

慢原甲藻——南海热带附生甲藻新记录

梁计林^{1,2}, 何伟宏¹, 龙超¹, 曾玲¹, 龙丽娟^{1*}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广州 510301; 2. 海南省海洋监测预报中心, 海口 570206)

摘要: 从海南陵水新村港分离出 1 株附生原甲藻, 在光学显微镜和扫描电子显微镜下进行形态学特征分析, 并结合核糖体 18S rRNA 基因序列分析, 鉴定为慢原甲藻(*Prorocentrum rhathymum*), 为国内首次报道。国内曾将该种与墨西哥原甲藻(*Prorocentrum mexicanum*)归为同种异名。

关键词: 甲藻; 慢原甲藻; 墨西哥原甲藻; 南中国海

中图分类号: Q949.24

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)01-0040-05

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.005

Prorocentrum rhathymum —— A New Record of Epiphytic Dinoflagellates in South China Sea

LIANG Ji-lin^{1,2}, HE Wei-hong¹, LONG Chao¹, ZENG Ling¹, LONG Li-juan^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resources Sustainable Utilization, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Ocean Monitoring and Forecasting Center of Hainan Province, Haikou 570206, China)

Abstract: The morphological characteristics of an epiphytic dinoflagellates isolated from Xincun Harbor waters, Hainan Province was observed under light microscope and scanning electron microscope, and its 18S rRNA sequence was analysed. The strain was identified as *Prorocentrum rhathymum*, a new record from China, which was once reported as *Prorocentrum mexicanum* in South China Sea for synonymy.

Key words: Dinoflagellate; *Prorocentrum rhathymum*; *Prorocentrum mexicanum*; South China Sea

墨西哥原甲藻 (*Prorocentrum mexicanum* Osorio-Tafall) 和慢原甲藻 (*P. rhathymum* Loeblich III, Sherley & Schmidt) 分别于 1942 年和 1979 年由 Osorio-Tafall 和 Loeblich 等报道, 为两种甲藻^[1-2]。由于形态上相似, 这两个种很容易混淆或者被认为是同种异名。2003 年 Cortés-Altamirano 等对这两个种进行了形态学区分并重新定义^[3]。我国的大亚湾和三亚海域曾有过墨西哥原甲藻的报道, 并把这两种视为同种异名^[4-6]。我们在甲藻资源调查中观察到慢原甲藻疑似种, 用光学显微镜 (Light Microscope, LM) 和扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 进行形态学鉴定分析, 并结合核糖体 18S rRNA 基因序列进行测序和比对, 为进一步明确其分类地位提供参考。

1 材料和方法

1.1 采样和藻种分离培养

样品分离自海南省陵水县新村港海域的海草海菖蒲 (*Enhalus acoroides*), 用海水冲洗海菖蒲表面使附着物分离。冲洗下来的海水带回实验室加入改良的 K 培养液, 使终浓度为 1/4K, 在光暗比为 13:11、光照强度 $67.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、25℃ 恒温下适应培养 2 d。于 Nikon Ts100 型倒置显微镜下, 用毛细管分离法进行单细胞分离, 用 K 培养液在相同条件下培养得到微藻纯系。藻种保存于中国科学院南海海洋研究所。

1.2 制备和观察照相

取 20 mL 藻液用 4% 甲醛固定 24 h, 在 800 × g

收稿日期: 2010-04-04

接受日期: 2010-07-27

基金项目: 中国科学院重要方向性项目 (KSCX2-YW-R-093); 海洋公益性行业科研专项经费项目 (200705026) 资助

作者简介: 梁计林 (1981 ~), 男, 壮族, 广西柳州人, 博士, 主要从事海洋微藻资源与利用研究, email: jinn77@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: longlj@scsio.ac.cn

下离心 5 min, 弃上清液; 沉淀加入 20 mL 超纯水, 振荡后再离心, 弃上清液; 沉淀小心加入 2 mL 1% 锇酸固定 4~6 h; 加超纯水振荡, 离心, 重复 3 次以清除锇酸; 离心后的藻泥依次用 30%、50%、70%、90%、95%、95% 乙醇浸泡 15 min 进行脱水处理。保持润湿状态加入适量乙酸异戊酯置换乙醇, 然后进行临界点干燥, 干燥后小心把藻粉散到金属平台进行喷金, 进行电镜观察。

Nikon E600 型显微镜、日立 S-3400 扫描电镜进行显微观察与照相。

1.3 总 DNA 的提取及核糖体 18S rRNA 基因扩增

离心收集 50 mL 指数期的藻细胞, 用 Qiagen DNeasy Plant Kit 试剂盒提取总 DNA。18S 小亚基序列用 18ScomF1 和 18ScomR1 引物进行扩增, PCR 反应程序为: 94℃ 3 min, 94℃ 20 s, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s 循环 30 次, 72℃ 7 min, 15℃ 保持。PCR 产物送广州拓谱基因技术有限公司进行测序。

2 结果和分析

2.1 形态与特征

培养细胞黄褐色, 具鞭毛, 有活动能力, 可分泌黏液, 密度高时在水体中形成网状或云雾状群体。

光镜下, 细胞呈卵形, 长 30~35 μm, 宽 20~25 μm, 黄褐色, 藻体前端凹陷, 有鞭毛伸出, 细胞内有许多蛋白核和 1 个明显的细胞核(图 1)。电镜

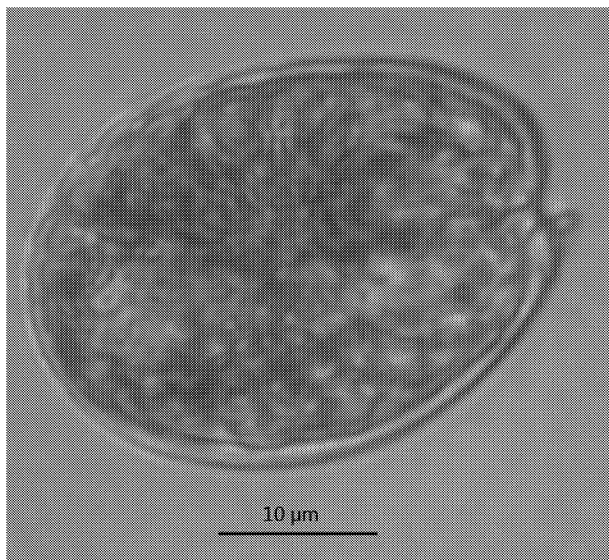


图 1 光学显微镜下的 *P. rathymum*

Fig. 1 *P. rathymum* under LM

下, 藻体由左右两壳板组成, 壳面光滑, 壳面中央有数量可数的刺丝胞孔而无拟孔, 刺丝胞孔自中央向边缘呈射线状延伸。左右两壳板前端均略为凹陷, 凹陷处上方有 1 块由背脊延伸出的舌形齿板, 右壳板前端凹陷处围绕着呈反 Z 字形的 6~7 个刺丝胞孔(图 2)。

通过与 Loeblich、Cortés-Altamirano 和 Faust 等^[2-3,7]的描述对比, 我们可以确定此种为 *P. rathymum*, 而不是 *P. mexicanum*。Loeblich^[2]描述其形态特征为: “两块壳板上有着数量相近(约 80 个)的刺丝胞孔, 在靠近藻体后端的部位, 这些孔排列在垂直于边缘的浅沟中……”。这些描述都与我们的观察的形态特征相符合(图 2)。*P. mexicanum* 新种报道于 1942 年, 而 Faust^[7]于 1990 年描述为: “依照 Steidinger、Carlson、Loeblich 等的方式使用名称 *P. mexicanum* 作为 *P. rathymum* 的同义词来使用……年轻的细胞表面光滑, 老的细胞有皱褶。两块壳板上都有功能未知的更小的孔”。引文的第一句表明, Faust 并没有可以证明此两种为同种异名的事实依据, 而 Loeblich 也从未声称过两者是同种异名; 第二句则表明两种间确实存在形态上的相似; 而最后一句正是区分两者的关键之一, *P. rathymum* 除刺丝胞孔外是没有小孔的, 而 *P. mexicanum* 则有更小的孔。可见 Faust 把 *P. mexicanum* 等同为 *P. rathymum* 是错误的, 这点由 Cortés-Altamirano 进行了详细的讨论^[3]。

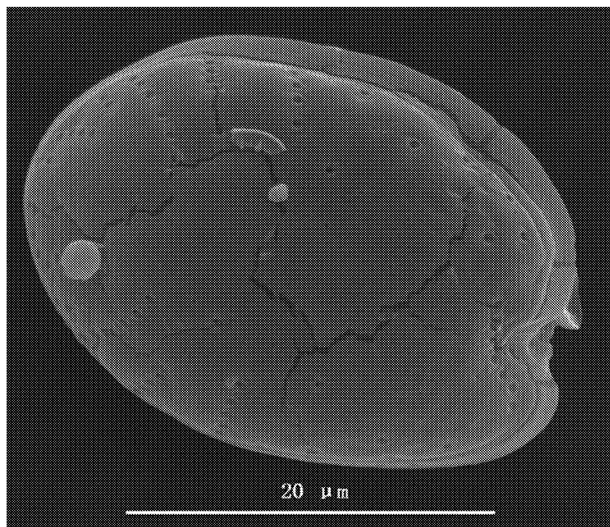


图 2 扫描电镜下的 *P. rathymum*

Fig. 2 *P. rathymum* under SEM

2.2 核糖体 18S rRNA 序列分析

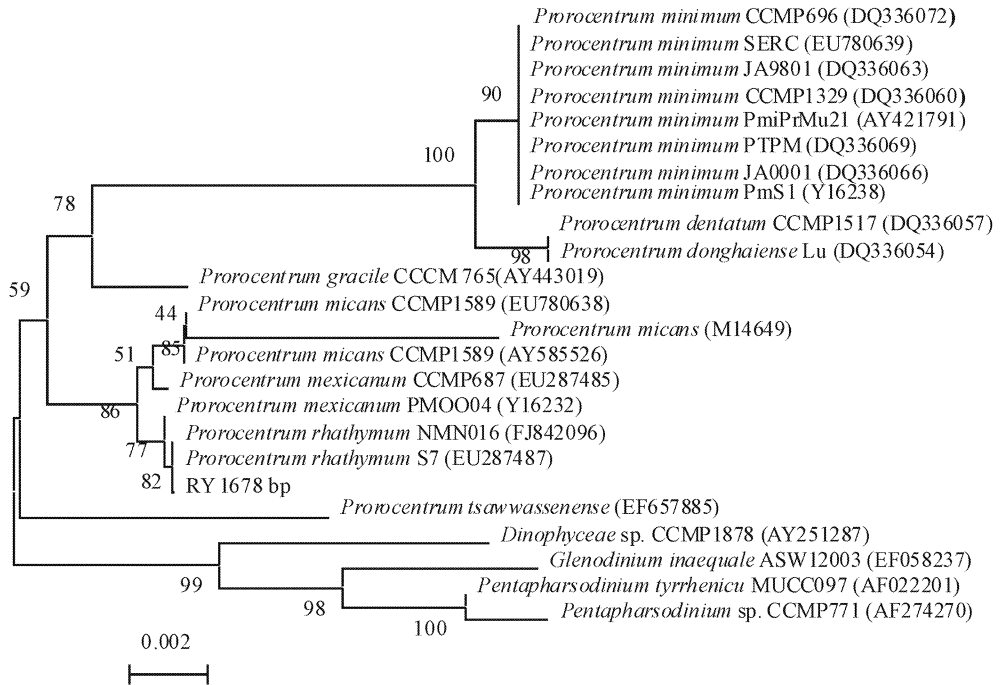
对此疑似种的核糖体 18S rRNA 基因进行测序,其序列暂编号为 RY。并利用 NCBI 数据库的核酸 BLAST 功能进行了序列相似性搜索。结果显示与南海采集到藻种株 RY 相似的前 20 位均为原甲藻属藻株,其中相似性最高、亲缘关系最近的为 *P. rhathymum* 的 2 个藻株,其后才是 *P. mexicanum* 和 *P. micans* (表 1)。可以看出,它们的相似度比较高,

分值前 10 位中有 3 条 *P. mexicanum* 18S rRNA 基因序列,1 条仅提交序列(登录号 EF492510),无文献可查;1 条序列登录号为 EU287485, Murray 等^[8]同时报道了 *P. mexicanum* 和 *P. rhathymum*,证明了它们是不同的种;另 1 条为 1998 年提交的序列(登录号 Y16232),因为是在 2003 年 Cortés-Altamirano^[9]的研究结果发表之前,我们有理由认为此研究也未能清楚区分 *P. mexicanum* 和 *P. rhathymum*。

表 1 NCBI 数据库的 BLAST 比对结果(前 20 条)

Table 1 NCBI BLAST results (top 20 sequences)

序号 Accession	描述 Description	最大分值 Max. score	总分 Total score	覆盖率(%) Query coverage	E	最大相似度 Max. ident (%)
EU287487.1	Prorocentrum rhathymum strain S7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3075	3075	99	0	99
FJ842096.1	Prorocentrum rhathymum strain NMN016 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3073	3073	98	0	99
Y16232.1	Prorocentrum mexicanum 18S rRNA gene	3066	3066	99	0	99
EU780638.2	Prorocentrum micans isolate CCMP1589 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3059	3059	99	0	99
EU287485.1	Prorocentrum mexicanum strain CCMP687 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3059	3059	99	0	99
EF492511.1	Prorocentrum micans isolate UTEX1003 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3059	3059	99	0	99
EF492510.1	Prorocentrum mexicanum isolate USDA 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3059	3059	99	0	99
AY585526.2	Prorocentrum micans strain CCMP1589 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3059	3059	99	0	99
AY803739.1	Prorocentrum micans isolate 1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3059	3059	99	0	99
DQ004735.1	Prorocentrum micans clone PmicC small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3053	3053	99	0	99
AJ415519.1	Prorocentrum micans 18S rRNA gene	3051	3051	99	0	99
AY833514.1	Prorocentrum micans small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3044	3044	98	0	99
AB183673.1	Prorocentrum triestinum gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: MBIC11147	3013	3013	99	0	99
DQ004734.1	Prorocentrum triestinum clone PtriC small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3013	3013	99	0	99
EF492512.1	Prorocentrum triestinum isolate UTEX1657 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3007	3007	99	0	98
AY443019.1	Prorocentrum gracile small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	3007	3007	99	0	98
EF657885.1	Prorocentrum tsawwassenense 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2964	2964	99	0	98
M14649.1	<i>P. micans</i> 17S, 5.8S, and 24S (5' end) ribosomal RNA genes	2961	2961	99	0	98
FJ587221.1	Prorocentrum minimum strain CCMP696 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	2935	2935	99	0	98

图 3 *Prorocentrum* 系统进化树(NJ Tree)Fig. 3 Phylogeny tree of *Prorocentrum* strains

另外,通过调取相似性搜索中有效发表的 18S rRNA 基因序列,应用 Mega4.0 构建与该种最相似物种的系统进化树(NJ 树)(图 3),从构建的系统树上可以看出该种与 *P. rhathymum* 的两个有效序列 EU287487 和 FJ842096 聚在同一分支,而 *P. mexicanum* Y16232 形成单独分支,显示从南海分离到的藻种 RY 与 *P. rhathymum* 具有最近的亲缘关系,应为同一物种。

3 讨论

P. rhathymum 和 *P. mexicanum* 在个体大小、长宽比、外形轮廓和颜色上极为相似,在光学显微镜下它们难于分辨,容易混淆,长期以来,被视为同种异名,使基因数据库和甲藻毒素的研究受到影响。

NCBI 是美国国立卫生院建设的关于生物医学网站,提供文献、基因序列、蛋白序列等的功能性数据库,其 BLAST 分析功能和 PubMed 文献为广大科研工作者提供了极大的方便,从遗传的角度溯源去寻找物种的进化发生史已成为越来越普遍的手段。但从此次 *P. rhathymum* 的混淆事件中,我们看到分子生物学方法的运用目前在微藻鉴定中还不成熟,利用有限的基因片段作为微藻分类依据仍欠缺足够可信度,因此我们认为该方法目前只能起到一个辅助的作用,起决定性作用的方法仍是传统的形态

学观察和生理学的特性研究。

国内只有墨西哥原甲藻(*P. mexicanum*)的记录^[4-6],并注明 syn: *P. rhathymum* 或 = *P. rhathymum*^[5-6]。与辜小莲和林永水等研究^[4-5]中的图片和描述进行对比,其整体形态、刺丝胞孔的排列和壳面纹理,与我们采集的目标藻应属于同一物种。因此,在我国南海海域采集到的疑似种应为 *P. rhathymum*,前人所观察到的也是 *P. rhathymum*,而不是 *P. mexicanum*。

P. rhathymum 被证实属于有毒赤潮种^[9],Steidinger 报道 *P. mexicanum* 可以产生与西加鱼毒相关的毒素^[10],但经 Cortés-Altamirano 核实,其所用的藻种材料也是 *P. rhathymum*^[3]。而此次采集观察到的 *P. rhathymum* 南海株是否具有毒性尚未可知,但在我们的调查中,*P. rhathymum* 在采集地的微藻生态群落中属于优势种^[11],因此对于南中国海的 *P. rhathymum*,我们不仅应该明确其存在及分类地位,也应关注其作为有毒甲藻中对食物链和环境生态的影响。

参考文献

- [1] Osorio-Tafall B F. Notas sobre algunos dinoflagelados planctonicos marinos de México, con descripción de nuevas especies [J]. An Esc Nac Cienc Biol, 1942, 11: 435-47.
- [2] Loeblich III A R, Sherley J L, Schmidt R J. The correct position of flagellar insertion in *Prorocentrum* and description of *Prorocentrum*

- rhathymum* sp. nov. (Pyrrhophyta) [J]. J Plant Res, 1979, 1 (2): 113–120.
- [3] Cortés-Altamirano R. Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rhathymum* (Dinophyceae) [J]. J Phycol, 2003, 39: 221–225.
- [4] Gu X L(辜小莲), Qi Y Z(齐雨藻), Cheng J F(陈菊芳), et al. Species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) in Daya Bay, China [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2002, 10(4): 335–339. (in Chinese)
- [5] Lin Y S(林永水), Zhou J M(周近明), He J Z(何建宗). Red Tide Organisms [M]. Beijing: Science Press, 2001: 1–7. (in Chinese)
- [6] Lin Y S(林永水). A Study on Eutrophication and Red Tide in the Offshore Area [M]. Beijing: Science Press, 1997: 1–10. (in Chinese)
- [7] Faust M A. Morphologic details of six benthic species of *Prorocentrum* (Pyrrhophyta) from a mangrove island, Twin Cays, Belize, including two new species [J]. J Phycol, 1990, 26: 548–558.
- [8] Murray S, Ip C L, Moore R, et al. Are proro-centroid dinoflagellates monophyletic? A study of 25 species based on nuclear and mitochondrial genes [J]. J Protist, 2009, 160 (2): 245–264.
- [9] Cortés-Altamirano R, Licea D S, Gómez-Aguirre S. Evidencias de aumento de microalgas nocivas en la Bahía de Mazatlán, Sin., México [C]// Tresierra-Aguilar A E, Culquichicón Z G. Memorias del VIII Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar. Perú: ALCIMAR, Universidad de Trujillo, 1999: 343–345.
- [10] Steidinger K A. A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology [J]. Prog Phyc Res, 1983, 2: 147–88.
- [11] Liang J L(梁计林). Studies on resources of epiphytic dinoflagellates in Sanya and the culture, secondary metabolites of *Coolia monotis* [D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2009: 24–32. (in Chinese)