

中国球状绿藻新纪录属—索囊藻属(*Choricystis*)*

朱欢¹ 宋会银^{1,3} 王清华^{1,3} 胡愈忻^{1,3} 胡征宇² 刘国祥¹

(1. 中国科学院水生生物研究所中国科学院藻类生物学重点实验室 武汉 430072 2. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉 430072 3. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 在西藏那曲的错鄂和湖北武汉的紫阳湖采集到两株淡水绿色海绵。形态观察显示, 两株海绵呈现绿色是由于其内共生有球状绿藻。基于形态观察和分子系统发育分析确定为该球状绿藻为索囊藻属的寄生索囊藻(*Choricystis parasitica* (K. Brandt) Pröschold & Darienko)。结果表明: (1)两株藻均为纺锤形或倒卵形, 长 1.2—2.8 μm , 宽 0.8—1.5 μm ; 具一个侧位片状色素体; (2)依据 18S rDNA 和 *rbcl* cpDNA 的进化分析显示这两株藻均位于胶球藻科(Coccomyxaceae), 索囊藻属(*Choricystis*); (3)基于 ITS2 的二级结构分析显示这两株藻与寄生索囊藻具有相同的二级结构, 表明这两株内共生的球状绿藻均为寄生索囊藻。寄生索囊藻为中国新纪录种, 所在属索囊藻属为中国新纪录属。本研究以形态性状和分子性状描述了采自中国的寄生索囊藻标本, 为今后研究提供依据和参考。

关键词 球状绿藻; 二级结构; 淡水海绵; 索囊藻属; 系统发育

中图分类号 Q949.2 doi: 10.11693/hyhz20160500104

虫绿藻属(*Zoochlorella*)是指同淡水原生动物、无脊椎动物共生的一类球状绿藻(coccolid green algae)(Rajević *et al*, 2015)。该属是 Brandt 依据在多种原生动物和无脊椎动物体内分离且能够营自由生活的多株球状绿藻标本而建立, Brandt 同时指出该属藻类与小球藻属(*Chlorella*)的主要区别在于能够与淡水原生动物和无脊椎动物共生(Letsch *et al*, 2009)。Beijerinck(1890)认为虫绿藻属在自由生活状态下的形态和繁殖方式均与小球藻相似而将虫绿藻属中的种均归入小球藻属。随着人们对淡水原生动物和无脊椎动物共生藻研究的展开, 越来越多的形态与“小球藻”相似的(*Chlorella*-like algae)种类被归入小球藻科(Chlorellaceae)或虫绿藻科(Zoochlorellaceae)(Fott *et al*, 1969; Lee *et al*, 1982; Kessler *et al*, 1990; Holweg *et al*, 1994; Pröschold *et al*, 2011; Rajević *et al*, 2015)。同时, 不断积累的形态学和植物生理学方面的证据表明虫绿藻属应该被作为小球藻属的异名处理(Fott *et al*, 1969; Vinayakumar *et al*, 1975; Kessler, 1976; Reisser, 1984; Douglas *et al*, 1986; Kessler *et al*, 1990;

Kessler *et al*, 1992; Takeda, 1995)。1999 年修订的国际植物命名法规更正了小球藻属和虫绿藻属, 认为二者是异名; 并依据优先权原则采用小球藻属和小球藻科(Greuter *et al*, 2000)。

分子生物学同形态学的结合使得人们对小球藻科的系统分类学有了进一步的认识(Huss *et al*, 1990; Henley *et al*, 2004; Müller *et al*, 2005; Darienko *et al*, 2010; Luo *et al*, 2010; Bock *et al*, 2011; Pröschold *et al*, 2011; Lee *et al*, 2012; Krienitz *et al*, 2015; Rajević *et al*, 2015)。由于小球藻科中的种类形态单一, 传统的仅仅依据形态学证据而建立的种类被分子系统学和其它的分类学手段(如超微结构、病毒抗性等)而更正(Krienitz *et al*, 2003; Henley *et al*, 2004; Pröschold *et al*, 2007; Luo *et al*, 2010; Bock *et al*, 2011; Lee *et al*, 2012; Leliaert *et al*, 2012; Krienitz *et al*, 2012; Krienitz *et al*, 2015)。近年来球状绿藻类群中新的分类学修订以及成立的新种属更多地依据分子系统学和超微结构的证据。在小球藻科中, 分子系统发育和 ITS2 二级结构被认为是区分不同属种最为有效的手段(Pröschold *et al*, 2007; Bock *et al*, 2011; Pröschold *et al*,

* 科技部科技基础性工作专项项目, 2014FY210700 号。朱欢, 助理研究员, Email: huanzhu@ihb.ac.cn

通讯作者: 刘国祥, 研究员, Email: liugx@ihb.ac.cn

收稿日期: 2016-05-07, 收修改稿日期: 2016-07-28

2011)。越来越多的分子系统发育研究表明该科模式属小球藻属是一个多系类群。之前被描述为小球藻属或虫绿藻属的种类不断被重新描述和定义, 例如, *Chlorella variabilis* 被认为同 *Chlorella paramaecii* 异名; 微芒藻(*Micractinium conductrix*)与 *Zoochlorella conductrix* 和 *Micractinium reisseri* 异名。同时, 虫绿藻属的种类被归入了多个属中, 如小球藻属(*Chlorella*)、胶球藻属(*Coccomyxa*)、微芒藻属(*Micractinium*)、索囊藻属(*Choricystis*)等(Pröschold *et al.*, 2011; Krienitz *et al.*, 2015; Rajević *et al.*, 2015)。

Fott 详细比较了多个胶球藻属的种的形态之后认为, 小胶球藻(*Coccomyxa minor*)等与模式种 *Coccomyxa dispar* 在细胞大小和似亲孢子形成过程方面不同, 建立索囊藻属(Fott, 1976)。最近的基于 rDNA 序列的分子系统发育和 ITS2 二级结构预测研究证实索囊藻属为一个单系类群, 归属于共球藻纲胶球藻科(Darienko *et al.*, 2015; Borowitzka, 2016)。然而基于叶绿体 *rbcL* 序列构建的进化分析显示索囊藻属虽然为一个单系类群, 但并未与胶球藻科聚于一支(Kulichová *et al.*, 2014)。由此可见, 索囊藻属的单系性已为多数分类学家所接受, 然而其具体的系统发育位置仍未有定论。

已有文献资料显示索囊藻模式种的分类历史最早可追溯到 Brandt(1881)描述的寄生虫绿藻(*Zoochlorella parasitic*)(Guiry *et al.*, 2016)。Bejerinck (1890)将该种归入小球藻属并更名为寄生小球藻(*Chlorella parasitica*)。Skuja(1948)根据该种的繁殖特征将之归入胶球藻属, 并更名为小胶球藻(*Coccomyxa minor*)。Fott(1976)详尽地研究了胶球藻属和伪胶球藻属, 并认为小胶球藻与胶球藻属的副模式种 *Coccomyxa confluens* 不同, 将之移出胶球藻属并以此成立索囊藻属。Pröschold 等(2011)对两株与针海绵内共生的球状绿藻进行了较为详尽的分子特征鉴定, 认为小胶球藻与寄生索囊藻和小索囊藻异名, 并重新指认寄生索囊藻为该属模式种。此外, 在有记录的索囊藻属的 9 个种中, 仅有其模式种(寄生索囊藻)有较为详尽地形态观察和分子特征描述(Guiry *et al.*, 2016)。

绿色淡水海绵(green freshwater sponge)是与绿藻共生而呈现出翠绿色的淡水针海绵(Skelton *et al.*, 2013)。在形成的共生体中, 海绵细胞吞噬了大量的球状绿藻但并未消化这些藻类, 而是与之共生(Johnson, 2011)。在共生体中, 海绵提供给藻类生长繁殖必须的

营养, 藻类将多余的光合产物提供给海绵(Johnson, 2011)。然而国内目前对淡水海绵的研究较少, 已有的研究多集中在物种的描述与生态调查方面。对绿色海绵共生藻类的研究仍旧处于空白状态。2015 年, 我们在西藏错鄂的湖底和武汉紫阳湖岸边采集到了两株绿色海绵。在室内分析样品时我们发现这两株绿色海绵的共生绿藻均为球状绿藻。通过形态观察、分子系统发育分析和 ITS2 二级结构比较, 我们将此两株海绵的共生藻鉴定为寄生索囊藻, 此属为在中国的首次报道。

1 材料与方法

1.1 材料采集和形态观察

两株海绵分别采集自西藏错鄂(采集人朱欢, 采集时间 2015 年 6 月 2 日, 采集地点 88°76'97"E, 31°60'57"N, 标本编号为 TB15158)和湖北武汉的紫阳湖(采集人刘国祥, 采集时间 2015 年 7 月 15 日, 采集地点 114°30'42"E, 30°53'05"N, 标本编号为 HB15002。采集后的标本一部分使用福尔马林加 10% 的甘油固定用于形态观察; 另一部分使用无水乙醇固定用于 DNA 提取。

在体视镜(KL1500 LCD; Zeiss, Göttingen, Germany)剥离海绵标本, 吸取浸出的藻液制作临时装片在显微镜(DM5000B, Leica, Wetzlar, Germany)下使用微分干涉(Differential Interference Contrast, DIC)模式观察形态结构, 图像获取使用 Leica DFC320 CCD。

1.2 DNA 提取, PCR 扩增及测序

体视镜下使用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.0)清洗剥离的海绵。将清洗后的植物体放入加入 1.5mL CTAB 缓冲液[2%CTAB, 0.1mol/L Tris-HCl(pH=8.0), 1.4mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 1.5% β -巯基乙醇]和 0.5mL 直径 0.5mm 的玻璃破碎珠的 2mL 冻存管中。使用 mini-beadbeater(Model 3110BX, Biospec Products, Bartlesville, Oklahoma, USA)振荡破碎 2min。后置于 65°C 温浴 30min。使用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)液抽提 1 次。转移上清至新的 EP 管中, 加入终浓度为 10 μ g/mL 的 RNAase, 37°C 温浴 25min。使用氯仿:异戊醇液(24:1)抽提一次。转移上清, 使用 2/3 倍体积的异丙醇沉淀 DNA。离心后弃上清, 70%的乙醇清洗沉淀 2 次。常温干燥沉淀后溶于 20 μ L 的 TE 缓冲液中。

使用 Honda 等(1999)中的引物和条件扩增 18S rDNA 序列; 使用 Zechman(2003)中的引物 *rbcLQ* 和

rbcLB 扩增 *rbcL* 序列; 使用 Hayakawa 等(2012)中的引物和条件扩增 ITS rDNA 序列。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外透射台(CUV30A, 上海勤翔)上切取目的条带, 使用胶回收试剂盒(E.Z.N.A. Gel Extraction Kit Omega Bio-Tek, 美国)纯化回收纯化 PCR 产物。纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T(宝生物, 大连, 中国)载体连接, 转化到 *E.coli* DH5 α 中, 以通用引物(M13)为测序引物测序(擎科生物, 武汉, 中国)。测序后的序列上传至 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)。

1.3 系统发育与二级结构预测分析

将本研究获取的序列从 GenBank 上检索比对, 并下载近缘序列。使用 mafft7.2(Katoh *et al.*, 2013)进行序列比对。使用 Bioedit7.2(Hall, 2013)修正比对后的序列。校正后的数据使用 MEGA7.0(Kumar *et al.*, 2016)和 DAMBE5.0(Xia, 2013)进行数据质量评估。使用 jModeltest2.1(Darriba *et al.*, 2012)进行最适模型评估。进化树的构建采用最大似然法和贝叶斯法。最大似然法使用软件为 RAXML8.0(Stamatakis, 2014), 贝叶斯法使用 MrBayes3.2 (Ronquist *et al.*, 2012)。

使用 ITS2 database 数据库对获取的 ITS 区域进行了精确注释(Ankenbrand *et al.*, 2015)。使用数据库中已有的 ITS2 二级结构作为预测模型对本研究中获取的 ITS2 二级结构进行预测(Ankenbrand *et al.*, 2015)。预测的模型使用 4sale 和 VaRNA3.1 软件进行比对注释(Seibel *et al.*, 2006; Darty *et al.*, 2009)。

2 结果与分析

2.1 形态观察

一种淡水针海绵(Spongillidae sp.)(图 1a、1b, 图 2a、2c)

本研究中共采集到两株海绵标本。其中西藏标本附着在湖底约 4.0—7.0m 处深的轮藻植物上, 海绵整体呈翠绿色, 缘管状, 缘管偶有分叉, 宽 0.5—1.2cm(图 1a、1b); 硅质骨针单轴、中部纵向具一条不明显的愈合缝, 长 150—500 μ m, 多 250—350 μ m(图 2a)。湖北标本附着在湖岸基质表面, 暗绿色, 整体呈垫状、无缘管状凸起; 骨针硅质, 单轴、中部纵向具一条不明显的愈合缝, 长 150—450 μ m, 多 300 μ m 左右(图 2c)。

由于标本采集后我们立即使用甲醛和无水乙醇分别进行了固定, 体视镜和显微镜下并未观察到完整的内部结构。这可能主要是因为构成淡水针海绵的

几类细胞(扁平细胞、领细胞、芒状细胞、变形细胞)在甲醛固定后极易破碎, 只有硅质骨针较为完整地保持了原本的形态。因此, 这也给标本的物种鉴定带来了一定困难。这也是我们将这两株海绵仅鉴定到科的主要原因。此外, 索囊藻均共生在一个形状不规则的囊球状细胞内, 这与国外报道的淡水针海绵的变形细胞一般会内共生大量球状绿藻的描述一致。

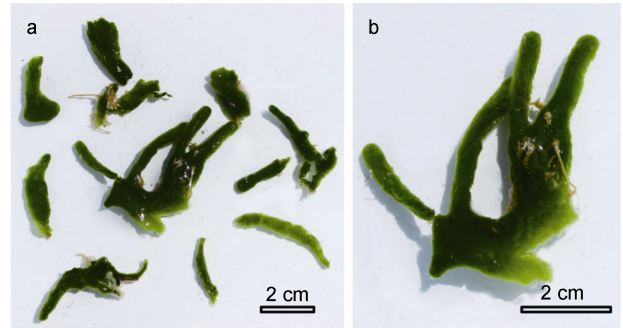


图 1 采集自错鄂的淡水海绵, 外观呈翠绿色的缘管状
Fig.1 The freshwater sponge collected from Nagtsang Tso, with an olive-green tubular in morphology

索囊藻属

Choricystis (Skuja) Fott, 1976

Fott, B. (1976). *Choricystis*, eine neue Gattung der Chlorococcales (Chlorophyceae). Archiv für Hydrobiologie Supplement Algological Studies 49: 382—388.

Holotype species: *Choricystis parasitica* (K. Brandt) Pröschold & Darienko 2011

细胞椭圆形、纺锤形或长卵形, 橄榄绿色; 细胞壁光滑, 无胶被; 具一个侧位片状色素体, 无蛋白核; 细胞长约 1.2—2.8 μ m, 宽约 0.8—1.5 μ m。无性繁殖以产生似亲孢子为主, 通常 2 或 4 个静孢子。该属内不同种的区分主要依靠营养细胞的大小和形态。

该属为中国新纪录属。

寄生索囊藻(图 2c—g)

Choricystis parasitica (K. Brandt) Pröschold & Darienko 2011.

Pröschold T, Darienko T, Silva P C, Reisser W & Krienitz L (2011). The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. Environmental Microbiology 13(2): 350—364.

Homotypic Synonyms: *Zoochlorella parasitica* K Brandt 1881; *Chlorella parasitica* (K. Brandt) Beijerinck 1890.

Heterotypic Synonyms: *Coccomyxa minor* Skuja 1948; *Choricystis minor* (Skuja) Fott 1976; *Choricystis minor* var. *gallica* (Bourrelly) Komarek 1979.

细胞椭圆形、纺锤形或长卵形, 橄榄绿色; 细胞

壁光滑, 无胶被; 具一个侧位片状色素体, 无蛋白核; 成熟老化的营养细胞色素体偶有不明显的分瓣; 细胞壁薄; 细胞长 1.2—2.8 μm , 宽 0.8—1.5 μm (图 2c—g)。通常十几个至数十个内共生在一个海绵变形细胞内(图 2c—d)。无性繁殖以产生两个似亲孢子为主。

该种为中国新纪录种。



图 2 本研究中采集的淡水针海绵的骨针和共生索囊藻形态特征

Fig.2 The morphology of spicules and *Choricystis* cells
注: a 和 b, 分别采自错鄂和紫阳湖的海绵骨针; c 和 d, 采自错鄂和紫阳湖的海绵的变形细胞, 胞内共生了大量索囊藻; e, 错鄂样品的索囊藻, 具有一个片状侧位的色素体; f 和 g, 紫阳湖样品的索囊藻

2.2 系统发育分析

本研究中获得的两条海绵的 18S rDNA 在 GenBank 上比对后, 下载获得了包含 38 条序列的矩阵, 其中 *Svenzea* 为外类群。比对后的序列矩阵长 1594bp, 其中可变位点 111 个, 简约信息位点 94 个, 单态位点 17 个; 矩阵中四种碱基 TCAG 的平均含量分别为 25.4%、20.8%、25.3%和 28.5%。饱和指数分析显示序列矩阵并未饱和($I_{ss}=0.077 < I_{ssc}=0.795$), 可用于进化分析。本研究中共获取了 4 条索囊藻的 18S

rDNA 序列, 其中西藏标本和湖北标本各两条。下载获得了包含主要共球藻纲支系的序列约 75 条, 其中以衣藻(*Chlamydomonas*)和团藻(*Volvox*)为外类群。比校正后的序列长度为 1594bp, 其中可变位点 523 个, 简约信息位点 336 个, 单态位点 187 个; 矩阵中四种碱基 TCAG 的平均含量分别为 25.4%、21.9%、24.4%和 28.2%。饱和指数分析显示序列矩阵并未饱和($I_{ss}=0.054 < I_{ssc}=0.791$), 可用于进化分析。本研究共获得了 4 条索囊藻的 *rbcL* 克隆序列, 其中两条扩增自西藏标本两条扩增自湖北标本。比校正后的序列矩阵共包含 60 条序列, 其中以两条团藻序列为外类群。矩阵长 937bp, 可变位点 427 个, 简约信息位点 400 个, 单态位点 27 个; 矩阵中四种碱基 TCAG 的平均含量分别为 29.9%、19.5%、28.9%和 21.7%。饱和指数分析显示序列矩阵并未饱和($I_{ss}=0.194 < I_{ssc}=0.739$), 可用于进化分析。

本研究共得到 8 条索囊藻的 ITS 序列, 精确注释后得到的 ITS2 长度均为 228bp, 序列与数据库中的两条寄生索囊藻 (GenBank numbers: FN298929 和 FN298930) 注释后的长度一致。在数据库中 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) 应用已有的胶球藻模型进行预测, 预测得到的 8 条 ITS2 二级结构模型均具有四条臂 (Helix), 其中 Helix-I 长度为 32bp, Helix-II 长度为 27bp, Helix-III 长度为 81bp, Helix-IV 长度为 8bp (图 3)。本研究中预测的二级结构与数据库中的寄生索囊藻的二级结构完全一致, 基本证明本研究中得到的两株索囊藻均为寄生索囊藻。

在构建的六条进化树中, 每个矩阵运用最大似然法和贝叶斯法得到的拓扑结构基本一致。在使用 18S rDNA 序列构建的针海绵的进化树中, 本研究采集的两株标本与针海绵科中的其它种类聚于一起, 该支的支持值和后验概率分别为 100 和 1.00, 证实了这两株为淡水针海绵科中的种类 (图 4)。但由于在针海绵科中, 各个属的分类问题较为复杂, 在将淡水针海绵科中的分类系统学问题解决之前仅通过 18S rDNA 序列并不能将标本鉴定到属。然而这一问题并不是本研究中的焦点, 在此不展开描述。

本研究共得到索囊藻 18S rDNA 序列 4 条、*rbcL* cpDNA 序列 4 条。基于 18S rDNA 序列构建的系统发育树显示本研究中的两株索囊藻与数据库中的索囊藻聚于一支, 与葡萄藻 (*Botryococcus*)、胶球藻 (*Coccomyxa*) 共同构成了共球藻纲的 CBC 分支, 其自展支持值和后验概率分别为 58 和 0.84。在 CBC 分支

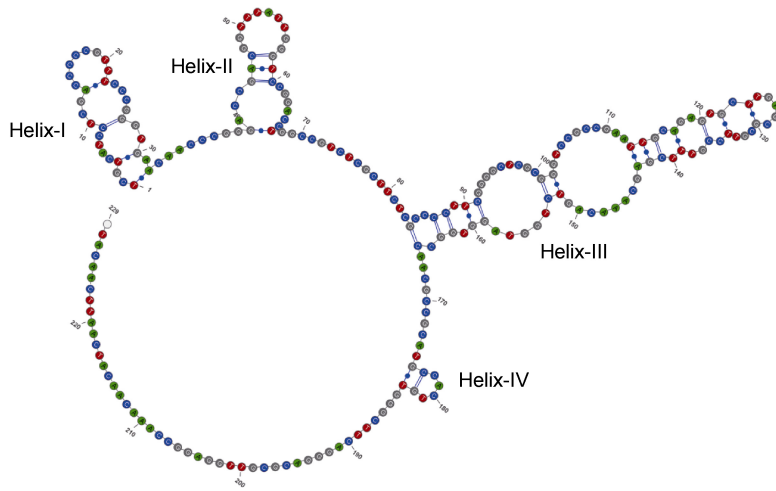


图 3 基于本研究获得的 8 条索囊藻克隆序列预测的 ITS2 二级结构。共有四条臂，分别为 32bp、27bp、81bp 和 8bp
 Fig.3 The consensus secondary structure of ITS2 inferred from eight sequences clones. There are four Helix in length of 32bp, 27bp, 81bp, and 8bp, respectively

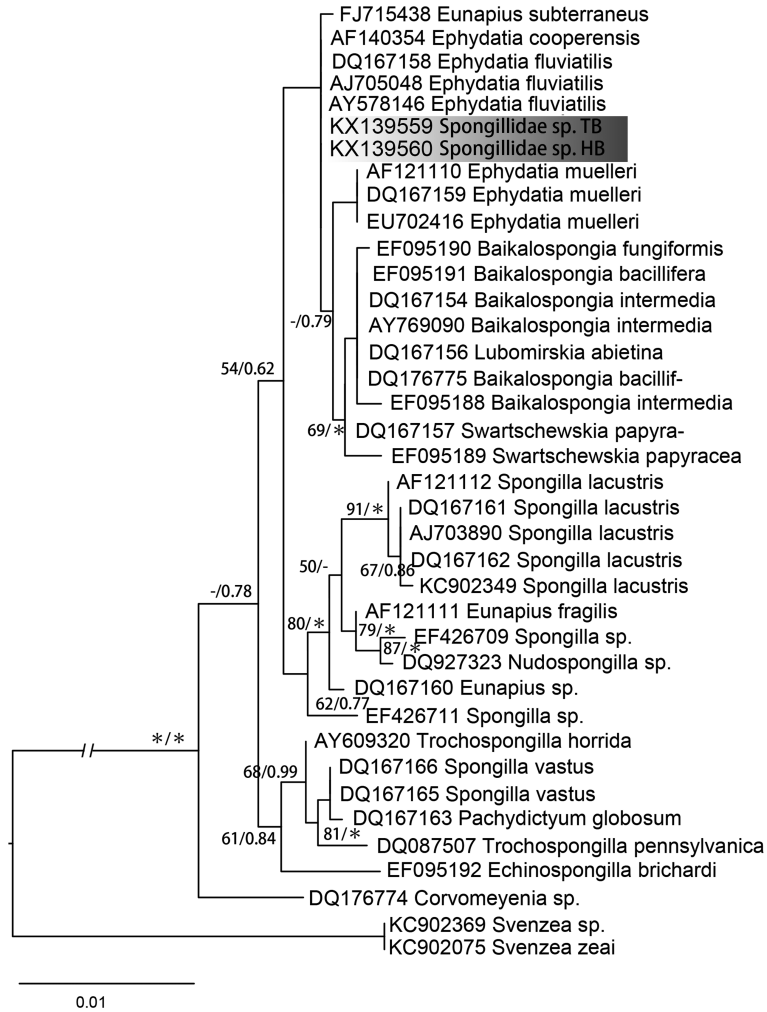


图 4 基于 18S rDNA 序列构建的淡水针海绵的系统进化树

Fig.4 The phylogram inferred from 18S rDNA sequences of Spongillidae

注：节点处的数值分别表示分支的自展支持值和后验概率，其中星号表示 100 或 1.00。本研究中获取的错鄂和紫阳湖的海绵 18S rDNA 序列用灰色背景标出，两条序列均位于针海绵科中

中, 本研究所用到的索囊藻序列均聚于一支, 其自展支持值和后验概率分别为 96 和 1.00(图 5)。本研究中, 依据 *rbcL* 序列进行的进化分析显示索囊藻均聚于一支, 其自展支持值和后验概率分别为 100 和 1.00(图 6)。然而, 基于 *rbcL* 的进化分析得出的共球藻纲的拓

扑结构与基于 18S rDNA 的拓扑结构有较大差异。在 *rbcL* 序列构建的进化树中, 索囊藻单独聚于一支与其它的共球藻纲的支系(诸如小球藻目、渡边分支、共球藻目和溪菜分支等)较早地分离; 但在 18S rDNA 序列构建的进化树中, 索囊藻与胶球藻和葡萄藻聚于一支。

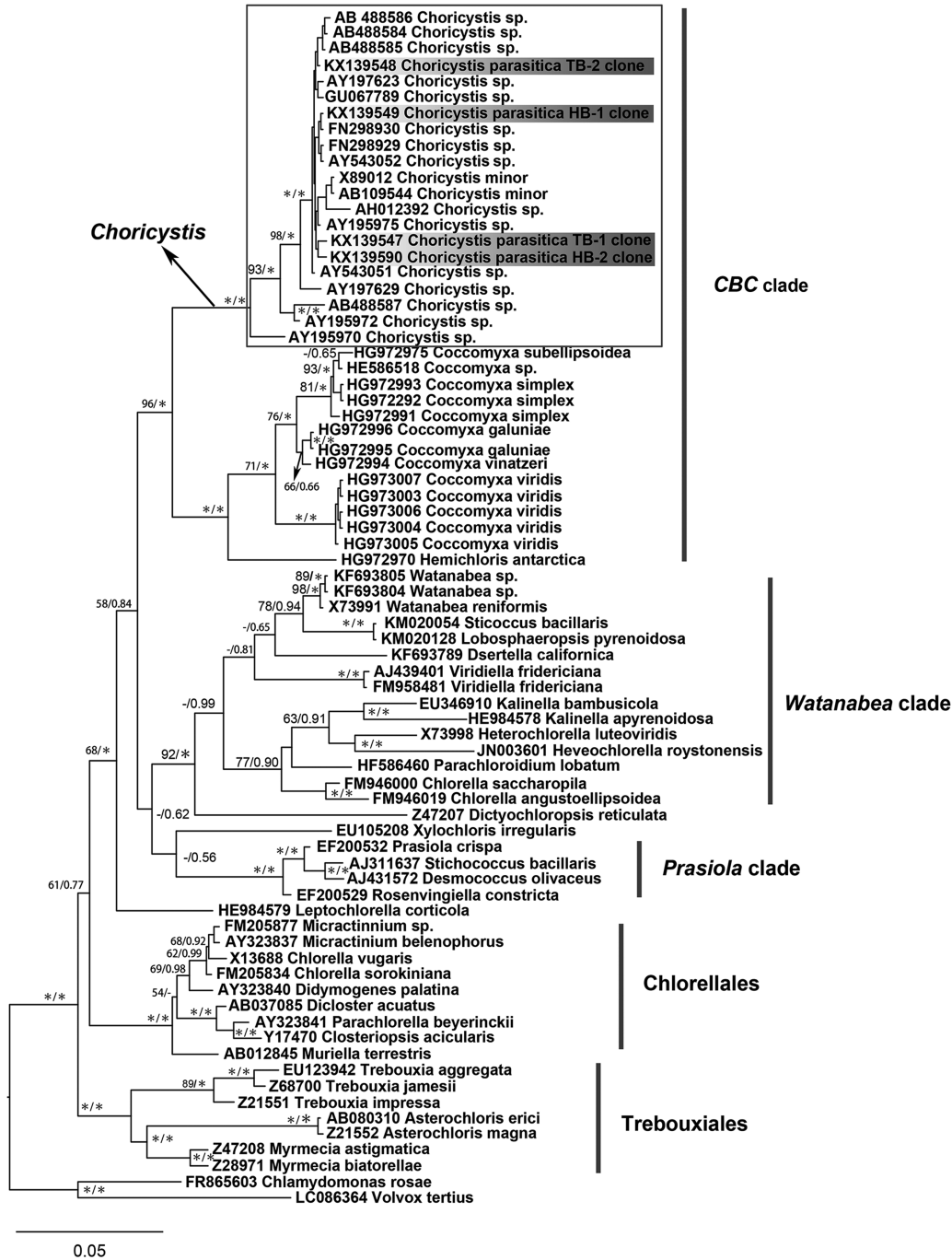


图 5 基于共球藻纲 18S rDNA 序列构建的系统进化树

Fig.5 The phylogram based on 18S rDNA sequences of Trebouxiophyceae

注: 节点处的数值显示了最大似然自展支持值和贝叶斯后验概率, 其中星号表示 100 或 1.00。索囊藻属与胶球藻属作为姊妹支构成了共球藻纲的 CBC 分支, 支持值为 100/1.00。本研究中获取的序列用灰色背景标出

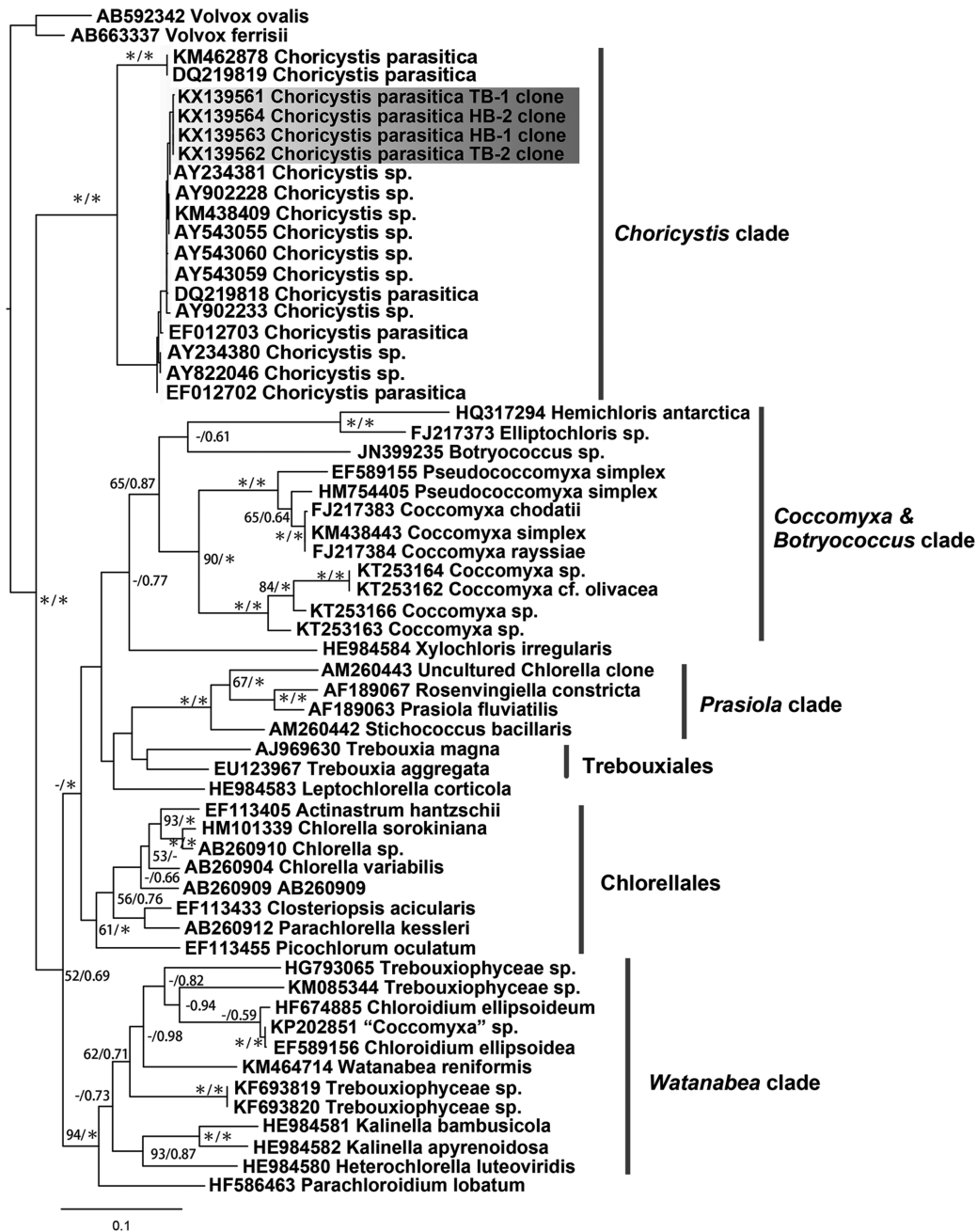


图6 基于共球藻纲 *rbcL* cpDNA 序列构建的系统进化树

Fig. 6 The phylogram based on *rbcL* rDNA sequences of Trebouxiophyceae

注: 节点处的数值显示了最大似然自展支持值和贝叶斯后验概率, 其中星号表示 100 或 1.00。索囊藻属较早地与其它共球藻纲支系分离单独聚为一支, 支持值为 100/1.00。灰色标记的为本研究获取的 *rbcL* cpDNA 序列

3 讨论

在球状绿藻类群中, 仅仅依靠显微形态来进行属种水平上的鉴定具有很大的缺陷和局限性, ITS2 二级结构对于解决种属水平的球状绿藻较为有效 (Coleman, 2007; Luo *et al*, 2010; Buchheim *et al*, 2011; Pröschold *et al*, 2011; Friedl *et al*, 2012; Krienitz *et al*, 2012; Leliaert *et al*, 2012)。这一观点在本研究中得到

证实。由于胶球藻科中的各个属在显微形态下基本差别不大, 对该科种类的鉴定往往依靠繁殖生物学的特征和超微结构特征以及分子特征。因此, 我们认为索囊藻属中其它各种的系统发育位置仍旧需要进一步的研究。

在共球藻纲中, 各个支系的系统发育位置仍旧充满争议 (Smith *et al*, 2011; Leliaert *et al*, 2012; Marin,

2012; Jeong *et al*, 2014; Lemieux *et al*, 2014; Orsini *et al*, 2016)。同时, 部分研究显示共球藻纲的并不是一个单系类群(Fučíková *et al*, 2014; Sun *et al*, 2016)。这些看似矛盾的结论可能主要是由基于核基因分子标记得出的进化分析结论与基于细胞器(质体或线粒体)基因组(或分子标记)不一致造成的(Pröschold *et al*, 2007; Leliaert *et al*, 2012)。本研究中也出现了这一现象, 即基于 18S rDNA 和 *rbcL* cpDNA 得出的共球藻纲的进化树具有不一致的拓扑结构。有学者认为这一问题的根源在于质体基因与核基因所面临的不同的进化压力(Smith *et al*, 2011; Jeong *et al*, 2014; Orsini *et al*, 2016)。总体而言, 我们推测共球藻纲的多数类群或支系其核基因进化速率与叶绿体基因的进化速率维持着相对稳定; 然而在一些特殊类群中, 如气生性的或内共生性的球状绿藻, 它们的特殊生境使得它们的叶绿体基因或核基因面临更大的进化压力, 进而表现出与二者之间有较大的进化速率。这表现在进化分析上就可能得出核基因与叶绿体基因不一致的拓扑结构。在本研究中的两株索囊藻均为内共生性的, 同时本研究中所用有详尽生境描述的索囊藻序列也均为内共生性。这表明针海绵与索囊藻可能是专一性共生。同时也在一定程度上支持了上述观点, 即针海绵将索囊藻吞噬牧植后其叶绿体基因或核基因表达速率可能升高, 进而表现为与其它共球藻纲支系不同的进化速率; 在拓扑结构上(基于核基因和质体基因的进化分析)这有可能表现为索囊藻处在不同的系统发育位置。

对索囊藻属进行系统的分类学研究比较困难, 这主要是因为索囊藻属内的物种采集较为困难。最近报道的索囊藻均为内共生性的种类, 且通过 ITS2 二级结构预测显示均为寄生索囊藻。可以说, 目前为止经过较为系统鉴定(包含有相应分子标记如 18S 和 ITS rDNA、*rbcL* 和 *tufA* cpDNA 等)的索囊藻仅有其模式种寄生索囊藻。已有描述的索囊藻属的种类在经过分子鉴定之后其分类可能会有进一步的革新。总体来讲, 绿藻门中包括索囊藻在内的球状绿藻的分类系统正处在急速的变革中。先前根据形态性状建立的种属需要较为全面的分子系统发育验证, 进而确定其系统发育位置; 此外, 球状绿藻存在较大的隐性多样性, 大量标本的采集和多种鉴定手段结合的多相方法对于解决这个问题可能较为有效。

致谢 样品采集过程中得到了中国科学院水生

物研究所何德奎博士、崔永德博士、贾银涛博士和熊雄博士的鼎力帮助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- Ankenbrand M J, Keller A, Wolf M *et al*, 2015. ITS2 database V: Twice as much. *Molecular Biology and Evolution*, 32(11): 3030—3032
- Beijerinck MW, 1890. *Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen*. *Botanische Zeitung*, 48: 725—785
- Bock C, Krienitz L, Pröschold T, 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2): 293—312
- Borowitzka M A, 2016. Systematics, Taxonomy and Species Names: Do They Matter? In: Borowitzka M A, Beardall J, Raven J A, eds. *The Physiology of Microalgae*. Switzerland: Springer, 655—681
- Brandt K, 1881. Ueber das Zusammenleben von Thieren und Algen. *Arch Anat Physiol*, 1881: 570—574
- Buchheim M A, Keller A, Koetschan C *et al*, 2011. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. *PLoS One*, 6(2): e16931
- Coleman A W, 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 35(10): 3322—3329
- Darienko T, Gustavs L, Mudimu O *et al*, 2010. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology*, 45(1): 79—95
- Darienko T, Gustavs L, Eggert A *et al*, 2015. Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS One*, 10(6): e0127838
- Darriba D, Taboada G L, Doallo R *et al*, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772—772
- Darty K, Denise A, Ponty Y, 2009. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25(15): 1974—1975
- Douglas A E, Huss V A R, 1986. On the characteristics and taxonomic position of symbiotic *Chlorella*. *Archives of Microbiology*, 145 (1): 80—84
- Fott B, Nováková M, 1969. A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. In: Fott B ed. *Studies in Phycology*. Praha, Czech: Academia, 10—74
- Fott B, 1976. *Choricystis*, eine neue Gattung der Chlorococcales (Chlorophyceae). *Arch Hydrobiol Supply*, 17: 382—388
- Friedl T, Rybalka N, 2012. Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status. In: Lüttge U, Beyschlag W, Büdel B, eds. *Progress in Botany 73*. Berlin Heidelberg: Springer, 259—280

- Fučíková K, Leliaert F, Cooper E D *et al*, 2014. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, <http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2014.00063>
- Greuter W, McNeill J, Barrie FR *et al*, 2000. International code of botanical nomenclature (Saint Louis Code). In: Saint Louis ed. *International code of botanical nomenclature*: St Louis, Missouri, USA: Sixteenth International Botanical Congress
- Guiry MD, Guiry GM. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched, 2016-07-26
- Hall T, 2013. BioEdit v7.2.3. Biological sequence alignment editor for Win 95/98/NT/2K/XP7. California: Ibis Biosciences Carlsbad
- Hayakawa Y I, Ogawa T, Yoshikawa S *et al*, 2012. Genetic and ecophysiological diversity of *Cladophora* (Cladophorales, Ulvophyceae) in various salinity regimes. *Phycological Research*, 60(2): 86—97
- Henley W J, Hironaka J L, Guillou L *et al*, 2004. Phylogenetic analysis of the ‘*Nannochloris*-like’ algae and diagnoses of *Picochlorum oklahomensis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, 43(6): 641—652
- Holweg C, Huss V A R, Kessler E *et al*, 1994. There is an Ecological Basis for Host Symbiont Specificity in *Chlorella Hydra* Symbioses. *Endocytobiosis and Cell Research*, 10(1—2): 35—46
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T *et al*, 1999. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S ribosomal RNA gene. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(6): 637—647
- Huss V A R, Sogin M L, 1990. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the Chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 31(5): 432—442
- Jeong H, Lim J M, Park J *et al*, 2014. Plastid and mitochondrial genomic sequences from Arctic *Chlorella* sp. ArM0029B. *BMC Genomics*, 15: 286
- Johnson M D, 2011. The acquisition of phototrophy: adaptive strategies of hosting endosymbionts and organelles. *Photosynthesis Research*, 107(1): 117—132
- Katoh K, Standley D M, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4): 772—780
- Kessler E, 1976. Comparative physiology, biochemistry, and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Systematics and Evolution*, 125(3): 129—138
- Kessler E, Huss V A R, 1990. Biochemical Taxonomy of Symbiotic *Chlorella* Strains from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Plant Biology*, 103(2): 140—142
- Kessler E, Huss V A R, 1992. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the university of Texas at Austin. *Journal of Phycology*, 28(4): 550—553
- Krienitz L, Hegewald E, Hepperle D *et al*, 2003. The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia*, 58: 437—446
- Krienitz L, Bock C, 2012. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*, 698(1): 295—326
- Krienitz L, Huss V A R, Bock C, 2015. *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*, 20(2): 67—69
- Kulichová J, Škaloud P, Neustupa J, 2014. Molecular diversity of green corticolous microalgae from two sub-Mediterranean European localities. *European Journal of Phycology*, 49(3): 345—355
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870—1874
- Lee H J, Hur S B, 2012. Comparison between phylogenetic relationships based on 18S rDNA sequences and growth by salinity of *Chlorella*-like species (Chlorophyta). *Fisheries and aquatic sciences*, 15(2): 125—135
- Lee J J, Reidy J, Kessler E, 1982. Symbiotic *Chlorella* species from larger Foraminifera. *Botanica Marina*, 25(4): 171—176
- Leliaert F, Smith D R, Moreau H *et al*, 2012. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1): 1—46
- Lemieux C, Otis C, Turmel M, 2014. Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae. *BMC Evolutionary Biology*, 14: 211
- Letsch M R, Muller-Parker G, Friedl T *et al*, 2009. *Elliptochloris marina* sp. nov. (Trebouxiophyceae, chlorophyta), symbiotic green alga of the temperate pacific sea Anemones *Anthopleura Xanthogrammica* and *A. elegantissima* (Anthozoa, Cnidaria). *Journal of Phycology*, 45(5): 1127—1135
- Luo W, Pröschold T, Bock C *et al*, 2010. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biology*, 12(3): 545—553
- Marin B, 2012. Nested in the Chlorellales or independent class? Phylogeny and classification of the Pedinophyceae (Viridiplantae) revealed by molecular phylogenetic analyses of complete nuclear and plastid-encoded rRNA operons. *Protist*, 163(5): 778—805
- Müller J, Friedl T, Hepperle D *et al*, 2005. Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and its rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 41(6): 1236—1247
- Orsini M, Cusano R, Costelli C *et al*, 2016. Complete genome sequence of chloroplast DNA (cpDNA) of *Chlorella sorokiniana*. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(2): 838—839
- Pröschold T, Leliaert F, 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: Brodie J. Lewis J, eds. *Unravelling the Algae: the Past, Present, and*

- Future of Algal Systematics. Boca Raton: CRC Press, 75: 123—153
- Pröschold T, Darienko T, Silva P C *et al*, 2011. The systematics of *Zoochlorella* revisited employing an integrative approach. *Environmental Microbiology*, 13(2): 350—364
- Rajević N, Kovačević G, Kalafatić M *et al*, 2015. Algal endosymbionts in European *Hydra* strains reflect multiple origins of the *zoochlorella* symbiosis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 93: 55—62
- Reisser W, 1984. The taxonomy of green algae endosymbiotic in ciliates and a sponge. *British Phycological Journal*, 19(4): 309—318
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P *et al*, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539—542
- Seibel P N, Müller T, Dandekar T *et al*, 2006. 4SALE—a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics*, 7: 498
- Skelton J, Strand M, 2013. Trophic ecology of a freshwater sponge (*Spongilla lacustris*) revealed by stable isotope analysis. *Hydrobiologia*, 709(1): 227—235
- Skuja H, 1948. Taxonomie des Phytoplanktons Einiger Seen in Uppland, Schweden. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 9: 1—399
- Smith D R, Burki F, Yamada T *et al*, 2011. The GC-rich mitochondrial and plastid genomes of the green alga *Coccomyxa* give insight into the evolution of organelle DNA nucleotide landscape. *PLoS One*, 6(8): e23624
- Stamatakis A, 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312—1313
- Sun L H, Fang L, Zhang Z H *et al*, 2016. Chloroplast Phylogenomic Inference of Green Algae Relationships. *Scientific Reports*, 6: 20528
- Takeda H, 1995. Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Phytochemistry*, 40(2): 457—459
- Vinayakumar M, Kessler E, 1975. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. *Archives of Microbiology*, 103(1): 13—19
- Xia X H, 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 30(7): 1720—1728
- Zechman F W, 2003. Phylogeny of the dasycladales (Chlorophyta, Ulvophyceae) based on analyses of rubisco large subunit (rbcL) gene sequences. *Journal of Phycology*, 39(4): 819—827

THE ENDOSYMBIOTIC GENUS *CHORICYSTIS* (TREBOUXIOPHYCEAE), A NEW RECORD FROM CHINA

ZHU Huan¹, SONG Hui-Yin^{1,3}, WANG Qing-Hua^{1,3}, HU Yu-Xin^{1,3}, HU Zheng-Yu², LIU Guo-Xiang¹

(1. Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. State key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Two green freshwater sponge samples were collected from Nagtsang Tso, Tibet and Ziyang Lake, Hubei. The endosymbiotic algae were observed within sponge cells of both samples. The coccoid algae were identified as *Choricystis parasitica* based on morphological observation and phylogenetic analysis. The main results including: (1) both strains were broadly ellipsoid, with a size about 1.2—2.8 μm in length and 0.8—1.5 μm in width and the chloroplast were parietal without pyrenoid; (2) the phylogenetic analysis based on 18S rDNA and rbcL cpDNA showed that the two strains were nested in the family Coccomyxaceae, the genus *Choricystis*; (3) The two strains shared a same ITS2 secondary structure with the type species, *Choricystis parasitica*. This paper first described the species *Choricystis parasitica* and the genus *Choricystis* in China, provided the morphological and molecular evidences of Chinese *Choricystis* specimens, and enriched the diversity of green algae in China with a useful reference about this group for further studies.

Key words coccoid green algae; ITS2 secondary structure; freshwater sponge; *Choricystis*; Phylogeny