东海藻华高发区塔玛亚历山大藻(Alexandrium tamarense)的形态、分子及分布特征*

李冬融 陆斗定 戴鑫烽 何飘霞 夏 平 王红霞

(国家海洋局第二海洋研究所 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室 杭州 310012)

提要 本文对分离自我国东海藻华高发区的亚历山大藻进行了详细的形态特征描述和分子系统进化分析,通过运用光学显微镜、荧光显微镜、扫描电镜和分子生物学方法,确定该藻株为塔玛亚历山大藻 Alexarium tamarense (Lebour) Balech, 并对其 ITS 序列进行了系统进化分析。该藻体长21—35μm, 体宽 20—33μm, ITS 序列长度为 592bp, 系统发育树中与中国东海、南海两株 A. tamarense 以及一株代表"亚洲温带"基因型的 A. catenella 聚合在一起,支持率为 100%,形态特征与 A. tamarense 基本一致,核糖体基因型则为塔玛复合种"亚洲温带"基因型。通过现场观测,研究浙南至闽北东海藻华高发区的塔玛亚历山大藻分布变化特点,在东海原甲藻藻华消散期,塔玛亚历山大藻逆势而上,其细胞密度达到 1.7×10⁴cell/L,并逐渐向沿岸靠近,这与季风转向,台湾暖流入侵及水体层化密切相关。

关键词 东海赤潮高发区; 塔玛亚历山大藻; 形态特征; 系统进化; 种群变化

中图分类号 Q948 doi: 10.11693/hyhz20140100037

亚历山大藻属(Alexandrium)是一类重要的海洋赤潮甲藻,其广泛分布于世界近岸海域,是海洋有毒藻家族的主要类群之一,在北美、欧洲、亚洲等海域中都曾有该属藻种引发赤潮事件的报道(Prakash et al, 1971; Anderson, 1989)。研究表明,亚历山大藻属中部分藻种能够产生麻痹性贝毒毒素(paralytic shellfish poisoning, PSP),其引发的赤潮不仅会给海洋养殖业造成巨大的经济损失,而且由于麻痹性贝毒毒素还可通过一些贝类富集,人类因误食含有藻毒素的贝类而中毒从而危及人类健康。

1960 年, Halim 在亚力山大港描述了新属 Alexandrium。Taylor(1979)于 1979 年建立了新属原膝 沟藻属(protogomyaulax),并将原属于膝沟藻属的 Gonyaulax tamarensis 作为该属典型,命名为 protogomyaulax tamarensis。Loeblich(1979)认为新属

Gessenrium 的特征应该包括 protogomyaulax 和 Alexandrium 的各个种类; Balech 等(1985)根据命名优先原则,提出 Gessenrium 和 protogomyaulax 应回归到 Alexandrium 属中。1990年, Steidinger(1990)通过研究认为 protogomyaulax 和 Alexandrium 应为同一属; Taylor(1979)也认为 Gessenrium 是 Alexandrium 的同属异名。Cembella(1985)将亚历山大藻分为: "tamarensis group"和"minitum group"两大种群。Scholin等(1994)对41株亚历山大藻的核糖体大亚基RNA基因部分序列进行了测序分析,结果揭示了亚历山大藻属的8种核糖体类型(ribotypes),其中"the tamarensis complex"含有五种核糖体类型,并发现其产毒能力与依据rDNA分子的序列差异而划分的不同核糖体类型之间具有相关性。Lilly等(2007)基于大亚基序列对世界范围内的塔玛复合体建立了系统发育树、重新将塔玛

^{*}国家自然科学基金, 41176141 号, 41376168 号, 41406173 号; 国家重点基础研究发展计划(973 项目), 2010CB428702 号; 公益专项子项目, 201505001 号; 海洋局二所基本科研业务费专项资金, JT1209 号, JG1223 号; 浙江省自然科学基金项目, LY12C03010 号。李冬融, 硕士, E-mail: lidongrong1989@126.com

复合体划分为五个区分明显的类群。根据 Lilly 等人的研究, Group 和 Group 的都是产毒株系, 而 Group 、Group 和 Group 的都是不产毒的株系。

在全球范围内、大量有毒有害性赤潮都是由塔 玛复合体引发的,造成了严重的生态和经济损失。在 我国各大海区也出现过塔玛复合体所引发的有毒赤 潮, 1994年在厦门虾池(林元烧, 1996), 2000年和 2002 年春季在长江口邻近海域(王金辉等, 2003), 2004 年 在浙江海域以及广东海域都发生了亚历山大藻赤潮 (曾妮, 2013), 但大多缺少准确的形态与分子证据, 而 Wang 等(Wang et al, 2008; Li et al, 2013)运用蛋白 组学分析技术协助区分塔玛和链状、芬地亚历山大藻 之间的区别, Gu 等(2013)从中国沿海沉积物孢囊中分 离萌发出多株亚历山大藻, 进行了形态和分子进化 研究。本文针对从 2013 年东海藻华高发区水体样品 中分离纯化出的一株塔玛亚历山大藻株 Alexarium tamarense (Lebour) Balech (LAMB130428), 对其进行 了形态特征、系统发育的深入分析,并报告该目标藻 在藻华现场的种群时空分布与重要物理海洋学参数 (温、盐度)的变化特点, 从而为阐释塔玛亚历山大藻 在东海藻华高发区的种群动力学及其该种的藻华发 生机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藻种的分离纯化和培养

实验所用塔玛亚历山大藻(A. tamarense)藻种分离于 2013 年 5 月在浙江温州海域南麂列岛(121.28°E, 27.41°W)所采的赤潮水样。取赤潮暴发时的水样,用直径为 100μm 的浮游植物筛网滤去大个体的浮游生物,得到水样低温保存至实验室,采用系列稀释法进行原样品的分离,获得单细胞藻株(实验室编号LAMB130428)。藻种分离培养的条件是温度 20°C, 盐度为 30, 光暗循环为 L:D=12:12, 光照强度为810lux。

1.2 形态观察

1.2.1 光学和荧光显微镜 使用 OLYMPUS CX31型光学显微镜观察生长状况及形态。取少量处于指数生长期的藻液,用鲁哥氏染色液固定,选取至少 50个藻细胞,利用 LEICA DM2500型光学显微镜和图像处理软件对细胞大小进行测量。在荧光显微镜(LEICADM5000B)下,使用核染料 4'6-二脒基-2-苯基吲哚 (4'6-diamidino-2-phenylindoledihydrochoride, DAPI)观察其细胞核位置,叶绿体的形态、数量及分

布;使用卡尔科弗卢尔(Calcofluor)荧光增白剂观察 藻株用片结构

1.2.2 扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM) 吸取指数期的藻液 10mL 于离心管,通过低转速的离心(Bolch et al, 1999)收集大约 0.5mL 浓缩藻液,藻细胞用等量的 4% OsO₄固定,去离子水漂洗。其次用一系列浓度的乙醇进行脱水(De Salas et al, 2008)。接着是 100%的酒精和 100%的丙酮各脱水两次。处理完后进行临界点干燥器和喷金,最后在扫描电镜(HITACHI S -3000N)下观察结果。

1.3 分子测序与系统进化分析

取生长指数期藻液 50 mL, 于室温下 4000 r/min 离心。去除上清液,采用 UNIQ-10 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)提取藻株基因组 DNA。将提取的基因组 DNA 作为 PCR 反应模板来扩增 rDNA ITS 序列,扩增引物为 Tits(+)和 Tits(-) (唐祥海等, 2006)。PCR 反应条件为: 在 95°C 下预变性 5 min; 94°C 下变性 1 min, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72°C 延伸 5 min, PCR 反应体系为 50μ L,包括 $10 \times 8 \text{uffer}$ (质量浓度为 25 mmol/L) 5μ L,4 NTP 混合液 1μ L,正向引物和反向引物各 1μ L,4 NTP 混合液 4μ L,正向引物和反向引物各 4μ L,4 NTP 混合污琼脂糖凝胶电泳,然后选取条带清晰的 PCR 扩增产物送于上海生工进行测序。

将藻株 ITS rDNA 序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库中,与库中藻株的分子序列进行比对。利用 Mega4.1 软件包,根据"Kimura 双参数"法则,采用 Neighbor-joining(NJ)方法,构建系统发育树,各分支的重复数均为 1000。Jukes-Cantor 距离矩阵的构建,则是用 Mega4.1 软件包,采用 NJ 法, Jukes-Cantor 方式计算而获得。

1.4 现场样品采集处理与数据分析

浮游植物样品于 2013 年 4—5 月"润江一号"调查 船在东海(121.44°E—119.43°E, 27.63°W—25.09°W) 海域沿岸垂直方向设置 ZA、FA、FB、FC、FD 共 5 个断面 12 个大面调查站位采集,每个站位采集表层 水样 0.5L。获取浮游植物水样共 97 份,每份样品分别加入 5mL 鲁哥氏染色液固定后带回实验室静置 24h,将样品摇匀后取 1mL,利用 Sedgewick-Pafter Cell S50 (Microlitre)型计数框在 Olympus CX31 型光学显微镜下做定量分析。以上样品采集处理与观察分析均按《海洋调查规范》(中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2007)中规定的方法进行,海水温

度与盐度用 CTD 多参数探头(SBE 19plus, Sea-Bird Electronics, Inc. America)获取,目标藻细胞密度以及海水温度、盐度的断面分布图是在 ocean data view (ODV, 2007, http://odv.awi.de/)软件中实现的。

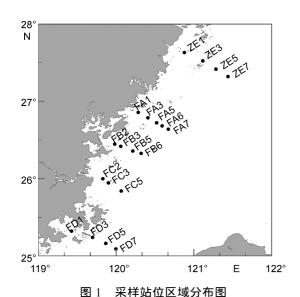


Fig.1 Deployment of the sampling sites

2 结果

2.1 细胞形态特征

2.1.1 光学和荧光显微镜下细胞形态特征 分离于东海的藻株 A. tamarense (LAMB130428), 其细胞大小如下: 体长范围 21—35μm, 平均值为(29.24±3.29)μm; 体宽范围 20—33μm, 平均值为(27.04±3.19)μm。在光学显微和荧光显微镜下观察到该藻细胞呈现椭圆形, 长略大于宽, 多为单个细胞, 偶尔有两个细胞形成的细胞链。从背面观察横沟深位于细胞中央, 上下壳均为半球形, 大小相近(图 2a)。 从腹面观察,横沟位于细胞中央,横沟始末两端位移与横沟等宽, 纵沟深, 后部变宽, 位于下壳, 细胞底部轻微

凹陷(图 2b)。细胞内充满若干黄褐色的叶绿体, 在荧光显微镜下呈红色(图 2c), 在横沟处呈透明带状。

2.1.2 扫描电镜下细胞形态特征 东海藻株 A. tamarense (LAMB130428)在扫描电镜下细胞整体呈现椭圆形,横沟深,位于细胞中央,始末两端移位与横沟宽相等,上壳与下壳半球形,大小相近。通过荧光显微镜和电镜观察藻株甲片结构:顶孔复合结构(APC)为三角形或矩形,腹部变窄(图 3f),顶孔板(Po)中央有一较大的逗号状的顶孔(AP),在顶孔右侧有一椭圆形的前连接孔(aap),但有的细胞其 APC 上并无前连接孔(图 3f)。第一顶板(1′)是对称的偏菱形结构,并与顶孔板(Po)直接相连(图 3a)。腹孔(Vp)通常存在于第一顶板(1′)和第四顶板(4′)接缝处(图 3a)。纵沟后板(Sp)偏菱形(图 3c),长度稍长于宽度。图 3d 为上壳半球甲片结构,顶孔复合结构(APC)位于中央,并由4块顶板和6块甲片分别围绕,组成上壳半球结构。

2.2 系统进化关系

东海塔玛亚历山大藻株(LAMB130428)的 rDNA ITS 序列在 GenBank 数据库中与其他藻株的 ITS rDNA 序列进行比对后,再对 GenBank 中收录的亚历山大藻 rDNA 序列信息进行综合分析,选择了典型藻株的序列构建基于 ITS 序列的系统进化树。相关序列的具体信息见表 1。东海藻株扩增序列总长度为592bp,具体碱基如图 4。去掉部分 18S rDNA 和 28S rDNA 序列,东海藻株的 5.8S rDNA ITS 总长度为510bp。

将东海藻株(LAMB130428)的 ITS 序列与表中所列的亚历山大藻属的藻株 ITS 序列进行比对分析,发现东海藻株(LAMB 130428)与 GenBank 中来自中国东海的 *A. tamarense* (KF034850)和中国南海的 *A. tamarense* (HM483851)以及代表塔玛复合种"亚洲温带"基因型的序列的链状亚历山大藻 *A. catenella* (AJ968683)的 ITS 序列极为接近,相似度为 99%,可

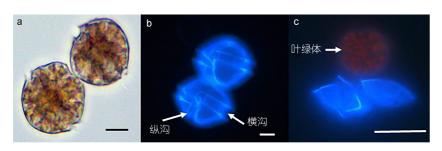


图 2 光学和荧光显微镜下东海藻株 A. tamarense (LAMB130428)细胞形态

Fig. 2 Light micrographs and fluorescence micrographs of A. tamarense(LAMB130428)

a: 背面观(光学显微镜); b: 腹面观 细胞横沟位移纵沟(荧光显微镜); c: 细胞中叶绿体和破碎的细胞壳(荧光显微镜); 标尺=5 μm

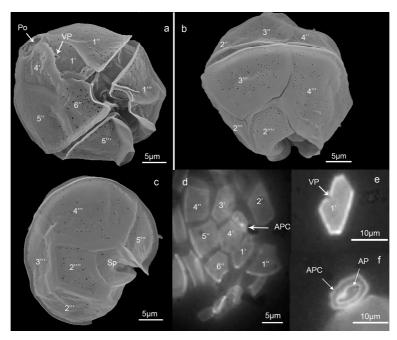


图 3 扫描电镜和荧光显微镜下东海藻株 A. tamarense (LAMB130428)的甲片结构

Fig.3 Scanning electron microscopy and fluorescence micrographs of A. tamarense (LAMB110535)

a: 腹面观(扫描电镜); b: 背面观(扫描电镜); c: 底面观(扫描电镜); d: 展开的上壳板(示顶孔复合结构和腹孔)、纵沟前板; e: 第一顶板及腹孔; f: 顶孔复合结构(前连接孔闭合)

1': 第一顶板; 1": 第一沟前板; 1": 第一沟后板; 1"": 第一底板; Po: 顶孔板; VP: 腹孔; Sp: 后纵沟板; APC: 顶孔复合结构; AP: 顶板

表 1 基于 ITS 序列进行的系统发育分析中所用藻种信息 Tab.1 Information of the algae for the ITS sequences used in the phylogenetic analysis

种类	藻株	采集地	序号		
Alexandrium tamarense	CCMP1493	南海	HM483851		
Alexandrium tamarense	ATXM01	东海	KF034850		
Alexandrium tamarense	MDQ1096	阿根廷	AM292306		
Alexandrium tamarense	04-197-30	韩国	FT042686		
Alexandrium tamarense	CCAP1119	爱尔兰	D0785891		
Alexandrium tamarense	CCMP115	英国	JF521640		
Alexandrium tamarense	CNR-OR3	意大利	AM292307		
Alexandrium tamarens	WKS-1	日本	AB006991		
Alexandrium tamarense	ATBB01	澳大利亚	JF521639		
Alexandrium tamarense	Kci	南极洲	JQ285849		
Alexandrium tamarense	IEO-VGO654	西班牙	AM238650		
Alexandrium tamarense	SZN01	意大利	AM238652		
Alexandrium catenella	IEO-709	西班牙	AJ968683		
Alexandrium fundyense	CCMP1719	意大利	AJ005049		
Alexandrium cohorticula	23	美国	AF154224		
Alexandrium fraterculus	AF0307MIE07	日本	JF521623		
Alexandrium insuetum	S1	日本	AB006996		
Alexandrium lusitanicum	AL-1	葡萄牙	JF906999		
Alexandrium pseudogonyaulax	H1	日本	AB006997		
Alexandrium taylori	_	意大利	AM296010		
Alexandrium affine	H1	日本	AB006995		
Alexandrium margalefi	IEO-VGO661	西班牙	AM237339		
Procentrum micans	CCMP694	加拿大	EU927524		

18SrDNA

图 4 东海藻株 rDNA ITS 分子序列

Fig.4 rDNA ITS sequence of the studied strain

以认为东海藻株(LAMB130428)属于塔玛复合种中"亚洲温带"基因型(Atama complex group IV)。利用东海藻株(LAMB130428)和实验室另一株东海塔玛亚历山大藻(LAMB110535)及相关藻株 rDNA ITS 分子列序,并以Procentrum micans 作为种外群,构建亚历山大藻属的系统发育树(图 5)。从系统发育树上可知, A. tamarense、A. catenella、A. affine、A. fundyense、A. chorticula 以及 A. frateraulus 先聚合在一起形成一个分支,其支持率为90%,该结果与Gu等(2013)用基于rDNA ITS 序列所构建的系统进化树结果一致。而后目标东海藻株(LAMB110535)、(LAMB110535)和 A. tamarense (KF034850)、A. tamarense (HM483851)以及代表塔玛复合种"亚洲温带"基因型序列的 A. catenella (AJ968683)以 100%支持率聚在一起,成为

一个分支,该结果与序列比对分析的结果相一致。

表 2 为基于 rDNA ITS 分子序列的 Jukes-Cantor 遗传距离矩阵, 比较东海藻株与表中塔玛亚历山大藻的遗传距离可以发现, 东海藻株(LAMB110535 和 LAMB110535)与收录号为 KF034850、HM483851 的塔玛亚历山大藻亲缘关系比较近, 无核苷酸差异值,与收录号为 JF521639、AB006991、D0785891、JF521640、AM292307、AM238652、AM238650 的塔玛亚历山大藻亲缘关系较远,核苷酸差异值范围为0.127—0.176。而与收录号为 AM292306、FT042686的两株塔玛亚历山大藻的亲缘关系更远,遗传距离分别为 0.211、0.219。另外, 东海藻株 A. tamarense (LAMB110535)与 A. catenella (AJ968683)无核苷酸差异值,其亲缘关系也比较近。

表 2 塔玛复合体不同藻株 rDNA ITS 序列的 Jukes-Cantor 距离矩阵 Tab.2 Pairwise distance matrix of Jukes-Cantor between different strains used in this study

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 东海 LAMB130428														
2 东海 LAMB110535	0.000													
3 东海 KF034850	0.000	0.000												
4 南海 HM483851	0.000	0.000	0.000											
5 西班牙 AJ968683	0.000	0.000	0.000	0.000										
6 南极洲 JQ285849	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
7 澳大利亚 JF521639	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127	0.127								
8 日本 AB006991	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.120							
9 爱尔兰 D0785891	0.159	0.159	0.159	0.159	0.159	0.159	0.117	0.003						
10 英国 JF521640	0.159	0.159	0.159	0.159	0.159	0.159	0.117	0.003	0.000					
11 意大利 AM292307	0.176	0.176	0.176	0.176	0.176	0.176	0.146	0.120	0.117	0.117				
12 意大利 AM238652	0.176	0.176	0.176	0.176	0.176	0.176	0.146	0.120	0.117	0.117	0.000			
13 西班牙 AM238650	0.176	0.176	0.176	0.176	0.176	0.176	0.146	0.120	0.117	0.117	0.000	0.000		
14 阿根廷 AM292306	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.211	0.180	0.163	0.159	0.159	0.146	0.146	0.146	
15 韩国 FT042686	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.219	0.180	0.163	0.159	0.159	0.146	0.146	0.146	0.005

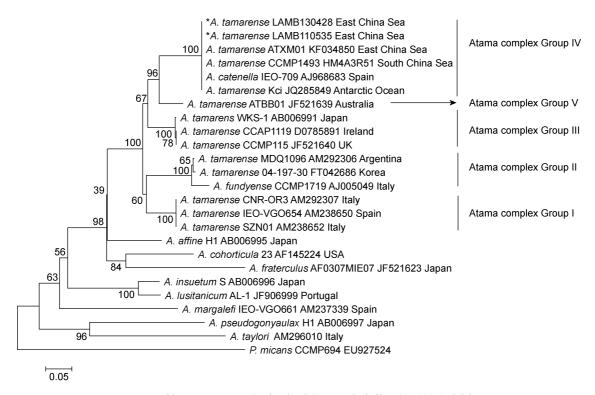


图 5 基于 rDNA ITS 序列所构建的亚历山大藻属的系统发育树 Fig.5 Phylogenetic relationship of *Alexandrium* species based on rDNA ITS

2.3 目标藻分布及温度、盐度的变化

两个航段的现场观察和采集水样显微镜观察结 果如下: 第一航段(4月24-28日)调查海域塔玛亚历 山大藻平均细胞密度为2.74×103cell/L, 共计7个站位 检出塔玛亚历山大藻, 其中最大值出现在 ZE3 站位, 达 7×10³cell/L, 最小值出现在 ZE5 站位, 达到 1×10³cell/L; 第二航段(5 月 19—23 日)调查海域塔玛 亚历山大藻平均细胞密度为 4.71×10³cell/L, 共计 12 个站位出现塔玛亚历山大藻, 其中最大值出现在 ZE1 站位、达 1.67×104cell/L、此外 FB5 站位塔玛亚历山大 藻密度也达到 1×10⁴cell/L, 相比上一次目标藻的分布 状况, 其细胞密度显著上升。李扬等(2009)在南麂海 域塔玛亚历山大藻的种群动态及调查结果显示、表 层水体中藻细胞密度最高值为 1.22×105cell/L, 出现 在 5 月初, 与本文结果基本相同, 表明塔玛亚历山大 藻的种群在4月底至5月初春季范围内不仅仅出现在 浙江南麂海域、同时广泛存在于浙东闽北沿岸海域、 种群密度随水温及盐度上升逐渐增多,并达到通常 认为有毒亚历山大藻形成藻华时的细胞密度。 与此同 时, 藻密度高值区更趋向近岸站位(图 6), 这与物理 驱动因素密切相关、以 ZE 断面为例、4 月 25 日和 5 月 22 日的温度和盐度结构出现了明显变化, 4 月底 ZE断面表层平均水温 15.3°C, 平均盐度 30.6, 随着水深增加, 温度降低, 盐度升高; 5 月底表层平均温度 21.2°C, 平均盐度 32.1, 盐度和温度均出现层化现象。东海海区的水体层化现象主要是台湾暖流和长江冲淡水的交互作用形成。随着 4 月初温度逐渐上升,台湾暖流从水体底部向沿岸推进, 产生温跃层和盐度梯度。 ZE 断面两个时间点均出现中层冷水团(图 7), 表明调查区表层增温受到太阳辐射影响, 而下层水体增温与台湾暖流水向近岸推进及涌升有关。

3 讨论

塔玛亚历山大藻分布广泛,其形态学指标主要基于细胞形状、顶孔板的形态、第一顶板上是否存在腹孔及后连接孔的位置等(Balech et al, 1985; Balech, 1995; Gu et al, 2013)。根据 Balech等(1985)的描述,塔玛亚历山大藻与链状亚历山大藻之间主要的差异在于: (1) 塔玛亚历山大藻 APC 腹部较链状亚历山大藻窄,但其顶孔却比链状亚历山大藻大。(2) 塔玛亚历山大藻的后连接孔位置比链状亚历山大藻更靠近纵沟后板边缘。(3) 塔玛亚历山大藻有腹孔,腹孔在第一顶板与第四顶板连接的中央位置,而链状亚历山

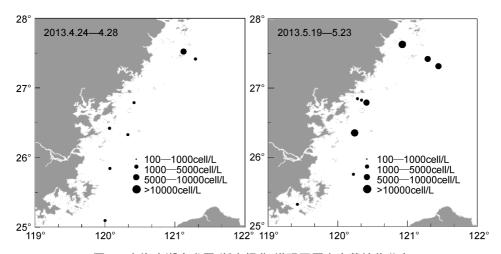


图 6 东海赤潮高发区(浙南闽北)塔玛亚历山大藻站位分布

Fig. 6 A. tamarense distribution in the East China Sea HAB area (in South Zhejiang and North Fujian of China)

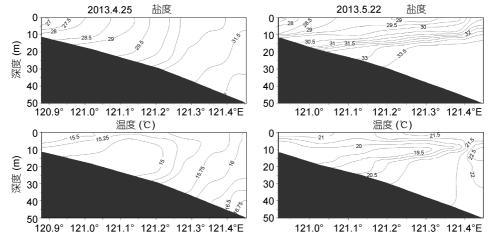


图 7 ZE 断面盐度和温度变化

Fig.7 The salinity and temperature changes in the ZE section

大藻没有腹孔,这是两者的一个主要区别。此外,营养细胞形成细胞链的长度也是这两个种的区别。而 A. fudyense 和塔玛亚历山大藻的区别就是 A. fudyense 没有腹孔。东海藻株在培养过程中没有观察到两个细胞以上的细胞链,多以单个细胞为主,偶尔能看到两个细胞形成的短链,APC 腹部比链状亚历山大藻要略窄一些,其顶孔略大于链状亚历山大藻。东海藻株第一顶板边缘有明显腹孔存在,与Balech等(1985,1995)和 Fukuyo等(1990)描述的塔玛亚历山大藻的 APC 形态结构基本一致,而 Gu 等(2013)报道的塔马亚历山大藻第一顶板的腹孔很不寻常地出现在顶板中央,与李氏亚历山大藻 A. Leei 的第一顶板相似。

赤潮生物在种间、种内等不同水平上均存在丰富的遗传多样性(尹娟, 2011)。核糖体转录单元内间隔区 (ITS)是中度重复序列,其广泛分布于基因组中,且不同物种间进化差异较大,通常认为可以应用于属

下种间, 甚至于亚种水平的研究, 而且在不少研究中 都验证了这一点。但是对于塔玛复合种这种情况比较 复杂。本文中东海藻株(LAMB130428)和 A. tamarense (LAMB110535)的 ITS 基因序列与 A. tamarense (KF034850), A. tamarense (HM483851), A. catenella (AJ968683)、A. tamarense (JQ285849)极为相似, 亲缘 关系极为接近。但与另外塔玛亚历山大藻的核苷酸差 异较大。Adachi 等(1996)指出, 海洋微藻 ITS 不同种 间的遗传距离值为 0.02—0.20, 但本文中东海藻株与 13 株塔玛亚历山大藻的遗传距离小于 0.20, 但其与 收录号为 AM292306、FT042686 的 2 株塔玛亚历山 大藻的遗传距离大于 0.20, 超过了 Adachi 指出的中 间遗传距离的范围。此外,东海藻株虽然在形态学上 和链状亚历山大藻存在差异、但其在 5.8s rDNA 及 ITS 区上的差异却非常小。根据 5.8s rDNA ITS 序列 分析比较只能认为东海藻株(LAMB130428)属于塔玛

复合种"亚洲温带"基因型(Group)。 从图 5 可以看出 同种的塔玛亚历山大藻,不同地域藻株间其核苷酸 序列存在较大差异, 从中也可以看出塔玛复合种间 的形态学特征虽然极为保守, 但其遗传学的特征却 有较高的变异。而系统进化树也反映了这一结果,同 名的塔玛亚历山大藻分列于不同基因型的复合体, 而同样的基因型中又包含着不同的藻种。对于这种现 象 Scholin 等(1995)曾提出塔玛复合种分子进化的"单 源辐射"假说, 他认为塔玛复合种内的各地理株起源 是相同的,经过长期的地理分隔和独立进化,虽然具 有相似的形态特征、但他们在遗传上产生了差异、这 一假说虽然在一定程度上和本实验的结果相吻合, 但也打破了形态学分类依据和遗传学分类依据的联 系。目前已有的分子生物学研究显示、该复合种包含 遗传上各异的若干株系与依据形态学分析划分的种 名之间没有严格的相关性、反映的是各个独立进化 的地理分隔的种群(Scholin et al, 1994, 1995; Adachi et al, 1996), 本文的结果也是如此。

不同的赤潮原因种都有最适宜生长、繁殖的温度 和盐度范围(陈翰林等, 2006)。东海原甲藻最适宜的 生长温度在 22°C 左右, 盐度为 25—31(张秀芳等, 2007)、同时受到海区物理、化学和生物等各方面的因 素相互制约。颜天等(2002)通过实验室改变环境因子 参数和数据分析得出、塔玛亚历山大藻生长的最适 宜条件是 19°C, 盐度 30。这和海上观察的塔玛亚历 山大藻高密度暴发时的温度、盐度条件基本相近。通 过分析这次暴发塔玛亚历山大藻密度最高的 ZE 断面 温度、盐度变化并结合塔玛亚历山大藻分布图、可以 明显地发现,从四月下旬开始,浙南闽北沿岸塔玛亚 历山大藻的密度均达到 10³cell/L, 但只零星分布, 只 有 ZE3 站位达到 10^4 cell/L, 一直到五月下旬, 温度逐 渐达到平均 19°C 左右, 为塔玛亚历山大藻生长提供 了稳定适宜的水温条件; 另一方面, 从盐度剖面分布 图观察, 可以明显地发现高盐水从外海向沿岸推进, 并形成了水体层化现象, 而水体层化会有利于许多 有害藻华的形成。Partensky 等(1986)在欧洲北部海域 发现米氏凯伦藻(Karenia mikimotoi)的分布与分层现 象有着密切的联系。东海原甲藻经常形成于分层水体 中, 并大规模繁殖形成大面积藻华(Lu et al, 2005; Zhou et al, 2008)。Dai 等(2013)通过探究剧毒卡尔藻 (Karlodinium veneficum)在东海海域形成藻华的条件 时,认为水体层化效应,特别是盐度的分层往往是赤 潮藻形成藻华的有利条件。层化效应最明显的时期是

春季后期,太阳辐射增强,季风转向导致台湾暖流高盐水在研究海区作用加强,使得水体中盐度分层效应明显(朱德弟等,2009; Zhou, 2010)。这与本次调查海域的塔玛亚历山大藻的种群变化乃至藻华形成时期的物理水文特征相一致。从4月中下旬东海原甲藻就零星出现于海区中,5月上中旬达到赤潮高峰,并逐渐向沿岸靠近,到5月下旬逐渐开始消散,而塔玛亚历山大藻种群丰度却乘势而上,其复杂的相互作用关系有待进一步研究。

4 结论

本文对分离自中国东海赤潮高发区的一株亚历山大藻,分别从显微结构及分子系统进化方面进行了描述和鉴定。利用光学显微镜、荧光显微镜及电子扫描电镜对目标藻的形态特征进行观察和描述;采用 ITS-rDNA 分子序列作为分子标记,从核苷酸序列分析、系统发育进化树及 Jukes-Cantor 遗传距离方面对目标藻的分子特征进行分析,结果表明该东海藻株在形态特征上基本与塔玛亚历山大藻一致,而核糖体基因型则为塔玛复合种"亚洲温带"基因型。同时,通过海上现场观测,认为塔玛亚历山大藻种群变动及藻华的发生机制与水体层化等有关。

致谢 感谢国家海洋局第二海洋研究所管卫兵研究员、陈琪老师、曹振轶老师和杨昀在水文方面的指导帮助,感谢藻华973项目成员在野外作业时提供的帮助。

参 考 文 献

王金辉, 黄秀清, 2003. 具齿原甲藻的生态特征及赤潮成因浅析. 应用生态学报, 14(7): 1065—1069

朱德弟, 陆斗定, 王云峰等, 2009. 2005 年春初浙江近海的低温特征及其对大规模东海原甲藻赤潮发生的影响. 海洋学报, 31(6): 31—39

李 扬,吕颂辉,江天久等,2009.浙江南麂海域塔玛亚历山 大藻种群动态及其与环境因子的关系。应用生态学报, 20(4):916—922

张秀芳, 刘永健, 2007. 东海原甲藻 *Prorocentrum donghaiense* Lu 生物学研究进展. 生态环境, 16(3): 343—347

陈翰林, 吕颂辉, 张传松等, 2006. 2004 年东海原甲藻赤潮暴发的现场调查和分析. 生态科学, 25(3): 36—40

林元烧, 1996. 有毒甲藻—塔玛亚历山大藻在厦门地区虾塘引起赤潮. 台湾海峡, 15(1): 16—18

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 2007. 海洋调查规范 第 6 部分:海洋生物调查. 北京:中国标准出版社, 1—157

- 唐祥海,于仁成,颜 天等,2006. 中国沿海亚历山大藻 (Alexandrium)核糖体 rDNA 部分序列分析及该藻属分子系 统进化研究. 海洋与湖沼,37(6): 529—535
- 尹 娟, 2011. 中国沿海塔玛亚历山大藻遗传多样性分析. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 5—6
- 曾 妮, 2013. 塔玛复合体第 类群的分布和扩散特征研究. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 3—5
- 颜 天,周名江,钱培元,2002.环境因子对塔玛亚历山大藻 生长的综合影响.海洋学报,24(2):114—120
- Adachi M, Sake Y, Ishida Y, 1996. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) speciesusing sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. Journal of Phycology, 32(3): 424—432
- Anderson, D M, 1989. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. Red tides: Biology, environmental science and toxicology, 11—16
- Balech E, Tangen K, 1985. Morphology and taxonomy of toxic species in the tamarensis group (Dinophyceae): *Alexandrium excavatum* (Braarud) comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) comb. nov. Sarsia, 70(4): 333—343
- Balech E, 1995. The genus *Alexandrium Halim* (Dinoflagellata). Sherkin Island marine station: 38—42
- Bolch C J S, Blackburn S I, Hallegraeff G M *et al*, 1999. Genetic variation among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinim calenatum* (Dinophyceae). Journal of Phycology, 35(4): 356—367
- Cembella A, Taylor F J R, 1985. Biochemical variability within the *Protogonyaulax tamarensis/catenella* species complex. Toxic Dinoflagellates, 55—60
- Dai X F, LU D D, Guan W B *et al*, 2014. Newly recorded *Karlodinium veneficum* dinoflagellate blooms in stratified water of the East China Sea. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 101: 237—243
- De Salas M F, Laza Martínez A, Hallegraeff G M, 2008. Novel unarmored dinoflagellates from the toxigenic family *Karrniaceae* (*Gymnodiniales*): five new species of *Karlodinium* and one new *Takayama* from the Australian sector of the southern ocean. Journal of Phycology, 44(1): 241—257
- Fukuyo Y, 1985. Morphology of *Protogonyaulax tamarensis* (Lebour) Taylor and *Protogonyaulax catenella* (Whedon and Kofoid) Taylor from Japanese coastal waters. Bulletin of Marine Science, 37(2): 529—537
- Gu H F, Zeng N, Liu T T et al, 2013. Morphology, toxicity, and phylogeny of Alexandrium (dinophyceae) species along the coast of China. Harmful Algae, 27: 68—81
- Halin Y, 1960. *Alexandrium minutum* nov. g. nov. sp. dinoflagelle provocant des eaux rouges. Vie Milieu, 11: 102—105
- Lilly E L, Halanych K M, Anderson D M, 2007. Species

- boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (dinophyceae). Journal of Phycology, 43(6): 1329—1338
- Li C, Zhang Y, Xie Z X et al, 2013. Quantitative proteomic analysis reveals evolutionary divergence and species-specific peptides in the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). Journal of Proteomics, 86: 85—96
- Loeblich III A L, Loeblich L A, 1979. The systematics of *Gonyaulax* with special reference of the toxic species. In: Taylor D L, Seliger H H eds. Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier North-Holland, New York: 41—46
- Lu D D, Goebel J, Qi Y Z et al, 2005. Morphological andgenetic study of *Prorocentrum donghaiense* Lu from the East China Sea, and comparison with some related *Prorocentrum* species. Harmful Algae, 4: 493—505
- Partensky F, Sournia A, 1986. Le dinoflagellé *Gyrodinium* cf. aureolum dans le plancton del'Atlantique Nord: identification, Ecologie, Toxicité Cryptogam, Algologie, 7: 251—275
- Prakash A, Medcof J C, Tennant A D, 1971. Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada bulletin of the fisheries. Research Board of Canada, 177: 1—87
- Scholin C A, Herzog M, Sogin M et al, 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed Alexandrium (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. Journal of Phycology, 30(6): 999—1011
- Scholin C, Hallegraeff G, Anderson D M, 1995. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions. Phycologia, 34(6): 472—485
- Steidinger K A, 1990. Species of the *tamarensis/catenella* group of *Gonyaulax* and the fucoxanthin derivative-containing gymnodinoids. Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York: 11—16
- Taylor F J R, 1979. The toxigenic *Gonyaulacoid* dinoflagellates developments in marine biology. Toxic Dinoflagellates Blooms. Elsevier North-Holland, New York: 47—56
- Wang D Z, Lin L, Gu H F *et al*, 2008. Comparative studies on morphology, its sequence and protein profile of *Alexandrium Tamarense* and *A. Catenella* isolated from the China Sea. Harmful Algae, 7(1): 106—113
- Zhou M J, 2010. Environmental settings and harmful algal blooms in the sea area adjacent to the Changjiang River Estuary. Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea: 133—149
- Zhou M J, Shen Z L, Yu R C, 2008. Responses of a coastal phytoplankton community to increased nutrient input from the Changjiang (Yangtze) River. Continental Shelf Research, 28(12): 1483—1489

MORPHOLOGICAL-PHYLOGENETIC ANALYSIS AND POPULATION DYNAMICS OF ALEXANDRIUM TAMARENSE IN THE BLOOM AREA OF THE EAST CHINA SEA

LI Dong-Rong, LU Dou-Ding, DAI Xin-Feng, HE Piao-Xia, XIA Ping, WANG Hong-Xia (Lab of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012, China)

Abstract We isolated and described *Alexandrium tamarense* Balech (LAMB130428) from the HAB area of East China Sea morphologically and phylogenetically in molecular level for taxonomic specifications using light microscopy, fluorescence microscopy, and scanning electron microscopy. The cell dimension are 21—35µm in length with 20—33µm in width. The ITS sequences of strain is 592bp. The phylogenetic tree suggests that the strain is clustered with two strains of *A. tamarense* of the South China Sea and *A. catenell* (a genotype of "Temperate Asian") in a high bootstrap value (100%). Morphologically in molecular scope, the strain was confirmed as *A. tamarense* as a genotype of "Temperate Asian". Cell density of *A. tamarense* ranges 1.0×10³—1.7×10⁴cell/L in the areas of South Zhejiang and North Fujian of China. The *A. tamarense* population kept increasing while *Prorocentrum donghaiense* bloom decreasing until the end of May. The relative high-density area of *A. tamarense* moved gradually coastward, which is very likely related to the physical driving forces, such as change of monsoon direction, Taiwan Warm Current invasion, and water stratification as well.

Key words East China Sea HAB area; *Alexandrium tamarense*; morphological characteristic; phylogeny population variation