

饶氏藻系统位置的研究

徐小蓉¹, 胡鸿钧^{2*}

(1. 贵州师范大学生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074)

摘要: 用 18S rDNA 基因序列分析饶氏藻属(*Jaoa*)与相关藻类的亲缘关系。结果表明:饶氏藻 18S rDNA 的长度为 1632 bp, GC% 为 50.6%, 泡状饶氏藻 18S rDNA 的长度为 1639 bp, GC% 为 50.3%。用最大简约法与饶氏藻上一级分类单元(目)构建的系统树表明有 4 个大的分支。两种饶氏藻与石莼目的 *Ulva curvata*、*U. rigida*、*Enteromorpha intestinalis* 和 *Monostroma grevillei* 构成很强的支持分支(分支 B), 它们之间的核苷酸趋异性最低仅 0.041, 而与胶毛藻目的 *Chaetophora incrassata* 的趋异性则很显著, 达 0.112, 因此, 饶氏藻应属于石莼目的一个类群, 且饶氏藻和泡状饶氏藻构成一单系起源的分支, 这两个物种的趋异性仅 0.002, 显示出它们具有非常紧密的亲缘关系, 很可能是 1 种 1 变种而不是 2 种。

关键词: 饶氏藻; 18S rDNA; 系统分类位置; 石莼目; 胶毛藻目

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.03.003

Studies on the Phylogenetic Placement of *Jaoa*

XU Xiao-rong¹, HU Hong-jun^{2*}

(1. College of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: *Jaoa* is an endemic group of fresh water algae in China. The phylogenetic relationship between *Jaoa* and related algae by using 18S rDNA sequences was studied. The result showed that the length of 18S rDNA of *J. prasina* is 1632 bp and GC% is 50.6%, and those of *J. bullata* are 1639 bp and 50.3%, respectively. The maximum parsimonious tree indicated that *Jaoa* with its related Orders could be divided four Clades. *Jaoa prasina*, *J. bullata*, *Enteromorpha investinalis*, *Ulva curvata*, *U. rigida* and *Monostroma grevillei* constituted strong supported clade (Clade B), among which the lowest nucleotide divergence was 0.041, while that reached up 0.112 between *J. prasina*, *J. bullata* and *Chaetophora incrassata*. Therefore, *Jaoa* probably belongs to Ulvales. *Jaoa prasina* and *J. bullata* constitute a monophyletic branch (100% bootstrap value) in Clade B with divergence of 0.002. It suggested that the two species of *Jaoa* are closely related species, they might be one species and one variety.

Key words: *Jaoa*; 18S rDNA; Phylogenetic placement; Ulvales; Chactophorales

饶氏藻(*Jaoa*)属绿藻门(Chlorophyta)绿藻纲(Chlorophyceae), 是我国特有的淡水藻类群, 藻体大, 圆盘形或略呈球形, 中空, 以假根着生, 单生或丛生, 表面具粗大皱褶, 绿色或橄榄绿色, 直径可达 6 cm, 高可达 3 cm。自 1941 年饶钦止发表新种以来迄今已有 70 年, 饶氏藻最初被定为新科——空

盘藻科(Coelodiscaceae), 放在胶毛藻目(Chaetophorales)^[1]。由于空盘藻拉丁名(*Coelodiscus*)已经被高等植物使用, 1964 年樊恭炬将其改名为饶氏藻(*Jaoa prasina* (Jao) Fan)(图 1)^[2]。饶氏藻是饶钦止于 1941 年在重庆嘉陵江急流岩石上发现的, 1947 年他又在贵州涪潭发现另 1 新

收稿日期: 2011-03-31 接受日期: 2011-08-01

基金项目: 贵州省科技厅国际科技合作计划项目(黔科合外 G 字[2010]7025 号); 贵州省科技创新人才团队建设项目(黔科合人才团队[2009]4007 号); 贵州省科技厅社发攻关项目(黔科合 SY[2010]3094 号)资助

作者简介: 徐小蓉(1977 ~), 硕士, 讲师, 主要从事植物生理生态研究。E-mail: xuxiaorong197600@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hjh34@wbcas.cn

种——泡状饶氏藻(*Jaoa bullatus* (Jao) Fan)^[3]。

在近 10 多年的调查中,除贵州省外,在云南、河南、河北等省少数地区也有分布^[4],但贵州省是饶氏藻的重要产地和主要分布区。经调查,贵州省内各种大小山间溪沟河流中的岩石和树干上都有繁茂的饶氏藻生长;黄果树瀑布高台上的水中岩石几乎被饶氏藻铺满。

近年来国内外对饶氏藻未有更深入的研究报道,有关这种淡水藻类的系统分类位置和分类单元等级一直有不同的看法。近 20 年来,随着藻类分子系统学研究的蓬勃发展^[5-9],本研究用 18S rDNA 作为分子标记分析饶氏藻与其他绿藻的亲缘关系,以确定其系统分类位置,为饶氏藻的深入

研究判定基础。



图 1 采自贵阳花溪的饶氏藻

Fig. 1 *Jaoa prasina* collected from Huaxi, Guiyan, Guizhou Province, China

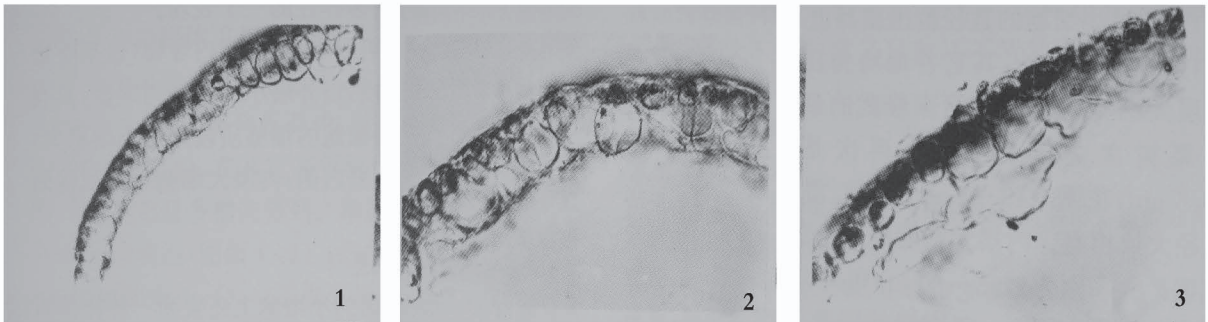


图 2 饶氏藻和泡状饶氏藻。1. 采自贵州罗甸的饶氏藻,示 2 层细胞结构(横切面); 2~3. 采自贵阳花溪公园的泡状饶氏藻,示 3 层细胞结构(横切面)。

Fig. 2 *Jaoa prasina* and *J. bullata*. 1. The 2-layer cells structure of *J. prasina* (transverse section) collected from Luodian in Guiyang; 2-3. The 3-layer cells structure of *J. bullata* (transverse section) from Huaxi Park in Guiyang.

2 材料和方法

2.1 材料

实验材料分别采自贵阳市花溪公园附近流水溪沟中岩石上和贵州省湄潭县(市)近郊山溪流水岩石上。采集时用当地天然水清洗藻体表面后置于冰盒内带回实验室,取少量标本在显微镜下观察。其余标本用蒸馏水洗涤几次后置于 4℃ 冰箱内过夜。

2.2 基因组 DNA 的提取

用 CTAB 法^[10]提取。预先加热 CTAB 缓冲液至 60℃,取适量(按 1:10)的 2×CTAB(含 2% 巯基乙醇)研磨剪碎的组织,充分混合,60℃ 下温浴 30~60 min,冷却至室温;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),轻摇混匀,56×g 离心,将上清液转移至新离心管中;反复抽提,直至溶液呈无色为止;加入 2/3 体积的冷异戊醇,轻摇混匀,-20℃ 下放置 30 min

或更长时间以沉淀 DNA,室温下 56×g 离心 3~5 min,小心倒掉上清液,加入 50% 乙醇及 1/10 体积的 NaCl 清洗 2 次,真空或室温干燥核酸沉淀,于 -20℃ 下贮存备用;电泳检测表明 DNA 含量 >40 ng μL⁻¹。

2.3 PCR 扩增

反应体系包含 50 μL 引物,5 μL 10×缓冲液,2.5 μL MgCl₂ (50 mmol/L),4 μL dNTP 混合液(1 mmol/L),1.5 U Taq DNA 聚合酶及 1~5 μL 模板 DNA。反应条件为:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 1 min,30 个循环,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增片断用 1% 琼脂糖进行电泳检测,用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收。

2.4 测序

作为测序的最终片断用 Wizard PCR Preps DNA 纯化系统纯化。3 个片断在上海生工基因公司 3900 型自动测序仪上测序。用于饶氏藻 18S

rDNA 片断扩增的正向引物 (18N I): 5'-GGA-TCAGAATTCTATCTGGTTGATCCTGCC-3'; 反向引物 (18N II R): 5'-CTCAGTAGGCTTGATCCTCC-GCAGGTTACAC-3'; 基因序列用 ClustalX 1.83 进行比对, 采用 Mega 3.1 计算 Kimura 2-parameter 遗传距离值, 重复 100 次计算自展率(bootstrap)。

采用最大简约(Maximum parsimony, MP)法和邻接(Neighbor-joining, NJ)法, 通过 PAUP 4.0610 (Swofford 2002)构建系统树。用于构建系统树的饶氏藻相关类群的 18S rDNA 序列从 GenBank 下载, 以小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 作为外类群 (Out group)。

3 结果和分析

光镜观察表明, 贵阳市花溪采集的外形为圆盘形略呈球形的中空藻体由两层细胞构成, 为饶氏藻(*Jaoa prasina*); 湄潭采集的藻体形态与花溪的十分相似, 但藻体由 3 层细胞构成, 为泡状饶氏藻(*J. bullatus*), 不过最内层细胞较大, 有时在切片中可见破裂的痕迹(图 2)。

由于饶氏藻体积较大, 产地分布广, 提取藻体的 DNA 材料的来源很丰富, 提取的饶氏藻的 DNA 较多, 我们设计的引物也比较合适, 所以分离的 18S

rDNA 数量较多、质量较好。因此, 测序的结果也比较理想。

两种饶氏藻的 18S rDNA 长度和 GC 比(%)略有差异。饶氏藻 18S rDNA 的长度为 1632 bp, GC% 为 50.6%; 泡状饶氏藻 18S rDNA 的长度为 1639 bp, GC% 为 50.3%。系统发育分析比对的位点总数为 1664, 其中 1289 个性状是稳定的, 75 个可变量性状是简约无信息的 (Parsimony-uninformative), 有信息的性状总数为 300。

用 Kimura 2-parameter 估算饶氏藻及其相关类群 18S rDNA 序列的趋异性为 0.000~0.132, 其中, *Ulva curvata* 和 *Enteromorpha intestinalis* 间的趋异性最低, 为 0.041, 而 *Jaoa prasina*、*J. bullata* 与 *Chaetosphaeridium globosum* 间的趋异性最高, 达 0.112。两种饶氏藻间的趋异性只有 0.002, 而两种饶氏藻与 *Ulva* 和 *Enteromorpha* 显示出低的趋异性, 约为 0.041~0.044(图 3)。

4 讨论

饶氏藻是我国的特有类群, 长期以来, 其系统分类位置众说纷纭, 一直没有定论。Printz^[11] 认为饶氏藻属于胶毛藻目(Chaetophorales)的 1 属, 不是 1 科, 有 1 种 1 变种(饶氏藻泡状变种 *Jaoa prasina*

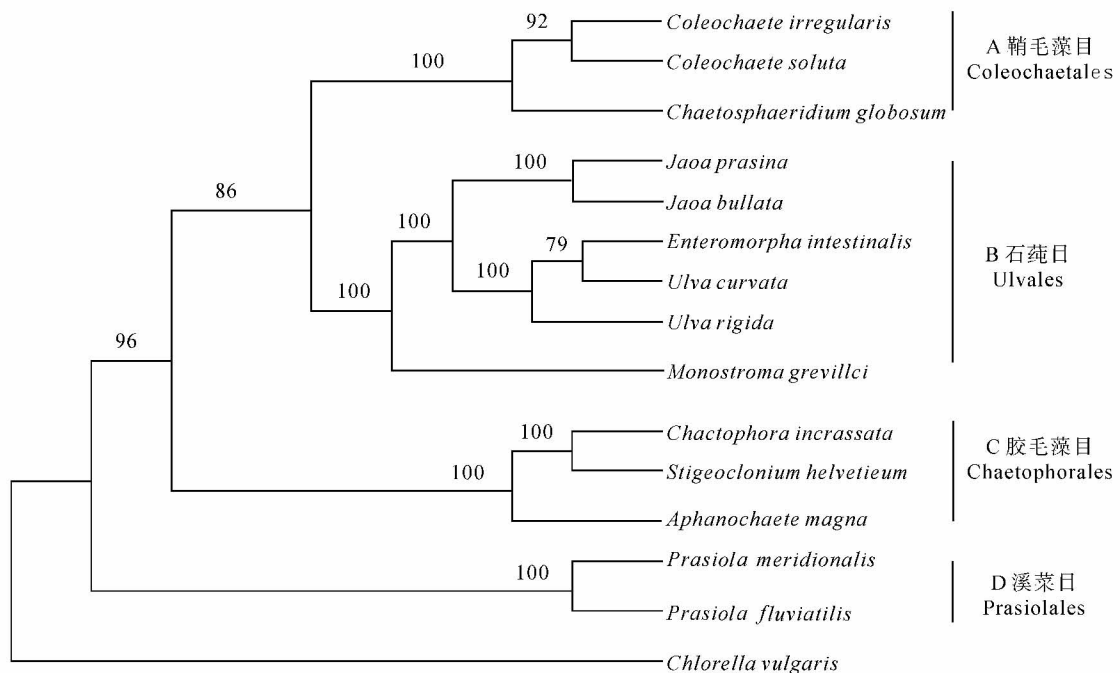


图 3 基于 18S rDNA 序列的最大简约树, 以小球藻作为外类群, 节线上的数值为自展率(重复 100 次)。饶氏藻(*Jaoa prasina*)和泡状饶氏藻(*J. bullata*)与石莼目(Ulvales)的肠浒苔(*Enteromorpha intestinalis*)聚在一起(分支 B)。

Fig. 3 Maximum parsimonious tree based on 18S rDNA sequences. The tree was rooted using *Chlorella vulgaris* as out-group. Bootstrap value (100 replicates) were given above the braches. *Jaoa prasina* and *J. bullata* with *Enteromorpha intestinalis* were assembled in Clade B.

var. *bullata*), 而不是 2 种; 王模善等^[12]、李红丽等^[4]报道泡状饶氏藻的营养细胞中的光合片层常 2 条并行排列, 并有 1~2 条类囊体穿过蛋白核, 与石莼目的超微结构类似, 这些特征表明饶氏藻在亲缘关系上与石莼目(Ulvales)相近。黎尚豪等^[13]仍将饶氏藻作为科放在胶毛藻目中。由于饶氏藻形态特殊, Silva^[14]将它放在分类系统位置未定之列, 认为饶氏藻作为科未被广泛接受, 更像作者定的新“目”——链枝藻目(Ctenocladales)中的 1 属。胡鸿钧等^[15]将饶氏藻作为石莼目的 1 科。现代大量的分子系统学研究表明, 真核生物 18S、26S、*rbcL* 等基因核苷酸序列保守序列较多, 适用于分析“科”“目”以上分类单元作系统分析, 而 ITS 等较小的 DNA 序列常用于属下种间分子系统分析。因饶氏藻的系统学位置涉及“科”“目”等较高分类单元, 因此本研究采用 18S rDNA 序列分析, 以确定其分类位置。序列分析表明, 图 3 中的两种饶氏藻与石莼目的曲石莼(*Ulva curvata*)和肠浒台(*Enteromorpha intestindis*)的核苷酸趋异性最低, 仅 0.041, 与硬石莼(*Ulva rigida*)和格氏礁膜(*Monostroma grevillei*)石莼目藻类间的趋异性也只为 0.043, 而泡状饶氏藻与胶毛藻目的 *Chaetophora incrasata* 趋异性则很显著, 达到 0.112, 因此基于 18S rDNA 核苷酸序列的分析, 饶氏藻应属于石莼目中的一个类群。

18S rDNA 核苷酸序列分析还表明饶氏藻和泡状饶氏藻构成一单系起源的分支, 这两个物种的趋异性仅 0.002, 显示二者有非常紧密的亲缘关系。李红丽等(未发表资料)用 ITS 序列分析了我国 6 个地区饶氏藻的遗传多样性, 结果表明这 6 个地区的饶氏藻碱基对(bp)差异很小, 北京房山县产的泡状饶氏藻与贵州罗甸产的饶氏藻间的 ITS 序列只有 6~7 个碱基的差异, 因此, 饶氏藻属目前很可能只有 1 种 1 变种而不是 2 种。

最近 Graham 等^[16]根据绿藻类鞭毛根丝体结构, 将绿藻门分为 5 纲, 原来的石莼目成为石莼纲(Ulvophyceae)。虽然石莼目包括在该纲之中, 更精确的系统学分析还需要对饶氏藻进行更多分子标记和孢子鞭毛超微结构的研究。

参考文献

[1] Jao C C. Studies on the freshwater algae of China. IX. Coelodiscaceae: A new family of the Chlorophyceae [J]. Sinensia, 1941, 12(1/2/3/4/5/6): 291-298.

- [2] Fan K C(樊恭炬). A new family name and a new generic name in the Chlorophyceae [J]. Acta Phytotaxon Sin(植物分类学报), 1964, 9(1): 101-102.(in Chinese)
- [3] Jao C C(饶钦止). *Coelodiscus bullatus* sp. nov.: A second species of the Coelodiscaceae [J]. Bot Bull Acad Sin(中央研究院植物学汇刊), 1947, 1(4): 255-256.(in Chinese)
- [4] Li H L(李红丽), Hu H J(胡鸿钧). Cellular structural studies on *Jaoa prasina* and ultrastructural studies on *J. bullata* [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2003, 21(6): 481-486.(in Chinese)
- [5] Buchheim M A, Buchheim J A, Chapman R L. Phylogeny of the VLE-14 *Chlamydomonas* (Chlorophyceae) group: A study of 18S rRNA gene sequences [J]. J Phycol, 1997, 33(6): 1024-1030.
- [6] Hanyuda T, Arai S, Ueda K. Variability in the *rbcL* introns of *Caulerpalean* algae (Chlorophyta, Ulvophyceae) [J]. J Plant Res, 2000, 113(1112): 403-413.
- [7] Katana A, Kwiatowski J, Spalik K, et al. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA [J]. J Phycol, 2001, 37(3): 443-451.
- [8] Mei H(梅洪), Luo W(罗玮), Liu G X(刘国祥), et al. Phylogeny of *Oedogoniales* (Chlorophyceae, Chlorophyta) inferred from 18S rDNA sequences with emphasis on the relationships in the genus *Oedogonium* based on ITS-2 sequences [J]. Plant Syst Evol, 2007, 265(3/4): 179-191.(in Chinese)
- [9] Zhao J, Jiang P, Li N, et al. Analysis of genetic variation within and among *Ulva pertusa* (Ulvaceae, Chlorophyta) populations using ISSR markers [J]. Chin Sci Bull, 2010, 55(8): 705-711.
- [10] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12(1): 13-15.
- [11] Printz H. Die Chaetophorales der Binnenge wässereine systematische übersieht [J]. Hydrobiologia. Acta Hydrobiol Hydrogr Protistol, 1964, 24(1/2/3): 75-76.
- [12] Wang M S, Su W T, Wang X M. Ultrastructural studies of vegetative cells on *Jaoa bullata* (Jao) Fan. [J]. Acta Bot Sin, 1988, 30(2): 129-133.
- [13] Li S H(黎尚豪), Bi L J(毕列爵). Flora Algarum Sinicarum Aquae Dulcis Tomus V: Ulothricales, Ulvales, Chaetophorales, Sphaeropleales [M]. Beijing: Science Press, 1998: 76-78.(in Chinese)
- [14] Silva P C. Chlorophyceae [M]// Parker S P. Synopsis and Classification of Living Organisms. New York: SP. McGraw-Hill, 1982: 133-161.
- [15] Hu H J(胡鸿钧), Wei Y X(魏印心). The Freshwater Algae of China, Systematics, Taxonomy and Ecology [M]. Beijing: Science Press, 2006: 696-697.(in Chinese)
- [16] Graham L E, Graham J M, Wilcox L W. Algae [M]. 2nd ed. New York: Benjamin Cummings, 2009: 374-377.