

海洋亚历山大藻属分子系统学研究进展^{*}

邱小忠¹⁾ 陈月琴²⁾

(1) 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2) 化学化工学院)

摘 要 亚历山大藻属 *Alexandrium* 是一类重要的赤潮甲藻, 由于传统的分类鉴定往往标准不一, 因而容易引起分类上的混乱. 近年来, 人们已逐渐转向分子分类、分子系统及分子毒理方面的研究, 试图从分子水平认识亚历山大藻的遗传特征, 以便获得稳定、可靠的分子指标. 本文对这一最新研究进展作了综合分析, 对这一领域的研究成果及以后的发展方向作了有益的探讨.

关键词 亚历山大藻属 *Alexandrium*, 分子系统学, rRNA 及 rRNA 基因

分类号 Q 949. 24

亚历山大藻属 *Alexandrium* 是一类重要的海洋赤潮甲藻, 广泛分布于北美、欧洲、亚洲等海域中^[1], 我国海域常见的有毒种类为塔马亚历山大藻和链状亚历山大藻. 赤潮毒素是至今发现的毒性最大的天然有机毒物, 而有毒亚历山大藻所产生的麻痹性贝毒素是赤潮毒素中最重要、最多见的一类毒素, 由其引起的人体中毒事件 (PSP) 时有发生^[2]. 由于其对海洋渔业和人民身体健康产生的巨大影响, 目前, 对亚历山大藻属的各方面研究已成为赤潮生物学研究的热点之一^[1-3].

亚历山大藻属包含 20 多个种, 为一类单细胞的海洋微藻, 由于其形态学特征受环境变化及不同生理阶段的影响较大, 亚历山大藻属的固定的形态学分类标准一直无法达到统一, 而且往往出现同一个种的两个个体被鉴定为不同的两个种的情况, 两个不同种的个体人为地定为一个种的现象也时有发生^[3]. 其中有毒 *A. catenella itamarensis/fundyense* 种群复合体之间种的界定一直是亚历山大藻属的分类研究中争议最多的问题, 传统的形态分类鉴定显得非常困难^[3,4]. 基于上述情况, 人们希望有一个客观的标准用于亚历山大藻属的分类鉴定和系统位置分析. 同功酶分析、毒素成分分析、单克隆抗体等生化及免疫学技术是近年来常采用的分类和鉴定的手段, 但结果并不稳定^[3-5]. 90 年代以来, 英、美、日等国家的注意力已逐渐转向分子分类、分子系统及分子毒理方面的研究, 试图从分子水平认识亚历山大藻的遗传特征, 以便获得稳定、可靠的分子指标^[1,5,6], 本文对近几年的亚历山大藻属的分子系统学研究进行了综述.

* “九五”国家自然科学基金重大项目资助

收稿日期: 1997-04-24 邱小忠, 男, 28 岁, 硕士

1 亚历山大藻属的分子系统学研究方法

分子生物学的发展极大地推动着形态分类学的深入研究,同样也成为海洋甲藻分类及系统学研究的新动力.近年来对亚历山大藻属的分类鉴定及系统学研究逐渐集中到对其 rRNA 基因的分析上,rRNA 基因片段存在于所有生物组织中,具有保守区与高度区相互镶嵌的结构特点,已成为国际上普遍采用的分子指标^[7].目前,以 rRNA 及其基因为分子指标进行的藻类分子系统学研究,主要有以下方法:

1.1 序列分析法

对 rRNA 及其基因直接序列测定可为分子系统学研究提供准确丰富的信息量,是分析系统进化的良好方法. Guy lenaers 等人^[6]于 1991 年对 rRNA 的 D1 区和 D2 区及其两侧的保守序列进行了测定并分析了亚历山大藻属等甲藻的系统位置. Destombe 等人^[3]于 1992 年比较分析了 *A. excavatum* 与 *A. tamarense* 的 18S rDNA 序列,研究结果表明这两种亚历山大藻在 18S 上能够互相区分.此后, Scholin C. A. 与 Anderson D. M. 研究分析了亚历山大藻属一些种的 Ss-rRNA 基因序列和 Ls-rRNA 基因部分序列,结果同样表明它们能够很好地用于亚历山大藻的种间鉴定; Masao Adachi 等人^[5]利用 ITS 区和 5.8 S rDNA 比较分析了日本等海域中分别属于 *A. affine*, *A. catenella*, *A. fundyense*, *A. insuetum*, *A. pseudogonyaulax* 和 *A. tamarense* 的不同个体,发现这些个体可分为 7 种类型: *catenella* 型、*tamarense* 型、WKS-1 型、Thai 型、*affine* 型、*insnetum* 型、*pseudogonyaulax* 型.

1.2 RFLP 分析

以往的 RFLP 技术必需采用探针标志、分子杂交等繁琐步骤;改进的 RFLP 技术采用 PCR 反应预先扩增出较大的目的片段,然后采用合适的限制性内切酶进行酶解反应,通过琼脂糖凝胶电泳分析其多态性;这无疑是一种简单快速的方法,目前,在亚历山大藻属 rDNA 的 RFLP 分析成为快速分类鉴定的新方法,常用它来进行属间及种间的快速鉴定 (Scholin C A et al, 1994). 1994 年日本学者 Masao Adachi 等人^[8]首先用 PCR 反应扩增出日本海域亚历山大藻属几个种的 ITS 区及 5.8 s rDNA 片段,并用 RFLP 分析对它们进行分类鉴定;研究表明,选择合适的限制性内切酶进行 RFLP 分析时,不同种的酶切图谱有明显差异,而同种的酶切图谱则有一致性.几乎同时,美国学者 Scholin 等 (1993) 用 RFLP 分析了亚历山大等属的 SSu-rRNA 基因,确认了一种快速鉴定 A 基因和 B 基因的方法; 1996 年 Scholin 与 Anderson^[9]对亚历山大藻属某些种的 28 s DNA 进行了 RFLP 分析,对它们的系统位置进行了阐述;表明用 RFLP 分析得出的结果与序列分析的结果是一致的,我们利用 RFLP 技术分析研究了我国南海链状亚历山大藻,揭示了我国南海链状亚历山大藻与北美等海域亚历山大藻的差异,并在此基础上探讨了 RFLP 技术用于属、种间鉴定的可行性 (陈月琴,邱小忠等,未发表).

2 亚历山大藻属的分子系统学研究

2.1 亚历山大藻属的分子系统位置

通过化石的研究表明,至少在白垩纪就有亚历山大藻出现 (大约在 135 百万年以前),然而由于 *A. tamarense*, *A. catenella* 和 *A. fundyense* 等类群化石证据的缺乏^[9,10],对于这样一个古老的类群,其起源问题一直存在着争议; Guy, Lenaers 等人^[6]利用 24 s rRNA 的 D1 和

D8区对关系相近的 11 种类群作了系统比较, 分析了甲藻的系统进化, 结果表明甲藻是单一起源的, 并且把亚历山大藻属从漆钩藻属等属分离出来 (图 1)。从图 1 中可以看出, 亚历山大藻属与梨甲藻属 (*Pyrocystis lunula*) 的关系较近, 它们与漆钩藻属 (*Gonyaulax*) 的差异性较大, 分子证据进一步说明亚历山大藻属从漆钩藻属分类出来的原因, 并初步阐明亚历山大藻属的单元起源。

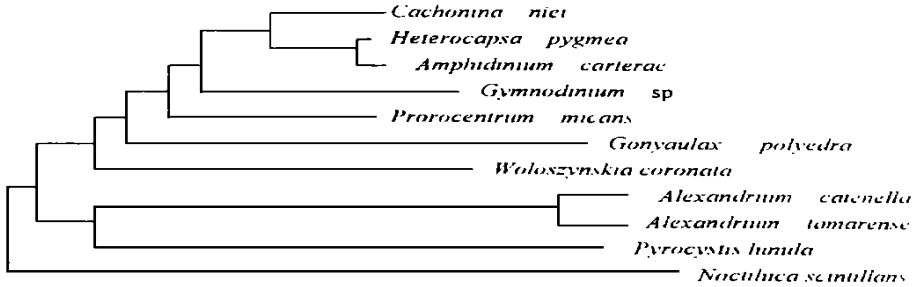


图 1 据 rRNA 序列比较分析的海洋甲藻系统关系 (Guy Lenaers, et al, 1991)

2.2 亚历山大藻属种间的分子分类学研究

要找出亚历山大藻属内各个种之间的进化位置及阐明各地理株之间的系统关系, 必需有更加合适的指标。rDNA 序列分析及 RFLP 分析在这一方面有独到的优点, 1995 年 Scholin 等人^[10]分析了亚历山大藻属 LSU rDNA 的部分序列, 有毒的亚历山大藻在树图上分别处于七个不同的分支, 可见有毒这一性状不能作为一个分类指标, 北美、日本北部等海域中有毒的 *A. tamarense* / *fundyense* / *catenella* 都具有 B 基因, 在树图上也非常接近, 它们起源于共同的祖先。而日本南部、泰国海域有毒的 *A. catenella* 却缺少 B 基因, 在树图上与坦桑尼亚海域中无毒的 *A. tamarense* (ATBB01) 关系较密切, 与日本南部无毒的 *A. tamarense* (WKS-1) 关系较远; 但与日本北部海域有毒的 *A. tamarense* / *catenella* (具 B 基因) 关系则相差更远。Scholin 等人^[9]于 1996 年用 LSU rDNA 的 RFLP 方法对其进行了进一步分析, 得到与序列分析相似的结果。日本学者 Masao Adachi 等人^[5, 10]通过 ITS 区与 5.8S rDNA 的 RFLP 分析及序列分析, 对日本等海域的亚历山大藻属作了更深入的分子系统研究, 研究发现, 日本具 B 基因的 *A. tamarense* / *fundyense* 与日本无 B 基因的 *A. tamarense* / *fundyense* 关系密切, 而与 *A. tamarense* (WKS-1) 关系相差较远。从图 2 中可以看出, Scholin 等人采用 LSU rDNA 部分片段序列比较分析的结果与 Masao Adachi 等人采用 ITS 区及 5.8s 分析的结果是大致相同的: *A. affine* / *A. minutum* / *A. andersonii* 等种类在树图上是基本一致的, *A. tamarense* / *A. catenella* / *A. fundyense* 等种类在传统的分类鉴定中则比较混乱, 这说明按传统分类标准进行分类, 具有不可避免的人为性、不准确性。日本海域中 *A. tamarense* 中无毒的 WSK-1 / CU-15 株型及有毒的 CU-13 株型从其他 *A. tamarense* 种类中独立出来, 特别是后两株与它们的关系相差很远。

3 亚历山大藻属的一种特殊的分子地理标志

由于自然的和人为的影响, 亚历山大藻属已遍布在世界各个海域, 其中不乏各种有毒藻类, 其毒害范围正在逐步扩大, 确定某海域的有毒亚历山大藻是当地种还是外来种的研究,

已引起各国科学家的极大关注^[7, 10].

1993年 Scholin 等在分析有毒 *A. fundyense* 类似 16 s rDNA 片段时,发现其上有 A, B 两套基因;后来发现在北美海域的所有有毒塔马亚历山大藻种群复合体中都有 A, B 两套基因.但西欧等一些海域的藻类却缺少 B 基因.日本海域北部的塔马亚历山大藻种群复合体也有 A, B 两套基因,而日本海域南部的藻类则缺少 B 基因^[10],我们通过 RFLP 分析研究了我国南海的链状亚历山大藻,发现我国的链状亚历山大藻缺少 B 基因,可作为我国海域有毒链状亚历山大藻

监控的分子地理标志.此外,对 B 基因的起源问题,则存在两个不同的假说,一种假设认为 B 基因是原

始基因,具有 B 基因的个体都代表原始的类群;另一种假设认为 B 基因是在进化过程中,随着不同海域环境的变化而产生的.通过对 B 基因在不同海域的分布情况以及不同海域地史演变过程的研究后,更多的证据支持后一种假说^[10].在北美海域, B 基因在 *A. tamarensis* / *catenella* / *fundyense* 等三类藻中的所有不同细胞形态中都有发现,从 LSU rDNA 片段序列分析研究中可以看出:具有 B 基因的 *A. tamarensis* / *catenella* / *fundyense* 遵循同一条进化路线.由此推断,具有 B 基因的个体来自共同的祖先,也进一步说明它们是单元起源的.

4 展 望

由于不断扩大的人类活动对海洋生态的影响,有毒甲藻引发的赤潮在全球范围内的发生率不断增长,给海洋渔业和人类的健康带来严重危害;有毒赤潮藻类鉴定的分子标志将为赤潮发生和传播的研究提供一个有力的工具.我国在这方面的研究刚刚起步,我们建立的甲藻微量 DNA 制备法(陈月琴,屈良鹤等,未发表),将为我国系统地进行甲藻分子分类和系统学的研究提供一种有效的新方法;同时,对于赤潮有毒甲藻的分子标志及其产毒机制的研究也具有重要意义.

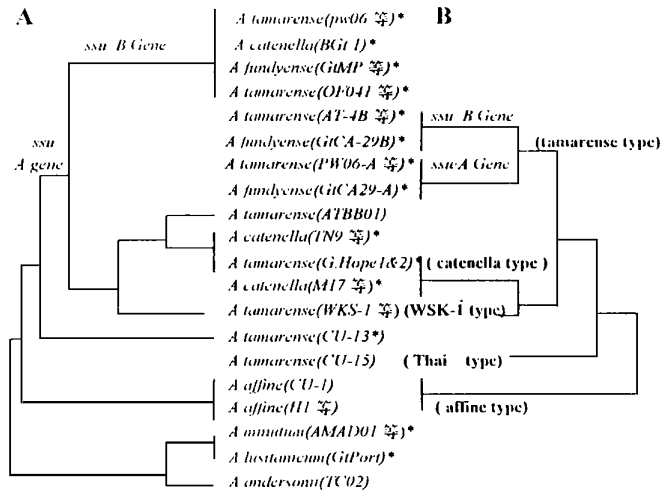


图 2 亚历山大藻属内种间的分子系统关系(*为有毒藻种)

A 仿 Scholin C A et al, 1995, LSU rDNA 序列分析;

B 仿 Masao Adachi et al, 1996, ITS 区及 5.8srDNA 序列分析

参 考 文 献

- Scholin C, 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 genes. *J Phycol* 1994, 30: 999-1011

- 张水漫, 杨清良, 邱辉煌, 等. 赤潮及其防治对策. 北京: 海洋出版社, 1994. 1-54

- 3 Destombe C, Cembella A D, Murphy C A, et al. Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA genes from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae), *Phycologia*, 1992, 31 (1): 121- 124
- 4 Zardoya R, Costas E, Rodas V, et al. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J Mol Evol*, 1995, 41: 637- 645
- 5 Masao Adachi, Yoshihiko Sako, Yuzaburo Ishida. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8s ribosomal and internal transcribed spacer regions. *J Phycol*, 1996, 30: 857- 863
- 6 Lenaers G, Scholin C, Yvonne Bhaud, et al. A molecular phylogeny of Dinoflagellate protists (Pyrrophyta) inferred from the sequence of the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8 ribosomal RNA. *J Mol Evol*, 1991, 32: 53- 63
- 7 陈家宽, 杨继. 植物进化生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 1994. 210- 228
- 8 Masao Adachi, Yoshihiko Sako, Yuzaburo Ishida. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed species (Dinophyceae). *J Phycol*, 1994, 32: 424- 432
- 9 Scholin C, Anderson D. Lsu rDNA-based RFLP assays for discriminating species and strains *Alexandrium* (Dinophyceae). *J Phycol*, 1996, 32: 1022- 1035
- 10 Scholin C, Hallegraeff G, Anderson D. Molecular evolution of the *Alexandrium tamarense* "species complex" (Dinophyceae): dispersal in the North American and West Pacific regions. *Phycologia*, 1995, 34(6): 472- 485

Progress in Molecular Phylogeny of the Genus *Alexandrium* (Dinoflagellate)

Qiu Xiaozhong^{*} *Chen Yueqin*

Abstract Dinoflagellates of genus *Alexandrium* include a number of species that produce saxitoxin which leads to paralytic shellfish poisoning (PSP). The taxonomy of this toxigenic group has undergone extensive revisions. However, the criterion of morphology used to classify it was ambiguous. Ribosomal RNAs and its genes provide useful and informative markers in the studies of phylogeny. In this review, the latest advance in molecular phylogeny of the Genus *Alexandrium* (Dinoflagellate) was summarized.

Keywords *Alexandrium*, molecular phylogeny, rRNA and rRNA gene

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275