

中国沿海亚历山大藻 (*Alexandrium*) 核糖体 rDNA 部分序列分析及该藻属分子系统进化研究^{*}

唐祥海 于仁成¹⁾ 颜 天 王云峰 周名江

(中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071;
中国科学院研究生院 北京 100039)

(中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

摘要 分析了几株自南海及东海分离的亚历山大藻的 rDNA 部分序列信息,其中包括核糖体大亚基 (LSU) rDNA 的 5'端 D1-D2 区序列,以及 5.8S rDNA 和 ITS 区序列;同时也对实验室保种的部分来自其它国家和地区的亚历山大藻相关序列进行了测序和分析,并以此作为序列分析中的参考。采用 Clustal X 及 MEGA2 软件对所得到的序列信息进行了综合分析对比。结果表明,分离自南海的塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 和分离自东海的链状亚历山大藻 (*A. catenella*),即便是在 ITS 区和 LSU rDNA 等高变区,其序列信息也完全一致。与基因库中搜索到的其它亚历山大藻 rDNA 序列信息相比较,中国沿海的塔玛/链状亚历山大藻序列更接近于塔玛复合种的“亚洲温带”基因型。对于分离自南海的另外两株未定种的亚历山大藻,通过对比序列信息,发现它们与相关亚历山大藻 (*A. affine*) 非常接近。分离于我国台湾地区的微小亚历山大藻 (*A. minutum*) 在序列上与分离自新西兰的藻株相似,而与分离自欧洲的微小亚历山大藻藻株相差较大。中国沿海亚历山大藻 rDNA 序列信息的获得为针对有毒藻种设计特异性核酸探针,发展灵敏快速的生物检测技术奠定了基础。

关键词 赤潮, 亚历山大藻, rDNA, 序列分析, 分子系统进化

中图分类号 X55

近 20 年来,有害赤潮发生的频率和规模有逐渐增加的趋势,已经成为全球性的海洋环境问题 (Hallegraeff 1993, 周名江等, 2001)。在形成有害赤潮的藻种中,亚历山大藻属的藻种非常常见。目前已知的亚历山大藻有 20 多种,其中部分藻种能够产生麻痹性贝毒毒素,对人类健康、水产养殖和自然生态构成了严重的威胁。对亚历山大藻的研究也已成为当前有害赤潮研究中的热点。

尽管目前已对亚历山大藻进行了大量的研究工作,但对其分类和识别仍具有一定的难度。如用于区分塔玛复合种 (*tamarense* species complex) *Alexandrium tamarense*, *A. fundyense* 和 *A. catenella*

的形态学标准,长期以来一直存有争议。现在用于区分这些藻种的分类依据仍然依靠一系列非常细致的形态学指标,如细胞的形状、顶孔板的形状、第一顶板上是否存在腹孔及后连接孔的位置等。然而,人们在东北太平洋沿岸海域发现的形态上介于 *A. tamarense* 和 *A. catenella* 之间的“中间形体”,以及环境条件和生长阶段可能影响这些形态学指标的报道 (Cambella et al. 1986),在一定程度上降低了这些形态学分类指标的可靠性。许多实验室曾经尝试通过一些生物化学指标来分析各藻种之间的亲缘关系,结果不尽相同。这主要是由于生物化学指标通常也是多基因协同表达的结

^{*} 国家 863 青年基金项目资助, 2002AA639420 号; 国家重点基础研究项目资助, 2001CB409704 号; 中国科学院海洋研究所知识创新项目资助, 200223107 号。唐祥海, 硕士, E-mail tangxiangha@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者: 于仁成, 博士, 研究员, E-mail rcyu@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2005-09-07, 收修改稿日期: 2006-03-22

果,仍有可能受到环境条件或生长阶段的影响。

近年来,随着分子生物学技术的发展和普及,人们希望借助于特定的基因序列信息,分析种属间或不同地理株之间的遗传关系,并建立相应的分子标记。由于 rDNA 序列已被广泛应用于生物系统发育和分类学研究,而且它含有许多保守性不同的区域,可以应用于不同的分类学水平,因此,有关亚历山大藻种系进化的研究主要基于对 rDNA 序列的分析。在这一方面, Scholin 等 (1994)和 Adachi等 (1996)曾进行了比较系统的研究工作,探讨了部分亚历山大藻的种系进化关系。

在我国沿海,高密度的亚历山大藻藻华也时有发生。部分文献报道了分离自中国沿海的亚历山大藻藻株的毒素产生情况 (Yu et al 1998 Wang et al 2005),在中国沿海的贝类中也发现了麻痹性贝毒毒素的污染 (Zhou et al 1999)。虽然,针对海洋微藻的相关研究已有开展 (张宝玉等, 2004),但是,对中国沿海亚历山大藻在种系进化上的关系研究还开展得很少 (陈月琴等, 1999)。本研究中作者针对分离自中国沿海的亚历山大藻,希望通过对其 rDNA 的序列测定,了解

其种系进化关系,并为针对有毒亚历山大藻设计特异性的核酸探针提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验藻株及培养条件

本实验中所用的藻株及其来源如表 1所示。其中分离自中国沿海的 8株亚历山大藻有 7株来自南海、1株来自东海。此外,对实验室保种的来自其它国家和地区的 *A. tumarense* (AT-6藻株, Anderson教授提供)、*A. minutum* (分离自台湾地区)及 *A. lusitanicum* (来自 CCMP, Culture Center of Marine Phytoplankton)也进行了测序和分析,作为序列分析中的参考。

所用藻种在中国科学院海洋所海洋生态与环境科学重点实验室内保种培养。培养液采用 *f/2*营养盐配方,但不添加 Na_2SO_3 。培养用海水系取自青岛汇泉湾附近的自然海水,经过海洋所水族楼匹配的海水处理系统过滤和消毒, pH 值为 7.9 ± 0.1 ,盐度为 30 ± 1 。进入实验室后首先以 $0.45\mu\text{m}$ 混合纤维滤膜过滤,并在 120°C 下高压湿热灭菌 20min 室温冷却后添加营养盐备用。实验藻类培养温度为 $(21 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光照为 $54\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (4000 lx),光暗比 (L:D)为 14h:10h。

表 1 实验中采用的亚历山大藻及所测序列的数据库 (GenBank)入口号
Tab. 1 *Alexandrium* species and strains used in the experiment and the GenBank accession numbers for their nucleotide sequences

种 名	株系	分离地	5.8S rDNA 及 ITS区	LSU rDNA D1-D2区
<i>A. tumarense</i>	ATC102	南海	DQ 176659	DQ 176650
<i>A. tumarense</i>	ATC103	南海	DQ 176660	DQ 176651
<i>A. tumarense</i>	AT5-1	南海	DQ 176662	DQ 176648
<i>A. tumarense</i>	AT5-3	南海	DQ 176663	DQ 176649
<i>A. tumarense</i>	ATHK	南海	DQ 176661	DQ 176652
<i>A. catenella</i>	ACDH	东海	DQ 176658	DQ 176647
<i>Alexandrium</i> sp. 1	AS-1	南海	DQ 176664	DQ 176653
<i>Alexandrium</i> sp. 2	AC-1	南海	DQ 176665	DQ 176654
<i>A. tumarense</i>	AT-6	未知	DQ 176666	DQ 176655
<i>A. minutum</i>	AM	台湾地区	DQ 176668	DQ 176657
<i>A. lusitanicum</i>	AL-1	葡萄牙	DQ 176667	DQ 176656

1.2 DNA 制备及 rDNA 靶序列扩增

亚历山大藻 DNA 的制备参照 Scholin 等 (1994)的方法,但对 DNA 的沉淀采用 1/10 体积的 3M 乙酸钠 (pH 4.5)溶液和 2倍体积 -20°C 预冷的无水乙醇,于 -20°C 下沉淀 1h。扩增引物系根据已知的多株亚历山大藻 rDNA 序列 (来自

GenBank),选择两端共同的保守区域,通过 Primer Premier 5.0及 Oligo 6软件设计,并人工校正。设计引物共两对,靶序列分别为 5.8S rDNA 及 ITS (Internal transcribed spacer)区、LSU rDNA D1-D2 两区,引物序列如表 2所示,分别对应于待扩增序列的两端 (图 1, ETS 表示 External transcribed

spacer)。PCR反应体积为 50μl 其中包括 1.5U Taq DNA 聚合酶、引物 (53μmol/L) 各 1μl dNTP (25mmol/L) 各 0.5μl 1×PCR缓冲液、2.5mmol/L MgCl₂。PCR反应程序为: 首先于 95℃变性 5min 然后进行 30个循环的 PCR 反应, 每一循环包括

95℃变性 1min, 53.2/52.3℃ (依引物对而定) 退火 1min, 72℃延伸 1min; 最后于 72℃延伸 10min 反应产物 4℃保温。扩增完成后, 取 5μl 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检查, 其余产物于 -20℃保存。

表 2 亚历山大藻 rDNA 的 PCR 扩增实验中所采用的引物情况

Tab. 2 Primers used in the PCR amplification of rDNA from *Alexandrium* spp.

扩增区域	引物名称	引物序列 (5'→3')	最佳退火温度	产物长度
5.8S rDNA 及 ITS区	Tits(+)	TTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAAC	52.3℃	618bp
	Tits(-)	GGTTTAATTTCCACCACTACTTAT		
LSU rDNA D1-D2区	T28(+)	CCGCTGAATTTAAGCATATAAGTA	53.2℃	694bp
	T28(-)	TTCAAGACGGGTCAAGCAG		

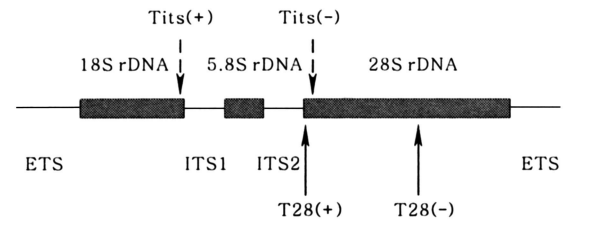


图 1 rDNA 序列及引物对应位置示意图

Fig. 1 Diagram of rDNA and the locations of primers

1.3 PCR 扩增产物的序列测定及分析

PCR 产物由华大基因上海鼎安生物科技有限公司纯化、测序。纯化使用切胶回收方法, 测序使用 ABI-377 DNA 自动测序仪, 序列分析软件为 Sequence Analysis 3.0。

利用 ClustalX 软件将测得的序列信息进行比较, 并选取 GenBank 中保存的其它地区的亚历山大藻 rDNA 序列进行比较分析。以 MEGA 2 软件计算各序列间的遗传距离, 并以 Clustal X 软件中的“bootstrap N-J tree”程序构建亚历山大藻系统发育树。其中自展分析次数设为 1000 以检验所构建树图的稳定性。

2 结果与分析

2.1 rDNA 两个高变区的 PCR 扩增

实验中扩增反应所采用的引物, 是根据已有的亚历山大藻 rDNA 序列, 通过 Primer Premier 5.0 及 Oligo 6 软件设计, 并人工校正。扩增结果表明利用两对引物可以获得专一性较好的扩增产物, 并且具有较高的重复性 (图 2)。

2.2 中国沿海亚历山大藻序列测定结果及遗传距离分析

对分离自中国沿海的 8 株亚历山大藻序列

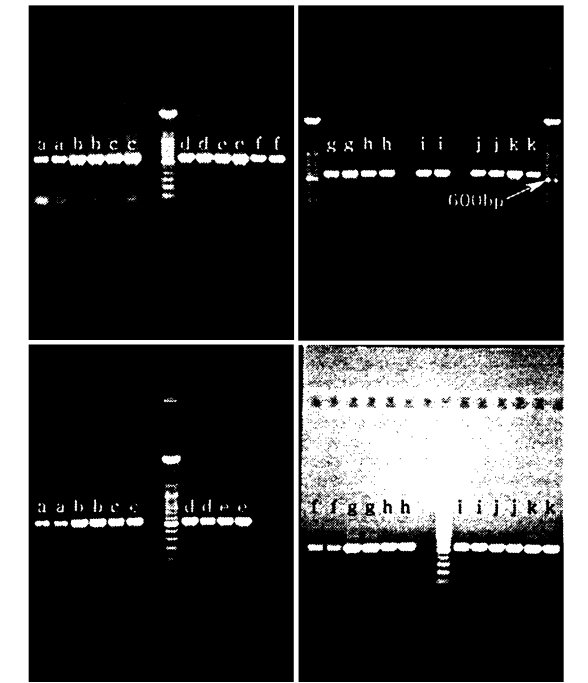


图 2 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pictures of PCR amplification products 上排图: LSU rDNA D1-D2 区; 下排图: 5.8S rDNA 及 ITS 区。a *A. minutum* AM; b *A. tamarense* ATC103; c *A. tamarense* AT5-3; d *A. tamarense* AT5-1; e *A. tamarense* ATHK; f *A. lusitanicum* AL-1; g *A. tamarense* ATC102; h *Alexandrium* sp. 2 AG-1; i *Alexandrium* sp. AS-1; j *A. tamarense* AT-6; k *A. catenella* ACDH

(表 1) 的分析结果显示, 分离自南海海域的 5 株塔玛亚历山大藻和分离自东海海域的 1 株链状亚历山大藻在两个高变区序列完全一致。另外两株分离自南海的藻株 AS-1 及 AG-1 两个高变区的遗传序列也完全相同, 但明显不同于塔玛亚

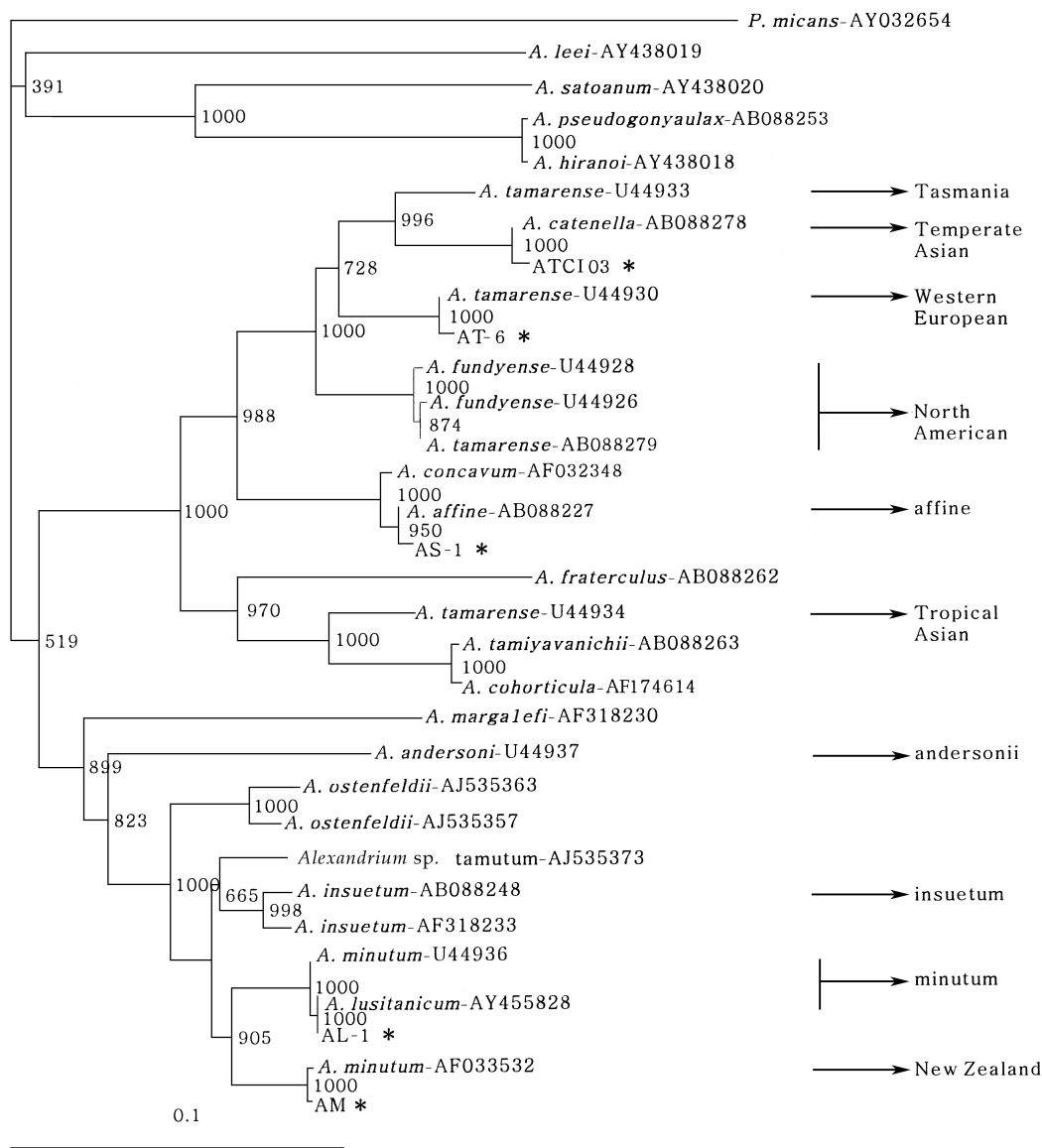


图 4 亚历山大藻属系统发育树 (依据 LSU rDNA 的 5' 端 D1-D2 区序列信息)
Fig 4 Molecular phylogenetic tree of genus *Alexandrium* (based on the sequences of LSU rDNA)
* 表示本次实验所用藻株; → 表示基因型

从图 3 图 4 中可以看到各个藻株在亚历山大藻属系统发育中所处的位置。由于 GenBank 中所收集的亚历山大藻藻株的序列非常有限, 有关 ITS 区的序列更少, 因此, 通过两段序列所建立的系统发育树并不完全一致。但是, 对于遗传距离较近的各个“簇”, 由两个区域分析所得的结果完全一致: ATC102、ATC103、AT5-3、AT5-1、ATHK 及 AC-DH 六株藻均属于塔玛复合种的“亚洲温带”基因型; AS-1 及 AC-1 两株藻属于“affine”基因型。对于实验中分析的其它亚历山大藻藻株, 可以看出藻株 AM 属于微小亚历山大藻“新西兰”基因型;

藻株 AL-1 属于“minutum”基因型; 无毒的 AT-6 藻株属于塔玛复合种的“西欧”基因型。

3 讨论

3.1 核糖体 DNA 用于亚历山大藻分类及种系进化研究的有效性

rDNA 存在于所有的生物细胞中, 并且具有相似的结构和功能, 是可用于所有生物比较分析的分子指标。在 rDNA 的保守区中, 存在着与属、种等相对高级分类阶元有一定对应关系的核苷酸序列; 而在其高变区中, 则有可能存在着与种、亚种甚至地理株等相对应的核苷酸序列。这些特征性

核苷酸序列应当可以作为传统分类学的辅助,对生物进行简便、快速和可靠的鉴定。 rDNA 序列分析的结果既不依赖于生物的生理状态,也不依赖于其它基因的伴随表达,它所测量的是生物基因组的整体变化,因此避免了由于表型趋同和可塑性等造成的问题。

但是,与表型分类依据相似,基于遗传序列的分类依据在与生物“种”的对应性上也同样存在问题。由于 rDNA 在各类生物物种间的变化程度不尽相同,因此不可能以统一的标准进行物种界定。而且,对于亚历山大藻而言,确定生物学“种”本身也非常困难。因为即便在同种之间,这些藻类的有性生殖效率有时也非常低。

本研究中作者采用的两个高变区域 (5.8S rDNA 及 ITS 区、LSU rDNA 的 5'端 D1-D2 区)核苷酸替换速率较高,通常认为这两个区域可以应用于属下种间,甚至于亚种水平的研究。在作者所建立的亚历山大藻属系统发育树中,有的藻种确实验证了这一观点,如同属 *A. minutum* 的藻存在“*m. minutum*”基因型和“新西兰”基因型(假如作者接受 *A. minutum* 和 *A. lusitanicum* 为同种异名)。但是,对于塔玛复合种,这一情况却非常复杂,既有同名的藻种分列于不同基因型的情况,也有完全相同的基因型中包含不同藻种的情况,后者如中国沿海的亚历山大藻。当然,作者并不能完全排除中国沿海亚历山大藻以往定种存在问题的可能性,但这还需要更多的研究和探讨。

3.2 塔玛复合种分子进化的“单源辐射”假说及其散布

在以往针对塔玛复合种的研究中,人们所发现的一个突出问题是:塔玛复合种保守的形态学特征掩盖了它们遗传上的多样性。在塔玛复合种内各不同株系之间遗传上的差异是非常明显的,1994 年 Scholin 的研究曾将该复合种区分为 5 种基因型:“北美”、“西欧”、“亚洲温带”、“塔斯马尼亚”和“亚洲热带”(Scholin *et al.* 1994)。为了解释塔玛复合种的遗传多样性,他提出了复合种分子进化的“单源辐射”假说,认为复合种内的各地理株有一个共同的起源,而不是来自于独立进化的多个源头 (Scholin *et al.* 1995)。但是,由于长期的地理分隔和独立进化,它们虽然具有相似的表型,但在遗传上却产生了差异。所以,这种遗传上的差异实际上反映的是各个具有共同起源但此后发生独立进化的在地理上分隔的种群。

按照“单源辐射”假说,如果没有散布发生,不同基因型的亚历山大藻种群应该被限制在它们各自的地理区域中。这与当前塔玛复合种在全球分布的总趋势是基本一致的:从同一地理区域分离而来的藻株,不管它们形态上是否有差别,它们在遗传上是相似的;而从不同地理区域分离而来的藻株,尽管有时它们在形态上是一样的,但它们在遗传上是不同的。但是,如果有散布发生,亚历山大藻种群的这种分布格局就会被打破,散布种应该携带其源头种群的形态和遗传特征。这一假说可以在一定程度上解释作者所得到的实验结果。但是,与之相伴的就是塔玛复合种的形态学分类依据和遗传学分类依据的割裂。鉴于到目前为止,有关 *A. tamarense fundyense/catenella* 复合种还没有一个标准可以将分子鉴定的结果和公认的形态描述统一起来,因此,建议在今后对塔玛复合种的研究中,应尽量强调“藻株”的名称及其“分离地”。

参 考 文 献

- 张宝玉,王广策,张炎等,2004. 东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM) 的 5.8S rDNA 及其转录间隔区 (ITS) 的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 35(3): 264—272
- 陈月琴,屈良鹤,曾陇梅等,1999. 南海赤潮有毒甲藻链状-塔玛亚历山大藻的分子鉴定. 海洋学报, 21(3): 106—111
- 周名江,朱明远,张经,2001. 中国赤潮的发生趋势和研究进展. 生命科学, 13(2): 54—59
- Adachi M, Sako Y, Ishida Y, 1996. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J Phycol, 32: 424—432
- Cambella A D, Taylor F J R, 1986. Electrophoretic variability within the *Prorocentrum micans/caenella* species complex pyridine linked dehydrogenases. Biochem Syst Ecol, 14: 311—321
- Hallegraeff G M, 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia, 32: 79—99
- Scholin C A, Herzog M, Sogin M *et al.* 1994. 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 Phycol, 30: 999—1011
- Scholin C A, Hallegraeff G M, Anderson D M, 1995. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* species complex

(Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions *Phycologia* 34(6): 472—485

Wang D Z, Jiang T J, Hsieh D P H, 2005. Toxin composition variations in cultures of *Alexandrium* species isolated from the coastal waters of southern China. *Harmful Algae*, 4(1): 109—121

Yu R C, Hummert C, Luckas B *et al.* 1998. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia* 48(9): 671—677

Zhou M J, Li J, Luckas B *et al.* 1999. A recent shellfish toxin investigation in China. *Marine Pollution Bulletin*, 39: 331—334

SEQUENCE ANALYSIS AND MOLECULAR PHYLOGENETICS OF
RIBOSOMAL RNA GENE OF *ALEXANDRIUM* (DINOPHYCEAE)
STRAINS IN CHINA

TANG Xiang-Hai, YU Ren-Cheng, YAN Tian, WANG Yun-Feng, ZHOU Ming-Jiang
(Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)
(Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract rDNA sequence that consists of highly conserved regions interspersed with variable regions has been used extensively as phylogenetic and taxonomic indicators for a variety of organisms, making it an appropriate candidate for molecular phylogenetic studies over wide range of taxonomic levels. In this study, two highly variable regions of rDNA, the 5.8S ribosomal RNA gene flanking internal transcribed spacers 1 and 2, and the 5' portion of large-subunit rDNA (encompasses so-called “D1” and “D2” hypervariable domains) of several strains of *Alexandrium* isolated from the East China Sea and the South China Sea were amplified and sequenced for phylogenetic analysis. Besides, the same region of rDNA of several other strains of *Alexandrium* originated from other countries or regions were also sequenced serving as references in sequence analysis. The sequences were compared and analyzed with software ClustalX and MEGA 2. It was found that the sequences of all toxic *A. tamarense* and *A. catenella* isolated from Chinese coast were the same. Based on the phylogenetic study, the *A. tamarense* and *A. catenella* strains from China should belong to a genotype of “Temperate Asian”. Two other strains of *Alexandrium*, which have not been identified by morphotypical characteristics, were defined as genotype “affine”. The sequence of *A. minutum* isolated from Taiwan is very different from those of the species isolated from western European, but similar to the sequence of the strain from New Zealand. The sequence information could be further used for the development of genetic probes targeted on the toxic species of *Alexandrium* along Chinese coasts.

Key words Red tide, *Alexandrium*, rDNA, Sequence analysis, Molecular phylogeny