

骨条藻的种类与基因多样性研究进展*

程金凤 高亚辉** 梁君荣 陈长平

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

摘要 骨条藻属(*Skeletonema* Greville)是一种在全球近岸海域广泛分布的广温广盐性浮游硅藻, 为赤潮引发种。文中就骨条藻形态学分类和分子生物学方面的工作进展进行介绍。各种骨条藻种类之间的形态学差异非常细微, 在准确鉴定上具有一定的难度。目前, 结合形态学方法和分子生物学方法, 国际上该属的分类记录种达到12种今生种和9种化石种, 而我国已报道了4种今生种。骨条藻中克隆并已定序的基因或靶序列有: 脱氧核糖核酸聚合酶(pol)、谷氨酰氨合成酶(gln)、岩藻黄素叶绿素a/c蛋白复合体(fcp)、硝酸还原酶(nar)、16S rDNA和骨条藻特异性死亡蛋白(ScDSP)等。这些工作为更好地认识骨条藻, 有效地防治该藻引发的赤潮灾害提供了很好的研究基础。

关键词 骨条藻 形态学分类 分子分类 已定序的基因

海洋微型藻类, 骨条藻属(*Skeletonema* Greville)是一类全球近岸海域广泛分布的广温广盐性浮游硅藻。属于硅藻门 Bacillariophyta, 中心纲 Centricae, 海链藻科 Thalassiosiraceae。骨条藻细胞近球形、透镜形或短圆柱形, 壁薄, 单个生活或呈8个以下或50个细胞以上的长短不同的链状群体。壳面圆形, 平或凸起如冠状。在壳面的边缘生一圈与细胞贯壳轴平行的细长管状突起(支持突), 相邻细胞的支持突呈结状连接, 联结成链状群体。邻细胞间的距离(即支持突的长度)长短不一, 有的很短(几乎看不出距离), 有的则长于细胞的贯壳轴。细胞壳面支持突的数目变化范围很大, 约8—30根。细胞中的色素体的数目和形状也不同, 或为1—2个呈大肾形, 或为无数个小颗粒^[1]。骨条藻为赤潮引发种, 常在世界各地的海域形成赤潮, 对海洋生态环境造成严重危害, 并对养殖的海洋经济动物造成机械性伤害或后续的窒息性死亡, 因此, 引起了赤潮研究者的广泛关注。

由于各个骨条藻种类之间的形态学差异非常细

微, 在准确鉴定上具有一定的难度, 也需要一定的研究工具和分类专家才能进行, 绝大多数研究者都习惯于将骨条藻种类归入其典型种: 中肋骨条藻 *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, 以其为研究对象, 开展各个方面的研究工作。其实, 骨条藻是由多个种类组成的, 各国学者始终在试图澄清骨条藻的种类多样性。因此, 本文对其相关工作进展进行概述。

1 骨条藻的形态分类学研究历史及现状

1.1 国外关于骨条藻的分类学研究

骨条藻最早的记录是在1857年, Norman在北海的约克郡海鞘的胃中发现的, 并被定名为直链藻 *Melosira*。骨条藻(*Skeletonema*)术语正式出现是1865年, Greville在巴巴多斯岛发现一个化石种, 并命名为巴巴多斯骨条藻 *Skeletonema barbadensis* Greville^[2], 这是第一个被鉴定的骨条藻种类。一年后, Greville(1866)在香港水域的样品中报道了一个

2006-09-01 收稿, 2006-10-30 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 40476055, 40627001)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2005CB422305)资助项目

** 通信作者, E-mail: gaoyh@xmu.edu.cn

今生新种, 并命名为 *Melosira costata* Greville^[3], 提到该种的壳面具有纵行的肋, 与相邻细胞连接, 而且 Greville 认为香港水域发现的种类与 Norman 发现的骨条藻应属同一个种. 随后, Cleve(1873)在爪哇海也发现这个种, 将该种与 *S. barbadensis* 进行了比较研究, 认为这个种与巴巴多斯骨条藻 *S. barbadensis* 是相似的, 应该属于同一个属, 于是 Cleve 将该种从直链藻属修订到骨条藻属, 并将 *Melosira costata* 订正为 *Skeletonema costatum*^[4].

这之后, 陆续有 6 个今生种和 4 个化石种被报道. Cleve(1900)在北纬 6—10°N 加勒比海南部的南美海岸发现热带骨条藻 *Skeletonema tropicum* Cleve, 热带骨条藻区别于中肋骨条藻的特点是, 细胞较宽, 细胞间支持突也较多, 每个细胞内的色素体通常多于 2 个, 一般 5—7 个, 有时 10—15 个, 而中肋骨条藻一般 1—2 个色素体^[5]. 但是中肋骨条藻比热带骨条藻的分布范围要广^[6]. 近盐骨条藻 *Skeletonema subsalsum* (A. Cleve) Bethge(1928)和江河骨条藻 *Skeletonema potamos* (Weber) Hasle(1976)都是淡水硅藻, 硅质化程度比其他骨条藻的低, 两者形态比较接近, 江河骨条藻区别于近盐骨条藻的特征是, 江河骨条藻的支持突长于近盐骨条藻, 壳面是半球形的, 而近盐骨条藻的壳面是扁平的. 前者的拟沟比后者的明显. 江河骨条藻明显区别于其他骨条藻的特征是, 支持突是管状的, 但支持突上没有特殊的结构, 细胞间的连接不是互锁的, 只是简单地和相邻的细胞相靠. Makarova(1964)在里海发现细柱骨条藻 *Skeletonema cylindraceum* Prosh-kina-Lavrenko et Makarova, 细柱骨条藻和热带骨条藻一样, 也是每个细胞有多个色素体, 一般(8—12 个), 但关于其形态学描述的资料有限, 也没有学者对其和其他种类进行过比较性

研究^[7]. Guillard 在西大西洋发现曼氏骨条藻 *Skeletonema menzelii* Guillard, Carpenter & Reimann, 细胞单个或者两个细胞成链生活, 壳面只分布有硅质肋纹, 支持突基部只有 2 个围孔^[8]. Medlin(1991)根据形态和分子生物学方法发现了拟中肋骨条藻 *Skeletonema pseudocostatum* L. K. Medlin. 拟中肋骨条藻与江河骨条藻不同的是, 前者壳面扁平, 具浅的壳套, 10 μm 的孔纹比较少, 两者支持突都是如双手十指叉握似的连接, 支持突的外管都是开裂的, 但后者支持突外管开裂的部分比拟中肋骨条藻的长的多. 江河骨条藻、拟中肋骨条藻和曼氏骨条藻细胞单个或者成短链生活, 相邻细胞间不能形成持久的连接方式, 可能是因为这些藻失去了形成长链的能力, 只能形成单个的细胞^[9].

随着电子显微镜(EM)的应用, Sims(1994)对化石种重新进行了形态学观察, 并发现了 4 个新化石种. 研究发现化石种明显地区别于今生种, 具有一些特殊的形态特征: 在今生种中, 细胞之间以支持突的外突相连接, 然而, 化石种没有支持突, 有个唇形突边环, 唇形突不属于连接细胞的刺, 相邻细胞间是依靠壳面边缘的突起而连接成群体. 因此, Sims 认为这些特征表明化石种是一个不同的家族, 明显地为另一个属, 将化石种归为一个新属——类骨条藻属 *Skeletonemopsis* P. A. Sims, 原来的今生种仍归入骨条藻属 *Skeletonema*, 中肋骨条藻为其模式种. 并对该属进行了形态学描述, 其主要特征是: 细胞圆柱形, 依靠壳缘的突起连接成链状. 壳面圆形或者球形突起状, 壳面边缘具连接突, 连接突有一部分是中空的. 壳面网状肋纹成放射状排列, 唇形突位于壳的边缘. 化石种主要分布于白垩纪到渐新世^[10]. 到目前为止, 发现的化石种有 9 种(见表 1).

表 1 骨条藻属已记录种类

拉丁学名	中文名	主要形态特征	文献	原采地
今生种				
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	中肋骨条藻	细胞呈透镜或钮扣状, 链中支持突外管完全闭合	Cleve PT(1878) ^[4]	香港海湾
<i>S. tropicum</i> Cleve	热带骨条藻	多个色素体, 链中支持突外管完全裂开	Cleve PT(1900) ^[5]	加勒比海南部
<i>S. potamos</i> (Weber) Hasle	江河骨条藻	淡水种, 支持突管状, 链中支持突只是简单地与相邻细胞相靠	Hasle GR & Evensen LD (1976) ^[11]	美国和德国的江河湖泊

续表

拉丁学名	中文名	主要形态特征	文献	原采地
<i>S. pseudocostatum</i> L. K. Medlin	拟中肋骨条藻	支持突外管无明显膨大, 链端支持突外管基部闭合, 并呈一定的角度	Medlin LK, Elwood HJ, Stickel S & Sogin ML (1991) ^[9]	澳大利亚, 南威尔士, Hacking River
<i>S. subsalsum</i> (A. Cleve) Bethge	近盐骨条藻	淡水种, 细胞球形或椭圆形, 链中支持突外管下部闭合, 上部裂开	(Cleve A) Bethge (1928) ^[11]	瑞典斯德哥尔摩多岛海
<i>S. menzelii</i> Guillard, Carpenter & Reimann	曼氏骨条藻	1—2个色素体, 支持突基部有两个围孔	Guillard RRL, Carpenter EJ & Reimann BEF (1974) ^[8]	西大西洋
<i>S. dohrnii</i> Sarno & Kooistra	多恩骨条藻	细胞圆柱形, 胞间接合部具透明带	Sarno D, Kooistra WHCF, Medlin LK, Percopo I & Zingone A. (2005) ^[12]	意大利那不勒斯海湾
<i>S. grethae</i> Zingone & Sarno	格里斯骨条藻	支持突外管基部无管状结构	Sarno D, Kooistra WHCF, Medlin, LK, Percopo I & Zingone A (2005) ^[12]	美国罗得岛州
<i>S. grevillei</i> Sarno & Zingone	桂氏骨条藻	支持突基部有扇贝形结构, 链端唇形突靠近支持突的环带	Zingone A, Percopo I, Sims PA & Sarno D (2005) ^[13]	香港海湾
<i>S. japonicum</i> Zingone & Sarno	日本骨条藻	多个色素体, 支持突叉状互锁, 主要连接方式为1:2, 形成Z字形	Sarno D, Kooistra WHCF, Medlin LK, Percopo I & Zingone A (2005) ^[12]	日本广岛海湾, Seto Inland Sea,
<i>S. marinoi</i> Sarno & Zingone	玛氏骨条藻	胞间接合部具点条纹	Sarno D, Kooistra WHCF, Medlin LK, Percopo I & Zingone A (2005) ^[12]	北亚德里亚海, 地中海
<i>S. cylindraceum</i> Proshkina-Lavrenko et Makarova	圆柱骨条藻	多个色素体, 一般8—12个	Makarova and Proshkina-Lavrenko (1964) ^[7]	里海
化石种				
<i>Skeletonemopsis denticulatum</i> N. I. Strelnikova	齿状类骨条藻	—	Diat Pozdn Mela(1974) ^[11]	俄罗斯: 秋明州; Ust-Manya, N. Sosva River Upper 白垩纪
<i>S. probable</i> A. P. Jousé	盖然类骨条藻	—	Proshkina-Lavrenko AI (ed.), Diat Anal 1949. (R) ^[11]	乌克兰; 伏罗希洛夫格勒州 渐新世
<i>S. ventricosum</i> N. W. Anissimowa	膨胀类骨条藻	细胞弯曲, 3—6个唇形突, 唇形突在壳外是圆形的开口	Sims PA 1994 ^[10]	俄罗斯; 乌里扬诺夫斯克州 化石
<i>S. barbadensis</i> ('barbadense') (Greville) PA Sims	巴巴多斯类骨条藻(翠叶骨条藻)	细胞间的连接形式呈Z字形, 无壳环带	Sims PA 1994 ^[10]	始新世中到渐新世初
<i>S. crawfordii</i> P. A. Sims	克劳福德类骨条藻	细胞弯曲, 壳面圆顶形, 连接形式为爪形	Sims PA 1994 ^[10]	北冰洋; Alpha Ridge 白垩纪晚期
<i>S. mahoodii</i> P. A. Sims	胡德氏类骨条藻	唇形突在壳外面为狭长的切口	Sims PA 1994 ^[10]	西伯利亚; 科曼多尔群岛 渐新世早期到晚期
<i>S. morenoensis</i> P. A. Sims	莫雷诺类骨条藻	唇形突为耳状, 壳套排列不整齐	Sims PA 1994 ^[10]	加利福尼亚; 弗雷斯诺; Panoche Hills (Moreno Shale) 白垩纪后期(Maastrichtian)
<i>S. simbirskiana</i> (A. Schmidt) P. A. Sims	辛比尔斯克类骨条藻	唇形突为耳状, 壳套排列整齐	Sims PA 1994 ^[10]	俄罗斯; 辛比尔斯克 Inza
<i>S. rugosa</i> P. A. Sims	罗斯类骨条藻	细胞弯曲, 3—6个唇形突, 在壳外是圆形的开口	Sims PA 1994 ^[10]	俄罗斯; 乌里扬诺夫斯克州; Inza 古新世

表中内容主要引自 <http://algaebase.org>

从20世纪90年代到本世纪初,对骨条藻的研究主要是围绕中肋骨条藻进行的生理生化和生态学。因为自1990年以来有588篇文章在其题目中或者摘要中提到骨条藻,其中548篇都将骨条藻定义为中肋骨条藻^[11]。由于骨条藻种类之间的形态学差异非常细微,在准确鉴定上有一定的难度,也需要一定的仪器和分类专家,有可能多数研究者习惯于将骨条藻归入其模式种:中肋骨条藻来进行研究。

2005年,Zingone和Sarno对骨条藻进行了最新和比较全面的研究,发现了5个新今生种^[12,13]。Zigone对Greville(1866)香港水域的样品重新进行了光镜和电镜的观察,研究发现骨条藻细胞壁的形态、支持突的形状、细胞间支持突的连接方式等有明显的区别,并丰富了中肋骨条藻的形态特征,同时还发现了一个新种桂氏骨条藻 *Skeletonema grevillei* Sarno et Zingone sp. nov., 细胞小,4—7.5 μm,链短。链端支持突开裂为刀切状或者多刺状,链中支持突连接方式为1:1,连接部分的外形呈关节状。唇形突位于壳缘^[13]。Sarno还对分离自意大利那不勒斯不同季节和海区以及从日本、香港等海域获得的骨条藻藻株进行光学显微镜(LM)、透射电子显微镜(TEM)和扫描电子显微镜(SEM)的全面的形态学研究,结合核糖体 rDNA 大小亚基序列特征,报道了4个新种多恩骨条藻 *Skeletonema dohrnii* Sarno et Kooistra sp. nov., 格里斯骨条藻 *Skeletonema grethae* Zingone et Sarno sp. nov., 日本骨条藻 *Skeletonema japonicum* Zingone et Sarno sp. nov. 和玛氏骨条藻 *Skeletonema marinoi* Sarno et Zingone sp. Nov^[12], 并对已有的曼氏骨条藻、拟中肋骨条藻、近盐骨条藻和热带骨条藻的形态学特征进行了更为详细的描述和研究。玛氏骨条藻和多恩骨条藻区别与其他骨条藻的特征是:支持突扁平,末端扩展成裙状,末端边缘锯齿状。链中支持突的连接稀松。常为1:2连接方式,壳面间形成整个的“Z”字形。玛氏和多恩骨条藻间的区别是多恩骨条藻胞间接合部具透明带,玛氏骨条藻胞间接合部具点条纹。格里斯骨条藻支持突外管基部没有管状结构。日本骨条藻链中支持突通过叉状结构互锁,连接方式主要为1:2,形成“Z”字形。到目前为止,国际上对现有骨条藻属的分类已记录的

种类有12个今生种,9个化石种(见表1)。

1.2 国内关于骨条藻的分类学研究

骨条藻是我国近海海域数量最多、最常见的、分布极广的浮游硅藻种类。其生态性质比较复杂,可分为北方型和南方型,常在每年的4—5月份和8—9月份达到最高生物量,甚至形成赤潮,然后迅速消亡^[14,15]。在我国黄、东、南海均有该种引发赤潮的记录^[16-18],是我国近海常见且典型的有害赤潮藻^[19]。

国内关于骨条藻分类研究的资料很少,并且研究所提供的关于形态学特征的描述相对有限。虽然,国际上该属的分类记录已有13个今生种,在以往的研究中,我国学者则普遍将分布于我国近海海域的骨条藻种类都定名为同一个种:中肋骨条藻 *S. costatum*。我国最早关于骨条藻的记录是在1993年,程兆第等(1993)对福建沿海的骨条藻属的分类研究中报道了4种:中肋骨条藻 *S. costatum*、江河骨条藻 *S. potamos*、曼氏骨条藻 *S. menzelii* 和热带骨条藻 *S. tropicum*, 并进行了这4种骨条藻的形态及亚显微结构特征的观察和描述^[20]。这是至今为止,国内报道最多的骨条藻种类。随后的工作都是围绕上述4种展开。史亚波(1993)根据形态和生理生态特征差异,描述了中肋骨条藻 *S. costatum* 和热带骨条藻 *S. tropisum* 的形态特征,前者属于广温广盐种,后者属于高温高盐种^[21]。郭玉洁和钱树本(2003)也分别对以上4种骨条藻进行了形态描述^[1]。韩笑天(2004)比较研究了分离自胶州湾和长江口的两株骨条藻,并鉴定为中肋骨条藻,发现两个藻株其形态、个体大小、繁殖盛期和RAPD分析都存在差异,但认为是同种下的不同变种^[22]。

可以看出,我国关于骨条藻的研究远远地落后于国外的研究,与国外的研究结果存在很大的差距。因此,我国有必要对我国骨条藻进行更深入地研究,同时为我国近海海域骨条藻赤潮认识和防治提供最新的种类分类资料。

2 骨条藻的相关分子生物学研究

分子生物学技术为从分子水平上揭示硅藻生理代谢、分化发育和系统发生以及深入开发利用这一生物资源提供了新的手段。硅藻分子生物学

研究起步较晚, 80年代后期才开始有关于硅藻基因组结构、基因克隆与定序、基因定位与遗传图谱构建、系统发生学、基因表达与调控以及遗传工程等方面的研究报道。骨条藻中克隆并已定序

的基因或靶序列有, 脱氧核糖核酸聚合酶(pol)、谷氨酰氨合成酶(gln)、岩藻黄素叶绿素 a/c 蛋白复合体(fcp)、硝酸还原酶(nar)和 rDNA 等(见表 2)^[23]。

表 2 骨条藻中克隆并已定序的基因或靶序列

拉丁学名	中文学名	测序的基因或靶序列
<i>Skeletonema costatum</i>	中肋骨条藻	death-specific protein(ScDSP) partial vpp1 gene for proton-translocating inorganic pyrophosphatase 硝酸还原酶 mRNA PCNA mRNA tmRNA proteolysis tag(ssrA) 细胞色素 P450(CYP97E1) mRNA elongation factor Tu(tufA) putative nitrate transporter 谷氨酸合成酶(SGSA) mRNA 色素体 ycf5, ycf24, ycf35, ycf33, ycf25, ycf6, ycf12, ycf9 ycf47, ycf31, 光系统 I psaA, psaB, psaC, psaD, psaI 光系统 II psbA, psbC, psbK petB, petD, petG, trnD, trnI, trnT 谷氨酸合成酶 III mRNA mitochondrial coxI gene for cytochrome oxidase subunit I DNA 聚合酶 α cyclin(CYCL) gene rbcL 岩藻黄素叶绿素 a/c 蛋白复合体(scfcfA) mRNA, (scfcfH) mRNA, (scfcfG) mRNA, (scfcfF) mRNA, (scfcfE) mRNA, (scfcfD) mRNA, (scfcfC) mRNA, (scfcfB) mRNA, (scfcf141) mRNA, (scfcf151) mRNA ITS1, ITS2, 5.8 S rRNA, 18 S rRNA, 16 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema menzellii</i>	曼氏骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema pseudocostatum</i>	拟中肋骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA, 16 S rRNA, 5.8 S rRNA
<i>Skeletonema subsalsum</i>	近盐骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema tropicum</i>	热带骨条藻	28 S rRNA
<i>Skeletonema dohrnii</i>	多恩骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema grethae</i>	格里斯骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema japonicum</i>	日本骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema marinoi</i>	玛氏骨条藻	18 S rRNA, 28 S rRNA
<i>Skeletonema</i> sp. CCMP 1009		18 S rRNA
<i>Skeletonema</i> sp. GFC-2005. 1		18 S rRNA 28 S rRNA ITS1 5.8 S rRNA
<i>Skeletonema</i> sp. GFC-2005. 2		18 S rRNA 28 S rRNA ITS1 5.8 S rRNA
<i>Skeletonema</i> sp. GFC-2005. 3		18 S rRNA 28 S rRNA ITS1 5.8 S rRNA
<i>Skeletonema</i> sp. GFC-2005. 4		18 S rRNA 28 S rRNA ITS1 5.8 S rRNA
<i>Skeletonema</i> sp. GFC-2005. 5		18 S rRNA 28 S rRNA ITS1 5.8 S rRNA

表中内容引自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.1 骨条藻分子分类及遗传多样性研究

目前骨条藻的分类不再局限于形态学、生理生化特征,核酸序列分析为基础的分子分类研究开始引起广泛关注。

由于骨条藻形态学的差别十分细微,于是分子生物学方法逐渐应用于骨条藻的种类鉴定和遗传多样性的研究中。因为形态上的差异不易判断,有些差异是不同种类水平上的差异,而有些差异只是地理区域上的差异或者是不同生长阶段形态上的差异,差异大小的程度没有一个现成的标准,所以分子生物学方法的介入,可以通过分析其遗传物质的差异,并结合形态学的研究来确定其分类地位。研究最多的是针对骨条藻核糖体大小亚基进行的研究。如 Medlin 等通过 16 S rDNA 测序比较中肋骨条藻 4 个株系,并结合形态学确立了新种拟中肋骨条藻 *S. pseudocostatum*; 并且 Medlin 是第一个认为骨条藻核糖体小亚基(SSU rDNA)存在基因内变异^[9]。基因组内多态性位点的比例为 0.57%—1.81%,在培养的骨条藻内,基因组内核苷多态性平均接近 1%^[24]。Sarno 等人将核糖体 rDNA 大小亚基的序列分析应用到了 4 个新种多恩骨条藻 *S. dohrnii*、格里斯骨条藻 *S. grethae*、日本骨条藻 *S. japonicum* 和玛氏骨条藻 *S. marinoi* Sarno 的鉴定中。并将其研究的骨条藻种类分为四个形态学明显不同的系。其中系 I 包括拟中肋骨条藻 *S. pseudocostatum*, 热带骨条藻 *S. tropicum*, 格里斯骨条藻 *S. grethae* 和日本骨条藻 *S. japonicum*, 形态学特点是支持突的外突末断窄,以叉状、结状或者关节状连接方式与邻近细胞连接。系 II 包括曼氏骨条藻 *S. menzelii*。系 III 包括多恩骨条藻 *S. dohrnii* 和玛氏骨条藻 *S. marinoi*, 支持突具扁平的、向外延伸的突,连接方式为十指叉握似地,不形成节状或者关节状,系 IV 仅包括近盐骨条藻 *S. subsalsum*^[12](如图 1)。

系统分析表明,多恩骨条藻,玛氏骨条藻,近盐骨条藻和拟中肋骨条藻是单系的。但是 Alverson (2005)的 SSU rDNA 序列分析结果和我们的研究结果(数据未显示)表明,格里斯骨条藻和日本骨条藻不能很好地分开,两个种分组不明显。这个结果不同于 Sarno 等的研究结果。本文作者认为针对这两个种,我们有必要进行更深入和更详细的研究。

Stabile 等利用质体基因探针比较了不同季节的 3 个中肋骨条藻株系的 RFLPs,证明种群间生理的变异具有遗传背景,表明中肋骨条藻种内基因存在差异^[25]。苟万里等以 rDNA 序列为寻找特异性引物的靶区域,初步建立了骨条藻定量检测方法,即实时荧光定量 PCR(RFQ-PCR)法^[26]。应该说,在中国,骨条藻遗传多样性研究方面仍还有很多工作需要展开。

2.2 骨条藻中克隆并定序的其他一些基因

脱氧核糖核酸聚合酶(DNA polymerase, 简称为 pols)在 DNA 复制和修复中起着重要的作用。到目前为止,在真核细胞中已发现 9 种 DNA 聚合酶,分别为: pol α , pol β , pol γ , pol δ , pol ϵ , pol ζ , pol η , pol θ 和 pol ι , 其中 pol α , pol δ 和 pol ϵ 是真核生物 DNA 复制过程中不可缺少的 DNA 聚合酶,属于真核生物 DNA 聚合酶 B 家族的成员^[27]。中肋骨条藻的 DNA 聚合酶 α , 其基因片段的长度为 397 bp, 有一个开放的阅读框。中肋骨条藻 DNA 聚合酶 α 的氨基酸序列与其他真核生物的相似性为 44%—61%, 然而如果仅仅比较保守区的序列,其相似性是很高的。例如,中肋骨条藻和老鼠的相似性仅为 44%, 但仅比较保守区时,其相似性为 73%^[28]。两个中肋骨条藻株系 DNA 聚合酶 α 序列的相似性为 90%, 但是人和老鼠的为 94%。这说明其基因内区的核酸排列存在很大差异,研究结果支持以前 Stabile 的研究结果,表明中肋骨条藻种内基因差异是很高的^[29]。研究还表明 DNA 聚合酶 α 的表达与细胞的分裂有关^[28]。

细胞色素 P450(cytochrome P450)是广泛存在于生物体内的一类含血红素和硫羟基的蛋白。在真核生物中,作为一种膜结合蛋白,主要分布在内质网和线粒体内膜上。细胞色素 P450 的末端氧化功能使其在碳同化、激素合成、外源物质降解、导致癌物的活化等方面起着重要作用。从中肋骨条藻中得到的 CYP97E1 编码一个新的细胞色素 P450 蛋白。CYP97E1 蛋白包含 659 个氨基酸(M_r 74200)。BLAST 分析表明, CYP97E1 与其他植物的 CYP97B 序列相似性很高(>40%)。PSORT 研究表明, CYP97E1 是一种胞质蛋白。Northern 杂交分析表明 CYP97E1 在骨条藻中的表达没有明显地

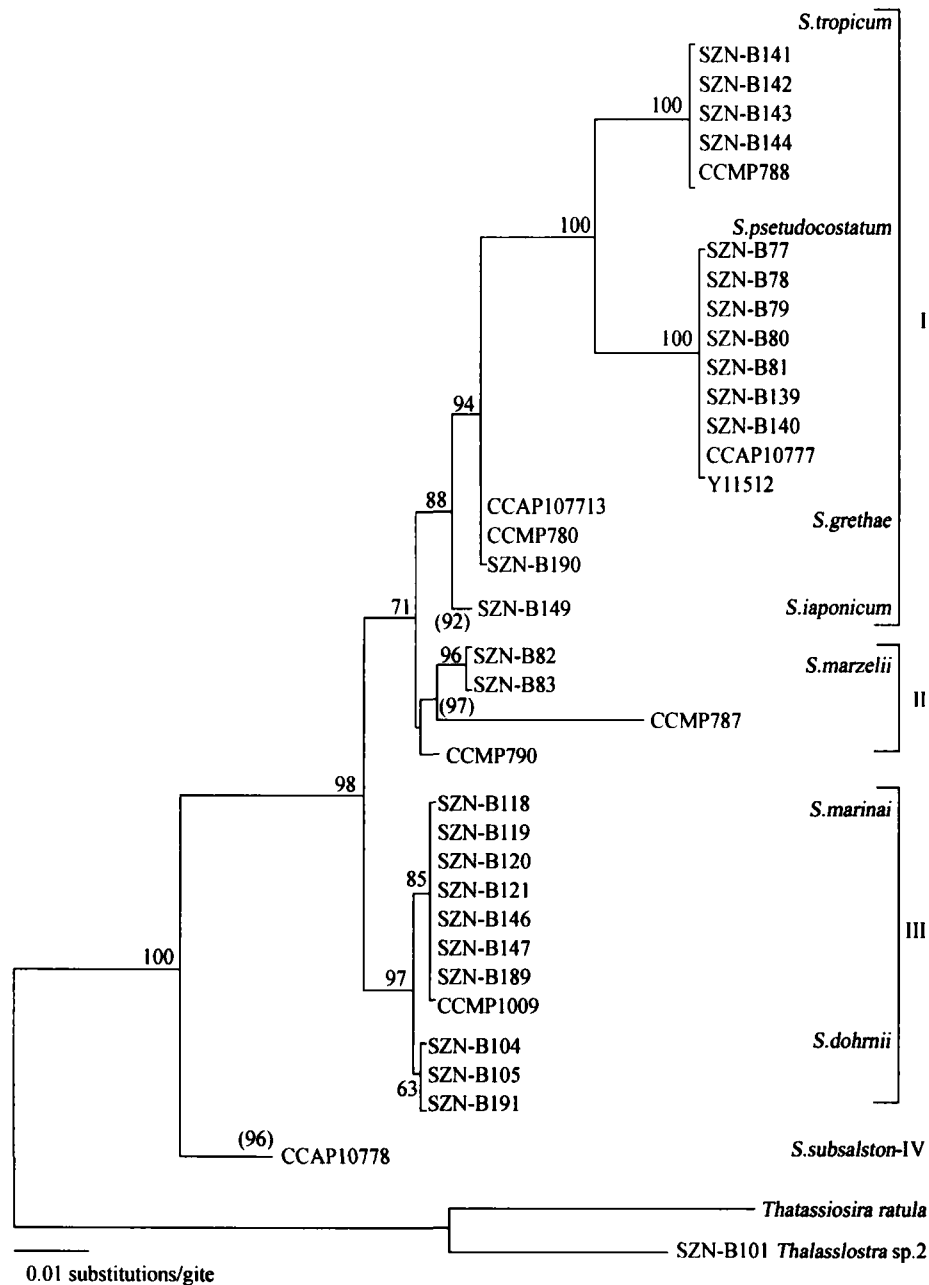


图1 基于LSU rDNA建立的ML树^[12]

被2, 4-氯酚影响, 说明CYP97E1没有参与骨条藻中2, 4-氯酚的去毒作用^[30]。

谷氨酰胺合成酶(GS)催化谷氨酸盐和铵生成谷氨酰胺, 在许多光合真核生物中以多种同工酶发生, 这些同工酶存在于叶绿体和胞液中。Deborah利用PCR技术, 得到骨条藻cDNA编码的GS。骨条藻的GS与绿藻和维管植物的GS相似性为50%, 系统分析表明硅藻的GS属于GSII基因家族。其N

末端的信号序列与硅藻中叶绿体蛋白的相似, 因此认为编码GS的同工酶位于叶绿体。Southern杂交分析表明骨条藻的cDNA是一个小的、高度保守的基因家族。系统分析表明硅藻中编码GS的基因和绿藻中的与维管植物中的是不同的分支, 这些结果支持假说硅藻中的GS、绿藻的和维管植物的是独立进化的。骨条藻的GS序列在离第一个ATG核苷酸-39和-9位有终止密码子。GS序列有一个

1230 bp的开放阅读框, 以一个终止密码子 TGA 终止, 编码一个分子量接近 45×10^3 的多肽。硅藻中 GS 开放阅读框的 G+C 的含量为 52%^[31]。

骨条藻属于杂色藻类, 含 Chla/c, 其质体基因组是骨条藻分子生物学研究的一个重要内容。目前已构建了中肋骨条藻的 cpDNA 的完整物理图谱。中肋骨条藻 cpDNA 为双链环状结构, 大小为 131 kb, 含有一个编码 rRNA 的反向重复序列 (IR), IR 的重复次数为 2, 重复区的大小为 20 kb, 将 cpDNA 分割成大小两个单拷贝区, 一个长单拷贝序列 (LSC) 和一个短单拷贝序列 (SSC)。不同种属硅藻 cpDNA 的基因顺序出现高度重排的现象。光系统 II 基因 psbA 在中肋骨条藻中位于 IR 区, rbcL 基因在中肋骨条藻中位于 LSC^[32]。

此外, 在浮游植物引发的赤潮过后, 藻类迅速消退。有研究认为, 除了物理的损伤 (如沉降或者被捕食) 外, 细胞自身破坏性消退被认为是浮游植物赤潮消退的一个重要原因^[33,34]。赤潮衰败过程中, 细胞自身破坏性消退被一群与细胞死亡相关的执行子 executors 所诱发^[35,36]。在骨条藻中发现致死基因 ScDSP, ScDSP cDNA 的总长度为 921 bp, 包括一个 699 bp 的开放阅读框, ScDSP 可能在浮游植物自身破坏性消退中起分子调控作用^[37]。

3 展望

骨条藻作为一种常见的赤潮引发种, 已经引起国内外赤潮研究者的广泛关注。但基于目前的研究现状, 作者认为, 国内可以从以下几个方面加强研究力度: (1) 进一步研究我国海域骨条藻的种类组成与分布特点, 明确我国海域存在的骨条藻种类多样性。(2) 应用分子技术进行骨条藻种类鉴定和遗传多样性分析。(3) 阐明骨条藻引发赤潮的机理, 以达到对其引发的赤潮进行预警和预防的目的。(4) 鉴于骨条藻为我国海域广布种和常见赤潮种, 可以将骨条藻作为赤潮研究的典型种, 进行相关生理生化机理的研究, 阐明该藻引发赤潮的发生、发展、消亡的内在机理, 为赤潮的有效防治提供基础理论。

参 考 文 献

1 郭玉洁, 钱树本. 中国海藻志 硅藻门. 北京: 科学出版社,

- 2003, 216
- 2 Greville RK. Description of new and rare diatoms. Series 16. Trans Micr Soc, London, 1865, 13: 43-57
- 3 Greville RK. Description of new and rare diatoms. Series 20. Trans Micr Soc, London, 1866, 14: 77-86
- 4 Cleve PT. Examination of diatoms found on the surface of the sea of Java. Bih Kongl Svenska Vetensk-Akad, Handl, 1873, 11: 3-13
- 5 Cleve PT. Notes on some Atlantic plankton organisms. Kongl Svens Vet Akad Hand, 1900, 34: 1-22
- 6 Hulburt EM, Guillard RRT. The relationship of the distribution of the diatom *Skeletonema tropicum* to temperature. Ecology, 1968, 49(2): 337-339
- 7 Makarova IV, Proschkina-Lavrenko AI. Diatomae novae e Mari Caspico. Syst Plant Non Vasc. 1964, 1: 34-43
- 8 Guillard RRL, Carpenter EJ, Reimann BEF. *Skeletonema menzeli* sp. nov; A new diatom from the western Atlantic Ocean. Phycologia, 1974, 13: 131-138
- 9 Medlin LK, Elwood HJ, Stickel S, et al. Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): Evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*. J Phycol, 1991, 27: 514-524
- 10 Sims PA. *Skeletonemopsis*, a new genus based on the fossil species of the genus *Skeletonema* Grev. Diatom Res, 1994, 9: 387-410
- 11 <http://algaebase.org>
- 12 Sarno D, Kooistra WHCF, Medlin LK, et al. Diversity in the genus *Skeletonema* (bacillariophyceae). II. An assessment of *S. costatum*-like species with the description of four new species. J Phycol, 2005, 41: 151-176
- 13 Zingone A, Percopo I, Sims PA, et al. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). I. A reexamination of the type material of *S. costatum* with the description of *S. grevillei* sp. nov. J Phycol, 2005, 41: 140-150
- 14 Gao YH, Chen CP, Li Y. Marine Nanoplanktonic Diatoms from Coastal Waters of Hong Kong. Perspective on Marine Environment Change in Hong Kong and Southern China, 1977-2001 (Morton B. ed.), 2003, 93-107
- 15 高亚辉, 虞秋波, 齐雨藻, 等. 长江口附近海域春季浮游硅藻的种类组成和生态分布. 应用生态学报, 2003, 14(7): 1044-1048
- 16 黄奕华, 楚建华, 齐雨藻. 南海大鵬湾盐田海域骨条藻数量多元分析. 海洋与湖泽, 1997, 28(2): 121-127
- 17 李 铁, 史致丽, 仇赤斌. 中肋骨条藻和新月菱形藻对营养盐的吸收速率及环境因素影响的研究. 海洋与湖沼, 1999, 30(6): 640-645
- 18 黄长江, 董巧香. 1998年春季珠江口海域大规模赤潮原因生物的形态分类和生物特征 III. 海洋与湖泽, 2001, 32(1): 1-6

- 19 霍文毅,俞志明,邹景忠,等. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系. 海洋与湖沼, 2001, 32(3): 311—318
- 20 程兆第,高亚辉,刘师成. 福建沿岸微型硅藻,北京:海洋出版社,1993,10—12
- 21 Shi YB. Preliminary analysis of biological characteristic of *Skeletonema* in Jiaozhou Bay and *Skeletonema* species in sea water in China. Abstracts of the 2nd Marine Environmental and Water Environmental Symposium. Beijing: Marine Press, 1992
- 22 韩笑天,王 炯,郑 立,等. 不同地理株中肋骨条藻生长特性及 RAPD 多态性. 生态学报, 2004, 24(11): 2602—2607
- 23 <http://ncbi.nlm.nih.gov>[2006-07-30]
- 24 Alverson AJ, Kolnick L. Intragenomic nucleotide polymorphism among small subunit (18S) rDNA paralogs in the diatom genus *Skeletonema* (Bacillariophyta). J Phycol, 2005, 41: 1248—1257
- 25 Stabile JE, Wurtzel ET, Gallagher JC. Comparison of chloroplast DNA and allozyme variation in winter strains of the marine diatom *Skeletonema costatum*. J Phycol, 1992, 28: 90—94
- 26 苟万里. rDNA 序列在几种浮游植物的分类和中肋骨条藻定量检测中的应用. 中国海洋大学, 博士学位论文, 青岛, 2003
- 27 翁 云. 真核生物 DNA 聚合酶 δ 的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(1): 55—57
- 28 Hwang LSP, Wang SK, Wei SF, et al. Identification and expression pattern of DNA polymerase α gene in marine diatom, *Skeletonema costatum*. Mar. Biotechnol, 1999, 1: 200—206
- 29 Stabile JE, Gallagher JC, Wurtzel ET, et al. Molecular analysis of intraspecific variation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. Biochem Syst Ecol, 1990, 18: 5—9
- 30 Yang S, Wu RSS, Mok HOL, et al. Identification of a novel cytochrome p450 cDNA, CYP97E1, from the marine diatom *skeletonema costatum* bacillariophyceae. J Phycol, 2003, 39: 555—560
- 31 Robertson DL, Smith GJ, Alberte RS. Characterization of cDNA encoding glutamine synthetase from the marine diatom *skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). J Phycol, 1999, 35: 786—797
- 32 Stabile JE, Gallagher GC, Wurtzel ET. Colinearity of chloroplast genomes in divergent ecotypes of the marine diatom *Skeletonema costatum*. J Phycol, 1995, 31: 795—800
- 33 Brussaard CPD, Riegman R, Noordeloos AAM, et al. Effects of grazing, sedimentation and phytoplankton cell lysis on the structure of a coastal pelagic food web. Mar Ecol Prog Ser, 1995, 123: 259—271
- 34 Cushing DH. The loss of diatoms in the spring bloom. Philos Trans R Soc Lond B. 1992, 335: 237—246
- 35 Kirchman DL. Phytoplankton death in the sea. Nature. 1999, 398: 293—294
- 36 Vardi A, Berman-Frank IB, Rozenberg T, et al. Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. Curr Biol, 1999, 9: 1061—1064
- 37 Chung CC, Hwang LS-P, Chang J. Cooccurrence of ScDSP Gene Expression, Cell Death, and DNA Fragmentation in a Marine Diatom, *Skeletonema costatum*. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8744—8751