

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.40518

张琪, 郑凌凌, 李天丽, 宋立荣. 具晶泡绿藻 (*Vacuoliviride crystalliferum*) ——分离自特殊生境的真眼点藻纲中国新纪录属种[J]. 植物科学学报, 2018, 36(4): 518-523

Zhang Q, Zheng LL, Li TL, Song LR. *Vacuoliviride crystalliferum* Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida, a new record of the genus and species of Eustigmatophyceae algae from a special habitat in China[J]. *Plant Science Journal*, 2018, 36(4): 518-523

具晶泡绿藻 (*Vacuoliviride crystalliferum*) ——分离自特殊生境的真眼点藻纲中国新纪录属种

张琪¹, 郑凌凌¹, 李天丽², 宋立荣^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院水生生物研究所, 中国科学院藻类生物学重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 从南京产白乳胶样品中分离和培养得到 1 株藻种, 编号为 FACHB-2245, 对其进行形态观察和 SSU 基因序列分析。结果显示, 该藻株为单细胞, 球状至椭球状, 细胞壁平滑。细胞具有 1 个大液泡、1 个红色球体和 1 个透明晶状结构以及许多折光颗粒。叶绿体周生, 1 至多个, 具膨大的蛋白核。结合形态和分子系统发育分析, 确定这株藻种为真眼点藻纲的具晶泡绿藻 (*Vacuoliviride crystalliferum* Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida)。该属种在我国是首次报道, 生活于白乳胶这一特殊生境。基于 SSU 序列的系统发育研究表明, 具晶泡绿藻藻株与真眼点藻纲中的角绿藻属 (*Goniocloris* Geitler)、粗盘藻属 (*Trachydiscus* Ettl) 和假十字趾藻属 (*Pseudostaurastrum* Chodat) 的亲缘关系密切, 位于这些类群的基部。

关键词: 真眼点藻纲; 具晶泡绿藻; 特殊生境; 新纪录; 中国

中图分类号: Q949.25

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)04-0518-06

Vacuoliviride crystalliferum Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida, a new record of the genus and species of Eustigmatophyceae algae from a special habitat in China

Zhang Qi¹, Zheng Ling-Ling¹, Li Tian-Li², Song Li-Rong^{1*}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: An algal strain sampled from Nanjing, Jiangsu Province, China, was isolated via vinyl acetate-ethylene emulsion and deposited at the Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology (FACHB-2245). The solitary spherical or ellipsoidal cells had a large vacuole, reddish globule, crystalline structure, and some refractile granules. The cells possessed one to several greenish parietal chloroplasts with a bulging pyrenoid. Based on morphological and molecular phylogenetic evidence, the strain was identified as eustigmatophycean species *Vacuoliviride crystalliferum* Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida. The species is considered as a new record of the genus and

收稿日期: 2017-11-03, 退修日期: 2017-12-21。

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-50); 中国科学院战略生物资源服务网络计划生物遗传资源库保藏能力建设专项(ZSSB-006)。

This work was supported by grants from the China Agriculture Research System (CARS-50) and Biological Resources Service Network Initiative, Chinese Academy of Sciences (ZSSB-006)。

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: zhangq@ihb.ac.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: lrsong@ihb.ac.cn)。

species in China. Phylogenetic analyses demonstrated that the strains of *V. crystalliferum* were clustered with *Goniochloris* Geitler, *Trachydiscus* Ettl, and *Pseudostaurastrum* Chodat.

Key words: Eustigmatophyceae; *Vacuoliviride crystalliferum*; Special habitat; New record; China

依据细胞学和超微结构特征, Hibberd 和 Leedale^[1, 2]将黄藻纲中一些种类划分出来, 重新建立了真眼点藻纲 (Eustigmatophyceae)。真眼点藻纲主要生活于池塘、沼泽、溪流、湖泊和海洋等水生生境以及土壤表面^[3, 4]。真眼点藻纲种类多数为单细胞, 球形或多角形, 具 1 个周生裂叶状或多个盘状叶绿体、1 个明显的蛋白核、1 个较大的液泡和 1 个红色球状体^[1, 5]。真眼点藻纲的色素组成与黄藻纲有所不同, 具有叶绿素 *a* 而不含叶绿素 *b* 和 *c*, 其主要的类胡萝卜素为苜蓿黄素 (Violaxanthin)^[6]。许多真眼点纲的藻类能够积累大量的油脂, 且富含二十碳五烯酸 (EPA) 等多不饱和脂肪酸, 在生产生物柴油和健康食品方面具有巨大潜力而备受关注^[7-9]。随着新种不断被发现, 科、属和种的数量都有所增加, 目前该纲已有 1 目 6 科 13 属 28 种^[3]。近年来, 在美国的一些淡水水体中分离到许多尚未被分类鉴定的真眼点藻纲种类, 其结果说明这一类群具有较高的多样性^[7, 10]。因此, 研究真眼点藻纲潜在的多样性对分类学和应用都具有重要价值。

2016 年, 我们在南京一家化工厂生产的白乳胶中发现了绿色漂浮物, 经过分离和培养确定这种绿色漂浮物是由藻类引起的。通过形态学初步观察, 确定该藻属于真眼点藻纲成员。经过测定该藻株的 SSU 序列, 构建系统发育树, 分析其系统发育位置, 并结合形态特点和系统发育研究, 进一步确定其分类位置, 发现其为真眼点藻纲的中国新纪录属种。

1 材料和方法

1.1 采集、分离和培养

本研究所用的藻株采集自白乳胶的绿色漂浮物。用毛细管吸取少量水样滴于载玻片上, 在显微镜下确认其中含有藻细胞后加适量培养基稀释, 反复吸取-镜检-稀释, 直到水滴中只含有单个目标藻种细胞, 再转移至含有 BG11 培养基的 96 孔板中静置培养。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。藻种采用 BG11 培养基培养^[11], 光暗周期为 12 h : 12 h, 光照强度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 培养温度 25℃。藻种保藏于中国科学院淡水藻种库 (FACHB-collection), 编号为 FACHB-2245。

1.2 形态观察

取少量新鲜藻细胞, 采用 Olympus BX53 型显微镜进行形态观察, 并用 Olympus DP80 型 CCD 采集图像。微分干涉和落射荧光照相方式都使用此套显微照相系统完成。数码拍照和数据测量通过显微镜附带的图像分析软件 cellSens Standard (v.1.14) 完成。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定

采用 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 方法提取基因组, 具体方法参见文献^[12]。用于 SSU rDNA 扩增和测序的引物为 18S-F (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') 和 18S-R (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG-3')^[13]。PCR 反应体系 50 μL : 25 ng 模板基因组 DNA, 10 \times 缓冲液 5 μL , 2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各 1 μL , *Taq* 酶 (TaKaRa Ex*Taq*) 1.25 U, 最后以灭菌双蒸水补足至终体积。SSU rDNA PCR 反应条件为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 1 min, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 1.5 min, 32 个循环; 72℃延伸 4 min。扩增产物用 Axygene 凝胶回收试剂盒纯化并送北京华大基因科技有限公司测序。序列提交至 NCBI, 获得 GenBank 号为 MG020123。

1.4 形态发育分析

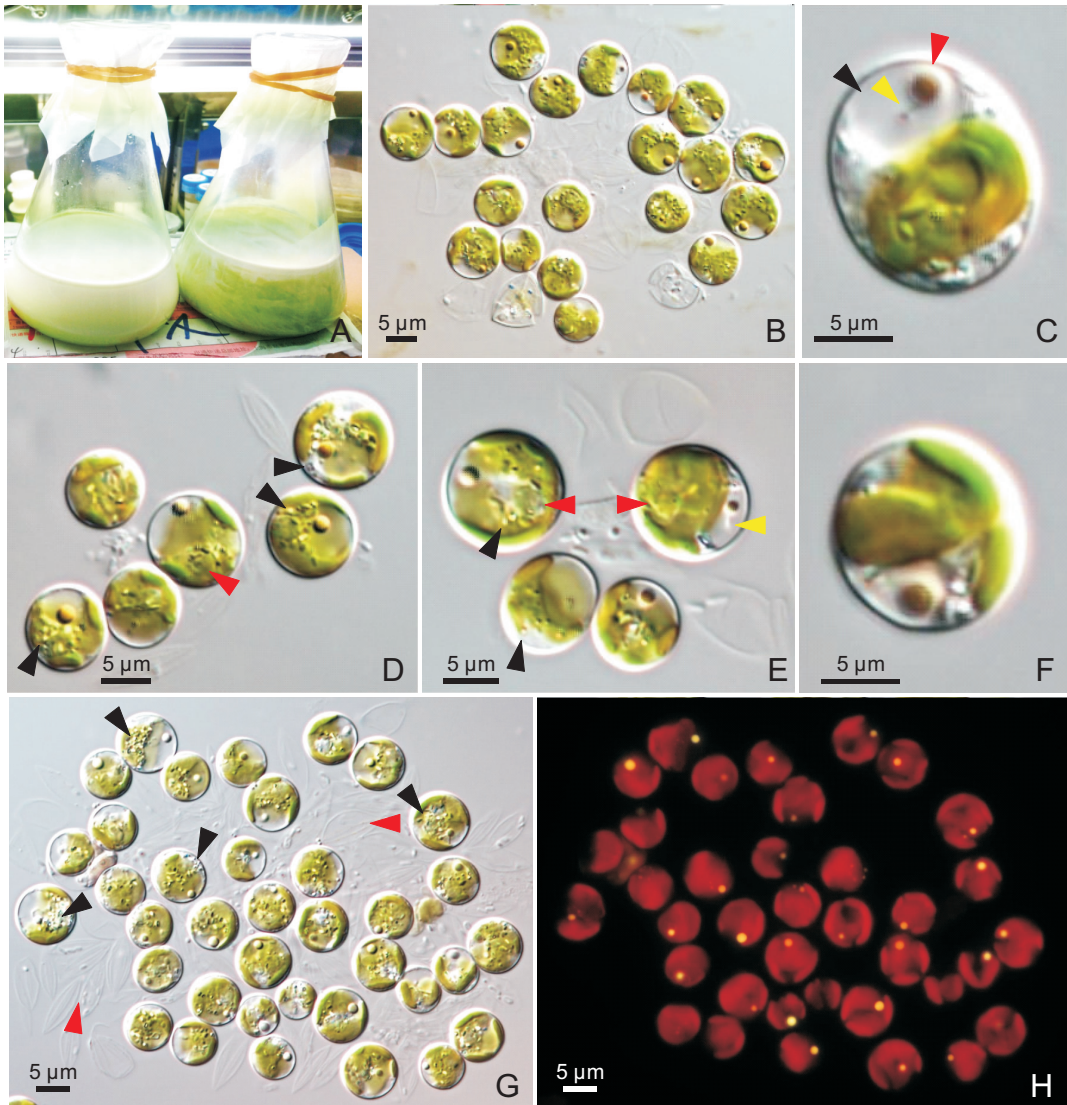
从 GenBank 上下载序列相似的真眼藻纲藻类序列, 利用 Clustal X (v.1.8) 对基因序列进行比对^[14], 辅以 Bioedit (v.7.0.9.1) 手工校正^[15]。分别使用最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 和贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 构建基于 SSU 序列的系统发育树。ML 树采用 RAxML (v.7.2.6) 软件完成^[16], BI 树采用 MrBayes (v.3.1.2) 软件完成^[17]。ML 树和贝叶斯树中替代

模型的选择采用 jModelTest (v. 2.1.5) 程序进行分析^[18], 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。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罗方法 (Markov chain Monte Carlo, MCMC) 设置 6 条链 (5 条热

链, 1 条冷链) 运行 1 000 000 次, 每运行 100 次获得一个进化树, 舍弃老化样本 burn in = 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
具晶泡绿藻 (图 1)



A: 分离自白乳胶的藻株; B~C: 营养细胞, 示大液泡 (黑箭头)、红色球体 (红箭头) 和晶状结构 (黄箭头); D, E: 营养细胞, 示折光颗粒 (黑箭头)、蛋白核 (红箭头) 和晶状结构 (黄箭头); F: 似亲孢子囊产生 2 个似亲孢子; G: 营养细胞, 示折光颗粒 (黑箭头) 和破裂的母细胞壁 (红箭头); H: 细胞的自发荧光, 示红色球体 (黄色) 和周生叶绿体 (红色)。
A: Strain isolated from vinyl acetate-ethylene emulsion; B~C: Vegetative cells showing large vacuole (black arrowhead), reddish globule (red arrowhead), and crystalline structure (yellow arrowhead); D, E: Vegetative cells showing refractile granules (black arrowhead), pyrenoids (red arrowhead), and crystalline structures (yellow arrowhead); F: Two autospores reproduced by an autosporangium; G: Vegetative cells showing refractile granules (black arrowhead) and ruptured cell walls with a slit (red arrowhead); H: Autofluorescence of cells showing reddish globules (yellow) and parietal chloroplasts (red).

图 1 具晶泡绿藻
Fig. 1 *Vacuoliviride crystalliferum*

Vacuoliviride crystalliferum Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida. *Journal of Plant Research*, 2015, 128: 249–257, fig. 1–3.

细胞单生, 球状至椭球状, 细胞壁薄、平滑, 无胶被。细胞具有1个大液泡和1个红色球体(1~3 μm) 以及许多折光颗粒, 通常具有杆状或“V”形的透明晶状结构(图1: C~E)。这种红色球体常在液泡内做布朗运动, 有时与透明结构相连。在年幼细胞中, 有时观察不到红色球体结构。荧光观察显示, 红色球体具有强烈黄色自发荧光, 而这种晶状结构观察不到自发荧光(图1: H)。在细胞质中, 具有许多折光颗粒。特别是在老细胞中, 这种折光颗粒更为明显(图1: D, E, G)。叶绿体1至多个, 有时呈不规则叶状, 具膨大蛋白核, 有时被折光颗粒包围, 因此常难以观察到(图1: D, E)。细胞以似亲孢子方式生殖, 产生2~8个似亲孢子。未观察到动孢子的存在。细胞直径8~16 μm (图1: B)。

该藻为淡水种类, 发现于化工厂白乳胶这一特殊生境中(图1: A)。在白乳胶中大量繁殖, 形成单一优势类群, 可附着在桶壁上, 也能在表面形成明显可见的绿色“水华”。此前, 仅在日本的类似生境中有报道。

2.2 序列和系统发育分析

经测序获得了该藻株的SSU序列片段, 序列长度为1693 bp。以 *Hibberdia magna* (M87331) 为外类群, 搜集其它真眼点藻纲类群的相同基因序列, 构建基于SSU序列的系统发育树。在SSU基因序列矩阵中, 含有21个长度为1703 bp的序列, 共有338个可变位点(Variable site), 其中有220个可供简约分析的信息位点(Parsimony-informative site)、118个单态位点(Singleton site)。A、T、C和G碱基的平均含量分别为26.0%、26.8%、20.1%和27.1%, 其中A+T含量(52.8%)略高于G+C含量(47.2%), 碱基转换/颠换值为1.44。我们所分离的藻株与GenBank中的 *Vacuoliviride crystalliferum* (LC004696) 相似性高达100%, 进一步验证了形态鉴定结果。

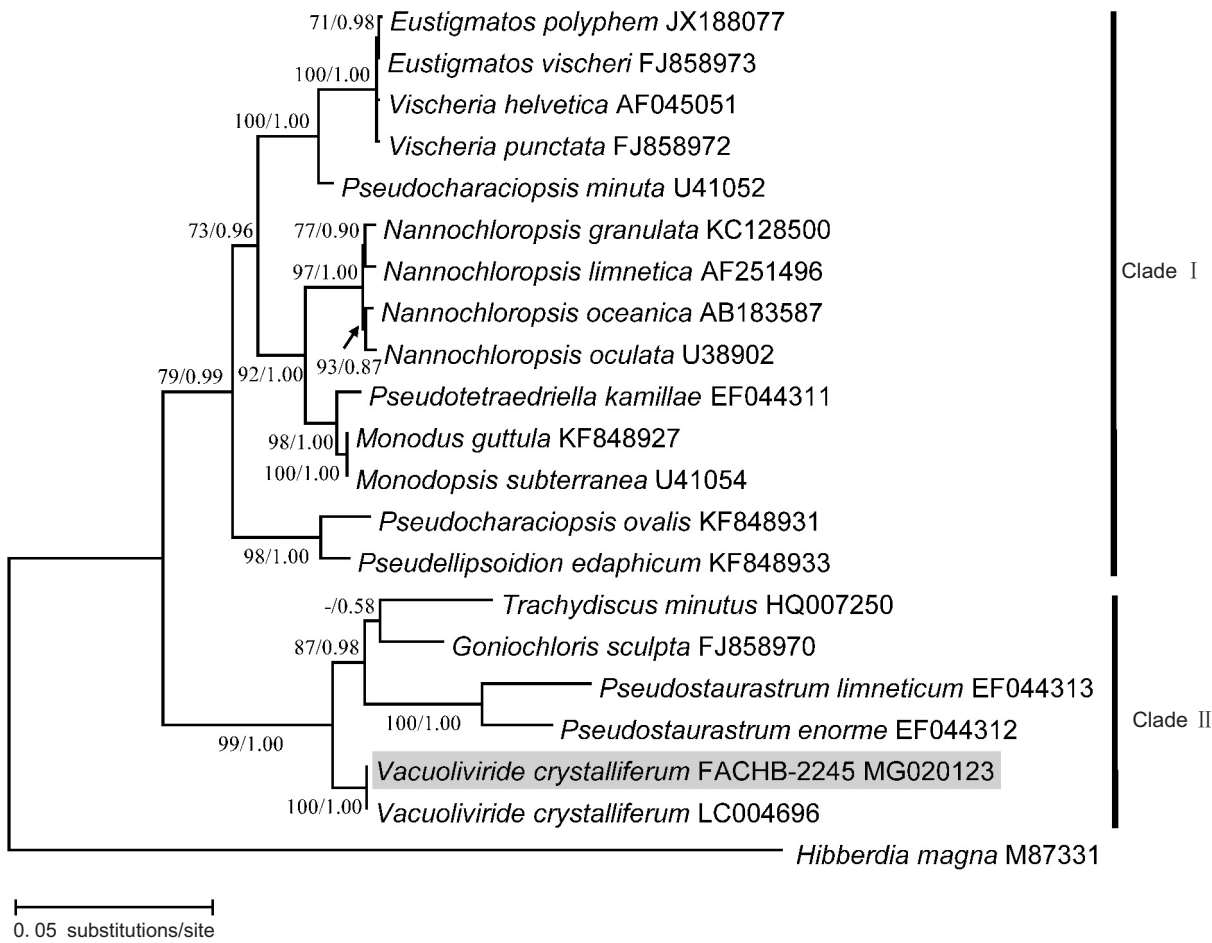
基于不同方法构建的SSU系统发育树均显示, 我们所分离的藻株与真眼点藻纲序列聚在一起。ML和贝叶斯系统发育树显示, 真眼点藻纲类群可

分成两个具有较高支持率的大分支, 分别为: 分支I (Clade I) (BP/PP = 79%/0.99); 分支II (Clade II) (BP/PP = 99%/1.00) (图2)。我们所分离的藻株位于分支II, 且以高度的支持值与 *V. crystalliferum* (LC004696) 聚在一起 (BP/PP = 100%/1.00) (图2)。在分支II中, *V. crystalliferum* 位于 *Trachydiscus minutus* (HQ007250)、*Goniochloris sculpta* (FJ858970)、*Pseudostaurastrum limneticum* (EF044313) 及 *P. enorme* (EF044312) 所形成的亚分支的基部。

3 讨论

Nakayama等^[19]于2002年分离获得了一株真眼点藻纲藻类, 经形态和系统发育分析, 认为这株藻应当属于新类群, 因此建立了泡绿藻属(*Vacuoliviride* Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida)。目前, 此属仅有1种, 即具晶泡绿藻(*V. crystalliferum* Nakayama, Nakamura, Yokoyama, Shiratori, Inouye & Ishida)。泡绿藻属具有真眼点藻纲的典型形态特征, 例如具折光颗粒、红色球体、无环带形的类囊体片层以及明显的蛋白核^[19]。尽管泡绿藻属与真眼点藻纲的真眼点藻属(*Eustigmatos* Hibberd)、假椭圆藻属(*Pseudellipsoidion* Neustupa & Němcová)、绿葡萄藻属(*Chlorobotrys* Bohlin)和拟葡绿藻属(*Botryochloropsis* Preisig & Wilhelm)形状和大小相似, 但泡绿藻属与这些类群间具有明显的形态差异。例如: 泡绿藻属细胞单生、不具胶被, 而绿葡萄藻属和拟葡绿藻属可形成群体且具胶被; 泡绿藻属具1个大液泡, 而假椭圆藻属和拟葡绿藻属不具大液泡; 泡绿藻属具1至多个叶绿体, 而真眼点藻属通常仅有1个周生叶绿体^[19–22]。细胞内透明晶状结构的存在被认为是具晶泡绿藻区别于其它真眼点藻纲种类的重要特征之一。这种晶状结构的尖端通常与红色球体(可能是脂类物质)相连, 因此推测这种结构可能与红色球体的形成有关^[19]。

与近年来真眼点藻纲的分子系统发育研究结果类似, 我们基于18S rDNA序列的系统发育研究表明, 真眼点藻纲类群也可分成两大分支, 即: 分支I (Clade I), 真眼点藻目分支(*Eustigmatales* clade); 分支II (Clade II), 角绿藻目分支(*Goniochloridales* clade)^[7, 23]。具晶泡绿藻与角



节点上的数字分别代表用最大似然法和贝叶斯法所得到当前分支的自展支持率 (BP) 和后验概率 (PP)。仅显示高于 50% 或 0.50 支持值。本研究所获序列用灰色框标记。

Numbers at nodes represent bootstrap support values (BP) / posterior probabilities (PP) from maximum likelihood and Bayesian inference. Only values above 50% or 0.50 for BP and PP are shown. Sequence obtained from our study is marked by gray square.

图 2 基于真眼点藻纲 SSU 序列构建的最大似然树

Fig. 2 Maximum likelihood phylogenies constructed from eustigmatophycean species based on small subunit ribosomal DNA (rDNA) sequences

绿藻属 (*Goniochloris* Geitler)、粗盘藻属 (*Trachydiscus* Ettl)、假十字趾藻属 (*Pseudostaurastrum* Chodat) 都位于分支 II，而具晶泡绿藻位于分支 II 的基部与这些属形成姐妹类群。具晶泡绿藻在形态上与分支 II 其它种类有所不同，例如：前者具有与分支 I 种类形态特征相似的膨大的蛋白核和光滑的细胞壁，而分支 II 其它种类通常无蛋白核和具有乳突状或角状等纹饰^[19, 23, 24]。这些形态差异进一步暗示了具晶泡绿藻具有一些真眼点藻的祖先特征，位于分支 II 的基部。

具晶泡绿藻最初是 Nakayama 等^[19]在日本清洁剂 (Clean glue) 胶水供应桶中被发现和分离的。我们在模式产地外首次发现了此物种，而且我们的藻株是在国内南京产的胶水中被发现和分离的。该

藻株在工厂的醋酸乙烯-乙烯共聚 (vinyl acetate-ethylene copolymer, VAE) 乳胶中快速生长形成单种藻落，大量附着在桶壁或漂浮在乳液表面。具晶泡绿藻能够生长在特殊的胶水生境中，但其对胶水环境的偏好或耐受的原因和机制仍不清楚，需要进一步研究。另外，Fukuda 等^[25]调查了近 190 种藻类和水生植物材料，从中发现具晶泡绿藻藻株表现出很强的去除放射性辐射的能力，在 2 d 培养过程中能够吸收培养基中 90% 的放射性¹³⁷Cs。目前，我们还不清楚具晶泡绿藻去除放射性辐射能力的内在原因以及国内分离的藻株是否也具有这种能力，有待进一步测试和研究。

参考文献：

[1] Hibberd DJ, Leedale GF. Eustigmatophyceae — a new

- algal class with unique organization of the motile cell[J]. *Nature*, 1970, 225: 758–760.
- [2] Hibberd DJ, Leedale GF. A new algal class: the eustigmatophyceae[J]. *Taxon*, 1971, 20(4): 523–526.
- [3] 高保燕, 张成武, 万凌琳, 李爱芬. 真眼点藻纲的系统分类、生物学特性及应用研究[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(5): 945–956.
- Gao BY, Zhang CW, Wan LL, Li AF. Systematics, biological characteristics and potential application of Eustigmatophyceae[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(5): 945–956.
- [4] Ott DW, Oldham-Ott GK. Eustigmatophyceae, Raphidophyceae, and Tribophyceae[M]// Wehr JD, Sheath RG, eds. *Freshwater Algae of North America Ecology and Classification*. Massachusetts: Academic Press, 2003: 421–427.
- [5] Hibberd DJ, Leedale GF. Observation on the cytology and ultrastructure of the new algal class, Eustigmatophyceae[J]. *Ann Bot*, 1972, 36(1): 49–71.
- [6] Whittle SJ, Casselton PJ. The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae[J]. *Br Phycol J*, 1975, 10(2): 179–191.
- [7] Fawley KP, Eliáš M, Fawley MW. The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade Goniochloridales[J]. *J Appl Phycol*, 2014, 26: 1773–1782.
- [8] Moazami N, Ashori A, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Nejad AS. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis* [J]. *Biomass Bioenergy*, 2012, 39: 449–453.
- [9] van Wagenen J, Miller TW, Hobbs S, Hook P, Crowe B, Huesemann M. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*[J]. *Energies*, 2012, 5(3): 731–740.
- [10] Prior SE, Fawley MW, Fawley KP. DNA sequence analysis of freshwater Eustigmatophyceae, a potential source of essential fatty acids[J]. *J Ark Acad Sci*, 2010, 63: 139–144.
- [11] Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M. Purification and properties of unicellular blue-green algae [J]. *Bacteriol Rev*, 1971, 35(2): 171–205.
- [12] Hillis DM, Moritz C, Mable BK. *Molecular Systematics* [M]. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1996: 665.
- [13] Katana A, Kwiatkowski J, Spalik K, Zakryś B, Szalacha E, Szymanska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA[J]. *J Phycol*, 2001, 37(3): 443–451.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [15] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41, 95–98.
- [16] Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(21): 2688–2690.
- [17] Huelsenbeck J, Ronquist F. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754–755.
- [18] Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(8): 772.
- [19] Nakayama T, Nakamura A, Yokoyama A, Shiratori T, Inouye I, Ishida K. Taxonomic study of a new eustigmatophycean alga, *Vacuoliviride crystalliferum* gen. et sp. nov [J]. *J Plant Res*, 2015, 128: 249–257.
- [20] Hibberd DJ. Observations on the cytology and ultrastructure of *Chlorobotrys regularis* (West) Bohlin with special reference to its position in the Eustigmatophyceae[J]. *Br Phycol J*, 1974, 9: 37–46.
- [21] Neustupa J, Němcová Y. Morphological and taxonomic study for three terrestrial eustigmatophycean species[J]. *Nova Hedwigia*, 2001, 123: 373–386.
- [22] Preisig HR, Wilhelm C. Ultrastructure, pigments and taxonomy of *Botryochloropsis similis* gen. et sp. nov (Eustigmatophyceae)[J]. *Phycologia*, 1989, 28: 61–69.
- [23] Přibyl P, Eliáš M, Cepák V, Lukavský J, Kaštánek P. Zoosporogenesis, morphology, ultrastructure, pigment composition, and phylogenetic position of *Trachydiscus minutus* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta) [J]. *J Phycol*, 2012, 48: 231–242.
- [24] Dashiell C, Bailey J. New observations on the biology of eustigmatophytes, with a description of *Microtalis* gen. nov. [J]. *J Phycol*, 2009, 45: 8.
- [25] Fukuda S, Iwamoto K, Atsumi M, Yokoyama A, Nakayama T, Ishida K, Inouye I, Shiraiwa Y. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy [J]. *J Plant Res*, 2014, 127: 79–89.