

doi: 10.7541/2013.37

中国蓝藻植物的新记录属—拟甲色球藻

刘洋 朱梦灵 徐瑶 虞功亮 李仁辉

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 拟甲色球藻(*Chroococidiopsis* Geitler 1933)在全球分布广泛,并在极端环境下多有发现,但目前在中国尚无报道。研究在对太湖水体进行野外调查时观察到了水体中的 *Chroococidiopsis*,并分离得到纯培养藻株,编号为 CHAB1690。拟甲色球藻属(*Chroococidiopsis*)为我国新记录属,本文描述了该属的特征。对 16S rRNA 基因进行测序分析表明: CHAB1690 与拟甲色球藻属的模式种温泉拟甲色球藻(*Chroococidiopsis thermalis*)基因序列相似度仅为 91%,暂未定种; CHAB1690 与欧洲的两株未定种 *Chroococidiopsis* 相似度较高,并与大多数拟甲色球藻(*Chroococidiopsis*)聚集在一起,但仍有少数藻株聚集在距离较远的另一个类群。比较两个类群中藻株的最低相似率,结果表明,基于形态界定的拟甲色球藻属(*Chroococidiopsis*)可能包含多个属。

关键词: 蓝藻; 拟甲色球藻; 温泉拟甲色球藻; 分类; 新记录

中图分类号: Q949.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0413-05

拟甲色球藻(*Chroococidiopsis*)是 Geitler 在 1933 年建立的单细胞群体蓝藻,在现代四目蓝藻分类系统中^[1],它属于色球藻目、异球藻科(Xenococaceae)。拟甲色球藻在全球分布广泛,从南极的岩石缝隙到印度尼西亚的热泉,以及世界各地的炎热沙漠或山洞中都被发现过^[2-6],而且在热带的草原上发现它们存在于地衣共生系统中^[7]。拟甲色球藻的一些种类能长期抗干旱和电离辐射^[8],为此美国国家航空航天局的一些科学家就希望通过研究使其成为火星的拓荒者。另外,一些拟甲色球藻种类则生活在水体中,包括淡水、海水、高盐度水体^[9]。目前,国际上对拟甲色球藻的关注多集中在对荒漠等极端环境下的研究,水体中也是以温泉为主的报道。我们最近在太湖进行蓝藻水华的调查和研究时,发现了拟甲色球藻存在于太湖水体中,通过对野外水体样品的分离培养,获得了拟甲色球藻单种培养藻种。通过对野外样品以及单种培养藻种的形态观察和聚类分析,确认为拟甲色球藻(*Chroococidiopsis*)的藻种,这是尚未在中国报道过的新记录属。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

采集地点为地处于江苏省宜兴大浦镇附近的西太湖,坐标为 N31°06'8.70"E 120°0'5.90",用 25 号筛绢制作的浮游生物网采集藻类样品。

1.2 藻种分离

用毛细管分离法:将灭菌后的巴斯德吸管制作成毛细管(Pasteur Micropipette),在解剖镜下挑取单个群体,清洗 6—8 次后^[10],最后放入含有 2 mL CT 培养基^[11]的 24 孔细胞培养板(无菌)中,培养温度为 25℃,白色灯光为光源,光照强度为 25 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照周期为 12h 12h(L D)。本研究使用的藻株编号为 CHAB1690,藻种保存于中国科学院水生生物研究所有害藻类学科组藻种库。

1.3 形态观察和测量

藻细胞形态的观察使用 Nikon eclipse 80i 型光学显微镜,外接数码相机(DS-Ri1)与台式计算机。数码拍照和数据测量通过其附带的图像分析软件 NIS-Elements D 3.2 实行。选取 50 个以上的藻体进

收稿日期: 2012-09-10; 修订日期: 2013-03-06

基金项目: 中国科学院知识创新工程(KSCX2-YW-Z-0932)资助

作者简介: 刘洋(1983—),男,河南新乡人;博士研究生;主要从事有害藻类分子监测及分类学研究。E-mail: ly@ihb.ac.cn

通信作者: 李仁辉(1965—),研究员;主要从事蓝藻分类系统以及藻类环境生物学研究。E-mail: reli@ihb.ac.cn

行各项数据的测量统计。

1.4 16S rRNA 基因序列测定和分子系统分析

对分离的藻株培养富集后, 进行 DNA 提取, 方法参考 Lin, *et al.*^[12]。用于扩增 16S rDNA 的引物为: 27F1(5'-AGAGTTTTGATCCTGGCTCAG-3')^[13]和 B23S(5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3')^[14], 由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μ L, 包含 200 mmol/L dNTP; 1.5 mmol/L MgCl₂; 1 \times bufferPCR 缓冲液; 10 pmol 引物; 1 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 通过胶回收试剂盒回收(BioFlux), 克隆到载体 pMD18-T 上(Takara, Japan)。将克隆载体转入感受态细胞 *E.coli* DH5 α 中, 菌液送北京华大基因科技有限公司进行双向测序, 测序后得到两段序列用 BioEdit 软件拼接。序列通过 NCBI 的 BLAST 进行比对, 并将获得序列和从 GenBank 数据库中下载的基因序列用 Clustal X1.83 软件进行对位排列。运用分子进化遗传分析软件 MEGA5.0 基于 Kimura two-parameter 模型构建邻接法关系树(NJ tree), 步展值(Bootstrap value)设为 1000, 空位或缺失位点均当作配对删除(Pairwise deletion)处理, 以 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 为外类群。

2 结果

2.1 拟甲色球藻属 *Chroococidiopsis* 形态特征

拟甲色球藻属(*Chroococidiopsis*)由 Geitler 建立于 1933 年, 现在的分类系统中隶属于蓝藻门(Cyanophyta)、蓝藻纲(Cyanophyceae)、色球藻目(Chroococcales)、异球藻科(Xenococcaceae), 以温

泉拟甲色球藻(*Chroococidiopsis thermalis*)为模式种。本属目前共报道过 13 个种^[1]。

单细胞或形成规则或不规则的球状群体。群体具有薄而坚实的无色胶被(图 1B 中箭头所指, 子细胞逃逸后留下的胶被)。群体常常聚集成肉眼可见的片状。群体直径为 31—57 μ m, 平均直径为 40 μ m。细胞球形、半球形或类多边形, 直径 4—10 μ m, 平均直径为 6.5 μ m, 细胞不规则分裂, 母细胞分裂出的子细胞通常大小形态各异(图 1C 箭头所指)。原生质体绿色, 无气囊。同一群体中的细胞尺寸大小不一, 排列紧密(图 1)。

有些细胞之后会变成内生孢子(或者某个群体中的部分细胞), 不同种类, 其内生孢子数量不同。绝大部分拟甲色球藻的内生孢子无运动特征, 但偶有出现, 且运行型内生孢子的出现取决于环境因子。分裂后的细胞或单细胞会从裂开的胶被中释放出来, 群体胶被通常透明。

2.2 分子系统分析

利用上述引物扩增 16S rRNA 基因, 获得了 2127 bp 的序列, GenBank 号为 JX494785。但与 GenBank 藻株序列进行比对处理后, 截取了最大可使用的 1182 bp 构建系统树。将测序结果和通过 Blast 比对得到的相似序列以及目前 Genbank 中已有的拟甲色球藻 16S rRNA 基因序列构建分子系统树(图 2)。太湖的 *Chroococidiopsis* CHAB1690 藻株同两株欧洲的 *Chroococidiopsis* 藻株(AJ344552 和 AJ344555)相似度很高(相似度均达到 99%), 从而聚在一起(图 2)。而目前 Genbank 收集的拟甲色球藻种类在分子系统树上归属于两个类群(I 和 II), 太湖的藻株则聚在了类群 I, 该类群藻株的最低相似度为

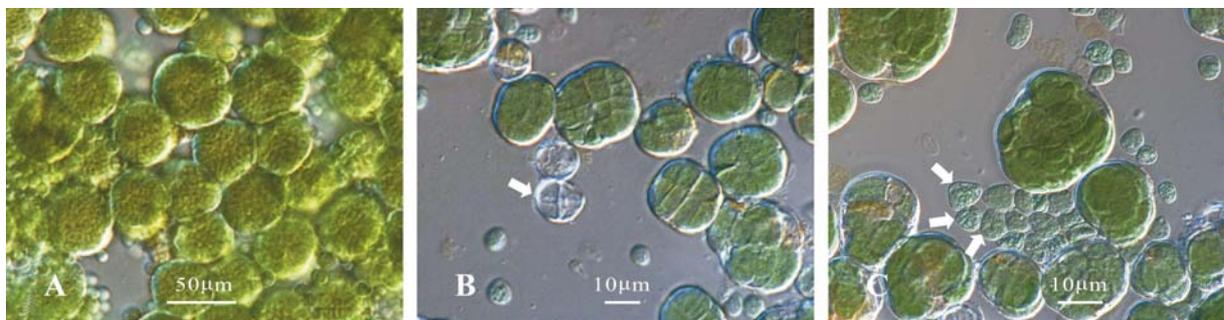


图 1 显微镜下 *Chroococidiopsis* CHAB1690 的形态

Fig. 1 Morphological image of *Chroococidiopsis* CHAB1690

A. 群体, 标尺=50 μ m; B. 图中箭头所指的是细胞逸出后剩下的胶被, 标尺=10 μ m; C. 图中箭头所指的是形态各异的子细胞, 标尺=10 μ m
A. colonies, Scale bar=50 μ m; B. Arrow indicates the thin, firm sheath without cells, Scale bar=10 μ m; C. Arrows indicates the daughter cells of different shape and size, Scale bar=10 μ m

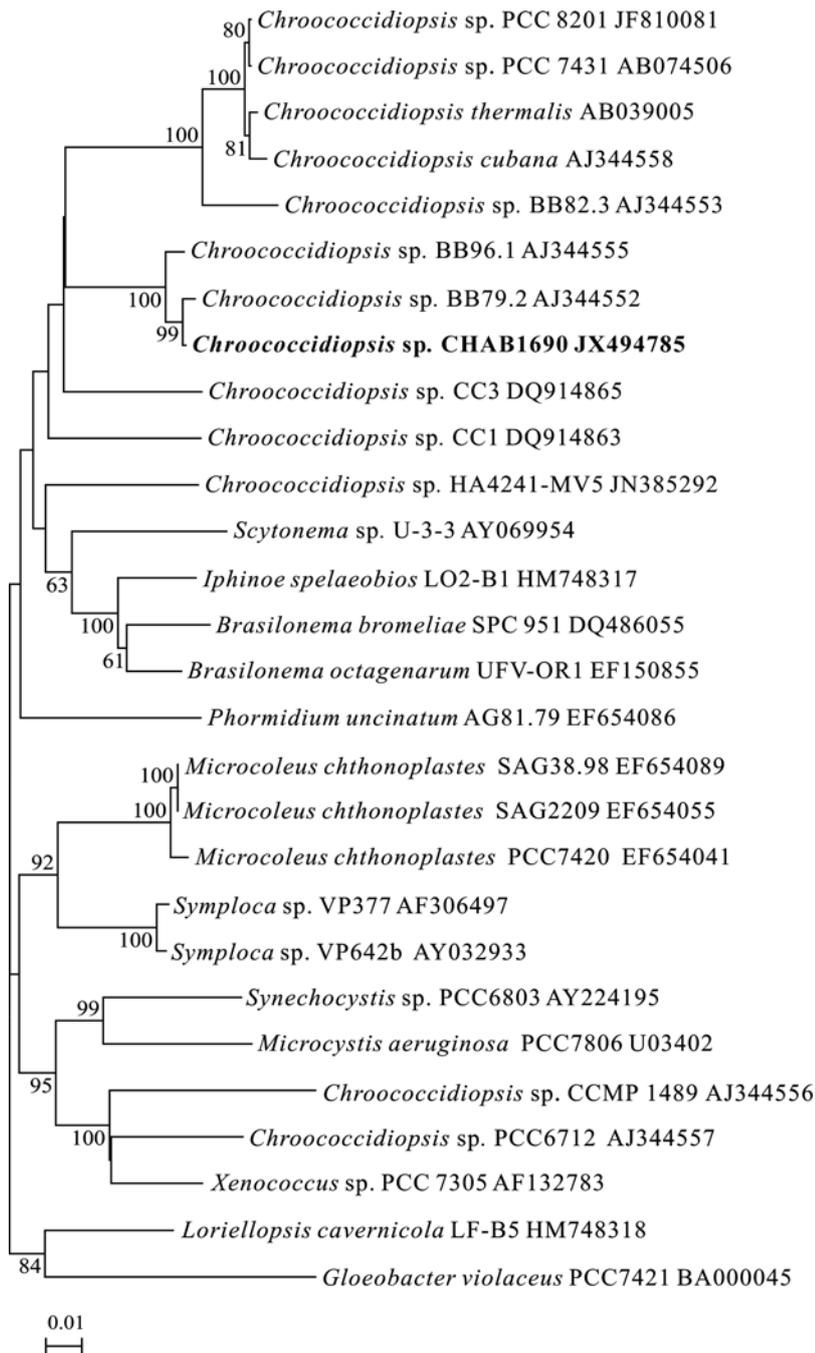


图2 基于 16S rRNA 基因序列的 NJ 分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree (NJ) based on 16S rDNA sequences

节点处数字代表 1000 重复 Bootstrap 值的百分数, 低于 50% 的未显示

The numbers at each nodes represent the percentage of bootstrap setting as 1000, only those above 50% are showed

88%。另有少数藻株聚在了较远的另一个类群 II。两个类群的最低相似度为 86%。

3 讨论

单细胞群体蓝藻异球藻科(Xenococcaceae)在以前五目蓝藻分类系统(色球藻目、厚皮藻目、颤藻目、

念珠藻目和真枝藻目)中归属于厚皮藻目, 但是最近的蓝藻分类系统还是以四目系统为主流^[1]。与拟甲色球藻属同属于异球藻科的还有另外 5 个属(*Chroococcidium*、

I *Myxosarcina*、*Xenococcus*、*Chroococcopsis*、*Xenotholos*), 该属区别于其他藻属的特征是群体具有薄而坚固且清晰的胶鞘, 并且群体内的细胞不会出现排成一列的假丝形态或阶段^[1]。中国拟甲色球藻虽然尚未得到详细描述, 但在个别文献中也有提及, 且在一些文献中被译为拟色球藻^[15]。根据藻属拉丁名的词根含义, *Chroococcopsis* 才是拟色球藻, 且已有资料可考^[16]。从两属的形态特征比较来看, 拟甲色球藻属群体内的细胞不会出现成列细胞的假丝形态或阶段, 而在拟色球藻属(*Chroococcopsis*)藻株的群体中则会呈现出成列细胞扇形分布的现象^[1]。拟甲色球藻属目前报道有 13 个种, 但详细描述的仅有 2 个种, 其中温泉拟甲色球藻(*Chroococcidiopsis thermalis*)为淡水种, 常在温泉中发现, *Chroococcidiopsis fissurarum* 则生活在海水中。根据形态特征, 太湖的拟甲色球藻类似于温泉拟甲色球藻, 但是此太湖藻种的 16S rRNA 基因序列同温泉拟甲色球藻(*Chroococcidiopsis thermalis* PCC7203)的相似度仅为 91%。而同本太湖藻种最为相似的两欧洲藻种并没有确定种名, 并且它们的形态特征也无法查阅。所以从生活习性和 16S rRNA 基因的序列来看, 此太湖的种类基本可以排除在 *Chroococcidiopsis thermalis* 和 *Chroococcidiopsis fissurarum* 之外, 但它是否为一新种, 还是其他的种类还需要大量的深入研究。总之, 以形态特征为界定的拟甲色球藻属并不是一个单系类群。分子系统学分析表明, 拟甲色球藻属的类群 I 和类

II

群 II 中藻株的最低相似度仅为 86%，而类群 I 内部中藻株的最低相似度也不到 90%。根据属内 16S rRNA 序列相似度不低于 95% 的原则^[17, 18]，这两个类群中的藻株可能不属于同一个属，所以目前的拟甲色球藻属 (*Chroococcidiopsis*) 中可能包含了多个种。对拟甲色球藻属分类学的整理，需要对此属的模式种类 (Type species) 和模式藻种 (Type strain) 的准确确定。通过大量的多种特征的比较，才能建立起一个自然的拟甲色球藻的分类系统，为异球藻科分类系统的梳理提供条件。我们期待中国境内更多拟甲色球藻属的藻类的发现，为其分类学和其他生物学的研究提供更多的材料。

参考文献:

- [1] Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota-2. Teil: Oscillatoriales [M]. Heifelberg: Elsevier GmbH. 2005, 419—435
- [2] Büdel B. Ecology and diversity of rock inhabiting cyanobacteria in tropical regions [J]. *European Journal of Phycology*, 1999, **34**: 361—370
- [3] Friedmann E I. The ecology of the atomphytic nitrate alga *Chroococcidiopsis kashaii* Friedmann Studies on cave algae from Israel [J]. *Archiv fur Mikrobiologie*, 1962, **42**: 42—45
- [4] Friedmann E I, Ocampo R. Endolithic blue-green algae in the dry valleys: Primary producers in the Antarctic desert ecosystem [J]. *Science*, 1976, **193**: 1247—1249
- [5] Friedmann E I, Ocampo-Friedmann R. Endolithic Microorganisms in Extreme Dry Environments: Analysis of a Lithobiontic Microbial Habitat [M]. In: M J Klug, C A Reddey (Eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. 1984, 177—185
- [6] Geitler L. Diagnosen neuer Blaualgen von den Sunda-Inseln [J]. *Archiv fur Hydrobiologie, Supplementband*, 1933, **8**: 622
- [7] Büdel B, Henssen A. *Chroococcidiopsis* (Cyanophyceae), a phycobiont in the lichen family Lichinaceae [J]. *Phycologia*, 1983, **22**: 367—375
- [8] Billi D, Friedmann E I, Hofer K G, *et al.* Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis* [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2000, **66**: 1489—1492
- [9] Dor I, Carl N, Baldinger I. Polymorphism and salinity tolerance as a criterion for differentiation of three new species of *Chroococcidiopsis* (Chroococcales) [J]. *Algological Studies*, 1991, **64**: 411—421
- [10] Watanabe M M, Hiroki M. NIES-collection: List of Strains, Microalgae and Protozoa [M]. 5th ed. Tsukuba: National Institute for Environmental Studies. 1997, 140
- [11] Yang L, Yu G L, Li R H. Eight newly recorded species of *Anabaena* Bory (Nostocaceae, Cyanophyta) from China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 917—923 [杨丽, 虞功亮, 李仁辉. 中国鱼腥藻属的八个新记录种. *水生生物学报*, 2009, **33**(5): 917—923]
- [12] Lin S, Shen J, Liu Y, *et al.* Molecular evaluation on the distribution, diversity, and toxicity of *Microcystis* (Cyanobacteria) species from Lake Ulungur—a mesotrophic brackish desert lake in Xinjiang, China [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, **175**(1—4): 139—150
- [13] Neilan B A, Jacobs D, Del Dot T, *et al.* rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis* [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, **47**: 693—697
- [14] Taton A, Grubisic S, Brambilla E, *et al.* Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurado Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2003, **69**: 5157—5169
- [15] Hu H J, Wei Y X. The Freshwater Algae of China. Systematics, Taxonomy, and Ecology [M]. Beijing: Science Press. 2006, 28 [胡鸿钧, 魏印心. 中国淡水藻类——系统、分类及生态. 北京: 科学出版社. 2006, 28]
- [16] Zeng C K, Bi L J. Aglossary of Terms and Names of Algae (2nd edition) [M]. Beijing: Science Press. 2005, 101 [曾呈奎, 毕列爵. 藻类名词及名称(第二版). 北京: 科学出版社. 2005, 101]
- [17] Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, *et al.* Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis [J]. *Electrophoresis*, 1998, **19**: 554—568
- [18] Stackebrandt E, Goebel B M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, **44**: 846—849

A NEW CYANOBACTERIAL GENUS *CHROOCOCCIDIOPSIS* (XENOCOCCACEAE) FROM CHINA

LIU Yang, ZHU Meng-Ling, XU Yao, YU Gong-Liang and LI Ren-Hui

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: *Chroococcidiopsis*, a unicellular cyanobacterial genus, distributes worldwide, and was found in extreme environments, but no *Chroococcidiopsis* species were reported from China. In this study, we successfully isolated a *Chroococcidiopsis* strain, encoded CHAB1690 from the Taihu Lake. This strain was morphologically similar to the hot spring species *Chroococcidiopsis thermalis*, however, low similarity of the 16S rRNA gene sequences (91%) and habitat difference distinguish this strain from *C. thermalis*. Including the *Chroococcidiopsis* CHAB1690 strain in the present study, the phylogeny based on the 16S rRNA gene sequences revealed that *Chroococcidiopsis* is a polyphyletic genus, and the reported *Chroococcidiopsis* species need thoroughly polyphasic reexamination.

Key words: Cyanobacteria; *Chroococcidiopsis*; *Chroococcidiopsis thermalis*; Taxonomy; New record