

# 三株赤潮硅藻 5.8S rDNA 及转录间隔区(ITS) 的克隆及序列分析

张宝玉<sup>1,2</sup>, 王广策<sup>1\*</sup>, 吕颂辉<sup>3</sup>, 齐雨藻<sup>3</sup>, 邹景忠<sup>1</sup>, 曾呈奎<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100089; 3. 暨南大学 水生生物研究所, 广东 广州 510632;)

**摘要:** 对引发赤潮的 3 株硅藻——1 株尖刺拟菱形藻(*Pseudonitzschia pungens*) 和 2 株中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*) 的 5.8S rDNA 和 ITS(internal transcribed spacers) 序列进行了 PCR 扩增、克隆和序列测定, 并分析了硅藻门 10 株赤潮藻(7 株从 GenBank 获得) 的系统进化关系. 研究表明, 尖刺拟菱形藻的 ITS 和 5.8S rDNA 的长度为 693bp, SK-1(分离自东海赤潮暴发区) 测序得到 715bp, 除 ITS 和 5.8S rDNA 外, 还包含部分 18S rDNA 和 28S rDNA; SK-2(分离自青岛养殖场) 的 ITS 和 5.8S rDNA 的长度为 331bp, 尖刺拟菱形藻与从 GenBank 中获得的 2 株尖刺拟菱形藻相似程度最高, 为 100%, 与该属的多列拟菱形藻相似程度稍低, 为 82.9%. SK-2 的 ITS 序列与 SK-1 的相似程度很低, 只有 51%, 但与拟中肋骨条藻的 ITS 序列相似程度高, 为 95.5%. SK-1 的 ITS 序列与拟中肋骨条藻的相似程度也低, 为 56.7%. 系统进化树反映的结果与相似性反映的结果一致. 研究的该株尖刺拟菱形藻从根据 ITS 序列研究的结果与形态鉴定的结果看是一致的; SK-2 可能属于拟中肋骨条藻; SK-1 比较特殊, 有待于用其他的方法进一步研究确定其分类地位.

**关键词:** 硅藻; 尖刺拟菱形藻; ITS; 序列分析; 系统进化

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 0253-4193(2006)01-0111-07

## 1 引言

赤潮作为一种日益频繁发生的海洋自然灾害正越来越受到关注, 而其中有害藻类水华(harmful algal bloom, HAB) 则成为赤潮研究的重点. 硅藻是赤潮生物中的一个重要类群, 但只有拟菱形藻是其中惟一发现含有藻毒素多莫酸(domoiic acid, DA) 的赤潮种类. 由 DA 引起的贝毒称为记忆缺失性贝毒(amnesic shellfish poisoning, ASP), 已报道在加拿大、美国、日本等海域均有分布<sup>[1]</sup>. 虽然我国目前仍未发现有关 DA 的报道, 但拟菱形藻却是沿海水域

中的重要优势种类, 时常引发赤潮, 在我国已有 5 次形成赤潮的记录<sup>[2~5]</sup>, 所以加强对拟菱形藻的研究显得十分必要, 而明确其分类地位是赤潮研究的基础.

中肋骨条藻也隶属硅藻门, 是一种世界范围内广泛存在的广盐性浮游植物. 本种赤潮无毒, 但增殖速率很快, 引发的赤潮危害面积大, 持续时间长, 引发频率高, 给海洋生态系统造成了严重影响, 也是需要引起特别重视的赤潮生物原因种. 该赤潮种的另一重要特点是不同地理株在形态及大小上高度变异<sup>[6]</sup>, 给鉴定工作带来一定的困难.

收稿日期: 2004-02-16; 修订日期: 2004-08-19.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170499); 中国科学院知识创新重要方向性资助项目(KZCX2-211); “973”项目“我国赤潮高发区赤潮生物多样性及其种群分布特征”资助项目(2001CB409701).

作者简介: 张宝玉(1975-), 女, 山东省诸城市人, 博士, 从事目标微型赤潮藻特异性遗传探针构建及核酸序列分析. E-mail: by-zhang@163.com

\* 通讯作者: E-mail: gcwang@ms.qdio.ac.cn

目前赤潮生物的分类和识别方法主要是根据细胞的形态及其生活史,但是这些产生赤潮的微生物的形态有时很难区分,有些形态的细微差别是由于环境条件的不同而产生的,以这些形态上的差别作为分类的标准会造成赤潮生物分类上的混乱,同时以形态上的差异作为分类的依据不同的分类学家有不同的标准,带有一定的主观性<sup>[7]</sup>. 鉴于形态鉴定方面的局限性,因此很有必要发展一种准确、快速的鉴定赤潮微藻的方法.

分子生物技术的迅速发展为浮游植物的鉴定提供了新思路. 目前用 rDNA 和 ITS 区作为分子指标在研究甲藻系统发育方面已取得了较好的结果<sup>[8-12]</sup>, 但对硅藻, 特别是对中肋骨条藻, 利用 ITS 区进行不同地理株的鉴定在这方面的研究比较少. 本文研究的 2 株中肋骨条藻藻在外形形态上差别不大, 根据其形态特征认为两者为同一个种. 本文拟采用分子生物学的方法进一步验证其分类地位.

本文对引发赤潮的 3 株硅藻——1 株尖刺拟菱形藻和 2 株中肋骨条藻的 5 S rDNA 及 ITS 区进行了 PCR 扩增、克隆和序列分析, 希望为我国赤潮藻的分子分类鉴定提供理论依据.

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

为方便起见将采自东海赤潮暴发区的中肋骨条藻命名为 SK-1; 另一株采自青岛养殖场, 命名为 SK-2. 在实验室分离并进行单种培养. 尖刺拟菱形藻也采自东海赤潮暴发区, 由中国科学院海洋研究所赤潮生物藻种库分离并提供藻种. 藻种于 f/2 培养基中培养, 光暗比为 12 h: 12 h, 照度为 2 000~4 000 lx, 培养温度为 19~20 °C.

### 2.2 实验试剂

实验所用的化学药品购于上海生工及 Promega 公司.

### 2.3 细胞总 DNA 的制备

DNA 制备方法参见文献<sup>[13, 14]</sup>. 提取的 DNA 在室温下干燥后用 TE (pH 8.0) 溶解, 用 Beckman DU-650 紫外分光光度计在 260 和 280 nm 处检测 DNA 的纯度和含量.

### 2.4 ITS 区的 PCR 扩增

从 GenBank 数据库中获得尖刺拟菱形藻 18S rDNA 和 28S rDNA 序列, 根据各序列中最保守区域用软件 Primer 5.0 设计 ITS 引物. 序列为:

正向序列为 5' CGAGGAATTC CTAGTAAA CGC 3',  
EcoR

反向序列为 5' CCGTCGAC TCGTT GACAAATGAC 3'.  
Sal

中肋骨条藻因在 GenBank 中无同一株的 18S rDNA 和 28S rDNA 序列, 故无法设计引物序列. 用如下 ITS 引物序列扩增:

正向序列为 5' GTC GTCGAC GTAGGTGAACCTGCAGAA-  
Sal

GGATCA 3',

反向序列为 5' C CTGCAG TCGA CATATGCTTAAA -  
Pst

TTCAGCAGG 3'.

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

扩增尖刺拟菱形藻 ITS 区域 PCR 反应条件如下: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min. 扩增 2 株中肋骨条藻的 ITS 区域时, 将 PCR 反应条件中的退火温度改为 45 °C, 其他条件不变. 50 μL 扩增反应体系含有 50 mmol/dm<sup>3</sup> KCl, 10 mmol/dm<sup>3</sup> Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol/dm<sup>3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 模板约 10 ng, 0.2 mmol/dm<sup>3</sup> dNTPs, 0.2 μmol/dm<sup>3</sup> 引物, 0.3 U/mm<sup>3</sup> Taq DNA 聚合酶. 每次均设空白对照, 在 Eppendorf Mastercycler Gradient 基因扩增仪上完成. 扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统 Pharmacia Biotech Image Master VDS 记录实验结果.

### 2.5 PCR 产物的克隆及测序

PCR 扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上 50 V 电泳 40 min, 从胶上回收目的物 DNA 片段. 用 T4 DNA 连接酶将目标片段连接到 pBluescript SK 加质粒载体上. 克隆方法按文献<sup>[15]</sup>操作. 菌液送至上海中科凯瑞测序公司, 正反向测序.

### 2.6 序列分析

分别将 3 株藻的正反方向两段序列拼接成一个序列, 用 DNASTar 软件将这些序列配对比较, 观察其相似性, 寻找差异区域, 对所有参数均用软件默认值.

在 NCBI 服务器上 (<http://www.ncbi.nih.gov>) 用 BLAST 进行同源检测, 以便表明所得的序列为 ITS 区. 实验测得的序列和其他硅藻 ITS 序列 (来自 GenBank) 分别用计算机软件 DNASTar, BioEdit 及 Phlip3.5 进行分析. 用 BioEdit 和 Clustlw 进行多序列匹配排列; 用 DNASTar 比较序列的相似性时采用 Jotun Hein 方法, 对参数均用默认值. 采

用 Phlip3.5 软件中的邻接 (neighbor-joining) 法来获得系统进化树, 并通过自举分析 (bootstrap) 作置信度检测, 自举数据集为 1 000 次. 选择一株棕囊藻 (*Phaeocystis* sp. Santou) 作为外类群. 序列的数据库入口号码如下: AY257844 (*P. multiseriis*); AY257845 (*P. pungens*); AY257846 (*P. pungens*); AY229895 (*Chaetoceros curviest*); AY229896 (*C. debilis*); AY229897 (*C. gracilis*); Y11511 (*Skeletonema pseudocostatum*); PSP271217 (*Phaeocystis* sp. Santou).

### 3 结果

#### 3.1 2 株中肋骨条藻显微观察

2 株中肋骨条藻活体显微镜下的观察结果见图 1. SK-1 每条链上约有 20 个细胞, 而 SK-2 每条链上约有 5 个细胞, 细胞大小基本相同, 也就是说两者在外部形态上差别不大.

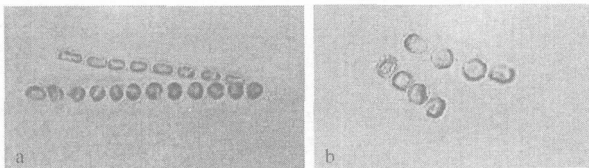


图 1 2 株中肋骨条藻活体显微观察

- a. SK-1 采自东海赤潮暴发区 (10×40)  
b. SK-2 采自青岛养殖场 (10×40)

#### 3.2 尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻的 ITS 和 5.8S rDNA 片段的 PCR 扩增及克隆

从图 2 中可以看出, 用上述引物可以成功地扩增出尖刺拟菱形藻和 2 株中肋骨条藻相应的 DNA 片段, 2 种藻的 PCR 产物大小有差别, 尖刺拟菱形藻的 PCR 产物要大于中肋骨条藻的 PCR 产物 (图 2).



图 2 PCR 扩增产物的电泳图谱 (1% 琼脂糖)

- a. 1. 100 bp 标志物; 2. 纯化后的尖刺拟菱形藻 PCR 产物;  
3. 纯化后的 SK-1 PCR 产物. b. 1. 100 bp 标志物; 2. 对照  
组; 3, 4. SK-2 的 PCR 产物

为纯化上述 PCR 产物, 对尖刺拟菱形藻用 *Sal* I 和 *Eco*R I 酶切, 对中肋骨条藻用 *Sal* I 和 *Pst* I 酶切后, 分别将其连接至 pBluescript SK 加质粒中, 经过转化, 筛选带有重组外源 DNA 的菌株. 图 3 是带有外源 DNA 片段的重组质粒经过酶切后的电泳图片, 从中可以看出外源 DNA 片段成功克隆至质粒载体中.

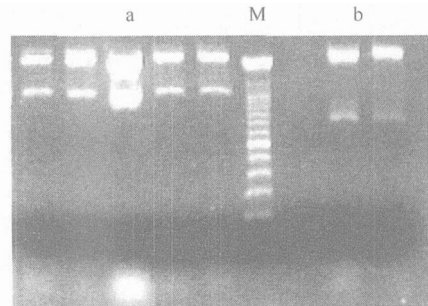


图 3 带有外源 DNA 片段的重组质粒经过限制性内切酶酶切后的电泳图片 (1% 琼脂糖)

- M. 100 bp 标志物, a. 外源片段为尖刺拟菱形藻的 PCR 纯化产物, b. 外源片段为 SK-1 的 PCR 纯化产物

#### 3.3 BLAST 结果

将测序得到的尖刺拟菱形藻的序列输入到 GenBank 中做 BLAST 分析, 结果发现 AY257846 和 AY257845 的 5.8S rDNA 及 ITS 序列与尖刺拟菱形藻的测序结果有最大的相似性. 其 BLAST 分值分别是:  $Score = 1\ 505$ ,  $E = 0.0$ ;  $Score = 1\ 501$ ,  $E = 0.0$ . 对中肋骨条藻的序列也做上述同样的分析, 结果发现 SK-1 的序列与 GenBank 中 100 多条序列的 5.8S rDNA 相匹配, 其  $Score = 157$  左右, 相似性达 90% 左右,  $E = 4e^{-35}$  左右, 其他的序列不匹配. SK-2 的序列与序列号为 Y11511 的 5.8S rDNA 及 ITS 序列有很高的相似性, 其  $Score = 515$ , 相似性达 95%,  $E = e^{-143}$ . 上述结果证实这 3 株藻的 PCR 产物确实是含 5.8S rDNA 的 ITS 序列.

#### 3.4 克隆 DNA 片段的序列分析

序列分析表明, 对尖刺拟菱形藻测得的序列共 1 133 个碱基, 其中含 18S rDNA 204 bp, 28S rDNA 236 bp; ITS1 为 259 bp, 5.8S 为 171 bp, ITS2 为 263 bp; 对 SK-1 测序共得到 715 个碱基. 因 GenBank 中无该藻的 ITS 和 5.8S rDNA 序列, 故无法根据比对结果进一步划分出 ITS1, 5.8S 和 ITS2 区域; 对 SK-2 的 PCR 产物测序共得到 682 bp, 其中 18S rDNA 120 bp, 28S rDNA 231 bp; ITS1 为

109 bp, 5. 8S 为 163 bp, ITS2 为 59 bp. 上述序列已提交到 GenBank, 获得的序列号分别为 AY544769, AY544770, AY660001.

### 3.5 测序的 DNA 片段与 GenBank 中硅藻 ITS 及 5.8S rDNA 的比较分析

#### 3.5.1 序列相似性比较

ITS 序列相似性及离散度比较结果见表 1, 2 和 3. 本文研究的尖刺拟菱形藻与 GenBank 中的 2 株尖刺拟菱形藻 (AY257846; AY257845) ITS 区的相似性为 100%, 离散度是 0.0; 多列拟菱形藻 (AY257844) 与该株尖刺拟菱形藻的相似性为 82.9%, 离散度为 19.6%.

表 1 拟菱形藻 5.8S rDNA 与 ITS 序列的相似性和离散度矩阵

		相似性 (%)				
		1	2	3	4	
离散度 (%)	1	100.0	100.0	82.9	1	<i>P. pungens</i>
	2	0.0	100.0	82.9	2	<i>P. pungens</i> AY257846
	3	0.0	0.0	82.9	3	<i>P. pungens</i> AY257845
	4	19.6	19.6	19.6	4	<i>P. multiseriata</i> AY257844
		1	2	3	4	

表 2 中肋骨条藻和拟中肋骨条藻 5.8S rDNA 和 ITS 序列的相似性和离散度矩阵

		相似性 (%)			
		1	2	3	
离散度 (%)	1	95.5	56.7	1	PSK
	2	4.7	51.5	2	SK-2
	3	65.9	79.9	3	SK-1
		1	2	3	

表 3 中肋骨条藻和 3 种角毛藻 5.8S rDNA 及 ITS 序列的相似性和离散度矩阵

		相似性 (%)					
		1	2	3	4	5	
离散度 (%)	1	99.2	99.5	49.4	51.5	1	AY229896
	2	0.8	99.4	49.0	51.1	2	AT22987
	3	0.5	0.6	49.7	51.4	3	AY229895
	4	85.9	87.2	85.0	51.1	4	SK-1
	5	78.7	80.0	79.1	81.2	5	SK-2
		1	2	3	4	5	

本文研究的 SK-2 的 ITS 序列与 SK-1 的相似程度很低, 只有 51.5%, 但与拟中肋骨条藻 (序列号为 Y11511) 的 ITS 序列相似程度高, 为 95.5%. SK-1 的 ITS 序列与上述拟中肋骨条藻的相似程度较低, 为 56.7%. 2 株中肋骨条藻与同属于中心硅藻纲的 3 种角毛藻的相似程度都很低, 为 50% 左右.

#### 3.5.2 系统树反映结果

从图 4 的系统进化树上可以看出, SK-1 单独形

成一支; SK-2 和拟中肋骨条藻聚在一起也形成一支, 但支持率很低, 只有 18%; 本文研究的尖刺拟菱形藻和拟菱形藻属的其他几株藻 (AY257845, AY257846, AY257844) 以很高的支持率 (BP = 99% - 100%) 聚在一起形成一大的分支, 多列拟菱形藻 (AY257844) 和尖刺拟菱形藻属于不同的种, 因而在此分支内又形成一小分支; 3 种角毛藻 (AY229895, AY229895, AY229895) 也以较高的支持率 (BP = 87% ~ 100%) 聚在一起而形成一大分支. 这些结果基本符合传统形态学上对这些藻的分类, 但本文研究的 2 株中肋骨条藻在进化树上反映的结果比较特殊, 其中的原因有待于进一步分析.

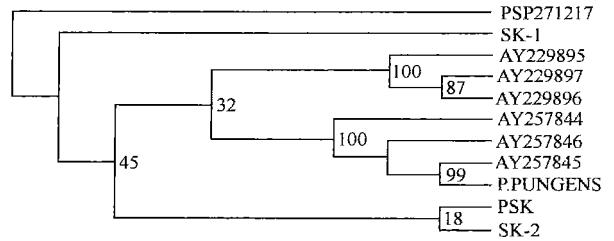


图 4 用 5.8S rDNA 和 ITS 序列构建的系统进化树

## 4 讨论

真核生物的 rDNA 成簇排列在一起, 由 18S rDNA, 5.8S rDNA 和 28S rDNA 组成一个转录单位, 彼此被转录单元内间隔区 ITS 分开. rDNA 及 ITS 区目前被广泛用作研究系统发育、进化及分类鉴定的分子指标, 特别是 ITS 区, 因它在进化速率上较核糖体大小亚基的保守区快, 可以提供比较丰富的信息, 因此近几年来常被用作许多生物属下种间水平上分类鉴定的分子指标. 这在动物、被子植物、真菌和赤潮藻如亚历山大藻等都得到了很好的体现<sup>[16-18]</sup>.

本文研究的尖刺拟菱形藻从形态鉴定上认为是这个种, ITS 序列分析的结果基本上与形态鉴定的结果一致. 因为测序得到的该株藻的 5.8S rDNA 及 ITS 序列与 GenBank 中提交的 2 株尖刺拟菱形藻 (序列号分别为 AY257846 和 AY257845) 的相应序列的相似性高达 100%. 在用 ITS 序列构建的系统树上, 本文研究的该株尖刺拟菱形藻也以 99% ~ 100% 的支持率与 AY257846, AY257845 聚在一起. 尽管这 3 株藻来自不同的地域 (AY257845 来自葡萄牙的新科斯塔; AY257846 来自墨西哥的 Near

Tuxpam), 但由此似乎可以说明尖刺拟菱形藻的不同地理株差异不大.

目前对尖刺拟菱形藻的研究已比较深入. 除了展开对其生理、生化、毒素、形态特征、环境因子等方面的研究外<sup>[19-21]</sup>, 在分子方面, Manhart 等利用 SSU 和 ITS 序列鉴定 *P. pungens* 和 *P. multiseri-ies* 取得了较好的结果. 他们通过比较分析及采用 RFP 法(restriction fragment patterns) 研究这 2 种藻的小亚基和 ITS 序列得到的结果与根据形态对它们的分类得到的结果相一致, 即两者虽然关系密切, 但属于拟菱形藻属的不同种<sup>[22]</sup>. 本文通过研究该株尖刺拟菱形藻的 ITS 序列相似性及其系统进化关系, 得到的结果与 Manhart 的结果相一致. 另外, Scholin 等根据其 LSU rDNA 序列设计探针, 用全细胞杂交和“三明治”杂交技术成功鉴定出拟菱形藻属的不同培养材料, 并将该技术成功地应用于自然水体样品的检测<sup>[23]</sup>. Miller 等也根据拟菱形藻 LSU rDNA 设计探针, 用全细胞杂交技术鉴定了拟菱形藻属不同的种<sup>[24]</sup>. Cangelosi 等证明 Pre-rRNA 在检测和识别不同种的拟菱形藻方面是一个很有用的分子目标<sup>[25]</sup>.

2 株中肋骨条藻形态鉴定的初步结果与利用 ITS 序列鉴定的结果却有一定的差距. 从青岛养殖场采集并分离出的 SK-2 和 GenBank 中的拟中肋骨

条藻的 ITS 序列有高达 95% 的相似性, 从这方面讲, SK-2 可能属于拟中肋骨条藻的不同地理株, 将其划分为中肋骨条藻是不合适的, 但 SK-2 和 Y11511 在系统进化树上的支持率却不高. 对于系统进化树上支持率低于 50% 的现象, Daugbjerg 等认为或者是该分支的祖先进化时间相当短, 或者是现有的数据不足以解释它们之间的进化关系<sup>[26]</sup>.

对于 SK-1, 尽管其 PCR 产物的测序结果经 BLAST 证实是 5.8S rDNA 及 ITS 区, 但它与 SK-2 拟中肋骨条藻以及角毛藻的相似性都很低, 在系统进化树上也单独形成一支. 到现在为止, GenBank 中无中肋骨条藻的 ITS 序列, 故无法利用 ITS 序列对 SK-1 作进一步的分析. 因此, 该株藻是否确实是中肋骨条藻还有待于借鉴其他研究方法, 如用扫描电镜(SEM) 或研究其 18S rDNA /28S rDNA 等作进一步的分析.

目前对中肋骨条藻的研究主要集中在生理和营养动力学方面<sup>[27-29]</sup>. 对该藻分子方面的研究主要集中在 18S rDNA 和 28S rDNA 的序列. Medlin 等采用核糖体小亚基鉴定 4 株中肋骨条藻, 证实有 2 株是拟中肋骨条藻<sup>[30]</sup>. 如引言中介绍的中肋骨条藻是世界广布种, 不同地理株在形态上高度多变, 因此对中肋骨条藻的分类地位的确定必须借鉴多种手段进行相互验证.

## 参考文献:

- [1] BATES S S, GARRISON, HORNER. Bloom dynamics and physiology of domoic acid producing *Pseudo-nitzschia* species [A]. ANDERSON D M, et al. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms [C]. Heidelberg: Springer-verlag, 1998. 267-292.
- [2] 杜琦. 厦门西海域赤潮的研究[J]. 暨南大学学报(赤潮研究专刊), 1989, 57-67.
- [3] 洪君超, 黄秀清, 袁永进. 长江口外及邻近海区赤潮多发区的分析与探讨[J]. 暨南大学学报(赤潮研究专刊), 1989, 40-50.
- [4] 方绍锦. 浙江近海上升流调查区赤潮的初步探讨[J]. 海洋学报. 1984, 6(3): 408-414.
- [5] 齐雨藻, 钱锋, 郑磊. 中国东南沿海赤潮的生理生态学研究[A]. 朱明远, 李瑞香, 王飞. 中国赤潮研究[M]. 青岛: 青岛出版社, 1996. 6-15.
- [6] HASLE G R. Morphology and taxonomy of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae)[J]. Norw J Bot, 1973, 20: 109-137.
- [7] FU KUYO Y. Morphology of *Protogonyaulax tamarensis* (Labour) Taylor and *Protogonyaulax catenella* (Whedon and Kofoid) Taylor from Japanese coastal waters[J]. Bull Mar Sci, 1985, 37: 529-537.
- [8] 陈月琴, 屈良鹤, 曾陇梅, 等. 南海赤潮有毒甲藻——塔马亚历山大藻的分子鉴定[J]. 海洋学报, 1999, 21(3): 106-111.
- [9] 庄丽, 陈月琴, 李钦亮, 等. 赤潮叉角藻 18S rDNA 和 ITS 区序列测定与分析[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(2): 148-153.
- [10] ADACHI M, SAKO Y, ISHIDA Y. Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae)[J]. J Phycol, 1994, 30: 857-863.
- [11] ADACHI M, SAKO Y, ISHIDA Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions[J]. J Phycol 1996, 32: 424-432.
- [12] 张宝玉, 王广策, 张炎, 等. 东海原甲藻和海洋原甲藻 APBM 的 5.8S rDNA 及其转录间隔区(ITS)的克隆和序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(3): 264-272.
- [13] ZHANG Zhao-duo, GREEN B R T, CAVALIER S. Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes [J]. J Nature, 1999, 400: 155-159.

- [14] 王广策, 孙海宝, 曾呈奎. 三角褐指藻磷酸甘油酸变位酶基因可能侧翼序列的筛选、克隆以及序列测定[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 259—264.
- [15] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M], 第 3 版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002. 96—105.
- [16] BALDWIN B G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the vomitoxin[J]. Mol Phylogen Evol, 1992, 1: 3—16.
- [17] GONZALEZ I L, SYLVESTER J E, SMITH T F, et al. Ribosomal RNA gene sequences and hominoid phylogeny [J]. Mol Biol Evol, 1990, 7: 203—219.
- [18] MORALES V M, PELCHER L E, TAYLOR J L. Composition of the 5.8S rDNA and internal transcribed spacer sequences of isolates of *Leptospira maculans* from different pathogenicity groups [J]. Curr Genet, 1993, 23: 490—495.
- [19] 陈菊芳, 徐宁, 王朝晖, 等. 大亚湾拟菱形藻 (*Pseudonitzschia* spp.) 种群的季节变化与环境因子的关系 [J]. 环境科学学报, 2002, 22(6): 743—748.
- [20] 左冬梅, 韩志国, 武宝酣. 铁对尖刺拟菱形藻生长及光合作用的影响 [J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2002, 23(5): 81—87.
- [21] 虞秋波, 高亚辉. 拟菱形藻软骨藻酸的研究进展[J]. 海洋科学, 2003, 27(8): 26—29.
- [22] LUNDHOLM N, MOESTRUP O, HASLE G R, et al. A study of the *Pseudonitzschia pseudodelicatissima* cuspidata complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? [J]. J Phycol, 2003, 39: 797—813.
- [23] SCHOLIN A, ROMAN M III, MILLER P E. DNA probes and a receptor-binding assay for detection of *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples [J]. J Phycol, 1999, 35: 1 356—1 367.
- [24] MILLER P E, SCHOLIN C A. On detection of *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) species using whole cell hybridization: sample fixation and stability [J]. J Phycol, 2000, 36: 238—250.
- [25] CANGELOSI G A, HAMLIN A M, ROMAN M III, et al. Detection of stable Pre-rRNA in toxic *Pseudonitzschia* species [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(12): 4 859—4 865.
- [26] DAUGBJERG N, HANSEN G, LARSEN J, et al. Phylogeny of some of major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates [J]. Phycologia, 2000, 39(4): 302—317.
- [27] 陈慈美, 周慈由, 郑爱榕, 等. 中肋骨条藻增殖的环境制约作用——Fe( ) 与 N、Mn、光、温交互作用对藻生化组成的效应 [J]. 海洋通报, 1996, 15(2): 37—42.
- [28] 陈雄文, 高坤山. CO<sub>2</sub>浓度对中肋骨条藻的光合无机碳吸收和胞外碳酸酐酶活性的影响 [J]. 科学通报, 2003, 48(21): 2 275—2 279.
- [29] KORB R E, SAvIKKE P J, JOHNSTON A M, et al. Sources of inorganic carbon for photosynthesis by three species of marine diatom [J]. J Phycol, 1997, 33: 433—440.
- [30] MEDLIN L K, ELWOOD H J, SHAWN S, et al. Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum* [J]. J Phycol, 1991, 27: 514—524.

## The cloning and sequence analysis of the 5.8S rDNA and its region from three strains of marine diatoms

ZHANG Bao-yu<sup>1,2</sup>, WANG Guang-ce<sup>1</sup>, LÜ Song-hui<sup>3</sup>, QI Yü-zao<sup>3</sup>,  
ZOU Jing-zhong<sup>1</sup>, ZENG Ceng-kui<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** *Pseudonitzschia pungens* and *Skeletonema costatum* are two strains of diatoms which cause harmful algal bloom in China. SK-1 and SK-2 are two strains of diatoms, assumably species of *S. costatum* by morphological characteristics. Three strains, SK-1 which was isolated from the East China Sea and SK-2 which was isolated from the Aquatic Farm of Qingdao and one strain of *Pseudonitzschia pungens* which was from the East China Sea, were studied based on rDNA data. The sequences of 5.8S rDNA and ITS re-

gions of three strains of diatoms were amplified, cloned and sequenced. Meanwhile, seven additional ITS sequences and 5.8S rDNA were included in the data analysis. The results were as follows: (1) The ITS sequence and 5.8S rDNA of *P. pungens* were 693 bp while the sequence of SK-1 was 715 bp, which contained complete ITS and 5.8S rDNA, partial 18S rDNA and 28S rDNA; The ITS and 5.8S rDNA sequences of SK-2 were 331bp; (2) the sequence of *P. pungens* had very high level of similarity with that of two strains of *P. pungens* retrieved from GenBank, and the similarity was 100%; while it showed 82.9% of identity compared with *P. multiseriis* which also belonged to the genus of *Pseudonitzschia*; the ITS sequence similarity of SK-2 and SK-1 was very low, showing 51.5% of identity, but it had very high level of similarity with that of *Skeletonema pseudocostatum* (95.5%); the ITS sequence of SK-1 had lower similarity with *S. pseudocostatum*; (3) results of evolutionary tree coincided with similarity analysis of all three strains; it was suggested that recognition of *P. pungens* by morphological characteristics was supported with rDNA and ITS regions; (4) the findings demonstrated that classifications of SK-2 and SK-1 based on morphological criteria maybe were incongruous. SK-2 should be belonged to *S. pseudocostatum* and more data are needed to classify which groups SK-1 is belonged to.

**Key words:** diatom; *Pseudonitzschia pungens*; ITS region; sequence analysis; phylogeny