

塔玛亚历山大藻遗传多样性的微卫星分析

叶吉龙¹, 杨维东^{1,2}, 李宏业^{1,2}, 刘洁生^{1,2*}

(1. 暨南大学生物工程学系, 广州 510632; 2. 水体富营养化与赤潮防治广东省高校重点实验室, 广州 510632)

摘要: 应用 12 个微卫星标记对 9 株来自欧洲和中国等不同海域的塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)进行了遗传多样性分析, 探讨了不同地理藻株之间的遗传分化程度和基因流水平, 分析了我国沿海塔玛亚历山大藻的遗传多样性。结果表明: 9 株塔玛亚历山大藻共检测出 26 个等位基因, 其中 9 个位点具有多态性, 多态比率 75%。有效等位基因数 1.3243 ~ 3.2667, 平均为 1.8774。塔玛亚历山大藻种内基因多样性为 0.3630。9 株塔玛亚历山大藻大致可以分为 3 个进化支, 进化支与藻株的地理位置相关联。其中, 中国海域的塔玛亚历山大藻至少可分为 2 个进化支。不同地理分布的塔玛亚历山大藻的遗传分化水平较高, 达 0.7522。种群间的基因流估算水平较低, 提示 3 个种群间可能不存在基因交流。

关键词: 塔玛亚历山大藻; 微卫星标记; 遗传多样性; 基因流

中图分类号: Q949.203

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)04-0428-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2010.04.017

Genetic Diversity among Populations of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium tamarense* Revealed by Microsatellite Markers

YE Ji-long¹, YANG Wei-dong^{1,2}, LI Hong-ye^{1,2}, LIU Jie-sheng^{1,2*}

(1. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Guangdong Provinces High Education Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Control, Guangzhou 510632, China)

Abstract: *Alexandrium tamarense* was a wide-spread species of dinoflagellate causing harmful algal blooms and paralytic shellfish poisoning around the world. The genetic diversity of 5 European and 4 Chinese strains of *A. tamarense* was analyzed by using microsatellite markers. Relative low genetic diversity was revealed in the 9 strains of *A. tamarense*, with effective number of alleles of 1.3243 ~ 3.2667 and gene diversity of 0.3630. Based on the markers, the 9 strains of *A. tamarense* were divided into three lineages with genetic differentiation of 0.7522, which related to their geographic origins. Chinese samples could be divided into two lineages, and the European strains belong to another lineage. High genetic differentiation among the three populations suggested the lack of gene flow.

Key words: *Alexandrium tamarense*; SSR; Genetic diversity; Gene flow

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)能产生麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP), 并通过食物链在鱼类、贝类等水生生物中蓄积, 对其他物种包括人类产生严重威胁。

塔玛亚历山大藻、链状亚历山大藻(*A. catenella*)和 *A. fundyense* 是亚历山大藻属赤潮爆发

的主要原因种^[1-4]。因其形态上非常相似, 分类有一定的难度和不确定性, 为方便起见统称为塔玛亚历山大藻复合体(*A. tamarense* species complex)。塔玛亚历山大藻广泛存在于中国各大海域, 是我国沿岸海域有毒有害赤潮的典型代表^[5]。目前, 对塔玛亚历山大藻的生理、生态、分子鉴定及分子标记

收稿日期: 2009-11-16 接受日期: 2010-03-25

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目(8251063201000001); 国家自然科学基金-广东省联合基金重点项目(U0733006)资助

作者简介: 叶吉龙, 硕士研究生, 主要从事分子生态与毒理学, email: yejilong@hotmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: tjslu@jnu.edu.cn, tywd@jnu.edu.cn

等已有较多研究,但多以 rDNA、蛋白质水平的研究为主^[6-8],对其种内的遗传多样性研究较少^[9]。核糖体基因突变率有限,只能显示极小的遗传多态性,难以区分具有共同地理来源的赤潮生物种群内和种群间的种内遗传差异^[9]。因此,采用新的技术探讨我国沿海塔玛亚历山大藻的遗传多样性状况具有重要意义。

微卫星 DNA,即 DNA 简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR),在真核生物基因组的许多位点广泛存在,能够提供高变的、信息量丰富的、选择中性的、稳定的分子标记,近年来受到了广泛关注,并已成功用于赤潮藻种内遗传多样性的分析^[10-15]。微卫星的多态性的灵敏度大大超过了 rDNA 序列或 RFLP 等以 DNA 为基础的分子标记,可以区分传统 rRNA 标记不能区分的种内差异^[9]。

本研究选择 12 个微卫星标记,对源自中国沿海、欧洲海域的 9 株塔玛亚历山大藻进行种内遗传多样性评价,探讨了不同地理来源藻株之间的遗传分化程度和基因流的水平,初步分析了我国沿海塔玛亚历山大藻的遗传多样性,为进一步阐明中国沿海塔玛亚历山大藻的遗传多样性以及海洋运输可能造成的影响提供了基础和依据。

1 材料和方法

1.1 实验藻株及培养

9 株塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 中的 CCMP115、CCMP116、CCMP1493、CCMP1598、CCMP1771、CCMP2022、CCMP2023 藻株购自美国 Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP),ATHK 和 ATDH01 由厦门大学王大志教授惠赠。藻株编号及采样地点见表 1。

表 1 藻株及采样地点

Table 1 Strains and sampling locations of *A. tamarense*

藻株 Strain	采样地点 Sampling locations
CCMP115	英国普利茅斯海域 Plymouth, England, UK
CCMP1771	英国普利茅斯海域 Plymouth, England, UK
CCMP2022	英国普利茅斯海域 Plymouth, England, UK
CCMP2023	英国普利茅斯海域 Plymouth, England, UK
CCMP116	西班牙比戈海域 Vigo, Spain
CCMP1493	中国大亚湾海域 Daya Bay, Guangdong, China
CCMP1598	中国大亚湾海域 Daya Bay, Guangdong, China
ATHK	中国香港海域 Hong Kong, China
ATDH01	中国长江口海域 Mouth of Yangtze River, China

CCMP115、CCMP116、CCMP1493、CCMP1598、CCMP1771、CCMP2022、CCMP2023 用 L1-Si 培养基(不添加硅盐)培养,ATHK 和 ATDH01 用 f/2 培养基培养。两种培养基均为 3.3% 人工海水按其相应的配方加营养盐配制而成,经 0.22 μm 纤维滤膜过滤除菌所得。藻培养液放置于温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、光暗比 12 h: 12 h 的 RXZ-430E 人工气候箱(宁波江南仪器厂)中培养。

1.2 微卫星标记的选择

微卫星标记引物参照王东东等^[8]和 Nagai 等^[11]的方法,PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,初步筛选出能扩增出清晰目的条带,且稳定、重复性好的引物。最后对选择的引物进行荧光标记,再次进行 PCR,以毛细管电泳技术检测 PCR 扩增产物的片段大小作为本实验最终的检测手段。

1.3 PCR 反应体系及程序

PCR 反应体系为 10 μL : 10 \times Ex *Taq* Buffer (Mg^{2+} Plus) 1 μL , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 0.8 μL , TaKaRa Ex *Taq* HS (5 U μL^{-1}) 0.1 μL , 微卫星上下引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.1 μL , 模板 DNA 约 50 ng, 用 ddH_2O 定量至 10 μL 。反应程序采用 Touch down PCR: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 2 次; 退火温度每次下降 2°C , 每个温度进行 2 轮循环直至 50°C ; 94°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 循环 29 次, 最后 72°C 延伸 7 min。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,初步判断引物是否能扩增出目的条带。

1.4 荧光标记引物 PCR 与毛细管电泳检测

PCR 反应体系为 50 μL : GeneAmp 10 \times PCR Buffer II 5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L each) 4 μL , Primer-mix 5 μL , Ampli *Taq* Gold (5 U μL^{-1}) 1 μL , gDNA 终浓度为 50 ng, ddH_2O 补齐体积至 50 μL 。PCR 反应程序: 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 15 s, 55°C 退火 15 s, 72°C 延伸 30 s, 40 个循环; 最后 72°C 延伸 30 min。

毛细管电泳技术检测参照王东东等的方法^[8],电泳数据经 Genemapper 软件处理后得到检测片段大小。

1.5 数据分析

使用 POPGEN32(version 1.32)软件统计塔玛亚历山大藻种内遗传多样性和种群间的遗传差异信

息,包括观察等位基因数(Observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数(Effective number of alleles, N_e)、Nei's 基因多样性(Nei's genetic diversity, H)、多态位点数(Number of polymorphic loci)和多态位点比率(Percentage of polymorphic loci, P),以及总种群期望杂合度(Total population expected heterozygosity, H_t)、亚种群期望杂合度(Each population expected heterozygosity, H_s)、遗传分化系数(Coefficient of gene differentiation, G_{st})和基因流估算(Estimate of gene flow)等。

用 NTSYSpc (version 2.10e)软件计算各藻株间的遗传相似度和 Nei's 遗传距离,再以非加权平均法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means, UPGMA)进行聚类分析,构建系统发育树。

2 结果和讨论

2.1 微卫星位点 PCR 产物毛细管电泳检测结果

结果表明,23 对微卫星标记引物中有 15 对引物能扩增出清晰的目的条带。进一步对这 15 对引物进行荧光标记,再次进行 PCR。其中,12 对荧光标记引物能获得清晰的目的条带,共计有 26 个等位基因。图 1 为部分引物毛细管电泳检测结果。

实验中,有些引物对部分藻株扩增不出目的条带,产生了所谓的“哑等位基因”现象。可能是:(1)引物的结合部位,尤其是引物 3' 末端发生了点突变、插入或缺失阻碍了微卫星标记的 PCR 扩增;(2)扩增的等位基因的片段大小不同;(3) DNA 模板质量不同或者模板质量较差^[6]。

2.2 种内遗传多样性

从表 2 可以看出,12 个微卫星标记中有 9 个位点具有多态性,多态位点比率达 75%。9 个多态性位点的有效等位基因数为 1.3243 ~ 3.2667,平均 1.8774。塔玛亚历山大藻种内基因多样性为 0.2449 ~ 0.7222,平均为 0.3630。本研究的位点多态性与 Nagai 等^[11]和 Alpermann 等^[17]的研究结果相似,但等位基因数和基因多样性指数平均值相对较低,这可能是实验藻株样本量较少;大部分引物是根据 EST 序列设计的,扩增的片段较为保守,突变程度可能不高引起的^[8]。

2.3 聚类分析

根据遗传相似度矩阵和 Nei's 遗传距离构建树状图(图 2)。可以看出,CCMP1493、CCMP1598 和

ATHK 的遗传距离较小,其中 CCMP1493 和 CCMP1598 聚为一支,亲缘关系极近;CCMP115、CCMP1771、CCMP2023、CCMP116 和 CCMP2022 的遗传距离差异也不大,亲缘关系较为接近;而 ATDH01 相对于这两个进化支的藻株亲缘关系都比较远,因此 9 株塔玛亚历山大藻可分为 3 个进化支:进化支 1 包括 CCMP115、CCMP1771、CCMP2023、CCMP116 和 CCMP2022,进化支 2 只有 ATDH01,进化支 3 包括 CCMP1493、CCMP1598 和 ATHK。进化支内各藻株均来自同一海域或者是临近海域,说明 9 株塔玛亚历山大藻的亲缘关系与地理分布关系非常密切,地理位置上越接近,其亲缘关系也越近。

进化支 2 和进化支 3 的 4 株藻株都来源于中国海域,说明中国沿海塔玛亚历山大藻至少可以分为两个独立的进化支,这与前人的结果有差异^[6,18]。唐祥海等^[6]认为,中国沿海的塔玛/链状亚历山大藻序列更接近于塔玛亚历山大藻复合种的“亚洲温带”基因型。陈月琴等^[18]用限制性片段长度多态性分析(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)表明,8 株中国南海的塔玛亚历山大藻与西欧有毒和无毒株相似。本研究表明,代表西欧塔玛亚历山大藻株的进化支 1 和代表中国南海株的进化支 3 之间的遗传距离较大,其原因可能与微卫星标记能够鉴别核糖体 rDNA 标记不能区分的种内遗传差异有关,也可能是所使用的藻株不同所致,还有待于进一步的研究。

2.4 种群的遗传分化及基因流

根据 9 株塔玛亚历山大藻的地理分布,结合聚类分析结果,本研究假定这些藻株为 3 个种群,分别代表 3 个进化支(表 3)。可以看出,3 个塔玛亚历山大藻种群的总种群期望杂合度为 0.3814,亚种群内期望杂合度为 0.0945,反映出单个群体和总群体存在较大的差别。遗传分化系数平均值为 0.7522,遗传分化系数相对较高,说明不同地理种群间存在较大的遗传差异。

3 个塔玛亚历山大藻种群之间的基因流水平见表 4。一般认为,当基因流大于 1 时,说明种群间存在一定的基因流动^[9]。可以看出,3 个种群之间的基因流很小(均小于 0.5),说明 3 个种群之间发生基因交流的可能性较小。

Scholin 等^[4]曾提出,不同地理分布的塔玛亚历山大藻复合种藻株是从一个共同的原种单源辐射

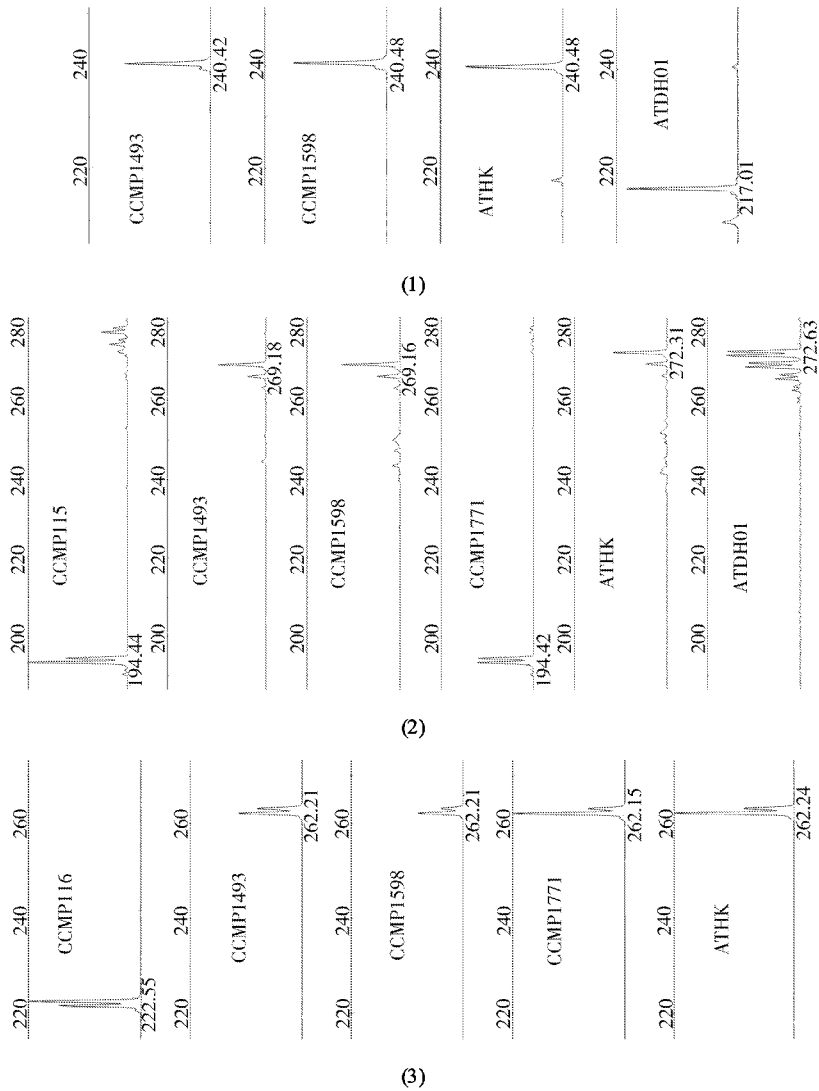


图 1 部分微卫星标记引物的毛细管电泳检测图

Fig. 1 Capillary electrophoresis of the part of microsatellite markers primer (1)P1; (2)P6; (3)P8

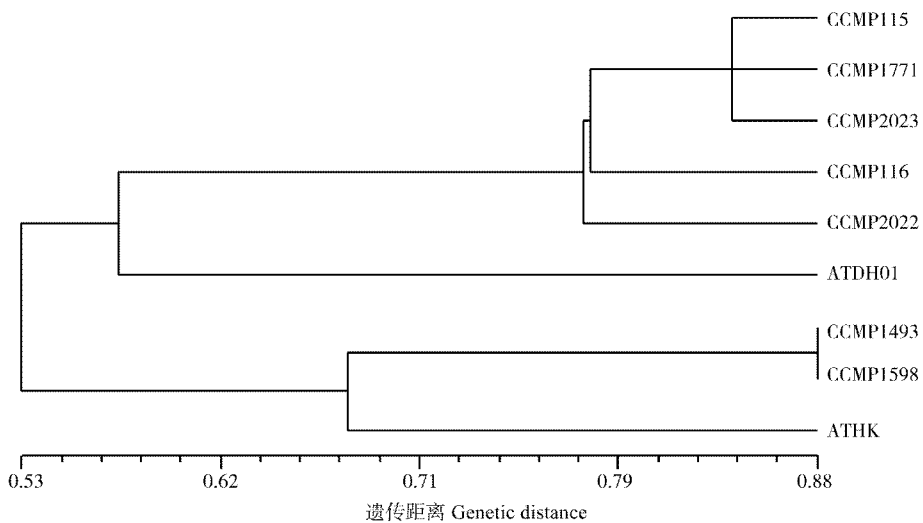


图 2 9 株塔玛亚历山大藻 Nei's 遗传距离聚类图

Fig. 2 The dendrogram based on Nei's genetic distance of 9 strains *A. tamarensis*

表 2 9 株塔玛亚历山大藻中 12 个微卫星标记的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of 12 microsatellite markers in 9 *A. tamarense* strains

引物 Primer	观察等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Nei's 基因多样性 Nei's gene diversity
P1	2	1.6	0.3750
P2	1	1	-
P4	2	1.3243	0.2449
P6	4	3.6	0.7222
P7	4	3.2667	0.6939
P8	2	1.4706	0.3200
P9	1	1	-
P10	2	2	0.5000
P11	2	2	0.5000
P12	3	2.6667	0.6250
Atama19	2	1.6	0.3750
Atama26	1	1	-
平均 Mean	2.1667	1.8774	0.3630

多态性引物数目 Number of polymorphic loci:9
多态性引物比率 The percentage of polymorphic loci:75%

引物 P1 ~ P12 引自文献[8], Atama19 和 26 引自文献[11]。P1 to P12 from reference 8, Atama19 and 26 from reference 11.

表 3 3 个塔玛亚历山大藻种群间的遗传分化

Table 3 Gene diversity in 3 populations of *A. tamarense*

引物 Primer	总种群期望杂合度 Expected heterozygosity among populations	种群内期望杂合度 Expected heterozygosity within population	种群遗传分化系数 Coefficient of gene differentiation
P1	0.5000	-	1.0000
P2	-	-	-
P4	0.2778	0.2222	0.2000
P6	0.7160	0.1481	0.7931
P7	0.6528	0.2917	0.5532
P8	0.3750	0.2500	0.3333
P9	-	-	-
P10	0.5000	-	1.0000
P11	0.4444	-	1.0000
P12	0.6111	0.2222	0.6364
Atama19	0.5000	-	1.0000
Atama26	-	-	-
Mean	0.3814	0.0945	0.7522

分布而来,发生遗传上的差异是因为长期的地理隔离和单独进化。John 等^[20]也提出类似的观点,他们假设塔玛亚历山大藻复合种都是始于一个全球广布种,伴随着几百万年来地球复杂的地壳运动和全球气候变化,向不同方向散布的塔玛亚历山大藻复合种发生了复杂的表型和遗传分化,直至今天形成了温带亚洲、热带亚洲、地中海、西欧和北美等 5

表 4 3 个塔玛亚历山大藻种群的基因流估算

Table 4 Estimate of gene flow in 3 populations of *A. tamarense*

	种群 1 Population 1	种群 2 Population 2	种群 3 Population 3
种群 1 Population 1	-	-	-
种群 2 Population 2	0.4259	-	-
种群 3 Population 3	0.1803	0.4059	-

个主要的种群。

一般认为,地理隔离较容易成为影响群体间遗传分化的重要因素。相同海域或者临近海域的藻株之间的地理隔离几乎可以忽视,或者说相对较弱,甚至可能在人类的海洋活动影响下存在一定的基因流。因此,基因在这些群体间的迁移水平较大,藻株之间的进化程度较一致,遗传差异不大。

本研究表明,9株塔玛亚历山大藻大致可以分为3个进化支,中国沿海塔玛亚历山大藻与西欧亚历山大藻分属不同的进化支,遗传距离较远,种群间的基因流水平很低,说明海运活动并未造成欧洲海域与中国海域塔玛亚历山大藻的基因交流,长时间的独自进化和相互之间缺乏基因流可能是导致其分化和差异的原因。同时,中国大亚湾和长江口海域的塔玛亚历山大藻可能属于不同的进化支,期间可能也未发生基因交流,说明中国海域塔玛亚历山大藻存在广泛的遗传多样性,这可能是造成以往研究差别的原因。陈月琴等^[8]指出,中国南海塔玛亚历山大藻缺少B基因,与西欧、澳洲等地的藻株类似,而与北美等地的不同。唐祥海等^[6]认为,中国沿海的塔玛/链状亚历山大藻序列更接近于塔玛复合种的“亚洲温带”基因型。不过,由于本研究收集的藻株数量有限,有关问题尚待进一步的证实。

3 结论

9株塔玛亚历山大藻大致可以分为3个进化支,进化支与藻株的地理位置相关联。其中,中国海域的塔玛亚历山大藻至少可能分为2个不同的进化支。不同地理分布的塔玛亚历山大藻的遗传分化水平较高,达0.7522。种群间的基因流估算水平较低,提示3个种群间可能不存在基因交流。可以认为,不同地理种群长时间的独自进化和它们之间缺乏基因流导致不同地理分布的塔玛亚历山大藻之间高的遗传分化水平。

参考文献

[1] Lilly E L, Halaných K M, Anderson D M. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) [J]. *J Phycol*, 2007, 43(6): 1329–1338.

[2] McCauley L A R, Erdner D L, Nagai S, et al. Biogeographic analysis of the globally distributed harmful algal bloom species *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) based on rRNA gene sequences and microsatellite markers [J]. *J Phycol*, 2009, 45(2): 454–463.

[3] Scholin C A, Herzog M, Sogin M, et al. Identification of group-and

strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene [J]. *J Phycol*, 1994, 30(4): 999–1011.

[4] Scholin C A, Hallegraeff G M, Anderson D M. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* “species complex” (Dinophyceae): Dispersal in the North American and West Pacific regions [J]. *Phycologia*, 1995, 34(6): 472–485.

[5] Li Y(李扬), Lü S H(吕颂辉), Jiang T J(江天久), et al. Population dynamics of *Alexandrium tamarense* and its relations with environmental factors in Nanji Islands sea area of Zhejiang Province [J]. *Chin J Appl Ecol(应用生态学报)*, 2009, 20(4): 916–922. (in Chinese)

[6] Tang X H(唐祥海), Yu R C(于仁成), Yan T(颜天), et al. Sequence analysis and molecular phylogenetics of ribosomal RNA gene of *Alexandrium* (Dinophyceae) strains in China [J]. *Ocean Limnol Sin(海洋与湖泊)*, 2006, 37(6): 529–535. (in Chinese)

[7] Wang D Z, Lin L, Chan L L, et al. Comparative studies of four protein preparation methods for proteomic study of the dinoflagellate *Alexandrium* sp. using two-dimensional electrophoresis [J]. *Harm Algae*, 2009(8): 685–691.

[8] Wang D D(王东东), Yang W D(杨维东), Liu J S(刘洁生). Screening of microsatellite markers in *Alexandrium* spp. [J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, 2009, 29(4): 2124–2133. (in Chinese)

[9] Masseret E, Grzebyk D, Nagai S, et al. Unexpected genetic diversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* as revealed by nuclear microsatellite marker [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(7): 2037–2045.

[10] Nagai S, Lian C, Yamaguchi S, et al. Microsatellite markers reveal population genetic structure of the toxic dinoflagellate (Dinophyceae) in Japanese coastal waters [J]. *J Phycol*, 2007, 43(1): 43–54.

[11] Nagai S, Lian C, Hamaguchi M, et al. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2004, 4(1): 83–85.

[12] Nagai S, Sekino M, Matsuyama Y, et al. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6(1): 120–122.

[13] Nagai S, McCauley L, Yasuda N, et al. Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2006, 6(3): 756–758.

[14] Nagai S, Nishitani G, Yamaguchi S, et al. Development of microsatellite markers in the noxious red tide-causing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7: 993–995.

[15] Demura M, Kavachi M, Kunugi M, et al. Development of microsatellite markers for the red tide-forming harmful species *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(2): 315–317.

[16] Dakin E E, Avise J C. Microsatellite null alleles in parentage analysis [J]. *Heredity*, 2004, 93(5): 504–509.

[17] Alpermann T J, John U E, Medlin L K, et al. Six new microsatellite

- markers for the toxic marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(4):1057–1059.
- [18] Chen Y Q(陈月琴), Qiu X Z(邱小忠), Qu L Q(屈良鹤), et al. Analysis of molecular biogeographic marker on red tide toxic *Alexandrium tamarense* in the south China sea [J]. Ocean Limnol Sin(海洋与湖沼). 1999, 30(1): 45–51.(in Chinese)
- [19] Wright S. The genetical structure of population [J]. Ann Eugen, 1951, 15: 323–354.
- [20] John U, Fensome R A, Medlin L K. The Application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* “species complex” (Dinophyceae) [J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(7): 1015–1027.