

文章编号: 0529-6579 (2000) 01-0127-02

1997 粤东海域棕囊藻赤潮原因种 18S rDNA 基因分析^{*}

王 宁¹, 陈月琴¹, 屈良鹄¹, 吕颂辉², 齐雨藻²

(1. 中山大学生物工程研究中心, 广州 510275; 2. 暨南大学水生生物研究所)

关键词: 赤潮棕囊藻; 18S rDNA; 序列分析

中图分类号: Q949. 24; Q751 **文献标识码:** A

近年来, 随着沿海城市工农业的高速发展, 大量含有氮、磷等营养元素的污水排入大海, 导致海水富营养化的加剧, 有毒藻类赤潮分布范围及出现频率明显增加. 1997 年 7~12 月我国东南沿海水面首次发生大规模的棕囊藻类 (*Phaeocystis*) 有毒赤潮, 其持续时间长, 危害大, 给水产养殖造成严重损失, 同时对渔民生活构成一定的威胁.

Phaeocystis 隶属于 *Prymnesiophytes* 或 *Haptophytes*. 该类群大多数种类的生活史比较复杂, 不仅有群体和游动性的单细胞二个阶段, 同时还有微孢子、大孢子等生殖过程, 因此种的形态学鉴定非常困难^[1]. 本研究采用分子生物学技术, 以核糖体 18S rDNA 为分子指标, 对我国粤东海域采集到的赤潮棕囊藻标本进行研究, 并结合其形态学特征及与其它海区的种类或株系比较, 从基因水平对诱发 1997 年粤东海域赤潮的原因种进行鉴定, 为赤潮动力学机理的研究提供分子水平的资料.

1 材料和方法

1.1 样品采集 1997 年 11 月, 用 10 号和 25 号浮游生物网在广东省汕头地区饶平县柘林镇的大门港和小门港海面赤潮藻进行采集, 并带回实验室进行形态特征观察及藻种分离; 由暨南大学水生生物研究所采集和分离培养. 采集时水温为 20℃ 左右, pH 为 7.0.

1.2 18S rDNA 的 PCR 扩增反应及序列测定 将收集的少数藻细胞置于 0.5 mL 的 Ependorf 管中, 加入 25 μ L 提取缓冲液 ($\rho=1\%$ SDS, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L NaCl); DNA 的制备以及 PCR 扩增反应条件等见文献 [2]. 18S rDNA PCR 扩增引物为: 18N1: 5' GGATCAGAATTC-TATCTGGTTGATCCCTGCCAG 3', 18N11R: 5' CTCAGTAAGCTTGATCCTTCCGCAGGTTTCACC 3', 分别对应于 18S rDNA 5' 端和 18S rDNA 3' 末端的序列, 为真核藻通用引物.

1.3 18S rDNA 的序列测定与分析 PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化, 377 型自动测序仪 (ABI PRISM) 进行序列测定. 测序引物分别为 18N1, 18N5: 5' TGGTGCCAGCAGCCGCGTA 3', 18N7R: 5' TCCGTCAATTC-CTTTAAGTT 3', 18N11R.

2 结果与讨论

18S rDNA 扩增产物约 1 800 碱基对. PCR 扩增产物经 DPS 纯化系统纯化后, 以引物 18N1, 18N5, 18N7R 和 18N11R 直接于自动测序仪进行序列测定. 共测得 1 200 碱基对核苷酸序列 (18S rDNA 基因部分

* 基金项目: “九五” 国家自然科学基金重大项目资助项目 (39790110); 国家自然科学基金资助项目 (39770058)

收稿日期: 1999-09-22; 作者简介: 王宁 (1976~), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 陈月琴.

序列)。通过 Internet 从 Genbank 中获取 *Phaeocystis* 另外 3 种 *P. poucheti*, *P. globosa* *P. antarctica* 的 18S rDNA 基因序列, 采用 Pgene 6.0 计算机分析软件包对所获得的序列进行比较, 序列中引入适量的空格, 以便达到最大的同源性(图略)。序列比较结果表明, 我国东南海域的 *Phaeocystis* 标本与 *P. globosa* 的 18S rDNA 基因序列完全相同, 而与 *P. poucheti* 和 *P. antarctica* 分别有 2% 的差异, 可初步判定 1997 中国东南沿海诱发赤潮的种类为 *Phaeocystis globosa*。

Phaeocystis 至今已报道的种类约有 9 个, 其中以 *P. pouchetii* 最为常见, 其次是 *P. globosa*。由于该属生活史复杂, 群体形态多变, 造成了该属分类学上的困难。粤东海域的棕囊藻标本的多样性也说明了这一点, 该种类群体一般呈球形或近球形, 外具一层柔软的胶质被; 群体大小的差别很大, 最小的群体仅 0.1 cm, 最大的群体可达 2~3 cm, 内含近千至数万个细胞, 基本上分布在群体的周层, 与文献记载 *P. poucheti* 非常相似。因此许多学者都建议将 1997 粤东海域的赤潮种定为 *P. poucheti*, 或暂定为 *Phaeocystis* cf. *poucheti*。但是按文献记载 *P. pouchetii* 为冷水性种类^[3], 而我们采集到的标本, 其生长最适温度为 20℃或更高, 与文献所记载的温水性种类 *P. globosa* 的生理温度相似^[3]。根据以上的分析, 以及 18S rDNA 基因的结果, 可以确定, 1997 粤东海域诱发赤潮的种类为 *P. globosa* 而不是 *P. pouchetii*。我们目前对 *Phaeocystis* 属不同种及不同株系 rDNA ITS 的研究结果还进一步证明了粤东海域诱发赤潮的种类是本地起源而不是外海引入(待发表)。

应当指出的是, 我国粤东海域的 *P. globosa* 形态特征与已报道的种类存在较大差异, 其群体超常地大, 最大直径可达 30 mm (其它一般为 8~9 mm), 该种类在中国海区群体超常地大是否是 *P. globosa* 由于环境引起的一种形态变化现象, 值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] SOURIA A. *Phaeocystis*(Prymnesiophyceae): How many species? [J]. *Nova Hedwigia*, 1988, 47: 211~217.
- [2] 陈月琴, 屈良鹄, 邱小忠, 等. 甲藻单个细胞 DNA 的制备及在赤潮藻类分子鉴定中的应用[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 1997, 36(4): 66~69.
- [3] JAHNKE J. The light and temperature dependence of growth rate and elemental composition of *P. globosa* Scheffell and *P. pouchetii* (Har.) Lagerh. In batch cultures[J]. *Netherlands J Sea Res*, 1989, 23: 15~21.

Analysis of 18S rDNA Gene from a “Red-Tide” Related *Phaeocystis* Species in South China Sea

*
WANG Ning, CHEN Yue-qin, QU Liang-hu, LI Tai-hui, QI Yu-zao

Abstract: 18S rDNA gene of a “red-tide” related *Phaeocystis* species from South China Sea was determined. Sequence analysis, combined with its physiological features, indicates the “red-tide” related *Phaeocystis* species is *P. globosa* instead of *P. pouchetii*.

Keywords: *Phaeocystis* species; 18S rDNA; sequence analysis