

海洋超微型浮游植物遗传多样性的分子系统学研究进展

陈敏艺 袁洁 陈月琴* 屈良鹤

中山大学基因工程教育部重点实验室, 广州 510275

摘要 近20年来, 分子系统学技术在海洋超微型浮游植物遗传多样性领域的应用, 使该领域的研究突破了传统研究方法的限制而得到迅速发展, 同时对海洋生物学和生态学研究也产生了重要影响, 充分显示海洋超微型浮游植物在海洋生态系统的能量流动和物质循环中起到重要作用。文中介绍了海洋超微型浮游植物的发现、特征和生态作用; 重点阐述了应用分子系统学方法研究其遗传多样性的主要成果和相关方法学进展; 最后展望了发展方向和应用前景。

关键词 海洋超微型浮游植物 聚球藻 原绿球藻 超微型真核藻类 分子系统学 遗传多样性

1 海洋超微型浮游植物简介

1.1 定义和发现

浮游植物(phytoplankton)大量吸取二氧化碳, 将之储藏到海洋深处, 同时释放氧气, 被喻为“大海中的隐形森林”^[1]。海洋超微型浮游植物(ultra-phytoplankton)是海洋浮游植物生物量和初级生产力的主体。它们是指直径 $\leq 5 \mu\text{m}$ 的浮游植物, 包括了所有的皮可型浮游植物(picophytoplankton, $\leq 2.0 \mu\text{m}$)和直径为 $2\text{--}5 \mu\text{m}$ 的纳诺型浮游植物(nanophytoplankton, $2.0\text{--}20 \mu\text{m}$)^[2]。海洋超微型浮游植物可分为超微型原核浮游植物和超微型真核浮游植物。前者主要是指单细胞蓝藻(蓝细菌)的聚球藻(*Synechococcus*)和原绿球藻(*Prochlorococcus*); 后者是指各种超微型真核藻类。

实验技术的重大进展和突破, 推动了海洋超微型浮游植物研究的不断进步。1979年, Johnson和Sieburth应用表面荧光显微技术, 在世界热带和温带海洋中第一次发现了具有强烈橙色荧光、直径约为 $0.5\text{--}1.5 \mu\text{m}$ 的光合自养原核生物——聚球藻

(*Synechococcus*)^[3]。1982年, 他们应用透射电子显微镜技术又发现了多种超微型真核浮游植物^[4]。至今发现的最小的光合自养原核生物——原绿球藻(*Prochlorococcus*), 由于体积极小, 过滤时容易丢失; 再加上微弱的自发荧光在表面荧光显微镜下极快消逝, 曾被误认为海洋细菌而被忽略^[5]。直到1988年, Chisholm等通过流式细胞仪的检测, 首次发现了这种海洋中丰度最高的光合自养原核生物, 原绿球藻从此成为了近20年来海洋生态学研究的重要材料之一^[6]。

1.2 特征与分布

海洋环境的特殊性使超微型浮游植物的生存竞争非常激烈。然而它们比表面积大, 光合色素特异, 能有效利用生存空间, 因此有着惊人的生物量和互补的生态位。超微型浮游植物的特征及分布详见表1^[2,7-13]。

1.3 生态作用

海洋超微型浮游植物个体微小, 沉降速度慢, 在真光层停留时间长^[14]。具有独特的光合色素和较

2004-11-08 收稿, 2005-03-28 收修改稿

* 通讯作者, E-mail: michelle.chen@na.amedd.army.mil; lsbr04@zsu.edu.cn

低的营养盐半饱和常数,比表面积大,能量转换率高^[15]。再加上数量大,多样性丰富,生物量循环迅速,成为海洋,尤其是寡营养海域,能量流动和物质循环的动力泵。海洋超微型浮游植物光合作用释放的或者残骸降解产生的溶解有机质(DOM),参与了异养细菌的“二次生产”。同时,海洋超微型浮游植物还被微型和小型浮游动物(如鞭毛虫或纤毛虫)所摄食,是微生物食物环(microbial food loop)必不可少的组成部分^[16]。

表1 超微型浮游植物的特征及分布

特征	聚球藻	原绿球藻	超微型真核浮游植物
直径/ μm	0.5-1.5	0.6-0.8	≤ 5
色素组	叶绿素 a-藻胆色素	二乙烯基叶绿素- α 类胡萝卜素-玉米黄素	叶绿素 a-藻胆素, 叶绿素 a-叶绿素 b-类胡萝卜素, 叶绿素 a-叶绿素 c-类胡萝卜素
吸收光	蓝绿光	蓝紫光	蓝紫光
分布	水平分布较广, 耐受温度范围低至 2 $^{\circ}\text{C}$	南北纬 40 $^{\circ}$ 间的海域, 垂直分布较广, 生长的光强范围可跨越 4 个数量级	沿海、开阔海洋甚至低温的南极深海
富存海域	低纬度水深 25 m 以上的富营养或中营养海域	相当于海面光照 0.1% 的 100 - 200 m 的热带、亚热带寡营养海域	在高纬度真光层底部是海洋超微型浮游植物的主体

2 遗传多样性研究进展

以往对海洋超微型浮游植物的研究,集中在分布、丰度及对初级生产力贡献的动态变化,环境影响因素等方面。通常用落射荧光显微镜或流式细胞仪进行分类和计数,或者应用高效液相色谱对色素进行定性、定量分析,研究其生物量的昼夜、季节或年间变化,进而推测其环境调控机制^[17-19]。近几年,分子系统学技术的引入,使海洋超微型浮游植物的遗传多样性及分类鉴定成为最活跃的研究领域。2000年,法、英、德、挪威和西班牙的重点实验室联手创立了 PICODIV 计划,在海洋聚球藻、原绿球藻的生理生态多样性和海洋超微型真核浮游植物的分子鉴定方面,已获得重要进展^[11-13]。

2.1 聚球藻

目前,根据捕光色素、G+C 核苷含量和生理特征等指标,可把聚球藻分为以下几类:MC-A (marine cluster A), MC-B (marine cluster B) 和 MC-C (marine cluster C)^[20]。其中 MC-A [(G+C) $\approx 55\% - 62\%$] 含藻红蛋白,在高盐 (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} 及 Ca^{2+}) 环境下生长,富存于沿海和大洋的真光层中;MC-B [(G+C) $\approx 63\% - 66\%$] 含藻蓝蛋白 (phycocyanin, PC) 而缺藻红蛋白 (phycoerythrin, PE),耐盐但生长不要求高盐,富存于沿海;MC-C [(G+C) 约 47.5% - 49.5%] 存在于沿海,至今对其研究不多^[21]。

分子系统学已用于研究 MC-A 的遗传多样性。利用 16S rDNA 为分子指标可将 MC-A 划分为 10 个进化枝^[20,22] (见表 2)。其中,色适应 (chromatic adaptation) 是指当环境光线从白光变为蓝光时,藻尿胆素 (PUB) 与藻红素 (PEB) 的比率 (PUB/PEB) 会随之增大^[23]。这使聚球藻能够利用多种光线,因此水平分布较广。富含 PEB 的株系常在沿海或中营养混浊水体中,而富含 PUB 的株系常在大洋或寡营养透明水体中^[24]。Clade VIII 具有 MC-B 的特征 (缺 PE、耐盐、G+C 含量高),但分子系统发生却在 MC-A 之内。而且 Clade VIII 中还存在表型多样性,例如有些能以硝酸盐作为氮源,有些则不可以。值得注意的是,并不是每个进化枝都有共同的表型特征 (如 Clade IV, VII 和 IX)。不同的进化枝间也可能存在相同的生理特征 (如 Clade II, V 和 X 都是低 PUB)。MC-A 丰富的遗传多样性反映了其生理和生态位的复杂性。

表2 根据 16S rDNA 划分的 10 个 MC-A 系统发生进化枝

进化枝	特征	进化枝	特征
Clade I	色适应	Clade VI	缺 PUB
Clade II	低 PUB	Clade VII	---
Clade III	某些具游动性,高 PUB	Clade VIII	缺 PE,耐盐
Clade IV	---	Clade IX	---
Clade V	低 PUB	Clade X	低 PUB

2.2 原绿球藻

原绿球藻可分为两种生态型 (ecotype): 高光适应型 (HL 或 low-B/A) 和低光适应型 (LL 或 high-B/

A). 两者存在明显的生理生态差异^[8, 25-28] (见表3). 应用分子标记构建系统发生树, 可较好地区分两种生态型^[22, 29, 30]. 其中, HL 可分为两个亚类群: HL I (或 low-B/A I) 和 HL II (或 low-B/A II). LL 并非单系起源, 可细分为 4 个进化枝, 其遗传多样性比 HL 更丰富^[22].

比较基因组学证明, 两种生态型的某些生理特征及生态位分离是有遗传基础的^[30] (见表4). 例如位于深海的 MIT9313 株系, 通过两个拷贝的 *psbA* 和 *pcb* 基因来提高捕光能力; 它还含有亚硝酸还原

酶基因和两个拷贝的 *pstS*, *pstABC* 基因, 能利用深海中的亚硝酸盐和正磷酸. 而 MED4 株系通过类碱性磷酸酶基因来利用浅海中丰富的有机磷; 它还含有光解酶基因, 能修复强光照产生的紫外损伤. 此外, 细胞表面多糖的差异导致了噬菌体识别的特异性. 基因组水平上的差异正是生物对环境适应的结果. 同样, 不同海域特有生态型的分布也可以反映出该海域的光照、营养水平、海洋环流等环境特征.

表3 原绿球藻两种生态型的特征比较

特征	高光适应型	低光适应型
生长环境	高光照、营养相对贫瘠	低光照、营养相对丰富
分布	HL I在浅海区, HL II从海面到 100 m 深海区	真光层底部(约 80—200 m)
荧光	微弱荧光	强烈荧光
chl <i>b₂</i> / <i>a₂</i> 比率	低(low-B/A)	高(high-B/A)
强光照适应力	强	较弱
耐受的 Cu ²⁺ 浓度	较高	较低
氮源	还原态氮, 不能利用硝态氮	某些株系可利用亚硝酸盐
磷源	有机磷及正磷酸	利用正磷酸, 不用有机磷
感染的噬菌体	短尾病毒(<i>Podoviridae</i>)	肌尾病毒(<i>Myoviridae</i>)
遗传多样性	较 LL 少	较 HL 多

表4 原绿球藻两种生态型株系的基因组差异

株系(生态型)	MED4(HL)	MIT9313(LL)
光系统 II D1 蛋白 <i>psbA</i> 基因	1 个	2 个
叶绿素结合蛋白 <i>pcb</i> 基因	1 个	2 个
高光诱导的蛋白基因	22 个	9 个
光解酶基因	有	无
亚硝酸还原酶基因	无	有
利用有机氮的相关基因	有利用尿素、氰酸盐、寡肽的相关基因, 缺单个氨基酸转运蛋白基因	有利用尿素、寡肽的相关基因及氨基酸转运蛋白基因, 缺利用氰酸盐相关基因
碱性磷酸酶基因	有	无
磷酸结合元件 <i>pstS</i> 基因	1 个	2 个
与磷相关的调控基因 <i>phoB</i> , <i>phoR</i> , <i>ptrA</i>	有	<i>phoR</i> 移码, <i>ptrA</i> 退化
细胞表面多糖基因	74.5 kb 基因簇, 缺 MIT9313 部分表面多糖生物合成基因	41.8 kb 基因簇

2.3 超微型真核浮游植物

2.3.1 研究技术的突破 海洋超微型真核浮游植物的遗传多样性研究才刚刚起步。这是由超微型真核浮游植物的特点决定的：(1) 个体微小，缺乏明显的形态特征^[31]。(2) 系统分类复杂，几乎每个藻门都有超微型真核藻类的代表。(3) 难以分离培养，培养种不能真实反映野生种的丰度和多样性^[32]。(4) 色素组成复杂，不能直接用流式细胞仪分选；应用高效液相色谱也只能鉴定到纲的水平^[33]。

直到2001年，分子系统学技术为超微型真核浮游植物的遗传多样性研究带来了新突破。Moonvan der Staay 和 Lopez-Garcia 等通过构建18S rDNA 克隆文库和分子系统树，分别研究了太平洋赤道区和南极水域超微型真核浮游生物的多样性^[11,12]。随后，世界各大洋和沿岸海域也作了相关的多样性研究^[13, 27-37]。国内，邵鹏等在中国厦门西海域开展了真核微藻种群结构的研究工作^[38]。此后，袁洁等对南沙海域超微型真核微生物的遗传多样性进行了探讨^[39,40]。海洋超微型真核浮游植物的遗传多样性研究方兴未艾。

2.3.2 主要研究成果

(1) 物种多样性丰富，遗传多样性高

目前，红海、地中海、南极水体、英吉利海峡西部、大西洋沿岸及外海、太平洋沿岸及赤道海域都有关于超微型真核浮游植物多样性的研究报道^[11, 13, 32, 37, 40, 43]。结果发现其多样性非常高，主要是由13个纲的真核藻类组成(见表5)。每个藻纲所包含的物种也相当丰富。例如至今发现细绿藻纲(Prasinophyceae)的16个属都有超微型藻的代表。

另外，不同地理株之间的遗传多样性较高。例如来自太平洋、地中海和英吉利海峡的 *Ostreococcus* 株系，在分子系统树上可分化为4个进化枝，说明 *Ostreococcus* 存在多种生态型，它们分别适应

不同海洋环境^[36]。又如棕囊藻(*Phaeocystis*，直径2.5—7 μm)在不同海域存在不同的地理株。以核糖体18S rDNA为分子指标，鉴定1997年诱发中国粤东海域赤潮的棕囊藻为本地起源的暖水种球形棕囊藻(*P. globosa*)，而区别于来自欧洲北海或北大西洋的冷水种胞奇棕囊藻(*P. pouchetii*)^[41,45]。

(2) 不同海域种群结构不同

某些超微型真核浮游植物只出现在特定的海洋环境中，使得不同海域的种群结构不同。譬如 *Bolidophyceae*, *Eustigmatophyceae* 和 *Pelagophyceae* 属的超微型藻，通常存在于南极水域、地中海和太平洋赤道海域，在英吉利海峡却没有发现^[13]。

但是某些超微型真核浮游植物能广泛存在于全球海洋环境，并表现出种群个体丰度的地理差异。例如 *Micromonas pusilla* 在加勒比海、马尾藻海、太平洋赤道和北太平洋西部海域中的丰度是1—10个/mL；在北极水体为10—10³个/mL；在挪威沿海、那不勒斯湾、巴伦支海和乔治亚海峡中高达10³—10⁴个/mL。说明 *Micromonas pusilla* 是温带富营养沿海区超微型真核浮游植物的优势种群^[36,37]。

(3) 存在未鉴定的新类群

在基因文库中，除了与已知的海洋超微型真核浮游植物具有较高亲缘关系的克隆以外，还有部分类群的系统发生位置有待进一步确定。例如在南沙海域发现的克隆 NS371A52，由于长枝效应与 *Pyrocystis noctiluca* 聚类，但 NS371A52 可能是一种新的甲藻类群^[40]。又如东太平洋沿岸发现的某些克隆只能鉴定到纲(Prymnesiophyceae)，而纲以下的分类界元还有待进一步探讨^[41]。在 Prasinophyceae, Cryptophyceae 和 Bacillariophyceae 中同样发现了大量未经培养或鉴定的新超微型藻类(见表5)。

表5 海洋超微型真核浮游植物的主要类群组成

类群	纲	属	参考文献
Alveolates	Dinophyceae	<i>Amphidinium</i>	[13]
		<i>Dinophysis</i>	[13]
		<i>Gymnodinium</i>	[12, 13, 34, 38, 39, 42]

续表

类群	纲	属	参考文献
Alveolates	Dinophyceae	<i>Gyrodinium</i>	[42]
		<i>Heterocapsa</i>	[40]
		<i>Lepidodinium</i>	[34, 42]
		<i>Peridinium</i>	[39]
		<i>Prorocentrum</i>	[12, 13, 33]
		<i>Pyrocystis</i>	[40]
Chlorophyta	Prasinophyceae	<i>Bathycoccus</i>	[13, 36, 37, 42]
		<i>Crustomastix</i>	[43]
		<i>Dolichomastix</i>	[43]
		<i>Marsupiomonas</i>	[43]
		<i>Micromonas</i>	[11, 13, 34, 36, 37, 42]
		<i>Mantoniella</i>	[33, 34]
		<i>Nephroselmis</i>	[35, 36]
		<i>Ostreococcus</i>	[13, 33, 34, 35, 36, 42]
		<i>Picocystis</i>	[43]
		<i>Prasinodermas</i>	[36]
		<i>Pseudoscourfieldia</i>	[43]
		<i>Pycnococcus</i>	[36]
		<i>Pyramimonas</i>	[13, 36, 41, 42]
		<i>Resultor</i>	[43]
	<i>Scherffelia</i>	[36]	
	<i>Tetraselmis</i>	[36, 42]	
	Trebouxiophyceae	<i>Chlorella</i>	[43]
		<i>Choricystis</i>	[43]
		<i>Nannochloris</i>	[43]
		<i>Nannochlorum</i>	[42]
<i>Stichococcus</i>		[43]	
environmental samples		[11, 36, 41]	
Cryptophyta	Cryptophyceae	<i>Cryptomonas</i>	[35]
		<i>Falcomonas</i>	[13]
		<i>Geminigera</i>	[13, 33, 34]
		<i>Hemiselmis</i>	[42]
		<i>Hillea</i>	[43]
		<i>Proteomonas</i>	[42]
		<i>Rhodomonas</i>	[13, 40]
		<i>Teleaulax</i>	[13, 42]
		environmental samples	[41]

续表

类群	纲	属	参考文献
Haptophyta	—	<i>Emiliania</i>	[34, 35, 41, 42]
	Prymnesiophyceae	<i>Chrysochromulina</i>	[11, 13, 32, 40, 42]
		<i>Imantonia</i>	[43]
		<i>Pavlova</i>	[42]
		<i>Phaeocystis</i>	[32, 34, 42]
		<i>Prymnesium</i>	[34]
		<i>Trigonaspis</i>	[43]
		<i>Nannochlorum</i>	[42]
		environmental samples	[11, 33, 39, 41]
stramenopiles	Bacillariophyceae	<i>Pseudo-nitzschia</i>	[12, 34, 42]
		environmental samples	[41]
	Bolidophyceae	<i>Bolidomonas</i>	[34]
	Chrysophyceae	<i>Dinobryon</i>	[38]
		<i>Ochromonas</i>	[41]
		<i>Tetraparma</i>	[43]
		<i>Triparma</i>	[43]
	Coccinodiscophyceae	<i>Chaetoceros</i>	[34, 42]
		<i>Corethron</i>	[34]
		<i>Papiliocellulus</i>	[34]
		<i>Rhizosolenia</i>	[42]
		<i>Skeletonema</i>	[34, 35, 38]
		<i>Thalassiosira</i>	[38, 42]
	Dictyochophyceae	<i>Rhizochromulina</i>	[11, 42]
		<i>Dictyocha</i>	[34, 40, 42]
	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis</i>	[34, 42]
	Pelagophyceae	<i>Aureococcus</i>	[43]
		<i>Aureoumbra</i>	[43]
		<i>Pelagococcus</i>	[43]
		<i>Pelagomonas</i>	[11, 33, 34, 43]
	Pinguiphyceae	<i>Pinguiochrysis</i>	[43]

3 主要研究方法及技术突破

3.1 基因指纹分析

3.1.1 变性梯度凝胶电泳(DGGE) 将样品扩增的分子指标进行变性梯度凝胶电泳, 估算样品的相似物种及其丰度^[46]. 经电泳获得的单种基因片段, 可

直接或经克隆后进行测序. 此法可快速检测群落的时空变化^[47]. 但通常不作精确的系统发生分析.

3.1.2 末端限制性片段长度多态性(T-RFLP) 用荧光标记 PCR 引物, 然后作限制性片段长度多态性(RFLP)分析. 根据末端消化片段的长度及荧光强度估算出相似物种及其丰度^[33]. 此法简单快捷,

可重复性强, 分辨率高, 可直接定量, 但提供的信息量少, 而且费用较高。

3.2 构建基因文库

目前研究超微型浮游植物遗传多样性最常用的方法是构建专一性的核糖体小亚基(SSU rRNA)基因文库。先通过过滤或流式细胞仪分选从海水中收集细胞, 然后提取样品总DNA, 经PCR扩增, 构建rDNA基因文库。再进行RFLP分析, 把具有相同RFLP型的克隆归入同一个操作分类单位(operational taxonomic unit, OTU)。从各个OTU中选取克隆代表进行测序, 最后构建分子系统树。另外, 还可以结合变性梯度凝胶电泳(DGGE)或荧光原位杂交(FISH)检测各类群的分布和丰度。

此法一方面避免了超微型细胞(尤其是真核藻类)难以从形态上鉴定、难以纯化培养的问题; 另一方面直接反映了环境中超微型浮游植物的丰度和多样性。分子指标除了SSU rDNA外, 还可以用质体SSU rDNA、rDNA ITS、*net A*、*psbA/B*、*petB/D*、*rpoB/Cl*、*rpeB*、*rbcL*等基因^[20, 22, 35, 41, 48-50]。此法能提供丰富可靠的序列数据, 迅速发现新的超微型浮游植物, 是目前国内外各个实验室采用的主要方法。

3.3 全基因组鸟枪法(WGS)测序

2004年, Venter等运用新技术——全基因组鸟枪法测序, 探索马尾藻海未经分离培养的微生物群落^[51]。此法先将表层海水过滤收集细胞, 提取基因组DNA并将其打碎, 电泳回收2-6kb的片段, 构建基因组文库; 文库测序后进行序列拼接和注释^[51, 52]。结果发现了100多万新基因, 1000多种物种(包括原绿球藻和某些超微型真核藻类)。Tyson等也用此法研究酸性矿物污水中的微生物群落, 并分析极端环境下的微生物代谢^[53]。应用全基因组鸟枪法测序来评估海洋或地层深处的微生物群落结构和特征, 不但可以避免PCR及rDNA多拷贝引起的偏差, 而且可以从大量的基因数据中发现新的基因和物种, 因此被美国*Science*杂志评选为2004年十大科学成就之一。

目前, 全基因组鸟枪法测序的主要研究对象为细菌、古细菌和噬菌体的种群结构^[51, 53]。若将其用于研究超微型真核浮游生物的遗传多样性, 将更好地揭示群落结构和生物进化, 加深对群落代谢网的

认识, 有助于进一步优化培养条件。

3.4 方法的完善与改良

目前常用的研究方法都是基于PCR反应, 但PCR受诸多因素影响, 容易产生偏差。为减少PCR偏差, 一方面可通过控制循环次数或采用温度梯度PCR(temperature gradient PCR)来提高PCR的质量^[41, 51-55]。另一方面, 可采用分离培养与分子技术相结合的方法。Massana等将直接采用分子技术的结果与先分离培养再用分子技术的结果进行比较, 发现两者各忽略了环境中不同的生物类群^[42]。分离培养与分子技术相互补充, 能更完整地探查超微型浮游植物的遗传多样性。

一般的荧光原位杂交信号较弱, 用落射荧光显微镜进行细胞计数耗时费力。采用酪胺信号放大的荧光原位杂交(TSA-FISH), 可将荧光信号强化到本底的20-40倍^[56]。联合流式细胞仪进行计数, 可快速准确地评估多样性及丰富度^[26, 56]。

4 发展方向与应用前景

目前, 海洋超微型浮游植物遗传多样性的研究局限于沿海与大洋的某些特定位点, 若对全球海洋系统中的超微型浮游植物遗传多样性进行全面的评估, 还需要探测更多不同的海域, 尤其是某些有代表性的特殊环境, 例如沿海环礁湖、上升流或南北极等水域。此外, 深入研究海洋超微型浮游植物与海洋生态以及全球环境的关系, 还需要对其形态、功能及生态作用等方面有更深入的了解, 这有赖于超微型浮游植物的培养与生理学方面的进一步研究。随着超微型浮游植物基因数据的丰富与功能基因的破译, 以及培养条件的不断优化, 人们对海洋中这一类微小的生物将有更加透彻与全面的了解。

海洋超微型浮游植物虽然个体微小, 但在科研和生产上却具有广阔的应用前景。随着陆地资源日益衰竭, 丰富的海洋超微型浮游植物资源越来越受到人们的关注, 巨大的开发潜力也将得到越来越充分的体现。

4.1 生物资源与海洋生态

采用分子技术研究海洋超微型浮游植物的遗传多样性, 是调查和评估海洋生物资源的重要环节。不但能发现大量新的微生物种类, 而且有助于揭示

海洋微生物食物环的结构和功能, 是海洋生物学和生态学研究的前沿领域。

4.2 环境监控

赤潮的频繁发生对水产业和人类健康造成极大危害。对赤潮微藻生物多样性及其种群动力学的研究, 将揭示赤潮的发生和消亡机制, 为赤潮预报提供分子生物学依据^[44,45,57,58]。这将进一步减低赤潮对环境、经济等多方面的不利影响。

4.3 基因工程模式生物

聚球藻基因组简单、生长快且能高密度培养, 可作为高效表达系统。人尿激酶原、热休克蛋白等基因已在聚球藻中成功表达^[59,60]。随着基因组的测定和破译, 以聚球藻为代表的超微型浮游植物将有可能成为转基因模式生物。

4.4 基因资源的开发利用

近年来不断有新的功能基因被发现和破译, 这将为基因资源数据库增添新的生长点。例如超微型浮游植物具有的耐寒、耐盐、高能量转换率等优良性状, 可尝试转到其他经济作物上表达。或者结合现代基因工程技术, 高效生产 β 胡萝卜素、不饱和脂肪酸、活性多糖等生物活性物质^[61-63]。

参 考 文 献

- Falkowski P G. The ocean's invisible forest. *Sci Am*, 2002, 287(2): 54-61
- 宁修仁. 海洋微型和超微型浮游生物. *东海海洋*, 1997, 15(3): 60-64
- Johnson P W, Sieburth J McN. *Chroococcoid cyanobacteria* in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol Oceanogr*, 1979, 24: 928-935
- Johnson P W, Sieburth J McN. *In situ* morphology and occurrence of eucaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *J Phycol*, 1982, 18: 318-327
- 孙书存, 陆健健, 张利华. 流式细胞仪在微型浮游植物生态学中的应用. *生态学杂志*, 2000, 19(1): 72-78
- Chisholm S W, Olson R J, Zettler E R, et al. A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, 1988, 334: 340-343
- Mann N H. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, 27(1): 17-34
- Bryant D A. The beauty in small things revealed. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(17): 9647-9649
- 焦念志, 杨燕辉. 中国海原绿球藻研究. *科学通报*, 2002, 47(7): 485-491
- Stockner J G, Antia N J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: A multidisciplinary perspective. *Can J Fish Aquat Sci*, 1986, 43: 2472-2503
- Moon-van der Staay S Y, Wachter R D, Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, 2001, 409: 607-610
- Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C, et al. Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 2001, 409: 603-606
- Romari K, Vaulot D. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of English Channel from 18S rDNA sequence. *Limnol Oceanogr*, 2004, 49(3): 784-798
- 李超伦, 栾凤鹤. 东海春季真光层分级叶绿素 a 分布特点的初步研究. *海洋科学*, 1998, 4: 59-62
- 黄邦钦, 洪华生, 林学举, 等. 台湾海峡超微型浮游植物的生态研究 II. 类群组成、生长速率及其影响因素. *海洋学报*, 2003, 25(6): 99-105
- 宁修仁. 微型生物食物环. *东海海洋*, 1997, 15(1): 66-68
- 宁修仁, 刘子琳, 蔡显明. 我国海洋初级生产力研究二十年. *东海海洋*, 2000, 18(3): 13-20
- 焦念志, 杨燕辉. 四类海洋超微型浮游生物同步监测. *海洋与湖沼*, 1999, 30(5): 506-511
- 陈纪新, 黄邦钦, 贾锡伟, 等. 利用光合色素研究厦门海域超微型浮游植物群落结构. *海洋环境科学*, 2003, 22(3): 16-21
- Fuller N J, Marie D, Partensky F, et al. Clade-specific 16S ribosomal DNA oligonucleotides reveal the predominance of a single marine *Synechococcus* clade throughout a stratified water column in the Red Sea. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2430-2443
- 马英, 焦念志. 聚球藻(*Synechococcus*)分子生态学研究进展. *自然科学进展*, 2004, 14(9): 967-972
- Rocap B, Distel D L, Waterbury J B, et al. Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(3): 1180-1191
- Palenik B. Chromatic adaptation in marine *Synechococcus* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(2): 991-994
- Six C, Thomas J C, Brahamsha B, et al. Photophysiology of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102, a new model organism. *Aquat Microb Ecol*, 2004, 35: 17-29
- Moore L R, Rocap G, Chisholm S W. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, 1998, 393: 464-467
- West N J, Schonhuber W A, Fuller N J, et al. Closely related

- Prochlorococcus* genotypes show remarkably different depth distributions in two oceanic regions as revealed by in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 2001, 147: 1731-1744
- 27 Sullivan M B, Waterbury J B, Chisholm S W. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*, 2003, 421: 1047-1051
- 28 West N J, Scanlan D J. Niche-partitioning of *Prochlorococcus* populations in a stratified water column in the eastern North Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(6): 2585-2591
- 29 Zeidner G, Beja O. The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblage. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(5): 528-534
- 30 Rocap G, Larimer F W, Lamerdin J, et al. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*, 2003, 421: 1042-1047
- 31 Massana R, Guillou L, Diez B, et al. Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4554-4558
- 32 Moon van der Staay S Y, van der Staay G W M, Guillou L, et al. Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45(1): 98-109
- 33 Diez B, Pedros alio C, Marsh T L, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2942-2951
- 34 Diez B, Pedros-Alio C, Massana R. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7): 2932-2941
- 35 Zeidner G, Preston C M, DeLong E F, et al. Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by psbA analyses. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(3): 212-216
- 36 Guillou L, Eikrem W, Chretiennot-Dinet M J, et al. Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems. *Protist*, 2004, 155: 193-211
- 37 Not F, Latasa M, Marie D, et al. A single species, *Micromonas pusilla* (prasinophyceae), dominates the eukaryotic picoplankton in the Western English Channel. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(7): 4064-4072
- 38 邵鹏, 袁洁, 陈月琴, 等. 自然水样微型藻类遗传多样性的方法学研究. *海洋科学*, 2002, 26(4): 1-4
- 39 袁洁, 邵鹏, 陈月琴, 等. 南沙群岛微型与超微型真核藻类遗传多样性的初步研究. *海洋科学*, 2003, 27(7): 43-47
- 40 Yuan J, Chen M Y, Shao P, et al. Genetic diversity of small eukaryotes from the coastal waters of Nansha islands in China. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240: 163-170
- 41 Rappe M S, Suzuki M T, Vergin K L, et al. Phylogenetic diversity of ultraplankton plastid small-subunit rRNA genes recovered in environmental nucleic acid samples from the Pacific and Atlantic Coast of the United States. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(1): 294-303
- 42 Massana R, Balague V, Guillou L, et al. Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 50: 231-243
- 43 Vault D, Gall F L, Marie D, et al. The Roscoff culture collection (RCC): A collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia*, 2004, 79: 49-70
- 44 王宁, 陈月琴, 屈良鹤, 等. 1997 粤东海域棕囊藻赤潮原因种 18S rDNA 基因分析. *中山大学学报*, 2000, 39(1): 127-128
- 45 陈月琴, 王宁, 周惠, 等. 棕囊藻赤潮原因种的分子鉴定和起源分析. *海洋学报*, 2002, 24(6): 99-103
- 46 Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73: 127-141
- 47 陈纪新, 黄邦钦, 郑微云, 等. 海洋超微型浮游植物多样性研究方法进展. *海洋科学*, 2002, 26(8): 34-39
- 48 Steglich C, Post A F, Hess W R. Analysis of natural populations of *Prochlorococcus* spp. in the northern Red Sea using phycoerythrin gene sequences. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8): 681-690
- 49 Dahllof I, Baillie H, Kjelleberg S. *ropB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecific heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(8): 3376-3380
- 50 Pichard S L, Campbell L, Paul J H. Diversity of the ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase form I gene (*rbcL*) in natural phytoplankton communities. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(9): 3600-3606
- 51 Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2001, 304: 66-74
- 52 罗春清, 杨焕明. 微生物全基因组鸟枪法测序. *遗传*, 2002, 24(3): 310-314
- 53 Tyson G M, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2001, 428: 37-43
- 54 Suzuki M, Rappe M S, Giovannoni S J. Kinetic bias in estimates

- of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(11): 4522-4529
- 55 Becker S, Boger P, Oehlmann R, et al. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(11): 4945-4953
- 56 Biegala I C, Not F, Vaulot D, et al. Quantitative assessment of picocukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescent in situ hybridization and flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5519-5529
- 57 陈月琴, 屈良鹤, 周惠, 等. 赤潮甲藻锥状斯氏藻 rDNAITS 区的序列测定和分析. *中山大学学报论丛*, 1997, 5: 104-107
- 58 Shao P, Chen Y Q, Zhou H, et al. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: Implications for species identification and phylogenetic analysis. *Marine Biology*, 2003, 144(2): 215-224
- 59 罗娜, 宁叶, 施定基, 等. 人尿激酶原基因在聚球藻 7002 中的克隆和表达. *植物学报*, 2000, 42(9): 931-935
- 60 章军, 秦燕, 欧阳青, 等. 蓝藻热休克诱导高效表达系统的构建. *高技术通讯*, 2001, 8: 17-21
- 61 胡晗华, 戴玲芬, 戴和平, 等. 一种海生黄藻的氨基酸和脂肪酸组成. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(5): 487-490
- 62 陈来成. 国外海洋生物技术发展概况. *生物工程进展*, 1991, 11(6): 11-20
- 63 高亚辉. 海洋微藻分类生态及生物活性物质研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2001, 40(2): 566-573

为保持在纳米技术的前沿地位, 欧盟提出行动计划

欧盟委员会宣布, 它试图通过安全和负责任的方式, 使欧洲在快速发展的纳米技术领域保持前沿地位. 纳米技术为原子和分子水平的应用带来了一系列效益, 包括更有效的传输药物、治疗疾病、更快的计算机处理器和更有效率的太阳能电池. 欧盟委员会提出一个行动计划, 建议采取措施在国家和欧洲的范围內加强在这一领域的研究并开发有用的产品和服务.

欧盟委员会科学和研究委员波托克尼科说, “欧洲需要对知识进行投资以保持它在全球经济的竞争地位. 总的来说纳米技术对欧洲的工业和社会发展有巨大的潜力, 所以对此领域有一个清晰的战略和决定性的行动是必要的. 我们必须考虑并尽可能早地提出任何可能出现的健康、安全和环境风险等问题”. 行动计划的措施包括:

(1) 在第七框架计划中加大对纳米技术的投入, 包括对人类健康和环境影响的特别支持, 在纳米技术的某些关键领域培育技术平台, 如纳米医学, 纳米电子学和可持续化学.

(2) 通过资助、交流最好的经验和利用现有设施, 研发具有国际竞争力的设施.

(3) 为欧洲工业创造良好条件, 使研究转化为有用的产品和服务. 如商品化的研讨会, 使企业不断增加对研究的介入并参与公共标准的制定. 一个数据图书馆和专利管理系统将成为另一个有用的工具.

(4) 保证永远对伦理准则的尊重, 重视公众的关注和期望, 通过学习、信息交流和对话, 在全欧洲范围内取得共识.

(5) 在尽可能早的阶段提出公共健康、安全和环境风险问题, 建立研究风险评估体系并对风险评估制定指导方针. 将对现有欧洲立法进行再评估, 保证完全适用纳米技术的特殊性.

(6) 促进对研究人员和工程师的跨学科教育和培训, 集中在对纳米技术的实际应用和对社会的更广泛的影响, 包括建立实习车间和开发课程. 一个纳米技术欧洲奖将能帮助促进更好的开展此项工作.

(7) 促进对共同感兴趣的问题开展国际对话, 诸如专业词汇命名法和毒理学.

欧盟委员会宣布纳米技术将继续作为今年的重点, 同时第二届欧洲纳米论坛和展览将于 2005 年 9 月 6—9 日在爱丁堡举行. 这一重大国际活动由欧盟资助, 聚焦“纳米技术和 2020 年欧盟公民的健康”. 它包括有世界顶尖科学家参加的 3 天会议, 公众讨论和其他活动, 同时有系列关于健康的纳米医学和纳米技术专门新闻简报.

(供稿: 白 鹤)