

聚果蜈蚣藻的修订——基于形态观察、早期发育及分子序列分析

温馨 卞瑶 张昕陶 马跃 王晨 王宏伟

RESEARCH ON THE REVISION OF *G. SOROCARPUS* LI ET DING BASED ON MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS, EARLY DEVELOPMENT AND MOLECULAR ANALYSES

WEN Xin, BIAN Yao, ZHANG Xin-Tao, MA Yue, WANG Chen, WANG Hong-Wei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.157>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

对枝蜈蚣藻的修订研究——基于形态特征和基因序列分析

RESEARCH ON THE REVISION OF *GRATELOUPIA DIDYMECLADIA* LI ET DING BASED ON MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS AND MOLECULAR ANALYSES

水生生物学报. 2017, 41(6): 1273–1281 <https://doi.org/10.7541/2017.158>

黏管藻的分子鉴定与生长特性研究

MOLECULAR CHARACTERISTICS AND GROWTH STATUS OF *GLOIOSIPHONIA CAPILLARIS*

水生生物学报. 2019, 43(5): 1122–1131 <https://doi.org/10.7541/2019.132>

东北七鳃鳗早期发育研究

THE EARLY DEVELOPMENT OF *LAMPETRA MORII*

水生生物学报. 2019, 43(4): 814–824 <https://doi.org/10.7541/2019.096>

西藏双须叶须鱼早期发育特征

CHARACTERISTICS OF EARLY DEVELOPMENT OF *PTYCHOBARBUS DIPOGON* IN XIZANG AUTONOMOUS REGION

水生生物学报. 2019, 43(5): 1041–1055 <https://doi.org/10.7541/2019.123>

西藏巨须裂腹鱼早期发育特征

CHARACTERISTICS OF EARLY DEVELOPMENT OF *SCHIZOTHORAX MACROPOGON* IN XIZANG AUTONOMOUS REGION, CHINA

水生生物学报. 2019, 43(2): 367–378 <https://doi.org/10.7541/2019.046>

壮体沙鳅早期发育及红水河来宾江段资源补充量评估

EARLY MORPHOGENESIS AND ESTIMATION OF RESOURCES OF *BOTIA ROBUSTA* IN THE LAIBIN SECTION OF HONGSHUIHE RIVER

水生生物学报. 2019, 43(4): 841–846 <https://doi.org/10.7541/2019.099>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.157

聚果蜈蚣藻的修订——基于形态观察、早期发育及分子序列分析

温馨^{1*} 卞瑶^{1,2*} 张昕陶¹ 马跃¹ 王晨¹ 王宏伟^{1,2}

(1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116081; 2. 辽宁师范大学, 辽宁省植物生物技术重点实验室, 大连 116081)

摘要: 基于分子辅助的形态分类学方法, 将采自山东省青岛市(模式标本产地)的聚果蜈蚣藻(*Grateloupia sorocarpus* Li et Ding)在蜈蚣藻属中的分类地位进行重新鉴定, 结果表明: (1) 藻体直立, 单生或丛生, 质地黏滑软骨质, 紫红色, 高5—15 cm, 主枝宽1.5—2 mm, 厚约1 mm, 1—2回羽状分枝, 具有扁平或棍棒状的小羽枝, 小枝基部缢缩, 对生、互生或偏生。(2) 雌配子体的生殖结构为典型的*Grateloupia*型, 果胞枝生殖枝从主枝和辅助细胞生殖枝从主枝分别由6个细胞和5个细胞组成(6cpb-5auxb型); 四分孢子体表面散落分布四分孢子囊, 呈十字形分裂。以上形态学特征均与亚洲蜈蚣藻(*G. asiatica* Kawaguchi et Wang)一致。(3) 聚果蜈蚣藻孢子的早期发育类型为“间接盘状体”型, 与亚洲蜈蚣藻一致。(4) 基于*rbcL*基因序列分析结果显示, 本研究的8个聚果蜈蚣藻样本之间无碱基差异, 与产自中国山东青岛和辽宁大连的亚洲蜈蚣藻无碱基差异, 形成独立的进化支, 与产自韩国的亚洲蜈蚣藻碱基差异为2 bp(0.124%), 与产自日本的亚洲蜈蚣藻碱基差异为3 bp(0.248%), 属于种内差异; 基于*COI*基因序列构建的系统树显示, 本研究的8个聚果蜈蚣藻样本之间无碱基差异, 与产自韩国和日本的亚洲蜈蚣藻无碱基差异, 形成独立的进化支。根据形态学与分子系统学相结合的分类学方法, 证实聚果蜈蚣藻为亚洲蜈蚣藻的同物异名。

关键词: 聚果蜈蚣藻; 形态观察; 早期发育; 分子分析; 分类修订

中图分类号: S949.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)06-1331-10



蜈蚣藻属(*Grateloupia* C. Agardh)是海膜科(Halymeniaceae)最大的属, 在中国共报道了36个种^[1-11], 广泛分布于我国暖温带、亚热带和热带沿海。该属很多种外部形态差异很大, 种的区分和鉴定很困难。《中国海藻志》中记载的大部分蜈蚣藻属海藻仅仅是依据外部形态所建立的新种, 很多种的分类地位还未确定。如今, 分子系统学的快速发展, 使得分子辅助的形态分类学(MAAT)逐渐兴起, 该方法也逐渐地应用于红藻分类研究上^[12-14]。2001年, Kawaguchi等^[6]采用形态学和*rbcL*基因序列分析相结合的方法对产自意大利和亚洲的*G. filicina* (Lamouroux) C. Agardh进行了详细研究, 发现二者在外部形态上虽具有一定的相似性但实际上是2个独立的种, 并提出1新种, 命名为亚洲蜈蚣藻(*G. asiatica* Kawaguchi et Wang), 模式标本产地为日本福冈

县。李芳等^[15]和刘芳等^[16]采用形态分类学的方法对李伟新等^[1]基于形态学特征建立的2个新种帚状蜈蚣藻(*G. fastigiata* Li et Ding)和对枝蜈蚣藻(*G. didymecladia* Li et Ding)进行再鉴定, 发现这2个新种实际上分别是亚洲蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻(*G. subpectinata*)的同物异名。由此可见, 在藻类分类学的研究中, 分子分析手段的加入, 可以来验证经典分类学的准确性, 为海藻分类学中已知种的鉴定提供了重要依据。

本研究的聚果蜈蚣藻(*G. sorocarpus* Li et Ding)记载于《中国海藻志》(2004)第二卷第三册中^[1], 对该种的描述为: 藻体主枝较硬, 小羽枝一般密集在分枝中部, 小枝棍棒状或扁平, 基部缢缩, 髓丝交接处呈哑铃状, 成熟囊果聚集在一起呈瘤状, 是由李伟新等^[1]基于囊果的形态及分布状态等简单的形

收稿日期: 2020-07-07; 修订日期: 2020-10-28

基金项目: 国家自然科学基金(31200521和31570209)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270251 and 31570209)]

作者简介: 温馨(1997—), 女, 硕士研究生; 主要从事海藻生态学研究。E-mail: 2237219353@qq.com 卞瑶(1988—), 女, 博士; 主要从事植物细胞发育研究。E-mail: high88.by@163.com *共同第一作者

通信作者: 王宏伟(1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师; 主要从事海藻分类及分子系统学研究。E-mail: kitamiwang@163.com

态学特征对采自中国山东省青岛市的雌配子体进行研究并建立的新种。为了验证仅依据简单的外部形态而提出的聚果蜈蚣藻的分类地位是否可靠,有必要对其形态、结构、孢子发育类型和基因序列分析进行详细的研究,将聚果蜈蚣藻的分类地位进行重新鉴定。研究结果将明确聚果蜈蚣藻的分类学地位,为蜈蚣藻属海藻的早期发育过程提供更详细的信息并对中国的蜈蚣藻属海藻的修订和重新分类提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 材料的采集、处理及观察

标本的采集: 2018年5月至2019年5月期间多次进行聚果蜈蚣藻的采集,采集地点位于模式标本产地山东省青岛市的第一海水浴场(120°20'30.275"E, 36°3'27.202"N)、麦岛(120°23'46.644"E, 36°18'26.784"N)和鲁迅公园(120°19'58.555"E, 36°3'17.096"N)的低潮带礁石上或石沼中(表1)。

标本的处理: 将采集后的样本去除附生藻类等杂质并进行编号,选择具有成熟囊果的新鲜活体标本保存于恒温箱中空运回实验室用于早期发育及生活史研究;选择形态完整的样本制作成腊叶标本、液浸标本和硅胶干燥标本,分别用于制作冰冻切片观察内部结构及提取DNA进行分子分析。

标本的观察: 样本的外部形态、内部结构及早期发育过程分别使用解剖镜和Olympus BX53荧光显微镜进行观察。

1.2 早期发育研究

将采集到的样本进行筛选和分类选择新鲜的、生长状态良好的、完整的四分孢子体和具有成熟囊果的雌配子体,进行反复冲洗,必要时可用毛笔刷洗藻体表面,并在解剖镜下观察藻体表面是否足够干净,无其他附生杂藻和泥沙等杂质。将脱脂棉进行酒精浸泡处理,擦拭玻璃器皿以达到消毒目的。将灭菌的载玻片置于玻璃器皿底部,添加灭菌的海水。将清洗过的雌配子体及四分孢子体迅速转移至不同的器皿中,并通入氧气。将藻体置于温度20℃,光照强度80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期(Light: Dark)12L:12D的条件下进行孢子的放散。1d后,检查载玻片上孢子的释放量并将合格的载玻片转移至培养液中,置于光照培养箱(LRH-250-GB)中培养。采用Olympus BX53荧光显微镜定时观察孢子萌发情况,用目镜测微尺测量早期发育过程中各时期孢子直径大小并记录,对原生质体的移动及萌发管的形成过程进行准确描述。每2天更换1次培养液。

1.3 基因序列分析

使用植物基因组DNA提取试剂盒提取藻体DNA后,对*rbcL*和*CO I*基因进行PCR体外扩增、样品纯化并进行测序。引物组合为F57—R753、F654—R1381和F1—R1。详细的实验步骤及引物设计的方法参照Yang等^[17]和Wang等^[7]的实验。

从GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GenBank>)网站获取了产自中国、韩国和日本的蜈蚣藻属的亚洲蜈蚣藻、中国产的蜈蚣藻属的齿状蜈蚣藻*G. serra*、台湾蜈蚣藻*G. taiwanese*和东方蜈蚣藻*G. orientalis*等12个种^[6-11, 18-23]及海膜属*Halymenia*的*H. floresia*和海柏属*Polyopes*的*P. constrictus*^[24]2个外群种的*rbcL*基因序列与本研究得到的8个聚果蜈蚣藻的*rbcL*基因序列,获取了蜈蚣藻属11个种^[22]及2个外群种海膜属的*H. pseudo-floresia*和海柏属*P. affinis*^[22]的*CO I*基因序列与本研究得到的8个聚果蜈蚣藻的*CO I*基因序列进行分析比对。用软件ClustalX进行校正和比对^[25],用MEGA6.0软件分析碱基差异度并构建NJ、MP和ML系统发育树,Bootstrap重复1000次^[26]。

2 结果

2.1 聚果蜈蚣藻的外部形态

雌配子体藻体直立(图1A),高为5—15 cm,主枝宽为1.5—2 mm;单生或丛生;呈紫红色;质地为软骨质,较黏滑;1—2回羽状分枝;对生、互生或偏生,具有长短不一的小羽枝,呈扁平或棍棒状,基部

表1 聚果蜈蚣藻的采集地点、标本编号和基因登录号列表

Tab. 1 Sampling locations, specimen numbers and gene accession numbers of *G. sorocarpus*

采集地点 Collection location	标本编号 Specimen No.	基因登录号 GenBank accession number	
		<i>rbcL</i>	<i>CO I</i>
Luxun Park, Qingdao, China	LNU18060580	MN809604	MN809612
Luxun Park, Qingdao, China	LNU18060581	MN809605	MN809613
Luxun Park, Qingdao, China	LNU19052237	MN809606	MN809614
Maidao, Qingdao, China	LNU19060582	MN809607	MN809615
Maidao, Qingdao, China	LNU19052240	MN809608	MN809616
Maidao, Qingdao, China	LNU19052239	MN809609	MN809617
The First Swimming Beach, Qingdao, China	LNU19060583	MN809610	MN809618
The First Swimming Beach, Qingdao, China	LNU19052238	MN809611	MN809619

缢缩,常密集生长在2回羽状分枝的中部(图 1B);囊果近球形,常聚集在一起呈瘤状,稍突出于藻体表面(图 1B和1C)。聚果蜈蚣藻的雄配子体未见。

2.2 聚果蜈蚣藻的内部结构

营养结构:聚果蜈蚣藻横切面厚度为510—680 μm ,两端具有7—10层细胞为皮层,皮层分为内、外皮层,总厚度为60—70 μm ,外皮层4—6层,细胞略小,多呈圆形;内皮层3—4层,细胞略大,形状不规则,以多角形和星形较为常见。中央丝状区域为髓部,髓部内髓丝错综交织,髓丝长为15—75 μm ,宽为2—3 μm ,皮层和髓部界限明显(图 2A和2B)。

生殖结构:果胞枝生殖枝丛源于内皮层细胞,符合 *Grateloupia* (6cpb-5auxb)型,包含1个主枝及2或3个不育侧枝,均由1个支持细胞承载。果胞枝包含2个细胞,即壶形果胞和下位细胞,壶形果胞末端连接一条受精丝指向藻体表面,受精丝位于藻体外侧,呈弯曲或伸直状。果胞周围包括基细胞、下位细胞、亚下位细胞和圆形细胞,这些细胞均带有一条不育侧枝弯向藻体表面,形成瓶状体(图 2C)。

辅助细胞成熟时,略大于周围其他细胞,呈圆球形,存在于辅助细胞生殖枝丛的底部。在成熟的辅助细胞周围可以观察到5个细胞,各带有一条侧枝,每条侧枝由10—12个细胞组成。辅助细胞及其周围细胞共同形成瓶状体(图 2D)。

果孢与精子完成受精作用后,会与下位细胞、基细胞融合,进而伸出联络丝与辅助细胞接触,并

形成融合复合体,进而产生孢丝指向藻体表面,其他未融合的瓶状体细胞则横向分裂形成营养丝。产孢丝末端形成若干球形果孢子。营养丝与其周围的髓丝相互缠绕形成囊果皮,包被着果孢子,为囊果。成熟囊果直径为170—230 μm ,孢子囊的顶端有囊孔,果孢子待成熟后经囊果孔逸出(图 2E和2F)。

四分孢子体的藻体大小与雌配子体相似(图 3A),四分孢子囊突出于藻体表面,散生于藻体中上部(图 3B),待藻体趋于成熟时,部分内皮层细胞分化形成较大的孢子囊母细胞(图 3C),孢子囊母细胞经减数分裂,先形成二分孢子(图 3D),最终形成四分孢子,成熟后呈十字形分裂,长为40—60 μm ,宽为20—40 μm (图 3E)。

2.3 聚果蜈蚣藻的早期发育

聚果蜈蚣藻的囊果突出于藻体表面(图 4A),囊果发育成熟后放散出紫红色的果孢子至载玻片上,果孢子球形,直径20 μm 左右(图 4B)。在24h后,果孢子一端形成萌发管(图 4C),并逐渐伸长,原生质体逐渐向萌发管一端移动,在原来的位置形成空泡,空泡内含有透明胶状物质(图 4D)。当萌发管不再继续伸长时,果孢子及胶状物质间形成透明的隔膜,随后果孢子开始分裂(图 4E和4F),随着细胞数目逐渐增多,另一端的透明胶状物质逐渐变小甚至消失,当空泡及其内的胶状物质消失时即到达细胞团阶段(图 4G)。当细胞团在水平方向上分化出基细胞及在垂直方向上分化出顶细胞时则到达盘状体阶

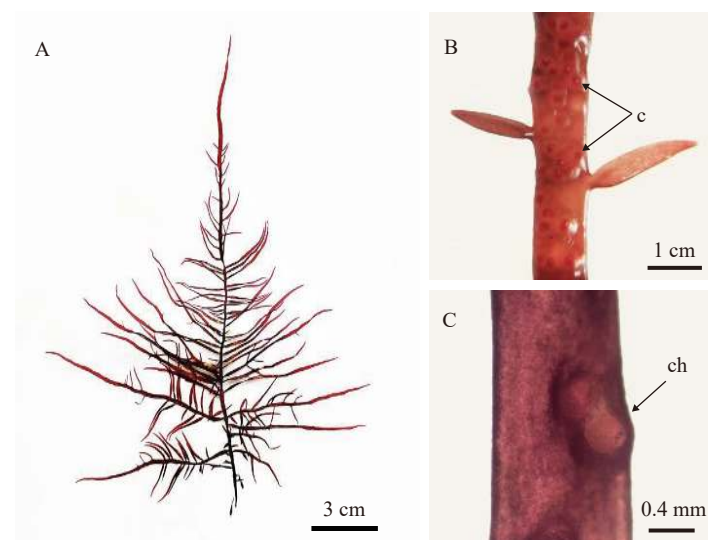


图 1 聚果蜈蚣藻雌配子体的外部形态及表面观

Fig. 1 The morphological appearance and surface observation of *G. sorocarpus*

A. 雌配子体(LNU18060584); B. 雌配子体表面观示囊果聚集成瘤状(c. 囊果); C. 雌配子体表面观示成熟囊果(ch. 囊果孔)

A. Female gametophyte (LNU18060584); B. Gnarled cystocarp from the female gametophyte (c. cystocarp); C. Developing cystocarp from female gametophyte (ch. cystocarp hole)

段(图 4H)。相邻的几个盘状体会相互靠近发生融合, 形成一个较大的盘状体, 即盘状体融合现象(图 4I 和 4J)。盘状体逐渐发育形成直立枝(图 4K), 直立枝继续生长发育形成聚果蜈蚣藻幼苗(图 4L), 四分孢子与果孢子形态大小相似, 发育过程无明显差异。

2.4 *rbcL* 基因序列分析

本研究共获得了 8 条 *rbcL* 基因序列, 基因序列长度均为 1259 bp, 对比校正后的序列长度为 1184 bp。

rbcL 基因序列比对(MAGE6.0)结果显示, 本研究 8 个样本的 *rbcL* 基因序列无碱基差异, 与产自中

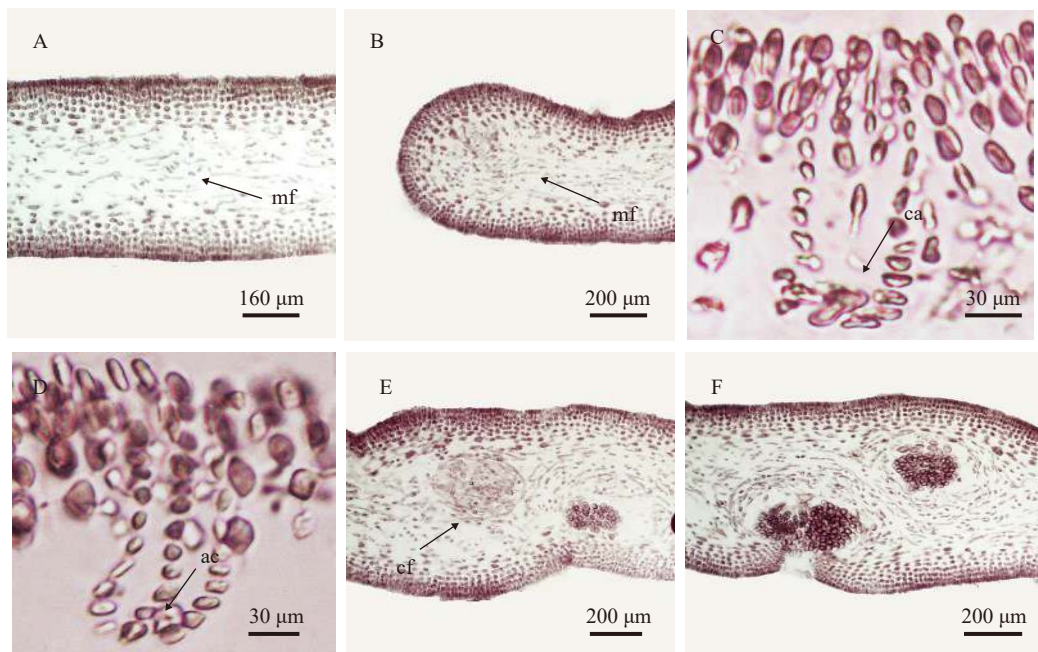


图 2 聚果蜈蚣藻雌配子体的内部结构

Fig. 2 The internal structure of gametophyte of *G. sorocarpus*

A、B. 藻体横切面(mf, 髓丝); C. 果胞枝生殖枝丛横切面观(ca, 果胞); D. 辅助细胞生殖枝丛横切面观(ac, 辅助细胞); E. 融合复合体(cf, 融合复合体); F. 囊果纵切面观

A, B. Transection of the thallus (mf, medullary filament); C. Cross-sectional of carpogonial branch ampullae (ca, carpogonium); D. Cross-sectional of auxiliary cell ampullae (ac, auxiliary cell); E. Complex fusion (cf, complex fusion); F. Longitudinal-section of the cystocarp

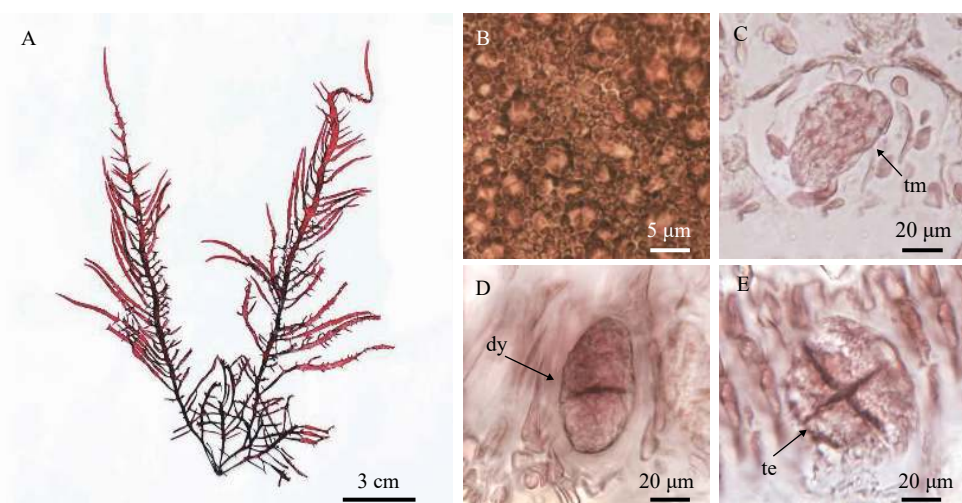


图 3 聚果蜈蚣藻四分孢子体的形态结构

Fig. 3 The morphological structure of tetrasporophyte of *G. sorocarpus*

A. 四分孢子体(LNU18060585); B. 四分孢子体表面观示四分孢子囊; C. 四分孢子囊母细胞(tm, 四分孢子囊母细胞); D. 二分体(dy, 二分体); E. 成熟的四分孢子囊呈十字形分裂(te, 四分孢子囊)

A. Tetrasporophyte (LNU18060585); B. Tetrasporangia from tetrasporophyte; C. Tetrasporoblasts (tm, tetrasporoblasts); D. Formed dyad (dy, formed dyad); E. Tetrasporangia cross division (te, Tetrasporangia)

国的亚洲蜈蚣藻无差异, 与产自日本和韩国的亚洲蜈蚣藻的碱基差异分别为3 bp(0.248%)和2 bp(0.124%), 且本研究的8个样本与亚洲蜈蚣藻在系统发育树中位于独立的进化支(图5); 与蜈蚣藻属内其他11个种的碱基差异为17(1.505%)—98 bp(8.289%); 与外群种*P. constrictus*和*H. floresia*的碱基差异分别为155 bp(13.100%)和154 bp(13.009%)。

2.5 CO I 基因序列分析

本研究共获得了8条CO I 基因序列, 序列长度为641 bp, 对比校正后的序列共20条, 序列矩阵长度为616 bp。

CO I 基因序列比对(MAGE6.0)结果显示, 本研究的8个样本的CO I 基因序列无差异, 与产自韩国和日本的亚洲蜈蚣藻无碱基差异, 它们在系统发育树中位于独立的进化支(图6), 与蜈蚣藻属内其余9个种的碱基差异为18(2.94%)—80 bp(13.04%); 与作为外群种的*P. affinis*和*H. pseudofloresii*的碱基差

异分别为107 bp(17.51%)和83 bp(13.59%)。

3 讨论

本研究对聚果蜈蚣藻和亚洲蜈蚣藻的形态等特征进行观察比较, 发现二者藻体颜色、分枝类型十分相似(图7A; 表2)。两者仅在形态学上具有较小的差异: 聚果蜈蚣藻具有1—2回羽状分枝, 小枝短一般生长在2回羽枝中部, 雌配子体囊果近球形, 常聚集在一起呈瘤状; 亚洲蜈蚣藻具有1—3回羽状分枝, 囊果随机散落分布在除固着器以外的整个藻体。蜈蚣藻属海藻根据生殖结构中助细胞生殖枝丛的不同可分3种类型。其中亚洲蜈蚣藻的生殖结构为(6cpb-5auxb)型, 果胞与下位细胞融合, 辅助细胞没有融合现象^[5]。研究结果显示聚果蜈蚣藻的生殖结构与亚洲蜈蚣藻完全一致。

研究发现, 聚果蜈蚣藻的孢子在萌发时会先形成萌发管并逐渐伸长, 随后细胞才会进行分裂, 进

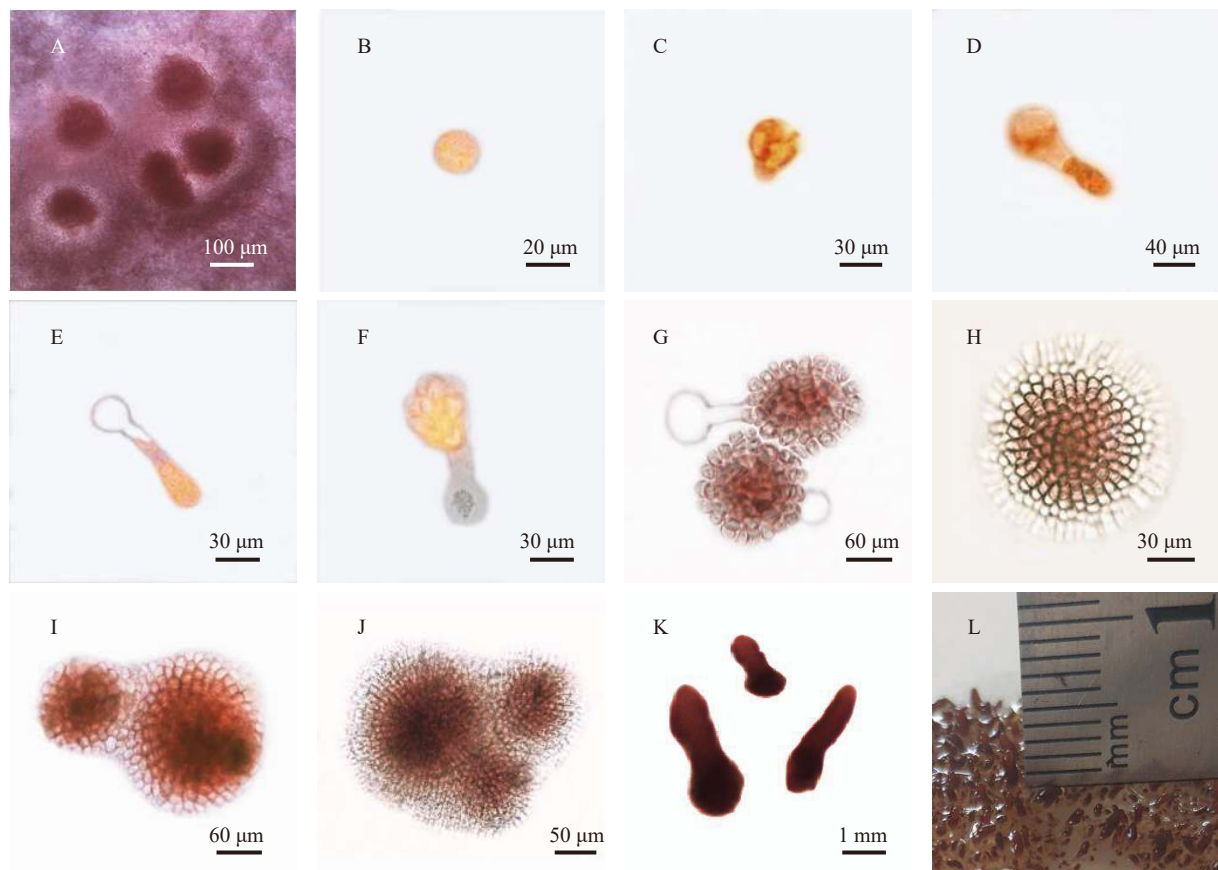


图4 聚果蜈蚣藻的早期发育过程

Fig. 4 The early development of *G. sorocarpus*

A. 藻体表面的囊果; B—F. 荧光显微镜拍摄结果; B. 果孢子; C, D. 果孢子内原生质体迁移; C—G. 萌发管内细胞分裂过程; H. 盘状体时期; I, J. 盘状体融合的过程; K. 直立芽体形成; L. 直立枝

A. Carposporophytes on the surface of thalli; B—F. were taken by using a fluorescence microscope of gametophyte; B. Carpospores; C, D. Transformation of protoplasts in the germ tube; C—G. Cell division in the germ tube; H. Discoid crust; I, J. Fusion of discoid crust; K. Upright branches; L. Growth of sporangia

入盘状体时期,发育类型为“间接盘状体”型,与亚洲蜈蚣藻的孢子发育类型一致^[27]。判断聚果蜈蚣藻与亚洲蜈蚣藻在形态学和早期发育及生活史水平上为同一种。

利用*rbcL*基因对进行了形态研究的聚果蜈蚣藻进行分子系统分析构建系统发育树,结果显示本研究的8个聚果蜈蚣藻与产自中国辽宁大连、山东青岛的亚洲蜈蚣藻无碱基差异并形成独立的进化支,与产自韩国和日本的亚洲蜈蚣藻碱基差异为2 bp (0.124%)和3 bp (0.248%)。李芳等^[16]提出蜈蚣藻属海藻的*rbcL*基因序列碱基差异在0.00—2.00%,均属于种内差异。基于*CO I*基因构建的系统树显示本研究的8个聚果蜈蚣藻与产自韩国和日本的亚洲

蜈蚣藻无碱基差异并形成独立的进化支。因此认为聚果蜈蚣藻与产自韩国和日本的亚洲蜈蚣藻的碱基差异为种内差异。从分子水平上也显示聚果蜈蚣藻与亚洲蜈蚣藻为同一种。

亚洲蜈蚣藻在6—7月达成熟期,在6—9月达生长盛期。达成熟期的雌配子体藻体表面具有囊果,因此采集日期的不同,海藻处于不同的生长期,有无囊果、囊果的大小及囊果是否聚集都会产生些许差异。由此可见,海藻采集的地理位置不同和采集地的海水温度、盐度等生态环境的不同,可导致同种海藻在外部形态上略微有些许差别。因此,在传统的分类学中只根据某一标本的形态或某一时期的标本的形态草率的建立一个新种是没有说服力

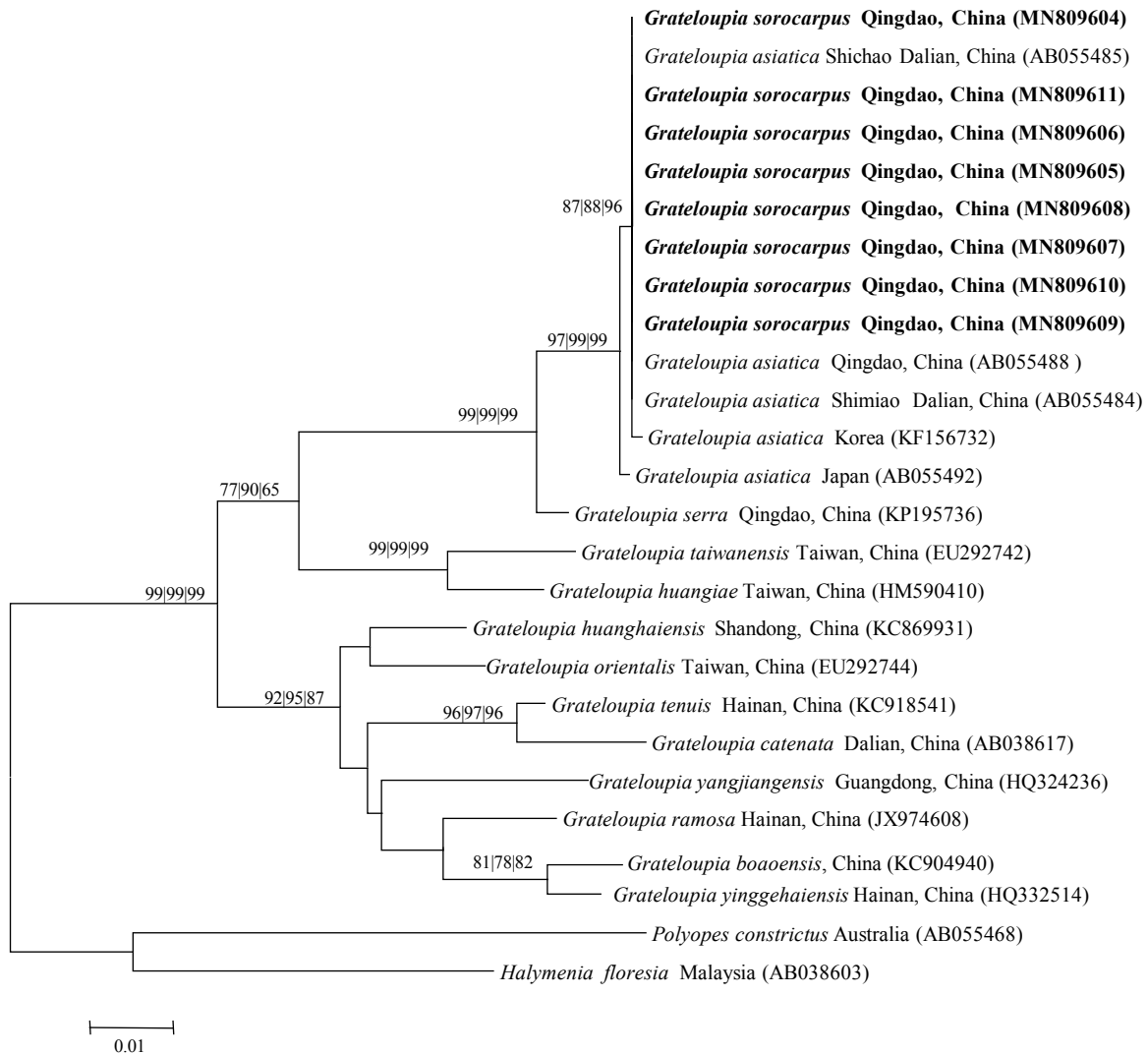


图5 基于*rbcL*基因序列所构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on partial *rbcL* sequences data

*H. floresia*和*P. constrictus*作为外群,分支上只显示支持率大于50%的数值,分别为ML(前)、NJ(中)和MP(后),粗体字为本文研究种。The *rbcL* sequences of *H. floresia* and *P. constrictus* were used as the out group. Numerals at nodes are the bootstrap values (support values>50 are indicated above the respective branches) from Maximum Likelihood (former), Neighbor Joining (middle) and Maximum Parsimony analyses (later), respectively. In order to make our research species displayed clearly, we marked them in bold.

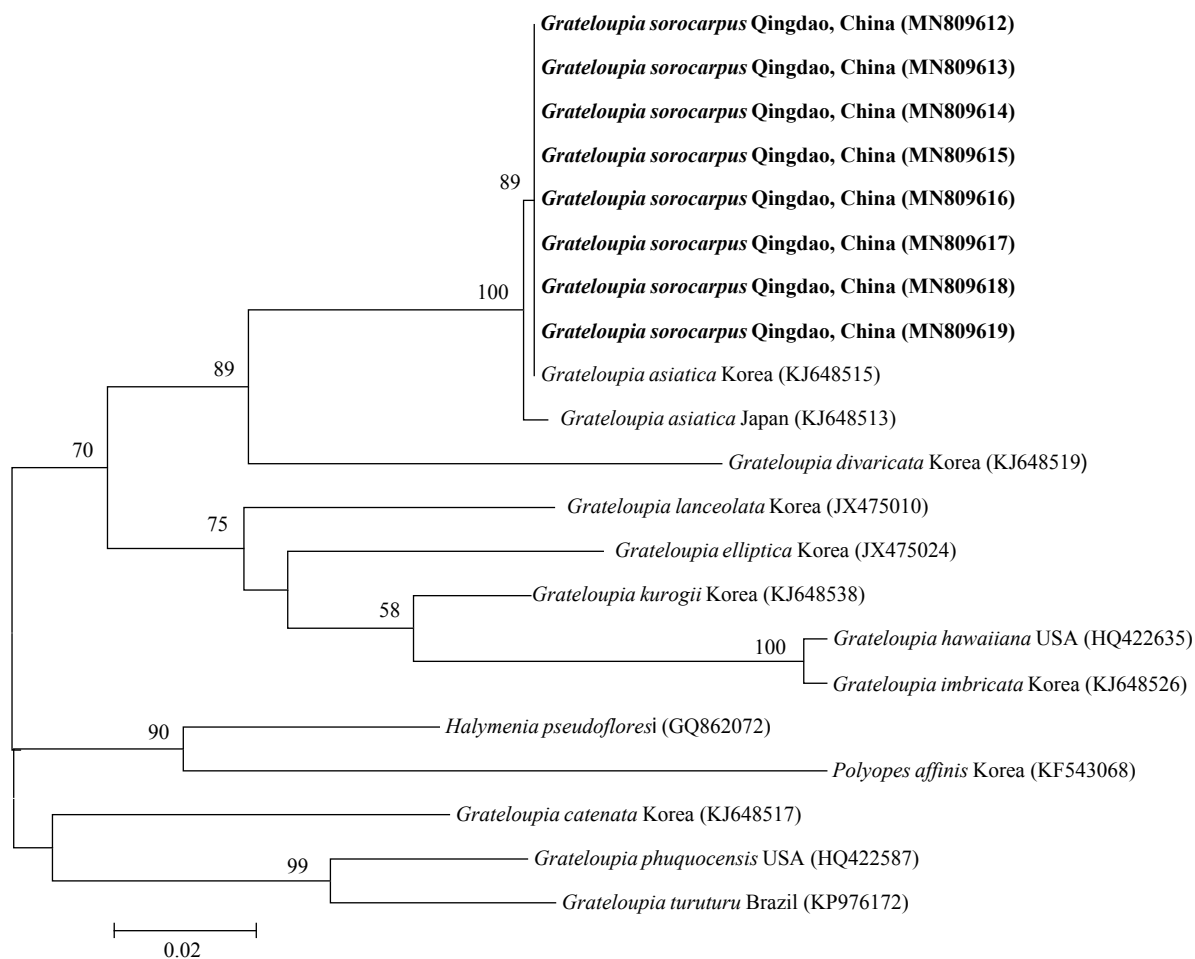


图 6 基于CO I 序列所构建的ML系统发育树

Fig. 6 The Maximum Likelihood (ML) tree based on CO I sequences

*P. affinis*和 *H. pseudofloresii* 作为外群, 分支上只显示支持率大于50%的数值, 粗体字为本文研究种

P. affinis and *H. pseudofloresii* were used as out groups, numerals at internal nodes are only values above 50% bootstrap support are shown, we marked our research species in bold

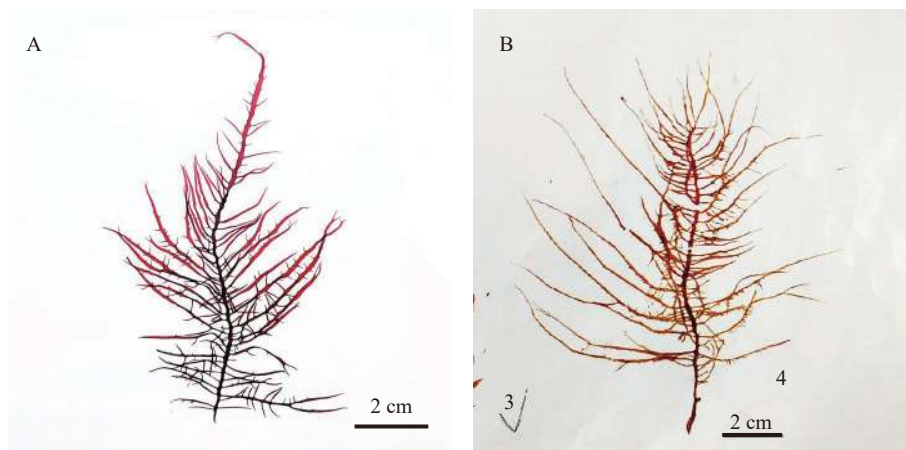


图 7 亚洲蜈蚣藻与聚果蜈蚣藻的外部形态

Fig. 7 The external morphological observation of *G. sorocarpus* and *G. asiatica*

A. 亚洲蜈蚣藻的外部形态; B. 《中国海藻志》中聚果蜈蚣藻的模式标本

A. External morphology of *G. asiatica* Kawaguchi et Wang; B. Typical specimen of *G. sorocarpus* Li et Ding in Flora Algarum Marinarum Sinicarum

表 2 聚果蜈蚣藻和亚洲蜈蚣藻形态学特征的比较

Tab. 2 Morphological characteristics contrast between *G. sorocarpus* and *G. asiatica*

形态学特征 Morphological characteristics	聚果蜈蚣藻 <i>G. sorocarpus</i>	亚洲蜈蚣藻 <i>G. asiatica</i>
外部形态	藻体直立, 紫红色, 1—2回羽状分枝, 高5—15 cm; 小枝一般生长在2回分枝的中部; 囊果常聚集在一起呈瘤状	藻体直立, 颜色呈紫红色, 1—3回羽状分枝, 高10—30 cm; 主枝扁压, 宽2—5 mm; 小枝羽状分枝
质地	质地黏滑, 软骨质	质地黏滑, 软骨质
皮层数	7—10层	7—10层
四分孢子囊形态	长椭圆形: (35—55) μm × (20—30) μm	长椭圆形: (30—55) μm × (20—30) μm
髓部结构	非中空, 由不规则排列的髓丝构成, 髓丝排列错综交织	非中空, 由不规则排列的髓丝构成, 髓丝排列错综交织
地理分布	中国青岛	中国大连、青岛、温州等
助细胞生殖枝丛类型	<i>Grateloupia</i> (6cap—5auxb)型	<i>Grateloupia</i> (6cap—5auxb)型
生长盛期	6—9月, 成熟期在6月份	6—9月, 成熟期在6、7月份
参考文献	本研究; 李伟新, 2004	Kawaguchi <i>et al.</i> , 2001

的, 还需要利用分子分析的手段, 对进行了形态研究的每个种进行分子系统分析, 进一步确定属内海藻种间的系统关系及种内的遗传多样性, 来进一步验证经典分类的合理性, 运用分子辅助的形态分类学方法, 得到的结果才具有准确性。

通过分子辅助的形态分类学的方法对聚果蜈蚣藻进行研究, 确定其与亚洲蜈蚣藻为同一种, 根据优先法则, 将其作为亚洲蜈蚣藻的同物异名。

参考文献:

- [1] Xia B M. Flora Algarum Marinarum Sinicarum [A]// Tomus II Rhodophyta. Part III. Gelidiales Cryptonemiales Hildenbrandiales [C]. Beijing: Science Press, 2004: 59-81. [夏邦美. 中国海藻志 [A]//第二卷红藻门, 第三册石花菜目隐丝藻目胭脂藻目[C]. 北京: 科学出版社, 2004: 59-81.]
- [2] Yu L. Three new species of *Grateloupia* C. Agardh [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2014: 1-56. [于玲. 蜈蚣藻属(*Grateloupia* C. Agardh)三个新种 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2014: 1-56.]
- [3] Li F. Morphological observation and molecular systematic study of four red algae [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2016: 1-65. [李芳. 四种红藻的形态学观察和分子系统学研究 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2016: 1-65.]
- [4] Zhao S Y. Two new species of *Grateloupia* C. Agardh based on morphological observations and *rbcL* sequence analyses and a study on the spore development and life cycle of *Grateloupia asiatica* Kawaguchi et Wang (Halymeniaceae, Rhodophyta) [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2016: 1-41. [赵树雨. 蜈蚣藻属(*Grateloupia* C. Agardh)两个新种及亚洲蜈蚣藻个体生态学研究 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2016: 1-41.]
- [5] Gargiulo G M, Morabito M, Manghisi A. A reassessment of reproductive anatomy and postfertilization development in the systematics of *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta) [J]. *Cryptogamie, Algologie*, 2013, **34**(1): 3-35.
- [6] Kawaguchi S, Wang H W, Horiguchi T, *et al.* A comparative study of the red alga *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae) from the Northwestern Pacific and Mediterranean with the description of *Grateloupia asiatica* sp. nov. [J]. *Journal of Phycology*, 2001, **37**(3): 433-442.
- [7] Wang H W, Kawaguchi S, Horiguchi T, *et al.* Reinstatement of *Grateloupia catenata* (Rhodophyta, Halymeniaceae) on the basis of morphology and *rbcL* sequences [J]. *Phycologia*, 2000, **39**(3): 228-237.
- [8] Zhao D, Wang H W, Sheng Y W, *et al.* Morphological observation and *rbcL* gene sequences studies of two new species, *Grateloupia dalianensis* H. W. Wang et D. Zhao, sp. nov. and *G. yinggehaiensis* H. W. Wang et R. X. Luan, sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta) from China [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, **31**(2): 109-120.
- [9] Yu L, Wang H W, Luan R X. *Grateloupia tenuis* Wang et Luan sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta): a new species from South China Sea based on morphological observation and *rbcL* gene sequences analysis [J]. *Biomed Research International*, doi: 10.1155/2013/560163.
- [10] Liu M, Wang H W, Luan R X. Morphological observation and *rbcL* sequence analysis of a new species from China, *Grateloupia boaoensis* Wang et Luan sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, **38**(5): 939-944.
- [11] Lou Y, Yi P, Song X W, *et al.* *Grateloupia serra* sp. nov. H. W. Wang & Y. Lou (Halymeniaceae, Rhodophyta): a new species previously confused with *Grateloupia asiatica* in China [J]. *Marine Biology Research*, 2019, **15**(4): 1-12.
- [12] Clarkston B E, Saunders G W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Floride-

- phyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. [J]. *Botany*, 2010, **88**(2): 119-131.
- [13] Cianciola E N, Popolizio T R, Schneider C W, *et al.* Using molecular-assisted alpha taxonomy to better understand red algal biodiversity in Bermuda [J]. *Diversity*, 2010(2): 946-958.
- [14] Clarkston B E, Saunders G W. Resolving species diversity in the red algal genus *Callophyllis* (Kallymeniaceae, Gigartinales) in Canada using molecular assisted alpha taxonomy [J]. *European Journal of Phycology*, 2013, **48**(1): 27-46.
- [15] Liu F, Tian Y L, Wang H W, *et al.* Research on the revision of *Grateloupia didymecladia* Li et Ding (Rhodophyta, Halymeniaceae) based on morphological observations and *rbcL* sequence analyses [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, **41**(6): 1273-1281. [刘芳, 田伊林, 王宏伟, 等. 对枝蜈蚣藻的修订研究—基于形态特征和基因序列分析 [J]. *水生生物学报*, 2017, **41**(6): 1273-1281.]
- [16] Li F, Jiang P, Zhao S Y, *et al.* Research on the revision of *Grateloupia fastigiata* Li et Ding (Rhodophyta, Halymeniaceae) based on morphological observations and *rbcL* sequence analyses [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(6): 1249-1256. [李芳, 姜朋, 赵树雨, 等. 帚状蜈蚣藻的修订研究—基于形态观察和*rbcL*序列分析 [J]. *水生生物学报*, 2016, **40**(6): 1249-1256.]
- [17] Yang M Y, Kim M S. Taxonomy of *Grateloupia* (Halymeniales, Rhodophyta) by DNA barcode marker analysis and a description of *Pachymeniopsis volvita* sp. nov. [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2015, **27**(3): 1373-1384.
- [18] Cao C, Liu M, Guo S, *et al.* *Grateloupia ramosa* Wang & Luan sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a new species from China based on morphological evidence and comparative *rbcL* sequences [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, **34**(2): 283-294.
- [19] Guan Y, Wang H W, Zhao F Q, *et al.* *Grateloupia huanghaiensis* sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a peculiar new species from China [J]. *Marine Biology Research*, 2015, **11**(4): 396-404.
- [20] Cao C C, Li Y Z, Wang H W. Morphological observation, life history and *rbcL* gene sequence analysis of a new species, *Grateloupia variata* sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta) from Qingdao, China [J]. *Marine Biology Research*, 2015, **12**(4): 443-453.
- [21] Zhang W, Wang H W, Zhao D. Morphological observation and *rbcL* gene sequence analysis of *Grateloupia orientalis* (Rhodophyta), a new record of the Hainan province [J]. *Marine Sciences*, 2012, **36**(7): 109-116. [张雯, 王宏伟, 赵丹, 等. 海南新纪录种东方蜈蚣藻(红藻门)的形态学观察和*rbcL*基因序列分析 [J]. *海洋科学*, 2012, **36**(7): 109-116.]
- [22] Yi P, Song X W, Lou Y, *et al.* *Grateloupia taiwanensis* (Rhodophyta, Halymeniaceae), A new record of the Hainan province based on morphological observation and *rbcL* gene sequence analysis [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, **49**(3): 604-613. [依朋, 宋学文, 娄宇, 等. 海南新纪录种台湾蜈蚣藻(红藻门)的形态学观察和*rbcL*与*COI*基因序列分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2018, **49**(3): 604-613.]
- [23] Wang H W, Guo S R, Zhang X M, *et al.* Re-identifying *Grateloupia yangjiangensis* (Rhodophyta, Halymeniaceae) based on morphological observations, life history and *rbcL* sequence analyses [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, **33**(4): 77-84.
- [24] Kawaguchi S, Wang H W, Horiguchi T, *et al.* Rejection of *Sinkoraena* and transfer of some species of *Carpopeltis* and *Sinkoraena* to *Polyopes* (Rhodophyta, Halymeniaceae) [J]. *Phycologia*, 2002, **41**(6): 619-635.
- [25] Wei Z H, Zhu M L, Yu G L, *et al.* Occurrence of planktonic cyanobacterium *Tychonema bourrellyi* in Erhai Lake and its taxonomic studies [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(6): 1171-1175. [卫志宏, 朱梦灵, 虞功亮, 等. 洱海的浮游蓝藻布氏常丝藻及其分类学的讨论 [J]. *水生生物学报*, 2012, **36**(6): 1171-1175.]
- [26] Koichiro T, Daniel P, Nicholas P, *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.
- [27] Wang H W, Li Y Z, Cao C C, *et al.* A study on the spore development and life cycle of *Grateloupia asiatica* Kawaguchi et Wang (Halymeniaceae, Rhodophyta) [J]. *Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition)*, 2014(2): 246-251. [王宏伟, 李雅卓, 曹翠翠, 等. 亚洲蜈蚣藻(*Grateloupia asiatica* Kawaguchi et Wang)孢子发育及生活史的研究 [J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2014(2): 246-251.]

RESEARCH ON THE REVISION OF *G. SOROCARPUS* LI ET DING BASED ON MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS, EARLY DEVELOPMENT AND MOLECULAR ANALYSES

WEN Xin¹, BIAN Yao^{1,2}, ZHANG Xin-Tao¹, MA Yue¹, WANG Chen¹ and WANG Hong-Wei^{1,2}

(1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China; 2. The Key Laboratory of Plant Biotechnology of Liaoning Province, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China)

Abstract: *Grateloupia sorocarpus* Li et Ding collected from Qingdao, Shandong Province was re-examined through morphological and early development observation followed by molecular analysis. The results showed that: (1) The thalli were upright, purplish red, single or clustered, up to 5—15 cm high, main branch width 1.5—2 mm, 1 mm thick. The texture was smooth and cartilaginous. The first branch was flat with pinnately branched 1—2 orders. Small plumes with flat or stick shapes. The branches were opposite, alternate or partial and usually constricted or tapered at the base. (2) Male gametophyte were not seen. The reproductive structure of the female gametophyte included carpogonial branch ampullae and auxiliary cell ampullae. The reproductive structure of female gametophyte showed representative *Grateloupia*-type; Carpogonial branch ampullae and auxiliary cell ampullae were composed of 6 cells and 5 cells (6cpb-5auxb type). Gametophytes dioecious, mature tetrasporangia originated from inner cortex cells and splitted into cross. These characteristics were similar with those of *G. asiatica* Kawaguchi et Wang. (3) The early developmental type of *G. sorocarpus* Li et Ding were ‘mediate discal type’, consistent with that of *G. asiatica*. (4) Based on the phylogenetic tree constructed by gene (*rbcL*) sequences, there was no sequence divergence between the eight samples of *G. sorocarpus* and *G. asiatica* from Qingdao and Dalian, which formed an independent monophyletic subclade within the large *Grateloupia* clade of Halymeniaceae. The *rbcL* sequences differences between *G. sorocarpus* and *G. asiatica* from South Korea were 2 bp (0.124%) and the *rbcL* sequences differences between *G. sorocarpus* and *G. asiatica* from Japan were 3 bp (0.248%), belonging to intraspecific difference. Based on the phylogenetic tree constructed by *CO I* gene, there was no sequence divergence between the eight samples of *G. sorocarpus* and *G. asiatica* from Korea and Japan, which formed a single monophyletic subclade. Considering the morphological observations and molecular analysis, *G. sorocarpus* Li et Ding and *G. asiatica* Kawaguchi et Wang were proved to be the same species. According to the priority rule, *G. sorocarpus* Li et Ding was the synonym of *G. asiatica*.

Key words: *Gateloupia sorocarpus* Li et Ding; Morphological observations; Early development of spores; Molecular analysis; Classification of revision