

东海原甲藻的分子鉴定

罗立明¹, 胡鸿钧^{1*}, 李夜光¹, 齐雨藻²,
吕颂辉², 耿亚红¹, 邓 光¹

(1. 中国科学院 武汉植物园/武汉植物研究所, 湖北 武汉 430074; 2 暨南大学 水生生物研究所, 广东 广州 520632)

摘要: 采用 nrDNA ITS 序列及 18S 序列两种分子标记, 对东海原甲藻和美国国家海洋藻种保藏中心(CCMP)的具齿原甲藻进行分子鉴定, 结果表明, 两者之间序列非常相似, 两者的 nrDNA ITS 序列碱基差异值仅为 0.002, nrDNA 18S 序列的碱基差异值为 0.000, 根据分子数据, 东海原甲藻和美国国家海洋藻种保藏中心的具齿原甲藻应为同一个种. 从基因库获取原甲藻的另外 3 个种 nrDNA ITS 序列和 8 个种的 18S 序列, 用计算机软件进行分析和构建分子系统树, 结果显示 18S 序列用于原甲藻的分子鉴定过于保守, 而 nrDNA ITS 更适合于该种属界定的分子标准.

关键词: 东海原甲藻; 具齿原甲藻; nrDNA ITS; nrDNA 18S; 分子鉴定

中图分类号: Q948.885.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2006)01-0127-05

1 引言

赤潮是海洋重大自然灾害, 不仅严重危害渔业生产, 还威胁着人类的健康. 近年来海洋环境日益恶化, 赤潮分布范围和出现频率明显增加, 赤潮的研究受到人们的高度重视^[1, 2].

对形成赤潮的生物分类鉴定是研究赤潮生物生态学、控制及治理赤潮的基础. 原甲藻是形成赤潮的一种重要的原因种, 在我国曾发生过多次^[3~5]. 东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*) 是陆斗定等^[6]在东海分离的一种赤潮原甲藻, 根据细胞形状、大小、超微结构特征, 将它定为一新种. 这种原甲藻是东海最典型的赤潮生物, 然而对于该种是否为一新种, 目前尚有较大争议, 其中争论的焦点为东海原甲藻与美国 Biglow 海洋研究所的国家海洋浮游植物藻种中心(Culture Center of Marine Phytoplankton, CCMP)保藏的编号为 CCMP1517, 种名为具齿

原甲藻(*Prorocentrum dentatum*) 的藻株是否为同一个种. 我们通过分子标记, 对这两种原甲藻进行比较研究. 基因测序目前广泛地应用于藻类分子鉴定和分类, 其中 18S nrDNA 和 ITS 序列为最常用的分子指标^[7~11], 本研究以 18S nrDNA 基因及转录间隔区 ITS 序列为分子标记, 对东海原甲藻和引进的 CCMP 具齿原甲藻进行研究, 从分子水平揭示两者之间的关系. 本研究还简要讨论 nrDNA ITS 和 18S 序列在原甲藻分子鉴定中的作用.

2 材料和方法

2.1 材料

本试验所用的材料为暨南大学从东海分离的东海原甲藻, 从 CCMP 引进的具齿原甲藻 CCMP1517 藻株, 另外 3 个种的 ITS 序列和 8 个种的 18S 序列来自基因库(见表 1).

收稿日期: 2004-09-05; 修订日期: 2004-11-25.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(2001CB409701).

作者简介: 罗立明(1976—), 女, 广西壮族自治区河池市人, 助理研究员, 从事藻类学研究. E-mail: llm@rose.whiob.ac.cn

* 通讯作者, E-mail: hongjun@rose.whiob.ac.cn

表 1 本研究所用材料的种名及在基因库中的序列号

	种名	序列号
ITS 序列	<i>Prorocentrum donghaiense</i>	实验测序
	<i>P. dentatum</i> CCM P1517	实验测序
	<i>P. minimum</i>	AF208244
	<i>P. micans</i>	AF208245
	<i>P. triestinum</i>	AF208246
18S 序列	<i>P. donghaiense</i>	实验测序
	<i>P. dentatum</i> CCM P1517	实验测序
	<i>P. panamensis</i>	Y16233
	<i>P. arenarium</i>	Y16234
	<i>P. emarginatum</i>	Y16239
	<i>P. minimum</i>	Y16238
	<i>P. concavum</i>	Y16237
	<i>P. maculosum</i>	Y16236
	<i>P. lima</i>	Y16235
	<i>P. mexicanum</i>	Y16232

2.2 方法

2.2.1 原甲藻的培养

将原甲藻置于恒温光照培养室中培养. 培养温度为(21±1) °C, 照度为 80~100 lx, 培养基是用天然海水配制的 f/2 培养基, 选取对数生长期(运动)的细胞用于基因组 DNA 的提取.

2.2.2 DNA 提取

基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法^[12].

2.2.3 nrDNA ITS 序列的扩增

ITS 序列的 PCR 扩增引物序列为: ITS 1(正向), GGGATCCGTTTC CGTAGGTGAACCTGC; ITS 2(反向), GGGATCCATATGCTTA AGTTCAGCGGG (13, 14). PCR 反应液为 ITS 1 引物(浓度为 10 μmol/L) 1 μL, ITS 2 引物(浓度为 10 μmol/L) 1 μL, 10× PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ (50 mmol/L) 2.5 μL, dNTP 混合液(1 mmol/L) 4 μL, TaqDNA 聚合酶(5 unit/μL) 0.2 μL, 基因组 DNA 提取液 2 μL, 加无菌重蒸水至 50 μL. PCR 扩增反应程序如下: 95 °C 5 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环, 72 °C 5 min, 在 PERKIN ELMER 9600 型 PCR 扩增仪上进行扩增.

2.2.4 18S 序列的扩增 PCR

扩增引物为: 16S1N(正向), TCCTGCCAG-TAGTCATATGC; 16S2N(反向), TGATCC TTCYG-CAGGTTAC (15). PCR 反应液为 16S1N 引物(浓度为 10 μmol/dm³) 1 μL, 16S2N 引物(浓度为 10 μmol/dm³) 1 μL, 10× PCR 缓冲液 5 μL, MgCl₂ (50 mmol/cm³) 2.5 μL, dNTP 混合液(1 mmol/dm³) 4 μL, TaqD-

NA 聚合酶(5 unit/μL) 0.2 μL, 基因组 DNA 提取液 2 μL, 加无菌重蒸水至 50 μL. PCR 扩增反应程序如下: 94 °C 4 min, 94 °C 1 min, 57 °C 2 min, 72 °C 3 min, 共 32 个循环, 72 °C 5 min, 在 PERKIN ELMER 9600 型 PCR 扩增仪上进行扩增.

2.2.5 ITS 及 18S 序列的测序

扩增结果通过 1% 的琼脂糖凝胶(EB 染色)电泳检测. 将扩增产物进行纯化, 在 3700 自动测序仪上进行测序(上海联合基因公司). 测序引物仍为扩增引物, 18S 序列测序的中间引物系我们自行设计的 16S3N: GCTCGTAGTTGG ATTTCTGC.

2.2.6 数据分析

采用 clustal X^[16] 对两个原甲藻 rDNA ITS 区全序列进行排列和比较. 用 Mega(version 1.01)^[17] 计算序列间的 Jukes-Cantor 距离系数, 用 UPGMA 法构建系统树.

3 结果

3.1 东海原甲藻与 CCMP1517 具齿原甲藻 ITS 序列和 18S 序列特征及比对

东海原甲藻及 CCMP1517 具齿原甲藻 nrDNA ITS 序列特征一致, ITS 1, 5 8S, ITS 2 总长度为 552 bp, 其中 ITS 1 为 245 bp, 5 8S 为 155 bp, ITS 2 为 218 bp, GC 含量为 49%, 552 个碱基中, 两者仅有 1 个碱基的差异. 对 18S 测出部分序列, 比对后长度为 1720 个位点, 其中 CCMP1517 具齿原甲藻长度为 1717 bp, GC 含量为 46%, 对东海原甲藻共测出 18S 部分序列, 长度为 1719 bp, GC 含量为 46%. 共有 4 个位点的差异, 均为插入/缺失.

3.2 各种间的 Jukes-Cantor 距离

根据 nrDNA ITS 序列计算原甲藻不同种的 Jukes-Cantor 距离系数, 各种之间的序列比较结果见表 2, 其中东海原甲藻与 CCMP1517 具齿原甲藻之间的核苷酸差异值最小为 0.002, CCMP1517 具齿原甲藻与 *P. micans* 之间的核苷酸差异值最大为 0.231.

表 2 原甲藻 nrDNA ITS 区序列 Jukes-Cantor 距离矩阵

种名	1	2	3	4
<i>P. donghaiense</i>				
<i>P. dentatum</i> CCMP1517	0.002			
<i>P. minimum</i>	0.087	0.089		
<i>P. micans</i>	0.229	0.231	0.229	
<i>P. triestinum</i>	0.270	0.273	0.267	0.286

根据 nrDNA 18S 序列计算原甲藻不同种的 Jukes-Cantor 距离系数, 各种之间的序列比较结果见表 3, 其中东海原甲藻与 CCMP1517 具齿原甲藻之间的核苷酸差异值最小为 0.000, *P. arenarium*

与 *P. emarginatum* 之间的核苷酸差异值最大为 0.116, 而东海原甲藻、CCMP 具齿原甲藻与 *P. minimum* 的核苷酸差异值也较小, 仅为 0.002.

表 3 原甲藻 nrDNA 18S 序列 Jukes-Cantor 距离矩阵

种名	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>P. donghaiense</i>									
<i>P. dentatum</i> CCMP1517	0.000								
<i>P. minimum</i>	0.002	0.002							
<i>P. mexicanum</i>	0.013	0.013	0.013						
<i>P. panamensis</i>	0.058	0.058	0.057	0.051					
<i>P. emarginatum</i>	0.077	0.077	0.076	0.066	0.104				
<i>P. concavum</i>	0.054	0.054	0.054	0.052	0.079	0.092			
<i>P. arenarium</i>	0.092	0.092	0.091	0.088	0.107	0.116	0.079		
<i>P. lima</i>	0.093	0.093	0.092	0.088	0.108	0.115	0.080	0.001	
<i>P. maculosum</i>	0.088	0.088	0.087	0.084	0.106	0.111	0.080	0.015	0.016

3.3 系统树构建

根据 nrDNA ITS 序列用 UPGMA 法构建分子系统树(图 1), 由图 1 可知, 东海原甲藻和 CCMP1517 具齿原甲藻聚在一起, 支持率为 100%, 它们与 *P. minimum* 也有很密切的亲缘关系.

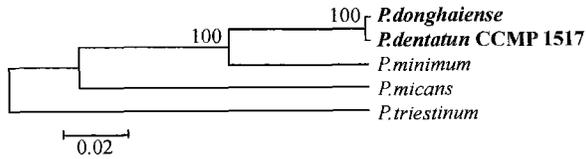


图 1 基于 nrDNA ITS 序列以 UPGMA 方法构建的分子系统树

根据 rDNA 18S 序列用 UPGMA 法构建分子系统树(图 2), 由图 2 可知, 东海原甲藻和 CCMP 的具齿原甲藻仍聚在一起, 支持率为 100%.

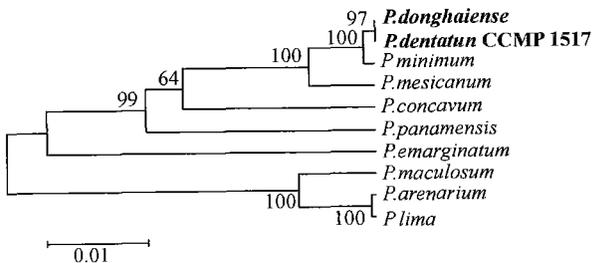


图 2 基于 nrDNA 18S 序列以 UPGMA 方法构建的分子系统树

4 讨论

对于东海原甲藻是否为 1 新种或者属于其他已知物种, 研究者间看法目前有很大分歧. 陆斗定等^[6, 18]研究了东海分离的原甲藻的显微和超微结构, 并与具齿原甲藻模式种和 Schiller 鉴定的钝头原甲藻的描述进行比较, 认为它们之间的形态结构和个体大小具有很大的差别, 将东海产的原甲藻定为 1 新种——东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense* Lu), 同时还认为韩国、日本海区出现的高生物量赤潮原甲藻不是具齿原甲藻, 而是东海原甲藻. 吕颂辉等^[19]对东海赤潮原甲藻标本和美国国家海洋中心(CCMP)的具齿原甲藻藻株(CCMP1517)通过光镜鉴定和扫描电镜对其细胞表面结构进行观察和比较, 认为生长在东海水域的赤潮原甲藻是具齿原甲藻而非新种.

目前以基因序列为基础的分子鉴定和分类已经在藻类中得到广泛的应用, 其中最常用的指标就是 nrDNA 基因, nrDNA ITS 已被各国研究者公认是生物类群属下种间水平的比较研究中较好的一个指标, 该区域具有较高的突变速率, 据有的研究者比较研究, 在真菌和藻类中种间 ITS 核苷酸差异值一般大于 14%, 尤其单细胞藻类的差异值一般较大, 但作为物种的界定, 尚未有一定的标准^[10], 而 18S 序列则相对保守一些. 我们的上述研究表明, 根据序列同源性比较结果, 东海原甲藻与从 CCMP 引进的具齿原甲藻在 ITS 全序列上仅有一个碱基的差异, 与

已测出的1700多碱基的18S序列中仅有4个碱基的差异。由nrDNA ITS区各种之间的碱基差异值可知,东海原甲藻与CCMP具齿原甲藻的碱基差异值仅为0.002,而与其他种的碱基差异为0.089~0.286,由nrDNA 18S序列各种之间的碱基差异值可知,东海原甲藻与CCMP具齿原甲藻的碱基差异值为0.000,与其他种的碱基差异为0.002~0.116。从两个分子标记的碱基差异来看,可以得出结论,东海原甲藻和CCMP具齿原甲藻应为相同的物种,它们与*P. minimum*也有较密切的亲缘关系,在两种分子标记构建的系统树中,东海原甲藻、CCMP具齿原甲藻和*P. minimum*均构成支持率为100%的一支。据光镜下观察,两者的形态非常近似,细胞大小相似,东海原甲藻细胞长度为17.5~18.75 μm,宽度为10~12.5 μm,CCMP具齿原甲藻细胞长度为13.75~18.75 μm,宽度为7.5~12.5 μm,因此认为,东海产原甲藻和CCMP藻株为同一物种,但两者与Stein描述的具齿原甲藻是否为同种还需要进一步深入研究,查对Stein F于1883年的原始描述。

尽管研究证明了东海产原甲藻与CCMP1517藻株的两种分子标记几乎完全一致,两者的形态和细胞大小很相似,可以很肯定两者是同一物种,但是CCMP1517藻株细胞比文献记载^[20]的具齿原甲藻明显小,现在的问题是:CCMP1517藻株种名为具齿原甲藻定得是否准确尚待进一步查证。陆斗定等^[18]对3种原甲藻的形态比较也有问题:(1)用以比较的具齿原甲藻和钝头原甲藻均用“模式种描述

的特征”而不是实物标本,表I的“细胞形态”是否是Stein F于1883年的原图?与Dodge^[20]的图(见图4中K-L)和Steidinger等^[21]图版中该种的图是有所不同的;(2)表I中细胞“是否在光镜下可见”一栏中笔者注明东海原甲藻为“否”而具齿原甲藻为“可见”,东海原甲藻细胞长16~22 μm,在光镜下是可见的;(3)Dodge等将钝头原甲藻作为具齿原甲藻的同物异名,虽未说明理由,但从具齿原甲藻形态描述“细胞(延)长心形到披针形,前端一侧延伸成尖的或钝的突起或肩”,附图4K似为钝头原甲藻的图;(4)该文中图1,14,东海产原甲藻细胞前端具有明显的钝的突起或“肩”,图6也可见这种突起;表I“细胞大小”具齿原甲藻“长度为50~60 μm”,无宽度,不知出自哪篇文献。如果依据Dodge等的文章,细胞为“长36~60 μm,宽15~20 μm”,而Steidinger的描述中无具体数字,只是笼统写为:细胞大小“小到中等”。

由两种分子标记的各种间的碱基差异值和分子系统树可见,nrDNA ITS区相对于18S序列有更大的碱基突变速率,nrDNA 18S序列则较保守,东海产原甲藻和CCMP1517藻株ITS区的碱基差异值为0.002,18S序列碱基差异值为0.000,东海产原甲藻与*P. minimum* ITS区碱基差异值为0.087,而18S序列的碱基差异值仅为0.002,由此也可证明,nrDNA ITS序列更适合于原甲藻的分类鉴定,这为我们进一步筛选原甲藻鉴定的分子标记提供了一定的依据,当然究竟如何确立一个确切的分类标准仍有待于更多更深入的系统研究。

参考文献:

- [1] 齐雨藻. 赤潮[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 1999. 6-7.
- [2] 张建辉, 夏新, 刘雪芹, 等. 赤潮研究的现状与展望[J]. 中国环境监测, 2002, 18(2): 20-25.
- [3] 蔡燕红, 项有堂. 舟山海域具齿原甲藻赤潮初探[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(4): 34-36.
- [4] 谷颖, 项有堂. 象山港海域富营养化与赤潮的关系[J]. 海洋环境科学, 2002, 21(3): 67-69.
- [5] 暨卫东, 黄自强, 黄尚高. 厦门西港湾富营养化与红潮间关系的研究[J]. 海洋学报, 1996, 18(1): 51-60.
- [6] LU Dou-ding, JEANETTE G. Five red tide species in genus *Prorocentrum* including the description of *Prorocentrum donghaiense* Lu sp. nov. from the East China Sea[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2001, 19(4): 337-344.
- [7] 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]. J Phycol, 1996, 32(3): 424-432.
- [8] BUCHHEIM M A, BUCHHEIM J A, CHAPMAN R L. Phylogeny of *Chloromonas* (Chlorophyceae): a study of 18S ribosomal RNA gene sequences[J]. J Phycol, 1997, 33(2): 286-293.
- [9] MARIELA A G, PATRICIA I G, ROLANDO M. Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences[J]. J Phycol, 2001, 37(1): 604-611.
- [10] 陈月琴, 屈良鹤. 海洋亚力山大藻种间界定的分子标准[J]. 中山大学学报, 1999, 38(1): 7-11.
- [11] 庄丽, 陈月琴, 李钦亮, 等. 赤潮叉角藻18S rDNA和ITS区序列测定与分析[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(2): 148-154.

- [12] SCOTT O R, BENDICH A J. Extraction of DNA from plant tissue[J]. *Plant Mol Biol Manual*, 1988, A6: 1—10.
- [13] COLEMAN A W, SURAZA, GOFF L J. Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta)[J]. *J Phycol*, 1994, 30(1): 80—90.
- [14] COLEMAN A W, JAFFREY C M. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness [J]. *J Mol E*, 1997, 45(2): 168—177.
- [15] GRZEBYK D, SAKO Y, BERLAND B. Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons and description of *Prorocentrum panamensis* sp. nov[J]. *J Phycol*, 1998, 34(6): 1 055—1 068
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4 876—4 882.
- [17] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. Mega: molecular evolutionary genetics analysis[M], version 1.01. University Park: The Pennsylvania State University, 1993.
- [18] 陆斗定, 齐雨藻, GOEBEL J, 等. 东海原甲藻修订及相关原甲藻的分类学比较[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(7): 1 060—1 064.
- [19] 吕颂辉, 张玉宇, 陈菊芳. 东海具齿原甲藻的扫描电子显微结构[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(7): 1 070—1 072.
- [20] DODGE J D. The Prorocentrales (Dinophyceae): II. Revision of the taxonomy within the genus *Prorocentrum*[J]. *Bot J Linn Soc*, 1975, 70(2): 103—125.
- [21] STEIDINGER K A, TANGEN K. Dinoflagellate[A]. DIEGO C R. Identifying Marine Phytoplankton[M]. San Diego: Academic Press, 1997. 419—423.

Molecular identification on *Prorocentrum donghaiense*

LUO Li-ming¹, HU Hong-jun¹, LI Ye-guang¹, QI Yu-zao²,
LÜ Song-hui², GENG Ya-hong¹, DENG Guang¹

(1. Wuhan Institute of Botany / Wuhan Botanic Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 520632, China)

Abstract: *Prorocentrum donghaiense* and *P. dentatum* from CCMP were re-identified by two molecular makers —nrDNA ITS and 18S sequences. The sequences of these two species are very similar. The results show that the nrDNA ITS nucleotide divergence between *P. donghaiense* and *P. dentatum* CCMP is only 0.002 and 18S nucleotide divergence is 0.000. According to the molecular data, *P. donghaiense* and *P. dentatum* CCMP are a similar species. Other three nrDNA ITS sequences and eight 18S sequences of *Prorocentrum* were obtained from the Genbank. These sequences were analyzed and the phylogenetic trees were constructed by computer programme (Clustal X and Mega). The results show that an nrDNA ITS region is a more suitable molecular maker to identifying interspecies of *Prorocentrum* and 18S sequence is too conservative.

Key words: *Prorocentrum donghaiense*; *P. dentatum*; nrDNA ITS; nrDNA 18S; molecular identification