

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00020

串珠藻目植物的系统发育-基于 *rbcL* 序列的证据

李 强 吉 莉 谢树莲

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘要: 世界范围内报道的全部串珠藻目种类均生活于淡水中, 而在淡水红藻中, 70%约有 130 种属于串珠藻目。研究以目前获取的来自世界各大洲串珠藻目植物 43 种的 *rbcL* 基因序列, 结合其形态和生物地理特征, 构建了该目的系统发育关系, 以期探讨整个串珠藻目植物的系统发育关系及发生途径, 进而为研究该目以至淡水红藻的起源提供基本资料。运用 PAUP*4.0b10 和 Mr Bayes 3.0b4 等软件对 43 种串珠藻目植物的叶绿体 DNA *rbcL* 基因序列进行系统发育分析, 探讨了其主要分类群的系统演化关系。用最大简约法、邻接法和贝叶斯分析方法构建的系统树基本一致, 结果显示: (1)基于分子数据分析结果显示, 红索藻目植物均独立于串珠藻目植物, 构成一个单独的分支, 支持红索藻目的建立。(2)鱼子菜科属于串珠藻目植物中较为进化的类群。(3)串珠藻属扭曲组与杂生组的差异度较小, 结合其形态特点, 倾向于将杂生组并入扭曲组。(4)串珠藻科属于串珠藻目中最大的科, 包括较多的种类, 其系统关系也较为复杂。因此, 串珠藻科系统发育关系的明确有待于进一步结合更多的分子数据和形态学特征加以分析研究。

关键词: 串珠藻目; 系统发育; *rbcL*

中图分类号: Q941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0020-09

串珠藻目 (Batrachospermatales) 属红藻门 (Rhodophyta), 真红藻纲 (Florideophyceae), 由 Pueschel 和 Cole 建立于 1982 年^[1]。Pueschel 和 Cole 依据藻体细胞的纹孔结构(外层纹孔栓帽呈明显的拱形隆起, 磷钨酸-铬酸沉积法显色稳定)和生活史特点(缺乏四分孢子体时期), 将串珠藻科 (Batrachospermaceae)、鱼子菜科 (Lemaneaceae) 和红索藻科 (Thoreaceae) 从海索面目 (Nemalionales) 中分离出来, 独立建目。

1989 年, Entwistle 建立了裸管藻属 (*Psilosiphon*), 隶属于鱼子菜科 (Lemaneaceae)^[2]。该属的主要特征是藻体节与节间的分化不明显, 外皮层的内外细胞无明显的大小分化, 在外皮层和中轴间有密集的丝体充填, 主要通过外皮层上产生不定小体进行营养繁殖。Sheath, *et al.* 进一步对该属的形态特征包括超微结构进行了详细研究, 将其提升为裸管藻科 (*Psilosiphonaceae*), 仍隶属于串珠藻目^[3]。

然而, Harper & Saunders, Vis, *et al.*, Sheath & Müller 基于分子生物学研究的结果显示红索藻科的棘刺红索藻 *Thorea hispida* (Thore) Desvaux emend. Sheath, Vis & Cole 与串珠藻目的其他种类有区别^[4-6]。2002 年, Müller, *et al.* 做了进一步的研究, 并综合了之前一些文献的研究结果, 建立了红索藻目 (Thoreales)^[7], 并得到了有关学者的认同^[8,9]。

目前, 一般认为串珠藻目包括 3 科(串珠藻科、鱼子菜科和裸管藻科), 7 属(串珠藻属 *Batrachospermum*、连珠藻属 *Sirodotia*、假枝藻属 *Nothocladus*、托氏藻属 *Tuomeya*、鱼子菜属 *Lemanea*、拟鱼子菜属 *Paralemanea* 和裸管藻属 *Psilosiphon*)。2007 年, Vis, *et al.* 基于智利采的标本, 建立了一个新属 *Petrohua*, 将其隶属串珠藻目, 但没有进一步关于该属确切分类地位的报道^[10]。在串珠藻目中, 串珠藻属是最大的一个属, 种数较多, 先后有多位作者将该属划分为若干亚属和组, 但是他们的划分

收稿日期: 2008-05-19, 修订日期: 2009-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470118, 30270119)资助

作者简介: 李强(1983—), 男, 汉族, 山西离石人; 硕士研究生; 研究方向为藻类系统

通讯作者: 谢树莲, Tel: 0351-7018121; E-mail: xiesl@sxu.edu.cn

却不尽相同^[11]。

迄今, 世界范围内报道的全部串珠藻目种类均生活于淡水中, 而在淡水红藻中, 70%约有 130 种属于串珠藻目^[9]。所以, 该目在红藻门尤其是淡水红藻中占有极其重要的地位。自 18 世纪后期串珠藻目植物有记载以来, 有关这一类群系统分类方面的研究工作已有大量报道。然而, 这些工作大都停留在经典的形态分类水平上。近十年来, 随着分子生物学技术的应用^[12,13], 串珠藻目系统发育研究有了长足发展^[14]。

叶绿体中编码核酮糖 1, 5-二磷酸羧化酶/氧化酶大亚基的 *rbcL* 基因具有以下一些特点: 以单拷贝形式存在, 不发生基因转变; 长达 1.4 kb, 能提供较多的分子性状; 进化速率比较适于研究高等级类元间的系统关系。因此, 该基因序列在植物分子系统学研究中受到广泛重视。

本文以目前获取的来自世界各大洲串珠藻目植物 43 种的 *rbcL* 基因序列, 结合其形态和生物地理特征, 构建了该目的系统发育关系, 以期探讨整个串珠藻目植物的系统发育关系及发生途径, 进而为研究该目以至淡水红藻的起源提供基本资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为新鲜藻体, 样品采集后用硅胶干燥贮存, 回到实验室在解剖镜下挑除杂质及附生藻类。用于 DNA 分析的材料于 -20℃ 冰冻保存, 用于形态观察的标本保存于 4% 的福尔马林溶液中。凭证标本保存在山西大学植物标本馆(SXU)。样品产地等信息(表 1)。其他由基因库中下载以用于本文系统发育分析的相关序列(表 2)。

表 1 用于 *rbcL* 基因序列测定的样本及相关信息
Tab. 1 Samples used in the *rbcL* gene sequencing and their information

分类群 Taxon	采样地点 Locality	标本号 No. of specimen
鸭形串珠藻 <i>Batrachospermum anatinum</i> Sirodot	山西朔州河道泉 Hedao Spring, Shuozhou, Shanxi	SAS06035
弧形串珠藻 <i>Batrachospermum arcuatum</i> Kylin	山西太原难老泉 Nanlao Spring, Taiyuan, Shanxi	SAS07001
胶串珠藻 <i>Batrachospermum gelatinosum</i> (L.) DC	山西宁武汾河源头 Source of Fenhe River, Ningwu, Shanxi	SAS06128
洪洞串珠藻 <i>Batrachospermum hongdongense</i> Xie et Feng	山西洪洞广胜寺泉 Guangsheng Temple Spring, Hongtong, Shanxi	SAS06009
绞扭串珠藻 <i>Batrachospermum intortum</i> Jao	山西临汾龙子祠泉 Longzi Temple Spring, Linfen, Shanxi	SAS06020
长柄串珠藻 <i>Batrachospermum longipedicellatum</i> Hua et Shi	江苏徐州拔剑泉 Bajian Spring, Xuzhou, Jiangsu	JS2006003

1.2 实验方法

总 DNA 提取 采用 CTAB 法^[15]提取单个样品中的基因组总 DNA, 并做了部分修改。

引物的设计 扩增 *rbcL* 基因所用引物根据 Vis & Sheath 所设计, 具体序列为 F160: 5'CCT CAA CCA GGA GTA GAT CC 3'(引物 1)和 *rbcL* reverse: 5'ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC 3'(引物 2)^[16]。

PCR 扩增 扩增反应在美国 BIO-RAD 公司产 PCR 仪上进行。反应体积为 25 μL, 包括 0.5 μL DNA 模板, 2.5 μL 引物 1, 2.5 μL 引物 2, 2.0 μL dNTPs, 2.5 μL 10×buffer, 1.5 μL MgCl₂ 及 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(大连宝生物公司)。扩增程序为 94℃, 5min 预变性。循环温度 94℃, 1min; 60℃, 1min; 72℃, 2min; 35 个循环。最后 72℃ 延伸 6min。利用上海华

舜小量胶回收试剂盒纯化回收电泳获得的特异性扩增条带扩增产物。

序列测定 序列测定在 ABI 3730 DNA 自动测序仪(Applied Biosystems, USA)上完成。除了扩增引物 F160 外, 内部引物 SMS093R、SMS084F、SMS145R、SMS145F(大连宝生物公司合成)也用于测序。

1.3 数据分析

应用 Clustal X 1.83^[17]将所有序列进行比对, 经人工检查联配结果。核苷替代的饱和性分析使用 DAMBE4.1^[18]。运用 PAUP*4.0b10 进行数据信息量的检测^[19], 采用 g1 检测^[20]。应用 Modeltest 3.7 对联配结果进行模型选择^[21], 并估计相关参数。

表 2 由基因库中下载的用于本文分析的 *rbcL* 序列
Tab. 2 GenBank Accession numbers of downloaded *rbcL* sequences in this study

分类群 Taxon	基因库序列号 GenBank accession No.
<i>Batrachospermum ambiguum</i> Montagne	AY423391
<i>Batrachospermum antipodites</i> Entwisle et Foard	DQ523252
<i>Batrachospermum atrum</i> (Hudson) Harvey	AY297055
<i>Batrachospermum boryanum</i> Sirodot <i>emend. Vis et al.</i>	DQ393132
<i>Batrachospermum cayennense</i> Montagne	AY423394
<i>Batrachospermum confusum</i> (Bory) Hassal	DQ393133
<i>Batrachospermum deminutum</i> Entwisle et Foard	AF209981
<i>Batrachospermum discors</i> Entwisle et Foard	AF257778
<i>Batrachospermum gracillimum</i> West et West	AY423395
<i>Batrachospermum guyanense</i> (Montagne) Kumano	AY423396
<i>Batrachospermum heterocorticum</i> Sheath et Cole	DQ393136
<i>Batrachospermum involutum</i> Vis et Sheath	AF029143
<i>Batrachospermum kraftii</i> Entwisle et Foard	AY297057
<i>Batrachospermum louisianae</i> Skuja	AF029144
<i>Batrachospermum macrosporum</i> Montagne	AY460203
<i>Batrachospermum nodiflorum</i> Montagne	AY423399
<i>Batrachospermum sirodotii</i> Skuja ex Flint	BSU04036
<i>Batrachospermum</i> sp.	AY423423
<i>Batrachospermum spermatophorum</i> Vis et Sheath	AY424882
<i>Batrachospermum theaquum</i> Skuja ex Entwisle et Foard	AY297051
<i>Batrachospermum turfosum</i> Bory	DQ449028
<i>Batrachospermum virgato-decaisneanum</i> Sirodot	AF029148
<i>Batrachospermum wattsii</i> Entwisle et Foard	AF209986
<i>Lemanea borealis</i> Atkinson	AF029149
<i>Lemanea fluviatilis</i> (Linnaeus) Agardh	AF029150
<i>Lemanea fucina</i> (Bory) Atkinson var. <i>parva</i> Vis et Sheath	AF029151
<i>Nothocladus lindauri</i> Skuja	AF209987
<i>Nothocladus nodosus</i> Skuja	AF029152
<i>Paralemanea annulata</i> (Kützing) Vis et Sheath	DQ449029
<i>Paralemanea catenata</i> (Kützing) Vis et Sheath	AF029154
<i>Paralemanea grandis</i> (Wolle) Kumano	DQ523259
<i>Psilosiphon scoparum</i> Entwisle	AF029155
<i>Sirodotia delicatula</i> Skuja	DQ646478
<i>Sirodotia huillensis</i> (Welwitsch ex W et G. S. West) Skuja	AF126410
<i>Sirodotia suecica</i> Kylin	DQ523255
<i>Sirodotia tenuissima</i> (Collins) Skuja ex Flint	AF126420
<i>Tuomeya Americana</i> (Kützing) Papenfuss	DQ523253
<i>Balbiania investiens</i> Sirodot	AF132293
<i>Ballia callitricha</i> (Agardh) Kützing	AF149029
<i>Nemalionopsis shawii</i> Skuja	AB159658
<i>Nemalionopsis tortuosa</i> Yoneda et Yagi	AB159659
<i>Rhododraparnaldia oregonica</i> Sheath, Whittiek et Cole	AF029156
<i>Thorea gaudichaudii</i> Agardh	AB159651
<i>Thorea hispida</i> (Thore) Desvaux	AB159653
<i>Thorea okadae</i> Yamada	AB159655
<i>Thorea riekei</i> Bischoff	AB159656
<i>Thorea violacea</i> Bory	AB159657

使用 PAUP*4.0b10 和 MrBayes3.0 软件^[22]分别重建了系统发育树, 采用邻接(NJ)、最大简约(MP)和贝叶斯(Bayesian)^[23]3 种建树方法。邻接法分析使用由 Modeltest 3.7 得到的 Tamura & Nei 遗传距离^[24], 节点支持率使用 1000 次自展(Bootstrap, BP)检验。MP 分析采用启发式搜索的方式, 分支交换算法设定为 TBR 算法。MP 树的拓扑结构的节点支持由 1000 次重复的自展检验分析得到。贝叶斯分析时, 同时建立 4 条马尔科夫链, 其中 3 条热链, 1 条冷链; 以随机树为起始树, 共运算 1000000 代, 对每 1000 代进行 1 次抽样。然后根据对数似然值老化曲线, 动态抽样得到的前 100 棵树作为老化样本(Burn-in samples)舍弃。用剩余的 901 棵树构建多数合意树(Majority consensus tree, Bayesian tree), 该树每个节点的支持率(Bayesian support, BS)由该节点在 901 棵树中出现的百分率表示, 是该节点后验概率的近似值。同样的设置运行两次, 两次的结果相似表明马尔科夫链是收敛的, 可以相信 Bayesian 法的分析结果^[25, 26]。获得的系统树使用 Treeview 检视分析。

用于本研究的串珠藻目分类单位共计 43 个。选择 *Nemalionopsis*, *Thorea*, *Balbiania*, *Rhododraparnaldia* 和 *Ballia* 等 5 个属的 10 个种作为外类群(表 2)。

2 结 果

g1 检测在最大简约法范畴下进行, 参数设置为随机抽取 100000 棵树, 运算中根据树长(Tree length)将这些树分为 100 个等级(Class)。*rbcL* 数据集的 g1 值为 -0.512761, 表明该数据集含有系统发育信息 ($P < 0.01$)^[20], 可以用于系统发育分析。

通过 Clustal X 1.83 排序, 生成供系统发育分析的序列矩阵。比对结果显示, *rbcL* 基因序列长度为 1264 bp, 无插入或缺失, 其中 532 个位点为可变位点(占序列长度的 42.01%), 470 个位点为信息位点(占序列长度的 37.18%)。用 DAMBE 软件分析了密码子第三位点变异率, 为 82.04%, 第一、二位点的变异率为 18.51%。转换和颠换与 Tamura & Nei 遗传距离的线性相关关系显示这些位点没有突变饱和。Modeltest 3.7 分析结果表明, 对串珠藻目 *rbcL* 数据集最适合的 DNA 进化模型为 GTR+I+G, 并得到 11 个模型相关参数(表 3), 包括模型的似然值自然对数的负数(-lnL)、4 种碱基频率(f(A)、f(C)、f(G)、f(T))、碱基 X-Y 的 6 种替代模型(R X-Y)、gamma 分布的

形状参数(G)等。等级似然比检验的结果直接用于贝叶斯分析的显式模型设置。

基于 *rbcL* 基因, 运用最大简约法、邻接法和贝叶斯 3 种方法构建的串珠藻目植物的系统发育关系, 所得结果大致相同。本文将用贝叶斯法构建的 50 % 多数一致树(BI)作为分析用树(图 1)。分支节点处的数字表示邻接树(NJ)、多数一致简约树(MP)和贝叶斯树中对此节点的支持率, 枝长表示分歧度。不同方法获得的系统树的拓扑结构基本一致, 仅有少数分支不同。使用非参数检验方法, 分别对 3 种建树方法得到的多数一致树进行两两比较, 结果显示它们相互间均无显著差异($P < 0.05$), 其中贝叶斯树给出了很好的分辨率以及统计学支持。

表 3 Modeltest 3.7 检验得到的优化模型参数
Tab. 3 Nucleotide substitution model parameter estimates for Modeltest 3.7 analyses

Model selected	Base frequencies	Rate matrix
GTR + I + G		R(a) [A-C] = 2.0021
-lnL = 15654.0312	freqA = 0.4055	R(b) [A-G] = 6.5555
K = 10	freqC = 0.1099	R(c) [A-T] = 0.5449
AIC = 31530.9590	freqG = 0.1021	R(d) [C-G] = 2.7388
(I) = 0.5350	freqT = 0.3825	R(e) [C-T] = 13.0171
(G) = 0.7240		R(f) [G-T] = 1.0000

从图 1 可以看出, 除了外类群(Outgroup)外, 内类群分为两大支系, 其后验概率均为 0.99 和 1.00。MP、NJ 树也有相似的两大支系, 且每大支系的种类组成与 BI 相同, 只在个别分枝上有不同(图 2)。第一大支系包括串珠藻属的多芒组(Sect. *Aristata*)、扭曲组(Sect. *Contorta*)、杂生组(Sect. *Hybrida*)和沼生组(Sect. *Turfosa*), 在 MP、NJ 树中也有同样的支系, 不同之处在于裸管藻科(Psilosiphonaceae)的系统发育地位。第二大支系包括串珠藻属的串珠藻组(Sect. *Batrachospermum*)、连珠藻属(*Sirodotia*)、假枝藻属(*Nothocladus*)、托氏藻属(*Tuomeya*)、鱼子菜属(*Lemanea*)和拟鱼子菜属(*Paralemanea*)。由于 *B. gelatinosum* 属于种内变异较大的种, 甚至不同区域的该种种群之间差异可能达到 10%—15%, 因此该种在串珠藻目中的系统发育位置较难确定, 在 MP 中该种位于鱼子菜科和连珠藻属两个支系的基部, 而在 BI 中则位于连珠藻属支系的基部。与其他系统发育树相比, BI 对于裸管藻科(Psilosiphonaceae)、*B. spermatiophorum* 和 *B. discors* 的系统发育关系并没有得到很好的解决。

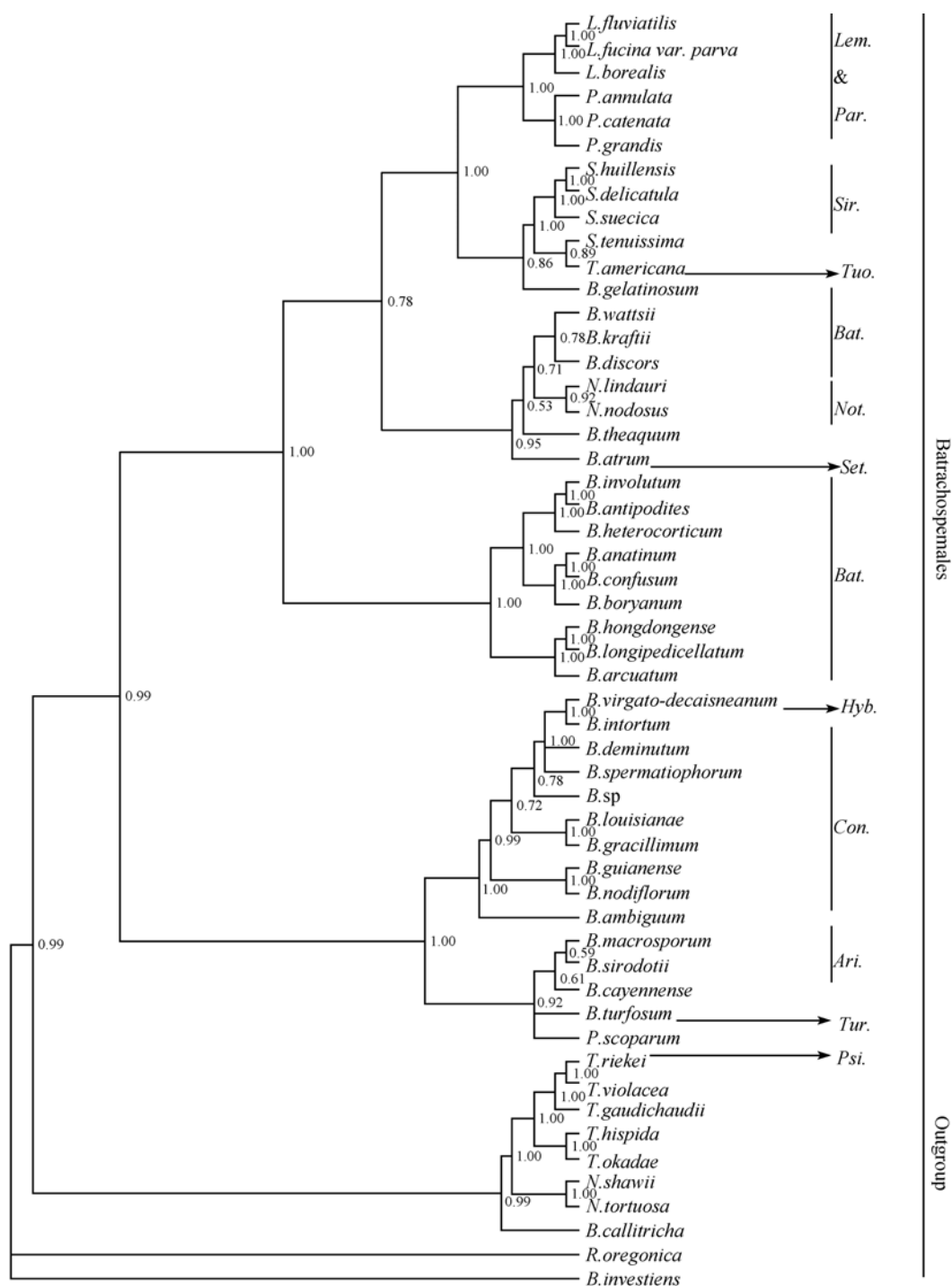


图 1 用Bayesian方法基于GTR + G+ I模型构建的50%多数一致树

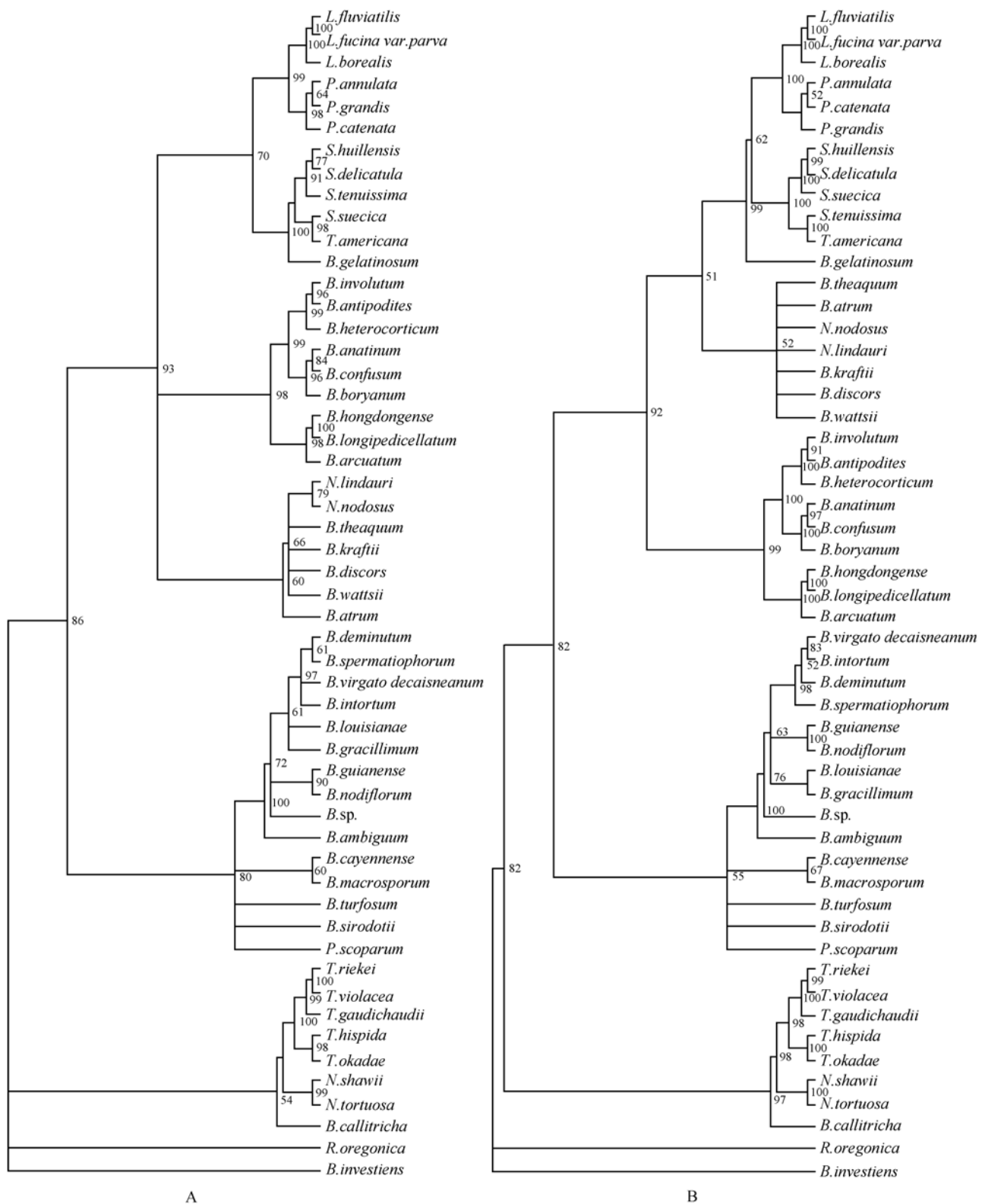
Fig. 1 Fifty percent majority-rule consensus tree derived from Bayesian analysis using GTR + G+ I

3 讨论

3.1 红索藻目与串珠藻目的系统关系

红索藻目是从串珠藻目中分离出来建立的^[7], 其主要形态特征是配子体为多轴型, 纹孔栓具双层帽, 外层帽呈平板状, 而串珠藻目则为配子体单

轴型, 纹孔栓具双层帽, 但外层帽呈拱形隆起。在本文数据分析得到的所有拓扑结构中, 所选红索藻目植物均独立于串珠藻目植物形成一个独立的分支, 并且有较好的统计学支持。本文的研究结果进一步支持了该目的建立, 也与此前的一些报道相一致^[4—6]。

图 2 基于 *rbcL* 基因序列的 NJ 树(A)和 MP 树(B)Fig. 2 NJ analysis and MP analysis based on sequences of *rbcL* gene

节点处数字代表 1000 次重复的 BP 分析得到的支持率(%), 支持率低于 50% 未显示(MP 树: 一致性指数(CI) = 0.282913, 同缘性指数(RI) = 0.601660)

The numbers at the node represent bootstrap support of 1000 replicates, and those below fifty percent are not shown

3.2 串珠藻目植物的系统关系

3 种分析方法所得到的系统发育树均显示, 鱼子菜科是串珠藻目植物中较为进化的类群。从图 1 和图 2 可以看出, 属于该科两个属(鱼子菜属和拟鱼子菜属)的种类各自聚为一支, 且这两支互为姐妹群, 构成鱼子菜科。谢树莲基于形态学特征对串珠藻目植物的系统发育进行了研究报道, 其研究结果表明鱼子菜科属于串珠藻目植物中较为进化的一支^[27]。本文的研究结果也印证了这一点。

裸管藻科是串珠藻目植物中的一个单属单种科, 通过分子数据确定其系统发生地位的结果需谨慎对待。谢树莲报道, 该科与鱼子菜科同为串珠藻目植物中较进化的科^[27]。从本文的分子数据分析结果看, 该科与串珠藻属的多芒组和沼生组聚为一支, 在进化程度上也较原始, 与形态学分析结果不一致。假设基于分子数据的分析结果成立, 则该种存在异种起源的可能性。因此, 关于裸管藻科植物系统发育地位的研究有待进一步通过其他分子数据和形态学特征加以论证。

串珠藻科是该目最大的科, 包括较多的种类, 因此其系统关系也较为复杂。

3.3 串珠藻科植物的系统关系

由 3 种方法分析的结果可以看出, 连珠藻属的种类聚在一起, 且与托氏藻属互为姐妹群, 并有较好的统计学支持, 表明两个属关系较近, 相对来说也比较进化。但两属的形态特征具有明显区别, 连珠藻属的种类没有定形的果孢子体, 而托氏藻属有。考虑到托氏藻属是一单种属, 其系统发育的地位也还需要更多的分子数据进一步论证。假枝藻属的两个种聚为一支, 与其互为姐妹群的是串珠藻属的若干种类, 但从图 1 和图 2 也可以看出, 假枝藻属与连珠藻属和托氏藻属同在一个大的分支上, 与大多数串珠藻属植物相分离。这一结果也与形态学研究结果相一致^[27]。至于串珠藻属, 由于其包括较多的种类, 因而其系统关系也较复杂。

3.4 串珠藻属植物的系统关系

在图 1 第一大分支(Clade I)中, 属于杂生组(Sect. *Hybrida*)和扭曲组(Sect. *Contorta*)的种类构成一支。谢树莲关于扭曲组的果胞枝有如下的描述: 大多发生于初生枝基部, 少有例外的, 均呈明显的弯曲、扭曲或螺旋状, 程度不等; 杂生组的果胞枝: 发生于初生枝基部, 较短, 直立或略弯曲^[27]。从形

态学观察的结果看, 杂生组的种类果胞枝或多或少有些弯曲或扭曲。因此, 本文的研究结果倾向于将杂生组归入扭曲组。

从研究结果看, 多芒组(Sect. *Aristata*)和沼生组(Sect. *Turfosa*)的种类聚为一支, 但两组包含的种类都不多, 沼生组只 1 种, 所以, 两组系统关系的确定还需要更多的生物学证据。

串珠藻组(Sect. *Batrachospermum*)是串珠藻属中最大的一个组, 包含的种类多, 且分布广泛。因此, 其系统发育关系较为复杂。就本文的分析结果来看, 该组并非单系起源。这一结果也与 Müller, *et al.* 的报道相一致^[7]。Vis, *et al.* 通过 18S rDNA 对串珠藻组的系统发育关系进行过研究报道, 认为该组的分类地位尚难确定^[5]。

B. gelatinosum 是串珠藻目植物中分布最广、变异最大的种, 该种与其他种类的系统关系也较难确定。Vis, *et al.* 的研究表明, 该种在各大洲的变异较大, 采自大洋洲的样本与其他洲样本的碱基差异度超过 10%, 就大洋洲本土的样本, 也有较大的差异(49 bp, 3.8%)。因此, 作者认为该种属于串珠藻组中较为进化的种类^[28]。本文中采自中国的 *B. intortum* 属于扭曲组(Sect. *Contorta*), *B. longipedicellatum*、*B. hongdongense*、*B. anatinum* 和 *B. arcuatum* 属于串珠藻组(Sect. *Batrachospermum*), 在研究结果中均有较高的统计学支持。

参考文献:

- [1] Pueschel C M, Cole K M. Rhodophycean pit plugs: an ultrastructural survey with taxonomic implications [J]. *Amer J Bot*, 1982, **16**: 703—720
- [2] Entwisle T J. *Psilosiphon scoparium* gen. et sp. nov. (Lemaneaceae, Rhodophyta): a new red alga from eastern Australian streams [J]. *Phycologia*, 1989, **28**: 469—475
- [3] Sheath R G, Müller K M, Vis M L, *et al.* A re-examination of the morphology, ultrastructure and classification of genera in the Lemaneaceae (Batrachospermales, Rhodophyta) [J]. *Phycol Res*, 1996, **44**: 233—246
- [4] Harper J T, Saunders G W. A molecular systematic investigation of the Acrochaetiales (Florideophycidae, Rhodophyta) and related taxa based on nuclear small-subunit ribosomal DNA sequence data [J]. *Eur J Phycol*, 1998, **33**: 221—229
- [5] Vis M L, Saunders G W, Sheath R G, *et al.* Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal DNA gene sequences [J]. *J Phycol*, 1998, **34**: 341—350

- [6] Sheath R G, Müller K M. Systematic and phylogenetic relationships of the freshwater genus *Balbiania* (Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 1999, **35**: 855—864
- [7] Müller K M, Sherwood A R, Pueschel C M, *et al.* A proposal for a new red algal order, the Thoreaales [J]. *J Phycol*, 2002, **38**: 807—820
- [8] Maggs C A. Yet another new red algal order [J]. *J Phycol*, 2002, **38**: 619—620
- [9] Kumano S. Freshwater Red Algae of the World [M]. Bristol: Biopress Limited. 2002, 375
- [10] Vis M L, Harper J T, Saunders G W. Large subunit rDNA gene sequence data place *Petrohia bernabei* gen. et sp. nov. in the Batrachospermales (Rhodophyta), but do not provide further resolution among taxa in this order [J]. *Phycol Res*, 2007, **55**: 103—112
- [11] Xie S L, Yao G. Change and development of the classification systems of Batrachospermaceae (Rhodophyta) and evaluation of its main characteristics [J]. *World Sci-Tech R & D*, 2006, **28**: 33—39 [谢树莲, 姚戈. 串珠藻科分类系统述评及主要分类特征的评价. 世界科技研究与发展, 2006, **28**: 33—39]
- [12] Mei H, Liu G X, Hu Z Y. Phylogenetic studies of Oedogoniales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on 28S rDNA sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **31**: 492—498 [梅洪, 刘国祥, 胡征宇. 基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育研究. 水生生物学报, 2004, **31**: 492—498]
- [13] Chen J, Zheng W W, Song T Y, *et al.* The genetic diversity of *Anabaena* based on PARD analysis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**: 531—534 [陈坚, 郑伟文, 宋铁英, 等. 满江红鱼腥藻遗传多样性的 RAPD 分析. 水生生物学报, 2001, **25**: 531—534]
- [14] Yao G, Xie S L. Progress in molecular systematics of Batrachospermales [J]. *Chinese Bull. Bot*, 2007, **24**: 141—146 [姚戈, 谢树莲. 串珠藻目分子系统学研究进展. 植物学通报, 2007, **24**: 141—146]
- [15] Hillis D M, Moritz C M, Mable B K. Molecular systematics (2nd edition) [M]. Massachusetts: Sinauer Sunderland. 1996, 655
- [16] Vis M L, Sheath R G. A molecular investigation of the systematic relationships of *Sirodotia* species (Batrachospermales, Rhodophyta) in North America [J]. *Phycologia*, 1999, **38**: 261—266
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *J Nucleic Acid Res*, 1997, **24**: 4876—4882
- [18] Xia X. Data analysis in molecular biology and evolution [M]. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2000
- [19] Swofford D L. PAUP*4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), beta version 4 [CP]. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 1998
- [20] Hillis D M, Huelsenbeck J P. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses [J]. *J Heredity*, 1992, **83**: 189—195
- [21] Posada D, Buckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests [J]. *J Syst Biol*, 2004, **53**: 793—808
- [22] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *J Bioinformatics*, 2003, **19**: 1572—1574
- [23] Rannala B, Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference [J]. *J Molecular Evolution*, 1996, **43**: 304—311
- [24] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. *Mol Biol Evol*, 1993, **10**: 512—516
- [25] Steiper M E, Ruvolo M. New world monkey phylogeny based on X-linked G6PD DNA sequences [J]. *Mol Phylog Evol*, 2003, **27**: 121—130
- [26] Geuten K, Smets E, Schols P, *et al.* Conflicting phylogenies of balsaminoid families and the polytomy in Ericales: combining data in a Bayesian framework [J]. *Mol Phylog Evol*, 2004, **31**: 711—729
- [27] Xie S L. Phylogenetic analysis on the Batrachospermales (Rhodophyta) based on morphological data [J]. *J Shanx Univ (Nat Sci Ed)*, 2007, **30**: 245—250 [谢树莲. 串珠藻目(红藻门)基于形态学证据的系统发育分析. 山西大学学报(自然科学版), 2007, **30**: 245—250]
- [28] Vis M L, Entwistle T J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales from *rbcL* sequence data of Australian taxa [J]. *J Phycol*, 2000, **36**: 1175—1182

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BATRACHOSPERMALES (FLORIDEOPHYCEAE, RHODOPHYTA) BASED ON CHLOROPLAST *rbcl* SEQUENCES

LI Qiang, JI Li and XIE Shu-Lian

(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract: Batrachospermales is an order belonging to Florideophyceae, Rhodophyta. It distributes all over the world, China and its adjacent regions are the distribution center. Since Batrachospermales has been reported, the studies about the order were mainly focused on their morphological characters and its flora. But the phylogenetic relationship between taxa of Batrachospermales was still hard to guarantee in terms of morphology. Chloroplast *rbcl* sequences from 43 species of Batrachospermales and their relative lineages were used to reconstruct the phylogenetic trees by using the PAUP* 4.0 b10 and Mr Bayes 3.0 b4 software, which contained 6 samples collected from China and 37 species abroad obtained from GenBank. The phylogenetic relationships were inferred using the neighbor-joining, maximum-parsimony and Bayesian analysis, and three methods produced trees with largely congruent topology. These trees revealed that: (1) Three kinds of phylogenetic trees based on *rbcl* sequences were consistent. All phylogenetic trees topology got a similar placement of Thoreales, which formed a monophyletic group with high bootstrap support (100%). According to the Bayesian analysis, the conclusion supported that the Thoreales should be classified as a separate order. Thoreales were distinguished from Batrachospermales based on having freshwater representatives with multiaxial gametophytes, a uniaxial chantransia stage, and pit plugs with two cap layers, the outer one of which was usually plate-like. (2) All phylogenetic trees, got from the three methods (MP, NJ and Bayesian), showed that the Lemaneaceae was a relatively evolutionary group in Batrachospermales. Two genera (*Lemanea* and *Paralemanea*), which belonged to family Lemaneaceae, formed new branches respectively, both of which were sister group. (3) In all trees, the taxa of *Sirodotia* and *Tuomeya* clearly formed a monophyletic clade with a strong bootstrap support, showed that they were relatively evolutionary group in Batrachospermales. The two species of the *Nothocladus* were closely related to each other and formed a sister clade with *Tuomeya* and *Sirodotia* of *Batrachospermum*, which separated from the clade including most taxon of the *Batrachospermum*. This result accorded with the morphologic study. (4) In *Batrachospermum*, Sect. *Hybrida* and Sect. *Contorta* had a relatively small sequence divergence. From the observational results of morphology, carpogonial branches of Sect. *Contorta* had distortion or twist more or less. So, the research result of this study was inclined to combine Sect. *Hybrida* as Sect. *Contorta*. (5) Batrachospermaceae was the largest family of Batrachospermales, contained many species and distributes broadly. So the phylogenetic relationship was more complex. Thereby, further molecular and morphological investigations are needed to determine the phylogentic position of the Batrachospermaceae.

Key words: Batrachospermales; Phylogenetic analysis; *rbcl*