

中国伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻的合种研究——基于形态观察、早期发育及分子分析

马跃 卞瑶 温馨 张昕陶 王宏伟

RESEARCH ON THE COMBINED SPECIES BETWEEN *GRATELOUPIA CORYMBCLADIA* LI ET DING AND *G. SUBPECTINATA* HOLMES BASED ON THE MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS, EARLY DEVELOPMENT AND MOLECULAR ANALYSES

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

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.231>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

缢基蜈蚣藻的修订——基于形态观察、早期发育及分子序列分析

RESEARCH ON THE REVISION OF *GRATELOUPIA CONSTRICTATA* LI ET DING BASED ON MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS AND EARLY DEVELOPMENT OF SPORES AND MOLECULAR ANALYSES

水生生物学报. 2021, 45(3): 670–679 <https://doi.org/10.7541/2020.2019.272>

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>

带形蜈蚣藻盘丝体孢子的形成及温度和光照强度对其放散的影响

EFFECTS OF TEMPERATURE AND LIGHT INTENSITY ON THE FORMATION AND RELEASE OF SPORES OF *GRATELOUPIA TURUTURU*

水生生物学报. 2019, 43(1): 219–225 <https://doi.org/10.7541/2019.027>

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>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.231

中国伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻的合种研究 ——基于形态观察、早期发育及分子分析

马跃^{1*} 卞瑶^{1,2*} 温馨¹ 张昕陶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: 运用分子辅助的形态分类学方法对分布于我国浙江省温州市南麂岛(模式标本产地)的伞形蜈蚣藻 *Grateloupia corymbcladia* Li et Ding 和亚栉状蜈蚣藻 *G. subpectinata* Holmes 进行了详细研究。结果表明: (1) 伞形蜈蚣藻藻体直立, 紫红色, 软骨质, 高15—30 cm。主枝扁平, 末端延长为亚扁形, 宽2—5 mm。藻体主枝两侧分布有小羽枝和1—2回羽状分枝; 辅助细胞生殖枝丛类型为 *Grateloupia* 型(5cpb-4auxb型), 四分孢子囊十字形分裂产生, 以上特征与亚栉状蜈蚣藻一致。(2) 在实验室条件下培养亚栉状蜈蚣藻和伞形蜈蚣藻的雌配子体, 观察到二者的孢子发育类型均为“间接盘状”型。(3) 基于 *rbcL* 和 *CO I* 基因序列分析结果显示, 6个伞形蜈蚣藻样本之间无碱基差异, 与亚栉状蜈蚣藻无碱基差异, 形成独立的进化枝。基于以上结果, 确定伞形蜈蚣藻与亚栉状蜈蚣藻为同一种。根据优先法则, 将伞形蜈蚣藻作为亚栉状蜈蚣藻的同物异名。

关键词: 伞形蜈蚣藻; 亚栉状蜈蚣藻; 形态观察; 早期发育; 分子分析

中图分类号: Q949.29

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)06-1361-10



伞形蜈蚣藻 *Grateloupia corymbcladia* 仅记载于《中国海藻志》^[1], 是李伟新等根据采自浙江省温州市南麂岛构托的四分孢子体的外部形态和内部结构特征建立的新种。《中国海藻志》共记载了31种蜈蚣藻属 *Grateloupia* 海藻, 其中有10种是根据外部形态及部分内部结构特征命名的新种, 但是由于蜈蚣藻属海藻的外部形态具有多样的特点, 仅通过外部形态很难对藻体进行区分; 《中国海藻志》对于藻体内部结构特征的记录也不甚完整; 受到当时实验条件的限制, 没有更为准确的方法用于海藻分类, 这些新种是否成立存在着争议。针对这些问题, 作者团队运用形态观察、早期发育和生活史等与分子分析相结合的分子辅助的形态分类学方法, 对海藻志中记载的我国产的部分蜈蚣藻属新种进行了重新鉴定, 其中除阳江蜈蚣藻 *G. yangjiangensis* Li et Ding^[2] 作为新种成立外, 其余种类陆续被重新修订。李芳等^[3] 运用分子辅助形态分类学方法对帚状蜈蚣藻 *G. fastigiata* Li et Ding 进行了重新鉴定,

结果显示帚状蜈蚣藻与亚洲蜈蚣藻 *G. asiatica* Kawaguchi et Wang 为同一种; 刘芳等^[4] 运用相同的方法将对枝蜈蚣藻 *G. didymecladia* Li et Ding 进行了重新鉴定, 结果表明对枝蜈蚣藻为亚栉状蜈蚣藻 *G. subpectinata* 的同物异名; Liu等^[5] 对青岛蜈蚣藻 *G. qingdaoensis* Li et Ding 重新鉴定, 同样发现其作为新种不成立, 并将其作为亚洲蜈蚣藻的同物异名。

亚栉状蜈蚣藻是在1912年由Holmes^[6] 最初命名的, 由于其多变的外部形态, 有学者又将其作为长枝蜈蚣藻 *G. prolongata* J. Agardh 和 *G. filicina* (Lamouroux) C. Agardh 的同物异名^[7-9], 直到2004年, Faye等^[10] 的研究才将其恢复为一个独立的种。21世纪以来, 法国、西班牙、新西兰、日本和韩国等多个地方被证实有亚栉状蜈蚣藻的分布^[11, 12], 2016年刘芳等^[4] 将对枝蜈蚣藻修订为亚栉状蜈蚣藻, 证明了亚栉状蜈蚣藻在中国也有分布。

本研究利用分子辅助的形态分类学方法对分布于我国浙江省温州市南麂岛(模式标本产地)的伞

收稿日期: 2020-10-20; 修订日期: 2021-04-21

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 (31200521 and 31570209)]

作者简介: 马跃(1996—), 女, 硕士研究生; 主要从事海藻分类学研究。E-mail: 2439539280@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

形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻进行了比较研究,明确了二者的分类地位及关系。本研究结果将为《中国海藻志》内容的更新及修订提供新信息和资料。

1 材料与方法

1.1 材料的采集与处理及形态观察

伞形蜈蚣藻样本和亚栉状蜈蚣藻雌配子体样本于2017年5月26日和2019年5月19日采自模式标本产地浙江省温州市的南麂岛。

将采集到的伞形蜈蚣藻标本去除附着在表面的杂质和其他藻类,选择成熟带有囊果的活体标本空运回实验室,其他结构完整的藻类用于制作腊叶标本,硅胶干燥标本。活体标本用于孢子早期发育研究,腊叶标本用来观察藻体外部形态,冰冻切片用于观察内部结构,硅胶干燥标本用于提取DNA;将采集到的成熟有囊果的亚栉状蜈蚣藻活体标本空运回实验室用于孢子早期发育研究。冰冻切片用Olympus BH2数字显微镜观察,再从中选取效果好的切片通过Nikon HFX-IIA照相机记录。本研究所用标本存放于辽宁师范大学生命科学学院植物标本室(LNU;表1)。

表1 伞形蜈蚣藻标本采集地点、标本号及基因登录号

Tab. 1 Collection location, specimen numbers and GenBank accession numbers of *G. corymbcladia*

标本采集地点 Collection location	标本号 Specimen No.	基因登录号 Accession No.	
		<i>rbcL</i>	<i>CO I</i>
中国浙江省温州市南麂岛 Nanji Island, Wenzhou City, Zhejiang Province, China	LNU2017052601	MT656298	MN812880
	LNU2017052602	MT656299	MN812881
	LNU2017052603	MT656300	MN812882
	LNU2017052604	MT656301	MN812883
	LNU2017052610	MT656302	MN812884
	LNU2017052621	MT656303	MN812885

1.2 早期发育

首先,玻璃培养容器提前用清水冲洗并用75%酒精浸泡的脱脂棉擦拭,晾干后再用灭菌海水冲洗3次。然后,在培养容器底部铺满载玻片,将处理干净的新鲜藻体及灭菌的氧气泵放入容器中,倒入灭菌海水直至没过海藻。氧气泵通电,将培养容器放入光照培养箱(LRH-250-GB)内,培养条件设置为温度20℃,光照强度80 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光周期(Light: Dark)12L:12D,等待孢子释放。24h后,观察孢子释放情况,当显微镜视野(10×10)下孢子释放量达到20—30个时,把载玻片移入培养液中,放进光照培养箱(LRH-250-GB)继续培养。每天观察一次孢子的变化,并用Olympus BX53荧光显微镜和Olympus

BH2数字显微镜观察记录。每2天更换1次培养液。

1.3 分子分析

按照植物基因组DNA提取试剂盒(TIAGEN, Valencia, CA, Beijing)的步骤提取伞形蜈蚣藻藻体全基因组DNA,用于PCR扩增。*rbcL*和*CO I*基因引物设计参考并改进Wang等^[13]的方法,引物组合为:*rbcF57—rbcR753*,*rbcF654—rbcR1381*,*CO I F1—CO I R1*(表2)。根据Yang等^[14]的设计进行PCR扩增及产物的电泳检测,引物合成、扩增产物的纯化和测序均由上海生工生物公司完成。

表2 PCR扩增所需引物

Tab. 2 Primers used for PCR

基因类型 Genotype	引物 Primer	序列Sequence (5'—3')
<i>rbcL</i>	F57	GTAATTCATATGCTAAAATGGG
	R753	GCTCTTTCATACATATCTTCC
	F654	ATGCGTTGGAAGAAAGATTCT
	R1381	ATCTTTCATAAATCTAAAGC
<i>CO I</i>	<i>CO I F1</i>	GGTGGTTGTATGTCTATGC
	<i>CO I R1</i>	CCGGGTCGAAGAAAGAAG

*rbcL*序列分析:从GenBank中选取并下载了包括产地为浙江省温州市南麂岛的亚栉状蜈蚣藻(基因登录号为:KY047357)在内的23个蜈蚣藻属物种^[2,4,10,13—22]及海膜属*Halymenia*的*H. durvillei*和海柏属*Polyopes*的*P. constrictus*^[23]2个外群种的*rbcL*基因序列与6个伞形蜈蚣藻*rbcL*基因序列进行比对分析。

*CO I*基因序列:从GenBank中选取下载了包括产地为浙江省温州市南麂岛的亚栉状蜈蚣藻(基因登录号为:KY047379)在内的14个蜈蚣藻属物种及2个外群种*H. floresia*和*P. affinis*^[14,24]的*CO I*基因序列与6个伞形蜈蚣藻*CO I*基因序列进行比对分析。

基因序列比对应用软件Clustalx(1.83)。应用MEGA6.0软件构建系统进化发育树并分析各物种碱基之间的差异度,计算遗传距离的模型为Number of differences和双参数遗传距离(K2-P),Bootstrap值设置为1000次。

2 结果

2.1 伞形蜈蚣藻的外部形态

藻体直立(图1a),紫红色,软骨质,高15—30 cm。主枝扁平,长4—6 cm,末端延长为亚扁形,宽2—5 mm。藻体主枝两侧分布有小羽枝,分布方式为对生或互生,且基部不缢缩(图1b和1c);主枝两侧也分布有1—2回羽状分枝,基部缢缩,有的分枝上不生小枝,有的则在分枝上再生出小羽枝,分布方式亦为对生

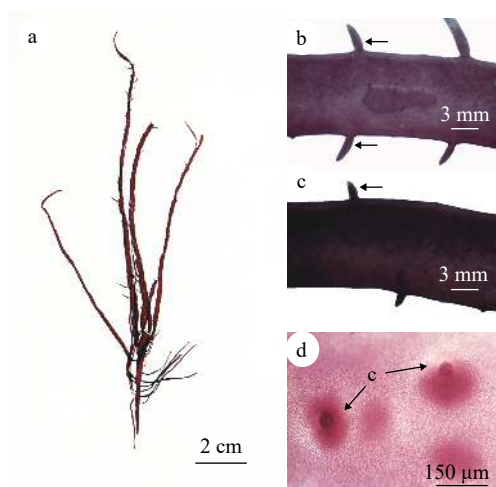


图1 伞形蜈蚣藻的外部形态及表面观

Fig. 1 External morphology and surface view of *G. corymbcladia*

a. 四分孢子体(LNU2017052601); b—c. 分枝为对生或互生(箭头所示; LNU2017052601); d. 囊果在主枝上的分布(c. 囊果; LNU2017052610)

a. Tetrasporophyte (LNU2017052601); b—c. Branches are opposite or alternate (shown by arrows; LNU2017052601); d. Distribution of cystocarp on the main branch (c. cystocarp; LNU2017052610)

或互生。囊果呈球形, 稍突出藻体表面, 散乱分布于除固着器外的整个藻体上(图1d)。

2.2 伞形蜈蚣藻的内部结构

营养结构: 藻体厚度约为85—110 μm , 由皮层及髓部构成(图2a和2b)。皮层由5—11层细胞构成, 其中外皮层细胞有3—5层, 呈圆形或长椭圆形, 内皮层细胞2—6层, 呈不规则多角边形。髓部由髓丝组成, 髓丝长16—36 μm , 宽2—3 μm , 在髓部纵走或交织在一起。藻体幼嫩时髓部致密, 且髓丝随着藻体生长而增长, 藻体衰老时髓部中空或髓丝少。

生殖结构: 果胞枝生殖枝丛产生于内皮层细胞, 其主枝由5个细胞构成, 分别为末端带有受精丝的壶形果胞, 1个椭圆形的下位细胞和3个卵圆形细胞。主枝上的每个细胞都带有不育侧枝, 且这些不育侧枝以指向藻体表面并向内弯曲的状态共同形成瓶状体(图2c和2d)。辅助细胞生殖枝丛也产生于内皮层细胞, 其主枝包括4个细胞, 其中相对较大的细胞为辅助细胞。该枝丛主枝上的每个细胞同样都带有不育侧枝, 同时也以与果胞枝生殖枝丛同样的状态形成瓶状体(图2e)。

精子是由雄配子体藻体表面的精子囊释放的, 精子囊由皮层细胞产生。精子可以通过雌配子体表面的受精丝到达果胞, 与其中的卵子结合完成受精作用。受精后的果胞先后与下位细胞和果胞枝上的基细胞融合形成融合细胞。融合细胞能够产

生联络丝, 联络丝逐渐延伸与相邻的辅助细胞相连, 随后相近的融合细胞与辅助细胞发生融合。融合后的辅助细胞再与周围的瓶状体中其他细胞继续融合形成融合复合体(图2f)。接着融合复合体中一部分细胞横向分裂延伸成营养丝, 另一部分向藻体表面纵向分裂延伸成产孢丝, 并在产孢丝的顶端产生果孢子。而后营养丝与周围髓丝相互缠绕逐渐发育为囊果被, 果孢子被包裹在其中, 即为囊果(图2g和2h)。随着囊果的成熟, 果孢子会从藻体表面的囊果孔释放(图2i)。成熟囊果可在藻体表面观察到(图1d), 其直径范围为180—240 μm 。

图3a为伞形蜈蚣藻四分孢子体表面观, 四分孢子囊产生于藻体皮层细胞, 成熟的四分孢子囊稍突出于藻体表面, 散落分布于伞形蜈蚣藻的主枝和小枝上(图3a)。成熟的四分孢子囊呈十字形分裂, 长为50—60 μm , 宽15—20 μm , 由四分孢子囊母细胞(图3b)经减数分裂先形成二分体(图3c), 再分裂形成四分体(图3d)。

2.3 伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻的早期发育

在实验室条件下同时培养了伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻。伞形蜈蚣藻成熟雌配子体表面分布有囊果, 藻体上成熟的囊果释放大量果孢子至载玻片(图4d)。果孢子球形, 紫红色, 直径20 μm 左右(图4a)。24h后, 果孢子一端形成萌发管且原生质体开始向萌发管移动, 原位置会形成空泡, 空泡中含有透明的胶状物质(图4b)。当原生质体全部移动入萌发管后, 原生质体与空泡间形成隔膜(图4c和4e)。随后, 原生质体开始分裂, 随着分裂产生细胞数量的增多, 空泡及其内部的透明胶质逐渐变小消失, 至此到达细胞团阶段(图4f—j)。当细胞团水平方向分化出基细胞且垂直方向分化出顶细胞时进入到盘状体阶段(图4k)。几个盘状体会相互靠近并发生盘状体融合(图4l—m), 当盘状体到达一定大小, 会逐渐向上发育为直立枝(图4n), 而后再进一步发育为幼苗(图4o)。亚栉状蜈蚣藻早期发育过程与伞形蜈蚣藻完全一致。

2.4 基因序列分析

rbcL基因序列分析 本研究共获得6条伞形蜈蚣藻的rbcL基因序列, 序列长度均为1317 bp, 比校正后的长度为1124 bp。

rbcL基因序列比对(MAGE6.0)结果显示(图5), 伞形蜈蚣藻的6个样本之间无碱基差异, 与亚栉状蜈蚣藻无碱基差异, 形成一个单独的小分支, 区别于其他种。伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻与带形蜈蚣藻*G. turuturu*的碱基差异为12 bp(1.089%), 与东方蜈蚣藻*G. orientalis*的碱基差异为38 bp(3.366%);

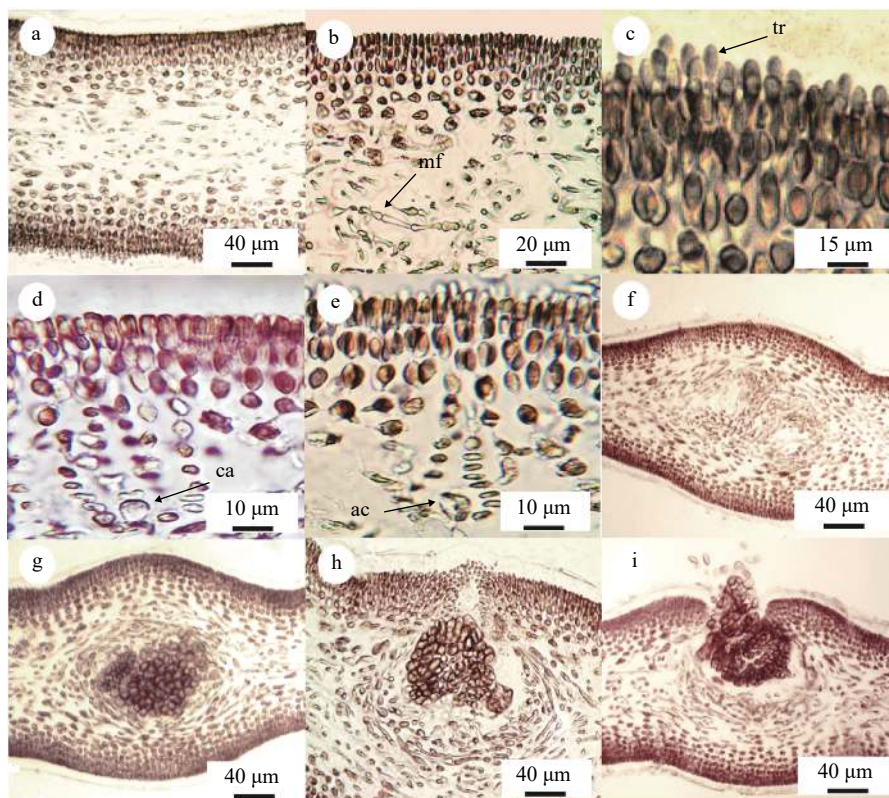


图2 伞形蜈蚣藻内部结构

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

a—b. 藻体的横切面观(mf. 髓丝; LNU2017052602); c—d. 果胞枝生殖枝丛横切面观(tr. 受精丝; ca. 果胞; LNU2017052610); e. 辅助细胞生殖枝丛(ac. 辅助细胞; LNU2017052621); f. 融合复合体(LNU2017052610); g. 初级产孢丝(LNU2017052610); h. 囊果生长(LNU2017052610); i. 成熟囊果(LNU2017052610)

a—b. Transection of the thallus (mf, medullary filament); c—d. Cross-section of carpogonial branch ampullae (tr, trichogyne; ca, carpogonium); e. Cross-section of auxiliary cell ampullae (ac, auxiliary cell); f. Complex fusion (LNU2017052610); g. Primary filament (LNU2017052610); h. Growth of cystocarp (LNU2017052610); i. Mature cystocarp (LNU2017052610)

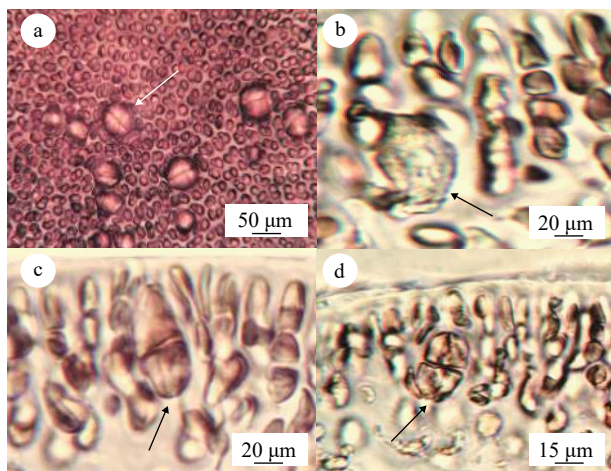


图3 伞形蜈蚣藻四分孢子体内部结构(LNU2017052601)

Fig. 3 The internal structure of tetrasporophyte of *G. corymbcladia* (LNU2017052601)

a. 四分孢子囊表面观; b. 四分孢子囊母细胞; c. 二分体; d. 成熟的四分孢子囊十字形分裂

a. Surface view of tetrasporangia; b. Tetrasporoblasts; c. Dyad; d. Tetrasporangia cross division

与2个外群种 *H. durvillei* 和 *P. constrictus* 的碱基差异分别为63 bp(5.564%)和65 bp(5.780%)。

CO I 基因序列分析 本研究共获得6条伞形蜈蚣藻的CO I 基因序列, 序列长度均为649 bp, 比对校正后长度为552 bp。

CO I 基因序列比对(MAGE6.0)结果显示(图6), 伞形蜈蚣藻的6个样本之间无碱基差异, 与亚栉状蜈蚣藻无碱基差异, 形成一个单独的小分支, 区别于其他种。伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻与带形蜈蚣藻的碱基差异为16 bp(2.983%), 与链状蜈蚣藻 *G. catenata* 的碱基差异为35 bp(6.440%); 与2个外群种 *H. floresia* 和 *P. affinis* 的碱基差异分别为42 bp(7.570%)和48 bp(8.638%)。

3 讨论

海藻分类最初运用的是经典的形态学分类方法, 该方法主要通过藻体的外部形态及生殖结构来区分鉴定物种, 但当面对形态相似的藻类时, 其鉴

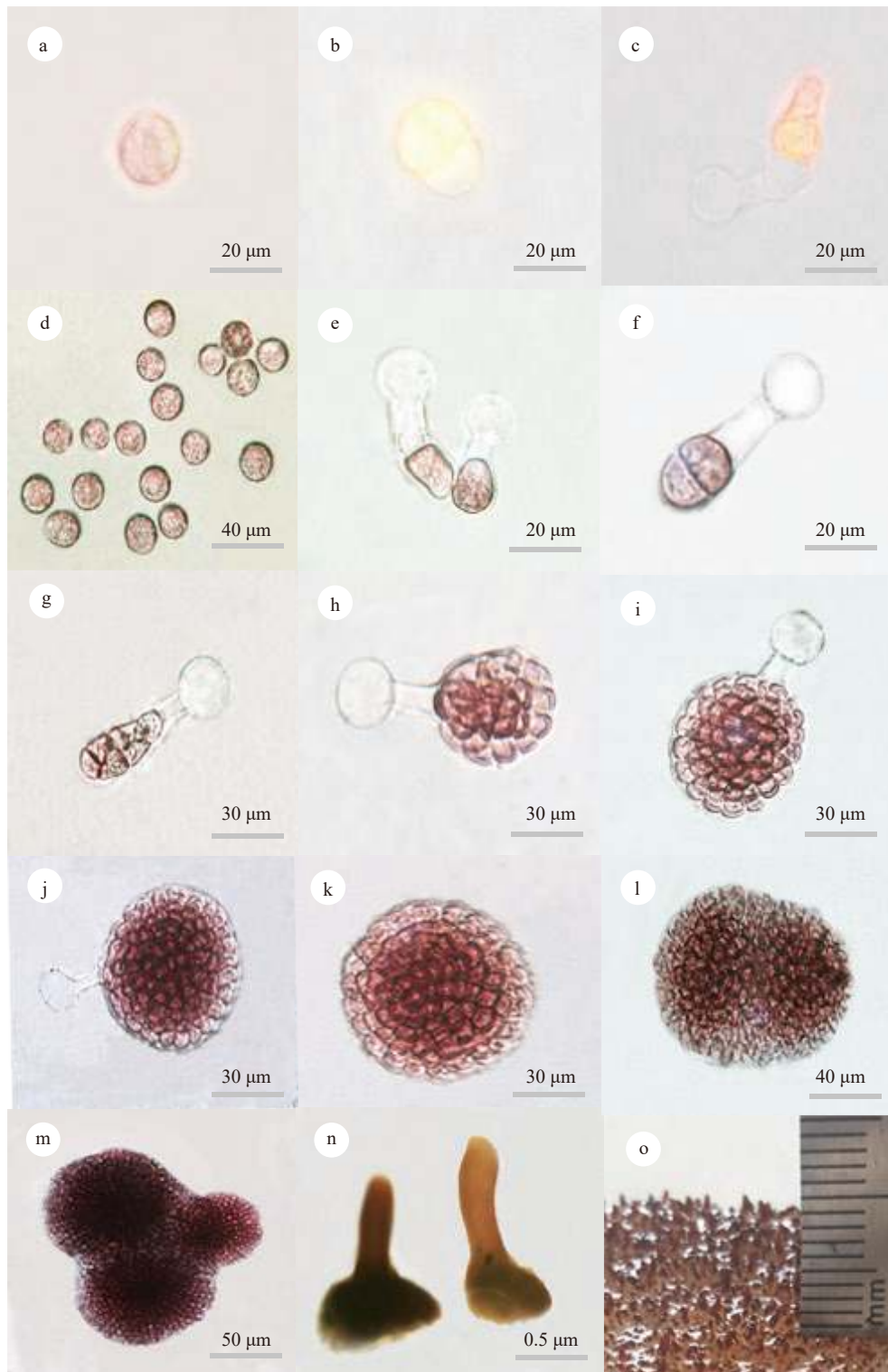


图4 伞形蜈蚣藻的早期发育

Fig. 4 Early development of *G. corymbcladia*

a—c. 荧光显微镜拍摄; a, d. 果孢子; b. 萌发管产生; c. 原生质迁移到萌发管; e—j. 萌发管内细胞分裂; k. 盘状体; l—m. 盘状体融合; n—o. 直立枝

a—c. Taken by fluorescence microscopy; a, d. Carpospores; b. Germ tube generation; c. Protoplast migration to germ tube; e—j. Cell division in germ tube; k. Discoid; l—m. Discoid Fusion; n—o. Upright branch

定结果就会缺乏准确性^[25]。随着分子技术的发展, 分子分析逐渐取代形态观察成为更为准确的鉴定

种的方法, 而形态观察更倾向于用作藻类的初步归类以及作为分子结果的补充, 在这种趋势下, 分子

辅助的形态分类学方法应运而生。分子辅助的形态分类学方法的提出不但解决了形态分类学与分子分类学之间的矛盾,还可以通过分析基因序列建立新的形态学分类标准,对鉴定已知种和发现新种等都具有重要意义。该方法一经提出便在国际上获得广泛认可,不仅成为国外海藻分类重要方法^[26-28],在国内也得到了广泛应用:作者团队应用该方法对

蜈蚣藻属藻类进行了更为准确的鉴定,报道了莺歌海蜈蚣藻 *G. yinggehaiensis* Wang et Luan 和齿状蜈蚣藻 *G. serra* Wang et Lou 等 8 个新种^[15-20, 29],获得普遍认可。以上事实充分显示了分子辅助的形态分类学方法在海藻分类学中的地位及其可靠性。

本研究运用分子辅助的形态分类学方法对伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻进行了研究。通过观察

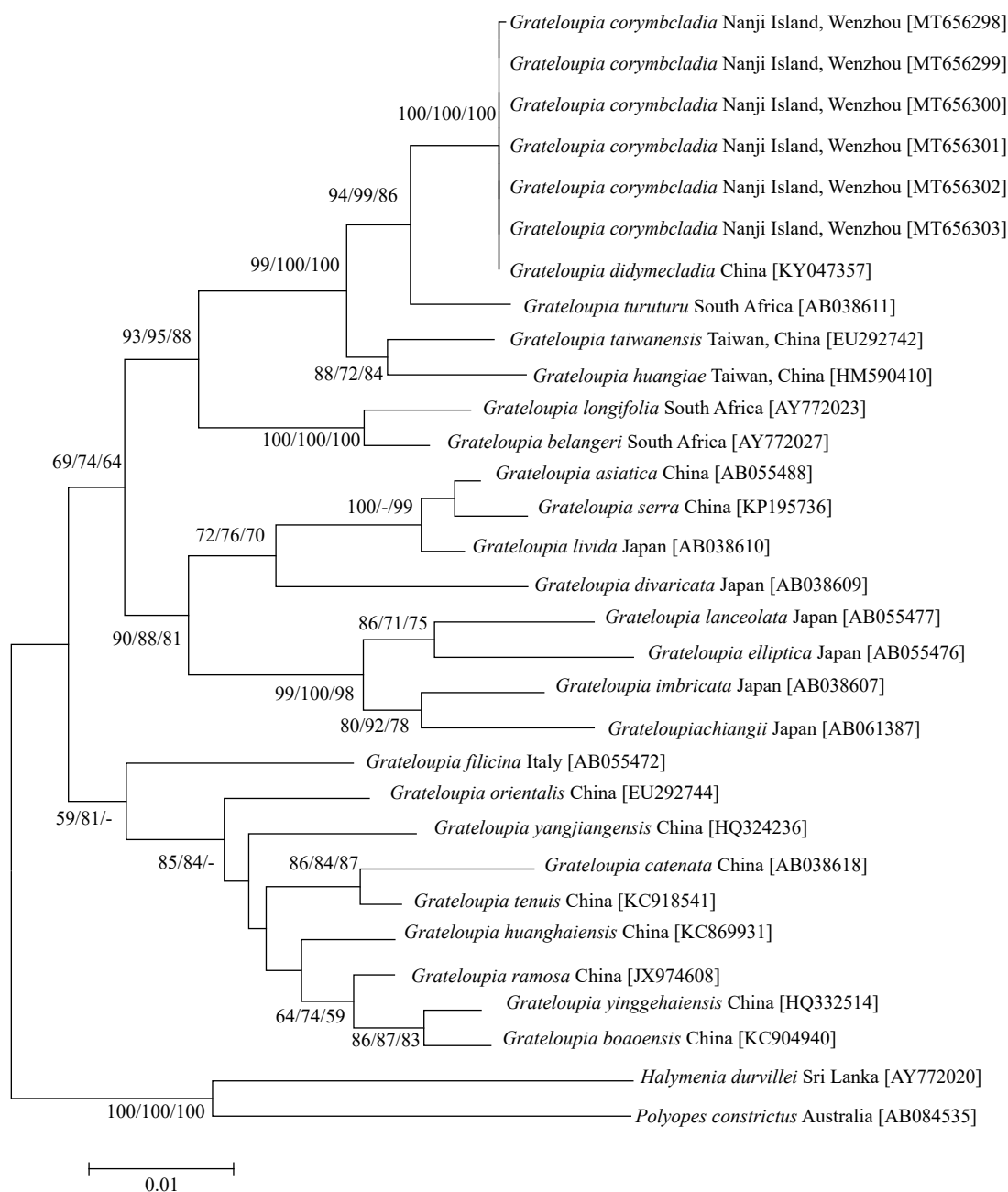


图 5 基于 *rbcL* 基因构建的 ML 系统发育树

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

系统树分支上的数字代表自展值(1000次重复), 从左到右依次为 ML、NJ、MP, 只显示自展值大于 50%, “-”代表自展值低于 50%。 *H. durvillei* 和 *P. constrictus* 作为外群种。黑线字为本文研究样本

The *rbcL* sequences of *H. durvillei* and *P. constrictus* were used as the out group. Numerals at nodes are the bootstrap values (only support values >50 are indicated) from ML (former), NJ (middle) and MP analyses (later). The research specimens were marked in bold

外部形态发现二者基本相同但略有差异(表 3)。2016 年李芳等^[3]指出蜈蚣藻属海藻外部形态变化较大, 同一物种也会因为标本采集的时间、地点和生态环境的不同而存在差异; 伞形蜈蚣藻的内部结构特征与亚栉状蜈蚣藻相关研究中报道的内部结构特征一致, 二者的辅助细胞生殖枝丛类型均为*Grateloupia*型(5cpb-4auxb型)。1970年Chiang^[30]指出海

膜科的辅助细胞生殖枝丛类型有5种, 其中*Grateloupia*型为蜈蚣藻属典型类型, 可作为鉴定蜈蚣藻属海藻的重要特征, Kawaguchi等^[31]随后再次明确了生殖枝丛结构对于蜈蚣藻属分类鉴定的重要意义; 在实验室条件下培养伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻的雌配子体, 观察到二者释放的孢子均先产生萌发管再分裂形成盘状体, 孢子早期发育类型均为

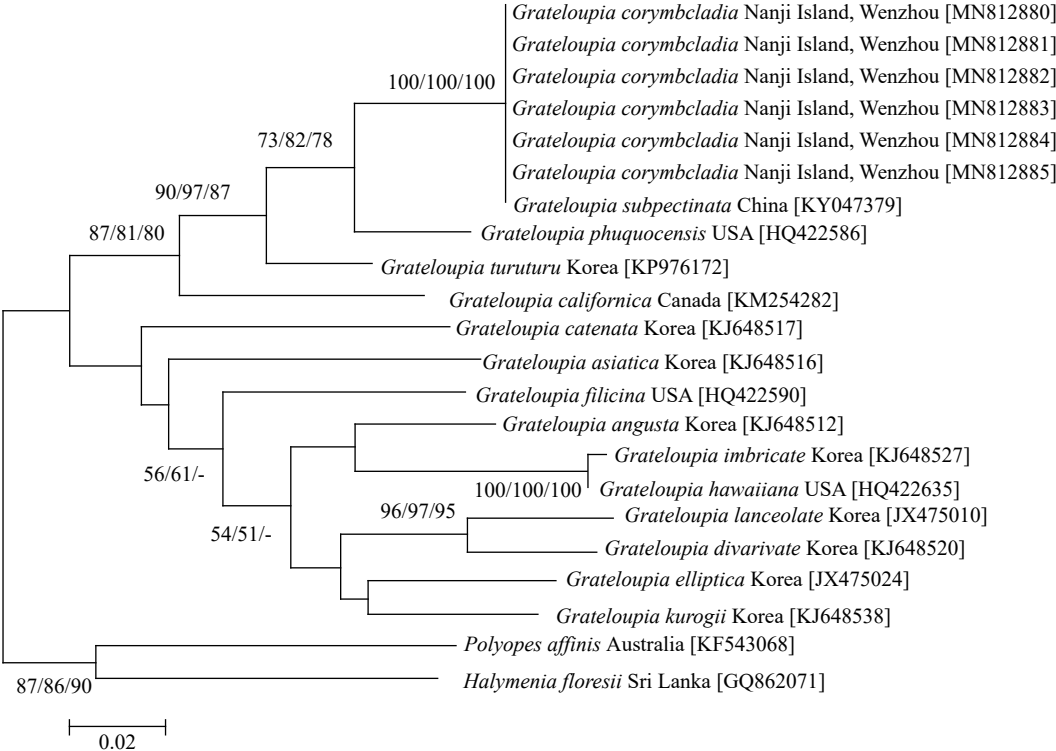


图 6 基于CO I 基因构建的ML系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on partial CO I sequences data

系统树分支上的数字代表自展值(1000次重复), 从左到右依次为ML、NJ和MP, 只显示自展值大于50%, “—”代表自展值低于50%。*H. floresia*和*P. affinis*作为外群种。黑线字为本文研究样本

The CO I sequences of *H. floresia* and *P. affinis* were used as the out group. Numerals at nodes are the bootstrap values (only support values >50 are indicated) from ML (former), NJ (middle) and MP analyses (later). The research specimens were marked in bold

表 3 伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻的形态特征比较

Tab. 3 Comparison of morphological characteristics of *G. corymbcladia* and *G. subpectinata*

	伞形蜈蚣藻 <i>G. corymbcladia</i>	亚栉状蜈蚣藻 <i>G. subpectinata</i>
外部形态Morphological of thallus	藻体直立, 深紫红色, 高10—20 cm, 主枝扁平; 1—2回羽状分枝, 基部渐细, 有的小枝对生或互生, 也有的分枝两侧不生小枝; 质地软骨质	藻体直立, 红褐色或深红色, 高15—40 cm, 主枝扁平; 1—3回羽状分枝, 基部缢缩, 对生或互生; 质地软骨质
皮层数Cortex (C)	5—11层	7—12层
四分孢子囊形状和大小Shape and size of tetrasporangia: length—width (μm)	长椭圆形: (50—60) μm×(15—20) μm	长椭圆形: (50—60) μm×(15—20) μm
髓部Medulla	非中空, 髓丝纵走或相互交织	髓丝错综交织, 非中空
配子体Gametophytes	雌雄异体	雌雄异体
辅助细胞生殖枝丛类型Auxiliary cell ampullae	<i>Grateloupia</i> 型(5cpb-4auxb)	<i>Grateloupia</i> 型(5cpb-4auxb)
分布Distribution	中国浙江温州	中国浙江温州、日本、韩国等
文献Reference	本研究; 夏邦美, 2004	夏邦美, 2004; 刘芳等, 2016

“间接盘状体”型。作者团体还对缢基蜈蚣藻和披针形蜈蚣藻等^[32-36]几种蜈蚣藻的孢子早期发育进行了研究,结果均为“间接盘状体”型,可见“间接盘状体”型为蜈蚣藻属海藻孢子早期发育的一种重要类型;基于*rbcL*和*CO I*基因序列分析结果显示,伞形蜈蚣藻与产自浙江省温州市的亚栉状蜈蚣藻之间无碱基差异,聚集在一个单独的分支上。2016年李芳等^[3]提出*rbcL*序列在蜈蚣藻属中的种内遗传变异为0.0—1.0%,2015年Yang等^[14]提出*CO I*基因序列在蜈蚣藻属中的种内遗传变异为0.0—1.6%,本研究中伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻与蜈蚣藻属其他种之间的差异均大于上述范围,属于种间差异。综合上述结果,伞形蜈蚣藻与亚栉状蜈蚣藻在外部形态、内部结构、早期发育及分子分析等方面均一致,即《中国海藻志》记载的伞形蜈蚣藻和亚栉状蜈蚣藻为同一种。同时我们也可以得出,相比于传统分类学参照的形态学分类方法,分子辅助的形态学方法从多个方面研究并最终明确伞形蜈蚣藻的分类学地位,得到的结果更具科学性和可靠性,对传统分类方法具有指导意义。

4 结论

本研究运用分子辅助的形态分类学方法,从形态观察、早期发育及分子分析等方面对伞形蜈蚣藻与亚栉状蜈蚣藻进行了详细研究,结果显示二者为同一种,伞形蜈蚣藻不成立。根据优先法则,将伞形蜈蚣藻作为亚栉状蜈蚣藻的同物异名。

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] 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.
- [3] 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.]
- [4] 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.]
- [5] Liu J, Li J, Bian Y, et al. The morphological, developmental and molecular landscape of *Grateloupia qingdaoensis* Li et Ding [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, **32**(2): 2093-2103.
- [6] Holmes E M. A new Japanese *Grateloupia* [J]. *The Scottish Botanical Review*, 1912(1): 208.
- [7] Yendo K. Notes on Algae New to Japan. II [M]. Tokyo: Botanical Magazine, 1914: 263-281.
- [8] Okamura K. Japanese Algae [M]. Tokyo: Uchida-roka-kuho, 1936: 964.
- [9] Yoshida T, Kawaguchi S. Marine Algae of Japan [M]. Tokyo: Uchida-Rokakuho, 1998: 697-734.
- [10] Faye E J, Wang H W, Kawaguchi S, et al. Reinstatement of *Grateloupia subpectinata* (Rhodophyta, Halymeniaceae) based on morphology and *rbcL* sequences [J]. *Phycological Research*, 2004, **52**(1): 59-67.
- [11] De Clerck, Gavio O B, Fredericq, et al. Systematics of *Grateloupia filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *rbcL* sequence analysis and morphological evidence, including the reinstatement of *G. capensis* sp. nov. [J]. *Journal of Phycology*, 2005, **41**(2): 391-410.
- [12] Nelson W A, Kim S Y, Boo S M, et al. The first record of *Grateloupia subpectinata* from the New Zealand region and comparison with *G. prolifera*, a species endemic to the Chatham Islands [J]. *Botanica Marina*, 2013, **56**(5-6): 507-513.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Liu M, Wang H W, Luan R X. Morphological observa-

- tion 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.
- [18] 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.
- [19] Cao C C, Liu M, Guo S R, et al. *Grateloupia ramose* 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.
- [20] 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.
- [21] Gavio B, Fredericq S. *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora* [J]. *European Journal of Phycology*, 2002, **37**(3): 349-360.
- [22] Lin X M, Liang H Y, Hommersand M H. Two types of auxiliary cell ampullae in *Grateloupia* (Halymeniaceae, Rhodophyta), including *G. taiwanensis* sp. nov. and *G. orientalis* sp. nov. from Taiwan based on *rbcL* gene sequence analysis and cystocarp development [J]. *Journal of Phycology*, 2008, **44**(1): 196-214.
- [23] 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.
- [24] Sherwood A R, Sauvage T, Kurihara A, et al. The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, **10**(1): 258.
- [25] Saunders G W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2005, **360**(1462): 1870-1888.
- [26] Clarkston B E, Saunders G W. A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. [J]. *Botany*, 2010, **88**(2): 119-131.
- [27] Clarkston B E, Saunders G W. Resolving species diversity in the red algal genus *Callophyllis* (Kallymeniaceae, Gigartinales) in Canada using molecular assisted alga taxonomy [J]. *European Journal of Phycology*, 2013, **48**(1): 27-46.
- [28] Saunders G W, McDonald B. DNA barcoding reveals multiple overlooked Australian species of the red algal order Rhodymeniales (Florideophyceae), with resurrection of *Halopeltis* J. Agardh and description of *Pseudohalopeltis* gen. nov. [J]. *Botany*, 2010, **88**(7): 639-667.
- [29] 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*, 2016, **12**(4): 443-453.
- [30] Chiang Y M. Morphological studies of the red algae of the family Cryptonemiaceae [J]. *University of California Publications in Botany*, 1970(58): 1-95.
- [31] Kawaguchi S, Shimada S, Wang H W, et al. The new genus *Yonagunia* Kawaguchi et Masuda (Halymeniaceae, Rhodophyta), based on *Y. tenuifolia* Kawaguchi et Masuda sp. nov. from southern Japan and including *Y. formosana* (Okamura) Kawaguchi et Masuda comb. nov. from Southeast Asia [J]. *Phycologia*, 2004, **40**(1): 180-192.
- [32] Ding Y Y, Bian Y, Wang H W, et al. Early development, life history and ecological habits of *Grateloupia constricta* Li et Ding [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2020, **39**(10): 155-161.
- [33] Tian Y L, Liu Y W, Wang H W. Early development and life cycle of *Grateloupia lanceolata* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, **48**(1): 113-121. [田伊林, 刘雨薇, 王宏伟. 披针形蜈蚣藻的早期发育及其生活史 [J]. 海洋与湖沼, 2017, **48**(1): 113-121.]
- [34] Jia X B, Jiang P, Zhou R J, et al. A study of the spore development and life cycle of *Grateloupia dalianensis* Wang et Zhao (Halymeniaceae, Rhodophyta) [J]. *Marine Sciences*, 2016, **40**(10): 25-32. [贾潇博, 姜朋, 周汝金, 等. 大连蜈蚣藻孢子发育及生活史的研究 [J]. 海洋科学, 2016, **40**(10): 25-32.]
- [35] Cao C C, Zhao F Q, Guo S R, et al. Effect of temperature and light on growth of *Grateloupia tenuis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, **2**(2): 298-304. [曹翠翠, 赵凤琴, 郭少茹, 等. 主要环境因子对细弱蜈蚣藻孢子发育的影响及生活史的研究 [J]. 海洋与湖沼, 2015, **2**(2): 298-304.]
- [36] 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, **37**(2): 246-251. [王宏伟, 李雅卓, 曹翠翠, 等. 亚洲蜈蚣藻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, **37**(2): 246-251.]

RESEARCH ON THE COMBINED SPECIES BETWEEN *GRATELOUPIA CORYMBCLADIA* LI ET DING AND *G. SUBPECTINATA* HOLMES BASED ON THE MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS, EARLY DEVELOPMENT AND MOLECULAR ANALYSES

MA Yue¹, BIAN Yao^{1,2}, WEN Xin¹, ZHANG Xin-Tao¹ 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 corymbcladia* Li et Ding and *G. subpectinata* Holmes distributed in Nanji Island, Wenzhou City, Zhejiang Province (specimen of origin) were studied in detail using molecular-assisted alpha taxonomy (MAAT). The results showed that: (1) *G. corymbcladia* were upright, purple-red, cartilage and 15—30 cm height. The main branch was flat, and the end was elongated to a sub-flat shape with 2—5 mm wide. Branchlets and 1—2 pinnate branches were distributed on both sides of the main branch. The reproductive structure of the female gametophyte included carpogonial branch ampullae and auxiliary cell ampullae, which were composed of five cells and four cells (*Grateloupia* type), respectively. Mature tetrasporangia originated from inner cortex cells and split into cross. The above characteristics were consistent with *G. subpectinata*. (2) Under laboratory conditions, the female gametophytes of *G. corymbcladia* and *G. subpectinata* both produced and divided to form discoids. The spore development types were all “mediate discal type”. (3) Based on the results of *rbcL* and *CO I* gene sequence analysis, there were no pairwise divergence between the six samples of *G. corymbcladia* and the *G. subpectinata*. They all formed a single monophyletic subclade. These results indicate that *G. corymbcladia* and *G. subpectinata* were the same species, and *G. corymbcladia* was regarded as the synonym of *G. subpectinata*.

Key words: *Grateloupia corymbcladia* Li et Ding; *G. subpectinata* Holmes; Morphological observations; Early development of spores; Molecular analysis

《水生生物学报》编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

主 编	桂建芳 (院 士)				
副主编	缪 炜 (研究员)	解绶启 (研究员)			
水生生物多样性与资源					
责任编辑	毕永红 (研究员)	刘焕章 (研究员)			
委 员	陈宜瑜 (院 士)	曹文宣 (院 士)	陈毅峰 (研究员)	陈勇生 (教 授)	
	何舜平 (研究员)	Martin Reichard	宋立荣 (研究员)	王克雄 (研究员)	
	吴小平 (教 授)	徐旭东 (研究员)	张承才 (研究员)	朱新平 (研究员)	
	庄 平 (研究员)				
水生态与环境					
责任编辑	王洪铸 (研究员)	周巧红 (研究员)			
委 员	唐启升 (院 士)	Annette Janssen	陈宇顺 (研究员)	韩博平 (教 授)	
	黄邦钦 (教 授)	刘家寿 (研究员)	Ralf Aben	吴辰熙 (研究员)	
	吴庆龙 (研究员)	吴振斌 (研究员)	谢 平 (研究员)	杨 军 (研究员)	
	张 黎 (研究员)	赵亚乾 (教 授)	周炳升 (研究员)	周集中 (教 授)	
渔业与生物技术					
责任编辑	肖武汉 (研究员)	周 莉 (研究员)			
委 员	麦康森 (院 士)	包振民 (院 士)	刘少军 (院 士)	艾庆辉 (教 授)	
	段存明 (教 授)	葛 伟 (教 授)	何建国 (教 授)	胡 炜 (研究员)	
	李创举 (研究员)	李富花 (研究员)	鲁义善 (教 授)	梅 洁 (教 授)	
	聂 品 (研究员)	秦启伟 (教 授)	石连玉 (研究员)	宋林生 (教 授)	
	徐 跑 (研究员)	殷 战 (研究员)	张永安 (教 授)	周志刚 (研究员)	
	邹 钧 (教 授)				
编辑部	杜新征 (副编审)	余 茜 (编 辑)	叶文娟 (编 辑)		