

中国淡水共球藻纲新记录属种——土佐牧野藻 (*Makinoella tosaensis* Okada)

张琪¹, 宋会银^{1,2}, 郑凌凌¹, 宋立荣¹, 刘国祥^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100039)

摘要: 报道分别从湖北省武汉市内和云南省西双版纳小水池中分离培养的两株绿藻, 对其进行了形态和 18S rDNA 基因序列分析, 编号分别为 FACHB-1783 和 FACHB-1784。这两株绿藻具独特的四边形群体形态, 通常为 4 或 16 个细胞, 细胞为宽椭圆形至不规则卵圆形、细胞壁两端无增厚, 叶绿体多数、片状, 具蛋白核。结合形态和分子系统发育分析, 确定这两株绿藻为我国 1 种淡水共球藻纲新记录属种——土佐牧野藻(*Makinoella tosaensis* Okada)。基于 18S rDNA 基因的系统发育研究表明这两株绿藻与分离自韩国的土佐牧野藻基因序列相似度可达 99.6%~99.9%, 并且以较高的支持值与土佐牧野藻聚在一起。

关键词: 共球藻纲; 卵囊藻科; 土佐牧野藻; 新记录

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.04.007

Makinoella tosaensis Okada, A New Recorded Genus and Species of Freshwater Trebouxiophycean Algae from China

ZHANG Qi¹, SONG Hui-yin^{1,2}, ZHENG Ling-ling¹, SONG Li-rong¹, LIU Guo-xiang^{1*}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: Two strains of green algae with No. FACHB-1783 and FACHB-1784 were isolated from small ponds in Wuhan, Hubei Province and Xishuangbanna, Yunnan Province, respectively. Their morphology and 18S rDNA sequences were studied. The typical coenobia of two strains are tetragonally arranged in flat, usually 4–16-celled. Cells are broad ellipsoid to irregularly oval, without polar thickenings. Numerous chloroplasts are discoid, each with a pyrenoid. Based on morphological and molecular phylogenetic evidences, the two strains were identified as *Makinoella tosaensis* Okada, which was considered as a new recorded genus and species of freshwater trebouxiophycean algae from China. The 18S rDNA sequence of the strains showed high similarity (99.6%–99.9%) with those of *M. tosaensis* Okada from Korea. The phylogenetic analyses based on 18S rDNA sequence showed that all strains of *M. tosaensis* Okada clustered into a clade with high support values.

Key words: Trebouxiophyceae; Oocystaceae; *Makinoella tosaensis* Okada; New record

牧野藻属(*Makinoella* Okada)隶属于绿藻门(Chlorophyta)共球藻纲(Trebouxiophyceae)小球藻目(Chlorellales)卵囊藻科(Oocystaceae), 是一类较罕见的卵囊藻科成员。卵囊藻科类群是常见于静水和流水中的淡水浮游植物类群^[1]。卵囊藻科成员具

有一些共同的特征, 如细胞通常呈球形、椭球形或纺锤形, 细胞壁多层, 以似亲孢子方式繁殖^[2]。这一类群最显著的超微结构特征是细胞壁多层且每层平行的纤维素质纤维垂直于相邻的细胞壁层^[3-4]。Komárek 将上述细胞壁特征作为卵囊藻科区别于球

收稿日期: 2015-10-21

接受日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(51279011)资助

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No. 51279011).

作者简介: 张琪(1985~), 男, 博士, 主要从事淡水藻类分类及系统发育研究。E-mail: zhangqiwx@sina.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liugx@ihb.ac.cn

状绿藻其他科的依据^[5]。超微结构和分子证据都表明卵囊藻科是共球藻纲中1个单系的自然类群^[2]。基于独特的四边形群体形态以及细胞排列方式,建立了牧野藻属^[6]。土佐牧野藻(*Makinoella tosaensis* Okada)是牧野藻属的模式种,也是此属的唯一物种,目前仅在日本、韩国和斯洛伐克有报道^[6-8]。

2012-2013年,我们在湖北省武汉市和云南省西双版纳的小池塘中分别采集、分离和培养了两株球状绿藻,对其进行形态观察,同时结合18S rDNA基因序列构建系统发育树确定其分类学地位,确定这两株球状绿藻均为土佐牧野藻,为我国卵囊藻科绿藻的新记录属种。通过形态比较和分子系统发育分析,本文还讨论了土佐牧野藻在卵囊藻科中的系统发育位置。

1 材料和方法

1.1 采集、分离和培养

藻株分别采集自湖北省武汉市武汉动物园内的人工池塘(时间:2013年6月10日,地点:30°32'28" N, 114°14'27" E)和云南省勐腊县西双版纳热带植物园的小池塘(时间:2012年7月12日,地点:21°55'12" N, 101°16'38" E)。用毛细管吸取少量水样滴于载玻片上,在显微镜下确认含有目标藻细胞后加适量BG11培养基^[9]稀释,反复吸取-镜检-稀释,直到水滴中只含单个目标藻种细胞,再转移至含有BG11培养基的96孔板中静置培养,光暗周期12 h/12 h,光照强度40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,培养温度25°C。20 d后镜检藻种生长状况。将获得的单种扩大至50 mL三角瓶中培养,藻种保藏于中国科学院淡水藻种库(FACHB-collection),分离自武汉和西双版纳的藻株编号分别为FACHB-1783和FACHB-1784。

1.2 形态观察

取少量新鲜藻细胞,在Leica DM5000型显微镜下观察形态,并用Leica DFC320型CCD采集图像,并进行微分干涉(Differential interference contrast, DIC)和相差(Phase contrast, PH)照相。

1.3 DNA提取、PCR扩增和序列测定

采用CTAB方法^[10]提取这两株藻的基因组。用于18S rDNA扩增和测序的引物分别为18S-F: 5'-AA-CCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'和18S-R: 5'-TGAT-

CCTTCTGCAGGTTACCTACG-3'^[11]。50 μL 的PCR反应体系:25 ng模板基因组DNA,10 \times 缓冲液5 μL ,2.5 mmol L⁻¹的dNTP 4 μL ,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的引物各1 μL ,Taq DNA聚合酶(TaKaRa ExTaq) 1.25 U,以灭菌双蒸水补足。18S rDNA的PCR反应条件:94°C预变性5 min,94°C变性1 min,55°C退火50 s,72°C延伸1.5 min,32个循环;72°C延伸5 min。扩增产物用Axygene凝胶回收试剂盒回收、纯化,并送北京华大基因科技有限公司进行测序。序列提交至NCBI,获得GenBank登录号为KP318979和KP318980。

1.4 形态发育分析

从GenBank下载序列相似的绿藻序列,利用Clustal X (V 1.8)对基因序列进行比对^[12],辅以Bioedit (V 7.0.9.1)手工校正^[13]。使用MEGA5计算碱基组成和转换/颠换值^[14]。

分别使用最大似然法(ML, Maximum Likelihood)和贝叶斯法(BI, Bayesian Inference)构建基于18S rDNA序列的系统发育树。ML树采用RAxML (V 7.2.6)软件完成^[15],BI树采用MrBayes (V 3.1.2)软件完成^[16]。ML树和贝叶斯树中替代模型的选择采用jModelTest (V 2.1.5)程序进行分析,按赤池信息量准则(Akaike information criterion, AIC)标准选择最适合的替代模型,筛选出最适模型为TrN+I+G^[17]。在ML分析中,选择执行快速支持度分析并采用自展支持(Bootstraps, BP)进行1000次重复检验。在贝叶斯分析中,采用马尔科夫链蒙特卡洛方法Markov Chain Monte Carlo, MCMC)设置7条链(6条热链,1条冷链)运行10⁶次,每运行100次获得1个进化树,舍弃老化样本burnin=1000,并采用后验概率(Posterior probability, PP)进行重复检验。

2 结果

2.1 形态描述

土佐牧野藻 (图1)

Makinoella tosaensis Okada, Okada Y. J Jap Bot, 1949, 24: 166-168^[6]。

定形群体,群体常呈四边形,通常为4或16个细胞,极少数为2、8或32个细胞,具明显的、可见分层的群体胶被(图1: A~F)。4细胞的定形群体呈方形,细胞位于一个平面上,两个细胞形成内层对,两个细胞形成外层对,相互以近端部相连(图



图 1 土佐牧野藻的形态。A, B: 典型的 16-细胞群体; C: 4-细胞群体; D: 16-细胞群体, 示胶被; E: 4-细胞群体, 示胶被; F: 4-细胞群体细胞壁; G-H: 长期实验室培养条件下的群体形态。标尺: A~B, D: 50 μm ; C, E-I: 20 μm

Fig. 1 Morphology of *Makinoella tosaensis* Okada. A, B: Typical 16-celled coenobia; C: 4-celled coenobia; D: 16-celled coenobia, showing mucilaginous envelopes; E: 4-celled coenobia, showing mucilaginous envelopes; F: Empty 4-celled coenobia, showing the cell wall; G-H: Coenobia under long-term laboratory conditions. Bars: A, B, D: 50 μm ; C, E-I: 20 μm

1: C, F)。4 细胞定形群体通过垂直于定形群体平面的方式分裂, 从而形成矩形、卵圆形或不规则形状的 16 细胞聚合定形群体(Syncoenobia) (图 1: B, D)。成熟的 4 细胞定形群体和聚合定形群体细胞呈菱形排列, 并且群体内部具有一定空隙。除细胞幼年阶段或似孢子形成阶段之外, 定形群体内部空间通

常为矩形或长菱形(图 1: E)。常为 16 个细胞的聚合定形群体通常可以破裂母细胞壁的方式释放出 4 细胞定形群体。具有胶被的 4 细胞定形群体大小为 60~70 μm ×50~60 μm , 16 细胞的定形群体大小为 80~100 μm ×60~80 μm 。

细胞呈宽椭圆形至不规则卵圆形, 稍不对称,

细胞 12~26 $\mu\text{m} \times 8 \sim 16 \mu\text{m}$, 在似亲孢子形成阶段 18~30 $\mu\text{m} \times 12 \sim 18 \mu\text{m}$ 。细胞壁明显, 表面平滑, 没有覆盖物或显著的两端增厚。叶绿体 8~16 个或更多, 亮绿色, 周生, 片状。每个叶绿体都具有一个显著的具淀粉鞘的蛋白核(图 1: C, I)。

定形群体多数以形成 4 个(少数 2 个)似亲孢子的方式进行繁殖。子代细胞长期保留于显著膨大的母细胞壁中, 最后会通过细胞壁胶化的方式释放出来。

淡水浮游种类, 通常发现于池塘或小水池等小水体中, 常与其它蓝藻、绿藻或鞭毛藻类伴生。此物种为牧野藻属的模式种, 也是目前此属仅有的 1 个物种。本研究发现此物种在我国湖北(武汉)和云南(西双版纳)均有分布。在长期培养条件下, 土佐牧野藻细胞更宽圆, 细胞单生或形成 2~32 个细胞的群体且细胞排列规律不太明显(图 1: G~I)。

2.2 序列分析

分离自武汉(FACHB-1783)和西双版纳(FACHB-

1784)的藻株, 其 18S rDNA 序列长度分别为 1698 bp (KP318979)和 1685 bp (KP318980)。以莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard)为外类群, 搜集其他共球藻纲类群相同基因序列, 构建基于 18S rDNA 基因的系统发育树。在 18S rDNA 基因序列矩阵中, 含有 38 个长度为 1612 bp 的序列, 共有 472 个可变位点(Variable site), 其中有 328 个可供简约分析的信息位点(Parsimony-informative site)、144 个单态位点(Singleton site)。A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 24.3%、25.0%、22.6%和 28.1%, 其中 A+T 含量(49.3%)与 G+C 含量(50.7%)几乎相等, 碱基转换/颠换值为 1.76。我们所分离的藻株与 GenBank 中土佐牧野藻序列(AF228691)相似性高达 99.6%~99.9%, 这进一步支持了形态学鉴定的结果。这些土佐牧野藻序列与卵囊藻科近缘种类[湖北延胞藻(*Ecballocystis hubeiensis* Liu et Hu)和 *Elongatocystis ecballocystiformis* Krienitz & Bock]的相似性为 96.8%~98.4%, 遗传距离为 $p=0.013 \sim 0.030$ (表 1)。

表 1 牧野藻及其近缘类群 18S rDNA 序列间的遗传距离(成对未修正的 p -距离)(左下)和相似性(右上)

Table 1 Distance (pairwise uncorrected p -distances) (lower left) and identity (upper right) based on 18S rDNA sequences of *Makinoella* Okada and its allied taxa

	土佐牧野藻 <i>M. tosaensis</i> AF228691	土佐牧野藻 <i>M. tosaensis</i> KP318979	土佐牧野藻 <i>M. tosaensis</i> KP318980	湖北延胞藻 <i>Ecballocystis</i> <i>hubeiensis</i> JX018185	<i>Elongatocystis</i> <i>ecballocystiformis</i> HQ008713
土佐牧野藻 <i>M. tosaensis</i> AF228691	0	99.7%	99.6%	96.8%	98.1%
土佐牧野藻 <i>M. tosaensis</i> KP318979	0.001	0	99.9%	97.0%	98.4%
土佐牧野藻 <i>M. tosaensis</i> KP318980	0.001	0.000	0	96.9%	98.3%
湖北延胞藻 <i>Ecballocystis hubeiensis</i> JX018185	0.030	0.029	0.029	0	96.3%
<i>Elongatocystis ecballocystiformis</i> HQ008713	0.013	0.013	0.013	0.033	0

2.3 系统发育分析

基于不同方法构建的 18S rDNA 系统发育树均显示共球藻纲(Trebouxiophyceae)类群可以形成几个分支, 分别为卵囊藻科(Oocystaceae)分支(BP/PP=1.00/1.00)、小球藻科(Chlorellaceae)分支(BP/PP=0.99/1.00)、渡边藻分支(*Watanabea*-clade, BP/PP=0.96/1.00)、环藻科(Prasiolaceae)分支(BP/PP=1.00/1.00)、葡萄藻分支(*Botryococcus*-clade, BP/PP=0.96/1.00)和共球藻科(Trebouxiaceae)分支(BP/PP=0.97/1.00)(图 2)。系统发育分析结果表明, 所有的卵囊藻科成员都聚成一支, 形成了单系的卵囊藻科分支, 且不同来源的土佐牧野藻聚在一起, 并获得高度支持(BP/PP=1.00/1.00)。同时, 卵囊藻科的代表性类群卵囊藻属(*Oocystis* Nägeli ex Braun)不是单系起源的, 土佐牧野藻分支与卵囊藻属类群关系似乎都不

太密切。土佐牧野藻与卵囊藻科的其他一些类群如湖北延胞藻和 *Elongatocystis ecballocystiformis* 关系密切(BP/PP=1.00/1.00)(图 2)。

3 讨论

土佐牧野藻(*Makinoella tosaensis* Okada)于 1939 年最早从日本高知县高知大学校园内的一小水池中分离, 由于其独特群体形态特征, 被认为是卵囊藻科内的 1 新属^[6]。为纪念日本著名的植物学家牧野富太郎(Tomitaro Makino)先生, 以牧野先生的姓氏命名了此属, 并以其出生地日本高知县(旧称土佐 Tosa)作为种加词。随后, Kamiya 又进一步研究了此物种的生殖方式^[18]。除日本外, Hegewald 等^[7]首次在韩国一校园内的小水池中发现了此物

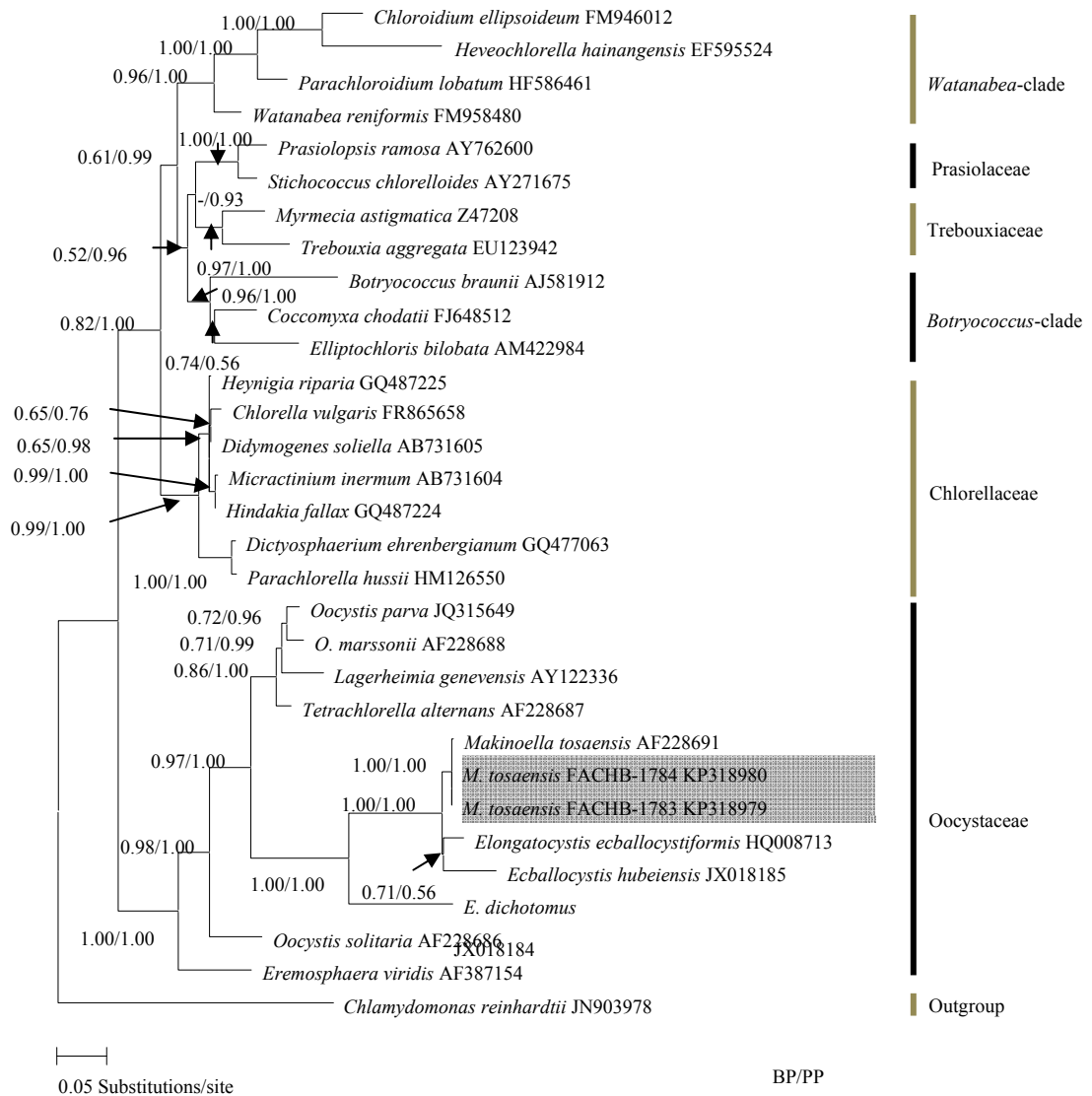


图 2 基于共球藻纲 18S rDNA 序列构建的最大似然树。节点上的数值代表分别用最大似然法和贝叶斯法所得当前进化枝的自展支持(BP)和后验概率(PP)。仅显示高于 50%的支持值。

Fig. 2 Maximum-likelihood tree based on 18S rDNA sequences of Trebouxiophyceae. The numbers on the nodes indicate the posterior probabilities/bootstrap support values based on Maximum Likelihood and Bayesian Inference. Only values >0.50 are shown.

种, 并首次研究了其超微结构^[19]。土佐牧野藻曾一度被认为是东亚特有种, 但后来在斯洛伐克共和国布拉迪斯拉发城(Bratislava)的斯洛伐克科学院园区内的小池塘中也发现了此物种。由于在东亚地区之外发现此物种, 从而推测此物种在温带地区具有更广泛的分布^[8]。但是, 我们在云南省最南端属于热带湿润区的西双版纳自治州勐腊县发现了此物种, 这表明这一物种的分布不仅限于温带地区, 而且在热带地区也有分布。本研究不仅首次在中国发现了此物种, 并将其分离、纯化和培养, 保藏于中国科学院淡水藻种库, 而且首次在热带地区报道

了此物种的存在。然而, 不论是在日本、韩国或斯洛伐克发现的藻株, 还是我们在中国报道的藻株, 都具有相似的生境, 即类似于公园池塘的小水体。

土佐牧野藻最初被认为隶属于卵囊藻科(Oocystaceae)^[6]。由于其群体发育特征, 将其置于栅藻科(Scenedesmaceae), 但根据原始文献的描述此藻具多个叶绿体并缺乏蛋白核, 认为此物种也可能属于黄藻纲^[20]。然而, 在透射电镜下观察超微结构, 这一物种不仅具有多个叶绿体, 而且每个叶绿体内还具有一个被淀粉鞘包裹的蛋白核^[19]。近年来, 通过分子手段进一步证实了土佐牧野藻位于卵囊藻

科^[2]。土佐牧野藻典型的4细胞定形群体特征为两个细胞形成内层对、两个细胞形成外层对,相互以近端部相连,类似于四球藻属(*Tetrachlorella* Korshikov);但是,土佐牧野藻营养细胞群体通常具有独特的矩形或长菱形的内部空间^[8,21]。与土佐牧野藻一样,一些卵囊藻属代表性的物种,如单生卵囊藻(*Oocystis solitaria* Wittrock)也具有多个片状叶绿体且每个叶绿体都具1个蛋白核。但是,土佐牧野藻与单生卵囊藻相比,细胞不呈柠檬形且缺乏明显的两端增厚^[8]。

基于18S rDNA序列的系统发育研究表明,卵囊藻科类群与共球藻纲其他类群关系都不密切,是单系起源的自然类群。但是,此科中的分类单元数量可能比之前认为的要少^[22]。我们的系统发育研究也明确支持土佐牧野藻是卵囊藻科的成员,而不是栅藻科成员。在Hepperle等^[2]的系统发育研究中,土佐牧野藻是1个单独分支,与其他卵囊藻科类群都不太密切。我们的系统发育研究支持Xia等^[23]的观点,即土佐牧野藻与湖北延胞藻和*Elongatocystis ecballocystiformis*亲缘关系密切。这三者具有许多共同的形态特征,例如细胞宽椭圆形或卵形,具含淀粉鞘的蛋白核,细胞壁厚、平滑,具明显胶被,两端通常不增厚。除了叶绿体数量不同外(土佐牧野藻8~16个或更多、湖北延胞藻2~6个、*Elongatocystis ecballocystiformis*有1~4个),这三者间形态特征最大不同之处在于野外条件下土佐牧野藻具有独特的四边形群体形态以及细胞排列方式,湖北延胞藻为不规则分子的树状群体,*Elongatocystis ecballocystiformis*为单生的^[23-24]。基于形态和分子系统发育分析的结果支持在卵囊藻科进化过程中发生了质体丢失事件的假设,即以单生卵囊藻和土佐牧野藻为代表的原始卵囊藻科类群的似亲孢子具有多数叶绿体,而以*Oocystis marssonii* Lemmermann和四球藻属为代表的一些卵囊藻科类群的似亲孢子仅具有1个质体^[2]。

目前,已有不少关于卵囊藻科类群生态和生化方面的研究报道^[25-27],但是由于缺乏更多分类群的分子序列,因此卵囊藻科类群的系统发育研究仍有很多不足。现有的系统发育结果表明卵囊藻科是单系起源的自然类群,但是此科属种水平的分类单元是高度不稳定的^[24]。也正是由于缺乏更多的分子数据,包括土佐牧野藻在内的多数卵囊藻科类群的系统发育位置仍不清楚。未来随着更多分类类群DNA

分子数据的加入以及更多分子标记的采用,才能进一步阐明卵囊藻科类群的亲缘关系和系统发育位置,确定卵囊藻科内属种的定义和界限。

参考文献

- [1] KRIENITZ L, BOCK C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters [J]. *Hydrobiologia*, 2012, 698(1): 295–326. doi: 10.1007/s10750-012-1079-z.
- [2] HEPPELLE D, HEGEWALD E, KRIENITZ L. Phylogenetic position of the Oocystaceae (Chlorophyta) [J]. *J Phycol*, 2000, 36(3): 590–595. doi: 10.1046/j.1529-8817.2000.99184.x.
- [3] ROBINSON D G, WHITE R K. The fine structure of *Oocystis apiculata* W. West with particular reference to the cell wall [J]. *Br Phycol J*, 1972, 7(1): 109–118. doi: 10.1080/00071617200650131.
- [4] HEGEWALD E, SCHNEPF E, ALDAVE A. Investigation on the lakes of Peru and their phytoplankton: 4. The algae of Laguna Paca with special reference to *Chodatella subsalsa* and *Scenedesmus ellipticus* [J]. *Arch Hydrobiol/Algol Stud Suppl*, 1978(21): 384–392.
- [5] KOMÁREK J. Änderungen in der Taxonomie der Chlorococcalgen [J]. *Arch Hydrobiol/Algol Stud Suppl*, 1979(24): 239–263.
- [6] OKADA Y. *Makinoella tosaensis*, a new genus of the Oocystaceae [J]. *J Jpn Bot*, 1949, 24: 166–168.
- [7] HEGEWALD E, SCHNEPF E, JEON S L. Report on *Makinoella tosaensis* Okada (Chlorophyta, Oocystaceae), a species new to Korea [J]. *Algae*, 1999, 14(2): 87–90.
- [8] HINDÁK F, HINDÁKOVÁ A. First report of *Makinoella tosaensis* Okada (Chlorophyta, Chlorococcales, Oocystaceae) outside East Asia [J]. *Fottea*, 2010, 10(1): 141–144. doi: 10.5507/fof.2010.008.
- [9] STANIER R Y, KUNISAWA R, MANDEL M, et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae [J]. *Bacteriol Rev*, 1971, 35(2): 171–205.
- [10] HILLIS D M, MORITZ C, MABLE B K. *Molecular Systematics* [M]. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996: 1–665.
- [11] 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. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x.
- [12] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIK F, et al. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876.
- [13] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acids*

- Symp Ser, 1999, 41: 95–98. doi: 10.1021/bk-1999-0734.ch008.
- [14] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.
- [15] STAMATAKIS A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(21): 2688–2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446.
- [16] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(8): 754–755. doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.
- [17] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, et al. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
- [18] KAMIYA T. A report on the reproduction of *Makinoella tosaensis* Okada [J]. *J Japn Bot*, 1956, 31(9): 257–261.
- [19] SCHNEPF E, Hegewald E. The ultrastructure of *Makinoella tosaensis* Okada (Chlorophyta, Oocystaceae) [J]. *Arch Hydrobiol/Algal Stud Suppl*, 2000(97): 79–91.
- [20] KOMÁREK J, FOTT B. Chlorophyceae (Grünalgen), ordnung: Chlorococcales [M]// HUBER-PESTALOZZI G. *Binnengewässer* 16/7. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1983: 1044.
- [21] KORSHIKOV O A. *Pidklas Protokokovi (Protococcinae)*, *Viznačnik prisnovod. Vodorostej Ukrainskoi RSR* [J]. *Akad Nauk URSR*, 1953, 5: 1–436.
- [22] MELKONIAN M. Phylum chlorophyta [M]// MARGULIS L, CORLISS J O, MELKONIAN M, et al. *Handbook of Protoctista*. Boston: Jones & Barlett, 1983: 597–660.
- [23] XIA S, ZHU H, CHENG Y Y, et al. Phylogenetic position of *Ecballocystis* and *Ecballocystopsis* (Chlorophyta) [J]. *Fottea*, 2013, 13(1): 65–75. doi: 10.5507/fot.2013.006.
- [24] KRIENITZ L, BOCK C. *Elongatocystis ecballocystiformis* gen. et comb. nov., and some reflections on systematics of Oocystaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) [J]. *Fottea*, 2011, 11(2): 271–278. doi: 10.5507/fot.2011.026.
- [25] CHANG C, SIBLEY T H. Accumulation and transfer of copper by *Oocystis pusilla* [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1993, 50(5): 689–695. doi: 10.1007/BF00194663.
- [26] KOVITVADHI U, CHAOPAKNAM B, NAGACHINTA A, et al. Ecology of freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) in Maeklong River, Kanchanaburi Province [J]. *Kasets J (Nat Sci)*, 1997, 32: 1–12.
- [27] LEE B H, PICARD G A. Occurrence of glutamate dehydrogenase isoenzymes during growth of *Oocystis alga* [J]. *Biotechn Bioeng*, 1983, 25(7): 1801–1816. doi: 10.1002/bit.260250710.