

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.05.037

一株轮藻新特征及其分类地位

陈孔翔, 兰利琼, 柳科欢, 张志霞, 曹素娟, 卿人韦

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 本研究基于在四川雅安采集到的一株特殊轮藻, 形态学观察显示其茎与小枝无皮层, 小枝分叉, 冠细胞两层——这些是丽藻族种类所具有的特征。然而, 其节部小枝基部具有乳突状托叶——这是丽藻族种类所不具备的特征。本研究显示, 乳突状托叶无论在野外采集植株的直接观察中, 还是在实验室稳定培养、继代培养植株的观察中均能稳定表达。18S rDNA与*rbcL*基因联合分子系统发育分析显示: 新特征轮藻与丽藻属其它种类聚在一起且成为单独的一支。形态学与分子系统发育学研究结果均说明新特征轮藻与丽藻族有密切的亲缘关系, 可以归入丽藻属, 但托叶不再仅仅是轮藻族独有的特征, 部分丽藻族的种类也拥有这一特征。

关键词: 轮藻; 新特征; 18S rDNA; *rbcL*; 分类系统

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)05-1107-06

A study of the new characteristic charophyte and the classification status

CHEN Kong-Xiang, LAN Li-Qiong, LIU Ke-Huan,
ZHANG Zhi-Xia, CAO Su-Juan, QING Ren-Wei

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: This study was focused on a special charophyte collected from Ya'an, Sichuan. Morphological observation showed that it had two-layer coronal, divided branchlets and no cortex. These were the features of Nitelleae. However, there were papillary stipulodes at the base of node and beneath the branchlets, which wasn't characteristic of the Nitelleae. The experimental observation showed that the papillary stipulodes could express stably no matter in the fresh collected samples, in the laboratory cultured specimens or in the seedlings coming from the germinated oospores in the laboratory. Molecular phylogenetic analyses, which combined the 18s rDNA gene with the *rbcL* gene, demonstrated that new feature charophyte clustered with other species of *Nitella* as a single clade. The results of morphological observation and molecular analyses illustrated that the new feature charophyte was closely related to Nitelleae and could be classified into *Nitella*. Whereas the papillary stipulodes was no longer just a unique characteristic of the Chareae, but the species of Nitelleae also had this characteristic.

Keywords: Charophyte; New characteristic; 18S rDNA; *rbcL*; Classification system

1 引言

现生轮藻植物仅一纲, 轮藻纲(Charophyceae),

轮藻目(Charales), 轮藻科(Characeae), 下分为轮藻族(Chareae)和丽藻族(Nitelleae)两个族。根据分枝型、藏卵器冠细胞、托叶和苞片等特点差异, 轮藻族

收稿日期: 2016-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470143); 四川省科技厅项目(2014JY0171)

作者简介: 陈孔翔(1989-), 男, 土家族, 湖北人, 硕士, 研究方向为轮藻分类。E-mail: 718202334@qq.com

通讯作者: 卿人韦。E-mail: qingrw@scu.edu.cn

包含有轮藻属(*Chara*)、灯枝藻属(*Lychnothamnus*)、丽枝藻属(*Lamprothamnium*)和拟丽藻属(*Nitellopsis*)，丽藻族包含丽藻属(*Nitella*)和鸟巢藻属(*Tolypella*)。其中，轮藻族的特点是冠细胞一层共 5 个细胞、小枝不分叉和具有单细胞结构(苞片、托叶、小苞片等)；丽藻族的特点是冠细胞两层共 10 个细胞、小枝分叉、没有苞片和托叶等结构^[1-5]。

我国具有丰富的现生轮藻资源，据记载有 5 个属，152 个种和 39 个变种^[3, 6, 7]。早在 2000 年时，本实验室在四川雅安采到了一株特殊的轮藻植物，具有茎与小枝无皮层、小枝分叉、藏卵器冠细胞 10 个且排成 2 层等丽藻族特征。但是，植株茎节处小枝基部具有丽藻族不具有的乳突状托叶，而此特征是轮藻族内重要分类特征之一。在已有的丽藻族相关研究中还没有报道过具有托叶的种类^[1-5, 7-9]。根据现有的轮藻分类系统，我们无法确定其系统位置，暂将其称为具有新特征的轮藻。同时，遵照科学的严谨性，为了确定这些特征是否稳定，多年以来，我们实验室一直在持续性地观察此种轮藻。

轮藻的分类和分子系统进化研究很广泛，最初的研究单独使用轮藻的核基因 18S rDNA 和叶绿体基因 *rbcL* 进行系统进化分析^[8, 10, 11]。2004 年，Sakayama 等选取了丽藻属中 *Tief fallenia* 亚属的 13 个种，采用三种方式，即 *atpB-rbcL*、5.8S rRNA-ITS、*atpB-rbcL*-5.8S rRNA-ITS 分别构建联合树，结果显示在种或种下水平，基因联合建树比单独建树具有更高的分辨率^[12]，叶绿体基因与细胞核基因联合建树的结果更接近于自然种间进化关系。

本研究以该具有新特征的轮藻为研究对象，对野外采集到的植株、取回实验室培养的植株以及采集到的轮藻合子进行萌发得到的植株进行形态学观察，并进一步进行分子系统发育分析，以探讨其系统分类地位。

2 材料与方法

2.1 材料

2014 年 1 月 19 日在四川省雅安市名山县的水稻田(30.211N, 103.225E)采集到新特征轮藻，标本号 NF010、NM002，采集人兰利琼、卿人韦、陈孔翔；2015 年 3 月 26 日再次同一地点采集样本，标本号 NF016、NF022、NM015、NM017，采集人傅华龙、陈孔翔。

2.2 方法

2.2.1 样本采集 采集样本时，保证植株和假根的完整性，同时采集繁殖季节时期含有合子(受精卵)的泥土。将采集到的新鲜藻体放置于浅搪瓷盘中，用毛笔轻轻刷净藻体，去除表面的杂质以及丝状绿藻等，动作轻缓，避免损坏藻体。用圆形反边水槽装一定厚度的黄泥土，去除杂质，蒸汽式高压灭菌，并用自来水多次浸泡黄泥并换水，以除去多余养分，待槽内水沉清后分别植入新鲜轮藻材料，置窗台边半日照、室温培养。将野外采集混合有合子的泥土放置于圆形反边水槽中，除去杂质，注入适量自来水，并定期换水，进行合子萌发实验。

2.2.2 形态学特征观察 使用体视显微镜(尼康 SMZ25; 东京, 日本)和外接 500 万像素数码相机 CCD 显微摄像/照相系统(UCMOS14000KPA; Toupcam, 杭州, 中国)的光学显微镜(Olympus BH; 东京, 日本)。

2.2.3 DNA 提取和目的片段扩增 选取轮藻植株，用毛笔轻轻刷净藻体，去除表面的杂质，选取幼嫩部分提取基因组 DNA，提取方法采用试剂盒提取(Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd, Beijing, PA, China)。18S rDNA 扩增引物: Char 18Sp1 (5'-CACTGTGAACTGCGAATGGCTC-3') 和 Char 18Sp2 (5'-GACCATTC AATCGGTAGGAGCGA-3')。 *rbcL* 扩增引物 Char *rbcL* p1 (5'-CACTGTGAACTGCGAATGGCTC-3') 和 Char *rbcL* p2 (5'-GACCATTC AATCGGTAGGAGCGA-3')。PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)反应条件参照文献^[13-15]，各自退火温度 18S rDNA 51.7°C/*rbcL* 47.9°C。PCR 产物进行 TA 克隆，并将阳性克隆送至华大基因测序。

2.2.4 系统发育树构建 将测序获得的序列通过 ContigExpress 拼接整理后，结合 GenBank 数据库相关序列(见表 1)，使用 MEGA v. 6.0^[16] 中的 CLUSTALW 软件进行多序列对比，并人工手动检查和部分序列校正，将序列两端切除对齐，然后将两个基因对应拼接在一起，并分析保守位点、变异位点和简约信息位点。系统进化分析采用了贝叶斯推理法(Bayesian inference, BI)、最大简约法(Maximum parsimony, MP)和最大似然法(Maximum likelihood, ML)。BI 和 MP 分析，分别运用 MrBayes v3.1.2^[17] 软件和 PAUP* version 4.0 beta 10 软件^[18]，方法步骤参照文献^[19]。ML 分析使用法国南部生物信息学平台的 ATGC: PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr>) 软件^[20]，采用

GTR 模型, 初始树采用 NNI 的启发式搜索, 对系统发育树的拓扑结构的可靠性通过自展法进行 1000 次的重复取样。

3 结果与分析

3.1 藻体形态

雌雄异株, 暗绿色或鲜绿色, 节处的小枝单轮排列, 6~8 枚一轮, 小枝均一次分叉, 末射枝 1~3 枚(图 1a)。雌、雄株小枝轮基部有托叶, 单轮, 不规则排列, 3~4 倍于小枝数, 外形退化, 呈乳突状(图 1b 雌株, 图 1c 雄株)。藏卵器单生或 2~3 个群生, 冠细胞两层, 上下层各由 5 个细胞组成(图 1d)。野外采集到的植株和实验室培养的植株形态特征一致。根据有关文献^[1,3-5], 植株不具有皮层与苞片结构, 属于丽藻族特征, 而具有托叶是轮藻族内的物种才具有的特征。

3.2 合子萌发

采集回实验室含有轮藻合子的泥土, 在实验室

条件下顺利萌发, 结果如图 2 a, b。合子萌发产生的后代植株中仍能观察到与图 1 所示相同的形态特征结果(如图 2), 其中托叶如图 2c(雌株), 图 2d(雄株)所示, 双层托叶如如图 2e, 图 2f 所示。这些结果说明了该轮藻这一新特征是可以稳定遗传的。

3.3 基因序列特征

用于 18S rDNA + *rbcL* 基因序列研究的序列共计 21 条(见表 1), 其中, 包含轮藻属 3 个种 5 条序列, 丽枝藻属 2 个种 1 条序列, 灯枝藻属 1 个种 1 条序列, 拟丽藻属 1 个种 2 条序列, 丽藻属 4 个种 6 条, 鸟巢藻属 2 个种 3 条序列, 另有 3 条外类群序列。序列矩阵总长度为 2580bp, 包含 525 个变异位点, 其中 267 个简约信息位点, 变异位点和简约信息位点分别占总位点的 20.35% 和 10.35%。不同样品的碱基含量差异不大, 碱基 G、C、A 和 T 的平均含量分别为 25.4%、19.3%、26.6% 和 28.7%。其中 G + C 的含量(44.7%)少于 A + T 的含量(55.3%)。

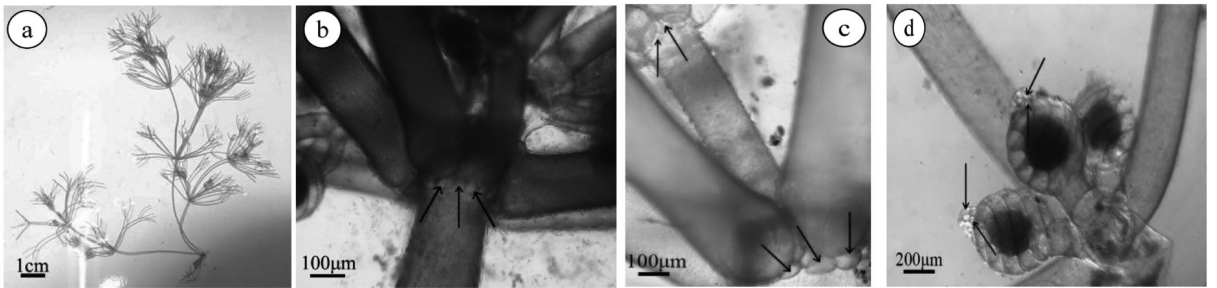


图 1 新特征轮藻图。

a 藻体形态; b, c 托叶(箭头所示); d 藏卵器(箭头所示两层冠细胞)

Fig. 1 The charophyte with new features

a Whole of plant; b, c Stipulodes; d Oogonia (arrow shows two layers of coronula)

表 1 用于系统进化分析的轮藻目种名或株号的 GenBank 信息

Tab. 1 List of the charales species or strains and related species and GenBank accession numbers used for the present phylogenetic analyses

种名	株号	序列号	
		18S rDNA	<i>rbcL</i>
<i>Chara vulgaris</i>	X-152 P061	AF032747 ^[11] 本研究	AF097166 ^[21] 本研究
<i>C. commixens</i>	F140	AF408223 ^[22]	AF097161 ^[21]
	H097	本研究	本研究
<i>C. globularis</i>	X-751		AF097165 ^[21]
	X-999	AF032735 ^[11]	
<i>Lamp. macropogon</i>	X-695	U18508 ^[8]	U27534 ^[21]
<i>Lychnorhamnus barbatus</i>	Unknown		U27533 ^[10]
	Unknown	U81272 ^[8]	
<i>Nitellopsis obtusa</i>	F131B	AF408226 ^[22]	U27530 ^[21]
	F011	本研究	本研究
New charophyte	NF010	本研究	本研究
	NM002	本研究	本研究

(续表 1)

种名	株号	序列号	
		18S rDNA	<i>rbcL</i>
<i>N. opaca</i>	F146	AF408227 ^[22]	AF097174 ^[21]
<i>N. flexilis</i>	Unknown	U05261 ^[8]	
	S010		AB076056 ^[23]
<i>N. hyalina</i>	KGK0059b	AY823711 ^[22]	
	S012		AB076067 ^[23]
	H009	本研究	本研究
<i>Tolypella nidifica</i>	F138	AY823712 ^[22]	U27531 ^[21]
<i>T. prolifera</i>	F150	AF408228 ^[22]	
	F150		AF097175 ^[21]
	T052	本研究	本研究
<i>Zygnema peliosporum</i>	UTEX LB 45	AF408238 ^[22]	U38701 ^[24]
<i>Coleochaete nitellarum</i>	Unknown	AF497794 ^[25]	
	UTEX LB1261		AB013662 ^[26]
<i>Cole. orbicularis</i>	UTEX LB 2651	M95611 ^[8]	
	Unknown		L13477 ^[27]

3.4 系统发育分析

ML 树、BI 树和 MP 树的拓扑结构大致相同(图 3),仅有的区别在于鸟巢藻属这一分支上,在 MP 树上鸟巢藻属与丽藻属构成一支,在 ML 树和 BI 树上鸟巢藻属分离出来,形成独立的一支,这与前人的工作是一致的^[8, 10, 23]. 新特征轮藻在 ML 树、BI 树和

MP 树上是一个单独的分支,与其他丽藻属内的成员聚类在一起,构成了一个单系. 新特征轮藻与 *N. flexilis* 和 *N. opaca* 形成高支持率的一支,在 ML 树、BI 树和 MP 树上的支持率分别是 100%、1.0 和 100%,且这一支与 *N. hyalina* 构成姐妹群. 这说明新特征轮藻应该属于丽藻族丽藻属.

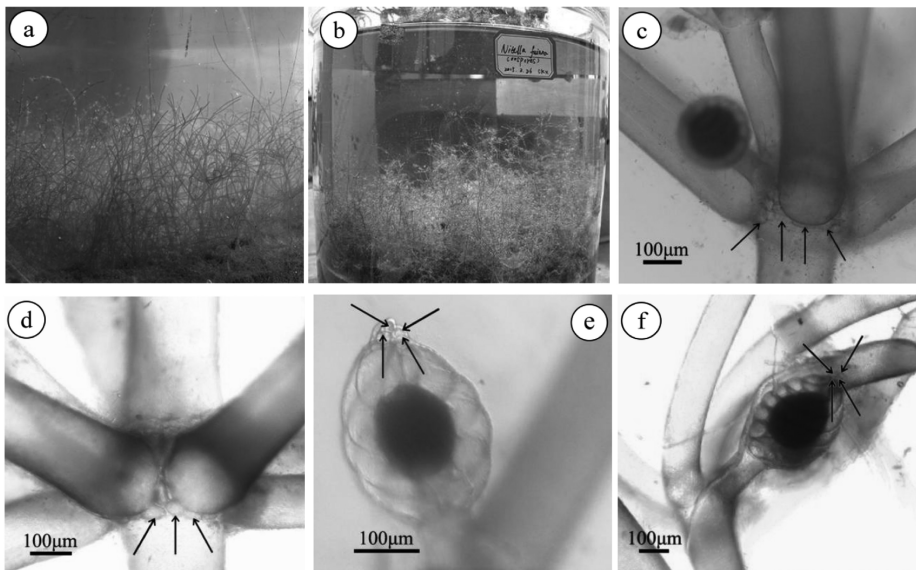


图 2 新特征轮藻萌发图.

a 幼体(2015年12月2日拍摄);b 成体(2016年3月31日拍摄);c,d 托叶(箭头所示);e,f 藏卵器(箭头所示两层冠细胞).

Fig. 2 The germination of the charophyte with new features.

a Protonema (On December 2, 2015). b Adult stage (On March 31, 2016). c, d Stipulodes. e, f Oogonia (arrow shows two layers of coronula).

4 讨 论

新特征轮藻既具有茎与小枝无皮层, 小枝分叉, 冠细胞 2 层 10 个等丽藻族特征, 又具有乳突状托叶这一属于轮藻族的特征. 现行的轮藻分类系统一般将轮藻科分为轮藻族和丽藻族, 轮藻族的特点是冠细胞一层共 5 个细胞、小枝不分叉、有或无皮层和具有单细胞结构(苞片、托叶、小苞片等), 丽藻族的特点是冠细胞两层共 10 个细胞、小枝分叉、无皮层、没有苞片和托叶等结构^[1, 3, 5]. 根据上述, 本

研究发现的轮藻应隶属丽藻族, 但又具有丽藻族未曾有过托叶报道的特征, 其分类位置值得探讨.

随着分子手段, 特别是细胞核基因与叶绿体基因的联合使用, 在轮藻分类重新评估的作用越来越大. 本研究采用 18S rDNA 和 *rbcL* 基因联合构建系统发育树, 结果显示新特征轮藻隶属丽藻属, 也支持了形态特征研究结果. 其它类群与此前有关文献的研究结果基本一致^[9-11, 21, 23, 28].

本研究再次采集到了具有新特征的轮藻, 也为现有轮藻分类系统的不断修订和完善提供了重要材料.

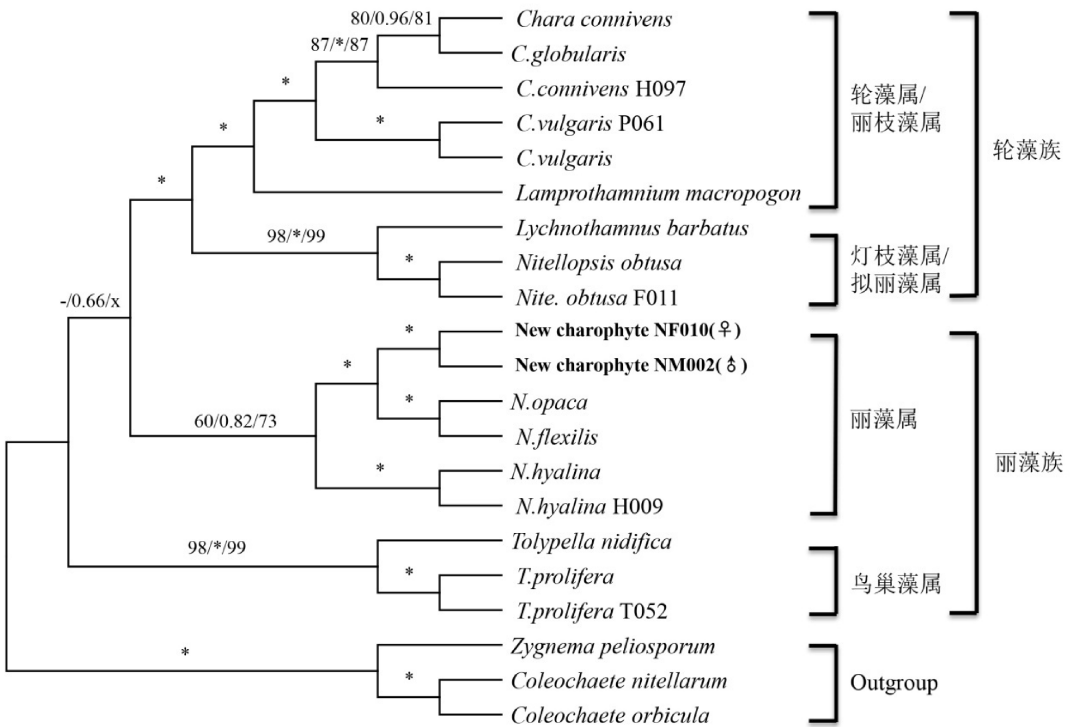


图 3 基于 18S rDNA+rbcL 基因序列构建的 Bayesian 联合树.

分支上显示的是支持率和后验概率(ML, BI 和 MP). 星号(*)表示支持率 100%或后验概率为 1.0. 破折号(-)表示支持率小于 50%或后验概率低于 0.5. "x"表示 BI 与 ML 和 MP 分析之间拓扑结构的不一致.

Fig. 3 Bayesian consensus tree of Characeae based on *rbcL* data.

The bootstrap values and posterior probabilities above branches (ML, BI, and MP values respectively). An asterisk (*) indicates a bootstrap proportion of 100% or a posterior probability of 1.0. A dash (-) indicates a bootstrap proportion less than 50% or a posterior probability less than 0.5. An "x" indicates an incongruent topology between the BI and the ML and the MP analyses and is shown in the inset with the BI posterior probability value.

参考文献:

[1] Wood R D, Imahori K A. A revision of the Characeae [M]. Weinheim: Cramer, 1965.
 [2] Zaneveld J S. The Charophyta of Malaysia and adjacent countries [J]. Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants, 1940, 4: 2.
 [3] 韩福山, 李尧英. 中国淡水藻志——第三卷轮藻门 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.

[4] 胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类——系统分类及生态 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
 [5] Groves J, Bullock-Webster G R. The British Charophyta [M]. Ray Society, 1920.
 [6] 兰利琼, 傅华龙, 卿人韦. 中国现生轮藻研究现状 [J]. 微体古生物学报, 2003, 2: 147.
 [7] 陈维群, 彭厚银. 现代轮藻地理分布的基本规律的探讨 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1990, 27: 354.

- [8] Meiers S T, Rootes W L, Proctor V W, *et al.* Phylogeny of the Characeae (Charophyta) inferred from organismal and molecular characters [J]. Arch Protistenk, 1997, 148: 308.
- [9] Sakayama H. Taxonomy of *Nitella* (Charales, Charophyceae) based on comparative morphology of oospores and multiple DNA marker phylogeny using cultured material [J]. Phycol Res, 2008, 56: 202.
- [10] Mccourt R M, Karol K G, Guerlesquin M, *et al.* Phylogeny of extant genera in the family Characeae (Charales, Charophyceae) based on *rbcL* sequences and morphology [J]. Amer J Bot, 1996, 83: 125.
- [11] Meiers S T, Proctor V W, Chapman R L. Phylogeny and biogeography of *Chara* (Charophyta) inferred from 18S rDNA sequences [J]. Austral J Bot, 1999, 47: 347.
- [12] Sakayama H, Hara Y, Arai S, *et al.* Phylogenetic analyses of *Nitella* subgenus *Tief fallenia* (Charales, Charophyceae) using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. Phycologia, 2004, 43: 672.
- [13] 范勇, 于广欣, 汪乐霓, 等. 雨生红球藻质体球滴结构蛋白基因的克隆与原核表达[J]. 水生生物学报, 2012, 36: 641.
- [14] 陈波, 黄龙, 郭婷, 等. 三角褐指藻甘油兼养条件下甘油激酶的功能研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2015, 52: 145.
- [15] 代易颖, 马红, 周兵兵, 等. 重组钝顶节旋藻藻蓝蛋白基因在聚球藻中的表达[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22: 190.
- [16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for Bigger Datasets [J]. Molec Biol Evol, 2016, 33: 1870.
- [17] Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 1572.
- [18] Swofford D L. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), version 4. 0 b10 [M]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- [19] Sakayama H, Miyaji K, Nagumo T, *et al.* Taxonomic reexamination of 17 species of *Nitella* subgenus *Tief fallenia* (Charales, Charophyceae) based on internal morphology of the oospore wall and multiple DNA marker sequences [J]. J Phycol, 2005, 41: 196.
- [20] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3. 0 [J]. Syst Biol, 2010, 59: 307.
- [21] Mccourt R M, Casanova M T, Karol K G, *et al.* Monophyly of genera and species of Characeae based on *rbcL* sequences, with special reference to Australian and European *Lychnothamnus barbatus* (Characeae: Charophyceae) [J]. Austral J Bot, 1999, 47: 363.
- [22] Karol K G, Mccourt R M, Cimino M T, *et al.* The closest living relatives of land plants [J]. Science, 2001, 294: 2352.
- [23] Sakayama H, Nozaki H, Kasaki H, *et al.* Taxonomic re-examination of *Nitella* (Charales, Charophyceae) from Japan, based on microscopical studies of oospore wall ornamentation and *rbcL* gene sequences [J]. Phycologia, 2002, 41: 398.
- [24] Mccourt R M, Karol K G, Kaplan S, *et al.* Using *rbcL* sequences to test hypotheses of chloroplast and thallus evolution in conjugating green algae (Zygnematales, Charophyceae) [J]. J Phycol, 1995, 31: 990.
- [25] Katana A, Kwiatowski J, Spalik K, *et al.* Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast SSU rDNA [J]. J Phycol, 2001, 37: 444.
- [26] Nishiyama T, Kato M. Molecular phylogenetic analysis among bryophytes and tracheophytes based on combined data of plastid coded genes and the 18S rRNA gene [J]. Molec Biol Evol, 1999, 16: 1028.
- [27] Manhart J R. Phylogenetic analysis of green plant *rbcL* sequences [J]. Molec Biol Evol, 1994, 3: 115.
- [28] Sakayama H, Kasai F, Nozaki H, *et al.* Taxonomic reexamination of *Chara globularis* (Charales, Charophyceae) from Japan based on oospore morphology and *rbcL* gene sequences, and the description of *C. leptospora* sp. nov. [J]. J Phycol, 2009, 45: 917.
- [29] Pérez W, Hall J D, McCourt R M, *et al.* Phylogeny of North American *Tolypella* (Charophyceae, Charophyta) based on plastid DNA sequences with a description of *Tolypella ramosissima* sp. nov. [J]. J Phycol, 2014, 50: 776.