

赤潮拟菱形藻形态学分类和分子生物技术鉴定研究概述

Review of morphological and molecular identification of *Pseudo-nitzschia*, a bloom forming diatom

高 杨, 梁君荣, 高亚辉, 王 鹏, 虞秋波

(厦门大学 生命科学院, 福建 厦门 361005)

中图分类号: Q946.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)01-0067-06

近年来, 随着环境的恶化和人类对环境监测重视程度的提高, 有关赤潮爆发的报道频繁出现。特别是关于有害藻赤潮(Harmful Algal Blooms)发生地域、频率、密度及其危害的报道日渐增多, 人们的注意力开始集中在对有害赤潮藻的控制上。这就需要控制有害赤潮藻的生态和环境方面的参数有更好的了解。相应的, 在赤潮发生中对有潜在产毒能力的赤潮藻的监测也成为研究的热点。

有毒赤潮藻的研究长期以来都集中于甲藻和蓝藻上, 但是, 1987年11月在加拿大发生的一次大规模拟菱形藻(*Pseudo nitzschia*)赤潮造成了至少3人死亡, 上百人中患毒病的严重后果。经研究发现, 这次危害的罪魁祸首是神经性毒素——软骨藻酸(Domoic acid, 简称DA)。它是一种低分子量的氨基酸, 是由拟菱形藻产生后, 经过滤食性动物积累并进入食物链, 进而影响海洋生物和人类的健康^[1]。这是人们第一次发现硅藻会产生毒素, 拟菱形藻从此引起了越来越广泛的关注^[1]。

目前, 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^[1, 2]。而有关拟菱形藻属的分类系统则比较混乱, 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在形态学上很难区分, 这些都影响了对由拟菱形藻引发赤潮的研究^[3-6]。作为目前藻类分类研究中一个争论的热点, 作者在此对拟菱形藻的形态和分子鉴定方面的研究进展进行综述。

1 形态学研究历史及现状

拟菱形藻(*Pseudo nitzschia*)是一种常见的海洋微型藻类。它属于硅藻门, 羽纹纲, 管壳缝目, 菱形藻科, 可以广泛分布在两极、温带、亚热带和热带等地区^[7]。拟菱形藻主要通过细胞相互重叠的形式形成群体。单个细胞和群体都有运动能力, 可以纵向滑动。运动方式是先朝一个方向滑动几秒, 接着朝相反方向滑动。每个细胞含有2个叶绿体, 位于细胞两端, 有中央核区。藻细胞的壳环面是由一些线形条带组成。在壳面和壳环面观上, 藻细胞通常是直的披针形, 但是部分种(如:*P. seriata*)在壳面观上是不以顶轴对称的。间点条的数目通常与小肋突的数目相等或者接近其2倍。细沟间经常有一到多排的孔纹。壳缝不位于壳面正中, 而且嵌入壳面, 壳缝的沟壁上没有孔。细胞的2条壳缝在两个壳面上对角排列。一些种在中央壳缝末端之间有中节。光学显微镜下可观察到在中央小肋突之间有很大的空隙(中央间隙)^[3]。

1.1 拟菱形藻属系统分类地位的确定

“拟菱形藻”的名字第一次出现在1899年出版的

收稿日期: 2003-08-13; 修回日期: 2004-02-14

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2001CB409701); 国家自然科学基金(3027118); 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室开放基金课题。

作者简介: 高杨(1977-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 微藻分子生物学, E-mail: flytohigh@eyou.com; 梁君荣, 通讯作者, 女, 讲师, 博士, E-mail: sunljr@163.com

由 Peragallo^[8]编写的书中,最早被归为菱形藻属(*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具有细胞末端更尖锐,并且聚集在一起的细胞可以相互滑动而形成链状的特征,所以把它们独立出来成为拟菱形藻属^[8]。后来因为其他形态学上的争论(例如 *N. fraudulenta* 和 *N. seriata* 的壳缝与 *Fragilariopsis* 相比只是部分缩短,而且它的运动能力至少得到部分保留),Hustedt 又在 1958 年把它们重新归为菱形藻属的一部分。1972 年 Hasle 因为拟菱形藻和 *Fragilariopsis* 之间在形态上具有很大相似性,把 *Fragilariopsis* 也归为菱形藻的一个部分,而 Round 等因为 *Fragilariopsis* 在形态上和菱形藻有一定的差别,所以建议还是将其保留为单一属。最后 Hasle^[3]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,但仍然强调拟菱形藻和 *Fragilariopsis* 之间有密切的联系。由此可见,拟菱形藻属的系统分类一直以来都是一个有争议的问题。这些争议源于拟菱形藻形态结构上的细微差别,而这些细微的差别通常被作为种类划分的依据。

1.2 拟菱形藻种间形态学分类研究进展

拟菱形藻在属水平上的鉴定工作在光学显微镜下就可以比较容易地完成,但是属内种间的鉴定就十分困难。不同种类间形态结构差异微小,必须通过电子显微镜才可以辨别。事实上,目前拟菱形藻的分类鉴别主要是对藻细胞的大小、形态、硅质壳的超微结构等特征进行辨析。例如壳缝中是否存在居中的大的空隙,壳面孔纹和小肋突的数目和结构上的不同等。

细胞壳面的宽度被作为一个重要的拟菱形藻种间鉴定特征^[9]。基于这个特征拟菱形藻被细分为 2 个群。属于 '*P. delicatissima* 混合群' 的种壳面较狭窄(壳面的宽度 $\leq 3 \mu\text{m}$),而属于 '*P. seriata* 混合群' 的是壳面比较宽(壳面的宽度 $\geq 3 \mu\text{m}$)的种^[10]。但是,仍有 3 个种不符合这个判定标准,它们的壳面宽度范围刚好介于 $3 \mu\text{m}$ 左右^[10]。前面的 2 个种已经被归为 '*P. delicatissima* 混合群' 中^[8],而 *P. americana* 是否属于拟菱形藻还在争议中。但在实际分析中,只有 *P. turgidula* 是壳面比较狭窄的种(' *P. delicatissima* 混合群'),而其他 2 个种壳面比较宽(' *P. seriata* 混合群')^[7]。这表明了细胞壳面的宽度并不是一个用来区分种的特别理想的特征,细胞壳面的大小范围在硅藻类中由于他们的特有细胞分隔可能会非常宽。

对拟菱形藻属的不同种进行分析发现,以壳面条纹和小肋突的数量和结构作为不同种的重要分类特征,在系统发生学研究中也未获得一个一致的结果。事实上,条纹和小肋突数量相当的种,也可能被划分在亲缘关系非常近或非常远的分支中。如 *P. pungens* 和 *P. multiseriata* 具有相同数量的条纹和小肋突(每 $10 \mu\text{m}$ 内条纹数:10~15;小肋突数:10~13)^[5],是在系统进化上属于亲缘关系十分相近的两个种。而相反,*P. delicatissima* 和 *P. multistriata* 同样也包含相同数目的条纹和小肋突,同样以显微结构的条纹作为区分标准,但亲缘关系却比较远。这在目前已知的所有系统进化发生树中都得到体现。作者依据 LSU rDNA 基因序列采用最大简约法所作的 19 种拟菱形藻系统进化树也体现了这一点(图 1)。此外,作者也发现系统发生接近的种如 *P. fraudulenta* 和 *P. subfraudulenta* 却具有不同的条纹和小肋突数量。可见,这些形态学特征属性,虽然有助于种的确认,但是其在属内识别不同种类的价值是有限的。

此外,就以已经发表的作为种间鉴定依据的形态学上的特征来说,相同种的不同地理株系之间也会存在差别。以 *P. multistriata* 为例,Orsini^[9]等对其所采集和培养的 *P. multistriata* 细胞在光镜和透射电镜下进行观察,其壳面观为:细胞中部线形,边缘渐细变窄到圆滑的末端。壳环观为:壳面两端是 S 形的,由此群体呈现出波浪形的外观。细胞顶轴长度 $38 \sim 50 \mu\text{m}$ (平均 $44 \mu\text{m}$),切顶轴长 $2.5 \sim 4 \mu\text{m}$ (平均 $3.2 \mu\text{m}$)。透射电镜观察:壳面 $10 \mu\text{m}$ 内有 23~32 个小肋突,37~44 个条纹。每个条纹有 2 排小孔(个别有 1 排或 3 排),在 $1 \mu\text{m}$ 内含有 11~13 个孔。这些和已经报道的种描述的电镜照片特征基本相符。但缺少了通常作为 *P. multistriata* 鉴定标准的一些特征,如:壳面每 $10 \mu\text{m}$ 只有 5~6 个孔,而且缺乏居中的大空隙,壳面末端在接近顶部则有 1 或 2 排倾斜的小孔。

Orsini^[9]研究的其他几种拟菱形藻 *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*, *P. fraudulenta* 和 *P. subfraudulenta* 的主要形态特征也基本符合目前世界上公认的特征描述,但是在一些次要的形态特征方面却有所不同。如 Hasle 等描述 *P. fraudulenta* 细胞的 2 种不同的壳面末端。一种靠近顶端处有 1 或 2 排倾斜的孔,而那不勒斯湾采集的样品靠近顶端为直线形排列的孔。相反,另外一种末端是直线形的孔,在那那不勒斯湾采集的该样品中却恰好是倾斜排列。*P. subfraudulenta* 细胞最初的描述是“壳环观呈明显的 S 形”,但是这个

特征并没有出现在采集自那不勒斯湾的藻细胞中，它们的壳环观上呈直线形。

2 拟菱形藻分子生物学技术鉴定研究进展

以形态学的细微特征对拟菱形藻进行鉴定存在许多困难和争议，于是人们开始把目光投向各类分子生物学技术。这些技术的应用大大地加快了包括拟菱形藻在内的各种赤潮微藻的种类鉴定效率，且这些方法已成为拟菱形藻形态学鉴定非常必要的辅助工具^[11,12]，并展现出越来越广泛的应用前景。

2.1 目的基因序列的分析和比较

近十年，分子标记技术在生物界得到了充分的发展。在所有的方法中，DNA 序列的比较分析是最直接的揭示遗传物质变异的方法。DNA 序列分析的数据既可以用于种间的宏观进化研究，也可以用于种内的微进化研究。赤潮微藻中，研究较多的基因序列为核糖体 RNA 基因，它包括核糖体大亚基（LSU rRNA）、核糖体小亚基（SSU rRNA）和转录间隔序列（ITS）等几个区域。rRNA 普遍存在于所有的生物细胞中，具有相似的结构和功能，并且同时交替分布着保守区和高变区。其中核糖体大亚基基因高变区的序列差别很大，甚至完全不同。核糖体大亚基基因这一进化模式，在用于亲缘关系远近不同的生物特征分析时具有极大的优越性。至今为止，拟菱形藻的基因序列分析主要集中在 LSU rRNA 这个区域上（表 1），且研究藻种多为产毒

藻。如 *P. multiseriata*, *P. pungens*, *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima* 等均为基因序列分析的热点。

作者根据 NCBI 国际基因数据库中已录入的拟菱形藻的 LSU rDNA 基因序列作出了 19 种拟菱形藻的最大简约法系统进化树（图 1）。从该系统进化树可以看出 *P. australis* 和 *P. seriata* 是亲缘关系很近的 2 个种，序列分析表明它们之间差异很小（0.13% ~ 0.5%）。虽然它们在形态学上确实存在细微差别，但总的来说，2 个种在形态和分子数据方面的极大相似性以致 Rivera 建议把它们作为同种对待。

但是，通过序列分析获得的分析结果和根据形态学进行分类所得的结果有时也存在一些偏差。比如上面提到的 *P. pungens* 和 *P. multiseriata*，从图 1 可知它们在系统发生上是亲缘关系相距较远的种，但这 2 个种的形态学特征却非常相似，差别仅在于节间带和条纹膜结构的不同。由于二者之间很大的相似性，Hasle 最初认为 *P. multiseriata* 和 *P. pungens* 属于同一个种。不过基于分子水平数据的最新分析支持把 *P. multiseriata* 作为一个独立的种。

再如 *P. fraudulenta* 和 *P. subfraudulenta*，由图 1 可知它们在分子水平非常相似（1.7% ~ 2.5% 的碱基对差异），但是在形态学上的特征有所不同：*P. fraudulenta* 有相同数目的条纹和小肋突，披针形的壳面外观，而 *P. subfraudulenta* 的内条纹数目更多而且壳面外观更接近直线形，这些差异又支持将这 2 个种完全分开。

表 1 拟菱形藻核糖体 RNA 序列分析情况

拉丁学名	中文名	所测基因序列	测序藻株数	是否产毒
<i>Pesudo. multiseriata</i>	多列拟菱形藻	SSU rRNA, LSU rRNA, ITS2, ETS1, 5.8S rRNA	12	是
<i>P. pungens</i>	尖刺拟菱形藻	SSU rRNA, LSU rRNA, ITS2, ETS1, 5.8S rRNA	12	是
<i>P. australis</i>	澳洲拟菱形藻	SSU rRNA, LSU rRNA, ITS2, ETS1, 5.8S rRNA	8	是
<i>P. delicatissima</i>	优美拟菱形藻	LSU rRNA,	6	是
<i>P. pseudodelicatissima</i>	伪优美拟菱形藻	LSU rRNA,	10	是
<i>P. seriata</i>	成列拟菱形藻	LSU rRNA,	2	是
<i>P. galaxiae</i>		LSU rRNA,	2	否
<i>P. cf. hemeii</i>		LSU rRNA,	1	否
<i>P. brasiliiana</i>		LSU rRNA,	4	否
<i>P. fraudulenta</i>		LSU rRNA,	4	是
<i>P. subfraudulenta</i>		LSU rRNA,	2	否
<i>P. micropora</i>		LSU rRNA,	1	否
<i>P. cf. subpacifici</i>		LSU rRNA,	3	否
<i>P. turgidula</i>		LSU rRNA,	1	是
<i>P. cf. pseudodelicatissima</i>		LSU rRNA,	1	否
<i>P. Americana</i>		LSU rRNA,	1	否
<i>P. inflatula</i>		LSU rRNA,	1	否

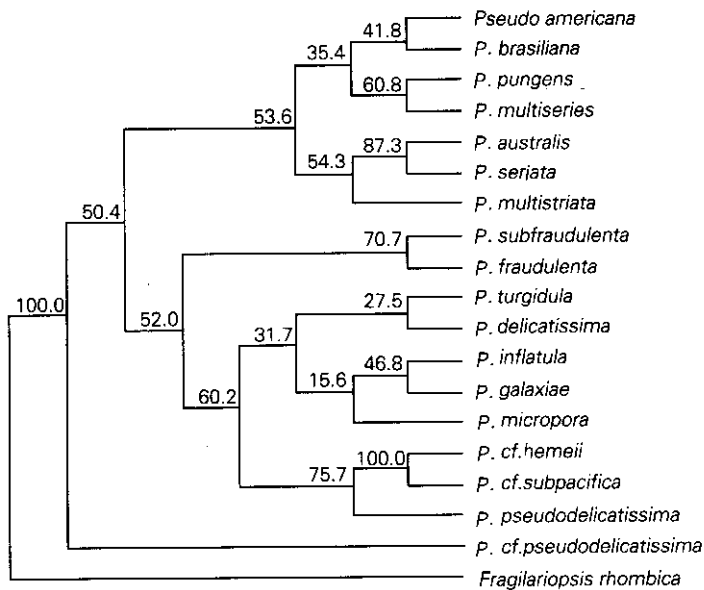


图1 基于 LSU rDNA 基因序列的 19 种拟菱形藻属的最大简约法系统进化树

2.2 分子探针的设计与应用

通过 DNA 序列分析进行拟菱形藻分类鉴定的优势在于信息量的完整性,但近年来出于方法的快速、简单甚至自动化的需求,在分子鉴定中,尝试较多的另一种方法是针对核基因编码的核糖体 RNA(rRNA)序列设计合成具有种特异性的 DNA 寡聚核苷酸探针,利用这些特异性分子探针进行种类鉴定。对拟菱形藻种特异性基因序列的搜寻结果主要为 rRNA 基因(rDNA),这其中包括核糖体小亚基,5.8S RNA,部分核糖体大亚基(LSU)编码区和 ITS 区的序列。应用分子探针针对拟菱形藻进行鉴定所采用的方法也在不断完善中。目前主要采用 2 种方法:全细胞杂交和“三明治”杂交^[12,13]。在全细胞杂交中,通过增加细胞膜的通透性使探针进入到细胞内和目标序列进行杂交,因被杂交细胞的外部形态得到完整的保存而较受青睐。探针事先做好荧光标记,以便杂交后能通过荧光显微镜或流式细胞仪进行检测。Miller 和 Scholin^[12,13]以不同种拟菱形藻的 LSU rRNA 为目的序列设计了一系列种特异性的寡核苷酸探针。这些探针在对从加利福尼亚的蒙特利湾(Monterey Bay)分离到的拟菱形藻进行鉴定时,取得了很好的效果。对新采集的 31 个样品进行的探针分析中,成功检出了 *P. multiseriis*, *P. pungens*, *P. australis*, *P. fraudulenta* 和 *P. pseudodelicatissima* 等 5 个种,并使用电子显微镜进行了形态学特征的验

证,得到一致的结果。其他 4 个未与任何探针杂交的样品中无拟菱形藻的存在。但是在为上述拟菱形藻设计的 15 种特异性探针中,有些探针并没有取得预期的效果。例如其中 3 个样品同时与 *P. fraudulenta* 和 *P. hemii* 的探针杂交,经形态学鉴定发现是 *P. subpacificae*(Hasle)Hasle。而为 *P. hemii* 设计的 3 种探针中,只有 1 种是有效的。这可能由于不同种之间的最有效的探针序列往往位于 LSU rRNA 的不同区域上,且不同种拟菱形藻的核糖体三级结构对探针接近目的序列难易程度不同,从而影响了特异性分子探针的特异性。

Parsons^[14]等将在 Monterey Bay 的拟菱形藻进行鉴定时取得良好效果的探针用于路易斯安那沿海的相应拟菱形藻的鉴定工作中,发现了一些问题。对采集样品同时进行探针鉴定和电子显微镜观察后,发现所有探针中只有为 *P. multiseriis* 设计的特异探针与该藻的杂交相符性较好,这说明两地该种拟菱形藻该目的序列相同。对其他样品进行鉴定过程中有 15% 的假阳性(探针检出而电子显微镜下未检测到)和 19% 的假阴性(探针未检测到而电子显微镜下可以观察到)的现象,以及部分探针的非特异性杂交现象。例如 *P. pseudodelicatissima* 不与其特异性探针杂交(在 Monterey Bay 的样品中显示该探针可成功与 *P. pseudodelicatissima* 杂交)而与 *P. delicatissima* 和 *P.*



australis 设计的探针发生非特异性杂交。产生假阳性结果的原因可能有以下几方面:(1) 探针的最低检出误差低于电子显微镜的最低检出误差。扫描电镜的最低检出误差在 1% (100 个细胞有 1 个无法检出), 而探针的最低检出误差为 0.043%^[14]。当样品丰度较小的情况下, 很有可能产生假阳性的现象;(2) 受到非特异性杂交的影响。比如 *P. pseudodelicatissima* 与为 *P. delicatissima* 和 *P. australis* 设计的探针发生非特异性杂交后会产生 *P. delicatissima* 或 *P. australis* 的假阳性现象。而产生假阴性的原因可能包括以下几点:(1) 由于探针荧光淬灭或变暗, 影响检测效果;(2) 死亡或衰亡期的硅藻无法用探针检出但是可以通过电子显微镜检出;(3) 非特异性杂交, 例如使用特异性探针针对 *P. pseudodelicatissima* 进行鉴定时并未成功杂交而引起假阴性结果。错误的杂交结果也可能与这两处地点的同种拟菱形藻数千年来受地理隔离等因素影响的分子进化导致 LSU rRNA 序列产生差异有关。

拟菱形藻分子探针检测技术还存在一个问题, 即不同地区的相同种在 LSU rRNA 的序列上存在一定的差异性。这导致该种的“特异性”探针并不能在全世界范围内对该种进行准确鉴定。为加州的拟菱形藻种设计的分子探针被用于对世界范围内的拟菱形藻进行鉴定, 显示的结果表明不是所有探针都是特异性的^[13,14]。在将种特异性的拟菱形藻探针序列和从那不勒斯湾分离的种的序列进行比较时, 会出现探针与特定种的序列不匹配而和不同种的序列匹配的情况。可见物种遗传多样性对特异性探针的设计可产生不利影响。所以, 在正确的探针合成完善之前, 对全世界范围的种内多样性进行彻底筛选是非常必要的。

2.3 其他方法

应用藻细胞的遗传物质进行拟菱形藻种类鉴定的方法还在不断尝试, 如采用直接作用于拟菱形藻细胞的多系抗体来进行不同种的区分, 最终结果需要免疫荧光才可以观察到种间的差别。Rhodes 等已经成功地将该方法应用于 *P. pungens* 和 *P. multiseriata* 的鉴定中。

3 中国拟菱形藻的研究概况

近年来, 国外学者采用形态学和分子生物学方法对拟菱形藻进行种类鉴定作了大量工作, 而国内在拟菱形藻的相关方面研究十分有限, 有记录的种较少,

而且对是否有产毒种(株)的存在也是众说纷纭。金德祥等首次对我国近海的尖刺拟菱形藻进行了种的描述。齐雨藻等报道了我国沿海的一个拟菱形藻新种 *P. sinica* 及其赤潮生态学特征。邹景忠等对中国近海尖刺拟菱形藻种下分类做了初步研究, 将其分为 2 个型: 尖刺型(*F. pungens*)和多列型(*F. multiseriata*), 前者不产毒, 后者产毒, 他们在所观察的早期采集的样品中只见到尖刺型。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. multiseriata*, *P. seriata*, *P. sinica* (中华拟菱形藻), 这是目前国内报道种类最多的。

对中国沿海拟菱形藻的分类和生态分布虽然已有一些初步的研究报道。但目前在中国沿海到底有多少种拟菱形藻, 多少有毒种或变种存在, 这些种类在中国沿海的生态分布和地理分布情况, 还没有系统的调查研究报道, 而且目前也未见该藻引起的中毒事件的报道。因此, 很有必要通过光学显微镜、扫描电镜、透射电镜, 并结合分子生物学技术, 对中国沿海存在的拟菱形藻的种类组成和生态地理分布及其可能存在的产毒种类(株系)做一全面系统的调查研究。这不仅对丰富中国的海洋浮游植物和海洋硅藻研究有重要的理论意义, 而且对中国赤潮生物的地理分布及赤潮的监测和防治研究, 保障人民生活和水产养殖业的健康发展, 具有重要的理论和实际意义。

参考文献:

- [1] Bates S S, Bird C J, DE Freitas, *et al.* 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: 1203 – 1215.
- [2] Amzil Z. Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima* [J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1245 – 1251.
- [3] Hasle G R. Nomenclatural notes on marine planktonic diatoms. The family Bacillariaceae [J]. *Beihefte Zur Nova Hedwigia*, 1993, 106: 315 – 321.
- [4] Hasle G R. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites [J]. *Harmful Algae*, 2002, 137 – 146.
- [5] Hasle G R, Syvertsen E E. Marine diatoms [A]. Tomas C R. In *Identifying Marine Phytoplankton* [C]. San Diego: A-

- cademic Press, 1997.5 – 385.
- [6] Fryxell G A, Villac M C, Shapiro L P. The occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920 – 1996: a review[J]. **Phycologia**, 1997, 36: 419 – 437.
- [7] Fryxell G A, Garza S A, Roelke D L. Auxospore formation in an antarctic clone of *Nitzschia subcurvara* Hasle[J]. **Diatom Res**, 1991, 6: 235 – 245.
- [8] Peragallo H M. Diatomees marines de France et des districts maritimes voisins. Micrographe-Editeur[R]. **Greiz-sur-loing** (Set-M) ,Atlas Pls, 1897 – 1908, 1 – 491.
- [9] 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: 247 – 257.
- [10] Skov J, Lundholm N, Moestrup Ø. Potentially toxic phytoplankton. 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/ Bacillariophyceae) . ICES Identification leaflets for phytoplankton, Leaflet No.185, International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark. 1999, 185: 1 – 23.
- [11] Ross N W , Bates S S. Electro-immunoblotting characterization of *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pungens* antigens by antibodies directed against whole cells[J]. **J Appl Phycol**, 1996, 8: 51 – 58.
- [12] Scholin C A, Anderson D M. Detection and quantification of HAB species using antibody and DNA probes: progress to date and future research objectives[A] . Reguera B, Blanco J, Fernandez M L. Harmful Algae[C]. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Spain: Grafisant, Santiago de Compostella, Spain. 1998. 253 – 257.
- [13] Scholin C A, Marin R, Miller P E. DNA probes and a receptor-binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples[J]. **J Phycol**, 1999, 35: 1 356 – 1 367.
- [14] Parsons M L, Scholin C A, Miller P E, *et al.* *Pseudo-nitzschia* species(Bacillariophyceae) in Louisiana coastal waters: molecular probes field trials, genetic variability, and domoic acid analyses[J]. **J Phycol**, 1999, 35: 1 368 – 1 378.

(本文编辑:张培新)