

doi: 10.7541/2024.2023.0340

## 中国裸藻属新记录种的形态学和分子系统学研究

姜小蝶<sup>1,2</sup> 朱为菊<sup>1</sup> 庞婉婷<sup>2</sup> 王全喜<sup>2</sup>

(1. 琼台师范学院理学院, 海南 571127; 2. 上海师范大学生命科学学院, 上海 200234)

**摘要:** 文章报道了来自中国上海市、黑龙江省和甘肃省的16株裸藻属物种, 使用光学显微镜对其形态学特征进行了详细的观察, 同时对所有藻株进行分离、纯化和培养, 提取DNA后扩增各藻株的4个分子序列, 并使用贝叶斯法和最大似然法构建系统发育树, 结合形态学方法和分子生物学手段鉴定为9个中国裸藻属新记录种, 分别为敏捷裸藻*Euglena agilis*、裸脊裸藻*E. gymnodinoides*、耶氏裸藻*E. jirovecii*、曼克斯裸藻*E. mainxii*、后缩裸藻*E. retronata*、光明裸藻*E. splendens*、星形裸藻*E. stellata*、拟星形裸藻*E. pseudostellata*和波形裸藻*E. undulata*, 对所有物种的形态学特征进行了详细的描述, 同时明确了各物种的系统发育位置。这些物种均是首次在中国发现, 中国裸藻属新记录种的发现将对裸藻属单系性研究及中国绿色裸藻类生物多样性组成研究提供数据支撑。

**关键词:** 新记录; 形态特征; 分子数据; 裸藻属

**中图分类号:** Q949.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2024)06-1011-08



裸藻属(*Euglena* Ehrenberg)隶属于裸藻门(Euglenophyta)裸藻纲(Euglenophyceae)裸藻目(Euglenales)裸藻科(Euglenaceae), 该属是绿色裸藻类(即细胞具色素体, 可进行光合作用)中尤为受关注的类群之一。对裸藻属的研究最早可追溯到1674年, 列文虎克在显微镜下观察到了绿色裸藻*E. viridis* (Müller) Ehrenberg<sup>[1]</sup>。但直到1830年, Ehrenberg<sup>[2]</sup>将*Cercaria viridis* Müller、*Enchelys sanguinea* Ness and Golgfufs、*Vibrio acus* Müller和*Cercaria pleuronectes* Müller这4个已经描述过的藻种和他发现的2个新种: 梨形裸藻*Euglena pyrum* Ehrenberg和长尾裸藻*Euglena longicauda* Ehrenberg合并在一起才建立了裸藻属, 当时并未指定模式种, 直到1841年, Dujardin指定绿色裸藻为裸藻属模式种<sup>[3]</sup>。随后, 陆续有学者增加了更多的裸藻属物种<sup>[3-8]</sup>, 目前全世界共报道了裸藻属物种167种<sup>[9]</sup>。

相较于国际, 中国仍有大量裸藻属物种还未被发现。国内对该类群的研究最早是由Skvortzov于20世纪20—30年代, 在我国(特别是东北地区)做了

不少有关裸藻类(包括裸藻属)的调查, 但对中国裸藻属物种最为全面的研究则记录于1999年出版的“裸藻志”中<sup>[10]</sup>, 书中共报道裸藻属物种62种(其中12种已在国外的研究中移出裸藻属)。此后, 对裸藻属的分类研究减少, 仅有零星报道, 且多在浮游植物群落调查研究中有所提及。

本研究于2019—2021年在中国上海市、黑龙江省和甘肃省采集到16株裸藻属物种, 通过观察藻株形态学特征, 测定4个核糖体序列(18S rDNA、28S rDNA、16S rDNA和23S rDNA), 基于贝叶斯法和最大似然法构建系统发育树, 鉴定为9个中国裸藻属新记录种。本文基于形态学和分子生物学手段对9个新记录种的形态特征进行了详细的描述, 明确其系统发育位置, 并给出各物种生境及国内外分布情况。

### 1 材料与方法

#### 1.1 样品的采集、分离与培养

本研究于2019—2021年在中国广泛采集绿色

收稿日期: 2022-10-27; 修订日期: 2023-12-18

基金项目: 上海市自然科学基金(23ZR1446800); 海南省自然科学基金(322RC739)资助 [Supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (23ZR1446800); the Natural Science Foundation of Hainan Province (322RC739)]

作者简介: 姜小蝶(1995—), 女, 博士; 主要从事藻类学研究。E-mail: 470821409@qq.com

通信作者: 庞婉婷, 女, 副教授; 主要从事藻类分类与生态研究。E-mail: pangwt@shnu.edu.cn

裸藻类样品,使用孔径为20  $\mu\text{m}$ 的浮游生物网在水体中来回拖拽多次,将水样收集于50 mL采样瓶后带回实验室对藻株进行分离、纯化、培养,使用AF-6培养基,培养温度(23 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ ,光照3000 lx,光暗比(L:D)为14h:10h。共培养裸藻属物种16株,9种;研究材料采集信息见表1。

表1 实验材料采集信息

Tab. 1 Strain collection information and GenBank accession number

藻种 Species	藻株 Strain	采集地 Location	采集时间 Collection date
敏捷裸藻 <i>Euglena agilis</i> Carter	S25D5	黑龙江省哈尔滨市,滨水大道	2020.7.31
裸脊裸藻 <i>Euglena gymnodinoides</i> Zakryś	SHNUS48A2	上海市,漕溪公园	2020.9.22
	SHNUS63D3	上海市,光启公园	2020.10.27
耶氏裸藻 <i>Euglena jirovecii</i> Fott	SHNUJ-1	上海市,上海师范大学植物园	2019.11.6
	SHNUS26B2	黑龙江省哈尔滨市,滨水大道	2020.7.31
曼克斯裸藻 <i>Euglena mainxii</i> Deflandre	SHNUQ25A5	上海市,青西郊野公园	2021.8.9
后缩裸藻 <i>Euglena retronata</i> Johnson	SHNUQ20B1	甘肃省平凉市,柳湖公园	2021.8.1
	SHNUQ20B5	甘肃省平凉市,柳湖公园	2021.8.1
光明裸藻 <i>Euglena splendens</i> Dangeard	SHNUJm2V	上海市,浦江郊野公园	2020.8.19
	SHNUQ24C1	上海市,徐家湾	2021.8.8
	SHNUQ25C1	上海市,大莲湖	2021.8.9
星形裸藻 <i>Euglena stellata</i> Mainx	SHNUQ20B3	甘肃省平凉市,柳湖公园	2021.8.1
拟星形裸藻 <i>Euglena pseudostellata</i> Zakryś et Kosmala	SHNUQ26C1	上海市,淀山湖	2021.8.9
	SHNUS22B6	黑龙江省哈尔滨市,滨水大道	2020.7.31
波形裸藻 <i>Euglena undulata</i> Kato	SHNUQ12A2	上海市,上海植物园	2021.6.23
	SHNUQ12B2	上海市,上海植物园	2021.6.23

## 1.2 形态学鉴定

使用光学显微镜(Carl Zeiss Inc., Hallbergmoos, Germany)进行观察拍照,主要观察特征有:藻株的形状、色素体形态及副淀粉粒形态,并对藻株的大小进行测量(图1)。

## 1.3 总DNA提取、扩增与测序

使用10%的螯合树脂Chelex 100(索莱宝)提取所有培养藻株的总DNA,并对藻株的18S rDNA (~2000 bp)、28S rDNA (~1000 bp)、16S rDNA (~1000 bp)和23S rDNA (~2000 bp)进行扩增和测序。采用已发表的引物、反应混合和扩增条件进行聚合酶链反应(表2)。PCR产物送到华大基因科技公司

(中国上海),用ABI 3730XL测序仪进行测序,本研究得到的藻株序列已上传至GenBank。

## 1.4 系统发育树的构建

本研究使用裸藻属46株、眼裸藻属*Euglenaria* Linton, Karnkowska et Kwiatowski 6株、拟裸藻属*Euglenaformis* M.S.Bennett & Triemer 2株、柄裸藻属*Colacium* Ehrenberg 1株、隐裸藻属*Cryptoglana* Ehrenberg 2株、陀螺藻属*Strombomonas* Deflandre 2株、囊裸藻属*Trachelomonas* Ehrenberg 2株、旋形藻属*Monoomorpha* Mereschkowsky 2株、盘状藻属*Discoplastis* Triemer 2株、易变裸藻属*Flexiglana* Zakryś & Lukomska 2株、鳞孔藻属*Lepocinclis* Perty 2株和扁裸藻属*Phacus* Dujardin 2株来构建系统发育树。

所有序列从GenBank中下载,并使用BioEdit序列分析软件中的Clustal W选项进行比对<sup>[15,16]</sup>,删除非常短的序列(<200 bp)。将比对后的序列导入MEGA6.0软件,剔除相同和接近相同的序列。筛选后的序列导入Sequence Matrix软件,将所有类群的18S rDNA、28S rDNA、16S rDNA和23S rDNA序列进行联合<sup>[17]</sup>,最后使用PhyloSuite v1.2.2<sup>[18]</sup>中的ModelFinder v1.6.8选择序列最优模型<sup>[19]</sup>(表3),以扁裸藻科植物为外类群,利用IQ-TREE v1.6.8基于最大似然法构建系统发育树<sup>[20]</sup>,使用MrBayes v3.2.6

表2 基因PCR扩增和测序引物信息

Tab. 2 Primer for PCR amplification and sequencing

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence	引物出处 Reference
18S rDNA	18S5	CAGTGGGTCTGTGA	[11]
	18S3	ATGGCTCC CGACGGGCGGTGT GTACAAGT	
28S rDNA	28SFn	CTGTTTAATTGAAA	[12]
	28SRn	CCCAGC ACGACGGTCTAAA CCCAG	
16S rDNA	cpSSU-F	TTGATCCTGGCTCA	[13]
	cpSSU-R	GGATGAACGCT CAAGGAGGTGATC CAGCCGACCTT	
23S rDNA	23S_AF	ATAAGCTTCATTGT	[14]
	23S_R	CRARAGG TATGCTTTCAGCAG TTATCCAC	

表3 构建系统发育树的最优化模型参数

Tab. 3 Substitution model obtained for each gene sequence

各序列模型选择 Model selected	贝叶斯法 Bayesian	最大似然法 Maximum Likelihood
16S rDNA	GTR+F+I+G4	GTR+F+R8
23S rDNA	GTR+F+I+G4	GTR+F+R8
18S rDNA	GTR+F+I+G4	TN+F+R4
28S rDNA	GTR+F+I+G4	TN+F+I+G4

基于贝叶斯法构建系统发育树<sup>[21]</sup>, 运行超过 10000000 代(图 3)。

## 2 结果

结合形态特征和分子数据, 我们鉴定 16 株裸藻属物种为 9 个裸藻属中国新记录物种; 在室内培养的过程中, 仅观察到无性繁殖(细胞纵向分裂), 没有观察到其他繁殖方式, 各物种形态特征见图 1—2。

### 2.1 形态学特征

#### 敏捷裸藻(图 1A—E)

*Euglena agilis* Carter, Ann. Mag. Nat Hist. 218: 240, Pl. VI, fig. 62, 1856; Gojdics, Gen. *Euglena*, p. 135-136, Pl. 1, fig. 5, 1953.

细胞表质柔软, 易变形(图 1B—C), 游动时呈圆柱形, 前端钝圆, 后端渐尖(图 1D); 长 13.0—21.6  $\mu\text{m}$ , 宽 10.2—16.5  $\mu\text{m}$ , 表质具线纹; 色素体呈细长的带状, 2 个, 具带副淀粉鞘的蛋白核, 副淀粉鞘为单侧球形(图 1B); 副淀粉粒为卵形和短棒形; 状态不好时, 色素体呈板状, 副淀粉粒数量增多(图 1D—E)。

生境: 沼泽。

国内分布: 黑龙江。

国外分布: 欧洲、南美洲、中东、亚洲、非洲、澳洲。

#### 耶氏裸藻(图 1F—G)

*Euglena jirovecii* Fott, Preslia 25: 150, figs. b—c, 1953.

细胞表质柔软, 易变形(图 1G), 游动时呈纺锤

形(图 1F), 两端较中间窄, 后端圆, 不具尾; 长 24.8—45.0  $\mu\text{m}$ , 宽 13.6—21.8  $\mu\text{m}$ , 表质具线纹; 色素体带状, 2 个, 具带副淀粉鞘的蛋白核, 副淀粉鞘为两侧表壳形(图 1G); 副淀粉粒为小的圆球形; 状态不好时, 副淀粉粒数量会增多。

生境: 池塘、沼泽。

国内分布: 上海、黑龙江。

国外分布: 欧洲。

#### 波形裸藻(图 1H—K)

*Euglena undulata* Kato, J. Jpn. Bot. 58: 238, figs. 1-3, 1983; Zakryś *et al.*, Eur. J. Phycol. 48: 260-267, figs. 7-8, 2013.

细胞表质柔软, 易变形(图 1I—K), 游动时呈纺锤形, 两端较中间窄, 后端具短尾突(图 1H); 长 23.8—35.9  $\mu\text{m}$ , 宽 16.4—21.8  $\mu\text{m}$ ; 表质具线纹; 色素体带状, 具带副淀粉鞘的蛋白核; 副淀粉粒为圆球形。

生境: 池塘。

国内分布: 上海。

国外分布: 欧洲。

#### 裸脊裸藻(图 1L)

*Euglena gymnodinoides* Zakryś, Nova Hedwigia 42: 508-510, Pl. II, fig. 2, 1986.

细胞表质柔软, 易变形, 游动时呈纺锤形, 两端较中间窄, 后端逐渐变细呈短尾状(图 1L); 长 42.3—60.2  $\mu\text{m}$ , 宽 18.1—21.4  $\mu\text{m}$ , 表质具线纹; 色素体带状, 具带副淀粉鞘的蛋白核; 副淀粉粒为小的圆球形。

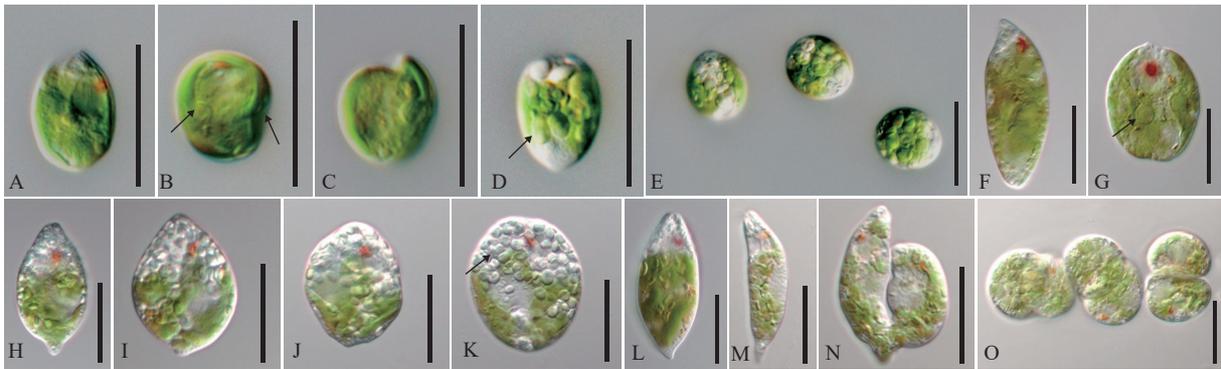


图 1 五种裸藻属物种的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristic of five *Euglena* species

A—E. 敏捷裸藻的形态特征; A. 敏捷裸藻的细胞形态; B. 敏捷裸藻的色素体(箭头); C. 变形中的敏捷裸藻; D—E. 敏捷裸藻生长状况不佳的状态; F—G. 耶氏裸藻的形态特征; F. 耶氏裸藻的细胞形态; G. 耶氏裸藻的色素体(箭头); H—K. 波形裸藻的形态特征; H. 波形裸藻的细胞形态; I—K. 变形中的波形裸藻, 箭头所指为圆球形副淀粉粒; L. 裸脊裸藻的细胞形态; M—O. 后缩裸藻的形态特征; M. 后缩裸藻的细胞形态; N. 处于分裂时期的后缩裸藻; O. 变形中的后缩裸藻。标尺=20  $\mu\text{m}$

A—E. Morphological characteristics of *E. agilis*; A. cell morphology of *E. agilis*; B. chloroplast morphology of *E. agilis* (arrow); C. metabolically active cell of *E. agilis*; D—E. *E. agilis* in bad condition; F—G. morphological characteristic of *E. jirovecii*; F. cell morphology of *E. jirovecii*; G. chloroplast morphology of *E. jirovecii* (arrow); H—K. morphological characteristic of *E. undulata*; H. cell morphology of *E. undulata*; I—K. metabolically active cell of *E. undulata*; L. cell morphology of *E. gymnodinoides*; M—O. morphological characteristic of *E. retronata*; M. cell morphology of *E. retronata*; N. *E. retronata* at division stage; O. metabolically active cell of *E. retronata*. Scale bar=20  $\mu\text{m}$

生境: 池塘。

国内分布: 上海。

国外分布: 欧洲。

### 后缩裸藻(图 1M—O)

*Euglena retronata* Johnson, T. Am. Math. Soc. p. 12, fig. 41, 1944.

细胞表质柔软, 易变形(图 1N—O), 游动时呈纺锤形, 前端呈喙状, 后端渐尖呈短尾状(图 1M); 长21.1—40.9  $\mu\text{m}$ , 宽9.4—20.4  $\mu\text{m}$ ; 表质具线纹; 色素体圆盘状, 多个, 不具蛋白核; 副淀粉粒为小颗粒

状, 伴随几个短杆状颗粒; 生长状态差时, 细胞长时间变形为圆球状(图 1O)。

生境: 池塘。

国内分布: 甘肃。

国外分布: 欧洲、亚洲、拉丁美洲。

### 星形裸藻(图 2A—C)

*Euglena stellata* Mainx, Arch. Protistenk. 54: 159, fig. D: a, 1926; Zakryś et Kosmala, J. Phycol. 45: 464-481, figs. 1: p-q, 2009.

细胞表质柔软, 易变形(图 2C), 游动时呈纺锤形

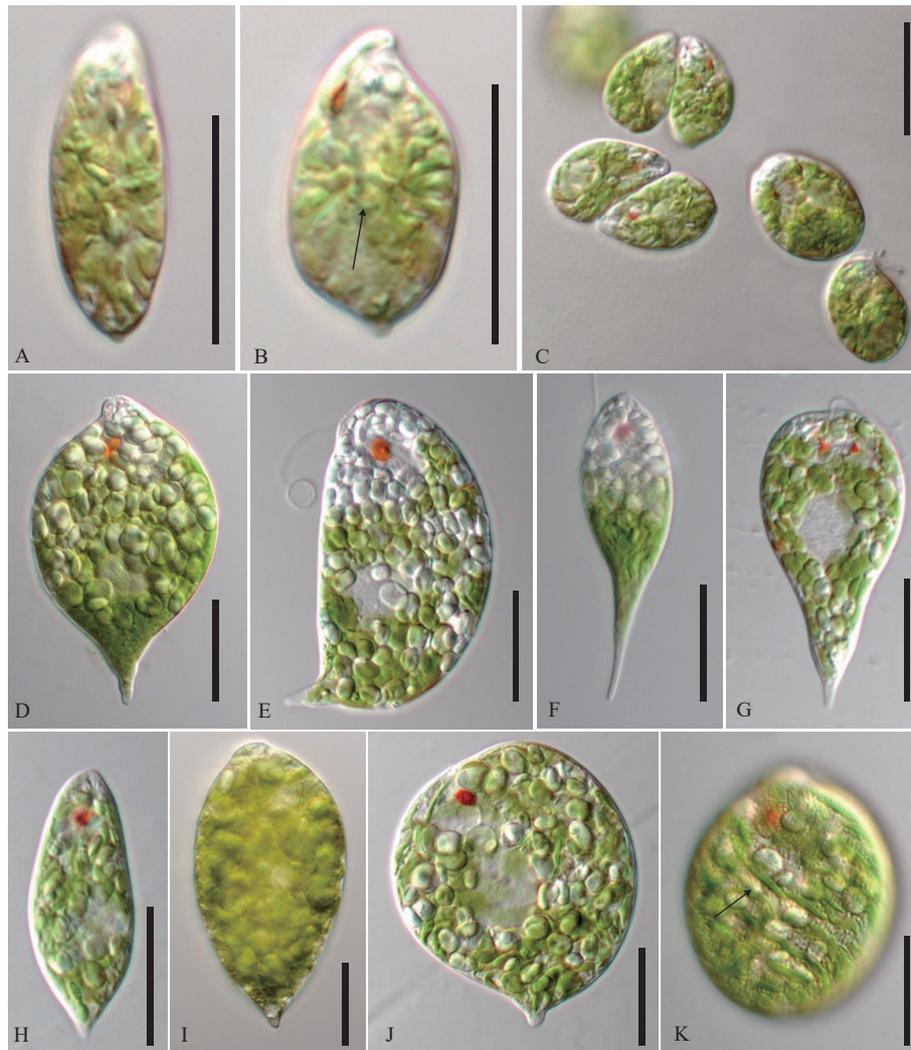


图 2 四种裸藻属物种的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristic of four *Euglena* species

A—C. 星形裸藻的形态特征; A. 星形裸藻的细胞形态; B. 星形裸藻的色素体(箭头); C. 变形中的星形裸藻群体; D—E. 曼克斯裸藻的形态特征; D. 曼克斯裸藻的细胞形态; E. 变形中的曼克斯裸藻; F—H. 拟星形裸藻的形态特征; F—G. 变形中的拟星形裸藻; H. 拟星形裸藻的细胞形态; I—K. 光明裸藻的形态特征, 箭头所指为螺旋排列的色素体; I. 光明裸藻的细胞形态; J—K. 变形中的光明裸藻, 箭头。标尺=20  $\mu\text{m}$

A—C. Morphological characteristics of *E. stellata*; A. cell morphology of *E. stellata*; B. chloroplast morphology of *E. stellata* (arrow); C. metaboly cell of *E. stellata* colony; D—E. morphological characteristic of *E. mainxii*; D. cell morphology of *E. mainxii*; E. metaboly cell of *E. mainxii*; F—H. morphological characteristic of *E. pseudostellata*; F—G. metaboly cell of *E. pseudostellata*; H. cell morphology of *E. pseudostellata*; I—K. morphological characteristic of *E. splendens*; I. cell morphology of *E. splendens*; J—K. metaboly cell of *E. splendens*. Scale bar=20  $\mu\text{m}$

或圆柱形, 两端较中间窄, 后端渐尖呈短尾状(图 2A); 长19.3—37.1 μm, 宽10.9—16.7 μm; 表质具线纹; 色素体星形, 1个, 具蛋白核, 蛋白核位于色素体中心

的一簇副淀粉颗粒内(图 2B); 副淀粉粒呈小颗粒状。  
 生境: 池塘。  
 国内分布: 甘肃。

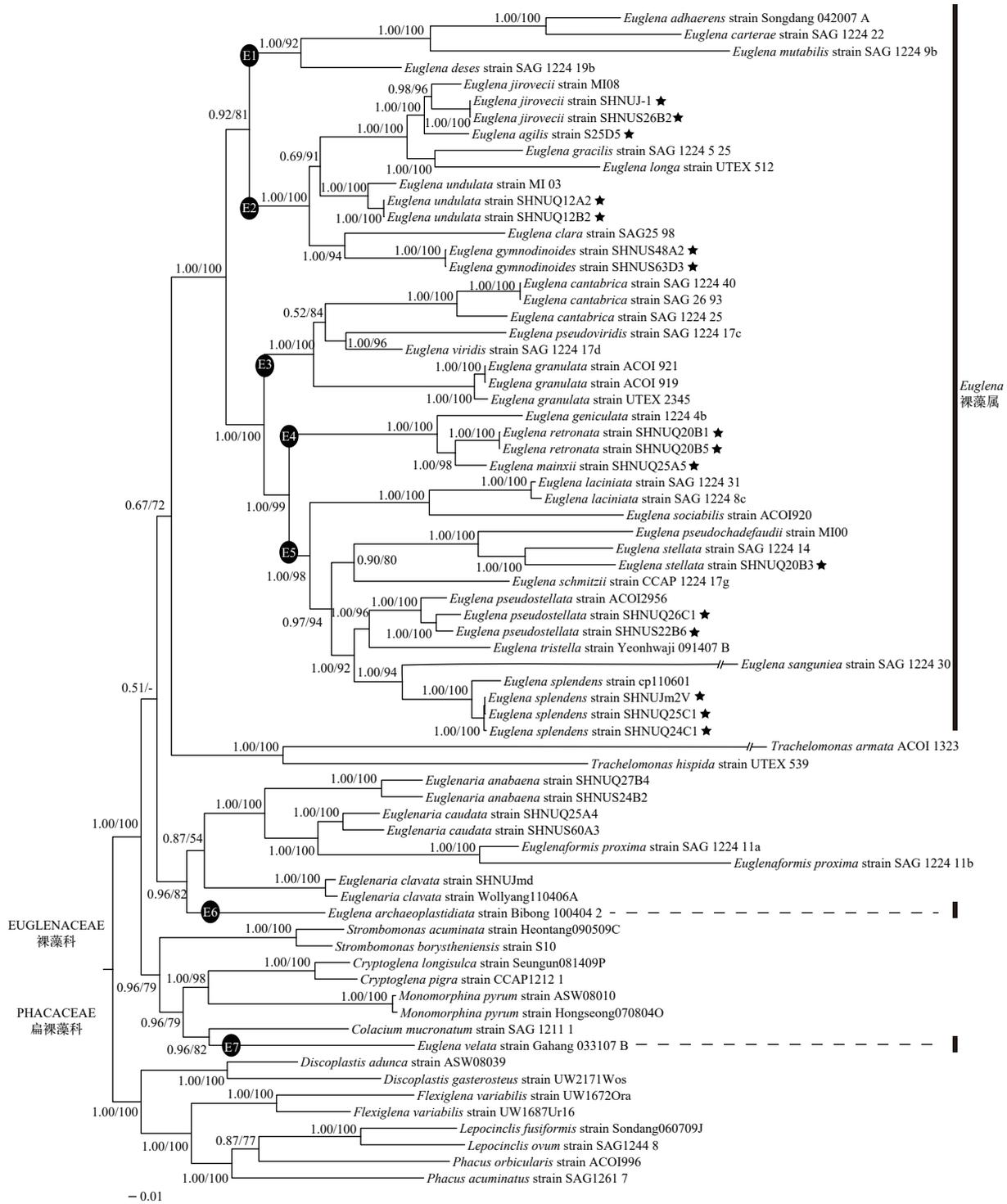


图 3 基于18S rDNA、28S rDNA、16S rDNA和23S rDNA序列联合构建的系统发育树

Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree based on combined nuclear SSU, nuclear LSU, plastid SSU and plastid LSU rRNA sequences

此处仅呈现贝叶斯树, 分枝节点的数字表示最大似然自展支持值/贝叶斯后验概率。支持率低于50%的数字不显示, 使用“-”代替, 本研究中的种类后面加星表示

Support values >50% for all analyses are shown on branches as follows: Bayesian posterior probabilities (BA)/maximum likelihood bootstrap values (ML). ‘-’ denotes <50% support for that analyses at that node. Sequences of our culture strains are followed by stars

国外分布: 欧洲、南美洲、北美洲、中东、亚洲、非洲。

#### 曼克斯裸藻(图 2D—E)

*Euglena mainxii* Deflandre, Ann. Protistol. 1: 138, 1928; Gojdics, Gen. *Euglena*, p. 85-86, Pl. 7, fig. 2, 1953.

细胞表质柔软, 易变形, 游动时呈纺锤形或卵形(图 2D); 前端呈喙状, 后端渐尖, 拉长为短的、透明的尾尖; 长57.6—81.4  $\mu\text{m}$ , 宽37.1—42.7  $\mu\text{m}$ ; 表质具线纹; 色素体呈圆盘状, 具蛋白核; 副淀粉粒呈球形或短杆状, 数量较多(图 2D—E)。

生境: 鱼池。

国内分布: 上海。

国外分布: 亚洲。

#### 拟星形裸藻(图 2F—H)

*Euglena pseudostellata* Zakryś et Kosmala, J. Phycol. 45: 464-481, figs. 1: h, w, 2009.

细胞表质柔软, 易变形, 游动时呈纺锤形或圆柱形, 两端较中间窄, 后端呈短尾状(图 2H), 但细胞在变形过程中, 前端可变圆, 后端可大幅度拉长(图 2F—G); 长35.5—63.8  $\mu\text{m}$ , 宽11.1—23.5  $\mu\text{m}$ ; 表质具线纹; 色素体星形, 蛋白核位于色素体中心的一簇副淀粉颗粒内; 副淀粉粒呈颗粒状。在野外条件下, 该物种与星形裸藻仅依据形态特征很难区分。

生境: 池塘。

国内分布: 上海、黑龙江。

国外分布: 欧洲。

#### 光明裸藻(图 2I—K)

*Euglena splendens* Dangeard, Le. Botan. 8: 165, fig. 9, 1902; Karnkowska-Ishikawa et al., J. Phycol. 49: 616-626, figs. 1: k-n, 2013.

细胞表质柔软, 易变形(图 2J), 游动时呈纺锤形, 前端钝圆, 后端渐尖, 呈尾状(图 2I); 长41.1—84.6  $\mu\text{m}$ , 宽23.6—53.2  $\mu\text{m}$ ; 表质具线纹; 色素体带状, 沿着表质线纹在细胞内螺旋排列(图 2K)。色素体具双侧表壳形蛋白核(不易观察); 副淀粉粒呈卵形, 在眼点处具1个明显大于其余副淀粉粒的球形副淀粉粒, 生长状态差时不易观察到。

生境: 池塘、湖泊、溪流。

国内分布: 上海。

国外分布: 欧洲、南美洲、北美洲、中东、亚洲、澳洲、非洲。

## 2.2 系统发育分析

以扁裸藻科物种为外类群, 裸藻科物种聚为一大支(1.00/100)。裸藻属位于裸藻科分支, 从系统发育树中可以看到, 裸藻属为多系分支, 绝大多数物

种位于E1—E5分支, E6和E7分支各包含一个裸藻属物种。

本研究发现的9个中国裸藻属新记录种分布在E2、E4和E5分支内。其中, 耶氏裸藻、敏捷裸藻、波形裸藻和裸脊裸藻分布在E2分支(1.00/100), 该分支包含的物种细胞呈长圆柱形或纺锤形, 两端较中间窄, 色素体带状。本研究采集到的两株耶氏裸藻(1.00/100)与来自美国的藻株(*E. jirovecii* strain MI08)聚为一支, 获得了较高的支持率(0.98/96)。敏捷裸藻则是与耶氏裸藻形成了姐妹分支, 亲缘关系较近(1.00/100)。两株采集于中国的波形裸藻则是与来自美国的藻株(*E. undulata* strain MI03)聚为一支, 支持率为1.00/100。采自上海不同公园水体的两株裸脊裸藻则是位于E2分支的基部, 分支支持率为1.00/100。

后缩裸藻和曼克斯裸藻位于E4分支(1.00/100), 该分支包含的物种细胞呈纺锤形或卵形, 前端呈喙状, 后端渐尖呈短尾状, 色素体和副淀粉粒多样化。本研究采集的两株后缩裸藻与曼克斯裸藻聚为一支, 获得了较高的支持率(1.00/98)。

星形裸藻、拟星形裸藻和光明裸藻则是分布在E5分支(1.00/98), 该分支包含的物种细胞呈纺锤形或圆柱形, 两端较中间窄, 色素体星形或螺旋排列呈带状, 具蛋白核及副淀粉鞘, 副淀粉粒呈卵形或颗粒状。本研究采集的星形裸藻与来自德国的藻株(*E. stellata* strain SAG 1224 14)聚为一支, 获得了极高的支持率(1.00/100)。采自上海和黑龙江的两株拟星形裸藻(1.00/100)与来自韩国的藻株(*E. pseudostellata* strain ACOI2956)聚为一支, 支持率为1.00/100。光明裸藻则是位于E5分支的基部, 采自上海市三个不同城市水体的藻株(1.00/100)与来自美国的藻株(*E. splendens* strain cp110601)聚为一支(1.00/100)。

## 3 讨论

在对绿色裸藻类进行的分类研究中, 裸藻属物种一直是重点关注对象, 最初仅依据形态学特征将裸藻属进行分离、分裂和重组, 扁裸藻属、鳞孔藻属和旋形藻属都曾是从裸藻属中分离建立的<sup>[3, 22, 23]</sup>。在使用分子手段对绿色裸藻类进行系统发育研究后, 裸藻属仍是最棘手的多系类群<sup>[24-26]</sup>, Linton等<sup>[27]</sup>曾提出将扁裸藻属和鳞孔藻属移回裸藻属, 而其他学者却选择了继续将裸藻属进行拆分或建立新属<sup>[12, 13, 28-32]</sup>。

由于藻株数量较少, 使用的序列单一, 导致未能将裸藻属修订为单系群。从本研究构建的系统

发育树中可以发现, 裸藻属仍然是多系群。E6分支包含的物种原质体裸藻 *Euglena archaeoplastidiata* Chadeffaud 并未落在裸藻属大分支内, 反而与眼裸藻属、拟裸藻属分支形成了姐妹分支, 而E7分支包含的物种短尖裸藻 *Euglena velata* Klebs 则是与柄裸藻属物种聚在一支; 对于这两个物种的系统发育位置还需要更多的数据来进一步确定。

我国淡水资源丰富, 水生生物物种多样性很高, 但目前对我国裸藻属物种的分类研究却很少, 本研究提供了9个中国裸藻属新记录种的形态和分子生物学数据, 但仍有更多物种还未被发现, 探索与发现裸藻属物种将对裸藻属单系性研究及中国绿色裸藻类生物多样性组成研究提供数据支撑。

### 参考文献:

- [1] Dobell C. Anthony van Leeuwenhoek and His "Little Animals" [M]. New York: Russell & Russell Inc, 1958: 1-435.
- [2] Ehrenberg C G. Neue beobachtungen über blutartige erscheinungen in aegypten, Arabien und sibirien, nebst einer uebersicht und kritik der früher bekannten [J]. *Annalen Der Physik und Chemie*, 1830, **94**(4): 477-514.
- [3] Dujardin F. Histoire Naturelle des Zoophytes. Infusoires, Comprenant La Physiologie et La Classification de Ces Animaux, et La Manière de Les Étudier à L'aide Du Microscope [M]. Paris: Roret, 1841: 1-684.
- [4] Ehrenberg C G. Über die Entwicklung und Lebensdauer der Infusionsthiere; nebst ferneren Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme [M]. Berlin: Abhandlungen der Königlich Akademie Wissenschaften, 1831: 1-154.
- [5] Ehrenberg C G. Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes [M]. Berlin: Abhandlungen der Königlich Akademie Wissenschaften, 1835: 145-336.
- [6] Schmarda L K. Kleine Beiträge Zur Naturgeschichte Der Infusorien [M]. Wien: Verlag der Carl Haas's chen Buchhandlung, 1846: 1-62.
- [7] Klebs G. Über die Organisation einiger Flagellaten Gruppen und ihre Beziehungen zu Algen und Infusorie [J]. *Unters Bot Inst Tübingen*, 1883(1): 233-262.
- [8] Huber-pestalozzi G. Das Phytoplankton des Süßwassers IV. Euglenophyceen. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung [M]. Germany: Stuttgart, 1955: 1-1135.
- [9] Guiry M D, Guiry G M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway [EB/OL]. [2023-10-26]. <http://www.algaebase.org/>.
- [10] Shi Z X, Wang Q X, Xie S L, et al. Flora Algarum Sincarum Aquae Dulcis [M]. Vol. 6, Euglenophyta. Beijing: Science Press, 1999: 68-69. [施之新, 王全喜, 谢树莲, 等. 中国淡水藻志第六卷, 裸藻门 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 68-69.]
- [11] Zakryś B E, Milanowski R, Empel J, et al. Two different species of *Euglena*, *E. geniculata* and *E. myxocylindracea* (Euglenophyceae), are virtually genetically and morphologically identical [J]. *Journal of Phycology*, 2002, **38**(6): 1190-1199.
- [12] Lukomska-Kowalczyk M, Chaber K, Fells A, et al. Description of *Flexiglena* gen. nov. and new members of *Discoplastis* and *Eugleniformis* (Euglenida) [J]. *Journal of Phycology*, 2021, **57**(3): 766-779.
- [13] Linton E W, Karnkowska-Ishikawa A, Kim J I, et al. Reconstructing euglenoid evolutionary relationships using three genes: nuclear SSU and LSU, and chloroplast SSU rDNA sequences and the description of *Euglenaria* gen. nov. (Euglenophyta) [J]. *Protist*, 2010, **161**(4): 603-619.
- [14] Kim J I, Shin W, Triemer R E. Multigene analyses of photosynthetic euglenoids and new family, Phacaceae (Euglenales) [J]. *Journal of Phycology*, 2010, **46**(6): 1278-1287.
- [15] Hall T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, **41**(41): 95-98.
- [16] 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.
- [17] Vaidya G, Lohman D J, Meier R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information [J]. *Cladistics*, 2011, **27**(2): 171-180.
- [18] Zhang D, Gao F, Jakovlić I, et al. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 348-355.
- [19] Kalyanamoorthy S, Minh B Q, Wong T K F, et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates [J]. *Nature Methods*, 2017, **14**(6): 587-589.
- [20] Nguyen L T, Schmidt H A, von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, **32**(1): 268-274.
- [21] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. *Systematic Biology*, 2012, **61**(3): 539-542.
- [22] Perty M. Über verticale Verbreitung mikroskopischer Lebensformen [J]. *Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern*, 1849(28): 17-45.
- [23] Mereschkowsky K S. Etjudy nad prostejsimi zivotnymi severa Rossii [J]. *Trudy S-Peterburgsk Obshch Estestvoisp*, 1877(8): 1-299.

- [24] Marin B, Palm A, Klingberg M A X, *et al.* Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing Euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure [J]. *Protist*, 2003, **154**(1): 99-145.
- [25] Triemer R, Farmer M. A Decade of Euglenoid Molecular Phylogenetics [M]. *Unravelling the Algae. America: CRC Press*, 2007: 315-330.
- [26] Kim J I, Linton E W, Shin W. Taxon-rich multigene phylogeny of the photosynthetic euglenoids (Euglenophyceae) [J]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2015(3): 98.
- [27] Linton E W, Nudelman M A, Conforti V, *et al.* A molecular analysis of the Euglenophytes using SSU rDNA [J]. *Journal of Phycology*, 2000, **36**(4): 740-746.
- [28] Triemer R E, Linton E, Shin W, *et al.* Phylogeny of the Euglenales based upon combined SSU and LSU rDNA sequence comparisons and description of *Discoplastis* gen. nov. (Euglenophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2006, **42**(3): 731-740.
- [29] Bennett M S, Wiegert K E, Triemer R E. Characterization of new genus *Euglenaformis* gen. nov. and the chloroplast genome of *Euglenaformis* [*Euglena*] *proxima* (Euglenophyta) [J]. *Phycologia*, 2014, **53**(1): 66-73.
- [30] Bennett M S, Triemer R E. A new method for obtaining nuclear gene sequences from field samples and taxonomic revisions of the photosynthetic euglenoids *Lepocinclis* (*Euglena*) *helicoides* and *Lepocinclis* (*Phacus*) *horridus* (Euglenophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2012, **48**(1): 254-260.
- [31] Kosmala S, Karnkowska A, Milanowski R, *et al.* Phylogenetic and taxonomic position of *Lepocinclis fusca* comb. nov. (= *Euglena fusca*) (Euglenaceae): morphological and molecular justification [J]. *Journal of Phycology*, 2005, **41**(6): 1258-1267.
- [32] Chaber K, Łukomska-Kowalczyk M, Fells A, *et al.* Toward the robust resolution of taxonomic ambiguity within *Lepocinclis* (Euglenida) based on DNA sequencing and morphology [J]. *Journal of Phycology*, 2022, **58**(1): 105-120.

## MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDIES ON NEW RECORD SPECIES OF *EUGLENA* IN CHINA

JIANG Xiao-Die<sup>1,2</sup>, ZHU Wei-Ju<sup>1</sup>, PANG Wan-Ting<sup>2</sup> and WANG Quan-Xi<sup>2</sup>

(1. College of Science, Qiongtai Normal University, Haikou 571127, China; 2. College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

**Abstract:** *Euglena*, a common group found in freshwater, belongs to the phylum Euglenophyta. Although *E. viridis* was observed by Leeuwenhoek as early as 1674, the genus was officially established by Ehrenberg in 1830. To date, 167 species of *Euglena* have been reported worldwide. Skvortzov conducted extensive surveys on Euglenoids (including *Euglena*) in China (especially in Northeast China) in the 1920s and 1930s. However, the most comprehensive study of *Euglena* species in China was documented in the book “Flora algarum sinicarum aquae dulcis Tomu VI Euglenophyta”, published in 1999, reporting a total of 62 *Euglena* species (with 12 species removed in foreign studies). Since then, studies on the classification of green Euglenoids in China have decreased, often mentioned within investigation of phytoplankton communities. In this study, 16 strains of *Euglena* species were collected and cultured from Shanghai, Heilongjiang and Gansu provinces. Morphological characteristics of all strains were meticulously observed using optical microscopy. Each strain was isolated, purified and cultured at the same time. Algal DNA was extracted, and four molecular sequences of each strain were amplified. Phylogenetic trees were constructed by using Bayesian method and maximum likelihood method. Employing both morphological and molecular biological methods, we identified nine species: *E. agilis*, *E. gymnodinoides*, *E. jirovecii*, *E. mainxii*, *E. retronata*, *E. splendens*, *E. stellata*, *E. pseudostellata*, *E. Gymnodinoides*, and *E. undulata*. The morphological characteristics of all species were described in detail, and the phylogenetic position of each species was defined. All of these species were discovered in China for the first time. Despite the abundance of fresh water resources in China, there has been a scarcity of taxonomic studies on *Euglena* species. This study provides morphological and molecular biological data on nine newly recorded species in China, yet there remain more species awaiting discovery. The exploration and discovery of *Euglena* species will provide support for the study of the *Euglena* monophyly and the biodiversity composition of green Euglenoids in China.

**Key words:** New record; Morphological characteristic; Molecular data; *Euglena*

附表 1 本研究下载自GenBank的相关序列信息

Appendix 1 Relevant sequence information downloaded from GenBank in this study

藻种名称 Species	藻株 Strain	登录号 GenBank accession			
		18S rDNA	28S rDNA	16S rDNA	23S rDNA
柄裸藻属 <i>Colacium</i> Ehrenberg					
<i>Colacium mucronatum</i>	SAG 1211-1	AJ532441	KT304894	EU221482	EF525388
隐裸藻属 <i>Cryptoglena</i> Ehrenberg					
<i>Cryptoglena longisulca</i>	Seungun081409P	JQ356762	JQ356784	JQ356809	JQ356831
<i>Cryptoglena pigra</i>	CCAP1212-1	AJ532437	JQ356786	EU221483	EF525364
盘状藻属 <i>Discoplastis</i> Triemer					
<i>Discoplastis adunca</i>	ASW08039	AJ532453	KJ158185	FJ719650	FJ719714
<i>Discoplastis gasterosteus</i>	UW2171Wos	NONE	NONE	MT591621	MT591600
裸藻属 <i>Euglena</i> Ehrenberg					
<i>Euglena adhaerens</i>	Songdang 042007 A	KT304822	KT304903	KT305046	KT305129
<b><i>Euglena agilis</i></b>	<b>SHNUS25D5</b>	<b>OR602935</b>	<b>NONE</b>	<b>OR602924</b>	<b>OR602934</b>
<i>Euglena archaeoplastidiata</i>	Bibong 100404-2	FJ719610	KT304906	FJ719659	FJ719716
<i>Euglena cantabrica</i>	SAG 1224 40	AJ532413	KT304909	EU370500	EF525315
<i>Euglena cantabrica</i>	SAG 1224 25	AJ532412	AY523020	AY626047	EF525316
<i>Euglena cantabrica</i>	SAG 26 93	AY626065	NONE	AY626048	EF525314
<i>Euglena carterae</i>	SAG 1224-22	AJ532406	KT304910	EU373477	KT305131
<i>Euglena clara</i>	SAG25.98	AJ532423	DQ140114	EU750707	EF525326
<i>Euglena deses</i>	SAG 1224 19b	AJ532409	KT304911	AY626043	KT305132
<i>Euglena geniculata</i>	1224 4b	AY070249	KT304915	AF289241	KT305133
<i>Euglena gracilis</i>	SAG 1224 - 5/25	AJ532426	NONE	NC001603	NC001603
<i>Euglena granulata</i>	ACOI 921	AY626062	JQ398652	AF289242	KT305136
<i>Euglena granulata</i>	ACOI 919	EU370491	NONE	EU370510	NONE
<i>Euglena granulata</i>	ACOI UTEX 2345	AJ532422	NONE	EU370511	NONE
<b><i>Euglena gymnodinoides</i></b>	<b>SHNUS48A2</b>	<b>OR601783</b>	<b>OR601794</b>	<b>OR601756</b>	<b>OR601769</b>
<b><i>Euglena gymnodinoides</i></b>	<b>SHNUS63D3</b>	<b>NONE</b>	<b>NONE</b>	<b>OR601757</b>	<b>OR601770</b>
<i>Euglena jirovecii</i>	MI08	FJ719607	KT304904	FJ719652	EF525322
<b><i>Euglena jirovecii</i></b>	<b>SHNUJ-1</b>	<b>OR601784</b>	<b>OR601795</b>	<b>OR601758</b>	<b>OR601771</b>
<b><i>Euglena jirovecii</i></b>	<b>SHNUS26B2</b>	<b>OR601785</b>	<b>OR601796</b>	<b>OR601759</b>	<b>OR601772</b>
<i>Euglena laciniata</i>	SAG 1224 - 31	AJ532420	NONE	EU221487	EF525296
<i>Euglena laciniata</i>	SAG 1224 - 8c	AJ532421	KT304919	EU221488	EF525295
<i>Euglena longa</i>	UTEX 512	AF112871	AY130223	NC002652	NC002652
<b><i>Euglena mainxii</i></b>	<b>SHNUQ25A5</b>	<b>OR601786</b>	<b>OR601797</b>	<b>OR601760</b>	<b>NONE</b>
<i>Euglena mutabilis</i>	SAG 1224 9b	AJ532405	KT304922	AY626044	KT305137
<i>Euglena pseudochadefaudii</i>	MI00	AY523033	KT304923	EU370509	EF525303
<i>Euglena pseudostellata</i>	ACOI2956	NONE	KT304925	EU370507	KT305139
<b><i>Euglena pseudostellata</i></b>	<b>SHNUQ26C1</b>	<b>OR601792</b>	<b>OR601804</b>	<b>OR601764</b>	<b>OR601778</b>
<b><i>Euglena pseudostellata</i></b>	<b>SHNUS22B6</b>	<b>OR601793</b>	<b>OR601805</b>	<b>OR601765</b>	<b>OR601779</b>
<i>Euglena pseudoviridis</i>	SAG 1224 -17c	AY523037	NONE	EU370498	KT305141
<b><i>Euglena retronata</i></b>	<b>SHNUQ20B1</b>	<b>OR601787</b>	<b>OR601798</b>	<b>OR601761</b>	<b>OR601773</b>
<b><i>Euglena retronata</i></b>	<b>SHNUQ20B5</b>	<b>OR601788</b>	<b>OR601799</b>	<b>OR601762</b>	<b>OR601774</b>
<i>Euglena sanguniea</i>	SAG 1224 - 30	JQ281806	NONE	JQ281802	EF525309
<i>Euglena schmitzii</i>	CCAP 1224-17g	AY626063	NONE	AY626049	NONE
<i>Euglena sociabilis</i>	ACOI920	EU750715	EU624024	EU750710	NONE

藻种名称 Species	藻株 Strain	登录号 GenBank accession			
		18S rDNA	28S rDNA	16S rDNA	23S rDNA
<i>Euglena splendens</i>	cp110601	FJ719613	NONE	FJ719662	EF525307
<i>Euglena splendens</i>	SHNUJm2v	<b>OR601789</b>	<b>OR601800</b>	<b>OR601763</b>	<b>OR601775</b>
<i>Euglena splendens</i>	SHNUQ25C1	NONE	<b>OR601802</b>	NONE	NONE
<i>Euglena splendens</i>	SHNUQ24C1	<b>OR601790</b>	<b>OR601801</b>	NONE	<b>OR601776</b>
<i>Euglena stellata</i>	SAG 1224-14	AJ532419	KT304930	AF289244	EF525304
<i>Euglena stellata</i>	SHNUQ20B3	<b>OR601791</b>	<b>OR601803</b>	NONE	<b>OR601777</b>
<i>Euglena tristellata</i>	Yeonhwaji 091407 B	FJ719614	NONE	FJ719664	FJ719718
<i>Euglena undulata</i>	MI 03	DQ140148	KT304932	EU221486	EF525324
<i>Euglena undulata</i>	SHNUQ12A2	NONE	<b>OR601806</b>	<b>OR601766</b>	<b>OR601780</b>
<i>Euglena undulata</i>	SHNUQ12B2	NONE	<b>OR601807</b>	<b>OR601767</b>	<b>OR601781</b>
<i>Euglena velata</i>	Gahang 033107 B	NONE	NONE	KT305051	KT305145
<i>Euglena viridis</i>	SAG 1224 -17d	AJ532417	KT304934	AF289248	FJ719719
眼裸藻属 <i>Euglenaria</i> Linton, Karnkowska et Kwiatowski					
<i>Euglenaria anabaena</i>	SHNUQ27B4	OM891635	OM891557	OM865822	OM865841
<i>Euglenaria anabaena</i>	SHNUS24B2	OM891637	OM891559	OM865824	OM865843
<i>Euglenaria caudata</i>	SHNUQ25A4	OM891639	OM891561	OM865826	OM865845
<i>Euglenaria caudata</i>	SHNUS60A3	OM891642	OM891564	OM865829	OM865848
<i>Euglenaria clavata</i>	SHNUJmd	OM891645	OM891566	OM865832	OM865851
<i>Euglenaria clavata</i>	Wollyang110406A	FJ719617	KT304940	FJ719669	FJ719722
拟裸藻属 <i>Euglenaformis</i> Bennett et Triemer					
<i>Euglenaformis proxima</i>	SAG 1224-11a	DQ140147	NONE	NONE	KT305151
<i>Euglenaformis proxima</i>	SAG 1224 - 11b	DQ249878	NONE	AY626050	GU904026
变异裸藻 <i>Flexiglena</i> Zakryś et Lukomska					
<i>Flexiglena variabilis</i>	UW1672Ora	MT591633	MT591651	NONE	MT591593
<i>Flexiglena variabilis</i>	UW1687Ur16	MT591634	MT591652	MT591614	MT591594
鳞孔藻属 <i>Lepocinclis</i> Perty					
<i>Lepocinclis fusiformis</i>	Sondang060709J	KT304833	KT304952	KT305067	KT305161
<i>Lepocinclis ovum</i>	SAG1244-8	AF110419	JN603873	AY221726	EF525352
旋形藻属 <i>Monomorphina</i> Mereschowski					
<i>Monomorphina pyrum</i>	ASW08010	JN603858	JN603906	JN603946	JN603983
<i>Monomorphina pyrum</i>	Hongseong070804O	FJ719623	JN603910	FJ719679	EF525359
扁裸藻属 <i>Phacus</i> Dujardin					
<i>Phacus acuminatus</i>	SAG1261-7	AJ532481	KF744102	EU221501	EF525337
<i>Phacus orbicularis</i>	ACOI996	DQ397670	KF744125	FJ719685	EF525338
陀螺藻属 <i>Strombomonas</i> Deflandre					
<i>Strombomonas acuminata</i>	Heontang090509C	KT304844	KT304965	KT305080	KT305172
<i>Strombomonas borystheniensis</i>	S10	DQ140131	KT304971	FJ719699	FJ719740
囊裸藻属 <i>Trachelomonas</i> Ehrenberg					
<i>Trachelomonas armata</i>	ACOI 1323	EF999904	KT304981	EU221508	KT305176
<i>Trachelomonas hispida</i>	UTEX 539	FJ719643	KT304988	EU221513	EF525375

\*粗体显示的为本研究藻株序列信息