

应用变性梯度凝胶电泳研究厦门西海域 超微型真核浮游生物多样性*

鲍磊, 陈纪新, 黄邦钦

(厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 应用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 方法对厦门西海域超微型真核浮游生物的遗传多样性进行周年变化特征研究分析。结果表明, 厦门西海域典型测站的超微型真核浮游生物群落具有丰富的多样性组成; 厦门西海域超微型真核浮游生物群落遗传结构和主要类群组成季节性变化显著; 不同典型测站之间的超微型真核浮游生物群落遗传结构的周年变化特征相似; 不同典型测站之间的超微型真核浮游生物群落的类群组成也很相似, 由绿藻、Stramenopiles、定鞭金藻、甲藻、未确定类群 (unidentified groups) 和其他类群组成。

关键词: 变性梯度凝胶电泳 (DGGE); 厦门西海域; 遗传多样性; 超微型真核浮游生物
中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2007)06-0504-06

Diversity of eukaryotic ultraplankton assemblages by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in Xiamen western waters

BAO Lei, CHEN Jixin, HUANG Bangqin

(State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The year-round changing patterns of eukaryotic ultraplankton assemblages' genetic diversity in Xiamen western waters was analyzed using DGGE. The results showed that the genetic diversity of the eukaryotic ultraplankton assemblages in typical sites of Xiamen western waters was very high. The genetic structures and compositions of eukaryotic ultraplankton assemblages have a great seasonal changes and the structures' changing patterns of eukaryotic ultraplankton assemblages were very similar between different typical sites and the phylogenetic compositions' changing patterns of these sites' eukaryotic ultraplankton assemblages were also very similar and the main groups were Chlorophyceae, Stramenopiles, Haptophytes, Dinophyceae, unidentified groups and other groups.

Key words denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); Xiamen western waters; genetic diversity; eukaryotic ultraplankton

变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术是由 Fischer 和 Lemarié^[1] 最先提出的用于 DNA 突变检测的一种电泳技术, 自 1993 年 Mulyzer^[2] 首次将该方法应用于微生物生态学的研究以来, 已经被广泛应用于土壤^[3]、热泉^[4]、海洋^[5] 及根际^[6] 等环境的微生物多样性研究中。虽然此项技术应用广泛, 但是国内尚未见有关海洋超微型真核浮游生物的研究报道。DGGE 技术可以较为快速的检测出样品中超微型真核浮游生物的系统发育的组成, 并且能同时进行多个样品的比较分析。

本文应用 PCR-DGGE 方法, 通过对代表性条带测序, 研究厦门西海域两个测站在周年尺度上不同月份样品之间超微型真核浮游生物群落遗传结构变化和类群组成特点。

1 材料和方法

1.1 测站与样品采集

在厦门西海域设立 2 个典型采样测站 (图 1)。其中, 27 号测站位于厦门胡里山附近海域; 18 号测站位于厦门宝珠岛周围海域。

* 收稿日期: 2006-02-28 修订日期: 2006-07-28

基金项目: 国家自然科学基金 (40376043, 40331004, 40076031); 教育部新世纪优秀人才培养计划资助。

作者简介: 鲍磊 (1980-), 男, 山东高密人, 硕士研究生, 主要从事海洋超微型浮游生物生态研究。

通讯作者: 黄邦钦, bqhuan@xm.u.edu.cn

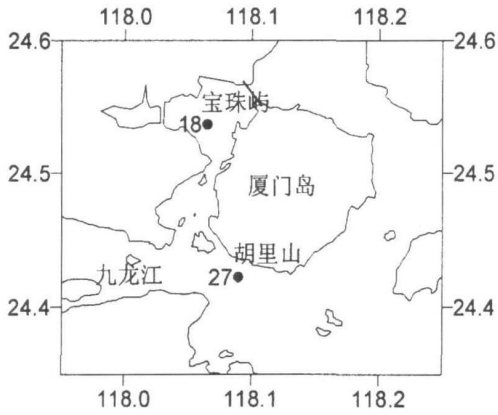


图 1 厦门西海域采样测站

Fig 1 Sampling stations in western waters of Xiamen

样品采集: 2003 年 12 月至 2004 年 11 月期间 (每月采样一次, 共 12 次), 每次于朔望大潮高平潮前后 2~3 h, 取表层海水, 立即带回实验室过滤分析。

样品预处理实现方法为先将水样滤过 5 μm 核孔滤膜 (Millipore), 收集过滤水样, 然后将收集水样滤过 GF/F 滤膜 (Whatman), 滤膜立刻进行冰冻保存。

表 1 主要引物

Tab 1 Primer sequences used in this study

引物	序列 (5' to 3')	Saccharomyces cerevisiae 位点	特异性	来源
Set A				
EukA	AACTGCTGATCCTGCCAGT	1 to 21	Eukarya	33
EukB	TGATCCTCTGCAAGTTCACTAC	1795 to 1772	Eukarya	33
Set B				
Euk1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 to 20	Eukarya	48
EukA r	CCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCG		Eukarya	This study
Set C				
Euk1A	CTGGTTGATCCTGCCAG	4 to 20	Eukarya	48
Euk516 rGC	ACCAGACTTGCCCTCC	563 to 548	Eukarya	2

GC 夹: CGCCCCGGCGCCGCCCGGGCGGGCGGGGGCGGGGGCACGGGGGG

PCR 程序 (Set A/Set B): 94°C 预变性 5 min 后, 先进行 20 个循环的降落 PCR (94°C 变性 1 min 退火 1 min 72°C 延伸 3 min 退火温度由 65°C 到 55°C, 每一循环递减 0.5°C), 再进行 10 个循环 (94°C 变性 1 min 55°C 退火 1 min 72°C 延伸 3 min), 最后 72°C 延伸 7 min。

PCR 程序 (Set C): 94°C 预变性 5 min 后, 先进行 10 个循环的降落 PCR (94°C 变性 30 s 退火 30 s 72°C 延伸 30 s 退火温度由 67°C 到 57°C, 每一循环递减 1°C), 再进行 10 个循环 (94°C 变性 30 s 57°C 退火 30 s 72°C 延伸 30 s), 最后 72°C 延伸 30 min^[8]。

1.5 DGGE

6% 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 37.5:1), 0.5 × TAE 缓冲液 (40 mmol/L Tris 40 mmol/L 乙酸; 1 mmol/L EDTA, pH 7.4), 70 V 恒定电压, 60°C 恒温条件下进行电泳。

每个加样孔中加入大约 800 ng 到 1000 ng 的 PCR 产物和大约 100 ng 的实验室单种培养藻类 PCR 产物进行电

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂: 引物 (7.0 nmol/L) 购自 Takara Taq DNA polymerase (1 U/μL)、dNTP Mix (各 2.0 mmol/L)、10 × Taq buffer 购自 MBI 尿素、去离子甲酰胺、过硫酸铵购自上海生工生物工程有限公司。

主要仪器: 紫外分光光度计 Ultraspec 2100 pro (Amersham), PCR Express thermal cycler (ThermoHybaid), The dcodeTM universal mutation detection system (Bio-Rad), SYNGENE 成像系统。

1.3 核酸提

使用 CTAB 改良法取直接从环境样品中提取目标 DNA^[7]。

1.4 PCR 扩增

应用真核浮游生物的 18S rDNA 通用引物 (表 1), 通过巢式 PCR 扩增出 18S rDNA 的高变区片段。PCR 扩增体系为 25 μL, 包括 10 × Taq Buffer 2.5 μL, dNTP Mix 1 μL (各 2.0 mmol/L), 正向引物 0.5 μL (7.0 nmol/L), 反向引物 0.5 μL (7.0 nmol/L), DNA 模板 1 μL (约 10 ng), Taq DNA polymerase 0.5 μL (1 U/μL)。

泳。使用 SYBR Green I 荧光染料对凝胶进行染色 30 min 在 1 × TAE 溶液中漂洗 10 min 后用 SYNGENE 成像系统进行观察。条带从 DGGE 凝胶中切取出来后, 悬浮在 100 μL MilliQ 水中, 储存于 4°C 下过夜^[9]。上清液使用 Set C 引物对 (无 GC 夹) 进行 PCR 扩增。PCR 产物经过凝胶试剂盒 (U-gene) 回收纯化后进行测序 (上海英俊公司)。使用 BlastN search (www.ncbi.nlm.nih.gov) 将测序条带序列 (小于 560 bp) 与 NCBI 数据库中序列进行比对, 获得代表性条带与 Genbank 序列相似性信息。DGGE 图谱经过软件 Crosschecker2.1 数字化处理后得到条带位置与条带亮度 (相对丰度) 的信息, 在此基础上采用非度量多维标度 (non-metric multidimensional scaling NMDS) 的排序方法对 18 号和 27 号测站内部样品号测站内部样品之间的群落遗传结构周年变化特征进行分析。

2 结果与讨论

2.1 总 DNA 的提取和 PCR 扩增

将从环境样品中直接提取的基因组 DNA 进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 在 15 kb 上方出现单一条带 (图略), 表明已获得较为完整片段的基因组 DNA。使用紫外分光光度计 U ltrospec 2100 pro (Am ersham) 对目标 DNA 分析: 得到 OD260/280 值在 1.6 ~ 1.8 之间, 产量范围为 50 ~ 100 ng/μ L 的目标 DNA。经过巢式 PCR 扩增后, 获得大小约为 560 bp 的特异扩增目标片段 (图略)。

2.2 DGGE 优化

电泳条件由垂直 DGGE 电泳 (图 2 a) 和平行 DGGE 电泳 (时间梯度) (图 2 b) 试验得出: 变性剂梯度范围为 25% ~ 40% (7 mol/L 的尿素, 40% 的甲酰胺为 100% 的变性剂浓度), 70V 恒定电压, 60C 恒温条件下进行电泳 14 h。

2.3 超微型真核浮游生物群落遗传结构多样性时空分布

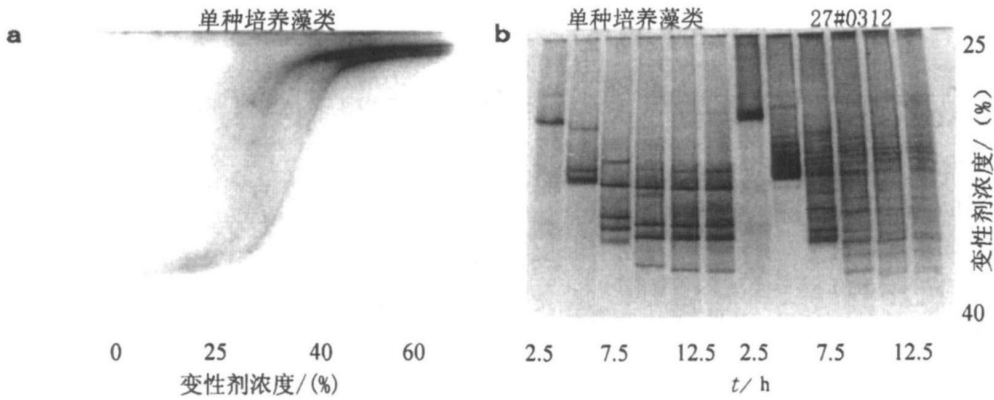


图 2 实验室单种培养藻类垂直 DGGE 电泳图谱 (a) 和实验室单种培养藻类、样品 27 号 0312 (27 号测站 2003 年 12 月份样品) 平行 DGGE 电泳 (时间梯度) 图谱 (b)

Fig 2 Negative image of a perpendicular DGGE gel from algal cultures (a) and Negative image of a parallel DGGE gel (time course separation) from algal cultures and sample 27#0312 (Site 27, December 2003 sample) (b)

将 DGGE 指纹图谱中位于相同位置的条带规定为一个可操作分类学单位 (OTU, Operational Taxonomic Unit)^[8]。18 号测站月份样品 (周年) 的条带数在 15 ~ 32 (平均为 22) 之间变动, OTUs 总数为 55; 27 号测站月份样品 (周年) 的条带数在 9 ~ 31 (平均为 21) 之间变动, OTUs 总数为 58。两个测站中条带数较高的月份都出现在 10 月、11 月和 12 月; 较少的条带数的月份都出现在 8 月和 9 月份 (图 3)。

带海域, 温度随着季节更替而显著变化, 因此, 温度变化极有可能是厦门西海域超微型真核浮游生物群落遗传结构和类群组成的重要决定性因素。两个测站群落遗传多样性周年变化特征主要表现为: 温度较低月份的样品之间的群落遗传结构比较相似, 18 号测站的 12、1、2、3 月份样品和 27 号测站的 12、2、4 月份样品分别在图 4 a 与图 4 b 中构成低温组; 温度较高月份的样品之间的群落遗传结构比较相似, 18 号测站的 5、7、8、9、10、11 月份样品和 27 号测站的 7、8、9、10 月份样品分别在图 4 a 与图 4 b 中构成高温组。

对 NMDS 图形 (图 4) 分析后发现, 两个测站的月份样品具有明显的季节分布特征。厦门西海域属于典型亚热带

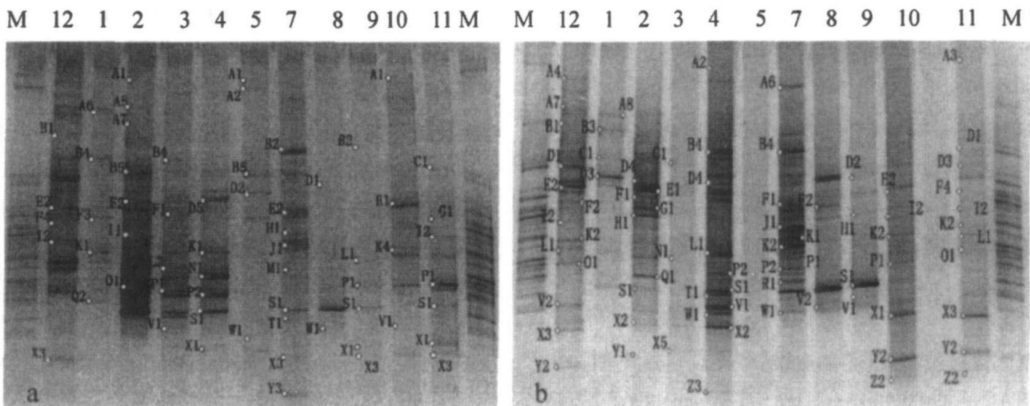


图 3 厦门西海域超微型真核浮游生物群落变性梯度凝胶电泳指纹图谱

Fig 3 DGGE fingerprints of eukaryotic ultraplankton assemblages in the western waters of Xiamen

a 18 号测站 (Set C 引物对扩增) DGGE 凝胶图谱; b 27 号测站 (Set C 引物对扩增) DGGE 凝胶图谱 (M: DGGE 预实验中已测序的代表性条带经再次 PCR 扩增后产物的混合体; 数字 12 2003 年 12 月份, 数字 1 2 3 4 5 7 8 9 10 11 2004 年相关月份, 其中六月份样品缺失)

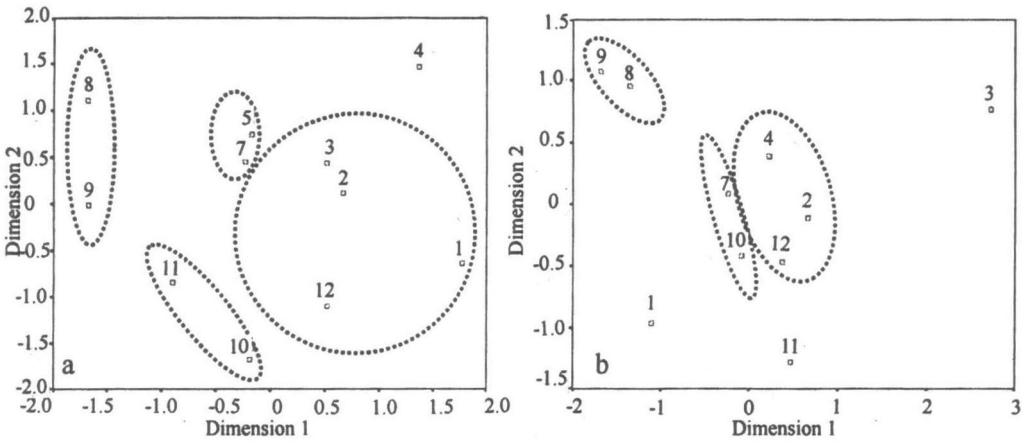


图 4 厦门港西海域超微型真核浮游生物群落 NMDS

Fig. 4 NMDS diagrams relating the eukaryotic ultraplankton assemblages in the western waters of Xiamen (a 18号测站; b 27号测站)

对 DGGE 指纹图谱 (图 3) 和对低温组、高温组内部相似性贡献较大的条带序列信息分析后发现, 对 18 号与 27 号测站月份样品构成的高低温组组间差异性贡献较大的条带分别为: 18 号测站中的属于绿藻的条带 W1, 属于 Stramenopiles 的条带 A5, 属于甲藻的条带 A1、M1 和属于未确定类群 (unidentified groups) 的条带 A6 等; 27 号测站中的属于绿藻的条带 P1、P2, 属于 Stramenopiles 的条带 A3、D2, 属于未确定类群的条带 D4、X2、Z2, 属于甲藻的条带 Q1、V1, 属于定鞭金藻 (*Haptophytes*) 的条带 E1 和属于灰胞藻 (*Glaucocystophyceae*) 的条带 Y1 等。

2.4 厦门西海域超微型真核浮游生物类群 18S rDNA 序列信息

对厦门西海域 18 号和 27 号测站的 DGGE 图谱中代表性条带测序后, 分别得到约占总条带数量 80% 和 90% 的条带序列信息。这些序列信息反映出, 厦门西海域超微型真核浮游生物具有丰富的群落遗传多样性组成; 不同测站样品中构成群落的主要类群基本相同, 包括: 绿藻、Stramenopiles、定鞭金藻、甲藻、未确定类群 (unidentified groups) 和其他类群 (像灰胞藻等) (图 5)。

绿藻是厦门西海域超微型真核浮游生物群落中分布

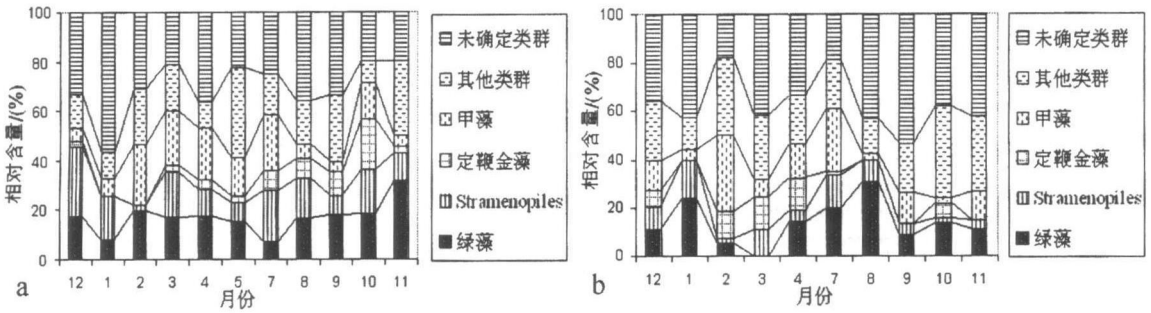


图 5 厦门西海域超微型真核浮游生物群落结构

Fig. 5 Eukaryotic ultraplankton assemblage structure in the western waters of Xiamen (a 18号测站; b 27号测站)

较广、相对丰度较高的类群。序列的相似度范围很高 (96% ~ 100%), 具有 5 个 OTUs 在 18 号和 27 号测站样品中的月均相对含量分别为 13.3% 与 13.6%。其中与 *Ostreococcus* sp 序列相似度达到 100% 的条带 P1, 在 18 号测站每个月份样品中均有分布 (4 月份除外), 相对丰度范围为 3.0% ~ 19.1%, 是 18 号测站样品中平均相对含量最高的条带; 与 *Micromonas pusilla* 序列相似度为 99% 的条带 W1 是分布最广 (相对含量亦很高) 的条带, 它在 27 号测站样品的每个季度均有分布, 在 18 号测站每个月份均有出现 (月均相对含量 9.1%); 另一个 OTU (条带 P2) 在进化树上位于 *Ostreococcus* sp 和 *Micromonas pusilla* 之间 (图

6), 在 18 号测站每个季度和 27 号测站每个季度 (冬季月份除外) 都有分布; 此外, 与 *Pyramonas aureus* 序列相似度为 99% 的条带 D3 和与 *Carteria* sp 序列相似度为 99% 的条带 F2 则比较特别, 它们在胡里山外侧的 27 号测站样品 (周年) 中均有广泛分布, 而在内湾的 18 号测站样品中几乎没有出现。因此, 绿藻是该海域中超微型真核浮游生物群落的重要组成部分。

未确定类群 (Unidentified groups) 也是研究海域超微型真核浮游生物群落重要的组成部分, 至少由 11 个 OTUs 组成。18 号测站中, 这些条带的亮度比例范围为 17.0% ~ 41.2% (月均 24.4%); 27 号测站中, 条带的亮度比例范围为 18.0% ~ 57.0% (月均 40.8%)。这些序列在进

化树上组成了独立的分枝,位置主要介于绿藻和真菌之间,序列相似度范围为 94% ~ 99% (图 6)。获得的序列信息中,有些条带的序列与其它海域环境样品中获得的序列很相近,具有在地理上广泛分布的特点,包括:与从

南沙群岛周边水域获得的 NS371A86^[9]的序列相似度为 98% 的条带 D4 以及与从湖泊中获得的 P34 11^[10]的序列相似度为 97% 的条带 D2 等。

Stramenopiles 定鞭金藻也是群落中分布较广、丰度较

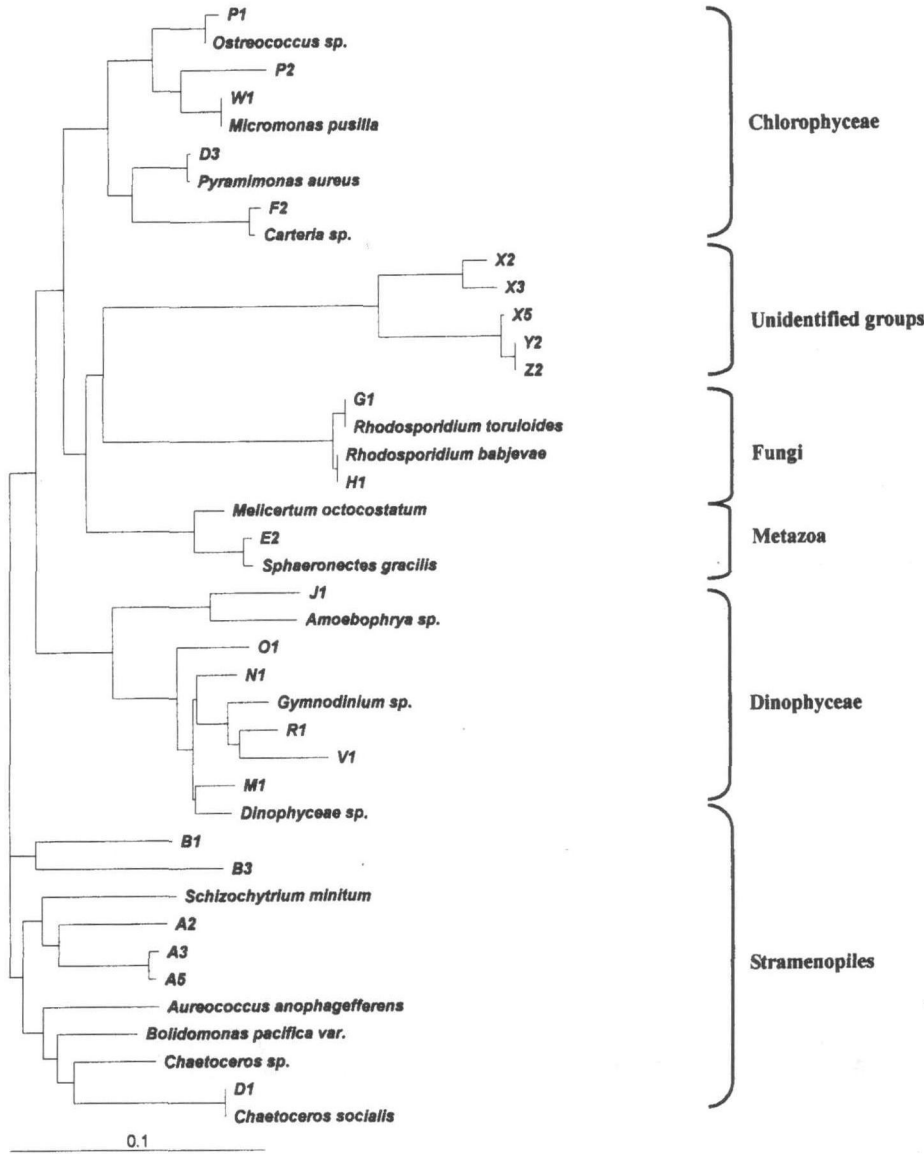


图 6 代表性条带 (图 3 部分标记条带) 的 18S rDNA 序列 (560bp 左右) 构建的系统进化树

Fig 6 Phylogenetic affiliation tree of the 18S rDNA partial sequences (approximately 560bp) from the specific bands (partial marked bands in Fig 3) Scale bar = 0.10 mutations per nucleotide position

高的类群。Stramenopiles 总共由 11 个 OTUs 组成,在 18 号和 27 号两个测站样品 (周年) 中分别具有 9 个 OTUs 和 8 个 OTUs,平均相对丰度分别为 10.9% 和 7.4%。其中与 *Chaetoceros* sp. 序列相似度为 92% 的条带 B1 等条带均属于这一类群; 定鞭金藻由 3 个 OTUs 组成,在 18 号和 27 号两个测站样品 (周年) 中的平均相对丰度分别为 6.3% 和 5.7%, 与 *Chrysochromulina hirta* 序列相似度为 92% 的条带 E1 等条带属于这一类群。

以往显微镜镜检、HPLC^[15,16] 等研究表明,硅藻、绿藻等为厦门西海域超微型真核藻类群落中含量比较高的类群,甲藻类群尽管也有分布,但是含量不是很高。但是本

文研究却发现,在 18 号和 27 号两个测站某些月份样品的超微型真核浮游生物群落中存在相对含量较高的甲藻类群,总共由 9 个 OTUs 组成,相对丰度范围分别为: 2.7% ~ 18.9% (月均 10.6%) 和 1.8% ~ 25.8% (月均 11.4%), 其中与 *Amoebophrya* sp. 序列相似度为 91% 的条带 J1 等条带都属于这一类群。这种现象不仅在我们研究的海区中会出现,而且在其他海域的研究中^[5,17] 也有类似的情况。一般认为,这种现象主要是由于对环境样品进行 PCR 扩增过程中受到的模板拷贝数不一致和不同模板之间扩增效率不均衡等因素影响而产生的误差造成的^[13,14]。由于甲藻类的 rRNA 的基因拷贝数比其它藻类

的 rRNA 的基因拷贝数高, 甲藻类群在 PCR 扩增的过程中获得优先扩增的机会便比其它的藻类的机会大很多, 这时大量的甲藻类群便扩增出来。因此, 即使环境样品中的甲藻相对含量比其它藻类(像绿藻、硅藻等)相对含量低, 但是经过 PCR 扩增后, 也会增加序列信息中的甲藻类群的 OTUs 数量(图 6 中条带的序列编号在 GeneBank 数据库中的编号范围为 DQ344643 ~ DQ344784 和 DQ352842 ~ DQ352853)。

在测序条带中还发现一些由 1 个 OTU 构成的类群, 如与灰胞藻(*Glaucocestophyceae*)的 *G. nostochinearum* 序列相似度为 93% 的条带 Y1 等以及一些具有与非超微型粒级海洋浮游生物序列十分相似的组分, 如少量与桡足类、真菌等相似的序列。这些类似的序列同样也在其它海区的研究^[5-13]中发现, 它们出现可能的原因^[5]有: (1) 这些较大个体的生物在过滤过程中由于物理剪切等原因而发生碎裂, 碎裂部分可以通过滤膜; (2) 环境中有些生物释放的游离 DNA 的存在; (3) 存在与这些类群序列相似的微小粒级的未知类群。

此外, 凝胶中切取下来的代表性条带在经过回收和重新 PCR 扩增后, 其中有些条带的扩增效果不好或者根本扩增不出。18 号测站中, 未测序条带的相对含量范围为 5.7% ~ 35.4%, 月均 19.6%; 27 号测站中, 未测序条带的相对含量范围为 0.2% ~ 13.4%, 月均 5.1%。因此在分析结果时应当谨慎的把这些未知的条带考虑在内。我们对这些条带对群落的多样性组成及群落结构变化等生态作用还不清楚, 有待于通过进一步的研究来获取。

3 结 论

本文应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)方法对厦门西海域代表性 18 号和 27 号测站的超微型真核浮游生物群落进行研究, 发现厦门西海域超微型真核浮游生物群落遗传多样性存在以下特点:

(1) 厦门西海域超微型真核浮游生物群落多样性很丰富, 由绿藻、Stramenopiles 定鞭金藻、甲藻、未确定类群和其它类群构成。(2) 厦门西海域 18 号和 27 号两个测站月份样品(周年)中群落遗传结构的变化特点比较一致: 温度低的月份样品之间的群落遗传结构相似; 温度高的月份样品之间的群落遗传结构相似。温度可能是厦门西海域超微型真核浮游生物群落结构方面的重要控制因子。(3) 绿藻、Stramenopiles 和定鞭金藻等类群是厦门西海域超微型真核浮游生物群落中分布较广, 所占比重也较高的类群。(4) 未确定类群在周年的超微型真核浮游生物的群落中分布较广、含量较高, 在群落结构变动等方面扮演重要的角色, 有待对其进行更加细致的研究。

参考文献:

[1] FISHER S G, LERMAN L S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with theory [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1983, 80: 1579-1583.

[2] HEAD IM, SAUNDERS JR, PICKUP R W. Microbial evolution, diversity and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of un-

cultivated microorganisms [J]. *Microbiol Ecology*, 1998, 35: 1-21.

[3] GELSOMINO A, KEILZER-WOLTERS A C, ELIASAS J D, *et al*. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 38: 1-15.

[4] FERRIS J W, WARD D M. Seasonal distributions of dominant 16S rRNA-defined populations in a hot spring microbial mat examined by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 1375-1381.

[5] DEZBIC PEDR S-ALI, MARSH T L, *et al*. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2942-2951.

[6] SMALLA K, WIELAND G, BUCHNER A. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plankton dependent enrichment and seasonal shifts revealed [J]. *Appl Environ Microbiol* [J], 2001, 67: 4742-4751.

[7] 袁明, 珠温柔, 刘吉升, 等. 几种生物材料中总 RNA 的提取 [J]. *分子生物育种*, 2005, 3(2): 285-292.

[8] SIGLER W V, MINACIC, ZEYER J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 57: 17-22.

[9] YUAN J, CHEN M, PENG S, *et al*. Genetic diversity of small eukaryotes from the coastal waters of Nansha Islands in China [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 240(2): 163-170.

[10] LERANC, THNOTM A, LEPRE C, *et al*. Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 5935-5942.

[11] MUYZER G. DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural communities [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 317-322.

[12] MUYZER G, DE WAAL E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59: 695-700.

[13] SUZUKI M T, RAPP S G, DVANNONIS J. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 4522-4529.

[14] WINTZINGER DEVON E, GOEBEL U B, STACKEBRANDT E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based RNA analysis [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, 21: 213-229.

[15] 黄邦钦, 林学举. 厦门西侧海域超微型浮游生物的时空分布及其调控机制 [J]. *台湾海峡*, 2000, 19(3): 329-336.

[16] 陈纪新, 黄邦钦, 贾锡伟, 等. 利用光合色素研究厦门海域超微型浮游生物群落结构 [J]. *海洋环境科学*, 2003, 22(3): 16-21.

[17] MASSANA R, BALAGUÉ V, GUILLOU L, *et al*. Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches [J]. *Microbiology Ecology*, 2004, 50: 231-243.