

几种典型藻华生物的分子分类学分析

侯建军^{1,2,3,4,5} 赖红艳² 黄邦钦³ 刘绍平¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 荆州 434000

2. 湖北师范学院生命科学院, 黄石 435002; 3. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005;

4. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 5. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 通过 PCR 克隆测序、rDNA 序列分析、随机 PCR 引物扩增结合 DGGE 技术等三个层次的分子分类水平对厦门海域的典型藻华生物进行分子生物学分析。结果表明, 基于 DGGE 检测的 18S rDNA 序列过于保守, 分类的精确度不高; AP-PCR 则是基于基因组的差异进行分析, 结果较为精确和全面; 而 rDNA 序列分析相对可靠, 尤其是针对 ITS 的长度和全序列分析以及 28S rDNA 的 D1、D2 区的序列分析, 可以提供更为准确的分类信息, 并可为设计检测探针提供基础。据此对分离自厦门海域的 3 种典型甲藻及其相关藻株建立了系统进化树。针对 23 株甲藻 ITS 序列建立的系统进化树显示 *Takayama pulchella* (AY764179) 和 *Karlodinium micrum* 的距离最近, 并能够把 *Akashiwo* 属、*Karenia* 属、*Gyrodinium* 属、*Karlodinium* 属、*Takayama* 属与 *Gymnodinium* 属等区分开。用 28S rDNA 序列建立的系统发育树只能把 *Karlodinium* 属、*Karenia* 属和 *Takayama* 属区分开, 但不能很好地把无纹环沟藻与 *Akashiwo* 属和 *Gymnodinium* 等的藻区分开。

关键词: 藻华生物; 分子分类学; 核糖体 DNA; 变形梯度凝胶电泳; 随机引物 PCR

中图分类号: Q344+.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)05-0711-09

由于微型甲藻类藻华生物形态的相似性和复杂性, 使传统分类学研究方法 (如光学显微镜分类鉴定法) 在实际应用中存在困难, 需花费较多的时间和精力, 要求鉴定者具有丰富的经验和分类知识, 且这种方式不适用于超微型藻华生物分类鉴定; 电子显微镜耗时、昂贵, 难以在基层监测部门推广应用。分子分类技术的出现, 有望克服有害藻华生物分类鉴定上的困难^[1]。近 20 年来, 分子分类学 (Molecular taxonomy) 和分子系统学 (Molecular phylogeny) 因 PCR、DNA 测序等分子生物学技术的成熟, 而逐渐成为分类学中又一个有效鉴定物种的方法^[2]。分子分类法提供了以 DNA 序列变异及差别为基础的客观标准, 可以弥补传统形态分类遇到外表差异细微的情况时, 依赖主观判别而存在的不足^[3]。分子分类学标记因其对于细胞生长具有独特功能而显示出其重要性, 这些标

记在 DNA 上的位置会产生不同程度的变异, 同时在演化时以不同的速度累积变异^[4]。传统分类手段在相当长一段时间内, 对浮游植物尤其是有有害藻华生物分类鉴定方面起到了重要的作用。但传统的形态学分类手段总是有限的, 导致分类模糊、种类界限不清的情况常常发生。形态相似的物种并非意味着其遗传起源相同, 形态上存在差异也并非表明其遗传上没有关系^[5]。所以需要考虑发展新的分子分类技术去辅助鉴定和区分这些疑似藻华生物。

1 材料与方法

1.1 实验使用的藻株及培养方法 实验所用藻株共 12 株 (表 1), 在 5000 lx 光强, L:D=12:12 的光周期和 22℃ 的温度下单种培养。培养藻量为 1L × 3 采用 f/2 培养基培养。

收稿日期: 2007-04-23 修订日期: 2008-02-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (编号: C00HAB2001CB409704); 中国博士后基金项目 (编号: 20060400854); 教育部博士点基金项目 (编号: 20070504076); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题 (编号: 2008FB005); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室开放课题 (编号: LFB20070611) 资助

作者简介: 侯建军 (1966—), 男, 土家族, 湖北恩施人; 教授, 博士; 主要从事环境科学和分子生态学研究。E-mail: jzhou@mail.hzau.edu.cn, HJJ681@163.com

通讯作者: 黄邦钦, 教授, 博士; 主要从事浮游植物生态学研究。E-mail: bqhuang@xmu.edu.cn

表 1 用于实验分析的藻株名称
Tab. 1 Names of microalgal species and strains tested in this study

藻株 Species/Strains	分类 Taxonomy	藻株名称缩写 Abbreviation of microalgal strains
<i>Prorocentrum donghaiense</i>	<i>Prorocentrum</i>	1. PDDH; 2. PDHK
<i>P. minimum</i>	<i>Prorocentrum</i>	3. PMDH; 4. PMHK
<i>P. triestinum</i>	<i>Prorocentrum</i>	5. PTHK
<i>Alexandrium tanarense</i>	<i>Alexandrium</i>	6. ATDH 01; 7. ATDH 03; 8. ATM J01; 9. ATM J02; 10. ATGX02
<i>A. catenella</i>	<i>Alexandrium</i>	11. ACDH 01; 12. ACDH 03
<i>A. minutum</i>	<i>Alexandrium</i>	13. AMTW
<i>A. affine</i>	<i>Alexandrium</i>	14. AFGX01
<i>Karenia brevis</i>	<i>Gymnodinium</i>	15. KBHK
<i>K. mikimotoi</i>	<i>Gymnodinium</i>	16. KMBJ; 17. KMHK; 18. KMDH
<i>Takayana pukhella</i>	<i>Gymnodinium</i>	19. TPXM
<i>Akashiwo sanguinea</i>	<i>Gymnodinium</i>	20. AS/CCMP1740
<i>Gyrodinium aureolum</i>	<i>Gyrodinium</i>	21. GIXM

1.2 DNA提取和 PCR扩增方法 DNA提取条件和 rDNA 的 PCR 扩增采用我们以前建立并优化的方法进行^[6]。进行 DGGE 的 PCR 扩增时,用真核浮游植物 18S rDNA 的通用引物(表 2)通过巢式 PCR 扩增出 18S rDNA 高变区片段; DGGE 的 PCR 扩增体

系和 PCR 程序参考文献报道的方法进行^[7]。用于本实验的 PCR 引物来自于相关文献(表 2)。用于扩增 rDNA 引物有 5 对(ITS 1 对、28S rDNA 1 对、18S rDNA 3 对),用于 DGGE 扩增引物有 SetA、SetB、SetC 共 3 组。

表 2 本实验所用的主要引物
Tab. 2 Primer sequences used in this study

引物 Primer	序列(5'端到 3'端) Sequence(5' to 3')	靶区域位置 Target region or positions	特异性 Specificity	参考文献 References
IFS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	IFS1-5, 8S-IFS2	Eukaryote	[8]
IFS5	GGAA GTAAAA GTCGTAA CAAG G	IFS1-5, 8S-IFS2	Eukaryote	[8]
LSUD4R a(R)	AAC CAGCTA CTAG RYGGTTCGAT	28S	Eukaryote	[9]
D3Ca	ACGAA CGATTTG CACGTCAG	28S	Eukaryote	[9]
Set A				
EukA	AA CCTGGTTGATCCTGCCAGT	1 to 21	Eukaryote	[10]
EukB	TGATCCTTCTGCAGGTTCA CCTAC	1795 to 1772	Eukaryote	[11]
Set B				
Euk1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 to 20	Eukaryote	[12]
EukA r	CCA CTCCTG GTGGT GCCCTTCGG	1146—1168	Eukaryote	[13]
Set C				
Euk1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 to 20	Eukaryote	[12]
Euk516 rGC	ACCAGACTTG CCTCC	563 to 548	Eukaryote	[14]
GC 夹	CGGGGGG CACGGGGGG CGGGGGG CACGGGGGG			[14]
Primer1	AAT CTA GAC GTT CTG CGC	For AP-PCR	Eukaryote	[15]
Primer2	ACC GTG AGT GAC TGT CAA CG	For AP-PCR	Eukaryote	[16]
Primer3	CAGCTAGAA GAGACGAATCTCCA	For AP-PCR	Eukaryote	[16]
Primer4	CGC TGG ACT CTG ATG GTG TT	For AP-PCR	Eukaryote	[16]
Primer5	ATG AAT CTG CCA ACA TCG C	For AP-PCR	Eukaryote	[16]

1.3 rDNA序列的克隆、测序及序列分析方法 rDNA 序列克隆、测序按照我们以前建立并优化的方法^[6]。

根据 Adachi *et al.*^[17]的方法分析各序列结构,用 ClustalX 1.81 和 Primer5.1 等软件对拼接处理后的序列进

行比较分析。使用 BlasN search (www. ncbi. nh. nh. gov) 将所测序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对^[18], 从而获得目标序列与 Genebank 序列的相似性信息, 对序列及其所属藻株进行描述和分类界定, 在 Genebank 中对得到的序列进行登记注册。

1.4 系统进化树的构建 用 Vector NTI Suite9 软件下载和管理相关序列, 并进行初步比对, 再用 Clustal X 1.81 程序进行多重完全比对, 采用邻位连接法 (Neighbour-Joining method) 构建系统进化树, 并通过自举分析 (bootstrap) 作置信度检测, 自举数据集为 1000 次; 所获得的分支树用 Treeview 1.5.2 程序分析处理^[19]。

1.5 DGGE 电泳方法 DGGE 电泳参考文献 [11] 报道的方法。DGGE 图谱经过软件 Crosschecker 2.1 数字化处理后可得到条带位置与亮度信息。根据文献报道的方法将 DGGE 指纹图谱中位于相同位置的条带规定为一个可操作分类学单位 (OTU, Opera-

tional Taxonomic Unit)^[20]。

1.6 AP-PCR 指纹图谱分析 AP-PCR 实验方法在 Lopez *et al.*^[15] 和苟万里等^[16] 的方法基础上进行修改和优化 (包括反应体系和 PCR 程序)。选用的随机扩增引物表 2 中的 Primer1-Primer5, 将 PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 并进行 PCR 产物的指纹图谱分析。

2 结果及分析

2.1 rDNA 和 ITS 区序列的结构及同源性分析 分离自厦门海域的典型赤潮生物 *T. pulchella*、微小原甲藻、无纹环沟藻三株藻的 18S、28S rDNA、5.8S rDNA 及转录间隔区 ITS 序列在 GeneBank 中的登记注册号 (表 3)。序列结构分析显示其覆盖了 SSU rDNA 基因的 3' 端绝大部分序列甚至全长、ITS1 区、5.8S rDNA、ITS2 区域全序列以及 LSU rDNA 基因的部分序列。各序列区域大小 (表 3)。

表 3 厦门海域三种典型甲藻 rDNA 和转录间隔区序列号及序列大小

Tab. 3 The registered numbers and length of rDNA and ITS of 3 representative dinoflagellates in Xiamen harbor

藻种 / 序列 Species / sequence	18S rRNA	ITS				28S rRNA
	注册号 / 序列大小 Accession number / length	注册号 / 大小 Accession number / length	ITS1	5.8S	ITS2	注册号 / 大小 Accession number / length
<i>T. pulchella</i>	AY800130 / 1799bp	AY764179 / 211bp		159bp	217bp	AY764178 / 697 bp
无纹环沟藻	DQ084522 / 1800bp	DQ084523 / 234bp		158bp	211bp	DQ084521 / 889bp
微小原甲藻	DQ028763 / 1796bp	DQ054538 / 205bp		158bp	189bp	DQ054539 / 871bp

注: AY764179 和 AY764178 两条序列已先由国家海洋局第三研究所顾海峰博士登记

Note AY764179 and AY764178 had been registered by Dr. Haifeng Gu in the Third Institute of Oceanology, State Oceanic Administration, China

T. pulchella (TPXM) 18S rRNA 序列在 Genebank 中与 *Karlodinium micrum* (AY245692) 以及几株 *Gymnodinium galatheanum* (AF272045-272050) 等裸甲藻种类的同源性均达到 98%, 而 ITS 序列与基因库中编号为 DQ459434 的 *Karlodinium micrum* (NMBJAH047) 同源性为 (92%), Gaps 占 (1%), 与其他株差异更大。*T. pulchella* 大亚基 D1-D2 区序列长度为 721bp, 与基因库中同种相似株同源性大于 99%, 以上从分子分类方面证实我们分离得到的这株藻是 *T. pulchella*。微小原甲藻 PMDH01 的 ITS 和 28S rRNA 序列与基因库中同种序列的同源性高达 99%, 证实我们分离到的藻为微小原甲藻。无纹环沟藻 GXM01 的 ITS 与基因库中来自中国深圳海域的 4 株同种藻同源性高达 99%, 也证实我们分离得到的是无纹环沟藻。其 28S rRNA 序列与基因库中的 *Gymnodinium* sp. (AY916549)、*Gyrodinium uncatenum* (AY916541)、*Gymnodinium* sp. (U94907) 的同

源性分别为 100%、100%、99%, 提示用 GXM01 的 28S rRNA 的此段序列不足以区分其他种类。

2.2 系统进化树分析 对分离自厦门海域的三种典型甲藻及相关藻株建立了系统进化树 (图 1)。针对 23 株甲藻 ITS 序列建立的系统进化树显示, *T. pulchella* (AY764179) 和 *Karlodinium micrum* 这个种的距离最近, 形成一棵子树; 同时和 *Karenia* 及 *Gymnodinium* 的两株藻 AF318225、AF318247 也有较近的亲缘关系, 组成了一个簇。利用 ITS 构建的 *Prorocentrum* 的 5 种藻株也形成了一簇。目标生物微小原甲藻 (DQ054538) 和东海原甲藻的亲缘关系很近。厦门海域的无纹环沟藻 GXM01 (DQ084523) 和分离自深圳海域的另一株 *Gyrodinium* (AJ534386) 共同构成了进化树的一支。用大亚基构建的系统进化树显示, *Takayama* 的三种藻株形成亲缘关系很近的一支, 并与 *Karlodinium* 的两株藻 DQ114467、U92257 及 *G. galathea-*

num (AF200675) 构成距离较近的簇, 与 *Karenia* 属的两个种 AY355459、U92249 距离也较近。目标生物无纹环沟藻 (DQ084521) 距离 *Gymnodinium* 和 *Akashiwo* 属相对较近。同样, 采用大亚基构建的

Prorocentrum 的 7 种藻株也形成了亲缘关系很近的一个簇, 目标生物微小原甲藻和基因库中一株 *Prorocentrum balticum* (AF042816) 的亲缘关系极近。

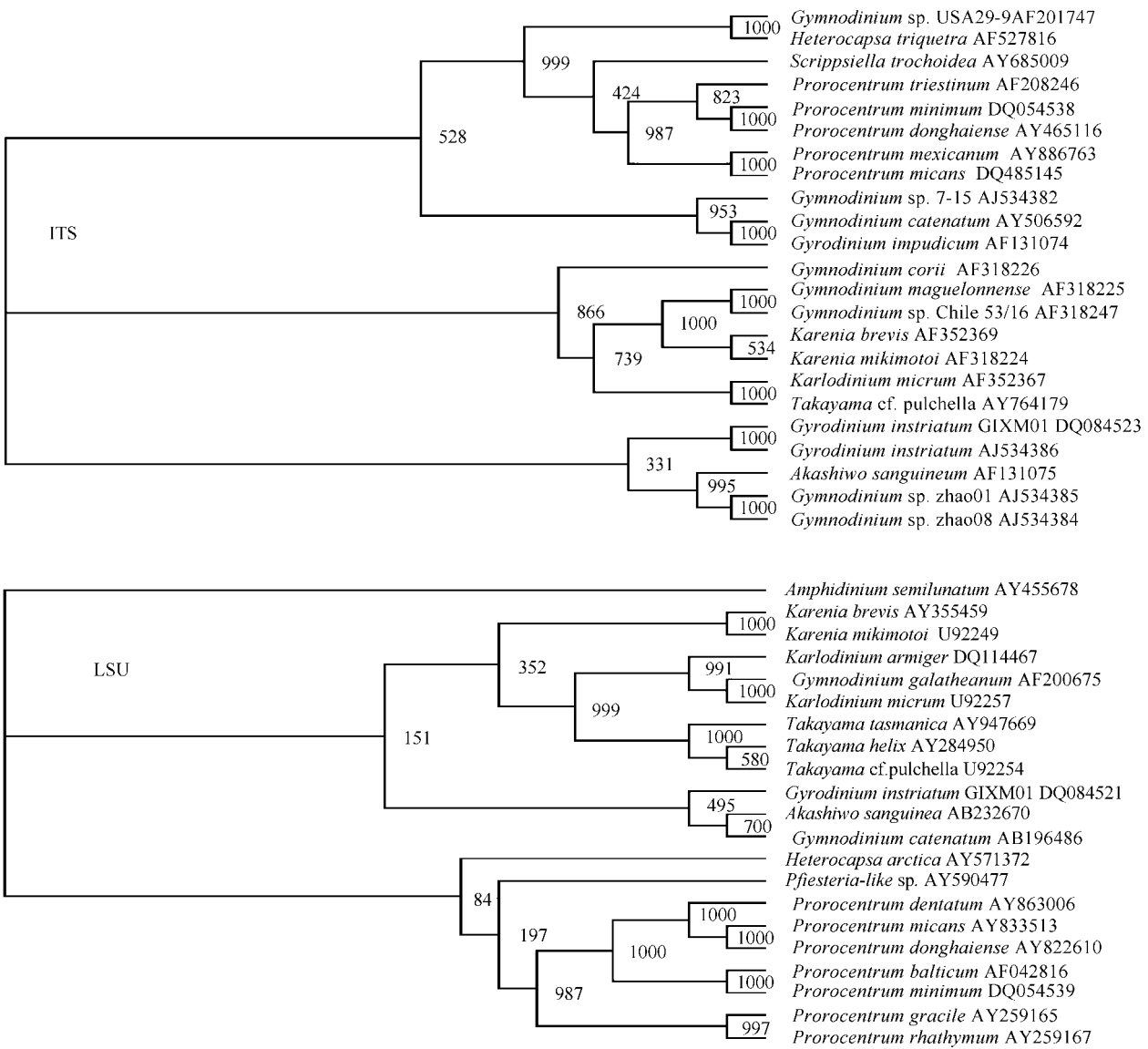


图 1 用邻位连接法建立基于 rDNA 序列的系统发育树

Fig 1 Neighbor-Joining method consensus tree resolved from rDNA nucleotide sequence (Numbers next to branching points indicate number of 1000 bootstrap s)

2.3 基于 PCR 产物分析的 DGGE 电泳结果

为了分析方便, 可将 DGGE 指纹图谱中位于相同位置的条带视为一个可操作的分类学单位 (OTU) (图 2)。为了衡量电泳系统的可靠性, 我们在第 1 泳道做了一个混合样品组成的 Marker, 其 OTU s 总数为 4, 在其余泳道均能找到混合样品中每个种类各自所对应的位置 (图 2)。图中显示, *Prorocentrum* 的

PMHK、PDDH、PMDH、PDHK、PTHK 均占据了图谱中相同的位置, 表明其处于同一个分类单位。同样, *Alexandrium* 的 ACDH01、ACDH03、ATDH01、ATDH03、ATM J01、ATM J02 也占据了图谱中相同的分类单位。*Gymnodinium* 的 KMHK、KMBJ、KBHK 则占据同一个分类学位置, 但米氏凯伦藻 KMDH、*T.pulchella* (TPXM) 和微小原甲藻 PMDH 处于同一位置, 表明此

分类单位不能有效区分这些藻类。无纹环沟藻 *GKM*、*Akashiwo* 的 *AS* (CCMP1740)、*Alexandrium* 的

AMTW、*AFGX01* 则处于与其他藻完全不同的分类位置, 表明 DGGE 指纹图谱也能区分这些藻种。

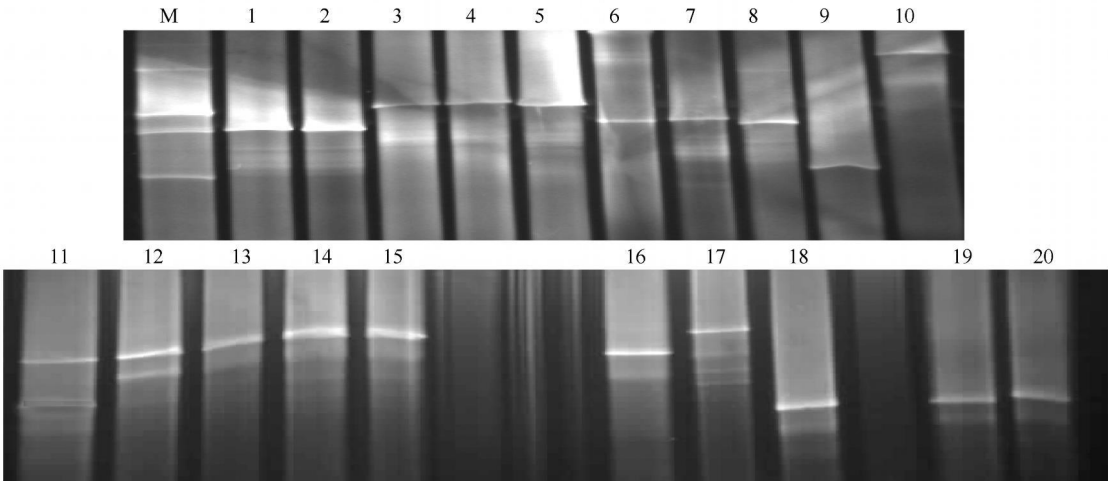


图 2 不同甲藻的 DGGE 指纹图谱

Fig 2 DGGE fingerprints of different dinoflagellate species

图中的 M 为混合对照 (M group in Fig 2 was control group of mixed algae sample); 1. PMHK; 2. PDDH; 3. KMHK; 4. KMBJ; 5. KBHK; 6. TPXM; 7. KMDH; 8. PMDH; 9. GKM; 10. AFGX01; 11. ACDH01; 12. ACDH03; 13. ATDH01; 14. ATDH03; 15. ATMJ01; 16. ATMJ02; 17. AMTW; 18. AS (CCMP1740); 19. PDHK; 20. PTHK; 各藻株的缩写详见表 1 (Abbreviations of microalgal strains were shown as Tab. 1)

2.4 AP-PCR 指纹图谱比较分析

平行样品的预实验显示电泳体系有较好的重现性和可靠性 (图 3A)。在所选用的 5 条随机引物中, 引物 4 产生了相对丰富的指纹图谱。由图 3 可见, 链状亚历山大藻 *ACDH01*、*ACDH03* 的指纹特征相似, *ATDH01*、*ATDH03*、*ATGX02* 的指纹特征也基本相同, *ACDH*、*ATDH* 系列之间指纹存在一定的差异; 塔玛亚历山大藻 *ATMJ01*、*ATMJ02* 指纹也相同, 与 *ATDH* 有一定的差异。压力山大藻属内种间的 *AFGX01*、*AMTW*、*ATDH*、*ACDH* 指纹图谱都存在差别。对于 *Prorocentrum*, 微小原甲藻 *PMDH*、*PMHK* 指纹图谱一致, 而东海原甲藻 *PDDH* 和 *PDHK* 却存在差异, *PTHK* 的指纹特征与其他的 *Prorocentrum* 都不一样。对于 *Gymnodinium*、无纹环沟藻 *GIXM*、*T.pulchella* (*TPXM*)、*Akashiwo* 的 *AS* (CCMP1740) 以及 *Karenia* 的 *KBHK*、*KMDH* 均表现出不同的指纹特征, *Karenia* 的 *KMBJ* 和 *KMHK* 的指纹特征却十分一致。结果显示, AP-PCR 指纹图谱能十分清楚地区分不同的亚历山大藻、原甲藻和裸甲藻, 甚至能区分亲缘关系十分相似的 *ATDH* 和 *ACDH* 株以及同种的不同细胞株系如 *ATDH*、*ATMJ* 和 *PDDH*、*PDHK*, 表明这些藻在全基因组序列上存在不同, 它们之间显示出遗传差异。

3 讨论

3.1 基于 rDNA 序列分析和 PCR 产物分析的分子分类特点

rRNA 及相关基因广泛适用于生物进化和生物分子标记等领域。其具备如下优点: 1) 在生物细胞中大量存在, 对蛋白质合成必需, 其生物合成量正比于细胞生长速度; 2) 这些基因容易分离和鉴定; 3) 在初级结构和次级结构中同时具备高度保守区和可变区域; 4) 目前已建立了大量 rRNA 基因序列数据库, 这对基因序列的比较分析十分有用; 5) 与已发现的其他基因不会表现出水平基因转移^[17, 21]。在藻类中, 18S 和 28S rRNA 编码区的序列比较分析已用于分类学和系统发生等方面的研究, 为设计 PCR 引物或探针提供特异性强的序列, 区别分类物种之间的亲缘关系如属、种或地理株系等问题^[21]。核糖体 18S rRNA 和 28S rRNA 基因转录间隔区 ITS 是国际上公认的生物各类群属下种间水平比较研究的一个很好的分子指标, 已经在动物、被子植物直至绿藻等方面得到广泛的应用^[17, 21]。本研究对 3 株分离自厦门海域的典型赤潮生物 *T.pulchella*、微小原甲藻和无纹环沟藻进行 PCR、克隆和测序, 将这些测序结果在基因库中 BLAST 分析, 结果表明 ITS 序列和 28S (尤其是 D1、D2 区, 无纹环沟藻除外) 能

帮助确定这三种藻的分类地位。

聚类和系统进化分析显示,用 ITS序列建立的系统发育树不能将 *Karlodinium* 属和 *Takayama* 属分开。分析 ITS序列的碱基数量, *T. pulchella* 与 *K. micrum* 最为接近, ITS1、5.8S、ITS2分别为 212、159和 216 裸甲藻科其他种类这三个区域的碱基数存在较大差异^[22],证明 ITS长度在分类上可作为有用的种类标志^[23]。以 ITS序列构建系统发育树大致能够把 *Akashiwo* 属、*Karenia* 属、*Gyrodinium* 属、*Karlodinium* 属和 *Takayama* 属与 *Gymnodinium* 属区分开来,多甲藻的种类则和 *Gymnodinium* sp. 混在一起, *Gymnodinium* 属有的种类没有能都有效地聚合在一起。原因可能是裸甲藻缺少有效分类

依据,有待我们发现并进一步地细分它们,这点因最近根据 *Takayama* 属 S形的顶沟把其从裸甲藻属中分离出来而得到验证^[24]。用大亚基序列建立的系统发育树可把 *Karlodinium* 属和 *Takayama* 属区分开^[24]。与 28S序列相比, ITS序列进化速度更快,并可经常用来在属和种的水平上作进化分析^[25],并成功地区分亚历山大属和斯氏藻属下的各个种^[17]。本研究中,用大亚基构建的进化树就不能很好地把无纹环沟藻的区分开,基因库中无纹环沟藻的 28S rDNA 序列数据也比较有限。用 ITS和 28S rDNA 构建的系统进化树都能使 *Prorocentrum* 的种类很好地聚合在一起,并能与其他属的藻类分开。

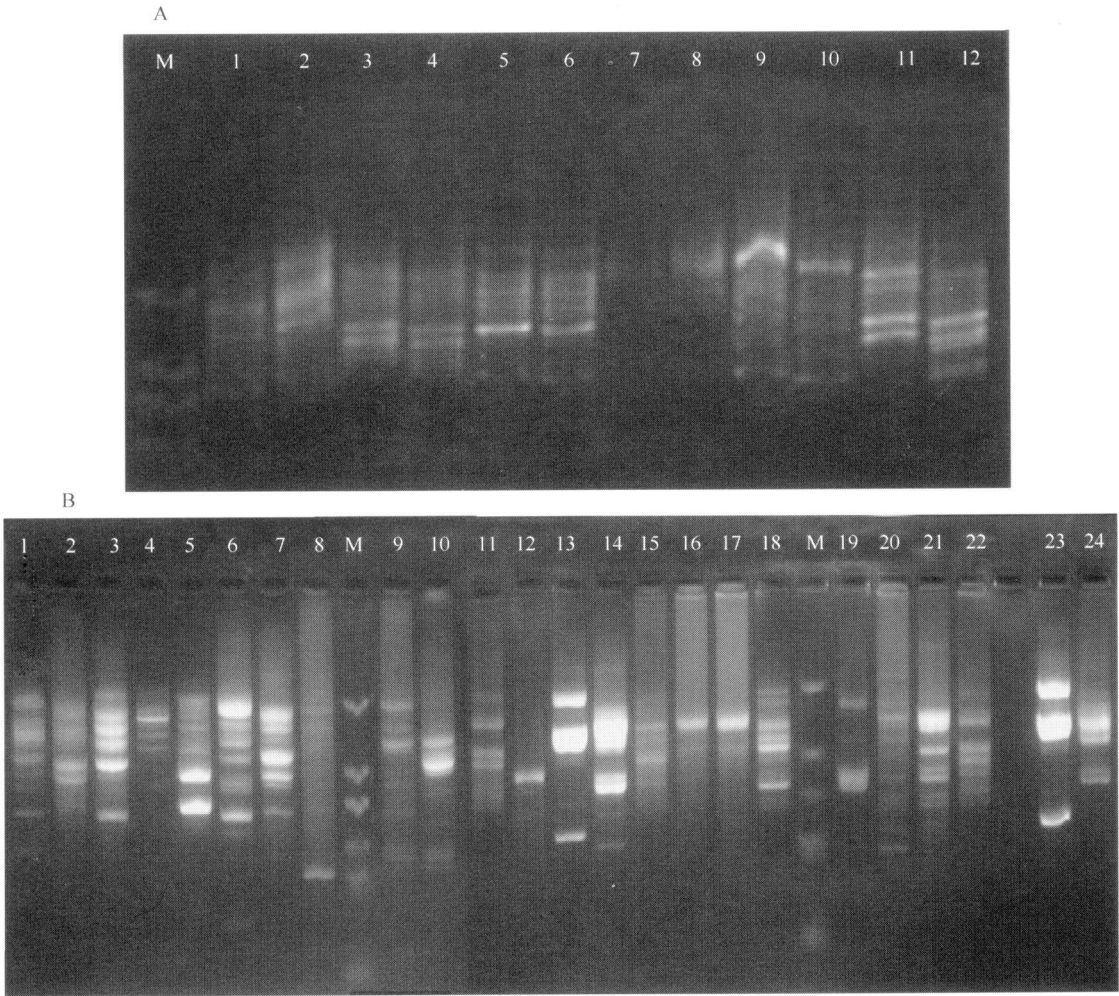


图 3 不同甲藻的 AP-PCR 指纹图谱

Fig. 3 AP-PCR fingerprint patterns of different dinoflagellate species

A 为 AP-PCR 对照重复组 (A was the control group of reduplicate AP-PCR); 1, 2 为 ACDH01; 3, 4 为 ACDH03; 5, 6 为 ATDH01; 7, 8 为 ATDH03; 9, 10 为 ATMJ01; 11, 12 为 ATMJ02。B 为 21 种藻的 AP-PCR 指纹图谱 (B was AP-PCR fingerprint patterns of 21 dinoflagellate species); 1. ACDH01; 2. ACDH03; 3. ATDH01; 4. ATDH03; 5. ATGX02; 6. ATMJ01; 7. ATMJ02; 8. GKM; 9. PMDH; 10. KMDH; 11. AFGX01; 12. AS (CCMP1740); 13. TPXM; 14. KBHK; 15. AMTW; 16. KMBJ; 17. KMHK; 18. PDDH; 19. PDHK; 20. PMHK; 21. PIHK; 22. AFGX01; 23. TPXM; 24. KBHK。M 为 Marker, 株名缩写见表 1 (M was marker, abbreviations of microalgal strains were shown as Tab. 1)

3.2 DGGE在藻华生物检测和分类上的应用

PCR-DGGE技术最早是用于 DNA 突变检测的一种电泳技术。1993 年该方法首次应用于微生物生态学的研究^[26], 目前已广泛应用于微生物多样性检测、微生物鉴定、微生物分子变异以及种群异化等方面的研究。Sgler *et al.*^[20]将 DGGE 指纹图谱中位于相同位置的条带规定为一个可操作分类学单位 (OTU)。我们采用基于 18S rRNA 可变区 PCR 引物扩增产物进行 DGGE 后可以有效区分和识别一些特定的藻类, 如无纹环沟藻 GIXM, Akashiro 的 AS (CCMP1740), 亚历山大藻的 AMTW, AFGX01。但其分辨的精度仍然存在一定的问题, 不能准确地区分 *T. pulchella* TPXM, 米氏凯伦藻 KMDH 和微小原甲藻 PMDH, 也不能对亲缘关系较近的种类如塔玛亚历山大藻和链状亚历山大藻进行区分。此种情况除了与 PCR 所选用的引物有关外, 也与方法本身有一定关系。DGGE 存在如下一些缺点: 1) 不能够确定代表性条带的绝对量; 2) 相对于全序列克隆测序而言, 此方法得到的单基因 (序列长度为 200—700bp 左右) 序列信息比较有限, 难以进行精确的系统发生关系分析^[11 20]。尽管 DGGE 方法在藻类分类鉴定方面存在缺点, 但其在微型浮游植物群落遗传结构研究中仍然是一种快速有效的技术方法, 可以得到较为全面的群落组成信息^[26]。

3.3 AP-PCR 指纹图谱技术在藻华生物检测和分类上的应用

由 AP-PCR 反应产生的指纹图谱多态性可用于鉴别亲缘关系很近个体间的差异。AP-PCR 指纹图谱相当复杂, 包含着丰富的分类信息, 且这些信息容易获得, 成本不高。因此 AP-PCR 在分类比较中分辨率很高, 甚至在系统发生分析和群体生物学研究中, AP-PCR 方法产生的多态性指纹图谱可辅助形态学特征加以分析。一般用随机引物在低严格度条件下进行 rDNA 第一和第二条链的合成来建立 RNA 群体的指纹图谱, 再用 PCR 扩增富集产物, 这样 RNA 的需要量少, 不受少量基因组 DNA 污染的影响, 可从任何样品组成中获得 10—20 个清晰可见的 PCR 产物条带, 而且是可重复的图谱, 可检测各种情形下 RNA 群体间的差异^[27]。

AP-PCR 在藻类分类鉴定的应用尚不多见。目前已有的工作如苟万里等^[16]对几种角毛藻亲缘关系进行了分子生物学分析, AP-PCR 结果显示, 实验所用的 3 种角毛藻在全基因组序列上明显不同, 表明这些亲缘关系很近的角毛藻之间存在遗传差异。

AP-PCR 指纹图谱可以清楚地区分本实验中不同的亚历山大藻、原甲藻和裸甲藻, 也能区分亲缘关系十分相似的 ATDH 和 ACDH 细胞株以及同种而地理株系不同的 ATDH 与 ATM, PDDH 与 PDHK, 表明这些藻在全基因组序列上可能存在不同。本文的这些工作证明了上述藻在整个基因组序列上的差异性, 从而为寻找种特异性的遗传标记提供参考依据; 这些信息能为研制快速检测这些藻的专一性核酸分子探针提供基础^[1]。

分子分类是传统形态学分类的重要补充, 能纠正传统形态分类对某些微型浮游植物分类的不一致和混乱。米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 最初形态学分类属于裸甲藻属 (*Gymnodinium*), 命名为米氏裸甲藻 (*Gymnodinium mikimotoi*), 后来通过分子遗传学分类分析, 则将其归为凯伦藻属 (*Karenia*)^[28]。类似的情况还有 *T. pulchella*、红色裸甲藻等裸甲藻以及角毛藻等^[16 22 24]。在最近的相关工作方面, 有研究也用基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育分析, 再次从分子水平上印证了其在整个绿藻中为单系起源的类型^[29]。总之, 分子分类可以弥补传统形态分类的不足, 帮助克服传统分类方法的困难, 二者在分类学上具有相辅相成的关系。

参考文献:

- [1] Hou J J, Chen J X, Huang B Q. Advances of molecular probes bio-techniques in application of harmful algal bloom species detection [J]. *Chin. J. of Pub Health*, 2004 **20**(9): 1127—1129 [侯建军, 陈纪新, 黄邦钦. 赤潮生物检测的分子探针技术研究进展. 中国公共卫生, 2004 **20**(9): 1127—1129]
- [2] Gontcharov A A, Melkonian M. Molecular phylogeny of *Staurastrum meyenex* Ralfs and related genera (Zygnemataphyceae, Streptophyta) based on coding and noncoding rDNA sequence comparisons [J]. *J. Phycol.*, 2005, **41**(4): 887—899
- [3] Kawai H, Sasaki H, Maeba S M. Morphology and molecular phylogeny of *Phaeostrophion irregulare* (Phaeophyceae) with a proposal for *Phaeostrophiceae* fam. nov., and a review of *Ishigeaceae* [J]. *Phycologia*, 2005 **44**(2): 169—182
- [4] Muller J, Friedl T, Hepperle D. Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and its rDNA sequences [J]. *J. Phycol.*, 2005 **41**(6): 1236—1247
- [5] Taylor F J R. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea* [M]. Elsevier New York, 1993 81—86
- [6] Hou J J, Lai H Y, Huang B Q. Comparative study on method of amplifying the rRNA of the genomes from *Gymnodinium* sp. and *Prorocentrum minimum* by PCR [J]. *Journal of Hubei Institute for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2005 **23**(1): 82—

- 85 [侯建军, 赖红艳, 黄邦钦. 用 PCR 扩增裸甲藻和微小原甲藻 rRNA 基因的方法研究. 湖北民族学院学报 (自然科学版), 2005, **23**(1): 82—85]
- [7] Janse I, Bok J, Zwart G. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **57**: 279—281
- [8] White T J, Bruns T, Lee S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J *et al.* (Eds.), *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* [M]. Academic Press Inc., New York, 1990, 315—322
- [9] Matsumoto M, Weickert C S, Beltaifa S. Catechol O-methyltransferase (COMT) mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2003, **28**: 1521—1530
- [10] Medlin L, Elwood H J, Stickel S. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions [J]. *Gene*, 1988, **71**: 491—499
- [11] Dez B, Pedraza A, Li C, Marsh T L, *et al.* Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2942—2951
- [12] Sogin M L and Gunderson J H. Structural diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs [J]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1987, **503**: 125—139
- [13] Usup G, Pin L C, Ahmad A. Phylogenetic relationship of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) to other *Alexandrium* species based on ribosomal rRNA gene sequences [J]. *Harmful Algae*, 2002, **1**(1): 59—68
- [14] Amann R J, Binder B J, Olson R J. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1919—1925
- [15] Lopez A, Xamena N, Cabre O. Analysis of genomic damage in the mutagen-sensitive *mus-201* mutant of *Drosophila melanogaster* by arbitrarily primed PCR (AP-PCR) fingerprinting [J]. *Mutat Res.*, 1997, **435**: 63—75
- [16] Gou W L, Sun J H, S Y. Molecular biological analyses of the relationship between several species of *Chaetoceros* [J]. *Chinese High Technology Letters*, 2003, **13**: 68—95 [苟万里, 孙军, 何闪英. 几种角毛藻亲缘关系的分子生物学分析. 高技术通讯, 2003, **13**: 68—95]
- [17] 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]. *J. Phycol*, 1994, **30**: 857—863
- [18] Altschul S F, Thomas L M, Alejandro A S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**: 3389—3402
- [19] Page D M. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers [J]. *Comput Appl Biosci*, 1996, **12**: 357—358
- [20] Sigler W V, Miniaci C, Zeyer J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, **57**: 17—22
- [21] Chen J X, Huang B Q, Jiao N Z, *et al.* Fluorescent *in situ* hybridization with oligonucleotide probes to identify *Alexandrium tamarense* and genus *Alexandrium* [A]. In: Ho K C, Lu S H, Yu T S (Eds.), *Recent advances in the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea* [C]. Proceedings of the International Conference on the Prevention and Management of Harmful Algal Blooms in the South China Sea (HABSCS2003), Hongkong, 2003, 81—88
- [22] Shao P, Chen Y Q, Zhou H. Genetic variability in *Gymnodiniaceae* ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis [J]. *Mar Biol*, 2004, **144**: 215—224
- [23] Steane D A, McCure B A, Clarke A E. Amplification of the polymorphic 5.8S rRNA gene from selected Australian giant kelp species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction [J]. *J. Phycol*, 1991, **27**: 758—762
- [24] Sakas M F D, Bolch C J S, Botes L. *Takayama* Gen. Nov. (Gymnodinales, Dinophyceae). A new genus of unarmored dinoflagellates with sigmoidal apical grooves including the description of two new species [J]. *J. Phycol*, 2003, **39**: 1233—1246
- [25] Colman A W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons [J]. *Trends in Genetics*, 2003, **19**(7): 370—375
- [26] Muyzer G, De Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695—700
- [27] Ling Y, Lu W F, Lu F. PCR-RFLP and AP-PCR of rbdL and ITS of dDNA show that *Taxodictyon peizhongii* (Taxodictyon, Cryptophyta) is not an intergeneric hybrid [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, **48**(4): 468—472
- [28] Daugbjerg N, Hansen G, Larsen J. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU dDNA sequence data including the erection of three new genera of unarmored dinoflagellates [J]. *Phycologia*, 2000, **39**: 302—317
- [29] Mei H, Liu G X, Hu Z Y. Phylogenetic studies of oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on 28S rDNA sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 492—498 [梅洪, 刘国详, 胡征宇. 基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育研究. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 492—498]

MOLECULAR TAXONOMY ANALYSES OF THE RELATIONSHIPS IN SEVERAL REPRESENTATIVE HARMFUL ALGAL BLOOM SPECIES

HOU Jian-Jun^{1,2,3,4,5}, LAI Hong-Yan², HUANG Bang-Qin³ and LIU Shao-Ping¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jinzhou 434000; 2. Department of Biology, Hubei Normal University, Huangshi 435002; 3. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005; 4. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 5. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract With rapid economic development and increasing pollution, some Chinese coastal waters have become eutrophic, which has resulted in a high frequency of harmful algal blooms. Rapid and unequivocal identification of harmful species has become a focal point of recent toxic algal research. At present, morphological criteria are the primary means to identify and classify harmful algae, but it is often difficult to distinguish morphologically similar species and differentiate non-toxic from toxic algae. Some new molecular taxonomy methods and related technologies must be developed and applied to differentiate non-toxic from toxic algae and to monitor the development of algal blooms in coastal waters. Application of the ribosomal DNA (rDNA) sequences to identification and classification of harmful algal bloom species are important complements for the traditionally morphological identification, and can give us more exact taxonomic informations and valuable results sometimes. Moreover, analysis of phylogenies and relationships among harmful algal bloom species using sequences of the rDNA can provide a basis on molecular probes design and can detect target algae quantitatively and rapidly. Molecular taxonomy has proved particularly useful to separate closely related species and has been the most common focus on phytoplanktonic ecology. In the present study, the gene fragments of 18S, 28S rDNA and ITS (Internal transcribed spacer) of several representative harmful algal bloom species from Xiamen harbor were amplified by polymerase chain reaction and cloned, and then their sequences were measured and analyzed by software. The variable regions of 18S rDNA were amplified by specific primer PCR and then analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. The genomic differences of these harmful algal bloom species were analyzed by AP-PCR. The different levels of molecular taxonomy were described by the above-mentioned methods, which were used to analyze the molecular taxonomy relationships in these harmful algal bloom species from Xiamen harbor. The results were as follows: 18S rDNA, detected by denaturing gradient gel electrophoresis, was too conservative and its precision to molecular taxonomy was not preferable. Molecular taxonomic method with AP-PCR based on the analysis of genomic differences was more accurate and integrated than DGGE. The analysis of rDNA sequences, especially the length and whole sequences analysis of ITS and variable domains D1 and D2 (about 721 bp) in 28S rDNA, could be more reliable and could provide more exact taxonomic informations than other methods. These taxonomic informations could offer a base and elements for the design of molecular probe which could detect, identify and classify these harmful algal bloom species. Two phylogenetic trees were constructed using ITS and partial 28S rDNA of three representative harmful algal bloom species isolated from Xiamen harbor and its correlative species. Phylogenetic tree constructed using ITS sequence of 23 species showed that *Takayama pulchella* (AY764179) was closely related to *Karlodinium micrum*, and these genera of *Akashiwo*, *Karenia*, *Gyrodinium*, *Karlodinium* and *Takayama* could also be separated from *Gymnodinium* genus approximately. Phylogenetic tree constructed using 28S rDNA (partial LSU, D1 and D2 region) sequence of 21 species could separate *Karlodinium* and *Karenia* from *Takayama*, but could not separate *Gyrodinium striatum* from *Akashiwo* and *Gymnodinium* species clearly.

Key words Harmful algal bloom species; Molecular taxonomy; rDNA (ribosomal DNA); DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis); AP-PCR (arbitrarily primed PCR)