

基于 *matK*、*rbcL* 和 ITS 序列的 5 种大叶藻系统发育研究

李 渊¹, 孙典荣², 李文涛¹, 张沛东¹, 江 鑫¹, 郭 栋¹, 高天翔^{1*}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要: 运用 PCR 直接测序法, 对采自爱尔兰、日本、韩国和中国的大叶藻、矮大叶藻、丛生大叶藻和红须根虾形藻及 GenBank 中的宽叶大叶藻 5 种大叶藻叶绿体的 *matK*、*rbcL* 和核糖体 ITS 的部分序列进行测定, 并比较分析了 5 种大叶藻 3 个目的片段的核苷酸序列, 结果发现胞嘧啶 (C) 在 3 个目的片段上的含量均较低。ITS 片段检测到 172 处核苷酸替换, 表现出丰富的遗传多态性。*matK* 基因片段上有 52 处核苷酸替换, *rbcL* 基因片段上有 20 处核苷酸替换, 且大部分替换来自于第三密码子的同义替换, 种间在氨基酸水平上产生了一定的分化。基于 ITS、*matK* 和 *rbcL* 3 个目的片段, 利用邻接法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建的系统发育树结果基本一致, 明显分为 3 大支。矮大叶藻与大叶藻属间 3 种大叶藻的核苷酸最小差异值为 19.33%, 在分子数据上达到了属的水平。基于 *matK* 和 *rbcL* 基因片段拼接序列的分析结果表明: 大叶藻与丛生大叶藻的分化时间在上新世(2~2.7 百万年前), 与宽叶大叶藻的分化时间在上新世(4~5.3 百万年前), 与矮大叶藻的分化时间在渐新世(27~36 百万年前), 与红须根虾形藻的分化时间在始新世(33~44 百万年前)。4 个地区大叶藻的 ITS 片段序列完全相同, 结果表明大叶藻 ITS 区的变异程度与地理距离不相关, 其不适用于大叶藻不同地理株间的分子系统演化。该研究进一步阐述了 5 种大叶藻的系统发育关系, 同时也为国内海草的分子系统发育研究提供重要参考。

关键词: 大叶藻属; 虾形藻属; *matK*; *rbcL*; ITS; 系统发育关系

中图分类号: Q 949; S 917

文献标识码: A

在热带和亚热带海区, 海草床 (seagrass bed, 海草在潮间带中呈片状分布, 通常将整片的海草称为海草床) 与红树林和珊瑚礁一样, 是三大典型海洋生态系统之一, 具有巨大的碳储备能力^[1]。KUO 等^[2]认为全世界海草共有 4 科 12 属 60 多种, 我国迄今为止有记录的海草共 4 科 10 属 20 种^[3]: 大叶藻科 (Zosteraceae), 聚伞藻科 (Posidoniaceae), 海神草科 (Cymodoceaceae), 水螅科 (Hydrocharitaceae)。国内大叶藻科包含大叶藻属 (*Zostera*) 和虾形藻属 (*Phyllospadix*) 2 个属, 大叶藻属包括大叶藻亚属 (subgenus *Zostera*) [大叶藻 (*Zostera marina*)、丛生大叶藻 (*Z. caespitosa*)、具茎大叶藻 (*Z. caulescens*)、宽叶大

叶藻 (*Z. asiatica*)] 和拟大叶藻亚属 (subgenus *Zosterella*) [矮大叶藻 (*Z. japonica*)] 5 个种; 虾形藻属包括黑须根虾形藻 (*Phyllospadix japonicus*) 和红须根虾形藻 (*P. iwatensis*)。以上 7 个种主要分布在山东、河北、辽宁沿海, 而矮大叶藻在厦门、福建、广东、广西、台湾亦有分布^[3]。国内学者关于海草的研究主要集中于生物学、生态生理学等方面^[4-8], 尚未见有遗传学方面的研究报道。

近年来, 随着分子系统学的发展, 叶绿体的 *matK*、*rbcL* 基因片段和核糖体 ITS 片段已经成功用于系统发育研究^[9-18], 但未见有对国内大叶藻科几种大叶藻的系统发育关系进行探讨。本研究借鉴国外大叶藻科系统发育研究经验的基础上^[10-13], 选用

收稿日期: 2010-09-27 修回日期: 2010-11-12

资助项目: 国家海洋公益项目 (200805069); 国家自然科学基金项目 (30700615)

通讯作者: 高天翔, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

系统发育常用的 ITS、*matK* 和 *rbcL* 片段作为分子标记,分析比较 5 种大叶藻在叶绿体和核糖体基因组不同片段上的遗传分化程度,并探讨 5 种大叶藻间的亲缘关系和分歧年代,同时比较核糖体和叶绿体基因组不同片段上核苷酸替代速率的差异,以期为国内大叶藻科的分子系统发育研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采集于爱尔兰的大叶藻由胡自民博士于 2008 年硅胶干燥保存带回,采集于韩国的样品由李文涛博士于 2009 年硅胶干燥保存带回,采集于日本东京湾的大叶藻由小松辉久教授 2009 年提供。采集中国青岛、威海、烟台沿海的 2 种大叶藻(表 1),并依据《中国植物志》第 8 卷^[19]和《中国海草植物》^[3]进行种类鉴定。样品采集后用海水洗净,取新鲜叶片,放入装有硅胶的离心管中带回实验室备用,或者将新鲜样品浸于海水中直接带回实验室使用。采样时为确保所采样品为不同植株,植株间隔至少在 2 m 以上。宽叶大叶藻和外群海菖蒲(*Enhalus acoroides*)的 *matK*、*rbcL* 和 ITS 序列参照 GenBank 中同源序列(AB125360/AB125352/EF198347)和(AB002569/U80697/AY870347)进行比对。

表 1 样品采集地点及样品数
Tab.1 List of species,localities and number

| 地点 location | 种类 species | | | |
|----------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| | 大叶藻 <i>Z. marina</i> | 丛生 大叶藻 <i>Z. caespitosa</i> | 矮大 叶藻 <i>Z. japonica</i> | 红须根 虾形藻 <i>P. iwataensis</i> |
| 爱尔兰克莱尔郡 | 2 | | | |
| 日本东京湾 | 2 | | | |
| 韩国巨济岛 | 2 | 5 | 5 | |
| 青岛胶南 | 2 | | | |
| 威海俚岛 | 2 | | | 5 |
| 威海天鹅湖 | 2 | | | |
| 烟台 | | | | 5 |

1.2 实验方法

基因组 DNA 提取 取 4 种大叶藻适量的新鲜叶片或干燥叶片,参照 BAN^[20] 的 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 法并加以改良来提取基因组 DNA,将乙醇沉淀后的基因组 DNA 溶解于 100 μ L 蒸馏水中,4 $^{\circ}$ C 保存备用。取提取的 DNA 3 μ L 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,以备之后的 PCR 扩增。

基因组片段的 PCR 扩增、纯化 用于扩增 4

种大叶藻的 *matK*、*rbcL* 和 ITS 片段的引物分别为:
matK F:5'-AACATTTCCCTTTTTGGAGGA-3',*matK* R: 5'-CAGAATCCGATAAATCAGTCCA-3'^[21]; *rbcL* LF: 5'-ATGTCACACCAAACAGAG-ACTAAAGC-3', *rbcL* LR: 5'-GCAGCAGCTAGTT-CCGGGCTCCA-3'^[11]; ITS F5:5'-GGAAGTAA-AAGTCGTAACAA-3'; ITS G4: 5'-CTTTTCCT-CCGCTTATTG-ATATG-3'^[22]。PCR 反应体系总体积为 50 μ L,其中:10 \times PCR 缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4;200 mmol/L KCl;100 mmol/L (NH₄)₂SO₄;15 mmol/L MgCl₂)5 μ L,dNTP 200 μ mol/L,引物各 0.2 μ mol/L,*Taq* 酶 1.25 U(大连宝生物公司),模板 DNA 20 ng,加水至 50 μ L。以上反应均设阴性对照以排除 DNA 污染的情况。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,凝胶成像系统拍照。

1.3 PCR 产物回收及 DNA 序列测定

PCR 产物经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳,产物电泳后于紫外灯下切割目的条带,用 DNA 胶回收试剂盒进行产物的纯化回收。测序分析仪为美国 ABI 公司 3700 型全自动序列分析仪,为保证所测序列的准确性,每个样品均进行双向测序,测序反应采用与 PCR 反应一致的引物。

1.4 序列数据分析

用 DNASTar 软件对所得序列进行剪切、编辑和比对,并辅以人工校正。用 PAUP 4.0^[23] 和 Modeltest 2.0^[24] 筛选 3 个目的片段核苷酸最佳替换模型,并且基于最佳替换模型利用 MEGA 4.1^[25] 软件将蛋白质编码基因 *matK* 和 *rbcL* 的核苷酸序列的密码子转换为氨基酸进行检测。分析叶绿体、核糖体基因组不同片段的核苷酸组成并计算种间遗传距离,5 种大叶藻的 DNA 多态性用软件 Arlequin ver 3.1^[26] 进行分析。使用 PAUP 4.0 软件,应用邻接法(NJ)^[27]、最大简约法(MP)^[28]、最大似然法(ML)^[29] 构建系统发育树,运用 MrBayes 3.0 软件构建贝叶斯(Bayes)^[30] 系统发育树。

2 结果

2.1 序列差异及核苷酸组成分析

4 种大叶藻样品经过 PCR 扩增后均得到清晰的 *matK*、*rbcL* 和 ITS 3 个目的片段,其中宽叶大叶藻的 *matK*、*rbcL* 和 ITS 序列参照 GenBank 中的同源序列,对所得序列进行比对且辅以人工校正,得

到同源片段序列分别为 *matK* (763 bp)、*rbcL* (1 324 bp) 和 ITS (436 ~ 455 bp) (不包括 5.8 S rDNA) (表 2)。5 种大叶藻在 ITS 片段上检测到 166 个多态位点,在 *matK* 片段上检测到 51 个多态位点,而在 *rbcL* 片段上检测到 20 个多态位点。

3 个目的片段核苷酸组成分析结果表明:5 种大叶藻的 3 个目的片段上胞嘧啶(C)的含量均低

于 17.62%,其中最低的是 *matK* 片段(13.24%)。C 含量在 *matK* 和 *rbcL* 蛋白质编码基因的第三密码子位点上的含量也很低(<12.19%),其中 5 种大叶藻在 *matK* 片段上呈现显著的反 C 偏倚(<9.8%)(图 1)。A+T 的含量明显高于 G+C 的含量,最低的 *rbcL* 片段中为 58.08%,A+T 平均含量为 65.54%(表 3)。

表 2 序列片段多态及 Modeltest 检验得到的模型

Tab. 2 Sequence variability and nucleotide substitution model estimates for Modeltest analyses

| 基因 gene | 片段长度(bp) sequence length | 信息简约位点 parsimony information sites | 多态位点 variable sites | 单一信息位点 singleton sites | 插入/缺失位点 gapped sites | 核苷酸 替代模型 best model | Gamma 值 Gamma value |
|-------------|-----------------------------|--|------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| <i>matK</i> | 763 | 5 | 51 | 46 | 0 | HKY | Equal rates |
| <i>rbcL</i> | 1 324 | 2 | 20 | 18 | 0 | HKY | Equal rates |
| ITS | 436 ~ 455 | 9 | 166 | 156 | 53 | HKY | Equal rates |

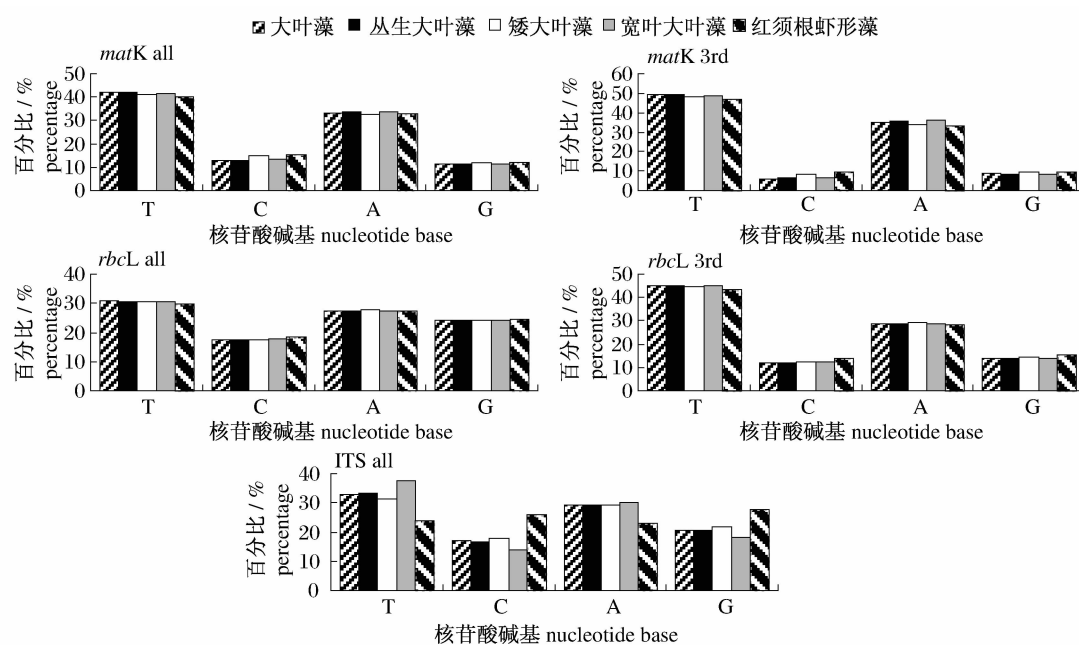


图 1 5 种大叶藻 3 个目的片段核苷酸组成

all. 整个片段; 3 rd. 蛋白质编码基因第三密码子位点。

Fig. 1 Nucleotide compositions of three partial fragments of five Zosteraceae species

all. means the partial fragment, 3rd. means the third codon of the gene.

2.2 遗传分化分析

ITS 片段中,12 株不同地区的大叶藻共享一个单倍型,5 株丛生大叶藻共享一个单倍型,5 株矮大叶藻中共享一个单倍型,10 株不同地区的红须根虾形藻也是共享一个单倍型。5 种大叶藻共检测到 166 个多态位点(9 个信息简约位点^[10]、156 个单一信息位点),172 个核苷酸替代(nucleotide

substitution) 中出现 88 个转换(transition)、84 个颠换(transversion)。*matK* 基因片段上,12 株不同地点的大叶藻定义了 3 个单倍型,5 株丛生大叶藻共享了一个单倍型,5 株矮大叶藻共享一个单倍型,10 株不同地点的红须根虾形藻共享一个单倍型。5 种大叶藻共检测到 51 个多态位点(5 个信息简约位点、46 个单一信息位点),52 个核苷酸替代中包

含34个转换、18个颠换。*rbcL*基因片段上,12株不同地点的大叶藻共享一个单倍型,5株丛生大叶藻和矮大叶藻分别共享一个单倍型,10株不同地点的红须根虾形藻共享一个单倍型。5种大叶藻共检测到20个多态位点(2个信息简约位点、18个单一信息位点),20个核苷酸替代中包含14个转换、6个颠换。基于HKY模型分别计算得到5种大叶藻间的遗传距离(表4和表5)。

表4 5种大叶藻的*matK*(上三角)和*rbcL*(下三角)基因序列之间的遗传距离

Tab.4 Genetic distances of gene fragments of *matK*(above diagonal) and *rbcL*(below diagonal) among five *Zosteraceae* species

| | 大叶藻 <i>Z. marina</i> | 矮大叶藻 <i>Z. japonica</i> | 丛生大叶藻 <i>Z. caespitosa</i> | 宽叶大叶藻 <i>Z. asiatica</i> | 红须根虾形藻 <i>P. iwatensis</i> |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 大叶藻 <i>Z. marina</i> | | 0.067 7 | 0.004 8 | 0.010 2 | 0.080 4 |
| 矮大叶藻 <i>Z. japonica</i> | 0.014 5 | | 0.065 3 | 0.060 7 | 0.047 7 |
| 丛生大叶藻 <i>Z. caespitosa</i> | 0.000 8 | 0.015 3 | | 0.007 9 | 0.080 3 |
| 宽叶大叶藻 <i>Z. asiatica</i> | 0.001 5 | 0.014 5 | 0.000 8 | | 0.077 1 |
| 红须根虾形藻 <i>P. iwatensis</i> | 0.020 0 | 0.019 2 | 0.019 2 | 0.018 4 | |

表5 5种大叶藻的ITS序列之间的遗传距离

Tab.5 Genetic distances of fragment of ITS among five *Zosteraceae* species

| | 大叶藻 <i>Z. marina</i> | 矮大叶藻 <i>Z. japonica</i> | 丛生大叶藻 <i>Z. caespitosa</i> | 宽叶大叶藻 <i>Z. asiatica</i> | 红须根虾形藻 <i>P. iwatensis</i> |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 大叶藻 <i>Z. marina</i> | | | | | |
| 矮大叶藻 <i>Z. japonica</i> | 0.215 5 | | | | |
| 丛生大叶藻 <i>Z. caespitosa</i> | 0.002 4 | 0.209 8 | | | |
| 宽叶大叶藻 <i>Z. asiatica</i> | 0.014 6 | 0.193 3 | 0.012 1 | | |
| 红须根虾形藻 <i>P. iwatensis</i> | 0.389 9 | 0.353 2 | 0.400 3 | 0.379 1 | |

在*matK*和*rbcL*两个蛋白质编码基因部分片段中,大部分的突变是同义突变(synonymous substitution),最普遍的核苷酸替代是发生在密码子第三位点上的转换,其次是密码子第三位点上的颠换和密码子第一位点上的无义转换^[31]。*matK*基因片段上的51处突变中,有23处在密码子第三位点上(5处为颠换),14处在第二密码子上(7处颠换),15处位于密码子第一位点(9转换)。*rbcL*基因片段上的20处突变中,17处核苷酸替代皆发生在密码子第三位点上(4处为颠换),第二密码子有1处颠换,第一密码子有2处颠换。

氨基酸水平上,在*matK*基因长度为254个氨基酸序列上,5种大叶藻共检测到氨基酸替代(amino acid substitution)42处。在*rbcL*基因长度为441个氨基酸序列上,5种大叶藻检测到5处氨基酸替代。可见5种大叶藻的*matK*和*rbcL*基因片段在氨基酸水平上均产生了一定程度的遗传分化(图2)。

表3 核苷酸*matK*、*rbcL*和ITS片段碱基分布频率

Tab.3 Nucleotide frequencies of *matK*, *rbcL* and ITS sequences

| 基因 gene | C | T | A | G | A+T |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>matK</i> | 13.24 | 41.83 | 33.36 | 11.58 | 75.19 |
| <i>rbcL</i> | 17.62 | 30.55 | 27.53 | 24.30 | 58.08 |
| ITS | 16.31 | 33.80 | 29.55 | 20.34 | 63.35 |
| 平均值 mean | 15.72 | 35.39 | 30.14 | 18.74 | 65.54 |

| | | |
|-------------|--|------------------|
| <i>matK</i> | 1111111111 1111111111 2222222222 22 | |
| | 111556677 9001111233 6677888999 0011111222 45 | |
| | 1029340104 3183457301 4502246168 5723789136 54 | |
| 1 | INVLMNYNLF FGRKVAHFL LFNVIKRVFN ISEYLNLIKV IV | <i>rbcL</i> 2233 |
| 2 | IDLLITSNLY SGHMEHAYLL VFHSMFAYFS ISESIDTIKI II | 1414 |
| 3 | INVLMNYNLF FGRIEVAHFL LFNVIKRVFN ISEYLNLIKV IV | 95094 |
| 4 | INVLMNYNLF FGRIEVAHFI LFNVIKRVFN ISEYLNLIKV IV | 9 RADAF |
| 5 | INVLMNYNLF FGRIEVAHFI LFNVIKRVFN ISEYLNLIKV IV | 10 RAESY |
| 6 | INVLMNYNLF FGRIEVAHFL LFNVIKRVFN ISEYLNLIKV IV | 11 RADSF |
| 7 | KDLIITSIFY SEHMEHVYLL VYNYIQSYLS TSGYIDITNV VI | 12 RADAF |
| 8 | KDLIITSIFY SEHMEHVYLL VYNYIQSYLS TSGYIDITNV VI | 13 KSEAY |

图2 5种大叶藻*matK*和*rbcL*基因

片段的氨基酸序列比对

1. 丛生大叶藻 韩国; 2. 矮大叶藻 韩国; 3. 大叶藻 爱尔兰; 4. 大叶藻 韩国; 5. 大叶藻 日本; 6. 宽叶大叶藻; 7. 红须根虾形藻 烟台; 8. 红须根虾形藻 俚岛; 9. 丛生大叶藻; 10. 矮大叶藻; 11. 大叶藻 日本; 12. 宽叶大叶藻; 13. 红须根虾形藻。

Fig.2 Amino acid sequences alignment of *matK* and *rbcL* gene fragments for five *Zosteraceae* species

1. *Z. caespitosa* Korea; 2. *Z. japonica* Korea; 3. *Z. marina* Ireland; 4. *Z. marina* Korea; 5. *Z. marina* Japan; 6. *Z. asiatica*; 7. *P. iwatensis* Yantai; 8. *P. iwatensis* Lidao; 9. *Z. caespitosa*; 10. *Z. japonica*; 11. *Z. marina* Japan; 12. *Z. asiatica*; 13. *P. iwatensis*.

不同基因间核苷酸替代速率的差异不是由于基因本身的差异引起的,而是可能由于不同进化世系间的差异产生的。分子钟假说(molecular clock hypothesis)认为:某一特定的大分子在所有的世系(Lineage)中,氨基酸或核苷酸替代速率在进化过程中是近似的保持恒定的,尽管替代速率的观测值受随机误差的影响^[32]。水稻(*Oryza sativa*)的 *rbcL* 的同义替代速率为 $(0.9 \sim 1.2) \times 10^{-9}$ 位点/年^[33],这一核苷酸同义替代速率同样适用于海藻^[11],利用贝叶斯联合模型将 *matK* 和 *rbcL* 片段拼接来推算 5 种大叶藻的分歧年代得出:大叶藻与丛生大叶藻的分歧时间为 2 ~ 2.7 百万年,发生于上新世(Pliocene);与宽叶大叶藻的分歧时间为 4 ~ 5.3 百万年,发生于上新世(Pliocene);与矮大叶藻的分歧时间为 27 ~ 36 百万年,发生于渐新世

(Oligocene);与红须根虾形藻的分歧时间约为 33 ~ 44 百万年,发生于始新世(Eocene)。

2.3 系统发育分析

本研究运用邻接法(NJ)、最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯(Bayes)构建的系统发育树基本一致(图3)。系统发育研究结果表明,5种大叶藻明显分为三大支,第一支由拟大叶藻亚属(subgenus *Zosterella*)组成,另外一支由大叶藻亚属(subgenus *Zostera*)3个种组成,第三支由红须根虾形藻组成,而且均有很高的支持率。从NJ、MP、ML和Bayes系统树上可以看出,大叶藻与丛生大叶藻首先聚为一支,之后再与宽叶大叶藻聚类构成大叶藻亚属大支;作为拟大叶藻亚属的矮大叶藻单独聚为一大支;虾形藻属的红须根虾形藻单独聚为一支。

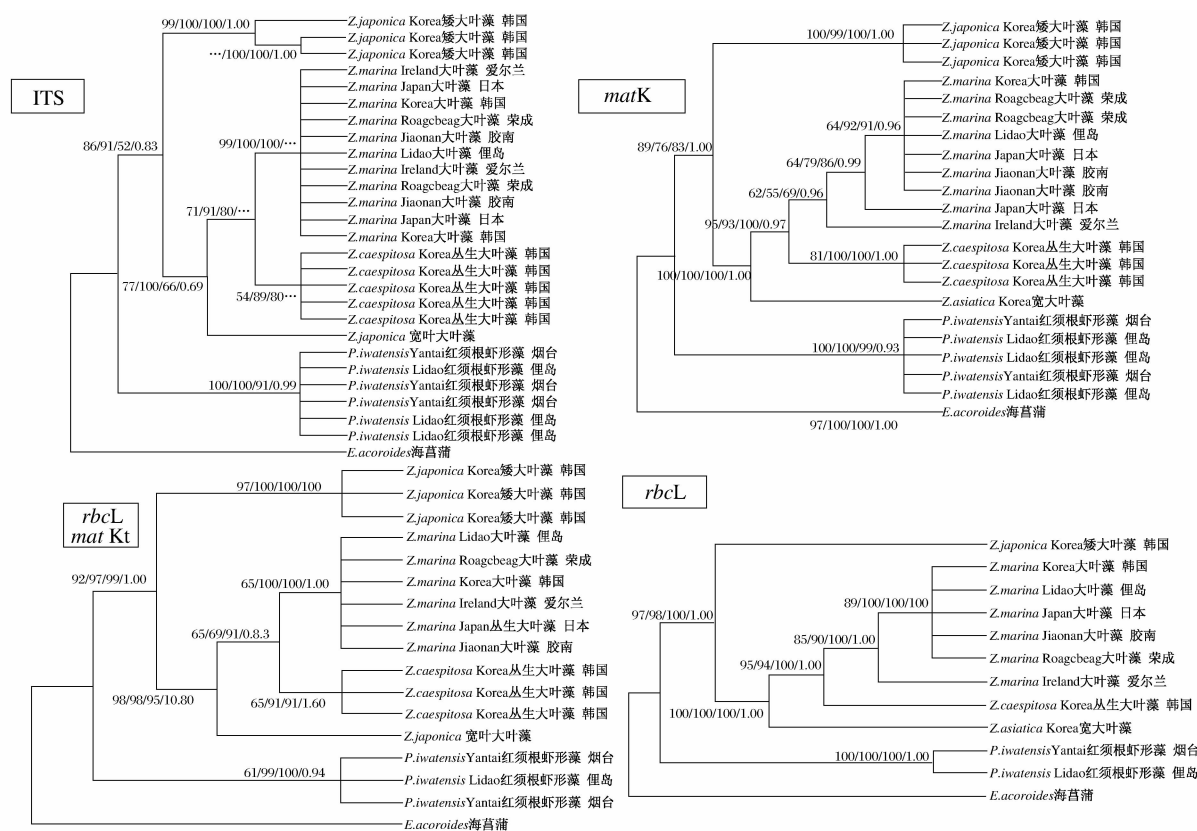


图3 邻接法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建 5 种大叶藻的系统发育树(支持率及后验概率标注在分支上)

Fig. 3 Phylogenetic trees of five Zosteraceae species based on neighbor joining analyses, maximum parsimony analyses, maximum likelihood and Bayes analyses (numbers on the trees represent the values of supporting values and posterior probability values)

3 讨论

本研究结果显示 *matK*、*rbcL* 和 ITS 3 个目的

片段中的胞嘧啶(C)的含量较低(均低于 17.62%),在 *matK* 和 *rbcL* 蛋白质编码基因的第三密码子位点上的含量更低(<12.19%)。A + T

的含量高于 C + G 的含量,表现出对 A + T 含量偏斜。蛋白质编码基因密码子第三位点上核苷酸的突变受到自然选择压力小,所以密码子第三位点能够更清晰的表明核苷酸组成的不均一性^[31],被子植物中蛋白质编码基因的密码子第三位点同样符合这一规律。MEYER^[31]认为,密码子第三位点上的突变很少导致氨基酸替代(同义替代),所以比导致氨基酸替代的突变(非同义替代)积累得快得多,最常见的突变是密码子第三位点上的转换,其次是密码子第三位点上的颠换和第一密码子位点上的无义转换。ITS 片段长度比较保守,缺乏编码选择压力,但核苷酸序列变化较大,进化速率较快^[9],在 ITS 基因片段中,检测到丰富的遗传多态,其中有 166 个多态位点,172 个核苷酸替代,本研究结果与王建波等^[9]的研究结果相似。在氨基酸水平上,氨基酸序列上的遗传变异比两种蛋白质编码基因核苷酸序列上的遗传变异低得多,5 种大叶藻在氨基酸序列上共检测到 47 处遗传变异,表明 5 种大叶藻在 *matK* 和 *rbcL* 基因片段上已有一定的分化。

大量的研究表明,*matK*、*rbcL* 和 ITS 片段都比较保守,适合于种以上水平系统进化分析,且得到了广泛的应用^[11,12-16]。其中 ITS 片段更是可以用于研究不同地理株间的分子系统演化关系^[17],汪文俊等^[18]对浒苔的研究发现中国海区的浒苔 ITS 片段序列完全相同,为同一来源,而与日本、英国和美国的浒苔有一定分化。本研究中中国、韩国、日本和爱尔兰大叶藻的 ITS 片段序列完全相同,结果表明 ITS 不适用于大叶藻不同地理株间的分子系统演化。*matK*、*rbcL* 和 ITS 3 个目的片段都能将 5 种大叶藻很好的区分开,而且构建的系统发育树基本一致。大叶藻与丛生大叶藻首先聚为一支,之后再与宽叶大叶藻聚类构成大叶藻亚属大支;作为拟大叶藻亚属的矮大叶藻单独聚为一大支,最后虾形藻属的红须根虾形藻单独构成一支,符合 KUO 等^[34]和 DEN HARTOG^[35]划分结果。

KATO 等^[11]对 *matK* 和 *rbcL* 的进化速率进行了检测,得到二者具有相似的进化速率,同时还利用 Tajima's relative rate test 对水稻和海草的碱基替代率进行了检测,结果表明二者之间无明显差别。本研究利用贝叶斯联合模型将 *matK* 和 *rbcL* 拼接^[36-38],分析重建系统发育关系(图 3),

结果与单独构建树形一致。将 $(0.9 \sim 1.2) \times 10^{-9}$ 位点/年核苷酸分歧速率用于 *matK* 和 *rbcL* 拼接片段上来推算 5 种大叶藻的分歧时间^[11]。基于这一标准,我们推算出 5 种大叶藻的分化时间。KATO 等^[11]在大叶藻属的系统研究中,得出大叶藻与宽叶大叶藻在 3~6 百万年前分歧,与本研究得出的结果相近。

1989 年, LARKUM 等^[39]在白垩纪(Cretaceous)地层发现了关于海草的化石,推测可能是现存的大叶藻科的虾形藻属物种^[40-41], AIOI^[42]提出大叶藻科在第三纪(Tertiary)之后才出现,所以不可能是大叶藻科物种的化石。本研究中的分歧时间支持 AIOI^[42]的观点。可见大叶藻科的起源依然存在争议,如果能找到大叶藻科物种化石,就可以准确地推断出大叶藻科各种间的分歧年代。

屈良鹄等^[43]对 GenBank 中不同生物类群的 ITS 序列进行比较得出属种划分的分子标准:被子植物大多数科属的 ITS 序列的种间差异值为 1.20% ~ 10.20%,属间差异值为 9.60% ~ 28.80%。基于这一标准,张宏意等^[44]得出单叶血藤和大血藤的种间差异为 0.32% ~ 2.31%,从分子数据上更支持将单叶血藤划到大血藤中;向建英等^[45]从遗传组学研究得出 *Begonia handelii* 和 *B. prostrata* 的种间差异仅为 0.556% ~ 0.696%,明显小于种间的差异值,认为二者在形态上存在一定差别,且在地理分布上不同,应该是起源于一较近的共同祖先,由于生境(分布)不同而分化为两个分类群。本实验得出的结果中,大叶藻与丛生大叶藻的种间差异为 0.0024,明显小于屈良鹄等^[43]提出的种间划分的分子标准,但二者在形态上存在明显的差别,可能是由于各自的进化环境不同而造成的。而矮大叶藻与大叶藻属间的几种大叶藻的核苷酸最小差异值为 19.33%,明显高于种间的差异值达到属间差异水平,从分子数据上支持矮大叶藻与大叶藻、丛生大叶藻、宽叶大叶藻之间的差异达到属的水平。TANAKA 等^[12]和 KATO 等^[11]建议将矮大叶藻所在的拟大叶藻亚属提升到属的水平。虾形藻属的红须根虾形藻与大叶藻属的属间差异最小的也为 35.32%,明显高于屈良鹄等^[43]提出的属间划分的分子标准。

由于本研究所用实验样品仅有大叶藻、丛生

大叶藻、矮大叶藻和红须根虾形藻,尚缺少国内分布的大叶藻科的宽叶大叶藻、具茎大叶藻和黑须根虾形藻,因此在今后的工作中应补充相关样品,开展形态学研究的同时,结合更多的分子标记对我国大叶藻系统发育关系进行深入的探讨。

参考文献:

- [1] COSTANZA R, d' ARGE R, DE GROOT R, *et al.* The value of the world's ecosystem services and natural capital[J]. *Nature*, 1997, 387: 253 - 260.
- [2] KUO J, DEN HARTOG C. Seagrass taxonomy and identification key[C]// SHORT F T, COLES R G. Eds. *Global Seagrass Research Methods*. Amsterdam: Elsevier Science, 2001: 31 - 58.
- [3] 范航清, 石雅君, 邱广龙. 中国海草植物[M]. 北京: 海洋出版社, 2009: 6.
- [4] 杨宗岱, 吴宝铃. 中国海草场的分布生产力及其结构与功能的初步探讨[J]. *生态学报*, 1981, 1(1): 84 - 88.
- [5] 叶春江, 赵可夫. 高等植物大叶藻研究进展及其对海洋沉水生活的适应[J]. *植物学通报*, 2002, 19(2): 184 - 193.
- [6] 李恒, 李美珍. 藻场的生态作用及人工藻场建设的现状[J]. *中国水产*, 2006(11): 77 - 79.
- [7] 于函, 马有会, 张岩, 等. 大叶藻的生态学特征及其与环境的关系[J]. *海洋湖沼通报*, 2007, 21: 112 - 120.
- [8] 李文涛, 张秀梅. 海草场的生态功能[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(5): 933 - 939.
- [9] 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(2): 407 - 416.
- [10] HSIAO C, CHATTERTON N J, ASAY K H. Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots genome [J]. *Genome*, 1994, 37: 112 - 120.
- [11] KATO Y, AIOI K, OMORI Y, *et al.* Phylogenetic analyses of *Zostera* species based on *rbcL* and *matK* nucleotide sequences; Implications for the origin and diversification of seagrasses in Japanese waters[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2003, 78: 329 - 342.
- [12] TANAKA N, KUO J, OMORI Y, *et al.* Phylogenetic relationships in the genera *Zostera* and *Heterozostera* (*Zosteraceae*) based on *matK* sequence data [J]. *Journal of Plant Research*, 2003, 116: 273 - 279.
- [13] LES D H, MOODY M L, JACOBS S W L, *et al.* Systematics of seagrasses (*Zosteraceae*) in Australia and New Zealand [J]. *Systematic Botany*, 2002, 27: 468 - 484.
- [14] 金虹, 施苏华, 潘恒昶, 等. 含笑亚族及其近源植物 *matK* 基因序列分析 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1999, 38(1): 93 - 97.
- [15] 向建英, 管开云, 杨俊波. 应用 ITS 区序列对秋海棠属无翅组分类学问题的探讨 [J]. *云南植物研究*, 2002, 24(4): 455 - 462.
- [16] ZHANG Z Y, LI D Z. Molecular phylogeny of section *Parrya* of *Pinus* (*Pinaceae*) based on chloroplast *matK* gene sequence data [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(2): 171 - 179.
- [17] BAKKER F J, OLSEN J L, STAM W T, *et al.* Nuclear ribosomal dna internal transcribed spacer regions (*its1* and *its2*) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (*Chlorophyta*) [J]. *Journal of Phycology*, 1992, 28: 839 - 845.
- [18] 汪文俊, 王飞久, 陈松林, 等. 浒苔 ITS 区的扩增和分析 [J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(5): 124 - 129.
- [19] 孙祥钟. 中国植物志 (第 8 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 85 - 95.
- [20] BAN Y. Methods of DNA and RNA isolation of *Oryza sativa* [C]// SHIMAMOTO K, SASAKI T, Eds. *PCR Experiments Protocol of Plants*. Shujunsha, Tokyo, 1997: 34 - 40.
- [21] COYER J A, MILLER K A, ENGLE J M, *et al.* Eelgrass meadows in the California Channel Islands and adjacent coast reveal a mosaic of two species, evidence for introgression and variable clonality [J]. *Annals of Botany*, 2007, 101: 73 - 87.
- [22] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]// INNIS M, GELFAND D, SNINSKY J, *et al.* Eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. San Diego: Academic Press, 1990: 315 - 322.
- [23] SWOFFORD D L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta [C]. Sunderland: Sinauer Associates Incorporated, 2001.
- [24] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14: 817 - 818.
- [25] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007(24): 1596 - 1599

- [26] EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S. Arlequin ver 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis [R]. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology University of Berne, Switzerland, 2006.
- [27] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method; a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406 – 425.
- [28] SWOFFORD D L. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony. Version 3.0. program and documentation [C]. Illinois Natural History Survey, Urbana, 1993.
- [29] FELSENSTEIN J. Evolutionary trees from DNA sequences; a maximum likelihood approach [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17: 368 – 376.
- [30] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes version 3.0: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19 (12): 1572 – 1574.
- [31] MEYER A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [M]. Amsterdam: Elsevier Press, 1993: 1 – 36.
- [32] WEIR J T, SCHLUTER D. Calibrating the avian molecular clock [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17: 2321 – 2328.
- [33] LI W H. Molecular evolution [M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.
- [34] KUO J, DEN HARTOG C. Seagrass taxonomy and identification key [C] // SHORT F T, COLES R G. Eds. *Global Seagrass Research Methods*. Amsterdam: Elsevier Science, 2001: 31 – 58.
- [35] DEN HARTOG C. The seagrasses of the world [M]. Amsterdam: North Holland Publication Co, 1970, 59: 1 – 275.
- [36] 李志强, 郭宝成, 李俊兵, 等. 贝叶斯联合模型与中国洞穴鱼类分歧时间的估算 (鲤科: 金线鲃属) [J]. *科学通报*, 2008, 53 (13): 1560 – 1569.
- [37] NYLANDER J A A, RONQUIST F, HUELSENBECK J P, *et al.* Bayesian phylogenetic analysis of combined data [J]. *Systems Biology*, 2004, 53: 47 – 67.
- [38] BRANDLEY M C, SCHMITZ A, REEDER T W. Partitioned Bayesian analyses, partition choice, and the phylogenetic relationships of scincid lizards [J]. *Systems Biology*, 2005, 54: 373 – 390.
- [39] LARKUM A W D, DEN HARTOG C. Evolution and biogeography of seagrass [C] // LARKUM A W D, MCCOMB A J, SHEPHERD S A. Eds. *Biology of Seagrass*. Amsterdam: Elsevier, 1989: 112 – 156.
- [40] KORIBA K, MIKI S. Observation on *Archaeozostera* from Upper Cretaceous Izumi sandstone [J]. *Chikyū (The Globe)*, 1931, 15: 165 – 201.
- [41] KORIBA K, MIKI S. *Archaeozostera*, a new genus from Upper Cretaceous in Japan [J]. *Palaeobotanist*, 1958, 7: 107 – 110.
- [42] AIOI K. A daybreak in the studies on Japanese *Zostera* beds [J]. (in Japanese with English abstract). *Aquabiology*, 2000, 22: 516 – 523.
- [43] 屈良鹄, 陈月琴. 生物分子分类检索表 – 原理与方法 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1999, 38 (1): 1 – 6.
- [44] 张宏意, 廖文波, 陈月琴, 等. 大血藤的 rDNA ITS 序列分析 [J]. *广西植物*, 2008, 28 (6): 737 – 740.
- [45] 向建英, 管开云, 杨俊波. 应用 ITS 区序列对秋海棠属无翅组分类学问题的探讨 [J]. *云南植物研究*, 2002, 24 (4): 455 – 462.

Phylogenetic relationship in five *Zosteraceae* species based on *matK*, *rbcL* and ITS partial sequences

LI Yuan¹, SUN Dian-rong², LI Wen-tao¹, ZHANG Pei-dong¹, JIANG Xin¹,
GUO Dong¹, GAO Tian-xiang^{1*}

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Fragments of the nuclear ribosome (ITS) and the chloroplast (*matK* and *rbcL*) regions were successfully suitable for phylogenetic relationship analysis. With sequencing by PCR amplification, the paper analyzed the phylogenetic relationship of 5 *Zosteraceae* species (*Zostera marina*, *Z. japonica*, *Z. caespitosa*, *Z. asiatica* and *Phyllospadix iwatensis*), which were collected from Ireland, Japan, Korea, China and GenBank. Partial nucleotide sequences of *matK*, *rbcL* gene and ITS were analyzed for five *Zosteraceae* species, and nucleotide composition analysis indicated a strong bias against cytosine (C) in three fragments. 172 nucleotide substitutions were found in ITS fragment, showing the high genetic polymorphism. 52 nucleotide substitutions were checked in *matK* gene and 20 nucleotide substitutions were checked in *rbcL* gene, most of them were synonymous transitions at the third codon positions. The five species had a certain degree of differentiation at the amino acid level. Based on partial sequences of *matK*, *rbcL* and ITS gene, phylogenetic trees were constructed by NJ, MP, ML and Bayes methods and the results were consistent and the phylogenetic trees showed three separate lineages. The minimum pairwise divergences percentage in the samples of *Z. japonica* and other *Zostera* species was 19.33% and much higher than the standard (9.60% – 28.80%) among genera of most angiosperm and it would be the generic rank from the molecular data. Based on the synonymous nucleotide substitution rate of the rice chloroplast genome *matK* combined with *rbcL* gene, we estimated the divergence time between 5 *Zosteraceae* species approximately arranged from Eocene to Pliocene. The ITS sequences of all *Z. marina* samples were identical, which fell into the same cluster. It was concluded that variation within ITS region of *Z. marina* was not correlated to their geographical distance, and ITS region was unsuitable for identification of population groups on a regional or oceanic scale. The paper further elaborated phylogenetic relationship of 5 *Zosteraceae* species, and also provided theoretic basis for seagrass phylogeny in China.

Key words: *Zostera*; *Phyllospadix*; *matK*; *rbcL*; internal transcribed spacer; phylogenetic relationship

Corresponding author: GAO Tian-xiang. E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn