

# 几种菱形藻及其近缘种分类界定的比较研究\*

刘宝宁 刘 晨 周成旭<sup>①</sup> 吴小凯 孙 雪 徐继林

(应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学 宁波 315211)

**提要** 菱形藻是较常见的羽纹硅藻类,其中一些种类的外部形态十分相似,差异细微,很难从经典形态分类的角度准确区分,造成此类微藻在分类地位上的混乱。作者综合利用经典形态分类方法、ITS(Internal transcribed spacer sequences)序列分析方法以及基于脂肪酸甾醇的化学分类多种方法,对 4 株从形态观察初步确定为菱形藻及其近缘种类的野外采集样品以及在分类上仍存分歧的小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*),进行了几种易混淆种类界定的差异比较研究。结果显示,基于多种方法的微藻种类鉴定,能获取比单一鉴定方法更多的鉴定信息,并且几种方法能获得比较一致的结果;分别明确了野外水样中的四株微藻品系的分类地位,其中的 3 株分别为拟尖刺菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens* Hasle)、柔弱拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia delicatissima*)、新月筒柱藻(*Cylindrotheca closterium*),但另外一株仅能确定为细柱藻属的一种,仍不能鉴定到种。分析结果还表明,小新月菱形藻应属于舟形藻目,褐指藻科,褐指藻属,这与之前有学者报道的结果一致。

**关键词** 菱形藻,近缘种,分类,比较研究

**中图分类号** Q949.27

海洋微藻不仅构成了全球物质循环和能量流动的重要环节,而且在人类活动中扮演了举足轻重的作用:新能源开发、赤潮灾害与防治、全球气候变化等等(殷明焱等,2009;刘静雯等,2010)。微藻的结构相对简单,但种类繁多,细微的形态结构差别就形成了不同的生态位和生态作用,既造成了对微藻分类的困难,也说明了对微藻精确分类的必要。实践证明,仅依赖硅藻的形态特征为主要依据的经典分类,不仅工作繁复,分类标准难于精确定位,而且难于区分形态一致但生态作用完全不同的种类。

随着研究技术以及生物化学和分子生物技术的不断进步,在经典形态分类学的基础上,形成了基于生化物质差异的化学分类法和典型基因分析为基础的分子生物学分类方法,多种方法的综合利用为疑难种及易混淆种类的界定提供了可能。徐继林等(2007)对微藻的脂肪酸和甾醇的聚类分析研究发现,

微型藻类的化学分类方法是微藻分类学的一个很好的补充。通过多种分类方法的结合,对众多经典分类难于区分或不能区分的种类进行精确定位,是现代分类学的研究目标和任务。

菱形藻是羽纹硅藻纲中分布广泛的一大类群,该类硅藻的许多种类具有几乎相似的外部形态特征,从而造成很多种类的分类歧义。在 Grethe(1994)将拟菱形藻从菱形藻中分成独立一属之前,拟菱形藻是作为菱形藻中的亚属。石娟等(2008)利用分子生物学方法分析小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornerutum*)以及新月筒柱藻(*Cylindrotheca closterium*)发现,小新月菱形藻并不属于菱形藻属,而应属于褐指藻属,并且极有可能是三角褐指藻的一个藻株。陆开宏等(2001)在进行三角褐指藻培养的过程中也发现,三出的三角褐指藻在培养过程中有时会出现梭形细胞。两

\* 国家自然科学基金项目,40776064 号;教育部长江学者与创新团队项目,IRT0734 号;教育部博士点基金项目,200816460002 号;宁波市重大科技项目,2006C100030 号;宁波科技计划项目,2007A31004 号。刘宝宁, E-mail:liubaoning@126.com

通讯作者:周成旭, E-mail:zhouchengxu@nbu.edu.cn

收稿日期:2010-04-01,收修改稿日期:2011-03-08

者似乎存在生理状态相关的同种易形。同样,李海涛等(2007)测定了野外水样中两株形态上与新月筒柱藻和长菱形藻(*Nitzschia longissima*)相似的微藻的 18S rRNA 和 *rbcL* 基因,并结合形态学特征判断两株微藻均归属于筒柱藻属。另外,高杨等(2005)认为同属于拟菱形藻属的种类,一些赤潮有毒种和无毒种的区分也相当困难。

基于多种分类方法的综合应用,作者就不同来源的几株初步鉴定为菱形藻及其近源种的微藻分类和种间差异进行了比较研究。通过形态学观察、ITS 序列分析、基于脂肪酸及甾醇特征的聚类分析等方法的综合应用,建立了几种微藻种类鉴定和种间差异的相关资料,并且,在比较和探讨多种分类方法结果的基础上,就微藻的分类方法学问题以及菱形藻及其近源种易混淆的种类鉴定问题进行了讨论。

## 1 材料和方法

### 1.1 藻种来源与培养

藻种来源于宁波大学微藻种质室。室内保种的藻类培养在 *f/2* 培养液中,均为单种培养。除特别说明外,用于检测的微藻均是经新鲜培养液重新活化培养至指数生长期时取样的。

野外样品分别分离自浙江沿海水样和大西洋水样,通过光学显微镜观察初步确定为菱形藻类,在本文中编号分别为: NSP、NATO、NC、PN。除 PN 的培养温度为 25℃外,其他藻及其他激活培养条件均为: 20℃, 4000—5000lx(L:D = 12h:12h)。

室内保种样品为小新月菱形藻(*N. closterium f. minutissima*, NFC)和三角褐指藻(*P. tricornutum*, PTB)。由于小新月菱形藻与三角褐指藻分类界定尚存歧义,所以,本研究中将三角褐指藻也作为被研究种类之一。温度 18℃,光照 2000 lx, L:D = 12h:12h。

### 1.2 细胞形态观察

将单种培养生长活跃的微藻细胞用于显微观察。在光学显微镜(Olympus BX60)下进行活体和固定细胞的观察和拍照。扫描电镜观察的样品处理方法(邢小丽等, 2007)为: 离心收集生长到指数期的微藻,加入等体积的甲醛固定 24 h,水洗 3 至 4 次,之后加入 1 倍体积的浓硝酸和 3 倍体积浓硫酸,置于 100℃沸水中水浴 3 min 至硅藻细胞中的有机物被完全氧化,用蒸馏水多次水洗至中性后制片,自然晾干或在红外灯下烘干后喷金,利用扫描电子显微镜(日立

S3400)进行扫描电镜观察和拍照。

### 1.3 ITS 序列测定

**1.3.1 DNA 的提取** 取 1.0 ml 对数生长期的藻细胞, 6000 r/min 离心 8 min 收集藻体。按照 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)的使用说明提取藻细胞基因组 DNA。最后用 30 μl 洗脱液进行 DNA 的洗脱。

**1.3.2 PCR 扩增与检测** ITS 扩增所用引物 P2, 5'-GTAGGTGAACCTGC(AG)AAGGATCA-3' 和 P4, 5'-CGACA(TG)ATGCTTAA(AG)TTCAGC(AG)GG-3', 分别对应于 18S rDNA 3'末端和 24S rDNA 5'末端区域。

PCR 扩增在 GeneAmp PCR system 5600(Perkin Elmer)中进行。总反应体积为 20 μl, 其中模板 DNA 为 2 μl, Mg<sup>2+</sup> 浓度为 1.5 mmol/L, 各 dNTP 浓度为 0.2 mmol/L, 引物浓度为 0.2 μmol/L, Taq 酶 1 单位。PCR 扩增程序为 94℃, 预变性 5 min, 然后按照 94℃变性 50 s, 50℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min 的程序进行 30 个循环, 循环结束后 72℃延伸 8 min。在 1.0%的琼脂糖凝胶电泳, 在紫外透射分析仪上观察结果。

**1.3.3 PCR 产物的回收与克隆** 用 BioSpin Gel Extraction Kit 试剂盒(杭州昊天)进行 PCR 产物的回收, 将回收的 PCR 产物与 pMD 18-T 载体连接后转化感受态 *E. coli* JM109。挑选白色菌落用通用引物对进行 PCR 扩增以检测重组子。

**1.3.4 测序与序列分析** 将扩增培养后的重组菌落送去测序(上海生工 英骏公司)。

### 1.4 脂肪酸甾醇检测

#### 1.4.1 实验器材

**1.4.1.1 试剂** 标准甾醇、三氟双(三甲基硅烷基)乙酰胺(BSTFA)购自美国 SIGMA-ALDRICH 公司, 正己烷、氯仿为美国 TEDIA 公司产色谱纯试剂, 14% BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH 溶液为美国 ALLTECH 公司, 色谱纯正己烷为美国 TEDIA 公司, 甲醇、氯仿、二氯甲烷、乙醚、无水硫酸钠、氢氧化钾均为国产分析纯。

**1.4.1.2 仪器** QP2010 气相色谱-质谱分析仪(日本 SHIMADZU 公司), 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm SPB-50 色谱柱(美国 SUPELCO 公司); 冷冻干燥机(美国 LABCONCO 公司)。另外, 国产旋转蒸发器、旋涡混合仪、高速分散匀质机、高速离心机、水浴锅、电子天平。

**1.4.1.3 样品** 藻种在 2500 ml 的锥形瓶中进行扩增培养, 每天定时摇动 8 次, 取样跟踪细胞密度变化,

当种群生长处于对数生长后期或平台期时, 4000 r/min 下离心收集, 冷冻干燥,  $-20^{\circ}\text{C}$  温度下充氮冷冻保存。

**1.4.2 样品分析** 称取 20 mg 左右的微藻干品, 参考 Bligh 等(1959)法提取总脂; 总脂提取后加入 2 ml 5%—6% 氢氧化钾甲醇水(体积比为 4:1)溶液, 充氮气 1 min, 密封,  $60^{\circ}\text{C}$  水浴皂 2 h, 冷却, 皂化液加 15 ml 饱和氯化钠溶液 1 ml, 再用 HCl(1:1)调 pH 小于 1; 氯仿和正己烷(体积比为 1:4)6 ml 分 3 次提取, 加入 1 g 无水硫酸钠吸水 12 h, 旋转蒸发仪真空干燥, 加入 100  $\mu\text{l}$  过量 BSTFA, 密封,  $60^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h,  $\text{N}_2$  吹干, 正己烷定容, 进行 GC-MS 分析。

**1.4.3 定性定量分析和数据处理** 根据 GC-EIMS-TIC 中各组分的离子碎片质量谱图, 通过对 NIST 库和 WILEY 库检索并参考脂肪酸和甾醇标准谱图进行鉴定。用面积归一法计算各脂肪酸、甾醇的百分组成。

每种微藻平行培养 3 次, 每个样品平行测定 2 次, 取均值进行统计处理。以所测定的每种脂肪酸、甾醇的相对含量作为变量, 欧几里德距离平方(Squared Euclidean distant)作为聚类统计量, 应用统计分析软件(SPSS16.0)中分层聚类方法分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态的差异比较

本文中作者研究的 6 种微藻品系, 除 NFC(小新月菱形藻)和 PTB(三角褐脂藻)为实验室长期培养种外, 其余均为野外水样。基于 4 种野外微藻的光学显微镜和扫描电镜的细胞形态学特征, 结合文献资料(金德祥等, 1965 a,b), 初步将 NSP 和 PN 归为拟菱形藻属(*Pseudo-nitzschia*), NATO 和 NC 归为筒柱藻属(*Cylindrotheca*), 通过细胞形态特征方面的观察和比较分析, 明确差异和相似性所在。

**2.1.1 NFC 和 PTB** NFC 细胞纺锤形, 中央膨大, 两端渐尖, 朝同一个方向弯曲似月牙形; 细胞长约 12  $\mu\text{m}$ , 宽 2—3  $\mu\text{m}$ 。PTB 具有卵形, 梭形和三出放射形三种不同的形态, 这三种形态在不同的环境条件下可以转变。在正常的液体培养的条件下, 多是三出放射形细胞和少量的梭形细胞, 这两种形态都没有硅质的细胞壁(金德祥等, 1965 a,b)。三出放射形细胞臂长约 6—8  $\mu\text{m}$ 。梭形细胞长约为 10  $\mu\text{m}$ , 中央宽约 3  $\mu\text{m}$ , 向两端渐狭(图 1:e)。光学显微镜下观察, NFC 细胞和 PTB 培养液中的梭形细胞形态上很相似(图 1e、f)。

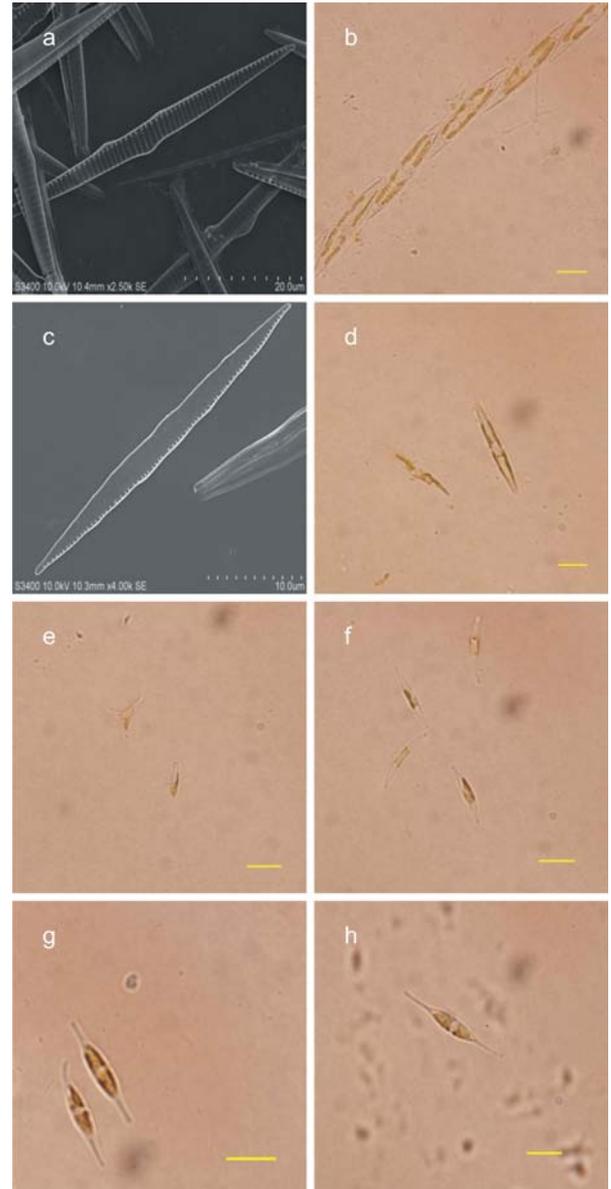


图 1 6 种微藻品系的光镜和电镜照片

Fig.1 LM and SEM photos of the 6 microalgal strains  
a. PN 的电镜照片; b. PN 的光镜照片; c. NSP 的电镜照片;  
d. NSP 的光镜照片; e. 三角褐脂藻(*Phaeodactylum tricornutum*,  
实验室编号为 PTB)的光镜照片; f. 小新月菱形藻(*Nitzschia  
closterium* f. *Minutissima*, 实验室编号为 NFC)的光镜照片;  
g. NATO 的光镜照片; h. NC 的光镜照片 (A、B、C、D、E、  
F 标尺示 10  $\mu\text{m}$ , G、H 标尺示 20  $\mu\text{m}$ )

**2.1.2 PN 和 NSP** 光学显微镜下观察生活细胞, PN 和 NSP 相邻细胞借壳面均可以连成滑动的细胞链, PN 长链甚至可以滑动成细胞完全重叠。最大链状伸张时, PN 最少相连部分为细胞长度的 1/5 以上(图 1b), NSP 相连部分为细胞长度的 1/6 以下, 且没有大幅度的胞间滑动。扫描电镜观察, PN 的单个细胞较粗, 宽

5—9 μm, 龙骨点明显(图 1 a)。NSP 细胞较细小, 宽 1.3—3 μm, 没有点条纹(图 1 c, d), 其特征和金德祥 (1965)有关尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens* Hasle)和柔弱拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia delicatissima*)的描述相似。

**2.1.3 NATO 和 NC** NATO 和 NC 细胞两端都具有较长的突出, 且突出向同一方向弯曲, NC 细胞两端的突出较 NATO 细长(图 1 g, h)。光学显微镜下两者的单个细胞形态十分相似, 很难区分。

**2.2 ITS 序列相关性分析**

根据测得 6 种微藻的 ITS 序列与 NCBI 国际基因数据库中已录入的硅藻的 ITS 序列进行 BLAST 比对, NSP blastn 分值最高的为柔弱拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia delicatissima*)、PN 为尖刺拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia pungens* Hasle), 这与形态学上的鉴定结果一致。NATO 为新月筒柱藻(*Cylindrotheca closterium*); 菱形藻属种、拟菱形藻属种和新月筒柱藻与 NC 比对得分都很高, 其地位归属需要进一步讨论。

根据 6 株微藻品系的 ITS 序列, 并通过 MEGA4 软件中 Pairwise Distainces 分析得到各品系之间的遗传距离(表 1)。通过表 1, 比较各微藻品系之间的遗传距离可以发现, NSP 和 PN、NATO 和 NC、PTB 和 NFC 之间的遗传距离很小, 分别为 0.651、0.637、0.005。说明 NSP 和 PN、NATO 和 NC、PTB 和 NFC 的 ITS 序列的相似性非常高, 亲缘关系很近。

将 6 种微藻的 ITS 基因序列与 NCBI 国际基因数据库中已录入的部分硅藻的 ITS 序列资料进行比较, 用 ClustalX4.0 软件对 DNA 序列进行排列, 通过 MEGA4 软件包作系统分析, 得到包括被研究藻种在内的 25 种硅藻品系的最小临近法聚类树(图 2)。

从系统树的分布来看, 同一门的微藻聚在同一簇中, 拟菱形藻属的品系(PN、NSP)聚集在硅藻门的同一簇中, 这一分类结果与传统

表 1 6 株微藻品系之间的遗传距离  
Tab.1 The degree of genetic distance between the pairs of the six microalgal strains

微藻	NSP	PN	NATO	NC	NFC	PTB
NSP	—	—	—	—	—	—
PN	0.651	—	—	—	—	—
NATO	0.983	1.271	—	—	—	—
NC	0.967	1.050	0.637	—	—	—
NFC	1.212	1.322	1.394	1.196	—	—
PTB	1.216	1.327	1.383	1.200	0.005	—

分类学在属一级的分类一致。PTB 和 NFC 与基因库中的 EF553459.1 (*Nitzschia closterium* f. *Minutissima*) 和 EF553458.1 (*Phaeodactylum tricornutum*)聚为一簇, 靴带支持率为 99%。同时发现 NC 的分类位置仍然较为模糊, 虽然与筒柱藻属的两个微藻品系(FJ864278、AF289049)聚为一簇, 但是靴带支持率并不高。

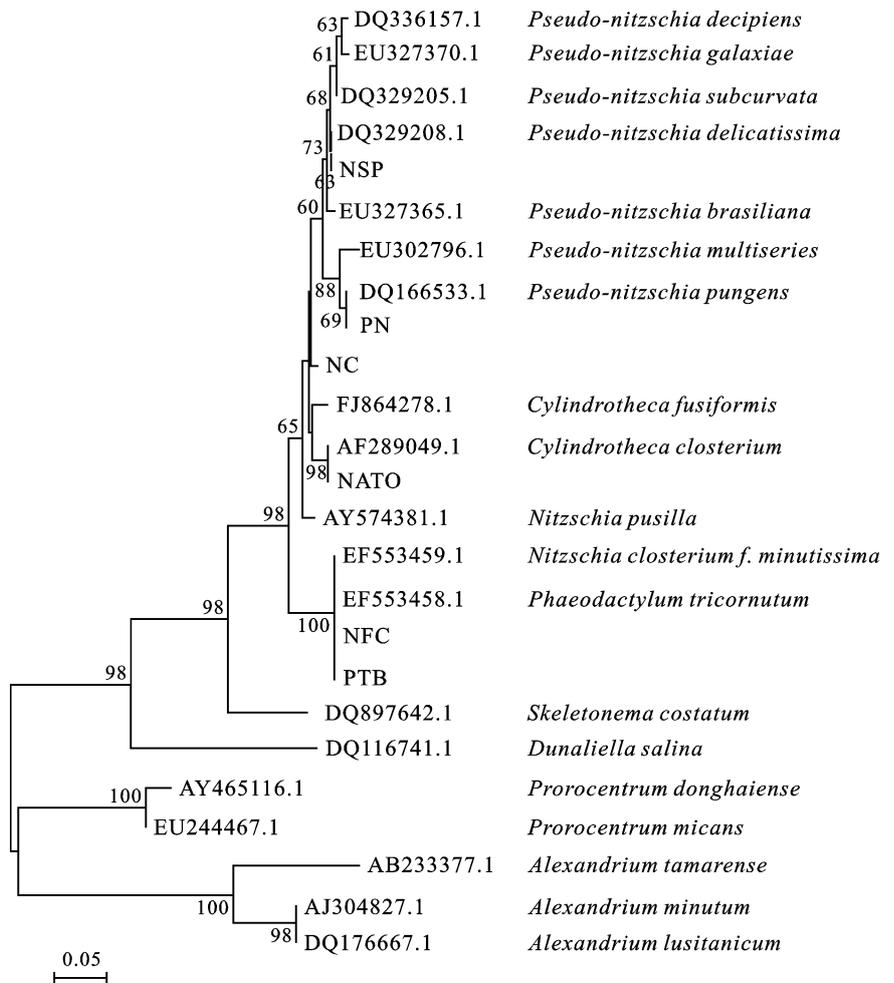


图 2 基于微藻品系 ITS 序列构建的最小临近法聚类树

Fig.2 Phylogenetic relationship of the studied strains based on the ITS sequences information

## 2.3 脂肪酸甾醇检测结果及分析

**2.3.1 微藻中脂肪酸鉴定** 根据 1.4.2 的检测方法, 分别检测了 NSP、NATO、NC、NFC、PTB、PN 的脂肪酸相对含量。从 6 株微藻中共鉴定出 34 种脂肪酸(表 2)。其中, 饱和脂肪酸有 12 种, 单不饱和脂肪酸有 7 种, 多不饱和脂肪酸有 15 种。每种微藻都有

其特定的脂肪酸组成, 甚至同一种的不同品系之间也会有很大的差别(Alonso *et al.*, 1992; Renaud *et al.*, 1995; Volkman *et al.*, 1989)。有些微藻的某种脂肪酸的表达含量很高, 比如: C16:1(n-7)在 PTB 和 NFC 中的百分比含量分别为 28.21%和 24.78%, 而在另外 4 种微藻中该脂肪酸的检测含量相对较低。但是只针对于

表 2 各微藻品系脂肪酸的检测结果(占脂肪酸总含量的百分比)

Tab.2 Results of the fatty acid analysis in the microalgal strains (percentage of the total fatty acids)

序号	脂肪酸	PTB	NFC	NC	NATO	NSP	PN
1	C12:0	—	—	0.15	—	—	—
2	C13:0	—	—	0.5	—	—	—
3	C14:0	8.21	6.17	10.41	9.96	23.24	31.51
4	C15:0	—	0.24	0.7	0.31	0.73	6.41
5	12Me-C15:0	—	—	—	0.38	—	1.41
6	13Me-C15:0	—	—	3.55	0.85	2.16	0.62
7	C16:0	17.99	12.61	8.86	9.59	7.78	—
8	14Me-C16:0	—	—	2.6	0.7	—	—
9	C16:1(n-5)	3.58	1.29	—	—	—	—
10	C16:1(n-7)	28.21	24.78	0.89	4.45	—	4.12
11	C16:1(n-9)	—	—	15.12	17.07	31.52	24.1
12	C16:2(n-4)	7.04	5.22	5.35	5.03	2.3	2.53
13	C16:2(n-6)	—	1.12	2.71	—	5.66	—
14	C16:3(n-3)	7.95	6.93	—	10.25	—	8.2
15	C16:3(n-6)	—	—	7.2	—	4.47	—
16	C16:4(n-3)	—	1.76	—	—	—	—
17	C18:0	0.75	0.84	1.01	0.41	0.81	0.59
18	C18:1(n-7)	1.87	1.38	—	—	—	—
19	C18:1(n-9)	0.99	1.03	11.93	2.78	10.18	1.74
20	C18:1(n-11)	—	—	1.73	—	1.25	—
21	C18:2(n-6)	—	0.79	1.02	—	0.69	—
22	C18:3(n-6)	—	—	4.88	3.03	—	—
23	C18:3(n-3)	—	—	—	0.91	—	—
24	C18:5(n-3)	—	—	—	1.52	—	—
25	C19:1(n-9)	—	—	2.13	—	0.87	—
26	3,7,11,15-M-C20:0	—	—	—	—	—	3.32
27	C20:4(n-6)	—	—	3.96	8.49	1.16	0.9
28	C20:4(n-5)	—	—	—	—	0.52	—
29	C20:5(n-3)	19.98	28.82	12.82	22.13	3.56	11.55
30	C22:4(n-7)	—	—	—	1.11	—	—
31	C22:5(n-3)	—	0.81	—	—	—	—
32	C22:6(n-3)	3.14	1.87	2.28	1.03	—	0.28
33	C24:0	—	2.99	0.2	—	0.76	—
34	C26:0	—	—	—	—	1.34	2.72
35	其他类	0.29	1.35	—	—	—	—

注: —表示未检出或检出量极少

某个脂肪酸的比较具有一定的片面性, 所以有必要借助统计分析的手段对 6 种微藻品系的脂肪酸组成进行聚类分析。

**2.3.2 脂肪酸分层聚类分析** 以所测定的每种脂肪酸的相对含量为变量, 欧几里德距离平方(Squared Euclidean distant)作为聚类统计量, 应用统计分析软件(SPSS16.0)对微藻进行分层聚类分析。

从脂肪酸的聚类分析树状图(图 3)可以看出, 6 株微藻品系可聚集为 3 类: NSP 和 PN、NC 和 NATO、PTB 和 NFC。在修正距离为 7 时, NSP 和 PN 可以分开; 在修正距离为 4 左右时, NC 和 NATO 才能分开; 而 PTB 和 NFC 脂肪酸成分组成非常的接近, 两者几乎不能分开。

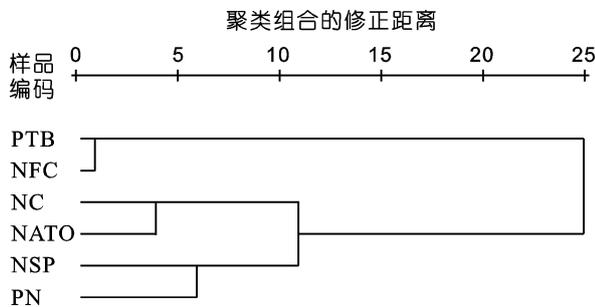


图 3 各微藻品系的脂肪酸聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis of the microalgal strains based on the fatty acid analysis

**2.3.3 微藻中甾醇(酮)的鉴定及分析** 根据 1.4.2 的检测方法分别检测了 5 种微藻品系(NSP、NC、NFC、PTB、PN)的甾醇相对含量, NATO 的甾醇未检测。根据各组分的 EI、CI 质谱数据, 并参考文献, 从 5 株微藻中(Ghosh *et al.*, 1998; Volkman *et al.*, 1997)共检测到 13 种甾类物质(表 3), 包括 3 种 C27 甾醇、4 种 C28 甾醇、6 种 C29 甾醇和 1 种还无法确定出碳数的甾醇。各甾醇在不同微藻中的分布程度也不一样,

表 3 5 种微藻品系中的甾醇

序号	名称	分子式
1	C27:2( $\Delta$ 5,22/27Nor,24Me)	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>Si</sub>
2	C27:1( $\Delta$ 5)	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>Si</sub>
3	C27:2( $\Delta$ 5,24)	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>Si</sub>
4	C28:1( $\Delta$ 5/24Me)	C <sub>31</sub> H <sub>56</sub> O <sub>Si</sub>
5	C28:2	C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> O <sub>Si</sub>
6	C28:2( $\Delta$ 5,24(28)/24Me)	C <sub>31</sub> H <sub>54</sub> O <sub>Si</sub>
7	C28:3( $\Delta$ 4,7,22/24Me)	C <sub>31</sub> H <sub>52</sub> O <sub>Si</sub>
8	C29:0	C <sub>32</sub> H <sub>60</sub> O <sub>Si</sub>
9	C29:1	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>Si</sub>
10	C29:1( $\Delta$ 5/24Ethyl)	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>Si</sub>
11	C29:1( $\Delta$ 5/4,24Me)	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>Si</sub>
12	C29:1( $\Delta$ 7/4,24Me)	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>Si</sub>
13	C29:2( $\Delta$ 5,22/24Ethyl)	C <sub>32</sub> H <sub>56</sub> O <sub>Si</sub>
14	Unknown	

注: 表示式 Cm: n ( $\Delta$ x/ y)中, m 代表甾类化合物的总碳数, n 代表不饱和和双键的数目, x 表示双键的位置, y 表示甲基、乙基或羟基的位置及数量

有些微藻中只有一种甾醇, 而有些微藻的甾醇种类却很丰富。

这些甾醇结构多样, 根据各甾醇结构的不同, 可把 5 株微藻中检测到的甾醇分 4 类(表 4): 第一类是 4 位无甲基  $\Delta$ 5 甾醇, 第二类是 4 位无甲基 5 位饱和的甾醇和甾烷醇, 第三类是 4-甲基甾醇和 4-甲基甾烷醇, 另外一类是未定甾醇。甾醇类化合物占总脂的比例虽然很低, 但很多组分都是良好的微藻化学分类学指标物(Volkman, 2003), 其中 C28:3( $\Delta$ 4,7,22/24Me) [为 4 位无甲基 5 位不饱和甾醇(酮)]只有在 PTB 和 NFC 中检测到, 并且在 PTB 中的检测百分比达到了 63.2%, 故 C28:3( $\Delta$ 4,7,22/24Me)可以作为该藻的特征甾醇。NSP 和 PN 中 C27:1( $\Delta$ 5)、C27:2( $\Delta$ 5,24)的检测量百分比很高, 有可能成为这两种微藻的特征甾醇。

表 4 微藻中的甾醇组成

Tab.4 Sterol composition from different microalgal strains

微藻	4 位无甲基 5 位不饱和甾醇(酮)	4 位无甲基 5 位饱和甾(烷)醇	4 位甲基甾(烷)醇	未定甾醇
PTB	6(21.2)	7(63.2)	—	14(15.6)
NFC	6(81.7), 4(3.3)	7(4.4)	11(4.0), 12(6.6)	—
NC	2(24.15), 3(13.15), 10(1.08)	—	—	14(3.58), 8(58.04)
NSP	1(1.41), 2(55.62), 6(27.95) 13(2.94)	—	—	14(3.2), 5(8.88)
PN	2(41.79), 3(56.93), 10(0.73)	—	—	9(0.55)

注: 表中各甾醇代码对应表 2 中各甾醇序号, 括号中数值为该甾醇占总甾醇的相对百分含量, —表示未检出或检出量极少

### 3 讨论

由于菱形藻类形态上的差异细微,而且其中有些差异可能是不同种水平上的差异,有些差异只是地理区域上的差异或者是不同生长阶段形态上的差异,并且差异的程度没有一个确定的标准,因此通过经典形态分类学的方法对一些易混淆微藻进行鉴定十分困难。而分子生物技术的介入,可以通过分析其遗传物质的差异并结合形态学的研究来确定其分类地位(程金凤等,2007)。由于 ITS 有着较快的变异率,多态性高,因此它成为了属间、种间特别是种内水平上进行系统分类的一个优良的分子标记(Connell,2001; Adachi *et al*,1996)。但是该方法却极大地依赖基因库中检索资料的丰富度。在 GeneBank 中报道较多的品系,比如拟菱形藻属,很容易将样品序列进行比对得到结果,但是对于一些研究较少的种类,这一做法并不十分完整可靠。

有研究表明,脂肪酸种类的不同及其相对含量高及特征成分等组成特性,可以作为微藻化学分类学地位的重要依据(徐继林等,2005)。脂类物质是所有真核生物细胞膜的基本组成成分。脂肪酸是构成细胞膜骨架的最主要成分,甾醇能控制膜的流动性和渗透性,在某些植物体内还担负细胞增殖信号传递、调节细胞膜结合酶活性的特殊功能,所以不同种类的生物体往往具有不同的脂肪酸和甾类化合物组成(Hartmann,1998; Piironen *et al*,2000)。以往的研究往往局限于一类微藻里特定脂肪酸和甾醇的异同进行化学分类学探讨,判断的主观性和实验人员实验技术之间的差异势必会给分类结果带来较大的差异。聚类分析是根据某些个体(样品)或变量(指标)的若干特征加以分类的统计方法,可以避免主观因素带来的差异(Viso *et al*,1993; Zhukova *et al*,1995)。有研究发现,以所测定的每种微藻脂肪酸的相对含量为变量,欧几里德距离平方作为聚类统计量,应用统计分析软件(SPSS11.5)对微藻进行分层聚类分析的结果与现行国际通用的海洋微藻的分类结果相吻合(章炜等,2006)。本研究中作者应用该方法通过应用统计分析软件(SPSS16.0)分析得到的6种微藻的脂肪酸分层聚类分析的结果,与基于 ITS 序列的遗传距离分析的结果以及形态鉴定的结果是一致的,为被研究种的种类归属提供了有力的佐证。同时甾醇的成分分布和一些特征甾醇也提供了一些种间差异的信息。比如甾醇成分 C28:3( $\Delta$ 4,7,22/24Me)只有在 PTB 和 NFC 中能够检测到,并且在 PTB 中的检测百分比达到了 63.2%,

故 C28:3( $\Delta$ 4,7,22/24Me)可以作为该藻的特征甾醇。NSP 和 PN 中 C27:1( $\Delta$ 5)、C27:2( $\Delta$ 5,24)的检测量百分比很高,有可能成为这两种微藻的特征甾醇。随着对微藻中脂类物质分离、提取、纯化技术研究的不断深入,加上质谱、核磁共振等结构分析手段和脂类衍生化技术的日益完善,可以构建海洋微藻脂类物质组成结构快速查询信息库,并使其成为微藻化学分类的一个重要辅助手段。

但是微藻的脂类生化组成受环境影响变化较大,使得脂肪酸的化学分类学研究在微藻分类学上的应用同样受到一定程度的限制(Volkman *et al*,1998; 徐继林等,2004)。研究表明,利用微藻的脂肪酸组成或典型代谢物对微藻进行聚类分析时,针对不同微藻,必须严格控制每次研究中培养条件的一致性,力求避免外界环境差异的影响。本研究在相似的静态条件下培养微藻各品系,测得的脂肪酸成分分析中,拟尖刺菱形藻(PN)和柔弱拟菱形藻(NSP)的聚类关系相当密切。由此可以看出,静态而且一致的培养条件下微藻脂肪酸、甾醇的聚类分析结果可以作为微藻分类的有力证据。

从本文的研究结果来看,小新月菱形藻与菱形藻属或圆柱藻属的差异较大,反而和三角褐指藻在形态特征、分子进化和生化组成方面给出的结果都表现出极大的一致性,三种分类学方法互相印证,共同为对小新月菱形藻分类地位的重新认识提供了证据(石娟等,2008),实证了基于经典分类学、分子生物技术和生化组成分析在微藻分类中的应用。

由于 GeneBank 中缺少与 NC 相关的检索资料,故在分子进化方面没能给出明确的种类归属。比较而言,NC 与菱形藻属代表种类的距离更远一些,但是在形态和脂肪酸组成上都和 NATO 十分相似,脂肪酸分析中,两者的有效相似距离更小于同属异种的 NSP 和 PN,由此推断 NC 应为圆柱藻属中的一种。

致谢 宁波大学骆其君老师、严小军老师进行野外采样,谨致谢忱。

### 参 考 文 献

- 石娟,潘克厚,2008. 对小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)分类地位的重新认识. 科学通报, 53(2):197—202
- 邢小丽,杨军霞,康燕玉等,2007. 大亚湾水域两种拟菱形藻的形态学鉴定及毒素分析. 台湾海峡, 26(4): 576—580
- 刘静雯,张稚兰,杜翠红等,2010. 富硒海洋球石藻(*Emiliania huxleyi*)的培养及其硒蛋白的初步分离纯化. 海洋与湖沼,

- 41(6): 879—884
- 李海涛, 杨官品, 张秀芳, 2007. 新月细柱藻的分离培养及形态和分子鉴定. 中国海洋大学学报, 7(4): 627—630
- 陆开宏, 林霞, 钱云霞, 2001. 三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)形态及其变异现象的研究. 青岛海洋大学学报, 31(1): 61—68
- 金德祥, 程兆第, 林均民等, 1965a. 中国海洋底栖硅藻类. 上卷. 上海: 上海科技出版社, 9, 199—200
- 金德祥, 程兆第, 林均民等, 1965b. 中国海洋浮游硅藻类. 下卷. 上海: 上海科技出版社, 201—202
- 徐继林, 严小军, 2004. 脂类分析在海洋微藻化学分类学上的研究进展. 海洋通报, 23(2): 65—72
- 徐继林, 严小军, 2005. 一种饵料微藻的脂肪酸甾醇分析及化学分类的探讨. 海洋学报, 27(4): 121—127
- 徐继林, 严小军, 周成旭等, 2007. 甾醇在海洋微藻中的分布研究. 海洋学报, 29(6): 93—100
- 殷明焱, 胡晓燕, 曾呈奎, 2009. 胶州湾有毒藻华形成种里氏金色藻(*Chrysochromulina leadbeateri*)的分类学研究. 海洋与湖沼, 40(6): 799—802
- 高杨, 梁君容, 2005. 赤潮拟菱形藻形态学分类和分子生物技术鉴定研究进展. 海洋科学, 29(1): 67—72
- 章炜, 徐继林, 严小军等, 2006. 利用脂肪酸组成对26种(株)海洋微藻聚类分析研究. 宁波大学学报(理工版), 19(4): 445—450
- 程金凤, 高亚辉, 梁军容等, 2007. 骨条藻的种类与基因多样性研究进展. 自然科学研究进展, 17(5): 586—594
- Adachi M, Sako Y, Ishida Y, 1996. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J Phycol, 32(6): 424—432
- Alonso D L, Grima, E M, Pérez J A S *et al*, 1992. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. Aquaculture, 102: 363—371
- Bligh E G, Dyer W J, 1959. A rapid method lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol, 37: 911—917
- Connell L B, 2001. Nuclear ITS region of the alga *Heterosigma akashiwo* (Chromophyta : Raphidophyceae) is identical in isolates from Atlantic and Pacific basins. Mar Bio, 136 (6): 953—960
- Ghosh P, Patterson G W, Wikfors G H, 1998. Sterols in some marine Prymnesiophyceae. J Phycol, 34 (4): 511—514
- Grethe Rytter Hasle, 1994. Pseudo-nitzschia as a genus distinct from nitzschia (Bacillariophyceae). Journal of Phycology, 30(6): 1036—1039
- Hartmann M A, 1998. Plant sterols and the membrane environment. Trends Plant Science, 3(5): 170—175
- Piironen V, Lindsay D G, Miettinen T A *et al*, 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J Sci Food Agric, 80 (7): 939—966
- Renaud S M, Zhou H C, Parry D L *et al*, 1995. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp.. Journal of Applied Phycology, 7: 595—602
- Viso A C, Marty J C, 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. Phytochemistry, 37(6): 1521—1533
- Volkman J K, Jeffrey S W, Nichols P D *et al*, 1989. Fatty acids and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol, 128: 219—240
- Volkman J K, Farmer C L, Barrett S M, 1997. Unusual dihydroxysterols as chemotaxonomic markers for microalgae from the order Pavloales (Haptophyceae). J Phycol, 33(9): 1016—1023
- Volkman J K, Barrett S M, Blackburn S I *et al*, 1998. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. Org Geochem, 29(5—7): 1163—1179
- Volkman J K, 2003. Sterols in microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol, 60(4): 495—506
- Zhukova N V, Nina A Aizdaicher, 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. Phytochemistry, 39(2): 351—356

## A COMPARATIVE STUDY ON THE IDENTIFICATION OF *NITZSCHIA*-RELATED SPECIES

LIU Bao-Ning, LIU Chen, ZHOU Cheng-Xu, WU Xiao-Kai, SUN Xue, XU Ji-Lin

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo, 315211)

**Abstract** *Nitzschia* spp. belongs to a common group of pennate diatom. Some species in this genus have subtle morphological differences, which make them difficult to be properly identified based on their morphological profiles only. In this paper, three taxonomical methods, namely microscopy observation, internal transcribed spacer sequence (ITS) sequence analysis, and microalgal fatty acids and sterols analysis, were used in the study of four field samples, which were preliminary identified to be *Nitzschia* genus and two closely related species, i.e., *Nitzschia closterium* f. *Minutissima* and *Phaeodactylum tricorutum*, using morphological method. We found that more information could be obtained by applying multiple methods in identifying microalgal strains than using only one method. Similar taxonomic results were obtained using these three methods. From the study, three field samples were identified to be *Pseudo-nitzschia pungens* Hasle, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, and *Cylindrotheca closterium*, respectively. However, we were only able to identify to the fourth strain as *Cylindrotheca* genus. The results also showed that *Nitzschia closterium* f. *Minutissima* belongs to *Naviculales*, *Phaeodactylaceae*, *Phaeodactylum*, consistent with previous findings.

**Key words** *Nitzschia*; related species; taxonomy; comparative study