

基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育研究

梅洪^{1,2} 刘国祥¹ 胡征宇¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:作者进行了较广泛的样品采集,通过实验分离纯化培养得到多个鞘藻目种类的株系,并采用 PCR 技术新获得鞘藻目 2 属 8 个种类的部分 28S rDNA 序列,连同 GenBank 中的另两条序列,分析的物种涵盖了鞘藻目中的每个属。通过比较分析绿藻纲中包括此 10 条序列的共 36 个种类的同基因序列,并选取 Trebouxiophyceae 中的椭圆小球藻 (*Chlorella ellipsoidea*) 和 *Fusochloris perforata* 作外类群,运用多种方法构建分子系统树,包括邻接法 (Neighbor-Joining)、最大简约法 (Maximum Parsimony) 和 Bayesian 方法。3 种方法所得的结果非常相似,在形态上就在整个绿藻中界限分明的鞘藻目从分子水平上再次证明为单系起源的类群;构建的系统发育树还在一定程度上表明毛鞘藻属处于鞘藻目内三个属中较分离的位置,而枝鞘藻属与鞘藻属植物并无明显界限。

关键词:鞘藻目; 细胞核编码的核糖体大亚基; 系统发育; Bayesian 方法

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)04-0492-07

鞘藻目 (Oedogoniales) 是一个十分独特的类群,仅有鞘藻科 (Oedogoniaceae) 一科,包括三个属——鞘藻属 (*Oedogonium*)、毛鞘藻属 (*Bulbochaete*) 和枝鞘藻属 (*Oedocladium*)。鞘藻科种类繁多,分布很广,在温暖地区的各种浅水水体中都较为常见^[1]。在绿藻门中,鞘藻目的种类以其特殊的细胞分裂方式,独具环状排列鞭毛的大型动孢子,复杂多样化的有性生殖特征,使其在整个绿藻中自成一个界限分明,而又相当独特的类群,从形态学上很难确定它与其他绿藻的亲缘关系。针对鞘藻目的种类分类,不同藻类学工作者采用的分类标准不尽相同,对该目中三个属的排列次序也各有不同^[2]。因此对鞘藻目的系统发育进行研究具有一定实际意义。

饶钦止先生^[2]提出以性分化方式作为鞘藻科各属的分类基础,并得到很多藻类学家的支持,但对不同性分化方式种类间的亲缘关系却无法确定。著名的波兰藻类学家 Mrozińska 则在 1991 年和 1993 年分别提出在鞘藻属和毛鞘藻属中以单个精子囊内精子的数量作为分类基础^[3,4]。在鞘藻目中属阶元上究竟以哪种特征为分类基础最为合适仍存争议。

随着分子系统学的发展,这一新的手段也

被引入到藻类系统发育的研究中。然而,针对鞘藻目分子系统学的研究迄今未见报道,只在相关的研究中^[5-8]有不超过 4 个鞘藻目的种类被引入分析。Buchheim^[6]等人使用了在进化过程中较为保守的 28S rDNA 序列对绿藻纲特别是环藻目的系统学进行了研究,其中仅涉及鞘藻目中鞘藻属和毛鞘藻属各一个种,至今未见有关鞘藻目种类的 28S rDNA 序列的更多报道。

本研究采样涉及该目所有的三个属,通过对 28S rDNA 序列进行测定与分析,构建了鞘藻目系统发育树,以进一步探讨其进化关系与进化模式。

1 材料与方法

1.1 样品采集及培养 实验材料包括鞘藻属的七个种类和枝鞘藻属的一个种类,分别来自湖北多个地区 (东经 110.6°—115°, 北纬 30.4°—31.7°) 和湖南张家界 (东经 110.4°, 北纬 29.1°) 地区。于实验室条件下分离纯化并培养,培养采用 Bold's Basal 培养基^[9],光暗周期为 16h:8h,光照强度为 25 μE/m²·s,培养温度为 20—25℃。

1.2 DNA 的提取、28S rDNA 序列扩增及测定 采用

收稿日期:2006-09-13; 修订日期:2007-03-13

基金项目:中国自然科学基金面上项目 (No. 30270116); 中国科学院水生生物研究所创新领域前沿项目 (No. 220104) 资助

作者简介:梅洪 (1979—), 女, 汉族, 湖北武汉人; 在读博士; 主要从事藻类分子系统学研究。E-mail: meih@ihb.ac.cn

通讯作者:胡征宇, E-mail: huzy@ihb.ac.cn

CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 方法提取单个样品中的基因组总 DNA^[10]。PCR 反应参照 Buchheim 等人^[6]的方法,以 ITS-4rc^[11]和 LS-18^[6]为 PCR 引物扩增 28S rDNA 片段。25 μ L 反应液包括 1 μ L DNA 模板, 1 μ mol/L 引物, 0.2mmol/L dNTPs, 3.0mmol/L MgCl₂ 及 1U *Taq* DNA 聚合酶 (Fermentas 公司)。反应共 30 个

循环,其中变性 94°C, 1min, 复性 52°C, 1 min, 延伸 72°C, 105s。扩增产物用 QIA-quick kit 试剂盒纯化。引物 ITS-4rc 和 LS-18 也被用作序列测定,其他测序引物均引自 Buchheim 等人^[6]的研究。28S rDNA 序列测定使用自动测序仪 (Applied Biosystems 3730 Stretch), 每个碱基均重复测定。其余序列来自 GenBank (表 1)。

表 1 用于 28S rDNA 序列分析的种类、株系来源、序列参考文献及 GenBank 序列号

Tab. 1 Species used for 28S rDNA sequences analyses, strain source, sequences reference and accession numbers

目 Order	种名及株系来源 Species and strain source	序列参考文献 Sequences reference	GenBank 序列号 GenBank accession no
Chaetopeltidales	<i>Planophila terrestris</i> Groover et Hofstetter UTEX 1709	Buchheim et al. 2001	AF183480
Chaetophorales	<i>Aphanochaete magna</i> Godward UTEX B 1909	Buchheim et al. 2001	AF183449
	<i>Chaetophora incrassata</i> (Huds.) Hazen UTEX LB 1289	Buchheim et al. 2001	AF183471
	<i>Schizomeris leibleinii</i> Kützing UTEX LB 1228	Buchheim et al. 2001	AF183483
	<i>Uronema belkae</i> Mattox et Bold (O' Kelly et Floyd) UTEX 1179	Buchheim et al. 2001	AF183489
Chlamydomonadales	<i>Characiochloris acuminata</i> Lee et Bold UTEX 2095	Buchheim et al. 2002	AF395493
	<i>Characiosiphon rivularis</i> Iyengar UTEX LB 1763	Buchheim et al. 2002	AF395494
	<i>Chlamydomonas parkeae</i> SAG 24.89	Buchheim et al.	DQ015731
	<i>Dunaliella tertiolecta</i> UTEX 999	Buchheim et al.	DQ015753
	<i>Haematococcus lacustris</i> UTEX 16	Buchheim et al.	DQ015727
	<i>Lobocharacium coloradoense</i> Kugrens, Clay et Aguiar Kugrens	Buchheim et al. 2002	AF395509
	<i>Oogamochlamys zimbabwiensis</i> UTEX 2214	Buchheim et al.	DQ015758
Chlorococcales	<i>Volvox carteri</i> Iyengar UTEX 1885 (HK10)	Buchheim et al. 2001	AF183490
	<i>Chlorococcum ellipsoideum</i> Deason et Bold UTEX 972	Buchheim et al. 2001	AF183470
Chlorosarcinales	<i>Tetracystis aeria</i> Brown et Bold UTEX 1453	Buchheim et al. 2002	AF395513
	<i>Chlorosarcinopsis bastropiensis</i> UTEX 1698	Buchheim et al.	DQ015736
Oedogoniales	<i>Chlorosarcinopsis gelatinosa</i> CCMP 1511	Buchheim et al.	DQ015737
	<i>Bulbochaete hiloensis</i> (Nordst.) Tiffany UTEX 66	Buchheim et al. 2001	AF183453
Sphaeropleales	<i>Oedocladium prescottii</i> Islam M2, 采于湖南张家界, 小溪旁的潮湿土壤表面	Present investigation	DQ335880
	<i>Oedogonium cardiacum</i> Witt. UTEX 40	Buchheim et al. 2001	AF183478
	<i>Oedogonium nodulosum</i> Witt. L1, 采于湖北麻城一小池塘内, 混生于多种丝状藻类中	Present investigation	DQ335874
	<i>Oedogonium pakistanense</i> Islam & Sarma M5, 采于中科院水生所一水缸中	Present investigation	DQ335881
	<i>Oedogonium</i> sp. I3, 采于武昌纸坊青龙山一小水坑内	Present investigation	DQ335876
	<i>Oedogonium</i> sp. I6, 采于湖北神农架自然保护区香溪源, 急湍的溪水中, 藻丝附于岩石上	Present investigation	DQ335878
	<i>Oedogonium</i> sp. L7, 采于武昌纸坊青龙山一小水坑内	Present investigation	DQ335879
	<i>Oedogonium subdissimile</i> Jao L5, 采于武昌磨山湿润土壤表面	Present investigation	DQ335877
	<i>Oedogonium subplagiostomum</i> Ley L2, 采于武昌纸坊青龙山一小水坑内	Present investigation	DQ335875
	<i>Neochloris aquatica</i> Starr UTEX 138	Buchheim et al. 2001	AF277653

续表

目 Order	种名及株系来源 Species and strain source	序列参考文献 Sequences reference	GenBank 序列号 GenBank accession no
	<i>Pediastrum angulosum</i> (Ehr.) Menegh UTEX 1370	Buchheim <i>et al.</i> 2005	AY779880
	<i>Schroederia setigera</i> (Schröd.) Lemm. UTEX LB 2454	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF277657
Tetrasporales	<i>Chaetopeltis orbicularis</i> Berthold UTEX 422	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF183465
	<i>Tetraspora</i> sp. UTEX-LB 234	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF183486
Chlorophyceae incertae sedis	<i>Cylindrocapsa geminella</i> Wolle SAG 3.87	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF183472
	<i>Dictyochloris fragrans</i> Vischer ex Starr UTEX 127	Shoup and Lewis 2003	AY206711
	<i>Treubaria setigera</i> (Archer) G. M Smith SAG 37.83	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF183488
	<i>Trochiscia hystrix</i> (Reinsch) Hansg. UTEX LB 606	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF277658
Outgroup	<i>Chlorella ellipsoidea</i> Gerneck IAM C-87	Buchheim <i>et al.</i> 2001	D17810
	<i>Fusochloris perforata</i> (Lee et Bold) Floyd et al. UTEX 2104	Buchheim <i>et al.</i> 2001	AF183467

1.3 序列比对及系统发育分析 利用 Clustal X 1.8^[12]对基因序列片段进行比对 (alignment), 参考 Booton 等^[5]的方法, 用 SEAVIEW^[13]程序对序列行排序并辅以手工校正; 使用 MEGA3^[14]计算得序列的碱基组成; 核苷替代的饱和性分析使用 DAMBE4. 1^[15]。

采用邻接法 (NJ)、最大简约法 (MP) 和贝叶斯法 (Bayesian)^[16]构建分子系统树。邻接法分析使用由 Modeltest^[17]得到的 Tamura & Nei^[18]遗传距离, 分析使用 PAUP * 4.0b10^[19]。节点支持率使用 1000 次 bootstrap (自展) 检验。运用 PAUP * 4.0b10 的最大简约法构建分子系统树, 运用了两次 heuristic searches (启发式搜索), 第一次 heuristic searches 的参数如下: 1000 random-sequence additions (随机序列加权) (每步保留 20 棵树), TBR branch swapping (树二等分再连接树枝交换)。此次得到的 6 棵树被用作下一次 heuristic searches, 第二次 heuristic searches 的参数为: MULTREES, TBR branch swapping and STEEPEST DESCENT。使用非参数自展法^[20] (nonparametric bootstrapping) 检验分支的可信度, 参数如下: 1000 replications, heuristic searches, 10 random sequence additions, TBR, and MULTREES。运用 MrBayes v3.0b4^[21], 采用 TrN + G + I 模型 (该模型是通过 Model test 检验获得) 构建 Bayesian 分子系统树。马可夫链蒙特卡洛 (MCMC) 数如下: number of generations (代数) = 1000000, number of chains (链数) = 4, sample frequency (取样频率) = 100, temperature = 0.5, starting tree = random; 舍弃老化样本数 burnin = 1000 (100000 generations), 15000 generations 时已达平衡。

2 结果

2.1 28S rDNA 序列特征

本研究共获得中国鞘藻目 2 属共 8 个种的细胞核编码的核糖体大亚基基因 5' 端 1862bp 的序列, 并从 GenBank 下载了另两个仅有的鞘藻目种类的该基因序列, 同属绿藻纲另 7 个目和 4 个种类的共 36 个种类的同序列以及作为外类群的 2 条序列一起读入 Clustal X 中排序, 生成供系统发育分析的序列矩阵。在这 1862 个序列位点中有 715 个碱基存在变异, 约占 38.4%; 简约性信息位点 478 个, 约占 25.7%。A、T、C、G 碱基平均含量为 25.9%、22.0%、21.6%、30.5%。其中, A + T 含量 (47.9%) 要低于 C + G 含量 (52.1%)。转换和颠换与 Tamura and Nei 遗传距离的线性相关显示这些位点没有突变饱和 (图 1)。

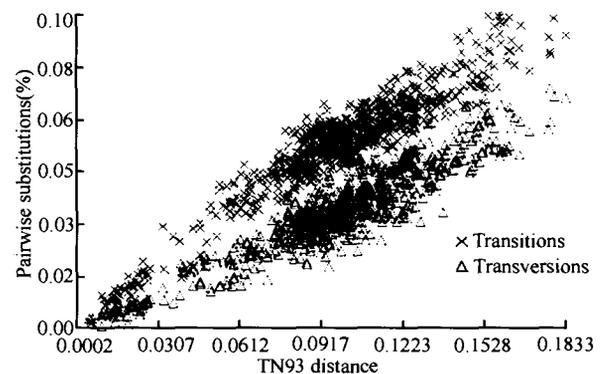


图 1 绿藻纲 28S rDNA 序列核苷酸替代与 Tamura and Nei 遗传距离的相关性比较显示其转换和颠换均没有突变饱和
Fig. 1 Pairwise inferred substitutions compared with TN93 distances from 28S rDNA sequences of the Chlorophyceae to show that neither transitions nor transversions have reached saturation

2.2 系统发育分析

对本研究所用的 28S rDNA 序列进行 Bayesian 分析,结果为: $-\ln L = 13559.4424$; 碱基频率为 $A = 0.2681, C = 0.2111, G = 0.2810, T = 0.2398$; 替代矩阵为 $[A-C] = 1.0000, [A-G] = 2.8004, [A-T] = 1.0000, [C-G] = 1.0000, [C-T] = 6.2699, [G-T] = 1.0000$; 不变位点的比例为 $I = 0.3998$; 变异位点的 Gamma 参数为 $G = 0.5686$ 。

基于细胞核编码的核糖体大亚基基因 5' 端序列用 Bayesian 方法 GTR + G + I 模型构建的 50% 多数一致树见图 2, 并与用 NJ 和 MP 方法分别构建的多数一致树进行比较。分支节点处的数字分别以 D、P 和 B 开头表示 NJ、MP 和 Bayesian 树中对此节点的支持率, 枝长表示分歧度。从图 2 可以看出, 三种方法所构建的一致树在鞘藻目、胶毛藻目 (Chaetophorales)、环藻目 (Sphaeropleales)、衣藻目 (Chlamydomonadales)、环藻目 (Sphaeropleales)、衣藻目 (Chlamydomonadales) 等类群中表现出高度的一致性。

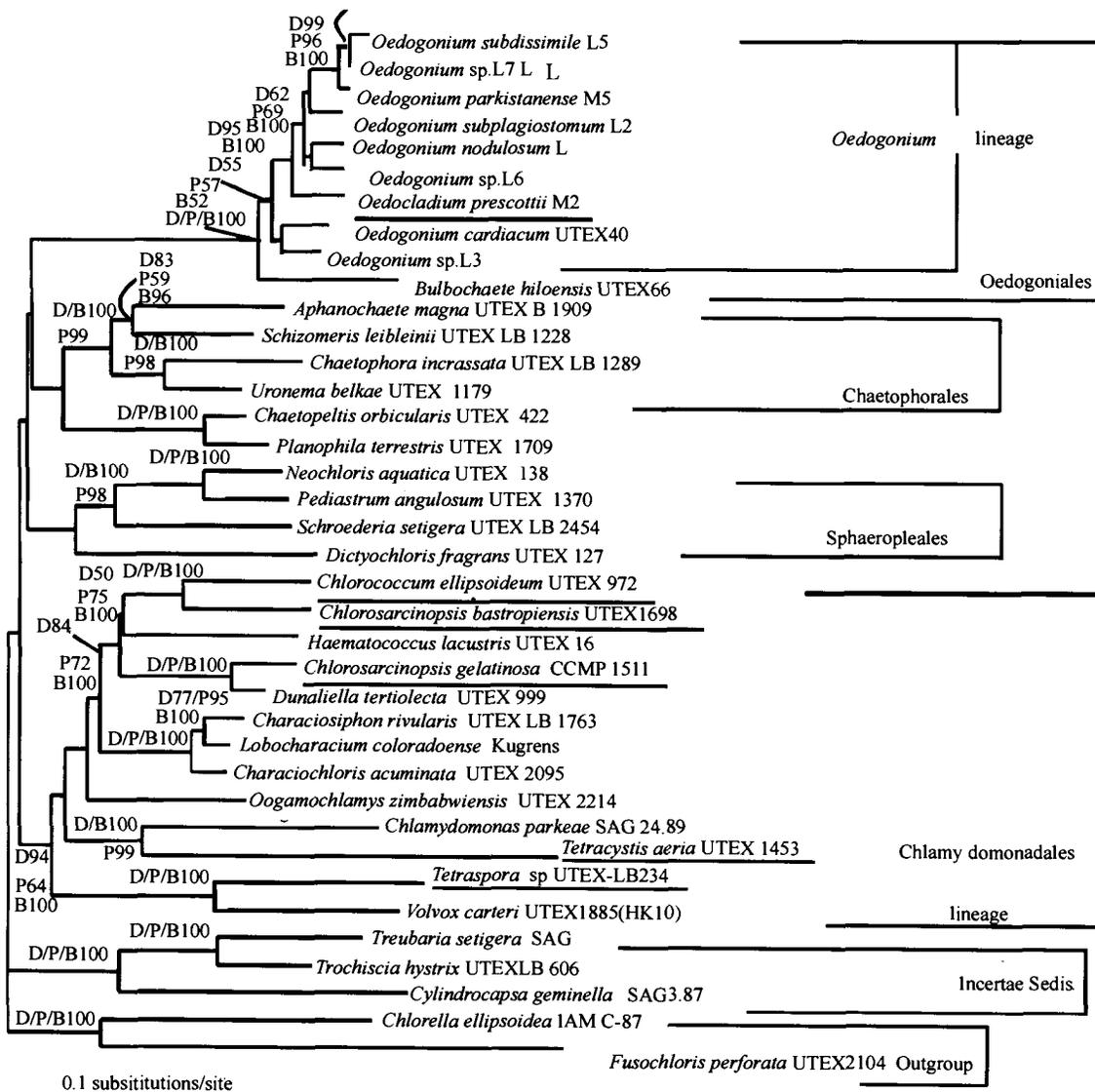


图 2 用 Bayesian 方法基于 GTR + G + I 模型构建的 50% 多数一致树

Fig. 2 Fifty percent majority-rule consensus tree derived from Bayesian analysis using GTR + G + I

分支节点处的数字分别以 D、P 和 B 开头表示 NJ、MP 和 Bayesian 树中对此节点的支持率, (MP 树: 一致性指数 (CI) = 0.4643, 同源性指数 (HI) = 0.5357)

Model branch lengths are proportional to the number of the expected nucleotide substitutions. Estimates of branch support provided include bootstrap support (%) when ≥ 50

B: Bayesian posterior probability; P: parsimony; D: distance

(Chlamydomonadales lineage) 及 Incertae Sedis 这几个大的进化枝上是统一的,且除了在衣藻目的支持率上 NJ 和 MP 树的支持率分别为 94 和 64 外,节点的支持率都达到了 100%。对于本研究所关注的鞘藻目,树的拓扑结构显示了该目与胶毛藻目有相对较近的亲缘关系,但尚未得到较好的支持。在鞘藻目内, NJ、MP 和 Bayesian 的一致树都支持毛鞘藻属植物 (*Bulbochaete hiloensis*) 在鞘藻目中处于较分离的位置,支持率分别为 55%、57% 和 52%,同时也都显示了枝鞘藻属植物 (*Oedocladium prescottii*) 与鞘藻属植物没有明显界限。对于本研究中包括此种枝鞘藻的鞘藻属类群, NJ 和 Bayesian 树都很好地支持了两种雌雄异株具大雄的种类 (*Oedogonium cardiacum* 和 *Oedogonium* sp. L3) 所组成的姐妹群处于较基部的位,但 MP 树中对此的支持却很低;三种树对其他鞘藻属种类之间的关系都基本一致。

3 讨论

本文采用 28S rDNA 序列分析方法,对鞘藻目的系统发育进行了分析,用 3 种方法构建了系统发育树,所得的结果大致相同,其中 NJ 树和 Bayesian 树更为相似。

在本研究中,树的拓扑结构显示了鞘藻目与胶毛藻目有相对较近的亲缘关系,只是未有较好地支持,这种亲缘关系是与这两个目的形态学研究结果相一致的。在形态学上,这两个目都由分枝或不分枝的丝状种类组成,因此,Booton 等^[5]曾就此两个目关系提出过假设,并试图用 18S rDNA 序列分析验证,但 18S rDNA 结果并不支持它们之间紧密的亲缘关系。28S rDNA 序列是否能更好地支持此形态学结果尚需进一步研究。

鞘藻目的单系性在 28S rDNA 序列分析中再次被 3 种方法以 100% 的支持率所肯定,进一步确证了形态学和前人通过 18S rDNA 序列分析的结果^[5]。形态学上,因鞘藻目的种类独具特殊的细胞分裂方式(包括形成分裂环的居间分裂和形成帽状结构的顶端分裂),环状排列鞭毛的大型动孢子和复杂多样化的有性生殖特征^[22,23],使其自成一个相当独特的类群。Booton 等人用 18S rDNA 序列构建的系统树也 100% 支持了鞘藻目的单系性。

从绿藻纲中各个进化枝的分歧度来看,鞘藻目显然是经过快速进化形成,因而较其他目的种类有着一些形态上独具的特征,使人们很难确定它与其他目的关系。在鞘藻目内,各个种类的分歧度相对

较小,这就呼应了形态学上鞘藻目各个种甚至各个属之间有很多相似的特性,如都具形成分裂环的细胞分裂和形成帽状结构的顶端分裂,都具环状排列鞭毛的大型动孢子,都具复杂多样化的有性生殖特征。同时,这种小的分歧度也使得鞘藻目的种类间分界不够明显。

鞘藻目内的三个属中,毛鞘藻属处于鞘藻目的基部位置(NJ、MP 和 Bayesian 树的支持率分别为 55%、57% 和 52%),而枝鞘藻属与鞘藻属无明显分界。在 Booton 等^[5]通过 4 个鞘藻目种类的 18S rDNA 序列分析得到的结果中,也得到了毛鞘藻属处于较分离地位的结论,但该研究由于采用的鞘藻目种类数目有限,对枝鞘藻属和鞘藻属的关系未做进一步讨论。本研究选用了较多的鞘藻目种类,得到了枝鞘藻属种类混于鞘藻属种类中的结果。从经典分类学上也可为本研究的结果找到依据:一方面,在此目中,毛鞘藻属植物的形态特征和个体发育都显示其特化的一面,如刺毛、分枝的出现,基细胞具连续分生能力的分裂方式及形成刺毛时的复杂分裂过程;另一方面,早期认为枝鞘藻属植物独具的基细胞无附着器分化和形成帽状结构的顶端分裂两个特征也在一些陆生的鞘藻种类中被观察到^[2,24-27]。以上结论充分说明,28S rDNA 序列分析用于鞘藻目系统发育研究是合适的。

在已有的有关鞘藻目的 28S rDNA 序列分析研究^[6]中,由于仅得到了鞘藻属和毛鞘藻属各一个种的序列,而无枝鞘藻属植物的序列,枝鞘藻属与另两属的关系无法通过此基因的序列分析得出。本研究补充了该属的序列,使得基于 28S rDNA 序列研究三个属的关系成为可能,并证实了 28S rDNA 和 18S rDNA 序列分析结果的一致。

但因为 28S rDNA 序列比较保守,基于该序列的数据不太适合用于分析属内种间的关系,鞘藻属内种间的亲缘关系尚未得到明确的结果,有待更多种类和分子标记引入分析。

参考文献:

- [1] Hu H J, Li Y Y, Wei Y X, et al. Freshwater Algae of China [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1980, 373—383 [胡鸿钧, 李尧英, 魏印心, 等. 中国淡水藻类. 上海: 上海科学技术出版社. 1980, 373—383]
- [2] Rao C Z. Monographia Oedogoniales Sinicae [M]. Beijing: Science Press. 1979, 536 [饶钦止. 中国鞘藻目专志. 北京: 科学出版社. 1979, 536]
- [3] Mrozinska T. A preliminary investigation of the taxonomical classification of the Genus *Oedogonium* Link (Oedogoniales) based on the

- phylogenetic relationship [J]. *Archiv Für Protisten Kunde*, 1991, **139**: 85—101
- [4] Mrozinska T. A preliminary investigation of the taxonomical classification of the Genus *Bulbochaete* Agardh (Oedogoniales, Chlorophyta) bases on the phylogenetic relationship [J]. *Archiv Für Protisten Kunde*, 1993, **143**: 113—123
- [5] Booton G C, Floyd G L, Fuerst P A. Origins and affinities of the filamentous green algal orders Chaetophorales and Oedogoniales based on 18S rRNA gene sequences [J]. *Journal of Phycology*, 1998, **34**: 312—318
- [6] Buchheim M A, Michalopoulos E A, Buchheim J A. Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26S rDNA data [J]. *Journal of Phycology*, 2001, **37**: 819—835
- [7] Shoup S, Lewis L A. Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of Chlorophyceae green algae (Chlorophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 2003, **39**: 789—796
- [8] Krienitz L, Hegewald E, Hepperle D, Wolf A. The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology [J]. *Biologia*, 2003, **58**: 437—446
- [9] Hua R C. Culture and utilize of unicell algae [M]. Beijing: Agriculture Press. 1980, 272—347 [华汝成. 单细胞藻类的培养和利用. 北京:农业出版社. 1980, 272—347]
- [10] Hillis D M, Moritz C M, Mable B K. Molecular systematics (2nd edition) [M]. Massachusetts: Sinauer Sunderland. 1996, 655
- [11] White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J (Eds.), PCR protocols [M]. San Diego, CA: Academic Press. 1990, 315—322
- [12] 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 Reserch*, 1997, **25**: 4876—4882
- [13] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLOWIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogenyp [J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, **12**: 543—548
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150—163
- [15] Xia X. Data analysis in molecular biology and evolution [M]. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2000
- [16] Rannala B, Yang Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, **43**: 304—311
- [17] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, **14**: 817—818
- [18] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, **10**: 512—516
- [19] Swofford D L. PAUP *. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods) Version 4. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts, 2002
- [20] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, 1985, **39**: 666—670
- [21] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MrBayes: bayesian inference of phylogeny [J]. *Biometrics*, 2001, **17**: 754—755
- [22] Pickett-Heaps J D. Green algae: structure, reproduction and evolution in selected genera [M]. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts. 1975, 219—356
- [23] Pickett-Heaps J D. Cell division and evolution of branching in *Oedocladium* (Chlorophyceae) [J]. *Cytobiologie*, 1977, **14**: 319—337
- [24] Liu G X, Bi L J. *Oedocladium*—an Oedogoniaceous genus first time discovered in China [J]. *Journal. of Wuhan Botanic. Research*, 1993, **11**: 219—221 [刘国祥, 毕列爵. 枝鞘藻属在我国的首次发现. 武汉植物学研究. 1993, **11**: 219—221]
- [25] Liu G X, Hu Z Y. Predominant occurrence of apical cell divisions in *Oedogonium pakistanense* and its phylogenetic significance [J]. *Phycologia*, 2004, **43**(6): 669—671
- [26] Luo W, Hu Z Y, Liu G X, Lokhorst G M. Peculiar cell wall rupture: an aspect of cell division and fine structure of pyrenoids in *Oedocladium prescottii* (Oedogoniales Chlorophyta) [J]. *Biologia*, 2003, **58**: 537—543
- [27] Luo W, Liu G X, Hu Z Y. A preliminary investigation of *Oedogonium* and *Bulbochaete* based on comparative studies of vegetative cell division [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2002, **33**: 640—647 [罗玮, 刘国祥, 胡征宇. 鞘藻属和毛鞘藻属营养细胞分裂方式的比较研究. 海洋与湖沼, 2002, **33**: 640—647]

PHYLOGENETIC STUDIES OF OEDOGONIALES(CHLOROPHYCEAE, CHLOROPHYTA) BASED ON 28S rDNA SEQUENCES

MEI Hong^{1,2}, LIU Guo-Xiang¹ and HU Zheng-Yu¹

(1. Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduated School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: The Oedogoniales is a very unusual order of green algae, and the studies about them were mainly focused on their morphological characters. But the relationship between the Oedogoniales and other greens is still hard to guarantee in terms of morphology. During the past few years various phycologists used different characteristics as basis for classification of the genera of Oedogoniales, and the relationship of the three genera was uncertain. In order to clarify the systematics problem existing in this unusual group of Oedogoniales, we collected the samples in a large area, isolated them from field and cultivated them at 20 to 25°C at a 16:8-h light: dark cycle under 25 μmol photons/m²·s, in modified of Bold's Basal medium. Algal cultures were harvested by centrifugation at 7400 rpm for 2min and DNA was extracted by CTAB method. The 28S rDNA was newly amplified and sequenced from 8 species representing 2 genera (Oedocladium and Oedogonium) of Oedogoniales. Aligning with another two sequences of this order from GenBank, we succeeded to analyze the sequences covering with all the three genera of the Oedogoniales. Selecting *Chlorella ellipsoidea* and *Fusochloris perforata* as outgroups, we constructed a matrix of 38 DNA sequences. The phylogenetic trees were constructed by using Neighbor-Joining, Maximum Parsimony and Bayesian. All the three trees displayed the similar topologic structures. The results showed that the Oedogoniales was monophyletic, and within this order, the genus *Oedocladium* was mixed in the member of the genus *Oedogonium*; whereas the genus *Bulbochaete* was in a divergence position to the other two genera.

Key words: Oedogoniales; Nuclear ribosomal DNA large subunit; Phylogeny; Bayesian method