

# 我国沿海拟菱形藻属的2新记录种及其产毒特征分析

徐国双, 李扬\*

(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

**摘要:** 为澄清我国沿海拟菱形藻属(*Pseudo-nitzschia*)的物种多样性, 并确认中国海域拟菱形藻属是否具有产生多莫酸(Domoic acid)的能力, 采用毛细管显微操作技术从我国沿海水体中分离、纯化拟菱形藻细胞, 建立了单克隆培养株系, 并基于核糖体转录间隔区 ITS1-5.8S-ITS2 序列构建了分子系统树。结果表明, 结合在光学显微镜和透射电镜下观察的形态学特征和分子系统发育分析数据, 鉴定到我国拟菱形藻属的 2 新记录种: 银河拟菱形藻(*P. galaxiae* Lundholm & Moestrup)和微孔拟菱形藻(*P. micropora* Priisholm, Moestrup & Lundholm), 对其形态学特征进行了详细描述, 并与相似种类进行了比较研究。利用高效液相色谱(HPLC)技术对多莫酸特征进行了检测, 结果表明培养株系并不产生多莫酸。这些为我国拟菱形藻属物种多样性和产毒特征研究提供了基础数据。

**关键词:** 拟菱形藻属; 新记录种; 银河拟菱形藻; 微孔拟菱形藻; 多莫酸

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.06.002

## Two New Records of Diatom Genus *Pseudo-nitzschia* from Chinese Waters and Analysis of Their Domoic Acid Production

XU Guo-shuang, LI Yang\*

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** In order to clarify the species diversity of toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* in domestic coastal, and confirm the ability of domoic acid production from Chinese *Pseudo-nitzschia* strains, single cells or single chains of *Pseudo-nitzschia* species were isolated and purified using glass micropipette under invert microscope, and finally the monoclonal culture strains of *Pseudo-nitzschia* species were established and maintained in the laboratory. The morphological characteristics and ultrastructure of colony were observed under light microscope and electron transmission microscope. The molecular phylogenetic tree was constructed based on sequences of internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2). The results showed that two new records of *Pseudo-nitzschia* from China were identified, i.e., *P. galaxiae* Lundholm & Moestrup and *P. micropora* Priisholm, Moestrup & Lundholm. Their detailed morphological characteristics have been described and compared with similar species. All strains of these two new records had no domoic acid (DA) production by using high performance liquid chromatography (HPLC). These would provide basic data for studying species diversity and domoic acid production of genus *Pseudo-nitzschia* in the China sea.

**Key words:** *Pseudo-nitzschia*; New record; *P. galaxiae*; *P. micropora*; Domoic acid

收稿日期: 2015-01-27

接受日期: 2015-04-13

基金项目: 中国科学院海洋先导专项(XDA11020304); 国家自然科学基金项目(31370235)资助

作者简介: 徐国双(1989~), 女, 硕士研究生, 主要从事藻类学研究。E-mail: 835940927@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liyang@scnu.edu.cn

拟菱形藻属(*Pseudo-nitzschia* Peragallo)是一类常见的海洋浮游硅藻,广泛分布于全球海域。1987年在加拿大爱德华王子岛发生一起由于食用当地海域养殖贻贝(*Mytilus edulis* Linnaeus)而中毒的事件(造成3人死亡,100多人中毒)后,人们开始意识到硅藻种类也可以产生毒素,拟菱形藻也由此受到人们的广泛关注,并成为研究热点<sup>[1-5]</sup>。

拟菱形藻属的鉴定在光学显微镜下就可以相对容易地完成,但种间的鉴定比较困难,需要利用电子显微镜对其多个形态学特征进行详细观察<sup>[6]</sup>。自20世纪90年代以来,对拟菱形藻属的分类学开展了许多工作,拟菱形藻属的种类数量快速增加。由于拟菱形藻属物种间的形态学区别极其细微,因此分子分类学多采用核糖体转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)为常用分子标记的方法<sup>[7-11]</sup>。目前报道的拟菱形藻属已有40余种<sup>[3,6-8,12-13]</sup>。我国最早对拟菱形藻属进行研究的是金德祥等<sup>[14]</sup>,他们在光镜下观察了尖刺拟菱形藻[尖刺菱形藻(*Nitzschia pungens* Grunow)]和柔弱拟菱形藻[柔弱菱形藻(*N. delicatissima* Cleve)]。Qi等<sup>[15]</sup>报道了我国沿海拟菱形藻属1新种:中华拟菱形藻(*P. sinica* Qi & Wang)。张诚等<sup>[16]</sup>对我国近海的尖刺拟菱形藻种下分类学进行了初步研究,将其分为2个变型:尖刺型和多列型。Gao等<sup>[17]</sup>对长江口海域的拟菱形藻属种类进行了研究,观察到3种:柔弱拟菱形藻[*P. delicatissima* (Cleve) Heiden]、尖刺拟菱形藻(*P. pungens* Hasle)和伪柔弱拟菱形藻[*P. pseudodelicatissima* (Hasle) Lundholm, Hasle & Moestrup]。邢小丽等<sup>[18]</sup>在大亚湾海域报道了2种:尖细拟菱形藻[*P. cuspidata* (Hasle) Lundholm, Moestrup & Hasle]和多纹拟菱形藻(*P. multistriata* Takano)。李扬等<sup>[19-20]</sup>报道了大亚湾美洲拟菱形藻复合群的3种和伪柔弱拟菱形藻复合群的6种。之后,Lü等<sup>[13]</sup>针对广东沿海开展了拟菱形藻属物种多样性的专题研究,报道了14种。但我国在拟菱形藻属物种多样性方面的研究还相对有限,目前已报道20余种,可能还有物种未被认知。

多莫酸(Domoic acid, DA)是拟菱形藻属产生并造成危害的藻毒素。自1987年爱德华王子岛悲剧发生后,引起各国学者对DA的高度关注,对DA的分布进行了广泛研究。在20世纪80年代末期,只在北美大西洋沿海报道有DA的存在,至90年代初,报道范围扩展到美国、加拿大的太平洋海域

以及新西兰等地<sup>[21]</sup>,而90年代中,欧洲学者也报道各自国家海域有DA的存在<sup>[22]</sup>。另外,日本、韩国等亚洲国家也从拟菱形藻中检测到DA<sup>[23-24]</sup>。现有研究表明,DA的分布是世界性的<sup>[7-8]</sup>。截至目前,全球已报道16种拟菱形藻产生DA<sup>[7-9,12]</sup>,而我国尚未有相关的研究报道,目前仅对分离自长江口和大亚湾的尖刺拟菱形藻、尖刺拟菱形藻和多纹拟菱形藻进行了检测<sup>[18,25]</sup>。然而,近年来我国一些海产品中已有DA检出的报道<sup>[26-28]</sup>,证实了DA在我国沿海的分布,但其真正的产生者尚不明确,成为中毒事件预防、预警的重要限制。

本文基于建立的拟菱形藻物种单克隆培养株系,结合形态学和分子系统学研究技术,报道了拟菱形藻属的2新记录种,同时利用HPLC技术对DA特征进行了检测,这为我国海域拟菱形藻属的物种多样性和产毒特征研究提供了基础数据。

## 1 材料和方法

利用浮游植物拖网(孔径10 μm)在预定站位进行水平拖网,以采集浮游植物样品。采集的水样尽快带回实验室内进行目标藻株的分离、纯化。首先利用毛细管法在倒置显微镜下挑取目标藻细胞,转移至滴有f/2培养液的96孔细胞培养板中培养<sup>[29]</sup>,待其存活并繁殖达到一定细胞数量之后,转移到盛有f/2培养液的100 mL三角瓶中培养,以MC (Marine collection)序列进行编号。藻株信息见表1。

**光镜观察** 吸取0.1 mL的培养藻液,滴在0.1 mL浮游植物计数框中,加盖盖玻片后在Olympus BX61光学显微镜下观察,并利用Q-imaging数码相机拍照。

**透射电镜样品处理** 取10 mL培养藻液,沉淀浓缩至2~5 mL,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<sup>[30]</sup>。

**透射电镜观察** 用微量进样器吸取5~10 μL酸化后的水样,滴加在喷镀碳膜的铜网上,自然晾干后,即可在JEM-1010 TEM下观察和拍照。

**基于ITS1-5.8S-ITS2的分子系统学分析** 用0.22 μm醋酸纤维滤膜过滤10 mL藻液,收集滤膜上的藻细胞,进行总DNA的提取<sup>[10]</sup>。利用引物I380F和ITS4进行目标基因的扩增和测序<sup>[10,31]</sup>。使用BioEdit软件进行序列的比对和矩阵<sup>[32]</sup>,基于MrModeltest 2.3计算的最适模型<sup>[33]</sup>,分别用MEGA

表1 实验藻株的采样信息

Table 1 Sampling information of studied strains

株系 Strain	分离地点 Location	采样时间 Sampling date	分离时间 Isolation date
MC233	青岛 Qingdao	20131027	20131028
MC250	青岛 Qingdao	20131027	20131103
MC294	大亚湾 Daya Bay	20140417	20140420
MC238	大亚湾 Daya Bay	20130928	20131025
MC257	汕尾港 Shanwei Harbour	20131126	20131128
MC258	汕尾港 Shanwei Harbour	20131126	20131128
MC259	汕尾港 Shanwei Harbour	20131126	20131128
MC260	南澳岛 Nanao Island	20131124	20131203
MC402	大亚湾 Daya Bay	20140719	20140721

5.0和MrBayes 3.1.2构建ML和BI系统树<sup>[34-35]</sup>。

**HPLC 检测样品的预处理** 取处于生长稳定期中后期的藻液 5 mL, 经 0.22  $\mu\text{m}$  醋酸纤维滤膜过滤, 收集滤液于离心管中, 用于分析胞外多萜酸含量; 另外用 5 mL 灭菌海水将滤膜上的藻细胞重悬, 转移到另一个离心管中。将藻液用超声波破碎仪冰浴破碎 3~5 min, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 滤液于  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存备用或直接进样分析。

**DA 检测** 采用 Agilent 1100 型高效液相色谱(二极管阵列检测器, DAD)对预处理的样品进行 DA 检测, 参见 Vale 等<sup>[36]</sup>方法进行分析, 并略有改动。流动相: 乙腈 + 0.1% 三氟乙酸(13+87); 流速: 1 mL  $\text{min}^{-1}$ ; 柱子: 反相 C18 柱(Supelco LC-PAH, 25 cm  $\times$  4.6 mm, 孔径 5  $\mu\text{m}$ ); DAD 检测波长: 242 nm; 波宽: 10 nm; 柱温:  $25^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

**DA 标准曲线的建立** 用乙腈:水(1:9)混合液将 DA 标准品稀释至浓度为 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , 再用流动相将标准品分别配制浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、2.5、10.0、16.0、20.0、40.0 和 80.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  的 DA 标准溶液。DA 标准品购自德国 Sigma 公司。

## 2 结果

### 2.1 形态学鉴定

利用 LM 和 TEM 对分离藻株进行了形态学观察, 并进行初步鉴定。

**MC233** LM 下, 多呈现单细胞生活的状态, 较少形成链状群体。TEM 下, 可见中央较大船骨点, 肋纹之间未见明显孔纹。壳面纵轴 14~17  $\mu\text{m}$ , 横轴 1.8~1.9  $\mu\text{m}$ 。10  $\mu\text{m}$  有肋突 22~24 条, 点条纹 56~64 条。初步鉴定为银河拟菱形藻。

**MC250** LM 下, 多形成 2~4 个细胞的短链状群体, 以 2 个细胞的群体居多。TEM 下, 可见中央较大船骨点, 肋纹间未见明显孔纹。壳面纵轴 14~17  $\mu\text{m}$ , 横轴 1.7~1.9  $\mu\text{m}$ 。10  $\mu\text{m}$  有肋突 24~26 条, 点条纹 56~64 条。初步鉴定为银河拟菱形藻。

**MC294** LM 下, 多形成 2~4 个细胞的短链状群体, 以 2 个细胞群体居多。TEM 下, 可见中央较大船骨点, 肋纹间未见明显孔纹。壳面纵轴长于 MC233 和 MC250, 达到 26~29  $\mu\text{m}$ , 横轴 1.8~1.9  $\mu\text{m}$ 。10  $\mu\text{m}$  有肋突 22~24 条, 点条纹 56~64 条。初步鉴定为银河拟菱形藻。

**MC238** LM 下, 多形成 2 个细胞的短链状群体, 相邻细胞重叠部分约为细胞纵轴的 1/7~1/9。TEM 下, 壳面无中央较大船骨点, 点条纹含两排孔纹。10  $\mu\text{m}$  有肋突 24~26 条, 点条纹 45~48 条。初步鉴定为微孔拟菱形藻。

**MC257** LM 下, 多形成 2 个细胞的短链状群体, 相邻细胞重叠部分可达到细胞纵轴的 1/4。TEM 下, 壳面无中央较大船骨点, 点条纹含两排孔纹。10  $\mu\text{m}$  有肋突 27~29 条, 点条纹 45~48 条。初步鉴定为微孔拟菱形藻。

**MC258** LM 下, 多呈现单个细胞生存。TEM 下, 壳面无中央较大船骨点, 点条纹含两排孔纹。10  $\mu\text{m}$  有肋突 27~29 条, 点条纹 45~48 条。初步鉴定为微孔拟菱形藻。

**MC259** LM 下, 多呈现单个细胞生存。TEM 下, 壳面无中央较大船骨点, 点条纹含两排孔纹。10  $\mu\text{m}$  有肋突 27~29 条, 点条纹 45~48 条。初步鉴定为微孔拟菱形藻。

**MC260** LM 下, 多呈现单个细胞生存。TEM 下, 壳面无中央较大船骨点, 点条纹含两排孔

纹。10 μm 有肋突 27~29 条,点条纹 45~48 条。初步鉴定为微孔拟菱形藻。

**MC402** LM 下,多呈现单个细胞生存。TEM 下,壳面无中央较大船骨点,点条纹含两排孔纹。10 μm 有肋突 27~29 条,点条纹 51~53 条。初步鉴定为微孔拟菱形藻。

### 2.2 基于ITS序列分析的分子系统学分析

利用 MEGA 5.0 对目标藻株的核糖体转录间隔区 ITS1-5.8S-ITS2 序列进行了比较分析。MC233、MC250和MC294藻株具有完全相同的 ITS 序列,与西班牙加泰罗尼亚海域报道的 3 个银河拟菱形藻株系(EU327368, EU327369, EU327370)有 3 个碱基的差异,与 NCBI 下载的银河拟菱形藻模式株系(AY257850,墨西哥图斯潘海

域)有 6 个碱基的差异。MC238、MC257~260 和 MC402 藻株具有完全相同的 ITS 序列,与 NCBI 下载的微孔拟菱形藻模式株系(JN252422,马来西亚沙巴海域)没有碱基的差异。基于 ITS1-5.8S-ITS2 序列和 NCBI 的相关株系,建立了 9 个样品的贝叶斯分子系统树(图 1),可见,MC233、MC250、MC294 藻株与银河拟菱形藻聚在一起,MC238、MC257~260、MC402 藻株与微孔拟菱形藻模式株聚在一起,并且采用的 ML 和 BI 分析均具有较高的置信值。这表明分子分析的结果与初步的形态学鉴定相一致。

### 2.3 多莫酸产毒特征的HPLC检测

多莫酸标准曲线的建立和最低检测限 图 2 为多莫酸 HPLC 检测的标准曲线。可见,多

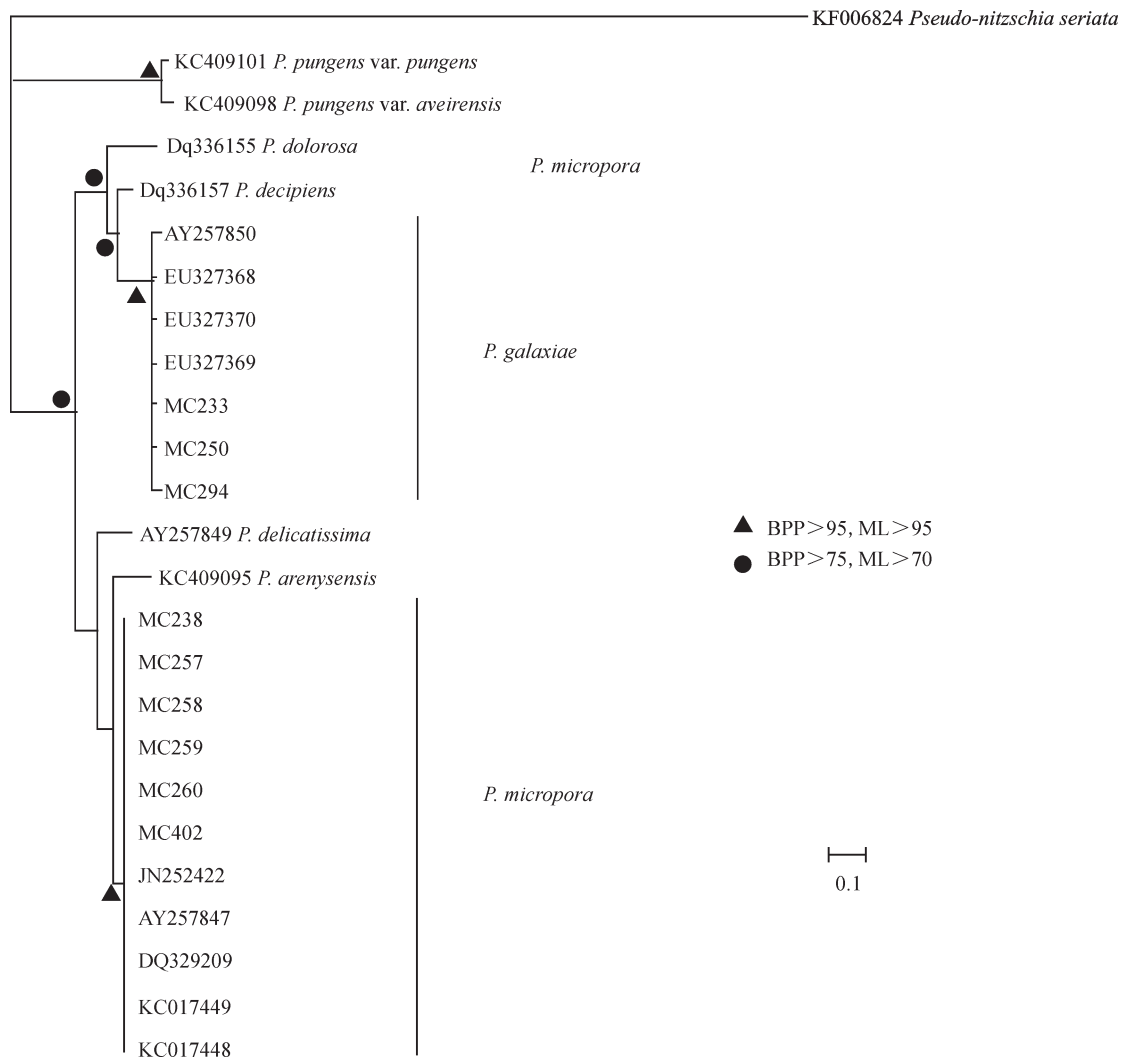


图 1 基于核糖体转录间隔区 ITS1-5.8S-ITS2 的贝叶斯分子系统树。以成列拟菱形藻为外类群。

Fig. 1 Bayesian phylogenetic tree based on ITS1-5.8S-ITS2 rDNA with *Pseudo-nitzschia seriata* as outgroup.



莫酸浓度为  $0.1\sim 16\ \mu\text{g mL}^{-1}$  时,其峰面积与质量浓度有良好的线性关系( $R^2=0.9999$ ),回归方程为: $y=87.1875x$ 。本方法的检测下限为  $10\ \text{ng mL}^{-1}$ 。

**样品检测** 多莫酸的出峰保留时间为

13.613 min (图 3: A)。分别对常规培养的微孔拟菱形藻和银河拟菱形藻进行 HPLC 检测,结果在预定的保留时间内都未出现样品峰(图 3: B~E),表明所测样品中不含有多莫酸。

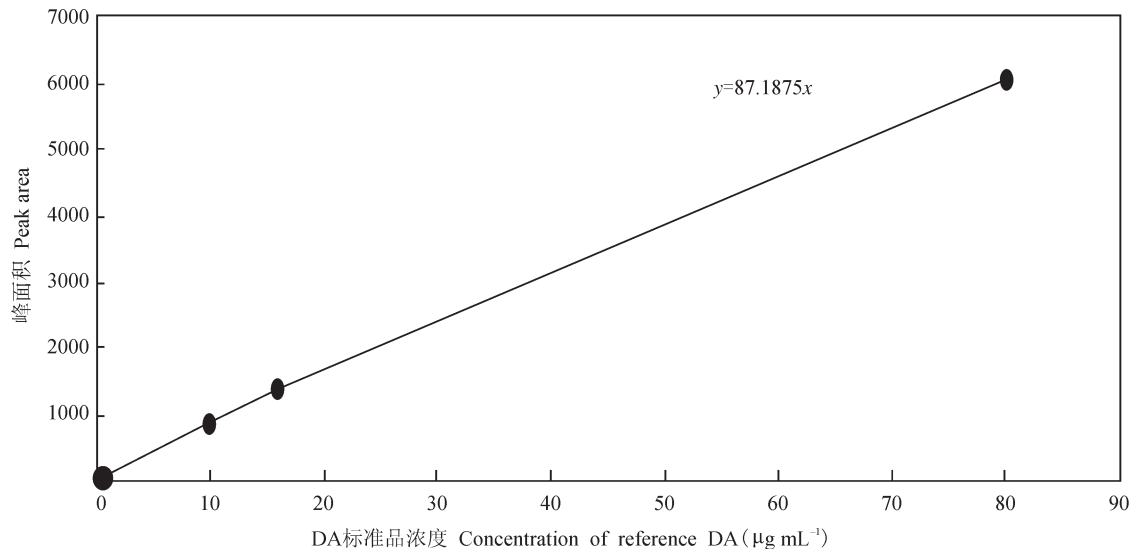


图 2 多莫酸标准样 HPLC 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of domoic acid by HPLC

## 2.4 拟菱形藻的形态学描述

**银河拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia galaxiae***  
Lundholm & Moestrup (图 4: A~D)

Lundholm & Moestrup 2002, p.596~601, figs. 1~22<sup>[37]</sup>.

可形成 2~4 个细胞的短链状群体,相邻细胞重叠部分约为细胞长轴的  $1/8\sim 1/10$ 。室内培养条件下多为单细胞生活。细胞壁硅质化较弱,光镜下多呈现壳端略微向同一侧弯曲。每个细胞内含 2 个色素体,沿细胞横轴对称分布。细胞披针形,两端钝圆呈喙状。壳面纵轴长  $15\sim 29\ \mu\text{m}$ ,横轴宽  $1.7\sim 1.9\ \mu\text{m}$ 。同一壳面的两个喙状末端在外形上常常不完全相似,即壳面横轴两侧的壳面是不对称的。肋突(Fibulae)分布不规则,即相邻肋突之间的距离时远时近,  $10\ \mu\text{m}$  有  $16\sim 26$  条,肋突的硅质化较重,但在光镜下亦不可见。有一条纵向硅质线连接所有肋突,并跨越于两侧壳面的基部。管壳缝强烈偏心,具有一个较大的中央船骨点。  $10\ \mu\text{m}$  壳面有点条纹  $56\sim 64$  条,点条纹中未见明确的孔纹,但是在高倍透射电镜下可见  $3\sim 4\ \text{nm}$  的细微点纹,它们排列成不明显的两行,相对集中分布在靠近肋纹的区域,这些细微点纹也分布于管壳缝和壳端。

本研究建立了 3 个银河拟菱形藻株系 MC233、MC250 和 MC294,主要形态学特征均符合该种的描述,壳面肋突和点条纹的密度也相符,但在细胞三维参数上存在一些差异。MC233 和 MC250 的纵轴均显著小于银河拟菱形藻的记录 ( $25\sim 41\ \mu\text{m}^{[37]}$ ), MC294 略微接近。3 个藻株的横轴均略宽于记录 ( $1.2\sim 1.7\ \mu\text{m}^{[37]}$ )。

**毒性.** 意大利那不勒斯湾株系能够产生多莫酸毒素<sup>[38]</sup>,但本研究的 3 个株系均未能检测到多莫酸。

**生态.** 海水浮游生活。

**分布.** 标本采自青岛海域(10 月)和大亚湾海域(4 月),培养藻株编号为 MC233、MC250 和 MC294。本种首次记录于墨西哥 Tuxpam 湾和澳大利亚悉尼海域<sup>[37]</sup>,还报道于意大利那不勒斯湾<sup>[38]</sup>。

**微孔拟菱形藻 *Pseudo-nitzschia micropora***  
Priisholm, Moestrup & Lundholm (图 5: A~F)

Priisholm, et al. 2002, p. 157~160, figs. 1~25<sup>[39]</sup>.

光镜下壳面观细胞较为对称,壳面横轴较窄,自壳面横轴最宽处向壳端逐渐变狭。环面观细胞呈线形或略微披针形,末端截平。细胞可形成链状群体,相邻细胞重叠部分约为细胞长轴的  $1/9$ 。每

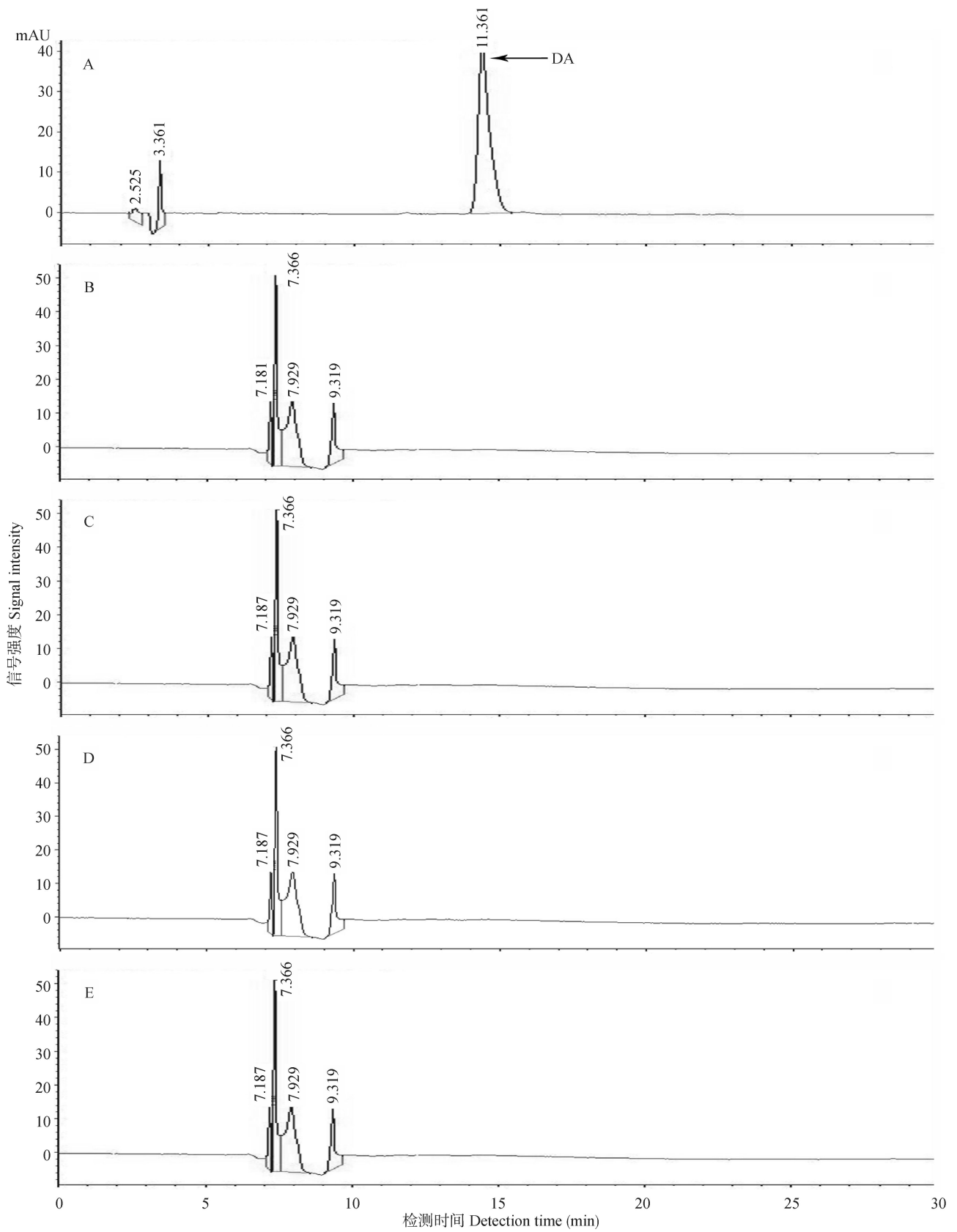


图3 多莫酸的HPLC 图谱。A: 多莫酸标准峰( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); B,C: 微孔拟菱形藻; D,E: 银河拟菱形藻; B,D: 细胞外; C,E: 细胞内。  
 Fig. 3 HPLC diagram of domoic acid. A: Standard peak of DA ( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); B,C: *Pseudo-nitzschia micropora*; D,E: *P. galaxiae*; B,D: Culture medium; C,E: Extract from cells.

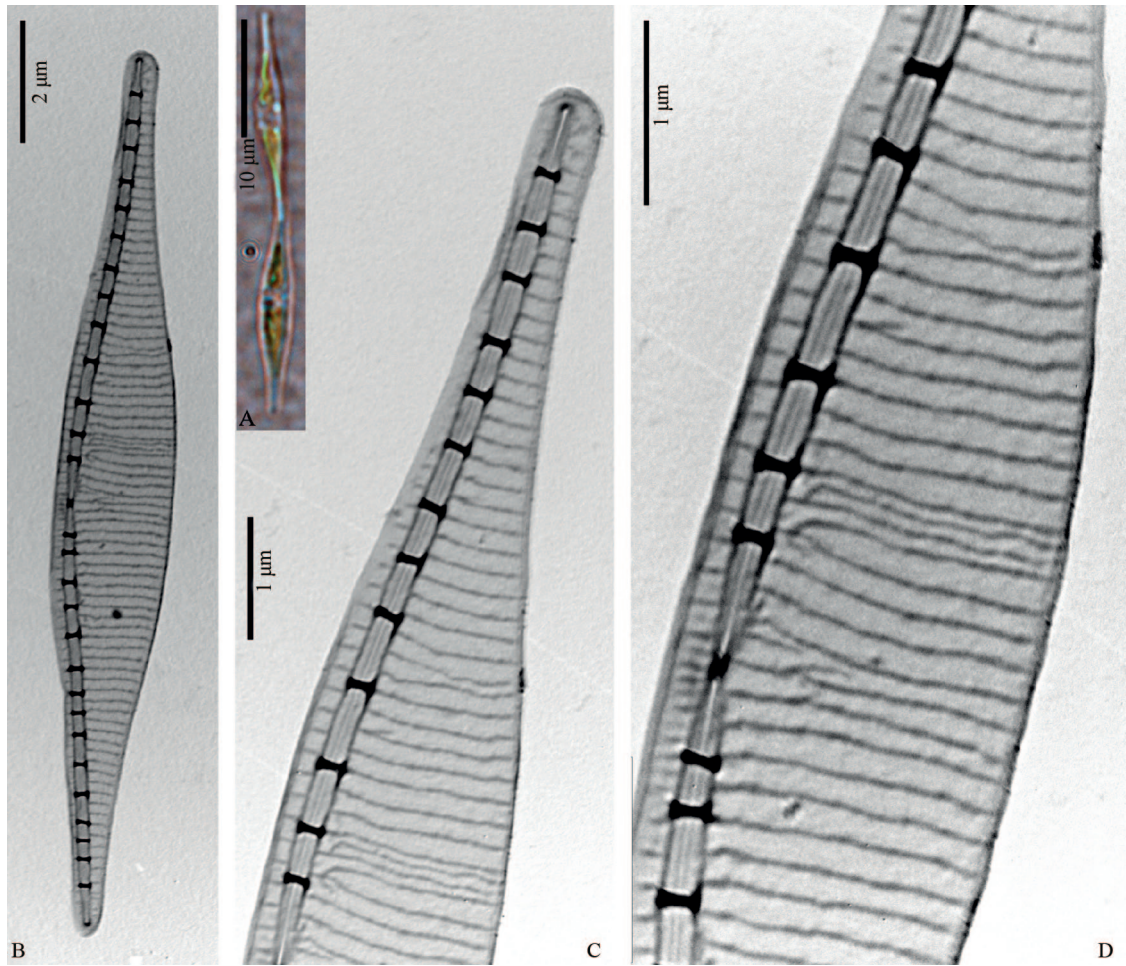


图4 银河拟菱形藻。A: LM, 示2个细胞的链状群体; B~D: TEM; B: 壳面外形; C: 壳端; D: 壳面中央部分。

Fig. 4 *Pseudo-nitzschia galaxiae*. A: LM, 2-cell chain population; B~D: TEM; B: Shape of valve; C: End of valve; D: Middle of valve.

个细胞内含2个色素体,沿细胞横轴对称分布。壳面纵轴长27~57  $\mu\text{m}$ ,横轴宽1.3~2.0  $\mu\text{m}$ 。透射电镜下可见壳面点条纹由两排孔纹组成,孔纹的分布较为靠近肋纹,10  $\mu\text{m}$ 有点条纹9~12个,壳面肋纹41~46条。肋突硅质化严重,较粗大,光镜下可见,10  $\mu\text{m}$ 有肋突21~29个。管壳缝强烈偏心,不具有中央较大船骨点。每个细胞有3条环带,每条环带的中部较宽,两端略窄。壳环带上孔纹排列较密,10  $\mu\text{m}$ 有48~54个,环带点条纹由2~3个孔纹组成。

**毒性.** 本种均不产生多莫酸毒素<sup>[39]</sup>,本研究的6个株系亦未能检测到多莫酸。

**生态.** 海水浮游生活。

**分布.** 藻株 MC238、MC257~MC260 和 MC402 采自汕尾海域(11月)、南澳岛(11月)和大亚湾(7, 9月)。本种首次报道于泰国普吉岛海域<sup>[39]</sup>,越南湄公河三角洲<sup>[40]</sup>和马来西亚沙巴州海域<sup>[41]</sup>也有分布。

## 3 讨论

### 3.1 形态学比较研究

银河拟菱形藻的标志性特征是短链状群体、较窄的披针形壳面、喙状壳端、较高密度的点条纹以及细微的点纹,且点条纹中未见明显的孔纹,但分布有细微的点孔(3~4 nm),这一特征在其他拟菱形藻种中未见报道,可作为银河拟菱形藻的区别性特征。与银河拟菱形藻具有相似形态学特征的是亚曲线拟菱形藻 [*P. subcurvata* (Hasle) Fryxell] 和格氏拟菱形藻 [*P. granii* (Hasle) Hasle], 它们都具有较窄披针形的壳面、喙状壳端以及紧密排列的点条纹,区别在于:(1) 后两者的点条纹中具有明确的点纹,而银河拟菱形藻则没有;(2) 后两者的管壳缝没有中央较大船骨点,而银河拟菱形藻则有。亚太平洋拟菱形藻 [*P. subpacific* (Hasle) Hasle] 也具有相似的特征,它们在分子系统树中具有相近的亲缘关



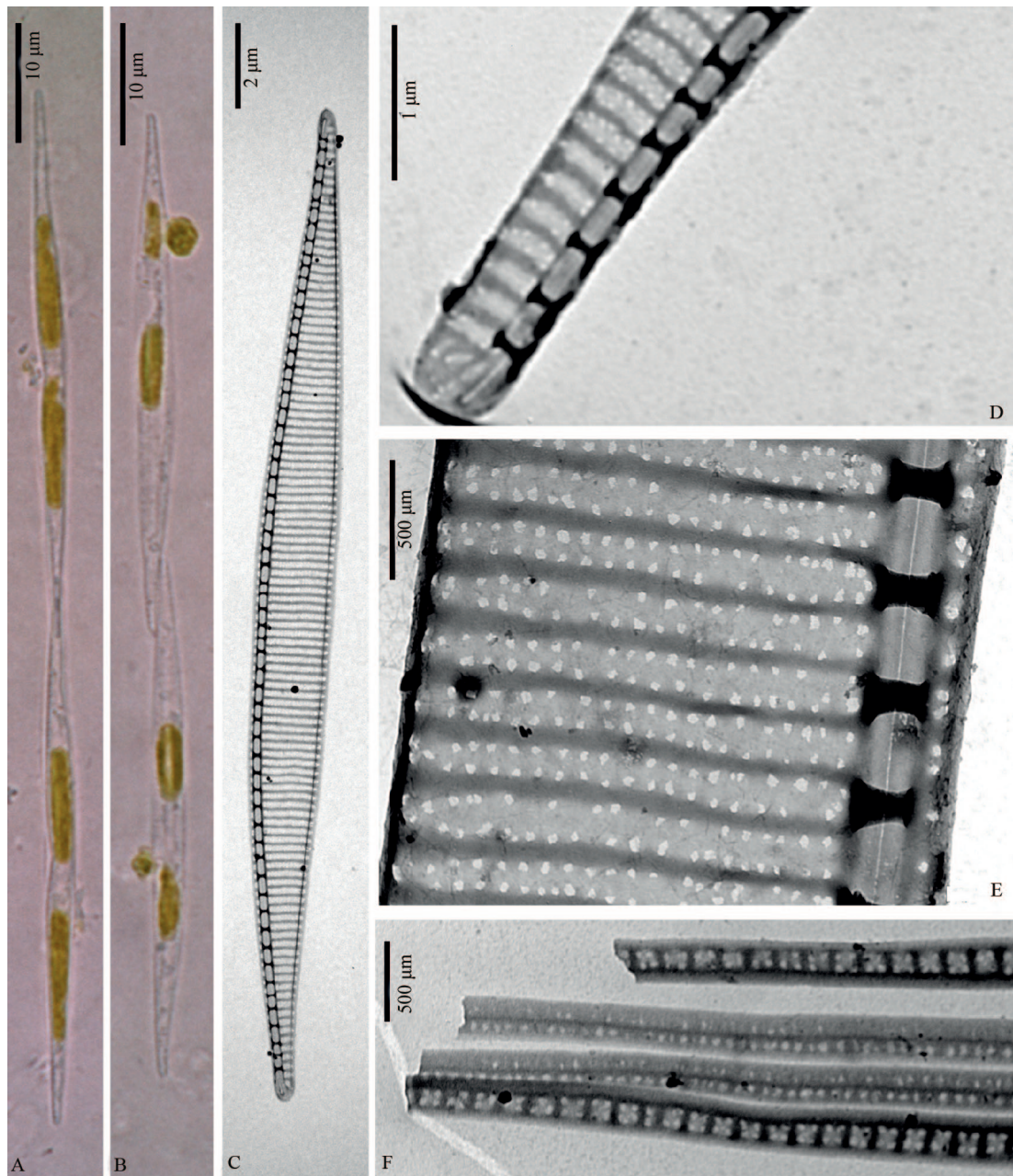


图5 微孔拟菱形藻。A,B: LM 照片,示2个细胞的链状群体,A:壳面观;B:环面观;C~F: TEM 照片;C:壳面外形;D:壳端;E:壳面中央部分;F:环带。

Fig. 5 *Pseudo-nitzschia micropora*. A, B: LM, 2-cell chain population; A: Valve view; B: Girdle view; C~F: TEM; C: Shape of valve; D: End of valve; E: Middle of valve; F: Bands.

系<sup>[22]</sup>,区别特征是太平洋拟菱形藻的壳面明显较宽(5~7 μm),且不具有喙状壳端。

依据 Hasle & Syvertsen 的分类原则<sup>[42]</sup>,微孔拟菱形藻由于壳面宽度小于 3 μm 而归入“柔弱群”(Delicatissima group)。该群包含其他 2 个没有中央较大船骨点的物种:亚曲线拟菱形藻和格氏拟菱形藻。微孔拟菱形藻与它们的区别特征在于具有较高的孔纹密度和肋突密度,以及较低的点条纹密

度和较短的长轴;另外微孔拟菱形藻的点条纹由两排孔纹组成,而亚曲线拟菱形藻和格氏拟菱形藻的点条纹由一排较大的方形孔纹组成。在点条纹具有两排孔纹的拟菱形藻属物种中,柔弱拟菱形藻 [*P. delicatissima* (Cleve) Heiden]、疑难拟菱形藻 [*P. dolorosa* Lundholm & Moestrup]、并基拟菱形藻 [*P. decipiens* Lundholm & Moestrup] 和肿胀拟菱形藻 [*P. turgidula* (Hustedt) Hasle] 与微孔拟菱形藻



更为相似,微孔拟菱形藻的显著区别特征是没有中央较大船骨点,而其他物种均具有1个中央较大船骨点,另外,在肋突、点条纹、孔纹密度上也有些许差别<sup>[11]</sup>。

### 3.2 拟菱形藻属DA产毒特征分析

微孔拟菱形藻首先是 Priisholm 等<sup>[39]</sup>报道于泰国普吉岛海域,之后在越南海域也有记录<sup>[40]</sup>,但均未对其多莫酸进行检测。Lim等<sup>[41]</sup>对分离自马来西亚婆罗洲海岸的微孔拟菱形藻进行了DA的检测,结果为阴性,显示不含有DA。本研究从中国海域分离并建立了微孔拟菱形藻的室内培养株系,利用HPLC技术检测DA,结果也没有检测到DA的存在。银河拟菱形藻首次报道于墨西哥海域<sup>[37]</sup>,并利用UV-DAD液相色谱(HPLC)和FMOC-HPLC方法对检测了2个株系,均未检测到DA。之后,Cerino等<sup>[38]</sup>采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)方法,对7株分离自意大利那不勒斯湾的银河拟菱形藻进行了DA检测,其中2株能够产生DA,产毒水平分别为 $3.6 \times 10^{-4}$  pg cell<sup>-1</sup>和 $7.8 \times 10^{-7}$  pg cell<sup>-1</sup>。本研究对分离自中国海域的银河拟菱形藻室内培养株系进行了DA检测,未能检测到DA。

拟菱形藻的产毒与否并不是一个稳定的特征,不同地理株系之间常存在差异。中国东海水体的尖刺拟菱形藻(*P. pungens* Hasle)不具备产毒特征<sup>[25]</sup>,但美国<sup>[2,43-44]</sup>和新西兰<sup>[21]</sup>株系却具有较强的产毒能力。意大利那不勒斯湾的多纹拟菱形藻(*P. multistriata* Takano)能够产生DA<sup>[45]</sup>,美国华盛顿州沿海的多纹拟菱形藻也能够产生DA<sup>[46]</sup>,但中国大亚湾的多纹拟菱形藻却不具备产毒能力<sup>[18]</sup>。截至目前,对亚洲海域拟菱形藻的DA检测还较少,Kotaki等<sup>[23]</sup>对采自日本Ofunata Bay的44个拟菱形藻株系进行了DA检测,仅有1个株系检测到少量DA的产生,最高值不超过5.7 pg cell<sup>-1</sup>。Larsen等<sup>[40]</sup>对越南海域的11种拟菱形藻进行了检测,均未有DA。Lim等<sup>[41]</sup>检测了分离自马来西亚水体的108个拟菱形藻株系,也未有阳性报道,因此初步推测水温可能是一个重要影响因素,导致热带水体的拟菱形藻不具备产毒能力。但Teng等<sup>[9]</sup>在马来西亚水域检测到1个具有DA产毒能力的种类,并报道为新种[*P. kodamae* Teng, Lim, Leaw & Lim],产毒水平为1.2~42.5 pg cell<sup>-1</sup>,这在某种程度上更加验证了拟菱形藻产毒与否具有较多的不确定性。

拟菱形藻的产毒能力是一个比较复杂的情况。截至目前,全球已报道能够产生DA的拟菱形藻种类达到16种<sup>[7,9]</sup>,我国报道的潜在产毒种类也有7种<sup>[13]</sup>,并且某些潜在产毒的拟菱形藻种类在我国沿海的分布很广,常在春季形成优势种,甚至引发藻华<sup>[4,13]</sup>,但截至目前我国尚未有DA中毒事件的报道,这是一个很有趣的现象,是我国关于拟菱形藻产毒的研究数据不够,还是中国海域的拟菱形藻确实不具备产毒的能力,亦或毒性弱?目前尚不能给出定论,还需要后续更多研究数据的补充和完善。有学者认为影响拟菱形藻产生DA的关键因素还未被认知,也有学者认为DA的产生是由基因决定的,但对这个产毒基因还不了解<sup>[8]</sup>。目前,欧洲学者正在对多列拟菱形藻[*P. multiseriata* Hasle]开展全基因组的测序工作,相信在不久的将来,我们对拟菱形藻产毒的内在机制会有更为深入的认识。

### 参考文献

- [1] Bates S S, Bird C J, de Freitas A S W. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1989, 46(7): 1203-1215.
- [2] Bates S S, Garrison D L, Homer R A. Bloom dynamics and physiology of domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species [M]// Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G M. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998: 267-292.
- [3] Hallegraeff G M. Species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* in Australian waters [J]. Bot Mar, 1994, 37(5): 397-411.
- [4] Chen J F, Xu N, Wang Z H, et al. Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. and environmental factors in Daya Bay, the south China Sea [J]. Acta Sci Circum, 2002, 22(6): 743-748.  
陈菊芳, 徐宁, 王朝辉, 等. 大亚湾拟菱形藻种群的季节变化与环境因子的关系 [J]. 环境科学学报, 2002, 22(6): 743-748.
- [5] Gao Y, Liang J R, Gao Y H, et al. Review of morphological and molecular identification of *Pseudo-nitzschia*, a bloom forming diatom [J]. Mar Sci, 2005, 29(1): 67-72.  
高杨, 梁君荣, 高亚辉, 等. 赤潮拟菱形藻形态学分类和分子生物技术鉴定研究概述 [J]. 海洋科学, 2005, 29(1): 67-72.
- [6] Hasle G R. *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae) [J]. J Phycol, 1994, 30(6): 1036-1039.
- [7] Lelong A, Hégaret H, Soudant P, et al. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: Revisiting previous paradigms [J]. Phycologia, 2012, 51(2): 168-216.
- [8] Trainer V L, Bates S S, Lundholm N, et al. *Pseudo-nitzschia* phy-

- siological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health [J]. *Harmful Algae*, 2012, 14: 271–300.
- [9] Teng S T, Lim H C, Lim P T, et al. *Pseudo-nitzschia kodamae* sp. nov. (Bacillariophyceae), a toxigenic species from the Strait of Malacca, Malaysia [J]. *Harmful Algae*, 2014, 34(1): 17–28.
- [10] Lundholm N, Moestrup Ø, Hasle G R, et al. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? [J]. *J Phycol*, 2003, 39(4): 797–813.
- [11] Lundholm N, Moestrup Ø, Kotaki Y, et al. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses [J]. *J Phycol*, 2006, 42(2): 464–481.
- [12] Guiry M D, Guiry G M. *Algaebase: World-wide electronic publication*, National University of Ireland, Galway [DB/OL]. 2015 [2015–01–23]. <http://www.algaebase.org>.
- [13] Lü S H, Li Y, Lundholm N, et al. Diversity, taxonomy and biogeographical distribution of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Guangdong coastal waters, South China Sea [J]. *Nova Hedwig*, 2012, 95(1/2): 123–152.
- [14] Chin T G, Chen J H, Ma J X, et al. *Pelagic Diatoms in China Coastal Waters* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1965: 199–200.  
金德祥, 陈金环, 马俊享, 等. 中国海洋浮游硅藻类 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1965: 199–200.
- [15] Qi Y Z, Wang J, Zheng L. The taxonomy and bloom ecology of *Pseudo-nitzschia* on the coasts of China [C]// Nontji A, Soemodihardjo S, Iladude A G, et al. *Proceedings of IOC-WESTPAC Third International Scientific Symposium*. Bali, Indonesia, 1994: 88–95.
- [16] Zhang C, Zou J Z. Preliminary study on the subspecific taxonomy of *Nitzschia pungens* Grunow in Chinese coastal waters [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 1994, 25(2): 216–218.  
张诚, 邹景忠. 中国近海尖刺菱形藻种下分类的初步研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(2): 216–218.
- [17] Gao Y H, Xie W L, Li Y, et al. *Pseudo-nitzschia*: taxonomy and biogeographic distribution in the estuary of Changjiang River, China [C]// Witkowski A. *Proceedings of 18th International Diatom Symposium*. Bristol: Biopress Limited, 2006: 75–90.
- [18] Xing X L, Yang J X, Kang Y Y, et al. Morphological study and toxic analysis for two *Pseudo-nitzschia* species isolated from Daya Bay [J]. *J Ocean Taiwan Strait*, 2007, 26(4): 576–582.  
邢小丽, 杨军霞, 康燕玉, 等. 大亚湾水域两种拟菱形藻的形态学鉴定及毒素分析 [J]. *台湾海峡*, 2007, 26(4): 576–582.
- [19] Li Y, He L N, Ma Y Y, et al. The study on morphological taxonomy of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2010, 34(2): 302–311.  
李扬, 何利娜, 马艳艳, 等. 伪柔弱拟菱形藻复合群的形态分类学研究 [J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 302–311.
- [20] Li Y, Ma Y Y, Lü S H. Morphological characteristics of *Pseudo-nitzschia americana* complex in Daya Bay, China [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2010, 34(4): 851–855.  
李扬, 马艳艳, 吕颂辉. 大亚湾美洲拟菱形藻复合群的形态学观察 [J]. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 851–855.
- [21] Rhodes L, White D, Syhre M, et al. *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: Domoic acid production *in vitro* and links with shellfish toxicity [M]// Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y. *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Paris: Intergov. Oceanogr. Comm. UNESCO, 1996: 155–158.
- [22] Vrieling E G, Koeman R P T, Scholin C A, et al. Identification of a domoic acid-production *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the Dutch Wadden sea with electron microscopy and molecular probes [J]. *Eur J Phycol*, 1996, 31(4): 333–340.
- [23] Kotaki Y, Koike K, Sato S, et al. Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseriis* isolated from Ofunato Bay, Japan [J]. *Toxicon*, 1999, 37(4): 677–682.
- [24] Lee J H, Baik J H. Neurotoxin-producing *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle, in the coastal waters of southern Korea: II. Production of domoic acid [J]. *Korea J Phycol* 1997, 12(1): 31–38.
- [25] Li A F, Yu R C, Wang Y F, et al. Morphological and toxicity characteristics of *Pseudo-nitzschia pungens* strain PP0201-01 isolated from the East China Sea [J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2005, 23(4): 418–426.
- [26] Song L L, Zhang H Q, Hou J D, et al. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of residue of domoic acid in shellfish [J]. *J Fish China*, 2008, 32(6): 950–956.  
宋琍琍, 张海琪, 侯镜德, 等. 液相色谱-串联质谱法测定贝类毒素软骨藻酸的残留 [J]. *水产学报*, 2008, 32(6): 950–956.
- [27] Ji W, Zheng J Y, Zeng X P, et al. HPLC analysis of domoic acid poisoning in south China Sea [J]. *Modern Food Sci Technol*, 2011, 27(1): 120–122.  
吉薇, 郑洁莹, 曾雪萍, 等. 南海海域软骨藻酸(DA)贝类毒素的HPLC方法检测 [J]. *现代食品科技*, 2011, 27(1): 120–122.
- [28] Wang H. An investigation of domoic acid content in shellfish in Zhoushan islands [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(12): 2986–2988.  
王恒. 舟山海域贝类海产品中软骨藻酸含量调查 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(12): 2986–2988.
- [29] Guillard R R L, Hargraves P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte [J]. *Phycologia*, 1993, 32(3): 234–236.
- [30] Cheng Z D, Liu S C, Gao Y H. *Nano-diatoms in Fujian Coast* [M]. Beijing: Ocean Press, 1993: 10–11.  
程兆第, 刘师成, 高亚辉. 福建沿岸微型硅藻 [M]. 北京: 海洋出版社, 1993: 10–11.

- [31] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR Protocols. New York: Academic Press, 1990: 315–322.
- [32] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT [J]. Nucl Acids Symp, 1999, 41(1): 95–98.
- [33] Nylander J A A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University [EB/OL]. 2004. <http://www.citeulike.org/user/mbutler808/article/7578084>.
- [34] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 1596–1599.
- [35] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572–1574.
- [36] Vale P, Sampayo M A M. Domoic acid in Portuguese shellfish and fish [J]. Toxicon, 2001, 39(6): 893–904.
- [37] Lundholm N, Moestrup Ø. The marine diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* sp. nov. (Bacillariophyceae): Morphology and phylogenetic relationships [J]. Phycologia, 2002, 41(6): 594–605.
- [38] Cerino F, Orsini L, Sarno D, et al. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae* [J]. Harm Algae, 2005, 4(1): 33–48.
- [39] Priisholm K, Moestrup Ø, Lunhdolm N. 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. [J]. Dia Res, 2002, 17(1): 153–175.
- [40] Larsen J, Nguyen N L. Potentially toxic microalgae of Vietnamese waters [J]. Opera Bot, 2004, 140(1): 5–216.
- [41] Lim H C, Leaw C P, Su S N P, et al. Morphology and molecular characterization of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from Malaysian Borneo, including the new species *Pseudo-nitzschia circumspora* sp. nov. [J]. J Phycol, 2012, 48(5): 1232–1247.
- [42] Hasle G R, Syvertsen E E. Marine diatoms [M]// Tomas C R. Identifying Marine Phytoplankton. San Diego: Academic Press, 1997: 5–385.
- [43] Homer R A, Postel J R. Toxic diatoms in western Washington waters (U.S. west coast) [J]. Hydrobiology, 1993, 269–270(1): 197–205.
- [44] Trainer V L, Wekell J C, Homer R A, et al. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia pungens* [M]// Reguera B, Blanco J, Fernandez M L, et al. Harmful Algae. Paris: Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, 1998: 337–340.
- [45] Orsini L, Sarno D, Procaccini G, et al. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: Morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species [J]. Eur J Phycol, 2002, 37(2): 247–257.
- [46] Trainer V L, Wells M L, Cochlan W P, et al. An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast [J]. Limnol Oceanogr, 2009, 54(5): 1461–1474.