

短孢角毛藻相似种类的形态学和系统学研究

陈作艺, 李扬*

(华南师范大学生命科学学院, 广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室, 广州 510631)

摘要: 短孢角毛藻的形态特征多变, 容易导致物种的错误鉴定, 并且其与若干相似种类之间存在物种混淆的情况。基于建立的单克隆培养藻株, 结合生活史中形态特征的连续观察, 以及基于目标基因序列分析的分子系统学数据, 对短孢角毛藻 (*Chaetoceros brevis* Schütt) 及其相似种类的形态学和系统学进行了研究。丰富了短孢角毛藻休眠孢子的形态学描述, 报道了一个新的特征: 休眠孢子壳面上刺的末端具有帽状结构, 该特征未报道于其他角毛藻种类, 可作为短孢角毛藻的标志性特征。报道了我国角毛藻属的 1 个新记录种——拟短孢角毛藻 (*C. pseudobrevis* Pavillard), 该种具有独特的形态学特征, 以及独立的系统学位置, 应是一个独立的物种, 而非短孢角毛藻的同种异名。垂缘组角毛藻的种类在系统发育树中显示出较好的单系起源, 链端角毛及其走势是否可以作为该类群的共享特征, 目前尚难做出定论。

关键词: 短孢角毛藻; 形态学; 系统学; 拟短孢角毛藻; 垂缘组角毛藻

doi: 10.11926/jtsb.3701

Morphological and Phylogenetic Studies on *Chaetoceros brevis* Schütt and Its Allied Taxa

CHEN Zuo-yi, LI Yang*

(Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Because of the variation of some key morphological characteristics and the subjective influences from researchers, the mis-identification has occurred commonly to *Chaetoceros brevis*. Meanwhile, there are still some debate on the species sharing very similar morphology with *C. brevis*, for example whether they could be ranked as a separated species or just a variety as *C. brevis* var. *pseudobrevis*. To solve the above questions, several monoclonal stains were established, their morphology and systematic were studied based on the combination of continuously morphological observation in the life cycle and molecular data from some target genes. One new morphological characteristic was found in *C. brevis*, i.e., the cap-like structure on the top of spines on the surface of resting spore, which has never been reported in other *Chaetoceros* species, and could be a unique feature to identify *C. brevis*. A newly recorded diatom species for China was observed, *C. pseudobrevis*. Combine the morphology and molecular data, it was shown that *C. pseudobrevis* should be a separate taxa, not a variety of *C. brevis*. In the phylogenetic trees, the taxa in section *Laciniosa* clustered in the same clade, which shown the monophyeny and matching with the morphological grouping. But so far it is difficult to confirm the common-sharing features for this section.

Key words: *Chaetoceros brevis*; Morphology; Phylogeny; *C. pseudobrevis*; Section *Laciniosa*

收稿日期: 2016-11-21 接受日期: 2017-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370235, 31570205); 广东省科技计划项目(2015A030401084)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31370235, 31570205), and the Science and Technology Foundation of Guangdong Province (Grant No. 2015A030401084).

作者简介: 陈作艺(1988~), 男, 硕士研究生, 主要从事藻类学研究。E-mail: 875999102@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liyang@sncu.edu.cn

角毛藻属(*Chaetoceros* Ehrenberg)是物种多样性最为丰富的浮游硅藻类群之一,广泛分布于全球各类水体中^[1-2],某些角毛藻种类还是重要的藻华原因种^[3-5]。角毛藻属的物种多样性丰富,目前已报道 529 个分类单位,但仅有 224 种被认可^[6],至少有一半被认为是同种异名^[2-4]。目前,角毛藻的分类学研究大多是依据光镜下的形态学特征,电镜下超微形态特征的应用还相对有限,分子生物学方法的引入更加稀少,在一定程度上限制了角毛藻属分类学和系统学的研究进展。因此对于一些形态相似的种类而言,更易造成界限不清、种间混淆的情况,短孢角毛藻(*C. brevis* Schütt)正是其中的典型代表之一。

短孢角毛藻最初报道于波罗的海^[7],是角毛藻属的典型种类,也是全球近岸广布种,从温带至热带的各类水体中均有报道^[3-4,8-13]。目前的认知中,短孢角毛藻的形态特征有:链状群体平直,窗孔花生状;角毛长且细,内部成明暗相间排列;有角毛基部;角毛上具有螺旋排列的小刺及孔纹;休眠孢子具有刺状结构^[3-4,7-8,10,12]。与此同时,短孢角毛藻的某些特征存在一定的变化,相关报道也不尽相同。首先,角毛延伸方向不定,有时呈 Brunel II 型^[10],有时呈 Brunel III 型^[4,12];其次,角毛内部明暗相间的特征有时明显^[3,9],有时不明显^[4,11]。对于这些变化特征的分类学评价,目前还存在争议^[4,9-12,14]。

为解答上述疑问,本文基于建立的单克隆培养藻株,结合生活史中形态特征的连续观察,以及基于目标基因序列分析的分子生物学技术,对短孢角毛藻的形态学特征进行了研究,还报道了我国的 1 个新记录种——拟短孢角毛藻(*C. pseudobrevis* Pavillard),就其分类学地位展开分析,最后对短孢角毛藻及其相似种类的系统学位置进行了探讨,这丰富了我国角毛藻属的物种多样性,廓清了短孢角毛藻的形态特征,及其与相似种类的种间界限,还提供了常用分子标记的序列信息,可望为后续分子系统学研究的深入提供基础信息。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

利用浮游植物网(孔径 10 μm)进行水平拖网,以采集活体浮游植物样品,尽快带回实验室进行目标藻株的分离、纯化。以前言中概括的典型形态特征

作为挑选短孢角毛藻(*Chaetoceros brevis*)及其相似种类的主要依据,来建立目标藻株培养体系。

1.2 单克隆培养株系的建立

利用毛细管法在生物倒置显微镜(Mshot MI-12)下挑取目标藻细胞,转移至滴有 L 培养液的 48 孔细胞培养板中^[15],待其存活并繁殖达到一定细胞数量(100 个以上),转移到盛有 L 培养液的 100 mL 三角瓶中培养。藻株保存于光照培养室内,培养条件是(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 、12:12 光循环、光照强度约为 50~80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。本研究共建立了 6 个目标藻株的单克隆培养株系(表 1)。

表 1 建立的单克隆培养藻株信息

Table 1 List and information of monoclonal strains

株系 Strain	分离海域 Location	分离时间 Isolation date
MC1115	台湾海峡 Taiwan Strait, 118.763 E 24.44 N	2016-04-19
MC1118	台湾海峡 Taiwan Strait, 118.763 E 24.44 N	2016-04-19
MC1144	南海北部 Northern South China Sea, 117.05 E 19.83 N	2016-05-18
MC1154	南海北部 Northern South China Sea, 111.90 E 19.75 N	2016-06-10
MC1186	台湾海峡 Taiwan Strait, 120.26 E 25.42 N	2016-07-24
MC1187	台湾海峡 Taiwan Strait, 120.26 E 25.42 N	2016-07-24

1.3 休眠孢子的诱导

吸取 1 mL 处于对数生长期的藻液,转移到盛有 L 无氮培养液的 100 mL 三角瓶中培养^[16],以诱导目标藻株的休眠孢子。培养条件是(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 、12 h:12 h 光循环、光照强度约为 50~80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,培养时间至少 4 周以上。每个藻株均诱导 3 次以上,并定期观察有无休眠孢子产生。

1.4 形态特征的观察

光学显微镜(Light microscopy, LM)观察:取对数生长期藻液,置于光学显微镜(Olympus BX53)下进行微分干涉(Differential interference contrast, DIC)观察,并使用 Olympus DP27 数码相机拍照。光镜下观察群体类型、色素、窗孔形态、角毛形态及走势、休眠孢子等特征。

扫描电镜(Scanning electron microscopy, SEM)观察:取对数生长期藻液 200 μL ,加入等体积的浓硫酸(>95%),静置 10 min,以去除有机质,然后加入灭菌双蒸水多次水洗至中性^[17]。用 20 mL 注射器

吸取酸化后的样品,用孔径 5 μm 的 Milipore 膜过滤样品,然后取出膜,自然晾干后,用碳导电胶贴于铜台上,喷金并置于扫描电镜(Zeiss Utras55)下观察和拍照。扫描电镜下观察角毛结构、窗孔超微形态、唇形突结构、休眠孢子结构等特征。

透射电镜(Transmission electron microscopy, TEM)观察:样品的处理方法同上。可用移液枪吸取 10 μL 酸化后的样品,滴加在喷镀碳膜的微孔铜网上,自然晾干后置于透射电镜(Philips tecnai10)下观察和拍照。透射电镜观察壳面孔纹、壳套结构等特征。

1.5 基于 LSU nrDNA 部分序列的分子系统学分析

用离心法收集藻细胞,进行总 DNA 的提取^[18]。利用正向引物 D1R-F^[19]和反向引物 D3B-R^[20]扩增核糖体大亚基编码基因(LSU nrDNA)的 D1~D3 区序列。PCR 产物送深圳华大基因公司(BGI)进行纯化和测序。

利用 NCBI 的 BLAST 功能,分别检索形态相似种类、遗传相似种类的序列信息,同时检索目标藻株相似种类的序列(详见图一)。运用 BioEdit 软件进行序列的比对和矩阵^[21],有 723 个碱基用于最终的系统学分析。基于 MrModeltest 2.3^[22]计算,选择的最适模型和参数为 GTR+I+G, ([AC]=1.0114), [AG]=2.6107], [AT]=1.2706], [CG]=0.4890, [CT]=4.4807, [GT]=1.0000, gamma shape=0.7769, nucleotide frequencies: A=0.2511, C=0.1927, G= 0.2814, T=0.2748), 然后分别用 RAxML-HPC2^[23]和 MrBayes 3.2^[24]构建最大似然树(Maximum likelihood, ML)和贝叶斯推理树(Bayesian inference, BI)。其中 ML 分析的自检值(Bootstrap test)设定为 1000, 选用霍氏半管藻(*Hemiaulus hauckii* Grunow) (EF423428)为外类群。

2 结果和分析

2.1 基于形态特征的物种识别

以短孢角毛藻现有形态学特征为依据,共建立了 6 个目标藻株的单克隆培养株系。利用 LM 和 EM 对 6 个目标藻株进行了形态学观察,根据群体特征、角毛走势、窗孔形状、休眠孢子等特征,可将 6 个目标藻株划分为以下两个类群。

类群一:包括株系 MC1115、MC1118、MC1186 和 MC1187。细胞链直,窗孔呈花生形,中央突起显著。角毛排列对称,具有明显的角毛基部。链端

角毛呈宽 V 型,比链中角毛稍粗。角毛细密,有时直,有时成波浪状弯曲,部分角毛可见明暗相间排列。休眠孢子呈山丘状凸起,壳面布满长短不一的刺状结构。基于上述形态特征,类群一的藻株初步鉴定为短孢角毛藻(*C. brevis*)。

类群二:包括株系 MC1144 和 MC1154。细胞链直,窗孔呈花生形或嘴唇形,中央突起不明显。角毛排列不规则,无角毛基部。链端角毛呈 U 型,比链中角毛稍粗。角毛细且直,角毛明暗相间排列明显。未见休眠孢子。类群二的藻株初步鉴定为拟短孢角毛藻(*C. pseudobrevis*)。

类群一和类群二的形态特征较为相似,主要区别在于角毛的排列方式、有无角毛基部和有无休眠孢子。

2.2 基于 LSU nrDNA 部分序列的分子系统学分析

以霍氏半管藻(*Hemiaulus hauckii* Grunow) (EF423428)为外类群,分别构建了 LSU nrDNA 的 ML 和 BI 系统发育树。两者具有相似的拓扑结构,继而将两者合并(图 1)。

分子系统学研究表明(图 1),48 株角毛藻总共聚成 4 个类群。其中,第二类群(Clade II)包含隶属于有色体角毛亚属的种类,第一、三、四类群(Clade I、III、IV)包含隶属于无色体角毛亚属的种类,这样的划分结果显示有色体角毛亚属是单起源,而无色体角毛亚属是多起源。6 个目标藻株位于第四类群(Clade IV)中,两者构成姐妹支,且具有较高的置信值(BPP=1, ML=98),同时与 1 株垂缘角毛藻(*C. lacinosus* Schütt)(KF379751)聚在一起,也具有高的置信值(BPP=1, ML=88)。

2.3 结合形态特征与分子系统分析的物种确认

结合形态特征和分子系统学研究结论,可以看出,基于形态特征划分的两个类群,亦得到分子系统学的支持,因此本文建立的 6 个单克隆培养株系可以确认属于两种不同的物种,分别鉴定为短孢角毛藻(类群一)和拟短孢角毛藻(类群二)。

2.4 形态学描述

短孢角毛藻 *Chaetoceros brevis* (图 2: A~M 和图 3: A~H)

Schütt, Reports of the German Botanical Society 13: 38, fig. 4 a & b, 1895.

细胞链直,常形成 3~8 个细胞的链状群体(图

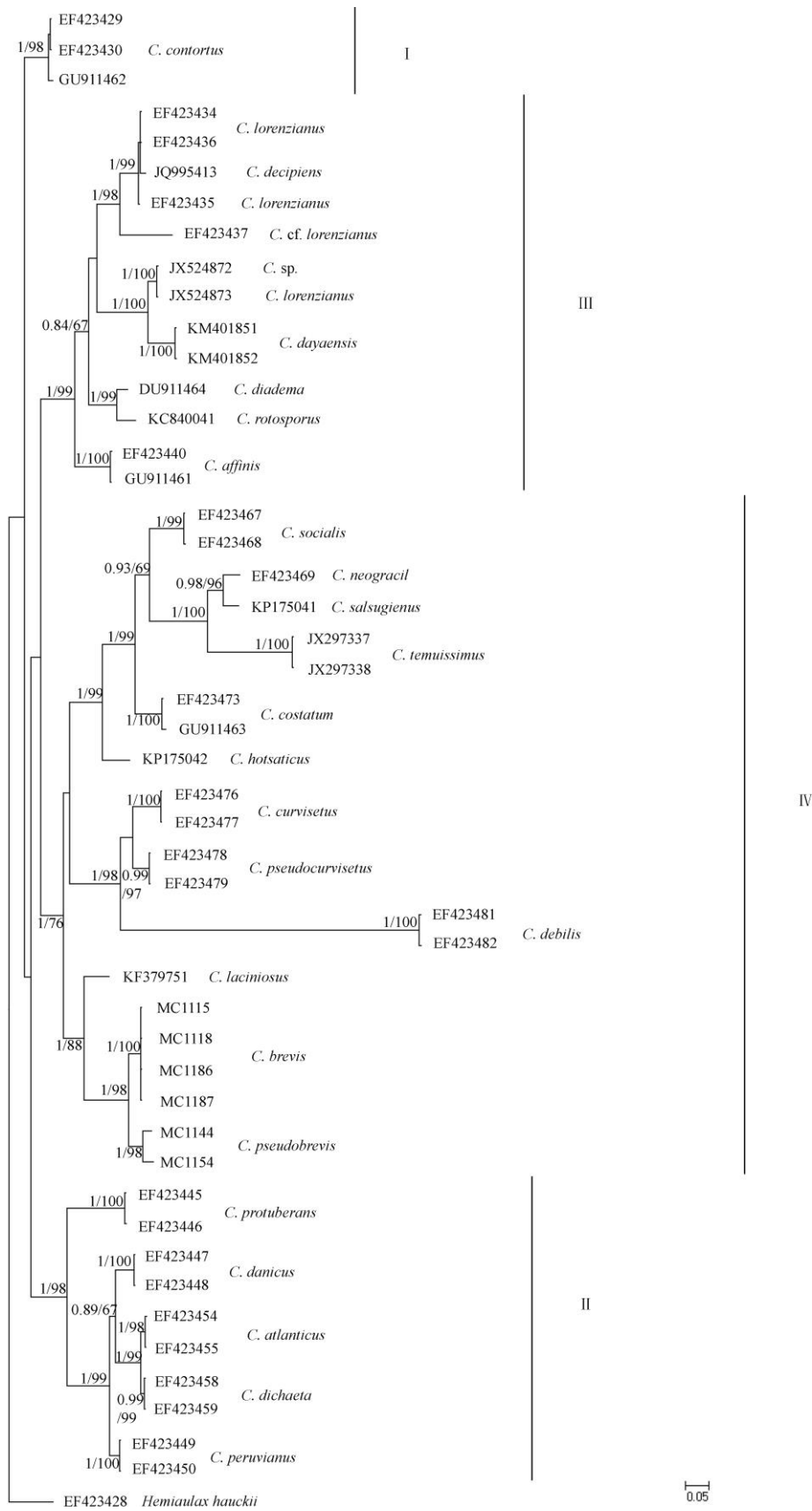


图 1 基于 LSU nrDNA 部分序列的系统树(以霍氏半管藻为外类群)

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree based on sequences of LSU rDNA with *Hemiaulus hauckii* Grunow as outgroup

2: A, C), 也有单细胞生活(图 2: B)。细胞宽环面观呈矩形, 壳面长轴大于贯壳轴高度(图 2: A~C)。每个细胞含 1 个色素体, 色素体呈盘状浅裂(图 2: A~C)。壳面观呈长椭圆形, 中央区域隆起(图 2: F, H)。壳面近中央处有一环纹, 环纹周围有不规则放射状排列的肋纹, 肋纹之间有散布的孔纹(图 2: G, K)。壳面长轴两端有明显隆起, 上生角毛(图 2: D~F)。壳套约占贯壳轴高 1/3 (图 2: C), 它与壳环带相接处有极小的凹缢(图 2: A, C)。链端壳面具有一个偏心的唇形突, 唇形突扁裂状, 内部则无此结构(图 2: F, G), 链中壳面则无唇形突(图 2: K)。壳套上结构与壳面相同, 有不规则放射状排列的肋纹, 以及其间分布的孔纹(图 2: L)。相邻细胞之间的窗孔呈花生形(图 2: A, C, D), 中部略缢缩(图 2: D)。

角毛长且硬, 呈 Brunel II 型, 自壳面边缘生出后, 成对角方向延伸一段距离后与相邻角毛在链轴外交叉(图 2: D, E), 角毛基部长度不一(图 2: E)。链端角毛呈宽 V 型(图 2: A~C), 比链中角毛稍粗。部分角毛出现明暗相间排列(图 2: B)。角毛细密, 有时直, 有时成波浪状弯曲(图 2: H), 具有一行螺旋排列小刺及多行螺旋排列的孔纹, 孔纹呈四边形, 长度为 $0.0345\sim 0.0452\ \mu\text{m}$, 平均为 $(0.0389\pm 0.0035)\ \mu\text{m}$, 密度为 $11\sim 16\ \mu\text{m}^{-1}$ 平均为 $(13.43\pm 1.65)\ \mu\text{m}^{-1}$ (图 2: I, J)。环带多数, 分布有平行排列的肋纹, 其间散布一些小孔(图 2: M)。营养细胞的壳面长轴为 $21.05\sim 22.5\ \mu\text{m}$, 平均为 $(21.72\pm 0.49)\ \mu\text{m}$, 贯壳轴高为 $7.37\sim 15\ \mu\text{m}$, 平均为 $(9.51\pm 1.84)\ \mu\text{m}$, 窗孔高为 $3.75\sim 7.37\ \mu\text{m}$, 平均为 $(5.78\pm 0.95)\ \mu\text{m}$ ($n=20$)。

休眠孢子位于母细胞的一端, 初生壳面呈山丘状突起, 而次生壳面略微突起, 壳面布满长短不一的刺状结构(图 3: A~D)。初生壳边缘有一圈平行排列的短刺, 壳面中部的小刺长于壳面边缘的, 小刺末端具有帽状结构(图 3: C~F)。次生壳的壳套边缘分布有一圈圆孔(图 3: H), 而初生壳则无(图 3: G)。次生壳面长有不规则小刺, 小刺上分布有碎片状或块状结构, 末端未见帽状结构(图 3: C, D)。

分布: 材料采自台湾海峡(4、7 月)。本种为近岸暖水种, 曾记录于我国青岛、烟台和福建等近岸海域^[11], 还分布于波罗的海^[7], 北美西部沿岸海域^[8], 美国罗德岛州纳拉干塞特湾^[3], 加利福尼亚湾^[10], 丹麦沿海^[4], 阿根廷布宜诺斯艾利斯沿海^[12]。

拟短孢角毛藻 *Chaetoceros pseudobrevis* (图 4:

A~J)

Pavillard, *Bulletin of the Society Botanical France*, **58**: 1, fig. 1D, 1911。

细胞链直, 常形成 3~6 个细胞的链状群体(图 4: A, C), 也有单细胞生活的情况(图 4: B)。细胞宽环面观呈矩形, 壳面长轴变化较大, 有时大于贯壳轴高度(图 4: C), 有时反之(图 4: A~B)。每个细胞含一个色素体(图 4: A~C)。壳面观呈长椭圆形(图 4: E~F)。壳面偏中央有一环纹, 环纹周围有不规则放射状排列的肋纹, 肋纹之间有散布的孔纹(图 4: G~H)。壳套约占贯壳轴高的 1/4 (图 4: A~C), 它与壳环带相接处的凹缢明显(图 4: C)。链端壳面具有一个偏心的唇形突, 唇形突扁裂状(图 4: E~F), 链中壳面则无唇形突(图 4: D)。壳套上结构与壳面相同, 有不规则放射状排列的肋纹, 肋纹之间无孔纹(图 4: H)。相邻细胞之间的窗孔呈花生形(图 4: C)或嘴唇状(图 4: D), 中央略微突起。

角毛长且硬, 延伸方向不定, 呈 Brunel II 型(图 4: C, E), 自壳面边缘生出后, 即与相邻角毛在细胞轴外交叉(图 4: D), 无角毛基部(图 4: D)。链端角毛呈 U 型(图 4: A~C), 比链中角毛稍粗, 角毛排列不规则(图 4: C)。角毛具明显的明暗相间排列(图 4: A~C), 角毛细密, 具有一行螺旋排列小刺及多行螺旋排列的孔纹, 孔纹呈四边形(图 4: J), 长度为 $0.0325\sim 0.0375\ \mu\text{m}$, 平均为 $(0.0353\pm 0.0020)\ \mu\text{m}$, 密度为 $11\sim 13\ \mu\text{m}^{-1}$, 平均为 $(12.06\pm 0.68)\ \mu\text{m}^{-1}$ 。环带多数, 环带分布有平行排列的肋纹, 其间散布一些小孔(图 4: I)。营养细胞的壳面长轴为 $17.89\sim 29.47\ \mu\text{m}$, 平均为 $(24.26\pm 5.67)\ \mu\text{m}$, 贯壳轴高为 $12.63\sim 26.32\ \mu\text{m}$, 平均为 $(18.24\pm 3.19)\ \mu\text{m}$, 窗孔高为 $3.16\sim 15.79\ \mu\text{m}$, 平均为 $(9.17\pm 3.15)\ \mu\text{m}$ ($n=20$)。

未见休眠孢子。

分布: 采自南海北部海域。本种还分布于地中海^[14], 英国沿岸海域^[25], 丹麦沿海^[4], 波罗的海^[26]。

3 结论和讨论

3.1 短孢角毛藻的形态学补充

以往界定短孢角毛藻的形态有: 链中角毛走势呈 Brunel II 型; 角毛内部呈明暗相间排列; 链端壳面唇形突成扁裂状; 休眠孢子具刺状结构。但是一些特征存在变化和不确定性, 如短孢角毛藻的链中角毛走势有时呈 II 型^[10], 有时呈 III 型^[4, 12]。角毛内

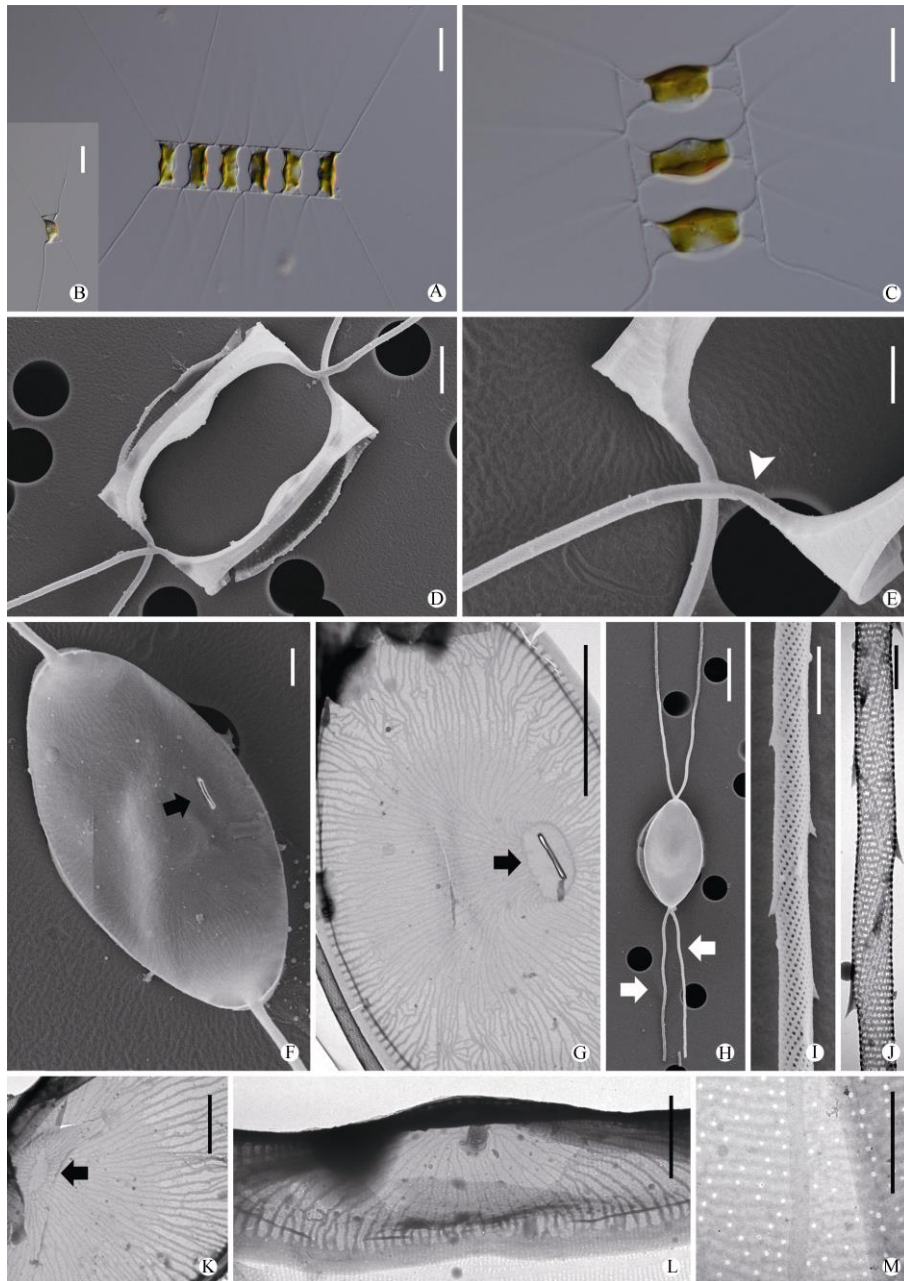


图 2 短袍角毛藻(LM: A~C; SEM: D~F, H, I; TEM: G, J~M)。A: 细胞链宽环面观及宽 V 型端角毛(MC1115); B: 单细胞宽环面观(MC1115); C: 窗孔形状和色素体(MC1118); D: 链中壳面及窗孔(MC1115); E: 链中角毛基部(MC1186); F~G: 链端壳面, 示唇形突(箭头)(MC1115); H: 链中壳面, 示波浪状角毛(箭头)(MC1115); I~J: 角毛结构(MC1115); K: 链中壳面, 示偏中央环纹(箭头)(MC1187); L: 壳套(MC1118); M: 环带(MC1115)。标尺: A, B=20 μm ; C, H=10 μm ; D=4 μm ; G=5 μm ; L=2.5 μm ; E~F, K=2 μm ; I~J, M=1 μm

Fig. 2 *Chaetoceros brevis* under LM (A~C), SEM (D~F, H, I) and TEM (G, J~M). A: Chain in broad girdle view and broad V-shaped terminal setae (MC1115); B: Solitary living cell (MC1115); C: Aperture and chloroplast (MC1118); D: Intercalary valves and aperture (MC1115); E: The setae base of intercalary valves (MC1186); F~G: Terminal valves with rimoportulae (arrow) (MC1115); H: Intercalary valve with wavy setae (arrows) (MC1115); I~J: Structure of setae (MC1115); K: Intercalary valve with eccentric annulus (arrow) (MC1187); L: Mantle (MC1118); M: Girdle bands (MC1115). Bars: A, B=20 μm ; C, H=10 μm ; D=4 μm ; G=5 μm ; L=2.5 μm ; E~F, K=2 μm ; I~J, M=1 μm

部明暗相间排列有时明显^[3,9], 有时不明显^[4,11]。本研究新补充的特征有 2 个: 壳面肋纹之间有零散分

布的小孔(图 2: G, K, L); 休眠孢子初生壳面中部的小刺长于壳面边缘的, 小刺末端具有帽状结构(图

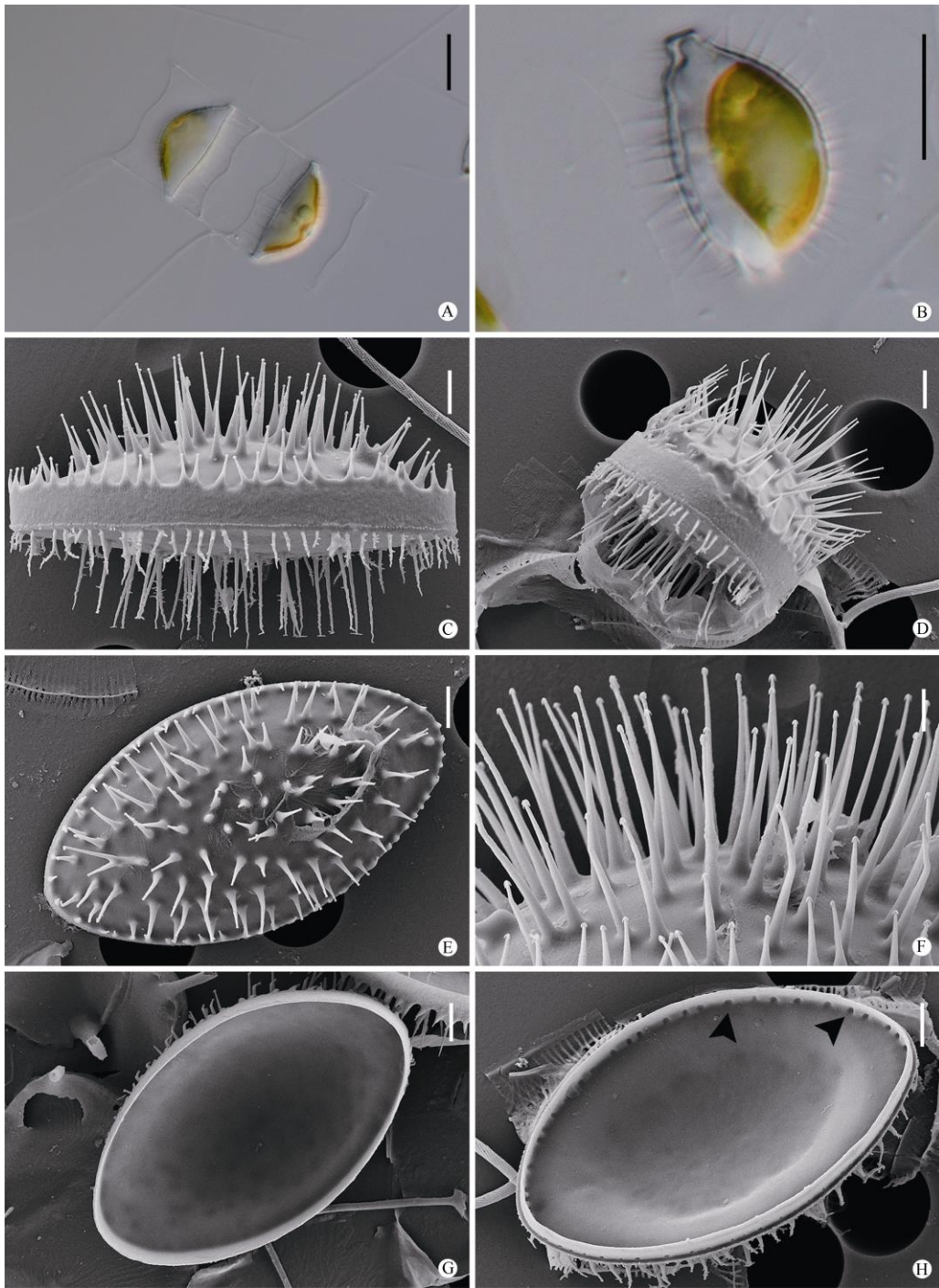


图3 短孢角毛藻(LM: A~B; SEM: C~H)。A: 成熟的休眠孢子位于母细胞链中(MC1115); B~D: 释放的成熟休眠孢子(MC1115); E: 休眠孢子壳面观(MC1118); F: 末端具帽状结构的小刺(MC1115); G: 休眠孢子初生壳(MC1118); H: 休眠孢子次生壳孔纹结构(箭头)(MC1118)。标尺: A, B=10 μm ; C~E, G~H=2 μm ; F=1 μm

Fig. 3 *Chaetoceros brevis* under LM (A~B) and SEM (C~H). A: Two mature spores in mother cells (MC1115); B~D: Released resting spores (MC1115); E: Resting spore in valve views (MC1118); F: Caps on the distal tips (MC1115); G: Primary valve of resting spore (MC1118); H: A ring of puncta on the margin of secondary valve mantle (arrowhead) (MC1118). Bars: A, B=10 μm ; C~E, G~H=2 μm ; F=1 μm

3: C~F), 次生壳面长有不规则小刺, 小刺上分布有碎片状或块状结构, 末端未见帽状结构(图 3: C~

D)。同时, 新补充的第二个特征很独特, 之前未见报道, 可作为短孢角毛藻的标志性特征。

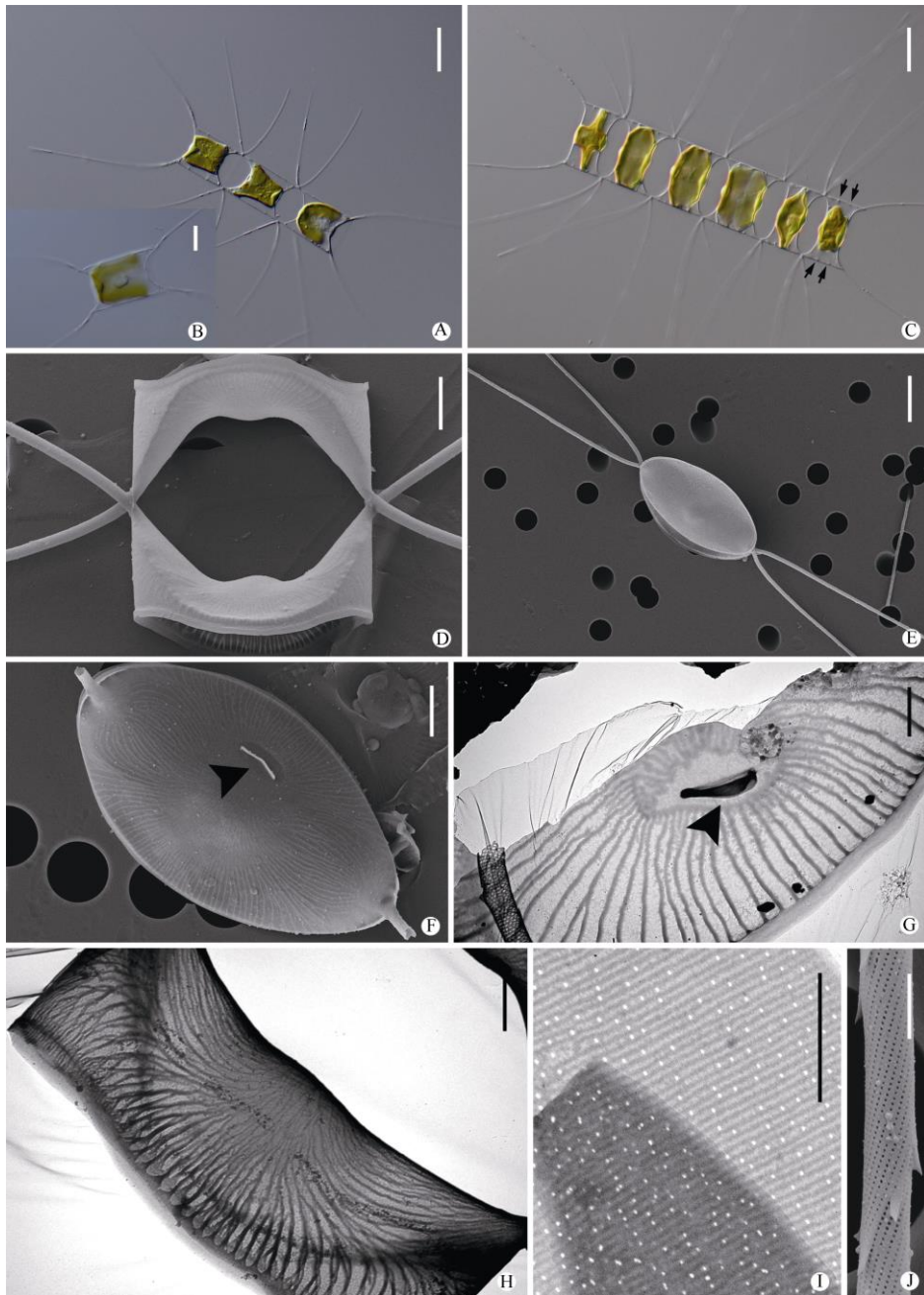


图 4 拟短孢角毛藻(LM: A~C; SEM: D~F, J; TEM: G~I)。A: 细胞链宽环面观及宽 U 型端角毛(MC1154); B: 单细胞宽环面观(MC1154); C: 壳套与环带相接处的凹缢(箭头)及窗孔形状(MC1144); D: 链中壳面及窗孔(MC1154); E: 链中壳面及角毛(MC1144); F~G: 链端壳面, 示唇形突(箭头)(MC1144); H: 壳套(MC1154); I: 环带(MC1154); J: 角毛结构(MC1154)。标尺: A, C=20 μm ; B, E=10 μm ; D, F=4 μm ; H~I=2 μm ; G, J=1 μm

Fig. 4 *Chaetoceros pseudobrevis* under LM (A–C), SEM (D–F, J) and TEM (G–I). A: Broad girdle views and U-shaped terminal setae (MC1154); B: Solitary living cell (MC1154); C: Detail of chains, showing constrictions (arrows) between the mantle and the girdle bands, and peanut-like aperture (MC1144); D: Intercalary valves and lip-shaped aperture (MC1154); E: Intercalary valve and sibling setae (MC1144); F–G: Terminal valves with rimoportulae (arrowhead) (MC1144); H: Mantle (MC1154); I: Girdle bands (MC1154); J: Structure of setae (MC1154). Bars: A, C=20 μm ; B, E=10 μm ; D, F=4 μm ; H–I=2 μm ; G, J=1 μm

3.2 拟短孢角毛藻的分类学地位

拟短孢角毛藻由 Pavillard 于 1911 年首次报道, 与短孢角毛藻的主要区别特征是壳面中央较平直,

未见明显隆起、端角毛呈 U 型伸展、链中角毛排列不规则^[14]。部分学者认同上述观点^[4], 但也有学者认为短孢角毛藻和拟短孢角毛藻之间的形态特征

变化不大,于是将拟短孢角毛藻列为短孢角毛藻的同种异名^[11,25]。

本研究建立了拟短孢角毛藻的两个培养株系(类群二,MC1144和MC1154),并与短孢角毛藻(类群一)进行了对比分析。首先,两者具有较为相似的形态特征:直的链状群体;链中角毛呈 Brunel II型;链端壳面具有一个偏心唇形突;角毛上具有1行螺旋排列小刺及多行螺旋排列的孔纹,孔纹呈四边形。同时两者的区别特征也很明显:(1)拟短孢角毛藻的窗孔呈花生形或嘴唇形,而短孢角毛藻的窗孔则呈花生形;(2)拟短孢角毛藻的链端角毛呈U型,而短孢角毛藻的链端角毛呈宽V型;(3)拟短孢角毛藻无角毛基部,而短孢角毛藻具明显的角毛基部;(4)拟短孢角毛藻的角毛排列不规则,短孢角毛藻的角毛排列对称;(5)拟短孢角毛藻的角毛细且直,内部明暗相间排列明显,而短孢角毛藻的角毛细密,有时直,有时成波浪状弯曲,部分角毛出现明暗相间排列;(6)拟短孢角毛藻壳面无散布的孔纹,中央较平直,未见明显隆起,而短孢角毛藻壳面具散布的孔纹,中央突起显著;(7)拟短孢角毛藻无休眠孢子,而短孢角毛藻有休眠孢子。这些形态差异亦得到分子系统学的支持,两者表现出较高的遗传差异,说明它们不是同一物种。因此,本研究认为无论是形态特征还是分子信息,拟短孢角毛藻都明显区别于短孢角毛藻,应该是1个独立的物种,而非短孢角毛藻的1个变种。

3.3 短孢角毛藻相似种类的比较形态学研究

短孢角毛藻的形态相似种与遗传相似种是一致的,都是拟短孢角毛藻、垂缘角毛藻。短孢角毛藻和拟短孢角毛藻的比较已在前面详细讨论,在此就不再赘述。短孢角毛藻与垂缘角毛藻也具有相似的形态特征:窗孔花生状、角毛基部明显且成对角方向延伸、角毛具有1行螺旋排列小刺及多行螺旋排列的孔纹^[2,4,7-8]。两者间也有明显的形态学差异:(1)前者细胞含1个色素体,而后者细胞含2个色素体;(2)前者端角毛长且细,呈宽V形延伸,后者端角毛则粗大,末端交叉延伸;(3)前者端壳面的唇形突偏心,而后者端壳面的唇形突位于壳面边缘^[27];(4)短孢角毛藻休眠孢子两壳面布满长短不一的小刺,且初生壳面上的小刺末端具有帽状结构,这也是本文对短孢角毛藻形态学特征的最新补充,而垂缘角毛藻的成熟休眠孢子两壳面皆光滑,但

初生壳面在发育过程中也可能出现硅质化细刺^[4]。

除了亲缘关系最近的拟短孢角毛藻和垂缘角毛藻外,短孢角毛藻与远距角毛藻(*C. distans* Cleve)及链刺角毛藻(*C. seiracanthus* Gran)也具有相似之处:细胞宽环面观呈矩形;壳面呈长椭圆形;色素体一个;窗孔花生形等。它们的区别特征有:(1)短孢角毛藻角毛上具有1行螺旋排列小刺及多行螺旋排列的孔纹,而远距角毛藻和链刺角毛藻角毛上分布有4~6排交替纵向排列的孔纹和小刺;(2)远距角毛藻休眠孢子低丘状,初生壳面凸起程度较次生壳高,壳面遍生长刺,次生壳面遍生短刺^[11];链刺角毛藻休眠孢子初生壳呈拱形,布满小刺,次生壳较小,呈圆形或头状,也布满小刺^[27];而短孢角毛藻休眠孢子初生壳面呈丘状突起,次生壳面只略微突起,壳面布满硅质化很重且长短不一的小刺,初生壳面边缘向壳面中央排列的小刺长度逐渐增加,小刺末端具有帽状结构,次生壳面长有不规则小刺,小刺上分布有碎片状或块状结构,末端未见帽状结构。

3.4 垂缘组角毛藻的系统学位置

垂缘角毛藻、短孢角毛藻和拟短孢角毛藻同属于垂缘组角毛藻^[2,10]。由分子系统树(图1)清晰显示,垂缘角毛藻、短孢角毛藻和拟短孢角毛藻聚在第四类群(Clade IV)的小分支上,而窄隙角毛藻(*C. affinis* Lauder)(第三类群 Clade III)和中肋角毛藻(*C. costatus* Pavillard)(第四类群 Clade IV)虽同属于窄环带组角毛藻^[2,10],却聚在不同的类群分支上,这样的划分结果显示垂缘组角毛藻是单起源的,而窄环带组角毛藻是多起源的,预示着角毛藻属存在修订和调整的可能。

参考文献

- [1] ROUND F E, CRAWFORD R M, MANN D G. Diatoms: Biology and Morphology of the Genera [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1990: 747-749.
- [2] HASLE G R, SYVERTSEN E E. Marine diatoms [M]// TOMAS C R. Identifying Marine Phytoplankton. London: Academic Press, 1997: 5-387.
- [3] RINES J E B, HARGRAVES P E. The *Chaetoceros* Ehrenberg (Bacillariophyceae) flora of Narragansett Bay, Rhode Island, U.S.A. [J]. *Bibl Phycol*, 1988, 79(3): 1-196.
- [4] JENSEN K G, MOESTRUP Ø. The genus *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) in inner Danish coastal waters [J]. *Opera Bot*, 1998, 18(1): 88.

- doi: 10.1111/j.1756-1051.1998.tb01103.x.
- [5] FRYXELL G A, HASLE G R. Taxonomy of harmful diatoms [M]// HALLEGRAEFF G M, ANDERSON D M, CEMBELLA A D. Manual on Harmful Marine Microalgae. 2nd ed. Paris, France: UNESCO Publishing, 2003: 465–510.
- [6] GUIRY M D, GURIY G M. AlgaeBase [EB/OL]. Galway: World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland. <http://www.algaebase.org>.
- [7] SCHÜTT F. Types of chaetoceros and peragallia: A contribution to the seas Flora [J]. Rep Ger Bot Soc, 1895, 13(4): 35–50.
- [8] CUPP E E. Marine Plankton Diatoms of the West Coast of North America, Vol. 5 [M]. UC San Diego: Scripps Institution of Oceanography, 1943: 1–237.
- [9] JIN D X, CHEN J H, HUANG K G. Marine Planktonic Diatoms from China Sea [M]. Shanghai: Science and Technology Press, 1965: 115–118. 金德祥, 陈金环, 黄凯歌. 中国海洋浮游硅藻类 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1965: 115–118.
- [10] HERNÁNDEZ-BECERRIL D U. A morphological study of *Chaetoceros* species (Bacillariophyta) from the plankton of the Pacific Ocean of Mexico [J]. Bull Nat Hist Mus Lond (Bot), 1996, 26(1): 1–73.
- [11] GUO Y J. Flora Algarum Marinarum Sinicarum, Tomus V. Bacillariophyta, No. 1 Centricae [M]. Beijing: Science Press, 2003: 345–346. 郭玉洁. 中国海藻志, 第 5 卷(硅藻门)第 1 册(中心纲) [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 344–346.
- [12] SUNESEN I, HERNÁNDEZ-BECERRIL D U, SAR E A. Marine diatoms from Buenos Aires coastal waters (Argentina): V. Species of the genus *Chaetoceros* [J]. Rev Biol Mar Oceanogr, 2008, 43(2): 303–326. doi: 10.4067/s0718-19572008000200009.
- [13] WANG Y, NIE R, Li Y, et al. Species diversity and geographical distribution of *Chaetoceros* in Guangdong coastal waters [J]. Adv Mar Sci, 2010, 28(3): 342–352. doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2010.03.010. 王艳, 聂瑞, 李扬, 等. 广东沿海角毛藻(*Chaetoceros*)的种类多样性及其地理分布 [J]. 海洋科学进展, 2010, 28(3): 342–352. doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2010.03.010.
- [14] PAVILLARD M J. Observations on the Diatomées [J]. Bull Soc Bot France, 1911, 58(1): 21–29. doi: 10.1080/00378941.1911.10831437.
- [15] GUILLARD R R L, HARGRAVES P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte [J]. Phycologia, 1993, 32(3): 234–236. doi: 10.2216/i0031-8884-32-3-234.1.
- [16] KOOISTRA W H C F, SARNO D, HERNÁNDEZ-BECERRIL D U, et al. Comparative molecular and morphological phylogenetic analyses of taxa in the Chaetocerotaceae (Bacillariophyta) [J]. Phycologia, 2010, 49(5): 471–500. doi: 10.2216/09-59.1.
- [17] CHENG Z D, GAO Y H, LIU S C. Nano-Diatoms in Fujian Coast [M]. Beijing: Ocean Press, 1993: 91–95. 程兆第, 高亚辉, 刘师成. 福建沿岸微型硅藻 [M]. 北京: 海洋出版社, 1993: 91–95.
- [18] LUNDHOLM N, DAUGBJERG N, MOESTRUP Ø. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA [J]. Eur J Phycol, 2002, 37(1): 115–134. doi: 10.1017/s096702620100347x.
- [19] SCHOLIN C A, HERZOG M, SOGIN M, et al. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae): II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene [J]. J Phycol, 1994, 30(6): 999–1011. doi: 10.1111/j.0022-3646.1994.00999.x.
- [20] NUNN G B, THEISEN B F, CHRISTENSEN B, et al. Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda [J]. J Mol Evol, 1996, 42(2): 211–223. doi: 10.1007/bf02198847.
- [21] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT [J]. Nucl Acid Symp Ser, 1999, 41(2): 95–98.
- [22] NYLANDER J A A. MrModeltest v2. Program [M/OL]. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004. <http://www.citeulike.org/user/mbutler808/article/7578084>.
- [23] MILLER M A, PFEIFFER W, SCHWART T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees [C]// Proceedings of 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA: IEEE, 2010: 8.
- [24] RONQUIST F, TESLENKO M, van der MARK P, et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. Syst Biol, 2012, 61(3): 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sys029.
- [25] HENDEY N I. An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters, Part V: Bacillariophyceae (Diatoms). MAFF Fishery Investigations, Series 4 [M]. London: Her Majesty's Stationery Office, 1964: 235–239.
- [26] HALLFORT G. Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species (Including Some Heterotrophic Protistan Groups) [M]. Helsinki: Helsinki Commission, Baltic Marine Environment Protection Commission, 2004: 121–123.
- [27] EVENSEN D L, HASLE G R. The morphology of some *Chaetoceros* (Bacillariophyceae) species as seen in the electron microscopes [J]. Nov Hed Beih, 1975, 53(4): 153–174.