

# 蜈蚣衣科地衣 1 个中国新记录属——金奥克衣属

阿尔古丽·加玛哈特, 热衣木·马木提\*

(新疆大学 生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**以采自新疆地区的地衣标本为试验材料,通过观察和研究该地衣形态解剖特征、次生代谢产物以及构建核糖体 DNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)系统发育树,研究鉴定该地衣标本为蜈蚣衣科(Physciaceae)1个中国新记录属:金奥克衣属[*Oxnerella*(S. Y. Kondr., Lökös & Hur)]及中国新记录种双裂金奥克衣[*O. safaavidiorum*(S. Y. Kondr., Zarei-Darki, Lökös & Hur)],该种含有柔扁枝衣酸,文中提供了该种形态解剖图,并讨论了其与相似物种的关系。

**关键词:**新记录;双裂金奥克衣;系统发育学;分类学;新疆

**中图分类号:**Q949.34      **文献标志码:**A

## *Oxnerella*, a New Lichen Genus of Physciaceae to China

AERGULI Jiamahat, REYM Mamut\*

(College of Life Science, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

**Abstract:** In this paper, we used morphology, anatomy, lichen chemistry and phylogeny methods to study the specimens collected from Xinjiang, China. Divarictic acid was detected from some collections by Color test (CT), thin layer chromatography (TLC) and high Performance Liquid Chromatography (HPLC). Morphological characters, secondary metabolites, and phylogenetic tree of ITS of the specimens showed that some specimens should be identified as *Oxnerella safaavidiorum*. Therefore, the genus *Oxnerella* with species *O. safaavidiorum* are reported for the first time from China. Descriptions with photos of the thallus, apothecia, asci and ascospores are provided based on Chinese collections. In addition, the relationships of the species and its related species are discussed.

**Key words:** new record; *Oxnerella safaavidiorum*; phylogeny; taxonomy; Xinjiang

金奥克衣属(*Oxnerella*)隶属于真菌界(Fungi)子囊菌门(Ascomycota)茶渍纲(Lecanoromycetes)粉衣目(Caliciales)蜈蚣衣科(Physciaceae),单种属<sup>[1]</sup>。目前该属仅有双裂金奥克衣(*Oxnerella safaavidiorum* S. Y. Kondr., Zarei-Darki, Lökös & Hur)。

金奥克衣属与副茶渍属(*Lecania* A. Massal.)地衣体形态结构差异不大,子囊盘均无柄、盘面平至略凸、盘缘明显、子囊呈 *Biatora*-type 内含 8~16 孢子,孢子橄榄绿色横隔双胞,因此金奥克衣属与副茶渍属依据形态解剖特征难以区分。Naesborg 等<sup>[2-3]</sup>利

用贝叶斯计算方法对副茶渍属的线粒体小亚基(mitochondrial small subunit, mtSSU)、核糖体大亚基(nuclear large subunit, nuLSU)以及 RNA 聚合酶 II 大亚基 2(the second subunit of the RNA polymerase II gene, RPB2)的分子数据进行了系统研究,结果显示副茶渍属地衣形成了单独分支,与金奥克衣属不聚集于一个分支内。Ekman 等<sup>[4]</sup>和 Kelly 等<sup>[5]</sup>学者相继从系统发育学角度研究了副茶渍属地衣,完善了副茶渍属地衣的分子数据库,为双裂金奥克衣地衣与副茶渍属地衣从分子生物学角度研究提供了分子数

收稿日期:2019-11-15;修改稿收到日期:2020-03-17

基金项目:国家自然科学基金(31670023,31760052)

作者简介:阿尔古丽·加玛哈特(1992-),女,硕士研究生,研究方向为植物分类学。E-mail:1019465928@qq.com

\* 通信作者:热衣木·马木提,副教授,现主要从事地衣资源调查研究工作。E-mail:reyim\_mamut@xju.edu.cn

据的支持。2014年 Kondratyuk 首次鉴定出该属,他选取采自伊朗伊斯法罕省区域内曾鉴定为 *Lecania* aff. *ochronigra* J. Steiner 地衣标本进行分子生物学研究,研究显示该种在树花科(Ramalinaceae)中形成了单独分支<sup>[6]</sup>。Kondratyuk 通过对金奥克衣属、副茶渍属、网衣属(*Lecidea*)和树花属(*Ramalina*)等 33 个属的 ITS nrDNA 以及 12S mtSSU DNA 进行系统发育学研究,依据系统发育树中金奥克衣属分支聚类情况,明确了该物种属水平上的地位,而后也从形态解剖学角度进一步比较了该属同其他属之间的形态特征差异,从而进一步确定该种并非 *Lecania* aff. *ochronigra*,并确定该种为新属新种。

金奥克衣属为中国新记录属,本研究结合了形态解剖学方法、地衣化学方法和系统发育学方法,采用表型和基因型相结合的研究手段,使得该属地衣鉴定结果更具科学性和可信性。

## 1 材料和方法

本研究所用的研究材料采自新疆阿勒泰地区白哈巴县、哈密地区巴里坤县和昌吉地区奇台县和木垒县,采集地海拔为 1 500~2 000 m,标本保藏于新疆大学资源植物学地衣标本室。

### 1.1 形态解剖及化学方法

用 SZM45 光学体式解剖镜对地衣体形态特征进行观察、Olympus 显微镜观察地衣体解剖学特征,用 Nikon EclipseE200 显微镜和 Nikon D-810 数码相机观察拍照。

地衣化学显色反应方法确定次生代谢产物类型,K 溶液(10%的氢氧化钾水溶液)、C 溶液(次氯酸钙饱和水溶液)和 I 溶液(1%碘化钾水溶液)用于地衣体皮层和髓层次生代谢产物检测,N 溶液(50%浓硝酸水溶液)和 I 溶液(0.3%碘化钾水溶液)用于地衣体解剖结构中上子实层和子实层中次生代谢产物检测和子囊顶器类型的观察。此外也结合薄层层析法<sup>[7-8]</sup>(Thin-layer Chromatography, TLC)和高效液相色谱法<sup>[9-10]</sup>(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)对次生代谢产物类型进行进一步确认。

### 1.2 ITS 序列测定及系统发育分析

本研究中使用 DNA 试剂盒(真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司),提取成功的基因组 DNA 于 -20 °C 冷冻保存。以抽提的基因组 DNA 为模板,以 ITS1F<sup>[11]</sup>(CTT-

GGTCATTTAGAGGAAGTAA)和 ITS4<sup>[12]</sup>(TC-CTCCGCTTATTGATATGC)为引物,进行该种核糖体 rDNA 的 ITS 位点扩增。PCR 扩增用 50  $\mu$ L 反应体系:25  $\mu$ L Taq PCR Master Mix, 19  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L ITS1F, 2  $\mu$ L ITS4, 2  $\mu$ L DNA 模板。PCR 扩增反应条件:94 °C 预变热 4 min,按以下步骤循环 34 次(94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min),循环结束后在 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

利用 Chromas 软件拼接和整理序列,在 GenBank 数据库中 Nucleotide Blast 出 ITS 目的片段相似性较高的序列(本研究中下载了 16 条序列)。用 Mega7.0 软件对 ITS 序列进行最佳模型选择,最佳模型为 T92 + G,采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)以 Tamura 三参数模型(T92)构建系统发育树,用 Bootstrap 方法检验系统发育树,置信度设为 1 000<sup>[13]</sup>。用 RAXML-HPC2<sup>[14]</sup> on XSEDE 在 CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org>)<sup>[15]</sup> 构建 ITS 序列的最大似然树(Maximum likelihood, ML),Bootstrap 参数设置为 1 000,其余参数设置为默认。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态解剖特征(图 1)

双裂金奥克衣 *Oxnerella safaavidiorum* S. Y. Kondr., Zarei-Darki, Lökös & Hur 2014, in Kondratyuk, Lökös, Kim, Kondratiuk, Jeong, Zarei-Darki & Hur, Acta bot. hung. 56(3-4): 388

地衣体土黄色,裂片分散呈膨大的半球状,极薄,表面具小颗粒状物质,不平整,直径约 0.3~0.6 mm;具与地衣体同色的下地衣体。子囊盘呈黑色,贴生至半埋生,基部不缢缩无柄,聚生;盘面平整,略凸起;盘缘规整较厚,与地衣体同色,与盘面齐平或略高于盘面;子囊盘呈近圆形;子囊盘直径约 0.5~0.6 mm。

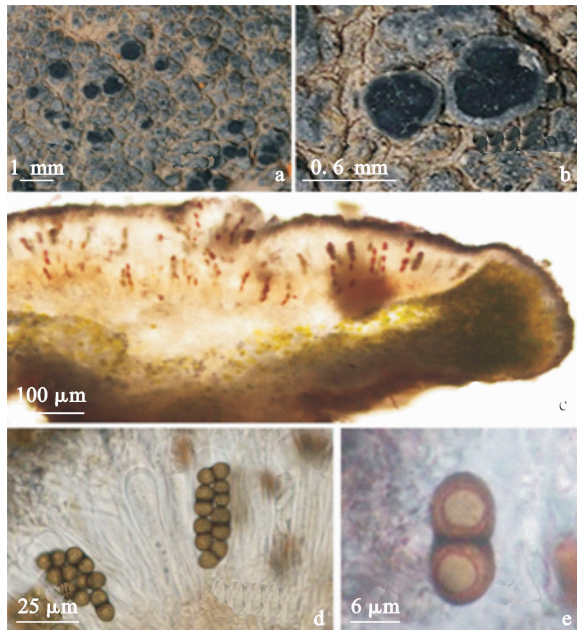
上子实层呈深黄棕色至棕色,厚度 20  $\mu$ m 左右;子实层透明,厚度为 90~110  $\mu$ m;下子实层不明显;囊层基黄棕色至浅黄色,厚度 40~130  $\mu$ m;囊盘被外侧呈深黄棕色,内侧不明显;子囊呈椭棱锥型,子囊顶器呈 *Biatora*-type 型,子囊内具 8 孢子;孢子橄榄绿色至褐色,圆锥状两端细中部粗,横隔双胞,大小(7.5~10)×(9~13)  $\mu$ m,孢子两端具呈圆形的大油滴;侧丝不分支,顶端部分呈链珠状,侧丝粘合不易分开,侧丝顶部具深黑色的帽状结构。

显色反应(CT):地衣体  $K^-$ ,  $KC^-$ ,  $C^-$ ,  $P^-$ ; 髓层  $I^-$ ; 子实层  $I^+$  蓝色。

次生代谢物类型:柔扁枝衣酸(TLC, HPLC)。

基物:硅质岩石。

研究标本:新疆巴里坤下涝坝, 1 622 m, 石生, 2017. 10. 15, 阿不都拉·阿巴斯, 居勒得孜·赛力克, 201710654(ITS 序列号为 MN699351); 巴里坤



a. 地衣体; b. 子囊盘; c. 子囊盘切片; d. 子囊及子囊孢子; e. 子囊孢子

图 1 双裂金奥克衣形态及解剖结构

a. Thallus; b. Apothecia; c. Apothecium section;

d. Ascus and ascospores; e. Ascospores

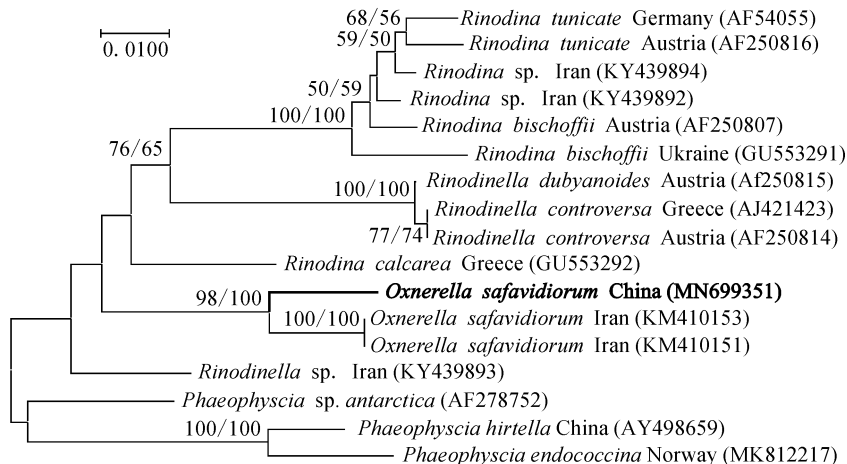
Fig. 1 Morphology and anatomy of *Oxnerella safaavidiorum*

海子沿乡, 1 656 m, 石生, 2017. 10. 05, 阿不都拉·阿巴斯, 居勒得孜·赛力克, 201710613; 木垒大石头, 1 549 m, 石生, 2017. 10. 05, 阿不都拉·阿巴斯, 居勒得孜·赛力克, 阿尔古丽·加玛哈特, 201710603; 达坂城东沟, 2 027 m, 石生, 2017. 08. 25, 阿不都拉·阿巴斯, 居勒得孜·赛力克, 阿尔古丽·加玛哈特, 201710642; 奇台县江布拉克, 1 910 m, 石生, 2018. 07. 18, 阿不都拉·阿巴斯, 夏依拉·肖开提, 山都喀什·哈布力, 阿尔古丽·加玛哈特, 20180135; 阿勒泰白哈巴, 1 600 m, 石生, 2005. 08. 13, 阿不都拉·阿巴斯, 510389。

世界分布: 伊朗<sup>[6]</sup>; 中国(新疆)。

## 2.2 ITS 序列比对与系统发育学分析

本研究中提取的 ITS 序列片段与 GenBank 数据库中双裂金奥克衣地衣的序列比对结果相似性在 97% 以上。对该种的 ITS 序列和相似性较高的序列构建了 NJ 法和 ML 法系统发育树, 两种方法构建的系统发育树的拓扑结构相似。图 2 显示 NJ 法构建的系统发育树, 树枝前分别标注了两种方法所得的支持率(NJBS/MLBS)。由图 2 结果可知, 该种的 ITS 序列与 GenBank 数据库中 2 个伊朗标本的 ITS 序列聚在一个分支内, 两种方法所得的支持率较高, 分别为 98% 和 100%。而与双裂金奥克衣形态解剖特征极为相似的副茶渍属地衣的 ITS 序列比对结果显示该种与副茶渍属地衣的相似性较低, 副茶渍属地衣中最相近的种的序列比对结果相似性仅为 80.78%。



树枝前标注 NJBS/MLBS, 显示高于 50% 支持率

图 2 邻接法(NJ)对金奥克衣属及来自 GenBank 相近物种的 ITS 基因序列的系统发育分析

The values labelled before branches NJBS/MLBS, bootstrap support equal or above 50% are indicated

Fig. 2 Phylogenetic analysis inferred from *O. safaavidiorum* ITS gene sequences and related species from GenBank using Neighbor-joining (NJ)

### 3 讨 论

双裂金奥克衣与 *Lecania ochronigra* 形态解剖极为形似,二者的细微特征差异在于双裂金奥克衣的地衣体较后者发达、子囊盘具柄和果托、子实层较厚,且金奥克衣属多生长于硅质岩,而 *Lecania ochronigra* 生长于钙质岩<sup>[6]</sup>。双裂金奥克衣与 *Lecania flavescens* Lynge 相比,前者具与地衣体同色的下地衣体、较大的子囊盘、较厚的子实层以及较宽

的子囊孢子。但形态解剖特征相似的副茶渍该两个物种与双裂金奥克衣的亲缘关系较远,最相近种的 ITS 序列比对结果相似性仅为 80.78%。通过系统发育学分析可知,该属与蜈蚣衣科的饼干衣属 [*Ranodina* (Ach.) Gray] 地衣亲缘关系较近,但后者的子囊孢子较长(5~14×11~35 μm),囊层基多为无色,子囊顶器 *Lecanora*-type,未检测出次生代谢产物,基物类型较多<sup>[16]</sup>,据此可将两个属区分开。截止目前该属在世界范围内仅具一个种即双裂金奥克衣。

### 参考文献:

- [1] KIRK P M, CANNON P F, MINTER D W, *et al.* Dictionary of the fungi, 11th ed[M]. Wallingford: CAB International, 2018: 202.
- [2] NAESBORG R R, EKMAN S, TIBELL L. Molecular phylogeny of the genus *Lecania* (Ramalinaceae, lichenized Ascomycota)[J]. *Mycological Research*, 2007, **111**(5): 581-591.
- [3] NAESBORG R R. Taxonomic revision of the *Lecania cyrtrilla* group based on molecular and morphological evidence[J]. *Mycologia*, 2008, **100**(3): 397-416.
- [4] EKMAN S, ANDERSEN H L, WEDIN M. The limitations of ancestral state reconstruction and the evolution of the ascus in the lecanorales (lichenized ascomycota)[J]. *Systematic Biology*, 2008, **57**(1): 141-156.
- [5] KELLY L J, HOLLINGSWORTH P M, *et al.* DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context[J]. *New Phytologist*, 2011, **191**(1): 288-300.
- [6] KONDRATYUK S, LŐKÖS L, KIM J, *et al.* *Oxnerella saavidiorum* Gen. et Spec. Nov. (Lecanoromycetidae, Ascomycota) from Iran (Asia) proved by phylogenetic analysis [J]. *Acta Botanica Hungarica*, 2014, **56**(3-4): 379-398.
- [7] ORANGE A, JAMES P W, WHITE F J. Microchemical Methods for the Identification of Lichens[M]. 2nd edition. London: British Lichen Society, 2010.
- [8] JOHN A E. A Catalogue of Standardized Chromatographic Data and Biosynthetic Relationships for Lichen Substances [M]. Canberra: Published by the author, 2014.
- [9] 于世林. 高效液相色谱方法及应用[M]. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2005, 1-11.
- [10] 王俊德, 商振华, 郁蕴璐, 等. 高效液相色谱法[M]. 北京: 中国石化出版社, 1992, 1-9.
- [11] GARDES M, BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993, **2**(2): 113-118.
- [12] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics[M]. London: Academic Press, 1990: 322.
- [13] KUMAR S, STECHER G, *et al.* MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, **33**(7): 1 870-1 874.
- [14] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(9): 1 312-1 313.
- [15] MILLER M A, PFEIFFER W, *et al.* Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees [C]//2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), November 14, 2010. New Orleans, LA, USA. IEEE, 2010: 1-8.
- [16] THOMAS H, NASH III, BRUCE DR, *et al.* Lichen Flora the Grater Sonoran Desert Region2[M]. Arizona State: University Tempe Arizona, 2004: 467.

(编辑:潘新社)