽 $54 \pm 5.7 \mu\text{m}$ ($n=40$); 细胞中央处最宽, 具横沟和纵沟, 横沟较窄分布在中央, 把细胞分为上锥部和下锥部两部分, 上下锥部长度近似, 纵沟未侵入上锥部; 上锥部呈钟状, 下锥部含有

两个底角, 分为两叶呈 W 形; 光学显微镜下隐约可见位于细胞中央的细胞核(浅色区)(图 2A)。细胞荧光染色后, 位于细胞中央的圆形细胞核清晰可见(图 2B)。上述特征与文献中描述的红色赤潮藻形态特征相符^[16]。

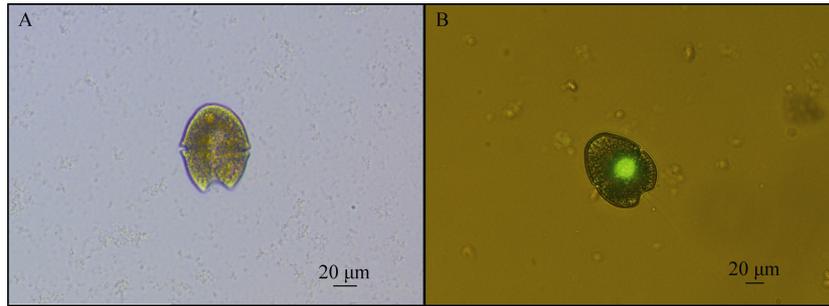


图 2 北部湾涠洲岛疑似红色赤潮藻 S2-Ak-2019-1 的光学显微镜图(A)和荧光显微镜图(B)

Fig. 2 Light microscopy (A) and fluorescence microscopy images (B) of putative *A. sanguinea* from Weizhou Island, Beibu Gulf

2.2 PCR 扩增与测序

以藻株 S2-2019-Ak-1、S2-2019-Ak-2、S2-2019-Ak-3、S2-2019-Ak-4、S7-2019-Ak-1、S7-2019-Ak-2 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得 SSU rDNA、LSU rDNA、ITS 序列电泳图(图 3), 3 种序列的电泳图均出现 1 条

明亮条带, 表明 PCR 扩增正常, 测序所得序列长度分别约为 1.7 kb、1.3 kb 和 700 bp。

2.3 系统发育树分析

以球形棕囊藻为外类群, 构建 SSU rDNA、LSU rDNA 和 ITS 序列系统发育树, 发现北部湾涠洲岛 6 株

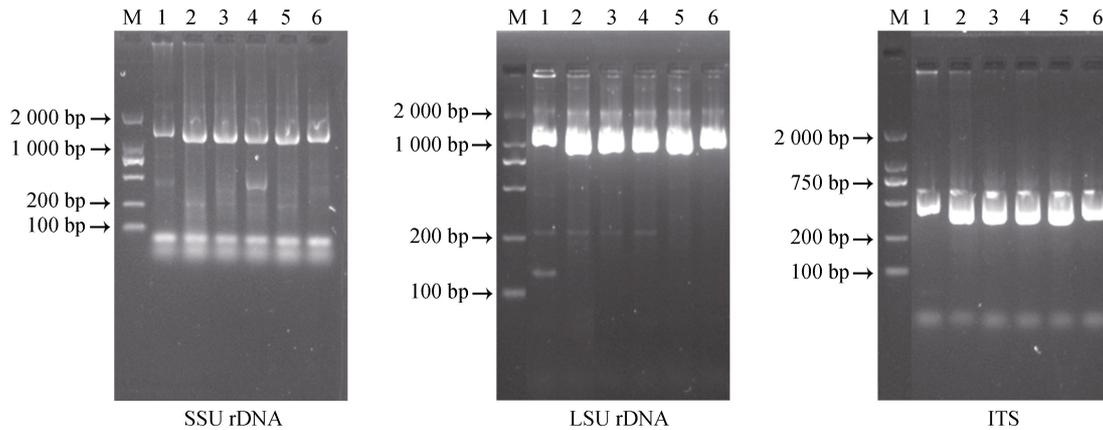


图 3 疑似红色赤潮藻 SSU rDNA、LSU rDNA、ITS 序列电泳图

Fig. 3 Electrophoresis map of LSU rDNA, SSU rDNA and ITS sequences of putative *Akashiwo sanguinea*
M. Marker DL2000, 1-6. S2-2019-Ak-1、S2-2019-Ak-2、S2-2019-Ak-3、S2-2019-Ak-4、S7-2019-Ak-1、S7-2019-Ak-2

疑似红色赤潮藻与世界不同海域的红色赤潮藻聚成一大分支, 自展值分别为 99、100 和 100(图 4—图 6)。上述系统树主要包含 3 个分支: (1) 本文 6 株红色赤潮藻与韩国安山海域的 GSW0207 藻株(SSU)、新加坡 GT6 藻株(LSU)、中国厦门港 GSXM02 藻株(ITS)聚在一起, 同源性较高, 自展支持值分别为 93、99、84; (2) 美国海域的红色赤潮藻藻株聚成一小支, 自

展值亦较高, 分别为 99、99、90; (3) 其他亚洲韩国、日本和欧洲挪威、法国等海域的藻株聚成一小支, 自展值为 79、92、99(图 4—图 6)。裸甲藻科内, 与红色赤潮藻亲缘关系最近的藻属是环沟藻属(*Gyrodinium*), 其次是裸甲藻属(*Gymnodinium*)和凯伦藻属(*Karenia*), 而与旋沟藻属(*Cochlodinium*)的亲缘关系较远(图 4—图 6)。

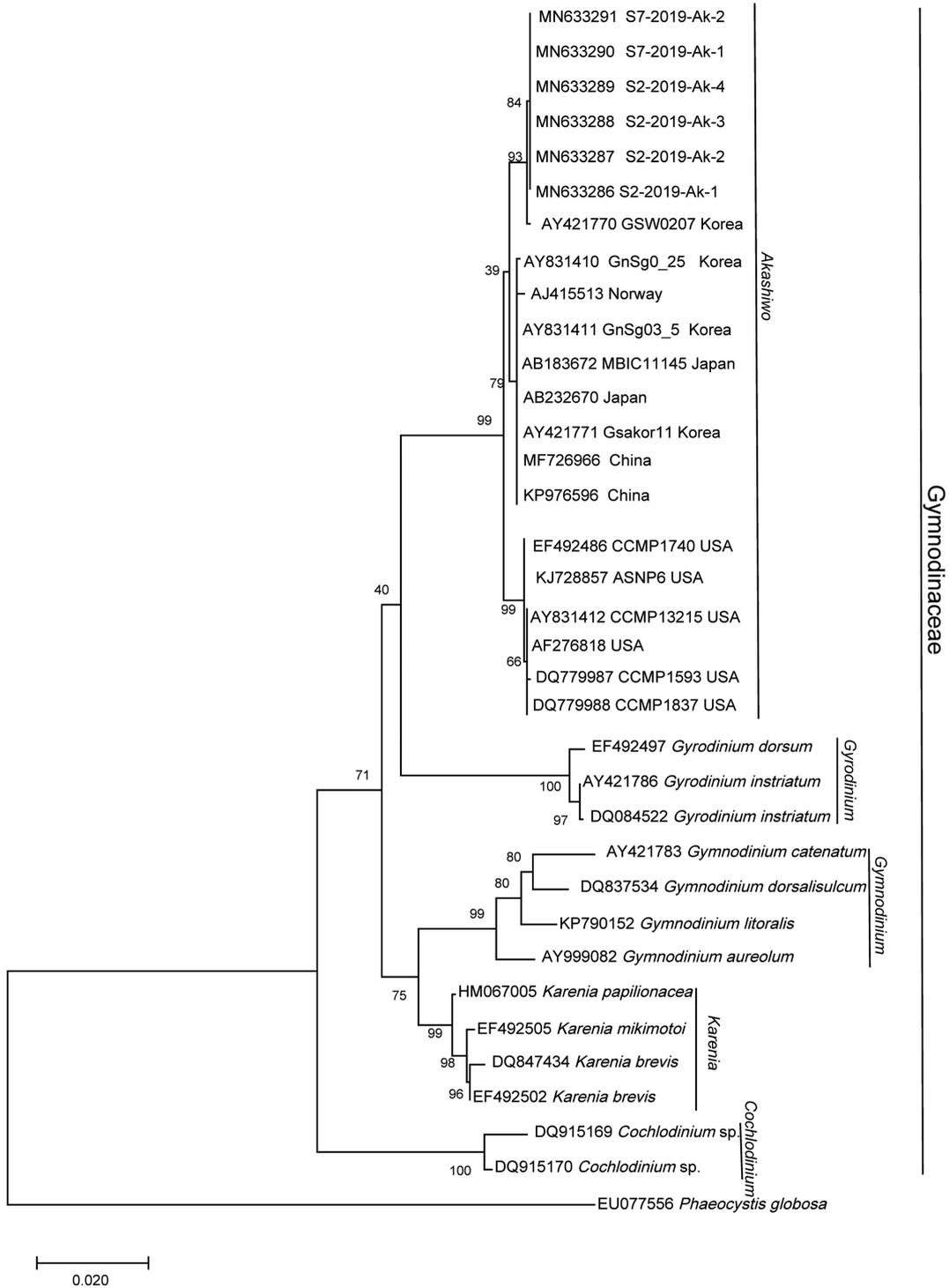


图 4 基于 SSU rDNA 序列构建的疑似红色赤潮藻系统发育树(最大似然法)

Fig. 4 The Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree based on SSU rDNA sequences of putative *Akashiwo sanguine*

遗传距离计算得出, 北部湾涠洲岛六株红色赤潮藻株的 SSU rDNA、LSU rDNA、ITS 序列之间的遗传距离分别为 0.000、0.000、0.001~0.005, 它们与亲缘关系最近的韩国安山红色赤潮藻株 GSW0207(图 4)、新加坡株 GT6(图 5)和中国厦门港

株 GSXM02(图 6)遗传距离分别为 0.001、0.003 和 0.045, 而与世界其他海域的红色赤潮藻 SSU、LSU、ITS 遗传距离则分别为 0.001~0.008、0.003~0.025 和 0.045~0.406。上述 3 个序列的红色赤潮藻种内遗传距离(包括涠洲岛株)为 0.000~0.010、0.000~0.028、

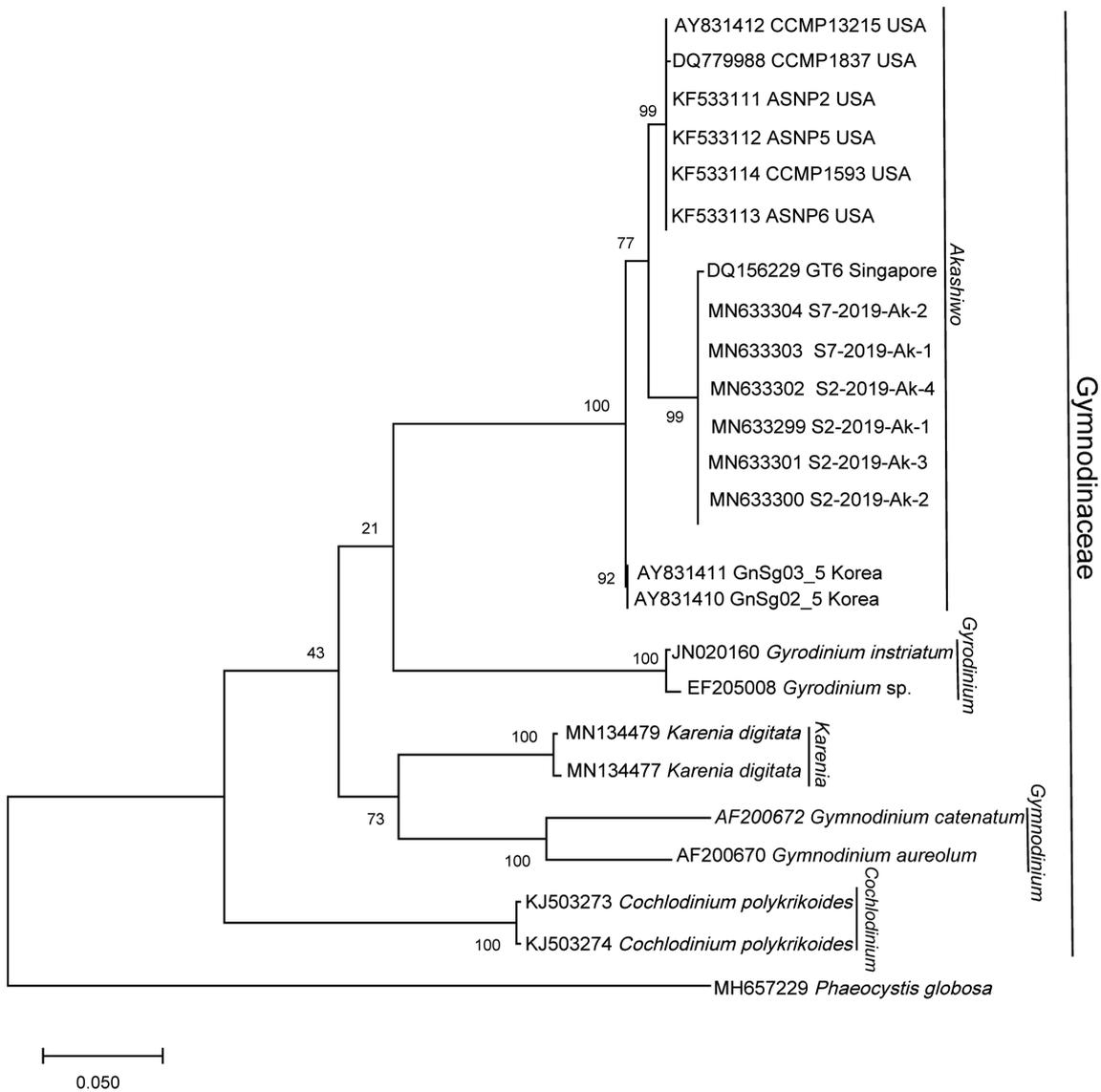


图 5 基于 LSU rDNA 序列构建的疑似红色赤潮藻系统发育树(最大似然法)

Fig. 5 The Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree based on LSU rDNA sequences of putative *Akashiwo sanguine*

0.000~0.406, 明显小于该藻与裸甲藻科下近缘藻属环沟藻属、裸甲藻属、凯伦藻属、旋沟藻属间的 SSU、LSU、ITS 遗传距离 0.032~0.072、0.165~0.222 和 0.589~1.559。因此, 系统发育树和遗传距离结果均确认本文研究的 6 株涠洲岛疑似红色赤潮藻株属于红色赤潮藻。

3 讨论

红色赤潮藻是一种混合营养型甲藻, 目前虽尚无产毒报道, 但大量研究表明该藻爆发的赤潮能使大量浮游植物和水生生物死亡^[21-22], 从而破坏海洋生态系统平衡和水产养殖业发展。北部湾位于中国

南海西北部, 是一个半封闭海湾, 水体交换能力和自净能力差^[23], 一旦发生赤潮, 很可能导致严重海洋灾害。掌握红色赤潮藻客观准确的分子序列特征及该类群的起源和生理特性是防治该藻灾害的关键。本研究对采自北部湾涠洲岛的疑似红色赤潮藻株进行形态学特征和目的基因 SSU rDNA、LSU rDNA 和 ITS 分析, 判定 6 株藻均为红色赤潮藻, 结果将为北部湾海域赤潮藻种的来源与组成, 及赤潮的发生与管理提供基础信息。

总的来说, 源自同一或邻近海域的红色赤潮藻株序列差异小, 亲缘关系较近; 而地理位置相距较远的差异大, 亲缘关系较远。红色赤潮藻北部湾涠洲

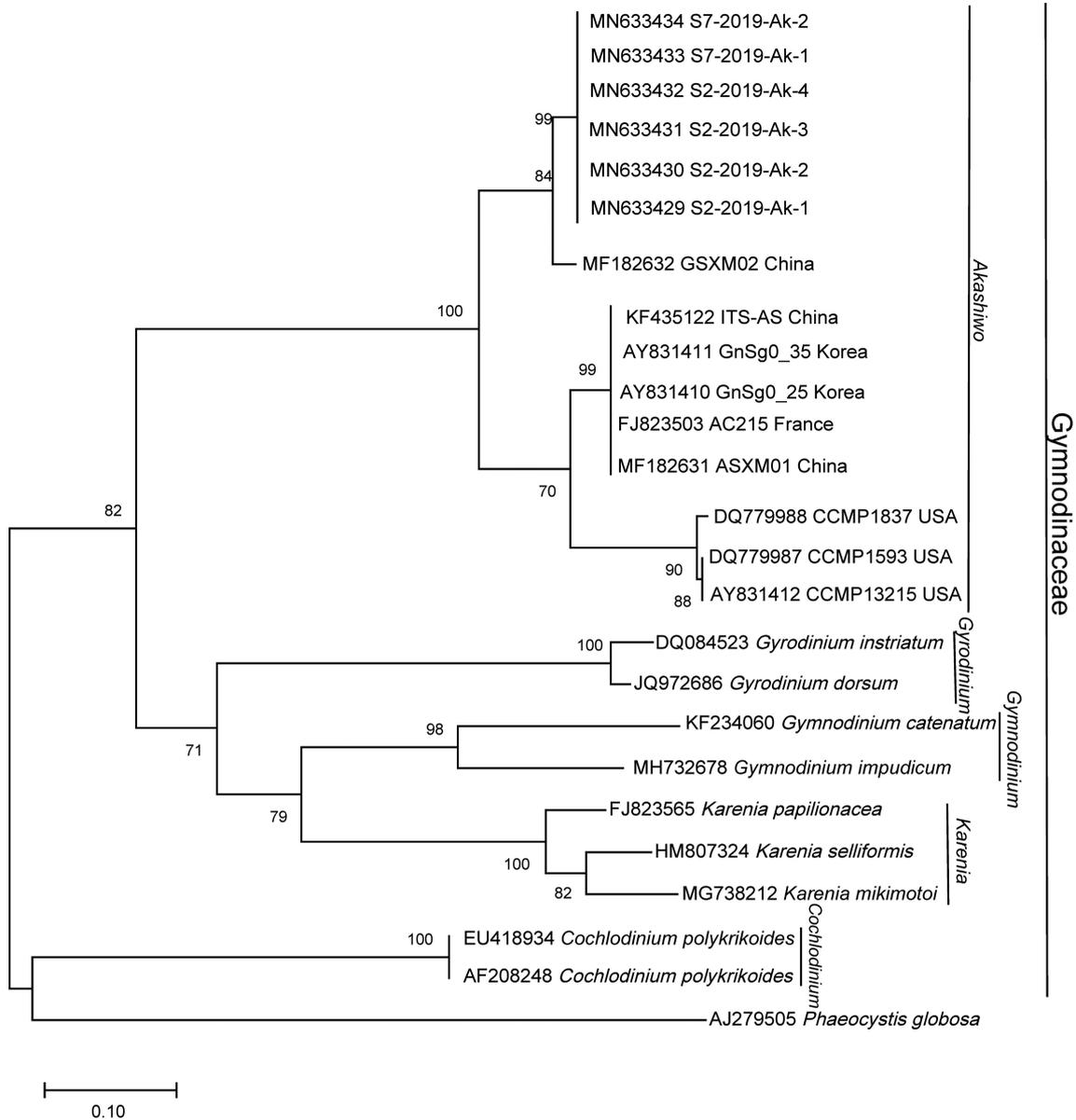


图 6 基于 ITS 序列构建的疑似红色赤潮藻系统发育树(最大似然法)

Fig. 6 The Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree based on ITS sequences of putative *Akashiwo sanguine*

岛株与亚洲海域来源的韩国安山株、新加坡株、中国厦门港株亲缘关系较近，而与地理位置较远的美国切萨皮克海湾、美国哈灵顿海峡、美国纳拉干西特湾株红色赤潮藻亲缘关系较远。但研究也发现北部湾涠洲岛株 LSU rDNA 与韩国长木海域株亲缘关系较远，反而与地理分布较远的美国株亲缘关系更近，类似现象在他人研究中^[24-25]也有报道，这可能反映了红色赤潮藻不同地理株在自然或人为因素影响下的入侵。3 种序列遗传距离中，SSU rDNA 最为保守，而 ITS 序列相对于 SSU rDNA 和 LSU rDNA 序列有更大的碱基突变速率，例如红色赤潮藻北部

湾涠洲岛株与 CCMP1837 藻株 SSU rDNA 和 LSU rDNA 序列核苷酸差异值分别为 0.007 和 0.022，而与 ITS 序列核苷酸差异值为 0.251~0.266。因此，ITS 区域进化速率较快，对鉴定红色赤潮藻不同株的亲缘关系有较好的参考。

本研究发现红色赤潮藻种内遗传距离超过了其他一些微藻，如三角棘原甲藻(*Prorocentrum triestinum*)和纤细原甲藻(*Prorocentrum gracile*)的 SSU rDNA 序列遗传距离为 0.001，与慢原甲藻(*Prorocentrum rhathymum*)的遗传距离为 0.006^[26]，南极棕囊藻(*Phaeocystis antarctica*)与球形棕囊藻 SSU rDNA 遗

传距离为 0.008^[27], 而红色赤潮藻 SSU rDNA 种内遗传距离最大值为 0.010(韩国安山 GSW0207 株与美国纳拉干西特湾 CCMP1593 株), 本文 6 株红色赤潮藻与美国哈灵顿海峡株 CCMP1837、美国纳拉干西特湾株 CCMP1593 的 SSU rDNA 遗传距离也达到了 0.008。类似地, 本文红色赤潮藻 LSU rDNA 种内遗传距离最大值 0.028, 大于链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)与塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)的 LSU rDNA 序列遗传距离 0.005^[28], ITS 遗传距离 0.000~0.406 与陈月琴^[29] 等得出的微藻类 ITS 序列核苷酸种间差异应大于 0.2 也不一致。结合图 4—图 6 的系统进化树拓扑结构, 红色赤潮藻种下仍具有 3 个分支, 分支具有较好的自举值 79~99 支持, 且同一地理相近的藻株更易聚成一支, 说明在分子生物学鉴定上, 红色赤潮藻各个株的遗传差异较大, 赤潮藻属红色赤潮藻存在进一步定义不同种的可能, 但不同分支的红色赤潮藻究竟是否有可能划分为不同种, 还需要开展更深入的研究, 尤其需要形态学等表观特征的验证。

4 结论

作者对在北部湾涠洲岛采集到的 6 株疑似红色赤潮藻株进行了种类鉴定, 光学显微镜和荧光显微镜观察其与赤潮藻属下的种类红色赤潮藻相一致。应用 SSU rDNA、LSU rDNA 和 ITS 基因序列构建系统发育树, 确定北部湾涠洲岛 6 株藻均为红色赤潮藻。它们与来源于亚洲海域的韩国安山株、新加坡株、中国厦门港株序列差异小, 亲缘关系较近相近, 而与地理位置相距较远的红色赤潮藻株序列差异大, 亲缘关系较远。

致谢: 感谢西班牙藻类学家 Santiago Fraga 对本文讨论部分的建议。

参考文献:

- [1] Matsubara T, Nagasoe S, Yamasaki Y, et al. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 342(2): 226-230.
- [2] 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.
- [3] Yang C, Li Y, Zhou B, et al. Illumina sequencing-based analysis of free-living bacterial community dynamics during an *Akashiwo sanguinea* bloom in Xiamen sea, China[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8476.
- [4] Lebour M V. The dinoflagellates of the northern seas[M]. United Kingdom: Marine Biological Association of the United Kingdom, 1925: 20-66.
- [5] 吴玉霖, 周成旭, 张永山, 等. 烟台四十里湾海域红色裸甲藻赤潮发展过程及其成因[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(2): 159-167.
Wu Yulin, Zhou Chengxu, Zhang Yongshan, et al. Evolution and causes of formation of *Gymnodinium Sanguineum* bloom in Yantai Sishili Bay[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(2): 159-167.
- [6] 冷科明, 陈波, 廖敏, 等. 深圳海域引发赤潮生物种类的演变及其原因浅析[J]. *海洋环境科学*, 2004, 23(3): 55-57.
Leng Keming, Chen Bo, Liao Min, et al. Succession trend of red tide causative organisms in Shenzhen Coastal waters[J]. *Marine Environmental Science*, 2004, 23(3): 55-57.
- [7] 王金辉, 秦玉涛, 李志恩, 等. 南麂列岛自然保护区海域红色裸甲藻赤潮及其成因分析[J]. *海洋科学*, 2005, 29(2): 32-36.
Wang Jinhui, Qin Yutao, Li Zhien, et al. The environmental factor and cause of *Gymnodinium sanguineum* HAB in Nanji Islands Preserved District[J]. *Marine Sciences*, 2005, 29(2): 32-36.
- [8] 罗金福, 李天深, 蓝文陆. 北部湾海域赤潮演变趋势及防控思路[J]. *环境保护*, 2016, 44(20): 40-42.
Luo Jinfu, Li Tianshen, Lan Wenlu. Evolution trend and prevention strategy of algae bloom in the Beibu Gulf[J]. *Environmental Protection*, 2016, 44(20): 40-42.
- [9] Xu Y X, Zhang T, Zhou J. Historical occurrence of algal blooms in the northern Beibu Gulf of China and implications for future trends[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 451.
- [10] 广西壮族自治区海洋局. 2016 年广西壮族自治区海洋环境质量公报[EB/OL]. [2017-06-26]. http://www.fcgs.gov.cn/hyj/zwgk/201706/t20170627_42799.html.
Ocean Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region. Guangxi Zhuang Autonomous Region Marine Environment Quality Bulletin in 2016[EB/OL]. [2017-06-26]. http://www.fcgs.gov.cn/hyj/zwgk/201706/t20170627_42799.html.
- [11] 防城港市海洋局. 2016 年防城港市海洋环境质量公报[EB/OL]. [2017-09-11]. http://www.fcgs.gov.cn/hyj/zwgk/201709/t20170911_45391.html.
Fangchenggang Marine Bureau. Fangchenggang Marine Environment Quality Bulletin in 2016[EB/OL]. [2017-09-11]. http://www.fcgs.gov.cn/hyj/zwgk/201709/t20170911_45391.html.

- 11_45391.html.
- [12] Kim S H, Kim K Y, Kim C H, et al. Phylogenetic analysis of harmful algal bloom (HAB)-causing dinoflagellates along the Korean coasts, based on SSU rRNA gene[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 14(5): 959-966.
- [13] Shao P, Chen Y Q, Zhou H, et al. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis[J]. *Marine Biology*, 2004, 144(2): 215-224.
- [14] 刘国强, 史海燕, 魏春雷, 等. 广西涠洲岛海域浮游植物和赤潮生物种类组成的初步研究[J]. *海洋通报*, 2008, 27(3): 43-48.
Liu Guoqiang, Shi Haiyan, Wei Chunlei, et al. Preliminary studies on phytoplankton and red tide organism composition in the coastal water of the Weizhou Island, Guangxi[J]. *Marine Science Bulletin*, 2008, 27(3): 43-48.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB17378.1—2007 海洋监测规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB17378.1-2007[S]. Beijing: China Standards Press, 2008.
- [16] 郭皓. 中国近海赤潮生物图谱[M]. 北京: 海洋出版社, 2004: 69-70.
Guo Hao. Illustrations of planktons responsible for the blooms in Chinese coastal waters[M]. Beijing: China Ocean Press, 2004: 69-70.
- [17] Morton S L, Norris D R. The role of temperature, salinity, and light on the seasonality of *Prorocentrum lima*[C]// Graneli E. Toxic marine phytoplankton. New York: Elsevier, 1990: 201-205.
- [18] Li L Y, Lin D, Chen J H, et al. Diversity and distribution of planktonic protists in the northern South China Sea[J]. *Journal of Plankton Research*, 2011, 33(3): 445-456.
- [19] Scholin C A, Herzog M, Sogin M, et al. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene[J]. *Journal of Phycology*, 1994, 30(6): 999-1011.
- [20] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8s regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 1994, 30(5): 857-863.
- [21] Xu N, Wang M, Tang Y, et al. Acute toxicity of the cosmopolitan bloom-forming dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* to finfish, shellfish, and zooplankton[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2017, 80(3): 209-222.
- [22] Tang Y Z, Gobler C J. Sexual resting cyst production by the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*: a potential mechanism contributing to the ubiquitous distribution of a harmful alga[J]. *Journal of Phycology*, 2015, 51(2): 298-309.
- [23] 孙才志, 张坤领, 邹玮, 等. 中国沿海地区人海关系地域系统评价及协同演化研究[J]. *地理研究*, 2015, 34(10): 1824-1838.
Sun Caizhi, Zhang Kunling, Zou Wei, et al. Study on regional system of man-sea relationship and its synergistic development in the coastal regions of China[J]. *Geographical Research*, 2015, 34(10): 1824-1838.
- [24] 胡晓坤, 张清春, 陈振帆, 等. 北部湾海域球形棕囊藻遗传多样性分析[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 601-610.
Hu Xiaokun, Zhang Qingchun, Chen Zhenfan, et al. Genetic diversity of *Phaeocystis globosa* strains isolated from the Beibu Gulf, the South China Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(3): 601-610.
- [25] Luo Z, Yang W, Leaw C P, et al. Cryptic diversity within the harmful dinoflagellate *Akashiwo sanguinea* in coastal Chinese waters is related to differentiated ecological niches[J]. *Harmful Algae*, 2017, 66: 88-96.
- [26] 龙超, 陈宪云, 陈波, 等. 北部湾三角棘原甲藻(甲藻门原甲藻目)的形态观察和 18S rDNA 序列分析[J]. *热带海洋学报*, 2014, 33(2): 66-71.
Long Chao, Chen Xianyun, Chen Bo, et al. Morphological and phylogenetic analysis of *Prorocentrum triestinum* isolated from the Beibu Gulf[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2014, 33(2): 66-71.
- [27] 覃仙玲, 赖俊翔, 陈波, 等. 棕囊藻北部湾株的 18S rDNA 分子鉴定[J]. *热带亚热带植物学报*, 2016, 24(2): 176-181.
Qin Xianling, Lai Junxiang, Chen Bo, et al. Molecular identification of *Phaeocystis* from Beibu Gulf based on 18S rDNA sequences[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2016, 24(2): 176-181.
- [28] 王朝晖, 马长江, 许忠能. 中国东南沿海四株亚历山大藻的系统发育研究[J]. *海洋环境科学*, 2015, 34(1): 1-5.
Wang Zhaohui, Ma Changjiang, Xu Zhongneng. Phylogenetic relationship of four *Alexandrium tamarense/catenella* isolates from southeast Chinese coastal waters using rDNA sequences[J]. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(1): 1-5.
- [29] 陈月琴, 屈良鹄. 海洋亚历山大藻属种间界定的分子标准[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(1): 9-13.
Chen Yueqin, Qu Lianghu. Molecular criteria for the delimitation of *Alexandrium* species based on the analyses of rDNA ITS[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1999, 38(1): 9-13.

Molecular identification of *Akashiwo sanguinea* in Weizhou Island, Beibu Gulf

XU Yi-xiao^{1, 2}, HE Xi-lin^{1, 2}, ZHANG Teng^{1, 2}, ZHAO Zhi-juan³, WEI Guang-ling^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Environment Change and Resources Use in Beibu Gulf, Ministry of Education, Nanning Normal University, Nanning 530001, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Earth Surface Processes and Intelligent Simulation, Nanning Normal university, Nanning 530001, China; 3. School of Environmental and Life Sciences, Nanning Normal university, Nanning 530001, China)

Received: Nov. 6, 2019

Key words: *Akashiwo sanguinea*; molecular identification; phylogenetic tree; genetic distance; Beibu Gulf

Abstract: To identify six putative *Akashiwo sanguinea* strains from the vicinity of Weizhou Island, Beibu Gulf, light microscope and fluorescence microscope observations were used to define morphological characteristics, and the genes SSU rDNA, LSU rDNA, and ITS were sequenced to construct phylogenetic trees using the maximum probability method. The results showed that certain strains morphology was consistent with *Akashiwo sanguinea*. Besides, all six strains were clustered on the same branch with *Akashiwo sanguinea*, in the phylogenetic trees based on the SSU rDNA, LSU rDNA, and ITS genes, supported by bootstrap values of 99, 100, and 100, respectively. The minimum genetic distance was between Weizhou Island's six *Akashiwo sanguinea* varieties, and Anshan (Korea), Singapore, and Xiamen harbor. The genetic distances of SSU, LSU, and ITS sequences within *Akashiwo sanguinea* were 0.001–0.008, 0.003–0.025, and 0.045–0.406, respectively, which is significantly smaller than the genetic distances between *Akashiwo sanguinea* and other Gymnodiniaceae species (0.032–0.072, 0.165–0.222, and 0.589–1.559). As a result, *Akashiwo sanguinea* six putative strains at Weizhou Island, Beibu Gulf are all *Akashiwo sanguineas*. This taxonomic and systematic information on causative species in the Weizhou Island and Beibu Gulf region of Guangxi for harmful algal blooms is important in the management of HABS in that region.

(本文编辑: 谭雪静)