

混合营养型马勒姆杯棕鞭藻的重描述及其系统发育分析

陈 马明洋 王红霞 胡强 龚迎春

REDESCRIPTION OF MIXOTROPHIC *POTERIOOCHROMONAS MALHAMENSIS* AND ITS PHYLOGENETIC ANALYSIS

CHEN Man, MA Ming-Yang, WANG Hong-Xia, HU Qiang, GONG Ying-Chun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.131>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

田中碘泡虫的重描述及系统发育分析

REDESCRIPTION AND PHYLOGENY OF *MYXOBOLUS TANAKAIKATO ET AL.*, 2017

水生生物学报. 2020, 44(4): 904–911 <https://doi.org/10.7541/2020.107>

浙江近海属鱼类形态描述及中国属鱼类分子系统发育分析

MORPHOLOGICAL DESCRIPTION OF *SILLAGO* SPECIES IN THE COASTAL WATERS OF ZHEJIANG AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *SILLAGO* SPECIES IN CHINA

水生生物学报. 2018, 42(1): 99–105 <https://doi.org/10.7541/2018.013>

青海湖裸鲤舌状绦虫裂头蚴的分子鉴定及系统发育研究

MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC STUDY OF *LIGULA INTESTINALIS* PLEROCEROID IN *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* FROM THE QINGHAI LAKE, CHINA

水生生物学报. 2018, 42(1): 33–38 <https://doi.org/10.7541/2018.005>

鲤sPLA₂-III基因结构、系统发育和表达特征

STRUCTURE, PHYLOGENY AND TISSUE DISTRIBUTION OF SPLA₂-III IN *CYPRINUS CARPIO*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1172–1181 <https://doi.org/10.7541/2019.138>

鳊亚科棒花鱼属鱼类的分类与系统发育关系

TAXONOMY AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE GENUS *ABBOTTINA* FISHES IN THE SUBFAMILY GOBIONINAE

水生生物学报. 2017, 41(4): 843–852 <https://doi.org/10.7541/2017.105>

棕鞭藻及其培养滤液对铜绿微囊藻生长及生理特性的影响

EFFECTS OF *OCHROMONAS* SP. CULTURE MEDIA FILTRATE ON THE GROWTH AND PHYSIOLOGICAL TRAITS OF *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

水生生物学报. 2019, 43(1): 213–218 <https://doi.org/10.7541/2019.026>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.131

混合营养型马勒姆杯棕鞭藻的重描述及其系统发育分析

陈 嫚^{1,2} 马明洋¹ 王红霞¹ 胡 强¹ 龚迎春¹

(1. 中国科学院水生生物研究所藻类生物技术与生物能源研发中心, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 马勒姆杯棕鞭藻(*Poterioochromonas malhamensis*)是典型的混合营养型单细胞鞭毛藻, 因个体微小且形态多变, 该鞭毛藻的正确鉴定十分困难, 且至今针对该物种一直没有详细全面的形态描述。从小球藻的大规模培养中分离出一株捕食性鞭毛藻*P. malhamensis* CMBB008, 利用荧光染色、扫描和透射电镜等方法, 对其形态学特征进行了详尽的描述, 并获取该物种的SSU rDNA和*rbcL*基因序列用于探讨该物种的系统发育地位。文章在前人形态描述的基础上, 详细记录了囊壳和叶绿体的形态: 囊壳柄长18.3—47.5 μm , 杯体宽8.5—11.3 μm , 深6.3—10.7 μm ; 叶绿体1—2个, 为中间桥接的二裂片状。文章还结合光镜和电镜观察首次报道了该物种的硅质胞囊, 发现其具有独特的三层领状结构和顶端孔塞结构, 并揭示了其主要细胞器的超微结构及重要代谢产物, 如油滴和金藻昆布多糖液泡等。通过不同种株间的比较研究发现, 作为*Poterioochromonas*属重要形态特征的囊壳和叶绿体, 由于形态变异性高, 不适合用于*P. malhamensis*的鉴定, 而胞囊形态很可能作为*Poterioochromonas*种间区分的重要形态特征。分子系统发育分析显示*Poterioochromonas*所有株系聚为一大支, 表明该属是单系类群。*P. malhamensis* CMBB008位于模式株*P. malhamensis* SAG933-1a所在的大分支内。*Poterioochromonas*支系可分为*P. malhamensis*和*P. stipitata*两个姊妹群, *P. malhamensis*支系可进一步分为两个姊妹支, 其中CCMP3181可能并不是*P. malhamensis*。研究补充和完善了*P. malhamensis*的形态和分子数据, 并从形态学和分子系统发育学角度为*Poterioochromonas*属的分类研究提供重要的参考信息。

关键词: 马勒姆杯棕鞭藻; 鉴定; 胞囊; 囊壳; 系统发育

中图分类号: Q949.26

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)05-1130-13

混合营养型是很多原生生物的一个重要特征, 近年来已获得了越来越广泛的关注^[1, 2]。混合营养型鞭毛藻在水生态系统中广泛存在, 而且是水生态系统中细菌的主要摄食者^[3]。马勒姆杯棕鞭藻(*Poterioochromonas malhamensis*)^[4]属于金藻纲(*Chrysophyceae*)棕鞭藻目(*Ochromonadales*)棕鞭藻科(*Ochromonadaceae*)杯棕鞭藻属(*Poterioochromonas*)^[5], 是典型的混合营养型鞭毛藻, 被认为是研究营养型转变^[6, 7]和其他有趣行为如细胞体积调控^[8, 9]、摄食特性^[10]及抗菌作用^[11]的模式生物。此外, *P. malhamensis*在摄食产毒蓝藻和降解微囊藻毒素中发挥重要作用^[12, 13], 因此可能具有控制水华的巨大潜能。另外, 近年来有报道指出*P. malhamensis*是微藻(如小球藻^[14, 15]和集胞藻^[16])的商业化培养中的

主要摄食者并造成严重的经济损失。

虽然*P. malhamensis*具有重要的生态学作用并对微藻产业带来巨大危害, 但它的物种鉴定却十分混乱。*Poterioochromonas*藻体单细胞, 前端两根不等鞭毛, 叶绿体周生, 光合产物为金藻昆布多糖。具几丁质囊壳, 囊壳由上方的杯形和下方中空的柄组成^[4]。由于形态极为相似, 杯棕鞭藻属(*Poterioochromonas*)常与棕鞭藻属(*Ochromonas*)混淆, 而囊壳的存在与否是区分*Poterioochromonas*与*Ochromonas*的重要特征^[17]。*P. malhamensis*于1952年首次被报道, Pringsheim将其命名为*Ochromonas malhamensis*^[18], 该株系即现在*P. malhamensis*的模式株SAG933-1a。后来Péterfi利用光学和电子显微镜揭示其存在囊壳结构, 将其重命名为*Poterioochromo-*

收稿日期: 2020-03-21; 修订日期: 2020-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(31772419和31872201)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31772419 and 31872201)]

作者简介: 陈嫚(1993—), 女, 硕士研究生; 主要从事原生动植物病害研究。E-mail: manchen@ihb.ac.cn

通信作者: 龚迎春, 女, 副研究员; 主要从事浮游动物分类与生态学研究。E-mail: springgong@ihb.ac.cn

nas malhamensis^[19]。此后, 研究报道了许多*P. malhamensis*或*Poterioochromonas* sp., 它们的来源十分广泛, 如微藻培养系统^[14, 15], 水华样品^[20], 甚至白蚁的消化道内^[21]。然而, 已有研究提供的形态学数据非常不完善, 且至今针对该物种一直没有详细全面的形态描述。

对于*P. malhamensis*的形态鉴定, 其难点是检测几丁质囊壳的存在, 这也是*Poterioochromonas*属的重要特征^[4]。然而, 这个重要的形态学特征在*P. malhamensis*有些类群的报道中并未被发现, 即使是模式株SAG933-1a^[18]。此外, 近年来在微囊藻培养体系中分离的*Poterioochromonas* sp. DO-2004^[22]和CCMP2718^[23], 还有从苔藓环境中分离到的其他株系^[24]等, 也没有观察到囊壳结构, 从而给该类群的鉴定带来很大困惑。因此, 检查*P. malhamensis*囊壳的有无十分关键。此外, 研究表明*Poterioochromonas*形态变异性大, 包括细胞大小和形状, 叶绿体的形态和数目, 细胞表面结构, 鞭毛相对身体的长度, 甚至是胞内储存物的数量与种类, 在生长的不同时期或周围的环境或食物发生变化时, 其形态变化很大^[25], 这些具有高变异性的形态是鉴定*P. malhamensis*时的又一大难题。因此, 寻找稳定可信的形态特征是对*P. malhamensis*进行物种鉴定的有效手段。

作为形态高度变化的小型鞭毛藻, 分子数据的引入是对形态学特征的重要补充, 并对其正确的物种鉴定起到关键作用。*P. malhamensis*的SSU rDNA基因早在1999年就被测序^[26], 从而为该物种的准确鉴定提供宝贵的参考信息。然而, 直至目前, 该物种的模式株SAG933-1a却没有被测序, 从而极大限制了该物种的准确鉴定。随着分子生物学方法的快速发展, 越来越多来自环境样品的分子序列被鉴定为*Poterioochromonas* spp., 但没有任何形态学数据的支撑^[27, 28], 这对*Poterioochromonas*的分类学研究造成很大困扰。此外, 大量研究表明许多命名为*Ochromonas*的物种在进化树中位于*Poterioochromonas*分支内^[25], 也造成了这两个属的分类混淆。

本研究旨在对分离自小球藻的*P. malhamensis*的形态特征进行全面的形态描述和分子系统发育分析, 并收集模式株SAG933-1a作为参考, 从而对*P. malhamensis*及相似物种的分类鉴定提供详细的基础信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集与培养

*P. malhamensis*样本采集自美国亚利桑那州立大学内的小球藻培养中, 可大量摄食小球藻, 该株

系暂定为CMBB008。这株鞭毛藻在倒置显微镜(Olympus CKX41)下通过毛细玻璃管分离并在pH 6.5的AF-6培养基^[29]中培养, 培养条件为(23±1)℃, 持续提供50 μmol photons/(m²·s)的光照。

为对其形态学进行比较研究, 分别从德国哥廷根大学藻种保藏中心(Culture Collection of Algae at Göttingen University, SAG)购买*P. malhamensis* SAG933-1a以及从美国海洋藻类和微型生物国家保藏中心(National Center for Marine Algae and Microbiota, NCMA)购买*P. malhamensis* CCMP3181和*P. stipitata* CCMP1862, 并进行纯培养, 培养条件同CMBB008。

1.2 光学显微镜观察

通过显微镜(Olympus BX53)的微干涉功能进行形态学观察, 并使用配置的DP80相机(Olympus)拍照, 用cellSens图像软件进行拍摄及图像处理。

在观察囊壳时, 将1 mL卡尔科弗卢尔-伊文斯蓝染料(Calcofluor White-Evans blue, CW-Eb; Sigma-Aldrich)加入1 mL细胞悬液中, 然后在暗处静置30min, 随后在荧光显微镜(激发/发射波长 = 355/435 nm)下观察^[30]。叶绿体的数目通过自发荧光观察。为统计叶绿体数目, 测量囊壳长度及杯体长宽和细胞大小等数据, 随机选取至少30个处于稳定期的细胞进行观察, 长度通过cellSens的图像功能进行测量。

将10 μL BODIPY 505/515染料(DMSO溶解, 储存液浓度为5 mmol/L; Invitrogen)加入1 mL细胞悬液中进行染色, 在室温下暗处静置10min后在荧光显微镜(激发/发射波长=490/515 nm)下观察胞内的油滴^[31]。

1.3 电子显微镜观察

鞭毛藻扫描电镜和透射电镜的样品制作方法参照Gong等^[32]。此外, 本文还对该鞭毛藻的胞囊开展扫描电镜观察。胞囊的收集方法为: 在AF-6培养基中加入麦粒(1粒/10 mL)静置培养获得高浓度的细胞。随后提供低光[10—20 μmol photons/(m²·s)], 光周期为12h:12h。每天在光镜下监测是否有胞囊的产生。一旦有大量胞囊产生, 将培养液以3000×g离心10min, 弃去上清, 将沉淀在酒精灯上方加热直至水分蒸发干。加入2—4滴浓盐酸, 酒精灯加热至盐酸蒸发。然后依次加入2—4滴浓硫酸和浓硝酸, 重复上述步骤, 酸处理将去除胞囊的有机质。然后将处理干净的胞囊在含变色硅胶的真空干燥器中干燥3d^[33], 制作扫描电镜样品并拍照。

1.4 DNA提取, 扩增和测序

将*P. malhamensis* CMBB008、SAG933-1a和

CCMP3181及*P. stipitata* CCMP1862的细胞经过12000×g离心5min, 参照DNeasy Blood & Tissue试剂盒(Qiagen)说明书提取细胞的总DNA。

SSU rDNA基因片段扩增采用引物SSU-F(5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')和SSU-R(5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3')^[34], 反应程序设置为95℃预变性5min; 95℃变性1min, 50℃退火1min, 72℃延伸2min 30s, 35个循环; 72℃末端延伸10min。*rbcL*基因片段扩增采用设计的引物*rbcL*-F(5'-CAGTAGTATGGACAG-3')和*rbcL*-R(5'-CCAACTACAGTTCAGC-3'), 反应程序设置为95℃预变性5min; 95℃变性30s, 45℃退火30s, 72℃延伸1min, 35个循环; 72℃末端延伸10min。

扩增的DNA片段在琼脂糖凝胶电泳后通过E.Z.N.A.[®]胶回收试剂盒(OMEGA, Biotek)纯化, 然后根据说明书连接到pGEM-T[®]载体(Promega)上, 转入大肠杆菌感受态细胞(DH5α)。蓝白斑筛选出白色克隆, 根据单克隆PCR的电泳结果挑选5—10个阳性克隆送往武汉天一辉远公司测序, 最后将四个株系的SSU rDNA和*rbcL*序列上传至GenBank。

1.5 系统发育分析

为了确定*P. malhamensis* CMBB008及*Poteroochromonas*属在金藻纲中的系统发育地位, 用本研究中测定的4个SSU rDNA和3个*rbcL*序列, 以及从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中收集的金藻纲的49个SSU rDNA和28个*rbcL*序列构建系统发育树, 此外分别选取4个和2个真眼点藻纲的SSU rDNA和*rbcL*序列作为外类群。将上述序列利用ClustalX软件^[35]进行比对, 然后用SeaView^[36]修剪序列, 同时用最大似然法(Maximum likelihood, ML)^[37]和贝叶斯推断法(Bayesian Inference, BI)^[38]进行进化分析。使用最大似然法在线建树(<http://www.atgc-montpellier.fr/phym/>), 分支节点支持率采用Bootstrap 1000次检验; 贝叶斯推断法分析在MrBayes软件中进行, 共运算1000000代, 对每1000代进行1次抽样。

2 结果

2.1 形态学描述

P. malhamensis CMBB008细胞形状多变, 大部分是球形或卵圆形, 也可见其他不规则形状(图1A—D), 细胞大小为6.5—12.4 μm(表1)。没有眼点。每个细胞有两根长短不等的鞭毛: 长鞭毛是体长的1—1.5倍, 短鞭毛在显微镜下有时难以观察到(图1A、1B)。长鞭毛上附生茸毛, 而短鞭毛光滑(图2A、2B)。细胞纵分裂, 细胞复制产生两套鞭毛(图2C)。

典型的叶绿体呈棕黄色的二裂片状(图1E), 其形状和颜色会在不同的生长阶段和培养条件下稍有变化(图1A—E)。不含叶绿体的细胞非常罕见(图1F)。细胞有时会通过囊壳的柄附着在颗粒上而聚集成群体(图1G)。在细胞体侧有时能观察到带状或柄状的伪足(图1D和1H、图2F)。透明的伸缩泡位于细胞前端, 细胞核在尾部(图1B)。细胞能通过吞噬摄食小球藻或细菌, 食物颗粒在食物泡中消化(图1H、1I)。在摄食过程中, 细胞通过鞭毛吸附小球藻(图2D), 通过细胞膜摄入小球藻或排出食物残渣(图2E)。细胞在摄食时很容易体型拉长且形成伪足(图2F)。稳定期的细胞中常可见油滴和大的昆布多糖液泡(图1J、1K)。囊壳在光学显微镜下很难观察到, 要借助CW-Eb染料在荧光显微镜下观察(图1M、1N)。囊壳杯状结构较宽和浅(图1L), 平均宽度和深度为9.4和8.0 μm(表1)。空的囊壳常通过柄基部聚集成簇(图1L)。在观察中还罕见地发现胞囊形成的初级阶段, 色素体膨大致密, 细胞外包裹一层厚的胶状物质, 细胞位于囊壳的杯状结构上(图1O、1P)。

细胞在饥饿条件下产生硅质胞囊(图3)。胞囊呈球形, 直径10—15 μm, 表面光滑。胞囊顶部有一个小孔, 小孔周围有三层领状结构: 第一层圆锥形, 第二层含有三个向内弯曲的凸起, 第三层含有三个扁平的圆顶(图3D—F)。在有些胞囊中, 小孔被一小型的塞子封口(图3F)。

透射电镜照片揭示了胞质中细胞器的超微结构(图4)。细胞有一个大的细胞核(1.6—2.1 μm), 核仁和细胞质清晰可见(图4A、4B和4E)。高尔基体是由许多半圆环, 即扁平膜囊堆积而成, 周围有大量圆形囊泡(图4F)。叶绿体和线粒体的数目和大小会随着细胞营养方式的不同而发生轻微改变: 在细胞自养时, 叶绿体很明显, 而线粒体数量少且个体小(图4A); 当转化为吞噬营养时, 会出现大量食物泡, 叶绿体会变得很小或消失, 但是线粒体的数目或体积大小会增大(图4B)。两片二裂片状叶绿体中间有桥连, 细胞核和叶绿体共用外膜(图4E)。鞭毛呈现“9+2”型微管结构(图4D)。另外, 可见鞭毛根部的过渡区, 过渡螺旋结构及含过渡平面的基体等超微结构(图4C和G)。

2.2 分子系统发育学分析

基于最大似然法和贝叶斯推断法(ML/BI)构建SSU rDNA(图5)和*rbcL*(图6)基因的系统发育树以确定*P. malhamensis* CMBB008的系统发育地位以及该属与金藻纲中其他物种的关系。通过测序获

得 *P. malhamensis* CMBB008, SAG933-1a, CCMP 3181 和 *P. stipitata* CCMP1862 的 SSU rDNA 基因序列(登录号分别为 MH536660、MH536656、MH542674 和 MH536657)和前三株 *P. malhamensis* 的 *rbcL* 基因序列(登录号分别为 MH643691、MH643685 和 MH643684)。系统发育分析最后比对的 SSU rDNA 序列包含 57 个物种 1686 个碱基, *rbcL* 序列包含 33 个物种 914 个碱基。

SSU rDNA 基因树(图 5)包含金藻纲中的 5 个目。所有的 *Poterioochromonas* 聚为一支, 位于棕鞭藻目(Ochromonadales)中, 该分支内分 3 个群(A、B 和 C): *P. stipitata* CCMP1862 和 *Poterioochromonas* sp. ACOI-1258 形成分支 A; *P. malhamensis* CCMP

3181, HT-2 和两株 *Poterioochromonas* sp.(CCMP 2718 和 CCMP2060)形成分支 B; SAG933-1a 和其他 *P. malhamensis*, 3 株 *Poterioochromonas* sp., 2 株未培养的金藻共同构成分支 C。在分支 C 中, CMBB008 株系最先分化, 其他株系构成另外一支后分化。此外, A 支与 B 和 C 构成的进化支以较高的支持率(ML/Bi=73.7%/0.92)形成姊妹支, B 和 C 形成姊妹支在 SSU rDNA 树中支持率较低(ML/Bi<50%/0.70)。*Poterioochromonas* 支系与含 3 株未定种的分支 D 亲缘关系密切(ML/Bi>90%/0.95)。最后, A-D 共同形成的分支与 4 株 *Ochromonas* 也形成亲缘关系很近的姊妹支(ML/Bi>90%/0.95)。与 *Poterioochromonas* 形态相似的 *Ochromonas* 属位于棕鞭藻目的两个

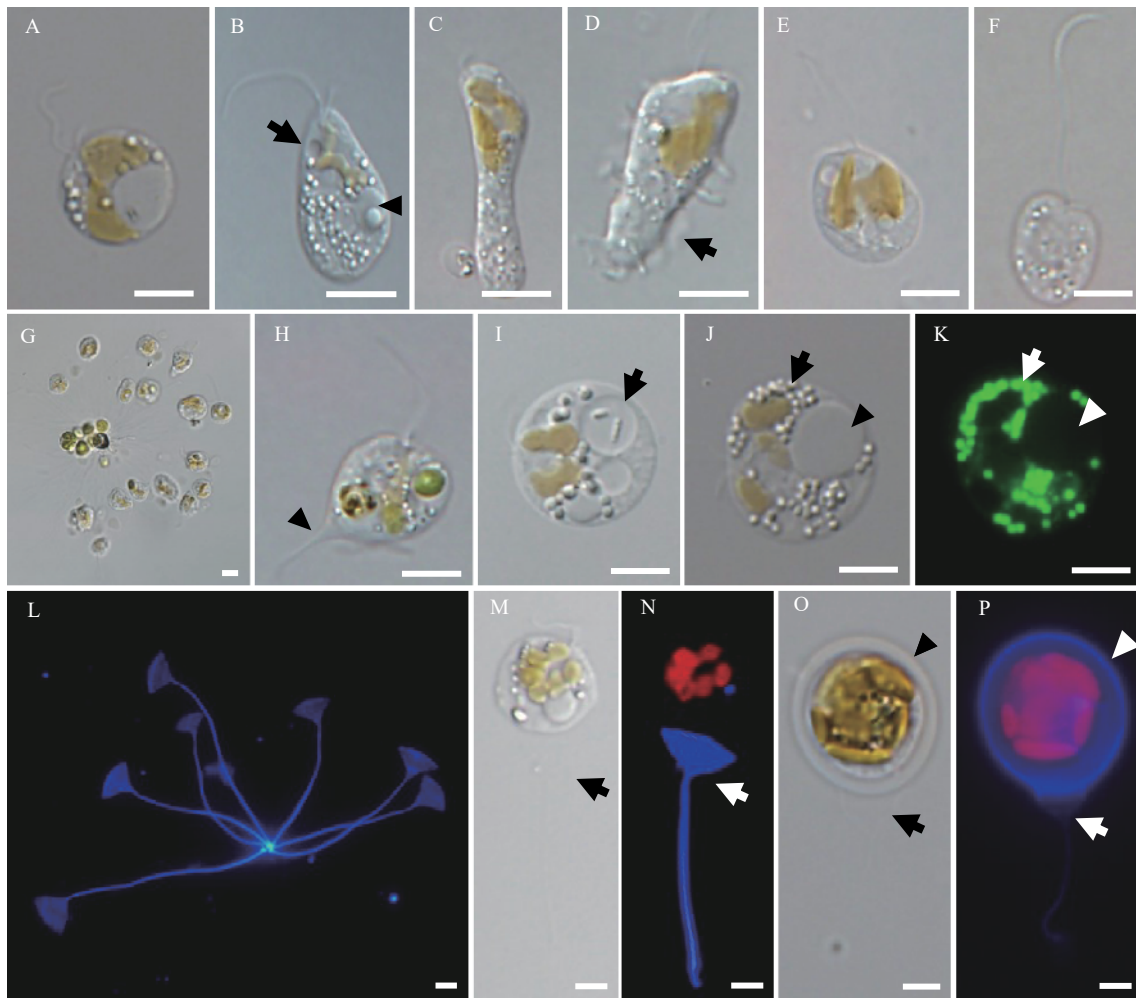


图 1 *P. malhamensis* CMBB008 的光学形态照片

Fig. 1 Light micrographs of *P. malhamensis* CMBB008

A—J, M, O. 微分干涉照片; K, L, N, P. 荧光照片; B. 伸缩泡(箭头)和细胞核(无尾箭头); D. 带状伪足(箭头); H. 柄状伪足(无尾箭头); I. 食物泡(箭头); J—K. 油滴(箭头)和昆布多糖液泡(无尾箭头); M—N. 囊壳(箭头); O—P. 囊壳杯形(箭头)和胶状层(无尾箭头); 标尺 = 5 μ m

A—J, M, O. differential interference contrast images; K, L, N, P. fluorescence microscopy. B. vacuole (arrow) and the nucleus (arrowhead); D. band-like pseudopods (arrow); H. Stalked pseudopod (arrowhead); I. food vacuole (arrow); J—K. lipid droplets (arrow) and chrysolaminarin vacuole (arrowhead); M—N. lorica (arrow); O—P. cup (arrow) and gel-like layer (arrowhead). Scale bars = 5 μ m

表 1 *Poterioochromonas*不同种群的形态比较

Tab. 1 Morphology comparison between different population of *Poterioochromonas*

物种Taxon	株系Strain	细胞大小Cell size (μm)	囊壳长度Lorica length (μm)	囊壳杯状Lorica cup (μm)	叶绿体数目Chloroplast number	胞囊Cyst	参考文献Reference
<i>P. malhamensis</i>	CMBB008	6.5—12.4(8.6)	18.3—47.5(34.6)	8.5—11.3(9.4) wide6.3—10.7 (8.0) deep 6.6—8.9(7.8) wide4.7—8.5 (6.7) deep	1—2	Found	This study
<i>P. malhamensis</i>	SAG 933-1a	6.9—11.8(9.1)	37.2—129.9(68.5)	3.2—5 deep; 4—8 wide (young)4—10 deep; 4—8 wide (mature) 6.9—11.4(9.1) 5.3—9.2(6.7)	1,2	—	This study
<i>P. malhamensis</i>	SAG 933-1a	6—8 (non-motile) 6—10× 4—7 (motile)	10—40×0.5—1.2		1—3	—	Péterfi ^[19]
<i>P. malhamensis</i>	CCMP3181	5.9—14.7(9.6)	20.0—42.7(28.7)		1	Frequently found	This study
<i>P. nutans</i>		7.0—7.6	30	8—9 wide, shallow	1—3	—	Jane ^[39]
<i>P. stipitata</i>		7.0—10.0	Variable length	Large	1	—	Scherffel ^[17]
<i>P. stipitata</i>	CCMP 1862	5.0—10.9(7.4)	10.3—24.0(17.0)	4.6—7.8(6.4) wide2.9—7.2 (5.0) deep	1	—	This study
<i>P. stipitata</i>	CCMP 1862	7—12	24—46 (35)	Broad and shallow	2	—	Andersen等 ^[23] Peck等 ^[30]
<i>Poterioochromonas</i> sp.	CCMP2060	10—13	-	Broad and shallow	1	Found	Andersen等 ^[23]

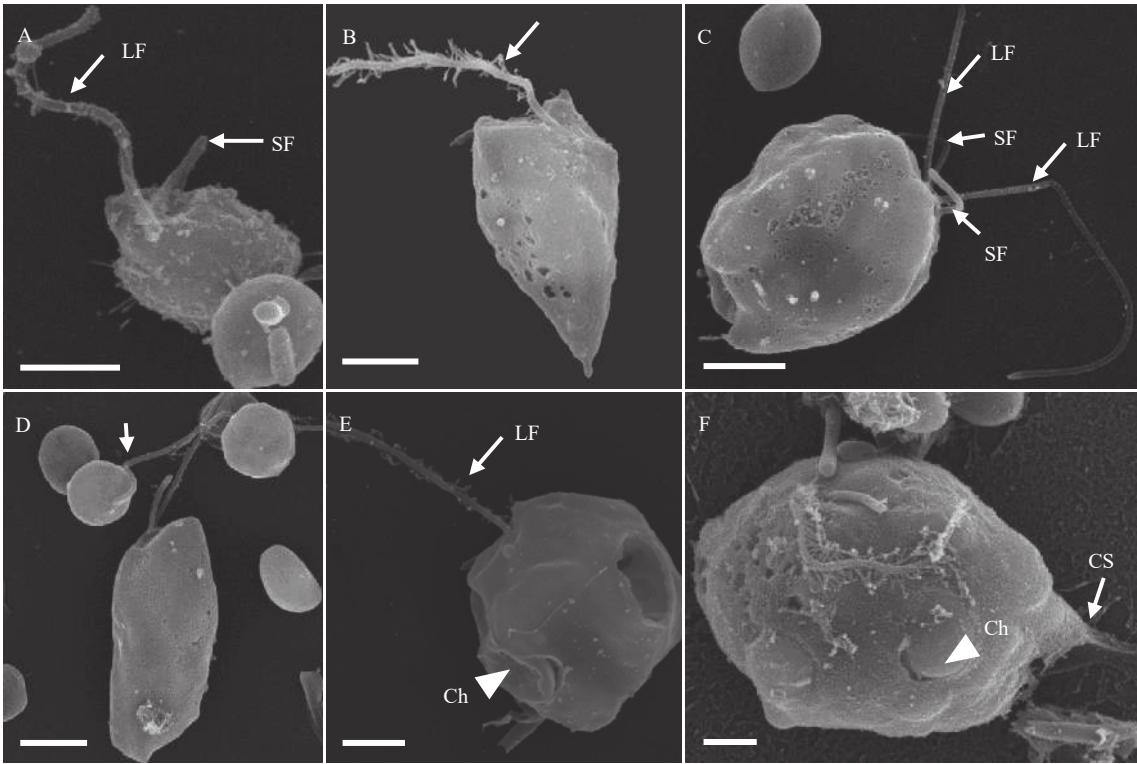


图 2 *P. malhamensis* CMBB008的扫描电镜照片

Fig. 2 Scanning electron micrographs of *P. malhamensis* strain CMBB008

LF. 长鞭毛; SF. 短鞭毛; Ch. 小球藻; CS. 细胞质柄; 标尺 = 2 μm

LF. long flagellum; SF. short flagellum; Ch. *Chlorella*; CS. cytoplasmic stalk. Scale bars = 2 μm

分支中。

在NCBI中金藻纲的*rbcL*序列相对较少, 为获得更准确的系统发育分析, 本研究收集了几乎所有的*Poterioochromonas*的*rbcL*序列构建系统发育树

(图 6), 结果表明基于不同基因的进化树整体拓扑结构略有区别, 但*Poterioochromonas*支的拓扑结构与SSU rDNA基因树表现出一致性, 也分为支持率很高的三个支系。

3 讨论

3.1 *P. malhamensis*的种间形态学比较

基于详细的形态学观察, 本研究分离的CMBB008株系与最早对*P. malhamensis*的描述几乎是一致的^[18, 19], 特征如下: 细胞呈球形或卵形, 有一个或两个二裂片状的叶绿体, 没有眼点, 有两根不等鞭毛和鞭毛附近的伸缩泡, 细胞后部的金藻多糖液泡及特殊的囊壳结构。BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对结果表明CMBB008与模式株SAG933-1a是同一个种(SSU rDNA-ITS基因序列相似度99.76%)。因此形态学和分子数据均支持本研究中分离自亚利桑那小球藻培养的鞭毛藻为*P. malhamensis*。

到目前为止, *Poterioochromonas*属仅报道3个种, 分别是*P. malhamensis*^[19]、*P. stipitata*^[17]和*P. nutans*^[39]。然而有关这3个物种的区分存在争议, 每个物种都找不到一个在形态上可以与其他物种区分的明显特征^[19]。*P. stipitata* Scherffel为该属模式种, 单细胞, 球形或长条形。细胞7—10 μm , 长鞭毛长达20 μm , 长鞭毛是短鞭毛的2.5倍长。一个叶绿体, 无眼点。有杯状囊壳, 囊壳后端有一条细而中空的柄^[17]。*P. nutans*的囊壳比*P. stipitata*更宽和浅, 有1—3个叶绿体^[39]。Péterfi^[19]认为*P. malhamen-*

*sis*和*P. stipitata*可能属于同种异名, 但缺少更多数据的支持。后来Peck^[30]认为*P. malhamensis*囊壳柄的基部为单一的足, 少数足具2条分支, 而*P. stipitata*的足具3条或多于3条分支, 此特征可用于区分*P. malhamensis*和*P. stipitata*。本研究针对前人研究中争议比较大的叶绿体数目和囊壳形态这两个特征进行了深入的观察比较。

叶绿体数目一直是*Poterioochromonas*分类学研究者广泛关注且存在争议的一个特征。根据Pringsheim对*P. malhamensis*的模式株SAG933-1a的描述, 该物种叶绿体的大小和颜色变化较大, 一个叶绿体由两个部分连接而成^[18], 但对于同一株系, Péterfi^[19]观察到1—3个叶绿体或者更多。*P. nutans*也有1—3个叶绿体^[39], 而*P. stipitata*有1个^[17]或2个^[22](表1)。本研究经过对大量细胞的观察, 发现*P. malhamensis* SAG933-1a的叶绿体有1—2个, *P. malhamensis* CCMP3181和*P. stipitata* CCMP1862通常只有1个叶绿体, 而CMBB008的叶绿体与SAG933-1a类似, 有1—2个。此外, 本研究通过透射电镜的观察(图4B), 发现*P. malhamensis*处于吞噬营养状态时叶绿体会变小, 表明叶绿体数目和大小在不同营养状态下也会有所变化, 这与前人的研究一致^[15, 21]。为此, 我们推断叶绿体数目的变异性在不同种甚至是同一物种的不同株系或者同一株系的

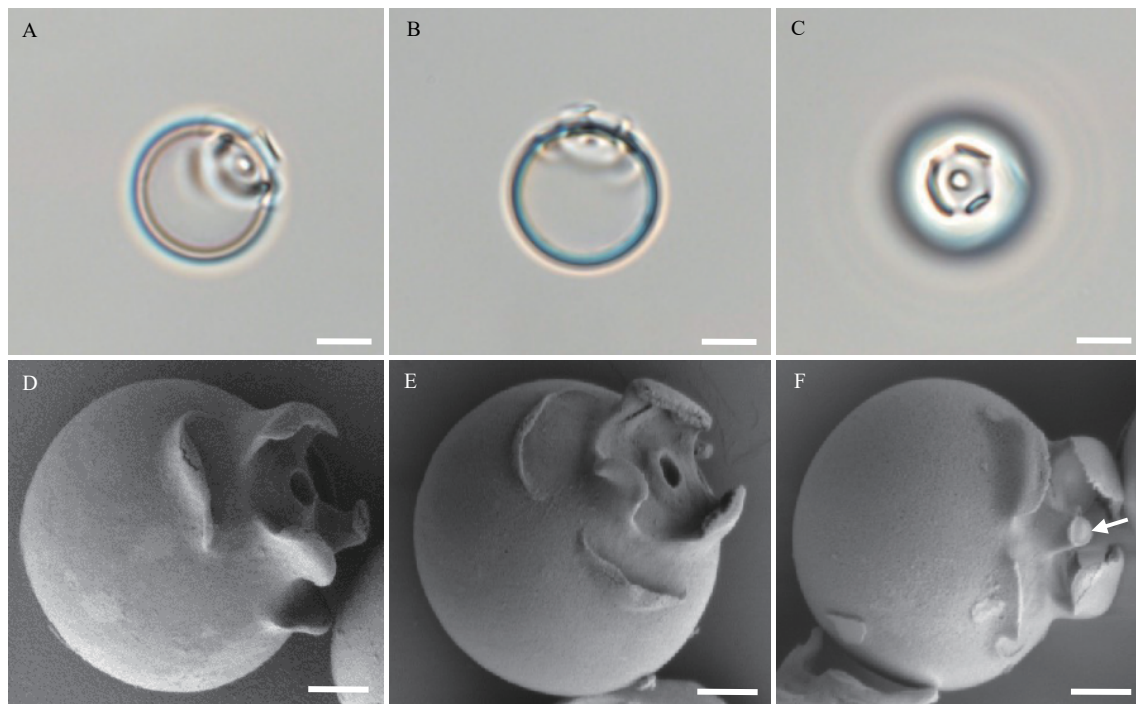


图3 *P. malhamensis* CMBB008胞囊形态

Fig. 3 Morphology of stomatocysts of *P. malhamensis* strain CMBB008

A—C. 光镜照片; D—F. 扫描电镜照片; 图F中箭头表示孔塞; 标尺: A—C为5 μm ; D—F为2 μm

A—C. Light micrographs; D—F. Electron micrographs. Arrow in F represents plug in pore. Scale bars: 5 μm for A—C, 2 μm for D—F

不同营养时期中普遍存在, 因此不适合用叶绿体数目来进行*Poterioochromonas*不同物种之间的区分。

另外, 学者们普遍认为囊壳是鉴定*Poterioochromonas*的重要结构^[23]。然而在*P. malhamensis*的物种鉴定过程中, 有些被鉴定为*P. malhamensis*的物种完全没有观察到囊壳结构, 即使是*P. malhamensis*的模式株SAG933-1a, 其囊壳也被观察到时有时无, 这给其分类带来很大困扰。因此有学者怀疑*Poterioochromonas*中含有一些没有囊壳的物种^[23], 如果该结论成立, 则该属的形态特征描述需要重新定义。为此, 我们对所分离的CMBB008以及从不同保藏中心收集的*P. malhamensis* SAG933-1a、CCMP3181和*P. stipitata* CCMP1862的囊壳进行了详细的观察, 发现它们都具有囊壳, 表明囊壳是*P. malhamensis*或*Poterioochromonas*的基本结构。虽然该结果仅仅是基于四个株系的观察, 但是

仍具有重要的意义。将我们的研究方法和前人进行比较, 有两个问题值得引起注意: 首先, *Poterioochromonas*具有两种形态, 即不含囊壳的游动细胞形态和具有囊壳的有柄固着形态, 在培养过程中细胞大多是以游离的形式存在, 此时很难观察到囊壳, 因此给物种鉴定带来困难, 而已有研究几乎都是根据游离细胞的观察判断是否含有囊壳。在本研究中我们发现, 虽然附着有细胞的囊壳结构很难观察到, 但是没有细胞附着的囊壳却普遍存在且常常出现多个囊壳聚集成簇的现象(图1G和1L)。这些光秃的囊壳柄是细胞游离后留下来的, 由于其主要成分是几丁质^[30], 因此可以在培养物中存在较长的时间, 本研究正是基于这些游离囊壳柄的观察判断细胞含有囊壳结构的。另外, 在本研究中我们采用CW-Eb对囊壳进行染色, 该方法极大提高了囊壳在显微镜下的可视性。虽然早在1980年Herth^[40]已提

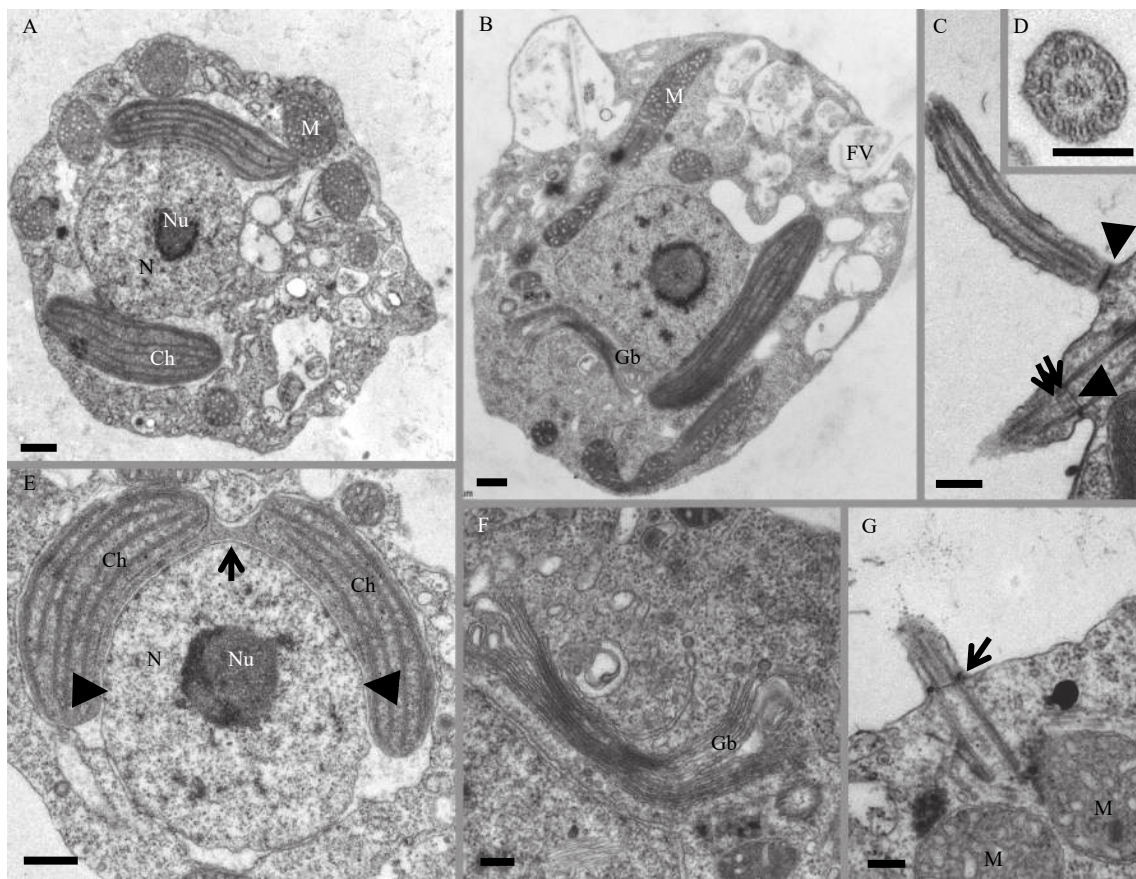


图4 *P. malhamensis* CMBB008的透射电镜照片

Fig. 4 Transmission electron micrographs of *P. malhamensis* strain CMBB008

M. 线粒体; N. 细胞核; Nu. 核仁; Ch. 叶绿体; Gb. 高尔基体; Fv. 食物泡; C. 鞭毛的过渡螺旋(箭头)和过渡区(无尾箭头); E. 两片叶绿体间的桥接(箭头), 叶绿体与细胞核共用外膜(无尾箭头); G. 鞭毛的过渡面(箭头); 标尺: A、B和D为0.5 μm ; C、E—G为0.2 μm

M. Mitochondria; N. Nucleus; Nu. Nucleolus; Ch. Chloroplast; Gb. Golgi body; Fv. Food vacuole. C. The distal transitional helix (arrow) and transition region (arrowhead) of flagella; E. Two lobes of the bilobed chloroplast connected with a slim joint (arrow), and the outermost membrane of the chloroplast continuous with the outer nuclear envelope (arrowheads). G. Transitional plate of flagella (arrow). Scale bars: 0.5 μm for A, B and D, 0.2 μm for C, and E—G

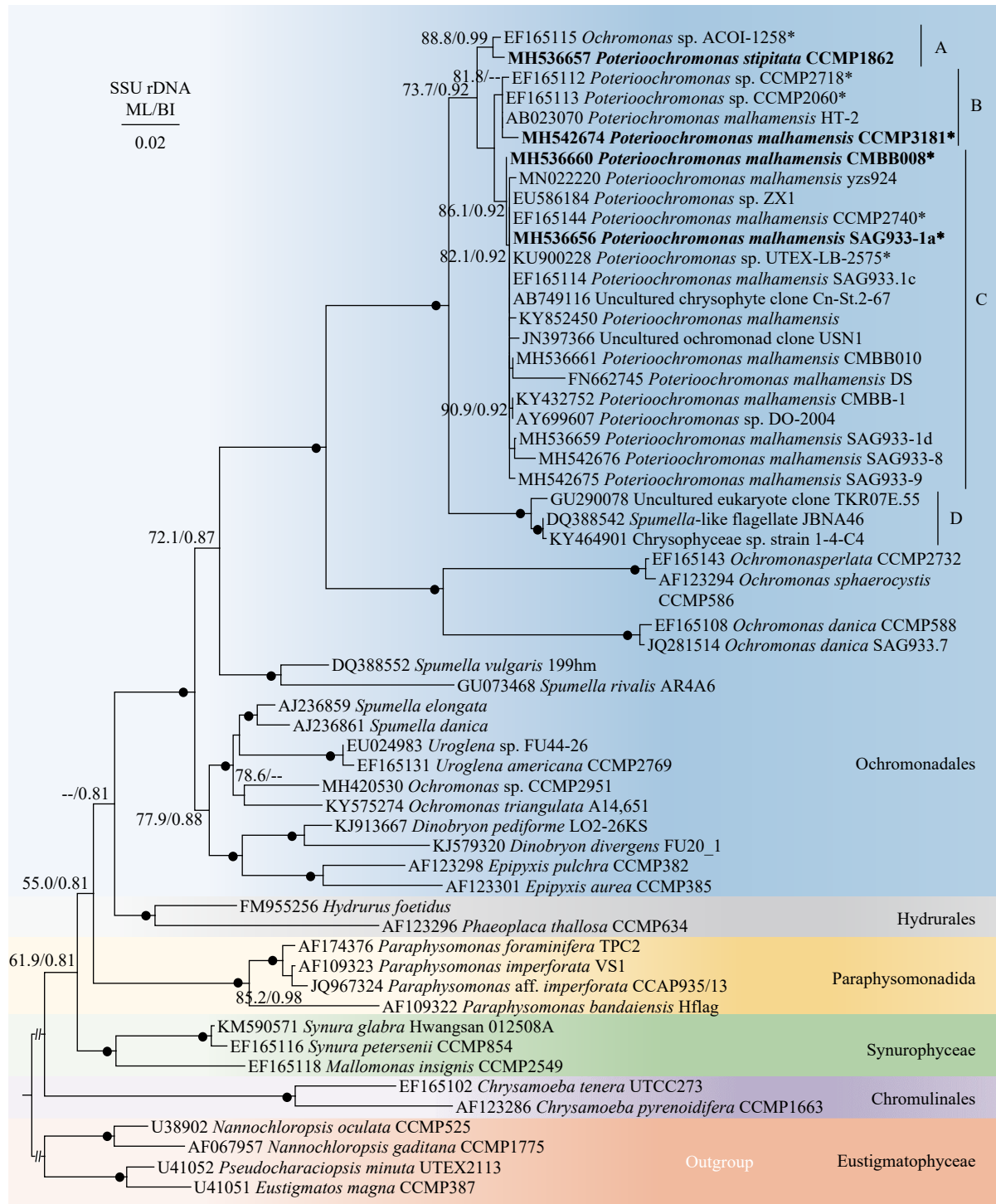


图 5 基于金藻纲SSU rDNA基因序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the SSU rDNA gene sequences of Chrysophyceae

系统发育树利用57条序列共1686个比对的碱基构建, 支持率是基于最大似然法(ML)结合贝叶斯推断(BI)整合而成, 当支持率分别大于50%和0.70时会标注数值, 黑点代表支持率大于等于90%/0.95。选取4个真眼点藻纲的物种作为外类群。星号表示物种原来被鉴定为*Ochromonas*, 参照Andersen等^[23], 将其重命名为*Poterioochromonas* spp.。标尺为0.02 μm , 代表序列差异度是2%

A total of 57 sequences with 1686 aligned characters were used to build the phylogenetic tree. Support values of maximum likelihood (ML) and Bayesian inference methods (BI) were indicated at nodes when they are above 50% and 0.70, respectively. The black circles represent support values at or above 90%/0.95. Two species of Eustigmatophyceae were used as outgroup. The black circles represent support values at or above 90%/0.95. Two species of Eustigmatophyceae were used as outgroup. The asterisks represent species which were previously identified as *Ochromonas* have been re-named as *Poterioochromonas* spp., referring to Andersen, *et al.*^[23]. Scale bar = 0.02 μm , indicating that the sequence divergence is 2%

出可用CW-Eb对*P. malhamensis*的囊壳结构进行有效染色, Peck^[30]也利用该方法对一些金藻的囊壳开展了研究, 但在*Poterioochromonas*的鉴定中并没有得到广泛应用, 有些学者在形态学观察过程中没有利用任何染色^[22], 有些染色方法明显没有CW-Eb效果好^[23]。因此本研究认为所有的*P. malhamensis*都有囊壳, 至少在生活史的某些阶段, 前人没有观察到囊壳结构主要是受限于所使用的方法。我们强

烈建议将CW-Eb染色作为观察*Poterioochromonas*囊壳结构的标准方法, 此外在观察过程中不能仅对游动细胞进行观察, 还要对该细胞的培养物进行全面详细观察, 采样过程中注意对培养器皿底部样品的采集, 以快速确定该细胞是否可以形成囊壳结构。

以上观察表明叶绿体和囊壳在细胞的不同生活史时期其形态表现出较大的变异性, 将其作为

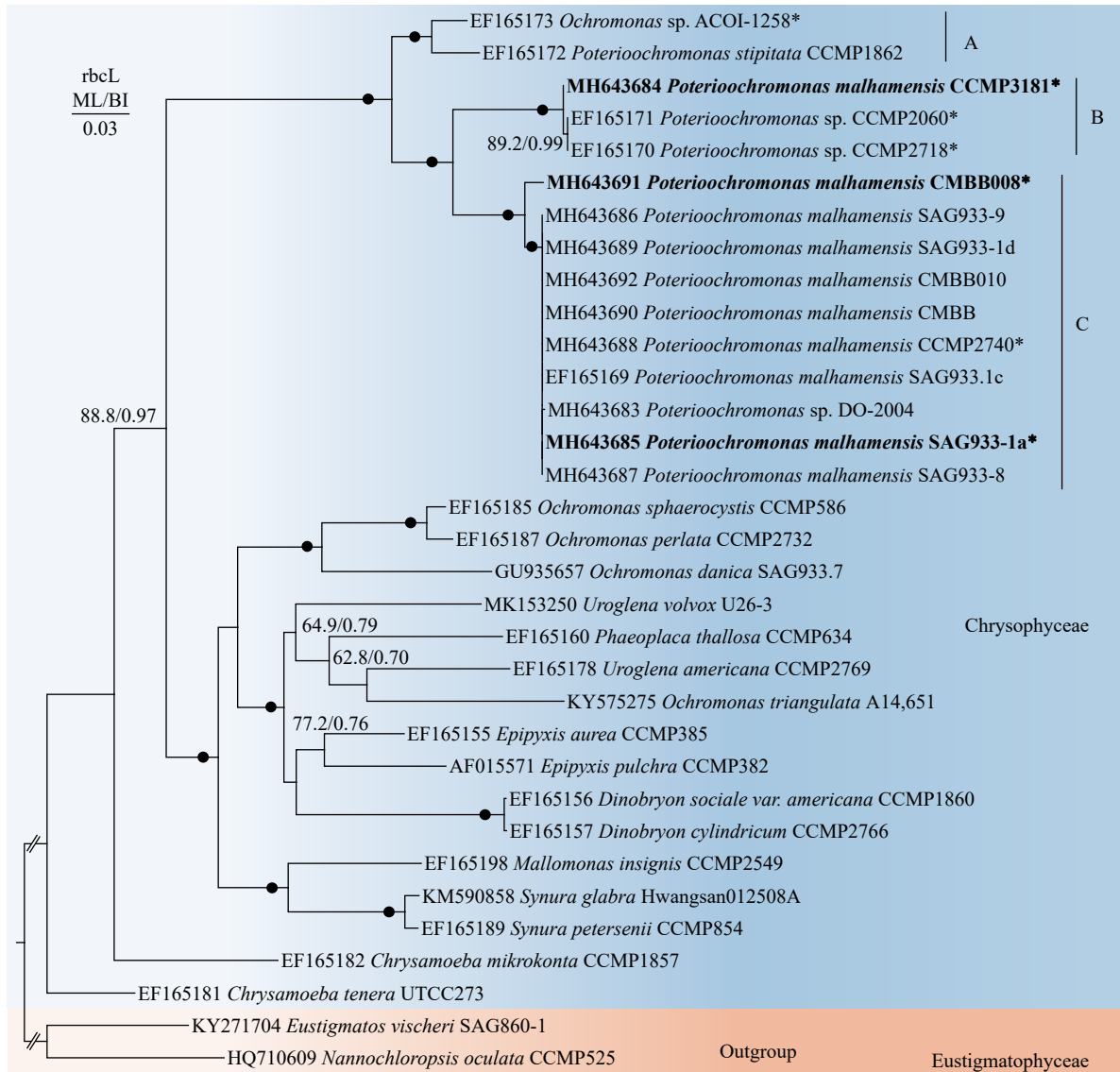


图6 基于金藻纲*rbcL*基因序列的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the *rbcL* gene sequences of Chrysophyceae

系统发育树利用33条序列共914个比对的碱基构建, 支持率是基于最大似然法(ML)结合贝叶斯推断(BI)整合而成, 当支持率分别大于50%和0.70时会标注数值, 黑点代表支持率大于等于90%/0.95。选取2个真眼点藻纲的物种作为外类群。星号表示物种原来被鉴定为*Ochromonas*, 参照Andersen等^[23], 将其重命名为*Poterioochromonas* spp.。标尺为0.03 μm, 代表序列差异度是3%

A total of 33 sequences with 914 aligned characters were used to build the phylogenetic tree. Support values of maximum likelihood (ML) and Bayesian inference methods (BI) were indicated at nodes when they are above 50% and 0.70, respectively. The black circles represent support values at or above 90%/0.95. Four species of Eustigmatophyceae were used as outgroup. The asterisks represent species which were previously identified as *Ochromonas* have been re-named as *Poterioochromonas* spp., referring to Andersen, *et al.*^[23]. Scale bar = 0.03 μm, indicating that the sequence divergence is 3%

*Poterioochromonas*属不同物种之间的区分标志存在很大困难, 为此, 本研究试图通过对形态上更为稳定的胞囊的观察, 为该属的物种鉴定寻找更为稳定的结构特征。胞囊是细胞在饥饿状态下形成以抵御不良环境, 前人在鉴定与*Poterioochromonas*形态相似的*Ochromonas*属时, 认为胞囊形态比游泳细胞的形态更稳定可靠^[41, 42]。此前, 仅Andersen等^[23]对两株*Poterioochromonas*未定种(CCMP2060和CCMP2718)的胞囊形态进行报道。本研究通过扫描电镜详细观察了CMBB008的胞囊(图 3), 发现其与上述两个物种的领状结构有很大不同, 此外本研究观察到CMBB008的胞囊具有孔塞, 该结构在前两株研究中没有被发现。考虑到胞囊结构在不同株系间的显著区别, 它很有可能作为种间区分的有效特征。然而, 目前有描述胞囊结构的株系非常少, 因此后续需要对更多*Poterioochromonas*的胞囊结构进行全面观察, 以证明胞囊结构是否有*Poterioochromonas*种间区分的潜力。

3.2 *P. malhamensis*的种内形态学比较

在*Poterioochromonas*属中, 虽然仅有3个物种, 但是*P. malhamensis*无疑是最受关注而且是报道最多的物种。将本研究中的CMBB008与*P. malhamensis*其他种群比较, 发现不同种群细胞大小相似, 但是囊壳变化较为明显(表 1)。CMBB008的囊壳长度总体小于模式株SAG933-1a(18.3—47.5 μm vs. 37.2—129.9 μm), 而且*P. malhamensis*的囊壳长度总体大于*P. stipitata*(12—130 μm vs. 10—24 μm)。除囊壳长度外, 比较研究结果表明, CMBB008的囊壳杯状较深且宽(8.0 μm 深和9.4 μm 宽), SAG 933-1a适中(6.7 μm 深和7.8 μm 宽), 而*P. stipitata*较浅而窄(5.0 μm 深和6.0 μm 宽)。总的来说, *P. stipitata*的囊壳杯状比*P. malhamensis*更小。另一点需要注意的是, 本研究所测量的SAG933-1a囊壳比前人的描述显著更长(37.2—129.9 μm vs. 10—40 μm), 囊壳的杯状形态也稍有区别(表 1)。因为囊壳具有重要的生态学作用^[30], 并存在形态可塑性, 据报道室内培养超过30年的*P. malhamensis*相比于新分离的株系在形态学和生理学上都会对环境产生不同的响应^[43], 因此长期在实验室培养可能导致囊壳形态发生改变。总之, 仅通过形态学特征难以区分不同种群, 后期有待寻找合适的分子标记以对种群进行有效区分。

3.3 *Poterioochromonas*的系统发育分析

关于*Poterioochromonas*的系统发育研究, 以前的报道数据十分有限。此外, 由于*Ochromonas*个体微小, 结构简单, 且与*Poterioochromonas*形态极为

相似, 主要区别在于后者具有囊壳结构。由于在早期研究中, 囊壳结构的染色方法没有得到很好的应用, 导致很多本应属于*Poterioochromonas*的物种被错误鉴定为*Ochromonas*。因此在进化树中*Poterioochromonas*常常与*Ochromonas*类群分布在一起^[24, 28], 导致这两个属系统发育关系的混淆。本研究从NCBI收集了近缘物种的基因序列进行分析, 结果证实所有的*Poterioochromonas*聚在一起(分支A+B+C)且与*Ochromonas*分开(图 5和图 6), 表明*Poterioochromonas*是单系发生的。在进化树中, *Poterioochromonas*分支先与3个来自环境样品的未鉴定种聚为一支, 然后与*Ochromonas*分支聚在一起, 推测含环境样品的分支可能是*Poterioochromonas*与*Ochromonas*的过渡阶段。

如上所述, 依据形态特征, 目前*Poterioochromonas*属只有三个有效种, 除了研究较多的*P. malhamensis*外, *P. stipitata*和*P. nutans*由于没有模式标本和模式株保存, 这两个种的确凿性仍值得怀疑。有趣的是, 在本研究中, SSU rDNA和*rbcL*基因树的*Poterioochromonas*支中也显示了三个明显的分支(图 5)。SSU rDNA树中*Poterioochromonas*中的大部分株系聚在*P. malhamensis*模式株SAG933-1a所在的分支C, 表明已报道的*Poterioochromonas*株系大部分为*P. malhamensis*。意外的是, 本研究中基于两种基因构建的进化树均表明CMBB008和*P. malhamensis* SAG933-1a所在的分支有一定的距离, 且支持率较高(SSU rDNA树中ML/BI = 86.1%/0.92, *rbcL*树中ML/BI > 90%/0.95)。由于CMBB008和SAG933-1a在形态上很难区分, 虽然我们发现它们囊壳柄的长度存在一定差异, 但是由于该结构受环境因子影响较大, 而且针对SAG933-1a自身而言, 其长度变化也存在很大差异, 所以目前暂时不能作为区分两者的标志。此外, 两者的SSU rDNA基因序列1769 bp中只有2个碱基差异, 相似度高达99.89%, 因此不建议鉴定为其他物种。本研究仍将分支C中的CMBB008鉴定为*P. malhamensis*, 后续需要更多基因标记或基因组学信息进行进一步确认。分支C中还包括几株未定种, 例如分离自微囊藻的*Poterioochromonas* sp. DO-2004^[22]、ZX1^[20]及UTEX-LB-2575, 还有一些分离自环境样品的克隆。这些物种由于缺乏全面的形态特征描述, 以及缺乏模式株序列作为参考, 因此很难鉴定到种。本研究以*P. malhamensis*的模式株SAG933-1a作为参考, 由于它们的相似度非常高, 因此可以将上述未定物种鉴定为*P. malhamensis*。另一个物种*P. stipitata* CCMP1862位于分支A, 同Andersen^[25]构建的

系统发育树一样, *P. stipitata* CCMP1862总是与*Poterioochromonas* sp. ACOI-1258聚为一支, 说明ACOI-1258可能为*P. stipitata*。然而, *P. stipitata* CCMP1862并不是分离自*Poterioochromonas*模式种*P. stipitata* Scherffel的来源地, 所以不能确定CCMP 1862所在的分支A是否可以代表*P. stipitata*。因此后续有待于从模式种来源地收集*P. stipitata*并进行详细和准确的鉴定, 以对*P. stipitata*的有效性进行最终确认。此外, 意外的是被鉴定为*P. malhamensis*的CCMP3181并没有分布在分支C中, 而是与*P. malhamensis* HT-2和两株*Poterioochromonas*的未定种形成另一分支(分支B)。结合CCMP3181在形态上不同于其他*P. malhamensis*的特性, 如单个叶绿体和频繁产生胞囊(表 1), 认为将该株系鉴定为*P. malhamensis*有待怀疑, 后续更多来自B类群的形态学和分子数据将有利于阐述这一疑点。

4 总结

本文对一株危害小球藻的*P. malhamensis*进行了详尽的光学和超微结构描述以及分子系统发育研究。首次揭示该物种胞囊的扫描电镜结构, 并推测胞囊结构可作为*Poterioochromonas*属种间区分的特征。此外, 囊壳是用来鉴定*Poterioochromonas*的重要特征, 建议将CW- Eb染色作为观察囊壳的标准方法。SSU rDNA和*rbcL*基因构建的进化树均表明*Poterioochromonas*属是单系的, 且*Poterioochromonas*分支分为三支, 预示着这些类群可能涵盖三个种。在下一步的工作中, 亟需获得更多株系尤其是模式株的形态, 分子序列以及基因组或转录组数据, 以对该类群的物种多样性进行全面厘清。

致谢:

感谢华盛顿大学Robert A. Andersen对本文提出宝贵的修改意见。

参考文献:

- [1] Stoecker D K. Conceptual models of mixotrophy in planktonic protists and some ecological and evolutionary implications [J]. *European Journal of Protistology*, 1998, **34**(3): 281-290.
- [2] Esteban G F, Fenchel T, Finlay B J. Mixotrophy in ciliates [J]. *Protist*, 2010, **161**(5): 621-641.
- [3] Sanders R W, Porter K G, Caron D A. Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis* [J]. *Microbiology Ecology*, 1990, **19**(1): 97-109.
- [4] Wei Y X. Flora algarum sinicarum aquae dulcis, tomus XXI, Chrysophyta (II) [M]. Beijing: Science Press, 2018: 22-24. [魏印心. 中国淡水藻志, 第二十一卷, 金藻门(II) [M]. 北京: 科学出版社, 2018: 22-24.]
- [5] Kristiansen J, Kaloud P. Chrysophyta [M]. Handbook of the Protists. Springer International Publishing, 2017: 331-366.
- [6] Beisser D, Graupner N, Bock C, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis provides new insights into nutritional strategies and phylogenetic relationships of chrysophytes [J]. *Peer J*, 2017(5): e2832.
- [7] Graupner N, Jensen M, Bock C, *et al.* Evolution of heterotrophy in chrysophytes as reflected by comparative transcriptomics [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, **94**(4): fty9.
- [8] Kaus H. Sensing of volume changes by *Poterioochromonas* involves a Ca^{2+} -regulated system which controls activation of isofluidoside-phosphate synthase [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1981, **68**(2): 420-424.
- [9] Kaus H. Volume regulation in *Poterioochromonas*: involvement of calmodulin in the Ca^{2+} -stimulated activation of isofluidoside-phosphate synthase [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1983, **71**(1): 169-172.
- [10] Zhang X, Watanabe M M. Grazing and growth of the mixotrophic Chrysomonad *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) feeding on algae [J]. *Journal of Phycology*, 2001, **37**(5): 738-743.
- [11] Blom J F, Pernthaler J. Antibiotic effects of three strains of chrysophytes (*Ochromonas*, *Poterioochromonas*) on freshwater bacterial isolates [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, **71**(2): 281-290.
- [12] Ou D Y, Song L R, G an, N Q, *et al.* Effects of microcystins on and toxin degradation by *Poterioochromonas* sp. [J]. *Environmental Toxicology*, 2005, **20**(3): 373-380.
- [13] Zhang X, Hu H Y, Men Y J, *et al.* Feeding characteristics of a golden alga (*Poterioochromonas* sp.) grazing on toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* [J]. *Water Research*, 2009, **43**(12): 2953-2960.
- [14] Wang Y, Gong Y C, Dai L L, *et al.* Identification of harmful protozoa in outdoor cultivation of *Chlorella* and the use of ultrasonication to control contamination [J]. *Algal Research*, 2018(31): 298-310.
- [15] Ma M Y, Gong Y C, Hu Q. Identification and feeding characteristics of the mixotrophic flagellate *Poterioochromonas malhamensis*, a microalgal predator isolated from outdoor massive *Chlorella* culture [J]. *Algal Research*, 2018(29): 142-158.
- [16] Touloupakis E, Cicchi B, Benavides A M S, *et al.* Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.) [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, **100**(3): 1333-1341.
- [17] Scherffel A. Kleiner Beitrag zur Phylogenie einiger Gruppen niederer Organismen [J]. *Botanische Zeitung*,

- 1901(59): 143-158.
- [18] Pringsheim E. On the nutrition of *Ochromonas* [J]. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 1952, **3**(21): 71-96.
- [19] Péterfi L S. Fine structure of *Poterioochromonas malhamensis* (Pringsheim) comb. nov. with special reference to the lorica [J]. *Nova Hedwigia*, 1969(17): 93-103.
- [20] Zhang X, Hu H Y, Hong Y, *et al.* Isolation of a *Poterioochromonas* capable of feeding on *Microcystis aeruginosa* and degrading microcystin-LR [J]. *FEMS Microbiology Letter*, 2008, **288**(2): 241-246.
- [21] Tarayre C, Bauwens J, Brasseur C, *et al.* Isolation of an amylolytic chrysophyte, *Poterioochromonas* sp., from the digestive tract of the termite *Reticulitermes santonensis* [J]. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*, 2014, **18**(1): 19-31.
- [22] Guo S J, Song L R. Observation on *Poterioochromonas* sp. (Chrysophyte) [J]. *Journal of Water Resource and Protection*, 2010, **2**(6): 592-596.
- [23] Andersen R, Graf L, Malakhov Y, *et al.* Rediscovery of the *Ochromonas* type species *Ochromonas triangulata* (Chrysophyceae) from its type locality (Lake Veysove, Donetsk region, Ukraine) [J]. *Phycologia*, 2017, **56**(6): 591-604.
- [24] Feng J, Zhang X J, Wang G H, *et al.* Morphology and phylogenetic relationships of the chrysophytes associated with two mosses [J]. *Symbiosis*, 2016, **69**(3): 151-159.
- [25] Andersen R A. Molecular systematics of the Chrysophyceae and Synurophyceae [M]//Brodie J, Lewis J (Eds.), *Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics*. Wales: Taylor and Francis, 2007: 285-313.
- [26] Andersen R A, Peer Y V D, Potter D, *et al.* Phylogenetic analysis of the SSU rRNA from members of the Chrysophyceae [J]. *Protist*, 1999, **150**(1): 71-84.
- [27] Boenigk J, Pfandl K, Stadler P, *et al.* High diversity of the 'Spumella-like' flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions [J]. *Environmental Microbiology*, 2005, **7**(5): 685-697.
- [28] Bock C, Chatzinotas A, Boenigk J. Genetic diversity in chrysophytes: Comparison of different gene markers [J]. *Journal of the Czech Phycological Society*, 2017, **17**(2): 209-221.
- [29] Kato S. Laboratory culture and morphology of *Colacium vesiculosum* Ehrb. (Euglenophyceae) [J]. *The Japanese Journal of Phycology*, 1982(30): 63-67.
- [30] Peck R K. Structure of lorica and stalks of several bacterivorous Chrysomonads (Chrysophyceae): Taxonomical importance and possible ecological significance [J]. *Protist*, 2010, **161**(1): 148-159.
- [31] Rumin J, Bonnefond H, Saint-Jean B, *et al.* The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, **8**(1): 42.
- [32] Gong Y, Patterson D J, Li Y, *et al.* *Vernalophrys algivore* gen. nov., sp. nov. (Rhizaria: Cercozoa: Vampyrellida), a new algal predator isolated from outdoor mass culture of *Scenedesmus dimorphus* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, **81**(12): 3900-3913.
- [33] Holen A D. Chrysophyte stomatocyst production in laboratory culture and descriptions of seven cyst morphotypes [J]. *Phycologia*, 2014, **53**(5): 426-432.
- [34] Fokam Z, Ngassam P, Strüder-Kypke M C, *et al.* Genetic diversity and phylogenetic position of the subclass Astomatia (Ciliophora) based on a sampling of six genera from West African oligochaetes (Glossoscolecidae, Megascolecidae), including description of the new genus *Paraclausilocola* n. gen [J]. *European Journal of Protistology*, 2011, **47**(3): 161-171.
- [35] 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.
- [36] Gouy M, Guindon S & Gascuel O. SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2010, **27**(2): 221-224.
- [37] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, *et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 [J]. *Systematic Biology*, 2010, **59**(3): 307-321.
- [38] Huelsenbeck J P, Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**(8): 754-755.
- [39] Jane F W. XXXVI.-Observations on some British Chrysomonads-I. *Poterioochromonas nutans*, sp. n [J]. *Journal of Natural History*, 1944, **11**(77): 340-344.
- [40] Herth W. Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poterioochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation [J]. *Journal of Cell Biology*, 1980, **87**(2): 445-450.
- [41] Hibberd D J. Ultrastructure of cyst formation in *Ochromonas tuberculata* (Chrysophyceae) [J]. *Journal of Phycology*, 1977, **13**(4): 309-320.
- [42] Andersen R A. A light and electron microscopical investigation of *Ochromonas sphaerocystis* Matvienko (Chrysophyceae): the statospore, vegetative cell and its peripheral vesicles [J]. *Phycologia*, 1982, **21**(3): 390-398.
- [43] Holen D A. Effects of prey abundance and light intensity on the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis* from a mesotrophic lake [J]. *Freshwater Biology*, 1999, **42**(3): 445-455.

REDESCRIPTION OF MIXOTROPHIC *POTERIOOCHROMONAS MALHAMENSIS* AND ITS PHYLOGENETIC ANALYSIS

CHEN Man^{1,2}, MA Ming-Yang¹, WANG Hong-Xia¹, HU Qiang¹ and GONG Ying-Chun¹

(1. Center for Microalgal Biotechnology and Biofuels, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Poterioochromonas malhamensis* is a typical mixotrophic single-celled flagellate. Due to its small size and variable morphology, the correct identification of this flagellate is still challenging. So far, there is no detailed morphological description for the species. In this study, one algae-grazing flagellate from *Chlorella* mass culture was isolated, which was identified as *P. malhamensis* CMBB008. Through fluorescence dyeing, scanning and transmission electronic microscopy, the morphological features were described in detail. In addition, SSU rDNA and *rbcL* gene sequences were also obtained to investigate phylogenetic position of this species. Based on previous morphological description, the morphology of lorica and chloroplast was documented: lorica length varied between 18.3—47.5 μm , the cup width was 8.5—11.3 μm , the cup depth was 6.3—10.7 μm , and the strain has one or two connected bilobed chloroplast. Using light and scanning electronic microscopy, siliceous cyst was firstly reported: a unique trilaminar collar and plug on the top. In addition, some primary organelles and metabolite such as oil droplets and chrysolaminarin vacuole were observed. Comparing different species and strains, the results revealed that lorica and chloroplast, which were regarded as important features of *Poterioochromonas*, were not suitable for identification of *P. malhamensis* because of high variable morphology. However, the cyst morphology was a candidate feature for species differentiation in *Poterioochromonas*. Molecular phylogenetic analysis showed that all strains of *Poterioochromonas* clustered in a clade supporting the genus was monophyly. *P. malhamensis* and *P. stipitata* formed sister clades in big clade of *Poterioochromonas*, and clade *Poterioochromonas* also divided in two sister clades, in which CCMP3181 probably be a species different from *P. malhamensis*. The study provides complete morphological and molecular data for *P. malhamensis* and valuable reference for the genus of *Poterioochromonas* in morphology and phylogeny.

Key words: *Poterioochromonas malhamensis*; Identification; Cyst; Lorica; Phylogeny