

doi: 10.7541/2018.025

# 我国新记录海链藻属物种的形态学和系统学研究

郭雅琼 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, 广州 510631)

**摘要:** 为了廓清我国海链藻属的物种多样性, 并丰富其分子生物学信息, 为后续的系统学研究提供基础数据, 从我国沿海分离并建立了海链藻的单克隆培养株系, 利用光学显微镜和电镜技术进行了形态学研究, 同时还对其核糖体大亚基的高变区序列进行了扩增和测序分析。结合形态学和分子生物学数据, 鉴定了我国海链藻属的2个新记录种: 狭线形海链藻 *Thalassiosira anguste-lineata* (Schmidt) Fryxell & Hasle 和碟形海链藻 *T. minicosmica* Lee & Park。对它们的形态学特征进行了较为详尽的描述, 并与相似种进行了比较研究。此外, 还基于核糖体大亚基高变区的碱基序列信息, 分析了它们的分子系统学位置。在分子系统树上, 狭线形海链藻和碟形海链藻均不与该属模式种——诺氏海链藻 *T. nordenskiöldii* 聚在同一分支上, 显示它们与典型海链藻属物种之间具有较大的遗传差异。分子系统树还显示, 目前基于形态学建立的海链藻属并非自然类群, 而是被骨条藻属 *Skeletonema*、小环藻属 *Cyclotella*、漂流藻属 *Planktoniella* 等邻近属种分隔成多个分支, 这预示着现存的海链藻属应该是一个并系类群, 在后续的系统学研究中, 或许会有较大的系统学调整, 但目前有限的分子生物学信息是相关研究推进的重要限制。

**关键词:** 狭线形海链藻; 碟形海链藻; 新记录; 海链藻属; 形态学; 系统学

**中图分类号:** Q949.27      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3207(2018)01-0196-10

海链藻属 *Thalassiosira* Cleve 是硅藻中的一个典型大属, 广泛分布于全球各类水体中<sup>[1, 2]</sup>。绝大多数海链藻属物种的细胞个体微小<sup>[1, 2]</sup>, 但它们却是海洋生态系统中最主要的初级生产者<sup>[3, 4]</sup>, 也是常见的藻华物种<sup>[5, 6]</sup>。此外, 一些海链藻属物种还是很好的模式生物, 广泛应用于硅藻基因组、有性繁殖生活史、群落和个体生理生态等多方面的研究<sup>[7, 8]</sup>。

海链藻属种间差异细微, 准确的物种鉴定需要基于电镜下的超微形态学特征<sup>[1-4]</sup>, 其中突起的数量和排列方式, 以及孔纹特征是重要的形态分类依据<sup>[2]</sup>。然而, 由于海链藻细胞个体微小, 并且有些形态特征也具有不稳定性, 所以单纯依靠形态特征极易造成错误鉴定<sup>[9, 10]</sup>。因此为减少主观因素的影响, 分子生物学技术的引入显得更具价值。但是目前海链藻分子生物学信息还相对有限, 制约了其分子分类学和系统学的发展。迄今为止, 全球已报道

的海链藻现生物种约有170种<sup>[11]</sup>, 而我国已报道的约有50种<sup>[3, 12, 13]</sup>, 但相对于我国的广阔海域而言, 目前报道的物种多样性还相对较少, 同时以往开展研究的海域也相对有限, 这都预示着我国海域应该具有更为丰富的物种多样性。

本文通过建立海链藻单克隆培养株系, 结合形态学和分子生物学数据, 报道了我国海链藻属的2个新记录种, 分别是狭线形海链藻 *T. anguste-lineata* (Schmidt) Fryxell & Hasle 和碟形海链藻 *T. minicosmica* Lee & Park。同时还扩增了其核糖体大亚基高变区序列, 基于分子系统树, 针对海链藻属的系统学研究展开了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 单克隆培养株系的建立

利用浮游植物网(孔径10 μm)进行水平拖网, 然后尽快带回实验室。在生物倒置显微镜(Mshot MI-

收稿日期: 2016-11-07; 修订日期: 2017-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(31370235和31570205); 广东省科技计划项目(2015A030401084)资助 [Supported by National Natural Science Foundation of China (31370235, 31570205); Science and Technology Foundation of Guangdong Province (2015A030401084)]

作者简介: 郭雅琼(1991—), 女, 河南新乡人; 硕士研究生; 主要从事藻类学研究。E-mail: yaqiong@163.com

通信作者: 李扬, E-mail: liyang@scnu.edu.cn

12)下,利用毛细管复洗技术对目标藻细胞进行分离,之后转移至预先装有L培养基的48孔细胞培养板内<sup>[14]</sup>,置于培养室内培育。培养条件为:光照强度约50—80  $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光周期12h:12h,温度(20±2)°C。经过5—7d培养后,观察其生长状况,待细胞个数达到100个以上,再转移到装有L培养基的100 mL锥形瓶中,继续扩大培养。具体藻株信息详见表1。

## 1.2 形态学特征的观察

光学显微镜(Light Microscopy, LM)观察:取0.1 mL对数生长期藻液,利用Olympus BX53进行微分干涉(Differential interference contrast, DIC)的观察,并使用Olympus DP27数码相机拍照,在Olympus CellSens软件上获取图像信息。主要观察特征有:群体特征、细胞色素体形态等。

扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscopy, SEM)观察:取1 mL对数生长期藻液,加入等体积的浓硫酸(>95%),酸化以去除有机质,然后用蒸馏水多次水洗至中性<sup>[3]</sup>。用20 mL注射器吸取适量样品,并过滤至5  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜上。取出滤膜,自然晾干后,用碳导电胶贴于SEM样品台上,喷金后即可置于扫描电镜(Zeiss Ultra 55)下观察和拍照。另外,为了避免酸化对一些有机结构的破坏,本文还准备了未经酸化处理的电镜样品,即直接用毛细管吸取目标细胞并吹在滤膜上,待干燥之后直接喷金观察。主要观察特征有:各类突起的形态和结构、孔纹特征、内壳面筛板膜结构等。

## 1.3 分子系统学分析

离心法收集对数生长期藻细胞,并提取总DNA<sup>[15]</sup>。利用引物D1R-F<sup>[16]</sup>和D3B-R<sup>[17]</sup>扩增核糖体大亚基编码基因(Large subunit ribosomal encoding gene, LSU)的D1—D3区序列。PCR产物送往上海立菲生物科技有限公司进行纯化和测序。

从NCBI下载海链藻属物种及其邻近属种的LSU nrDNA序列信息。参考以往文献<sup>[18]</sup>,选择克罗丽纹藻*Lampriscus kittonii*、锤状中鼓藻*Bellerop-*

*chea malleus*、平滑井字藻*Eunotogramma laevis*、布氏双尾藻*Ditylum brightwellii*、波状石丝藻*Lithodesmium undulatum*为外类群。运用BioEdit软件进行序列的比对和矩阵<sup>[19]</sup>,共有551个碱基用于最终的分析。基于MrModeltest 2.3<sup>[20]</sup>计算,选择的最适模型和参数为GTR+I+G ([AC=1.0449], [AG=3.4071], [AT=1.7247], [CG]=0.4855, [CT]=5.9824, [GT]=1.0000, gamma shape=0.5318, nucleotide frequencies: A=0.2099, C=0.2194, G=0.3136, T=0.2574),用MrBayes 3.2<sup>[21]</sup>构建贝叶斯推理树(Bayesian Inference, BI)。

## 2 结果

### 2.1 形态学描述

狭线形海链藻*Thalassiosira anguste-lineata* (Schmidt) Fryxell & Hasle(图版 I—II)

Fryxell & Hasle 1977, p. 73, figs 22—34; Hoppenrath *et al.* 2007, p. 274, figs 6—7.

在培养条件下,细胞呈紧密相连的长链状群体(图版 I-1、2),未见多条胶质丝相连的链状群体。壳面规则圆形(图版 I-3),细胞内布满圆形、椭圆形以及不规则形色素体(图版 I-3),直径为25.0—27.0  $\mu\text{m}$ 。环面观呈矩形(图版 I-2)。壳面孔纹呈切线状排列(图版 II-1),密度为每10  $\mu\text{m}$ 内13—16个。壳套高度为4—5个孔纹(图版 II-7),密度为每10  $\mu\text{m}$ 内19—23个。壳面中央区至壳缘的一半处分布有若干支持突,无外管(图版 II-3),基部有3—5个围孔(图版 II-4)。该支持突排列方式较为多变(图版 II-3、4),围绕壳面中心点形成正六边形时(图版 II-3),每个角仅有1个支持突;而呈现近似正五边形时(图版 II-4),其中一个角为2个较为靠近的支持突,其余均为1个近中央支持突。壳面近中央处有1个中央大孔(图版 II-3、4)。1环壳缘支持突(图版 II-1、2),基部有4个围孔(图版 II-6),密度为每10  $\mu\text{m}$ 内3—4个。但是该壳缘支持突分布不均匀(图版 II-1、2),可见有2个壳缘支持突紧密相邻(图

表1 本文建立的目标藻株信息

Tab. 1 The information of established monoclonal strains in this study

株系Strain code	种名Taxon	分离地点Isolation location	采样时间Sampling data
MC369	<i>T. minicosmica</i>	温州Wenzhou	May 2015
MC372	<i>T. minicosmica</i>	温州Wenzhou	May 2015
MC544	<i>T. minicosmica</i>	青岛Qingdao	Sep. 2015
MC1529	<i>T. minicosmica</i>	香港Hong Kong	Dec. 2015
MC1530	<i>T. minicosmica</i>	香港Hong Kong	Dec. 2015
MC1557	<i>T. anguste-lineata</i>	南黄海South Yellow Sea	Jul. 2016
MC1562	<i>T. anguste-lineata</i>	南黄海South Yellow Sea	Jul. 2016

版 II-7), 其外管末端紧缩呈球状并且无明显的管状延伸(图版 II-5、7)。1个壳缘唇形突(图版 II-1、2、5、6), 位于2个壳缘支持突间并略微偏向其中1个(图版 II-1、2), 该唇形突的外管末端开口略微膨大(图版 II-5)。壳缘处无肋纹结构(图版 II-7)。

生境: 海洋浮游生活。

分布: 标本采自我国的黄海南部(31°59.959' N, 122°29.632' E, 7月)。本种主要分布于北大西洋的温带<sup>[23-25]</sup>、太平洋<sup>[26]</sup>以及美国南部海域<sup>[27]</sup>。

碟形海链藻 *Thalassiosira minicosmica* Lee & Park(图版 III—IV)

Park & Lee 2015, p. 164, figs 1—33.

大多数细胞单独生活(图版 III-2—4), 未见胶质状群体, 偶见两个细胞组成的短链群体(图版 III-1)。在自然样品中, 细胞环带的膜状结构有时有(图版 III-3, 图版 IV-1)有时无(图版 III-1), 但在人工培养条件下, 该特征完全消失(图版 III-2、4)。

细胞壳面呈圆盘形(图版 III-3、4), 直径 17.1—33.8  $\mu\text{m}$ , 内含圆形或椭圆形色素体(图版 III), 主要贴近细胞壁的内侧分布。细胞环面观呈鼓形(图版 III-1、2), 壳面隆起(图版 IV-2)。壳面孔纹小而密, 呈束状(图版 IV-3)或切线状(图版 IV-1)排列。其中壳面中部孔纹相对较疏, 密度为每 10  $\mu\text{m}$  内 16—22个; 壳面靠边缘处孔纹相对较密, 密度为每 10  $\mu\text{m}$  内 21—24个。壳套与壳面的界限不明显, 壳套高度为 3—5个孔纹(图版 IV-1、2、7), 密度是每 10  $\mu\text{m}$  内 29—40个。1个中央支持突(图版 IV-5、6), 无外管(图版 IV-5), 基部具有 4个围孔(图版 IV-6), 内壳面可见与之相邻的 1个中央较大孔纹(图版 IV-6)。1环壳缘支持突(图版 IV-1、3、4), 基部有 4个围孔(图版 IV-8), 密度为 10  $\mu\text{m}$  内 4—5个, 有较细且明显的外管(图版 IV-1—2、7)。壳缘处有 1个唇形突(图版 IV-1—4), 位于 2个壳缘支持突间, 但是比壳缘支持突略靠近壳面中央 2—3个孔纹。相较于壳缘支持突, 唇形突的外管更长且更宽(图版 IV-2、7)。壳缘处无肋纹结构(图版 IV-2)。

生境: 海洋浮游生活。

分布: 标本采自温州(5月)、青岛(9月)和香港(12月)海域。本种首次报道于韩国<sup>[28]</sup>。

## 2.2 基于 LSU rDNA 序列的分子系统学分析

本文基于 LSU rDNA D1—D3 区间序列构建了系统发育树(图 1)。MC1557 和 MC1562 的基因完全相同, 形态学鉴定为狭线形海链藻。而这 2 个株系在分子系统树上与一株狭线形海链藻聚为一支, 并且具有较高的置信值(BPP>0.90), 这表明分子系统树的结果也支持形态学鉴定的结论。但同时它们与

这一株美国圣华金河株系(DQ512414)也存在 5 个碱基的遗传差异, 应该是不同地理株系之间的差异。

碟形海链藻首次记录于韩国<sup>[28]</sup>, 但是最初的报道只对其形态学特征进行了研究, 并未提供任何分子序列信息。而本文建立的 5 个单克隆培养株系(MC369、MC372、MC544、MC1529 以及 MC1530)在形态学特征上完全符合之前报道的碟形海链藻, 与此同时这 5 个株系具有完全相同的 LSU nrDNA D1—D3 序列, 因此我们将它们鉴定为碟形海链藻。Park 和 Lee<sup>[28]</sup>认为碟形海链藻与小字海链藻 *T. minuscula* 的形态特征最为相似, 但也存在一些差异。而本文所构建的系统发育树显示碟形海链藻与小字海链藻聚在了同一个大分支上, 并且具有较高的置信值(BPP>0.90), 之后这 2 个种又进一步独立分成了 2 个小支, 说明它们在遗传学上存在差异, 这也从分子系统学的角度验证了这 2 个物种之间的形态学区别。

## 2.3 海链藻属分子系统学的结构分析

现存的海链藻属典型形态特征是: (1)细胞壳面圆形; (2)壳缘具有支持突和唇形突, 少数物种还具有闭合突; (3)壳面孔纹呈六边形或多边形, 中央大孔贯穿内外壳面, 内壳面处有筛板膜覆盖<sup>[2]</sup>。但是从本文所构建的贝叶斯系统发育树(图 1)可以看出, 海链藻属物种并非聚类在一个分支上, 而是被骨条藻属 *Skeletonema*、漂流藻属 *Planktoniella*、小盘藻属 *Minidiscus*、小环藻属 *Cyclotella* 等其他邻近藻属所分隔, 因此基于形态学建立的海链藻属并不是一个单系起源, 而是由多个并系类群所组成。此外, 诺氏海链藻 *T. nordenskiöldii* 作为海链藻属的模式种, 其系统学位置对于整个海链藻属应具有重要的指示意义, 但是在系统树上该种仅与部分海链藻属物种聚在一个小分支上, 并且短棘藻属 *Detonula*、小盘藻属 *Minidiscus*、杆链藻属 *Bacterosira* 物种穿插其中。除此之外, 还有其他一些海链藻属物种的系统学位置较为特殊。如杰拉德海链藻 *T. guillardii* 和威氏海链藻 *T. weissflogii* 聚为独立的一支; 假微型海链藻 *T. pseudonana* 与小环藻属物种聚在一起并且具有较高的置信值(BPP>0.90); 结线形海链藻 *T. nodulolineata*、狭线形海链藻以及地中海海链藻 *T. mediterranea* 位于同一个分支上, 但同时也被骨条藻属所分隔开。这些独立存在的小分支, 或许正是下一步海链藻属系统学研究的方向之一。

## 3 讨论

### 3.1 相似种的比较研究

狭线形海链藻与相似种的比较研究 狭线

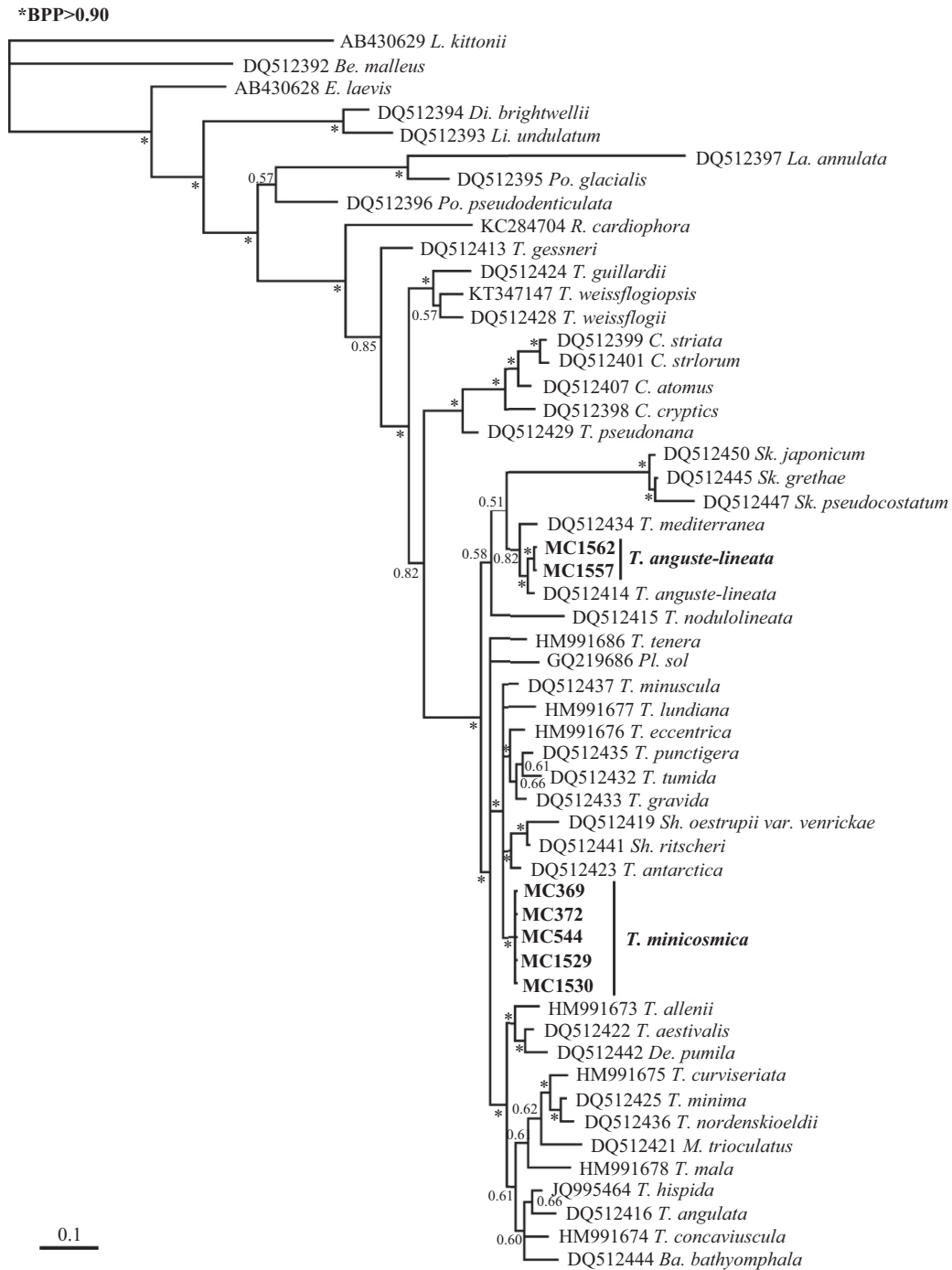


图 1 基于核糖体大亚基D1—D3区间序列构建的贝叶斯系统树

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree from Bayesian analysis inferred from sequences of D1—D3 region of LSU rRNA

其中属名缩写为: 丽纹藻属(*L.*), 中鼓藻属(*Be.*), 井字藻属(*E.*), 双尾藻属(*Di.*), 石丝藻属(*Li.*), 娄氏藻属(*La.*), 多孔藻属(*Po.*), 罗德藻属(*R.*), 海链藻属(*T.*), 小环藻属(*C.*), 骨条藻属(*Sk.*), 漂流藻属(*Pl.*), 盐野藻属(*Sh.*), 短棘藻属(*De.*), 小盘藻属(*M.*), 杆链藻属(*Ba.*); \*表示置信值>0.90

Generic abbreviations are: *Lampriscus* (*L.*), *Bellerochea* (*Be.*), *Eunotogramma* (*E.*), *Ditylum* (*Di.*), *Lithodesmium* (*Li.*), *Lauderia* (*La.*), *Porosira* (*Po.*), *Roundia* (*R.*), *Thalassiosira* (*T.*), *Cyclotella* (*C.*), *Skeletonema* (*Sk.*), *Planktoniella* (*Pl.*), *Shionodiscus* (*Sh.*), *Detonula* (*De.*), *Minidiscus* (*M.*), *Bacterosira* (*Ba.*). \* indicating supporting value>0.90

形海链藻最明显的特征是壳面半中央区具有多个支持突, 并排列成环状, 同样具有这个特征的还有地中海海链藻、萨氏海链藻 *T. sackettii*、威氏海链

藻、杰拉德海链藻等<sup>[22, 29, 30]</sup>。狭线形海链藻与威氏海链藻、杰拉德海链藻的区别特征是前者为独立筛板膜, 后两者为连续筛板膜。此外, 狭线形海链

藻壳缘支持突外管紧缩呈球状,后两者则是开放的管状结构。狭线形海链藻与地中海海链藻的形态特征最为接近,区别特征是:(1)壳面孔纹排列方式:狭线形海链藻为切线状排列,地中海海链藻为束状并且有若干条放射状硅质肋纹;(2)筛板膜的形态特征:狭线形海链藻是独立筛板膜,地中海海链藻的壳面中部是连续筛板膜,壳套处则为独立筛板膜;(3)半中央区支持突的排列方式:狭线形海链藻有时会有2—3个支持突紧密相邻的情况,但地中海海链藻则是单独分布;(4)半中央区支持突的位置:狭线形海链藻的壳面支持突位于孔纹之间的硅质壁上,而地中海海链藻的则是取代了壳面孔纹的位置。

Mahood等<sup>[27]</sup>基于形态特征将狭线形海链藻与地中海海链藻、湖沼海链藻*T. lacustris*、辐射盐野藻*Shionodiscus endoseriata*(原辐射海链藻)划分为同一类群,划分依据是它们的壳面半中央区具有一圈可变的支持突。威氏海链藻和杰拉德海链藻亦具有此特征,但系统树上却显示它们并不与狭线形海链藻聚为一支,而是独立聚在一个分支上。然而矛盾的是狭线形海链藻却与地中海海链藻聚在一个小分支上,这说明它们之间的亲缘关系又是较为接近。但是目前由于缺少湖沼海链藻、萨氏海链藻等相关物种的分子信息,所以难以判断具有壳面半中央区支持突的海链藻属物种是否为单起源。

之后Hernández-Becerril & Tapia Peña<sup>[26]</sup>根据壳面孔纹排列方式将狭线形海链藻与偏心海链藻*T. eccentrica*、厄氏盐野藻范氏变种*Sh. oestrupii* var. *venrickae*(原厄氏海链藻范氏变种)、细孔海链藻*T. punctifera*、门迪海链藻*T. mendiolana*、对称海链藻*T. symmetrica*以上壳面孔纹偏心状排列的物种归为同一类群。然而分子树上显示狭线形海链藻与厄氏盐野藻范氏变种以及偏心海链藻的系统学位置相距甚远,位于2个不同的大分支上,说明它与厄氏盐野藻范氏变种以及偏心海链藻的亲缘关系较远,同时这也表明壳面孔纹的排列方式不能作为海链藻属类群划分的依据。

**碟形海链藻与相似种的比较研究** 碟形海链藻的显著特征是壳缘唇形突的位置比壳缘支持突更靠近壳面中央。在已报道的现生海链藻属物种中,安达曼海链藻*T. andamanica*、小字海链藻、斑点海链藻*T. punctigera*、管状海链藻*T. tubifera*也具有此特征<sup>[31-35]</sup>,但是它们之间存在明显的形态学区别。首先,安达曼海链藻、斑点海链藻和管状海链藻具有壳面支持突,而碟形海链藻不具有这一特征。其次,碟形海链藻的壳缘支持突具有外管结构,而斑点海链藻无外管;碟形海链藻无闭合突结

构,而管状海链藻则有。就形态学特征而言,小字海链藻与碟形海链藻最为接近,它们都具有1环壳缘支持突,无壳面支持突以及1个具有明显外管的壳缘唇形突,且唇形突的位置比壳缘支持突更加远离壳缘。这2个种之间也具有一定的形态学差异:(1)小字海链藻的壳缘唇形突与1个独立的支持突相邻,这也是小字海链藻的特有特征,碟形海链藻并不具有;(2)碟形海链藻具有壳缘支持突外管,而小字海链藻则无外管;(3)碟形海链藻的壳套高度为3—5个孔纹;小字海链藻的壳套仅为1—2个孔纹高度。

以往研究建立了细弱海链藻复合群*T. subtilis complex*<sup>[32, 35]</sup>,将具有胶质状群体的细弱海链藻、萎软海链藻*T. mala*、小字海链藻、斑点海链藻*T. punctigera*等12个海链藻属物种归于其中<sup>[31, 32, 36, 37]</sup>。之后Park & Lee<sup>[28]</sup>在报道碟形海链藻时发现该种亦会形成胶质状群体(本文未观察到该群体特征),遂将其归为细弱海链藻复合群,同时基于形态学研究认为胶质状群体不能作为物种划分的依据,于是对细弱海链藻复合群进行了重新定义,并提出了细弱海链藻类群*T. subtilis group*这一概念,将安达曼海链藻*T. andamanica*、双环海链藻*T. diporocyclus*、伦德海链藻*T. lundiana*、碟形海链藻、小字海链藻、斑点海链藻和细弱海链藻以上7种海链藻归为该类群。从本文所构建的系统发育树上也显示萎软海链藻和小字海链藻等具有胶质状群体的海链藻并不聚在一起,而是与它们独立位于2个大的分支上,这表明萎软海链藻与它们的亲缘关系相对较远,所以这也从分子学角度验证了胶质状群体特征不能作为海链藻分类学体系的划分依据。此外,斑点海链藻并不与小字海链藻、碟形海链藻、伦德海链藻聚在一起,而是与偏心海链藻*T. eccentrica*、圆海链藻*T. gravida*、膨胀海链藻*T. tumida*聚为了1个小分支,并且具有较高的置信值(BPP>0.90),这表明斑点海链藻或与后3种海链藻的亲缘关系更为接近。但是目前,由于缺乏安达曼海链藻等其余3种海链藻的分子信息,所以并不能对该类群进行更为客观的分析。因此,单纯的依靠形态学特征所建立的细弱海链藻类群是否成立,还有待进一步的研究。

### 3.2 海链藻属的系统学研究

随着越来越多的海链藻属物种被报道,部分学者开始尝试对海链藻属特定类群进行系统学修订。其中一些修订工作得到了广泛的认可,例如:Alverson等<sup>[38]</sup>基于唇形突远离壳缘,支持突具有较长内管而无外管,将包括厄氏海链藻范氏变种、瑞

兹海链藻 *T. ritscheri* 等在内的 26 个种划分出来, 并建立新属——盐野藻属 *Shinodiscus*, 基于 LSU nrDNA 和 SSU nrDNA 的序列信息所建立的贝叶斯系统发育树中也支持这一藻属的建立<sup>[18]</sup>。然而, 也有一些修订工作并没有被普遍接受, 例如: *Stachura-Suchoples* 和 *Williams* 根据筛板膜的连续性建立了连筛藻属 *Conticribra*, 模式种为化石种: 三环连筛藻 *C. tri-circularis*, 同时他们也将具有连续筛板膜的现生种杰拉德海链藻、威氏海链藻、内华达海链藻 *T. nevadica* 修订至此属<sup>[39]</sup>。但是该属模式种的另一个显著特征是具有三环壳缘支持突, 而这一特征在其修订的现生海链藻中并不存在, 并且化石种分子数据的缺失也导致无法利用分子生物学技术去验证该属的成立是否客观。

迄今为止, 全球已报道的海链藻现生种约有 170 种, 而在 NCBI 上可查询到基因序列的海链藻属物种不过 30 种, 并且多数序列信息都是核糖体基因, 分子数据的缺乏已成为制约海链藻属系统学研究的重要因素, 这也是今后研究的一个重要内容。

#### 参考文献:

- [1] Round F E, Crawford R M, Mann D G. The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera [M]. Cambridge: Cambridge University Press. 1990, 747
- [2] Hasle G R, Syvertsen E E. Marine Diatoms [A]. In: Tomas C R (Eds.), Identifying Marine Phytoplankton [M]. San Diego: Academic Press. 1997, 5—387
- [3] Cheng Z D, Gao Y H, Liu S C. Nano-diatoms in Fujian Coast [M]. Beijing: Ocean Press. 1993, 91 [程兆第, 高亚辉, 刘师成. 福建沿岸微型硅藻. 北京: 海洋出版社. 1993, 91]
- [4] Li Y. Taxonomic studies and ecological characteristics on Nano-diatoms in coastal waters of China [D]. Doctoral dissertation, Xiamen University, Xiamen. 2006 [李扬. 中国近海海域微型硅藻的生态学特征和分类学研究. 博士学位论文, 厦门大学, 厦门. 2006]
- [5] Fryxell G A, Hasle G R. Taxonomy of harmful diatoms [A]. In: Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae [M]. Paris: Imprimerie Landais. (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). 2004, 465—510
- [6] Xie W L, Li Y, Gao Y H. First record of *Thalassiosira curviseriata* Takano (Bacillariophyta) and its bloom in the East China Sea [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2008, 27(6): 124—132
- [7] Armbrust E V, Berges J A, Bowler C, et al. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism [J]. *Science*, 2004, 306(5693): 79—86
- [8] Bowler C, Allen A E, Badger J H, et al. The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes [J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 239—244
- [9] Park J S, Lee J H. A study on the fine structure of marine diatoms in Korean coastal waters: Genus *Thalassiosira* 5 [J]. *Algae*, 2010, 25(3): 121—131
- [10] Sar E A, Sunesen I, Lavigne A S, et al. *Thalassiosira rotula*, a heterotypic synonym of *Thalassiosira gravida*: morphological evidence [J]. *Diatom Research*, 2011, 26(1): 109—119
- [11] Guiry M D, Guiry G M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, 2016
- [12] Li Y, Zhao Q L, Lü S H. The genus *Thalassiosira* off the Guangdong coast, South China Sea [J]. *Botanica Marina*, 2013, 56(1): 83—110
- [13] Li Y, Zhao Q L, Lü S H. Taxonomy and species diversity of the diatom genus *Thalassiosira* (Bacillariophyceae) in Zhejiang coastal waters, the East China Sea [J]. *Nova Hedwigia*, 2014, 99(3-4): 373—402
- [14] Guillard R R L, Hargraves P E. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte [J]. *Phycologia*, 1993, 32(3): 234—236
- [15] Lundholm N, Daugbjerg N, Moestrup Ø. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA [J]. *European Journal of Phycology*, 2002, 37(1): 115—134
- [16] Scholin C A, Herzog M, Sogin M, et al. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene [J]. *Journal of Phycology*, 1994, 30(6): 999—1011
- [17] Nunn G B, Theisen B F, Christensen B, et al. Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 42(2): 211—223
- [18] Alverson A J, Jansen R K, Theriot E C. Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by *thalassiosiroid* diatoms [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 45(1): 193—210
- [19] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence

- alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [C]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, **41**: 95—98
- [20] Nylander J A A. MrModeltest. Program distributed by the author [M]. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004, 65
- [21] Ronquist F, Teslenko M, van der 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
- [22] Fryxell G A, Hasle G R. genus *Thalassiosira*: some species with a modified ring of central strutted processes [J]. *Nova hedwigia. Beihefte*, 1977, **54**(1—2): 15—66
- [23] Hoppenrath M, Beszteri B, Drebes G, *et al.* *Thalassiosira* species (Bacillariophyceae, Thalassiosirales) in the North Sea at Helgoland (German Bight) and Sylt (North Frisian Wadden Sea) - a first approach to assessing diversity [J]. *European Journal of Phycology*, 2007, **42**(3): 271—288
- [24] Harris A S D, Medlin L K, Lewis J, *et al.* *Thalassiosira* species (Bacillariophyceae) from a Scottish sea-loch [J]. *European Journal of Phycology*, 1995, **30**(2): 117—131
- [25] Muylaert K, Sabbe K. The diatom genus *Thalassiosira* (Bacillariophyta) in the estuaries of the Schelde (Belgium/The Netherlands) and the Elbe (Germany) [J]. *Botanica Marina*, 1996, **39**(1—6): 103—116
- [26] Hernández-Becerril D U, Tapia Peña M I. Planktonic diatoms from the Gulf of California and coasts off Baja California: species of the genus *Thalassiosira* [J]. *Botanica marina*, 1995, **38**(1-6): 543—556
- [27] Mahood A D, Fryxell G A, McMillan M. The diatom genus *Thalassiosira*: species from the San Francisco Bay system [J]. *Proceedings of the California Academy Sciences*, 1986, **44**(8): 127—156
- [28] Park J S, Lee J H. A new gelatinous colony-forming *Thalassiosira minicosmica* sp. nov. (Bacillariophyta) from Korean coastal waters and a consideration of the *Thalassiosira subtilis* group [J]. *Diatom Research*, 2015, **30**(2): 163—173
- [29] Hasle G R. The planktonic marine diatom *Thalassiosira mediterranea* (synonym *Thalassiosira stellaris*) [J]. *Diatom Research*, 1990, **5**(2): 415—418
- [30] Hasle G R. Some freshwater and brackish water species of the diatom genus *Thalassiosira* Cleve [J]. *Phycologia*, 1978, **17**(3): 263—292
- [31] Gedde A D. *Thalassiosira andamanica* sp. nov. (Bacillariophyceae), a new diatom from the Andaman Sea (Thailand) [J]. *Journal of Phycology*, 1999, **35**(1): 198—205
- [32] Hasle G R. *Thalassiosira subtilis* (Bacillariophyceae) and two allied species [J]. *Norwegian Journal of Botany*, 1972, **19**: 110—137
- [33] Hasle G R. *Thalassiosira punctigera* (Castr.) comb. nov., a widely distributed marine planktonic diatom [J]. *Nordic Journal of Botany*, 1983, **3**(5): 593—608
- [34] Hasle G R. Examination of diatom type material: *Nitzschia delicatissima* Cleve, *Thalassiosira minuscula* Krasske, and *Cyclotella nana* Hustedt [J]. *British Phycological Journal*, 1976, **11**(2): 101—110
- [35] Fryxell G A. Three new species of *Thalassiosira*, with observations on the occluded process, a newly observed structure of diatom valves [J]. *Nova hedwigia. Beihefte*, 1975, **53**(1—2): 57—73
- [36] Fryxell G A, Gould Jr R W, Watkins T P. Gelatinous colonies of the diatom *Thalassiosira* in Gulf Stream Warm Core Rings including *T. fragilis*, sp. nov [J]. *British Phycological Journal*, 1984, **19**(2): 141—156
- [37] Sunesen I, Sar E A. *Thalassiosira fryxelliae* nov. spec. (Bacillariophyceae) from Argentinian coastal waters [J]. *Botanica Marina*, 2004, **47**(3): 238—247
- [38] Alverson A J, Kang S H, Theriot E C. Cell wall morphology and systematic importance of *Thalassiosira ritscheri* (Hustedt) Hasle, with a description of *Shionodiscus* gen. nov [J]. *Diatom Research*, 2006, **21**(2): 251—262
- [39] Stachura-Suchoples K, Williams D M. Description of *Conticribra tricircularis*, a new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship to other continuous cribra species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its freshwater origin [J]. *European Journal of Phycology*, 2009, **44**(4): 477—486

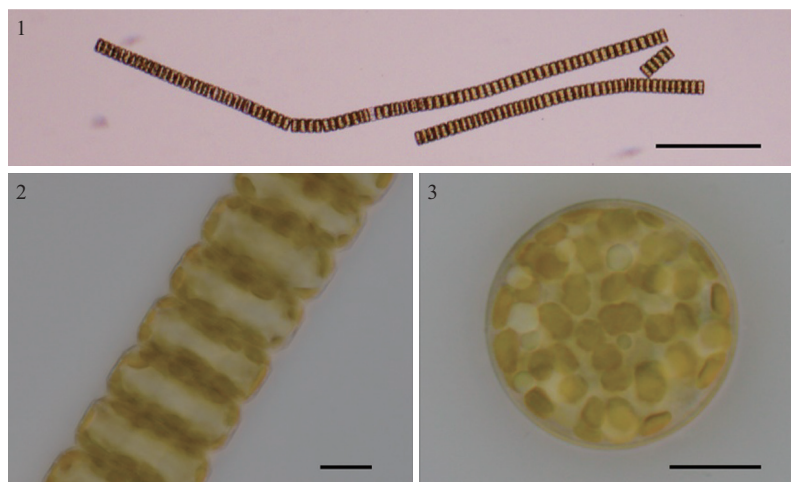
## THE MORPHOLOGICAL AND PHYLOGENETIC STUDIES ON TWO NEWLY RECORDED *THALASSIOSIRA* SPECIES FROM CHINA

GUO Ya-Qiong and LI Yang

(Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** To investigate the species diversity of *Thalassiosira* in China and provide molecular data for further phylogenetic studies, monoclonal strains have been isolated and established from some representative sites in Chinese coast. The morphology was studied using light and electron microscopy, and the hypervariable D1–D3 region of the nuclear large subunit ribosomal RNA-encoding gene region (LSU rRNA gene) was amplified and sequenced. Two newly recorded *Thalassiosira* species (*T. anguste-lineata* (Schmidt) Fryxell & Hasle and *T. minicosmica* Lee & Park) for China were reported based on the combination of morphology and molecular data. Their detailed morphology were described and compared with allied taxa. The results of molecular phylogenetic tree based on sequences data of D1–D3 region of LSU rRNA indicated that neither *T. anguste-lineata* nor *T. minicosmica* were clustered with *T. nordenskiöldii*, the type species of the genus *Thalassiosira*, suggesting great genetic difference is present among *Thalassiosira* taxa, and that the present morphology-based genus *Thalassiosira* is not a natural group because it is separated by some other allied genus, such as *Skeletonema*, *Cyclotella*, *Planktoniella*. These results revealed that the present reported *Thalassiosira* species should be paraphyletic group and will be gradually revised into multiple independent genera in future phylogenetic study. However, it is difficult to carry out specific taxonomic revisions because of limited molecular data that is an important constraint for the advancement of related researches.

**Key words:** *Thalassiosira anguste-lineata*; *Thalassiosira minicosmica*; Newly record; *Thalassiosira*; Morphology; Phylogenetics

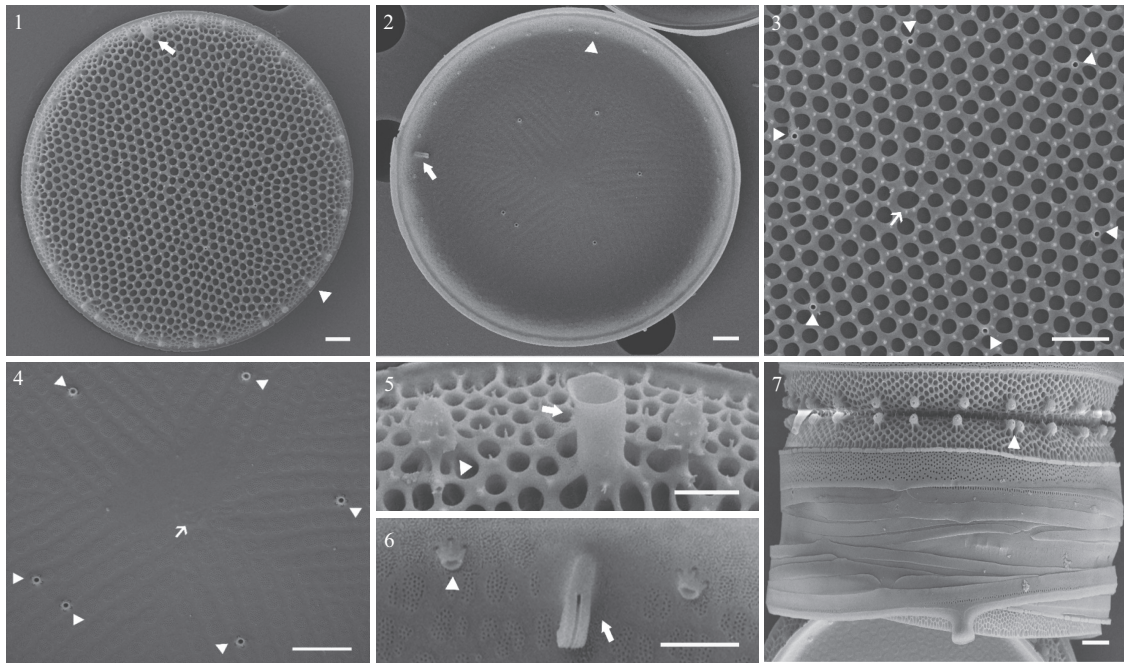


图版 I

Plate I

1—3 狭线型海链藻(LM); 1—2. 链状群体(MC1557); 3. 壳面观(MC1562); 标尺: 200 μm (1), 10 μm (2—3)

1—3 *T. anguste-lineata* (LM); 1—2. Chains in girdle views (MC1557); 3. valve view (MC1562). Scale bars: 200 μm (1), 10 μm (2—3)

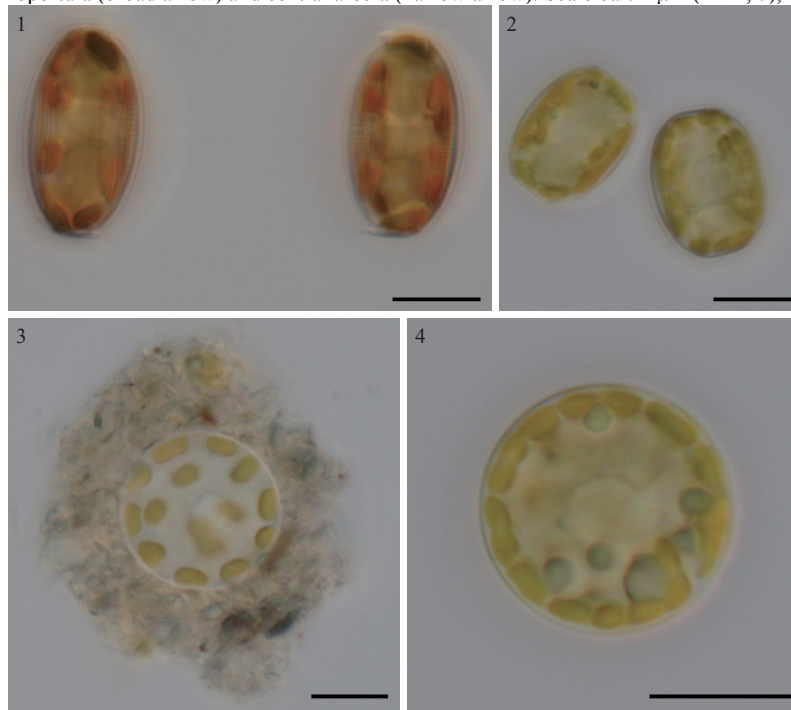


图版 II

Plate II

1—7 狭线型海链藻(SEM); 1. 外壳面观(MC1562); 2. 内壳面观(MC1557); 3—4. 壳面支持突及中央大孔, 3(MC1562), 4(MC1557); 5—6. 壳缘支持突和唇形突(MC1557); 7. 环面观及壳套(MC1557)。三角示支持突, 宽箭头示唇形突, 窄箭头示中央大孔; 标尺: 2  $\mu\text{m}$  (1—4, 7), 1  $\mu\text{m}$  (5—6)

1—7 *T. anguste-lineata* (SEM). 1. Whole external valve (MC1562); 2. Whole internal valve (MC1557); 3—4. Fultoportulae and central areolae, 3 (MC1562), 4 (MC1557); 5—6. Marginal fultoportulae and rimoportulae (MC1557); 7. Girdle view and valve mantle (MC1557). Fultoportula (Triangle), rimoportula (broad arrow) and central areola (narrow arrow). Scale bar: 2  $\mu\text{m}$  (1—4, 7), 1  $\mu\text{m}$  (5—6)

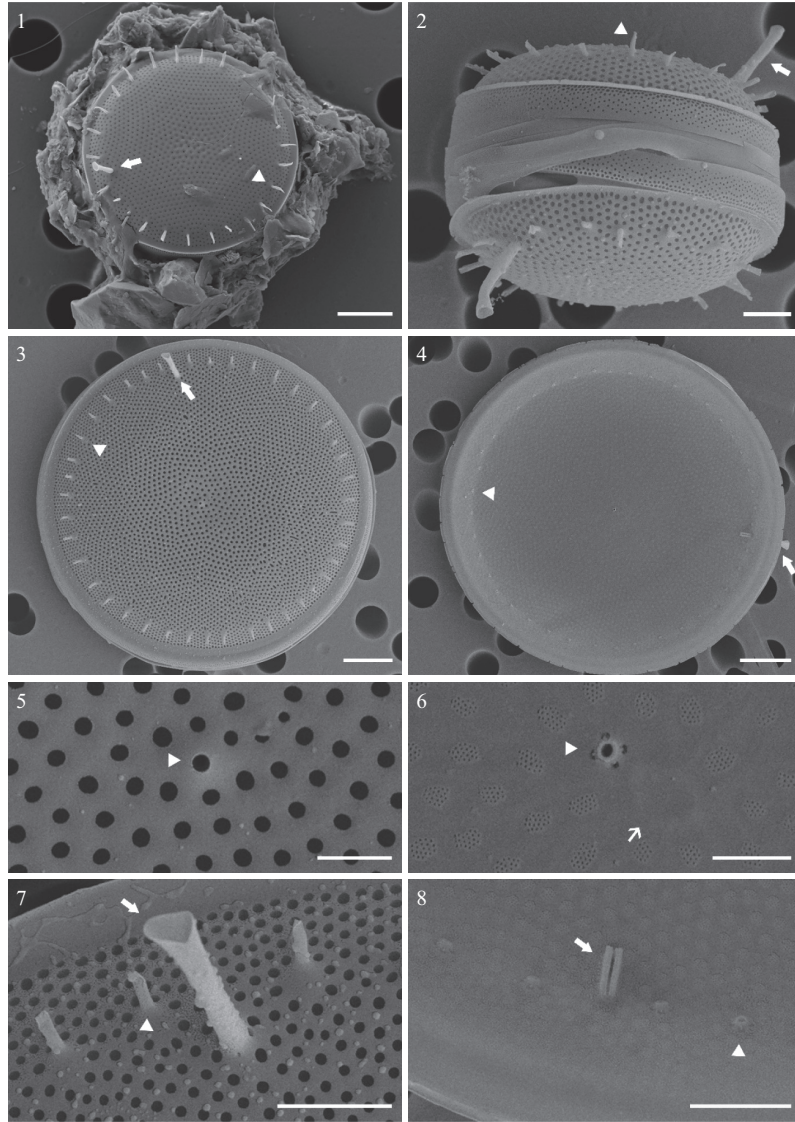


图版 III

Plate III

1—4 碟形海链藻(LM); 1—2. 环面观, 1. 链状群体(MC372), 2. 单细胞个体(MC1529); 3—4. 壳面观(MC1529); 标尺: 10  $\mu\text{m}$

1—4 *T. minicosmica* (LM). 1—2. Girdle views, 1. Chain in girdle view (MC372), 2. Individual cells (MC1529); 3—4. Valve views (MC1529). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$



图版IV

Plate IV

1—8 碟形海链藻(SEM)。1. 外壳面观(MC1529); 2—8 (MC372); 2. 环面观及壳套, 3. 外壳面观, 4. 内壳面观, 5. 外壳面中央支持突, 6. 内壳面中央支持突及中央大孔, 7—8. 壳缘支持突和唇形突。三角示支持突, 宽箭头示唇形突, 窄箭头示中央大孔; 标尺: 5  $\mu\text{m}$  (1, 3—4), 2  $\mu\text{m}$  (2, 7—8), 1  $\mu\text{m}$  (5—6)

1—8 *T. minicosmica* (SEM). 1. Whole external valve (MC1529); 2—8 (MC372); 2. Girdle view and valve mantle, 3. Whole external valve, 4. Whole internal valve, 5. Central fultoportulae on external valve, 6. Central fultoportula and central areola on internal valve, 7—8. Marginal fultoportula and rimoportula. Fultoportula (Triangle), rimoportula (broad arrow) and central areola (narrow arrow). Scale bar: 5  $\mu\text{m}$  (1, 3—4), 2  $\mu\text{m}$  (2, 7—8), 1  $\mu\text{m}$  (5—6)