

文章编号: 1004-7271(2001)03-0264-05

·综述·

## 同工酶在藻类学领域的应用

### Application of isoenzyme in phycology

周志刚, 胡远皆

(上海水产大学渔业学院, 农业部水产增殖生态、生理重点开放实验室, 上海 200090)

ZHOU Zhi-gang, HU Yuan-jie

(Key laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture of Ministry of Agriculture, SFU, Shanghai 200090, China)

关键词: 同工酶; 藻类学

Key words: isoenzyme; phycology

中图分类号: Q814.9 文献标识码: A

同工酶是生物体内基因转录和翻译的直接产物,它反映了编码酶蛋白的 DNA 序列信息,酶谱的变化反应了等位基因和位点的变化。利用凝胶电泳技术,能够得到具有较好的同源性和可比较性的同工酶谱,通过对酶谱的进一步分析,可以较深入、直接地了解物种的遗传信息。Chang 等<sup>[1]</sup>首先将同工酶凝胶电泳应用于高等植物天然种群研究,而该技术在藻类学领域得以应用则是自 Fredrick<sup>[2, 3]</sup>开始,同工酶电泳技术的使用大大促进了人们对种的遗传过程的认识,并且随着生化分析技术的提高,这种研究方法不断得以完善,研究领域继续拓展。下面就同工酶电泳分析技术在藻类学领域的应用作一简单综述。

### 1 分类工具

对生物的认识和利用,通常是以“种”作为基本单位的。在传统的藻类分类学领域,正常都是根据种的形态学特征、细胞结构及某些生理指标对其加以区分。但由于使用方法不同,常会在定种上引发一些学术性的争论<sup>[4, 5]</sup>。70 年代初,同工酶就开始被当作有力的分类工具应用于藻类学领域<sup>[6, 7]</sup>。分类学家通过对同工酶谱带型的分析为种的鉴定提供重要的生化指标。

Murphy 和 Guillard<sup>[8]</sup>利用酶电泳技术论证了海链藻属不同种之间存在着明显的分类界限,这与传统形态学上从硅壳外部结构分析得出的分类结果一致,并且同工酶结果分析表明海链硅藻(*Thalassiosira pseudonana*)可进一步划分成几个生态学种;Blair 等<sup>[9]</sup>以同工酶淀粉凝胶电泳(SGE)和形态分类学分别对线形硬毛藻(*Chaetomorpha linum*)、墨绿硬毛藻(*C. atrovirens*)和气生硬毛藻(*C. aerea*)等多种绿藻进行了比较研究,证明了同工酶淀粉凝胶电泳在分类学上的精确性和准确性;Whitten 和 Hayhome<sup>[10]</sup>则利用同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)对波罗的海双核甲藻(*Peridinium balticum*)和叶状薄甲藻(*Glenodinium foliaceum*)进行了比较研究,结果发现二者虽然在超微结构和许多生化特点上具有较大相似性,但在同一酶谱中的 129 条谱带中只有 28 条是共有的,明确显示它们应该隶属于不同的属。Price 等<sup>[11]</sup>结合十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和等电聚焦电泳(IEF),对以形态学为依据鉴定的绢丝

收稿日期: 2001-04-28

基金项目: 上海市教育委员会“曙光计划”项目(No. 98-SC-32)和国家自然科学基金项目(No. 39800105)

作者简介: 周志刚(1964-),男,安徽肥东人,理学博士,副研究员,主要从事海洋生物技术、分子生态学研究。

藻属 (*Callithamnion* Lyngbye) 的物种进行了研究,电泳结果证明了因传统方法所造成的同物异名现象;Lindstrom 和 Cole<sup>[12]</sup>对位于北美的太平洋沿岸的紫菜进行了系统性的分类学研究,认为根据形态学得到的分类结果常引起混淆,并且运用 SGE 技术从孔紫菜 (*Porphyra perforata*) 中分离和鉴定出一新种和几个亚种<sup>[13]</sup>;而 Benzie<sup>[14]</sup>也较好地使用酶电泳对蕨藻属进行了分类学和种群遗传学的研究。

由此可见,形态学特征尽管简易、直观,但因变化幅度大,易造成误差。而物种的形态结构及生理结构亦会因生长地理环境各异而有较大起伏,难以精确统一。经结合电泳分析技术,同工酶谱既直接又精确地反映了编码酶蛋白的 DNA 信息,从而使之在分类学上占据了重要的位置。并且,随着电泳技术的多样化和人们对基因编码的可溶性酶蛋白认识的加深,同工酶电泳分析技术应用于藻类分类学的研究将更加深入。

## 2 遗传结构和种群遗传学研究

物种是以种群形式存在的,进化也是以种群为基本单位的。只有研究种或种群的遗传学组成及分布状况,才可以掌握种群的遗传学结构。但与其它生物比较,因为能使用的研究工具和方法有限,使对于藻类的遗传学结构和基因突变、选择、随机遗传漂变等因素所导致的遗传变异的研究受到一定的限制<sup>[15, 16]</sup>。目前最简便、有效的方法就是使用凝胶电泳技术,经分析种间或种内同工酶的多态性,估计自然种群的遗传变异,测定种群内的遗传趋异度。因为同工酶是一种相对稳定的基因组标记,酶谱上所揭示的酶蛋白质的多态性被看作是对整个基因组的随机取样,通过分析酶蛋白质的表现型,就可算出等位基因频率或基因型频率,这样在空间上可以了解种群间的遗传变异,推断它们之间的基因交流和生殖隔离情况;在时间上还可以通过种群间或种内同工酶变异情况的比较,推断种群间的历史情况、迁徙方向。最终测量出种群的遗传变异性,对种群的遗传学结构作出估计。

Gallagher<sup>[17]</sup>将 PAGE 运用于骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 种群的研究中,通过分析 5 种酶位点的多态性,第一次定量检测了微藻的种群遗传学结构;Fuji<sup>[18]</sup>在研究条斑紫菜 (*P. yezoensis*) 叶状体的种群遗传变异时,经 SGE 检测了 12 种酶位点,论证了该种群的遗传变异水平与其大量的无性繁殖方式有关;这与 Pearson 和 Murray<sup>[19]</sup>在研究加利福尼亚地区的珊瑚藻 (*Lithothrix aspergillum* Gray) 种群时得出的海藻种群遗传学结构和遗传变异状况与该种群的生殖方式、生活史以及散布能力密切相关的结论一致。

常规的方法对无融合生殖的种的无性系 (clone, 也译为“克隆”) 的遗传多样性的了解是无能为力的,然而,运用同工酶分析则可以进行探查,Fuji<sup>[20]</sup>运用 SGE 研究了紫菜叶状体,发现多态性均值达到 0.583, 12 个被检测的位点间杂合度均值可达 0.197。此外,一般认为单倍体的藻类在遗传学上是走下坡路的种群,但 Fuji<sup>[18]</sup>经同工酶分析得到条斑紫菜叶状体遗传趋异度 ( $F_{st}$ ) 却高达 0.623, 其遗传多样性完全可以与二倍体的生物体相比,据此可知单倍体在一定情况下对种群遗传学结构的多样性的贡献也是较大的。

但 Sosa 和 Lindstrom<sup>[21]</sup>在运用同工酶研究大型海藻种群遗传学中发现,所检测的同工酶中有近一半只是呈现单位点,说明大型海藻自然种群内的遗传变异水平很低,所以单一运用酶电泳技术难以很好地研究海藻的遗传变异和遗传多样性。

## 3 系统演化的研究

分类学所涉及的问题是将生物性状基本一致的各类群进行分门别类,这样就可以对不同物种予以鉴别;而对于进化研究,则重在测算物种之间的亲缘关系。通过对同工酶资料进行遗传学计算,用遗传相似度 (genetic similarity) 或称遗传一致度 (genetic identity) 和遗传距离 (genetic distance) 对种群间的亲缘关系给出一个定量的指标,进而可以了解种系发生的结构。

同工酶在红藻<sup>[22-26]</sup>、褐藻<sup>[27-29]</sup>;淡水甲藻类<sup>[30, 31]</sup>;绿藻<sup>[32-35]</sup>等藻类系统演化研究中的分析应用已经十分广泛。通过比较同属中的不同种的同工酶谱,可以计算出种间的遗传距离,然后经分支分析,

画出类群间亲缘关系远近的分支图。但在系统演化研究中使用同工酶资料时还应考虑到,尽管某些酶的同工酶资料在某些情况下对系统演化研究有用,可在大多数情况下,单纯用同工酶资料对亲缘关系较远的藻类种间、属间以及更高级的类群建立系统树时可能存在较大的偏差<sup>[14]</sup>。

Thomas 和 Groover<sup>[36]</sup>结合同工酶和免疫学方法成功地鉴定了隶属于绿藻 4 属的 7 种之间的系统关系,为各种不同方法共同使用于系统发育研究开辟了新途径;此后 Lindstrom 和 Cole<sup>[24]</sup>则从同工酶、形态学和染色体三种传统和现代的方法共同得出的证据分析了位于北大西洋和北太平洋两地紫菜的亲缘关系; Van Oppen 等<sup>[37]</sup>还运用同工酶和 RAPD 标记相结合技术用以分析位于北大西洋和波罗的海的橡叶藻 (*Phycodrys rubens*) 群体内和群体之间的遗传变异和系统发育,利用 RAPD 分析修正了因基因突变而可能未表达时所导致的同工酶分析误差。

Benzie 等<sup>[38]</sup>通过酶电泳研究鉴定了澳大利亚境内 13 种马尾藻 (*Sargassum* spp.) 之间的关系,但在实验中发现所检测的同工酶的多态性很低,由此指出更为合理的分析方法应该是考虑将同工酶与叶绿体 DNA 或特异核酸序列分析相结合。由于编码酶蛋白的基因比较容易变化,当类群间亲缘关系较远时,多数酶位点已分化太远,因而失去了测量亲缘关系远近的能力,为此也应该是结合使用形态、化石、免疫、染色体和 DNA 等资料,对建立系统树才是更为有用的。所以在利用同工酶电泳技术进行各种水平的系统演化研究时,应选择那些各类群具相同或相异的性状和特征来衡量它们之间的关系,这样才具有实际意义。

#### 4 遗传标记

随着聚合酶链式反应(PCR)的广泛应用,鉴别生物的各种分子遗传标记技术也不断涌现,有限片段长度多态性(RFLP)、随机扩增片段多态性(RAPD)、DNA 指纹(fingerprint)、扩增片段长度多态性(AFLP)等技术已在线粒体 DNA 和核基因组 DNA 的研究方面取得了一定的进展,可被广泛应用于物种分类鉴定、遗传进化等各个研究领域。尽管 DNA 技术比同工酶电泳能提供更多的遗传数据,但后者具有操作简单、实验要求不太苛刻、易于普及开展不可比拟的优点,且可以直接从等位基因的角度进行遗传结构的分析,使得同工酶电泳能作为遗传标记广泛地应用于藻类学领域,解决一些用传统方法难以定论的问题,主要包括四个方面:①鉴定物种的遗传标记。Matlock 和 Romeo<sup>[39]</sup>使用 PAGE,以五种同工酶位点作为分离和鉴别弓江藻 (*Gracilaria arcuata*)、缢江藻 (*G. Salicornia*) 和可食江藻 (*G. Edulis*) 的遗传标记,结果表明在遗传学上弓江藻与缢江藻的亲缘关系很近,而与形态上相差较大的可食江藻的亲缘关系较远,应该划分成两个遗传学上明显不同的种群,最终准确的将不同种予以区分和定位。同样, Hayhome 和 Chinain 在从形态相同的同属甲藻中辨认出有毒种类时,也是以其作为特异性遗传标记,准确而又快速的得出鉴定结果,避免了因形态学区分所造成的困难,也抛开了由生化分析藻类毒素带来的烦琐<sup>[40,41]</sup>。②繁育方式的研究。Innes 和 Yarish<sup>[42]</sup>分析了缘管浒苔 (*Enteromorpha linza*) 五个自然种群中五种同工酶位点的多态性,发现所有采集的个体都有一个或多个位点呈现多态性,这与该群体以有性繁殖占绝对优势的生殖模式相冲突,由此发现该属的物种经过一段时间的有性生殖后可以出现向无性生殖方式的转变,为同工酶分析技术作为遗传标记在藻类自然种群的生殖模式方面的研究开辟了新的途径。③系统演化的遗传标记。Francke 和 Coesd<sup>[43]</sup>利用电泳检测到位于荷兰与英格兰之间埃伦新月藻 (*Closterium ehrenbergii*) 种群的遗传一致度为 0.20,而位于荷兰境内的埃伦新月藻与项圈新月藻 (*C. Moniliferum*) 种群间的遗传一致度却高达 0.65,由此确定两地的埃伦新月藻种群内部存在着遗传上的不同应分属于两个不同的生物群落。Benzie 等<sup>[14]</sup>应用 SGE 研究了澳大利亚北部蕨藻属的 7 种和 4 变种间等位酶谱的变化,从而确立了彼此间的进化关系。④亲本鉴定和辅助育种。Zhou 等<sup>[44]</sup>将同工酶应用于海带 (*Laminaria* spp.) 不同品系的分析,成功地建立了不同品系间的亲缘关系,在品系鉴定中确立了 Adk - 1 和 Flk - 1 位点作为海带区分的标记,并且在海带育种中初步确立了品系不育或雄性不育的同工酶标记。

综上所述,我们不难看出,同工酶分析技术在藻类学领域的应用具有以下几方面显著的优点:①可

直接统计出等位基因频率和基因型频率。②能探测种内隐藏的变异。③适合对无性生殖或无融合生殖的类群开展研究。所以在 DNA 分析手段还没有变得经济、简便以前,同工酶技术仍将是藻类学领域物种的鉴定、种群结构、系统发育、遗传进化分析等方面的有力工具。但是它的不足之处主要体现在受环境的影响比较大,有时会带来一定的分析误差。所以在藻类学各领域中应与其它各方面资料如形态学、细胞学、生态学、地理学、基因组 DNA 等结合使用,特别是在系统进化、遗传变异等方面。随着人们对同工酶技术认识的加深和使用水平的提高,该技术将能适用于更多新的研究领域。

### 参考文献:

- [1] Chang L O, Srb A M, Steward F C. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora* [J]. *Nature*, 1962, 193:756 - 759.
- [2] Fredrick J F. Polyacrylamide gel studies of the isozymes involved in polyglucoside synthesis in the algae [J]. *Phyton (Argentina)*, 1964, 21:85 - 89.
- [3] Fredrick J F. Biochemical evolution of glucosyl transferase isozymes in the algae [R]. *The Second Conference on Multiple Molecular Forms of Enzymes*, New York Academy of Sciences 1967.
- [4] Melkonian M. An ultrastructural study of the flagellate *Tetraselmis cordiformis* Stein (Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus [J]. *Protoplasma*, 1979, 98: 139 - 151.
- [5] Lindstrom S C, Cole K M. The *Porphyrta lanceolata* - *P. pseudolanceolata* (Bangiales, Rhodophyta) complex unmasked: recognition of new species based on isozymes, morphology, ultrastructures and distributions [J]. *Phycologia*, 1992, 31:431 - 448.
- [6] Thomas D L, Brown R M. New taxonomic criteria in the classification of *Chlorella* species. III. Isozyme analysis [J]. *J Phycol*, 1970, 6:293 - 299.
- [7] Murphy L S. Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes. II. Loss of heterozygosity in clonal cultures of the centric diatoms *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana* [J]. *J Phycol*, 1978, 14:247 - 250.
- [8] Murphy L S, Guillard R R L. Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes. I. The centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *T. flaxinifera* [J]. *J Phycol*, 1976, 12:9 - 13.
- [9] Blair S M, Matheison A C, Cheney D P. Morphological and electrophoretic investigations of selected species of *Chaetomorpha* (Chlorophyta: Cladophorales) [J]. *Phycologia*, 1982, 21:164 - 172.
- [10] Whitten D J, Haythorn B A. Comparative electrophoretic analysis of two binuclear dinoflagellates [J]. *J Phycol*, 1986, 22:348 - 352.
- [11] Price J H, Pettitt J M, Russell S. Indications of species status from total protein signatures in *Collithamnion* (Ceramiales) [J]. *Hydrobiologia*, 1987, 151/152:213 - 220.
- [12] Lindstrom S C, Cole K M. An evaluation of species relationships in the *Porphyrta perforata* complex (Bangiales, Rhodophyta) using starch gel electrophoresis [J]. *Hydrobiologia*, 1990, 204/205:179 - 183.
- [13] Lindstrom S C, Cole K M. *Porphyrta fallax*, a new species of Rhodophyta from British Columbia and northern Washington [J]. *Jap J Phycol*, 1990, 38:371 - 376.
- [14] Benzie J A H, Price I R, Ballment E. Population genetics and taxonomy of *Gulderia* (Chlorophyta) from the Great Barrier Reef, Australia [J]. *J Phycol*, 1997, 33:491 - 504.
- [15] Jones D J. Genetic differentiation among population of marine algae [J]. *Helgol Meeresunters*, 1984, 38:401 - 417.
- [16] Bird C J, van der Meer J P. Systematic of economically important marine algae: a Canadian perspective [J]. *Can J Bot*, 1986, 71:361 - 369.
- [17] Gallagher J C. Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay [J]. *J Phycol*, 1980, 16:464 - 474.
- [18] Fujio Y, Kldaka P L G, Hara M. Genetic differentiation and amount genetic variability in natural population of the haploid liver *Porphyrta yezoensis* [J]. *Jap J Genet*, 1985, 60:347 - 354.
- [19] Pearson E A, Murray S N. Patterns of reproduction, genetic diversity, and genetic differentiation in California population of the geniculate coralline algae *Lithothrix aspergillum* (Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 1997, 33:753 - 763.
- [20] Fujio Y, Tanaka M Y, Hara M, et al. Enzyme polymorphism and population structure of the haploid liver *Porphyrta yezoensis* [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53:357 - 362.
- [21] Sosa P A, Lindstrom S C. Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and application in systematic [J]. *Euro J Phycol*, 1999, 34: 427 - 442.
- [22] Cheney D P, Babbel G R. Biosystematic studies of the red algal genus *Eucheuma*. I. Electrophoretic variation among Florida populations [J]. *Mar Biol*, 1978, 47:251 - 264.
- [23] Gabrielson P W, Garbary D J, Scagel R F. The nature of the ancestral red alga: inferences from a cladistic analysis [J]. *Biosystems*, 1985, 18: 335 - 346.

- [24] Lindstrom S C, Cole K M. Relationship between some North Atlantic and North Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta): evidence from isozymes, morphology, and chromosome [J]. *Can J Bot*, 1992, 70:1355 - 1363.
- [25] Lindstrom S C, Cole K M. The systematic of *Porphyra*: character evolution in closely related species [J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260/261:151 - 157.
- [26] Lindstrom S C. Intra- and micro-population genetic variation in species of *Porphyra* (Rhodophyta, Bangiales) from British Columbia and adjacent waters [J]. *J Appl Phycol*, 1993, 5:53 - 62.
- [27] Neefus C D, Allen B P, Baldwin H P, et al. An examination of the population genetics of *Laminaria* and other brown algae in the Laminariales using starch gel electrophoresis [J]. *Hydrobiologia*, 1993, 260/261:67 - 79.
- [28] Lu T T, Williams S L. Genetic diversity and genetic structure in the brown alga *Haldrys divisa* (Fucales, Cystoseiraceae) in Southern California [J]. *Mar Biol*, 1994, 121:363 - 371.
- [29] Williams S L, Di Fiori R E. Genetic diversity and structure in *Petalonia fastigiata* (Phaeophyta, Fucales): does a small true in neighborhood size explain fine-scale genetic structure [J]. *Mar Biol*, 1996, 126:371 - 382.
- [30] Bean C A, Himes M. Electrophoretic characterization of members of the *Cryptocentraria robusta* (Ocnophyceae) complex [J]. *J Phycol*, 34: 204 - 217.
- [31] Campbell A D, Taylor F J R, Theriault J C. Cladistic analysis of electrophoretic variants within the toxic dinoflagellate genus *Prorocentrum* [J]. *Bot Mar*, 1988, 31:39 - 51.
- [32] Thomas D L, Delcarpio J B. Electrophoretic analysis of enzymes from three species of *Chlamydomonas* [J]. *Amer J Bot*, 1971, 58(8): 716 - 720.
- [33] Mercei D, Grant B R. Peroxidase in *Caulerpa* [J]. *J Phycol*, 1982, 18:107 - 113.
- [34] Coesel P F M, Menken S B J. Biosystematic studies on the *Caulerium noronhaiense/ehrenbergii* complex (Chlorophyta, Western Europe. I. Isozyme patterns [J]. *Br J Phycol*, 1988, 23: 193 - 198.
- [35] Buchheim M A, Nickrent D, Hultman L R. Systematic analysis of *Sphaerocapsa* (Chlorophyceae) [J]. *J Phycol*, 1990, 26:173 - 181.
- [36] Thomas D L, Croover R D. Electrophoretic and immunological analyses of seven chlorosarcinaceous algae [J]. *J Phycol*, 1973, 9:289 - 296.
- [37] Van Oppen M J H, Olsen J L, Stum W T. Genetic variation within and among North Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycoerythra robusta* (Rhodophyta) [J]. *Eur J Phycol*, 1995, 31:251 - 260.
- [38] Benzie J A H, Ballant E, Edyvane K. Allezymes as genetic identification markers of *Sargassum* spp. (Phaeophyta) from the Great Barrier Reef, Australialia [J]. *Bot Mar*, 2000, 43: 169 - 179.
- [39] Matlock D B, Romeo C. Interspecific variability within the genus *Gracilaria* (Rhodophyta) on Guam [J]. *Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium*, 1981, 2:415 - 417.
- [40] Hayhorne B A, Anderson D M, Kullis D M, et al. Variation among congeneric dinoflagellates from the northeastern United States and Canada. I. Enzyme electrophoresis [J]. *Mar Biol*, 1989, 101:427 - 435.
- [41] Chinnain M, Germain M, Sako Y, et al. Intraspecific variation in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). I. Isozyme analysis [J]. *J Phycol*, 1997, 33:36 - 43.
- [42] Innes D J, Yarish C. Genetic evidences for the occurrence of asexual reproduction in population of *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. (Chlorophyta, Ulvales) from Long Island Sound [J]. *Phycologia*, 1984, 23:311 - 320.
- [43] Francke J A, Coesel P F M. Isozyme variation within and between Dutch population of *Cladonia ehrenbergii* and *C. noronhaiense* (Chlorophyta, Conjugata - phyceae) [J]. *Br J Phycol*, 1985, 20:201 - 209.
- [44] Zhou Z C, Wu C Y, Wang S J. Application of isozyme in the breeding of *Laminaria* [A]. Shin S, Lee SM. *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources* [C]. Korea: Kangnung national university and Kangwon provincial government, 1998, 131 - 157.