

石莼目几种绿藻的 ITS 区和 5.8S rDNA 的序列及系统发育分析

李艳燕¹, 朱立静¹, 沈颂东^{1*}, 吴勋建¹, 张耀东¹ 兰平²

(1. 苏州大学 医学部细胞生物学系, 江苏 苏州 215123; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

关键词: 浒苔; 格氏礁膜; ITS; 序列分析; 系统发育

中图分类号: Q942

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2009)05-0162-07

1 引言

在海藻的分类系统上, 由于海洋的开放环境和人为因素的影响, 单凭藻体的形态、结构特征很难得到统一的结论, 因此探求一种能够有效补充传统分类方法的新手段具有十分重要的意义^[1-2]。随着分子生物学技术的不断发展和完善, 为分类学和系统学研究提供了许多新方法。分子生物学技术如 RAPD^[3-4], RFLP, AFLP, CAPS, SSLPs, SNPs 等技术为海洋绿藻的分子系统学的研究提供了可靠的分子标记资料, 其中核糖体 rDNA ITS 区(包括 ITS1, 5.8S 和 ITS2) 序列被广泛用于不同物种的种间、亚种和种群水平上的系统发生的研究^[5-12]。由于 ITS 区进化速度快, 能够提供比较丰富的变异位点和信息位点^[13-15], 在分子系统学研究中常作为构建系统进化树的基础。目前 GenBank 数据库中已经收录了数万种 rDNA 的全部或者部分序列, 可以为物种的系统进化及种质鉴定研究提供丰富而详实的资料^[16]。在国外, 利用 ITS 序列对绿藻门的物种进行分类和系统发育的研究较多^[17-19], 但国内目前只有汪文俊等^[20]人利用该技术对大型海洋绿藻进行系统进化分析。本文利用 ITS 作为分子标记技术, 对绿藻门浒苔属的浒苔(*Enteromorpha prolifera*) 和礁膜属的格氏礁膜(*Monostroma grevillei*) 的 rDNA 进行序列分析, 并通过和 GenBank 数据库

中已经公布的其他绿藻物种的 rDNA 序列的比较, 并依据 ITS 区对绿藻的不同物种进行系统发育研究, 以期确立一种能够有效补充传统分类方法的新手段, 为合理保护和利用绿藻的种质资源提供理论依据。

2 材料和方法

2.1 材料来源

分别取冷冻储存的浒苔和格氏礁膜叶状体少许(采自青岛海滨, 洗净后晾干, -20℃保存), 复苏若干小时, 使叶状体全部舒展开来。分别挑取完整的大型个体作样品, 先用 0.7% 的 KI 浸泡, 再用一级水洗净(毛笔洗刷 3~5 次即可)。

2.2 DNA 模板的制备

将洗净的样品晾干, 剪碎后, 放入预冷的研钵中, 充分研磨。加入适量的酶液(2% 的海螺酶, 2 mol/dm³ 葡萄糖), 于摇床 25℃ 酶解 3 h。无菌水稀释酶解物, 筛绢过滤。无菌水悬浮, 收集细胞^[21]。参照杨君等^[22]人的 CTAB 法方法并作改进提取模板 DNA。

2.3 扩增前样品 DNA 完整性、浓度和纯度的测定

扩增前将总 DNA 抽提物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 测定样品 DNA 的完整性, 确定其分子量大小。并将完整的 DNA 样品用 752 型紫外分光光度计测定 OD260 值和 OD280 值, 以测定 DNA 的浓度

收稿日期: 2008-11-06; 修订日期: 2009-09-20。

基金项目: 国家自然科学基金(30570125); 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放课题(2005HS006) 资助。

第一作者: 李艳燕(1984-), 女, 江苏省盐城市人, 硕士研究生; 研究方向: 藻类分子生物学。E-mail: liyanyanjiangsu@163.com

* 通信作者: 沈颂东, 副教授, 博士研究生; 研究方向: 藻类细胞发育研究。E-mail: shensongdong@suda.edu.cn

和纯度,然后根据原浓度将其稀释到 20 ng/cm^3 ,保存于 4°C 冰箱中备用。

2.4 核糖体 DNA ITS 片断扩增及 PCR 产物纯化

根据 GenBank 数据库中获绿藻的 18S rDNA 和 28S rDNA 序列,根据各序列中最保守区域用软件 Primer 5.0 设计 ITS 引物。(引物 a: $5' \text{ TCTTTGAAA CCGTATCGTGA} 3'$; 引物 b: $5' \text{ GCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGT} 3'$) 引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应的程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 60°C 退火 3 min, 60°C 延伸 1 min, 35 个循环, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 反应体系为 $50 \mu\text{L}$, 其中含有 $10 \times \text{Buffer}(\text{Mg}^{2+}) 5 \mu\text{L}$, dNTPs (2.5 mmol/dm^3) $4 \mu\text{L}$, 上、下游引物 (10 pmol/dm^3) 各 $1 \mu\text{L}$, Taq 酶 (TaKaRa 公司) 2.5 U , 模板 DNA $6 \mu\text{L}$, 补足超纯水至终体积 $50 \mu\text{L}$ 。利用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照,在 My cycle™ PCR 基因扩增仪上完成。扩增的 PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检查结果于 Genius 凝胶成像系统中观察。用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物。扩增产物送于测序。将纯化后的 PCR 扩增产物送交上海生工生物工程技术有限公司进行正反双向测序。

2.5 ITS 序列测定和系统树的构建

利用 Vector NTI Suite 9 软件将所测得的两段序列拼接成完整的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列。将拼接的序列经 Bio Edit^[23] 整理,用 Clustal X^[24] 程序进行对位排序,手工进一步调整。在 NCBI 服务器上 (<http://www.ncbi.nih.gov>) 用 BLAST 进行同源检测,以便表明所得的序列为 ITS 区,同时根据同源性的比较结果确定 5.8S rDNA 和 ITS 序列的边界及长度。用 DNAMAN 软件将这些序列配对比较,观察其相似性,寻找差异区域,对所有参数均用软件默认值。将实验测得的序列和紫菜属的其他种的 ITS 序列(来自 GenBank) 用 Bio Edit 和 Clustal X 进行多序列匹配排列,采用 MEGA2.0 软件 (<http://www.megasoftware.net>) 中的 Kimura 双参数模型^[25] 计算种间的遗传距离,再应用 MEGA3.1 中的邻接法(neighbor-joining method) 计算不同物种间的关系获得系统进化树,并通过自举分析(bootstrap) 作置信度检测,bootstrap 为 1000 次。序列的数据库入口号码如下: AB097643 *Enteromorpha*

intestinalis; AB097648 *Enteromorpha linza*; AJ550765 *Enteromorpha compressa*; AJ012276 *Enteromorpha ahleriana*; AY260558 *Enteromorpha procera*; AY422522 *Ulva rigida*; AJ234316 *Ulva fenestrata*; AY422518 *Ulva californica*; AF415170 *Monostroma nitidum*; AF415173 *Monostroma angicava*; AF415171 *Monostroma Arcticum*; AF428050 *Monostroma grevillei*.

3 结果与分析

3.1 BLAST 结果及 ITS 和 5.8S rDNA 序列分析

测序结果已经提交 GenBank, *Enteromorpha prolifera* 的序列号是 GQ920623, *Monostroma grevillei* 的序列号是 GQ920624。

根据 GenBank 中的 BLAST 同源检测的结果,确定出 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 的完整序列长度(见图 2)。将浒苔和格氏礁膜的 ITS 和 5.8S rDNA 序列通过 Clustal X1.8 软件对序列进行比对分析后,手工进一步调整。BLAST 分析结果显示,序列号为 AJ012276 和 AY260558 的 ITS 序列及 5.8S rDNA 与本研究浒苔的测序结果有最大的相似性,均为 99%,序列号为 AF415173, AF428050 的 ITS 序列及 5.8S rDNA 与本研究的格氏礁膜序列有最大的相似性,为 99%。上述结果均证实本研究中的浒苔和格氏礁膜的 PCR 产物确实是含 5.8S rDNA 的 ITS 序列。

利用 Dnaman 软件对浒苔和格氏礁膜的 ITS1, 5.8S rDNA 和 ITS2 序列进行序列比对分析(见图 2)。从图 1 中可以看出,浒苔和格氏礁膜的 ITS1 序列长度分别为 193 bp, 191 bp; 5.8S rDNA 的长度是一致的,均为 160 bp; ITS2 的长度分别为 183 bp, 192 bp。表 1 显示了 11 种绿藻的 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 基因序列的碱基组成以及 GC 含量。其中礁膜属的 GC 含量在 55% 左右;石莼属的 GC 含量均高于 60%;除浒苔外,浒苔属其他物种的 GC 含量也均高于 60%。说明 ITS 序列具有核苷酸偏好性,这一结果与 Leskinen 等^[17] 人的结论相一致。序列比对的结果显示,浒苔和格氏礁膜的 5.8S rDNA 序列长度保守的性比较强,核苷酸差异性较小,而 ITS1 和 ITS2 序列虽然在长度上相对保守,但是在 ITS 区的核苷酸序列的变异程度则非常高,这一结果与其他学者在石莼科物种中的研究结果相类似^[17-18]。这种序列高变区和保守区交替出现,为种质鉴定和遗传进化分析提供了方便^[26]。

表 1 ITS, 5 8S rRNA, ITS2 基因的碱基组成及 GC 含量

种名	T	C	A	G	G+ C (%)
<i>Ulvaes fenestrata</i>	15.8	34.4	21.4	28.3	62.8
<i>Ulvaes pertusa</i>	16.4	34.5	21.4	27.7	62.2
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	18.7	33.4	18.7	29.1	62.6
<i>Enteromorpha compressa</i>	18.4	32.1	19.8	29.7	61.8
<i>Enteromorpha linza</i>	17.0	33.5	19.5	29.9	63.5
<i>Enteromorpha prolifera</i>	20.4	30.8	20.8	28.0	58.8
<i>Ulvaes californica</i>	19.1	32.1	20.4	28.4	60.5
<i>Ulvaes rigida</i>	17.5	33.8	20.4	28.3	62.1
<i>Monostruma angicava</i>	21.2	30.9	23.0	24.9	56.0
<i>Monostruma grevillei</i>	23.7	28.2	23.3	24.9	53.0
<i>Monostruma arcticum</i>	21.4	30.3	23.2	25.1	55.4

3.2 ITS 序列及 5 8S rDNA 遗传距离和核苷酸序列间的差异分析

通过 MEGA3.1 软件分析, 计算得到种间的遗传距离(表 2)。从表中可以看出, *E. prolifera* 与礁膜属物种的遗传距离比较大, 亲缘关系较远; *E. prolifera* 和 *E. linza* 的遗传距离最小, 为 0.007, 序列趋异值也较小为 0.004, 表现出较近的亲缘关系, 这一结果与杨君等^[3]人的 RAPD 分析结果存在分歧, 他们认为缘管浒苔与浒苔属之间达到属间差异差异, 应归为石莼属。 *M. grevillei* 和 *M. angicava* 的遗传距离和序列趋异值均为 0.000, 而两者在形

态学上极其相似, 只是藻体的厚度存在差异, 这可能跟藻体的暴露程度以及生存环境有关^[27], 因此认为 *M. grevillei* 和 *M. angicava* 是同一个种。而格氏礁膜与石莼属和浒苔属的物种序列趋异值均在 0.040 左右, 亲缘关系相对较远。从表中其他物种之间的遗传距离明显可以看出, 礁膜属内物种的遗传距离和序列差异性要小于属间物种, 而浒苔属和石莼属内的物种其遗传距离非常相近, 这表明礁膜属与浒苔属和石莼属的亲缘关系较远, 浒苔属和石莼属的亲缘关系很近, 这一结果与传统分类学上浒苔属和石莼属的形态特征更接近相吻合。

表 2 核苷酸序列间的差异和 Kimura 双参数距离

种名	<i>U. fenestrata</i>	<i>U. pertusa</i>	<i>E. intestinalis</i>	<i>E. compressa</i>	<i>E. linza</i>	<i>E. prolifera</i>	<i>U. californica</i>	<i>U. rigida</i>	<i>M. angicava</i>	<i>M. grevillei</i>	<i>M. arcticum</i>
<i>U. fenestrata</i>		0.032	0.092	0.120	0.110	0.112	0.105	0.133	0.036	0.036	0.415
<i>U. pertusa</i>	0.009		0.097	0.123	0.110	0.102	0.112	0.125	0.023	0.023	0.411
<i>E. intestinalis</i>	0.015	0.016		0.105	0.097	0.095	0.102	0.125	0.060	0.060	0.457
<i>E. compressa</i>	0.017	0.018	0.016		0.139	0.136	0.136	0.174	0.069	0.069	0.459
<i>E. linza</i>	0.017	0.017	0.016	0.019		0.007	0.055	0.100	0.016	0.016	0.412
<i>E. prolifera</i>	0.017	0.016	0.015	0.019	0.004		0.058	0.097	0.008	0.008	0.404
<i>U. californica</i>	0.016	0.017	0.016	0.019	0.011	0.012		0.104	0.041	0.041	0.450

3.3 系统进化树反映的结果

从图 3 构建的系统进化树明显可以看出, 石莼目的 11 种绿藻聚集成三个大的进化支。 *U. fenestrata* 和 *U. pertusa* 先聚集成一个小分支 (BP=100%), *E. intestinalis* 和 *E. compressa* 聚集成一个分支 (BP=80%), 最后这四种绿藻形成一个大的分支, 其支持率为 70%; *E. prolifera* 和 *E. linza* 聚为一支, 其支持率为 100%, *U. californica* 与 *U. rigida* 再与之相继聚类形成另一大的分支。 *M. grevillei* 和 *M. angicava* 聚为一支并得到 Bootstap 的高度支持 (BP=100%), 再与 *M. arcticum* 聚集成一支 (BP=100%)。从整个系统进化树反映的结果来看, 同为石莼科的石莼属和浒苔属的物种先聚集到一起, 再与礁膜科礁膜属的三个物种聚类。礁膜属的三个物种形成单独的一个大的进化支, 这与传统的形态分类学相一致。但是石莼属的物种和浒苔属物种并没有按属聚类, 而是有所交叉。浒苔、

缘管浒苔并没有和肠浒苔、扁浒苔聚为一支, 而与硬石莼、加州石莼聚集形成一个大的进化支; 而穿孔石莼、孔石莼却与肠浒苔、扁浒苔又聚集形成另外一个大的分支, 这与传统形态学上的分类存在较大的分歧。这说明浒苔属和石莼属不是各自独立起源的, 其在形态学上形成的特征往往是在进化过程中经过多次独立变化的结果, 这一结果与 Tan 等^[28]人对石莼属和浒苔属的 21 个物种 rDNA 的 ITS 序列分析的结论相符。 Hayden 等^[29]人对石莼科各个属编码叶绿体 Rubisco 大亚基和 rDNA 小亚基的序列进行比较研究的结果也证实石莼属和浒苔属是相近的, 不是单一起源的种类。由于经典的形态学分类很容易受到环境因素的影响, 同一地理环境下也可能存在趋同进化的问题, 因此依赖于分子序列标记的分类方法更为客观可靠。将藻类的形态学特征和遗传学研究结合起来必将成为藻类物种分类的趋势。

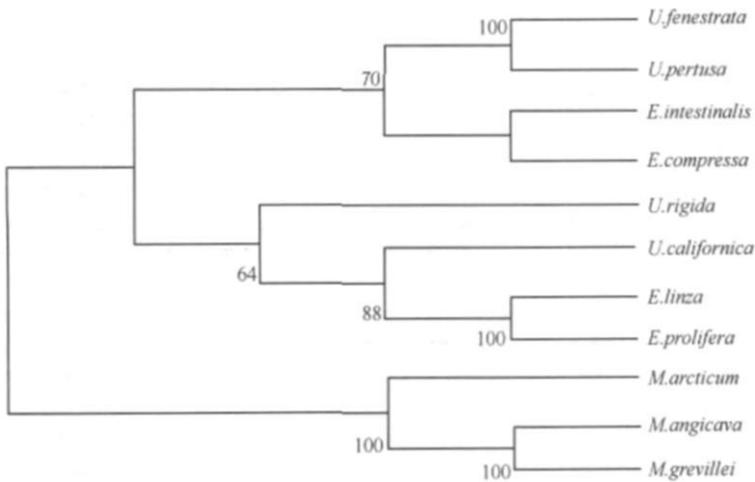


图 3 以 ITS 序列及 5.8S rDNA 构建的系统进化树

4 结论

本文对绿藻门石莼目的礁膜属、石莼属和浒苔属 11 种绿藻的 ITS 区和 5.8S rDNA 序列进行了序列分析, 遗传距离比较以及系统进化分析。序列的遗传差异性与系统进化树反映的结果显示, 浒苔属的物种与石莼属的物种表现出较近的亲缘关系, 而礁膜属的物种表现出与浒苔属、石莼属的物种较远的亲缘关系; 序列比对的结果显示, 石莼目不同种绿

藻的 ITS 区在长度上相对保守, 但在核苷酸序列上存在着明显的差异性。因此, 可以利用 ITS 区序列来确定石莼目不同种间的系统进化关系, 从而为石莼目绿藻的种质鉴定和系统进化研究提供重要的分子依据。而对浒苔属和石莼属存在争议的物种, 必须结合其他方面的证据和特征, 借助于分子生物学的多重方法进行深入的研究, 才能最终确定它们的合理的系统发育关系, 为绿藻的遗传的多样性, 种质鉴定, 育种改良提供参考。

参考文献:

- [1] HO C L, PHANG S M, PANG T. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales)[J]. *European Journal of Phycology*, 1995, 30: 273—280
- [2] HO C L, PHANG S M, PANG T. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random polymorphic DNA (RAPD) primers[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1995, 7: 33—41
- [3] 杨君, 安利佳, 王茜, 等. 石莼属(*Ulva*)和浒苔属(*Enteromorpha*)绿藻的RAPD分析[J]. *海洋与湖沼*, 2000, 31(4): 408—413
- [4] CHO Y C, PARK J W, JIN H J, et al. RAPD identification of genetic variation in Ulvales seaweed[J]. *Journal of the Korean Fisheries Society*, 1997, 30(3): 388—392
- [5] 蔡金娜, 周开亚, 徐璐珊, 等. 中国不同地区蛇床的 rDNA ITS 序列分析[J]. *药学报*, 2000, 35(1): 56—59
- [6] 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 野生参与栽培山参 rDNA 内转录间隔区(ITS)序列比较[J]. *中国中药杂志*, 2000, 25(4): 206—209
- [7] 谢潮添, 纪德华, 陈昌生, 等. 坛紫菜 5.8S rDNA 和 ITS 区片段的序列分析及应用[J]. *高技术通讯*, 2007, 17(5): 540—545
- [8] 张宝玉, 王广策, 吕颂辉, 等. 三株赤潮硅藻 5.8S rDNA 及转录间隔区(ITS)的克隆及序列分析[J]. *海洋学报*, 2006, 28(1): 111—117
- [9] ALICE L A, CAMPBELL C S. Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences[J]. *American Journal of Botany*, 1999, 86: 81—97.
- [10] STEANE D A, SCOTLAND R W, MABBERLEY D J, et al. Molecular systematic of *Clerodendrum* (Lamiaceae): ITS sequences and total evidence[J]. *American Journal of Botany*, 1999, 86(1): 98—107.
- [11] BALDWIN B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the composite[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1992, 1: 3—16
- [12] GONZALEZ I L, SYLVESTER J E, SMITH T F, et al. Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1990, 7: 203—219
- [13] 徐田军, 刘楚吾, 刘丽, 等. 基因间隔序列(ITS)在水产动物种质鉴定和遗传多样性分析中的应用[J]. *湛江海洋大学学报*, 2006, 26(1): 84—88
- [14] 唐伯平, 周开亚, 宋大祥. 核 rDNA - ITS 区在无脊椎动物分子系统学研究中的应用[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(4): 67—73
- [15] 李学营, 彭建营, 白瑞霞. 基于 rDNA 的 ITS 序列在种子植物系统发育研究中的应用[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(4): 829—834
- [16] 李玉泉, 何平, 邓洪平, 等. rDNA 片段序列分析技术及其在植物系统与进化研究中的应用[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2005, 30(1): 145—149
- [17] LESKINEN E, PAMILO P. Evolution of the ITS sequences of ribosomal DNA in *Enteromorpha* (Chlorophyceae)[J]. *Hereditas*, 1997, 126: 17—23
- [18] BLOMSTER J, MAGGS C A, STANHOPE M J, et al. Extensive intraspecific morphological variation in *Enteromorpha muscoides* (Chlorophyta) revealed by molecular analysis[J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35: 575—586
- [19] BLOMSTER J, HOEY E M, MAGGS C A, et al. Species-specific oligonucleotide probes for macroalgae: molecular discrimination of two marine fouling species of *Enteromorpha* (Ulvophyceae)[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 177—186
- [20] 汪文俊, 王飞久, 陈松林, 等. 浒苔 ITS 区的扩增和分析. *海洋水产研究*, 2008; 2(5): 124—129
- [21] 郭宝太, 毕玉平, 单雷, 等. 条斑紫菜高纯度总 DNA 及其质粒状 DNA 的提取[J]. *海洋学报*, 2000, 22(2): 87—91
- [22] 杨君, 王茜, 刘美华, 等. 一种简便的海藻 DNA 提取方法[J]. *生物技术*, 1999, 9(4): 39—42
- [23] HALL T A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/ 98/ NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95—98
- [24] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAK F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4876—4882
- [25] KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN I B, et al. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1244—1245
- [26] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. *植物分类学报*, 1999, 37(4): 407—416
- [27] 李茹光. 旅大的海生绿藻[J]. *吉林师范大学学报*, 1964, 1: 91—106
- [28] TAN I H, BLOMSTER J, HANSEN G, et al. Molecular phylogenetic evidence for a reversible morphogenetic switch controlling the gross morphology of two common genera of seaweeds, *Ulva* and *Enteromorpha*[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(8): 1011—1018
- [29] HAYDEN H S, WAALAND J R. Phylogenetic systematic of the Ulvaceae (Ulvales, Ulvophyceae) using chloroplast and nuclear DNA sequences[J]. *Journal of Phycology*, 2002, 38: 1200—1212

Sequence and phylogeny analysis of ITS region and 5. 8S rDNA of several green algae (Ulvales)

LI Yan-yan¹, ZHU Li-jing¹, SHEN Song-dong¹, WU Xu-jian¹,
ZHANG Yao-dong¹, DING Lan-ping²

(1 Department of Cell Biology, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China; 2 Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: *Enteromorpha prolifera*; *Monostroma grevillei*; ITS region; sequence analysis; phylogeny