

有孔虫分子生物学研究进展*

李保华¹ Kemal Topac Ertan² Christoph Hemleben²

1. 中国科学院南京地质古生物研究所, 南京 210008;

2. Institute of Geology, University of Tübingen, D-72076, Germany

摘要 传统的微体古生物学研究中, 有孔虫是生活于海洋环境中以具有膜状、胶结质或钙质壳为特征的丝网状肉足虫类原生动动物。最近对底栖有孔虫 rDNA 序列的分析研究, 揭示了有孔虫还有无壳(裸露)种类以及生活于陆地淡水环境的类型。同时分子系统学研究表明有孔虫位于真核生物系统树的基部, 在双滴虫类与绿眼虫类之间。对浮游有孔虫大量基因型及其与环境关系的研究, 揭示了传统研究低估了有孔虫的多样性。有孔虫基因型与生物地理分布、海洋环境有关研究表明利用 rDNA 序列分析识别出的同一物种的不同基因型可以为古环境研究提供更加精确的替代性指标。

关键词 有孔虫 rDNA 分子生物学 系统分类 古海洋学

有孔虫在分类上属原生动物门肉足虫纲, 活体具有丝网状原生质, 多生活于海洋环境中, 并以具有膜状、胶结质或钙质壳体为特征。作为微体古生物学研究门类之一, 有孔虫在地层划分、对比和石油钻探中具有极其重要的作用^[1, 2]。随着深海钻探计划(DSDP)与大洋钻探计划(ODP)的实施, 有孔虫研究在新的学科——“古海洋学”研究中处于举足轻重的地位(如稳定同位素气候与地层、表层海水古温度等^[3-5])。尽管20世纪70年代以来进行了不少有孔虫生态学调查, 但其分类仍然依靠形态学手段, 很多属种的亲缘关系很难确定^[6-8]。90年代以来, 分子生物学分析手段的应用, 开始了对有孔虫系统分类、演化及其与环境变化关系的深入研究^[9, 10]。

有孔虫的分子生物学研究主要以编码核糖体RNA的基因序列(rRNA基因)为对象。rRNA基因是一个相对稳定的基因, 通常由小亚基片段(small subunit, SSU)如18S、大亚基片段(large subunit, LSU)如25S以及5.8S, ITS, IGS等组成(图1)。

研究表明, 有孔虫SSU rRNA基因的保守部分有特征的插入片段(图1中F1, F2, F3等), 成为有孔虫区别于其他生物类群的分子特征之一。在真核生物中, 一个rRNA基因中的SSU, LSU和5.8S等均可有50—5000个重复单位。所以尽管有孔虫为单细胞生物, 由于其rRNA基因组有很多这样的重复单位, 从而使得该类群的分子生物学实验分析与研究得以实现。

1 有孔虫DNA的提取、PCR扩增、克隆与测序

有孔虫DNA的提取曾经尝试了直接提取与通过有孔虫繁殖产生大量配子提取的两种方法, 结果表明这两种方法得出类似的DNA序列^[10, 11]。由于后一方法通常比较困难, 现在提取有孔虫DNA多采用前者。

直接提取法主要采用裂解缓冲液法, 如DOC液方法^[10]、Guanidine液方法^[12]或CATB液法^[13-15]: 将仔细清洗过的有孔虫捣碎、加入裂解

2004-08-09 收稿, 2004-09-30 收修稿稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 40276012)

E-mail: bhli@public1.ppt.js.cn

液, 然后置于恒温箱中 60℃ 培养 1 h. 有时也采用专门试剂盒提取, 如 Qiagen DNeasy Plant Mini Kit

试剂盒法^[16-20]. 提取后的有孔虫 DNA 于 -20℃ 冷藏保存待分析.

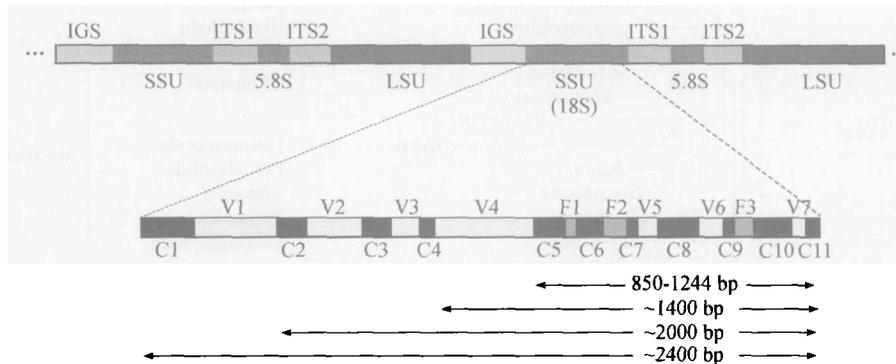


图1 有孔虫编码核糖核酸基因(rRNA 基因)及结构简图

ITS: 转录间隔区; IGS: 基因间隔区; LSU: 大亚基基因片段; SSU: 小亚基基因片段(如 18S); 下图为放大的有孔虫 SSU rRNA 基因(18S); C1-C11 为保守基因片段; V1-V7 为变异片段; F1-F3 为有孔虫特征基因片段. 图中所示为不同基因片段的大概长度

最近的研究多以有孔虫部分 SSU rDNA 序列为基础, 对该 SSU rDNA 片段(图 1, C5-C11, 约为 1000 bp)进行 PCR 扩增是通过特殊引物的设计(如 S14F1/S21F1)和退火温度的设置加以控制(50—54℃)等^[21, 22]. 然后对扩增产物进行单株克隆与测序, 就可以得到有孔虫个体的 SSU rDNA 序列了, 并进而用于序列对比与系统发生分析等. 而对其他有孔虫基因如 LSU rRNA 基因序列、RPB1 基因序列等, 亦采用类似的分析方法, 只是在引物的设计等方面略有差别^[15, 23].

2 有孔虫分子生物学在有孔虫分类、系统发生上的应用

传统的有孔虫分类以壳体形态特征为依据, 因而对那些无壳或形态变化较大的胶结类型的分类非常困难, 运用这些个体的 SSU rDNA 序列分析, 可以为属种的鉴定提供较准确的手段. 例如淡水有孔虫新种 *Edaphoallogromia australica* Meisterfeld, Holzmann and Pawlowski 与海相胶结壳有孔虫新种 *Toxisarcon synsuicidica* Cedhagen and Pawlowski 的建立^[16, 18]. 通过 SSU rDNA 序列研究, 确定 *Ammonia catesbyana* (d'Orbigny) 是独立于 *Ammonia beccarii* (Linné) 类的新种^[14]; 确认 *Syringamina corbicula* Richardson 是有孔虫^[24]; 推测淡水变形虫 *Reticulomyxa filosa* Nauss 应归有孔虫一类^[25].

由于形态变异大, *Ammonia beccarii* var. 是底

栖有孔虫分类中最为困难和混乱的一个类群. 分子生物学研究显示形状不同的 *Ammonia beccarii* var. 并不属于同一个种^[23, 26, 27]. Hayward 等^[28] 结合 LSU rDNA 序列与壳体形态特征对世界各地 17 个国家 30 个地区的 *Ammonia* 个体进行了系统研究. 结果表明, LSU rDNA 序列可以将这些个体归类为 12 个分子类型, 这些类型可以有相对应的壳体特征如壳形、房室形状、孔隙度、房室直径、壳面放射纹的长度、脐直径等, 据此他们提出了对该类群分类方案的建议.

基于 SSU 和 LSU rDNA 序列的分子系统学研究, 有孔虫位于真核生物系统树基部位置, 在双滴虫类(Diplomonadida)与绿眼虫类(Euglenoida)之间^[21](图 2). 但有孔虫在分子系统树上如此早的分化与其化石记录自寒武纪(约 540 Ma)才开始出现之间有着明显的不一致^[29]. 现生无壳(裸露)类型有孔虫的存在与确认则在某种程度上解析了上述矛盾^[30]. 另外, 根据对无壳的、角质的和胶结壳单房室有孔虫的 SSU rDNA 序列分析和分子系统发生学研究, 确立了有孔虫早期演化的主要步骤^[20]. 根据肌动蛋白基因序列的分子系统学研究^[31], 有孔虫可能包含于真核生物“树冠(crown)”群中最近建立的 Cercozoa 类群^[32]中. 而 Berney 等^[33] 根据 54 个 SSU rDNA 序列重新分析的结果显示有孔虫在真核生物系统树的基部, 和 Cercozoa 类群亲源关系比较接近. RPB1 基因序列研究也证实了上述结论^[19].

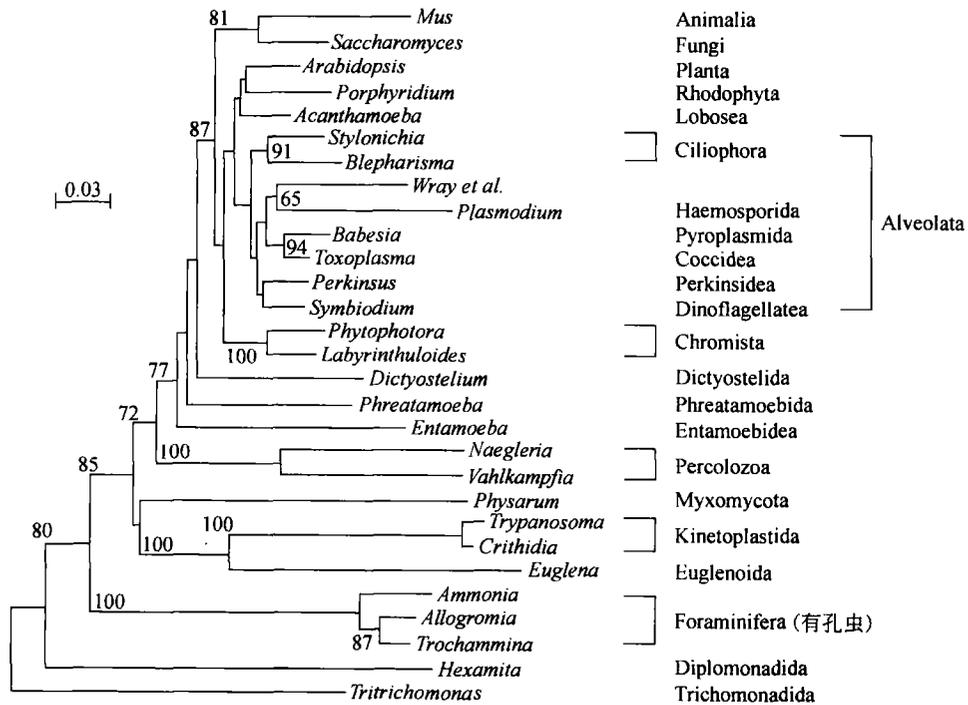


图 2 基于 29 个 SSU rDNA 序列分析所揭示的真核生物系统发生树^[21]

3 有孔虫分子生物学特征与古环境、古海洋学研究

现代大洋中共约有 50 多个浮游有孔虫种，相对与其他浮游类型来说要少得多^[8]。浮游有孔虫的 rDNA 序列分析表明每个种均有数个基因型，而生物地理和生态特征分析表明有孔虫属种的不同基因型有独特的生物地理分布。例如，在现代大西洋中 *Globorotalia truncatulinoides* (d'Orbigny) 就有 4 个不同的基因型：这些不同的基因型具有旋向与纬度分布等差异^[34] (图 3)。而据 *Globigerinella siphonifera* (Brady) 的 rDNA 序列划分的两个基因型 (I 型和 II 型)，均有特征的同位素与壳体微细结构：如 I 型 *Gs. siphonifera* 比 II 型 *Gs. siphonifera* 具有偏轻的 $\delta^{18}\text{O}$ 与 $\delta^{13}\text{C}$ 、以及较多和较大的壳孔^[35]。*Orbulina universa* (d'Orbigny), *Globigerinoides ruber* (d'Orbigny), *Globigerina bulloides* d'Orbigny 等属种的不同基因型也分布于不同的海洋范围，但可以通过水团进行基因交流^[35,36]。研究表明，南极和北极区的基因交流可以通过边界上升流而穿越赤道进行；另外基因流还可以通过水团边缘

传播，热带-亚热带有孔虫基因可以沿着现代洋流从太平洋-印度洋绕过南非好望角流向大西洋^[35, 37]。

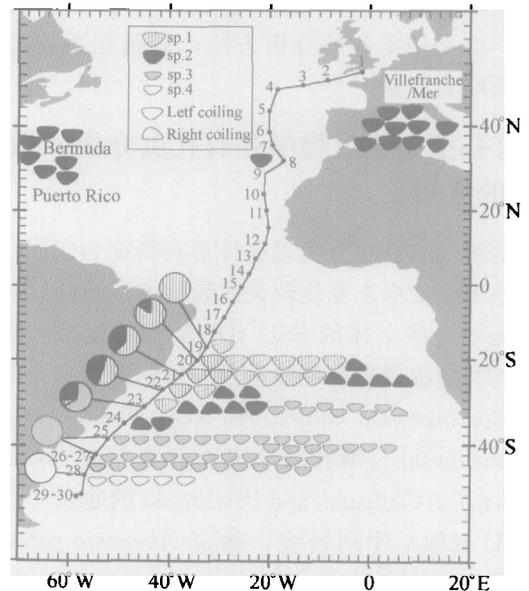


图 3 现代大西洋中浮游有孔虫 *Globorotalia truncatulinoides* 的不同基因型、它们的个体含量及其地理分布^[34]

古海洋学研究中，不同古海洋环境中的浮游有

孔虫具有不同生态型。分子生物学研究表明这些不同生态型,如左旋型与右旋型壳的 *Globorotalia truncatulinoides* 和 *Neogloboquadrina pachyderma* (Ehrenberg)、粉红色与白色壳体的 *Globigerinoides ruber* 等均为不同的基因型。显然,这种不同水体环境中的亚类型基因的存在表明远洋生物的多样性远远被低估了。浮游有孔虫种的形成不一定表明有明显的形态学变化,传统分类中不同环境中的同一有孔虫物种、或同一环境中的相同种的不同形态类型,实际上可能就是不同的种^[12,34]。

由于许多浮游有孔虫种的不同基因型在形态上难以区分,因而常被称为隐型种(Cryptic species)。而海洋中浮游有孔虫大量隐型种的存在以及它们特有的分布模式,很可能代表了独特的有孔虫生态型。Kucera等^[38]将 *Globigerina bulloides* 隐型种的概念引进海水古温度的估计上,结果显示比传统的转换函数法、现代类比法的分析误差能够降低1℃。

4 存在的问题与讨论

在有孔虫的起源与系统演化研究中,DNA序列分析结合形态学与生态环境的比较和综合研究可以为其提供一个更强有力的手段。DNA序列分析作为分类与基于分子钟的时间标尺可以更好地区分不同属种并建立它们的发展史,更好地估计它们的分化时间和最佳水文环境,以及与其基因差异有关的形态特征^[34]。

尽管有孔虫分子生物学研究能够建立较多的基因型、并对古海洋学研究中以浮游有孔虫为基础的更可靠环境替代性指标建立有所帮助,但只有部分基因型的形态特征能够被清楚地区别开来^[26,27]。在实际研究中,正是由于这种从不同基因型到表现型“转化”的不明显,限制了它们从分子生物学研究到微体古生物、古环境、古海洋学研究的应用。

最近,更加详细的研究显示同一地区不同季节有孔虫基因型亦有明显差异,显示了有孔虫基因型分布的复杂性^[39]。但从基因交流的角度来看,同一环境中基因库具有自由交流的群落中,其基因变异不应该达到如此的差异。另外,同一个体的不同克隆实验分析表明,没有两个克隆的 ITS rDNA 序列完全相同^[34]。因此,有孔虫作为原始的单细胞原核生物,在经历数亿年的演化之后,是否单个有孔虫

体内的 rRNA 基因在不同的 SSU(或 LSU)复制单位本身就具有较大的差异?部分这种差异是否只是种内的、而没有达到种水平上的分异?也就是说在有孔虫的系统分类上,这种基因型的差别是否能够达到种的水平,即我们通常理解的生物学定义的“种”?在分子水平上,到底什么程度的基因差异可以认为是两个种,目前还缺乏严格的标准。这些还有待于有孔虫分子生物学的进一步研究来解决。

然而,可以确信的是,通过更多的有孔虫基因型的描述、它们的生物地理分布范围、生态条件、以及其壳体的微细构造、化学或者同位素特征的辨认,而使其不同基因型区分在古海洋学研究中得以可能,从而使有孔虫具有更精确的环境指示意义。

致谢 郝家胜、李春香博士及两位评阅人对本文的修改提出了宝贵意见,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Bolli H M, Saunders J B. Oligocene to Holocene lower latitude planktonic foraminifera. In: Bolli H M, Saunders J B, Perch-Nielsen K, eds. Plankton Stratigraphy. Cambridge: Cambridge University Press, 1985, 155—262
- 2 中华人民共和国石油勘探公司南海分公司,中国科学院南京地质古生物研究所. 南海北部大陆架第三纪古生物图册. 广州: 广东科技出版社, 1981, 1—274
- 3 Prell W L, Imbrie J, Martinson D G, et al. Graphic correlation of oxygen isotope stratigraphy application to the late Quaternary. Paleoclimatology, 1986, 1(2): 137—162
- 4 Thunell R, Anderson D, Gelliar D, et al. Sea-surface temperature estimates for the tropical western Pacific during the last Glaciation and their implications for the Pacific Warm Pool. Quaternary Res, 1994, 41: 255—264
- 5 Lear C H, Elderfeld H, Wilson, P A. Cenozoic deep-sea temperatures and global Ice volumes from Mg-Ca in benthic foraminiferal calcite. Science, 2000, 287: 269—272
- 6 Be A W H. An ecological, zoogeographic and taxonomic review of recent planktonic foraminifera. In: Ramasay A T S, ed. Oceanic Micropaleontology. London: Academic Press, 1977, 1—100
- 7 Saito T, Thompson P R, Breger D. System Index of Recent and Pleistocene Planktonic Foraminifera. Tokyo: University of Tokyo Press, 1981, 1—190
- 8 Hemleben C, Spindler C M, Anderson O R. Modern Planktonic Foraminifera. New York: Springer-Verlag, 1989, 1—363
- 9 Langer M R, Lipps J H, Piller W E. Molecular paleobiology of protists: Amplification and direct sequencing of foraminiferal

- DNA. *Micropaleontology*, 1993, 39: 63—68
- 10 Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni J, et al. Taxonomic identification of foraminifera using ribosomal DNA sequences. *Micropaleontology*, 1994, 40: 373—377
 - 11 Darling K F, Kroon D, Wade C M, et al. Molecular phylogeny of the planktic foraminifera. *J Foraminiferal Res*, 1996, 26: 324—330
 - 12 De Vargas C, Zaninetti L, Hilbrecht H, et al. Phylogeny and rates of molecular evolution of planktonic foraminifera; SSU rDNA sequences compared to the fossil record. *J Mol Evol*, 1997, 45: 285—294
 - 13 De Vargas C, Bonzon M, Rees N W, et al. A molecular approach to biodiversity and biogeography in the planktonic foraminifer *Globigerinella siphonifera* (d'Orbigny). *Mar Micropaleontol*, 2002, 45: 101—116
 - 14 Langer M R, Leppig U. Molecular phylogenetic status of *Ammonia catesbyana* (d'Orbigny, 1839), an intertidal foraminifer from the North Sea. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Mh*, 2000, 9: 545—556
 - 15 Holzmann M, Habura A, Giles H, et al. Freshwater foraminifera revealed by analysis of environmental DNA samples. *J Eukaryot Microbiol*, 2003, 50: 135—139
 - 16 Meisterfeld R, Holzmann M, Pawlowski J. Morphological and molecular characterization of a new terrestrial allogromiid species; *Edaphoallogromia australica* gen. et sp. nov., (Foraminifera) from Northern Queensland (Australia). *Protist*, 2001, 152: 185—192
 - 17 Cedhagen T, Pawlowski J. *Toxisarcon synsuicidica* n. gen, n. sp., a large monothalamous foraminiferan from the west coast of Sweden. *J Foraminiferal Res*, 2002, 32: 351—357
 - 18 Longet D, Archibald J M, Keeling P J, et al. Foraminifera and Cercozoa share a common origin according to RNA polymerase II phylogenies. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1735—1739
 - 19 Pawlowski J, Holzmann M, Berney C, et al. The evolution of early Foraminifera. *Proc Nat Acad Sci*, 2003, 100: 11494—11498
 - 20 Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni J, et al. Early origin of foraminifera suggested by SSU rRNA gene sequences. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 445—450
 - 21 Ertan K T, Hemleben V, Hemleben C. Molecular evolution of some selected benthic foraminifera as inferred from sequences of the small subunit ribosomal DNA. *Mar Micropaleontol*, 2004, 53: 367—388
 - 22 Holzmann M, Piller W, Pawlowski J. Sequence variations in large-subunit ribosomal RNA gene of *Ammonia* (Foraminifera, Protozoa) and their evolutionary implications. *J Mol Evol*, 1996, 43: 145—151
 - 23 Pawlowski J, Holzmann M, Fahrni J, et al. SSU rDNA suggests that the Xenophyophorean *Syringamina orbicula* is a foraminiferan. *J Eukaryot Microbiol*, 2003, 50: 483—487
 - 24 Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni J, et al. Molecular evidence that *Reticulomyxa filosa* is a freshwater naked foraminifer. *J Eukaryot Microbiol*, 1999, 46: 612—617
 - 25 Holzmann M, Pawlowski J. Molecular, morphological and ecological evidence for species recognition in *Ammonia* (Foraminifera). *J Foraminiferal Res*, 1997, 27: 311
 - 26 Holzmann M. Species concept in foraminifera; *Ammonia* as a case study. *Micropaleontology*, 2000, 46: s21—s37
 - 27 Hayward B W, Holzmann M, Grenfell H R, et al. Morphological distinction of molecular types in *Ammonia* towards a taxonomic revision of the world's most commonly misidentified foraminifera. *Mar Micropaleontol*, 2004, 50: 237—271
 - 28 Culver S J. Early cambrian foraminifera from west Africa. *Science*, 1991, 254: 689—691
 - 29 Pawlowski J, Bolivar I, Fahrni J, et al. Naked foraminifera revealed. *Nature*, 1999, 399: 27
 - 30 Keeling P J. Foraminifera and Cercozoa are related in actin phylogeny: Two orphans find a home? *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 1551—1557
 - 31 Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1998, 73: 203—266
 - 32 Berney C, Pawlowski J. Revised small subunit rRNA analysis provides further evidence that Foraminifera are related to Cercozoa. *J Mol Evol*, 2003, 57: 1—8
 - 33 De Vargas C, Renaud S, Hilbrecht H, et al. Pleistocene adaptive radiation in *Globorotalia truncatulinoides*; Genetic, morphologic, and environmental evidence. *Paleobiology*, 2001, 27: 104—125
 - 34 Darling K F, Wade C M, Kroon D, et al. The diversity and distribution of modern planktic foraminiferal small subunit ribosomal RNA genotypes and their potential as tracers of present and past ocean circulations. *Paleoceanography*, 1999, 14: 3—12
 - 35 De Vargas C, Norris R, Zaninetti L, et al. Molecular evidence of cryptic speciation in planktonic foraminifers and their relation to oceanic provinces. *Proc Nat Acad Sci*, 1999, 96: 2864—2868
 - 36 Darling K F, Wade C M, Stewart I A, et al. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature*, 2000, 405: 43—47
 - 37 Kucera M, Darling K F. Cryptic species of planktonic foraminifera: their effect on palaeoceanographic reconstructions. *Phil Trans R Soc Lond A*, 2002, 360: 695—718
 - 38 Darling K F, Kucera M, Wade C M, et al. Seasonal distribution of genetic types of planktonic foraminifer morphospecies in the Santa Barbara Channel and its paleoceanographic implications. *Paleoceanography*, 2003, 18(2): 1032