

棕囊藻赤潮原因种的分子鉴定和起源分析

陈月琴¹, 王 宁¹, 周 惠¹, 屈良鹄¹, 杨练锋², 吕颂辉³, 齐雨藻³

(1. 中山大学 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275; 2. 国家海洋局 南海环境监测中心, 广东 广州 510300; 3. 暨南大学 水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 测定了发生于我国东南海域赤潮原因种 *Phaeocystis* sp. 及相关种类 *P. globosa* 和 *P. pouchetii* 18S rDNA 序列, 并以 Phylip35 分析软件构建序列距离矩阵和分子系统发育树图. 结果表明, 该赤潮原因种与球形棕囊藻 *P. globosa* 18S rDNA 序列完全相同, 从分子水平鉴定了该原因种为 *P. globosa*. 分子系统发育树图表示的 *P. globosa* 和 *P. pouchetii* 的分化顺序表明, 分布于我国东南海域的 *P. globosa* 可能是一种本地起源的暖水种. *Phaeocystis globosa* 不同株系的形态差异, 可能是适应不同生活环境的结果. 根据分子生物学的数据对有害赤潮藻类进行系统发育分析, 并设计用于有害赤潮藻快速鉴定的特异性分子探针, 对赤潮的监控和防治具有重要意义.

关键词: 棕囊藻; 赤潮原因种; 18S; rDNA

中图分类号: Q949. 24; Q751 文献标识码: A 文章编号: 0253- 4193(2002)06- 0099- 05

1 引言

随着污染的加剧, 近年来我国沿海赤潮发生的频率不仅有增加的趋势, 而且还有新的产毒赤潮藻类和毒素被发现. 1997 年底在我国东南沿海水面首次发生大规模的棕囊藻类有害赤潮^[1], 1999 年 7 月又再次发生. 这两次赤潮的持续时间长, 危害性大, 给水产养殖业造成严重损失.

该赤潮原因种经显微镜鉴别发现主要是以胶质群体的形态存在, 同时还有游动的单细胞形态. 群体的大小差别很大, 最小的群体仅为 0.1 cm 左右, 最大的群体可达 2~ 3 cm. 游动的单细胞常呈球形或近球形, 具有两条几乎等长的鞭毛. 从该赤潮藻的群体和游动细胞的形态特征可确定它为定鞭藻类(*Prymneisiophytes*)的棕囊藻属(*Phaeocystis*). 该种类在形态和生理

收稿日期: 2001- 10- 18; 修订日期: 2002- 01- 21.

基金项目: 国家自然科学基金“九五”重大资助项目(39790110); 国家自然科学基金资助项目(39970063); 广东省自然科学基金资助项目(001213).

作者简介: 陈月琴(1964-), 女, 海南省三亚市人, 教授, 博士. 从事生物资源和环境分子生物学研究.

温度上均与 *P. globosa* 和 *P. pouchetii* 都有较大差异. *P. globosa* 是暖水种, 其群体胶质囊直径一般为 8~9 mm^[2]; *P. pouchetii* 是一种嗜冷水的种类, 其生长最适温度在 8 °C 左右^[2], 而我国东南海域的赤潮原因种生长最适温度为 20 °C 或更高, 因此该赤潮原因种的分类鉴定问题仍然是未解决.

对棕囊藻属目前已见报道的有 *P. pluchetii* 和 *P. globosa* 等 9 个种. 该属大多数种类的生活史和生殖过程复杂, 造成形态和生理鉴定的极大困难, 使得种间鉴定容易混淆^[3]. 近年来, 有害棕囊藻赤潮的发生在全球有扩增的趋势, 对这些赤潮原因种的发生和传播机理的研究已成为赤潮研究的关键问题之一, 而这些都依赖种的准确鉴定. 本研究采用分子生物学技术, 以核糖体 18S rDNA 为分子指标, 对我国东南海域赤潮原因种 *Phaeocystis* sp. 及相关种类 *P. globosa* 和 *P. pouchetii* 进行研究, 并从分子生物学数据库中调取相关序列, 进行序列分析比较并构建 *Phaeocystis* 属的分子系统发育树图, 从 DNA 水平对我国东南海域赤潮原因种进行鉴定, 同时探讨该种的地理起源问题.

2 材料和方法

2.1 藻种

实验所用的藻种见表 1, 其中 *P. globosa* CCMP627 和 *P. pouchetii* P361 由德国 Alfred Wegener 极地和海洋研究中心 Medlin L K 博士提供, 我国东南海域赤潮原因种 *Phaeocystis* sp. 采自 1997 和 1999 年赤潮重灾区广东省柘林湾. 样品分别由暨南大学水生生物所吕颂辉和国家海洋局南海环境监测中心杨练锋提供. 1997 年的样品是用采回室内培养样品进行分析, 而 1999 年的是采用自然水样的活体样品进行分析.

表 1 本研究所用材料名称、来源及其在基因库中的收录号

Species	Strain	Origin	Abbreviation	GenBank Accession
<i>Phaeocystis</i> sp.	Santou97	Southeast Chian Sea	Santou	AJ279499
<i>P. globosa</i>	CCMP627	Mexico	Pgl627	AJ278035
<i>P. globosa</i>	SK35	German Bight	Pglsk35	PGS18SR
<i>P. pouchetii</i>	P361	Svalhard (Norway)	Ppo361	AJ278036
<i>P. pouchetii</i>	SK34	Greenland Sea	Ppo34	PPHL18SR
<i>P. jahnii</i>	Unknown	Mediterranean Sea	Pja	AF163148
<i>P. cordata</i>	Unknown	Mediterranean Sea	Pco	AF163147

2.2 总 DNA 的提取和 18S rDNA 的 PCR 扩增

离心收集少数细胞并迅速悬浮于 25 mm³ 提取缓冲液中 ($\rho = 1\%$ SDS, 10 mmol/dm³ EDTA pH8.0, 10 mmol/dm³ Tris-HCl pH7.5, 10 mmol/dm³ NaCl), 18S rDNA 扩增引物为 18N1: 5' GGATCAGAATTCTATCTGGTTGATCCTGCCAG3', 18N11R: 5' CTCAGTAAGCTTGATCCTCCG CAGGTT CACC3', 分别对应于真核生物 18S rDNA 1~21 bp 和 1775~1796 的序列, 为真核生物通用引物. DNA 制备见文献[5]. PCR 反应程序为 94 °C 2 min, 然后是 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环, 扩增完成后, 取 2 mm³ 于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, PCR 产物用 Qiaquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Germany) 纯化, -20 °C 保存.

2.3 序列测定和分子分析

PCR 纯化产物用 377 型自动测序仪 (ABI PRISM) 进行序列测定, 测序用引物为 18N1, 18N5 (5' TGGTGCCAGCAGCCGCGGTA3', 对应于真核生物 18S rDNA 812~830 bp) 和 18N11R, 从国际分子生物学数据库中调取 4 个同源序列 (*P. globosa* SK31, *P. pouchetii*, *P. jahnii*, *P. cordata*), 用 Pcgene 6.0 计算机分析软件包进行序列分析, 并手工校正. 利用 PHYLIP 软件包 DNA dist 程序 Kimura 公式建立序列距离矩阵, 并使用 Neighbor-joining 和简约法 parsimony 构建系统发育树图, 以 *Pavlova gyrans* 为外类群, 自展树为 100.

3 结果和讨论

共测得我国东南海域 *Phaeocystis* sp. 和 *P. globosa* CCMP627, *P. pouchetii* P361 18S rDNA 全序列, 序列间核苷酸差异值按 Kimura 的 K 值计算^[4], K_{nuc} 见表 2.

表 2 棕囊藻不同种及不同株系 18S rDNA 序列比较结果 (K_{nuc})

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 Ppo361	0.000 0	0.003 1	0.016 6	0.012 0	0.012 7	0.018 0	0.034 3	0.136 5
2 Ppo34		0.000 0	0.015 9	0.009 8	0.010 5	0.014 7	0.030 9	0.132 4
3 Pgl627			0.000 0	0.005 2	0.006 5	0.025 1	0.038 9	0.145 9
4 Santou				0.000 0	0.001 3	0.017 9	0.031 6	0.137 0
5 Pglsk35					0.000 0	0.019 2	0.032 9	0.138 6
6 Pco						0.000 0	0.023 8	0.126 4
7 Pja							0.000 0	0.130 8
8 Pgy								0.000 0

对距离矩阵的分析结果表明, *Phaeocystis* 属各种类与 *Pavlova gyrans* 相似性系数在 87%~90% 内变化, 这表明使用核酸序列差异来分析是可行的. 从系统发育树图看 (见图 1), *P. globosa* (CCMP627 和 SK35) 和我国东南海域赤潮原因种 *Phaeocystis* sp. 虽然起源于不同的地域, 却形成独立的一支, *P. pouchetii* (P361 和 SK34) 形成另一支, *P. cordata* 和 *P. jahnii* 分别形成另外两个分支. 从树图表示的分化先后顺序来看, *P. globosa* 要比 *P. pouchetii* 分化得早.

对 *Phaeocystis* 属已报道的有 9 个种, 各种之间群体胶质囊的形态非常相似, 而单细胞的个体大小又极微小, 很难用形态差异来鉴别. 如 *P. pouchetii* 和 *P. globosa*, 早期的研究根据两者的分布和群体胶质囊形态特征来加以区分, 但 Kornmann 认为 *P. pouchetii* 和 *P. globosa* 其实是同一种类, *P. globosa* 只不过是 *P. pouchetii* 的幼态而已, 因此怀疑以群体胶质囊进行种的鉴定的可靠性^[6]. 近年来又有人对 *P. globosa* 和 *P. pouchetii* 群体胶质囊不同阶段的形态学进行了研究, 仍支持两者是不同种的观点, 对其生理温度和光耐受性的研究也同样支持其为两个种^[7]. 我国东南海域的赤潮原因种, 尽管在形态与生理上都表现出其特有的性状, 但对 18S rDNA 基因分析表明, 我国东南海域赤潮原因种与 *P. globosa* 基因序列完全相同, 而与 *P. pouchetii* 存在 2% 的差异, 可初步判定 1997 和 1999 年发生于我国东南海域的棕囊藻赤潮原因种为 *P. globosa*. 笔者对 *Phaeocystis* 属不同种类 rDNA ITS 区的研究也支持该赤潮藻为 *P. globosa* (陈月琴等, 未发表结果), 其群体胶质囊异常很大, 可能是由于环境引起的一种形

态变化现象.

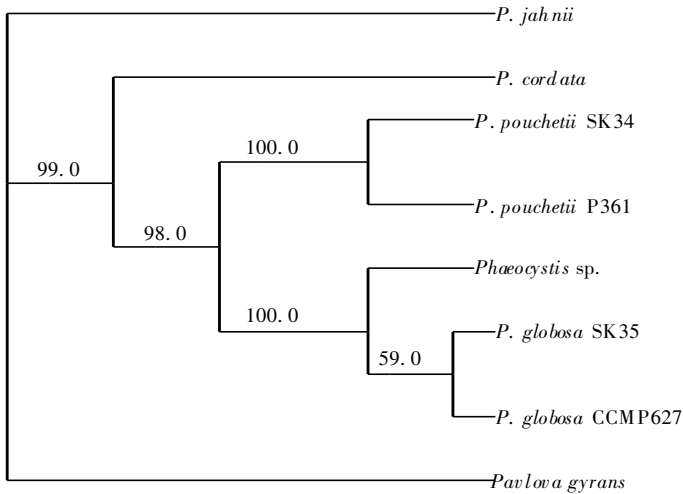


图 1 棕囊藻属不同种及不同株系 18S rDNA 系统发育树

关于 *Phaeocystis* 属的地理分布及起源问题, Medlin 等^[8] 以 rRNA 基因为分子指标对定鞭藻类进行系统学研究, 提出棕囊藻属可能为一种暖水起源的全球性分布藻类, 同时根据 Ochman^[9] 提出的 rRNA 分子钟概念, 推测嗜暖水的种类 (*P. globosa*) 和嗜冷水的种类 (*P. pouchetii*) 的分歧年代距今约 5 000 万 a, *P. pouchetii* 要比 *P. globosa* 晚 5 000 万 a 才出现, 这与本文所构建的分子系统发育树图反映的分化次序一致. 那时海洋水体比较均一, 气候温和, 后来随着全球变冷, 造成海洋水体分布不均一, 出现冷暖分层^[10], 基于适应环境的需要, 冷水性藻类逐渐分化出来. 根据这个假设, 诱发我国东南海域赤潮的 *P. globosa* 应该是本地起源(endemic species). 在正常情况下, 由于其数量少或个体微小(游动的单细胞直径已达 2.5~7 μm), 难于被观察到. 随着水体的污染, 富营养化加重, 加快了该藻类的繁殖而引发赤潮.

利用分子生物学手段, 不仅能为 *Phaeocystis* 属种的鉴定提供基因水平的证据, 达到快速准确鉴定的目的, 而且在藻种的起源等问题上也具有重要意义. 设计该属有害藻类的特异的分子探针, 将为有毒赤潮快速准确鉴定奠定基础.

德国 Alfred Wegener 极地和海洋研究中心 Medlin L K 博士提供了藻种 *P. globosa* CCMP627 和 *P. pouchetii* P361. 暨南大学水生生物所吕颂辉和国家海洋局南海环境监测中心杨练锋提供我国东南海域赤潮原因种 *Phaeocystis* sp., 特此致谢.

参考文献:

- [1] 黄楚光, 李锦蓉, 杨练锋, 等. 1997 年粤东海域水文环境与赤潮关系研究[A]. 梁松. 南海资源与环境研究文集[C]. 广州: 中山大学出版社, 1999.
- [2] JAHNKE J, BAUMANN. Differentiation between *Phaeocystis pouchetii* (Har.) Lagerheim and *Phaeocystis globosa* Scherffel. I. Colony shapes and temperature tolerances[J]. Hydro Bull, 1987, 21: 141-147.
- [3] SOURNIA A. *Phaeocystis*(Prymnesiophyceae): how many species[J]. Hova Hedwigia, 1988, 47: 211-217.
- [4] 陈月琴, 屈良鹤, 邱小忠, 等. 甲藻单个细胞 DNA 的制备及其在赤潮藻分子鉴定中的应用[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36(4): 66-69.

- [5] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *J Mol Evo*, 1980, 16: 111—120.
- [6] KORNMANN P. Beobachtungen an *Phaeocystis*-kuoturen[J]. *Helgoländer Wissenschaftlich Meeresuntersuchungen*, 1995, 5: 218—233.
- [7] BAUMANN M E M, LANCELOT C, BRANDINI F P, et al. The taxonomic identity of the cosmopolitan prymnesiophyte *Phaeocystis*: a morphological and ecophysiological approach[J]. *J Mar Sys*, 1994, 5: 5—22.
- [8] MEDLIN L K, LANGE M, BAUMANN M E M. Genetic differentiation among three colony-forming species of *Phaeocystis*: further evidence for the phylogeny of the Prymnesiophyta[J]. *Phycologia*, 1994, 33(3): 199—212.
- [9] OCHMAN H, WILSON A C. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes[J]. *J Mol Evol*, 1987, 26: 74—86.
- [10] FRANKS L A, FRANCIS J E, SYKTUS J I. *Climate modes of the Phanerozoic*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 274.

Molecular identification and origin analysis on “red tide” related *Phaeocystis* causative species

CHEN Yue-qin¹, WANG Ning¹, ZHOU Hui¹, QU Liang-hu¹, YANG Lian-feng²,
LU Song-hui³, QI Yü-zao³

(1. Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. South China Sea Branch, State Oceanic Administration, Guangzhou 510300, China; 3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The 18S rRNA genes of “red tide” related *Phaeocystis* sp. from the southeast coast of China, and its related species *P. globosa* and *P. pouchetii* are sequenced. Phylogenetic trees are constructed by using these 18S rDNA sequences. It is clearly shown that *Phaeocystis* sp. from the southeast coast of China is remarkably similar to several isolates of *P. globosa* rather than *P. pouchetii*. The results demonstrate that the bloom-forming species of *Phaeocystis* most likely originated from an endemic warm-water species. The phenotypes of different members of the genus *Phaeocystis* are variable, apparently changing in response to environmental conditions.

Key words: *Phaeocystis*; “red tide” causative species; 18S rDNA