

台湾海峡隆氏拟菱形藻的物种信息和毒性特征

董焕嫦, 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, 广东 广州 510631)

摘要:为丰富我国海域产毒拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia*)的物种多样性,并了解其毒性特征,于2017年5月在台湾海峡建立了4个拟菱形藻培养株系.利用光镜和透射电镜观察了形态学特征,构建了基于核糖体转录间隔区的分子系统树,预测了第二间隔区转录RNA的二级结构.结合形态学和分子生物学数据,报道了我国拟菱形藻属的1个新记录种:隆氏拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia lundholmiae*).该种的典型形态特征是壳面披针形,具有中央较大船骨点,点条纹由一排孔纹组成,孔纹多分为2个部分.采用高效液相色谱-质谱联用法检测了藻株的多莫酸(domoiic acid, DA)特征,有1个株系检测到DA,单细胞产毒水平为2.3 fg.利用卤虫(*Artemia salina*)和强额拟哲水蚤(*Paracalanus crassirostris*)混合培养来探索隆氏拟菱形藻的产毒特征,发现均能提高其DA水平,增强幅度在3~4倍之间.本研究丰富了我国产毒拟菱形藻的物种多样性,明确了隆氏拟菱形藻的毒性特征和产毒水平,可为后续深入研究提供基础数据.

关键词:海洋生物学;隆氏拟菱形藻;物种多样性;形态;核糖体转录间隔区;多莫酸;台湾海峡

DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2019. 01. 002

中图分类号:P735

文献标识码:A

文章编号:2095-4972(2019)01-0014-07

拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia*)是一类近岸海域常见浮游硅藻,部分物种可产生记忆缺失性贝毒(amesic shellfish poisoning, ASP)——多莫酸(domoiic acid, DA),因而备受关注^[1-2].目前,该属已报道49个物种,其中26个能够产生DA^[3-5].

以往研究已证实,拟菱形藻的分布是全球性的,DA的分布也是全球性的^[1-2].北美、欧洲等国的研究相对较多^[1-2],均报道了丰富的产毒物种.近年成为研究热点的马来西亚海域,也陆续报道5种产毒拟菱形藻^[3].我国的相关研究还十分有限,目前仅报道了2个产毒种:伪装拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia simulans*)^[5]和福氏拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia fukuyoi*)^[6],产毒物种的多样性明显偏低.然而另一方面,我国多个沿海地区的海产品中已陆续有DA的检出^[7-8],但其生物来源尚不清楚.因此,有必要加大对我国海域产毒拟菱形藻的关注,尽快了解其真实的物种多样性和产毒特征.

本研究基于建立的拟菱形藻单克隆培养株系,

采集形态特征和分子遗传信息,以确保物种的准确鉴定.通过浮游动物诱导产毒能力,继而检测DA含量.报道了我国产毒拟菱形藻的一个新记录种:隆氏拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia lundholmiae*),提供了较为详细的物种信息和产毒特征,丰富了我国产毒拟菱形藻的物种多样性.

1 材料与方法

1.1 样品采集与单克隆株系的建立

搭载国家自然科学基金委台湾海峡春季共享航次(2017年5月25日),采用浮游植物网(孔径10 μm)采集活体样品.利用微吸管挑取拟菱形藻的单个细胞或单条链状群体,经过多次水洗和纯化,最后转移至盛有L培养基的细胞培养板中^[9],培养条件为光照强度50~80 lx、光周期为12h:12h,温度20℃.以MC(marine collection)序列进行编号.本研究共建立4个单克隆培养株系,采样站位于25°25'N,119°89'E.

收稿日期:2018-03-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31570205,31370235);广州市科技计划资助项目(201607010370)

作者简介:董焕嫦(1993—),女,硕士研究生;E-mail:460324827@qq.com

通讯作者:李扬(1978—),男,博士,研究员;E-mail:liyong@senu.edu.cn

1.2 形态学观察

取 0.1 cm^3 对数期藻液,置于 Olympus BX53 光学显微镜 (LM) 下观察和拍照。取 2 cm^3 对数期藻液,加入等体积浓盐酸, 100°C 水浴约 10 min,加蒸馏水稀释多次至中性^[10]。吸取 10 mm^3 处理后样品,均匀平铺在喷镀碳膜的铜网上,自然晾干后,在 JEM-1010 透射电子显微镜 (TEM) 下观察和拍照。

1.3 分子系统学研究

吸取培养瓶底部藻液,离心后弃上清液,提取藻细胞总 DNA^[11]。选取引物 ITS1、ITS4 扩增核糖体转录间隔区^[12]。PCR 产物送至华大基因 (BGI) 测序。从美国国家生物信息中心 (NCBI) 下载拟菱形藻 ITS 序列。序列的比对和矩阵由 BioEdit 执行^[13]。利用 MrModeltest 2.3 计算最适模型,分别采用 MrBayes 3.2^[14] 和 RAxML-HPC2^[15] 构建贝叶斯推理树 (Bayesian Inference, BI) 和最大似然树 (Maximum Likelihood, ML)。

1.4 ITS2 二级结构的预测及 CBC 分析

本研究中以亲缘邻近种伪柔弱拟菱形藻 (*P. pseudodelicatissima*) 的 ITS2-RNA 二级结构为模板,使用 ITS2 Database^[16] 预测隆氏拟菱形藻的二级结构,并与其亲缘关系最近的拟菱形藻物种进行比较。利用 VARNA^[17] 观察并下载二级结构,使用 4SALE v. 1.7^[18] 观察补偿性碱基变化 (compensatory base changes, CBC)、半补偿性碱基改变 (hemi-CBC) 或单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。

1.5 卤虫和哲水蚤的培养及诱导

卤虫的培养:购买商品化卤虫 (*Artemia salina*) 卵,用 $200 \text{ mg}/\text{dm}^3$ 的福尔马林溶液浸泡消毒 30 min,用灭菌人工海水清洗多次,移至 L 培养基中,培养条件参见“1.1”。约 2 d 后,卵孵化并发育为成虫,转移至装有培养基的大烧杯中备用。

强额拟哲水蚤 (*Paracalanus crassirostris*) 的培养:于 2017 年 8 月,采用 $200 \mu\text{m}$ WP-2 浮游生物网在广东南澳岛海域采集活体浮游动物样品,挑取哲水蚤优势物种。本研究挑取的优势种是强额拟哲水蚤。将强额拟哲水蚤放到装有培养基的大烧杯中培养备用^[19]。

诱导实验:将目标藻株转移至 700 cm^3 培养瓶中扩大培养,诱导实验开始之前,调整细胞密度为 $1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{dm}^3$ 。分别转移 20 个卤虫或 10 个强额拟哲水蚤到培养瓶中,将培养瓶固定在旋转式培养架上,培养条件参见“1.1”。

1.6 LC-MS/MS 法检测藻毒素

分别对纯种培养藻株和浮游动物诱导藻株进行 DA 的检测。对于纯种培养藻株,在培养至稳定期 (约 21 d 左右),取大约 200 cm^3 藻液,经 $0.22 \mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜过滤,用超声波破碎仪冰浴破碎 3 ~ 5 min,于 -20°C 下保存备用,详细方法参照黄春秀等 (2017) 的方法^[6]。对于浮游动物诱导藻株,在混合培养的第 8 天,收集 200 cm^3 藻液,经 $0.22 \mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜过滤,采用上述方法进行 DA 的提取。样品送至农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室,采用高效液相色谱-质谱联用法 (LC-MS/MS) 检测 DA 含量,本方法的检测下限为 $10 \text{ ng}/\text{cm}^3$ 。

2 结果与讨论

2.1 形态学描述

隆氏拟菱形藻 (图 1) 可形成阶梯状群体,重叠区约为壳面纵轴的 $1/7 \sim 1/5$ (图 1a)。光镜下,细胞含有两个色素体,壳面稍微呈“S”形,两端分别向相反方向弯曲 (图 1b)。电镜下,壳面呈披针形 (图 1c),壳端尖 (图 1d)。壳面长 $77 \sim 80 \mu\text{m}$,宽 $2.2 \sim 2.4 \mu\text{m}$ ($n = 20$)。管壳缝位于壳面边缘,有 1 个中央较大船骨点 (图 1e)。肋突分布不规则 (图 1d、e), $10 \mu\text{m}$ 内 17 ~ 19 条。点条纹由 1 排孔纹组成 (图 1f),其密度为 $10 \mu\text{m}$ 内 29 ~ 32 个。孔纹密度为 4 ~ 5 个/ μm ,每个孔纹内部分为 1 ~ 3 部分,多数为上下两部分 (图 1f),少数分为 3 个或 1 个 (图 1e)。具有 3 条环带 (图 1g),壳环带宽 2 个孔纹,高 2 ~ 3 个孔纹,点条纹密度 $10 \mu\text{m}$ 内 38 ~ 39 条。第 2 条环带高 1 ~ 2 个孔纹,宽 1 ~ 2 个孔纹。第 3 条环带的孔纹退化。海水浮游生活。本研究中样品采自台湾海峡 ($25^\circ25' \text{N}$, $119^\circ89' \text{E}$, 5 月)。本种首次报道于马来西亚 Perak 水域^[12],马来西亚婆罗洲水域也有分布^[4]。

2.2 基于 ITS 序列的分子系统学分析

ML 树和 BI 树的拓扑结构一致,将二者合并成图 2。本研究 4 个株系 (MC4216、MC4217、MC4218 和 MC4219) 的 ITS 碱基序列 (序列号分别为 MH836625、MH836624、MH836626、MH836627) 完全相同。分子系统树中,它们与隆氏拟菱形藻的模式株 (KC147523)、另一个马来西亚株系 (KC147526) 聚在一起,具有较高的置信值 (BI 的置信值为 1, ML 值为 100),但本研究 4 个株系与马来西亚株系 (KC147523 和 KC147526) 之间有 3 个差异碱基。

2.3 基于 ITS2 二级结构的分析

本研究选择 MC4218 株系的 ITS2 序列,构建 ITS2-RNA 二级结构。该结构符合拟菱形藻属 ITS2

二级结构典型特征(图 3),具有 4 个单环(Helix I、Helix II、Helix III、Helix IV)和一个拟环 Helix II a,表明所预测的二级结构是可信的.本研究株系 MC4218 的二级结构与隆氏拟菱形藻模式株系 PnTb10 完全一致,未见 CBC、hemi-CBC 或 SNP 差

异,说明 ITS2-RNA 二级结构分析再次验证了形态学和分子分类学的鉴定结果.与隆氏拟菱形藻亲缘关系最为接近的是伪柔弱拟菱形藻,两者的二级结构存在 1 个 CBC 差异和 7 个 HCBC 差异.

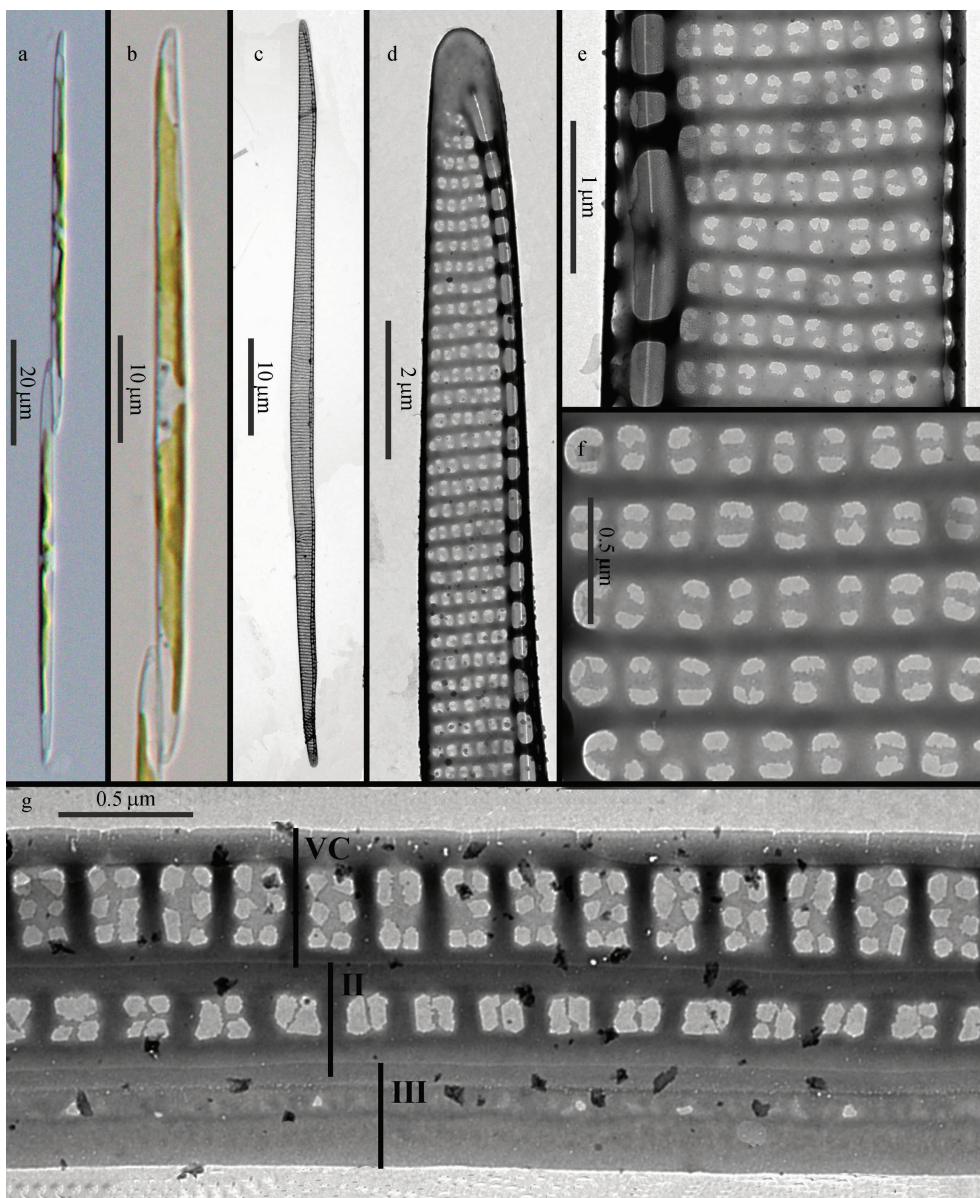


图 1 隆氏拟菱形藻的形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Pseudo-nitzschia lundholmiae*

图 a、b 为 LM 图, a. 链状群体环面观, b. 环面观; 图 c - g 为 TEM 图, c. 壳面, d. 壳端, e. 壳面中部, f. 孔纹结构, g. 环带; VC 为壳环带, II 为第 2 条环带, III 为第 3 条环带

2.4 DA 产毒分析

分别检测了隆氏拟菱形藻的纯种培养株系和浮游动物混培诱导株系的 DA 含量,详细检出结果见表 1.

隆氏拟菱形藻的纯种培养株系中,3 个株系(MC4216、MC4217、MC4219)没有检出 DA,仅有

MC4218 检出 DA,单细胞产毒量为 2.3 fg. 分别将卤虫和强额拟哲水蚤与株系 MC4218 混合培养,发现该株系的产毒量均有所提高. 卤虫诱导条件下,单细胞产毒由 2.3 fg 升至 8.2 fg,提升幅度约为 3 倍. 强额拟哲水蚤诱导条件下,单细胞产毒量由 2.3 fg 升至 9.8 fg,提升幅度约为 4 倍.



图2 由核糖体转录间隔区构建的系统发育树

Fig. 2 Molecular phylogeny tree based on ITS-rRNA sequences

节点数值为BI概率和ML置信值

2.5 讨论

2.5.1 隆氏拟菱形藻与相似种的比较 隆氏拟菱形藻首次报道于马来西亚 Perak 水域^[12],其主要形态学特征,如壳面宽度、肋突、点条纹、孔纹密度等,均与本研究株系一致.本研究株系的壳面纵轴(77~80 μm)略长于马来西亚株系(63~73 μm),但对于硅藻来说,壳面纵轴可有较大的变化范围,不具有显著的分类学意义.

根据“壳面点条纹由单排孔纹构成”的特征,隆氏拟菱形藻隶属于伪柔弱拟菱形藻复合群(*P. pseudodelicatissima* complex).该复合群目前已报道23个物种^[3],物种之间的主要区别在于孔纹内部结构.隆氏拟菱形藻的孔纹内部分为1~3部分,多为上下2部分,该特征与伪柔弱拟菱形藻(*P. pseudodelicatissima*)、阿巴拟菱形藻(*P. abrensii*)、尖细拟菱形藻(*P. cuspidata*)、中华拟菱形藻(*P. sinica*)较为相

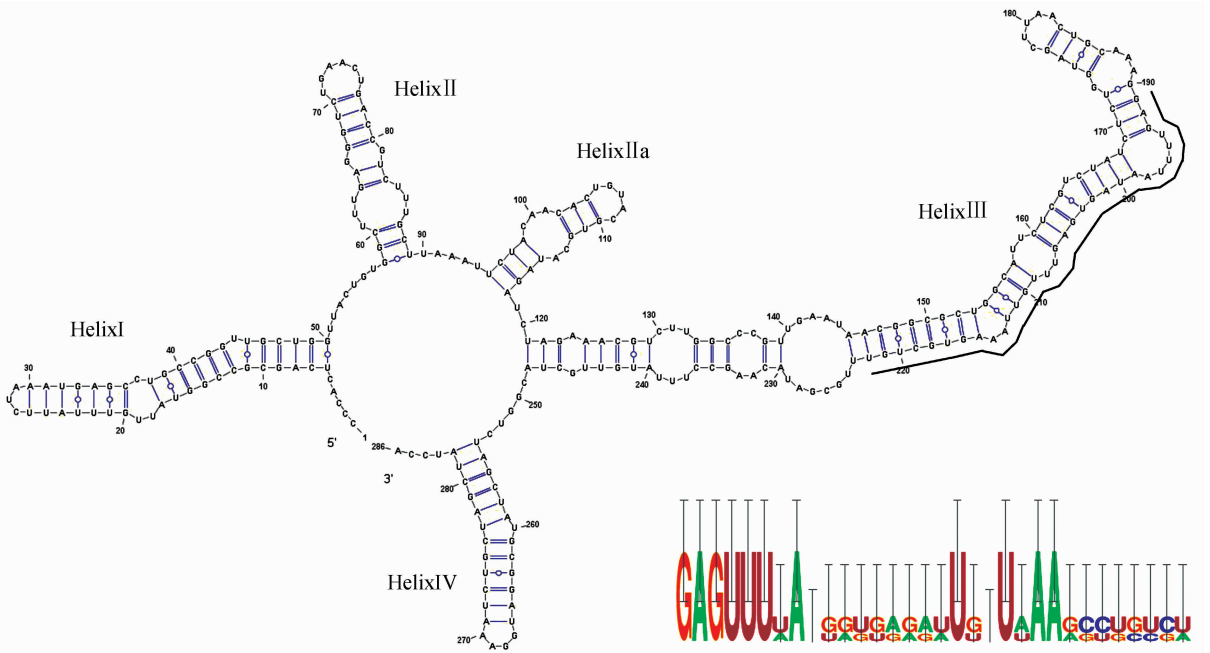


图 3 隆氏拟菱形藻 MC4218 株系的 ITS2-RNA 二级结构

Fig. 3 ITS2-RNA secondary structure in strain MC4218 of *Pseudo-nitzschia lundholmiae*

右侧黑实线标出的碱基是隆氏拟菱形藻与其亲缘关系最为接近的两个物种(伪柔弱拟菱形藻和尖细拟菱形藻)特异性标记区段中碱基的合并,突出三者在该区段的碱基差异情况

表 1 不同株系隆氏拟菱形藻的 DA 含量

Tab. 1 DA concentration detected in different samples of *Pseudo-nitzschia lundholmiae*

| 株条 | 浮游动物 | 检出量 /($\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$) | 单细胞产毒量 /($\text{fg} \cdot \text{cell}^{-1}$) |
|--------|--------|--|---|
| MC4216 | - | ND | ND |
| MC4217 | - | ND | ND |
| MC4218 | - | 22.2 | 2.3 |
| MC4219 | - | ND | ND |
| MC4218 | 卤虫 | 137.8 | 8.2 |
| MC4218 | 强额拟哲水蚤 | 202.7 | 9.8 |

注:表中“-”表示没有用浮游动物诱导;“ND”表示没有检测到 DA

似,但它们的区别特征也很明显.隆氏拟菱形藻与伪柔弱拟菱形藻的区别在于壳面外形,前者呈披针形,后者呈线形.隆氏拟菱形藻的壳面宽度(2.2~2.4 μm)也宽于伪柔弱拟菱形藻(0.9~1.6 μm).隆氏拟菱形藻与尖细拟菱形藻的区别在于壳端在环面观呈“S”型,它们的肋突、点条纹、壳环带点条纹密度等也不一样^[20].阿巴拟菱形藻的区别特征是壳面线形,肋突、点条纹密度等有差异^[21].中华拟菱形藻细胞壁硅质化严重,在电镜观察下颜色较深,较易区别于隆氏拟菱形藻^[22].

伪柔弱拟菱形藻复合群的其它物种,如靛纹拟

菱形藻(*P. calliantha*)、多区拟菱形藻(*P. plurisetata*)、花形拟菱形藻(*P. caciaantha*)、曼氏拟菱形藻(*P. mannii*)、环孔拟菱形藻(*P. circumpora*)等,孔纹分区多在4个以上,如花形拟菱形藻为4~5个^[20],靛纹拟菱形藻为7~10个^[20],环孔拟菱形藻更可多达10个以上^[23],这是它们与隆氏拟菱形藻最为明显的区别特征.

2.5.2 隆氏拟菱形藻的产毒特征分析 隆氏拟菱形藻的产毒株系最早报道于马来西亚婆罗洲水域^[4],仅有一个株系(PnMi01)检测到低浓度的DA,单细胞产毒量为1.13 fg.本研究从台湾海峡海域建立的4个隆氏拟菱形藻中,也仅有一个株系MC4218检出DA,单细胞产毒量为2.3 fg.以往研究均已证实,拟菱形藻的产毒特征是不稳定的,受到水温、营养盐含量等环境要素,以及不同生活史阶段等因素的影响^[1-2].比如,Bates等(1991)发现培养基中低浓度硅可以促使多列拟菱形藻(*P. multiseriis*)在稳定期产生更多DA,该研究还发现氮缺乏会导致多列拟菱形藻无法继续产生DA^[24].Lundholm等(1994)发现成列拟菱形藻(*P. seriata*)的产毒水平与细胞生长周期相关,稳定期产毒水平最高^[25].目前隆氏拟菱形藻的报道较少,后续更为广泛的研究或许能够丰富其产毒特征.

2.5.3 浮游动物对隆氏拟菱形藻产毒水平的影响

分析 以往关于影响拟菱形藻产毒的研究,多聚焦于生活史、营养盐等因素^[1-2],近年有学者开始关注捕食互作效应。Tammilehto 等(2015,2012)分别研究了 2 种桡足类(*Calanus hyperboreus* 和 *C. finmarchicus*)与成列拟菱形藻的捕食互作效应,发现成列拟菱形藻的产毒能力有所增加,单细胞产毒水平分别由 0.1pg 提高到 13.1pg 和 4.2pg^[19,26]。研究认为,桡足类的捕食压力会促使拟菱形藻物种形成更长的链状群体,并产生更多的 DA,这些改变有利于降低拟菱形藻的被捕食概率^[19]。本研究利用卤虫和强额拟哲水蚤诱导隆氏拟菱形藻(MC4218)的产毒水平,发现两种浮游动物均能提高其产毒水平,单细胞产毒水平分别由 2.3 fg 提高到 8.2 fg 和 9.8 fg。黄春秀等(2017)也曾利用卤虫和褶皱臂尾轮虫(*Bra-*

chionus plicatilis)诱导了福氏拟菱形藻的产毒能力,发现其产毒水平可提高 4~28 倍^[6]。与 Tammilehto 选用的桡足类不同^[19,26],本研究选用的卤虫隶属于枝脚类,强额拟哲水蚤则隶属于桡足类拟哲水蚤科,它们也具有促进拟菱形藻产毒的特征,或许预示着有更为广泛的浮游动物类群都具有类似作用,该作用应该直接源于实际存在的捕食关系。

3 结论

本研究鉴定到我国拟菱形藻属的一个新纪录种:隆氏拟菱形藻,丰富了该属的物种多样性。在一个隆氏拟菱形藻株系(MC4218)中检测到 DA,单细胞产毒水平为 2.3 fg。卤虫和强额拟哲水蚤均能提高隆氏拟菱形藻的 DA 水平,其增强幅度在 3~4 倍之间。

参考文献:

- [1] LELONG A, HEGARET 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.
- [2] TRAINER V L, BATES S S, LUNDHOLM N, et al. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health[J]. *Harmful Algae*, 2012, 14(1): 271-300.
- [3] LUNDHOLM N. Bacillariophyceae IOC-UNESCO taxonomic reference list of harmful micro algae[DB/OL]. [2018-02-03]. <http://www.marinespecies.org/hab>.
- [4] TENG S T, TAN S N, LIM H C, et al. High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with description of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2016, 52:973-989.
- [5] LI Y, HUANG C X, XU G X, et al. *Pseudo-nitzschia simulans* sp. nov. (Bacillariophyceae), the first domoic acid producer from Chinese waters[J]. *Harmful Algae*, 2017, 67:119-130.
- [6] 黄春秀,董焕嫦,李扬. 福氏拟菱形藻:中国产毒拟菱形藻的新纪录[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(4):767-776.
- [7] 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.
- [8] 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): 2 986-2 988.
- [9] GUILLARD R R L, HARGRAVES P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte[J]. *Phycologia*, 1993, 32: 234-236.
- [10] 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.
- [11] LUNDHOLM N, DAUGBJERG N, MOESTRUP Ø. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA[J]. *European Journal of Phycology*, 2002, 37: 115-134.
- [12] LIM H C, TENG S T, LEAW C P, et al. 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 [J]. *Journal of Phycology*, 2013, 49(5), 902-916.
- [13] HALL T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98.
- [14] RONQUIST F, TESLENKO M, MARK P, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. *Systematic Biology*, 2012, 61(3): 539-542.
- [15] MILLER M A, PFEIFFER W, SCHWART T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees [C]//Institute of Electrical and Electronics Engineers. Proceedings of 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans:Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2010: 8.
- [16] WOLF M, ACHTZIGER M, SCHULTZ J, et al. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structure[J]. *RNA*, 2005,11:1 616-1 623.
- [17] DARTY K, DENISE A, PONTY Y. VARNA: interactive drawing and editing of the RNA secondary structure[J]. *Bioinformat-*

ics, 2009,25:1 974-1 975.

- [18] SEIBEL P, MVLLER T, DANDEKAR T, et al. Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE[J]. BMC Research Notes, 2008, 1: 91.
- [19] TAMMILEHTO A, NIELSEN T G, KROCK B, et al. Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 159: 52-61.
- [20] LUNDHOLM N, MOESTRUP Ø, HASLE G R, et al. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? [J] Journal of Phycology, 2003, 39(4):797-813.
- [21] ORIVE E, PEREZ-AICUA L, DAVID H, et al. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in a temperate estuary with description of two new species; *Pseudo-nitzschia plurisetata* sp. nov. and *Pseudo-nitzschia abrensis* sp. nov.[J]. Journal of Phycology, 2013, 49(6):1 192-1 206.
- [22] QI Y Z, JU W, ZHENG L. The taxonomy and bloom ecology of *Pseudo-nitzschia* on the coasts of China[C]//Nontji A, Soemodihardjo S, Ilahude A G, et al. Proceedings IOS-WESTPAC third international scientific symposium. Bali:Research and development center for oceanology, Indonesian Institute of Science, 1994:22-26.
- [23] LIM H C, LEAW C P, SU S N, et al. Morphology and molecular characterization of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from Malaysian Borneo, including the new species *Pseudo-nitzschia circumpora* sp. nov. [J]. Journal of Phycology, 2012, 48(5): 1 232-1 247.
- [24] BATES S S, FREITAS A S W, MILLEY J E, et al. Control on domoic acid production by diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriata* in culture: nutrients and irradiance[J]. Canada Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1991, 48:1 136-1 144.
- [25] LUNDHOLM N, SKOV J, POCKLINGTON R, et al. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe[J]. Phycologia, 1994, 33:475-478.
- [26] TAMMILEHTO A, NIELSEN T G, KROCK B, et al. *Calanus* spp. —Vectors for the biotoxin, domoic acid, in the Arctic marine ecosystem? [J]. Harmful Algae, 2012, 20: 165-174.

Biological traits and toxicity of *Pseudo-nitzschia lundholmiae* from the Taiwan Strait, China

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: In order to clarify the species diversity of the toxic *Pseudo-nitzschia* in China and declare their domoic acid (DA) production, four monoclonal strains were established from the samples of Taiwan Strait during May, 2017. Based on the morphology under light and transmission electron microscopy, and molecular analysis inferred from internal transcribed spacer (ITS) region of rRNA encoding gene, as well as the analysis of ITS2-RNA secondary structure, a newly recorded *Pseudo-nitzschia* species of China was identified as *P. lundholmiae*. It is characterized by lanceolate valve, presence of central interspacer, striae comprising one row of poroids and poroids normally dividing into two sectors. Using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), DA was only detected from one strain, with an average concentration of 2.3 fg/cell. *Artemia salina* and *Paracalanus crassirostris* were selected to mix-culture with *P. lundholmiae*, to evaluate the impact of zooplanktons on the DA production. The result showed that the existence of zooplankton could increase the DA production of *P. lundholmiae* in 3–4 times. The above results add new knowledge to the diversity of the toxic *Pseudo-nitzschia* in China and provides the DA features of *P. lundholmiae*, which can provide the basic data for further studies.

Key words: marine biology; *Pseudo-nitzschia lundholmiae*; species diversity; morphology; internal transcribed spacer; domoic acid; Taiwan Strait

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2019.01.002

(责任编辑:王 静)