

## 汉江硅藻水华优势种的形态及 18S rDNA 序列分析

郑凌凌<sup>1</sup> 宋立荣<sup>1</sup> 吴兴华<sup>1</sup> 庄惠如<sup>2</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108)

### ANALYSIS OF MORPHOLOGY AND 18S rDNA GENE FROM THE CAUSATIVE SPECIE RELATED DIATOM BLOOM IN HANJIANG RIVER

ZHENG Ling-Ling<sup>1</sup>, SONG Li-Rong<sup>1</sup>, WU Xing-Hua<sup>1</sup> and ZHUANG Hui-Ru<sup>2</sup>

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072 2. Fujian Normal University, College of Life Sciences, Fuzhou 350108)

关键词: 汉江水华; 冠盘藻; 小环藻; 18S rDNA

**Key words** Hanjiang River bloom; Stephanodiscus Cylindric; 18S rDNA

中图分类号: Q949.27 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)03-0562-04

我国汉江下游在 1992、1998、2000、2003 年初春曾先后多次发生水华。水华发生期间, 硅藻大量增殖, 形成肉眼可见的褐色颗粒悬浮于江水中, 使江水呈现黄褐色。在以往的研究中认为汉江硅藻水华优势种为小环藻<sup>[1,2]</sup>, 但并未从分类上展开研究。传统上硅藻种类的鉴定主要是以硅藻壳的形态及壳表面上的花纹为依据。目前国内外学者利用 18S rDNA 基因分析对水华赤潮原因种的鉴定方面也作了许多相关的研究。陈丽芬等利用 18S rDNA 序列分析确定香港海域一株棕囊藻为球形棕囊藻<sup>[3]</sup>。本文从汉江水华硅藻壳面上的花纹特征以及 18S rDNA 序列分析, 以期对汉江硅藻水华优势种的分类地位进行初步探讨。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 2003 年从汉江分离培养成功的单克隆水华硅藻优势种及 2003 年 3 月 8 日汉江水华期间采集的水样。

#### 1.2 方法

**1.2.1 硅藻壳的制作** 参照文献 [4]

**1.2.2 模板 DNA 的制备** 采用北京博大泰克生物基因技术有限公司生产的植物组 DNA 提取试剂盒。

**1.2.3 18S rDNA 的 PCR 扩增, 扩增产物纯化及连接** 自行设计用于 PCR 扩增的引物序列 18S 正向引物: 5' CCTCGGGGTGCTTTGGTGATTC 3'; 18S 反向引物: 5' TAG-GTGCGACGGGCGGTGTG 3'。反应程序为: 95℃ 变性 5min,

然后按 95℃ 30s, 61℃ 30s, 72℃ 1min 程序 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖胶中电泳。PCR 产物回收纯化采用 V-GENE 纯化试剂盒。用 Takara 18-T Vector 进行连接。

**1.2.4 转化感受态 DH5α 及转化重组子的筛选** 参照文献 [5]

### 2 结果与讨论

**2.1 实验室分离培养的水华优势种与水华期间采集的硅藻壳面上花纹比较**

为了证实从汉江分离的硅藻为水华期间的优势种, 在本实验中将水华期间采集的硅藻与实验室分离培养的硅藻的壳面电镜照片进行了对比(图版 I)。图版 I-1 为从汉江分离培养的硅藻, 图版 I-2、3 为汉江水华期间采集的水样。结果表明从汉江分离培养的硅藻壳面上的花纹与产生汉江水华优势种的壳面上的花纹特征相似, 均具束状的放射状点纹, 放射线纹深入到中心区, 中央区点纹单列, 至壳缘成为多列, 每束点纹间具有平滑间隙。由此可见在实验室分离纯化的硅藻为汉江水华优势种。

**2.2 从汉江分离的水华硅藻形态及壳面花纹特征分析**

图版 I-4 中所示为从汉江分离纯化的水华优势种。光学显微镜观察结果显示该藻为单细胞体, 细胞小型, 直径约为 8—10μm; 细胞壳面圆盘形, 带面方形; 色素体小盘状, 多

收稿日期: 2007-12-21; 修订日期: 2008-11-29

基金项目: 中国科学院知识创新项目 (KZCX2-YW-426); 国家自然科学基金重大项目 (30490232)

作者简介: 郑凌凌 (1980—), 女, 福建泉州人; 硕士研究生; 研究方向水生生物学。E-mail: zll2002331@163.com

通讯作者: 宋立荣, E-mail: lsong@ihb.ac.cn

数。以上特征可初步判断该水华硅藻隶属于硅藻门 Bacillariophyta 中心硅藻纲 Centricae 圆筛硅藻目 Coscinodiscalia 圆筛硅藻科 Coscinodiscaceae, 但与该硅藻形态特征相近的属有: 圆筛藻属 *Coscinodiscus*, 小环藻属 *Cyclotella* 和冠盘藻属 *Stephanodiscus*。

- 分属检索表<sup>[4]</sup>
1. 细胞圆柱形, 常连成或长或短的链状 ..... 直链藻属 *Melosira*

1. 细胞圆盘形或鼓形, 单细胞, 极少连成疏松的链状 ..... 2

2. 壳面边缘部分具放射状线纹与中央部分花纹不同, 并明显断开 ..... 小环藻属 *Cyclotella*

2. 壳面边缘部分与中央部分的花纹没有明显断开 ..... 3

3. 壳面具束状的放射状点纹, 中央部分点纹单列至壳缘成为多列, 每束点纹间有 1 条狭的平滑间隙 ..... 冠盘藻属 *Stephanodiscus*

3. 壳面具细的点纹至粗的网眼纹, 不成束状排列亦无平滑间隙 ..... 圆筛藻属 *Coscinodiscus*

由于汉江水华硅藻为单细胞, 因此根据分属检索表, 这种水华硅藻不属于直链藻属 *Melosira*。此种硅藻壳面上的花纹 (图版 I -1), 边缘部分的花纹与中央部分的花纹并没有断开, 因此这种水华硅藻应不属于小环藻属 *Cyclotella*。此外这种硅藻壳面上的花纹呈束状排列, 每束点纹间具有 1 条间隙, 可见这种硅藻壳面花纹特征与圆筛藻属也不相符。因

此, 这种水华硅藻应隶属于冠盘藻属 *Stephanodiscus*。

2.3 从汉江分离的水华硅藻的 18S rDNA 系列分析

利用引物对分离纯化后的汉江硅藻水华优势种进行 18S rDNA PCR 扩增, 扩增产物纯化、克隆后测序, 产物片段大小约为 1490bp。用 ClustalX 1.82 将硅藻水华优势种的 18S rDNA 基因与其他同源性较高的藻类的 18S rDNA 基因进行多序列比对, 比对结果用 Mega 3.0 软件包进行系统进化分析, 采用邻位相连 (Neighbor joining) 算法<sup>[6]</sup>, 经 Consensus 程序计算多数一致树, 构建了进化树, 进化距离计算采用 Felsenstein 的最大可能性 (Maximum likelihood) 算法<sup>[7-9]</sup>。结果如图 1 所示, *cyc* (待确定的优势种) 与外类群 *Melosira varians* 亲缘关系最远, 与 AY485495、AY485518 亲缘关系次之, 而与 DQ514914、DQ514906、DQ514916、DQ514909、DQ514010 这几种藻的亲缘关系比较接近。它们之间的相似性比较可得, 待确定的优势种 *cyc* 与 DQ514914、DQ514906、DQ514916、DQ514909、DQ514010 相似性达到 99%, 与 AY496207、AY496209、AJ535172、AY496208 相似性达到 94%, 与 AY485499 相似性为 92%, 与 AY485495、AY485518 相似性为 84%, 而与 AY569590 的相似性仅为 80.7%。因此汉江水华优势种与冠盘藻属的遗传距离比较近, 与小环藻属遗传距离次之, 而与直链藻属遗传距离则较远, 该水华硅藻应隶属于冠盘藻属。

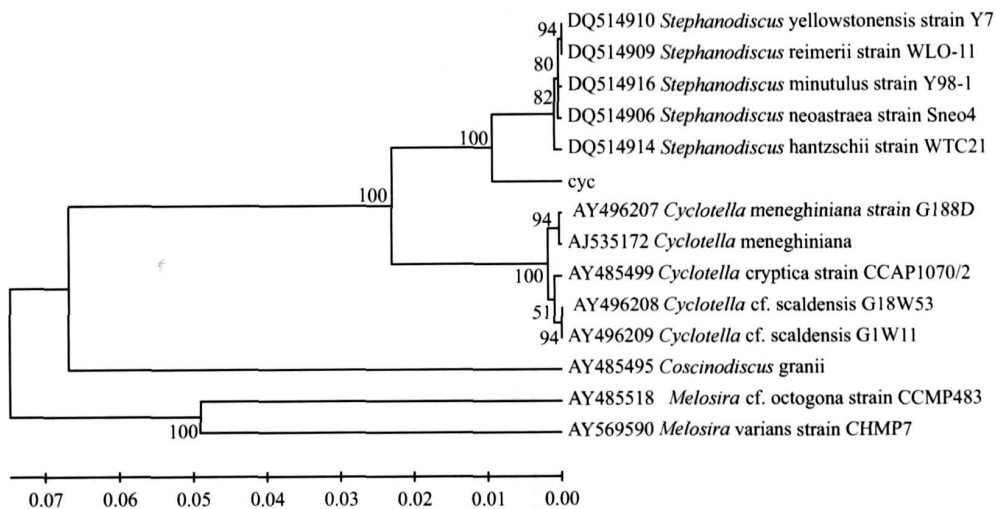


图 1 邻近种间亲缘关系图 (NJ 法)

Fig. 1 The relationship between neighbour species (NJ)

3 结 论

将此水华优势种形态学及壳面花纹特征与 18S rDNA 序列结合起来进行分析, 此水华优势种应隶属于 *Stephanodiscus* 属。齐雨藻等对中国的 *Stephanodiscus* 属进行了研究, 认为中国的 *Stephanodiscus* 属主要产于淡水水域, 在湖泊、水库、河流中均有分布<sup>[10]</sup>。Kyong et al. 报道 Nakdong 河在冬末

初春, *Stephanodiscus* 大量增殖, 形成水华<sup>[11]</sup>。因此, 从生态学的角度, *Stephanodiscus* 极有可能在河流中形成水华。

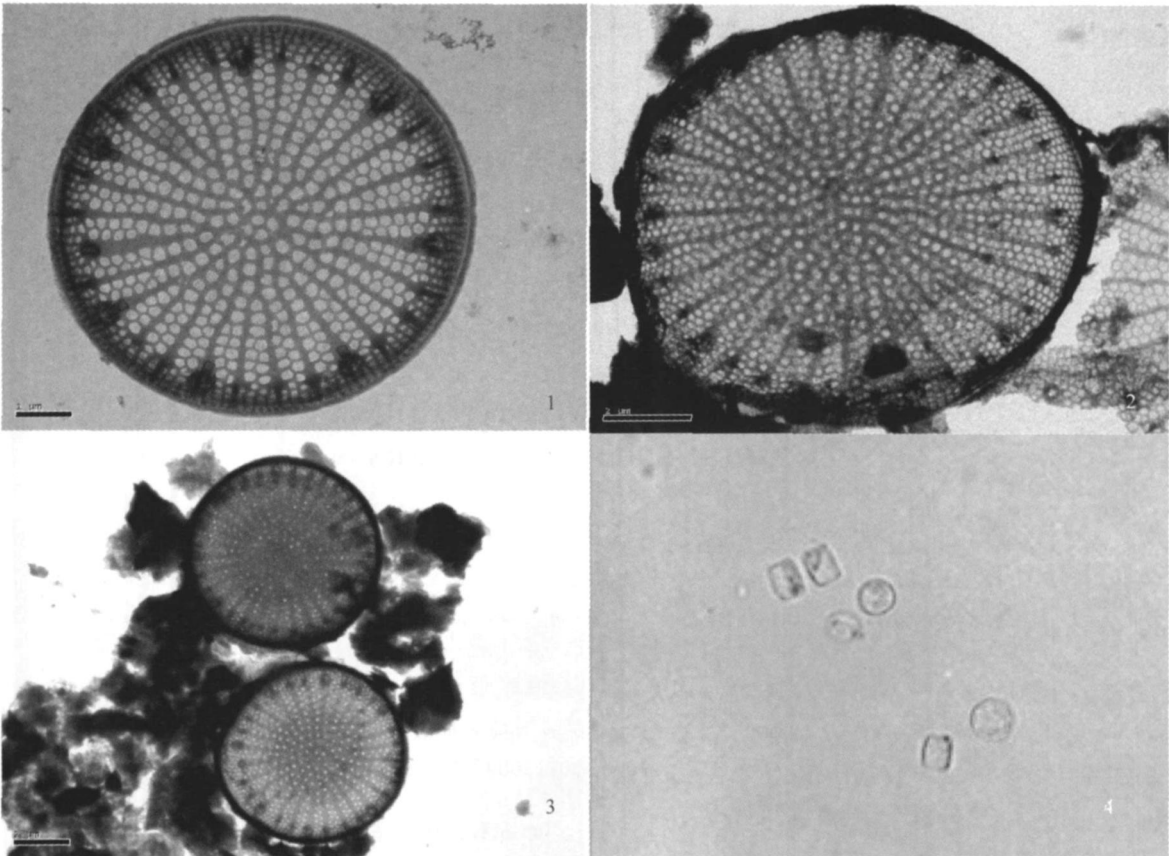
致谢:

本文中硅藻壳面花纹特征分析曾蒙厦门大学大学生命科学学院高亚辉教授的悉心指导, 特此表示感谢!

参考文献:

[1] Dou M, Xie P, Xia J et al Study on algal bloom in Hanjiang

- River [ J ]. *Advances In Water Science*, 2002, **13**( 5 ): 557—561  
[ 奚明, 谢平, 夏军, 等. 汉江水华问题研究. 水科学进展, 2002, **13**( 5 ): 557—561 ]
- [ 2 ] Lu D Y, Liu P G, Fan T Y, *et al* The investigation of Water Bloom in the downstream of the Hanjiang River [ J ]. *Research of Environmental Sciences*, 2000, **13**( 2 ): 28—31 [ 卢大远, 刘培刚, 范天俞, 等. 汉江下游突发“水华”的调查研究. 环境科学研究, 2000, **13**( 2 ): 28—31 ]
- [ 3 ] Chen L F, Zhang Q, Luo Y M, *et al* Molecular identification of the Hongkong strain P2 of *Phaeocystis* as *Phaeocystis globosa* [ J ]. *Ecologic Science*, 2003, **22**( 22 ): 349—350 [ 陈丽芬, 章群, 骆育敏, 等. 18S DNA 序列分析鉴定棕囊藻香港株 P2 为球形棕囊藻. 生态科, 2003, **22**( 22 ): 349—350 ]
- [ 4 ] Hu H J, Wei Y X. The Freshwater Algae of China Systematics Taxonomy and Ecology [ M ]. Beijing: Science Press, 2006, 303—313 [ 胡鸿钧, 魏印心编著. 中国淡水藻类——系统、分类及生态. 北京: 科学出版社. 2006, 303—313 ]
- [ 5 ] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al* Short Protocols in Molecular Biology [ M ]. John Wiley & Sons, Inc. 1995
- [ 6 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [ J ]. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**( 4 ): 406—425
- [ 7 ] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach [ J ]. *J Mol Evol*, 1981, **17**( 6 ): 368—376
- [ 8 ] Felsenstein J. Distance methods for inferring phylogenies: justification [ J ]. *Evolution*, 1984, **38**: 16—24
- [ 9 ] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [ J ]. *Evolution*, 1985, **39**: 783—791
- [ 10 ] Qi Y Z, Xie S Q, Edward Theriot. Studies on *Stephanodiscus* in China [ J ]. *Bulletin of Botanical Research*, 1990, **10**( 1 ): 57—58 [ 齐雨藻, 谢淑琦, 爱. 泰里奥. 中国冠盘藻属的研究. 植物研究, 1990, **10**( 1 ): 57—58 ]
- [ 11 ] Kyong H, Min H o J, Geun Jae J. Winter *Stephanodiscus* bloom development in the Nakdong River regulated by an estuary dam and tributaries [ J ]. *Hydrobiologia*, 2003, 506—509 ( 1—3 ): 221—227



图版I     *Plat*

1. 从汉江分离培养的藻种 (10000倍); 2. 汉江水华期间采集的水样 (8000倍); 3. 汉江水华期间采集的水样 (4000倍); 4. 光学显微镜下水  
华优势种形态示意图 (10×40)
1. Electron microscope photo of the strain isolated from Hanjiang River (10000×); 2. Electron microscope photo of the sample collected from Hanjiang  
River (8000×); 3. Electron microscope photo of the sample collected from Hanjiang River (4000×); 4. Light microscope photo of the strain isolated  
from Hanjiang River (10×40)