

doi: 10.7541/2015.20

基于叶绿体 *psaA* 和 *psbA* 基因的中国熊野藻属植物系统发育分析

南芳茹 冯 佳 谢树莲

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要: 以中国产熊野藻属 *Kumanoa* 的两个种, 绞扭熊野藻 *K. intorta* (=绞扭串珠藻 *Batrachospermum intortum*), 弯形熊野藻 *K. curvata* (=弯形串珠藻 *B. curvatum*) 和其他 6 种淡水红藻为实验材料, 对其 *psaA* 和 *psbA* 基因进行扩增和测序, 并与 GenBank 中相近序列进行比对分析, 以贝叶斯法、最大似然法和邻接法分别构建了单基因和联合基因系统发育树。结果表明, 3 种方法构建的系统树具有相似的拓扑结构, 反映的系统发育关系基本一致, 熊野藻属中的两个种聚为一支, 与串珠藻属相分离, 支持该属的建立; 中国产的熊野藻属分子学研究结果与来自南美洲及澳洲的该属植物结果一致, 说明该属的建立具有广泛的地理适用性。系统发育树聚类结果也明确反映了熊野藻属与串珠藻属较近的亲缘关系, 根据果胞枝形态特点, 推测熊野藻属进化地位晚于串珠藻属植物, 而早于顶丝藻目和红索藻目。此外, 胶串珠藻与其他串珠藻植物分离, 支持将其单独分组, 红索藻目植物与串珠藻目植物分离, 支持红索藻目的建立。同时也表明 *psaA* 和 *psbA* 基因用于淡水红藻分析, 能够较好地反映其系统发育关系。

关键词: 熊野藻属; *psaA*; *psbA*; 系统发育

中图分类号: Q941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)01-0155-09

熊野藻属 *Kumanoa* 是 2009 年由 Entwistle 等^[1]将原来隶属于串珠藻属 *Batrachospermum* 的扭曲组 Section *Contorta* 和杂生组 Section *Hybrida* 分离出来而建立的一个较新的属。扭曲组是串珠藻属中种类最多的一组^[2], 其主要形态特征是果胞枝明显弯曲、扭曲或螺旋状, 杂生组的果胞枝则略弯曲, 两者最主要的区别是果胞枝的弯曲程度, 在实际观察中, 有时很难将两组区分开来^[3, 4]。1998 年, Vis 等^[5]采用 *rbcL* 和 SSU 序列研究了串珠藻目的系统发育关系, 结果显示扭曲组的 *B. louisianae* 和杂生组的 *B. virgatodecaisneanum* 聚为一支, 可能有较近的亲缘关系, 建议将两组合并, 其主要特征是具有弯曲的果胞枝。2000 年, Vis 和 Entwistle^[6]基于分子数据研究了产于澳大利亚的 13 种串珠藻, 同样表明扭曲组和杂生组有较近的亲缘关系, 提议将杂生组并入扭曲组。2005 年, Vis 等^[7]研究了采自法属圭亚那的扭曲组中 5 个样本, 得到的结果也显示该组能很好地聚

为一支。2010 年, 李强等^[8]基于 *rbcL* 序列研究了串珠藻目 Batrachospermales 植物的系统发育, 结果表明扭曲组与杂生组的差异度较小, 结合其形态学特点, 也倾向于将杂生组并入扭曲组。2012 年, Vis 等^[9]对熊野藻属的种类进行了界定, 承认该属的 31 个种, 同时否认了原先扭曲组组内的分类标准。

虽然熊野藻已作为单独的属被建立, 但由于研究样本有限, 所测基因序列还较少, 分子生物学数据尚显不足, 使该属内的有关分类标准还比较模糊, 与其他属的亲缘关系还不很明确, 其系统进化地位仍然有待研究。

我国目前尚未对熊野属 *Kumanoa* 植物进行专门研究, 对串珠藻属扭曲组 Sect. *Contorta* 和杂生组 Sect. *Hybrida* 植物也大都停留在传统形态学描述阶段。1941 年, 饶钦止^[10]对我国该属植物进行了首次报道, 即绞扭串珠藻 *B. intortum* Jao, 属于串珠藻属扭曲组 Sect. *Contorta*。之后施之新、谢树莲等^[11-14]

收稿日期: 2014-01-28; 修订日期: 2014-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200164, 31370239)资助

作者简介: 南芳茹(1990—), 女, 山西人; 博士研究生; 主要从事淡水藻类系统分类方面的研究。E-mail: 616387189@qq.com

通信作者: 谢树莲, E-mail: xiesl@sxu.edu.cn

陆续报道了扭曲串珠藻 *B. torsivum* Shi、阿比串珠藻 *B. abili* Reis、马赫拉串珠藻 *B. mahlacense* Kumano & Bowdenkerby、可疑串珠藻 *B. ambiguum* Montagne、诺诺串珠藻 *B. nonocense* Kumano & Liao、钏路串珠藻 *B. kushiroense* Kumano et Ohsaki、假枝藻状串珠藻 *B. nothocladoideus* S. L. Xie et Z. X. Shi 和过渡串珠藻 *B. transitorium* S. L. Xie et Z. X. Shi。迄今, 我国已报道的串珠藻属扭曲组 Sect. *Contorta* 和杂生组 Sect. *Hybrida* 种类共 10 种, 其中 5 个为我国特有种, 其余为稀有种^[15]。然而, 在我国应用分子生物学方法对熊野属 *Kumanoa* 进行研究还鲜有报道。

psaA 和 *psbA* 基因是叶绿体内编码光合反应有关蛋白的基因, *psaA* 基因编码光反应系统中心色素 P700 结合蛋白 A1, *psbA* 基因编码光反应系统 II 类囊体蛋白 D1, 在光合系统中心反应中都具有重要作用。有研究表明它们在分析藻类系统进化中可以提供较好的信息^[16]。王亚楠等^[17]也采用 *psaA* 和 *psbA* 基因研究了红索藻目植物的系统发育关系, 进一步证明了两个基因用作分子标记的可行性。但是, 基于

psaA 和 *psbA* 基因的淡水红藻分子生物学研究还鲜有报道, 尤其在串珠藻目中还缺乏相关序列信息。

本研究以采于中国的熊野藻属和其他淡水红藻共 8 个种为实验材料, 通过测定其 *psaA* 和 *psbA* 基因序列, 并与 GenBank 中相关序列比对分析, 构建系统发育树, 以期熊野藻属的确立及与近缘属的系统发育关系分析提供更多的分子生物学证据, 同时为中国范围及至亚洲区域内的熊野藻属植物提供相关数据, 填补该领域的研究不足。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料采集地和标本号见表 1。各材料分别代表其所属的分类单位, 以其讨论各类群的系统发育关系。样品采集后清洗去除杂质, 在解剖镜下挑除附着藻类。用于 DNA 分析的材料用硅胶干燥保存于 -20℃ 冰箱, 用于形态观察的样本保存于体积浓度为 4% 的福尔马林溶液中, 凭证标本保存于山西大学植物标本馆(SXU)。

表 1 实验材料采集地和标本号
Tab. 1 Locality and voucher specimen number of samples in this study

属名 Genus name	分类单位 Taxon	采集地点 Locality	采集时间 Collection data	采集人 Collector	标本号 No. of specimen
奥杜藻属 <i>Audouinella</i>	中华奥杜藻 <i>Audouinella sinensis</i>	山西平定县娘子关水帘洞 Shuiliandong Spring, Pingding, Shanxi	2006.3.6	姚戈	SAS06020
串珠藻属 <i>Batrachospermum</i>	弧形串珠藻 <i>Batrachospermum arcuatum</i>	山西太原市晋祠难老泉 Nanlao Spring, Taiyuan, Shanxi	2006.3.6	姚戈	SAS06128
串珠藻属 <i>Batrachospermum</i>	胶串珠藻 <i>B. gelatinosum</i>	山西宁武县汾河正源 Fenhe Spring, Ningwu, Shanxi	2006.8.16	姚戈	SAS06009
串珠藻属 <i>Batrachospermum</i>	洪洞串珠藻 <i>B. hongdongense</i>	山西洪洞县广胜寺 Guangsheng Temple Spring, Hongtong, Shanxi	2006.4.4	姚戈, 张猛	SAS06009
串珠藻属 <i>Batrachospermum</i>	长柄串珠藻 <i>B. longipedicellatum</i>	山西太原市晋祠难老泉 Nanlao Spring, Taiyuan, Shanxi	2006.3.6	姚戈	SAS07001
熊野藻属 <i>Kumanoa</i>	绞扭熊野藻 <i>Kumanoa intorta</i> (=绞扭串珠藻 <i>B. intortum</i>)	江苏徐州市拔剑泉 Bajian Spring, Xuzhou, Jiangsu	2006.4.25	冯佳, 姚戈	SAS06020
熊野藻属 <i>Kumanoa</i>	弯形熊野藻 <i>K. curvata</i> (=弯形串珠藻 <i>B. curvatum</i>)	湖北当阳玉泉寺珍珠泉 Zhenzhu Spring, Dangyang, Hubei	2008.4.21	陈乐, 李强	HP08003
红索藻属 <i>Thorea</i>	棘刺红索藻 <i>Thorea hispida</i>	山西平定县娘子关平阳湖 Pingyang Lake, Pingding, Shanxi	2009.3.8	冯佳	SAS09009

1.2 方法

总 DNA 提取 取一定量硅胶干燥保存的藻体, 置于液氮中研磨, 使用小量植物组织 DNA 抽提试剂盒(Watson Biotechnologies, Inc), 按照使用说明进行 DNA 提取。

目的片段扩增 查阅相关文献[18], 确定 *psaA* 引物序列为 *psaA*130F: 5'-AACWACWACTTG GATTTGGAA-3' (正向引物)和 *psaA*930R: 5'-CCCA ATTAGTTCTATACATRT-3'(反向引物)。*psbA* 引物序列为 *psbA*-F: 5'-ATGACTGCTACTTTAGAAAGACG-3'

(正向引物)和 *psbA*-R2: 5'-TCATGCATWACTTCC ATACCTA-3'(反向引物)。PCR 反应在 MyCycler Thermal Cycler (BIO-RAD, USA) 中进行。反应体系为 25 μ L, 包括 1 μ L DNA 模板, 正向和反向引物各 2 μ L, 2 μ L dNTPs, 2 μ L 10 $\times$ buffer (Mg^{2+}) 及 0.2 μ L *Taq* DNA 聚合酶(大连宝生物公司 TaKaRa)。 *psaA* 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C, 6min 预变性; 循环温度 94 $^{\circ}$ C, 20s; 52 $^{\circ}$ C, 35s; 72 $^{\circ}$ C, 50s; 35 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。 *psbA* 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C, 1min 预变性; 循环温度 94 $^{\circ}$ C, 1min; 52 $^{\circ}$ C, 1min; 72 $^{\circ}$ C, 1min; 35 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。琼脂糖电泳检测扩增产物, PCR 特异性扩增条带利用上海华舜小量胶回收试剂盒进行纯化回收。

序列测定 回收产物送去上海生工公司和北京华大公司进行测序, 反应在 ABI3730 DNA 自动测序仪上进行, 正反向扩增引物均用于测序反应, 以便进行双向测序。

数据分析 所测序列用 GenBank 中的 blast 工具进行比对, 确认其为研究的目的片段。根据比对结果, 在 GenBank 中下载相关基因序列, 登录号见表 2 和表 3。将所有序列输入 Clustal X 软件^[19]进行排序比对, 人工检查校正比对结果, 生成供系统发育分析的序列矩阵, 使用 MEGA 5.0^[20]分析序列特征。采用邻接法(NJ)、最大似然法(ML)和贝叶斯法(Bayesian)^[21]构建系统发育树, 分别基于软件 MEGA 5.0、PAUP*4.0b 和 MrBayes 3.0^[22]作树。

表 2 基因库中下载的用于分析的 *psaA* 序列及登录号
Tab. 2 GenBank accession number of related *psaA* gene sequences in this study

分类单位 Taxa	<i>psaA</i> 基因序列登录号 GenBank accession number of <i>psaA</i>	采集地 Locality	作者及发表年限 Author and publish time	参考文献 Reference
<i>Anotrichium crinitum</i>	AY295119	New Zealand: Cape Campbell	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Anotrichium elongatum</i>	AY295120	Australia: Melbourne: Queenscliff	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Anotrichium tenue</i>	AY295121	Korea: Pohang: Gampo	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Anotrichium yagii</i>	AY295123	Korea: Gangreung: Anin	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Antithamnion nipponicum</i>	AY295136	Korea: Samcheok: Maengbang	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Batrachospermum gelatinosum</i>	DQ787596	—	—	Unpublished
<i>Centroceras clavulatum</i>	AY295137	Korea: Pohang: Guryongpo	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Ceramium kondoii</i>	AY295138	South Korea: Taean: Hakampo	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Chondrus crispus</i>	AY119710	Canada: Nova Scotia	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D 2002	[18]
<i>Griffithsia antarctica</i>	AY295125	Chile: Punta Arenas: Chabunco	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia corallinoides</i>	AY295126	France: Roscoff	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia japonica</i>	AY295127	Japan: Chiba: Choshi	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia pacifica</i>	AY295130	USA: Washington: San Juan Island: Friday Harbor	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia</i> sp. SMB-2003	AY295128	South Korea: Jeju: Moonsum	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia teges</i>	AY295132	Australia: Melbourne: Queenscliff	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia traversii</i>	AY295134	New Zealand: Kaikoura	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Halurus flosculosus</i>	AY295135	United Kingdom: Isle of Man: Port Erin	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Hildenbrandia rubra</i>	DQ787593	—	—	Unpublished
<i>Palmaria palmata</i>	AY119711	USA: Maine	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D 2002	[16]
<i>Thorea violacea</i>	AY119712	Sammlung von Algenkulturen (SAG) 51.94	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D 2002	[16]
Outgroup				
<i>Bangia atropurpurea</i>	AY119698	Sammlung von Algenkulturen (SAG) 33.94	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D 2002	[18]

2 结果

2.1 序列分析

将本研究所测序列上传至 GenBank 数据库中, 所得序列登录号见表 4。使用 Clustal 软件对所有序列进行比对, 经比对校正后 *psaA* 基因供分析的序列长为 694 bp, 核苷酸变异位点为 339 个, 占序列长度的 48.8%, 其中简约信息位点为 318 个, 占序列长度的

45.8%; *psbA* 基因供分析的序列长为 835 bp, 核苷酸变异位点为 296 个, 占序列长度的 35.4%, 其中简约信息位点为 246 个, 占序列长度的 29.5%。运用 DAMBE 4.1 软件^[23]分析核苷酸变异与遗传距离的相关性, 结果显示转换与颠换与 Tamura & Nei 遗传距离线性相关, 表明这些位点没有突变饱和, 可以用于系统发育分析。Modeltest 3.7 软件^[24]分析 DNA 序列最适合的进化模型为 GTR+I+G, 并得到相关模型参数(表 5、表 6)。

表 3 基因库中下载的用于分析的 *psbA* 序列及登录号
Tab. 3 GenBank accession number of related *psbA* gene sequences in this study

分类单位 Taxon	<i>psbA</i> 基因序列登录号 No. of <i>psbA</i> GenBank accession number	采集地 Locality	作者及发表年限 Author and publish time	参考文献 Reference
<i>Anotrichium crinitum</i>	AY295139	New Zealand: Cape Campbell	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Anotrichium elongatum</i>	AY295140	Australia: Melbourne: Queenscliff	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Anotrichium tenue</i>	AY295142	Korea: Ulsan: Ulgi	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Anotrichium yagii</i>	AY295144	Korea: Gosung: Ayajin	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Antithamnion nipponicum</i>	AY295157	Korea: Samcheok: Maengbang	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Batrachospermum gelatinosum</i>	DQ787636	—	—	Unpublished
<i>Chondrus crispus</i>	AY119746	Canada: Nova Scotia	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D. 2002	[18]
<i>Griffithsia antarctica</i>	AY295145	Chile: Punta Arenas: Chabunco	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia corallinoides</i>	AY295146	France: Roscoff	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia japonica</i>	AY295147	Japan: Chiba: Choshi	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia pacifica</i>	AY295151	UTEX LB2317	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia teges</i>	AY295152	Australia: Melbourne: Queenscliff	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Griffithsia traversii</i>	AY295154	New Zealand: Kaikoura	Yang E C, Boo S M 2003	[17]
<i>Halurus flosculusus</i>	AY295156	United Kingdom: Isle of Man: Port Erin	Yang E C, Boo S M 2003	[16]
<i>Hildenbrandia rubra</i>	DQ787633	—	—	Unpublished
<i>Palmaria palmata</i>	U28165	USA: Maine	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D. 2002	[18]
<i>Thorea violacea</i>	AY119747	Sammlung von Algenkulturen (SAG) 51.94	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D. 2002	[18]
Outgroup				
<i>Bangia atropurpurea</i>	AY119734	Sammlung von Algenkulturen (SAG) 33.94	Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D. 2002	[18]

表 4 本实验测得序列 GenBank 登录号
Tab. 4 GenBank accession number of gene sequences determined in this study

分类单位 Taxon	<i>psaA</i> 序列登录号 GenBank accession number of <i>psaA</i>	<i>psbA</i> 序列登录号 GenBank accession number of <i>psbA</i>
中华奥杜藻 <i>Audouinella sinensis</i>	JN592045	JN592046
弧形串珠藻 <i>Batrachospermum arcuatum</i>	KF806485	KF806491
胶串珠藻 <i>B. gelatinosum</i>	KF806488	KF806494
洪洞串珠藻 <i>B. hongdongense</i>	KF806487	KF806493
长柄串珠藻 <i>B. longipedicellatum</i>	KF806486	KF806492
绞扭熊野藻 <i>Kumanoa intorta</i> (=绞扭串珠藻 <i>B. intortum</i>)	KF806483	KF806489
弯形熊野藻 <i>K. curvata</i> (=弯形串珠藻 <i>B. curvatum</i>)	KF806484	KF806490
棘刺红索藻 <i>Thorea hispida</i>	JN171698	JN171699

表 5 Modeltest 3.7 检验得到的 *psaA* 基因优化模型参数
Tab. 5 Nucleotide substitution model parameter estimates of *psaA* gene for Modeltest 3.7 analyses

模型参数 Model selected	碱基频率 Base frequency	矩阵参数 Rate matrix
GTR+I+G	freqA=0.3818	R(a)[A-C]=1.1410
−lnL=7195.2520	freqC=0.1188	R(b)[A-G]=4.4088
K=10	freqG=0.0840	R(c)[A-T]=0.0539
(I)=0.4233	freqT=0.4155	R(d)[C-G]=1.8109
(G)=0.4572		R(e) [C-T]=8.5279
		R(f)[G-T]=1.0000

表 6 Modeltest 3.7 检验得到的 *psbA* 基因优化模型参数
Tab. 6 Nucleotide substitution model parameter estimates of *psbA* gene for Modeltest 3.7 analyses

模型参数 Model selected	碱基频率 Base frequency	矩阵参数 Rate matrix
GTR+I+G	freqA=0.2388	R(a)[A-C]=0.6887
−lnL=5288.5190	freqC=0.1614	R(b)[A-G]=11.9902
K=10	freqG=0.2146	R(c)[A-T]=15.0786
(I)=0.5874	freqT=0.3851	R(d)[C-G]=1.4730
(G)=2.8051		R(e)[C-T]=41.1570
		R(f)[G-T]=1.0000

2.2 系统发育分析

以中国产熊野藻属 *Kumanoa* 的两个种, 绞扭熊野藻 *K. intorta*(=绞扭串珠藻 *B. intortum*), 弯形熊野

藻 *K. Curvata* (=弯形串珠藻 *B. curvatum*)和其他 24 个分类单位为研究对象, 并以较为原始的红毛菜亚纲的暗紫红毛菜 *B. atropurpurea* 作为外类群, 基于 *psaA* 和 *psbA* 序列, 分别使用贝叶斯法(Bayesian)、最大似然法(ML)和邻接法(NJ)构建系统发育树。3 种方法得到的系统进化树拓扑结构大致相同。本研究以贝叶斯树为基础进行分析, 分支节点处的数字分别代表贝叶斯法、最大似然法和邻接法所得到的支持率(图 1—3)。两个种的形态特征见表 7。

从以 *psaA* 基因构建的系统树(图 1)可看出, 熊野藻属的两个种绞扭熊野藻 *K. intorta* 和弯形熊野藻 *K. curvata* 单独聚为一支, 3 种方法的支持率均为 100%, 与该属亲缘关系最近的是串珠藻属种类, 3 种方法的支持率分别为 92%、58.6%和 76%。从以 *psbA* 基因构建的系统树(图 2)可看出, 熊野藻属的两个种仍然单独聚为一支, 3 种方法的支持率都为 100%, 与该属亲缘关系最近的也是串珠藻属种类, 其中两种方法的支持率超过 90%。图 3 是以 *psaA* 和 *psbA* 基因联合构建的系统树, 与图 1 和图 2 一样, 熊野藻属的两个种单独聚为一支, 3 种方法的支持率都为 100%, 与其亲缘关系最近的是串珠藻属种类, 3 种方法的支持率均在 90%以上。

表 7 绞扭熊野藻和弯形熊野藻的形态特征
Tab. 7 Morphometric data for specimens of *Kumanoa intorta* and *K. curvata*

藻体形态特征 Thallus characteristics	绞扭熊野藻 <i>Kumanoa intorta</i>	弯形熊野藻 <i>Kumanoa curvata</i>
繁殖系统 Breeding system	雌雄同体 Dioecy	雌雄同体 Dioecy
藻体颜色 Color	深橄榄绿 Dark olive green	橄榄绿 Olive green
轮节形状 Whorl shape	截顶锥形 Truncated cone	梨形 Pear-shaped
轮节直径 Whorl diam. (μm)	300—500	250—550
节间长度和宽度 Internode length and width (μm)	350—780, 60—80	260—650, 50—160
皮层丝细胞直径 Cortical filament diam. (μm)	6—7	6—9
初生枝细胞长度 Fascicle length (cells)	5—12	5—12
次生枝 Secondary fascicles	多 dense	多 dense
果胞枝长度 Carpogonial branch length (cells)	(6—)8—12	4—7
果胞枝细胞直径, 长度 Carpogonial branch cell diam., length (μm)	6—10, 6—9	7—10, 6—9
果胞直径, 长度 Carpogonium diam., length (μm)	25—33, 9—11	28—70, 6—15
受精丝形状 Trichogyne shape	棒形, 具短柄或无柄 Clavate, with short or no stalk	狭椭圆形或狭卵形, 具短柄或无柄 Arrow elliptical or ovate, with short or no stalk
果孢子体直径 Carposporophyte diam. (μm)	120—190	63—400
每节果孢子体数目 Carposporophytes per whorl	1—2	1 (—2)
果孢子囊直径和长度 Carposporangium diam., length (μm)	12—15, 17—23	10—15, 13—18
精子囊直径 Spermatangium diam. (μm)	(5—) 7—11	4.5—10

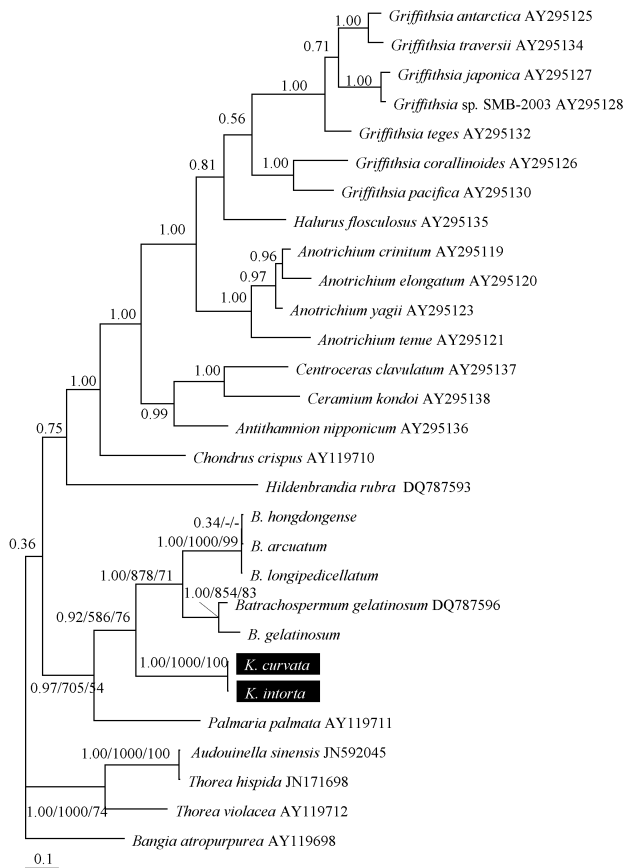
图 1 基于 *psaA* 基因序列的系统树

Fig. 1 Bayesian analysis tree based on the *psaA* gene sequence. 节点处的数字分别代表贝叶斯后验概率、最大似然法步靴值、邻接法步靴值；下同

Support values for all analyses are shown as follows: Bayesian posterior probabilities/ML bootstrap/NJ distance bootstrap. ‘-’ denotes <50% support for that analyses at that node; the same applies below

总体分析，以 *psaA* 和 *psbA* 基因分别构建和联合构建的系统树大体一致，差异较小。淡水红藻和海洋红藻的种类是基本分离的。在淡水红藻中，属于红索藻目 Thoreales 的种类棘刺红索藻 *Thorea hispida* 和蓝色红索藻 *T. violacea* 聚在一起，并与串珠藻目的种类分别位于不同的分支。在串珠藻目中，熊野藻属的两个种纹扭熊野藻和弯形熊野藻单独聚为一支，与其他串珠藻属种类所在的分支分离，且 3 种方法的支持率都为 100%。在几个串珠藻属种类中，胶串珠藻 *B. gelatinosum* 与其他 3 种，洪洞串珠藻 *B. hongdongense*、长柄串珠藻 *B. longipedicellatum* 和弧形串珠藻 *B. arcuatum* 相分离，也都有很高的支持率。

3 讨论

熊野藻属是从串珠藻属分离出来而建立的，其

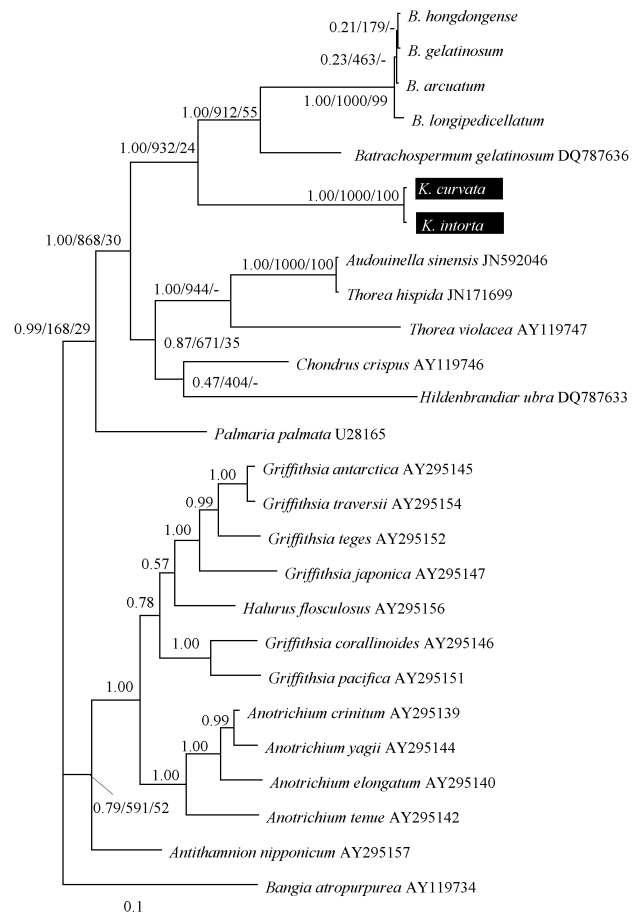
图 2 基于 *psbA* 基因序列的系统树

Fig. 2 Bayesian analysis tree based on the *psbA* gene sequence

主要形态特征是果胞枝不同程度弯曲、扭曲或螺旋状，而串珠藻属的果胞枝则基本是直立的，长短不一。之前多篇文献基于 *rbcL* 和 18S rRNA 基因对熊野藻属的研究结果显示，将其作为一个单系分支具有很高的支持率，即有好的统计学支持，显然区别于串珠藻属^[1, 5—8]。Vis 等^[9]基于 *COI* 和 *UPA* 基因序列的研究也得到了同样的结果。在本研究中，基于 *psaA* 和 *psbA* 两个基因分析得到的所有拓扑结构中显示熊野藻属和串珠藻属分别属于不同的单系分支，与之前的研究报道相一致，很好地支持了该属的建立。中国产的熊野藻属分子学研究结果支持了南美洲及澳大利亚的该属植物分子学分类提议^[1]，该属的成立具有广泛的地理适用性。同时系统发育树聚类结果也明确反映了熊野藻属与串珠藻属较近的亲缘关系，两属各自分支后又聚合于串珠藻目大枝中，与该属成立来由相吻合^[1]。基于系统树反映的进化关系，顶丝藻目在真红藻亚纲中起源较早，掌形藻目和红索藻目次之，其次为

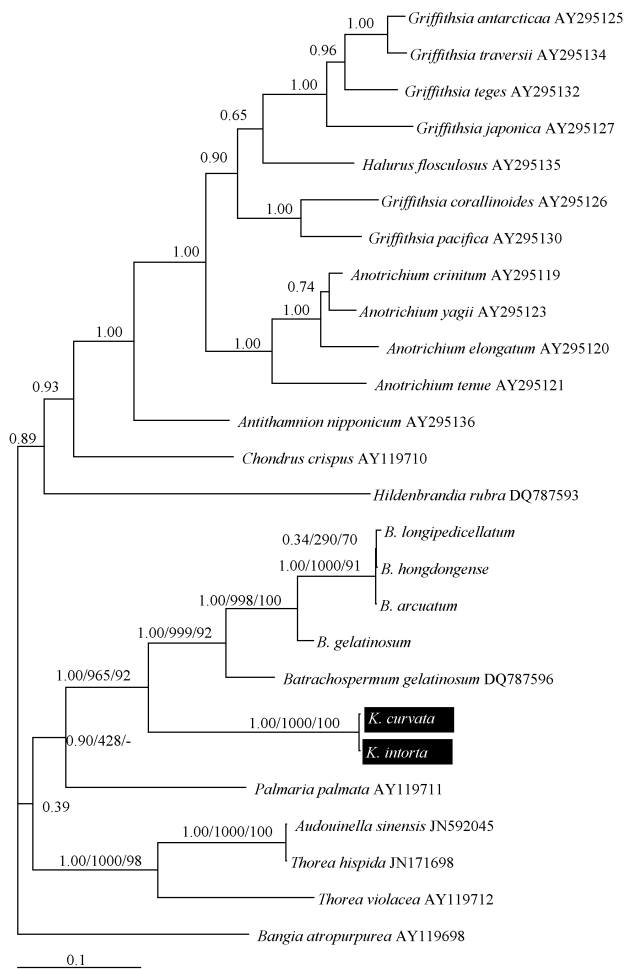
图 3 基于 *psaA* 和 *psbA* 联合基因序列的系统树

Fig. 3 Bayesian analysis tree based on the combined *psbA* and *psaA* gene sequence

串珠藻目^[25]。本文系统树结果也支持这一结论,然而在串珠藻目中,熊野藻属和串珠藻属起源先后依然很难确定,根据谢树莲^[26]基于形态学证据对串珠藻目植物系统发育分析结果,果胞枝的形态特点经历由对称向不对称的进化历程,即由直立向弯曲或扭曲发展,因此推测熊野藻属进化地位晚于串珠藻属植物。

此外,淡水红藻和海洋红藻的种类基本分离,也进一步说明两者分离较早。曾有文献提到,淡水红藻可能起源于 18000 万年前的三叠纪或更早,经过了长期的独立进化过程^[27]。在串珠藻属中,胶串珠藻与其他 3 种,洪洞串珠藻、长柄串珠藻和弧形串珠藻相分离,也都有很高的支持率,与基于 *cox2-3spacer* 序列的系统发育关系一致^[28],为两组 Section *Batrachospermum* 和 Section *Helminthoidea* 的分离提供了进一步的证据。

PsaA 和 *psbA* 是两个高度保守的基因,所以常用于属以上分类等级的分子系统发育研究,但其用于藻类植物系统发育的研究报道还很少^[29—32]。本研究结果表明, *psaA* 和 *psbA* 基因能够较好地反映红藻的系统发育关系,也进一步证明这两个分子标记用于红藻系统发育研究的可行性,同时,利用联合基因序列可以提高支持率和可信度。

熊野藻属是串珠藻科中种类较多的一个属,目前约有 30 种^[9]。根据这一分类上的变化,之前属于串珠藻属扭曲组和杂生组的种类应隶属熊野藻属。据此,我国目前已报道的该属植物有下列 10 种^[33]。原先的分类检索表应更改如下,以期熊野藻属植物的形态学研究提供理论基础和检索依据,今后该属植物的研究方向应是结合形态特征和分子生物学数据来进一步明确其系统发育地位。

中国熊野藻属 *Kumanoa* 分种检索表

1. 初生枝上部细胞小球形,呈念珠状,果胞枝发生于初生枝的基部、顶端或中部 过渡熊野藻 *K. transitoria*
1. 初生枝上部细胞不呈小球形,果胞枝发生于初生枝的基部或近基部 2
2. 藻体产生单孢子囊 绞扭熊野藻 *K. intorta*
2. 藻体不产生单孢子囊 3
3. 果胞枝略弯曲 阿比熊野藻 *K. abilii*
3. 果胞枝明显弯曲 4
4. 果胞枝呈螺旋状扭曲 5
4. 果胞枝不呈螺旋状扭曲 弯形熊野藻 *K. curvata*
5. 果孢子体紧密 6
5. 果孢子体疏松 8
6. 受精丝具明显的短柄 7
6. 受精丝不具明显的短柄 马赫拉熊野藻 *K. mahlacensis*
7. 果胞长 30—50 μm 扭曲熊野藻 *K. torsiva*
7. 果胞长 20—28 μm 可疑熊野藻 *K. ambigua*
8. 藻体较硬,皮层丝非常紧密 假枝藻状熊野藻 *K. nothocladoideus*
8. 藻体较软,皮层丝不是非常紧密 9
9. 轮节倒锥形,次生枝多 诺诺熊野藻 *K. nonocensis*
9. 轮节近球形,次生枝少 钏路熊野藻 *K. kushiroensis*

参考文献：

- [1] Entwisle T J, Vis M L, Chiasson W B, *et al.* Systematics of the Batrachospermales (Rhodophyta)—a synthesis [J]. *Journal of Phycology*, 2009, **45**(3): 704—715
- [2] Kumano S. Taxonomy of the family Batrachospermaceae (Batrachospermales, Rhodophyta) [J]. *Japanese Journal of Phycology*, 1993, **41**(3): 253—274
- [3] 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**(1): 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**(1): 33—39]
- [4] Entwisle T J, Foard H J. *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) in Australia and New Zealand: new taxa and records in sections *Contorta* and *Hybrida* [J]. *Australian Systematic Botany*, 1999, **12**(4): 615—633
- [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]. *Journal of Phycology*, 1998, **34**(2): 341—350
- [6] Vis M L, Entwisle T J. Insights into the phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) from *rbcL* sequence data of Australian taxa [J]. *Journal of Phycology*, 2000, **36**(6): 1175—1182
- [7] Vis M L, Chiasson W B, Sheath R G. Phylogenetic relationship of *Batrachospermum* species (Batrachospermales, Rhodophyta) from coastal streams in French Guiana [J]. *Phycologia*, 2005, **44**(4): 441—446
- [8] Li Q, Ji L, Xie S L. Phylogenetic analysis of *Batrachospermales* (Florideophyceae, Rhodophyta) based on chloroplast *rbcL* sequences [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(1): 20—28 [李强, 吉莉, 谢树莲. 串珠藻目植物的系统发育-基于 *rbcL* 序列的证据. 水生生物学报, 2010, **34**(1): 20—28]
- [9] Vis M L, Necchi O, Chiasson W B, *et al.* Molecular phylogeny of the genus *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2012, **48**(3): 750—758
- [10] Jao C C. Studies on the freshwater algae of China VIII. A preliminary account of the Chinese freshwater Rhodophyceae [J]. *Sinensia*, 1941, **12**: 245—290
- [11] Shi Z X, Wei Y X, Li Y Y, *et al.* Studies on Algae Resources in Southwest Area [M]. Beijing: Science Press. 1994, 1—405 [施之新, 魏印心, 李尧英, 等. 西南地区藻类资源考察专集. 北京: 科学出版社. 1994, 1—405]
- [12] Xie S L, Shi Z X. New reports of *Batrachospermum* Roth (Batrachospermales, Rhodophyta) from China [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2003, **23**(3): 269—275 [谢树莲, 施之新. 中国串珠藻属新记录. 植物研究, 2003, **23**(3): 269—275]
- [13] Xie S L, Shi Z X, Lu H S, *et al.* Four new reports of *Batrachospermum* (Batrachospermales, Rhodophyta) from China [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2003, **21**(2): 148—152 [谢树莲, 施之新, 卢海声, 等. 中国串珠藻属的4个新记录种. 武汉植物研究, 2003, **21**(2): 148—152]
- [14] Xie S L, Shi Z X. Three new species of *Batrachospermum* Roth (Batrachospermales, Rhodophyta) in China [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2005, **23**(2): 204—209.
- [15] Shi Z X. Flora Algarum Sinicarum Aquae Dulcis, Vol. 13, Rhodophyta and Phaeophyta [M]. Beijing: Science Press. 2006, **57**, 62—68 [施之新. 中国淡水藻志, 第13卷, 红藻门和褐藻门. 北京: 科学出版社. 2006, **57**, 62—68]
- [16] Yang E C, Boo S M. Evidence for two independent lineages of *Griffithsia* (Ceramiaceae, Rhodophyta) based on plastid protein-coding *psaA*, *psbA*, and *rbcL* gene sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, **31**(2): 680—688
- [17] Wang Y N, Feng J, Xie S L. Phylogenetic relationship of Thorealess based on *psaA* and *psbA* genes [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2011, **31**(3): 257—260 [王亚楠, 冯佳, 谢树莲. 基于 *psaA* 和 *psbA* 基因的红索藻目系统发育研究. 植物研究, 2011, **31**(3): 257—260]
- [18] Yoon H S, Hackett J D, Bhattacharya D. A single origin of the peridinin-and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, **99**(18): 11724—11729
- [19] 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]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876—4882
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2731—2739
- [21] Rannala B, Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, **43**(3): 304—311
- [22] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(12): 1572—1574
- [23] Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Journal of Heredity*, 2001, **92**(4): 371—373
- [24] 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]. *Systematic Biology*, 2004, **53**(5): 793—808

- [25] Shi Z X. Flora Algarum Sinicarum Aquae Dulcis, Vol. 13, Rhodophyta and Phaeophyta [M]. Beijing: Science Press. 2006, 57, 20—22. [施之新. 中国淡水藻志, 第 13 卷, 红藻门和褐藻门. 北京: 科学出版社. 2006, 57, 20—22]
- [26] Xie S L. Phylogenetic analysis on the Batrachospermales (Rhodophyta) based on morphological data [J]. *Journal of Shanxi University* (Natural Science Edition), 2007, 30(2): 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(2): 245—250]
- [27] Xie S L, Ling Y J. Modern geographical distribution and origin of Batrachospermales [J]. *Journal of Shanxi University*, 2002, 25(2): 149—155 [谢树莲, 凌元洁. 串珠藻目的现代地理分布和起源. 山西大学学报 (自然科学版), 2002, 25(2): 149—155]
- [28] Ji L, Chen L, Feng J, *et al.* Molecular phylogenetics of *Batrachospermum* Roth (Rodophyta) based on *cox2-3* spacer sequence [J]. *Journal of Shanxi University*, 2013, 36(3): 449—454 [吉莉, 陈乐, 冯佳, 等. 基于 *cox2-3* spacer 序列的串珠藻属系统发育研究. 山西大学学报 (自然科学版), 2013, 36(3): 449—454]
- [29] Stefaniak K, Kokociski M, Rurek M, *et al.* The polymorphic *psaA* and *rbcL* loci in populations of *Planktothrix agardhii* in Polish hypertrophic lakes [J]. *Biologia Bratislava*, 2005, 60(3): 313—317
- [30] Christiansen G, Molitor C, Philmus B, *et al.* Nontoxic strains of Cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(8): 1695—1704
- [31] Yang Z M, Zhang Q, Xie S L, *et al.* Sequence analyses of chloroplastic *psaA* gene fragment from *Phaeocystis globosa* [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2004, 12(5): 435—439 [杨泽民, 章群, 谢数涛, 等. 球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 叶绿体 *psaA* 基因片段的序列分析. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(5): 435—439]
- [32] She D W, Zhang H B, Wang Y, *et al.* Sequence analyses of Chloroplastic *psaA* gene fragment from *Porphyra haitanensis* [J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(5): 289—291 [余大为, 张海波, 王月, 等. 坛紫菜叶绿体 *psaA* 基因片段的序列分析. 水产科学, 2007, 26(5): 289—291]
- [33] Shi Z X. Flora Algarum Sinicarum Aquae Dulcis, Vol. 13, Rhodophyta and Phaeophyta [M]. Beijing: Science Press. 2006, 62—68 [施之新. 中国淡水藻志, 第 13 卷, 红藻门和褐藻门. 北京: 科学出版社. 2006, 62—68]

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF GENUS *KUMANO*A BASED ON CHLOROPLAST *PSAA* AND *PSBA* GENES

NAN Fang-Ru, FENG Jia and XIE Shu-Lian

(School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: *Kumanoa intorta* (former *Batrachospermum intortum*) and *K. curvata* (former *B. curvatum*) are two species of genus *Kumanoa* originally from China. In this study we amplified and sequenced the chloroplast *psaA* and *psbA* genes of these two species and of other six freshwater Rhodophyta species. We aligned their sequences with related groups from GenBank, and constructed phylogenetic trees of both single gene and combined genes by using the methods of Bayesian analysis, maximum likelihood and neighbor-joining. The trees generated with three different methods showed similar topologies and thus inferred consistent phylogenetic relationships. The two species from genus *Kumanoa* could form one clade with high supportive values but should be separated from genus *Batrachospermum*. The analysis above supported our report about a new genus *Kumanoa*. The molecular biological study of *Kumanoa* species originally from China revealed similar results with those originally from South America and Australia, indicating wide geographical areas of this genus. The phylogenetic tree demonstrated a close relationship between genus *Kumanoa* and *Batrachospermum*. According to the characteristics of the carpogonial branch, we deduced that the evolution of genus *Kumanoa* was later than that of *Batrachospermum*, but earlier than that of Acrochaetiales and Thoreales. *B. gelatinosum* should be separated from other section *Batrachospermum* species and be classified as an independent section. The construction of the order Thoreales could be supported by the fact that Thoreales and Batrachospermales should be separated. Furthermore, our study suggested that *psaA* and *psbA* genes could be used as molecular markers in the study of the phylogenetic relationships of Rhodophyta.

Key words: *Kumanoa*; *psaA*; *psbA*; Phylogenetic analysis