

一株海洋微型硅藻的形态学和分子生物学鉴定

张东¹, 隋正红^{1*}, 王春燕², 包振民¹

(1. 中国海洋大学 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 莆田海洋渔业局 莆田海洋与渔业环境监测站, 福建 莆田 351100)

关键词: rDNA; ITS; 角毛藻; 分类

中图分类号: Q947.27

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)02-0168-06

1 引言

微型浮游植物(粒径为 2~20 μm)是海洋环境中主要的初级生产者,在海洋初级生产力中占有很大比重,特别在寡营养水域,微型浮游植物可占初级生产力的 80%以上^[1],并且在粒级结构上微型浮游植物对初级生产力的贡献要比较大粒级的植物的贡献更大^[2]。

角毛藻属于硅藻门(Bacillariophyta)、中心纲(Centriales)、盒形藻目(Biddulphiales)、角毛藻科(Chaetoceroaceae)、角毛藻属(Chaetoceros)。培养种类有牟氏角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)、钙质角毛藻[*Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takana]、纤细角毛藻(*Chaetoceros gracilis*)等,它们都是生长在海中的浮游微藻,细胞小,细胞壁薄,大多数是单个细胞,也有数个细胞集成群体的。壳面呈椭圆形或圆形,中间略突起,少数较平坦。壳环面呈长方形至四角形。壳环带不明显,角毛细而长,末端尖。培养过程中细胞形态常有变化,细胞中间膨大,角毛缩短或消失,繁殖方式一般为无性的二分裂繁殖。环境不良时可形成休眠孢子^[3]。角毛藻属耐高温种类,适合在夏季培养,是双壳类,海参,海胆甲壳类等幼体的优质饵料^[4],角毛藻作为一种经济藻类有十分广阔的前景。

微型角毛藻是指粒径为 2~20 μm 的角毛藻

属的藻类,目前对其系统的研究较少,研究较多的主要是作为饵料的种类,如牟氏角毛藻和纤细角毛藻,它们是对虾、海胆、海参等养殖品种的优质饵料^[5]。

以前对浮游植物的分类学研究主要依靠形态学手段,但形态学的鉴定有诸多不足之处。首先,形态学的鉴定需要有经验丰富的专业工作人员,而且工作量大;其次,生物的形态学特征有时会因环境的变化而改变,形态学鉴定无法解决这一难题。分子生物学分类方法以核酸序列的差异为分类依据,由于核酸序列在遗传上的稳定性要大大高于形态学特征,避免了环境因素造成的细微外观差异引起的错误判断,解决了依赖主观判断而存在的困扰,因而在近年来得到了广泛的应用。

本实验从天然海水中分离到一种微型硅藻,借助光镜和电镜技术,初步判断为角毛藻,进一步利用 5.8SrDNA-ITS 和 18SrDNA 序列的扩增和分析,对这株藻进行了分类鉴定。

2 实验材料和方法

2.1 材料

2.1.1 实验所用藻株

本实验所用藻株 *C. sp. qd* 分离于青岛太平角海域(36°02'N, 120°20'E)。分离方法为 96 孔板有限稀释法。藻株培养于不加硅的 F/2 培养基上,培养温度为 24 °C,明暗时间比为 12h:12h,光照度为 1 300 lx。

收稿日期:2009-07-19;修订日期:2009-11-24。

基金项目:国家科技部海洋调查专项项目资助(908-01-ST02);山东省“九〇八”海洋调查项目资助(SD-908-01-01-05.06)。

作者简介:张东(1984—),男,山东省潍坊市人,从事海洋生物学专业。E-mail:z308795397@163.com

*通信作者:隋正红(1969—),从事海洋生物学研究。E-mail:suizhengh@ouc.edu.cn

2.1.2 实验用试剂盒、工具酶和其他试剂

凝胶回收试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit)购自 TakaRa 公司, Taq 酶等 PCR 试剂购自 MBI 公司, 其他试剂为分析纯。

2.2 方法

2.2.1 微藻的纯化方法

使用 96 孔板分离培养的方法, 从天然海水中纯化微藻, 利用 500 目筛绢和 0.8 μm 微孔滤膜富集细胞大小为 1~20 μm 的微藻, 并在微藻放入 f/2 培养基中培养至适宜浓度。血球计数板计算密度, 根据密度将藻液稀释到每 200 μL 含有 1~2 个单藻, 并把它们分到 96 孔板中, 定期镜检, 直到 100 倍油镜下观察藻细胞形态一致即纯化成功。

2.2.2 扫描电镜样品处理

用 1.5 mL EP 管取 1 mL 处于对数生长期的藻细胞, 按 1 000 r/min 离心 10 min 收集藻体, 加 1 ml 1% 戊二醛固定 2~3 h, 按 1 000 r/m 离心 10 min, 用 0.1 mol/dm³ 的磷酸缓冲液漂洗 3 次, 然后依次用 30%, 50%, 70%, 90%, 100% 的乙醇进行逐级脱水, 用吸管将含有样品的乙醇溶液滴在有明胶膜的盖玻片上, 可防止细胞被冲走, 用临界点干燥法干燥, 用离子溅射镀膜法镀膜^[6]。

2.2.3 透射电镜样品处理

用 1.5 mL EP 管取 1 mL 处于对数生长期的藻细胞, 按 1 000 r/min 离心收集藻体, 加 500 μL 浓盐酸, 水浴煮沸 20~30 min, 加高锰酸钾溶液少许, 静置 24 h, 加草酸褪色, 水洗至中性, 用铜网直接蘸取少许样品, 静置片刻, 用吸水纸吸去多余的水分, 干燥后观察^[7]。

1.2.4 总 DNA 的提取和纯化

取角毛藻对数生长期的藻细胞 3×10^6 个/mL, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集藻细胞。将藻细胞于液氮中研磨后转入 1.5 mL 离心管。使用 TIANGEN 植物总 DNA 试剂盒(TIANGEN Biotech Beijing)提取基因组 DNA, 操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

2.2.5 引物设计

根据 NCBI 数据库中硅藻 18S 序列设计引物, PCR 扩增 18S 序列; 根据已测序的 18S 序列设计 ITS-5.8S rDNA 的正向引物, 根据相关硅藻的 ITS 序列设计反向引物。PCR 扩增包含 5.8S rDNA 在内的 ITS1 和 ITS2 片段、18S rDNA 末端保守序列和 28S rDNA 前端保守序列, 由上海博尚公司合成。

实验所涉及引物见表 1。

表 1 本实验所用到的引物

引物名称	引物序列(5'端到 3'端)
硅藻通用 18S 引物	
D1	5'-CCGTAGTAATTCTAGAGCTAATAC -3'
D2	5'-AAACCTTGTTACGACTTCACC-3'
<i>Chaetoceros</i> sp. qd rDNA-ITS 引物	
C1	5'-TTGTCTGCGAGAACTTGCCTAA-3'
C2	5'-CATTCCACAACCTCGGCACCA-3'

2.2.6 PCR 反应条件

PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 扩增结果用 1% 琼脂糖进行电泳检测。

2.2.7 PCR 产物的克隆和测序

将 PCR 产物用 TaKaRa 凝胶回收试剂盒(Agarose Gel DNA Purification Kit)回收后再用 T4 DNA 连接酶将目标片段连接到质粒载体 PMD18-T 上, 转入细菌 DH5 α , 由北京华大生物公司测序。

2.2.8 序列分析

在 NCBI 服务器上用 NucleotideBlast 进行同源检测, 证实所得的序列为 ITS1, ITS2, 5.8S rDNA 以及部分 18S rDNA, 28S rDNA 区域。将测得的序列和其他角毛藻 5.8S rDNA-ITS 序列(来自 GenBank)用计算机软件进行序列对齐排序、系统进化树构建、遗传距离值计算分析。用 Clustal X 1.83 进行多序列对位分析。采用 MEGA 3.1 分别采用 NJ 法、ME 法和 UPGMA 法建树, 用 Kimura 2-parameter 计算遗传距离值, 重复 1 000 次计算 bootstrap 值。

3 结果与讨论

3.1 藻种的形态学特征

从 100 倍油镜下可看到此藻细胞体呈正方形(见图 1a), 细胞长(7.78 \pm 1.99) μm , 宽(5.44 \pm 1.67) μm , 在细胞体四角各有一角毛, 角毛长度为(16.11 \pm 2.42) μm 。具有多个贴壁的色素体。细胞独立生活, 不连成群体。在光镜下偶可观察到脱壳的细胞体及细胞壳(见图 1b), 透明状的为脱下的细胞壳, 还带有角毛结构, 陀螺状的为脱壳后的藻细

胞,已看不到角毛结构。此细胞可能为环境不良时形成的休眠孢子。

在扫描电镜下观察到较完整的细胞(见图 1c),细胞呈圆柱形,环面观近似正方形,细胞表面光滑,壳面观呈椭圆形,壳面两端边缘各有两条角毛,角毛基部隆起。还观察到脱壳的细胞体,呈近似陀螺状,形状与在光镜下看到的相符(见图 1d)。细胞中部有一环状突起,细胞上部呈椭球形,下部呈陀螺状。也可观察到脱下的细胞壳(见图 1e),可见细胞壁较

薄,细胞内容物已消失。

图 1f 为透射电镜下观察到得较完整的细胞,可见致密的细胞体。由于透射电镜处理方法要用到浓盐酸,离心后细胞基本已破碎,很难观察到完整的细胞,由图可看到细胞体并无明显骨架结构。角毛呈网状的硅质骨架结构,基部较中部致密(见图 1j)。每隔 $0.5 \mu\text{m}$ 左右有一互生的刺状突起,顶端呈锥状(见图 1g,i)。顶部放大观察可分辨出网状骨架主干呈螺旋状,延伸至顶端(如图 1i)。

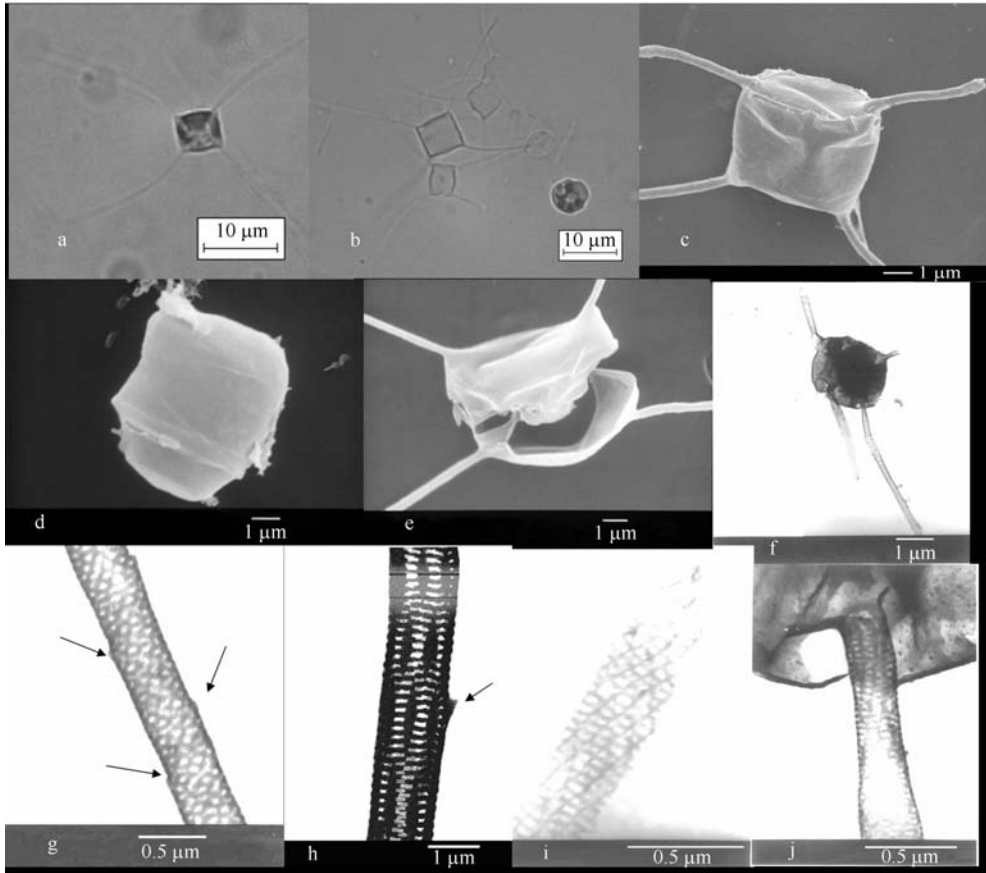


图 1 角毛藻的形态学观察

a—b. 角毛藻细胞的光镜观察, a. 生长状态良好的细胞, b. 脱壳后的休眠孢子和细胞壳。c—e. 角毛藻细胞的扫描电镜观察, c. 生长状态良好的细胞, d. 脱壳后的细胞体, e. 脱壳后的细胞壳。f—j. 角毛藻细胞的透射电镜观察, f. 较完整的细胞, g. 角毛中部局部放大(箭头表示互生的小刺), h. Rogerson 等^[8]研究的角毛结构(箭头表示小刺), i. 角毛顶端的局部放大(表示螺旋状的骨架结构), j. 角毛基部的局部放大

从以上光镜照片和电镜照片可初步推断此藻株为角毛藻属的藻类。根据形态特征初步将这株藻命名为 *Chaetoceros*, sp. qd。

3.2 18SrDNA 序列的扩增和分析

对角毛藻的基因组 DNA 使用自行设计的硅藻门的 18SrDNA 特异性引物,经过 PCR 扩增得到的目

的片段,经过 1% 琼脂糖电泳分析, DNA 片段为 1 700 bp 左右。由测序结果得知 *C. sp. qd* 的 18S 序列部分长度为 1 623 bp。GC 含量为 46.58%, 使用 NucleotideBlast 将所测序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对分析,得到 *C. sp. qd* 与 *Chaetoceros gracilis* strain UTEX LB 2375 的 18SrDNA 相似值最高,达到 99%。

3.3 ITS-5.8S rDNA 序列的扩增和分析

对角毛藻的基因组 DNA 使用角毛藻属的 5.8S rDNA-ITS 区的特异引物,经过 PCR 扩增得到的目的片段,经过 1%琼脂糖电泳分析,DNA 片段为 1 100 bp 左右。5.8S rDNA-ITS 测序后,C. sp. qd 的 ITS 的序列长度为 1 083 bp。去掉部分 18S rDNA 和 28S rDNA 序列,5.8S rDNA-ITS 的序列总长度为 837 bp。

将 C. sp. qd 的 5.8S rDNA-ITS 序列与从 Genbank 获取的所有相关角毛藻的 5.8S rDNA-ITS 序列进行比较(表 2)。可以发现角毛藻属的不

同种在 5.8S rDNA-ITS 的总长度、5.8S 长度、ITS1, ITS2 长度等在基本性状上都有差异。5.8S rDNA-ITS 的总长度变化是 698~810 bp,而本藻种 5.8S rDNA-ITS 区比已知角毛藻属的种类更长,达到 837 bp。5.8S 区域的长度是 157~160 bp, ITS1 区域的长度是 281~331 bp, ITS2 区域的长度是 260~324 bp,其中本种与已知角毛藻属物种在 ITS2 区的长度差别最大,比角毛藻属的其他种类最长的 ITS2 区还长 36 bp,这显示此种与已知角毛属其他种类有较大差异。

表 2 用于系统树构建的角毛藻 5.8S rDNA-ITS 区域的基本信息

物种	ITS-5.8S	5.8S/ bp	ITS1	ITS2	Genebank 登录号
<i>Chaetoceros curvisetus</i>	791	160	307	324	AY229895
<i>Chaetoceros debilis</i>	791	160	307	324	AY229896
<i>Chaetoceros gracilis</i>	791	160	307	324	AY229897
<i>Chaetoceros calcitrans</i> f. <i>pumilus</i> strain CCMP 1315	698	157	281	260	DQ358111
<i>Chaetoceros gracilis</i> strain UTEX LB 2375	810	160	331	319	DQ358112
<i>Chaetoceros gracilis</i> strain UTEX LB 2658	810	160	331	319	DQ358113
<i>Chaetoceros simplex</i> strain CCAP 1085/3	769	160	290	319	DQ358115
<i>Chaetoceros muellerii</i> strain CCAP 1010/3	769	160	290	319	DQ358116
<i>Chaetoceros calcitrans</i> f. <i>pumilus</i> strain CCAP 1010/11	699	157	281	261	DQ358117
<i>Chaetoceros</i> sp. <i>jonquieri</i>	724	157	281	286	DQ858214
<i>Chaetoceros simplex</i> var. <i>calcitrans</i> strain CSIRO CS 251	769	160	290	319	DQ358114
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	769	160	290	319	DQ897644
<i>Chaetoceros</i> sp. qd	837	160	317	360	

2.4 系统树的构建和距离值的计算

利用表 2 所列出的 13 株角毛藻 5.8S rDNA-ITS 序列,以 *Cetraria odontella* country Finland (AF228304) 5.8S rDNA-ITS 序列为外群,用 MEGA3.1 软件按照三种方法构建系统发育树,分别为 NJ 法(见图 2),ME 法和 UPGMA 法,用三种方法所建的进化树树形几乎完全相同,而且在每个

主要节点都有很高的支持率。用三种方法所建的进化树中 C. sp. qd 都不与所有已知的角毛藻属的种类聚群,并且在较早的进化阶段就独立分支,节点支持率分别为 86(NJ 树)、79(ME 树)、99(UPGMA 树),支持率都很高。为进一步分析此种与其他属内角毛藻种的亲缘关系,将所有角毛藻序列和外群藻种使用 MEGA3.1 计算它们之间的遗传距离值。

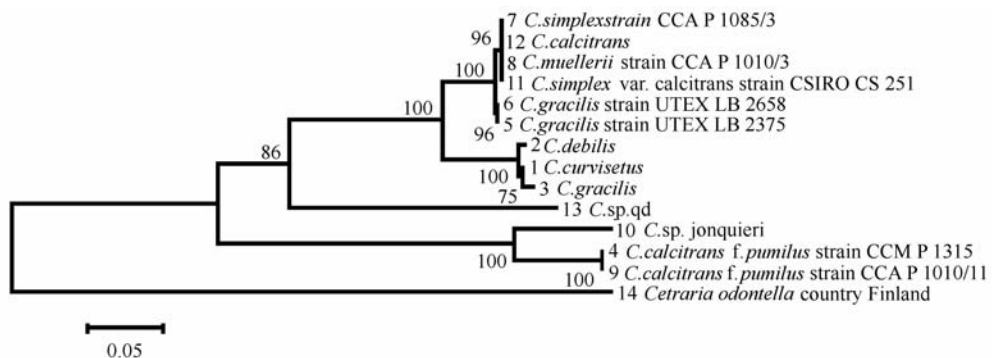


图 2 由 NJ 法基于角毛藻 5.8S rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

用 Clustal X 1.83 进行多序列对齐分析,采用 MEGA 3.1 建树,重复 1 000 次计算 bootstrap 值,节点数值表示 1 000 次重复抽样获得的自检支持百分率

从表 3 可以看出 *C. sp. qd* 与已知序列的 12 种角毛藻的遗传距离为 0.315~0.483, 与已知角毛藻属的种类遗传距离较大, 而所有已知序列的 12 种角

毛藻属内不同种间的遗传距离为 0.007~0.476。角毛藻属和同是盒形藻科不同属的齿状藻属之间的遗传距离值为 0.703~0.783。

表 3 基于 5.8S rDNA-ITS 序列的 13 株角毛藻和 1 株齿状藻之间的遗传距离值

物种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>C. curvoisetus</i>													
2 <i>C. debilis</i>	0.007												
3 <i>C. gracilis</i>	0.009	0.014											
4 <i>C. calcitrans</i> f. <i>pumilus</i> CCMP 1315	0.449	0.453	0.462										
5 <i>C. gracilis</i> UTEX LB 2375	0.088	0.091	0.096	0.424									
6 <i>C. gracilis</i> UTEX LB 2658	0.088	0.091	0.096	0.424	0.000								
7 <i>C. simplex</i> CCAP 1085/3	0.088	0.091	0.096	0.436	0.007	0.007							
8 <i>C. muellerii</i> CCAP 1010/3	0.088	0.091	0.096	0.436	0.007	0.007	0.000						
9 <i>C. calcitrans</i> f. <i>pumilus</i> CCAP 1010/11	0.449	0.453	0.462	0.000	0.424	0.424	0.436	0.436					
10 <i>C. sp. jonquieri</i>	0.463	0.458	0.476	0.121	0.430	0.430	0.443	0.443	0.121				
11 <i>C. simplex</i> var. <i>calcitrans</i> CSIRO CS 251	0.088	0.091	0.096	0.436	0.007	0.007	0.000	0.000	0.436	0.443			
12 <i>C. calcitrans</i>	0.088	0.091	0.096	0.436	0.007	0.007	0.000	0.000	0.436	0.443	0.000		
13 <i>C. sp. qd</i>	0.322	0.322	0.333	0.483	0.315	0.315	0.315	0.315	0.483	0.482	0.315	0.315	
14 <i>Cetraria odontella</i> country Finland	0.730	0.730	0.748	0.776	0.703	0.703	0.709	0.709	0.776	0.783	0.709	0.709	0.741

4 讨论

4.1 形态学

从形态学上观察, 此藻种为单细胞生长, 并不像一般的角毛藻那样连成长链, 如扭链角毛藻 (*Chaetoceros tortissimus*)、远距角毛藻 (*Chaetoceros distans*)、短孢角毛藻 (*Chaetoceros brevis*) 等。细胞较小, 只有 5~7 μm , 根据 Rogerson 等^[8]对纤细角毛藻 (*Chaetoceros gracilis*) 的研究, 此藻种与纤细角毛藻外形相近, 光镜下无法区分。Rogerson 等对纤细角毛藻的角毛结构进行了分析, 其中螺旋状的硅质骨架和互生的小刺与 *C. sp. qd* 相似, 但螺旋和小刺的形状与本种也有差别, 从照片可清楚地看到本种螺旋状的骨架, 骨架之间有横隔相连, 形成小孔结构 (见图 1), 从纤细角毛藻的照片可看到小孔结构呈螺旋状排列, 并没有观察到骨架结构 (见图 1h), 本种的小刺形状短而钝, 而纤细角毛藻的尖而长, 呈三角形 (见图 1g, h)。此外由于文中没有对细胞表面结构进行描述, 无法进行比较, 因此无法确定 *C. sp. qd* 是否是纤细角毛藻。

4.2 分子生物学

将 *C. sp. qd* 的 5.8SrDNA-ITS 序列与从 Genbank 获取的所有相关角毛藻的 5.8SrDNA-

ITS 序列进行比较 (见表 2), 可以发现角毛藻属的不同种在 5.8SrDNA-ITS 的总长度、5.8S 的长度、ITS1, ITS2 的长度等基本性状上都存在差异。5.8S rDNA-ITS 的总长度是 698~810 bp, 而本藻种 5.8SrDNA-ITS 区比已知角毛藻属的种类更长, 达 837 bp。5.8S 区域的长度是 157~160 bp, ITS1 区域的长度是 281~331 bp, ITS2 区域的长度是 260~324 bp, 其中 *C. sp. qd* 与已知角毛藻种在 ITS2 区差别最大, 比所有角毛藻属内其他种类最长的 ITS2 区还长 36 bp。这显示此种与角毛藻属内其他种类有较大差异, 并且本种与纤细角毛藻在 ITS 区的差别也比较大 (见表 2), 总长度比 *Chaetoceros gracilis* 长 46 bp, 比 *Chaetoceros gracilis* strain UTEX LB 2375 和 *Chaetoceros gracilis* strain UTEX LB 2658 长 27 bp, 特别在 ITS2 区, 比 *Chaetoceros gracilis* 长 36 bp, 比 *Chaetoceros gracilis* strain UTEX LB 2375 和 *Chaetoceros gracilis* strain UTEX LB 2658 长 41 bp。通过 BLAST 比对可知, 与本种最接近的是 *Chaetoceros gracilis*, 相似度达到 99%, 但覆盖度仅为 59%, 主要位于 5.8S 区, 在 ITS 区相似度不高, 证明与纤细角毛藻差别较大。ITS 区长度和比对结果表明此种可能是一新的角毛藻属物种。

通过三种方法进行系统进化树的构建,分析得出的结果一致,均显示 *C. sp. qd* 比较特殊,不与已知的角毛藻聚群,在进化的早期就已经独立分支,并且分支节点的支持率都很高,此结果也支持此藻种为角毛藻属内一新种。

进一步分析遗传距离分析可知角毛藻属内种间的遗传距离为 0.007~0.476,角毛藻属与同属盒形藻目的齿状藻属的遗传距离为 0.703~0.783,都大于 0.7,可见不同属间的遗传距离明显大于种间的。同种不同株间的遗传距离很小,如 *Chaetoceros gracilis* 与 *Chaetoceros gracilis* strain UTEX LB 2375 之间的遗传距离仅为 0.096。Adachi 等^[9]以 rDNA, ITS 区为分类指标对日本海域 *Alexandrium* 属不同地理株进行分析,得出日本海域 *Alexandrium* 属不同种的种间序列有显著差异,而种内个体间 ITS 区序列差异很小(<0.01)。陈月琴等^[10]的研究结果指出,亚历山大藻属不同种的种间序列有显著差异(核苷酸差异大于

0.20),而种内个体间 ITS 区序列则非常相似(差异仅为 0.01),表明 ITS 区序列用于亚历山大藻属的分类鉴定是一个较稳定的指标。张宝玉等^[11]利用 ITS 区作为属内种间的分类指标鉴定了一株尖刺拟菱形藻。本实验中 *C. sp. qd* 与角毛藻属内其他种类基于 ITS 序列的遗传距离值为 0.315~0.483,都大于 0.3,符合种间遗传距离的范围,但小于 0.7,并未超过属间的遗传距离。

通过以上形态学和分子生物学分析推测,*C. sp. qd* 为角毛藻属新种,将其命名为 *Chaetoceros bricklenis*。

5 结论

本实验从海水中分离纯化得到一株未知藻种,从形态学上鉴定它是角毛藻属的种类,进一步从分子生物学角度对其进行鉴定,利用 18S 序列和 5.8S-ITS 序列分别进行了系统发育树的构建和遗传距离的分析,显示此藻种为一微型角毛藻新种。

参考文献:

- [1] GIOVANNONI S J, BRITSCHGI T B, MOYER C L, et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton[J]. *Nature*, 1990, 345: 60—63.
- [2] HUANG B Q, HONG H S, WANG H L. Size fractionated primary productivity and the phytoplankton bacteria relationship in the Taiwan Strait[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 183: 29—38.
- [3] 朱树屏,郭玉洁.烟台、威海鲈鱼渔场及其附近海区角毛硅藻属的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1957, 1(1): 27—87.
- [4] 孙颖民,石玉,郝彦周.水产生物饵料培养实用技术手册[K].北京:中国农业出版社,1999:24—25.
- [5] FABRICE P, REJEAN T, ERIC D, et al. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system[J]. *Aquaculture*, 2003, 221: 393—406.
- [6] 张菊平,张兴志.植物游离细胞的扫描电镜样品的制备法[J]. *生物学通报*, 2008, 43(8): 56.
- [7] 程兆第,高亚辉,刘师成.福建沿海微型硅藻[M].北京:海洋出版社,1993:8—9.
- [8] ROGERSON A, DEFREITAS A S W, MCINNES A G. Growth rates and ultrastructure of siliceous setae of *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 1986, 22: 56—62.
- [9] ADACHI M, SAKO Y, ISHIDA Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 18S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions[J]. *Journal of Phycology*, 1996, 32: 424—432.
- [10] 陈月琴,屈良鹤.海洋亚历山大藻属种间界定的分子标准[J]. *中山大学学报:自然科学版*, 1999, 38(1): 7—11.
- [11] 张宝玉,王广策,吕颂辉,等.三株赤潮硅藻 5.8S rDNA 及其转录间隔区(ITS)的克隆和序列分析[J]. *海洋学报*, 2006, 28(1): 111—117.

Morphological and molecular identification of a marine nanodiatom

ZHANG Dong¹, SUI Zheng-hong¹, WANG Chun-yan², BAO Zhen-min¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Marine Genetics and Breeding Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Putian Marine and Fishery Environmental Monitoring Station, Putian Marine and Fishery Bureau, Putian 351100, China)

Key words: rDNA; ITS; *Chaetoceros*; taxonomy