

不同地理种群瓦氏马尾藻 ITS 序列特征及其系统进化分析

毕燕会, 杨旭, 周志刚*

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为研究不同地理种群瓦氏马尾藻 ITS 的序列变异, 实验采用 PCR 扩增和序列测定方法, 获得了 3 个不同地理种群 15 株瓦氏马尾藻的 ITS 全长序列, 并进行序列分析。结果显示, 15 个个体共出现 4 种不同的 ITS 序列, 它们相应的 ITS1、5.8S、ITS2 长度相同, 均为 762、158 和 507 bp, 共有 3 个位点发生碱基变异。结合从 GenBank 中下载的马尾藻科 3 个属 24 种马尾藻的 ITS 序列, 以羊栖菜属的羊栖菜, 喇叭藻属的拟小叶喇叭藻和下延喇叭藻作为 3 个外群, 采用邻位相连法构建分子系统进化树, 结果显示, 瓦氏马尾藻的 ITS 序列优先聚在一起然后以较高的置信度与南海马尾藻和球囊马尾藻聚为一支, 在系统发生上显示出更近的亲缘关系。在选取的马尾藻中瓦氏马尾藻与南海马尾藻遗传距离最近为 0.004, 与拟小叶喇叭藻遗传距离最远为 0.422。

关键词: 瓦氏马尾藻; ITS 序列; 地理种群; 系统进化; 遗传距离

中图分类号: Q 785; S 917.3

文献标志码: A

瓦氏马尾藻 (*Sargassum vachellianum* C. Agardh) 属于褐藻门 (Phaeophyta)、褐藻纲 (Phaeophyceae)、墨角藻目 (Fucales)、马尾藻科 (Sargassaceae Kuetzing)、马尾藻属 (*Sargassum* C. Agardh) 是中国特有藻种, 主要分布在浙江、福建、广东和香港海域^[1]。瓦氏马尾藻藻体高达 80 cm, 生活在低潮带和潮下带岩石上, 是形成我国东部沿海海藻床的主要成员, 起着重要的生态意义, 已被海洋生态学家列为重建海底藻场和实施海洋生态修复的重要物种之一。马尾藻属是褐藻纲最大的属, 全世界共有 400 多种, 我国也多达 130 种^[1]。长期以来, 马尾藻的分类主要参考以外部形态为基础的 Agardh 分类系统^[2]。但近十年来, 随着分子生物学在分类学研究中的应用, 马尾藻分子分类系统与传统分类产生很多分歧, 比如根据分子分类系统, Stiger 等^[3-4] 提出将叶囊组 (*S. section Phyllocystae*) 从反曲叶亚属 (*Bactrophyucus*) 移至真马尾藻亚属 (*S. subgen. Sargassum*); Mattio 等^[5] 将 *S. sinclairii* 从节叶亚属 (*S. subgen. Arthrophyucus*)

移至反曲叶亚属; Yoshida 等^[6] 将裂叶亚属 (*S. subgen. Schizophycus*) 合并入真马尾藻亚属等。但是, 瓦氏马尾藻依据分子标记进行的系统分类与传统分类是否一致, 目前尚未有报道。另外, 马尾藻外部形态容易随生活环境发生改变, 造成种内形态差异, 产生很多同种异名和错误命名现象^[7]。比如 *S. debile* 和 *S. ornatum* 是 *S. glaucescens* 的同物异名; *Carpacanthus heterocystus* Kuetzing 是 *S. heterocystum* Montagne 的同物异名等等^[1]。瓦氏马尾藻 (*S. vachellianum*) 也曾因与草叶马尾藻 (*S. graminifolium*) 外部形态相似长期被认为是同一物种^[8], 直到 1935 年才由 Setchell 根据藻叶的厚度、藻叶上毛窝的多少和生殖托是否密集将二者分开, 定为 2 个独立的种^[1]。因此, 有必要利用分子标记进行瓦氏马尾藻的物种鉴定和系统分类研究。

核糖体 DNA 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列具有进化速度相对较快, 能够积累更多的变异, 同时拥有明显的序列长度多态性, 能广泛地应用于同属近缘种甚至同种

收稿日期: 2014-05-24 修回日期: 2014-07-03

资助项目: 海洋公益性行业科研专项 (20111418008); 国家自然科学基金青年项目 (31201992); 上海海洋大学一流学科海洋科学项目

通信作者: 周志刚, E-mail: zgzhou@shou.edu.cn

不同地理种群的进化关系研究^[9-12],已被广泛应用于马尾藻分子系统分类研究中^[13-15]。但目前尚未有瓦氏马尾藻 ITS 序列的相关报道。针对 ITS 序列存在地理种群甚至个体间序列变异,本研究通过 PCR 扩增及测序方法获得和比较了浙江南麂岛、福建崇武和广东汕头 3 个地理种群的瓦氏马尾藻 ITS 序列,并结合 GenBank 数据库中马尾藻科各种属 ITS 序列,从分子水平上探讨其系统分类,为瓦氏马尾藻物种鉴定和分子系统学研究提供更多的数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验选用浙江南麂岛(27°37'371"N, 121°10'144"E)、福建崇武(24°66'355"N, 118°02'741"E)、广东汕头(23°28'872"N, 117°06'721"E)瓦氏马尾藻(*S. vachellianum*)野生种群个体为实验材料。采集的叶状体于海水中保存,空运至实验室。样品用抽滤海水充分清洗以去除附着在表面的藻

类和附生的海洋动物,按株分装,放置于-80℃下冷冻保存。

1.2 DNA 提取

每个地理种群取 5 株保存藻体,剪取叶状体组织约 100 mg 放入研钵中加入液氮充分研磨成粉末状,用植物基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)按照试剂盒说明书进行基因组 DNA 提取;并使用植物基因组纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行 DNA 纯化。1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度。然后将纯化后的基因组 DNA 置于-20℃下保存。

1.3 ITS 序列测定

据本实验室扩增获得的瓦氏马尾藻 18S rDNA 序列(登录号:JQ327705)和海黍子(*S. muticum*)28S rDNA 序列(登录号:AF053109.1)利用 Primer Premier 5.0 设计引物 ITS-F: 5'-CCGATTGAATGTTTCGGTGAAGATT-3', ITS-R: 5'-CTTCGCTTCCCTTTCAGCAATTCA-3', 引物位置见图 1。

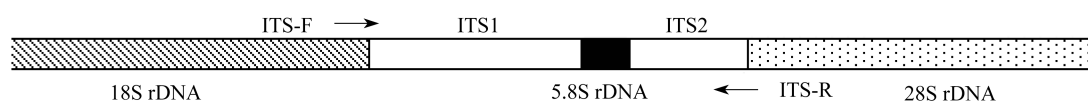


图 1 ITS 引物的扩增区域

Fig. 1 Locations of ITS forward and reverse primers on *S. vachellianum* genome

PCR 反应条件:94℃变性 1 min;30 个循环包括 94℃变性 30 s,63.5℃退火 2 min,72℃延伸 2 min;72℃延伸 7 min。25 μL 反应体系:12.5 μL 天根 2×Taq PCR MasterMix[0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μmol/L dNTP, 20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.3), 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂], 10 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL, 10.5 μL ddH₂O, 1 μL 基因组 DNA。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,使用 TIANgel Midi Purification Kit(北京天根生化科技有限公司)胶回收纯化,连接 pMD19-T 载体(TaKaRa 宝生物工程有限公司)并转化至感受态 *E. Coli* DH5α(北京天根生化科技有限公司),经氨苄青霉素抗性筛选阳性克隆,每个个体随机挑选 4 个克隆送生工生物工程技术服务(上海)有限公司测序,避免测序误差以保证序列准确性。

1.4 数据分析

利用 SeqMan 软件对所有测序数据进行峰图

校正和序列拼接,然后利用 Clustal X(1.83)^[16]对每一个体的 4 个克隆序列进行比对和校正,最终得到 15 株瓦氏马尾藻完整的 ITS 序列。用 BioEdit 软件^[17]计算各 ITS 的 GC 含量。从 GenBank 中下载褐藻门 5 个目 7 个科 13 个属中一些物种的 ITS 全长序列,分析 ITS 长度变化特征。同时从 GenBank 中下载马尾藻科 3 个属不同物种的 ITS 序列(GenBank 序列号及详细信息见表 1),通过 Clustal X(1.83)^[16]软件进行比对,用 BioEdit 软件^[17]对序列进行人工编辑,以羊栖菜属(*Hizikia*)的羊栖菜(*H. fusiforme*),喇叭藻属(*Turbinaria*)的拟小叶喇叭藻(*T. conoides*)和下延喇叭藻(*T. decurrens*)作为 3 个外群,利用 MEGA 4.0 软件^[18]采用邻位相连法(Neighbor-Joining, NJ)构建分子系统进化树,Bootstrap 置信值估算重复次数 1 000 次;同时基于 Kimura 双参数法计算种间的遗传距离^[19]。

表 1 GenBank 下载 ITS 序列来源及序列号
Tab.1 Detailed information of ITS sequences from GenBank used in the study

属 genus	种 species	来源 source of reference	GenBank 登录号 accession number
马尾藻属 <i>Sargassum</i>	果叶马尾藻 <i>S. carpophyllum</i>	Mattio 等 ^[2]	EU100799.1
	软叶马尾藻 <i>S. tenerrimum</i>		JN038383.1
	南海马尾藻 <i>S. sp.</i>	Mattio 等 ^[13]	HQ416070
	瓦氏马尾藻 <i>S. vachellianum</i>	本研究	KJ855998, KJ855999, KJ856000, KJ856001
	硬叶马尾藻 <i>S. aquifolium</i>	Mattio 等 ^[13]	HQ416073
	斯氏马尾藻 <i>S. swartzii</i>		JN038387.1
	宾德马尾藻 <i>S. binderi</i>		AB043116.1
	重缘叶马尾藻 <i>S. duplicatum</i>		AB043614.1
	冠叶马尾藻 <i>S. cristaeifolium</i>		AY315628.1
	厚叶马尾藻 <i>S. crassifolium</i>		AB043118.1
	山德马尾藻 <i>S. sandei</i>		AY315635.1
	冬青叶马尾藻 <i>S. ilicifolium</i>	Mattio 等 ^[13]	HQ416061
	铜藻 <i>S. horneri</i>		AB043776.1
	裂叶马尾藻 <i>S. siliquastrum</i>		AB043778.1
	半叶马尾藻 <i>S. hemiphyllum</i>	Cheang 等 ^[20]	FJ712756
	海蒿子 <i>S. confusum</i>		AY150001
	海黍子 <i>S. muticum</i>	McDevit 等 ^[21]	FJ042709
	鼠尾藻 <i>S. thunbergii</i>		AB043777.1
	无肋马尾藻 <i>S. fulvellum</i>		AB043572
	球囊马尾藻 <i>S. piluliferum</i>		AY150019
	展枝马尾藻 <i>S. patens</i>		AB043666
	莫氏马尾藻 <i>S. mcclurei</i>		AB043111.1
	羊栖菜属 <i>Hizikia</i>	羊栖菜 <i>H. fusiforme</i>	
喇叭藻属 <i>Turbinaria</i>	拟小叶喇叭藻 <i>T. conoides</i>	Rohfritsch 等 ^[22]	DQ448828.1
	下延喇叭藻 <i>T. decurrens</i>	Mattio 等 ^[13]	EU882258.1

2 结果

2.1 瓦氏马尾藻 ITS 序列特点

通过 PCR 扩增及序列测定,得到 15 株瓦氏马尾藻 ITS 全长序列和部分 18S、28S 序列,根据 GenBank 数据库发布的 ITS 序列,确定 ITS1、5.8S、ITS2 的序列范围。Clustal X (1.83)^[16] 序列比对结果表明,15 株藻体共出现 4 种不同的 ITS 序列:11 株藻体的 ITS 序列相同标记为 vITS;与 vITS 相比,两株南鹿岛个体 ITS 序列 557 位点发生 G-A 突变、1108 位点发生 A-G 突变,标记为 vITS-N;1 株崇武个体 1108 位点发生 A-G 突变,标记为 vITS-C;1 株汕头个体 603 位点发生 T-A 突变,标记为 vITS-S。它们相应的 ITS1、5.8S、ITS2 长度相同,均为 762、158 和 507 bp,只是 3 个位点发生碱基变异,但未出现地理种群特异位点,序列比对见图 2。这 4 个序列的 ITS1、5.8S、

ITS2 的 GC 含量基本相同分别为 58.79%、54.43% 和 59.76%。GenBank 序列登录号分别为 KJ855998、KJ855999、KJ856000 和 KJ856001。

2.2 瓦氏马尾藻 ITS 序列的长度

分析比较 GenBank 中墨角藻目马尾藻科、墨角藻科和褐藻门其他 4 个目的一些物种的 ITS 全长序列(表 2),结果显示多数褐藻门藻种 ITS1 序列长度大于 ITS2;瓦氏马尾藻 ITS1 长度为 762 bp,ITS2 为 507 bp,比值为 1.5。另外,不同科间 ITS 序列长度变化没有规律,而科内物种 ITS 序列长度差别较小,其中马尾藻科的 ITS 序列长度为 1368~1592 bp;瓦氏马尾藻 ITS 序列全长为 1427 bp,位于马尾藻科范围之内。与 ITS1 和 ITS2 相比,5.8S 序列长度在不同目物种间相对稳定,介于 153~160 bp;瓦氏马尾藻 5.8S 序列长度为 158 bp,与褐藻门其他物种相比仅有几个碱基的长度差异,表现出极强的保守性。

```

      550      560      570      580      590      600      610
vITS-N: GGCATTTCGATCGTTGGCGGCCCGGGCGGCCTACGCGGCACGTTGGCGTGGTGTGTTGCTCTTGT
vITS-C: .....G.....
vITS: .....G.....
vITS-S: .....G.....A.....
*****

      1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160
vITS-N: GCTGGAGACGGGTCTACCTTGCCTCCGGAAGATGCGTTGTTGACCTCACCCCTCTCGCG
vITS-C: .....
vITS: .....A.....
vITS-S: .....A.....
*****

```

图 2 瓦氏马尾藻 4 种 ITS 的变异位点区序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of four *S. vachellianum* ITS fragments with mutational sites

表 2 褐藻门不同来源 ITS 序列长度比较

Tab. 2 Lengths of complete sequences of ITS1, 5.8S and ITS2 from the selected algae of phaeophyta

分类		物种		ITS1	5.8S	ITS2	ITS 全长	登录号
classification		species					full length	accession number
墨角藻目	墨角藻科	墨角藻属 <i>Fucus</i>	<i>F. spiralis</i>	448	153	353	969	AF102909.1
	Fucales	Fucaceae						
		墨角藻属 <i>Fucus</i>	<i>F. vesiculosus</i>	482	154	352	988	AF102931.1
		鹿角菜属 <i>Silvetia</i>	白氏鹿角菜 <i>S. compressa</i>	404	153	398	955	AF102956.1
		鹿角菜属 <i>Silvetia</i>	白氏鹿角菜 <i>S. babingtonii</i>	401	153	409	963	AF102957.1
		鹿角菜属 <i>Silvetia</i>	鹿角菜 <i>S. siliquosa</i>	400	153	385	938	AF102960.1
		泡叶藻属 <i>Ascophyllum</i>	泡叶藻 <i>A. nodosum</i>	410	153	326	889	AF102971.1
	马尾藻科	羊栖菜属 <i>Hizikia</i>	羊栖菜 <i>H. fusiforme</i>	868	158	566	1 592	JQ807792.1
	Sargassaceae							
		马尾藻属 <i>Sargassum</i>	鼠尾藻 <i>S. thunbergii</i>	845	158	561	1 564	JQ807793.1
		马尾藻属 <i>Sargassum</i>	海黍子 <i>S. muticum</i>	732	153	567	1 452	FJ042707.1
		马尾藻属 <i>Sargassum</i>	硃洲马尾藻 <i>S. naozhouense</i>	851	158	359	1 368	JF710314.1
		马尾藻属 <i>Sargassum</i>	瓦氏马尾藻 <i>S. vachellianum</i>	762	158	507	1 427	KJ855998, KJ855999, KJ856000, KJ856001
		马尾藻属 <i>Sargassum</i>	斜叶马尾藻 <i>S. plagiophyllum</i>	770	157	524	1 451	KF692547.1
		马尾藻属 <i>Sargassum</i>	围氏马尾藻 <i>S. wightii</i>	771	158	640	1 569	KF692549.1
海带目	翅藻科	翅藻属 <i>Alaria</i>	<i>A. marginata</i>	246	160	259	665	AF362997.1
Laminariales	Alariaceae							
		裙带菜属 <i>Undaria</i>	裙带菜 <i>U. pinnatifida</i>	242	160	273	675	AF319007.1
	海带科	<i>Saccharina</i>	<i>S. groenlandica</i>	242	153	275	670	FJ042751.1
	Laminariaceae	海带属 <i>Laminaria</i>	北极海带 <i>L. solidungula</i>	244	153	274	671	FJ042757.1
黑顶藻目	黑顶藻科	黑顶藻属 <i>Sphacelaria</i>	<i>S. caespitula</i>	237	158	290	685	AJ311819.1
Sphacelariales	Sphacelariaceae							
		黑顶藻属 <i>Sphacelaria</i>	总状黑顶藻 <i>S. racemosa</i>	287	158	275	720	AJ311817.1
		黑顶藻属 <i>Sphacelaria</i>	<i>S. nana</i>	303	158	265	726	AJ311816.1
酸藻目	酸藻科	酸藻属 <i>Desmarestia</i>	<i>D. dudresnayi</i>	256	158	359	773	AJ439832.1
Desmarestiales	Desmarestiaceae							
		酸藻属 <i>Desmarestia</i>	<i>D. menziesii</i>	247	158	320	725	AJ243781.1
水云目	水云科	水云属 <i>Ectocarpus</i>	<i>E. crouaniorum</i>	867	158	263	1 288	FN564442.1
Ectocarpales	Ectocarpaceae							
		水云属 <i>Ectocarpus</i>	长囊水云 <i>E. siliculosus</i>	870	158	263	1 291	U38770.1
		库氏藻属 <i>Kuckuckia</i>	<i>K. sp.</i>	829	158	274	1 261	U38830.1

2.2 系统进化分析

NJ 进化树显示,马尾藻科 3 个属的 25 种马尾藻形成 3 个分支,其中喇叭藻属作为外群聚为一支,马尾藻属明显分为两支,分别是真马尾藻亚

属和反曲叶亚属,每一分支都具有较高的置信度,说明除少数物种(展枝(*S. patens*)、球囊(*S. piluliferum*)、莫氏马尾藻(*S. mcclurei*))外 ITS 能够将所有物种按照各自所属类群进行准确分类:

来自同一科的不同属各聚为一支,来自同一属不同亚属的物种优先聚在一起,显示出较近的亲缘关系,如马尾藻科的马尾藻属和喇叭藻属,马尾藻属的反曲叶亚属和真马尾藻亚属;但是亚属内组的分类与传统分类不完全一致:真马尾藻亚属的刺托组[图 3-I,III]物种没有完全聚类为一支,叶托混生组[图 3-II]也未聚类为完整的一支,体现

出与仅依据形态进行马尾藻分类的分歧。本研究中的瓦氏马尾藻的 4 个 ITS 序列优先聚在一起然后以较高的置信度与南海马尾藻(*S. sp.*)和球囊马尾藻聚为一支,在系统发生上显示出更近的亲缘关系。在选取的马尾藻中瓦氏马尾藻与南海马尾藻遗传距离最近为 0.004,与拟小叶喇叭藻遗传距离最远为 0.422(表 3)。

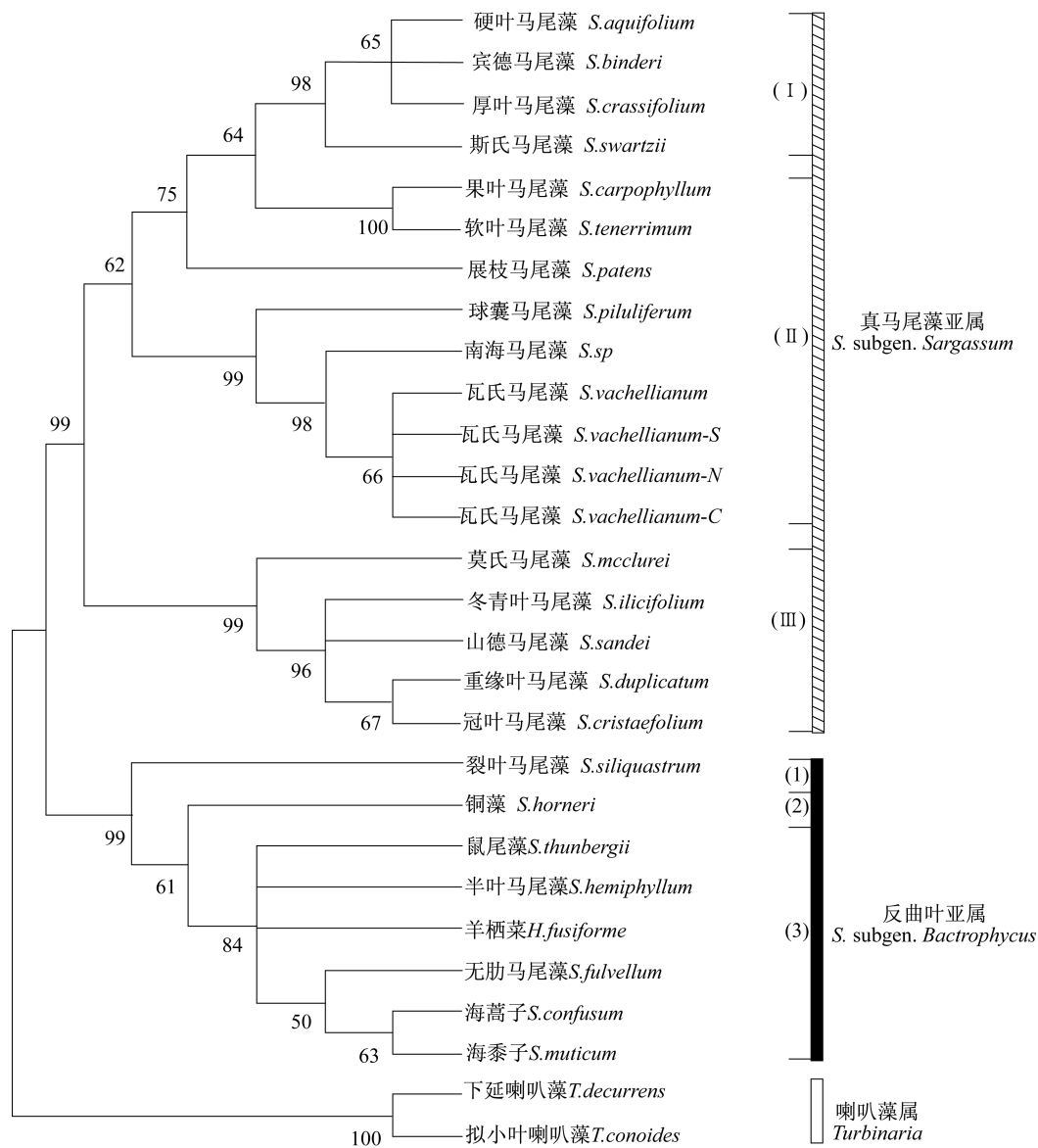


图 3 基于 ITS 序列通过 NJ 法构建的分子系统树

(I) ~ (III) 表示真马尾藻亚属的 3 个分支; (1) ~ (3) 表示反曲叶亚属的分组, (1) 反曲叶组; (2) 长干组; (3) 圆柱形组

Fig. 3 Phylogenetic affinities within the selected *Sargassums*, implemented by the NJ method based on ITS alignment

The numbers in parentheses (I) - (III) indicate the three clades within the subgenus *Sargassum*. (1) - (3) indicate three sections within the subgenus *Bactrophyucus*, each corresponding to the sections as follows: (1) Section *Halochloa*; (2) sect. *Spongocarpus*; and (3) sect. *Teretia*. The numbers at each node represent bootstrap values (1 000 replicates)

表 3 25 种马尾藻种间的 Kimura 双参数法遗传距离
Tab.3 Pairwise genetic distances between species used in this study

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
海蒿子 <i>S. confusum</i>																												
海黍子 <i>S. muticum</i>	0.012																											
无肋马尾藻 <i>S. fubvellum</i>	0.029	0.016																										
半叶马尾藻 <i>S. hemiphyllum</i>	0.037	0.033	0.042																									
鼠尾藻 <i>S. thunbergii</i>	0.033	0.020	0.029	0.033																								
羊栖菜 <i>H. fusiforme</i>	0.055	0.050	0.059	0.064	0.046																							
鞘藻 <i>S. hornei</i>	0.081	0.068	0.077	0.085	0.059	0.081																						
裂叶马尾藻 <i>S. siliquastrum</i>	0.059	0.046	0.054	0.063	0.037	0.058	0.050																					
果叶马尾藻 <i>S. carpophyllum</i>	0.381	0.366	0.373	0.356	0.359	0.426	0.407	0.368																				
软叶马尾藻 <i>S. tenerrimum</i>	0.381	0.366	0.373	0.356	0.359	0.426	0.407	0.368	0.000																			
硬叶马尾藻 <i>S. aquifolium</i>	0.183	0.168	0.173	0.182	0.162	0.198	0.177	0.137	0.253	0.253																		
宾德马尾藻 <i>S. binderi</i>	0.183	0.168	0.173	0.182	0.162	0.198	0.177	0.137	0.253	0.253	0.000																	
厚叶马尾藻 <i>S. crassifolium</i>	0.183	0.168	0.173	0.182	0.162	0.198	0.177	0.137	0.253	0.253	0.000	0.000																
斯氏马尾藻 <i>S. swartzii</i>	0.189	0.173	0.178	0.188	0.168	0.204	0.183	0.142	0.259	0.259	0.008	0.008	0.008															
展枝马尾藻 <i>S. patens</i>	0.187	0.177	0.177	0.186	0.166	0.202	0.181	0.146	0.280	0.280	0.054	0.054	0.059	0.059														
瓦氏马尾藻 <i>S. vachellianum</i>	0.186	0.171	0.177	0.180	0.155	0.197	0.170	0.141	0.292	0.292	0.081	0.081	0.081	0.086	0.081													
瓦氏马尾藻 <i>S. vachellianum-S</i>	0.186	0.171	0.177	0.180	0.155	0.197	0.170	0.141	0.292	0.292	0.081	0.081	0.081	0.086	0.081	0.000												
瓦氏马尾藻 <i>S. vachellianum-N</i>	0.186	0.171	0.177	0.180	0.155	0.197	0.170	0.141	0.292	0.292	0.081	0.081	0.081	0.086	0.081	0.000	0.000											
瓦氏马尾藻 <i>S. vachellianum-C</i>	0.186	0.171	0.177	0.180	0.155	0.197	0.170	0.141	0.292	0.292	0.081	0.081	0.081	0.086	0.081	0.000	0.000	0.000										
南海马尾藻 <i>S. sp</i>	0.187	0.171	0.177	0.180	0.156	0.197	0.171	0.142	0.285	0.285	0.086	0.086	0.090	0.085	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004									
球囊马尾藻 <i>S. pituliferum</i>	0.177	0.161	0.167	0.171	0.146	0.187	0.161	0.132	0.287	0.287	0.072	0.072	0.072	0.077	0.072	0.020	0.020	0.020	0.020	0.025								
重缘叶马尾藻 <i>S. duplicatum</i>	0.198	0.182	0.182	0.192	0.172	0.214	0.188	0.152	0.328	0.328	0.110	0.110	0.110	0.115	0.100	0.104	0.104	0.104	0.104	0.109	0.091							
冠叶马尾藻 <i>S. cristaefolium</i>	0.198	0.182	0.182	0.192	0.172	0.214	0.188	0.152	0.316	0.316	0.110	0.110	0.110	0.115	0.100	0.104	0.104	0.104	0.104	0.109	0.091	0.008						
山德马尾藻 <i>S. sandei</i>	0.188	0.172	0.172	0.182	0.162	0.204	0.178	0.142	0.316	0.316	0.100	0.100	0.100	0.105	0.091	0.095	0.095	0.095	0.095	0.100	0.082	0.008	0.008					
冬青叶马尾藻 <i>S. ilicifolium</i>	0.188	0.172	0.172	0.182	0.162	0.204	0.178	0.142	0.316	0.316	0.100	0.100	0.100	0.105	0.091	0.095	0.095	0.095	0.095	0.100	0.082	0.008	0.008	0.000				
莫氏马尾藻 <i>S. mclurei</i>	0.197	0.182	0.182	0.191	0.171	0.214	0.187	0.152	0.321	0.321	0.109	0.109	0.109	0.114	0.104	0.104	0.104	0.104	0.104	0.109	0.095	0.033	0.024	0.024				
下延喇叭藻 <i>T. decurrens</i>	0.297	0.278	0.286	0.289	0.265	0.308	0.279	0.235	0.540	0.540	0.292	0.292	0.292	0.299	0.296	0.266	0.266	0.266	0.266	0.273	0.267	0.305	0.299	0.293	0.286			
拟小叶喇叭藻 <i>T. conoides</i>	0.407	0.396	0.406	0.401	0.388	0.409	0.404	0.359	0.608	0.608	0.412	0.412	0.412	0.421	0.409	0.422	0.422	0.422	0.422	0.430	0.410	0.427	0.421	0.414	0.419	0.206		

注:与瓦氏马尾藻物种间最小和最大遗传距离用下划线标注

Notes: The smallest and greatest pairwise genetic distances of *S. vachellianum* are underlined

3 讨论

3.1 瓦氏马尾藻 ITS 序列长度特征

与已报道的马尾藻科其他物种类似,本研究获得的瓦氏马尾藻 ITS1 的长度大于 ITS2,其比值 1.5 位于墨角藻目 ITS1/ITS2 比值 1.0~1.6 的范围内^[15]。另外,多数褐藻门藻类 ITS1 的长度大于 ITS2,这与绿藻门类似,绿藻门 ITS1 长度为 416~531 bp,ITS2 为 291~405 bp^[23-25];而与红藻门相反,红藻门多数 ITS2 的序列长度大于 ITS1,ITS1 为 151~563 bp,ITS2 为 350~799 bp^[26-27]。

3.2 瓦氏马尾藻的分类地位

基于 ITS 序列的系统进化树中,与传统分类一致,瓦氏马尾藻聚在真马尾藻亚属一支,但在分支聚类中,却以较高的置信度与南海马尾藻和叶枝亚属(*S. subgen. Phyllotrichia*)的球囊马尾藻聚在一起,在系统发生上显示出更近的亲缘关系,体现出与传统分类的分歧。这一结果并不矛盾,因为球囊马尾藻的传统分类地位很早就受到质疑。鉴于该藻是叶枝亚属中唯一分布于北半球的藻种,Tseng 等^[28]早在 1983 年就对其叶枝亚属的系统分类提出质疑。另外,Stiger 等^[4]认为虽然其分枝和藻叶十分相似,符合叶枝亚属的典型特征,但其具有简单分叉的生殖托,与真马尾藻亚属物种特征相似,并且通过 ITS 系统分类,把它归入真马尾藻亚属。在本研究中,球囊马尾藻与瓦氏马尾藻以高置信度聚类在真马尾藻亚属不仅支持 Stiger 的观点,还体现出二者较近的亲缘关系。

3.3 马尾藻的传统分类和分子标记系统分类

随着分子标记在马尾藻分类中的应用,马尾藻很多物种的分类地位进行了修订,但总体上属的分类与传统分类一致,亚属分类中有一些物种归属需要修订,而在亚属内组的分类就比较模糊^[5,29],这可能与马尾藻随生活条件的不同形态变异很大有关。

在本研究的 ITS 系统进化树中,除了球囊马尾藻外,还有展枝马尾藻、莫氏马尾藻和羊栖菜的分类地位与传统分类不一致。展枝马尾藻传统分类中属于叶枝亚属,在分子进化树中却聚类在真马尾藻亚属中,这并不偶然,Stiger 等^[4]通过 ITS 分子标记进行马尾藻系统分类,也将展枝马尾藻移入真马尾藻亚属,体现出传统依据外部形态进

行分类和分子系统演化的不一致性,Mattio 等^[30]指出鉴于叶枝亚属中种的分类的变化,有必要对传统分类系统中属于叶枝亚属的物种以及用于鉴别该亚属的典型形状特征进行重新评估。

此外,作为外群的羊栖菜在分子进化树中聚类到马尾藻属的反曲叶亚属分支,与传统分类中属于单型羊栖菜属不一致。关于羊栖菜的系统地位,有不同的意见,日本藻类学家 Okamura^[31]认为羊栖菜形态上没有分化明显的叶片和气囊,于是建立了一个新属羊栖菜属 *Hizikia okamura*,但是羊栖菜作为一个单型属的系统分类方法也仅限于日本、韩国和中国^[32]。美国藻类学家 Setchell^[33]认为羊栖菜和马尾藻属的鼠尾藻(*S. thunbergii*)非常相似,应移到马尾藻属反曲叶亚属中;Lee 等^[34]也认为羊栖菜形态上具有基生叶、次生分枝从初生分枝的叶腋处长出、生殖托从叶腋处长出的特征与马尾藻相似,对羊栖菜作为单型属的系统分类提出质疑;Ajisaka^[35]在对墨角藻目依据形态学特征进行系统进化分析时指出羊栖菜应归入反曲叶亚属,位置上紧挨着半叶马尾藻(*S. hemiphylum*),这与本研究结果一致。Stiger 等^[4]利用 ITS-2 nrDNA 序列作为系统演化分子标记,认为把羊栖菜作为反曲叶亚属的一个独立的组比较恰当,恢复羊栖菜 *S. fusiforme* 的种名,归入一个新组 *S. sect. Hizikia* (Okamura) Yoshida。因此,综合以上观点,羊栖菜应重新归入马尾藻属反曲叶亚属,而是否把其作为一个新组,需要更多物种 ITS 序列的提交和依据多种分子标记进行系统分析。

对于莫氏马尾藻,最先定位在节叶亚属(*Arthrophyucus*)^[36],后来移入反曲叶亚属^[28],2000 年又由 Stiger 等^[3]基于 ITS-2 序列分析将其移入真马尾藻亚属,本研究莫氏马尾藻以高的置信度与真马尾藻亚属刺托组物种聚类,支持其属于真马尾藻亚属。

综上所述,本研究利用 ITS 分子标记进行瓦氏马尾藻分子系统分类,结果显示其与南海马尾藻和球囊马尾藻在系统发生上具有更近的亲缘关系。在马尾藻分子系统分类研究中,常用的分子标记有核糖体 DNA 内转录间隔区序列-2(internal transcribed spacer 2,ITS-2)、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase,RubisCO)和细胞色素氧

化酶 3 (cytochrome oxidase 3,cox3)^[5],另外还有线粒体 DNA 间隔区 (mitochondrial spacer, mtsp) 和细胞色素氧化酶 I (cytochrome oxidase subunit I,COI)^[13]。但是目前还未确定适合作为马尾藻 DNA 条形码的分子标记,马尾藻分子系统分类研究仅是对一些物种的传统分类地位提出质疑和分类修订建议。相信随着对马尾藻分子标记研究的深入和积累将促进马尾藻 DNA 条形码的建立,结合马尾藻形态学特征,从而使物种繁多、形态多变的马尾藻物种鉴定和种间系统发生关系研究更加清晰。

参考文献:

- [1] Zeng C K, Lu B R. Fucales. Phaeophyta. Icones of Chinese algae [M]. Beijing: Science Press, 2000. [曾呈奎, 陆保仁. 中国海藻志 褐藻门 墨角藻目. 北京: 科学出版社, 2000.]
- [2] Mattio L, Payri C E, Stiger-Pouvreau V. Taxonomic revision of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from French Polynesia based on morphological and molecular analyses [J]. Journal of Phycology, 2008, 44(6): 1541 - 1555.
- [3] Stiger V, Horiguchi T, Yoshida T, et al. Phylogenetic relationships of *Sargassum* (Sargassaceae, Phaeophyceae) with reference to a taxonomic revision of the section Phyllocystae based on ITS-2 nrDNA sequences [J]. Phycological Research, 2000, 48(4): 251 - 260.
- [4] Stiger V, Horiguchi T, Yoshida T, et al. Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from ITS-2 nrDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus [J]. Phycological Research, 2003, 51(1): 1 - 10.
- [5] Mattio L, Payri C E. 190 years of *Sargassum* taxonomy, facing the advent of DNA phylogenies [J]. Botanical Review, 2011, 77(1): 31 - 70.
- [6] Yoshida T, Ajisaka T, Noro T, et al. Species of the genus *Sargassum* subgenus *Schizophycus* [M] // Abbott I A, Eds. Taxonomy of economic seaweeds with reference to the Pacific and other locations. Honolulu: Hawaii Sea Grant College Program, 2004: 93 - 106.
- [7] Kilar J A, Hanisak M D, Yoshida T. On the expression of phenotypic variability: Why is *Sargassum* so taxonomically difficult? [M] // Abbott I A, Norris J N, Eds. Taxonomy of economic seaweeds III. La Jolla: California Sea Grant College Program, University of California, 1992: 95 - 117.
- [8] Okamura K. Icones of Japanese Algae [M]. Tokyo: Kazama Shobō, 1936. [冈村金太郎. 日本海藻志 [M]. 东京: 内田老鹤圃, 1936.]
- [9] LaJeunesse T C. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: In search of a species level marker [J]. Journal of Phycology, 2001, 37(5): 866 - 880.
- [10] Santos S R, Taylor D J, Coffroth M A. Genetic comparisons of freshly isolated versus cultured symbiotic dinoflagellates: Implications for extrapolating to the intact symbiosis [J]. Journal of Phycology, 2001, 37(5): 900 - 912.
- [11] van Hannen E J, Lurling M, van Donk E. Sequence analysis of the ITS-2 region: A tool to identify strains of *Scenedesmus* (Chlorophyceae) [J]. Journal of Phycology, 2000, 36(3): 605 - 607.
- [12] González M A, Coleman A W, Gómez P I, et al. Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences [J]. Journal of Phycology, 2001, 37(4): 604 - 611.
- [13] Mattio L, Payri C. Assessment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales) [J]. Cryptogamie Algologie, 2010, 31(4): 467 - 485.
- [14] Oak J H, Suh Y, Lee I K. Phylogenetic Relationships of *Sargassum* subgenus *Bactrophycus* (Sargassaceae, Phaeophyceae) inferred from rDNA ITS Sequences [J]. Algae, 2002, 17(4): 235 - 247.
- [15] Serrão E A, Alice L A, Brawley S H. Evolution of the Fucaceae (Phaeophyceae) inferred from nrDNA-ITS [J]. Journal of Phycology, 1999, 35(2): 382 - 394.
- [16] Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3497 - 3500.
- [17] 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.
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596 - 1599.

- [19] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16 (2): 111 – 120.
- [20] Cheang C C, Chu K H, Ang P O Jr. Phylogeography of the marine macroalga *Sargassum hemiphyllum* (Phaeophyceae, Heterokontophyta) in northwestern Pacific [J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19 (14): 2933 – 2948.
- [21] McDevitt D C, Saunders G W. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol [J]. *Phycological Research*, 2009, 57 (2): 131 – 141.
- [22] Rohfritsch A, Payri C, Stiger V, et al. Molecular and morphological relationships between two closely related species, *Turbinaria ornata* and *T. conoides* (Sargassaceae, Phaeophyceae) [J]. *Biochemical Systemic Ecology*, 2007, 35 (2): 91 – 98.
- [23] Kooistra W H C F, Stam W T, Olsen J L, et al. Biogeography of *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences [J]. *Journal of Phycology*, 1992, 28 (5): 660 – 668.
- [24] Coleman A W. Phylogenetic analysis of “Volvocaceae” for comparative genetic studies [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1999, 96 (24): 13892 – 13897.
- [25] Fabry S, Kohler A, Coleman A W. Intraspecific analysis: comparison of ITS sequence data and gene intron sequence data with breeding data for a worldwide collection of *Gonium pectorale* [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1999, 48 (1): 94 – 101.
- [26] Goff L J, Ashen J, Moon D. The evolution of parasites from their hosts: A case study in the parasitic red algae [J]. *Evolution*, 1997, 51 (4): 1068 – 1078.
- [27] Patwary M U, Sensen C W, MacKay R M. Nucleotide sequences of small-subunit and internal transcribed spacer regions of nuclear rRNA genes support the autonomy of some genera of the Gelidiales [J]. *Journal of Phycology*, 1998, 34 (2): 299 – 305.
- [28] Tseng C K. *Sargassum* sect. *Phyllocystae* sect. nov. , a new section of *Sargassum* subgenus *Bactrophycus* [M] // Abbott I A, Norris J N, Eds. *Taxonomy of Economic Seaweeds*, La Jolla: California Sea Grant College Program, 1985: 15.
- [29] Yoshida T. Japanese species of *Sargassum* subgenus *Bactrophycus* (Phaeophyta, Fucales) [J]. *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Series V (Botany)*, 1983, 13 (2): 99 – 246.
- [30] Mattio L, Payri C E. Taxonomic revision of *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from New Caledonia based on morphological and molecular analyses [J]. *Journal of Phycology*, 2009, 45 (6): 1374 – 1388.
- [31] Okamura K. *Icones of Japanese Algae* [M]. Tokyo: Kazama Shobō, 1932: 99 – 100.
- [32] Tseng C K. *Common Seaweeds of China* [M]. Beijing: Science Press, 1983: 316.
- [33] Setchell W A. Hong-Kong seaweeds II. Sargassaceae [M] // Herklots G A C, Eds. *Hong-Kong naturalist supplement 2*. Hong-Kong: South China Morning Post, 1931: 237 – 253.
- [34] Lee Y P, Kamura S. Morphological variations of *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura (Sargassaceae, Phaeophyta) from the western coast of the North Pacific [J]. *The Korean Journal of Phycology*, 1997, 12 (2): 57 – 72.
- [35] Ajisaka T. Cladistic studies in the Fucales and the genus *Sargassum* (Phaeophyceae) from their morphological and anatomical characters [J]. *Phycologia*, 1997, 36 (4s): 1.
- [36] Setchell W A. Hong-Kong seaweeds III. Sargassaceae [M] // Herklots G A C, Eds. *Hong-Kong naturalist supplement 2*. Hong-Kong: South China Morning Post, 1933: 33 – 49.

Characterization and phylogenetic analysis of ITS sequences in three geographic populations of *Sargassum vachellianum* (Fucales, Phaeophyceae)

BI Yanhui, YANG Xu, ZHOU Zhigang*

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Sargassum vachellianum* C. Agardh is native to China and mainly distributed in coastal waters of Zhejiang, Fujian, Guangdong and Hong Kong, China. It is important in maintaining the structure and function of littoral ecosystems and has been chosen as the main candidate for seaweed bed reconstruction by artificial breeding in China. Thus, to conserve and sustainably use this species, we should make genetic studies on it. As the traditional classification and phylogenetic relationships in *Sargassum* have been challenged by DNA phylogenies and the status of numerous species have been re-assessed, it is necessary to know whether the traditional taxonomy of *S. vachellianum* needs to be revised. However, there was no DNA markers have been reported in this important species. In this study, we cloned and sequenced ITS sequences of 15 *S. vachellianum* individuals from 3 different geographic populations. As a result, 4 different ITS sequences were obtained. Sequence analysis revealed that the lengths of the four ITSs were all the same and their ITS1, 5.8S and ITS2 were 762, 158, and 507 bp, respectively. There were 3 mutations among the four ITS sequences, but no geographic population specific sites were found. The phylogenetic relationships among the four *S. vachellianum* ITSs and 24 GenBank ITS sequences from three genera of Sargassaceae were studied with sequences from *Hizikia fusiformis*, *Turbinaria conoides* and *T. decurrens* as three outgroups. The Neighbor-Joining phylogenetic tree constructed by MEGA 4.0 showed the four ITSs of *S. vachellianum* were clustered together first and then clustered with *S. sp.* and *S. piluliferum*, indicating a close genetic relationship corresponding to the smallest genetic distance (0.004) between *S. vachellianum* and *S. sp.* The greatest pairwise genetic distance (0.422) existed between *S. vachellianum* and *T. conoides*.

Key words: *Sargassum vachellianum* C. Agardh; ITS; geographic population; phylogenetic relationships; genetic distance

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zgzhou@shou.edu.cn