

李 斯 著

HAIYANG WEIZAO DE  
FENLEI FANGFAXUE YANJIU

# 海洋微藻的 分类方法学研究



北京邮电大学出版社  
[www.buptpress.com](http://www.buptpress.com)

# 海洋微藻的分类方法学研究

李 斯 著

北京邮电大学出版社

· 北京 ·

## 内 容 简 介

海洋微藻是海洋生态系统中的初级生产者,在海洋生态系统的物质和能量的循环中起着极其重要的作用。海洋微藻的分类是微藻各项研究的基础,本书首先在分子生物学和形态学两方面探讨了对不同海洋微藻的分类方法,然后在微藻生殖方式研究方面进行了探索:①通过单细胞 PCR 方法把对保存的海洋微藻样品的分子信息和形态信息联系起来;②利用 Illumina GA 测序技术对微拟球藻(*N. oceanica*)的全基因组进行测序,揭示了微拟球藻的无性生殖方式;③硅藻的有性生殖的类别反映了硅藻进化中的重要变化,这也是微藻形态学分类的一个重要根据,本书以三角褐指藻为例详细叙述了硅藻的有性生殖的过程。

### 图书在版编目(CIP)数据

海洋微藻的分类方法学研究 / 李斯著. -- 北京:北京邮电大学出版社, 2018.12

ISBN 978-7-5635-5413-3

I. ①海… II. ①李… III. ①微藻—植物分类学 IV. ①Q949.209

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 060999 号

- 
- 书 名 海洋微藻的分类方法学研究  
著 者 李 斯  
责任编辑 沙一飞  
出版发行 北京邮电大学出版社  
社 址 北京市海淀区西土城路 10 号(100876)  
电话传真 010-82333010 62282185(发行部) 010-82333009 62283578(传真)  
网 址 www.buptpress3.com  
电子信箱 ctrd@buptpress.com  
经 销 各地新华书店  
印 刷 北京建宏印刷有限公司  
开 本 787 mm×960 mm 1/16  
印 张 12  
字 数 202 千字  
版 次 2018 年 12 月第 1 版 2018 年 12 月第 1 次印刷

---

ISBN 978-7-5635-5413-3

定价: 55.00 元

如有质量问题请与发行部联系

版权所有 侵权必究

# 前 言

海洋微藻是海洋生态系统中的初级生产者,也是重要的海洋生物资源。海洋微藻遍布全球海洋的每一部分,种类多、数量大、繁殖快。它的很多种类具有很高的经济价值,并且在海洋生态系统的物质和能量的循环中起着极其重要的作用。

海洋微藻的分类是微藻各项研究的基础。从 19 世纪以来,微藻的鉴定方法经历了从形态学鉴定、生理生化鉴定到分子生物学鉴定发展,但每种方法都有其局限性。对海洋微藻的分类还没有达到对高等动植物分类的水平,例如生殖隔离和生殖方式尚未应用于海洋微藻的分类中。

本书在分子生物学和形态学两方面探讨了对不同海洋微藻的分类方法,然后在微藻生殖方式研究方面进行了探索。

(1) 本书介绍了一种研究方法,通过单细胞把保存的海洋微藻样品的分子信息和形态信息联系起来。针对长度大于  $20\ \mu\text{m}$  的海洋微藻,此研究利用单细胞 PCR 方法,调查了 40 种以微藻为主的中国南海的小型浮游生物的 18S rRNA 基因信息,并使之与其形态相对应。最终结果显示,利用这种形态与分子生物学信息结合的办法,可以把分离得到的小型浮游生物(主要是微藻)鉴定到属的水平。研究中,提出了绕过海洋微藻培养,用分子生物学进行鉴定的新方法。

(2) 本书选择微拟球藻作为典型,研究利用分子生物学方法把微藻鉴定水平提高到种的方法。由于微拟球藻属是一种小型、简单,并在全世界范围广泛分布的生物,属于真眼点藻纲。这一属中的物种常常在近海被发现,它们大小通常为  $2\sim 5\ \mu\text{m}$ 。微拟球藻通常被认为是微小型浮游生物。可以利用平板法分离得到了一株微拟球藻,提取其 DNA,扩增并测序得到 18S rRNA 基因、*rbcL* 基因和核糖体转录单元的 ITS 区域序列,然后构建邻接法(neighbor joining)(Tamura-Nei 距离转化模型)和最大简约(maximum parsimony)算法系统发育树分析其在微拟球藻属内分类关系。结果证明这一株微拟球藻为 *Nannochloropsis oceanica*(微拟球藻大洋科),表明 18S rRNA 基因、*rbcL* 基因和 ITS 区域序列三种序列联合使用可以成功

将微拟球藻鉴定到种的水平。

(3) 传统的微藻分类方法很少考虑其生殖方式。生殖是微藻生活史的重要阶段,影响着微藻物种的稳定性,这是分类的重要依据。本书介绍了利用 Illumina GA 测序技术对微拟球藻(*N. oceanica* S. Suda et Miyashita)的全基因组进行测序的研究,揭示了微拟球藻的无性生殖方式。此研究显示微拟球藻的基因组约为 30 Mb, 含有 11 129 个编码蛋白的基因。*N. oceanica* 的多态性核苷酸的低频率以及 1:1 (major:minor, minor  $\geq 10$ ) 期望值的偏离,揭示了 *N. oceanica* 的核单倍性。而缺少主要减数分裂相关特异蛋白编码基因则证明了微拟球藻(*N. oceanica*)的生殖方式为无性生殖。

(4) 硅藻的有性生殖的类别反映了硅藻进化中的重要变化,这也是微藻形态学分类的一个重要根据,也可以解决海洋微藻在培养过程中形态变化造成的形态鉴定困难。三角褐指藻是一种针晶羽纹硅藻,被广泛用作生物化学和生理学的研究材料,全球三角褐指藻都属于一种。其分子生物学分类的研究已开展过,但关于它的有性生殖还从未在形态上被发现过,有性生殖方式还未被描述过。三角褐指藻具备三种形态且可以相互转化,对其生殖方式的观察有助于揭示单纯对其某一种形态的观察所不能揭示的进化位置问题。在本书中,我们公布了一项研究,观察到了三角褐指藻细胞核在细胞之间的转移,发现了两个细胞配对,有时配对的两个细胞其中一个的细胞核转移到另一个细胞中。细胞的配对起始于两个细胞在其细胞壁顶端处铰合,然后围绕连接处转动,最终并排连接在一起。将要进行细胞核转移的配对细胞可以在下壳的厚度和细胞排列方式上同有丝分裂形成的细胞对区分。我们观察到三角褐指藻上符合 Hustedt 的羽纹硅藻生殖方式的第二种模型——简化类型 A,从两个母细胞通过交配产生一个复大孢子;两个配对的细胞只产生并释放一个细胞;配对的细胞只能通过行为而不是外观区别出来。这里的异配生殖是进行融合的配子活动方式的不同,其中一个保持不动,而另一个则运动着影响胞质融合。三角褐指藻的有性生殖方式的揭示有助于理解其在硅藻中的进化位置,也是分类鉴定尝试中的重要发现。

本书的完成要感谢潘克厚教授和杨官品教授的悉心指导。还要感谢以下项目的支持:河北省自然科学基金资助项目——三角褐指藻有性生殖对摄食压力响应机制研究,项目编号 C2015202202;河北省高等学校科学技术研究项目——桡足类摄食对三角褐指藻有性生殖影响的转录组研究,项目编号 QN20131082;国家自然科学基金面上项目——海洋钻井平台海域微生物资源的石油烃降解机制研究,项目批准号 51474084;河北工业大学教育教学改革研究项目——人工智能技术背景下生物类课程综合实践新模式的探究与实践,项目编号 201704049;河北工业大学大学生创新创业训练计划项目——人工智能算法在生物信息识别中的应用,项目编号 201710080305。

# 目 录

<b>第 1 章 海洋微藻分类研究历史</b> .....	1
1.1 海洋微藻分类主要技术 .....	1
1.1.1 海洋微藻概述 .....	1
1.1.2 海洋微藻的分类方法的演变 .....	2
1.1.3 几种传统微藻分类方法及其优缺点 .....	2
1.2 海洋微藻分子生物学分类 .....	4
1.2.1 分子生物学在微藻分类中的应用 .....	4
1.2.2 适合微藻分子生物学分类的工具 .....	6
1.3 硅藻分类形态学特征拓展——有性生殖方式 .....	14
1.3.1 微藻形态学分类研究的典型——硅藻 .....	14
1.3.2 硅藻有性生殖方式 .....	16
1.4 作者研究的目的与研究方案的设计 .....	26
1.4.1 研究的目的 .....	26
1.4.2 研究方案设计 .....	27
<b>第 2 章 利用单细胞 PCR 方法调查中国南海小型浮游生物分子信息的研究</b> .....	29
2.1 材料和方法 .....	30
2.1.1 仪器和试剂 .....	30
2.1.2 方法 .....	30
2.2 结果 .....	32
2.3 讨论 .....	40

<b>第 3 章 微拟球藻大洋种的分子鉴定</b> .....	41
3.1 材料和方法 .....	41
3.1.1 藻种培养 .....	41
3.1.2 藻种的分离 .....	42
3.1.3 DNA 提取 .....	42
3.1.4 DNA 质量的检测 .....	43
3.1.5 PCR 扩增 .....	44
3.2 结果 .....	44
3.3 讨论 .....	52
<b>第 4 章 微拟球藻 (<i>Nannochloropsis oceanica</i>) 的基因组序列揭示其核单倍性与无性生殖</b> .....	53
4.1 方法 .....	54
4.1.1 藻种的分离、DNA 提取 .....	54
4.1.2 文库的构建和测序 .....	54
4.1.3 从头组装 .....	54
4.1.4 多态性核苷酸的搜索 .....	54
4.1.5 基因预测和功能注释 .....	55
4.1.6 目的蛋白的搜索 .....	55
4.2 结果 .....	55
4.2.1 基因组的大小 .....	55
4.2.2 多态性核苷酸 .....	56
4.2.3 功能基因 .....	57
4.2.4 无性生殖 .....	58
4.3 讨论 .....	59
<b>第 5 章 三角褐指藻有性生殖观察</b> .....	61
5.1 材料和方法 .....	62
5.1.1 藻种来源 .....	62
5.1.2 培养条件 .....	62
5.1.3 细胞固定 .....	62
5.1.4 光学显微镜观察 .....	62
5.1.5 电子显微镜观察 .....	62

---

5.2 结果 .....	63
5.2.1 细胞的结合 .....	63
5.2.2 细胞核的运动和可能的细胞质交换 .....	65
5.2.3 为细胞核转移而结合的细胞对与有丝分裂形成的细胞对在 结构上的不同 .....	67
5.3 讨论 .....	72
总结与展望 .....	74
参考文献 .....	75
附录 1 分离得到的中国南海小型浮游生物形态图像 .....	98
附录 2 中国南海小型浮游生物分离得到的 18S rRNA 序列 .....	138
附录 3 f/2 培养基 .....	179
致谢 .....	181
本书研究项目成果来源 .....	182
作者简介 .....	183

# 第 1 章 海洋微藻分类研究历史

## 1.1 海洋微藻分类主要技术

### 1.1.1 海洋微藻概述

海洋微藻是一类原始植物,是海洋生态系统中的初级生产者,也是重要的海洋生物资源。微藻遍布全球海洋的每一部分,其种类多、数量大、繁殖快。微藻的很多种类具有很高的经济价值,在海洋生态系统的物质和能量的循环中起着极其重要的作用。海洋微藻的代谢影响着整个海洋生态系统的生产力,与水产养殖、生态环境、污染治理、工业生产密切相关。微藻本身营养丰富,富含蛋白质,是单细胞蛋白(single cell protein, SCP)的重要来源,可以作为鱼类、贝类等育苗的开口饵料。很多微藻由于脂肪酸含量较高,也可以作为提炼生物柴油的原料<sup>[1]</sup>。随着全球温室气体的增加,海洋微藻因数量大、繁殖快、生长迅速,在生物量积累的过程中能大量吸收二氧化碳等诸多优点,被很多科学家开始研究把其应用于节能减排。而且由于海洋微藻富含能产生蛋白、多糖、脂肪、类胡萝卜素等生物活性物质,因而在食品、医药、农业及工业生产等领域都具有重要开发价值。

海洋微藻的应用离不开对微藻资源的准确分类鉴定。从 19 世纪出现大量对海洋微藻的分类专著以来,海洋微藻从传统的形态学分类法开始,经历了化学分类

法、同工酶分类法,到现在普遍应用的分子生物学分类法。分类方法学的研究和探讨从未停止,一直有新的发现,下面概述海洋微藻的一些分类方法和历史。

### 1.1.2 海洋微藻的分类方法的演变

尽管微藻是地球上出现最早生物,但由于它们体积微小(一般只有几微米到几百微米),要借助显微镜才能观察,所以关于它们的研究起步较晚。对海洋微藻的早期研究,主要集中在它们的数量和种类优势以及在海洋生态系统中的重要作用等方面。在19世纪末20世纪初出现了不少分类学专著,如A. Schmidt(施密特)著述的《硅藻图集》(*Atlas der Diatomaceen-kunde*),H Van Heurck(奎克)著述的《比利时硅藻概要》(*Synopsis des Diatomees de Belgique*)等。20世纪,海洋微藻的分类学研究得到了巨大的发展,随着五六十年代以后电子显微镜的出现,对海洋微藻的分类和细胞结构的认识更进了一步,尤其是对一些体积微小的微型浮游植物(nanophytoplankton)种类(细胞大小为 $2\sim 20\mu\text{m}$ ,如nanodiatom)和超微型浮游植物(picophytoplankton)种类(细胞大小为小于 $2\mu\text{m}$ ,如cyanobacteria)。20世纪90年代以后,随着分子生物学、流式细胞技术(flow cytometry, FCM)等现代技术的发展,对海洋微藻的认识又有了一个重大进步,这主要在于利用这些技术鉴定了一些超微型浮游植物种类和用常规方法难于界定的疑难种类。

### 1.1.3 几种传统微藻分类方法及其优缺点

#### 1. 形态分类法

形态学观察是普遍使用也是最早应用的微藻类分类方法。形态学分类主要是根据藻细胞大小、鞭毛及色素体的有无,鞭毛的位置及数目、腹孔的有无,色素体的个数及形状,硅藻的特异性花纹等表面平整情况,群体或个体胶被形态和群体中细胞个数等特征来确定微藻的种类<sup>[2]</sup>。

在长期的研究中发现,形态学分类方法在微藻的鉴定中还存在着许多问题。第一,微藻的种类繁多,且许多种属的微藻形态差异细微,只有长期从事该项工作的专业人员才能完成形态分类,而且形态学特征的鉴定需要长期大量细致、费时、费力的工作。第二,很多野生藻株经过培养后,形态会发生变化<sup>[3,4]</sup>,这给培养后的

藻种鉴定带来很大麻烦,如色球藻和优美平裂藻在培养后微藻的形态发生变化,对它们的鉴定也就变得非常困难。第三,很多微藻因为需要电镜技术配合,需要经过扩大培养后进行鉴定,而很多这样的微藻不能在实验室条件下培养,因而达不到鉴定的条件。第四,很多微藻需要根据其生活史进行鉴定,这类微藻很多也难以扩大培养,增加了鉴定的难度。由此可见,形态学鉴定的人为因素太多,受许多条件制约,且不同研究者的鉴定结果也存在差异,检测标准化难度较大。因此,发展出了其他的分类鉴定办法。

## 2. 生物化学分类法

生物化学分类法是根据细胞的生物大分子的组成差异来对微藻分类的方法。生化特性也是进行微藻分类需要研究的一个指标,但只是对传统分类方法的一个补充,没有形成一个完整的分类体系。

目前能够用于生化分类的海洋微藻“特征化学成分”有色素、脂肪酸、甾醇、醛类、碳水化合物(糖类)和氨基酸等。色素因其具有明显特征和成熟的分析方法而成为最为理想的微藻化学生物标志物<sup>[5]</sup>。因为许多微藻门类的色素种类都很独特,被称为标志色素(marker pigment)。因此它们在一定程度上可以作为微藻分类学上的生物标志物(biomarker)。原绿球藻(*Prochlorococcus*)的发现是色素应用于微藻分类的典型例子。由于原绿球藻细胞极小(是迄今发现的地球上最小的光合自养原核生物),所以直到1994年,因焦念志等用高效液相色谱法检测到了原绿球藻的特征色素——二乙烯基叶绿素(divinyl-chlorophyll a, b)在东海的存在,才确认了原绿球藻在中国海区有分布<sup>[6]</sup>。脂肪酸的组成通过气相色谱-质谱联用定性定量分析,进而对脂肪酸种类和相对含量进行聚类分析,其结果也被用来作为辅助手段鉴定微藻。

利用色素或者脂肪酸对微藻分类,只能进行到纲一级,不能达到属或种的级别,所以只能作为一种辅助手段。许多曾被认为特定的标志物后来在多种藻类中被发现,但是这一鉴定标准后来被质疑,限制了其应用的范围。此外,色素易受到破坏,作为分类鉴定指标不稳定;同一种藻在不同的生理状态下,其色素组成会有变化,这些变化影响了鉴定标准的形成;进行色素和脂肪酸分析的仪器较为昂贵也限制了其作为分类方法的发展和应用。

同工酶是功能相同但结构和性质不同的多肽性酶的总称。生物物种亲缘关系的远近,可由同工酶基因序列及其编码的蛋白质序列的相似性进行推断。对同工

酶进行电泳,由于同工酶具有不同大小、构象和带电荷数,形成具有不同数目和迁移率条带的酶谱,这些酶谱反映了等位基因和位点的变化,具有种属特异性。Kato等曾用此方法作为标准对一些铜绿微囊藻进行分类<sup>[7]</sup>。不过 Belda-Baillie 等用此方法对与蛤共生的共生藻属(*Symbiodinium spp*)进行分类研究时发现,这种方法虽然能很灵敏地检测出共生体的物种差异,但很难区别出共生体中藻的属内差异<sup>[8]</sup>。

## 1.2 海洋微藻分子生物学分类

### 1.2.1 分子生物学在微藻分类中的应用

分子生物学技术的出现增强了分析各种生物体的能力。但是,由于缺乏大多数微藻的微小体积和形态标记,许多物种无法培养,在水环境里长期季节性的样品获取较困难等类似的问题,阻滞了我们对微藻多样性和种群结构的了解。尽管如此,科学家们通过对生理生化测量的应用还是推断出了微藻群体中存在的显著遗传多样性<sup>[9,10,11]</sup>。通过这些数据,研究者们推断了隐藏的生物多样性和遗传多样性的时空结构(或者说基因流)。现在,分子技术通过对微藻群体的多样性、结构和进化的分析能够开展更多的量化工作,而这些工作都依赖于对微藻分类的正确把握。

大多数微藻分类依赖于质体或者鞭毛等细胞特征,利用这些特征把微藻分为单源(monophyletic)的分类单位,尽管有些这样的分类单元已经被分子分析所揭示。例如裸藻纲,是一个很早的真核生物分支,并被认为与绿藻纲有关联,而绿藻纲是一个主要的真核生物分支,被称作皇冠群分支(crown group radiation)。藻界(kingdom chromista)以前被认为是单源的分类群,包含了真核微藻分类群的大多数,如定鞭藻门、不定鞭藻门和隐藻门。但是藻界现在被认为是多源的分类群(polyphyletic taxon)<sup>[12,13]</sup>,尽管原来的观点完全基于证据(包括形态和来自于核糖体 DNA 的分子数据)的分子生物学的分析,把定鞭藻门从不定鞭藻门中分离出来,然而基于其他基因的分析使隐芽植物距不定鞭藻和定鞭藻的距离越来越远<sup>[14,15,16]</sup>。丝足虫门(chlorarachniophyte)现在清晰地表现出与多叶阿米巴原虫的

关联<sup>[14]</sup>，而不能像原先一样被归为藻界。显然，藻界是一个过时的概念。在一些例子中发现通常微藻外部的形态特征支持分子的进化支，例如定鞭藻、硅藻，细胞内部结构很好地支持了分子树上的更深的分支，因此硅质细胞壁更广泛的分类学特征支持了新的分支<sup>[17]</sup>。甲藻被证明是最难分析的。系统发育分析的结果验证依赖于所用的算法。

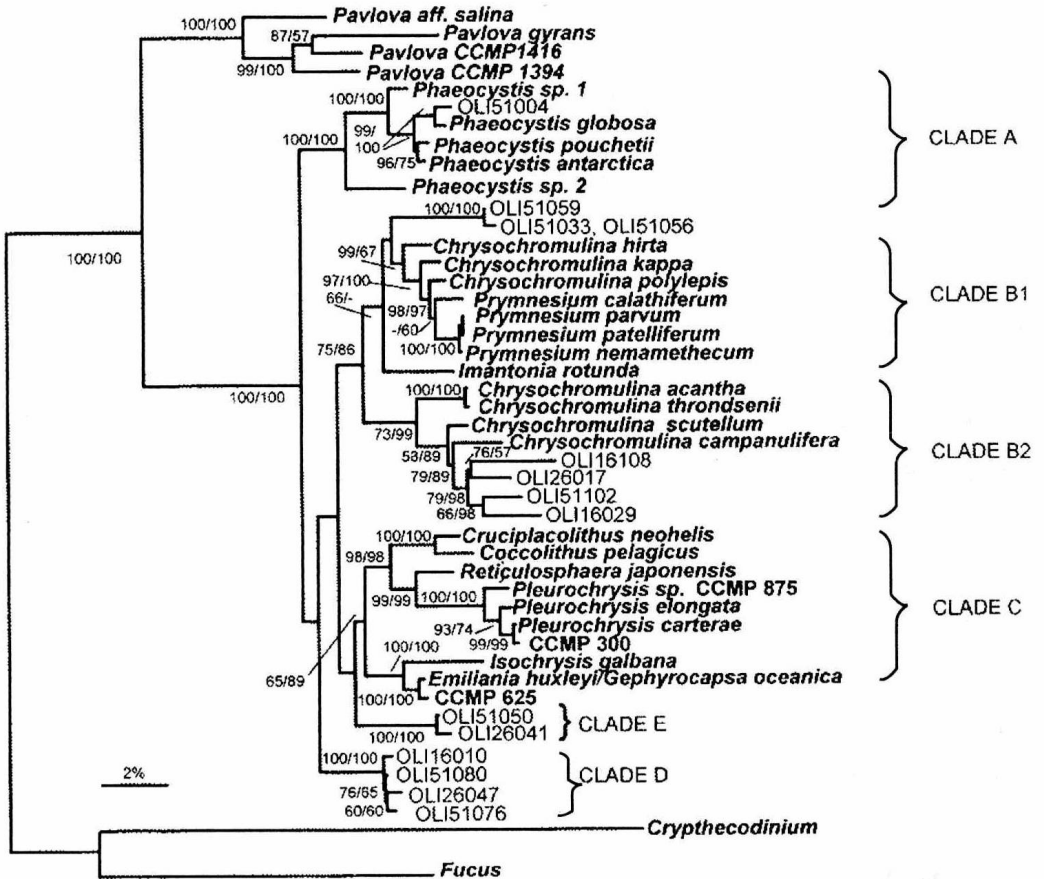


图 1-1 最大简约法构建的系统发育树揭示的黏着植物分类关系<sup>[18]</sup> (The systematic relationship of haptophyte taxa as was revealed by the phylogenetic tree constructed with a maximum likelihood analysis<sup>[18]</sup>)

分子生物学技术在属和种的级别上改善了以往的分类学，在许多藻类群体中表现出多源和并系类群。缺少形态标记的群体最能体现这种变化。多源的分类群

包括像前绿色植物、小球藻、衣藻和金色藻<sup>[19]</sup>。但是即便是在有良好表型标记的类群中,如骨条藻和隐甲藻,也有隐藏的姊妹种。

许多微藻的种群结构依据分子数据也进行了重构。大多数分子生物学研究显示一个物种的多株系与地理位置息息相关,但是有时按照地理位置分离的株系也表现出多源性和并系类群<sup>[20,21,22,23]</sup>。识别并分离多源或并系类群可能是很有争议的,而且分类学上的结果很难被修改。关于物种的概念常常需要根据对分子数据和形态数据结合的分析重新评价<sup>[24,25,26]</sup>。更多的隐藏种(姊妹种)被分子数据识别出来<sup>[27,28,29]</sup>,通过这些数据并结合很少具有争议的形态数据<sup>[30,31]</sup>,生物学家们能更好地确定分类单元在分类学上的归属。当真正估计所有的姊妹种并鉴定了这些“灰色或者绿色小绿球”以及那些“非常小的红色荧光体”后,关于微藻多样性的知识很可能会呈数量级地增长。

## 1.2.2 适合微藻分子生物学分类的工具

偏好性和解析度的限制存在于目前所有的分子技术中。进行光合作用的生物与异养生物有不同的基因排列,研究者们能利用这一点来重新构建种系关系。但是,通过进行广泛的比较,应该选择这些基因在所有生物中通用的一个,而不管这些生物是否自养。

当为进行系统发育分析而选择分子标记时应该考虑以下问题,这些问题会影响研究中应选用何种分子标记。这些问题包括:①要分类到何种水平上;②分子标记的进化速度是否适合要分析的分类水平;③要分析的物种的地质年龄是多少;④是否有足够的采样策略来进行微藻群的时空遗传变异的调查。

下面论述一些适合于微藻分子生物学分类的技术。

### 1. 核酸序列分析

#### (1) 核糖体 RNA。

基因序列-基因组的编码或者非编码区域的基因序列能被用来重新构建生物体的进化历史以及各种分类水平的关系。很多基因都能被用来进行系统发育分析,核糖体 RNA 是最常用的一种。核糖体 RNA 有很多特性使得它成为理想的分子标记<sup>[32]</sup>。核糖体 RNA 基因相对比较大,可变区和保守区能分别被用来阐释相近和较远的进化关系。没有证据表明核糖体 RNA 的保守区会横向转移<sup>[33]</sup>。大型

的核糖体 RNA 数据库的存在使得各种主要类群(phyla)都能被用来分析。核糖体数据库计划(the ribosomal database project, RDP, <http://rna.uia.ac.be>)包含了几乎所有主要生物类群的超过 436 种真核小亚基(SSU) rDNA 和 28 种大亚基(LSU)基因序列。

分割基因的非编码区域被称作间隔区域。在一些操纵子中,例如核糖体操纵子,间隔区域对成熟 rRNA 分子的最终处理起作用,但在大多数基因中它们的作用并不明确。它们以一个相当快的速度进化,因为它们并不受到像编码区那样相同的进化限制。但是,在一个群体中,如果受到一个定向的选择压力,编码区对变异的修复作用能显示出相当快的速度,快到能同非编码区的进化速度相比较。为了揭示相近物种或者群体水平的遗传结构,拥有更快进化速度的非编码区是一个最好选择,即便有些序列在一些藻类中的属或者更高的级别上较为保守<sup>[34]</sup>。形态上的快速变化能影响人们对物种和属的水平上的认知,而这会影响基因组所有区域的解析能力。过去曾被认为是同种的东大西洋和西大西洋的红藻门叉枝藻 *gymnogongrus devoniensis* 的 RUBISCO 间隔区域探测到很大的差异,能确定产生一种新的种<sup>[35]</sup>。然而对一个距今年代比较近(小于 270 000 年)的分类单元, *Emiliania huxleyi* 的全球株系的检测显示没有差异<sup>[36]</sup>。在遗传距离较远的硅藻的属之间, RUBISCO 间隔区几乎一样<sup>[37]</sup>。核糖体顺反子的 ITS 间隔区能区别关系很近的种或者属(绿藻、刚毛藻和硅藻)<sup>[38,39,40]</sup>。法国罗斯科夫地区的石莼种内或者种间的变异能利用 ITS 来鉴别<sup>[34]</sup>,但是附近湖中形成物种时间少于 12 000 年的硅藻却不能用 ITS 来鉴别<sup>[38]</sup>。

## (2) 细胞器基因。

在大多数藻类群体中,细胞核的核糖体 DNA 基因具有与细胞器核糖体 DNA 不同的进化速度,能更好地用于高分类水平。这些基因对原生动物来说,分辨率能达到物种级别的分类水平;而对动物和高等植物来说,甚至能达到更高的分类水平,因为它们的进化更靠近现在。基于细胞器的基因进行的对系统发育历史的重构只能反映出内共生发生以来细胞器的历史,因为细胞器(质体和线粒体)的基因组都是内共生的结果。自从它们由独立的生物体变为俘获的内共生体,就产生了一种不同的进化速度。

核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RUBISCO)大亚基(rbcL)的序列也同样在属或者更高的水平上被用于系统发育分析<sup>[33,39,40]</sup>。相对于核糖体 DNA 分子的二级结构

在比对上的问题,RUBISCO 大亚基基因几乎没有比对的问题,这也是大亚基基因相对于核糖体 DNA 基因的优势。而大亚基基因的横向转移问题也被重复地讨论过<sup>[41]</sup>,尽管自从它们从细菌祖先到真核生物宿主的最初的横向转移发生后,它们就表现出纵向的遗传。

### (3) 分子条形码技术。

生命的多样性是所有生物学研究的基础,但也是严重的负担。就像物理学家面对的宇宙是由 12 种基本粒子组成的一样,生物学家面对的是一个有几百万种生物生存的星球。区别这些物种不是一个简单的工作。实际上只有少数分类学家能精确地鉴定 1 000 万到 1 500 万个估计的物种中略多于 0.01% 的种类<sup>[42,43]</sup>,如果仅依赖于形态判定,那么就得需要一个由大约 15 000 个分类学家组成的群体来工作。此外,这种用于常规生物鉴定的办法有四个重要的限制条件。第一,表型的延展性和基因的变异性在物种鉴别时可能导致不正确的鉴定。第二,这种办法忽视了形态上的隐藏分类单元,而这样的分类单元在很多类群中都很普遍<sup>[42,43]</sup>。第三,因为形态上的关键要素常常只对一个特定的生活时期或性别适用,所以许多个体不能被鉴别。第四,尽管现在形态上的关键要素相互作用、共同鉴定的办法代表了一个方向,但对这些关键要素的使用要求有比较高的专业水平,就导致了常常会出现错误鉴别的情况。

基于形态学的鉴定系统里存在限制条件,并且越来越多的分类学家也采用了一种对分类学认识的新方法——微型基因组识别系统。它可以通过基因组上一小段序列的分析来对生物进行鉴别,是一个有广泛应用前景的对生物多样性判别的方法。这种方法已经得到了那些很少用到形态学方法研究生物群体(病毒、细菌和原生生物)的科研工作者的广泛接受<sup>[44,45,46,47]</sup>。形态学分类方法中的固有的问题使这种方法应用到所有的生物中。实际上,越来越多的案例证明基于 DNA 鉴定的系统已经被应用于更高级的生物里<sup>[48,49,50,51]</sup>。

基因组方法来鉴定分类单元开发了用于鉴定物种的 DNA 序列之间的多样性<sup>[52,53]</sup>。从另一个意义上说,这些序列可被看作遗传的“条形码”嵌入到每一个细胞里。当从一种结合的角度认识生命多样性的鉴别时,这是一个适当的方法。如同通用产品码,用来鉴别零售的货物,在 11 个位点上采用 10 个交替数字,来产生 1 000 亿个唯一标识符。基因组的“条形码”在每一个位点上只有 4 个交替核苷酸,但是用于检测的由这些位点形成的长链却是巨大的。仅仅 15 个这样的核苷酸位

点就能制造  $4^{15}$  种编码的可能性,100 倍于目前需要鉴定的物种的数目(如果每一个分类单元都被单独标记)。但是,核苷酸多样性的研究需要更全面,因为功能的限制使得一些核苷酸位点相对恒定,使得种内的多样性的区别存在于别的位点上。能通过集中关注一个编码蛋白来减轻功能限制的影响,原因是由于大多数的密码子的第三个碱基的摇摆性而 75% 地减弱了功能要求的碱基的相对恒定。因此,对 45 个核苷酸的检测,能得到减弱选择作用的 15 个位点,所以没有必要把分析限制在一段短的 DNA 链上,几百个碱基的 DNA 片段是很容易得到的。这种对较长序列的检测是很重要的,造成对其他两个方面的思考。第一,在第三个位置的核苷酸的组成通常有严重的偏好性(在节肢动物中是 A-T,在脊椎动物中是 C-G),减少了信息量。但是,即使是 A-T 或者 C-G 的比例达到了 100%,对仅仅是 90 个碱基的检测就能获得预期 10 亿种替换( $2^{30} = 4^{15}$ )。第二,约束来源于对潜在信息容量的限制,因为大多数核苷酸的位置和相近物种比较起来是恒定的。但是,如果有序列变化的适度速率(例如每百万年 2%),那么在物种比较时,对 600 个碱基中的 12 个核苷酸所检测到的不同将说明存在 100 万年的生殖隔离。因为化石的记录和分子分析都说明大多数的物种都存在了 100 万年,分类单元是很容易判断的。但是,没有一种简单的公式能预测到底需要多长的序列来保证对物种的鉴定,因为分子的进化速率在不同分类单元以及基因组不同片段上是不一样的。显然,对快速进化的家基因区域或者分类单元的分析将有助于鉴定只有较短生殖隔离历史的品系,而对那些低速率进化的基因或物种则相反。

尽管还从没有试着在大范围中使用微基因组鉴定系统,但已经有足够多的研究工作指明了关键的设计因素。很明显动物的线粒体基因组比核基因组适于分析,因为它缺少内含子,避免了重组以及遗传的单倍性<sup>[54]</sup>。强力的引物也能扩增线粒体基因组上的特定片段<sup>[55,56]</sup>。过去的系统研究工作经常把重点放在编码核糖体 DNA 的线粒体基因上,但其在大规模的分类学研究时功能被限制了,因为经常出现的插入和缺失使序列的比对更加复杂<sup>[57]</sup>。

“条形码”技术能对已存在的微藻的命名高效化,或者对新发现的那些不能活体保存的物种,以及对不能进行有效新陈代谢的培养物命名。“条形码”技术的基本问题如同先前探讨过的那样<sup>[58]</sup>,是如何使“条形码”技术与传统命名学调和以提供一个分子结合典型。以硅藻为例,因为“条形码”已经在这个群体中可行,而命名机制很急迫,但原则是通用的。