

厦门大学硕士学位论文

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20120051302007

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

中国东南沿海五种拟菱形藻形态、遗传多样性与系统进化研究

The Morphology, Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis
of Five *Pseudo-nitzschia* Species in Southeast China Sea

指导教师姓名: 梁君荣 副 教 授

高亚辉 教 授

专 业 名 称: 水 生 生 物 学

论文提交日期: 2008 年 4 月

论文答辩时间: 2008 年 6 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 刘广发

评 阅 人: _____

2008 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 ()，在年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
ABSTRACT	III
第一章 前言.....	1
1.1 拟菱形藻的形态分类研究.....	1
1.2 拟菱形藻的分子分类及系统进化研究.....	7
1.3 分子系统发育.....	11
1.4 DNA二级结构在生殖隔离和遗传多样性研究中的应用.....	16
1.5 本论文研究的目的和意义.....	17
第二章 材料和方法.....	19
2.1 自然样品的采集与藻株的分离、纯化.....	19
2.2 主要试剂和仪器.....	20
2.3 方法.....	22
2.4 本实验的技术路线.....	27
第三章 实验结果.....	29
3.1 形态观察结果.....	29
3.2 拟菱形藻SSU序列片段的扩增及序列分析.....	44
3.3 拟菱形藻LSUnrDNA片段的扩增及序列分析.....	52
3.4 拟菱形藻 5.8S rDNA及转录间隔区(ITS1、ITS2)序列扩增及序列分析..	62
第四章 讨论.....	75
4.1 拟菱形藻分类中引入DNA序列的必要性.....	75
4.2 拟菱形藻遗传多样性分析.....	76
4.3 拟菱形藻系统进化及形态学分析.....	79
第五章 总结与展望.....	84
5.1 研究特色.....	84
5.2 有待进一步研究的问题.....	84
参考文献.....	86
攻读硕士期间发表的论文和参加的课题.....	94
致谢	95

Contents

Abstract in chinese..... I

Abstract in English.....III

1 Introduction.....1

 1.1 The morphological taxonomy of *Pseudo-nitzschia*.....1

 1.2 The molecular taxonomy and phylogeny study of *Pseudo-nitzschia*.....8

 1.3 Molecular phylogeny.....11

 1.4 The application of secondary structure of DNA sequence in reproductive isolation and genetic diversity.....16

 1.5 The objective and significance of this study.....17

2 Material and methods.....19

 2.1 Sample collection and microalgal isolation and purification.....20

 2.2 Main reagent and instruments.....22

 2.3 Method.....22

 2.4 Flow chat of this study.....28

3 Results.....29

 3.1 The results of morphological observation.....29

 3.2 The SSU nrDNA amplication and gene sequences analysis of *Pseudo-nitzschia* species.....44

 3.3 The SSU nrDNA amplication and gene sequences analysis of *Pseudo-nitzschia* species52

 3.4 The 5.8S nrDNA and ITS gene sequences amplication and gene sequences analysis of *Pseudo-nitzschia*.....62

4 Discussion.....75

 4.1The essentiality of DNA sequences in *Pseudo-nitzschia* taxonomy75

 4.2 The genetic diversity analysis of *Pseudo-ntizschia* species.....76

 4.3 The phylogeny study of Pseudo-nitzschia specie.....79

5 The research prospect.....84

 5.1 The features of this study.....84

 5.2 Scientific problems need to be further explored.....84

References.....86

Published papers and participated research projects.....94

Acknowledgement.....95

中文摘要

拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia*) 是广泛分布于世界各地的潜在产毒赤潮藻。本研究首先从我国东南沿海分离并建立拟菱形藻各个种的纯种株系; 然后利用光学显微镜、透射电子显微镜和扫描电子显微镜对其进行形态学观察、特征描述, 并进行分类研究; 再选择核糖体 SSU nrDNA、LSU nrDNA、和 5.8S rDNA 及转录间隔区(ITS1、ITS2)基因对其进行分子生物学分析, 包括基因序列差异性分析、遗传多样性分析和系统进化分析。旨在对分布于我国东南沿海的拟菱形藻进行形态学分类和分子鉴定, 并分析其种间、种内、不同地理株系的地理遗传差异性和系统进化关系, 探明我国东南沿海主要拟菱形藻的种类和遗传多样性水平。主要结果如下:

1. 分析了采自海南、香港、广州、厦门、台湾海峡和长江口等地的 12 株拟菱形藻。根据其形态学特征, 鉴定为 5 个种: 尖刺拟菱形藻(*P. pungens*)、尖细拟菱形藻 (*P. cuspidata*)、多纹拟菱形藻 (*P. multistriata*) 和巴西拟菱形藻 (*P. braziliiana*)、柔弱拟菱形藻 (*P. delicatissima*)。其中除巴西拟菱形藻外, 其它四种均为潜在产毒藻。除分析了从我国东南沿海分离的拟菱形藻外, 还综合比较了来自加拿大的 6 株有毒多列拟菱形藻 (*P. mutiseries*)。

2. 分析了上述 12 株拟菱形藻基于 SSUnrDNA、LSUnrDNA 和 5.8S rDNA 及转录间隔区(ITS1、ITS2)序列的遗传多样性。结果表明: SSUnrDNA 序列平均长度为 1745bp, 含有 103 个变异位点和 44 个简约信息位点; LSUnrDNA 平均长度为 822bp 含有 50 个变异位点和 32 个简约信息位点; 5.8S rDNA 及转录间隔区(ITS1、ITS2)的平均长度为 729.3bp, 有 439 (1209) 个变异位点和 401 (1209) 个简约信息位点。总体来说, 拟菱形藻的 SSUnrDNA 和 LSUnrDNA 较为保守, ITSnrDNA 变异性较大。柔弱拟菱形藻 (*P. delicatissima*) 的 LSUnrDNA 存在较明显的种内差异。其他 4 种拟菱形藻的 SSUnrDNA 和 LSUnrDNA 的种内差异性不大。

3. 通过软件预测 ITS 序列的二级结构并计算补偿性碱基改变 (CBCs: compensatory base changes)。通过对拟菱形藻的 ITS-1 和 ITS-2 二级结构的 CBCs

分析表明，来自长江口和来自厦门胡里山的尖刺拟菱形藻可能存在生殖隔离。

4.在系统发育的研究中，从用邻位相接法(NJ)、最大简约法(MP)和最小进化法(ME)所构建的系统进化树来看，多列拟菱形藻和尖刺拟菱形藻各为单系，而尖细拟菱形藻(*P. cuspidata*)和伪柔弱拟菱形藻(*P. pseudodelicatissima*)存在一个复合体，在基于三种基因的系统进化树中都无法区分出来。并通过对系统进化树的构建，探讨了拟菱形藻、菱形藻和拟脆杆藻的亲缘关系。结果表明拟脆杆藻与拟菱形藻之间的亲缘关系比拟菱形藻和菱形藻的之间亲缘关系更近。

关键词：拟菱形藻；多样性；nrDNA；DNA 二级结构；系统进化

ABSTRACT

Pseudo-nitzschia is a diatom genus with species which are red tide causative species with world-wide distribution. The *Pseudo-nitzschia* strains were isolated from Southeast China Sea and cultivated in lab. Morphological studies on *Pseudo-nitzschia* species include the morphological observation under LM, SEM and TEM, and the description of morphological characteristics and classification. As for the molecular study, the SSU nrDNA, LSU nrDNA and 5.8S, ITS rDNA gene sequences were clones, sequenced and then used as DNA markers for genetic analysis and phylogenetic studies. The main purpose of this dissertation centered on following five aspects: the morphological classification, molecular identification, the interspecies and intra species differences analysis, geographical genetic difference and phylogenetic relation. The main results were showed as follows:

12 strains of *Pseudo-nitzschia* isolated from the coast of Southeast China Sea including, Holiday Bay of Hainan, Hongkong, Daya bay of Guangzhou, Xiamen, Taiwan Strait and Yangtse River estuary. According to the morphological characters, five species were identified: *P. pungens*, *P. cuspidata*, *P. multistriata*, *P. braziliiana* and *P. delicatissima*. Except for *P. braziliiana*, other four species are potential toxic species. Besides these 12 *Pseudo-nitzschia* strains, six toxic *P. multiseriata* strains from Canada were also studied in this dissertation.

The genetic diversity of SSU nrDNA, LSU nrDNA, 5.8S rDNA and ITS were analysed and the phylogenetic tree based on these gene sequences were constructed. The results show that: the average length of SSU nrDNA is about 1745bp which contains 103 variable sites and 44 informative variable sites; the average length of LSU nrDNA is about 822bp which contains 50 variable sites and 32 informative variable sites; the average length of 5.8S rDNA and ITS gene sequence is about 822bp which contains 439 variable sites of 1209bp including gaps and 401 informative variable sites of 1209bp including gaps. As a whole, the SSU nrDNA and LSU nrDNA gene sequences are more conservative and 5.8S rDNA, ITS gene sequence is more variable in *Pseudo-nitzschia* species. The LSU nrDNA of *delicatissima* exist relatively high diversity within the same species. Except for *P. delicatissima*, the genetic diversity of

SSUnrDNA and LSUnrDNA within the same species of *Pseudo-nitzschia* species in this study are relatively low. According to the CBCs analysis of the ITS-1 and ITS-2 of strains in this study, the *P. pungens* from Xiamen and Yangze estuary may form reproductive isolation.

The secondary structure of ITS sequences were forecasted by Mold software online and their CBCs were calculated by cbsanalyzer software. According to the CBCs analysis of the ITS-1 and ITS-2 of strains in this study, the *P. pungens* from Xiamen and Yangze estuary may form reproductive isolation.

In the phylogeny study, the *P. multisereis* and *P. pungens* form monopoly respectively in all phylogenetic tree. And the *P. cuspidata* and *P. pseudodelicatissima* cannot be distinguished in all phylogenetic tree and form a complexity. According to the phylogeny tree, the phylogenetic relationship between the *Nitzschia*, *Fragilariopsis* and *Pseudo-nitzschia* were also explored. The results show that the phylogenetic relationship between *Fragilariopsis* and *Pseudo-nitzschia* is closer than that of *Nitzschia* and *Pseudo-nitzschia*.

Key words: *Pseudo-nitzschia*; nrDNA; diversity; the secondary structure of DNA; phylogeny

第一章 前言

拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia*) 是一类常见的海洋微藻, 属于硅藻门 (*Bacillariophyta*), 羽纹硅藻纲 (*Pennatae*), 管壳缝目 (*Aulonorphidinales*), 菱形藻科 (*Nitzschiaceae*), 广泛分布在两极、温带、亚热带和热带海域。1987年在加拿大的爱德华王子岛发生了第一起由拟菱形藻赤潮引发的中毒事件, 造成3人死亡, 100多人中毒。经研究发现拟菱形藻能产生一种神经性毒素—软骨藻酸 (Domoic acid, 简称DA), 它通过食物链进入贝类中, 由DA引起的贝毒称为记忆缺失性贝毒 (Amnesic Shellfish Poisoning, ASP)。人类食用了被软骨藻酸污染的贝类和鱼类引发呕吐、腹泻、神智不清、丧失记忆甚至死亡。在此之前人们仅发现蓝藻和甲藻能产生毒素, 这是第一次发现硅藻也能产生毒素。自此又相继出现拟菱形藻产软骨藻酸报道和软骨藻酸引起海洋中毒事件。人们意识到拟菱形藻赤潮是一种潜在的威胁, 因此加强了对拟菱形藻的研究, 在拟菱形藻形态和分子研究方面也有了较大的发展。

1.1 拟菱形藻的形态分类研究

“拟菱形藻”最早出现在1899年Peragallo H编写的书中, 归入菱形藻属 (*Nitzschia*)。但是由于拟菱形藻中的 *Nitzschia seriata* 和 *Nitzschia fraudulenta* 与菱形藻属其他种相比细胞末端更尖锐, 细胞相叠呈链状, 所以把它们独立出来成为拟菱形藻属。后来因为其他形态学上的争论, Hustedt又在1958年把它们重新归为菱形藻属的一部分。因为拟菱形藻和拟脆杆藻 (*Fragilariopsis*) 之间在形态上具有很大相似性, Hasle在1972年把 *Fragilariopsis* 也归为菱形藻的一个部分, 而Round等因为 *Fragilariopsis* 在形态上和菱形藻仍存在一定的差别, 所以建议还是将其保留为单一属。Hasle在比较了拟菱形藻和菱形藻某些亚属 (包括 *Nitzschia sigmoideae*、*Nitzschia spathulatae* 和 *Nitzschia dissipatae*) 的形态学特征后, 重新建议将拟菱形藻作为一个单独的属。直到1994年, 本属又重新恢复了属的分类地位 (Hasle, 1994)。由此可见, 拟菱形藻的分类地位一直存在争议。拟菱形藻的形态上的细微差别是进行分类的重要依据, 也是引起分类争议的重要原因。

拟菱形藻在属水平的鉴定在光学显微镜下就可以完成, 但是拟菱形藻属种间的形态分类必须利用硅质壳上细微结构的差别来区分的。主要的形态学区别特征是: 群体间细胞相连部分的比例, 壳面外形, 点条纹的组成特征, 肋纹、孔纹和

肋突的密度,壳端形状,有无中央较大船骨点,孔纹形状、密度和内部结构(李扬,2006)。这些细微结构无法在光学显微镜下区分,必须由熟练的专业人员利用电子显微镜,对拟菱形藻进行鉴定。细胞壳面的宽度被作为一个重要的拟菱形藻的种间鉴定特征,根据壳面的宽度拟菱形藻可分为两个类群(Skov J,1999)宽度 $>3\mu\text{m}$ 的为*Pseudo-nitzschia seriata* group包括:*P. seriata.f.seriata*,
P. seriata.f.obtusa,*P. australis*,*P. pungens*,*P. multiseriis*,*P. pungiformis*,
P. fraudulent,*P. subfraulent*,*P. pacifica*,*P. hemii*;壳面宽度 $<3\mu\text{m}$ 的为
Pseudo-nitzschia delicatissima group 包括:*P. delicatissima*,*P. pseudodelicatissima*,
P. cuspidata,*P. lineola*,*P. turgidula*,*P. turgiduloide*,*P. inflatula*。这种分类对于壳面宽度明显大于或小于 $3\mu\text{m}$ 的典型拟菱形藻种比较适用,但对于那些壳面宽度范围刚好介于 $3\mu\text{m}$ 的拟菱形藻种,这种分类方法就有它的局限性。而且硅藻中细胞壳面的大小范围在由于他们的特有细胞分隔可能会非常宽,使得这种简单的以细胞宽度为主要类群分类依据有较大的局限性。

随着技术水平的提高,各国学者对拟菱形藻的研究进一步深入,陆续发现了一些新的种类。例如曾经被认为是同一种的*P. pungens*和*P. multiseriis*通过在电子显微镜的帮助下,得以区分。至今为止,国际上报道的拟菱形藻种类已达到30个种(Lundholm *et al.*,2003, Gao *et al.*,2006)(见表1.1)。目前发现共有*P. australis*,*P. turgidula*,*P. cuspidata*,*P. delicatissima*,*P. multiseriis*,*P. multistriata*,*P. pseudodelicatissima*,*P. fraudulent*,*P. pungens*,*P. seriata*,*P. calliantha* 11种拟菱形藻具有产生DA的能力(Johanna fehling *et al.*,2004)。*P. pseudodelicatissima*是否能产生DA还存在争议。

表 1.1 拟菱形藻属已记录的种类（加下划线者示潜在有毒种）
 Tab 1.1 The recorded 30 *Pseudo-nitzschia* species(The species with the line are the potential toxic species)

拉丁名 Species name	中文名(Species name in Chinese)	分布
<i>P. americana</i> (Hasle) Fryxell, 1993	美洲拟菱形藻	南美洲: 乌拉圭 (Lundholm et al.,2002) 欧洲: 荷兰 (Lundholm et al.,2002) 北美洲: 美国加利福尼亚 (Lundholm et al.,2002) , Rhode 岛 (Lundholm et al.,2002) 南美洲: 智利 (Lundholm et al.,2002) , 乌拉圭 (Lundholm et al.,2002) 非洲: 南非 (Lundholm et al.,2002) 东南亚: 越南 (Lundholm et al.,2002) 亚洲: 日本 (Lundholm et al.,2002) 中国 (李扬, 2006)
<i>P. antarctica</i> Manguin, 1978		南极洲 (Van L& Sam L,1978)
<u><i>P. australis</i></u> Frenguelli, 1973	澳洲拟菱形藻	欧洲: 爱尔兰 (Cusack, Raine, & Patching,2004) 葡萄牙 (Hasle & Lundholm 2005, Lundholm et al.,2006) 北美洲: 美国加利福尼亚州 (Hasle & Lundholm,2005) 华盛顿 (Hasle & Lundholm,2005) 南美: 智利 (Hasle & Lundholm,2005) 非洲: 南非 (Hasle & Lundholm,2005) 亚洲: 中国 (Qi Y. Z,1994)
<i>P. brasiliiana</i> Lundholm,Hasle et Fryxell, 2002	巴西拟菱形藻	北美洲: 墨西哥 (Lundholm et al.,2002) 田纳西洲 (Lundholm et al.,2002) 中美洲: 巴拿马 (Lundholm et al.,2002) 南美:巴西 (Lundholm et al.,2002) 亚洲: 韩国 (Lundholm et al.,2002) 中国 (李扬, 2006)
<i>P. caciantha</i> Lundholm, Moestrup et Hasle, 2003	花形拟菱形藻	加拿大 (Irena K et al.,2005) 墨西哥 (Lundholm N, Moestrup Ø,2003) 意大利 (Amato et al.,2007)
<u><i>P.calliantha</i></u> Lundholm, Moestrup et Hasle, 2003	靛纹拟菱形藻	亚洲:越南 (Hasle & Lundholm 2005, Lundholm et al., 2006) 中国 (李扬, 2006)
<u><i>P. cuspidata</i></u> (Hasle). 1993	尖细拟菱形藻	大西洋岛屿: Canary 岛 (Lundholm et al.,2006.) 北美洲:墨西哥 (Lundholm et al.,2006) 澳大利亚新南威尔士 (Lundholm et al.,2006)
<i>P. decipiens</i> Lundholm et Moestrup, 2006		北美洲:墨西 (Cusack et al.,2004;Lundholm et al.,2006) 大西洋岛屿: Canary 岛 (Lundholm et al.,2006)
<u><i>P. delicatissima</i></u> (Cleve) Heiden, 1928	柔弱拟菱形藻	欧洲: 罗马尼亚 (Caraus 2002) ,西班牙 (Varela et al.,1982) 欧洲: 丹麦 ((Hasle & Lundholm 2005, Lundholm et al.,2006) 爱尔兰 (Cusack, Raine, & Patching,2004) 意大利 (Amato et al 2005, Lundholm et al.,2006) 葡萄牙 (Lundholm et al.,2006) 西班牙 (Amato et al.,2005) 北美洲:墨西哥 (Lundholm et al.,2006) 亚洲: 中国香港 (Lundholm et al.,2006) 日本 (Lundholm et al.,2006)
<i>P. dolorosa</i> Lundholm et Moestrup, 2006		欧洲: 爱尔兰 (Lundholm et al.,2006) 意大利 (Lundholm et al.,2006) 葡萄牙 (Lundholm et al.,2006) 北美洲: 美国加利福尼亚 (Lundholm et al.,2006)
<u><i>P. fraudulent</i></u> (Cleve) Hasle, 1965		澳大利亚 (Hallegraeff et al.,1994) 美国加利福尼亚州 (Villac et al.,1996) 墨西哥 (Hernández-Becerrill et al.,1998) 新西兰 (Rhodes et al.,1998) 阿根廷 (Ferrario et al.,2002)

		爱尔兰 (Cusack et al.,2004;Skov et al.,1999) 斯卡格拉克海峡(在丹麦日德兰半岛与挪威南部之间 Hasle, Lange & Syvertsen,1996)
<i>P. galaxiae</i> Lundholm et Moestrup, 2002		北美洲:墨西哥(Lundholm & Moestrup 2002;Lundholm et al.,2006) 澳大利亚新南威尔士(Lundholm & Moestrup 2002;Lundholm et a.,2006)
<i>P. granii</i> (Hasle) Hasle, 1964		
<i>P. heimii</i> Manguin, 1957	海氏拟菱形藻	欧洲沿岸国家, 如德国、英国、挪威等 (李扬, 2006)
<i>P. inflatula</i> (Hasle) Hasle, 1965		泰国 (Nina L et al.,2002)
<i>P. linea</i> Lundholm, Hasle et Fryxell, 2002	线形拟菱形藻	香港吐露港 (李扬, 2006) 墨西哥湾 (Apalache Bay and Tampa Bay) 哥斯达黎加加勒比海沿岸, Narragansett Bay 以及越南 (Halong Bay) (李扬, 2006)
<i>P. lineola</i> (Cleve) Hasle, 2002		南大洋大西洋部分 (21°E, 47°S) (Philipp A et al.,2007) 威德尔海(南极洲的边缘海,在南极半岛同科茨地之间) (Gasto'n O et al.,2008)
<i>P. micropora</i> Priisholm et Moestrup, 2002		越南 (Nina L et al.,2002)
<i>P. multiseris</i> (Hasle) Hasle, 1995	多列拟菱形藻	欧洲: 丹麦 (Evans et al.,2004), 德国 (Evans et al.,2004), 爱尔兰(Cusack, Raine, & Patching,2004) 北美洲: 美国加利福尼亚州 (Hasle & Lundholm 2005;Lundholm et al.,2006), New Brunswick (Evans et al. 2004), Nova Scotia (Kim, Garbary & McLachlan 2004, Evans et al. 2004), Prince Edward岛 (Evans et al. 2004) 亚洲: 日本 (Hasle & Lundholm,2005) 俄罗斯 (Evans et al.,2004) 中国香港 (Yang & Hodgkiss,2002)
<i>P. multistriata</i> (Takano) Takano, 1993	多纹拟菱形藻	意大利 (Orsini et al., 2002) 日本 (Takano,1993) 新西兰 (Rhodes et al.,2000) 中国香港 (Yang & Hodgkiss,2002) 法国 (E.nezan et al.,2007)
<i>P. obtusa</i> (Hasle) Hasle et Lundholm, 1965		欧洲: 挪威 (Hasle & Lundholm,2005) 俄罗斯 (Hasle & Lundholm,2005)
<i>P. prolongatoides</i> (Hasle) Hasle, 1965		Antarctic and the subantarctic islands: Antarctica (Scott & Thomas,2005).
<i>P. pseudodelicatissima</i> (Hasle) Hasle emend, 2003	拟柔弱拟菱形藻	欧洲: 法国 (Bornet et al.,2005) 爱尔兰 (Cusack, Raine, & Patching,2004) 葡萄牙 (Hasle & Lundholm 2005, Lundholm et al.,2006) 中国香港 (Yang & Hodgkiss,2002)
<i>P. pungens</i> (Cleve) Hasle, 1993	尖刺拟菱形藻	欧洲: 比利时 (Chepurnov et al.,2006), 法国 (Chepurnov et al.,2006), 德国 (Evans et al.,2005), 爱尔兰 (Cusack, Raine & Patching,2004), 荷兰 (Chepurnov et al.,2006), 葡萄牙 (Hasle & Lundholm 2005;Lundholm et al., 2006) 大西洋岛: Canary 岛 (Gil-Rodríguez et al.,2003). 美洲: 墨西哥 (Lundholm et al.,2006); 阿根廷 (V.Sastre,2007) 东南亚: 越南 (Hasle & Lundholm.,2005) 中国香港 (Yang & Hodgkiss,2002)
<i>P. pungiformis</i> (Hasle) Hasle, 1971		爱尔兰 (Colin Pybus,1996)
<i>P. seriata</i> (Cleve) Peragallo f. <i>seriata</i> Lundholm et al., 1994	成列拟菱形藻	<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> f. <i>obtusata</i> (Hasle) Hasle 欧洲: 罗马尼亚 (Caraus et al.,2002) 西班牙 (Varela et al.,1982) <i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (Cleve) H. Peragallo 欧洲: 丹麦 (Hasle & Lundholm 2005, Lundholm et al.,2006) 格陵兰岛 (Hasle & Lundholm,2005) 爱尔兰 (Cusack et al.,2004) 挪威 (Hasle & Lundholm,2005) 大西洋 Canary岛 (Gil-Rodríguez et al.,2003) 北美洲: Nova Scotia (Kim et al.,2004) 中国广东 (钱宏林, 1998)
<i>P. sinica</i> Qi et Wang, 1996	中华拟菱形藻	中国广东 (Qi Y Z,Wang J& Zheng L,1996)

<i>P. subcurvata</i> (Hasle) Fryxell, 1964		南极和亚南极 (Scott & Thomas 2005), Ross Sea (Lundholm et al 2006)
<i>P. subfraudulenta</i> (Hasle) Hasle, 1965	亚伪善拟菱形藻	主要分布在沿岸海域, 大西洋、太平洋和印度洋沿岸水域均有记录 (李扬, 2006) 中国香港 (李扬, 2006)
<i>P. subpacificica</i> (Hasle) Hasle, 1965		欧洲: 爱尔兰 (Cusack et al.,2004), 西班牙 (Hasle & Lundholm 2005;Lundholm et al.,2006) 法国 (E.nezan et al.,2007) 中国香港 (Yang & Hodgkiss,2002)
<i>P. turgidula</i> (Hustedt) Hasle, 1993		南极洲 (Scott & Thomas,2005) 中国香港 (Yang & Hodgkiss,2002)
<i>P. turgiduloides</i> (Hasle) Hasle, 1997		南极洲 (Akira Ishikawa,2000) 阿根廷 (Gasto'n O. Almandoz et al.,2007)

拟菱形藻是中国东南沿海常见和多发的赤潮原因种之一。1965 年金德祥首次对中国海域发现的拟菱形藻进行了描述, 分别为 *P. pungens* 和 *P. delicatissima* (原命名为 *N. pungens* 和 *N. delicatissima*) (金德祥, 1965)。20 世纪 90 年代初, 随着广东沿海拟菱形藻赤潮频发, 拟菱形藻也逐渐成为了人们的关注热点。Qi Y. Z (1994) 等报道了我国沿海的一个拟菱形藻新种 *P. sinica*(中华拟菱形藻)及其赤潮生态学特征。钱宏林等在对广东沿海赤潮的特点及成因研究中列出了广东近海主要赤潮生物名录,记录了拟菱形藻属的 7 个种:*P. australis*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. multiseriis*, *P. seriata*, *P. sinica*。Yang & Hodgkiss (2002) 在香港水域记录了 8 种拟菱形藻: *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. turgidula*, *P. subpacificica*, *P. subfraudulenta*, *P. delicatissima*, *P. multistriata*, *P. multiseriis*。王金辉 (1998) 等曾报道了长江口海域的 4 种拟菱形藻: *P. pungens*, *P. multiseriis*, *P. delicatissima*, *P. multistriata*。李扬在我国近海海域共鉴定到 13 个拟菱形藻种类: *P. americana*(美洲拟菱形藻), *P. brasiliiana*(巴西拟菱形藻), *P. cacialantha*(花形拟菱形藻), *P. calliantha*(靛纹拟菱形藻), *P. cuspidata*(尖细拟菱形藻), *P. delicatissima*(柔弱拟菱形藻), *P. heimii*(海氏拟菱形藻), *P. lineata*(线形拟菱形藻), *P. multiseriis*(多列拟菱形藻), *P. multistriata*(多纹拟菱形藻), *P. subfraudulenta*(亚伪善拟菱形藻), *P. pseudodelitissima*(拟柔弱拟菱形藻)和 *P. pungens*(尖刺拟菱形藻)(李扬, 2006)。

综上所述, 中国海域目前已记录的拟菱形藻有 18 种 (见表 1.2), 在上述世界范围内有毒拟菱形藻藻种中, 中国曾报道过其中的 9 种: *P. australis*, *P. turgidula*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. seriata*, *P. delicatissima*, *P. multistriata*, *P. multiseriis*, *P. calliantha* (Gao et al.,2006; 李扬, 2006)。关于拟菱形藻软骨藻酸的理化性质、中毒机理、毒素产生与藻类生长的关系等方面研究

已有很多报道 (Bates, 1998; Bates et al., 1989, 1998; 刘伟斌、杜琦, 1997; 杨平、李秀兰, 1998; 虞秋波、高亚辉, 2003)。但是目前仍未发现中国有毒拟菱形藻藻种。同一个种, 不同的株系, 产毒能力差别很大, 在中国以外的其它海域引发过中毒事件的拟菱形藻藻种在中国海域目前还未检测其能产毒。到目前为止, 在中国尚无由拟菱形藻引发的中毒事件的相关报导。与此同时, 中国在 DA 检测方面所做的尝试非常少。Yang & Hodgkiss (2002) 对从香港水域分离获得的 8 种拟菱形藻, 利用 HPLC 法检测了除 *P. multiseries* 以外的七个种, Li Aifeng 等 (2005) 曾对一株分离自长江口水域的尖刺拟菱形藻做过初步的检测, 但均未检测到毒素存在。杨军霞用 HPLC 法检测了我国东南沿海分离获得的 4 种拟菱形藻, 也未检测到毒素的存在 (杨军霞, 2007)。而有关拟菱形藻属的分类系统则比较混乱, 形态学种类鉴定也比较困难, 国内外对其种类界定尚无统一认识, 且产毒种和非产毒种的形态学很难区分。有时, 同种拟菱形藻, 有的株系会产毒, 有的株系并不产毒, 但两者的差别很难辨别, 从而影响了对拟菱形藻引发赤潮的研究。

表 1.2 目前中国海域已记录的拟菱形藻种类与分布

Tab 1.2 The recorded *Pseudo-nitzschia* species and their distribution in China

种类 Species name	分布 Distribution
美洲拟菱形藻 <i>P. americana</i>	厦门胡里山 (李扬, 2006), 香港吐露港 (李扬, 2006)
巴西拟菱形藻 <i>P. brasiliiana</i>	福建厦门港宝珠屿、胡里山 (李扬, 2006), 广东大亚湾 (李扬, 2006) 香港吐露港 (李扬, 2006), 海南假日海湾 (本研究)
花形拟菱形藻 <i>P. caciaantha</i>	香港吐露港 (李扬, 2006)
靛纹拟菱形藻 <i>P. calliantha</i>	香港吐露港 (李扬, 2006)
尖细拟菱形藻 <i>P. cuspidata</i>	香港吐露港 (李扬, 2006), 广东大亚湾 (李扬, 2006), 海南假日海湾 (本研究)
柔弱拟菱形藻 <i>P. delicatissima</i>	长江口海域 (李扬, 2006; 本研究); 香港 (Yang & Hodgkiss, 2002; 李扬, 2006); 台湾海峡 (本研究); 广东 (钱宏林, 2000)
海氏拟菱形藻 <i>P. heimii</i>	香港海域 (李扬, 2006)
线形拟菱形藻 <i>P. linea</i>	香港海域 (李扬, 2006)
多列拟菱形藻 <i>P. multiseries</i>	广东 (钱宏林, 2000), 香港 (Yang & Hodgkiss, 2002; 李扬, 2006), 长江口海域 (李扬, 2006; 王金辉, 2006)
多纹拟菱形藻 <i>P. multistriata</i>	广东大亚湾 (李扬, 2006), 香港 (李扬, 2006; Yang & Hodgkiss, 2002) 海南假日海湾 (本研究), 长江口海域 (王金辉, 2006)
亚伪善拟菱形藻 <i>P. subfraudulenta</i>	长江口海域 (李扬, 2006)
拟柔弱拟菱形藻	长江口海域 (李扬, 2006), 香港 (李扬, 2006)

<i>P. pseudodelitissima</i>	
尖刺拟菱形藻 <i>P. pungens</i>	长江口海域 (李扬, 2006; 王金辉, 2006), 香港海域 (Yang & Hodgkiss, 2000; 李扬, 2006), 厦门胡里山 (本研究); 广东 (钱宏林, 2000)
<i>P. subpacific</i>	香港 (Yang & Hodgkiss, 2002)
<i>P. australis</i> 澳洲拟菱形藻	广东 (钱宏林, 2000)
<i>P. sinica</i> 中华拟菱形藻	广东 (Qi et Wang, 1996)
<i>P. seriata</i> 成列拟菱形藻	香港 (Yang & Hodgkiss, 2002), 广东 (钱宏林, 2000)
<i>P. turgidula</i>	香港 (Yang & Hodgkiss, 2002)

1.2 拟菱形藻的分子分类及系统进化研究

1.2.1 nrDNA 序列简介

随着分子生物学的飞速发展,分子生物学技术在生物学的各个领域有着越来越广泛的应用。在所有的的方法中,DNA序列的比较分析是最直接的揭示遗传物质变异的方法。本质上来说,生物个体的不同取决于遗传物质基因组DNA碱基序列的差异(包括不同种个体之间和同种不同个体之间)。DNA序列不仅可以用于种类的分子鉴定,还可用于研究宏观的分子系统进化和种内差异的研究,更重要的是DNA序列数据保存于Genbank后,便于和后续研究的数据比较。分子技术引入拟菱形藻传统分类研究中,能弥补其不足之处:1)拟菱形藻的形态鉴定需要在电子显微镜下完成,需要经验丰富的研究者。2)形态差异是由基因和环境相互作用造成的,某些形态上的差异不是种间差异,而是由环境差异引起的。单靠形态的差异作为判断,容易得出错误的结果,需要分子手段进行综合分析。

生物的基因组DNA很庞大,对于一般物种的分子分类,在传统分类的基础上,选择有代表性的基因序列(包含一个或几个基因序列)作为分类标准,用不同的分子生物学技术来区分种内株、系之间,群体之间的遗传差异,以及种以上单元的遗传差异就成为当前研究的主要方向。

在微藻中研究和应用最多的是核糖体DNA(简称nrDNA)。真核生物的核糖体DNA为串联重复序列,约100-200个拷贝,成簇排列在一起,由18SnrDNA(LSU),5.8SnrDNA和28SnrDNA(SSU)组成一个转录单位,产生一个前体RNA。在形成rRNA时,第一内转录间隔区(简称ITS-1位于5.8S和18SnrDNA之间),第二转录间隔区(简称ITS-2位于5.8SnrDNA和28SnrDNA之间)被剪切。ITS区包括ITS-1和ITS-2,通常将ITS-1、5.8SrRNA和ITS-1统称为ITS,ITS虽对nrDNA的成熟有

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库