

赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区 序列测定与分析*

庄 丽 陈月琴¹⁾ 李钦亮 屈良鹄

(中山大学生物工程中心 广州 510275)

(国家海洋局北海监测中心 青岛 266033)

提要 采用 PCR 及克隆测序的方法,对 1998 年引发渤海赤潮的叉角藻 18S rRNA 基因及 rDNA ITS 区(Internal Transcribed Spacer Regions)进行了序列测定与分析。并通过因特网从国际分子生物学数据库中获得甲藻另外 15 个种的 18S rDNA 序列,以 *Tetrahymena corlissi* 作为外类群,分别采用 Neighbor-Joining 和 Fitch 方法构建了甲藻较为一致和可靠的进化树图,探讨具有高度多样性和在分类上争议较多的甲藻各类群之间的形态与分子进化关系。结果表明, *Prorocentrum* (有 2 个简单的壳板) 出现得较早,而大多数多甲藻目(覆盖着多个壳板)、裸甲藻目(大多数不具壳板)和膝沟藻目的成员较晚出现。另外,对叉角藻 ITS 区的分析表明,ITS 区为高变区,是良好的分子标记,可用于叉角藻快速鉴定的专一性核酸分子探针的研制。

关键词 叉角藻, 18S rDNA, ITS 区, 形态演化, 分子进化

中图分类号 Q75

甲藻(dinoflagellate)是重要的浮游植物类群,是形成海洋灾害——赤潮的主要门类。甲藻中有 120 多种能形成赤潮,近 60 种为有毒种类(齐雨藻, 1999)。叉角藻(*Ceratium furca*)为其中一种,是诱发 1998 年渤海赤潮的原因种之一。面对日益恶化的海洋环境,赤潮发生频率不断增加,因此,对沿海海域诱发赤潮发生的海洋甲藻进行快速准确的检测、鉴定及监控是目前赤潮生物学和环境学研究的热点之一(洪君超等, 1994; 黄奕华等, 1997; 何家菀等, 1999; 黄长江等, 2001)。

甲藻具有很高的形态多样性,同时某些形态特征具有可变性,其野生种和实验室培养种有较大差异,加上有关甲藻分类方法缺乏较为完整、系统的指导性标准,因此目前对甲藻分类存在较大的争议。如分类学中探讨甲藻各大类群演化关系的主要依据是鞭毛的着生位置及壳板的数目和形状,但是,这些性状具有可变性,当涉及到各类之间的演化关系时,存在较多问题。例如:无细胞壁或细胞壁很薄的裸甲藻(大多数不具壳板)和多甲藻(覆盖着多个壳板)相比,哪一种更为原始?等等。

20 世纪 90 年代以来,分子生物学技术的迅速发展,为探讨甲藻分子进化问题及分类

* 国家自然科学基金资助项目, 39770058 号。庄 丽, 女, 出生于 1972 年 4 月, 硕士生, E-mail: lshrc04@zsu.edu.cn

1) 通讯作者

收稿日期: 1999-10-08, 收修改稿日期: 2000-03-20

鉴定提供了新的手段(Inagaki *et al.*, 1997; Zardoya *et al.*, 1995)。目前,被广泛应用于甲藻系统发育研究的分子指标有大分子 rDNA 及其基因间隔区 ITS 区(Internal Transcribed Spacer)等。本研究对我国海区分离到的赤潮叉角藻 18S rDNA 及 ITS 区进行序列测定及分析,拟找出其特征性核苷酸序列,为研制快速鉴定赤潮叉角藻的核酸分子探针奠定基础。同时应用距离矩阵方法,对属于甲藻纲多甲藻目(Peridinales)等各大目的 16 个代表种的 18S rDNA 进行序列比较分析,探讨其形态与分子进化之间的关系以及进化模式。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的藻种为赤潮叉角藻(*Ceratium furca*), 采自辽宁省葫芦岛市港内, 由国家海洋局北海监测中心生物室李钦亮工程师鉴定。另外 16 个种的 rDNA 序列来自基因库, 见表 1。

表 1 本研究所用材料的种名、缩写、所属目及在基因库中的注册号码

Tab. 1 List of the investigated dinoflagellate species, their abbreviation, order, and Genbank accession number

种名	缩写	所属目	注册号码
<i>Ceratium furca</i>	<i>C. fr.</i>	Gonyaulacales	AJ276699
<i>Prorocentrum panamensis</i>	<i>P. p.</i>	Prorocentrale	PSPY16233
<i>Gymnodinium catenatum</i>	<i>G. c.</i>	Gymnodinales	AF022193
<i>Gymnodinium mikimotoi</i>	<i>G. m.</i>	Gymnodinales	AF022195
<i>Gymnodinium</i> sp.	<i>G. sp.</i>	Gymnodinales	AF022196
<i>Lepidodinium viride</i>	<i>L. v.</i>	Gymnodinales	AF022199
<i>Cryptoperidiniopsis brodyi</i>	<i>C. b.</i>	Cryptoperidiales	AF08097
<i>Heterocapsa triquetra</i>	<i>H. t.</i>	Peridinales	AF022198
<i>Pentapharsodinium tyrrhenicum</i>	<i>P. t.</i>	Peridinales	AF022201
<i>Peridinium</i> sp.	<i>P. sp.</i>	Peridinales	AF022202
<i>Cathonina hallii</i>	<i>C. h.</i>	Peridinales	AF033865
<i>Gloedinium viscum</i>	<i>G. v.</i>	Phytodinales	GDIRGSS
<i>Ceratium fusus</i>	<i>C. fs.</i>	Gonyaulacales	AF022153
<i>Alexandrium tamarense</i>	<i>Al. t.</i>	Gonyaulacales	AF022191
<i>Ceratium tenue</i>	<i>C. t.</i>	Gonyaulacales	AF022192
<i>Alexandrium minutum</i>	<i>Al. m.</i>	Gonyaulacales	AMU27499
<i>Tetrahyena corlissi</i>	<i>T. c.</i>	Hymenostomatida	TCU17356

1.2 DNA 的制备、18S rDNA 和 ITS 区的 PCR 扩增反应

1.2.1 DNA 的制备 从显微镜下挑取数个藻细胞(经福尔马林固定)于 0.5ml 的离心管中,加入 25μl 提取缓冲液(1%SDS, 10mmol/L EDTA, pH= 8.0, 10mmol/L Tris-HCl, pH= 7.5, 10mmol/L NaCl), 采用本实验室研制的 DPS 纯化系统直接从提取缓冲液中获取微量 DNA, 用于 PCR 扩增(陈月琴等, 1997)。

1.2.2 18S rDNA 和 ITS 区的 PCR 扩增反应 18S rDNA PCR 引物为: Dino18N1: 5' TGTCTCAAAGATTAAGCCATG3', Gym18(-): 5' ACTTCTCCTTCCTCTAAGTGA3', 分别对应于 18S rDNA 的 5' 末端和 3' 末端区域, 为甲藻的专一性引物; rDNA ITS 区扩增

引物为 LH₂: 5' AGGTGAACCTGCGGAAGGATC3', Dlam(甲藻专一性引物): 5' CCT-GCAGTCGACA(TG)ATGCTTAA(AG)TTCAGC(AG)GG3', 分别对应于 18S rDNA 3' 末端和 24S rDNA 5' 末端区域; 在中国科学院上海生物化学研究所合成。扩增完成后, 取 2μl 于 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查, 其余在 -20℃ 保存备用。

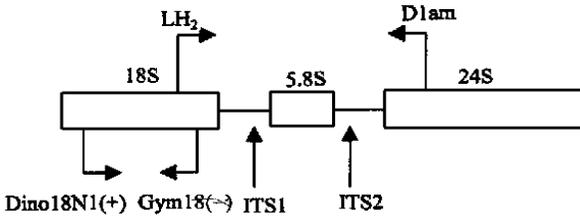


图 1 引物 Dino 18N1(+) 和 Gym18(-)、LH₂ 和 Dlam 分别扩增赤潮叉角藻 18S rDNA 及 ITS 区示意图

Fig. 1 Diagram of PCR amplification of 18S rDNA and ITS regions of *Ceratium furca* by using Dino 18N1(+) / Gym18(-) and LH₂/ Dlam, respectively

1.3 rDNA PCR 扩增产物的序列测定、比较分析与数据处理

PCR 扩增产物经 QIAquick spin column 系统纯化后, 与质粒 PTZ19 连接、克隆(萨姆布鲁克等, 1992)。使用 377 型自动测序仪(ABI PRISM)测定重组质粒的 DNA 序列。

按照最大同源性的原则将所测得序列进行排列, 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。采用计算机分析软件包 Phylip35

(Felsenstein, 1993)¹⁾ 中的 DNAdist 程序进行序列核苷酸差异值(Knuc values)的计算, 再以 Neighbor-Joining 和 Fitch 方法构建甲藻分子系统进化树。

2 结果与讨论

2.1 甲藻 18S rDNA 及 ITS 区的 PCR 扩增

由于所采集的样品为赤潮发生时自然水体, 除含有叉角藻外, 显微镜下观察还有链状亚历山大藻和鳍甲藻及原生动物等。为了避免其它藻类和原生动物的影响, 直接在显微镜下挑取单个叉角藻, 采用单个细胞法进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 具有较好的重复性, 且该方法不依赖微藻培养技术的完善。同时, 为了避免 18S rDNA 5' 端的“假结”结构, 设计了甲藻专一性引物 Dino18N1(+), Cym18(-) 和 Dlam, 分别为甲藻属 18S rDNA 5' 末端(32-52)和 3' 末端, 24S rDNA 5' 末端保守序列。PCR 结果见图 2。18S rDNA PCR 产物约为 1700bp; rDNA ITS 区则约为 500bp(包括 18S 3' 末端和 24S 5' 末端 rDNA 部分序列)。

2.2 叉角藻 18S rDNA 的序列测定与分析

叉角藻 18S rDNA PCR 产物经纯化、克隆后于自动测序仪进行序列测定, 共测得 1841 碱基对核苷酸序列, 其 G+C 含量为 44.1%。

将所测得序列输入国际分子生物学数据库(Genbank), 并通过因特网从国际分子生

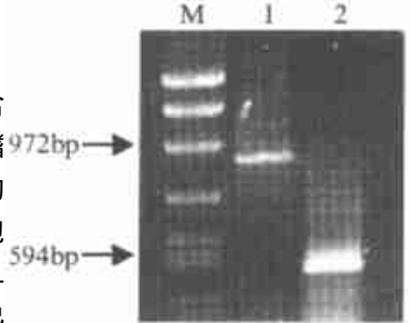


图 2 赤潮叉角藻 18S rDNA 及 ITS 区扩增

Fig. 2 18S rDNA and ITS regions PCR amplification of red tide-related *Ceratium furca*
M. 2kb marker;
1. 18S rDNA; 2. rDNA ITS

1) Felsenstein J, 1993. Phylip- Phylogeny Inference Package, Version 3.5. Distributed by the author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle

物学数据库中获取甲藻另外 15 个种的 18S rDNA 序列。序列分析比较结果表明,角藻属的 3 个种: *Ceratium furca*、*C. tenue* 和 *C. fusus* 的 18S rDNA 具有很高的保守性。如在 611 位点,此 3 个种皆为 A,而其余 13 个甲藻为 G。又如在 461 位点,此 3 个种皆为 T,而其余 13 个甲藻皆为 C。

2.3 叉角藻 ITS 区序列测定与分析

共测得叉角藻 ITS 区序列 438bp。其中,ITS1 为 149bp,5.8S 为 157bp,ITS2 为 132bp。

通过因特网从国际分子生物学数据库中获取甲藻另外 6 个种的 ITS 区序列进行分析比较。结果表明,所测定的叉角藻 ITS 区长度与同一个目的另外一个种 *Alexandrium pseudogonyaulax* 较为相似。同时也发现,甲藻四大目之间 5.8S rDNA 非常接近,都在 160bp 左右,表明 5.8S rDNA 是一个非常保守的区域。该结果还表明,无细胞壁或细胞壁较薄的裸甲藻类 ITS 区较长;有 2 个简单壳板的原甲藻类次之;膝沟藻目较短;而细胞壁覆盖着较多壳板的多甲藻目 ITS 区最短。ITS 区长度从裸甲藻→原甲藻→膝沟藻→多甲藻呈现规律性的递减,这是否预示着甲藻这四大目之间在分子进化方面存在某种趋势?此问题有待进一步研究。

另外,对叉角藻 ITS 区的分析表明,ITS 区为高变区,是良好的分子标记,可用于快速鉴定叉角藻的专一性核酸分子探针的研制。这些结果为赤潮叉角藻的鉴定及系统学研究提供了分子基础。

表 2 甲藻 5.8S rDNA and ITS 区长度的比较

Tab. 2 Length of the 5.8S rDNA and ITS regions among several ITS types

种名	所属目	ITS1	5.8S	ITS2	总长度(bp)	注册号码
<i>Ceratium furca</i>	Gonyaulacales	149	157	132	438	AJ276700
<i>Coolia monotis</i>	Peridiniales	165	163	> 27	> 355	AF076467
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	Peridiniales	166	156	> 44	> 366	AF076217
<i>Alexandrium pseudogonyaulax</i>	Gonyaulacales	184	161	165	510	Aboo6997
<i>Prorocentrum micans</i>	Prorocentrales	211	160	199	565	PMIRG17S
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	Gymnodiniales	260	160	237	657	AF131075
<i>Gyrodinium impudicum</i>	Gymnodiniales	179	160	268	607	AF131074

2.4 甲藻形态与分子进化

目前,世界上现存甲藻约 4000 多种,包含两大类: Dinophyceae 和 Syndinophyceae。Syndinophyceae 仅为少数的寄生种类,约 40 个种,而通常所指的甲藻主要为前者——Dinophyceae。

鞭毛的着生位置及壳板的数目和形状是 Dinophyceae 目间分类的主要依据,据此划分出多甲藻(Peridiniales)、原甲藻(Prorocentrales)、膝沟藻(Gonyaulacales)、鳍藻(Dinophysiales)和裸甲藻(Gymnodiniales)等目,为现存甲藻主要代表,也是海洋甲藻的常见类群。

目前,根据壳板的数目和排列方式,存在三种解释甲藻各目间系统关系的假说。

(1) 壳板递增模型 从生物学角度推断有壳板的原甲藻目和多甲藻目代表较原始的类群,而裸甲藻目是分化或更先进的类群。

(2) 壳板递减模型 根据中生代的化石记录,认为大量的薄壁发展成较少数目的壳板,因而裸甲藻目是最原始的,原甲藻目较为先进。

(3) 壳板断裂模型 结合生物学和古生物学证据,认为原甲藻目代表最古老的一支,其细胞壁由两块壳板组成,通过壳板分化成膝沟藻和多甲藻;而另有一支通过壳板减少演化成不被壳的裸甲藻(Bujak *et al*, 1981; Goodman, 1987)。由于缺乏足够的证据,这些假说未能得到进一步的证实和发展。

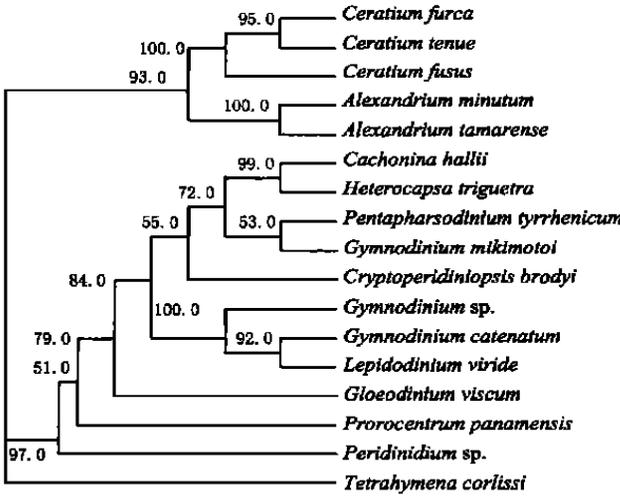


图3 以 Fitch 方法构建的甲藻分子系统树

Fig.3 Dinoflagellate phylogeny tree based on the distance matrix using the Fitch method

注:以 *Tetrahymena corlissi* 作为外类群,根据核苷酸差异值 (Knucc values)计算

在测定和分析叉角藻 18S rRNA 基因的基础上,从国际分子生物学数据库(Genbank)中获取甲藻另外 15 个种的 18S rDNA 序列。采用 Phylip35 计算机分析软件中的 Seqboot 程序生成 100 个自展数据集;以 *Tetrahymena corlissi* 作为外类群,应用 Neighbor - Jionig method 和 Fitch 方法¹⁾,经 Consensus 程序计算多数一致树,构建了较为一致的甲藻分子系统树(图 3)。从图 3 可以看出,甲藻的演化大致可以分为两大分支,一支为膝沟藻目的甲藻株系;另外一支中,属于多甲藻目的 *Peridinium sp.* 先出现,接着是原甲藻目的 *Prorocentrum panamensis* 和 *Phyto-*

diniales 目的 *Gloeodinium viscum*,再接着分为两支,分别为多甲藻目和裸甲藻目的成员。

传统的鉴定裸甲藻方法是按照其很不明显的形态学特征(即不披壳)来决定的,这远远不足以建立可靠的分类系统,因此,分子生物学方法可能是对其一个很好的补充。这也解释了为什么按照形态学特征鉴定为裸甲藻的 *Gymnodinium mikiimotoi* 在系统树中与多甲藻目的成员较为接近,而与裸甲藻目的其它株系相隔较远。

从系统树上还可以看出, *Prorocentrum panamensis*(有 2 个简单的壳板)的出现相对较早,而大多数多甲藻目(覆盖着多个壳板)、裸甲藻目(大多数不被壳)和膝沟藻目(覆盖着多个壳板)的成员较晚出现,且出现的时间比较接近,表明甲藻各大目之间是平行演化的。同时还表明裸甲藻细胞裸露可能是次生演化的结果。这些结论与 Lenaers 等(1989, 1991)根据 24S rRNA 序列分析得到的结果大部分一致。Lenaers 等(1989, 1991)通过分析甲藻 7 个目 13 个种的 24S rRNA 高变区 D1 和 D8 序列,以 *Tetrahymena thermophila* 为外类群构建系统树,发现原甲藻、多甲藻和裸甲藻都不是最原始的类群,而是较晚出现的平行发展的较为先进的类群。Zardoya 等(1995)对原甲藻、多甲藻和裸甲藻 3 个目 10

1) 同第 153 页脚注。

个种的 24S rRNA D1/D2、D9/D10 分析比较,也得到与 Lenaers 基本相同的结论。这表明,壳板的数目和形态用于甲藻进化的研究并不是有效指标。从这些 rRNA 分子序列比较得到的结果来看,以前主要建立在壳板的递增、递减和断裂基础之上的进化模式可能需要重新考虑。

3 结论

对具有高度多样性和在分类上争议较多的甲藻类群,采用 18S rDNA 序列分析方法能够较好地推断各类群之间的系统演化关系,表明分子生物学方法是传统形态分类学的很好补充。同时,通过对叉角藻及相关类群 ITS 区的分析比较,可以看出 rDNA ITS 区用于该类群专一性核酸分子探针的研制是良好的分子标记。

参 考 文 献

- 齐雨藻, 1999. 赤潮. 广州: 广东科技出版社, 6—7
- 陈月琴, 屈良鹤, 邱小忠等, 1997. 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), 36(4): 66—69
- 何家苑, 施之新, 张银华等, 1999. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析. 海洋与湖沼, 30(2): 172—179
- 洪君超, 黄修清, 蒋晓山等, 1994. 长江口中肋骨条藻赤潮发生过程环境要素分析——营养盐状况. 海洋与湖沼, 25(2): 179—184
- 黄奕华, 楚建华, 齐雨藻等, 1997. 南海大鹏湾盐田海域肋骨条藻数量多元分析. 海洋与湖沼, 28(2): 121—127
- 黄长江, 董巧香, 2001. 1998 年春季珠江口海域大规模赤潮原因生物的形态分类和生物学特征 III. 海洋与湖沼, 32(1): 1—6
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 金冬雁, 黎孟枫, 张 励等译, 1992. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 34—60
- Bujak J, Williams G, 1981. The evolution of dinoflagellates. *Can J Bot*, 59: 2077—2087
- Goodman D K, 1987. Dinoflagellate cysts in a ancient and modern sediments. In: Taylor J F R ed. *The Biology of Dinoflagellates*. *Bot Monog*, 21: 649—722
- Inagaki Y, Hayashi- Ishimaru Y, Ehara M *et al*, 1997. Algae or protozoa: phylogenetic position of euglenophytes and dinoflagellates as inferred from mitochondrial sequences. *J Mol Evol*, 45(3): 295—300
- Lenaers G, Maroteaux L, Michot B *et al*, 1989. Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J Mol Evol*, 29: 40—51
- Lenaers G, Scholin C, Bhaud Y *et al*, 1991. A molecular phylogeny of Dinoflagellate Protists (Pyrrophyta) inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8. *J Mol Evol*, 32: 53—63
- Zardoya R, Costas E, Lopez- Rodas V *et al*, 1995. Revised Dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large- subunit ribosomal RNA gene sequences. *J Mol Evol*, 41: 637—645

**SEQUENCE DETERMINATION AND ANALYSIS OF 18S rDNA
AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER REGIONS OF RED
TIDE- RELATED *CERATIUM FURCA***

ZHUANG Li, CHEN Yue- Qin, LI Qin- Liang, QU Liang- Hu
(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou, 510275)
(Beihai Minorng Center, State Oceanic Administration, Qingdao, 266033)

Abstract The sequences of 18S rDNA and ITS regions were determined from a red tide- related species *Ceratium furca* collected from Huludao City, Liaoning Province, in 1998. Sequence alignments over 1700 nucleotides of 18S rDNA of *Ceratium furca* and other fifteen representative species of dinoflagellates from Genbank have been analyzed in order to investigate phylogenetic relationships within this highly divergent and taxonomically controversial group. A coherent and convincing evolutionary tree was obtained, using *Tetrahymena corlissi* as the outgroup. The reconstructed phylogeny indicates that the early emergence of *Prorocentrum panamensis* (characterized by two thecal plates) preceded that of most Peridinales, a large order of thecate species, whereas the unarmored Gymnodinales appeared more recently, along with members of the Gonyaulacales. Our results also show that the internal transcribed spacer of rDNA had a high level sequence divergence, suggesting the sequence may be a well- suited target sequence for developing genus and species- specific oligonucleotide probes. These results provide new perspectives on proposed evolutionary trees for the dinoflagellates based on morphology, biology, and fossil records.

Key words *Ceratium furca*, 18S rDNA, ITS regions, Morphology evolution, Molecular evolution