

中国淡水绿藻纲新记录属——麦可属(*Mychonastes*)

李艳晖^{1,2} 胡明明^{1,2} 沈银武¹ 刘永定¹ 李敦海¹ 李根保¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 从我国滇池分离、培养获得 2 株超微真核藻, 对其进行形态学、细胞超微结构和 18S rRNA 基因序列分析。结果表明: 藻株在细胞形态、结构和繁殖方式具麦可属(*Mychonastes* Simpson & Van Valkenburg)特征, 细胞壁 2 层, 外层细胞壁表面具不规则肋网和典型的暗-明-暗结构; 具备一套简单的细胞器, 包括细胞核、不具蛋白核的叶绿体和线粒体各 1 个, 叶绿体周生、杯状, 占据细胞大部分体积; 以似亲孢子方式繁殖。结合 18S rRNA 序列分析, 将其归为麦可属, 属于绿藻纲、绿藻门, 是该属在我国淡水湖泊的首次描述。

关键词: 绿藻纲; 麦可属; 中国新记录

中图分类号: Q949.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2013)03-0473-08

超微浮游植物(Picophytoplankton, <3 μm)广泛分布于各种类型和不同营养水平的湖泊中, 是水体的重要初级生产者^[1, 2], 包括超微蓝藻(Picocyanobacteria)和超微真核藻(Eukaryotic picoalgae)。

一般来说, 典型的真核超微浮游生物的特征为: 细胞球状, 形态简单, 以似亲孢子或二分裂营无性生殖^[3]。由于其细胞较小, 形态特征简单, 使用普通光学显微镜甚至电子显微镜观察也很难鉴定到纲水平^[4], 因此常被描述为“Small coccoid 或 *Chlorella*-like cells; little round green balls”(LRGT)或 *Nannochloris*-like algae^[1, 2], 导致了对这类藻进行分类学描述和鉴定上的困难, 同时也人为降低了其在自然水体中的多样性。

目前, 国外已报道的常见淡水真核超微藻种类主要有: *Choricystis minor* (Skuja) Fott^[5-8]、*Pseudodictyosphaerium jurisii* (Hindák) Hindák^[9]、*Mychonastes homosphaera* (Skuja) Kakina & Punčochářová^[10, 11]、*Nannochloropsis limnetica* Krienit, Hepperle, Stich & Weiler^[4, 12], 欧洲、北美、以色列等都有超微浮游植物分离、形态学、超微结构和系统发育方面的报道。我国尚未有关于淡水超微真核浮游植物的分布和多样性方面的研究, 最新的藻类分类学资料《中国淡

水藻类——系统、分类及生态》^[13]中也没有关于超微真核藻属和种的描述。作者于 2006 年自滇池分离获得 2 株单种真核超微藻, 对其进行了形态学、细胞超微结构特征观察, 同时结合 18S rRNA 基因序列构建系统发育树确定其分类学地位, 填补我国淡水真核超微浮游植物分类学研究方面的空白。

1 材料与方法

1.1 藻株的分离与培养

取一定体积新鲜采集的水样预过 Whatman GF/C 玻璃纤维滤膜或 Whatman 2.0 μm 孔径的聚碳酸酯膜, 取过滤水样(或原水样)划平板或铺平板接种于含 1%琼脂的 BG11^[14]或 BBM^[15]固体培养基, 用封口膜封好后将其倒置于光照培养箱内, 于 20—30 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 、光暗周期 12h : 12h、温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养, 待平板上长出可见藻落, 挑取单藻落进行镜检, 进一步分离纯化目的藻落, 挑单藻落至 BG11 液体培养基, 于相同条件下培养。获得藻株 DC-10 和 DC-11 (分别于 2006 年 7 月和 2006 年 10 月分离自滇池水样)。

1.2 形态学和细胞超微结构观察

取培养至指数生长阶段的藻细胞进行光镜及电

收稿日期: 2012-05-12; 修订日期: 2012-09-12

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07105-006, 2008ZX07102-005, 2009ZX07101-011-03)资助

作者简介: 李艳晖(1977—), 女, 山西人; 博士; 主要从事藻类生理生态影响方面的研究。E-mail: liyh7822@163.com

通信作者: 刘永定, 研究员; E-mail: liuyd@ihb.ac.cn; 李根保, E-mail: ligb@ihb.ac.cn

镜的样品制备。分别用生物显微镜(Nikon ECLIPSE E600)、扫描电镜(荷兰 FEI 公司的 Quanta 200)和透射电镜(日本 JEOL 公司的 JEM-1230)观察。

1.3 藻细胞基因组 DNA 提取

方法参照《精编分子生物学实验指南》(第四版)^[16]。取适量体积指数生长期的藻液,于 20℃,12000 r/min 离心 5min 收集藻细胞并用无菌水洗涤 3 次,加 567 μL 的 TE 缓冲液[100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L Na₂EDTA]反复吹打使藻细胞重悬浮,加 30 μL 10%的 SDS 和 3 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K,混匀,37℃温育 1h,期间不断轻轻摇动;加 100 μL 5 mol/L 的 NaCl,充分混匀后加入 80 μL 10%的 CTAB/NaCl 溶液,混匀,于 65℃温育 30min;加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀,于 20℃,10000 r/min 离心 10min,小心吸取上清至新管中,加等体积氯仿/异戊醇(24/1),混匀,20℃,10000 r/min 离心 10min,重复 1 次;转移上清至新管中,加 0.6 倍体积的冰冷异丙醇沉淀 DNA,于 4℃,12000 r/min,10min 离心收集 DNA 沉淀;70%乙醇清洗 2 次后加 50—100 μL 无菌水溶解 DNA,−20℃保存。

1.4 藻株 18S rRNA 基因序列分析 18S rRNA 基因扩增

使用真核生物通用 18S rRNA 基因引物对 18F (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3')和 18R (5'-TGA TCCTTCT/CGCAGGTTCAC-3') (Moon-van der Staay, 2001)^[17]扩增藻株 18S rRNA 基因片段,引物由上海英骏合成。PCR 反应体系为 20 μL,包括: 10×PCR 缓冲液[200 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 750 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% TWEEN 20], 1.5 mmol/L MgCl₂, dNTP 200 μmol/L, 引物各 0.15 μmol/L, 1 μL 模板 DNA, 0.2 U *Taq* DNA 聚合酶(Fermentas),加水补足至 20 μL。反应条件为: 94℃预变性 5min; 94℃ 60s, 58℃ 60s, 72℃, 90s, 循环 29 次; 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测,扩增片段大小在 1800 bp 左右。

PCR 产物的回收、纯化与克隆 扩增的 PCR 产物使用 OMEGA (USA)试剂盒回收纯化,连接至 pMD 18-T vector (Takara, Japan),转化大肠杆菌 *E. coli* DH 5α感受态细胞,使用引物对 18F/18R 进行阳性克隆检验,对重组质粒进行测序,由上海 Invitrogen 生命技术有限公司完成测序。

藻株系统发育分析 使用软件 Clustal X (1.83)进行多序列比对; MEGA 4.0 采用邻接法(NJ)

和最大简约法(MP)构建系统树,自展率(Bootstrap)进行 1000 次重复,获得一致系统树。用于构建系统进化树的藻株及其 GenBank 信息(表 1)。藻株 DC-10

表 1 用于构建系统进化树的藻株及其 GenBank 信息

Tab. 1 Strains used for phylogenetic tree construction and their GenBank information

分类单元 Taxon	藻株 Species	登录号 Accession No.
Trebouxio- phyceae	<i>Chlorella kessleri</i> SAG 211-11g	X56105
	<i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-11b	X13688
	<i>Chlorella minutissima</i> C-1.1.9	X56102
	<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-8k	X62441
	<i>Choricystis minor</i>	X89012
	<i>Nanochlorum eucaryotum</i>	X06425
	<i>Nannochloris</i> sp. RCC 011	AJ131691
	<i>Trebouxia impressa</i>	Z21551
	<i>Mychonastes homosphaera</i> CCAP 211/8e	X73996
	<i>Mychonastes homosphaera</i>	AB025423
Chloro- phyceae	<i>Mychonastes</i> sp. AS 7-9	AY195971
	<i>Pseudodictyosphaerium jurisii</i>	AF106074
	<i>Mychonastes jurisii</i> CCAP 260/1	GQ477038
	<i>Mychonastes pusillus</i> CCAP 260/4	GQ477039
	<i>Mychonastes racemosus</i> CCAP 222/34	GQ477042
	<i>Mychonastes racemosus</i> CCAP 222/35	GQ477043
	<i>Mychonastes afer</i> CCAP 260/6	GQ477044
	<i>Mychonastes pushpae</i> CCAP 260/9	GQ477046
	<i>Mychonastes pushpae</i> CCAP 260/10	GQ477047
	<i>Mychonastes afer</i> strain CCAP 211/406	GQ477049
	<i>Mychonastes huancayensi</i> SAG 89.81	GQ477050
	<i>Mychonastes racemosus</i> CCAP 222/52	GQ477051
	<i>Mychonastes rotundus</i> CCAP 260/14	GQ477053
	<i>Mychonastes homosphaera</i> CCAP 205/1	GQ477054
	<i>Mychonastes timauensis</i> CCAP 205/2	GQ477055
	<i>Mychonastes homosphaera</i> CICALA 380	GU799582
	<i>Mychonastes homosphaera</i> CAUP H6501	GU799581
	<i>Mychonastes</i> sp. 5C3	AF357150
	<i>Mychonastes</i> sp. 2C1	AF357151
	<i>Mychonastes</i> sp. AN 2/29-3	AY195965
Prasino- phytes	<i>Mychonastes</i> sp. JL 1/12-12	AY195978
	<i>Mychonastes</i> sp. Tow 6/3 P-1w	AY197637
	<i>Pseudodictyosphaerium</i> sp. Itas 6/3 M-2w	AY543062
	<i>Pseudodictyosphaerium</i> sp. Itas 9/21 S-3w	AY543064
	<i>Pseudodictyosphaerium</i> sp. Itas 9/21 14-4w	AY543065
	<i>Pseudodictyosphaerium</i> sp. Itas 9/21 14-8w	AY543066
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	M32703
	<i>Chlamydomonas humicola</i>	U13984
	<i>Mantoniella squamata</i>	X73999
	<i>Pseudoscourfiedia marina</i>	X75565

和 DC-11 在 GenBank 中的登录号分别为: JF834168 和 JF834169。

2 结果

2.1 形态学特征分析

藻株 DC-10(图 1a)和 DC-11 均为单细胞, 细胞球形, 直径 1.5—4 μm , 在光镜下观察细胞壁平滑, 多见母细胞包被 2 个似亲孢子进行繁殖。

2.2 藻株 DC-10 的细胞超微结构观察

在扫描电镜下观察藻株 DC-10, 细胞球形, 不同于普通光学显微镜下观察到的平滑细胞壁, 细胞壁表面具有不规则的肋网(图 1b)。

藻株 DC-10 的超薄切片观察结果(图 1c-f): 细胞壁 2 层, 外层宽 20—25 nm, 为三层结构, 表现为暗—明—暗三层。每个细胞具备一套简单的细胞器, 主要包括: 1 个细胞核, 1 个线粒体和 1 个叶绿体。叶绿体周生, 杯状, 占据细胞大部分体积, 不具蛋白

核; 类囊体一般 2—6 层平行堆叠, 淀粉粒散布在其中, 但数量不多且并没有在每个细胞中都观察到。细胞核常位于叶绿体凹面对面, 线粒体则常位于细胞核和叶绿体之间, 脊数目较少, 三者占据了细胞的绝大部分体积, 在细胞质中分布着数量众多的核糖体(图 1c-e)。

DC-10 营似亲孢子的无性繁殖方式, 如图 1c 显示的是由母细胞壁包被 2 个大小相同、具相同细胞器的似亲孢子。似亲孢子母细胞的外层细胞壁具典型的 TL-层(Trilaminar Layer)结构, 2 个暗层之间为透明电子层。

2.3 藻株 DC-10、DC-11 的 18S rRNA 基因序列分析

使用真核生物通用引物对 18F/18R 扩增藻株 DC-10 和 DC-11 的 18S rRNA 基因片段长度约为 1800 bp, 同 *Mychonastes homosphaera* (X73996 和 AB025423)相似性为 99%, 在构建的 18S rRNA 系统发育树(图 2、图 3)中, DC-10 和 DC-11 同 *Mychonastes*

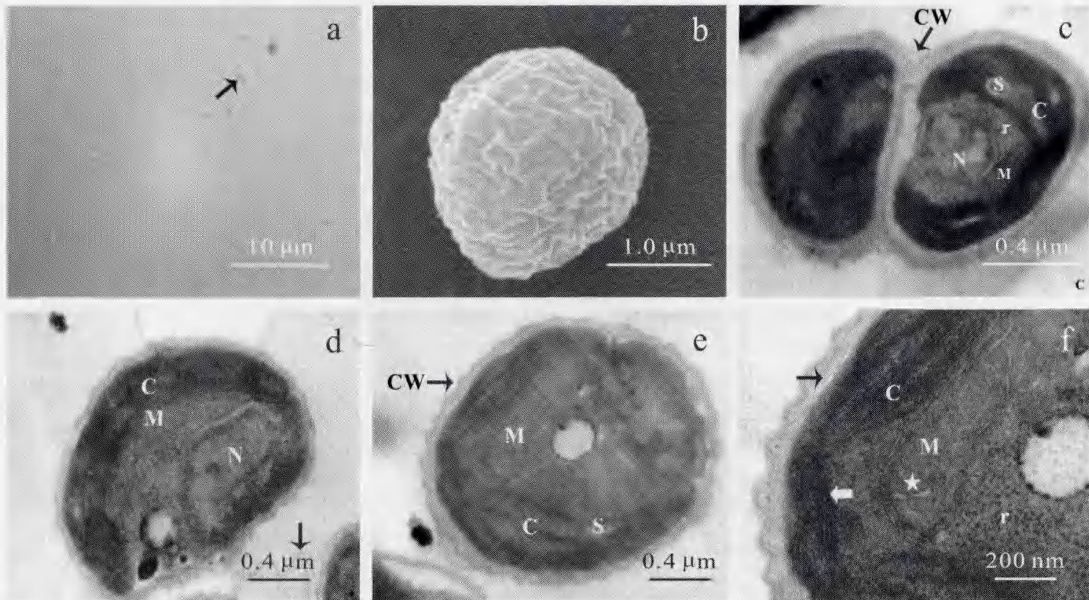


图 1 藻株 DC-10 显微镜照片

Fig. 1 Micrographs of green alga strain DC1-10

a. 藻株 DC-10 光镜照片, 箭头所指为母细胞包被 2 个似亲孢子; b. DC-10 扫描电镜照片, 细胞壁表面具肋网状结构; c-f. DC-10 的透射电镜照片. N: 细胞核; C: 叶绿体; M: 线粒体; CW: 细胞壁; r: 核糖体; c. 母细胞包被 2 个似亲孢子, 箭头指示母细胞壁的外层 TL-层结构; d. 似亲孢子, 图中所示为其叶绿体、线粒体和细胞核, 箭头指示处为残留母细胞壁; e. 营养细胞, 图中所示为周生、杯状叶绿体, 线粒体和淀粉粒, 箭头所示其肋网状外层细胞壁; f. 图 1e 的放大照片, 示叶绿体(类囊体, 箭状物)、线粒体(脊, 星号)和数量众多的核糖体, 箭头所指为细胞壁 TL 层内的电子致密层

a. Micrographs of green alga strain DC-10. The arrow indicates mother cell with two autospores; b. Scanning electron micrograph of strain DC-10, with an irregular network of ribs on the surface; c-f. Transmission electron micrographs of strain DC-10. The acronyms are: N, nucleus; C, chloroplast; M, mitochondrion; CW, cell wall; r, ribosomes. c. Mother cell with two autospores, the arrow indicates a trilaminar-layer of mother outer cell wall; d. Autospore, showing chloroplast, mitochondrion and nucleus, notice remnants of the mother cell wall (arrow); e. Vegetative cell with a minimal set of major organelles, including a parietal and cup-shaped chloroplast; a mitochondrion and a starch grain. The arrow indicates the network of ribs on the outer layer of cell wall; f. a close-up view of panel. e, showing the thylakoid (arrowhead) of chloroplast, the cristae (asterisk) of mitochondrion and numerous ribosomes. The arrow indicates the inner electron-dense wall layer

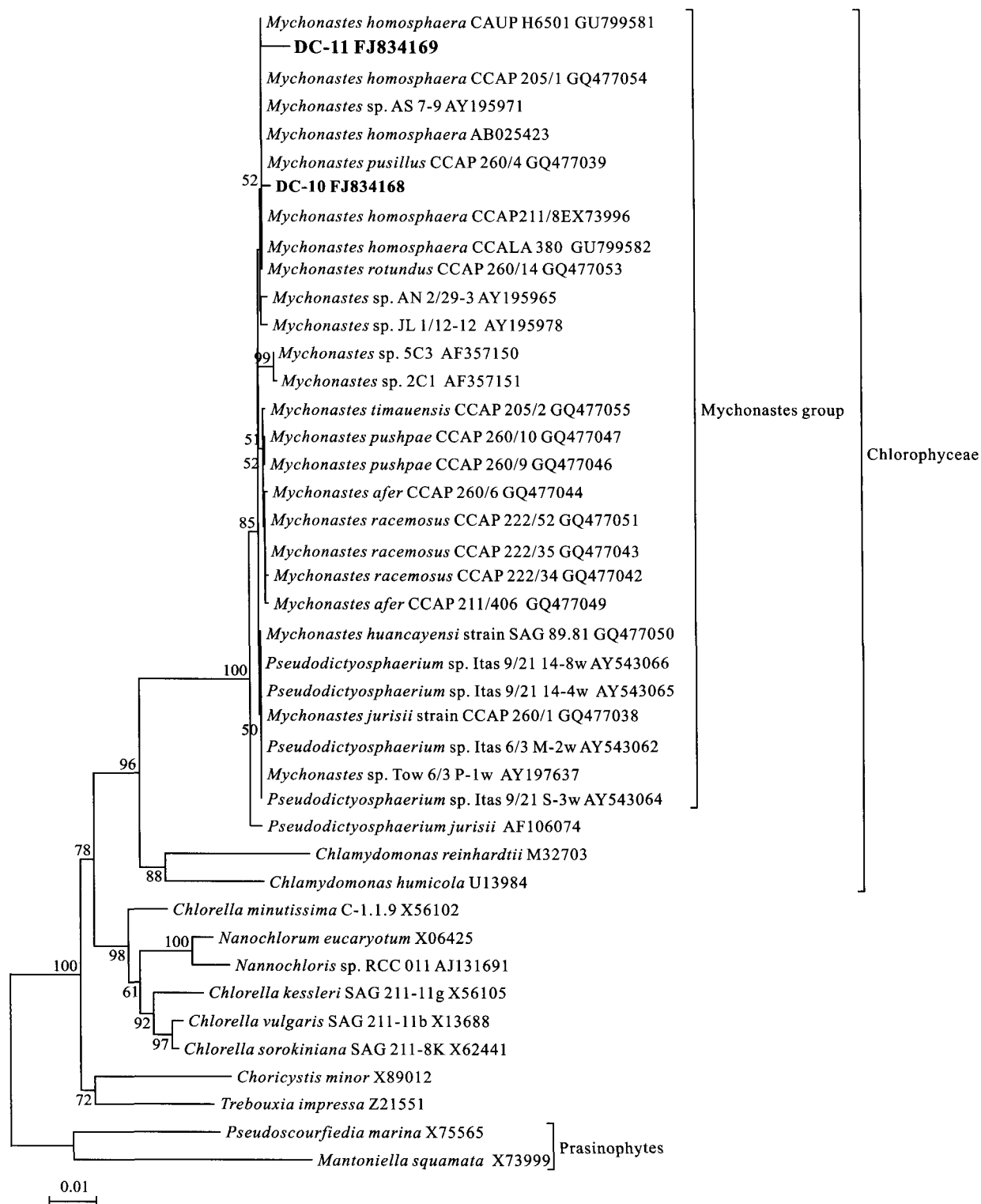


图2 采用邻接法(NJ)基于部分 18S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree (neighbour-joining) inferred from partial 18S rRNA gene sequences

枝末端表示藻株名称及 GenBank 序列号(本研究获得的序列粗体表示), bootstrap 重复 1000 次, 外类群为葱绿藻(Prasinophytes)的 2 株藻

Terminal branches are species names and their GenBank accession number. The species in bold font are sequences determined in this study. Numbers at nodes are bootstrap support percentages of 1000 replicates. Two species of *Prasinophytes* were listed as the outgroup

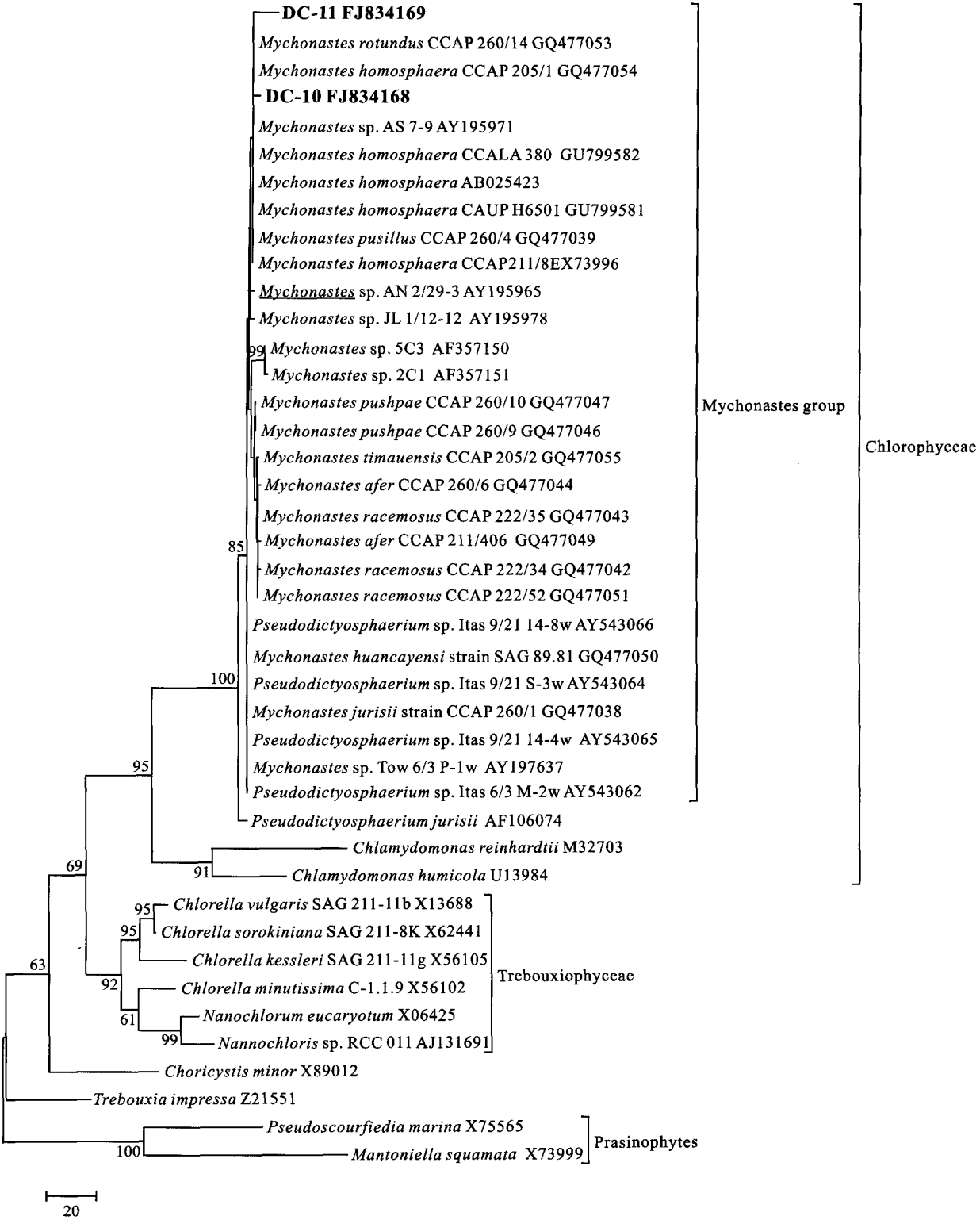


图 3 采用最大简约法(MP)基于部分 18S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree (Maximum parsimony) inferred from partial 18S rRNA gene sequences
枝末端表示藻株名称及 GenBank 序列号(本研究获得的序列粗体表示), bootstrap 重复 1000 次, 外类群为葱绿藻(Prasinophytes)的 2 株藻
Terminal branches are species names and their GenBank accession number. The species in bold font are sequences determined in this study.
Numbers at nodes are bootstrap support percentages of 1000 replicates. Two species of *Prasinophytes* were listed as the outgroup

homosphaera CCAP211/8E (X73996)、*M. Homosphaera* (AB025423)、*M. homosphaera* CCAP 205 等 *Mychonastes* (Simpson & van Valkenburg) 属的其他藻株以 85% 的 bootstrap 值组成麦可群, 为单起源, 同 *Pseudodictyosphaerium jurisii* 以 100% 的 bootstrap 值分成 2 个独立的进化枝, 均属于绿藻纲(Chlorophyceae), 同小球藻属(*Chlorella* Beijerinck)、*Choricystis* (Skuja) Fott 等淡水中常见的真核超微藻属种类所在的特波藻纲(Trebouxiophyceae)进化枝相邻。

2.4 麦可属(*Mychonastes* Simpson et Van Valkenburg)

该属特征同小球藻属类似, 但不具蛋白核。细胞球形、卵形或椭圆形, 细胞壁厚, 2 层, 外层细胞壁表面具肋网; 单生或多个细胞聚集成群; 叶绿体 1—4 个, 周生, 盘状或杯状, 常有淀粉粒; 通过似亲孢子生殖; 不具动孢子; 细胞核 1 个, 营养细胞中其大小有差异; 线粒体 1 个^[10, 22]。

藻株 DC-10 的细胞大小、形状、叶绿体形态、细胞壁结构及似亲孢子繁殖方式同麦可属 *M. homosphaera* 基本相同^[10]。在构建的 18S rRNA 基因系统发育树中, DC-10 和 DC-11 位于麦可属群进化枝上, 属于绿藻纲。但由于选取的 18S rRNA 基因序列保守性高, 突变频率低, 在构建的进化树中不能进一步确定其种水平。因此我们将 DC-10 和 DC-11 归为麦可属种类, 为我国首次报道的淡水超微真核藻。

3 讨论

麦可属由 Simpson 和 Van Valkenburg 于 1978 年首次描述, 其模式种为 *M. ruminates* Simpson & Van Valkenburg, 分离自美国马里兰州切萨皮克湾。随后原先为小球藻属的 *C. homosphaera* Skuja 和 *C. zofingiensis* Dönnz 被划分至麦可属, 分别重新命名为 *M. homosphaera* 和 *M. zofingiensis* (Dönnz) Kalina & Punčochářová^[10, 11]。*M. homosphaera* 同 *M. ruminates* 形态相似, 只是生境不同, *M. homosphaera* 分离自淡水, 而 *M. ruminates* 分离自半咸水。*M. zofingiensis* 的细胞大小、叶绿体形状和似亲孢子数目不同于 *M. homosphaera*, 细胞大小约 2 倍于后者, 叶绿体几个或多数, 形成的似亲孢子数目可达 64 个^[10]。

同 *M. homosphaera* 不同之处在于, 在 DC-10 中我们观察到的似亲孢子的数目多为 2 个, 偶见母细胞包被 4 个似亲孢子, 这可能与使用的培养基不同

或是处于不同的生长阶段有关。另外, 同分离自以色列 Kinneret 湖的藻株相比, DC-10 细胞壁上的肋网要密集一些。

麦可属呈世界性分布, 生境广泛, 包括溪流和大型静止水体^[11], 在肯尼亚 Baringo 湖和 Victoria 湖, 瑞典 Erken 湖, 德国 Stechlin 湖, 印度 Gandhi 湖^[11], 以色列 Kinneret 湖^[10], 瑞士 Hagel 湖、Lucerne 湖和 Alpnach 湖^[8], 美国北达科他州 Arrowwood 国家野生动植物保护区内浅水湖^[18]都有分布。

分子系统学研究表明绿藻门似亲孢子类球状绿藻具有很多分类单元, Friedl 基于 18S rDNA 序列分析, 将这类藻归为 2 个不同的纲, 分别是特波藻纲(Trebouxiophyceae)和绿藻纲(Chlorophyceae)^[19]。根据 Huss, *et al.* 基于生物化学、生理学、超微结构和分子生物学研究的结果, 小球藻类群(*Chlorella* taxa)分属于特波藻纲和绿藻纲, 其中 *M. homosphaera* 属于绿藻纲。小球藻(*C. vulgaris* Beijerinck)、凯氏小球藻(*C. kessleri* Fott & Nováková)、*C. lobophora* Andreyeva 和 *C. sorokiniana* Shih. & Krauss 4 种属于小球藻属(*Chlorella* Beijerinck), 属特波藻纲, 其特征是葡萄糖胺为细胞壁主要成分, 具淀粉鞘且被 2 层类囊体嵌入的蛋白核^[9, 20]。小球藻为小球藻属的模式种, 其细胞壁薄, 不含孢粉类物质, 外层细胞壁不具暗—明—暗三层结构^[7]。《中国淡水藻类—系统、分类及生态》^[13]中小球藻属有 3 个种, 分别为小球藻, 椭圆小球藻(*C. ellipsoidea* Gerneck)和蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa* Chick), 《中国淡水藻志(第八卷)—绿藻门, 绿球藻目》^[21]中小球藻属包括 5 种, 除小球藻和椭圆小球藻外, 还有凯氏小球藻、喜糖小球藻(*C. sacharophila* (Krueger) Migula)和埃氏小球藻(*C. emersonii* Shihira & Krauss)。在 Huss, *et al.* 构建的小球藻类 18S rRNA 基因系统发育树中, 喜糖小球藻、椭圆小球藻、*C. luleoviridis* Chodat 和 *C. mirabilis* Andreyeva 各以很高的 bootstrap 值(>88%)聚在一起, 说明它们之间亲缘关系很近, 同小球藻属均属于特波藻纲^[20]。可通过观察藻细胞大小和是否含蛋白核来区分小球藻属和麦可属种类, 小球藻属的 4 种藻细胞均不小于 3 μm , 不属于超微浮游植物范畴, 具蛋白核, 而麦可属不具蛋白核。

另外常混淆的小型球状类藻还有 *Nannochloris* (Naumann), 根据 Naumann 对 *Nannochloris* 属模式种 *N. bacillaris* (Naumann) 的原始描述, 它通过二分

裂方式繁殖, 属于丝藻目(*Ulotrichales*)^[7], 而麦可属则以似孢子方式繁殖。

伪网球藻属(*Pseudodictyosphaerium* Hindák)同麦可属均隶属于绿藻纲, 该属的基本特征为: 单细胞或群体, 细胞直径 2—10 μm , 叶绿体周生, 杯状或带状, 不具蛋白核, 具一套简单的细胞器, 其细胞超微结构同麦可属类似。分布于河流、湖泊和小型水体如池塘中, 德国 Stechlin 湖^[9]和美国明尼苏达州 Itasca 湖^[3]都有其分离报道。其中, *P. jurisii* (Hindák) Hindák 最初被描述为 *Dactylosphaerium jurisii* Hindák, 后根据其不具蛋白核和动孢子将其划分至伪网球藻属(*Pseudodictyosphaerium*), 是一种常见的超微绿藻, 但细胞通常以群体形式存在, 由残存的母细胞壁连接在一起, 使用墨汁负染色法很容易观察到细胞包被在透明的无特殊结构的胶被中, 但是在野外或是室内培养条件下, 群体很容易完全解聚^[9, 11], 因此增加了鉴定小型、球形或椭圆形类绿藻的困难。

球状类超微绿藻由于其细胞小, 形态学特征相同而很难对其进行正确分类, 应结合电镜和分子生物学方法方能更准确地确定其分类学地位。我国有关淡水超微真核藻的分离培养、形态学、生理生态学、多样性及分子系统关系研究起步较国外晚, 因此有待于进一步扩大研究调查范围, 分离培养获得更多的超微浮游植物材料, 以完善我国的淡水超微浮游植物的分类学资料。

致谢:

衷心感谢魏印心先生、胡鸿钧先生及刘其芳老师给予本文的指导和帮助。感谢云南大理洱海湖泊研究中心的卫志宏、孟良和大理州环境监测站工作人员在洱海样品采集过程中的帮助和支持。

参考文献:

- [1] Callieri C, Stockner J G. Freshwater autotrophic picoplankton: a review [J]. *Journal of Limnology*, 2002, **61**(1): 1—14
- [2] Stockner J G, Antia N J. Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1986, **43**: 2472—2503
- [3] Fawley M W, Fawley K P, Owen H A. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyeralla planktonica*, gen. et sp. nov. [J]. *Phycologia*, 2005, **44**(1): 35—48
- [4] Krienitz L, Hepperle D, Stich H B, et al. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater [J]. *Phycologia*, 2000, **39**(3): 219—227
- [5] Krienitz L, Huss V A R, Hümmer C. Picoplanktonic *Choriocystis* species (Chlorococcales, Chlorophyta) and problems surrounding the morphologically similar 'Nannochloris-like algae' [J]. *Phycologia*, 1996, **35**(4): 332—341
- [6] Belykh O I, Semenova E A, Kuznedelov K D, et al. A eukaryotic alga from picoplankton of Lake Baikal: morphology, ultrastructure and rDNA sequence data [J]. *Hydrobiologia*, 2000, **435**: 83—90
- [7] Hepperle D, Krienitz L. Systematics and ecology of Chlorophyte picoplankton in German inland waters along a nutrient gradient [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2001, **86**(3): 269—284
- [8] Hepperle D, Schlegel I. Molecular diversity of eukaryotic picoalgae from three lakes in Switzerland [J]. *International Review of Hydrobiology*, 2002, **87**(1): 1—10
- [9] Krienitz L, Takeda H, Hepperle D. Ultrastructure, cell wall composition, and phylogenetic position of *Pseudodictyosphaerium jurisii* (Chlorococcales, Chlorophyta) including a comparison with other picoplanktonic green algae [J]. *Phycologia*, 1999, **38**(2): 100—107
- [10] Hanagata N, Malinsky-Rushansky N, Dubinsky Z. Eukaryotic picoplankton, *Mychonastes homosphaera* (Chlorophyceae, Chlorophyta) in Lake Kinneret, Israel [J]. *Phycological Research*, 1999, **47**: 263—269
- [11] Krienitz K, Bock C, Dadheech P K, et al. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species [J]. *Phycologia*, 2011, **50**(1): 89—106
- [12] Fietz S, Bleiß W, Hepperle D, et al. First record of *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) in the autotrophic picoplankton from Lake Baikal [J]. *Journal of Phycology*, 2005, **41**: 780—790
- [13] Hu H J, Wei Y X. The Freshwater Algae of China Systematics, Taxonomy and Ecology [M]. Beijing: Science Press. 2006, 209—903 [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, 209—903]
- [14] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria [J]. *Journal of General Microbiology*, 1979, **111**(1): 1—61
- [15] Nichols H W, Bold H C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. [J]. *Journal of Phycology*, 1965, **1**(1): 34—38
- [16] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M] (4th ed.) John Wiley & Sons, Inc., Publishers. 2000, 55—56 [F. M. 奥斯伯, R. 布伦特, R. E. 金斯顿. 精编分子生物学实验指南(第四版). 北京: 科学出版社. 2000, 55—56]
- [17] Moon-van der Staay S Y, De Wachter R, Vaultot D. Oceanic

- 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity [J]. *Nature*, 2001, **409**: 607—610
- [18] Phillips K A, Fawley M W. Diversity of coccoid algae in shallow lakes during winter [J]. *Phycologia*, 2000, **39**(6): 498—506
- [19] Friedl T. Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dicthyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.) [J]. *Journal of Phycology*, 1995, **31**: 632—639
- [20] Huss V A R, Frank C, Hartmann E C, *et al.* Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) [J]. *Journal of Phycology*, 1999, **35**: 587—598
- [21] Bi L J, Hu Z Y. Flora Algarum Sinicarum Aquae Dulcis. Tomus VIII. Chlorophyta. Chlorococcales [M]. Beijing: Science Press. 2005, 30—32 [毕列爵, 胡征宇. 中国淡水藻志第八卷 绿藻门 绿球藻目. 北京: 科学出版社. 2005, 30—32]
- [22] Simpson P D, Van Valkenburg S D. The ultrastructure of *Mychonastes ruminates* gen. *et* sp. nov., a new member of the Chlorophyceae isolated from brackish water [J]. *European Journal of Phycology*, 1978, **13**: 117—130

MYCHONASTES, A NEW RECORDED GENUS OF FRESHWATER CHLOROPHYCEAE ISOLATED FROM A CHINESE LAKE

LI Yan-Hui^{1,2}, HU Ming-Ming^{1,2}, SHEN Yin-Wu¹, LIU Yong-Ding¹,
LI Dun-Hai¹ and LI Gen-Bao¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Morphology, ultrastructure, and 18S rRNA gene sequences of two strains of eukaryotic picoplankton isolated from Lake Dianchi, China, were analysed. Results showed that cellular shape, structure and autospore formation of two strains were similar to characteristics of the genus *Mychonastes* Simpson & Van Valkenburg. The cell wall was consisted of double layers. The outer layer had a network of ribs on its surface and a trilaminar sheath, which appeared as a dark-light-dark triple layer. Cells had a minimal set of organelles, typical for small coccoid green algae, a single nucleus, one mitochondrion, one chloroplast without pyrenoid. Chloroplast was parietal, cup-shaped and occupied most of the cell volume. The phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequence data showed that isolated strains belonged to the genus *Mychonastes*, which belonged to the Chlorophyceae (Chlorophyta). *Mychonastes* was a firstly recorded genus of eukaryotic freshwater picoalgae in China.

Key words: Chlorophyceae; *Mychonastes*; New record in China