

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00900

## 基于 *matK* 基因和 *ITS* 序列探讨大叶藻科的系统发育关系

李 渊<sup>1</sup> 李文涛<sup>1</sup> 孙典荣<sup>2</sup> 高天翔<sup>1</sup>

(1. 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广州 510300)

**摘要:** 比较分析了 15 种大叶藻的 *matK* 基因和 *ITS* 片段的核苷酸序列, 结果发现胞嘧啶(C)在两个目的片段上含量均较低。*ITS* 基因片段检测到 228 处核苷酸替换, 表现出丰富的遗传多态性; *matK* 基因片段上有 249 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 *matK* 基因和 *ITS* 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 4 大支, 大叶藻亚属、异叶藻属、拟大叶藻亚属和虾形藻属分别构成一支。大叶藻亚属和拟大叶藻亚属的核苷酸差异值在 29.09%—35.51%, 超过了屈良鹄等提出的大部分被子植物 *ITS* 属间核苷酸差异值 (9.60%—28.80%), 在分子数据上两亚属都达到了属的水平。研究结果支持 Tomlinson 和 Posluszny 对大叶藻科的划分结果, 建议将大叶藻科分为 4 个属。

**关键词:** *ITS*; *matK*; 大叶藻科; 系统发育关系

**中图分类号:** Q949; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2011)06-0900-08

大叶藻科 (Zosteraceae) 隶属于沼生目 (Helo-biae)<sup>[1]</sup>, 有大叶藻属 (*Zostera*) (12 种)、异叶藻属 (*Heterozostera*) (1 种) 和虾形藻属 (*Phyllospadix*) (5 种) 3 个属<sup>[2, 3]</sup>。目前对于这 3 个属的归属尚有争议, 有学者认为它们属于大叶藻科 (Zosteraceae)<sup>[4]</sup>, 也有学者将其归于眼子菜科 (Potamogetonaceae) 的大叶藻亚科<sup>[5]</sup>。

大叶藻属包括大叶藻亚属 (subgenus *Zostera*) 和拟大叶藻亚属 (subgenus *Zosterella*)<sup>[3]</sup>, 共 12 个种。大叶藻亚属包含大叶藻 (*Zostera marina* Linnaea)、具茎大叶藻 (*Zostera caulescens* Miki)、丛生大叶藻 (*Zostera caespitosa* Miki)、宽叶大叶藻 (*Zostera asiatica* Miki) 和 *Zostera pacifica* Watson 5 个种, 均分布于北半球。其中, 大叶藻广泛分布于太平洋和大西洋沿海, 具茎大叶藻和丛生大叶藻只分布于西北太平洋海域 (中国、日本、韩国和俄罗斯东南海域), 宽叶大叶藻分布在太平洋海域和北美沿海<sup>[6-9]</sup>, *Z. pacifica* 仅分布于加利福尼亚沿海<sup>[10]</sup>。拟大叶藻

亚属包含 7 个种, 其中 *Zostera capensis* Setchell、*Zostera capricorni* Ascherson、*Zostera muelleri* Irmisch ex Ascherson、*Zostera mucronata* den Hartog 和 *Zostera novaealandica* Setchell 仅分布于澳大利亚和新西兰沿海, 矮大叶藻 (*Zostera japonica* Ascherson and Graebner) 分布于西北太平洋沿岸, 诺氏大叶藻 (*Zostera noltii* Hornemann) 分布于北大西洋和地中海<sup>[11]</sup>。异叶藻属仅 *Heterozostera tasmanica* den Hartog 一个种, 分布于澳大利亚沿海和北美智利沿海<sup>[4]</sup>。虾形藻属共 5 个种, 分布于北太平洋沿岸<sup>[4]</sup>。近年来的研究表明, 大叶藻科中虾形藻属的分类地位已经明确<sup>[2]</sup>, 但大叶藻属与异叶藻属的划分仍存在分歧<sup>[2, 4, 8, 11-13]</sup>。随着分子生物学技术的应用<sup>[14, 15]</sup>, 大叶藻科的系统发育研究有了长足地发展<sup>[8, 11]</sup>。

大叶藻科物种都属于海草 (Seagrasses), 海草是多种水生被子植物的总称, 是一个生态组群而不是一个分类组群。Kuo 和 den Hartog<sup>[3]</sup> 认为全球海草共有 4 科 12 属 60 种。海草场是一类具有极高生产力

收稿日期: 2010-06-28; 修订日期: 2011-05-01

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

作者简介: 李渊 (1985—), 男, 山东省青岛人; 硕士研究生; 研究方向为海草分类学和居群遗传学。Tel: 0532-82032601; E-mail: liyuan422@163.com

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

的浅海生态系统, 其主要的结构成分是海草。它可以作为许多生物的直接食物来源, 也可作为许多生物的重要栖息地和隐蔽场所<sup>[9]</sup>。本研究依据叶绿体的 *matK* 基因片段和核基因 *ITS* 片段, 对大叶藻科的分类和进化关系进行探讨, 以为大叶藻属和异叶藻属的重新划分提供遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采集中国青岛、威海沿海和韩国巨济岛的 4 种大叶藻, 并依据《中国植物志》第 8 卷<sup>[16]</sup>和《中国海藻植物》<sup>[9]</sup>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。其他大叶藻科物种及外群[海菖蒲 *Enhalus acoroides* (L. f.) Royle 和无尾水筛 (*Blyxa aubertii* Rich)]的序列信息来自于 GenBank(表 1)。

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<sup>[17]</sup>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  $\mu$ L

蒸馏水中, 4℃ 保存备用。取提取的 DNA 3  $\mu$ 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* 和 *ITS* 片段的引物分别为: *matK* F: 5'-AACATTTCCCTTTTGGAGGA-3', *matK* R: 5'-CAGAATCCGATAAATCAGTCCA-3'<sup>[10]</sup>; *ITS* F5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-3', *ITS* G4: 5'-CTT TTCCTCCGCTTATTGATATG-3'<sup>[18]</sup>。PCR 反应体系总体积为 50  $\mu$ L, 其中: 10 $\times$ PCR 缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; 200 mmol/L KCl; 100 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, dNTP 200  $\mu$ mol/L, 引物各 0.2  $\mu$ mol/L, *Taq* 酶 1.25 U(大连宝生物公司), 模板 DNA 20 ng, 加水至 50  $\mu$ L。*matK* 反应条件为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 1min, 57℃ 退火 2min, 72℃ 延伸 1min, 40 个循环; 72℃ 延伸 10min。*ITS* 反应条件为: 94℃ 预变性 2min, 94℃ 变性 1min, 37℃ 退火 2min, 72℃ 延伸 2min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。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 琼脂糖凝胶电泳检测, 产物电泳后于紫外灯下切割目的条带, 用 DNA 胶回收试剂盒(上海华舜)进行产物的纯化回收。测序分

表 1 样品、采样地点和 GenBank 序列号  
Tab. 1 List of species, localities and GenBank accession numbers

| 种类<br>Species                        |        | 采样地点<br>Locality                | GenBank 序列号( <i>matK</i> / <i>ITS</i> )<br>Accession No. |          |
|--------------------------------------|--------|---------------------------------|----------------------------------------------------------|----------|
| <i>Z. capricorni</i>                 | —      | Australia. Sydney               | AB096167                                                 | AY077996 |
| <i>Z. mucronata</i>                  | —      | Australia. WA, Perth            | AB096168                                                 | AY077993 |
| <i>Z. muelleri</i>                   | —      | Australia. Melbourne            | AB096169                                                 | AY078005 |
| <i>Z. novazelandica</i>              | —      | New Zealand. Kaikoura Peninsula | AB096173                                                 | AY077994 |
| <i>Z. japonica</i>                   | 矮大叶藻   | Korea. Geoje Island             | 本研究                                                      | 本研究      |
| <i>Z. noltii</i>                     | 诺氏大叶藻  | Germany. North Frisian Island   | AB096170                                                 | AY077992 |
| <i>H. tasmanica</i>                  | —      | Australia. WA, Perth            | AB096171                                                 | AY077989 |
| <i>Z. asiatica</i>                   | 宽叶大叶藻  | Japan. Hokkaido                 | AB096161                                                 | EF198347 |
| <i>Z. caulescens</i>                 | 具茎大叶藻  | Japan. Iwate                    | AB096163                                                 | —        |
| <i>Z. caespitosa</i>                 | 丛生大叶藻  | Korea. Geoje Island             | 本研究                                                      | 本研究      |
| <i>Z. marina</i>                     | 大叶藻    | China. Qingdao                  | 本研究                                                      | 本研究      |
| <i>Z. pacifica</i>                   | —      | California. Santa Catalina      | EF198340                                                 | EF198348 |
| <i>Z. minima</i>                     | —      | —                               | AJ581456                                                 | —        |
| <i>Phyllospadix torreyi</i> Watson   | —      | —                               | EF198333                                                 | AY077985 |
| <i>Phyllospadix iwatensis</i> Makino | 红须根虾形藻 | China. Weihai                   | 本研究                                                      | 本研究      |
| <i>E. acoroides</i>                  | 海菖蒲    | —                               | AB002569                                                 | —        |
| <i>B. aubertii</i>                   | 无尾水筛   | —                               | —                                                        | AY870359 |

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(DNASTAR, Inc)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 和 Modeltest 2.0 筛选两个目的片段核苷酸最佳替换模型。用 MEGA 4.1 软件将蛋白质编码基因 *matK* 的核苷酸序列的密码子转换为氨基酸进行检测。15 种大叶藻的 DNA 多态性用软件 Arlequin ver 3.1 进行分析。使用 PAUP 4.0 软件, 应用邻接法(NJ)、最大简约法(MP)、最大似然法(ML)构建系统发育树, 运用 MrBayes 3.0 软件构建贝叶斯(Bayes)系统发育树。

2 结果

2.1 核苷酸组成及序列差异

4 种大叶藻经过 PCR 扩增后均得到清晰的 *matK* 和 *ITS* 两目的片段, 对测得序列进行比对且辅以人工校正, 得到同源片段序列 *matK* 长度为 715 bp, *ITS* 区(不包括 5.8S rDNA)序列的长度范围为 424—438 bp。其中多种大叶藻科的 *matK* 和 *ITS* 序列参照 GenBank 中同源序列进行比对(表 1)。15 种大叶藻在 *matK* 片段存在 249 个多态位点, 在 *ITS* 片段上有 236 个多态位点(表 2)。

15 种大叶藻两目的片段的胞嘧啶(C)的含量均较低, *matK* 基因编码区密码子第三位点上的 C 含量低于 14.32%。15 种大叶藻在 *matK* 片段上反 C 偏倚尤为显著(<9.70%, 但 *P. torreyi* 的 C 含量达到 21.80%)。A+T 含量明显高于 G+C 的含量, 平均含

量为 67.65%, 其中 *ITS* 片段 A+T 含量最低为 62.30%(表 3)。

*ITS* 片段的 228 处变异包括 156 处转换、102 处颠换。*matK* 基因片段上的 249 处突变中有 138 处转换、122 处颠换, 有 153 处发生在密码子第三位点上(62 处颠换), 38 处在密码子第二位点上(28 处颠换), 58 处位于密码子第一位点(29 处颠换)(数据未列出)。氨基酸水平上, 在 *matK* 基因的 237 个氨基酸序列中, 15 种大叶藻共检测到氨基酸替代(Amino acid substitution)45 处。这说明在氨基酸水平上, 15 种大叶藻已在 *matK* 基因片段上产生了一定程度的遗传分化(图 1)。

基于 HKY+G 和 HKY 模型分别计算得到 15 种大叶藻间的遗传距离(表 4), 异叶藻属与虾形藻属的遗传距离在 0.5872—0.6141 之间, 与大叶藻亚属的差异为 0.3155—0.3514, 与拟大叶藻亚属的差异为 0.1265—0.1599, 大叶藻亚属与拟大叶藻亚属的差异在 0.2909—0.3551 之间, 结果显示异叶藻属与拟大叶藻亚属亲缘关系最近, 与系统发育树结果一致。

2.2 系统发育分析

利用邻接法(NJ)、最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯法(Bayes)构建的系统发育树基本一致(图 2)。15 种大叶藻明显分为 4 大支, 第一支为拟大叶藻亚属, 第二支由异叶藻属组成, 第三支由大叶藻亚属组成, 虾形藻属单独构成最后一支, 除个别节点外大部分节点均有较高的支持率。

基于 *matK* 和 *ITS* 两目的片段构建的系统树中, *Z. capricorni*、*Z. mucronata*、*Z. muelleri* 和 *Z. novae-landica* 未能分开。

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<br>Gene  | 片段长度<br>Sequence length (bp) | 信息简约位点<br>Parsimony information sites | 多态位点<br>Variable sites | 单一信息位点<br>Singleton sites | 插入/缺失<br>位点<br>Indels | 核苷酸替代<br>模型<br>Best fit model | Gamma 值<br>Gamma value |
|-------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|
| <i>matK</i> | 715                          | 56                                    | 249                    | 193                       | 0                     | HKY                           | Equal rates            |
| <i>ITS</i>  | 424—438                      | 187                                   | 228                    | 49                        | 82                    | HKY+G                         | 1.988                  |

表 3 核苷酸 *matK* 和 *ITS* 片段碱基频率分布  
Tab. 3 Nucleotide frequencies of *ITS* and *matK* gene sequences (%)

| 基因<br>Gene     | C     | T     | A     | G     | A+T   |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>matK</i>    | 14.26 | 40.73 | 32.72 | 12.30 | 73.00 |
| <i>ITS</i>     | 17.36 | 34.46 | 27.84 | 20.34 | 62.30 |
| 平均值<br>Average | 15.81 | 37.60 | 30.28 | 16.32 | 67.65 |

3 讨论

本研究结果显示 *matK* 和 *ITS* 两目的片段 4 种碱基存在明显的偏向性, 胞嘧啶(C)的含量都较低(<17.36%), 在 *matK* 基因的密码子第三位点上 C 的含量更低(14.32%)。A+T 的含量明显高于 C+G 的含量, 表现出对 A+T 含量的偏倚。 *ITS* 片段长度比较

表 4 15 种大叶藻的 *matK*(下三角)基因和 *ITS*(上三角)序列之间的遗传距离  
Tab. 4 Genetic distances of gene fragment of *matK* (below diagonal) and *ITS* (above diagonal) among fifteen *Zosteraceae* species

|                         | <i>H. tasmanica</i> | <i>P. iwatensis</i> | <i>P. torreyi</i> | <i>Z. asiatica</i> | <i>Z. caespitosa</i> | <i>Z. capricorni</i> | <i>Z. caulescens</i> |
|-------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>H. tasmanica</i>     |                     | 0.5872              | 0.6141            | 0.3155             | 0.3342               | 0.1265               | —                    |
| <i>P. iwatensis</i>     | 0.045               |                     | 0.1228            | 0.6168             | 0.6595               | 0.6309               | —                    |
| <i>P. torreyi</i>       | 0.396               | 0.3506              |                   | 0.6732             | 0.6874               | 0.622                | —                    |
| <i>Z. asiatica</i>      | 0.0527              | 0.0746              | 0.4217            |                    | 0.022                | 0.2909               | —                    |
| <i>Z. caespitosa</i>    | 0.0576              | 0.0781              | 0.4136            | 0.0085             |                      | 0.3094               | —                    |
| <i>Z. capricorni</i>    | 0.0127              | 0.045               | 0.3928            | 0.0526             | 0.0574               |                      | —                    |
| <i>Z. caulescens</i>    | 0.062               | 0.0827              | 0.4237            | 0.0113             | 0.0084               | 0.0588               |                      |
| <i>Z. japonica</i>      | 0.017               | 0.0465              | 0.3926            | 0.0572             | 0.0619               | 0.0042               | 0.0634               |
| <i>Z. marina</i>        | 0.0591              | 0.078               | 0.4164            | 0.0113             | 0.0056               | 0.0605               | 0.0084               |
| <i>Z. minima</i>        | 0.0622              | 0.0828              | 0.4165            | 0.0127             | 0.007                | 0.062                | 0.0127               |
| <i>Z. mucronata</i>     | 0.0156              | 0.0465              | 0.3949            | 0.0557             | 0.0604               | 0.0028               | 0.0619               |
| <i>Z. muelleri</i>      | 0.0127              | 0.045               | 0.3928            | 0.0526             | 0.0574               | 0                    | 0.0588               |
| <i>Z. noltii</i>        | 0.0156              | 0.045               | 0.3929            | 0.0556             | 0.0604               | 0.0028               | 0.0619               |
| <i>Z. novazelandica</i> | 0.0127              | 0.045               | 0.3928            | 0.0526             | 0.0574               | 0                    | 0.0588               |
| <i>Z. pacifica</i>      | 0.0576              | 0.0782              | 0.4139            | 0.0085             | 0.0028               | 0.0574               | 0.0085               |

|                         | <i>Z. japonica</i> | <i>Z. marina</i> | <i>Z. minima</i> | <i>Z. mucronata</i> | <i>Z. muelleri</i> | <i>Z. noltii</i> | <i>Z. novazelandica</i> | <i>Z. pacifica</i> |
|-------------------------|--------------------|------------------|------------------|---------------------|--------------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>H. tasmanica</i>     | 0.1599             | 0.3459           | —                | 0.1298              | 0.1265             | 0.1515           | 0.1265                  | 0.3514             |
| <i>P. iwatensis</i>     | 0.6786             | 0.6575           | —                | 0.6381              | 0.6309             | 0.6404           | 0.6309                  | 0.648              |
| <i>P. torreyi</i>       | 0.6694             | 0.6826           | —                | 0.6291              | 0.622              | 0.6316           | 0.622                   | 0.6919             |
| <i>Z. asiatica</i>      | 0.3189             | 0.0277           | —                | 0.2954              | 0.2909             | 0.3138           | 0.2909                  | 0.0248             |
| <i>Z. caespitosa</i>    | 0.338              | 0.0109           | —                | 0.3141              | 0.3094             | 0.333            | 0.3094                  | 0.0081             |
| <i>Z. capricorni</i>    | 0.0486             | 0.3204           | —                | 0.0027              | 0                  | 0.0451           | 0                       | 0.326              |
| <i>Z. caulescens</i>    | —                  | —                | —                | —                   | —                  | —                | —                       | —                  |
| <i>Z. japonica</i>      |                    | 0.3495           | —                | 0.0515              | 0.0486             | 0.0248           | 0.0486                  | 0.3551             |
| <i>Z. marina</i>        | 0.0651             |                  | —                | 0.3252              | 0.3204             | 0.3444           | 0.3204                  | 0.0027             |
| <i>Z. minima</i>        | 0.0666             | 0.007            |                  | —                   | —                  | —                | —                       | —                  |
| <i>Z. mucronata</i>     | 0.007              | 0.0636           | 0.065            |                     | 0.0027             | 0.048            | 0.0027                  | 0.3308             |
| <i>Z. muelleri</i>      | 0.0042             | 0.0605           | 0.062            | 0.0028              |                    | 0.0451           | 0                       | 0.326              |
| <i>Z. noltii</i>        | 0.0042             | 0.0635           | 0.065            | 0.0056              | 0.0028             |                  | 0.0451                  | 0.3502             |
| <i>Z. novazelandica</i> | 0.0042             | 0.0605           | 0.062            | 0.0028              | 0                  | 0.0028           |                         | 0.326              |
| <i>Z. pacifica</i>      | 0.062              | 0.0056           | 0.007            | 0.0605              | 0.0574             | 0.0604           | 0.0574                  |                    |

保守, 缺乏编码选择压力, 核苷酸序列变化较大, 进化速率较快<sup>[19]</sup>。本研究结果与王建波等<sup>[19]</sup>的研究结果相似, 在 *ITS* 片段中, 检测到丰富的遗传多态性, 有 228 个多态位点。密码子第三位点上的突变大多为同义突变, 很少导致氨基酸替代, 其中最常见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<sup>[20]</sup>, *matK* 基因片段的研究结果与此一致。在 15 种大叶藻的 *matK* 基因片段上共检测到 249 处变异位点, 其中 138 处转换, 122 处颠换。密码子第三位点上的转换 95 处, 颠换 62 处, 这可能是由于蛋白质

编码基因密码子第三位点上核苷酸突变受自然选择压力小所致; 密码子第一位点上 29 处转换, 32 处颠换; 在受到功能限制最强的密码子第二位点上也检测到 38 处核苷酸替代, 转换 14 处, 颠换 28 处。氨基酸水平上, 15 种大叶藻在氨基酸序列上共检测到 45 处遗传变异, 表明 15 种大叶藻在 *matK* 基因片段上已有一定的分化。

目前虾形藻属因其形态特征和染色体数目与其他属的差异很大<sup>[3, 4, 21]</sup>, 分类地位明确, 因此大叶藻科的争议主要集中在大叶藻属与异叶藻属的划分上。Setchell<sup>[22]</sup>因 *Zostera tasmanica* 与大叶藻属其他

|                         |                                                                                     |       |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <i>H. tasmanica</i>     | LIPYPINLEI LUQILQSVIQ DDPALHLRF YIYEVHMT FITAKKSYN FSKENQRLR LLVNSYLSEY ELUFCIRKH   | [80]  |
| <i>P. ivatensis</i>     | .....I.....                                                                         | [80]  |
| <i>P. torreyi</i>       | .....I.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. asiatica</i>      | U.....                                                                              | [80]  |
| <i>Z. caespitosa</i>    | U.....                                                                              | [80]  |
| <i>Z. capricorni</i>    | .....S.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. caulescens</i>    | U.....                                                                              | [80]  |
| <i>Z. japonica</i>      | .....S.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. marina</i>        | U.....                                                                              | [80]  |
| <i>Z. minima</i>        | U.....                                                                              | [80]  |
| <i>Z. mucronata</i>     | .....S.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. muelleri</i>      | .....S.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. noltii</i>        | .....S.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. novazelandica</i> | .....S.....                                                                         | [80]  |
| <i>Z. pacifica</i>      | U.....                                                                              | [80]  |
| <i>H. tasmanica</i>     | SSVLLSTSG DFIDRTHFYU KHEHLAUFC NYFHNKLQL KDPFHVYRY QKKSIMASKG THLHKVKY HLUFFVQCNF   | [160] |
| <i>P. ivatensis</i>     | .....E.....                                                                         | [160] |
| <i>P. torreyi</i>       | .....E.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. asiatica</i>      | .F.....                                                                             | [160] |
| <i>Z. caespitosa</i>    | .F.....                                                                             | [160] |
| <i>Z. capricorni</i>    | .....Q.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. caulescens</i>    | .F.....                                                                             | [160] |
| <i>Z. japonica</i>      | .....Q.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. marina</i>        | .F.....                                                                             | [160] |
| <i>Z. minima</i>        | .F.....                                                                             | [160] |
| <i>Z. mucronata</i>     | .....Q.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. muelleri</i>      | .....Q.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. noltii</i>        | .....Q.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. novazelandica</i> | .....Q.....                                                                         | [160] |
| <i>Z. pacifica</i>      | .F.....                                                                             | [160] |
| <i>H. tasmanica</i>     | NFVSQPVRIN ITQLANKSFF FLGYFLSULI NPLIUSKIL ESCFLIDTVI KKLDIUIPII PIIRSLSKAK FCNISGV | [237] |
| <i>P. ivatensis</i>     | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>P. torreyi</i>       | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. asiatica</i>      | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. caespitosa</i>    | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. capricorni</i>    | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. caulescens</i>    | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. japonica</i>      | S.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. marina</i>        | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. minima</i>        | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. mucronata</i>     | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. muelleri</i>      | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. noltii</i>        | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. novazelandica</i> | Y.....                                                                              | [237] |
| <i>Z. pacifica</i>      | Y.....                                                                              | [237] |

图1 15种大叶藻 *matK* 基因的氨基酸序列比较Fig. 1 Amino acid sequences alignment of *matK* gene for fifteen *Zosteraceae* species

物种不同的形态特征, 将其定义为新属 *Heterozostera*。den Hartog<sup>[5]</sup>和 Kuo<sup>[21]</sup>依据根茎节间分支特点和皮层维管束的数目将异叶藻属与大叶藻属和虾形藻属进行鉴别。Kuo<sup>[21]</sup>同时认为染色体数目与形态特征相结合可以作为大叶藻科中属与亚属的划分标准, 将染色体数目与 Sauvageau, *et al.*提出的一些区分大叶藻属和异叶藻属的形态特征结合, 支持异叶藻属的独立存在。随着研究的进一步深入, 大叶藻属和异叶藻属间的界限并不明确, 植物形态有过渡性。Tomlison<sup>[1]</sup>同样支持将异叶藻属作为一个独立的属, 但并不认为根茎的以上特征可以作为划分属的标准, 研究发现异叶藻属中既有单轴式根茎也有合轴式根茎。1995年 Soros-Pottruff 和 Poslusny<sup>[23]</sup>明确提出异叶藻属根茎属于单轴式, Yip<sup>[24]</sup>发现异叶藻属与大叶藻属的根茎维管束数目亦有重叠, 同时 Tomlison<sup>[1]</sup>发现异叶藻属与 *Z. muelleri* 的叶片形态和结构也有一定的相似性。而 Soros-Pottruff, *et al.*<sup>[23]</sup>和 Les, *et*

*al.*<sup>[2]</sup>支持 Taylor<sup>[12]</sup>将异叶藻属作为大叶藻属的一个亚属。Tomlinson 和 Poslusny<sup>[13]</sup>首次将拟大叶藻亚属提升到属的水平(genus *Nanozostera*), 将大叶藻科分为 *Heterozostera*(1 个种)、*Nanozostera*(8 个种)、*Zostera*(4 个种)和 *Phyllospadix*(5 个种)4 个属。

大量的研究表明, *matK* 基因和 *ITS* 片段都适用于植物系统发育研究<sup>[4, 8, 11, 25—27]</sup>, 本研究中 *matK* 和 *ITS* 两个片段都能将大叶藻科各物种很好的区别, 而且构建的系统发育树拓扑结构图基本一致(除了 *matK* 系统树中多 2 个种)。大叶藻科物种明显分为 4 大支, 而且有很高的置信度。有研究表明, 虾形藻属是最早从大叶藻科中分化出来的<sup>[13]</sup>, 而大叶藻亚属在很多研究中都是被看作一个独立的组群<sup>[3, 5]</sup>, 与本研究的结果相符合。与形态分类结果不同的是异叶藻属与拟大叶藻亚属聚到一起, 而非单独存在, 与其他研究结果相同。Les, *et al.*<sup>[2]</sup>基于 *rbcL* 基因片段研究海洋被子植物, 得到异叶藻属与拟大叶藻

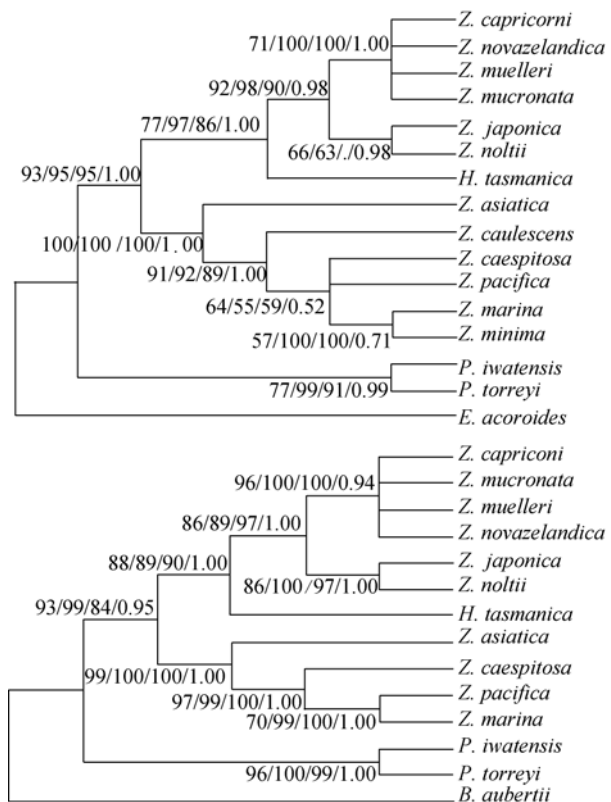


图 2 邻接法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建 15 种大叶藻的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic trees of fifteen Zosteraceae species based on neighbor joining analyses, maximum parsimony analyses, maximum likelihood and Bayes analyses

支持率及后验概率标注在分支上; 上: *matK*; 下: *ITS*

Numbers on the trees represent the values of supporting values and posterior probability value; above: *matK*; below: *ITS*

亚属的 *Z. mucronata* 和诺氏大叶藻聚类到一起, 再与大叶藻亚属的大叶藻聚到一起。Les, et al.<sup>[11]</sup>运用 *matK*、*ITS* 和 *rbcL* 基因片段探讨澳大利亚和新西兰的大叶藻科的系统发育, 其结果显示异叶藻属也与拟大叶藻亚属聚为一支, 提出将异叶藻属作为大叶藻属的一个亚属, 建议将大叶藻科分成虾形藻属和大叶藻属。Tanaka, et al.<sup>[4]</sup>基于 *matK* 基因片段研究了大叶藻属与异叶藻属的系统发育关系, 结果也显示异叶藻属与拟大叶藻亚属聚为一支, 对于大叶藻属和异叶藻属重新划分提出了 3 个方案: (1)合并为大叶藻属, 异叶藻属作为大叶藻属的一个亚属; (2)划分为大叶藻属(大叶藻亚属)和新属 *Nanozostera* (异叶藻属和拟大叶藻亚属); (3)划分为大叶藻属(大叶藻亚属)、*Nanozostera*(拟大叶藻亚属)和一个新属(异叶藻属和 *Z. capensis*)。Kato, et al.<sup>[8]</sup>基于 *matK* 和 *rbcL* 基因片段探讨日本沿海大叶藻科物种的系统发育与起源, 也认为可将大叶藻亚属和拟大叶藻亚属

提升到属的水平, 建议大叶藻科划分为虾形藻属、大叶藻属(大叶藻亚属)和 *Nanozostera*(异叶藻属和拟大叶藻亚属)。以上诸学者的结果都是拟大叶藻亚属与异叶藻属的亲缘关系较近, 而与同属的大叶藻亚属较远。本研究基于 *matK* 基因和 *ITS* 片段对大叶藻科进行系统发育研究, 也得出了与以上诸学者类似的结果, 同时也可以看出虾形藻属最先分化。

诸多学者利用叶尖形态特征(截形、钝圆、微凹和裂口)进行大叶藻科种类鉴定<sup>[3, 5]</sup>, 但这些形态分类特征并不是清晰可辨的, 当有重叠交叉时, 并非完全可靠, 因此在分类上就不能完全有效地分开<sup>[11, 28]</sup>。基于 *matK* 和 *ITS* 两目的片段构建的系统树中, *Z. capricorni*、*Z. mucronata*、*Z. muelleri* 和 *Z. novaezelandica* 未能完全分开, 而且序列变异很小, 仅几个碱基的差异(*matK* 片段上是 2 碱基差异, 在 *ITS* 片段上 4 碱基差异)。2002 年, Les, et al.<sup>[11]</sup>提出将澳大利亚和新西兰的这四个种合并为一个种 *Z. capricorni*。2006 年, Jacobs, et al.<sup>[28]</sup>认为从形态特征和分子上并不能完全将这 4 个种分开, 主张合并为一个种 *Z. muelleri*, 包含 4 个亚种 *Z. muelleri* subsp. *muelleri* (Linnaea) Jacobs, *Z. muelleri* subsp. *capricorni* (Ascherson) Jacobs, *Z. muelleri* subsp. *mucronata* (den Hartog) Jacobs 和 *Z. muelleri* subsp. *novaezelandica* (Setchell) Jacobs。2008 年, Jones, et al.<sup>[29]</sup>也支持将四个种合并为一个种 *Z. muelleri*, 但是否应该划分亚种还需要进一步的证实。

屈良鹄和陈月琴<sup>[30]</sup>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 1.20%—10.20%, 属间差异值为 9.60%—28.80%。张宏意等<sup>[31]</sup>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<sup>[26]</sup>从遗传组学上得出 *Begoni handelii* 和 *Begoni 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, 应该是起源于亲缘关系较近的共同祖先, 由于生境(分布)不同而分化为两个分类群。本研究得到的结果显示异叶藻属与虾形藻属的核苷酸差异值为 58.72%—61.41%, 与大叶藻亚属的核苷酸差异值为 31.55%—35.14%, 与拟大叶藻亚属的核苷酸差异值为 12.65%—15.99%, 大叶藻亚属与拟大叶藻亚属的核苷酸差异值为 29.09%—35.51%, 这些都明显高于屈良鹄等<sup>[30]</sup>提出的属间划分的分子标准, 异叶藻属、虾形藻属

和大叶藻属间差异都在属的水平上,符合 den Hartog 和 Kuo<sup>[3, 5]</sup>划分结果,但是大叶藻亚属和拟大叶藻亚属间的差异也达到了属的水平。Tanaka, *et al.*<sup>[4]</sup>和 Kato, *et al.*<sup>[8]</sup>都曾将大叶藻亚属和拟大叶藻亚属提升到属的水平。

综上,拟大叶藻亚属与异叶藻属的亲缘关系最近,之后是同属的大叶藻亚属,最远的是虾形藻属,本研究结果支持 Tomlinson 和 Posluszny<sup>[13]</sup>对大叶藻科划分的结论,建议将大叶藻亚属和拟大叶藻亚属提升为属。但由于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,对于大叶藻科其他物种的了解不够全面。今后应加强样品采集和形态学的研究,尤其是能有效区分各物种的形态特征探讨,同时结合更多的分子标记对大叶藻科进行更为深入的系统发育研究。

#### 参考文献:

- [1] Tomlinson P B. Anatomy of the Monocotyledons. VII. Helobiae (Alismatidae) [C]. New York: Oxford University Press. 1982
- [2] Les D H, Cleland M A, Waycott M. Phylogenetic studies in Alismatidae. II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily [J]. *Systematic Botany*, 1997, 22(3): 443—463
- [3] Kuo J, den Hartog C. Seagrass taxonomy and identification key [A]. In: Short F T, Coles R G (Eds.), *Global Seagrass Research Methods* [C]. Amsterdam: Elsevier Science. 2001, 31—58
- [4] 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(4): 273—279
- [5] den Hartog C. The Seagrasses of the World [M]. Amsterdam: North Holland Publication Co. 1970, 1—275
- [6] Nakaoka M, Aioi K. Ecology of seagrass *Zostera* spp. (Zosteraceae) in Japanese water: A review [J]. *Otsuchi Marine Science*, 2001, 26: 7—22
- [7] Short F T, Coles R G, Pergent-Martini C. Global seagrass distribution [A]. In: Short F T, Coles R G (Eds.), *Global Seagrass Research Methods* [C]. Amsterdam: Elsevier Press. 2001, 5—30
- [8] 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(5): 329—342
- [9] Fan H Q, Shi Y J, Qiu G L. China Seagrass Plant [M]. Beijing: Ocean Press. 2009, 6—23 [范航清, 石雅君, 邱广龙. 中国海草植物. 北京: 海洋出版社. 2009, 6—23]
- [10] 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(1): 73—87
- [11] 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(3): 468—484
- [12] Taylor A R A. A reconsideration of the taxonomic position of *Zostera tasmanica* [A]. In: XIII International Botanical Congress [C]. Sydney: Australian Academy of Science. 1981, 338
- [13] Tomlinson P B, Posluszny U. Generic limits in the seagrass family Zosteraceae [J]. *Taxon*, 2001, 50(2): 429—437
- [14] Li Q, Gu L, Xie S L. Phylogenetic analysis of Batrachospermales (Florideophyceae, Rhodophyta) based on chloroplast *rbcL* sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1): 20—28 [李强, 古莉, 谢树莲. 串珠藻目植物的系统发育-基于 *rbcL* 序列的证据. 水生生物学报, 2010, 34(1): 20—28]
- [15] Mei H, Liu G X, Hu Z Y. Phylogenetic studies of Oedogoniaceae (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on 28S rDNA sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31(4): 492—498 [梅洪, 刘国祥, 胡征宇. 基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育研究. 水生生物学报, 2007, 31(4): 492—498]
- [16] Sun X Z. Flora of China (Vol.8) [M]. Beijing: Science Press. 1992, 85—95 [孙祥钟. 中国植物志(第 8 卷). 北京: 科学出版社. 1992, 85—95]
- [17] Ban Y. Methods of DNA and RNA isolation of *Oryza sativa* [A]. In: Shimamoto K, Sasaki T (Eds.), *PCR Experiments Protocol of Plants* [C]. Shujunsha, Tokyo. 1997, 34—40
- [18] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, *et al.* (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* [C]. San Diego: Academic Press. 1990, 315—322
- [19] Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 1999, 37(2): 407—416 [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. 植物分类学报, 1999, 37(2): 407—416]
- [20] Meyer A. Evolution of Mitochondrial DNA in Fishes [M]. Amsterdam: Elsevier Press, 1993, 1—36
- [21] Kuo J. Chromosome numbers of the Australian Zosteraceae [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2001, 226(3): 155—163
- [22] Setchell W A. A preliminary survey of the species of *Zostera* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1933, 19(9): 810—817
- [23] Soros-Pottruff C L, Posluszny U. Developmental morphology of reproductive structures of *Zostera* and a reconsideration of *Heterozostera* (Zosteraceae) [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 1995, 156(2): 143—158
- [24] Yip M. The anatomy and morphology of the vegetative and

- floral parts of *Zostera* L. M. Sc. [D]. Thesis, Guelph University, Guelph, Ontario. 1988
- [25] Jin H, Shi S H, Pan H C, *et al.* Phylogenetic relationships between *Michelia* (Magnoliaceae) and its related genera based on the *matK* gene sequence [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1999, **38**(1): 93—97 [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. 中山大学学报(自然科学版), 1999, **38**(1): 93—97]
- [26] Xiang J Y, Guan K Y, Yang J B. Study on the classification of *Begonia* Sect. *Sphenanthera* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data [J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2002, **24**(4): 455—462 [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. 云南植物研究, 2002, **24**(4): 455—462]
- [27] 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
- [28] Jacobs S W L, Les D H, Moody M L. New combinations in Australasian *Zostera* (Zosteraceae) [J]. *Telopea*, 2006, **11**(2): 127—128
- [29] Jones T C, Gemmill C E C, Pilditch C A. Genetic variability of New Zealand seagrass (*Zostera muelleri*) assessed at multiple spatial scales [J]. *Aquatic Botany*, 2008, **88**(1): 39—46
- [30] Qu L H, Chen Y Q. Key to molecular taxonomy-principles and methods [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 1999, **38**(1): 1—6 [屈良鹄, 陈月琴. 生物分子分类检索表-原理与方法. 中山大学学报(自然科学版), 1999, **38**(1): 1—6]
- [31] Zhang H Y, Liao W B, Chen Y Q, *et al.* Analysis of rDNA ITS sequences of *Sargentodoxa cuneata* [J]. *Guihaia*, 2008, **28**(6): 737—740 [张宏意, 廖文波, 陈月琴, 等. 大血藤的 rDNA ITS 序列分析. 广西植物, 2008, **28**(6): 737—740]

## PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN ZOSTERACEAE BASED ON *MATK* AND *ITS* NUCLEOTIDE SEQUENCES

LI Yuan<sup>1</sup>, LI Wen-Tao<sup>1</sup>, SUN Dian-Rong<sup>2</sup> and GAO Tian-Xiang<sup>1</sup>

(1. Fisheries College of Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** Seagrasses are composed of four families belonging to angiosperms and they are thought to become adaptive to aquatic life independently. The marine monocotyledonous Zosteraceae are one such family, which place in the order of Helobiae using traditional classifications and are typically circumscribed to comprise three genera (*Heterozostera*, *Phyllospadix* and *Zostera*) with approximately 18 species. Since Zosteraceae had been reported, the studies about the family were mainly focused on their morphological characters, physiological and biochemical characters and their flora. But the phylogenetic relationship between taxa of Zosteraceae was still hard to guarantee in terms of similar morphological characteristics. With sequencing by PCR amplification, we reconstructed the phylogenetic relationship of Zosteraceae based on fragments of the chloroplast (*matK*) and the nuclear ribosome (*ITS*) regions, which were successfully suitable for phylogenetic relationship analysis. Four species were collected from China and Korea, and eleven species were obtained from GenBank. The nucleotide composition analysis indicated a strong bias against cytimidine (C) in both fragments. 228 nucleotide substitutions were found in *ITS* gene, showing the high genetic polymorphism. 249 nucleotide substitutions were checked in *matK* gene, and most of them were synonymous transitions at the third codon positions. The Zosteraceae species had a certain degree of differentiation at the amino acid level. Based on partial sequences of *matK* and *ITS* gene, phylogenetic trees were constructed by neighbor joining, maximum parsimony, maximum likelihood and bayesian inference methods and the four methods produced trees with largely congruent topology. These phylogenetic trees showed four separate lineages: (1) subgenus *Zostera*, (2) *Heterozostera*, (3) subgenus *Zosterella* and (4) *Phyllospadix*. The pairwise percentage divergence values in the samples of subgenus *Zostera* and subgenus *Zosterella* were from 29.09% to 35.51% and were much higher than the standard values (9.60% to 28.80%) among genera of most angiosperm. The results suggested genetic differentiation of these two subgenus had reached the level of generic variation. Our results lend support to the classification by Tomlinson and Posluszny, who recommended taxonomic delimitation of Zosteraceae as four genera: *Heterozostera* (one spp.), *Nanozostera* (eight spp.), *Phyllospadix* (five spp.) and *Zostera* (four spp.). The molecular evidence suggested that *Phyllospadix* was the most divergent taxon, while *Heterozostera* and *Nanozostera* were the most closely related taxa. The phylogenetic relationship was more complex, so, further molecular and morphological investigations were needed to classify the phylogentic relationships of Zosteraceae.

**Key words:** Internal transcribed spacer; *matK*; Zosteraceae; Phylogenetic relationships