

我国东南海域 2 个新记录拟菱形藻物种 及其产毒特征*

黄春秀 董焕娣 李 扬

(华南师范大学生命科学学院 广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室 广东省水产健康安全养殖
重点实验室 广州 510631)

摘要 为丰富我国拟菱形藻属的物种多样性,并澄清其产毒特征,本文从我国东南海域分离和建立了拟菱形藻的单克隆培养株系,结合光学显微镜下的群体特征和透射电镜下的超微形态特征,还有基于核糖体转录间隔区的分子系统学数据,以及基于 ITS2 转录 RNA 的二级结构分析,鉴定到我国拟菱形藻属的 2 个新记录种:镰刀拟菱形藻(*P. sabit* Teng, Lim, Lim & Leaw)和中鼓拟菱形藻(*P. inflatula* (Hasle) Hasle)。镰刀拟菱形藻的典型形态特征是壳面呈现镰刀状,点条纹由两排孔纹组成,与并基拟菱形藻(*P. decipiens*)的系统学关系最为接近,ITS2-RNA 有 2 个补偿碱基差异。中鼓拟菱形藻主要形态特征是壳面呈直线形,点条纹由单排孔纹组成,孔纹内部以上下两分区为主,与格氏拟菱形藻(*P. grani*)和亚弧线拟菱形藻(*P. subcurvata*)的亲缘关系接近,ITS2-RNA 二级结构分别有 4 个补偿碱基差异。另外,利用高效液相色谱-质谱联用法对培养藻株的产毒特征进行了分析,未检测到多莫酸。本文为我国拟菱形藻属的物种多样性做了必要的补充,还可为拟菱形藻的毒理研究提供基础数据。

关键词 镰刀拟菱形藻;中鼓拟菱形藻;物种多样性;形态;核糖体转录间隔区;ITS2-RNA 二级结构;多莫酸

中图分类号 Q949.2 doi: 10.11693/hyhz20161200288

拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia* Peragallo)是广泛分布于全球近岸水体的浮游硅藻类群,也是记忆缺失性贝毒(amnesic shellfish poisoning, ASP)——多莫酸(domonic acid, DA)的重要生物来源(Lelong *et al*, 2012; Trainer *et al*, 2012)。1987 年加拿大发生了一起由于拟菱形藻引起的人类中毒事件(Bates *et al*, 1989),引起了各国政府以及学者对其高度的关注。随后,欧洲、大洋洲等地方也陆续有产毒拟菱形藻的报道(Hallegraeff, 1994; Lundholm *et al*, 1994)。因此拟菱形藻受到广泛关注,并成为藻类学和环境毒理学研究热点之一(Lundholm *et al*, 2002, 2006; Lelong *et al*, 2012; Trainer *et al*, 2012)。

目前全球已报道 48 种拟菱形藻(Percopo *et al*, 2016; Teng *et al*, 2016),我国报道了 23 个物种(Lü *et al*, 2012; 徐国双等, 2015),但绝大部分物种的研究仅停留在单纯形态学水平,甚至有些种类仅报道于名录中,未见任何种源信息。此外,全球记录的 24 种产毒拟菱形藻中(Lelong *et al*, 2012; Trainer *et al*, 2012; Teng *et al*, 2016; Lundholm *et al*, 2017),有 15 个物种在我国也有分布(李扬等, 2010; Lü *et al*, 2012; 徐国双等, 2015),但尚未有产毒的报道(徐国双等, 2015)。然而近年我国海域海产品中陆续有 DA 的检出报道(宋琍琍等, 2008; 吉薇等 2011; 王恒等 2011),表明 DA 产毒物种在我国海域的真实存在。

* 国家自然科学基金资助项目, 31570205 号, 31370235 号; 广州市科技计划项目, 201607010370 号。黄春秀, 硕士研究生, E-mail: 3127166788@qq.com

通讯作者: 李 扬, 研究员, E-mail: liyang@scnu.edu.cn

收稿日期: 2016-12-24, 收修改稿日期: 2017-04-11

本文从我国东南海域建立拟菱形藻单克隆培养株系,结合形态学和分子分类学技术,开展物种识别的工作。报道了我国的2个新记录种:镰刀拟菱形藻(*P. sabit*)和中鼓拟菱形藻(*P. inflatula*)。同时利用高效液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)开展DA的检测工作。以期能够丰富我国拟菱形藻属的物种多样性,并为其毒理研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 单克隆藻株的建立

水平拖曳浮游生物网(筛绢孔径 10 μ m)进行采样,尽快将样品带回实验室。利用毛细管复洗法在倒置显微镜(Mshot MI-12)下分离目标藻细胞,经过多水洗和转移,以确保目标藻的纯化。最后转移至预先滴有L培养基的48孔细胞培养板中(Lundholm *et al.*, 2006),放置在光照强度约50—80 μ mol photons/(m²·s)、光周期12h:12h,温度(20 \pm 2) $^{\circ}$ C的条件下培养。待其存活并繁殖达到约100个藻细胞之后,转移到盛有L培养基的100mL锥形瓶中培养,以MC(Marine collection)序列进行编号,具体藻株信息详见表1。

表1 本文建立的目标藻株信息

Tab.1 List and information of the monoclonal strains in this study

株系	采样地点	采样时间
MC990	台湾海峡(22 $^{\circ}$ 79'N, 116 $^{\circ}$ 78'E)	2016.04
MC3013	台湾海峡(22 $^{\circ}$ 79'N, 116 $^{\circ}$ 78'E)	2016.04
MC3014	台湾海峡(22 $^{\circ}$ 79'N, 116 $^{\circ}$ 78'E)	2016.04
MC3039	台湾海峡(22 $^{\circ}$ 79'N, 116 $^{\circ}$ 78'E)	2016.04
MC3111	南海北部(19 $^{\circ}$ 13'N, 112 $^{\circ}$ 28'E)	2016.06
MC3086	南海北部(17 $^{\circ}$ 90'N, 111 $^{\circ}$ 23'E)	2016.06
MC3087	南海北部(17 $^{\circ}$ 90'N, 111 $^{\circ}$ 23'E)	2016.06

1.2 形态学观察

光学显微镜(light microscopy, LM)观察:取处于对数生长期的藻液0.1mL,滴在载玻片上,盖上玻片后,利用Olympus BX53进行微分干涉(differential interference contrast, DIC)的观察,并使用Olympus DP27数码相机拍照,在Olympus CellSens软件上获取图像信息。主要观察群体特征、细胞色素体形态等。

透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察:取对数生长期的藻液2mL,加入等量浓硫酸(>95%)以去除有机质,然后用蒸馏水多次水洗至中性(徐国双等, 2015)。用微量进样器吸取5—10 μ L

酸化后的水样,滴加在喷镀碳膜的铜网(100目)上,自然晾干后,即可在JEM-1010 TEM下观察和拍照。主要观察壳面超微结构,如点条纹、肋突、孔纹等。

1.3 分子系统学分析

离心法收集处于对数生长期的藻细胞,进行总DNA的提取(Lundholm *et al.*, 2002)。利用引物ITS1和ITS4进行核糖体转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)的扩增(Lim *et al.*, 2013),PCR产物送至上海立菲生物科技有限公司进行纯化和测序。从NCBI下载拟菱形藻种类的ITS nrDNA序列,使用BioEdit软件进行序列的比对和矩阵(Lim *et al.*, 2013)。基于MrModeltest 2.3的计算,选择最适模型和参数为GTR+I+G([AC=1.0449], [AG=3.4071], [AT=1.7247], [CG]=0.4855, [CT]=5.9824, [GT]=1.0000, gamma shape=0.5318, nucleotide frequencies: A=0.2099, C=0.2194, G=0.3136, T=0.2574)。用MrBayes 3.2(Ronquist *et al.*, 2012)构建贝叶斯推理树(Bayesian inference, BI),用RAxML-HPC2(Miller *et al.*, 2010)构建最大似然树(Maximum Likelihood, ML)。以奇异棍形藻*Bacillaria paxillifer*、新月细柱藻*Cylindrotheca closterium*和船斑菱形藻*Nitzschia navis-varingica*为群外对照(Teng *et al.* 2014)。

1.4 ITS2 二级结构的预测及CBCs(Compensatory base changes)分析

从GenBank下载镰刀拟菱形藻的ITSrDNA序列,参考序列标注,将其ITS2片段截下。使用Mfold(Percopo *et al.*, 2016)在线预测镰刀拟菱形藻ITS2的二级结构,所得二级结构含4个环和一个拟菱形藻属环。以镰刀拟菱形藻二级结构为同源模板,使用ITS2 Database(Percopo *et al.*, 2016)在线预测本文的5个镰刀拟菱形藻单克隆株系,与其亲缘关系最接近的并基拟菱形藻(*P. decipiens*)的RNA二级结构。中鼓拟菱形藻藻株的ITS2二级结构构建方法同上。最后使用VARNA(Lim *et al.*, 2013)观察并下载二级结构。同时使用4SALE v.1.7(Lim *et al.*, 2013)软件中自带的补偿碱基变化(CBCs)功能观察CBC差异,分析生殖隔离情况。

1.5 LC-MS/MS法检测藻毒素

取处于生长稳定期中后期的藻液300—600mL,藻细胞浓度约 5×10^5 ind./mL,经0.2 μ m醋酸纤维滤膜过滤,收集藻细胞立刻置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存;另外取5mL混匀的藻细胞加2mL鲁格-4 $^{\circ}$ C保存,用于单细胞产毒量的计算。将已收集的藻细胞加4mL甲醇

水(甲醇:水=1:1)充分混匀,用超声波细胞粉碎机冰浴破碎 5min,经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液于 -20°C 下保存备用。本实验样品皆寄往中国水产科学研究院黄海水产研究所上机检测。

采用 Prominence UFLC 超快速液相色谱(Shimadzu 公司)和 5500 QTRAP 四极杆-线性离子阱复合质谱检测系统(SCIEX 公司)对预处理的样品进行 DA 检测,参见 Wu 等(2014)方法进行分析。DA 标准品购自德国 Sigma 公司。

2 结果

结合形态学、分子系统学和 ITS2 二级结构特征,鉴定到我国沿海拟菱形藻两个新记录种:镰刀拟菱形藻 *P. sabit* Teng, Lim, Lim & Leaw (MC990、MC3013、MC3014、MC3039)和中鼓拟菱形藻 *P. inflatula* (Hasle) Hasle (MC3086、MC3087)。

2.1 形态学描述

镰刀拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia sabit* Teng, Lim, Lim & Leaw (图 1A—G)

细胞具有两个黄褐色的色素体,对称分布在横轴两侧,相邻两细胞间非对称分布,可形成非直线链状群体(图 1A),重叠部为壳面全长的 1/10—1/12。细胞壳面纵轴呈现镰刀状(图 1B, C),壳端钝圆(图 1C),两壳端形状相似。壳面长 28—47 μm ,宽 1.8—2.2 μm 。管壳缝强烈偏心,值得注意的是管壳缝位置有所不同,有的处于凸面(图 1B),有的处于凹面(图 1C)。具有中央较大船骨点(图 1E)。肋突分布在壳缘,排列不规则(图 1F),密度为 20—27 个/10 μm 。点条纹主要由两排孔纹组成,偶尔会出现单排孔纹(图 1E),密度为 41—48 条/10 μm 。孔纹为不规则的多边形,密度为 1 μm 内 11—14 个。本文只观察到第二和第三条环带(图 1G),第二条环带宽 1—2 个孔纹,高 1—2 个孔纹,

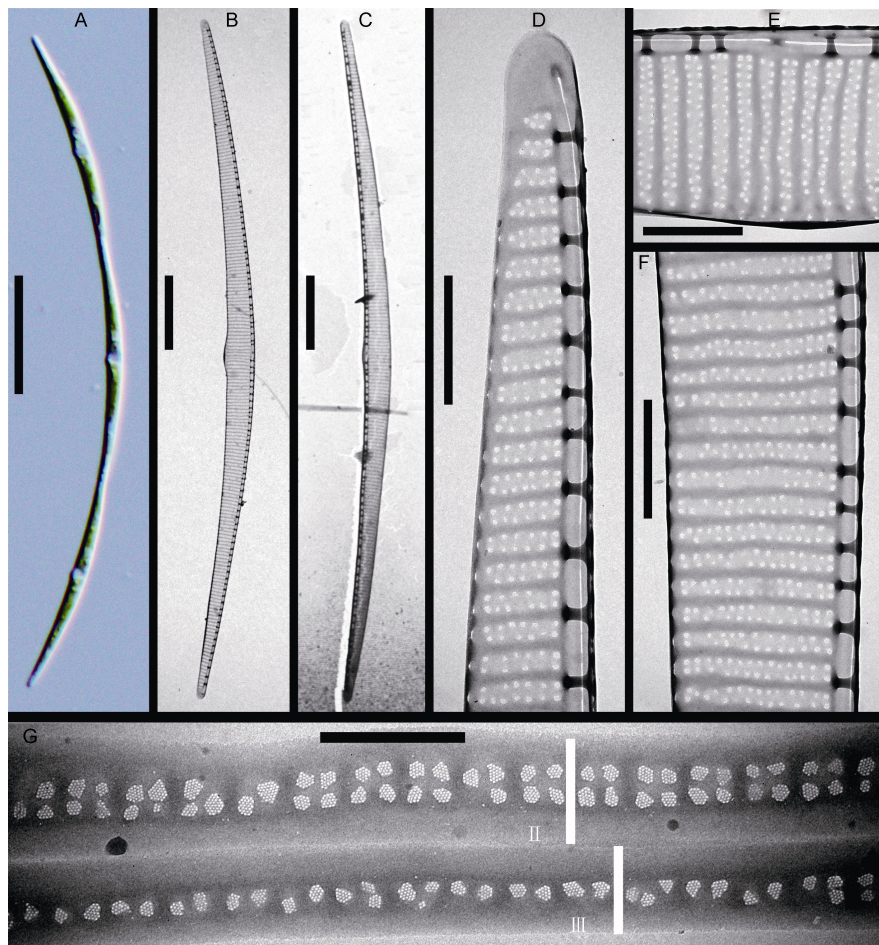


图 1 镰刀拟菱形藻

Fig.1 *Pseudo-nitzschia sabit*

注: A: 光镜照片, 示 3 个细胞的链状群体; B—G: 透射电镜照片; B—C: 壳面外形; D: 壳端; E: 壳面中部放大; F: 壳面局部放大; G: 环带(第二条环带, ; 第三条环带,)。标尺: 20 μm (A), 5 μm (B—C), 1 μm (D—F), 0.5 μm (G)

点条纹密度50—54个/10 μm , 孔纹内部由多边形的筛孔构成(图1G); 第三条环带具有一排纵向排列的孔纹(图1G)。

生态: 海水浮游生活。

分布: 标本采自台湾海峡(4月)和南海北部(6月)。本种曾报道于马来西亚和墨西哥(Teng *et al.*, 2015)。

中鼓拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia inflatula* (Hasle) Hasle(图2A—F)

细胞具有两个黄褐色的色素体, 对称分布在横轴两侧, 可形成链状群体(图2A), 重叠部为壳面全长的1/10—1/11。细胞壳面纵轴呈线形(图2B), 两壳端形状相似。壳面长67—74 μm , 宽1.0—1.3 μm 。管壳缝强烈偏心(图2D)。有中央较大船骨点(图2D)。肋

突分布在壳缘, 排列不规则(图2C, D), 密度为23—28个/10 μm 。点条纹由单排孔纹组成, 密度为46—50条/10 μm 。孔纹内部的筛板膜分成1—3个分区, 以上下2个分区为主, 每个分区为不规则的多边形, 孔纹密度1 μm 内6—9个。可观察到2条环带(图2E, F), 壳环带宽2个孔纹, 高3个孔纹, 点条纹密度59—63个/10 μm , 孔纹内部有裂缝, 分成不规则的多边形(图2E, F); 第二条环带宽2个孔纹, 高2个孔纹。

生态: 海水浮游生活。

分布: 标本采自南海北部(6月)。本种曾报道于丹麦海峡和亚南极的太平洋(Hasle 1997)、泰国(Priisholm *et al.*, 2002; Lundholm *et al.*, 2006; Quijano-Scheggia *et al.*, 2009)、墨西哥(Hernández-Becerril *et al.*, 2006)、马来西亚(Teng *et al.*, 2013)。

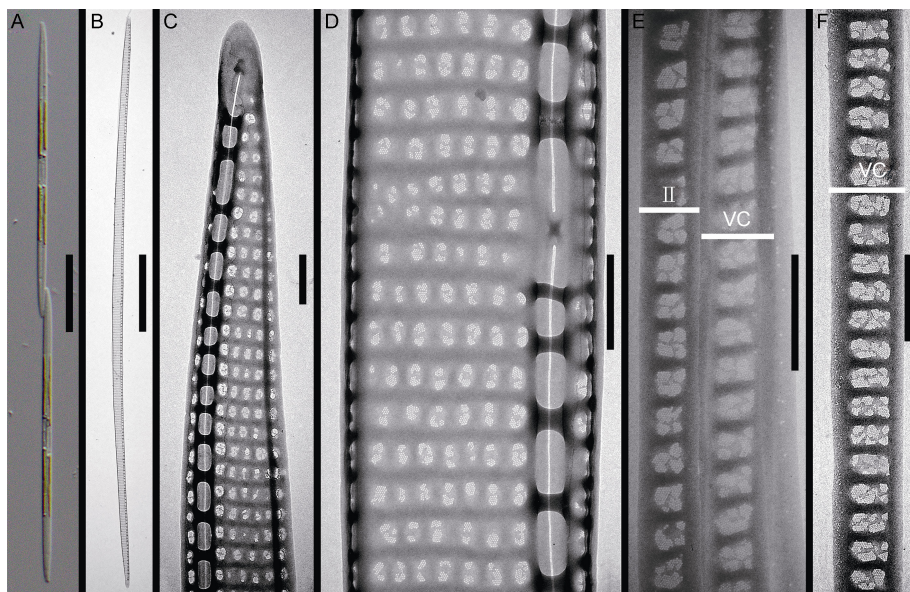


图2 中鼓拟菱形藻

Fig.2 *Pseudo-nitzschia inflatula*

注: A: 光镜照片, 示2个细胞的链状群体; B—F: 透射电镜照片; B: 壳面外形; C: 壳端; D: 壳面中部放大; E: 环带(壳环带, VC; 第二条环带,); F: 壳环带。标尺: 20 μm (A), 10 μm (B), 0.5 μm (C—F)

2.2 基于 ITS 序列分析的分子系统学分析

本文利用 RAxML 对 ITS1-5.8S-ITS2 序列的 939 个碱基进行了比对分析, 建立了分子系统发育树(图3)。MC990 与 MC3111、MC3013 与 MC3014 的基因完全相同, 后两个株系与前两个株系有 1 个碱基的差异, MC3039 与前四个株系的遗传差异最大, 有 5 个碱基的差异。MC990、MC3111 与马来西亚株系(PnPd96)基因完全相同, 与墨西哥株系(Ps147、Ps149、Ps283)有 1—2 个碱基的差异。本文建立的 5

个株系与已报道的 5 株镰刀拟菱形藻聚在同一个分支上, 且具有较高的置信值(BPP=0.84, ML=85), 这表明分子分类的结果也支持形态鉴定的结论。

以往对中鼓拟菱形藻的认知主要是形态特征, 分子数据较少, NCBI 上只有一个株系(no7)提供了分子序列信息。本文建立的 2 个单克隆株系(MC3086、MC3087)在形态学上与以往报道的中鼓拟菱形藻完全相符。MC3086 与 MC3087 基因完全相同, 与泰国株系(no7)有 6 个碱基的差异, 应该是不同地理株系

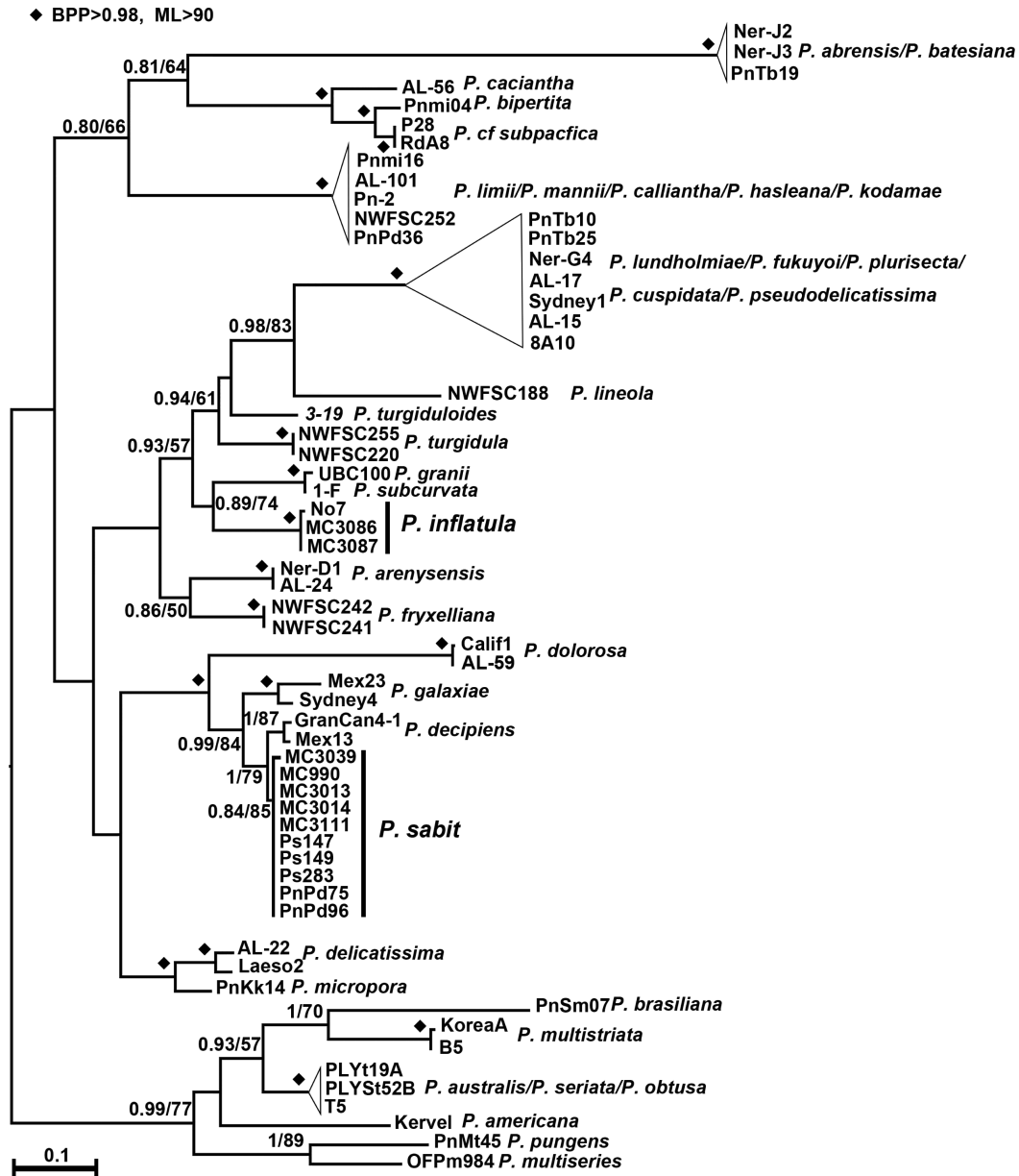


图 3 基于核糖体转录间隔区 ITS1-5.8S-ITS2 的分子系统树
Fig.3 Molecular phylogenetic tree inferred from ITS1-5.8S-ITS2 rDNA

之间的差异。这三个株系聚为一枝, 并且具有较高的置信值(BPP=1, ML=100), 也表明分子系统发育树的鉴定结果与形态学鉴定的结果相一致。

2.3 ITS2 二级结构分析

镰刀拟菱形藻和中鼓拟菱形藻的 ITS2 二级结构模型具有四个单环和一个拟环 IIa(图 4, 5), 与其他拟菱形藻种类的 ITS2 二级结构基本一致(Teng *et al.*, 2014; Percopo *et al.*, 2016)。镰刀拟菱形藻 ITS2-RNA 的标志性区间位于 helix III, 31-bp 信号区域: 5'-UUG UUA CUA GCU GUU CGA ACG AUU ACU AAA A-3'。本文 4 个镰刀拟菱形藻株系(MC990、MC3013、

MC3014、MC3111)与之前报道的马来西亚株系(PnPd96)和墨西哥株系(Ps147、Ps149、Ps283)具有完全一致的 ITS2 二级结构, 只有 MC3039 与前四个实验株系有 3 个 SNPs(单核苷酸多态性)的差异, 没有 CBC 和 hemi-CBC(HCBC)的差异, 这表明 ITS2 二级结构的结论亦支持形态学与分子分类的鉴定结果。将本文的镰刀拟菱形藻与系统发育树上亲缘关系最近的并基拟菱形藻相比较, 发现与并基拟菱形藻株系(GranCan4-1)在 helix 上有 2 个 CBCs 和 3 个 HCBCs 的差异。

本文的 2 个中鼓拟菱形藻株系(MC3086、MC3087)

具有完全相同的二级结构, 与泰国株系(no7)在 helix 上有一个 SNP 差异, 没有 CBC 和 HCBC 的差异, 这表明 ITS2 二级结构的结论也支持形态学与分子分类学的鉴定结果。中鼓拟菱形藻 ITS2-RNA 的标志性区间位于 helix , 33-bp 信号区域: 5'-UUG UUG GUA GCC UGU UUG CGA UCA CAA CAA GUC-3'。

在 4SALE 软件中将本研究的中鼓拟菱形藻株系与分子系统树中亲缘关系较接近的格氏拟菱形藻 (*P. granii*) 株系 (UBC100) 和亚弧线拟菱形藻 (*P. subcurvata*) 株系 (1-F) 相比较, 发现与后两者均存在 4 个 CBCs 的差异, 存在生殖隔离, 应该分别隶属于不同物种。

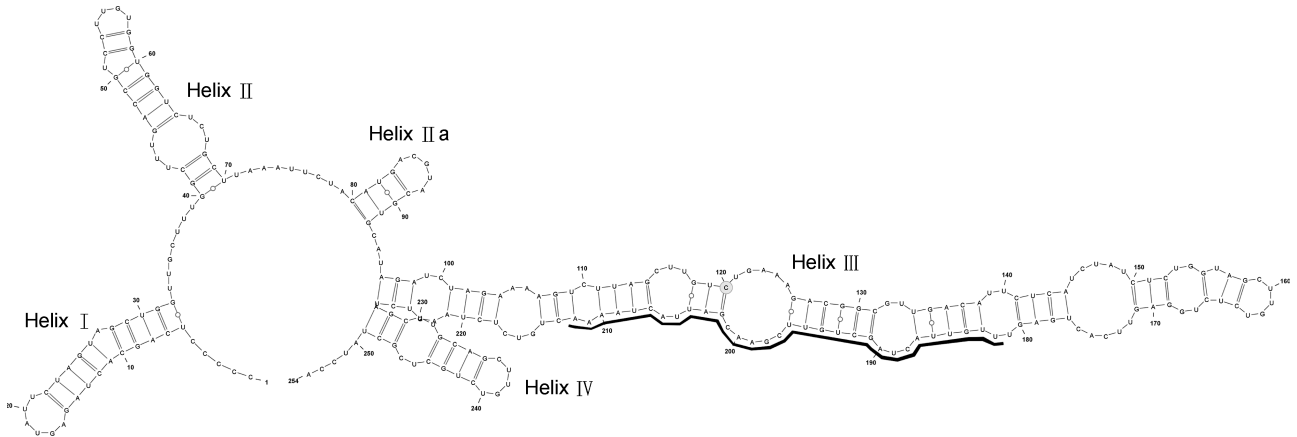


图 4 镰刀拟菱形藻 ITS2 二级结构图

Fig.4 The secondary structure of ITS2-RNA in *Pseudo-nitzschia sabit* strain MC990

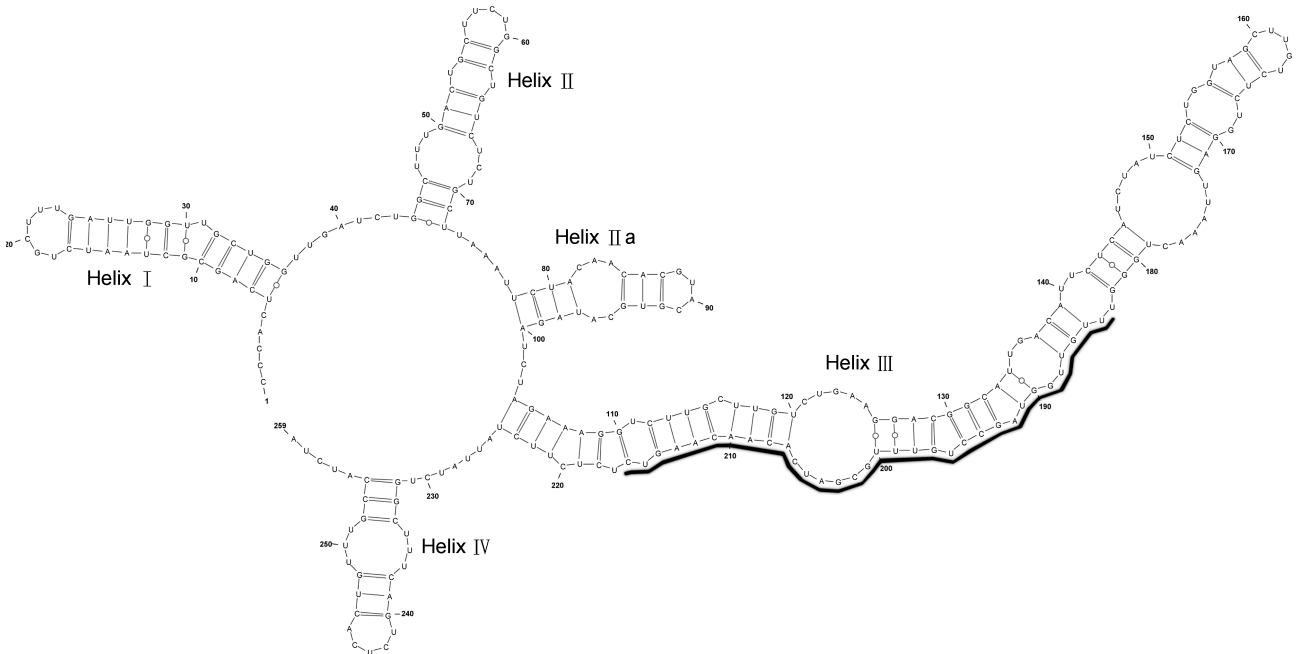


图 5 中鼓拟菱形藻 ITS2 二级结构图

Fig.5 The secondary structure of ITS2-RNA in *Pseudo-nitzschia inflatula* strain MC3087

2.4 DA 产毒特征的 LC-MS 检测

以 DA 标准品浓度($\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 建立 DA 的 LC-MS 检测标准曲线, DA 浓度为 50—500 $\mu\text{g/L}$ 时, 其峰面积与质量浓度有良好的线

性关系 ($R^2=0.99934$), 回归方程为: $y=164.64875x-3947.22457$ 。本方法的检测下限为 50ng/mL。DA 的出峰保留时间为 0.77min。对常规培养的镰刀拟菱形藻和中鼓拟菱形藻进行 LC-MS 检测, 结果在预定的

保留时间内都未出现样品峰。表明藻株在本检测限内未检测到 DA 的存在。

3 讨论

3.1 相似种的比较研究

3.1.1 镰刀拟菱形藻与相似种的比较研究 镰刀拟菱形藻最典型的形态特征是壳面呈现独特的镰刀状, 该种类的壳面宽度小于 $3\mu\text{m}$, 点条纹由两排孔纹组成, 而且点条纹密度大于 40 条/ $10\mu\text{m}$, 属于 Clade : 柔弱拟菱形藻类群(Teng *et al.*, 2015)。分子系统学的研究已经证实, 拟菱形藻属内的多个复合群, 都是基于相似形态学特征而建立的种类集群, 并不能反映各个种类之间的系统学关系(Lundholm *et al.*, 2006; Quijano-Scheggia *et al.*, 2009; Teng *et al.*, 2015, 2016)。本研究的镰刀拟菱形藻点条纹密度(41 — 48 条/ $10\mu\text{m}$)略高于以往报道(38 — 45 条/ $10\mu\text{m}$)(Teng *et al.*, 2015), 明显高于柔弱拟菱形藻类群中的阿雷拟菱形藻(34 — 43 条/ $10\mu\text{m}$)(Quijano-Scheggia *et al.*, 2009)、柔弱拟菱形藻(34 — 40 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2006)、疑难拟菱形藻(30 — 36 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2006)和 *P. lineola* (Cleve) Hasle(22 — 31 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2012)。镰刀拟菱形藻与微孔拟菱形藻和多纹拟菱形藻都具有两排孔纹, 孔纹形状也相似, 但前者具有中央船骨点, 而后两种没有(Teng *et al.*, 2015)。镰刀拟菱形藻与亚弧线拟菱形藻具有相似的壳面(镰刀状 VS 一壳面边缘有凸起)及宽度(1.8 — $2.2\mu\text{m}$ VS 1.3 — $2.5\mu\text{m}$)(Hasle *et al.*, 1997; Almandoz *et al.*, 2008), 两者在光镜下易混淆, 但是前者为长链状群体生活, 而后者以单个细胞生活为主(Hasle *et al.*, 1997; Almandoz *et al.*, 2008), 此外在电镜下还是比较容易区分的, 如肋突密度前者(20 — 27 个/ $10\mu\text{m}$)明显高于后者(12 — 22 个/ $10\mu\text{m}$)(Almandoz *et al.*, 2008)。

在拟菱形藻分类学中, 环带特征(环带数目、点条纹密度、环带上孔纹形状)可以作为区分不同种类或变种的重要指标(Lundholm *et al.*, 2003, 2006, 2012; Amato *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2013), 例如依据环带上孔纹形状而划分的尖刺拟菱形藻的三个变种: 尖刺拟菱形藻原变种、尖刺拟菱形藻阿维罗变种和尖刺拟菱形藻环带变种(Casteleyn *et al.*, 2008)。镰刀拟菱形藻的环带特征也有其独特之处, 绝大多数拟菱形藻具有 3 条环带, 而镰刀拟菱形藻有 4 条环带(Teng *et al.*, 2015)。镰刀拟菱形藻壳环带上点条纹的数目(49 — 58 条/ $10\mu\text{m}$)(Teng *et al.*, 2015)明显高于柔弱拟菱形藻复

合群中的阿雷拟菱形藻(40 — 50 条/ $10\mu\text{m}$)(Quijano-Scheggia *et al.*, 2009)、柔弱拟菱形藻(43 — 48 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2006)和疑难拟菱形藻(40 — 44 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2006), 略高于其形态与遗传最接近的并基拟菱形藻(48 — 55 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2006)。

镰刀拟菱形藻的遗传相似种类主要有两个: 并基拟菱形藻和银河拟菱形藻。镰刀拟菱形藻与并基拟菱形藻的亲缘关系最为接近, 但两者形态上存在明显差异, 最大的区别在于前者的壳面呈独特的镰刀状(Teng *et al.*, 2015)。镰刀拟菱形藻与银河拟菱形藻在形态学上最明显的区别是: 前者的点条纹由两排孔纹构成, 而后者点条纹中未见明显的孔纹(徐国双等, 2015)。

3.1.2 中鼓拟菱形藻与相似种的比较研究 有报道认为中鼓拟菱形藻的主要形态特征是点条纹由单排孔纹组成, 壳面中部略鼓起, 接近壳端也出现局部膨胀(Priisholm *et al.*, 2002; Hernández-Becerril *et al.*, 2006)。但是本文的中鼓拟菱形藻接近线形, 壳面中央略有膨胀, 或有时不明显; 而且壳端未见局部膨胀。因此本文认为这两个特征对于中鼓拟菱形藻是不稳定的。该种类在透射电镜下比较容易区分, 因此以往对中鼓拟菱形藻的鉴定主要是进行形态学的观察(Hasle, 1997; Priisholm *et al.*, 2002; Hernández-Becerril *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2013), 现有的分子数据较少。本文鉴定的中鼓拟菱形藻与以往报道的泰国株系(Priisholm *et al.*, 2002)在形态学上更为接近, 但也存在一些差异。如泰国株系(1.3 — $1.8\mu\text{m}$)宽度明显大于本文株系(1.0 — $1.3\mu\text{m}$)。在点条纹密度上, 本文株系(46 — 50 条/ $10\mu\text{m}$)稍高于泰国株系(38 — 46 条/ $10\mu\text{m}$), 而在壳环带点条纹密度上, 本文株系(59 — $63\mu\text{m}$)也明显高于泰国株系(46 — 52 条/ $10\mu\text{m}$)。在 ITS 序列系统树中, 本文株系与泰国株系聚在同一个分枝, 而且具有较高置信值。同时鉴于 ITS2-RNA 二级结构的分析结论, 我们认为上述形态差异应该是地理分布差异引起的。中鼓拟菱形藻属于伪柔弱拟菱形藻复合群中的一员, 其中与其形态最为相似的是伪柔弱拟菱形藻(*P. pseudodelicatissima*)和尖细拟菱形藻 (*P. cuspidate*)。本文中鼓拟菱形藻的点条纹密度和壳环带上点条纹密度明显高于伪柔弱拟菱形藻(36 — 43 条/ $10\mu\text{m}$; 48 — 55 条/ $10\mu\text{m}$)和尖细拟菱形藻(35 — 44 条/ $10\mu\text{m}$; 47 — 53 条/ $10\mu\text{m}$)(Lundholm *et al.*, 2003)。在孔纹内部筛板膜的分区上, 中鼓拟菱形藻具有 1 — 3 个,

以上下不规则的2个分区为主,而后两者孔纹则分成较均匀的2个分区。

在分子系统学中,由于中鼓拟菱形藻与拟菱形藻属中其他物种的亲缘关系较远,在以往研究中多被作为外类群(Lundholm *et al.*, 2006)。但中鼓拟菱形藻与格氏拟菱形藻、亚弧线拟菱形藻的亲缘关系相对较近,然而前者与后两者在形态学上却存在明显区别。虽然三者细胞壳面都是中部膨大,但是中鼓拟菱形藻壳面中部膨胀的特征不是很明显,而后两者较明显。在孔纹形状上前者孔纹主要分成2部分,而后两者孔纹分成4—6部分(Almandoz *et al.*, 2008)。此外在肋突密度和点条纹密度上也存在些许差别。值得注意的是,本研究对格氏拟菱形藻(UBC100)和亚弧线拟菱形藻(图1F)的ITS序列进行比对,发现两者只有7个碱基差异,构建的系统发育树中它们也聚在一起,而且具有较高置信值(图3)。甚至它们的ITS2-RNA二级结构不存在CBC或HCBC的差异。Hasle *et al.*在1997年对这两个种类进行了描述,主要依据两者壳面特征进行区分,认为亚弧线拟菱形藻的一边壳缘凸起,另一边壳缘是直线或稍微出现凹面,而格氏拟菱形藻细胞壳面中部膨大,两边壳缘都凸起。此外,它们在宽度、肋突密度、点条纹密度上也完全一样。格氏拟菱形藻和亚弧线拟菱形藻之间更为清晰的种类界限,需要后续研究加以澄清。

3.2 拟菱形藻属DA产毒特征分析

Teng等(2015)首次报道了镰刀拟菱形藻,样品采自马来西亚和墨西哥,但未检测到DA的存在。而中鼓拟菱形藻最早报道于丹麦海峡和亚南极的太平洋,至今未有产生DA的直接报道。本文从我国东南海域分离并建立了4株镰刀拟菱形藻和2株中鼓拟菱形藻培养株系,利用LC-MS技术对其产毒特征进行检测,也没有检测到DA的存在。截至目前,全球已报道能够产生DA的拟菱形藻种类达到24种(Lelong *et al.*, 2012; Lundholm, 2017; Teng *et al.*, 2016),其中15种在我国也有分布(徐国双等, 2015),但是目前尚未有我国拟菱形藻产毒的直接报道。近年来我国沿海的部分水产品中却已有DA的检出报道(宋琍琍等, 2008; 吉薇等, 2011; 王恒等, 2011),并且采集的浮游植物网样品中亦有检出(深圳大鹏澳, 2016年8月,浓缩网样中DA的含量9.56—13.28mg/L, 黄春秀等,未发表数据),但本数据由于拖网滤过的实际海水体积无法计算,因此只能用于定性,而不能定量分析。因此上述DA的生物来源是什么?有待后续研究的持续

深入。

拟菱形藻的产毒能力是一个比较复杂的情况,国内外学者对影响拟菱形藻产毒的因素进行了分析(Lelong *et al.*, 2012),如硅和磷限制可以促进DA的产生,低浓度的铁和高浓度的铜也能激发DA的产生;有机氮源、pH、二氧化碳、盐度、细菌浓度等的变化都能影响拟菱形藻属产DA(Lelong *et al.*, 2012)。

4 结论

(1) 结合形态学与分子生物学数据,发现并鉴定了我国拟菱形藻属的两个新记录种,分别是镰刀拟菱形藻*P. sabit*和中鼓拟菱形藻*P. inflatula*,丰富了我国拟菱形藻属的物种多样性。

(2) 对所建立的7个拟菱形藻株系进行了DA检测,未检测到DA的存在。

参 考 文 献

- 王 恒, 2011. 舟山海域贝类海产品中软骨藻酸含量调查. 中国卫生检验杂志, 21(12): 2986—2988, 2992
- 吉 薇, 郑洁莹, 曾雪萍等, 2011. 南海海域软骨藻酸(DA)贝类毒素的HPLC方法检测. 现代食品科技, 27(1): 120—122, 116
- 李 扬, 何利娜, 马艳艳等, 2010. 伪柔弱拟菱形藻复合群的形态分类学研究. 水生生物学报, 34(2): 302—311
- 宋琍琍, 张海琪, 侯镜德等, 2008. 液相色谱-串联质谱法测定贝类毒素软骨藻酸的残留. 水产学报, 32(6): 950—956
- 徐国双, 李 扬, 2015. 我国沿海拟菱形藻属的2新记录种及其产毒特征分析. 热带亚热带植物学报, 23(6): 614—624
- Almandoz G O, Ferreyra G A, Schloss I R *et al.*, 2008. Distribution and ecology of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in surface waters of the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biology*, 31(4): 429—442
- Amato A, Montresor M, 2008. Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycologia*, 47(5): 487—497
- Bates S S, Bird C J, de Freitas A S W *et al.*, 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(7): 1203—1215
- Casteleyn G, Chepurnov V A, Leliaert F *et al.*, 2008. *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): A cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae*, 7(2): 241—257
- Hallegraeff G M, 1994. Species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Australian waters. *Botanica Marina*, 37(5): 397—411
- Hasle G R, Syvertsen E E, 1997. Marine diatoms. In: Tomas C R ed. *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego: Academic Press, 5—385
- Hernández-Becerril D U, Díaz-Almeyda E M, 2006. The

- Nitzschia bicapitata* group, new records of the genus *Nitzschia*, and further studies on species of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from Mexican Pacific coasts. *Nova Hedwigia*, Beiheft, 130: 293—306
- Lelong A, Hégaret H, Soudant P *et al*, 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 51(2): 168—216
- Lim H C, Teng S T, Leaw C P *et al*, 2013. Three novel species in the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex: *P. batesiana* sp. nov., *P. lundholmiae* sp. nov., and *P. fukuyoi* sp. nov. (Bacillariophyceae) from the Strait of Malacca, Malaysia. *Journal of Phycology*, 49(5): 902—916
- Lü S H, Li Y, Lundholm N *et al*, 2012. Diversity, taxonomy and biogeographical distribution of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Guangdong coastal waters, South China Sea. *Nova Hedwigia*, 95(1—2): 123—152
- Lundholm N, 2017. IOC-UNESCO taxonomic reference list of harmful micro algae. <http://www.marinespecies.org/hab>
- Lundholm N, Bates S S, Baugh K A *et al*, 2012. Cryptic and pseudo-cryptic diversity in diatoms—with descriptions of *pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *p. fryxelliana* sp. nov. *Journal of Phycology*, 48(2): 436—454
- Lundholm N, Daugbjerg N, Moestrup Ø, 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology*, 37(1): 115—134
- Lundholm N, Moestrup Ø, Hasle G R *et al*, 2003. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/ cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology*, 39(4): 797—813
- Lundholm N, Moestrup Ø, Kotaki Y *et al*, 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 42(2): 464—481
- Lundholm N, Skov J, Pocklington R *et al*, 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia*, 33(6): 475—478
- Miller M A, Pfeiffer W, Schwart T, 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans, LA, USA: IEEE, 1—8, doi: 10.1109/gce.2010.5676129
- Percopo I, Ruggiero M V, Balzano S *et al*, 2016. *Pseudo-nitzschia arctica* sp. nov., a new cold-water cryptic *Pseudo-nitzschia* species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Journal of Phycology*, 52(2): 184—199
- Priisholm K, Moestrup Ø, Lundholm N, 2002. Taxonomic notes on the marine diatom genus *Pseudo-nitzschia* in the Andaman Sea near the island of Phuket, Thailand, with a description of *Pseudo-nitzschia micropora* sp. nov. *Diatom Research*, 17(1): 153—175
- Quijano-Scheggia S I, Garcés E, Lundholm N *et al*, 2009. Morphology, physiology, molecular phylogeny and sexual compatibility of the cryptic *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyta), including the description of *P. arenysensis* sp. nov. *Phycologia*, 48(6): 492—509
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P *et al*, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539—542
- Teng S T, Leaw C P, Lim H C *et al*, 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Malaysia, including new records and a key to species inferred from morphology-based phylogeny. *Botanica Marina*, 56(4): 375—398
- Teng S T, Lim H C, Lim P T *et al*, 2014. *Pseudo-nitzschia kodamae* sp. nov. (Bacillariophyceae), a toxigenic species from the Strait of Malacca, Malaysia. *Harmful Algae*, 34: 17—28
- Teng S T, Lim P T, Lim H C *et al*, 2015. A non-toxicogenic but morphologically and phylogenetically distinct new species of *Pseudo-nitzschia*, *P. sabit* sp. nov. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 51(4): 706—725
- Teng S T, Tan S N, Lim H C *et al*, 2016. High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 52(6): 973—989, doi: 10.1111/jpy.12448
- Trainer V L, Bates S S, Lundholm N *et al*, 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14: 271—300
- Wu H Y, Guo M M, Tan Z J *et al*, 2014. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks. *Journal of Chromatography A*, 1358: 172—180

TWO NEW RECORDS OF DIATOM GENUS *PSEUDO-NITZSCHIA* AND THEIR DOMOIC ACID PRODUCTION IN SOUTHEASTERN CHINA COASTAL WATERS

HUANG Chun-Xiu, DONG Huan-Chang, LI Yang

(Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring, Guangdong Provincial Key Laboratory of Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract A set of monoclonal strains was isolated and established from the southeastern China coastal waters. These strains were identified carefully using morphology in light microscopy and transmission electron microscopy. Their molecular data from internal transcribed spacer region of ribosomal rRNA encoding gene were characterized, and compared with the secondary structure of ITS2 RNA transcripts. Two new recorded species were found for China, *P. sabit* Teng, Lim, Lim & Leaw and *P. inflatula* (Hasle) Hasle. Their morphology were compared with both morphology-similar and molecule-close taxa, and the unique molecular feature for the secondary structure of ITS2-RNA was analyzed. Meanwhile, the production of domoic acid was examined in liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) injection. However, it showed no detectable domoic acid. The new records enrich the diversity of the genus *Pseudo-nitzschia* in China, and may provide detail information of domoic acid production in *Pseudo-nitzschia* strains.

Key words *Pseudo-nitzschia sabit*; *Pseudo-nitzschia inflatula*; diversity; morphology; internal transcribed spacer; ITS2-RNA secondary structure; domoic acid