

亚历山大藻属微卫星标记的筛选

王东东^{1,3}, 杨维东^{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等学校重点实验室, 广州 510632;

3. 广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要: 采用生物信息学方法, 从塔玛亚历山大藻的 ESTs 数据库中筛选微卫星 (Simple Sequence Repeat, SSR) 位点, 设计 SSR 引物, 利用毛细管电泳对 4 株塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*)、2 株相关亚历山大藻 (*Alexandrium affine*) 和 1 株链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) 进行种内、种间遗传多样性分析, 获得以下主要结果: (1) 从 6830 条非冗余的 ESTs 中共查找到 222 个 SSR, 平均每 18.5 kb 就有一个 SSR, 三核苷酸重复在所有的重复类型中所占比例最大, 达到 48.2%, 重复单元 CTG/CAG 出现频率最高。进一步筛选出 12 条 SSR 引物, 用于遗传多样性分析。(2) 种内遗传多样性水平整体偏低, 多态性引物比率仅为 41.67%, Nei's 基因多样性平均为 0.2130。种间遗传多样性水平较高, 多态性引物比率为 75%, Nei's 基因多样性平均水平为 0.4643; 另外, 种间遗传分化系数较高, 平均水平为 0.7051。(3) 对 7 个样品的聚类图分析发现, *A. tamarense* CCMP116 与 *A. affine* CCMP112 遗传距离极为接近; *A. tamarense* ATHK9301、CCMP1598 和 ATDH01 相互聚在一起; *A. catenella* ACDH01 与 *A. tamarense* 分属两枝。以上结果表明, SSR 标记在亚历山大藻种内遗传多样性分析方面是一种非常有用的工具。

关键词: 亚历山大藻; 表达序列标签; 微卫星标记; 遗传多样性

文章编号: 1000-0933 (2009) 04-2124-10 中图分类号: X55 文献标识码: A

Screening of microsatellite markers in *Alexandrium* spp.

WANG Dong-Dong^{1,3}, YANG Wei-Dong^{1,2}, LIU Jie-Sheng^{1,2,*}

1 Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 Guangdong Provinces High Education Key Lab of Eutrophication and Red Tide Control, Guangzhou 510632, China

3 Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(4): 2124 ~ 2133.

Abstract: To provide more information on the molecular identification methods for the genus *Alexandrium*, some SSR were screened from ESTs database about *Alexandrium tamarense* by means of bioinformatics. The genetic diversity was analyzed among 4 strains of *A. tamarense*, 2 strains of *A. affine* and 1 strain of *A. catenella* by capillary electrophoresis. Totally 222 SSR were discovered, one SSR per 18.5 kb in average. The trinucleotide repeats accounting for 48.2%, were dominant among the repeat motifs, of which CTG/CAG was the most type. Twelve of primers were further screened for the analysis of genetic diversity. Low level of genetic diversity was observed in intraspecies of *Alexandrium* spp., with the ratio of polymorphic primers of 41.67% and Nei's gene diversity of 0.2130 in average. In contrast, higher genetic diversity was observed in interspecies of *Alexandrium* spp. with ratio of polymorphic primers of 75% and Nei's gene diversity of 0.4643. The interspecies genetic coefficient of differentiation was higher with the average level of 0.7051. According to the dendrogram of these seven strains, *A. tamarense* CCMP116 and *A. affine* CCMP112 greatly closed to each other. *A. tamarense* ATHK9301, CCMP1598 and ATDH01 clustered together. *A. catenella* ACDH01 and *A. tamarense* distributed in the two branches. These results suggested that the SSR marker was a potentially useful method in the study of within-species genetic variability of *Alexandrium* spp.

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

收稿日期: 2007-10-24; **修订日期:** 2008-08-29

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tywd@jnu.edu.cn

Key Words: *Alexandrium* spp; EST; SSR; Genetic diversity

亚历山大藻属是重要的赤潮藻,其属下的 20 余种甲藻约一半是有毒种类,不仅破坏生态环境,而且危害人类健康。据报道,世界范围内每年由亚历山大藻产生的 PSP 毒素致死的人数多达几万人。目前对亚历山大藻进行鉴定,采用较多的仍是形态分类法,但由于形态分类法受环境变化和藻体不同生理阶段的影响,亚历山大藻固定的形态分类学标准一直难以统一^[1]。针对这种情况,人们急需有一个客观的标准用于亚历山大藻属的分类鉴定和系统进化分析。近年来,随着分子生物学的兴起,分子鉴定手段被越来越多的人所采用,人们试图从分子水平上认识藻种的遗传特征,以便对其进行更准确的分类。目前用于藻种鉴定的分子手段主要有核糖体 rDNA 序列分析^[2]、RFLP^[3]、RAPD^[4]等。Cholin 和 Adachi 等^[5]基于对 rDNA 序列的分析,研究了部分亚历山大藻的种系进化关系。唐祥海等^[5]分析了几株自南海及东海分离的亚历山大藻的 rDNA 部分序列信息,包括核糖体大亚基(LSU) rDNA 的 5'端 D1-D2 区序列、5.8S rDNA 和 ITS 区序列等,并与来自其它国家和地区亚历山大藻进行了比较,分析了其分子系统进化关系。王大志等^[6]采用扫描电镜、ITS 区序列分析及蛋白质组学的方法分析了 *A. tamarense* 和 *A. catenella* 之间的差异,认为两者应归为同种藻。但 Kamikawa 等^[7]建立的一种线粒体 DNA 分子标记却能够有效区分 *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. tamiyavanichii*, *A. affine*, *A. hiranoi* 和 *A. pseudogonyaulax* 等 6 种亚历山大藻。

微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 又称简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR 或 SRS), 是近年来发展较快、应用较广的一项分子遗传标记技术。由于微卫星的多态性以及灵敏度大大超过了 rDNA 序列或 RFLP 等以 DNA 为基础的分子标记。因此,微卫星标记技术已引起赤潮界的高度关注。2000 年, Rynearson 等^[8]对同一海域不同地点采集的 4 组硅藻样品进行了区域群体的微卫星分析。2004 年, Evan 等^[9]对尖刺拟菱形藻 (*Pseudonitzschia pungens*) 进行了分析。2007 年, Demura 等^[10]将微卫星标记应用于针胞藻纲 *Chattonella antique*、*C. marina* 和 *C. ovata* 的研究。本研究采用微卫星标记技术,对 3 种 7 株亚历山大藻进行遗传分析,以期建立一种新的亚历山大藻分子鉴定方法提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 藻种来源

塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) CCMP1598、CCMP116 和相关亚历山大藻 (*Alexandrium affine*) CCMP112 由 CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton) 提供,分别采自中国大亚湾海域、西班牙海域和西班牙海域。塔玛亚历山大藻 ATHK9301、ATDH01,相关亚历山大藻 A7 和链状亚历山大藻 (*Alexandrium catenella*) ACDH01 由厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室王大志教授提供,分别采自中国香港海域、长江口海域、香港海域和舟山海域。

1.2 实验方法

1.2.1 塔玛亚历山大藻 EST (Expressed Sequence Tag) 序列的查找与去冗余

本实验所用塔玛亚历山大藻 EST 序列主要来源于 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 主页的 dbEST 数据库。查找到 EST 序列后,利用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 程序,在 Windows 系统下对所得 EST 序列进行拼接。

1.2.2 微卫星位点的查找与 EST-SSR 引物设计

通过 GRAMENE 网站的在线搜索工具 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/searches/ssritool>) 进行微卫星位点的查找。为进一步利用塔玛亚历山大藻 EST 建立微卫星标记,在剔除 SSR 两侧序列小于 20 bp 的 EST 之后,对余下的已经去冗余拼接的 EST 用 Primer primer (version 5.0) 设计引物,并用 Oligo (version 6) 对设计出的引物进行评价。引物由上海生工公司合成。

1.2.3 藻的批量培养

除 CCMP1598 用 f/2-Si 培养基 (即是 f/2 培养基不加 Si 盐) 培养外,其它藻种均选用 f/2 培养基。实验所

用培养基为 3.3% 人工海水加营养盐配置而成,经 0.22 μm 纤维滤膜除菌所得。置于温度在 $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、光照强度为 4000 lx、光暗循环为 L:D = 12:12 的 Xutemp 智能生物人工气候箱中进行培养。

1.2.4 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用 TaKaRa 公司 Universal Genomic DNA Extraction Kit,略有改进:① 延长 65 $^\circ\text{C}$ 温浴时间至 60 ~ 70min,并隔 10 min 振荡混匀 1 次;② 增加 1 次 RinseA 洗脱过程。

1.2.5 PCR 反应

PCR 反应体系为 10 μl ,扩增聚合酶为 TaKaRa 的 Ex Taq $^{\text{®}}$ Hot Start Version,反应的成分及用量分别为:10 $\times$ PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 1 μl , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 0.8 μl , TaKaRa Ex Taq HS (5U/ μl) 0.1 μl , 微卫星上、下游引物各 0.3 μl , 模板 DNA 25 ~ 50 ng, 用 ddH $_2$ O 定量至 10 μl 。10000 r/min 离心 10 s, 置 PCR 扩增仪上进行扩增。采用 Touch down PCR, 具体反应程序如下: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 2 次。94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 退火温度每次下降 2 $^\circ\text{C}$, 每个温度 2 轮循环, 直至 50 $^\circ\text{C}$ 。94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 29 次, 于最后 1 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 7 min。采用许绍斌等^[11]发展的 DNA 银染方法, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。

1.2.6 荧光标记引物与毛细管电泳检测

选择 PCR 扩增产物清晰的引物进行荧光标记, 再次进行 PCR 扩增。

PCR 反应条件 (AmpliTaQ Gold) 为: 1 μl GeneAmp 10 $\times$ PCR Buffer II, 1 μl MgCl_2 (25 mmol/L), 0.8 μl dNTPs (2.5 mmol/L each), 1 μl Primer-mix, 0.2 μl AmpliTaQ Gold (5U/ μl), gDNA 终浓度为 50 ng, 最后用 ddH $_2$ O 补齐到 10 μl 。

PCR 反应条件如下: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 12 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 15 sec, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 15 sec (每过两个循环降 2 度, 直至 50 $^\circ\text{C}$), 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 sec。94 $^\circ\text{C}$ 变性 15 sec, 50 $^\circ\text{C}$ 退火 15 sec, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 sec, 循环 30 次, 于最后 1 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 15 min。将 Hi-Di Formamide 1 ml 和 GeneScan-500 LIZ Size Standard 50 μl 混合后, 取 9.5 μl 与 0.5 μl 经 20 倍稀释的 PCR 产物混合后在 PE9700 型 PCR 仪 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min, 迅速放置在冰中 5 min 以上。然后在 ABI PRISM $^{\text{TM}}$ 310 Genetic Analyzer 上用 PE 公司的 POP-4 胶, 15 kV 于 60 $^\circ\text{C}$ 下电泳 28 min。

电泳数据经 Genescan 软件 (3.7 版)、Genotyper (3.7 版) 处理后得到检测片段大小, 所用试剂除 dNTPs 由宝生物工程 (大连) 有限公司提供外, 其他试剂均由 Applied BioSystems 公司提供。

1.2.7 数据分析

用软件 POPGENE Version 1.31 对电泳结果进行统计, 分别计算观测等位基因数 (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) 和群体间遗传分化系数 (Genetic differentiation among populations, G_{ST}) 等。用 NTSYS 软件计算各个体间的遗传相似度和 Nei's 遗传距离, 再以 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means, 类平均法) 算法进行聚类分析, 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 ESTs 序列去冗余及微卫星位点的筛选结果

经过 DNASTar 软件聚类拼接, 从 10885 条塔玛亚历山大藻 CCMP1598 的 EST 序列中, 共获得 6830 条非冗余 EST。在 6830 条非冗余 EST 中, 共发现了分布于 201 个 EST 中的 222 个 SSRs, 占全部 EST 的 2.94%, 平均每 18.5 kb 就有一个 SSRs。三核苷酸重复在所有的重复类型中所占比例最大, 达到 48.2%, 重复单元 CTG/CAG 出现频率最高。在 201 条含有 SSRs 的 EST 中, 只含有 1 个 SSRs 的有 184 条, 含有 2 个 SSRs 的有 14 条, 含 3 个和 4 个 SSRs 的分别有 2 条和 1 条。

2.2 引物的筛选与扩增结果

根据引物设计标准, 从查找出的包含微卫星位点的序列中设计了 27 对引物。用 CCMP1598 对其进行扩增检测, 结果共有 20 对引物出现预期扩增产物, 其中 5 对来源于二碱基重复序列, 9 对来源于三碱基重复序

列,6 对来源于六碱基重复序列。从以上 20 对引物中挑选 10 对条带清晰、稳定性高、重现性好的引物与文献^[12]中的两对引物一起作为最终确定的检测位点,观察不同藻株间的扩增结果。

12 对引物在 7 株亚历山大藻中基本都有扩增条带产生,而且扩增结果中,除样品 A7 用引物 P5 扩出两条带外,其他样品都只有一条带,这大体符合当前认为塔玛亚历山大藻是单倍体的结论,推测两条带的出现可能是因为非特异扩增或同一位置存在两个基因型的原因。图 1 代表性地列出引物 P2、P8、P10 和 P12 的毛细管电泳检测结果。

12 对引物的实际扩增片断均在预期扩增范围之内。其中,除 P1、P4 和 P9 只有单一基因以外,剩下的 9 对引物均具有多态性,占到全部引物数目的 75%,说明在所有样品的水平上引物的选取具有一定的代表性。

2.3 塔玛亚历山大藻种内遗传多样性的分析

因客观条件限制,本实验中链状亚历山大藻和相关亚历山大藻选取的样本量不足以进行种内分析,因此仅对塔玛亚历山大藻进行了种内遗传多样性分析,结果见表 1。可以看出,12 对微卫星引物在 4 株塔玛亚历山大藻中共扩增出了 36 个位点,其中 5 对引物的 17 个位点(每对引物产生 2~4 个位点)具有多态性,多态性引物比率为 41.67%,Nei's 基因多样性平均为 0.2130。在 5 对具有多态性的引物中,每对引物观察到的等位

表 1 *A. tamarense* 12 个微卫星标记的遗传多样性统计
Table 1 Genetic diversity statistics of 12 SSR primers in *A. tamarense*

引物编号 Number	引物序列(5'—3') Primer sequence	核心序列 Repeat motif	观测等位 基因数 Observed number of alleles	有效等位 基因数 Effective number of alleles	产物范围 Product	Nei's 基因 多样性 Nei's Genetic Diversity
P1	AGTCACAAGAATGGTGGAAAG GGTGATAACCTGGGAGTGT	(CTC) ₅	1	1	239	—
P2	GCCAACTCAGCATCCTTCA ATGGCTTGTTCTTTCCTCT	(CTT) ₅	1	1	272	—
P3 ^[12]	AGAGCAAGGATGTTGGTTCCG GCAACGCTTTCGTTACCAGCA	(CA) ₁₄	3	3	159~173	0.6667
P4	AGCCTCACTTCGCCATCAT TCGACTTTCGCCACTTCCT	(CCCGTC) ₃	1	1	261	—
P5 ^[12]	CTCATGAGCATCGCTTCATTG CTTAAGGGATCCTGCAAAATTG	(GT) ₁₁ G(CGTGTG) ₄ CGT GCG(CGTGTG) ₅ (CGTG) ₃	1	1	243	—
P6	TGGCTTGAGACCGACTTT TGCTGTTGCGAGAAGGAC	(TGC) ₂₉	2	1.8	263~266	0.4444
P7	GCTCTTATCCTGGGAATGG ATTGAGGTGCCCTTGGGACT	(AG) ₁₁	2	1.8	250~252	0.4444
P8	TACTGAAATCTTGGGCTTCG TACAGGTGACGGGCTCTATG	(GCA) ₅	2	1.6	220~261	0.3750
P9	CATCTCCGACATGAGCTGGAT ACGAGGACTCCGACATGGAA	(GTC) ₅	1	1	167	—
P10	TGGTCGTTGTCGTGCTTG CTGGCGGACTTGTCTTT	(TGTGCT) ₅	1	1	288	—
P11	TGTTTCGCCTCTGAATGC GCAAAGACAAAGATGACGG	(CTTGTC)V3C(T) ₃ G CCTTG(TCCTTT) ₃	1	1	215	—
P12	ATGCCCTGCTAAAATGGG GCGTCTGGTGAATCGGTA	(AC) ₁₁	3	2.6667	278~290	0.6250
平均值 Average			1.5833	1.4889		0.2130

多态性引物数目 The number of polymorphic loci:5
多态性引物比率 The number of polymorphic loci:41.67%

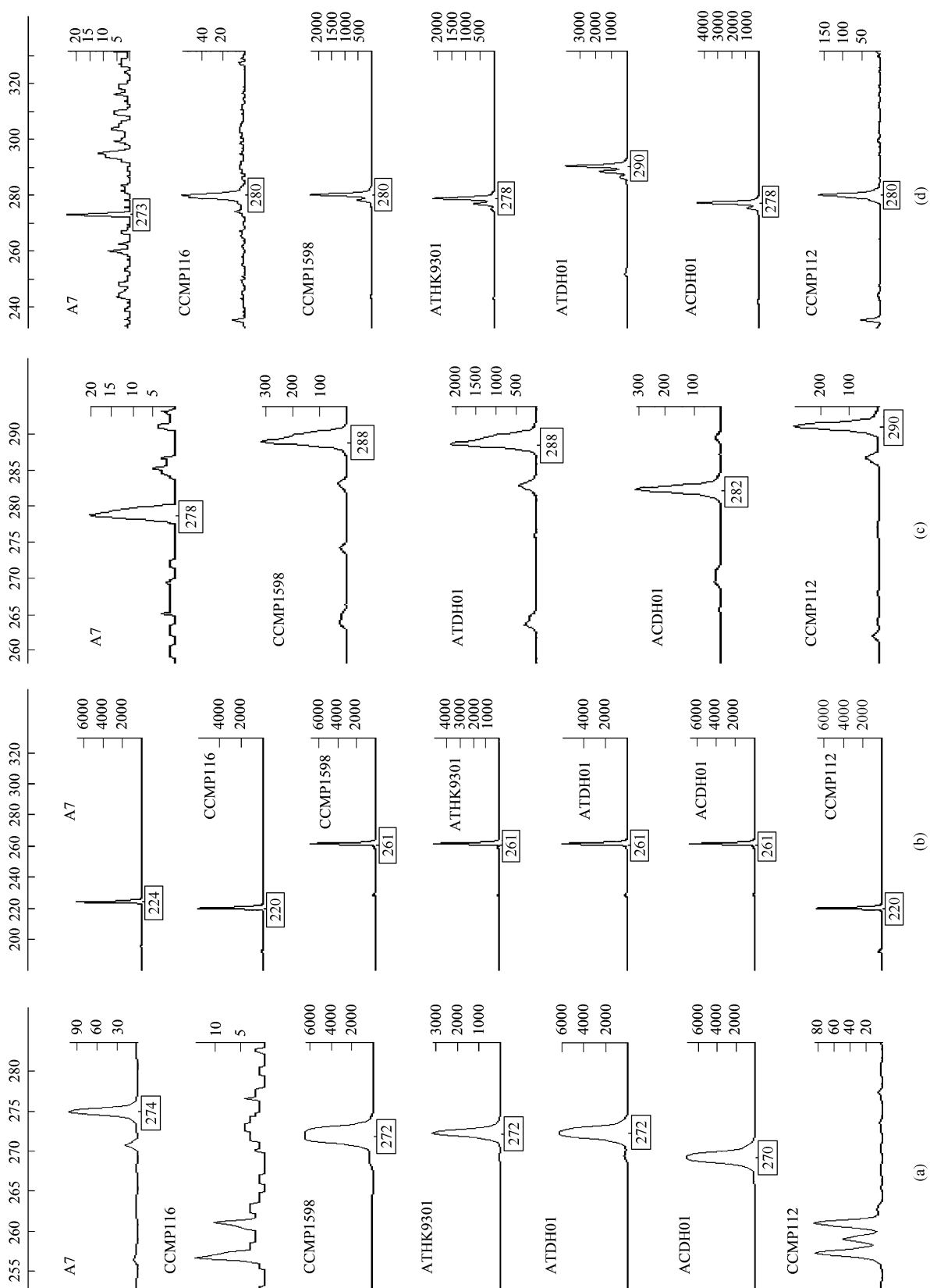


图1 部分 ESTs-SSR 引物的毛细管电泳图

Fig. 1 Analysis by capillary electrophoresis of part of ESTs-SSR primer

(a) P2; (b) P8; (c) P10; (d) P12

基因分别为 2~3 个, Nei's 基因多样性范围为 0.3750~0.6667, 总体平均等位基因数为 1.5833 个, 平均有效等位基因数为 1.4889 个。

2.4 种间的遗传多样性分析

为了解亚历山大藻整体的遗传差异, 对实验的 3 个物种间也进行了遗传多样性分析, 结果见表 2。

表 2 亚历山大藻 3 个物种(7 个藻株)间的遗传多样性统计
Table 2 Genetic diversity statistics of 3 species(7 samples) in *Alexandrium*

引物编号 Number	观测等位基因数 Observed number of alleles	有效等位基因数 Effective number of alleles	Nei's 基因多样性 Nei's Genetic Diversity	群体间遗传分化系数 Genetic differentiation among populations
P1	1	1	—	—
P2	3	2.2727	0.56	1.0
P3	4	3.5714	0.72	0.6667
P4	1	1	—	—
P5	3	3	0.6667	0.6
P6	3	2.6667	0.625	0.6364
P7	3	2.7778	0.64	0.7692
P8	3	2.3333	0.5714	0.4878
P9	1	1	—	—
P10	4	3.5714	0.72	0.7692
P11	2	1.6	0.375	1.0
P12	4	3.2667	0.6939	0.449
平均值 Average	2.6667	2.3383	0.4643	0.7051

物种间多态性引物数 The number of polymorphic loci: 9; 物种间多态性引物比率 The number of polymorphic loci: 75%

2.5 对 7 个样本的聚类分析

为进一步探讨微卫星标记在藻种鉴定方面的可行性, 在假设不知样本遗传背景的前提下, 利用得到的微卫星多态性的结果, 重新对 7 个样本进行聚类。7 个样本的遗传相似度矩阵和根据 Nei's (1978) 遗传距离构建的树状图如图 2 所示。

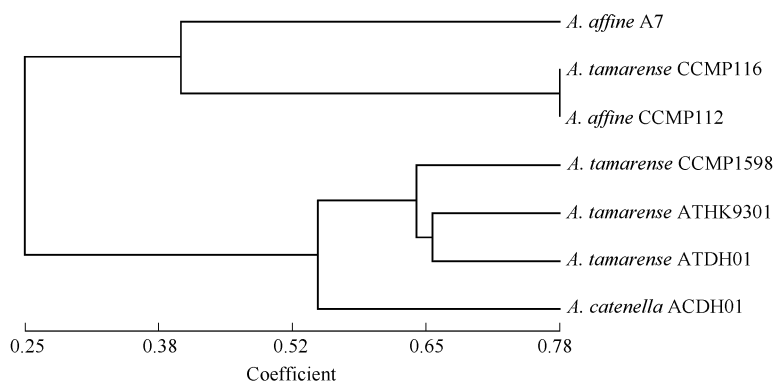


图 2 7 个样本间 Nei's 遗传距离聚类图

Fig. 2 The dendrogram based on Nei's genetic distance of 7 samples

从遗传相似度矩阵可以看出, CCMP1598、ATHK9301 和 ATDH01 之间具有相当大的遗传相似性, 分别达到 0.625000、0.656250 和 0.65625, 符合这 3 种藻按形态学分类属于同一种的结论; 但 CCMP116 与 CCMP112 之间相似度为 0.78125, 却与传统分类学相差较大。依据传统的形态学分类方法, CCMP116 属于塔玛亚历山大藻, 而 CCMP112 则属于相关亚历山大藻。链状亚历山大藻 ACDH01 与塔玛亚历山大藻 CCMP1598 和 ATHK9301 之间的相似度均为 0.59375, 表明 ACDH01 与塔玛亚历山大藻具有较大的遗传相似性。从遗传聚

类图上可以更直观地观察到这几点:ATHK9301、ATDH01 和 CCMP1598 首先聚类在一起,然后又与 ACDH01 聚在一枝,表明这 4 种藻的遗传距离彼此比较接近;有所不同的是,聚类图上 ACDH01 与其它 3 种藻虽然接近,却仍然有差异,具有自己独立的分支;其它,CCMP112 和 CCMP116 聚在一枝,二者与 A7 一起与其他 4 种藻区分开来。

3 讨论

3.1 微卫星位点的筛选

目前,微卫星位点查找方法主要分为两大类:(1)直接分离,从研究对象的基因组中分离出微卫星位点;(2)从已有数据库中查找微卫星位点或根据近缘物种基因组设计引物来扩增研究对象基因组。本研究采取从 EST 数据库中筛选 SSR 位点的方法,不仅得到了实验所需的 SSR 位点,而且克服了传统筛选方法效率低下的问题,同时节省了大量的人力、物力和财力,一定程度上也验证了应用 ESTs-SSR 在藻类鉴定中的可行性。

值得注意的是,因为 ESTs 数据来自单轮测序,序列的错误率可高达 2%~5%,且 ESTs 数据库中并未包含序列的质量信息,有时序列在提交到网上前未能完全去除来自基因组 DNA 的污染,所以从 ESTs 数据库中查找到的目标物种的 SSR 直接用于后续实验可能造成结果的假阳性,为了确保 SSR 序列的准确性,需要对序列进行前处理,主要包括:低质量序列和载体序列的去除、真核生物 mRNA polyA 尾巴的去除和冗余序列的拼接等。本研究中对下载的所有 EST 序列进行了检测,结果发现这些 EST 序列在网上提交之前已处理得较为干净,因此仅仅对其进行了冗余序列的拼接。

关于 ESTs-SSR 的查找标准,目前尚无一个确定的标准,不同的研究者有不同的选择。Saha 等^[13]采用的标准是二核苷酸重复次数 $n \geq 10$,三核苷酸重复次数 $n \geq 6$,四核苷酸重复次数 $n \geq 5$ 和五核苷酸重复次数 $n \geq 4$;Becker 和 Heun^[14]所用的依据是单核苷酸重复 $n \geq 10$,两核苷酸重复 $n \geq 5$,三核苷酸重复 $n \geq 4$ 和两个四核苷酸重复 $n \geq 3$;而 Scott^[15]采用的标准是单核苷酸 $n \geq 10$,两核苷酸重复次数 $n \geq 7$,三核苷酸重复次数 $n \geq 5$ 。一般来说,核心序列重复次数越多,其相关的多态性就越高,更利于实验结果的检测与分析。本实验采用 Scott 等的标准。

3.2 ESTs-SSR 的密度及其分布情况

塔玛亚历山大藻的 EST 序列在经过冗余拼接后,10885 条原始序列组装成了 6830 个 contig,约有 37% 的 EST 序列被整合或屏蔽,说明这些 EST 序列在提交至网上数据库之前并未经过质量检测,仍然存在大量的冗余及低质量序列。经过 contig 分析后,有些断裂的 SSR 又重新被拼接起来,不仅提高了 SSR 在 EST 序列中的含量,而且增加了实验的可靠性。

Eujay^[16]从苜蓿(*Medicago truncatula*)的 147000 个 ESTs 中发现了 4384 个微卫星位点,约占序列总数的 2.98%;Kantety 等^[17]对大麦、小麦、水稻、高粱和玉米 EST 中 SSR 的含量的统计发现,SSR 的含量分别为 3.4%、3.2%、4.7%、3.6% 和 1.5%。本实验共从 6830 条塔玛亚历山大藻 EST contig 序列中查找到各种类型的微卫星序列 222 个,SSR 数目约占全部 EST 序列的 2.94%,这与其它物种筛选出的微卫星比例大体相符。

塔玛亚历山大藻的 SSR 密度较低,大约为每 18.5 kb 出现一个 SSR,这与棉花(每 20 kb 出现一个 SSR)^[18]相仿,却远远低于其它已知的多数物种,如水稻^[18](每 3.4 kb 出现一个 SSR)、小麦(每 1.67 kb 出现一个 SSR)和拟南芥(每 6 kb 出现一个 SSR)^[19]等。

在塔玛亚历山大藻的 ESTs 中,三核苷酸重复所占的比例最高,达到 48.2%,这与大部分物种的报道一致^[18],据推测可能是因为三核苷酸重复数目的变化导致缺失了基因组的移码突变,从而避免了三核苷酸重复单元的消失^[20]。本实验中二核苷酸重复数目为 31 个,占全部 SSR 的 13.96%。其中,出现频率最高的重复单元是 CT/AG(7 次),这与其他物种的研究结果类似。Cardle^[18]在研究拟南芥时指出,AG/TC 在所有的微卫星序列中所占比例最大,并且为 AT/TA 重复的 8 倍;Kantety^[17]等证明 GA/CT 在 5 种禾本科植物中比例最高。刘必谦等^[21]研究条斑紫菜时发现,AG/CT 重复的次数最多。

3.3 荧光标记引物-毛细管电泳检测微卫星 DNA 多态性的优越性

关于微卫星 DNA 的检测方法,国内目前发展较为成熟的是聚丙烯酰胺凝胶电泳加银染,因其程序简单,

易操作,故大部分文献上采用此法^[22]。但该方法耗时、耗力,而且在大规模、多批次的数据收集和分析时存在相当大的难度;加上判读带型时不同等位基因的识别完全靠经验,主观性太强,造成了实验结果的不可靠。因此,这种方法已逐渐被毛细管电泳所替代。毛细管电泳作为一种快速分析方法,具有高效、快速、高灵敏度的特点,已广泛用于医学、生物学等领域,在核酸、多肽和蛋白质等生物大分子的分析检测方面显示出巨大的优越性^[23]。本实验用聚丙烯酰胺凝胶电泳首先判断引物的质量,再以毛细管电泳作为最终微卫星 DNA 多态性的检测手段,使得二者优势互补,既节省时间,又保证了实验结果的准确性。

3.4 微卫星位点多态性的分析

本研究的 12 个微卫星座位在 3 种 7 株亚历山大藻中共检测到了 32 个等位基因,平均每个座位有 2.66 个等位基因。塔玛亚历山大藻种内基因多样性为 0.375 ~ 0.6667,总体低于国外已发表文献中的塔玛亚历山大藻种内基因多样性水平^[12]。究其原因,样本量小是一个主要的影响因素。Nagai 等^[12]曾经选用 20 个样品对 13 个微卫星位点检测,基因多样性高达 0.632 ~ 0.974,而本实验仅有 4 个样品,材料较少,造成了数值的偏低。除此之外,与材料的选择、引物的来源也有关系。实验中所用塔玛亚历山大藻大部分采自同一海域或邻近海域,光照、温度、盐度等各种环境因素相差较小,很大程度上造成了塔玛亚历山大藻各株之间基因结构的趋同与遗传变异的缓慢。同时,由于此次实验的微卫星引物是从 EST 序列设计得来,ESTs-SSR 来源于基因转录编码区,而一些与生物基本生理、生化和代谢密切相关的基因在物种内和物种间高度保守。

相对于种内来说,物种间微卫星位点的基因多样性表现的较为丰富,平均达到 0.4643,并且遗传分化系数也较高,这说明不同藻种间由于不同的地理环境、不同的遗传背景可能造成其具有较高的多态性。

实验中,个别样本对于一些微卫星位点表现为条带缺失,其原因有二:一是引物扩增位点不存在目的基因;二是存在无效等位基因^[24]。除了条带缺失,个别位点还出现产生多余条带的现象,如 P5 在样品 A7 中扩出两条带,这与目前认为亚历山大藻是单倍体的推断有悖。研究表明,甲藻除了生殖期为二倍体外,其他时间均为单倍体,而如果为纯培养,则即使处于二倍体时期仍然为纯合子,因此在做微卫星实验的时候,应该只能有单一条带出现。迄今已有不少研究证实了这个推断,如 Scott 等^[25]用微卫星方法证实了甲藻属于单倍体;Nagai 等^[12]对 *A. tamarense* 进行微卫星扩增,只有单条带出现。关于出现多于一条带的现象,Scott 等^[25]推测可能是由于该位点包含至少两个基因型的缘故。在设计引物时,如果两侧序列相差过远,有可能核心序列不止一个,在电泳图上就可能出现多于预期数目的条带,Rynearson 等^[8]在研究硅藻时也发现类似现象。硅藻为二倍体,本应出现一至两条带,但结果显示有 3 条带出现。本实验中引物 P5 选自文献,对其引物筛选过程缺乏了解,不排除存在两个基因位点的可能,至于具体情况需进一步研究。

3.5 用微卫星标记对亚历山大藻属进行分子鉴定的初步探讨

本实验应用微卫星技术对选用的 7 个样品的进化关系进行了初步分析,从聚类图可以看出,分离自西班牙海域的 *A. tamarense* CCMP116 与 *A. affine* CCMP112 非常接近,无显著差别。造成这种情况的原因可能与共生细菌的干扰有关^[26]。两种藻均来自西班牙海域,可能携带相同的细菌;另一方面,可能与本文所用的微卫星数量有限有关。从中国海域分离的 3 种塔玛亚历山大藻 ATHK9301、CCMP1598 和 ATDH01 在进化距离上相互接近,符合传统分类学标准;同样分离自中国海域的 *A. catenella* ACDH01 在聚类图上与 *A. tamarense* 的距离较近,但没有完全聚在一枝,而是拥有自己独立的分枝,这与陈月琴^[27]、Kamikawa 等^[7]的研究结论相似,说明微卫星标记可以区分这两种藻。陈月琴等^[27]发现,*A. tamarense* 和 *A. catenella* 种间 ITS 区序列有显著差异,核苷酸差异值大于 20%,应作不同种处理。Kamikawa 等^[7]建立的基于线粒体 DNA 的分子标记,也将 *A. tamarense* 和 *A. catenella* 有效区分开来。然而,许多学者却认为二者实为一种藻,有人为了方便,干脆将其统称为“*Alexandrium complex*”。王大志等^[6]根据 ITS 序列和蛋白质组成的差异提出,*A. tamarense* DH01 和 *A. catenella* DH01 应归于同一藻类。

从聚类图上,还能观察到一个现象,即分离自相同或相近海域的藻种在遗传距离上相互接近。实际上,根据 *Alexandrium* LSU rDNA 的序列,可以将塔玛亚历山大藻分为北美(NA)、中亚(TA)、西欧(WE)和

地中海 (ME) 等不同的地理进化枝, 却难以区分 *A. tamarense*、*A. catenella* 和 *A. fundyense* 之间的差异^[6]。这一方面可能是在分离藻种时, 误把同种藻定为不同种; 另一方面可能由于基因流的存在。基因流是指基因在群体中的运动, 当一些个体从一个群体迁移到另一个群体时, 他们把自身的基因带到新的群体中, 使新的群体的基因组成、基因频率等都有较大的变化。基因在群体间流动的水平越大, 群体就会越均匀, 或普遍相似^[28]。另外, 由于赤潮藻的无菌培养比较困难, 不能忽略共生细菌对结果的干扰和影响^[26]。

4 结论

从 6830 条非冗余的 ESTs 中共查找到 222 个 SSR, 平均每 18.5kb 就有一个 SSR, 三核苷酸重复在所有的重复类型中所占比例最大, 达到 48.2%, 重复单元 CTG/CAG 出现频率最高。进一步筛选出 12 条 SSR 引物, 用于遗传多样性的分析。遗传多样性分析结果显示, 种内遗传多样性水平整体偏低, 多态性引物比率仅为 41.67%, Nei's 基因多样性平均为 0.2130。种间遗传多样性水平较高, 多态性引物比率为 75%, Nei's 基因多样性平均水平为 0.4643; 另外, 种间遗传分化系数较高, 平均水平为 0.7051。聚类分析发现, *A. tamarense* CCMP116 与 *A. affine* CCMP112 遗传距离极为接近; *A. tamarense* ATHK9301、CCMP1598 和 ATDH01 相互聚在一起; *A. catenella* ACDH01 与 *A. tamarense* 分属两枝。SSR 标记在亚历山大藻种内遗传多样性分析方面是一种非常有用的工具。

References:

- [1] Qiu X Z, Chen Y Q. Progress in molecular phylogeny of the genus *Alexandrium* (Dinoflagellate). *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1997, S1: 125–129.
- [2] Zhang B Y, Wang G C, Zhang Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of 5.8S rDNA and its region from *Prorocentrum donghaiense* and *P. micans* APBM. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 3: 264–272.
- [3] Chen Y Q, Qu L H, Zeng L M, *et al.* Molecular identification of red tide toxic *Alexandrium tamarense*-*Alexandrium catenella* from the South China Sea. *Acta Oceanologica Sinica*, 1999, 3: 106–112.
- [4] Li G, Jiang Y, Qiao D R, *et al.* Genetic variability analysis of the halophilic species in *Dunaliella* by RAPD. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2002, 22(3): 511–515.
- [5] Tang X H, Yu R C, Yan T, *et al.* Sequence analysis and molecular phylogenetics of ribosomal RNA gene of *Alexandrium* (Dinophyceae) strains in China. *Oceanology et Limnology Sinica*, 2006, 37(6): 529–535.
- [6] Wang D Z, Lin L, Gu H F, *et al.* Comparative studies on morphology, ITS sequence and protein profile of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* isolated from the China Sea. *Harmful Algae*, 2008, 7: 106–113.
- [7] Kamikawa R, Hosoi-Tanabe S, Yoshimatsu S, *et al.* Development of a novel molecular marker on the mitochondrial genome of a toxic dinoflagellate, *Alexandrium* spp., and its application in single-cell PCR. *J Appl Phycol*, 2008, 20: 153–159.
- [8] Ryneerson T A, Armbrust E V. DNA fingerprinting reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45(6): 1329–1340.
- [9] Evans K M, Hayes P K. Microsatellite markers for the cosmopolitan marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens*. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(1): 125–126.
- [10] Demura M, Kawachi M, Kunugi M, *et al.* Development of microsatellite markers for the red tide-forming harmful species *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(2): 315–317.
- [11] Xu S B, Tao Y F, Yang Z Q, *et al.* A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation. *Hereditas* (Beijing), 2002, 24(3): 335–336.
- [12] Nagai S, Lian C, Hamaguchi M, *et al.* Development of microsatellite markers in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(1): 83–85.
- [13] Saha M, Mian M, Eujayl I, *et al.* Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109(4): 783–791.
- [14] Becker J, Heun M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Molecular Biology*, 1995, 27(4): 835–845.
- [15] Scott K D, Eggler P, Seaton G, *et al.* Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100(5): 723–726.
- [16] Eujayl I, Sledge M, Wang L, *et al.* Medicago truncatula EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *TAG Theoretical and*

- Applied Genetics, 2004, 108(3): 414—422.
- [17] Kantety R V, La Rota M, Matthews D E, *et al.* Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48(5): 501—510.
- [18] Cardle L, Ramsay L, Milbourne D, *et al.* Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 2000, 156(2): 847—854.
- [19] Morgante M, Hanafey M, Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet*, 2002, 30(2): 194—200.
- [20] Metzgar D, Bytof J, Wills C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*, 2000, 10(1): 72—80.
- [21] Liu B Q, Zeng Q G, Luo Q J, *et al.* Isolation of microsatellite loci from dbEST of algae *Porphyra yezoensis* and primer amplification of interspecies transfer. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, 3: 248—254.
- [22] Wu Y T, Zhang T Z, Guo W Z, *et al.* Detecting polymorphism among upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars and their roles in seed purity of hybrids with SSR markers. *Acta Gossypii Sinica*, 2001, 3: 131—133.
- [23] Han F T, Xu Q, Lin B C, *et al.* Polymerase chain reaction product analysis by capillary electrophoresis in a denatured non-gel sieving matrix. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1999, 10: 1179—1182.
- [24] Zhang Y W, Zhang Y P. Microsatellites and its application. *Zoological Research*, 2001, 4: 315—320.
- [25] Scott R S, Mary A C. Molecular genetic evidence that dinoflagellates belonging to the genus *Symbiodinium freudenthal* are haploid. *The Biological Bulletin*, 2003, 204(1): 10.
- [26] Touzet N, Franco J M, Raine R. Characterization of nontoxic and toxin-producing strains of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Appl Environm Microbiol*, 2007, 73(10): 3333—3342.
- [27] Chen Y Q, Qu L H. Molecular criteria for the delimitation of *Alexandrium* species based on the analyses of rDNA ITS. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1999, 1: 7—11.
- [28] Qu R Z, Hou L, Lv H L, *et al.* The gene flow of population genetic structure. *Hereditas (Beijing)*, 2004, 26(3): 377—382.

参考文献:

- [1] 邱小忠, 陈月琴. 海洋亚历山大藻属分子系统学研究进展. *中山大学学报(自然科学版)*, 1997, S1: 125~129.
- [2] 张宝玉, 王广策, 张炎, 等. 东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)和海洋原甲藻 APBM(*P. micans* APBM)的 5.8S rDNA 及其转录间隔区(ITS)的克隆和序列分析. *海洋与湖沼*, 2004, 3: 264~272.
- [3] 陈月琴, 屈良鸽, 曾陇梅, 等. 南海赤潮有毒甲藻链状-塔马亚历山大藻的分子鉴定. *海洋学报(中文版)*, 1999, 3: 106~112.
- [4] 李钢, 蒋彦, 乔代蓉, 等. 利用 RAPD 分析杜氏藻属(*Dunaliella*)嗜盐种间遗传多样性. *西北植物学报*, 2002, 22(3): 511~515.
- [5] 唐祥海, 于仁成, 颜天, 等. 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*, 2006, 37(6): 529~535.
- [11] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法. *遗传*, 2002, 24(3): 335~336.
- [21] 刘必谦, 曾庆国, 骆其君, 等. 条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)dbEST 中筛选微卫星位点及引物种间转移扩增. *海洋与湖沼*, 2005, 3: 248~254.
- [22] 武耀廷, 张天真, 郭旺珍, 等. 陆地棉品种 SSR 标记的多态性及用于杂交种纯度检测的研究. *棉花学报*, 2001, 3: 131~133.
- [23] 韩富天, 许琪, 林炳承, 等. 变性无胶毛细管筛分电泳分析聚合酶链式反应产物. *分析化学*, 1999, 10: 1179~1182.
- [24] 张云武, 张亚平. 微卫星及其应用. *动物学研究*, 2001, 4: 315~320.
- [27] 陈月琴, 屈良鸽. 海洋亚历山大藻属种间界定的分子标准. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 1: 7~11.
- [28] 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流. *遗传*, 2004, 26(3): 377~382.