

海洋褐藻分子系统学研究进展

PROGRESS IN MOLECULAR SYSTEMATICS OF MARINE BROWN ALGAE

徐 涤 秦 松

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海洋藻类的分类学一直是困扰人们的难题。应用传统的形态学、生态学等方法对海洋藻类进行分类,往往产生结果上较大的分歧。传统的生物分类和谱系树的建立是基于对生物表型的比较分析,而表型是基因型与环境相互作用的产物,基因型相同的个体在不同环境条件下可能表现出显著的表型差异,给分类和谱系分析带来很多困难和不确定性,所以有人主张直接将基因型用于分类和系统学研究。

基因型直接反映基因的分子结构特征,具体说就是 DNA 和 RNA 的一级结构特征。Zuckerlandl 和 Pauling 在 1965 年最早提出这个设想,认为核酸包含有系统发生的最原始信息,可以用于系统学研究。分子系统学就是从核酸的信息推断生物进化的历史,或者说“重塑”系统发生的(谱系)关系,并以系统树的形式表现出来。通过藻类核酸的分析比较研究藻类系统发生的学科,称为藻类分子系统学。分子系统学的分析方法从陆地生物起步,20 世纪 80 年代末以来在海洋藻类中得到应用。

藻类种类繁多,根据捕光色素系统的不同可将其分为 3 种类型,即捕光色素系统为藻胆蛋白的红蓝藻类,捕光色素系统为叶绿素 a/ b 蛋白质复合物的绿藻,以及进化程度介于红蓝藻类与绿藻之间

的杂色藻类,如褐藻和硅藻等,其主要捕光色素系统为叶绿素 a/ c- 蛋白质复合物。本文将在介绍海藻分子系统学常用研究方法的基础上,重点对海洋褐藻分子系统学研究的最新进展进行评述。

1 海藻分子系统学常用的研究方法

真核藻类同陆地植物一样,至少有 3 种类型的 DNA: 核 DNA、叶绿体 DNA 和线粒体 DNA,而真核藻类叶绿体和线粒体 DNA 往往是单亲遗传的。20 世纪 90 年代初期海洋藻类 DNA 分析最常用的方法是限制性内切酶酶切片长度多态性(RFLPs)方法,但随着 DNA 测序和计算机分析技术的飞速发展,DNA 序列分析已经成为藻类分子系统学研究最主要的方法,从而使分析结果更加直观、可信。除此之外,其他一些简便快捷的分子遗传标记技术,如随机引物扩增多态性 DNA(RAPD)技术、微卫星技术、单链构象多态性(SSCP)技术也被用于海洋藻类分子系统学研究中。

1.1 对核 DNA(nDNA)的分析比较

1.1.1 rRNA 基因 rDNA 在所有生物中都存在,而且是以高度重复方式存在的。真核生物中它以 18 S rDNA(SSU, small-subunit)、5.8 S rDNA、26 S rDNA(LSU, large-subunit)的顺序串联而组成重

复单体。另外 rDNA 中还含有两种间隔区 IGS (Intergenic spacer) 和 ITS (Internally transcribed spacer)。IGS 含有串联的重复序列,每种序列约 70 ~ 350 bp。IGS 在相近种类中长度的变化主要是由染色体间不等交换而引起的重复序列拷贝数不同所导致。ITS 又分为两个片段,ITS1 连接 18 S 和 5.8 S rDNA,而 ITS2 连接 5.8 S 和 26 S rDNA。

SSU rDNA 区域很保守,而 ITS1 区域碱基替换的频率是外显子区的 10 倍,只有序列很接近的分类单元才能在整个长度中进行比较。Burkhardt 1998 年,Stache-crain 1997 年研究显示,SSU rDNA 与 ITS 的数据进行综合分析可以增加结果的稳定性^[1]。而 IGS 进化得比 ITS 更快,可进行种间及种内分类地位的确定。LSU rDNA 的片段大,其序列变异水平在 SSU rDNA 和 *trcL* 之间。LSU rDNA 包括一些随着保守的核心区域而变化的扩展片段,它们的位置和数目在被子植物中保守,但与核心区域相比,它们有较高的变化位点,并且经常有较大的插

第一作者:徐涤,出生于 1972 年,在读博士生。毕业于青岛海洋大学海洋生物专业,1998 年获比利时根特大学硕士学位,现从事海洋生物技术方面的研究。

收稿日期:2001-04-09

修回日期:2001-07-31



入/缺失片段。

由于 rRNA 的二级结构有茎和环的结构,会显示出不同的替换率。rRNA 基因还频繁进行不等交换,因此有时会出现错误的系统学关系。

1.1.2 RPBI 基因 RPBI 是编码 RNA 聚合酶 II (Pol II) 大亚基的核基因。在所有细菌和真核生物中,Pol II 的大亚基上都存在 AH 8 个保守域,但在真核生物中,其 3' 末端还存在一个附加的编码 CTD (Carboxyl-terminal domain) 的区域,CTD 是由一个七肽 (TyrSerProThrSerProSer) 串联而成的重复序列,在转录前后都有重要的功能。Stiller 与 Hall^[11] 的研究结果发现,最早分枝的真核生物中缺乏这个七肽的重复序列,所以 CTD 可作为系统发生的标记。

1.2 叶绿体 DNA (cpDNA)

1.2.1 *npB* 基因 *npB* 基因编码 RNA 聚合酶的 β -亚基,不含间隔序列。

1.2.2 *rbcL* 和 *rbcS* *rbcL* 和 *rbcS* 分别编码 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 的大亚基和小亚基。在绿藻中,*rbcL* 是由叶绿体编码而 *rbcS* 是核编码的;但在杂色藻、隐藻和红藻中,*rbcL* 和 *rbcS* 都是由质体编码的。

rbcL 适于分析较高水平的分类关系,其优点有:DNA 片段大 (> 1 400 bp),可提供较多的系统学特征;进化速度相对较慢,适于进行科或更高水平上系统学关系的分析。

1.2.3 ATP 酶基因 ATP 酶基因含有高度保守的亚基,*atpA* 和 *atpB* 均可提供很好的系统学证据。1994 年 Douglas 与 Murphy 通过对真细菌和质体 *atpB* 序列的系统学分析,认为所有质体都起源于蓝藻。Leitsch 等^[5] 又通过对 *atpA* 及其上下游核苷酸序列的分析发现含有叶绿素 a + c 的隐藻 *Gallandia theta* 的叶绿体起源于红藻,从而支

持了二级共生假说。

1.3 线粒体 DNA (mt DNA)

目前对藻类 mtDNA 所知甚少,基因序列还没能象质体 DNA 那样被广泛地应用于藻类系统学研究中。但是,藻类线粒体基因组很小,重组率较低并且保守性高,藻类 mtDNA 比陆生植物更适于分子系统学研究。目前得到应用的藻类 mtDNA 有编码 NADH 脱氢酶一个小亚基的基因 *nad4L* 和编码细胞色素氧化酶的 COX 的 I 基因^[12] 等。但是由于片段太小,对于较高水平的系统分析还缺乏说服力。

2 褐藻分子系统学研究进展

褐藻的形态差异很大,Clayton 将褐藻纲 (Phaeophyceae) 分为 15 个目,从小型的丝状体到全长可达 60 m 的巨藻。褐藻也因此分为两大类:一类结构简单,形态较小,主要附着于其他物体表面或内共生于大型海藻体内,如水云目、索藻目等;另一类形体较大,结构上有一定程度上的分化,如墨角藻目、海带目等。

褐藻分子系统学研究主要集中在 rRNA 基因、*rbcL* 和 *rbcS* 序列分析上。Tan 和 Druehl 研究结果表明,SSU rDNA 较保守,对褐藻目以下的系统学关系提示意义不大,ITS 属内整个长度比较才有意义,而 SSU rDNA 与 ITS 的序列综合分析可以增加结果的稳定性。Assali 等、Valentin 与 Zetsche 的研究结果表明,间囊藻 (*Pylaiella littoralis*) 和长囊水云 (*Ectocarpus siliculosus*) 的 *rbcL* 序列仅相差 7.4%,提示 *rbcL* 可以在褐藻目和科的水平上提供有用的信息;而 *rbcL* 和 *rbcS* 之间的间隔序列在科和属的水平可信。

Cavalier-Smith 与 Chao 认为在褐藻中最早分支的是墨角藻目,尔后分支的是水云目。而 Tan 与

Druehl 1996 年和 Peters 等^[7] 的研究也表明,相对于其他的褐藻类型来说,墨角藻目中的种类组成了独立的分支。

Tan 和 Druehl 报道了利用 18 S rDNA 部分序列建立的系统树,并显示了水云目的多源性。Sie mer^[10] 等对 *rbcL* 及 *rbcL* 和 *rbcS* 之间间隔序列的核苷酸序列分析结果否定了将网管藻并入线翼藻目的观点。生长在大型海藻体内的内共生褐藻结构简单但分类困难。1998 年 Burkhardt 和 Peters^[11] 分析了从海带和红藻上分离到的各两种内共生褐藻的 SSU 和 ITS rDNA 序列,结果表明,来自海带的内共生藻属于水云目的 *La minarocolax*, 而来自红藻的内共生藻属于扭线藻属 (*Streblospora*)。Peters 与 Burkhardt^[8] 也利用 SSU 和 ITS rDNA 序列分析将海带中的共生褐藻 *La minarionem elsbetiae* 的分类地位定为水云目,但又独立于水云目中其他种类之外,这揭示了内共生褐藻起源的多源性。Miller 等^[6] 利用 SSU 和 LSU rDNA 部分序列分析证实,目前归属于水云目中的一些丝状褐藻如 *Asterocladon*, *Asterionema* 等都不属于该目。

Tan 与 Druehl 通过完整的 SSU rDNA 序列分析证实,毛透藻目 (Sporocnales)、酸藻目 (Desmarestiales) 和海带目 (Laminariales) 的关系很接近,rDNA 系统树还表明海带目中存在近源现象 (图 1)。

海带目中的翅藻科、海带科和巨藻科之间形态差异显著,Saunders 与 Druehl 对上述 3 科的叶绿体 DNA 进行限制性酶切图谱分析,结果显示巨藻科中的某些属更靠近翅藻科和海带科。巨藻科中的多源现象还需要加以证实。另一方面,由于缺乏化石资源,这些分子证据也可以为海带目的进化提供线索。Saunders 与 Druehl 后来对海带

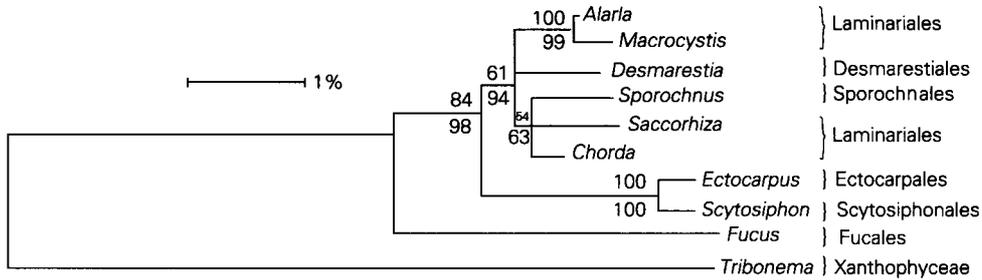


图1 建立于18S rDNA序列分析基础上的系统树(Tan与Druel,1996)

目有代表性的8个属的样品进行SSU rRNA序列分析,得出序列差异百分率为0.66%,从而支持海带目的分枝时间较晚的观点。作者推论海带目这些属之间的分化发生在 1.600×10^4 a前至 2.000×10^4 a前之间。另外结果还显示巨藻科中的*Lessoniopsis*与翅藻属(*Alaria*)的SSU rRNA序列仅相差一个碱基,提示了巨藻科的多源问题。Kraan与

Guiry¹⁴发现*ibcL*和*ibcS*间隔序列分析对采自大西洋的翅藻属的5个种具有较高的分辨率,但无法分辨同一种的不同地理种群。

Rousseau等1997年对采自欧洲海岸的墨角藻目的8个属样品的LSU rDNA中D1、D2两个变异区域进行序列分析,并由此建立系统树。结果显示样品分为两大类,分别与墨角藻目的两个科相对应(图

2):其一与Fucaceae(墨角藻科)和Himantaliaceae相符,另一组与Cystoseiraceae(囊链藻科)和Sargassaceae(马尾藻科)相符,并且第一组中墨角藻科表现出显著的单源性。Serrão等¹⁹对墨角藻科全部6个属16个种rDNA的ITS1和ITS2序列分析也证实了该科的单源性。另外Peters等¹⁷利用ITS序列分析揭示了酸藻科的南半球起源性。

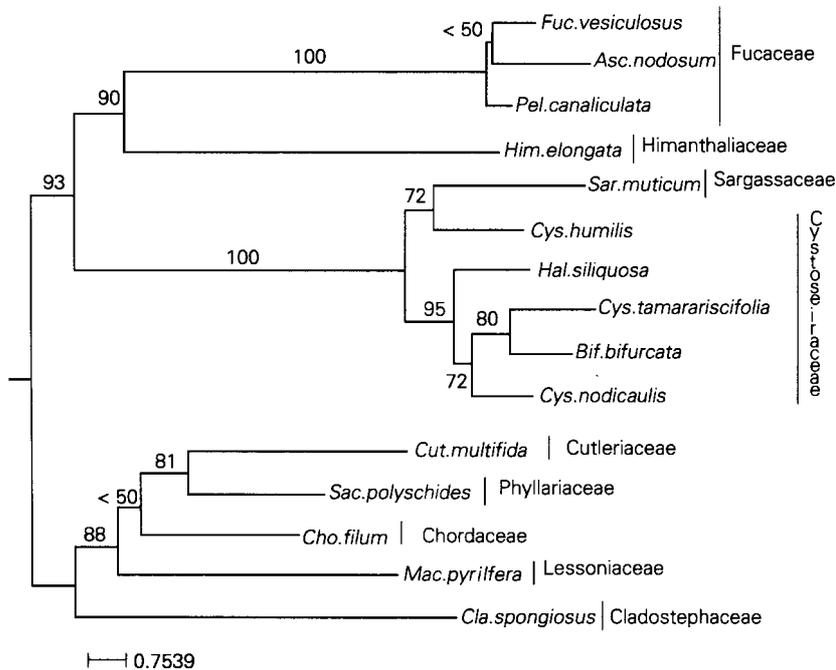


图2 建立于LSU rDNA基础上的墨角藻目系统树(Rousseau等,1997)



Koga me 等^[3]对荳藻目部分种类进行 *trcL*、*trcS* 和部分 LSU rDNA 序列分析, 结果显示各种分子证据结果一致, 从而将荳藻目分为两个分支单位, 一个包括了从温带到热带的种类, 另一个则来自寒温带。

3 问题与展望

十几年来海藻分子系统学研究已建立了方法, 在分类、系统进化和生物地理学研究方面取得了研究成果。针对形态简单而传统分类困难的丝状褐藻的分类地位进行探讨, 确定了一些新种和新属。另外针对构造复杂的大型褐藻, 力求确立的单源 (Monophyletic) 自然分类单位应包含同一祖先全部已知的后裔, 而不能排除任何; 如果一个分类群包含了多个共同祖先趋同进化的后裔, 就是多源的。

但是目前为止, 多数工作仍限于积累信息、利用孤立的分子证据构建局部的分子系统树, 而整体的系统发生关系仍然很模糊。虽然我们极力构建单源的分类单位, 但就象在形态分类中遇到趋同进化问题一样, Donoghue 与 Sanderson 在 1992 年指出, 分子数据中也存在着这种平行演化的现象, 因而最终的结论应该是由分子生物学与形态学, 即基因型和表型相互验证后得出的。总之需要大量积累资料, 完善方法从而建立一个整合体系。

参考文献

1 Burkhardt E., Peters A.F. . Molecular evidence from nrDNA ITS sequences that *Laminocolax* (Phaeophyceae, Ectocarpales *sensu lato*) is a worldwide clade of closely related kelp endophytes, *Journal of Phycology*, 1998,

34: 682 ~ 691

2 Ehara M. *et al.* . Distribution of the mitochondrial deviant genetic code AUA for methionine in heterokont algae, *Journal of Phycology*, 1998, 34: 1 005 ~ 1 008

3 Koga me K. *et al.* . Phylogeny of the order Scytosiphonales (Phaeophyceae) based on DNA sequences of *trcL*, partial *trcS* and partial LSU nrDNA, *Phycologia*, 1999, 38: 496 ~ 502

4 Kraan S., Guiry M.D. . Sexual hybridization experiments and phylogenetic relationships as inferred from Rubisco spacer sequences in the genus *Alaria* (Phaeophyceae), *Journal of Phycology*, 2000, 36: 190 ~ 198

5 Leitsch C.E.W. *et al.* . The *atpA* gene cluster of *Guillardia theta* (Cryptophyta) : A piece in the puzzle of chloroplast genome evolution, *Journal of Phycology*, 1999, 35: 128 ~ 135

6 Miller K.M. *et al.* . Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales Rhodophyta) based on the Rubisco spacer *trcL* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. 1. North America, *Phycologia*, 1998, 37: 195 ~ 207

7 Peters A.F. *et al.* . Ribosomal DNA sequences support taxonomic separation of the two species of *Chorda* : reinstatement of *Hilosiphon tomentosus* (Lyngbye) Jaasund (Phaeophyceae, Laminariales), *Eur. J. Phycol.*, 1998, 33: 65 ~ 71

8 Peters A.F., Burkhardt E. . Systematic position of the kelp endophytes *Laminonema elsbetiae* (Ectocarpales *sensu lato*, Phaeophyceae) inferred from nuclear ribosomal DNA

sequences, *Phycologia*, 1998, 37: 114 ~ 120

9 Serrão E.A. *et al.* . Evolution of the Fucaceae (Phaeophyceae) inferred from nrDNA ITS, *Journal of Phycology*, 1999, 35: 382 ~ 394

10 Siemer B.L. *et al.* . Phylogenetic relationships of the brown algal orders Ectocarpales, Dictyosiphonales, and Tilopteridales (Phaeophyceae) based on Rubisco large subunit and spacer sequences, *Journal of Phycology*, 1998, 34: 1 038 ~ 1 048

11 Stiller J.W., Hall B.D. . Sequences of the largest subunit of RNA polymerase II from two red algae and their implication for rhodophytes evolution, *Journal of Phycology*, 1998, 34: 857 ~ 864

辅助参考文献

Peters A.F. *et al.* . Phylogeny and historical ecology of the Desmarestiaceae (Phaeophyceae) support a southern hemisphere origin, *Journal of Phycology*, 1997, 33: 294 ~ 309

Rousseau F. *et al.* . Molecular phylogeny of European Fucales (Phaeophyceae) based on partial large-subunit rDNA sequence comparisons, *Phycologia*, 1997, 36: 438 ~ 446

Stache-Crain B. *et al.* . Molecular systematics of *Ectocarpus* and *Kalkuckia* (Ectocarpales, Phaeophyceae) inferred from phylogenetic analysis of nuclear and plastid encoded sequences, *Journal of Phycology*, 1997, 33: 152 ~ 168

(本文编辑 :张培新)