

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0074-78

蓝藻分子系统学研究进展^{*}

庄 丽, 陈月琴

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 综述蓝藻分子系统学的研究成果及进展, 包括① 目前用于蓝藻分子系统学研究的基因种类以及这些基因进化的结构规律, PC-IGS, 16S rRNA 和 ISR 序列分析在蓝藻系统发育研究中取得的重要结果; ② 用于蓝藻分子系统学研究的方法及其应用; ③ 有毒微囊藻属的分子系统学研究进展。

关键词: 分子系统学, 蓝藻, 研究进展

分类号: Q 949.22, Q 7 **文献标识码:** A

蓝藻是一类分布广泛, 形态、结构较简单且多集聚生长的原核生物, 具有叶绿素 a 及藻胆素等, 进行生氧光合作用。其藻体有单细胞体的、群体的和丝状体的。蓝藻约有 150 属, 1 500 种, 传统上分为色球藻目、厚皮藻目、颤藻目、念珠藻目、真枝藻目。其中, 许多属种如微囊藻属 (*Microcystis*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*) 能产生毒素, 它们在自然环境中通常形成一个混合群体, 在各种各样生态条件的刺激下, 如淡水生境的富营养化, 大量繁殖, 集聚水面, 形成水华。蓝藻水华对饮用水体的最大危害是其产生有毒分子, 包括神经毒素和肝毒素。这些毒素不仅造成野生和饲养动物的死亡, 而且通过食物链引起人类多种急性和慢性的致病效应^[1]。

蓝藻分类学主要建立在形态学特征的基础上, 但是, 这些特征并不能鉴定潜在的形成水华或产毒的株系, 或者鉴定可能被混淆。更重要的是, 蓝藻在实验室培养条件下的形态特征和其在自然条件下的原本特征通常存在差异, 并且重复性也差。如 Komarek 报导, 其培养的种中, 50% 以上的培养株系的特点与该类群相关特征不相对应^[2]。基于上述情况, 建立在分子生物学基础上的一种新的分类方法已产生并不断成熟。本文对目前蓝藻分子系统学研究所采用的基因和方法作一基本介绍, 并着重概括了有毒微囊藻属的分子系统学研究进展。

1 主要基因种类及其进化规律

1.1 PC-IGS 分析法

Phycocyanin (PC) 是 1 种藻蓝蛋白。它是蓝藻光合系统 II 中主要集光色素的载体。整

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (39770058); 国家杰出青年基金 (39525007)

收稿日期: 1998-03-10 第一作者简介: 庄丽, 女, 26 岁, 研究生

个 PC 启动子包括编码 2 个后胆色素亚基的基因, 以及 3 个连接多肽. 在 2 个后胆色素亚基之间的间隔区 (IGS), 是 1 个高变区, 可用作蓝藻株系之间的鉴定. 研究发现^[3], 用多种限制性内切酶酶切 DNA 能产生对分类学上的不同水平有特异性的 DNA 分布图. 其中某些酶切出的片段对于整个属的物种来说长度都相同, 而另外一些则可进行种内的分类. 这为快速、可靠地分析蓝藻种群提供了可能.

1.2 基因组的多态性

应用随机多态性扩增 DNA (RAPD) 分析生物的基因组更能全面反映生物的遗传特征. 同时, 因为整个基因组都用来作为扩增 DNA 的基础, 所以这个方法是敏感而特殊的. 每条带都可被看作是从其扩增而来的株系的基因标志. Neilan^[3] 应用 RAPD 法得到了在富营养水体中引起水华的鱼腥藻属和微囊藻属成员特异的 DNA 分布图. 这些株系特异性 DNA 分布图有助于在属、种、株系水平上研究有毒蓝藻.

1.3 16S rRNA 及其基因

分析生物核糖体的 16S rRNA 基因, 是用得最多、最成熟的技术. 虽然任何基因都可以用作分子标志, 但是, rRNA 基因有其特殊的优点: (1) 现已建立了大型的 16S rRNA 基因的序列数据库, 如 RNA data base project. 其中包含了很多已培养物种的 16S rRNA 基因序列, 有足够的生物系统多样性. 这对基因序列的比较分析十分有用. (2) rRNA 基因在所有的细胞生物中均存在, 且是高度保守的, 所以可用于准确地确定亲缘关系较远的物种间系统发育关系. (3) 核糖体在细胞中大量存在, 其生物合成量正比于细胞的生长速度, 在生态学研究中, 很容易用专一性分子探针筛选 rDNA 分子.

在进行系统分类学研究时, 不需要测定 16S rDNA 基因的全序列. 研究结果表明, 使用不同区域的序列得到的分析系统树, 与用 16S rRNA 全序列构建出来的是大致相同的, 只是在末端分支的地方稍有不同. 16S rRNA 基因的某些区域在 1 级结构水平上有显著的差异, 这正是可用做分类的分子标记的基础, 但是, 在 2 级结构水平却很保守. 此特点非常有利于快速的序列分析比较.

1.4 16S rRNA 和 23S rRNA 基因间的转录间隔区

16S rRNA 可用于鉴定种以上的株系, 但是, 对于种以下的水平, 它具有 99.6% 的同源性, 分辨率不够. 相对来说, 大分子 rRNA 即 16S rRNA 和 23S rRNA 基因之间的间隔序列 (intergenic spacer region, ISR) 是一个特殊的区域, 具有较高的突变速率, 可作为精细的分子指标, 用于亲缘关系较密切的蓝藻和细菌的分类鉴定^[4]. 尽管蓝藻与其它真细菌一样, 不同种类其 rRNA 操纵子会有差异^[5], 但在蓝藻中, 同一种类 rRNA 操纵子具有较大的保守性^[6]. 从对微囊藻属^①和颤藻属^② rDNA 16S—23S 基因间隔区的分析来看, 该区域在属间和种间具有相对较高的突变速率, 而在种内则非常保守, 用于探针的设计是很好的靶序列. 因此可根据序列的这些特征, 选择某些变化区域, 合成专一性的核酸分子探针, 用于赤潮或水华种类的特异性检测. 随着研究的深入, 如探针应用的最佳条件等, 该项工

① 陈月琴, 庄丽, 屈良鹄, 等. 赤潮铜绿微囊藻 rDNA 基因间隔区的序列分析以及与淡水微囊藻的比较. 海洋科学

② 陈月琴, 唐绍清, 何家莞, 等. 蓝藻 *Oscillatoriaceae* rDNA 16S—23S 基因间隔区的序列及其分类学意义. 云南植物研究

作将为我国淡水水华及海区赤潮藻快速检测和监测提供一有效的手段。

2 蓝藻分子系统学研究的方法

分子生物学的发展极大地推动着形态分类学的深入研究, 同样也成为蓝藻分类及其系统学研究的新动力。遗传型特征, 包括 DNA 碱基组成, DNA-RNA 杂交和基因序列, 直接显示种群之间内在的遗传联系, 因此能作为一种很好的分类指标。目前主要采用的有以下方法。

2.1 PC-IGS RFLP 分析

Neilan 等^[2]于 1995 年采用 RFLP 分析法来鉴定淡水蓝藻的株系。首先用 PCR 反应扩增出 PC 启动子, 再用 9 个限制性内切酶来对 PCR 产物进行酶解反应。通过用 *Alu* I, *Cfo* I, *Hae* III 得到了微囊藻属株系属内的描述。最后用表征分析法和分支分析法分析数据, 来推断有毒微囊藻属的遗传联系, 是一种简单快速的分析方法。

2.2 RAPD 分析

株系特异性随机扩增多态性 DNA 使得蓝藻属、种、株系 3 个水平的鉴定成为可能。每个株系获得的标志也能应用于形态学的分析, 并推断基因之间的相关性。Neilan^[3]于 1995 年在原 RAPD 分析方法的基础上加以改良, 即一般 RAPD 使用 1 个单引物, 而新方法使用双引物, 提高了重复性, 获得高度重复性的 RAPD 图案。产生的数据包括从 *Anabaena* 和 *Microcystis* 10 个株系中得到的 29 个标记, 被用来计算遗传距离, 以及通过成对比较, 建立了表征图。从进化树主要的分叉可看出, 表征图支持对 *Anabaena* 和 *Microcystis* 的描述。11 个形成水华和产毒的蓝藻株系通过 8 个单引物和 1 个双引物的 PCR 反应得到的电泳图谱, 为确定每个株系培养方法和遗传距离提供了鉴别的指纹。

2.3 序列分析法

对 rDNA 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, 是研究分子系统进化的有力手段。

根据具体实验方法的不同, 可分为:

(1) 经 PCR 后, 建立克隆文库, 然后质粒限制性分析, 印迹, 杂交。经过序列分析, 发现海洋中相距很远的种群的(微生物)组成带有普遍性, 分别属 SAR11、蓝藻、G+细菌和 γ -蛋白细菌等。研究确定了在浮游生物群落中, 大多数的组成物种尚未被分离培养, 因而可能是以前未知的新物种。又发现海洋中蓝藻噬菌体每 mL 个体数达 $10^3 \sim 10^4$ 个, 但群落中的原核生物对相应的噬菌体都有抗性, 因而可与之共同生活。

(2) 经 PCR 后, 进行 DGGE(变性梯度凝胶电泳)分析。精度达到可检出仅占种群 1% 的物种的水平。并在好氧环境样品中检出本来认为是厌氧菌的硫酸盐还原细菌^[7,8]。

(3) RT-PCR 后, TGGE(温度梯度凝胶电泳)分析, 用以作有活性的核糖体基因的不均一性的结构和表达差异分析^[9]。

(4) 16S rRNA 逆转录成 rcDNA, 再克隆测序。有关实验从微生物群落中鉴定出未培养过的新物种, 其中 1 种为蓝藻类, 1 种为绿藻类^[10]。

Nubel 等^[7]把各种自然和人工培养的蓝藻 rRNA 基因片段有选择地扩增出来, 再通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)获得序列数据。包含同种 DNA 分子的 PCR 产物通过 DGGE 后可辨认出 1 条单一的带, 因此可被直接测序, 获得 16S rRNA 基因的大约 700 个核苷酸信

息. 这样, 免去了分子克隆过程, 使得检测株系之间基因的多样性更加快速简便.

3 有毒微囊藻属分子系统学研究进展

微囊藻属的分子鉴定及系统学研究是目前国际上蓝藻研究的热点之一. 该属包括一些全球分布的产毒种, 如 *Microcystis aeruginosa*. 总的来说, 在属的水平, RFLP 支持现有的建立在形态学上的分类学. 在种的水平, 现有的分类学并未被 RFLP 数据支持. 如 *Microcystis aeruginosa* 和 *M. wesenbergii* 的分类包括了几个非种特异性的 RFLP 图谱. 但也有例外, 在被研究的株系中, 仅有 3 对株系在种的水平 RFLP 和传统分类法是一致的. 在株系的水平, 微囊藻属的排列次序和 RFLP 分析得到的结果也不相同. RFLP 图谱和系统发育树把蓝藻分为几个明确的亚群, 单细胞或不形成异形胞的株系确定为 II 群. 这 1 类群包括 *Microcystis* 的成员, 部分 16S rRNA 基因序列数据支持 *Microcystis* 株系在 IIa 群. 在这 1 类群中, *Microcystis* 株系占据了多个基因的谱系, 显示它和传统分类不一致. *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. viridis* 和 *M. holsatica* 株系显示是任意定位的, 在分支之间和在每个末端结之间都有基因的多样性. 这些数据都不支持现有的建立在微小的形态度量区别上的微囊藻属分类系统. 这可能与方法的敏感性或 PC 基因的独立进化有关. 总之, *Microcystis* 株系按 RFLP 分类是多元的, 因此有必要重新审视传统的分类方法.

16S rRNA 和 RAPD 所得结果在属的水平都支持传统的分类方法. 在种的水平, RAPD 和传统的分类结果并不一致. 在株系的水平, *M. aeruginosa* PCC 7806 和 NIES89 通过 RAPD-PCR 得到的结果和传统的形态学数据是吻合的. 另一方面, 从 16S rRNA 得到的结果表明, 这 2 个株系之间的顺序同源达 99.6%, 显示了相对较少的基因多样性. 蓝藻蓝蛋白和 16S rRNA 中检测得到的 DNA 序列的异质性揭示了 *Microcystis* 株系多重起源及进化. RAPD-PCR 得到的系统发育关系在 *Microcystis* 株系中不具有清晰的分辨率, 但此方法不需要知道被测生物的基因序列, 对传统方法来说是可供选择的和有补充性的. 它所得到的结果可能因为移动因子或质粒的存在而发生变化.

4 展 望

核酸结构分析所产生的大量的分子数据, 有毒蓝藻及其他海洋微生物进化方面的知识获得了空前的增长. 这些新知识在许多方面与传统的认识十分吻合, 但也对传统的系统提出许多问题和挑战. 理想的、最合适的检测株系方法应包括对直接和肝毒素和神经毒素产生有关的基因的分析. 目前, 我们还未了解这些分子在蓝藻中合成的信息. 综上所述, 尚有待于进一步完善和改良所使用的分子生物学分类方法, 使建立在其之上的分类系统更趋向于系统发育的自然系统, 从而解决传统形态学分类法不能解决或比较混乱的问题.

参考文献:

- [1] CARMICHAEL W W. A status report on planktonic *Cyanobacteria* (blue-green algae) and their toxins In: Environmental Monitoring Systems Lab. Office of Research and Development VS. Environmental Protection Agency. Ohio: Cincinnati. 1992
- [2] NEILAN B A, JACOBS D, GOODMAN A E. Genetic diversity and phylogeny of toxic *Cyanobacteria* determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 3875~3883

- [3] NEILAN B A. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic Cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1995, 61: 2286~2291
- [4] JESUS G M, ANTONIO M M, ISABEL A, et al. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the COR collection and *E. coli* K-12. *J Bacteriology*, 1996, 178 (21): 6374~6377
- [5] NICHOLS J M, FOULDS I J, CROUCH D H, et al. The diversity of cyanobacterial genomes with respect to ribosomal RNA cistrons. *J Gen Micro*, 1982, 128: 2739~2746
- [6] TOMIOKA N, SUGIURA M T. Nucleotide sequences of the 16S-23S spacer region in the rRNA operon from a blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol & Gen Genet*, 1984, 193: 427~430
- [7] NUBEL U, GARCIA-PICHEL F, MUYZER G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1997, 63: 3327~3332
- [8] MUYZER G, WAAL E C D, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993, 59: 695~700
- [9] NUBEL U, ENGELIN B, FELSKE A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol.* 1996, 178: 5636~5643
- [10] WELLER R, WELLER J W, WARD D M. 16S rRNA Sequences of uncultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Appl Environ Microbiol.* 1991, 57: 1146~1151

Progress in Molecular Systematics of Cyanobacteria

ZHUANG Li^{*}, CHEN Yueqin

Abstract: Reviewed in the present paper are three most important factors stimulating the developing of molecular systematics: the evolution rules of increasing number of genes widely used in molecular systematics of Cyanobacteria; respective enumeration of some exciting results in molecular phylogeny constructed from sequence analysis of PC-IGS, 16S rRNA and ISR; the methods applied in the research of molecular systematics of Cyanobacteria; the progress in the developing of molecular systematics of toxic microcystis.

Keywords: molecular systematics, Cyanobacteria, research progress

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China