

江蓠属和龙须菜属 5 种海藻 ITS 序列分子系统学分析*

李婷婷¹, 陈斌¹, 陈省平², 刘翠¹, 姚雪¹, 陈伟洲³, 赖学文⁴, 刘涛¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080;

3. 汕头大学, 广东 汕头 515063;

4. 汕头市水产研究所, 广东 汕头 515000)

摘要: 测定了江蓠属 *Gracilaria* 和龙须菜属 *Gracilariopsis* 5 个物种的 23 个群体的 ITS (含 5.8S rDNA) 序列, 并结合 GenBank 数据库中现有江蓠科 Gracilariaceae 的 16 个物种的 ITS 序列进行分析, 在不同分类阶元中探讨了序列变异和系统进化关系。江蓠科海藻 ITS 序列长度在 893 ~ 1 508 bp 之间, 种间遗传距离在 0.041 ~ 0.600 之间, 种内遗传距离在 0.000 ~ 0.012 之间, 其种间遗传距离均大于种内遗传距离; ITS 系统发育聚类结果显示江蓠科分为两大分支, 分别是江蓠属/*Hydropuntia* 分支、龙须菜属/蓠生藻属 *Gracilariophila* 分支; 江蓠科海藻 5.8S 序列种内种间变异很小, 但存在稳定的属间区分位点, 可用于属以上水平的分类鉴定; 中国、美国和俄罗斯三地的真江蓠群体的 ITS 序列存在 9 个稳定的变异位点, 可以将不同地理群体区分开。

关键词: 江蓠科; 江蓠属; 龙须菜属; ITS; 5.8S rDNA; 系统发育

中图分类号: Q949; Q349 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2012) 04 - 0097 - 09

Phylogeny of Five *Gracilaria* and *Gracilariopsis* Species (Gracilariaceae, Rhodophyta) Based on ITS Sequence Analysis

LI Tingting¹, CHEN Bin¹, CHEN Shengping², YAO Xue¹, LIU Cui¹,
CHEN Weizhou³, LAI Xuewen⁴, LIU Tao¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

3. Shantou University, Shantou 515063, China;

4. Shantou Fisheries Research Institute, Shantou 515000, China)

Abstract: To analyze genetic diversity and phylogeny of Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta). We compared ITS (including 5.8S rDNA) sequences of twenty three populations of five *Gracilaria* and *Gracilariopsis* species (Gracilariaceae, Rhodophyta), with the ITS sequences of 16 Gracilariaceae species downloaded from GenBank database. The result showed that the length of ITS sequences of Gracilariaceae varies from 893 to 1 508 bp. The interspecific genetic distance ranges from 0.041 to 0.600; the intraspecific genetic distance ranges from 0.000 to 0.012, the former is much higher than the latter. Two main lineages of Gracilariaceae were from: *Gracilaria* \ *Hydropuntia* and *Gracilariopsis*/*Gracilariophila*. 5.8S sequences of Gracilariaceae has low variation among species and among populations, but the distinct sites were found among the genera and can be used on genus level or above. There are 9 mutant sites that can be used to distinguish the populations of *G. vermiculophylla* from China, Russia and USA.

Key words: Gracilariaceae; *Gracilaria*; *Gracilariopsis*; ITS; 5.8S rDNA; phylogenetic

* 收稿日期: 2011 - 11 - 07

基金项目: 国家科技基础性工作专项资助项目 (2007FY210500); 广东省科技攻关资助项目 (2006B20201056, 2010B060200010, 2010B020201015)

作者简介: 李婷婷 (1989 年生), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 刘涛; E-mail: liutao@ouc.edu.cn

江蓼科 Gracilariaceae 在自然分类系统上属于红藻门 Rhodophyta 江蓼目 Gracilariales, 包括江蓼属 *Gracilaria*、龙须菜属 *Gracilariopsis*、蓼生藻属 *Gracilariophila*、*Hydropuntia*、*Curdiea*、*Melanthalia* 和 *Congracilaria* 7 个属。在红藻门中, 江蓼科无论是解剖学层面^[1-3]还是分子学层面^[4-6], 都是很明确的一个科, 但是因缺乏足够多的形态学和生殖结构特征, 其属间种间存在着复杂的分类关系^[7-10]。在过去的 20 年里, 分子生物学技术不断的应用到江蓼科分类研究中, 揭示江蓼科种水平上的系统发生关系。目前江蓼科分子系统学研究多采用 18S rDNA^[10-11]、Rubisco spacer^[11-13]、ITS (internal transcribed spacer)^[10,12,14]、*rbcL*^[15-18]、*cox2* - 3^[13,19] 和 *psbA*^[16] 等序列。

ITS 序列包括 ITS1 和 ITS2, 是分别介于 18S 与 5.8S、5.8S 与 28S rDNA 之间的非编码序列, 呈

ITS1 - 5.8S - ITS2 结构 (本文将 ITS1 - 5.8S - ITS2 简称为 ITS)。此结构中 5.8S 是高度保守的基因序列, 而 ITS1 和 ITS2 是进化速度较快的序列, 利用 ITS 序列可以从不同分类水平上探讨系统进化关系。本文通过对来自江蓼属和龙须菜属总 5 个物种 23 个种群的 ITS 序列进行扩增, 并与 GenBank 中江蓼科海藻 ITS 序列进行比对分析, 从分子水平上阐明江蓼科海藻系统发育和种群水平的遗传变异, 为江蓼科海藻的分类和鉴定提供更多数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用江蓼科海藻 5 个物种 23 个群体由中国海洋大学大型海藻种质库提供 (见表 1)。每个群体选取 2~3 株个体进行实验, 总 66 株实验材料。

表 1 实验材料信息¹⁾

Table 1 Samples used in the ITS sequencing and their information

| 材料编号 | 物种 | 采样时间 | 采样地点 | GenBank 获取号 |
|------------|--|---------|-----------------------------|---------------------|
| 201003031 | 芋根江蓼 <i>G. blodgettii</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) ²⁾ | JN935112 - JN935114 |
| 201005013 | 芋根江蓼 <i>G. blodgettii</i> | 2010-05 | 中国广东汕头 (养殖群体) ²⁾ | JN935109 - JN935111 |
| 201003032 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935071 - JN935073 |
| 201003033 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935080 - JN935082 |
| 201003034 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935074 - JN935076 |
| 201003036 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935083 - JN935085 |
| 201003076 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935086 - JN935088 |
| 201003176 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-03 | 中国福建连江 (养殖群体) | JN935077 - JN935079 |
| 201004021 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-04 | 中国福建连江 (养殖群体) | JN935068 - JN935070 |
| 201009001 | 龙须菜 <i>Gp. lemaneiformis</i> | 2010-09 | 中国山东威海 (养殖群体) | JN935065 - JN935067 |
| 201003035 | 脆江蓼 <i>G. chouae</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935062 - JN935064 |
| 201003175 | 脆江蓼 <i>G. chouae</i> | 2010-03 | 中国福建连江 (养殖群体) | JN935059 - JN935061 |
| 201005004 | 真江蓼 <i>G. vermiculophylla</i> | 2010-05 | 中国山东青岛 (野生群体) | JN935115, JN935116 |
| 201006105 | 真江蓼 <i>G. vermiculophylla</i> | 2010-06 | 中国山东青岛 (野生群体) | JN935117 - JN935119 |
| 201003088 | 真江蓼 <i>G. vermiculophylla</i> | 2010-03 | 中国海洋大学 (养殖群体) ³⁾ | JN935089 - JN935091 |
| 201003089 | 真江蓼 <i>G. vermiculophylla</i> | 2010-03 | 中国广东汕头 (养殖群体) ⁴⁾ | JN935123, JN935124 |
| 201007588 | 真江蓼 <i>G. vermiculophylla</i> | 2010-07 | 中国山东威海 (野生群体) | JN935120 - JN935122 |
| 201004170 | 细基江蓼繁枝变种 <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 2010-04 | 中国海南 (养殖群体) | JN935100 - JN935102 |
| 201004169 | 细基江蓼繁枝变种 <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 2010-04 | 中国福建 (养殖群体) | JN935097 - JN935099 |
| 201004183 | 细基江蓼繁枝变种 <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 2010-04 | 中国福建 (养殖群体) | JN935103 - JN935105 |
| 201004207 | 细基江蓼繁枝变种 <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 2010-04 | 中国福建 (养殖群体) | JN935106 - JN935108 |
| 201006104 | 细基江蓼繁枝变种 <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 2010-06 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935092 - JN935094 |
| 2010081295 | 细基江蓼繁枝变种 <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 2010-08 | 中国广东汕头 (养殖群体) | JN935095, JN935096 |

1) *G.*: *Gracilaria* 江蓼属; *Gp.*: *Gracilariopsis* 龙须菜属; 2) *G. blodgettii* 原产地为印度尼西亚; 3) *G. vermiculophylla* 原产地为俄罗斯; 4) *G. vermiculophylla* 原产地为美国, 由中国海洋大学官庆礼教授提供

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取 总 DNA 提取采用改进的 CTAB 法^[20]。所提取 DNA 用 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 使用 NanoDrop ND-1000 仪器, 测定 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 比值, 对 DNA 浓度和纯度进行质量评价, 并将 DNA 模板浓度统一调整到 50 ng/ μL 。

1.2.2 PCR 扩增 用于 ITS 序列扩增的引物为 TW81: 5' - GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC - 3'; AB28: 5' - GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT - 3'^[21], 引物由上海博尚生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μL , 反应体系: ddH₂O 16.8 μL , 10 × Buffer 2.5 μL , MgCl₂ (25 mmol/L) 2.3 μL , dNTP 2.0 μL , 正反引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.1 μL , DNA 模板 (50 ng/ μL) 1.0 μL , Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL 。PCR 扩增程序: 94 °C 预处理 6 min 后, 94 °C 变性 1 min, 51 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 总 35 个循环, 最后在 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.2.3 PCR 产物纯化、克隆及测序 PCR 产物用 TIANGel Midi Purification Kit 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 胶回收纯化后与 pMD19-T 载体 (TaKaRa 宝生物工程有限公司) 连接后转化至感受态 *E. coli* TOP 10 (北京天根生化科技有限公司) 中, 经氨苄青霉素抗性筛选, 每份 PCR 产物挑取 3 个阳性克隆进行扩大培养, 菌液 PCR 扩增并利用 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小, 委托上海英骏生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.4 数据分析 利用 SeqMan 7.1.0 软件对测序数据进行拼接和质量矫正, 并与 GenBank 中下载到的江蓼科 16 个物种的 19 条 ITS 全长序列进行对比分析, 选择长心卡帕藻 *Kappaphycus alvarezii* (GQ869849) 作为外群 (GenBank 获取号以及详细信息见表 1 和表 2)。用 MEGA 4.0 计算其碱基含量和变异位点, 并选择 Kimura 2-parameter 和 Complete Deletion 计算遗传距离。选择不同物种和不同地理种群的序列用 ClustalX 1.83 软件进行序列比对, 用 PAUP 4.0 软件在 Modeltest 3.7 中计算不同核酸替代模型的似然值并筛选出最适核酸替换模型, 最终按 Akaike Information Criterion (AIC) 结

果得到的最适核酸替换模型为 GTR + I + G (参数: Base frequencies: A = 0.268 6, C = 0.170 8, G = 0.237 2, T = 0.323 4; substitution rate matrix: A - C = 1.19 8, A - G = 2.385 8, A - T = 1.334 1, C - G = 1.143 2, C - T = 2.868 0, G - T = 1.000 0; proportion of invariable sites = 0.093 0, gamma parameter = 2.510 4), 利用以上数据在 PAUP4.0 中依据邻接法 (Neighbor joining, NJ) 和最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统树, 自举值 Bootstrap 为 1 000 次重复。依据最大简约法 (Maximum parsimony, MP) 构建系统树时在 PAUP 4.0 中采用启发式搜索 (Heuristic search) 的逐步加入式算法 (Stepwise addition) 分支交换法 (Branch swapping algorithm) 设定为树二等分再连接算法 (Tree bisection reconnection, TBR), 每轮搜索最大尝试次数为 1 000 次, 每步保留 20 个树, 自举值 Bootstrap 为 1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列长度和 GC 含量分析

ITS 序列长度和 GC 含量分析结果见表 2。江蓼科海藻 ITS 存在较为丰富的长度变异, 长度在 893 ~ 1 508 bp 之间, 其中龙须菜属龙须菜 *Gp. lemaneiformis* 和 *Gp. tenuifrons* 的 ITS 序列长度较其他物种短, 分别为 1 065 (1 066) bp 和 893 bp; 江蓼科海藻 ITS1 序列长度在 121 ~ 568 bp 之间, ITS2 序列长度在 585 ~ 984 bp 之间, 同一物种的 ITS2 序列明显长于 ITS1 序列, 且其 GC 含量明显高于 ITS1 序列。

相比 ITS1 和 ITS2 序列, 江蓼科海藻的 5.8S 序列长度较为稳定, 除无管篱生藻 *Gp. oryzoides*、细基江蓼 *G. tenuistipitata* 和智利江蓼 *G. chliensis* 3 个物种外, 其他物种 5.8S 序列长度均为 159 bp; 5.8S 序列 GC 含量也明显高于 ITS1 和 ITS2 序列的 GC 含量。细基江蓼 *G. tenuistipitata* 5.8S 序列为 139 bp, 在 60 bp 位点后缺失 19 个碱基, 在 114 bp 处缺失一个碱基; 智利江蓼 *G. chliensis* 5.8S 序列为 140 bp, 在 60 bp 位点后缺失 19 个碱基; 蓼生藻属无管篱生藻 *Gp. oryzoides* 的 5.8S 序列长 162 bp, 在 102 位点之后增加了 3 个 T 碱基 (见图 1)。

表 2 江蓼科物种 ITS 序列长度及碱基组成¹⁾
Table 2 Length and GC contents of ITS sequences of Gracilariaceae species

| 种名 | ITS1 | | 5.8S | | ITS2 | | 总长/bp | 平均 GC 含量/% | GenBank 获取号 | 来源 |
|---|-----------|------------|---------|------------|-----------|------------|---------------|------------|--------------------|---------------------------|
| | 碱基数 /bp | 平均 GC 含量/% | 碱基数 /bp | 平均 GC 含量/% | 碱基数 /bp | 平均 GC 含量/% | | | | |
| <i>G. blodgettii</i> | 372 ~ 373 | 35.7 | 159 | 49.1 | 972 ~ 976 | 39.1 | 1 504 ~ 1 508 | 39.3 | 见表 1 | This work |
| <i>G. vermiculophylla</i> | 524 ~ 527 | 33.8 | 159 | 49.1 | 742 ~ 745 | 37.1 | 1 425 ~ 1 430 | 37.2 | 见表 1 | This work |
| <i>G. chouae</i> | 369 | 38.7 | 159 | 49.1 | 601 | 41.1 | 1129 | 41.5 | 见表 1 | This work |
| <i>G. tenuistipitata</i> var. <i>liui</i> | 567 ~ 568 | 35.7 | 159 | 49.1 | 578 ~ 580 | 36.7 | 1 307 ~ 1 305 | 37.8 | 见表 1 | This work |
| <i>G. tenuistipitata</i> | 568 | 35.9 | 139 | 48.9 | 578 | 36.8 | 1 285 | 37.8 | GTU21343 | Goff et al. [22] |
| <i>G. chilensis</i> | 361 | 36.0 | 140 | 50.0 | 593 | 36.3 | 1 094 | 37.8 | AF034265 | Goff et al. [22] |
| <i>G. verrucosa</i> | 156 | 33.3 | 159 | 49.1 | 778 | 40.6 | 1 092 | 40.7 | U21342 | Goff et al. [22] |
| <i>G. domingensis</i> | 344 | 39.8 | 159 | 49.1 | 705 | 43.6 | 1 208 | 43.2 | AF468913, AF472420 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. aff. lacinulata</i> | 346 | 42.0 | 159 | 49.1 | 585 | 41.7 | 1 090 | 42.9 | AF472419 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. aff. mammillaris</i> | 319 | 38.2 | 159 | 49.1 | 661 | 41.2 | 1 139 | 41.5 | AF468916 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. aff. tepocensis</i> | 350 ~ 352 | 37.7 | 159 | 49.1 | 678 | 43.0 | 1 187 ~ 1 189 | 42.3 | AF472417, AF472418 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. cervicornis</i> | 440 | 39.0 | 159 | 49.1 | 761 | 42.2 | 1 360 | 42.0 | AF468917 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. foliifera</i> var | 360 | 43.1 | 159 | 49.1 | 649 | 42.6 | 1 168 | 43.6 | AF468912 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. tikvahiae</i> | 351 | 38.8 | 159 | 49.1 | 624 | 42.4 | 1 134 | 42.2 | AF468911 | Bellorin et al. [10] |
| <i>G. pacifica</i> | 327 | 44.3 | 159 | 49.1 | 745 | 42.8 | 1 230 | 44.0 | U21341 | Goff et al. [22] |
| <i>Gp. lemaneiformis</i> | 250 | 36.0 | 159 | 49.1 | 666 ~ 667 | 44.1 | 1 065 ~ 1 066 | 42.9 | 见表 1, EU561239 | This work, Li et al. [23] |
| <i>Gp. tenuifrons</i> | 121 | 31.4 | 159 | 48.4 | 614 | 46.9 | 893 | 45.1 | GTU21246 | Goff et al. [22] |
| <i>H. caudata</i> | 346 ~ 351 | 36.9 | 159 | 49.7 | 729 ~ 736 | 41.5 | 1 239 ~ 1 241 | 41.3 | AF468910, AF468909 | Bellorin et al. [10] |
| <i>H. crassissima</i> | 328 | 37.8 | 159 | 49.7 | 727 | 42.8 | 1 214 | 42.3 | AF468907 | Bellorin et al. [10] |
| <i>Gp. oryzoides</i> | 109 | 33.1 | 162 | 48.1 | 463 | 46.4 | 734 | 44.8 | U33139 | Goff et al. [22] |

1) *Gl.* : *Gracilariophila* 藨生藻属; *H.* : *Hydropuntia*

2.2 ITS 序列比对分析

对所有江蓼科的 ITS 序列用 MEGA 4.0 进行比对, 比对后序列长度为 1 781 bp (including gaps), 计算遗传距离结果显示, 江蓼科各属内的种间遗传距离明显大于种内遗传距离 (见表 3)。江蓼属各物种的种内遗传距离在 0.000 ~ 0.012 之间, 存在 0 ~ 36 个变异位点; 细基江蓼繁枝变种和细基江蓼 *G. tenuistipitata* 种间遗传距离为 0.004, 存在 25 个变异位点, 包括了 14 个种间区分位点; 江蓼属其他物种的种间遗传距离在 0.041 ~ 0.411 之间, 存在 111 ~ 611 个变异位点。龙须菜属的种内遗传距离为 0.000, 龙须菜和 *Gp. tenuifrons* 种间遗传距离为 0.382。*Hydropuntia* 中 *H. caudata* 种内遗传距离为 0.009, 存在 14 个变异位点; *H. caudata* 和 *H. crassissima* 种间遗传距离为 0.128, 存在 252 个变

异位点。江蓼属与龙须菜属物种间的遗传距离在 0.401 ~ 0.554 之间。江蓼属与 *Hydropuntia* 物种间的遗传距离在 0.193 ~ 0.409 之间。江蓼属与藨生藻属物种间的遗传距离在 0.527 ~ 0.600 之间。龙须菜属与 *Hydropuntia* 物种间的遗传距离在 0.382 ~ 0.535 之间。龙须菜属与藨生藻属物种间的遗传距离在 0.267 ~ 0.406 之间。*Hydropuntia* 与藨生藻属物种间的遗传距离在 0.533 ~ 0.578 之间。

在本文研究的江蓼属和龙须菜属 5 个物种的 23 个群体中, 龙须菜 8 个群体 24 株个体的平均遗传距离为 0.000, 存在 2 个变异位点; 芋根江蓼 2 个群体 6 株个体的平均遗传距离为 0.003, 存在 12 个变异位点; 脆江蓼 2 个群体 6 株个体的平均遗传距离为 0.000, 存在 1 个变异位点; 细基江蓼繁枝变种 6 个群体 17 株个体的平均遗传距离为 0.004,

| | | |
|---|--|-------|
| | ACAACCTCGTA ACGGTGGATG TCTCGGCTCC TACATCGATG | |
| | AAGAACGTAG CAAACTGCGA AACGTAATGC GAATTGCAGA A | [81] |
| <i>G. blodgettii</i> | | [81] |
| <i>G. vermiculophylla</i> | | [81] |
| <i>G. chouae</i> | | [81] |
| <i>G. tenuistipitata</i> vat. <i>liui</i> | | [81] |
| <i>G. verrucosa</i> | | [81] |
| <i>G. domingensis</i> | | [81] |
| <i>G. aff. lacinulata</i> | | [81] |
| <i>G. aff. mammillaris</i> | | [81] |
| <i>G. aff. tepocensis</i> | | [81] |
| <i>G. cervicornis</i> | | [81] |
| <i>G. foliifera</i> var | | [81] |
| <i>G. tikvahiae</i> | | [81] |
| <i>G. pacifica</i> | | [81] |
| <i>G. tenuistipitata</i> | | [81] |
| <i>G. chilensis</i> | | [81] |
| <i>H. caudata</i> | | [81] |
| <i>H. crassissima</i> | | [81] |
| <i>Gp. lemaneiformis</i> | T T T | [81] |
| <i>Gp. tenuifrons</i> | T T T C T | [81] |
| <i>Gp. oryzoides</i> | C T C T CG TAT T | [81] |
| | CTCGTGAATC ATCAAATTTT T--GAACGC AAGTGGCGCT | |
| | CGCGGGTAAC CCTGCGAGCA TGTCTGTTG AGTGTCCGTA C | [162] |
| <i>G. blodgettii</i> | | [162] |
| <i>G. vermiculophylla</i> | --- | [162] |
| <i>G. chouae</i> | --- | [162] |
| <i>G. tenuistipitata</i> vat. <i>liui</i> | --- | [162] |
| <i>G. verrucosa</i> | --- | [162] |
| <i>G. domingensis</i> | --- | [162] |
| <i>G. aff. lacinulata</i> | --- | [162] |
| <i>G. aff. mammillaris</i> | --- | [162] |
| <i>G. aff. tepocensis</i> | --- | [162] |
| <i>G. cervicornis</i> | --- | [162] |
| <i>G. foliifera</i> var | --- | [162] |
| <i>G. tikvahiae</i> | --- | [162] |
| <i>G. pacifica</i> | --- CAG | [162] |
| <i>G. tenuistipitata</i> | --- T | [162] |
| <i>G. chilensis</i> | --- C | [162] |
| <i>H. caudata</i> | --- C | [162] |
| <i>H. crassissima</i> | --- C | [162] |
| <i>Gp. lemaneiformis</i> | C --- T T C C | [162] |
| <i>Gp. tenuifrons</i> | TG --- T C . T . CG | [162] |
| <i>Gp. oryzoides</i> | TG TTT T T C . T G | [162] |

图 1 江蓼科海藻 5.8S 核苷酸序列比对

Fig. 1 The alignment of 5.8S among Gracilariaceae species

存在 16 个变异位点；上述物种不存在群体区分位点。真江蓼 5 个群体 13 株个体的平均遗传距离为 0.002，13 个变异位点，且中国、俄罗斯和美国三地的种群间存在 9 个稳定有效的信息位点，可区分三地的群体（见图 2），但在中国两野生真江蓼群体间存在 6 个变异位点，均为个体的随机变异，并无稳定有效的信息位点。

单独对江蓼科海藻的 5.8S 序列进行分析，比对后序列长度为 162 bp（including gaps），存在 36 个变异位点，其中包括了 14 个信息位点，序列比对结果见图 1。江蓼属与龙须菜属物种间的遗传距离在 0.046~0.084 之间，存在 7~11 个变异位点，其中 4 个位点可进行属的鉴别。江蓼属与 *Hydropuntia* 物种间的遗传距离在 0.006~0.026 之间，

存在 1~4 个变异位点，其中有 1 个位点可进行属的鉴别。江蓼属与藻生藻属物种间的遗传距离在 0.099~0.116 之间，存在 13~17 个变异位点，其中 12 个位点可进行属的鉴别。龙须菜属与 *Hydropuntia* 物种间的遗传距离在 0.052~0.080 之间，存在 8~12 个变异位点，其中 5 个位点可进行属的鉴别。龙须菜属与藻生藻属物种间的遗传距离为 0.073~0.101，存在 11~15 变异位点，其中 7 个位点可进行属的鉴别。*Hydropuntia* 与藻生藻属物种间的遗传距离为 0.123，存在 18 个变异位点，均可进行属的鉴别。在江蓼属中，除细基江蓼 *G. tenuistipitata*、智利江蓼 *G. chilensis* 和 *G. pacifica* 外，其他物种的 5.8S 序列完全一致；细基江蓼 *G. tenuistipitata* 和智利江蓼 *G. chilensis* 除碱基缺失外，

两者与其他江蓼属物种都存在一个位点的变异; *G. pacifica* 与细基江蓼 *G. tenuistipitata*、智利江蓼 *G. chilensis* 的遗传距离均为 0.029, 与其他江蓼属物种间的遗传距离均为 0.019, 存在 3 个变异位点。龙须菜属的龙须菜种内遗传距离为 0.000, 与

Gp. tenuifrons 物种间的遗传距离为 0.060, 存在 10 个变异位点。*Hydropuntia* 中 *H. caudata* 和 *H. crassissima* 两物种 5.8S 序列完全一致。所有江蓼科物种的 5.8S 序列种内遗传距离都为 0.000。

| | | | | |
|---------|---|--------|---|--------|
| QingDao | TTCACAAAAA ACAGCCTAAC GCAACATGGT TTCTTAGGTT | [40] | AATAAAACAG AACCGCCATA GCACGGCTTG TTTCATATCA | [440] |
| WeiHai | | [40] | | [440] |
| Russia | | [40] |G..... | [440] |
| USA |T..... | [40] |G..... | [440] |
| | | | | |
| QingDao | ATCGTTCAT CGTCGAGATA ATTGCTGGAG AGCTAAGAAG | [1240] | TAGGAGTGAT GACCATAAAA ACAATGCTTT TT-GTTTTGT | [1280] |
| WeiHai | | [1240] |-..... | [1280] |
| Russia |G..... | [1240] |T..... | [1280] |
| USA | | [1240] |T..... | [1280] |
| | | | | |
| QingDao | TTTTGGGCG TTTATTGCT TCTT-GTGC CGACATCCAT | [1320] | TGTGCGAAAC CAACCCAAAA ACTTAAGATA TTTT | [1435] |
| WeiHai |-..... | [1320] | | [1435] |
| Russia |G.....T..... | [1320] |G·T.....G· | [1435] |
| USA |G.....-..... | [1320] | | [1435] |

图 2 真江蓼不同地理群体间 ITS 序列稳定有效信息位点

Fig. 2 The information sites of ITS sequences among the geographical populations of *G. vermiculophylla*

表 3 江蓼科海藻的种间遗传距离¹⁾

Table 3 Genetic distance among Gracilariaceae species

| No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 1 | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.250 | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.366 | 0.333 | - | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.367 | 0.367 | 0.364 | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.374 | 0.372 | 0.371 | 0.004 | - | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.386 | 0.386 | 0.343 | 0.064 | 0.066 | - | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0.053 | 0.226 | 0.357 | 0.352 | 0.359 | 0.371 | - | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0.115 | 0.244 | 0.352 | 0.363 | 0.367 | 0.361 | 0.102 | - | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0.115 | 0.213 | 0.362 | 0.348 | 0.354 | 0.347 | 0.098 | 0.142 | - | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0.063 | 0.222 | 0.339 | 0.343 | 0.349 | 0.352 | 0.041 | 0.102 | 0.095 | - | | | | | | | | | | |
| 11 | 0.088 | 0.227 | 0.334 | 0.344 | 0.349 | 0.357 | 0.072 | 0.066 | 0.112 | 0.060 | - | | | | | | | | | |
| 12 | 0.145 | 0.230 | 0.361 | 0.375 | 0.381 | 0.368 | 0.139 | 0.169 | 0.091 | 0.144 | 0.125 | - | | | | | | | | |
| 13 | 0.189 | 0.258 | 0.381 | 0.405 | 0.411 | 0.409 | 0.189 | 0.192 | 0.185 | 0.189 | 0.174 | 0.189 | - | | | | | | | |
| 14 | 0.170 | 0.258 | 0.410 | 0.383 | 0.389 | 0.385 | 0.170 | 0.177 | 0.188 | 0.188 | 0.200 | 0.219 | 0.215 | - | | | | | | |
| 15 | 0.200 | 0.273 | 0.401 | 0.333 | 0.339 | 0.334 | 0.207 | 0.181 | 0.196 | 0.196 | 0.211 | 0.184 | 0.188 | 0.115 | - | | | | | |
| 16 | 0.246 | 0.193 | 0.359 | 0.358 | 0.361 | 0.380 | 0.242 | 0.258 | 0.214 | 0.214 | 0.233 | 0.241 | 0.266 | 0.253 | 0.250 | - | | | | |
| 17 | 0.281 | 0.226 | 0.377 | 0.393 | 0.400 | 0.409 | 0.265 | 0.294 | 0.252 | 0.252 | 0.256 | 0.277 | 0.311 | 0.294 | 0.299 | 0.128 | - | | | |
| 18 | 0.472 | 0.468 | 0.401 | 0.488 | 0.494 | 0.471 | 0.467 | 0.450 | 0.434 | 0.434 | 0.435 | 0.466 | 0.450 | 0.504 | 0.440 | 0.472 | 0.506 | - | | |
| 19 | 0.488 | 0.554 | 0.516 | 0.498 | 0.504 | 0.521 | 0.513 | 0.534 | 0.500 | 0.500 | 0.494 | 0.529 | 0.515 | 0.471 | 0.487 | 0.514 | 0.535 | 0.382 | - | |
| 20 | 0.546 | 0.553 | 0.536 | 0.593 | 0.600 | 0.568 | 0.554 | 0.570 | 0.545 | 0.545 | 0.546 | 0.565 | 0.556 | 0.526 | 0.527 | 0.533 | 0.578 | 0.406 | 0.267 | - |

1) 1: *G. chouae*; 2: *G. blodgettii*; 3: *G. vermiculophylla*; 4: *G. tenuistipitata* var. *liui*; 5: *G. tenuistipitata*; 6: *G. chilensis*; 7: *G. aff. Lacinulata*; 8: *G. aff. Tepocensis*; 9: *G. aff. Mammillaris*; 10: *G. foliifera* var; 11: *G. tikvahiae*; 12: *G. domingensis*; 13: *G. cervicornis*; 14: *G. pacifica*; 15: *G. verrucosa*; 16: *H. crassissima*; 17: *H. caudate*; 18: *Gp. Lemaneiformis*; 19: *Gp. Tenuifrons*; 20: *Gl. oryzoides*

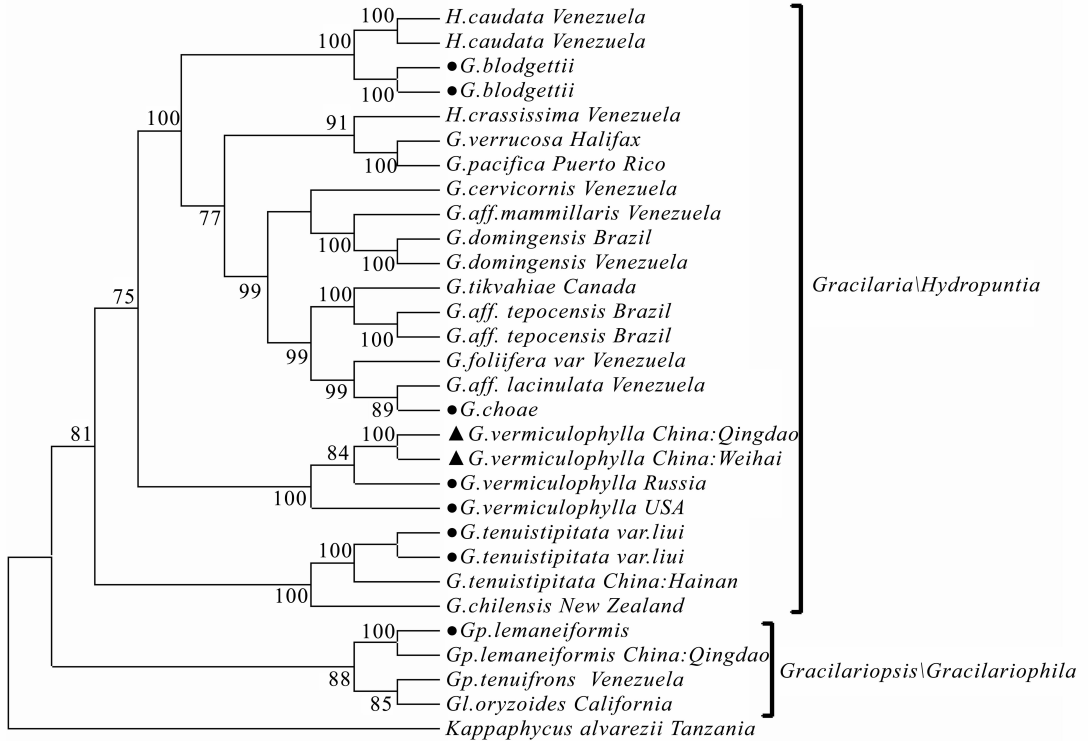


图 3 江蓼科海藻 ITS 序列系统进化树 (MP)

Fig. 3 Phylogenetic tree of Gracilariaceae based on ITS sequences by MP method

(●: 养殖种群; ▲: 野生种群)

2.3 ITS 系统树构建

根据江蓼科物种 ITS 序列用 NJ、MP 和 ML 法构建系统树, 3 种方法聚类结果一致, 仅列出 MP 法构建的系统树 (见图 3)。比对后总 1772 位点矩阵, 302 个稳定位点, 91 个变异位点但无信息的位点, 1 379 个信息位点, 启发式搜寻后最终获得 1 个最优简约树, 步长为 5 435, 一致性指数 (CI) 和严格性指数 (RI) 分别是 0.586 和 0.765。从系统树结构中可以看出, 20 种江蓼科海藻可基本分为 2 大分支, 包括龙须菜属/鳶生藻属分支, 江蓼属/*Hydropuntia* 分支。其中龙须菜属和鳶生藻属处在系统树的最基部, 说明其分化时间可能早于江蓼属/*Hydropuntia*。江蓼属/*Hydropuntia* 形成了 3 个小的分支, 分别是细基江蓼繁枝变种 *G. tenuistipitata* var. *liui* 分支、真江蓼 *G. vermiculophylla* 分支、脆江蓼 *G. chouae* 与芋根江蓼 *G. blodgettii* 分支; 青岛与威海的野生真江蓼关系最近, 其次是俄罗斯和美国的养殖真江蓼, 支持率分别为 100、84 和 100。

3 讨论

江蓼科 4 个属 20 个物种 ITS 长度差异较大, 遗传距离和系统聚类分析结果显示, 不同种、属之

间存在较为广泛的变异。Yamamoto 等^[24] 根据精子囊窠的发生位置将江蓼属分为江蓼属、*Hydropuntia* 和龙须菜属。但在本研究中用 ITS 序列构建系统树, 结果显示 *Hydropuntia* 物种聚类到江蓼属内, 并未形成单独的分支, 不存在明显的属间遗传分化, 但与龙须菜属/鳶生藻属分别聚在两大分支上, 存在明显的属间遗传分化。这与之前报道的 SSU rDNA、Rubisco spacer 和 *rbcL* 序列系统聚类的结果是一致的^[10,12,15]。在江蓼属系统分类中, 江蓼属和 *Hydropuntia* 海藻精子囊窠包括了“V”型、“T”型和“P”型 3 种类型, 而龙须菜属精子囊窠则属于“C 型”^[25], 在系统树中可以将其分为两组; 但江蓼属和 *Hydropuntia* 海藻并未按其精子囊窠排列方式的类型而形成单独的分支, 也没有形成与地域分布相关的分支, 这可能与这两个属存在着并系起源关系有关。鳶生藻属寄生于江蓼属、*Hydropuntia* 和龙须菜属海藻, 其藻体内部构造和生殖结构同于江蓼属、*Hydropuntia* 和龙须菜属^[26]; 鳶生藻属海藻是从最初的宿主藻体进化而来^[27], 在寄生过程中可从宿主获取叶绿体, 而保留自身的核基因组和线粒体基因组^[28], Bellorin 等^[10] 认为鳶生藻属与龙须菜属海藻属于并系起源, 至少有一个鳶生藻属

物种是由龙须菜属演化而来;本研究也显示了同样的结果。但是藓生藻属海藻寄生过程中是否会与宿主发生遗传物质的水平转移,以及在不同寄主中是否多次发生遗传物质的水平转移还有待证实。

ITS 序列无论是在序列长度还是变异程度上都能很好地区分和鉴定江蓠科物种。细基江蓠和细基江蓠繁枝变种的形态学主要差异是前者分枝 1~2 次,后者具有更多纤细的分枝;尽管细基江蓠和细基江蓠繁枝变种的 ITS 序列遗传距离低于江蓠科全部海藻的种间差异,属于种内差异水平,但其存在着 25 个变异位点,包括了 14 个种间区分位点,同时细基江蓠 5.8S 序列较江蓠属海藻缺失 20 个碱基,显示出独特的序列结构,这可能意味着细基江蓠与细基江蓠繁枝变种之间的分类地位还需要进一步的研究确认。

江蓠科海藻 5.8S 序列长度相对 ITS1 和 ITS2 保守,且种内和种间变异很小,存在着特定的稳定属间区分位点,且对于具有并系关系的属(江蓠属/*Hydropuntia* 和龙须菜属/藓生藻属)也具有稳定的区分位点,因此利用这些位点可以进行江蓠科属水平上的分类鉴定。同样已报道的江蓠科 18S rDNA 序列,也存在这特定的属间区分位点,能够很好地区分属^[12]。

本研究显示,龙须菜、脆江蓠和真江蓠(美国和俄罗斯)的养殖群体的群体间和群体内变异相比野生群体遗传变异较小,江蓠科海藻养殖主要通过无性繁殖进行,不发生有性生殖过程的杂交以及无性繁殖的遗传重组,这种养殖群体变异水平降低的情况可能是由于养殖筛选的影响;但在细基江蓠繁殖变种的养殖群体存在相对较高的遗传变异,这可能是由于其自然分布和养殖主要集中在亚热带和热带海域,生长速率和养殖继代频率高,导致其群体 ITS 序列变异幅度高于其他江蓠种群。在来自中国、俄罗斯和美国三地的真江蓠群体中,存在着 9 个与地理分布相关的信息位点,可以进行群体的有效区分。这与在真江蓠、提克江蓠 *G. tikvahiae*、绳江蓠 *Gp. chorda*、张氏江蓠 *G. changii* 的 *cox1* 和 *rbcL* 基因序列存在的与地理位置相关的单倍型是一致的^[29-32]。但在青岛和威海的真江蓠野生群体间并不存在种群间的稳定区分位点,因此,信息位点在地理群体识别的方面应用需要考虑到群体数量以及地理距离的因素。

4 前景展望

随着分子生物学的不断深入发展,核酸数

据的不断积累,利用单个或多个 DNA 序列并结合物种形态学研究物种分类与系统进化,逐渐成为现代生物学的有力工具。目前, DNA 序列分析在藻类分类鉴定中得到了广泛的应用,对阐明系统进化关系提供了重要的证据。但从分子系统学研究手段本身而言,也存在很多需要进一步研究和探讨的问题。不同类群同一 DNA 序列的进化速率有所差异,同一类群中不同 DNA 序列的进化速率也不相同,另外由于藻类早期演化中存在着线粒体和叶绿体内共生现象,其在平行演化中又存在着并系起源和直系起源现象,这为研究藻类系统发育与分化增添了较大的难度。从多个层次以及多个基因位点上系统地研究藻类形态结构进化、生态适应以及基因进化的内在关系则显得更为重要和迫切。

参考文献:

- [1] FREDERICQ S, HOMMERSAND M H. Comparative morphology and taxonomic status of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 1989, 25: 228 - 241.
- [2] FREDERICQ S, HOMMERSAND M H. Proposal of the Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa* [J]. *J Phycol*, 1989, 25: 213 - 227.
- [3] FREDERICQ S, HOMMERSAND M H. Diagnoses and key to the genera of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) [J]. *Hydrobiologia*, 1990, 204/205: 173 - 178.
- [4] FRESHWATER D W, RUENESS J. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species based on *rbcL* nucleotide sequences analysis [J]. *Phycologia*, 1994, 33: 187 - 194.
- [5] SAUNDERS G W, KRAFT G T. A molecular perspective on red algal evolution: focus on the Florideophycidae [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 1997, 11: 115 - 138.
- [6] HARPER J T, SAUNDERS G W. Molecular systematics of the Florideophyceae (Rhodophyta) using nuclear large and small subunit rDNA sequence data [J]. *J Phycol*, 2001, 37: 1073 - 1082.
- [7] BIRD C J, RICE E L, MURPHY C A, et al. Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences [J]. *Phycologia*, 1992, 31: 510 - 522.
- [8] BIRD C J. A review of recent taxonomic concepts and developments in the Gracilariaceae (Rhodophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 1995, 7: 255 - 267.
- [9] BIRD C J, RAGAN M A, CRITCHLEY A T, et al. Molecular relationships among the Gracilariaceae (Rhodo-

- phyta): further observations on some undetermined species[J]. *Europ J Phycol*, 1994, 29: 195 – 202.
- [10] BELLORIN A M, OLIVEIRA M C, OLIVEIRA E C. Phylogeny and systematics of the marine algal family Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) based on small subunit rDNA and ITS sequences of Atlantic and Pacific species[J]. *J Phycol*, 2002, 38: 551 – 563.
- [11] IYER R, TRONCHIN E M, BOLTON J J, et al. Molecular systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales) with emphasis on southern Africa[J]. *J Phycol*, 2005, 41: 672 – 684.
- [12] GUILLEMIN M L, AKKI S A, GIVERNAUD T, et al. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco [J]. *Aquatic Botany*, 2008, 89: 324 – 330.
- [13] BYRNE K, ZUCCARELLO G C, WEST J, et al. *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. nov.: Morphology, molecular relationships and agar content [J]. *Phycological Research*, 2002, 50: 295 – 311.
- [14] WEINBERGER F, GUILLEMIN M L, DESTOMBE C, et al. Defense evolution in the Gracilariaceae (Rhodophyta): substrate-regulated oxidation of agar oligosaccharides is more ancient than the oligoagar-activated oxidative burst [J]. *J Phycol*, 2010, 46: 958 – 968.
- [15] GARGIULO G M, MORABITO M, GENOVESE G, et al. Molecular systematics and phylogenetics of Gracilariacean species from the Mediterranean Sea[J]. *J Phycol*, 2006, 18: 497 – 504.
- [16] KIM M S, YANG E C, BOO S M. Taxonomy and phylogeny of flattened species of *Gracilaria* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Korea based on morphology and protein-coding plastid *rbcL* and *psbA* sequences[J]. *Phycologia*, 2006, 45 (5): 520 – 528.
- [17] GURGEL C F D, FREDERICQ S. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): A critical assessment based on *rbcL* sequence analyses[J]. *J Phycol*, 2004, 40: 138 – 159.
- [18] GURGEL C F D, LIAO L M, FREDERICQ S, et al. Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence[J]. *J Phycol*, 2003, 39: 154 – 171.
- [19] ZUCCARELLO G C, URGER G B, WEST J A, et al. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1443 – 1447.
- [20] 孙晓宇, 罗丹, 赵翠, 等. 不同保存条件下五种大型海藻的 DNA 提取和 PCR 分析[J]. *分子植物育种 (online)*, 2011, 9(95): 1680 – 1691.
- [21] COLEMAN A W, VACQUIER V D. Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: A test case for abalone (*Haliotis*) [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, 54: 246 – 257.
- [22] GOFF L J, MOON D A, COLEMAN A W. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales) [J]. *J Phycol*, 1994, 30(3): 521 – 537.
- [23] 李敏, 隋正红, 易恒, 等. 龙须菜 5.8S rRNA 和 ITS 区的克隆与系统学分析[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 39(1): 77 – 83.
- [24] YAMAMOTO H. The relationship between *Gracilariopsis* and *Gracilaria* from Japan [J]. *Bull Fac Fish. Hokkaido Univ*, 1975, 26: 217 – 222.
- [25] ISABELLA A A, ZHANG Junfu, XIA Bangmei. *Gracilaria mixta*, sp. nov. and other western Pacific species of the genus (Rhodophyta: Gracilariaceae) [J]. *Pacific Science*, 1991, 45(1): 12 – 27.
- [26] 夏邦美, 张峻甫. *中国海藻志* [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 17.
- [27] GOFF L J, ZUCCARELLO G. The evolution of parasitism in red algae: Cellular interactions of adelphoparasites and their hosts [J]. *J Phycol*, 1994, 30: 695 – 720.
- [28] GOFF L J, COLEMAN A W. Fate of parasite and host organelle DNA during cellular transformation of red algae by their parasites [J]. *The Plant Cell Online*, 1995, 7(11): 1899 – 1911.
- [29] YANG E C, KIM M S, GERALDINO P J L, et al. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta) [J]. *J Appl Phycol*, 2008, 20: 161 – 168.
- [30] GURGEL C F D, FREDERICQ S. Phylogeography of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta): A study of genetic discontinuity a continuously distributed species based on molecular evidence [J]. *J Phycol*, 2004, 40: 138 – 159.
- [31] KIM M S, YANG E C, KIM S Y, et al. Reinstatement of *Gracilariopsis chorda* (Gracilariaceae, Rhodophyta) based on plastid *rbcL* and mitochondrial *cox1* sequences [J]. *Algae*, 2008, 23(3): 209 – 217.
- [32] YOW Y Y, LIM P E, PHANG S M. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis [J]. *J Appl Phycol*, 2011, 23: 219 – 226.