

南海赤潮有毒甲藻链状 - 塔马亚历山大藻的分子鉴定*

陈月琴 屈良鹄

曾陇梅

(中山大学生命科学学院, 广州 510275) (中山大学化工学院, 广州 510275)

齐雨藻 郑磊

(暨南大学水生生物研究所, 广州 510632)

摘 要 以核糖体 rDNA ITS 为分子指标, 采用 RFLP 及序列分析方法对南海海域 *Alexandrium catenella* 和 *Alexandrium tamarense* 进行分析和鉴定, 并通过与日本海域不同海区 *A. catenella* 和 *A. tamarense* 的比较, 得出 *A. catenella* 或 *A. tamarense* 的不同地理株的种内个体间 ITS 区序列非常相似, 而种间序列则有显著差异, 表明了 ITS 区用于不同海区 *A. catenella* 和 *A. tamarense* 种间鉴定是一个较稳定的指标. 可看出, ITS 区的研究从一个新的角度为海洋微藻种的界定提供了很好的依据.

关键词 *A. catenella*-*A. tamarense* rDNA ITS 分子鉴定

1 引言

赤潮甲藻 *Alexandrium catenella* 和 *Alexandrium tamarense* (链状亚历山大藻和塔马亚历山大藻) 是亚历山大藻属的 2 个有毒种类, 也是南海海域引发有毒赤潮的主要类群之一. 两者细胞形态非常相似, 仅在顶孔板形状、后连接孔位置、腹孔等有微小差异, 一般光学显微镜难区分, 常常出现同一个种的两个个体被鉴定为不同的两个种, 或两个不同种的个体人为地定为一个种的混淆现象; 实验室培养种与野生种在形态上也存在差异, 种的形态界定标准很不清楚^[1,2], 但是, 它们形成的赤潮所造成的危害性差异很大, 因此, 关于 *A. catenella* 和 *A. tamarense* 是分类学上两个不同的种, 还是同一个种不同的地理株, 长期以来一直是甲藻分类

本文于 1997-11-07 收到, 修改稿于 1998-11-05 收到.

* “九五”国家自然科学基金重大项目资助(编号: 39790110), 国家杰出青年基金(编号: 395250070)部分资助.

第一作者简介: 陈月琴, 女, 33 岁, 讲师, 博士后, 现主要从事生物分子进化与分子系统学研究.

学家争论的主要问题之一。有的学者为了方便起见,将 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 统称为“tamarensis complex”^[2]。本世纪 80 年代,人们曾引入了一些新的技术,例如,免疫学技术^[3,4]、同工酶技术等^[5,6],通过细胞表面抗体的特异性及同工酶酶谱的变化对 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 进行分类鉴定,但未获得一致结论。

90 年代以来,西方各国逐渐转向 *Alexandrium* 属分子生物学水平的研究,试图从 DNA 水平获得稳定且可靠的分类指标。其中最常用的分子指标是核糖体 18s、28s rDNA 及两者之间的转录间隔区——ITS 区 (Internal Transcribed Sequences)。18s 和 28s rDNA,尤其是 28s rDNA,其结构具有保守区与高变区镶嵌的特点,在研究生物不同类群时,可采用不同的区域来作为分析比较的分子指标^[7,8],因而使其成为分类学上广泛使用的分子指标。但用于属下种间水平的研究时,其结构过于保守而不适用。相对而言,两者之间的转录间隔区——ITS 区,为高变的区域,在生物各类群属下水平的研究,可提供较多的信息,是属下种间水平研究一个很好的比较指标。目前在动物^[9]、被子植物^[10]、真菌^[11]、绿藻^[12]等均已获得理想的结果。Adachi^[13,14]以 rDNA ITS 区为分类指标对日本海域 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 不同地理株进行分析,获得有意义结论。我国海区 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* rDNA ITS 区特征如何? ITS 区是否可以作为一些形态非常相似的全分布有毒 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 种间界定稳定的指标? 鉴于此,我们采用 RFLP 分析及序列分析方法,对南海海域 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 不同地理株的 ITS 区进行分析,开展我国海域 *Alexandrium* 属的分子分类学研究,确定 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 种间的界定标准。并通过对我国种类的序列分析,设计出 *Alexandrium catenella* 和 *Alexandrium tamarensis* 专一性的核酸分子探针,使我国在赤潮微型生物快速准确识别方面获得突破。

2 材料与方法

2.1 材料

本研究所用材料列于表 1。藻种形态上鉴定为 *A. catenella* 或 *A. tamarensis*,为方便起见,我们将所有株系暂称作“tamarensis complex”,分别采自南海海域的大鹏湾、大亚湾及香港海域,由暨南大学水生生物研究所提供。所有藻种于 f/2 培养基中培养,培养条件:20~25 ℃,2 000~4 000 lx 光照,光:暗=14 h:10 h。藻种保存于暨南大学水生生物研究所。

表 1 本研究所用材料的株系、种名、采集地点和分离培养方法

株系	种名	采集地点	单细胞分离培养方法	毒性
AD01	tamarensis complex	大鹏湾	营养细胞分离	有毒
AD03	tamarensis complex	大鹏湾	营养细胞分离	有毒
AC02	tamarensis complex	大亚湾	孢囊萌发后营养细胞分离	有毒
AC03	tamarensis complex	大亚湾	孢囊萌发后营养细胞分离	有毒
AH01	tamarensis complex	香港海域	营养细胞分离	有毒
AN01	tamarensis complex	大鹏湾、南澳	孢囊分离	有毒
AN02	tamarensis complex	大鹏湾、南澳	孢囊分离	有毒

2.2 DNA 的制备及 rDNA ITS 区的 PCR 扩增反应

本研究 DNA 的制备,PCR 扩增反应条件等见文献[15]。PCR 引物为:LH2 5' GTC-

GAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA 3', D1am 5' CCTGCAGTCGACA(TG)AT-GCTTAA(AG)TTCAGC(AG)GG 3', 分别对应于 18s rDNA 3' 末端和 28s rDNA 5' 末端区域, 于中国科学院上海生物化学研究所合成; 扩增完成后, PCR 产物用乙醇沉淀或 DPS 系统纯化, 沉淀晾干后加适量 TE 溶解, 取 2 μ l 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 其余 -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

2.3 rDNA ITS 区 PCR 扩增产物的酶切分析

根据 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* rDNA ITS 区的酶切图谱^[13], 选取 AluI (Promega) 和 RsaI (Promega) 两种限制性内切酶进行酶切分析. 酶切反应: 取 50~100 ng PCR 产物, 5~8U 的限制性内切酶于 10 μ l 反应液中, 37 $^{\circ}$ C 3 h 或过夜; 酶切结果于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查.

2.4 rDNA ITS 区 PCR 扩增产物的克隆及序列测定

本研究用于序列测定的株系为 AC03、AN01, 分别为大亚湾、大鹏湾的代表. PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化后, 与质粒载体连接, 质粒载体为 pTZ19, 按文献[16]操作. 采用美国 Life Science Sequenase Version 2.0 (USB) 测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA 序列.

2.5 序列比较分析

按照最大同源性的原则将所测得序列进行排列, 并与日本海域 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 已知的同源序列进行比较, 序列见图 2. 序列中引入适当数量的空位(gap), 以便达到最大可能的同源性. 序列间距离序数(Knuc 值)按照 Kimura 的 two-parameter model, 采用计算机分析软件包 Phylip version 3.5 中的 DNAdist Program 进行计算.

3 结果与讨论

3.1 rDNA ITS 区的 PCR 扩增结果及 RFLP 分析

本研究采用“甲藻单个细胞 DNA 制备法”进行 DNA 快速制备, 所获得的微量 DNA 直接用于专一性引物的 PCR 扩增反应. PCR 扩增结果见图 1a, 7 个不同的地理株, PCR 产物长度基本一致, 约 600 个碱基. AluI、RsaI 两种限制性内切酶酶切结果见图 1b 和 c. 由图可见, 不同的株系, RFLP 带型(限制性内切酶酶谱)完全相同. 而且, 两种酶酶切结果与日本海域 *A. catenella* 的酶谱完全一致^[13], 可初步断定我们从南海海域分离培养的这几个株系为 *A. catenella* 同一个种不同的地理株. 由于 ITS 区在生物种类之间有较大的序列差异, 针对 ITS 区所作的 RFLP, 不同种的带型有明显差异, 而同种不同个体之间则有一致性, 是一种简单快速种间鉴定

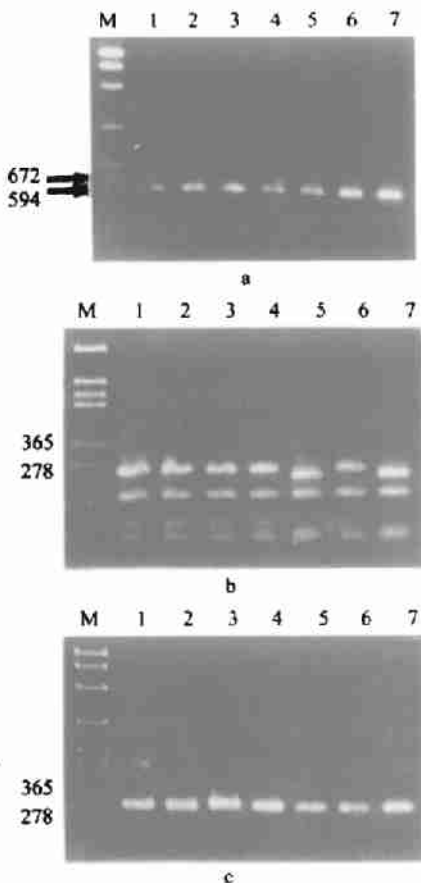


图 1 rDNA ITS 区 PCR 扩增产物及限制性内切酶酶切结果

a. PCR 扩增产物(约 600 bp) b、c. 分别为 AluI、RsaI 的酶谱; Lane M: 2Kb marker; Lane 1-7 分别为株系 AD01、AD03、AC01、AC02、AC03、AH01、AN01 和 AN02 的酶切结果

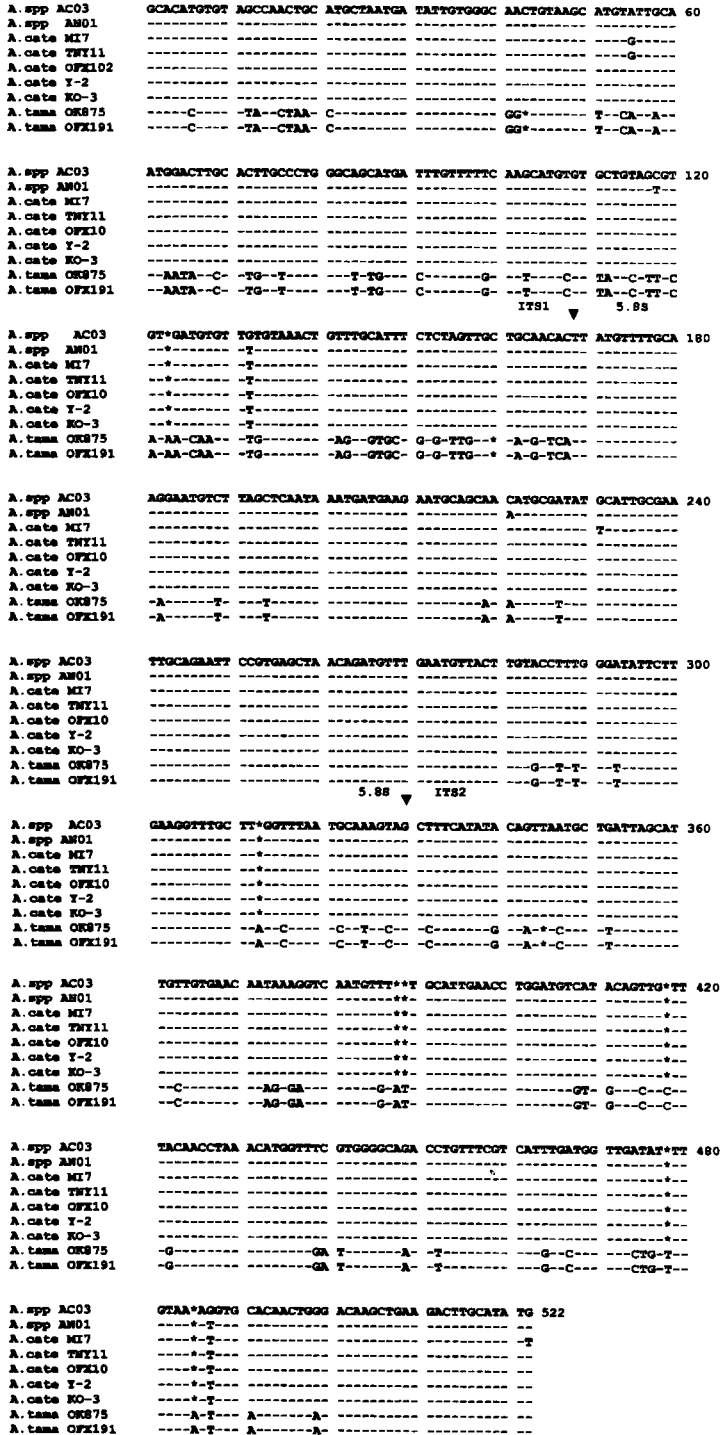


图2 链状-塔马亚历山大藻 rDNA ITS 序列比较

A. spp 为本研究所测序列, 其他为参考序列。排列中仅标明与顶部不同的核苷酸, 相同的核苷酸以短横线代表,

* 代表缺失的核苷酸

的方法^[12,13]。我们的结果也证明了这一点,该法可用于我国海区 *A. tamarensis* 和 *A. catenella* 的分类鉴定。

3.2 *A. tamarensis* 和 *A. catenella* rDNA ITS 区的序列比较及种的界定

尽管 ITS 区的 RFLP 分析是一种简单快速种间鉴定的方法,但是对 ITS 区序列进行测定,不仅可全面了解种的序列特征,而且可根据特征序列设计种的专一性核酸分子探针。为此本研究采用末端终止法分别测定了南海海域两个株系(AC03 和 AN01)rDNA ITS 区的全序列(包括 5.8s rDNA),结果见图 2。我国海区的两个株系,其 ITS 区长度一致,全长 515 个碱基,其中 ITS1 为 166 个碱基,ITS2 为 189 个碱基,5.8s rDNA 为 160 个碱基。两个序列除 4 个位点有变化之外,其余核苷酸完全相同。

将所测得序列与日本海域分布的 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 已知的同源序列进行比较(见图 2),并用计算机分析软件 Phylip version 3.5 的 DNAdist program 计算序列间的距离序数(Knuc 值,根据 Kimura 的 two-parameter model),所得结果如下:南海海域两个株系,与日本海域的 *A. tamarensis* 相比,ITS 区核苷酸差异较大,根据核苷酸差异计算出的距离序数(Knuc 值)为 0.20;而与日本海域不同海区的 *A. catenella* ITS 区基本一致,序列间的核苷酸差异(Knuc 值)很小(<0.01),与 Adachi^[14]所提出的 *catenella* 型相同。ITS 区的序列分析与 RFLP 结果完全吻合,进一步证明我们从南海海域分离培养的这几个株系为链状亚历山大藻(*A. catenella*)。以上结果说明,*A. catenella* 或 *A. tamarensis* 的不同地理株系(南海或日本海域),种内个体间 ITS 区序列非常相似,而 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 种间 ITS 区序列则有显著差异,表明 ITS 区用于不同海区 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 种间鉴定是一个较稳定的指标,同时也表明,以 ITS 为分子指标,可以解决 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 同一个种的两个个体被鉴定为不同的两个种,或两个不同种的个体人为地定为一个种的混淆现象。可以看出,ITS 区的研究从一个新的角度为藻种的界定提供了很好的依据,序列的核苷酸的差异(Knuc 值)可作为一种遗传距离,用于海洋微藻种界定的判别标准。

3.3 我国海域 *A. catenella* 专一性核酸分子探针的设计及其应用

根据我们所测 *A. catenella* 两个株系的 ITS 区序列,并与日本海域 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 不同地理株 ITS 区序列比较,可以看出(见图 2),ITS 区某些区域,如 ITS1 3'端 150~177 个碱基之间的 27 个核苷酸,在种内个体间非常保守,而种间变化相对较大。因此可根据序列这些特征,合成专一性的核酸分子探针,用于我国海域 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 的特异性检测。

4 结论

ITS 区为 18s 和 28s rDNA 之间的转录间隔区,是核苷酸替换速率较高的区域,对于生物类群分类和鉴定是很好的分子指标。将此遗传标志用于 *Alexandrium* 属 *A. catenella* 和 *A. tamarensis* 的分类学研究,获得理想的结果。两个种不同株系间 ITS 区序列相似性非常大,而种间则有明显差异。因此,选择种内具高度保守性的某一段序列作为核酸分子探针,可对该类进行特异性检测和鉴定。ITS 区作为一理想的分子标记将在海洋微藻类种的界定及种的快速检验中得到广泛的应用。

参考文献

- 1 Balech E. The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *tamarensis* group. In: Toxic Dinoflagellates (Anderson D M, White A W, Baden D G eds), Elsevier, New York, 1985, 33~38
- 2 Taylor F J R. The taxonomy and relationships of red tide dinoflagellates. In: Toxic Dinoflagellates. (Anderson D M, White A W, Baden D G eds), Elsevier, New York, 1985, 11~26
- 3 Adachi M, Sako Y, Ishida Y. The identification of conspecific dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies. Nippon Suisan Gakkaishi, 1993, **59**, 327~332
- 4 Sako Y, Adachi M, Ishida Y. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Alexandrium* species. In: Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea (Smayda T J, Shimizu Y eds), Elsevier, Amsterdam, 1993, 87~93
- 5 Cembella A D, Taylor F J R. Electrophoretic variability within the *Protogonyaulax tamarensis/catenella* species complex; pyridine linked dehydrogenases. Biochem. Syst. Ecol., 1989, **15**, 171~186
- 6 Hayhome B A, Anderson D M, Kulis D M *et al.* Variation among congeneric dinoflagellates from the north eastern United States and Canada. Mar. Biol. (Berl.), 1985, **101**, 427~435
- 7 Qu L H, Hardman N, Gill L L *et al.* Phylogeny of helminths determined by rRNA sequence comparison. Mol. Biochem Parasitol, 1986, **20**, 93~99
- 8 Lenaers G, Scholin G A, Bhaud Y *et al.* A molecular phylogeny of dinoflagellate protists (Pyrrophyta) inferred from the sequence of 24S rDNA divergent domains D1 and D8. J. Mol. Evol., 1991, **32**, 53~63
- 9 Gonzalez I L, Sylvester J E, Smith T F *et al.* Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny. Mol. Biol. Evol., 1990, **7**, 203~219
- 10 Baldwin B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the composite. Mol. Phylogen. Evol., 1992, (1): 3~16
- 11 Morales V M, Pelcher L E, Taylor J L. Comparison of the 5.8S rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptosphaeria maculans* from different pathogenicity groups. Curr. Genet., 1993, **23**, 490~495
- 12 Bakker F T, Olsen J L, Stam W T *et al.* Biogeography of *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences. J. Phycol., 1992, **28**, 660~668
- 13 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. Phycol., 1994, **30**, 857~63
- 14 Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8s ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J. Phycol., 1996, **32**, 424~432
- 15 陈月琴,屈良鹤,邱小忠等. 甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用. 中山大学学报(自然科学版), 1997, **36**(4): 66~69
- 16 萨姆布鲁克 J., 弗里奇 E.F., 曼尼阿蒂斯 T. 著, 金冬雁等译. 分子克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1996

Molecular identification of red tide toxic *Alexandrium tamarense*- *Aexandrium catenella* from the South China Sea

Chen Yueqin,¹ Qu Lianghu,¹ Zeng Longmei,² Qi Yuzao,³ Zheng Lei³

1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275

2. School of Chemistry and Chemical Technology, Zhongshan University, Guangzhou 510275

3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632

Abstract—The rDNA internal transcribed spacer and 5.8s regions of 7 strains of *Alexandrium* “tamarense complex” were amplified with the method of PCR amplification with individual cells for RFLP analysis and sequencing. PCR-RFLP analysis of rDNA ITS using three restriction enzymes revealed 7 strains carried unique restriction patterns and were in common with those of Japanese *A. catenella*. The sequence comparisons of three strains (AD01, AH01, AN01) with the homologous sequences of Japanese *A. catenella* and *A. tamarense* determined by Masao Adachi *et al.* in 1996 showed that three strains from the South China Sea with those Japanese *A. catenella* were closely related to each other, distance values between strains were extremely low (< 0.01), whereas distance values between three strains and Japanese *A. tamarense* were high (about 0.20), which suggested that 7 strains from the South China Sea were the species of *A. catenella*. It was concluded that rDNA ITS region could served as criteria for the “red tide” species identification.

Key words Molecular identification, *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, rDNA ITS