

棕囊藻北部湾株的18S rDNA分子鉴定

覃仙玲, 赖俊翔*, 陈波, 姜发军, 许铭本

(广西科学院, 北部湾海洋研究中心, 南宁 530007)

摘要: 为研究北部湾棕囊藻(*Phaeocystis*)藻华的成因, 采用PCR克隆了棕囊藻北部湾株核糖体18S rDNA序列。结果表明, 棕囊藻北部湾株具有游动单细胞与群体结构两种形态; 其18S rDNA序列和NCBI基因库中球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)的同源性为99%~100%, 在系统进化树上与不同海域来源的球形棕囊藻聚在一大分支上, 且与球形棕囊藻间的遗传距离均小于其他种。首次从分子生物学上确定棕囊藻北部湾株为球形棕囊藻。

关键词: 球形棕囊藻; 北部湾; 18S rDNA; 分子鉴定

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2016.02.008

Molecular Identification of *Phaeocystis* from Beibu Gulf Based on 18S rDNA Sequences

QIN Xian-ling, LAI Jun-xiang*, CHEN Bo, JIANG Fa-jun, XU Ming-ben

(Beibu Gulf Marine Research Center, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: In order to understand the causes of algae bloom in Beibu Gulf, the sequences of ribosome 18S rDNA of *Phaeocystis* were cloned by PCR. The results showed that the strains from Beibu Gulf had single-celled and group structures, and their sequences of ribosome 18S rDNA showed 99%–100% homology to those *Phaeocystis globosa* in NCBI GenBank. The strains from Beibu Gulf and *Phaeocystis globosa* with different origins get together in a big clade in the phylogenetic tree, the genetic distance with *Phaeocystis globosa* was less than that with other species of *Phaeocystis*. Therefore, it was confirmed for the first time that the strains of *Phaeocystis* in Beibu Gulf caused algal bloom belonged to *Phaeocystis globosa*.

Key words: *Phaeocystis globosa*; Beibu Gulf; 18S rDNA; Molecular identification

棕囊藻(*Phaeocystis*)隶属于定鞭金藻纲(Prymnesiophyceae), 是一种广温广盐性藻类, 在南北极和热带海洋中都有分布, 容易暴发性增殖形成有害赤潮^[1]。1997年10月至1998年2月在我国东南沿海首次暴发大规模棕囊藻赤潮, 渔业损失惨重; 1999年7月在饶平、南澳等海域再次暴发棕囊藻赤潮, 2004–2006年间, 在我国渤海暴发了3次棕囊藻赤

潮。据统计, 在我国广东(珠海、湛江、汕头)、天津、海南、香港等地都有棕囊藻赤潮发生, 且发生范围越来越大, 频率及强度亦愈来愈烈, 给水产养殖带来巨大经济损失^[2]。

在广西北部湾海域, 自2011年11月首次暴发后, 每年都发生棕囊藻赤潮, 且发生区域由最开始的北海北岸海域扩散到钦州和防城港海域。2014年12月

收稿日期: 2015-06-09 接受日期: 2015-08-22

基金项目: 广西科学院基本科研业务费项目(15YJ22HY07); 国家自然科学基金项目(41506146); 广西重大基础研究专项(2012GXNSFEA0533001)资助
This work was supported by the Fundamental Research Funds for Guangxi Academy of Sciences (Grant No. 15YJ22HY07), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 41506146), the Major Program for the Fundamental Research of Guangxi (Grant No. 2012GXNSFEA0533001).

作者简介: 覃仙玲(1989~), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋微藻的生理生态学研究。E-mail: 048before@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: laijunxiang@126.com

下旬北部湾暴发的棕囊藻赤潮持续了两个多月,除影响海洋水产业、海洋生态环境和海滨自然景观外,大量球状胶质囊体还堵住了防城港核电站的冷却水吸收口,如果核电站运行期间发生该藻赤潮将造成极大的经济损失。因此,摸清北部湾棕囊藻赤潮的成因成了当务之急,而鉴定其种类是深入研究棕囊藻北部湾株生理生态学特性的关键。

通过形态观察,曾认为北部湾棕囊藻赤潮原因为球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*),但棕囊藻具有复杂的异型生活史,且形体微小,缺少可靠而有效的鉴别特征,在种的分类鉴定方面一直存在困扰,仅靠形态鉴定是不准确的。而随着分子生物学的发展,DNA分子标记已经成为区分物种的有效手段。其中,18S rDNA基因序列具有高度保守性,是棕囊藻属藻种分子鉴定应用最为广泛的分子标记。1994年,Medlin等^[3]利用18S rDNA基因序列并结合形态和生理特征,将棕囊藻分为4种:凹孔棕囊藻(*P. scrobiculata*)、泼切棕囊藻(*P. pouchetii*)、球形棕囊藻(*P. globosa*)和南极棕囊藻(*P. antarctica*);1999年,Zingone等^[4]根据群体形态及SSU rRNA特征报道了2新种约氏棕囊藻(*P. jahnii*)和心形棕囊藻(*P. cordata*)。陈月琴^[5]、陈丽芬^[6]和曲凌云等^[7]用18S rDNA序列分别分析鉴定了棕囊藻广东柘林湾株、香港株和渤海株,认为这些棕囊藻地理株均为球形棕囊藻。

近些年在我国沿海发生的棕囊藻赤潮都被鉴定为球形棕囊藻,因此棕囊藻北部湾株也极有可能为球形棕囊藻,但是不同地理分布的藻株之间存在生理生态上的差异。棕囊藻已经成为广西北部湾海域的典型赤潮种,但关于北部湾的棕囊藻赤潮研究还未见报道,面对北部湾棕囊藻赤潮频繁且大面积暴发的紧迫形势,急需了解该棕囊藻株的分类学地位、及与其它同种或相似种亲缘关系。本研究采用18S rDNA序列分析鉴定棕囊藻北部湾株的种类,为今后北部湾棕囊藻赤潮的监控和防治提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 采样和藻种分离培养

于2014年1月在广西钦州湾的藻华发生海区采

集棕囊藻(*Phaeocystis*)水样。在Nikon Ti-s型倒置显微镜下,用毛细管分离法从水样中挑选完整的棕囊藻球形囊体进行扩大培养,采用f/2培养基,在22℃、光照强度 $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、光暗比为12 h:12 h的条件下培养。藻种保存于广西科学院北部湾海洋研究中心的“北部湾赤潮藻种质资源库”,编号为BBW-P1。

1.2 藻体形态观察

将水样用鲁格试剂固定,吸取适量滴于载玻片上,在尼康T-100型光学显微镜下观察藻体形态并拍照。

1.3 基因组 DNA 的提取、18S rDNA 的克隆

取约50 mL新鲜藻体于 $5000\times g$ 下离心5 min,弃上清得藻体,藻体用于提取DNA。总DNA的提取参照CTAB法^[8],以提取的总DNA为模板进行PCR克隆18S rDNA片段。PCR引物为18S comF1: 5'-GCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC-3'和18S comR1: 5'-CACCTACGGAAACCTTGTTACGAC-3',由华大基因广州分公司合成。PCR条件: 94℃预变性3 min;然后94℃30 s, 55℃30 s, 72℃1 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min。反应体系共50 μL ,包含灭菌Milli Q水22 μL , DNA模板1 μL ,正、反向引物各1 μL , PCR MagicMix 25 μL (包含Taq DNA聚合酶、dNTPs、反应缓冲液等,北京天恩泽基因科技有限公司)。

1.4 电泳检测和测序

采用1%琼脂糖凝胶电泳法对PCR产物进行检测,缓冲液为TBE。PCR产物由华大基因广州分公司测序。

1.5 数据分析

用Seqman软件对BBW-P1的18S rDNA序列进行剪切,将测序不清楚的部位去除。将得到的序列与GenBank数据库中的棕囊藻属18S rDNA序列进行比较。在MEGA6软件中运用邻接法(Neighbor-Joining)构建分子系统树。

2 结果

2.1 藻体形态特征

在光学显微镜下,水样中的棕囊藻以单细胞(图

1: 左)和近球状的胶质群体(图1: 右)两种形态存在。单细胞呈球形或近球形, 直径为 $2.5\sim 7\ \mu\text{m}$; 可游动的单细胞前端有2条几乎等长的鞭毛, 长度比体长稍长, 1条向前呈波状运动, 1条较直斜向后方;

单细胞藻体还有一条较粗短的定鞭体。胶群体大小为 $0.1\ \text{mm}\sim 2\ \text{cm}$ 不等, 每个群体包含近千至数万个单细胞, 大部分胶质群体呈中空状, 细胞基本分布在外层。这些特征与棕囊藻的典型形态特征符合。

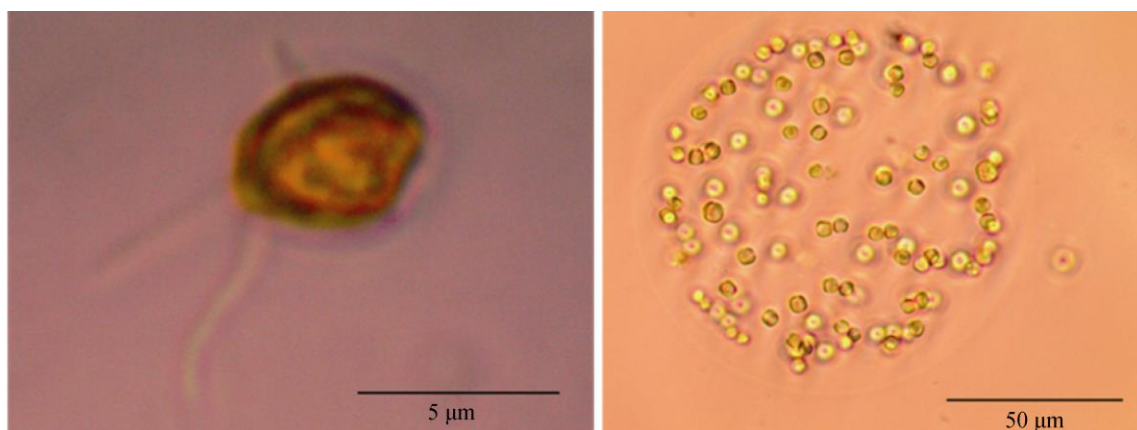


图1 北部湾棕囊藻(BBW-P1)的游动单细胞(左)和群体(右)结构

Fig. 1 Single-celled (left) and group (right) structure of *Phaeocystis* BBW-P1

2.2 18S rDNA 序列的克隆与测序

从图2可以看出, PCR产物经电泳只出现1条明亮条带, 表明PCR效果较好, 其大小约为1800 bp。测定BBW-P1藻株18S rDNA的部分序列长度为1200 bp。

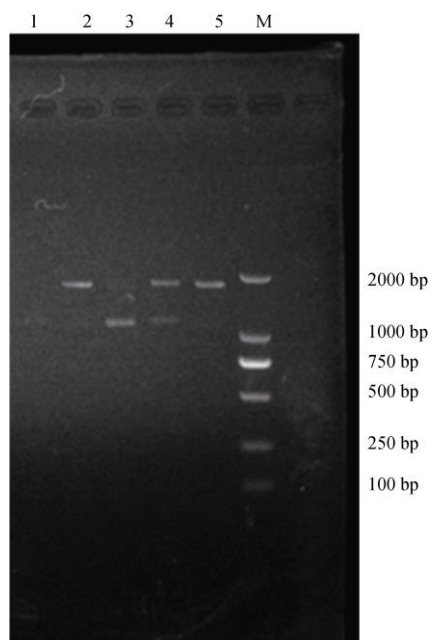


图2 棕囊藻18S rDNA的PCR扩增。1: 模板空白; 2: BBW-P1; 3~5: 其他藻类; M: 2000 bp DNA Marker。

Fig. 2 PCR amplification of 18s rDNA of *Phaeocystis*. 1: No template control; 2: BBW-P1; 3~5: Other algae; M: 2000 bp DNA Marker.

2.3 序列比对

将所得序列经Seqman软件剪切后在NCBI网站的GenBank中进行BLAST同源性分析。结果表明(表1), 所得序列与68条18S rDNA序列的覆盖率和相似度均高达99%~100%, 其中23条为球形棕囊藻(AJ278035、JX660987和AF182112等), 6条为棕囊藻属, 15条为棕囊藻科, 7条分别为南极棕囊藻(*P. Antarctica*)、心形棕囊藻(*P. cordata*)和波切棕囊藻(*P. pouchetii*), 其余为定鞭藻纲未定种。

将相似度较高的10条球形棕囊藻18S rDNA序列和其他棕囊藻[约氏棕囊藻(*P. jahnii*)和南极棕囊藻]的序列用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树(图3)。结果表明, BBW-P1和来自不同地域不同株系的球形棕囊藻聚在同一分支上, 自展支持率为80%, 这从分子水平上鉴定了北部湾棕囊藻株BBW-P1为球形棕囊藻。棕囊藻属的南极棕囊藻(X77477和X77478)则在另一独立的大分支上, 自展支持率为86%, 而约氏棕囊藻(AF163148)与心形棕囊藻(AF163147)为棕囊藻属最早分化的一支。

采用MEGA 6软件的Kimura 2-parameter模型建立棕囊藻属的18S rDNA遗传距离矩阵(表2)。结果表明, 北部湾棕囊藻株BBW-P1与美国布斯湾1株未

表1 棕囊藻核糖体18S rDNA序列

Table 1 18S rDNA sequences of *Phaeocystis* ribosome

藻 Alga	株系 Strain	来源地 Origin	GenBank 登录号 GenBank accession No.	覆盖率 (%) Coverage	相似度 (%) Similarity
<i>P. globosa</i>	—	南大洋威德尔海 Weddell Sea, Southern Ocean	X77476	100	99
<i>P. antarctica</i>	CCMP 1374	南大洋威德尔海 Weddell Sea, Southern Ocean	X77477	100	98
<i>P. antarctica</i>	SK 20	南大洋威德尔海 Weddell Sea, Southern Ocean	X77478	100	98
<i>P. globosa</i>	CCMP 1524	泰国 Thailand	AF182109	100	99
<i>P. globosa</i>	CCMP 1528	厄瓜多尔 Ecuador	AF182110	100	99
<i>P. globosa</i>	CCMP 627	墨西哥海湾 Mexico Gulf	AF182111	100	99
<i>P. globosa</i>	CCMP 628	大西洋苏里南 Suriname, Atlantic	AF182112	100	99
<i>P. globosa</i>	PCC 540	东大西洋 East Atlantic	AF182115	100	99
<i>P. globosa</i>	CCMP 627	中国汕头 Shantou, China	AJ278035	100	99
<i>P. cordata</i>	—	地中海 Mediterranean Sea	AF163147	100	99
<i>P. jahnii</i>	—	地中海 Mediterranean Sea	AF163148	100	98
<i>P. globosa</i>	PLY 147	比利时 Belgium	AY851300	100	99
<i>Phaeocystis</i> sp.	—	中国香港 HongKong, China	DQ075202	100	99
<i>Haptophyceae</i> sp.	W6-4	—	EF432535	100	98
<i>P. globosa</i>	—	法国 France	JX660987	99	99
<i>Phaeocystis</i> sp.	CCMP 2710	美国布斯湾 Boothbay, USA	KF422610	100	99

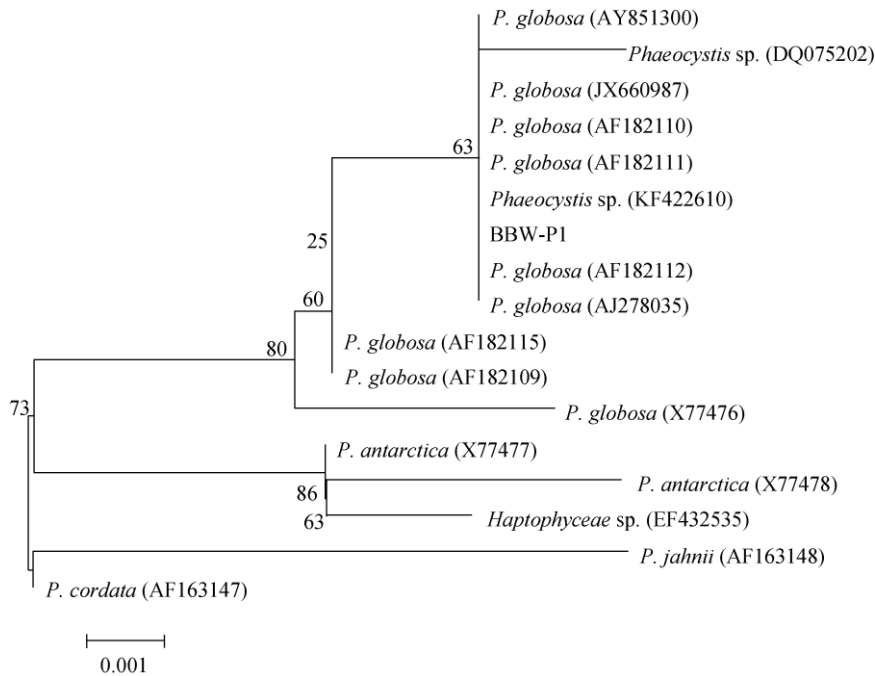


图3 用邻接法基于棕囊藻属18S rDNA序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 18S rDNA sequences of *Phaeocystis* species using Neighbor-Joining method

表2 棕囊藻属不同种和株系间的18S rDNA遗传距离矩阵

Table 2 Genetic distance matrix based on 18S rDNA sequences among different species and strains of *Phaeocystis*

序号 No.	种 Species	登录号 Accession No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	BBW-P1													
2	<i>Phaeocystis</i> sp.	KF422610	0.000											
3	<i>P. globosa</i>	AF182112	0.000	0.000										
4	<i>Phaeocystis</i> sp.	DQ075202	0.002	0.002	0.002									
5	<i>P. globosa</i>	AF182115	0.002	0.002	0.002	0.004								
6	<i>P. globosa</i>	AF182109	0.002	0.002	0.002	0.004	0.000							
7	<i>P. globosa</i>	X77476	0.006	0.006	0.006	0.008	0.004	0.004						
8	<i>P. jahnii</i>	AF163148	0.013	0.013	0.013	0.015	0.011	0.011	0.015					
9	<i>P. antarctica</i>	X77477	0.010	0.010	0.010	0.011	0.008	0.008	0.010	0.011				
10	<i>P. antarctica</i>	X77478	0.013	0.013	0.013	0.015	0.011	0.011	0.013	0.015	0.004			
11	<i>Haptophyceae</i> sp.	EF432535	0.011	0.011	0.011	0.013	0.010	0.010	0.011	0.013	0.002	0.006		
12	<i>P. cordata</i>	AF163147	0.006	0.006	0.006	0.008	0.004	0.004	0.008	0.008	0.004	0.008	0.006	

定种的棕囊藻(KF422610)、大西洋苏里南的球形棕囊藻(AF182112)和球形棕囊藻汕头株(AJ278035)等的亲缘关系最近,遗传距离为0.000;与来自香港(DQ075202),泰国(AF182109)以及东大西洋(AF182115)等地的球形棕囊藻亲缘关系较远,遗传距离为0.002,而与来自威德尔海的球形棕囊藻(X77476)的遗传距离最大(0.006)。球形棕囊藻种内遗传距离均小于种间遗传距离。

3 讨论

棕囊藻是全球广泛分布的有害赤潮藻类,具有独特的生理、生化及生态学特性,对其进行正确的分类鉴定是开展相关棕囊藻赤潮研究的基础。然而,棕囊藻单细胞个体微小,超显微结构观察相对困难,传统的形态特征分类存在较多不足,因而关于种类鉴定分歧较大^[9]。在北部湾棕囊藻赤潮现场水样中,我们既观察到了游动的单细胞,也观察到了胶质群体,而除心形棕囊藻(*P. cordata*)和凹孔棕囊藻(*P. scrobiculata*)仅观察到鞭毛单细胞形态外,其余棕囊藻种类都能够形成群体。由于群体的形成与摄食压力、营养条件等有密切的关系,故群体的有无不能作为分类依据。群体形态也是一个不太可靠的分类特征,通过观察群体发生过程曾认为球形棕囊藻(*P. globosa*)和泼切棕囊藻(*P. pouchetii*)是同种^[10],Baumann等^[11]报道南极的*P. antarctica*群体特征也类似于球形棕囊藻。虽然说泼切棕囊藻和南极棕囊藻都是冷水种,但是泼切棕囊藻和球形棕囊藻的群体形态可出现在同一环境中^[12]。所以,仅仅通过传统的显微镜形态观察,无法确定棕囊藻北部湾株BBW-P1的种类。

随着分子生物学的发展,获取藻类的基因片段,利用NCBI的BLAST分析功能可以从遗传的角度去寻找物种的进化发生史,已成为越来越普遍的手段^[13]。通过系统进化树(图3)可以看出,BBW-P1所在的分支上几乎都是球形棕囊藻,可以初步确定BBW-P1为球形棕囊藻。通过碱基序列差异分析,BBW-P1与不同地理分布的球形棕囊藻间的遗传距离均小于与其他种间的遗传距离,由此可进一步确定棕囊藻北部湾株为球形棕囊藻。除了核糖体18S

rDNA, 16s rDNA序列也被用于棕囊藻的鉴定分析,但马奔等^[14]使用该法并不能区分棕囊藻属内不同种。有人认为18S rDNA序列比较保守,进化速率相对较慢,所以种间差异往往较小,甚至有时种内差异大于种间差异^[15]。本研究利用18S rDNA部分序列构建的系统进化树可以将棕囊藻属不同种类分开,并且球形棕囊藻的种内遗传差异小于种间的遗传差异。由此可见,18S rDNA分子分类法可以克服棕囊藻传统分类方法中的困难,使其简单、快捷而准确。

球形棕囊藻是一种能产溶血毒素的赤潮藻,赤潮的发生对水产养殖业具有巨大的威胁;并且在该藻赤潮发生与消亡期间可能产丙烯酸和二甲硫醚^[16],从而对大气环境和海洋生态平衡造成较大破坏。北部湾海域是广西北部湾经济圈的重要支撑系统,其对该区的经济社会发展起着极其重要作用,而北部湾由中越两国陆地和海南岛环绕的一个天然半封闭海湾,其水体自净能力和交换能力相对较差,所以一旦棕囊藻在北部湾形成大规模赤潮,其造成的影响和损失无疑将是巨大的。本研究填补了棕囊藻北部湾株的研究空缺,为进一步研究广西北部湾棕囊藻赤潮的发生机制、赤潮预警与防治提供基础数据。

参考文献

- [1] CHEN Y, XU N, DUAN S S. Effects of the ratios of organic nitrogen and light intensity on the growth and photosynthesis of the brown tide *Phaeocystis globosa* [J]. Ecol Environ Sci, 2011, 20(3): 499–504. doi: 10.3969/j.issn.1674-5906.2011.03.019.
陈园, 徐宁, 断舜山. 有机氮磷比例和光强对赤潮藻球形棕囊藻生长和光合作用的影响 [J]. 生态环境学报, 2011, 20(3): 499–504. doi: 10.3969/j.issn.1674-5906.2011.03.019.
- [2] LI Y N, SHEN P P, HUANG L M, et al. Taxonomy and phylogenetics of the genus *Phaeocystis*: Research progress [J]. Chin J Ecol, 2012, 31(3): 745–754.
李亚男, 沈萍萍, 黄良民, 等. 棕囊藻的分类及系统进化研究进展 [J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 745–754.
- [3] MEDLIN L K, LANGE M, BAUMANN M E M. Genetic differentiation among three colony forming species of *Phaeocystis*: Further evidence for the phylogeny of the Prymnesiophyta [J]. Phycologia, 1994, 33(3): 199–212. doi: 10.2216/i0031-8884-33-3-199.1.

- [4] ZINGONE A, CHRÉTIENNOT-DINET M J, LANGE M, et al. Morphological and genetic characterization of *Phaeocystis cordata* and *P. jahnii* (Prymnesiophyceae), two new species from the Mediterranean Sea [J]. J Phycol, 1999, 35(6): 1322–1337.
- [5] CHEN Y Q, WANG N, ZHOU H, et al. Molecular identification and origin analysis on “red-tide” related *Phaeocystis* causative species [J]. Acta Oceanol Sin, 2002, 24(6): 99–103. doi: 10.3321/j.issn:0253-4193.2002.06.011.
陈月琴, 王宁, 周惠, 等. 棕囊藻赤潮原因种的分子鉴定和起源分析 [J]. 海洋学报, 2002, 24(6): 99–103. doi: 10.3321/j.issn:0253-4193.2002.06.011.
- [6] CHEN L F, ZHANG Q, LUO Y M, et al. Molecular identification of the Hong Kong strain P₂ of *Phaeocystis* as *Phaeocystis globosa* [J]. Ecol Sci, 2003, 22(4): 349–350. doi: 10.3969/j.issn.1008-8873.2003.04.013.
陈丽芬, 章群, 骆育敏, 等. 18S rDNA 序列分析鉴定棕囊藻香港株 P₂ 为球形棕囊藻 [J]. 生态科学, 2003, 22(4): 349–350. doi: 10.3969/j.issn.1008-8873.2003.04.013.
- [7] QU L Y, LÜ S H, GAO C L, et al. Structure and sequence analysis of 18s rDNA and ITS gene of *Phaeocystis* isolate from the Bohai Sea [J]. Adv Mar Sci, 2008, 26(2): 200–206. doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2008.02.010.
曲凌云, 吕颂辉, 高春蕾, 等. 棕囊藻渤海株核糖体 18S rDNA 和 ITS 基因结构序列分析 [J]. 海洋科学进展, 2008, 26(2): 200–206. doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2008.02.010.
- [8] ROGERS S O, BENDICH A J. Extraction of DNA from plant tissues [M]// GELVIN S B, SCHILPEROORT R A, VERMA D P S. Plant Molecular Biology Manual. Netherlands: Springer, 1989: 73–83. doi: 10.1007/978-94-009-0951-9_6.
- [9] CHEN J F, XU N, JIANG T J, et al. A report of *Phaeocystis globosa* bloom in coastal water of Southeast China [J]. J Jinan Univ (Nat Sci), 1999, 20(3): 124–129.
陈菊芳, 徐宁, 江天久, 等. 中国赤潮新记录种——球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) [J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 1999, 20(3): 124–129.
- [10] KORNMAN P. Beobachtungen an *Phaeocystis*-Kulturen [J]. Helgoländ Wissenschaftl Meeresuntersuchung, 1955, 5(2): 218–233. doi: 10.1007/BF01610509.
- [11] BAUMANN M E M, BRANDINI F P, STAUBES R. The influence of light and temperature on carbon-specific DMS release by cultures of *Phaeocystis antarctica* and three antarctic diatoms [J]. Mar Chem, 1994, 45(1/2): 129–136. doi: 10.1016/0304-4203(94)90097-3.
- [12] QI Y Z, SHEN P P, WANG Y. Taxonomy and lifecycle of genus *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae) [J]. J Trop Subtrop Bot, 2001, 9(2): 174–184. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2001.02.016.
齐雨藻, 沈萍萍, 王艳. 棕囊藻属 (*Phaeocystis*) 的分类与生活史 [J]. 热带亚热带植物学报, 2001, 9(2): 174–184. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2001.02.016.
- [13] LIANG J L, HE W H, LONG C, et al. *Prorocentrum rhathymum*: A new record of epiphytic dinoflagellates in South China Sea [J]. J Trop Subtrop Bot, 2011, 19(1): 40–44. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.005.
梁计林, 何伟宏, 龙超, 等. 慢原甲藻——南海热带附生甲藻新记录 [J]. 热带亚热带植物学报, 2011, 19(1): 40–44. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.01.005.
- [14] MA B, ZHANG Q, SI C L, et al. Plastid 16S rDNA sequence analysis of *Phaeocystis globosa* from South China Sea [J]. Ecol Environ Sci, 2011, 20(12): 1898–1901. doi: 10.3969/j.issn.1674-5906.2011.12.020.
马奔, 章群, 司从利, 等. 南海球形棕囊藻质 16S rDNA 序列分析 [J]. 生态环境学报, 2011, 20(12): 1898–1901. doi: 10.3969/j.issn.1674-5906.2011.12.020.
- [15] LONG C, CHEN X Y, CHEN B, et al. Morphological and phylogenetic analysis of *Prorocentrum triestinum* isolated from the Beibu Gulf [J]. J Trop Oceanogr, 2014, 33(2): 66–71. doi: 10.3969/j.issn.1009-5470.2014.02.009.
龙超, 陈宪云, 陈波, 等. 北部湾三角棘原甲藻 (甲藻门原甲藻目) 的形态观察和 18S rDNA 序列分析 [J]. 热带海洋学报, 2014, 33(2): 66–71. doi: 10.3969/j.issn.1009-5470.2014.02.009.
- [16] HE J W, SHI Z X, ZHANG Y H, et al. Morphological characteristics and toxins of *Phaeocystis* cf. *pouchetii* (Prymnesiophyceae) [J]. Oceanol Limnol Sin, 1999, 30(2): 172–179.
何家苑, 施之新, 张银华, 等. 一种棕囊藻的形态特征与毒素分析 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(2): 172–179.