

综 述

红藻分子系统学研究进展

ADVANCES IN THE STUDY OF MOLECULAR SYSTEMATICS IN RHODOPHYTA

匡 梅 王素娟

(上海水产大学, 200090)

Kuang Mei and Wang Sujuan

(Shanghai Fisheries University, 200090)

曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

Zeng Chengkui

(Institute of Oceanology, Qingdao 266071)

关键词 红藻, 分子系统学

KEYWORDS Rhodophyta, Molecular systematics

于 80 年代兴起的藻类分子系统学指通过比较藻类核酸差异进行藻类系统发生的研究, 主要采用 DNA-DNA 杂交, 限制性内切酶酶切片段长度多态性(restriction fragment length polymorphisms)、酶谱分析、DNA 指纹、核酸测序技术(sequence analysis)以及 DNA 随机引物扩增多态性分析(random amplified polymorphic DNA)等手段研究藻类系统发生、亲缘关系及地理种群分布等课题。红藻分子系统学是当今各国藻类学家研究的热点之一, 已积累了大量红藻核酸材料, 并解决了利用传统手段难以定论的问题, 实验技术与方法也在不断改进。

1 红藻分子生物学的主要研究手段

1.1 限制性内切酶酶切片段长度多态性(RFLPs)

1992 年前, RFLPs 是广泛应用的一种 DNA 技术, 通过限制性内切核酸酶探测因替代、缺失和插入所造成的 DNA 长度变异情况, 经琼胶电泳分离, 获得大量数据进行系统分析。叶绿体 DNA 和核 DNA 则是分析的主要对象[Saunders, 1993]。

叶绿体 DNA RFLPs 解决了一些种间和种内的关系问题。Goff 和 Coleman[1988]通过红藻质体 DNA RFLPs 提出了江蓠属(*Gracilaria*)中新的种群分类方法, 并首先阐明了该方法适用于红藻系统学及进化关系研究; 随后, Carroll[1989]也利用 RFLPs 研究了江蓠属的种群结构。Parsons 等[1990]则通过该方法证明了加拿大沿岸与法国沿海的叉枝藻属(*Gymnogongrus*)不是一个种。Scholfield 等[1991]运用 PCR 扩增了几种江蓠属和龙须菜属(*Gracilariopsis*)的 18srDNA, 并用识别 4-bp 序列的限制性核酸酶检查, 认为该方法在确定这两属中种的亲缘关系时可能比较有效, 但不适用于种间关系的检验。

对于核 DNA, Steane 等[1991]运用 PCR 扩增了产于澳大利亚的杉藻类的包括 5.8rRNA 和间隔区域 RNA, 通过凝胶电泳检验, 认为该扩增的多型性不适于用作种及其以上水平的分类标记。

收稿日期: 1995-09-18。

1.2 序列分析

序列分析是通过测定某个基因或其侧翼区域的核苷酸并进行比较的方法。自动测序仪和一些直接测定 PCR 产物技术的日益成熟,使近年来核酸序列分析越来越多地运用于红藻的系统发育与进化等研究中。序列分析所选定的基因片段必须依据在分析中所要解决问题的程度以及具有用作 PCR 扩增及测序的引物等客观条件[Goff 等, 1994]。那些包含较多遗传信息的基因片段成为分子生物学研究的主要目标。如:在光合作用中占重要地位的 *rbcL* 基因,因其大小(超过 1 400bp)可以提供许多性状(bp)进行系统分析,并且该基因具有相对较慢的演化率,故适于研究科级水平以上的关系[Freshwater 和 Rueness, 1994];在卡尔文循环和 CO₂ 固定中起主要作用的 1,5-二磷酸核酮糖羧化加氧酶(RUBISCO)基因间隙及其侧翼序列则适用于属间和种以上的研究。紫菜属(*Porphyra*),江蓠属和石花菜属(*Gelidium*)等重要经济红藻是研究的主要对象。

Bhattacharya 等[1990]比较了脐形紫菜(*Porphyra umbilicalis*)与其他真核、原核生物的质体 5srDNA 序列,发现不同的藻类质体起源有先后。Bird 等[1992]则从 rRNA 小亚基完整序列出发研究脐形紫菜与真菌中担子菌纲的 *Leucosporidium scottii* 的进化位置。

Bhattacharya 等[1990]通过比较江蓠目中龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)的核糖体小亚基 RNA 基因序列与不同的真核生物同源基因序列,认为红藻与高等动、植物和真菌几乎是同时分化的,该结论与基于 5srRNA 和质体基因的研究结果不同。同时,作者认为藻类是多起源的,与高等真菌没有较近的进化关系。Bird 等[1990, 1992]运用 Sogin[1990]制成的特异性真核引物来扩增 *Gracilaria tikvahiae*, 英国江蓠(*G. verrucosa*)和 *Gracilariopsis* sp. 的 rDNA 小亚基(18s = "16-like" rDNA)基因,随后测序。研究表明这一区域在描述属和目的关系上非常有效,但因其在种的水平上具有相对较高的保守性(约 0.5% ~ 3%),不适用于研究种和种群关系。

Destombe 和 Douglas[1991]、Maggs 等[1992]利用 Rubisco 基因大、小亚基间的转录间隙和一些附近编码 DNA 的侧翼区域检查英国江蓠和叉枝菜属中种及种群关系。Goff 等[1994]运用两个转录间隙进行了江蓠属和龙须菜属两属的分子系统学研究,通过 PCR 扩增核糖体重复片段的 5.8srDNA(ITSs)以及质体 Rubisco 启动子的转录间隙和编码基因的侧翼片段并测序,认为两属中核 ITSs 在种的水平上具有保守性并能作为研究种间关系的特征之一。

Zhou 等[1993]和 Zhou[1994]运用 PCR 产生的同源探针扩增了英国江蓠的 5 个编码蛋白质的核基因及相应的 cDNA(GapC, GapA, TPI, m-ACN 和 UB16R),并通过测序及基因组的 Southern 杂交确定了其性质。GAPDH 序列的系统发育树表明,红藻的 GapA 基因和绿色植物的 GapA/GapB 基因明显不同,两者可能共同起源于蓝细菌状的内共生体的 Gap 基因。Liaud 等[1993, 1994]也从角叉菜(*Chondrus crispus*)中获得了 GapC 和 GapA 基因的克隆,并测定了序列。

杉藻目 Gigartinales 中, Hommersand 等[1994]通过 *rbcL* 序列分析研究了杉藻科的系统学和生物地理学; Saunders 和 Kraft[1993]结合形态和分子生物学研究了 Sphaerococaceae, Phacelocarpaceae 和 Nizyeniaceae 三科的分类。Chiovitti 等[1995]又根据藻体细胞壁的多糖组分,营养解剖结构结合核酸序列(ITS2)分析提出将澳大利亚产的 Nizyeniaceae 中的三个种均置于 *Nizyenia* 属,原种 *Stenocladia australis* 与 *Nizyenia conferta* 构成一新组合。Fredericq 等[1995]则通过详细分析 *rbcL* 序列和形态发育特征建立了杉藻目中各科间的亲缘关系。

石花菜目 Gelidiales 中, Freshwater 和 Rueness[1994]获得了产于欧洲的 24 种及 13 种欧洲以外的石花菜属的 *rbcL* 序列,以研究欧洲石花菜的种及种群关系,他们认为,除 *Gelidium pusillum* 外的所有欧洲种类组成一个主要的欧洲石花菜类群。Freshwater 等[1995]又通过石花菜目中六个属 *Capreolia*, *Gelidiella*, 石花菜属, *Onikusa*, 鸡毛菜属(*Pterocladia*), *Ptilophora* 和 *Suhria* 的 *rbcL* 序列测定,进行系统发育分析,将之分归 10 个分类群,与传统分类相异的是,其中石花菜属和鸡毛菜属不是共同起源的。

Strachan 等[1995]测定了红叶藻目 Rhodymaniales 中 20 多个代表属的小亚基 rRNA 序列,认为该目中现有的三个科具有严格的相关性,但同时对传统的分类形式提出了一些疑问和修改意见。

1.3 DNA 随机引物扩增多态性分析

以任意序列的单链,短的寡核苷酸作为引物,扩增未知区域的基因组 DNA,然后通过凝胶电泳分辨扩增产物的方法称 DNA 随机引物扩增多态性分析(RAPDs)。RAPDs 技术相对快速、简便和经济,在种群分析中的应用优于系统发育分析。Williams 等[1990]、Weish 和 McClelland [1990]和 Caetano-Anollés 等 [1990]三个研究小组几乎同时报道了这项技术。该技术已经在高等植物基因图谱(mapping higher plant genomes),区别细菌品系和植物的真菌病原体及蕃茄的种间、种内体细胞杂交的鉴定等许多方面得到运用。

Patwary 等[1993]在 *Gelidium vagum* 中运用了 RAPDs 技术,用以鉴定一些 *G. vagum* 的隔离种是否具有足够的遗传变异,作为能获得杂种优势的亲本。1994 年,他们运用该法成功地检验了 *G. vagum* 的杂种优势的产生,即通过检测父本特有条带的有无以确定杂交是否产生,结果证明杂合子的生长速率超过近亲繁殖的四分孢子体的 9.5%~130%。Stam[1995]等在用 RAPDs 法研究了仙菜目的 *Lophocladia trichoclados* 的单倍体和双倍体后认为,该法仅适用于种群水平上的研究。Hong 等[1995]运用 RAPDs 法,检验了紫菜 *P. perforata* 藻体的 6 个不同区域(包括雌、雄组织,斑点组织,营养性的分生与非分生组织和根丝组织)中总 RNA 反转录合成的相应 cDNA,认为不同区域的形态差异是具有组织特异性的基因表达的结果。

2 实验技术与方法的改进

PCR 和核酸序列分析等技术的改进,渗透了藻类系统学的不同方面。在提取红藻 DNA 时,实验材料的选用已经从最初的大量新鲜的藻体发展至少量干燥藻体。Goff 和 Moon[1993]主要根据 Walsh 等[1991]报道的森林病理学中运用的方法从保存在标本室达 11 年之久的干燥的江蓠囊果体及新鲜的红藻孢子中扩增,克隆了质体 Rubisco 基因和核糖体基因,并测序,其扩增片段的大小及序列与从新鲜藻体中获得的结果相似。Saunders 和 Kraft[1993]针对红藻提出了一种快速简单的胶纯化方法,从许多种红藻(新鲜和干燥藻体)中分离微量(1~3 μg)基因组 DNA,进行 PCR 及进一步的分子分析。他建议藻体的采集、清洗和干燥在一天内完成,从而为一次性采集多种标本以及实验提供了便利。在 Steane 等[1991]的基础上,Saunders[1993]认为在裂解前加入钾盐(乙酸钾)可以大量降低裂解混合物的粘滞度,去除样品中一定的多糖和 RNA;为避免多糖的污染,红藻的裂解步骤在室温下进行的效果好于通常采用的 50~65℃。

参 考 文 献

- [1] Bhattacharya, D. et al., 1990. Phylogeny of *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) based on sequence analysis of its small subunit ribosomal RNA coding region. *J. Phycol.*, 26:181~186.
- [2] Bird, C.J. et al., 1992. Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta) as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia*, 31:510~522.
- [3] Bird, C.J. et al., 1990. Nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA genes from the red algae *Gracilaria tikvahiae* McLachlan, *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfuss and *Gracilariopsis* sp. *Nucl. Acids Res.*, 18:4023~4024.
- [4] Caetano-Anollés, G. et al., 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio. Technology*, 9:553~557.
- [5] Carroll, M.A., 1969. Population structure of a red alga as determined with restriction site variation. *J. Phycol.*, 25(suppl.):24.
- [6] Chiovitti, A. et al., 1995. A revision of the systematics of the Nizymeniaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on polysaccharides, anatomy, and nucleotide sequences. *J. Phycol.*, 31(1):153~166.
- [7] Destombe, C. and S.E. Douglas, 1991. Rubisco sapcer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species *Curr. Genetics*, 19:395~398.
- [8] Fredericq, S. et al., 1995. New insights into the systematics and biogeography of the red algal order Gigartinales derived from rbcL sequence analysis and development morphology. *J. Phycol.*, 31(3): 18.
- [9] Freshwater, D.W. and J. Rueness, 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on rbcL nucleotide sequence analysis. *Phycologia*, 33:187~194.
- [10] Freshwater, D.W. et al., 1995. A molecular phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on analysis of plastid rbcL nu-

- cleotide sequences. *J. Phycol.*, **31**:616 ~ 632.
- [11] Goff, L.J. and A.W. Coleman, 1988. The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations. *J. Phycol.*, **24**:357 ~ 368.
- [12] Goff, L.J. and D.A. Moon, 1993. PCR amplification of nuclear and plastid genes from algal herbarium specimens and algal spores. *J. Phycol.*, **29**:381 ~ 384.
- [13] Goff, L.J., D.A. Moon and A.W. Coleman, 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agrophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *J. Phycol.*, **30**:521 ~ 537.
- [14] Homersand, M.H. *et al.*, 1994. Observations on the systematics and biogeography of the Gigartinales (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analysis. Vth International Seaweed Biogeography Workshop. *Botanica Marina*, **37**:253 ~ 257.
- [15] Hong, Y.K., *et al.*, 1995. Differential display of tissue specific messenger RNAs in *Porphyra perforata* (Rhodophyta) thallus. *J. Phycol.*, **31**:640 ~ 643.
- [16] Liaud, H.F. *et al.*, 1994. The evolutionary origin of red algae as deduced from the nuclear genes encoding cytosolic chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Chondrus crispus*. *J. Mol. Evol.*, **38**:319 ~ 327.
- [17] Liaud, M.F. *et al.*, 1993. The GAPDH gene system of the red alga *Chondrus crispus*: promoter structures, intron/exon organization, genomic complexity and differential expression of genes. *Plant Mol. Biol.*, **23**:981 ~ 994.
- [18] Maggs, C.A. *et al.*, 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *J. Phycol.*, **28**:214 ~ 232.
- [19] Parsons T.J. *et al.*, 1990. Plastid DNA restriction analysis links the heteromorphic phases of an apomictic red algal life history. *J. Phycol.*, **26**:495 ~ 500.
- [20] Patwary, M.U. *et al.*, 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J. Phycol.*, **29**:216 ~ 222.
- [21] Saunders, G.W., 1993. Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. *J. Phycol.*, **29**:251 ~ 254.
- [22] Saunders, G.W. and G.T. Kraft, 1993. Morphological and molecular investigations of the Gigartinean Sphaerococaceae, Phaeocarpacaceae, and Nizymeniaceae, evidence for a taxonomic reunion. *J. Phycol.*, **39**(suppl):7.
- [23] Scholfield, C.I. *et al.*, 1991. Restriction fragment length polymorphisms of enzymatically amplified small subunit rRNA-coding regions from *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta)—a rapid method for assessing species limits. *J. Appl. Phycol.*, **3**:329 ~ 334.
- [24] Sogin, M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (Ed. by Innis A.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. & White T.J.), pp. 307 ~ 324. Academic Press, San Diego.
- [25] Stam, W. T. *et al.*, 1995. RAPDs and reds: assessing the limits for population level studies. *J. Phycol.*, **31**(3): 14.
- [26] Steane, D.A. *et al.*, 1991. Amplification of the polymorphic 5.8s rRNA gene from selected Australian gigartinean species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. *J. Phycol.*, **27**:758 ~ 763.
- [27] Strachan, I. *et al.*, 1995. Small-subunit rRNA phylogeny of the Rhodymeniales—a preliminary appraisal. *J. Phycol.*, **31**(3): 19.
- [28] Walsh, P.S., D.A. Metzger and R. Higuchi, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA from PCR-based typing from forensic medicine. *Bio. Techniques*, **10**:505 ~ 513.
- [29] Welsh, J. and M. McClelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, **18**:7213 ~ 7218.
- [30] Williams, J.G.K. *et al.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, **18**:6531 ~ 6535.
- [31] Zhou, Y.H. and M.A. Ragan, 1993. cDNA cloning and characterization of the nuclear gene encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the marine red alga *Gracilaria verrucosa*. *Curr. Genet.*, **23**:483 ~ 489.
- [32] Zhou, Y.H., 1994. Characterization of nuclear protein-coding genes in the red alga *Gracilaria verrucosa* and molecular approaches to the study of red algal phylogeny. Ph. D. dissertation. pp.1 ~ 225.