

文章编号: 1004-7271(2002)02-0160-07

·综述·

# 海藻分子生物学技术的应用与发展

## Application and progress of molecular biotechnology studies in seaweed

周志刚, 孙育平

(上海水产大学渔业学院, 农业部水产增养殖生态、生理重点开放实验室, 上海 200090)

ZHOU Zhi-gang, SUN Yu-ping

(Key Laboratory of Ecology Physiology in Aquaculture Certificated by the Ministry of Agriculture,  
Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

关键词 海藻; 分子生物学技术

Key words seaweed; molecular biotechnology

中图分类号 S917 文献标识码: A

分子生物学技术是有目的地利用及定向改造生物体系(包括组织、细胞及其组分)的技术。海藻分子生物技术指有目的地利用和定向改造海藻的有关分子生物学技术,它包括蛋白质工程、基因工程、以及与藻类天然产物开发有关的分子生物学技术。更广义地讲,它应包括应用于海藻学研究领域的分子生物学技术。目前的一些分子生物学技术如蛋白质同工酶、基于遗传物质基因组 DNA 的限制片段长度多态性(RFLP)技术、随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术、扩增片段长度多态性(AFLP)技术、微卫星 DNA(microsatellite DNA)、小卫星 DNA(minisatelliteDNA)、简单重复序列间扩增(intersimple sequence repeats, ISSR)、DNA 测序、差减文库(SSH, MSH)技术等一系列的 DNA 指纹技术,都是分子生物学技术,它们已经在生物领域得到了广泛的应用,并且取得了较大的研究进展。分子生物学技术在海藻中的应用已有了许多研究报道,本文旨在对近年来分子生物学技术在海藻方面的应用与发展研究情况作一综合阐述。

### 1 蛋白质同工酶

早在 20 世纪 60 年代中期,蛋白质电泳首先成为被广泛应用的分子遗传技术,应用于检测分子水平的遗传与变异,蛋白质同工酶是生物体内基因转录和翻译的直接表达产物,它反映了编码酶蛋白的 DNA 序列信息,酶谱的变化反应了等位基因和位点变化。通过对酶谱的进一步分析,可以较深入、直接地了解物种的遗传信息。Chang 等<sup>[1]</sup>首先将同工酶凝胶电泳应用于高等植物天然种群研究,而该技术在藻类学领域得以应用则是自 Fredrick<sup>[2,3]</sup>开始,同工酶电泳技术使用大大促进了人们对海藻种群的遗传过程认识,并且随着生化分析技术的提高,这种研究方法不断得以完善,在海藻学研究领域中继续拓展。

收稿日期 2001-10-30

基金项目:上海市教育委员会“曙光计划”项目(98-SG-32)和国家自然科学基金项目(39800105)

作者简介:周志刚(1964-),男,安徽肥东人,理学博士,副研究员,主要从事海洋生物技术、分子生态学研究。

Gallagher<sup>[4]</sup>将 PAGE 运用于骨条藻 (*Skeletonema costatum*) 种群的研究中,通过分析 5 种同工酶位点的多态性,第一次定量检测了微藻的种群遗传学结构;Fujiio 等<sup>[5]</sup>在研究条斑藻紫菜 (*P. yezoensis*) 叶状体的种群遗传变异时,经 SGE 检测了 12 种酶位点,论证了该种群的遗传变异水平与其大量无性繁殖方式有关,这与 Pearsall 和 Murray<sup>[6]</sup>在研究加利福尼亚地区的珊瑚藻 (*Lithothrix aspergillum* Gray) 种群时得出海藻种群遗传学结构和遗传变异状况与该种群的生殖方式、生活史以及散布能力密切相关的结论一致。Matlock 和 Romeo<sup>[7]</sup>使用 PAGE,以五种同工酶位点作为分离和鉴别弓江蕨 (*Gracilaria arcuata*)、缢江蕨 (*G. salicornia*) 和可食江蕨 (*G. edulis*) 的遗传标记,结果表明在遗传学上弓江蕨与缢江蕨的亲缘关系很近,而与形态上相差较大的可食江蕨的亲缘关系较远,应该划分成两个遗传学上明显不同的种群,最终准确的将不同种予以区分和定位。同样, Hayhome 等<sup>[8]</sup>和 Chinnain 等<sup>[9]</sup>在从形态相同的同属甲藻中辨认出有毒种类时,也是以其作为特异性遗传标记,准确而又快速的得出鉴定结果,避免了因形态学区分所造成的困难,也抛开了由生化分析藻类毒素带来的烦琐。Zhou 等<sup>[10]</sup>将同工酶应用于海带 (*Laminaria* spp.) 不同品系的分析,成功地建立了不同品系间的亲缘关系,在品系鉴定中确立了 *Adk-1* 和 *Hk-1* 位点作为海带区分的标记,并且在海带育种中初步确立了品系不育或雄性不育的同工酶标记。

## 2 DNA 水平上的分子生物学技术

进入 20 世纪 80 年代,随着生物分子生物学及克隆技术的发展和不断地完善,诞生了直接从 DNA 水平上进行遗传分析的分子生物学技术,且在人类基因组计划的大力推动下,这种分子生物学技术得到了迅猛的发展。它直接以 DNA 的形式表现,不受环境条件和生物个体发育阶段的影响,标记的数目众多,多态性高,并且许多分子标记表现为共显性,能提供完整的遗传信息。当前它广泛地已应用于海藻种群个体基因组研究的各个方面。

DNA 分子生物学技术的发展日新月异。DNA 通常分为核 DNA 和细胞器 DNA,其基本的技术包括 DNA 提取、限制性内切酶分析、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、分子杂交、cDNA 基因文库构建、DNA 测序等。基于这些技术建立起来的分子生物学技术已广泛地在海藻学方面得到应用和发展。

限制片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种最早的分子标记生物技术。1980 年 Bostein 等<sup>[11]</sup>首先提出了利用 RFLP 作为标记构建遗传图谱,它是指限制性内切酶酶切不同个体基因组 DNA 后,用印迹转移杂交的方法检测同源序列酶切片段在长度上的差异。这种差异显现和检测采用克隆的 DNA 片段作为探针进行 Southern 杂交,通过放射自显影来实现。RFLP 具有数量丰富、无表型效应、共显性、检测不受环境和发育阶段的影响等特点,是目前在海藻种群遗传学方面应用较为广泛的一种分子标记生物技术。在红藻门中, Mariela Gonzalez 等<sup>[12]</sup>对采自 Chile 的江蕨 (*Gracilaria*), Shigeru Araki 等<sup>[13]</sup>对紫菜 (*Bangiales*, *Porphyra*, *Rhodophyta*) 的不同种群属都用此法来分析它们之间的多态性;在甲藻纲中, Scholin 和 Anderson<sup>[14]</sup>用此方法鉴定了 Alexandrium 的甲藻纲 (*Dinophyceae*) 品系、种;蓝藻门中, Michelle 和 David<sup>[15]</sup>用 RFLP 对聚球藻 (*Synechococcus* spp., *Cyanobacteria*) 的种群品系的 DNA 多态性进行分析,并用 WH7803 与之杂交反应区分了不同种群品系。Scholin 和 Anderson<sup>[14]</sup>用此方法区别了 Alexandrium 地方甲藻种和品系之间的差异,在绿藻门中, Lemieux<sup>[16]</sup>研究了团藻目 (*Volvocales*) 的分类和进化。同样在褐藻门中 Fair<sup>[17]</sup>和 Fain 等<sup>[18]</sup>中也应用此研究了海带的分类和进化的关系。

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 20 世纪 80 年代后期随着 DNA 聚合酶链式反应 (PCR) 技术的问世。使直接扩增 DNA 多态性成为可能。在此基础上,1990 年由 Williams 等<sup>[19]</sup>和 Welsh 和 Clelland<sup>[20]</sup>领导的 2 个研究小组几乎同时发展了一种新型的 DNA 分子生物学标记技术。它基本采用随机合成的寡核苷酸引物 (通常为 10bp) 作为 PCR 反应的引物,对所研究生物的基因组进行 PCR 扩增。一般某一个引物在基因组中存在多个可能结合位点,经过 35~45 个循环,即可以得到

大量的 DNA 片段克隆,扩增产物经检测,形成 RAPD 条纹。虽然 Mizukami 等<sup>[21]</sup>研究了 DNA 的提取程序对 RAPD 重复性的影响,但直至目前,RAPD 无论是在海藻遗传图谱、种群遗传学方面的研究,还是在种群品系的鉴定研究应用仍是最广泛的。绿藻门中,Haring 等<sup>[22]</sup>用 RAPD 作为工具建立了成熟衣藻(*Chlamydomonas eugametos*)的遗传图谱;红藻门中,Mohsin 等<sup>[23]</sup>用 RAPD 作为标记鉴别石花菜(*Gelidium vagum*)杂种优势,Dutcher 和 Kaprauf<sup>[24]</sup>用 RAPD 来区分三个杂合体 and 纯合体紫菜(*Bangiales*,*Porphyra*,*Rhodophyta*)种群。褐藻门中,Billot 等<sup>[25]</sup>用 RAPD 作为鉴定掌状海带(*Laminaria digitata*)亲本遗传标记的工具。

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)是 1993 年 Zebeau 和 Voss<sup>[26]</sup>发明的一种 DNA 分子生物标记技术,它主要是对基因组 DNA 进行限制性酶切片段的选择性扩增,具体是将酶切后的基因组 DNA 进行限制性酶切后,将特定的接头连接在 DNA 酶切片段的两端,从而形成一个带接头的特异片段,通过接头和 PCR 引物 3' 端的识别,进行 PCR 扩增,最终经过银染或放射自显影检测。它实际是将 RFLP 和 PCR 结合的一种分子生物学技术。此技术在海藻的研究中应用较少,但也有应用,如在红藻门中,Donaldson 等<sup>[27]</sup>把 AFLP 作为鉴定红藻的一种遗传标记手段,研究了种群间和种群内的遗传变异情况。

微卫星、小卫星(microsatellite DNA,minisatellite DNA)最初是由 Jeffreys 等<sup>[28,29]</sup>发展起来的一些人类小卫星探针,这些探针后来广泛地用于动植物<sup>[30,31]</sup>、微生物<sup>[32,33]</sup>等的大量研究领域,后来逐渐应用在海藻方面,并且显示了巨大的潜力和优势。Fain 等<sup>[18]</sup>报道了大型藻 cpDNA 酶切重复和简单重复序列在进化上的保守性,Coyer 等<sup>[34,35]</sup>用多位点 DNA 指纹(multi-locus DNA fingerprint)鉴定了褐藻门中巨藻(*Macrocystis pyrifera*)的单倍体和二倍体及亲本和子代的种群遗传关系。在海藻种群差异的应用研究中,Coyer 等<sup>[34]</sup>和 Billot 等<sup>[36]</sup>分别已经有所报道。在红藻门,Remi 等<sup>[37]</sup>利用此方法对江蓠(*Gracilaria gracilis*)的遗传属性和种间的保守关系进行了研究,Yuzuru 等<sup>[38]</sup>对条斑紫菜叶状体(*Porphyra yezoensis* larev)的短状重复序列进行分析,实验充分证明它是研究种属群体进化的一种较好的分子生物学技术,今后有更广泛的应用和发展前景。

DNA、RNA 测序(线粒体和叶绿体 DNA)是区分个体间遗传差异最彻底的分析方法,特别能提供基因组特异区域的完全的遗传信息。但对所有生物基因组 DNA 都进行测序即无必要,也非易事。随着 PCR 技术的发展,基因组特殊区域或特异基因的测序逐渐实用,在解决所关注的等位基因的差异、快速进化的 DNA 序列测定问题上是一种很好的方法。在海藻种群遗传学方面的许多研究中,DNA 的测序技术应用较为广泛。诸如 Bhattacharya 和 Dureh<sup>[39]</sup>对褐藻中的一种藻(*Costaria costata*)的 DNA,Kazuhiro 等<sup>[40]</sup>对萱藻(*Scytosiphonales*,*Phaeorphyceae*)的 rbcL 部分 rbcS、LSU rDNA 进行了测序,并进行了系统遗传学的研究,Rintoul 和 Sheath 等<sup>[41]</sup>对地理分布在北美洲的红藻门种群中的弯枝藻目的(*Compsopogonales*,*Rhodophyta*)18sRNA 进行测序分析了,确定了其遗传关系。Saunders 和 Dureh<sup>[42]</sup>对海带(*Laminariales*)的小核糖体 RNA(SSU-RNA)测序、在绿藻中,Kooistra 等<sup>[43]</sup>对膜质拟刚毛藻(*Cladophoropsis membranacea*)的 DNA 测序都取得了很好的研究结果,在甲藻门中,Scholin 等<sup>[44]</sup>对全球分布的聚球藻类(*Alexandrium*)的 LSU rRNA 进行测序,很好地解决了种群中及地理区域种群之间的遗传关系,测序具有直观、准确的优点。

mRNA 差异显示技术(Differential Display)是这些年来建立起来一种新技术,它可以从一对细胞群体或基因型各自生产的 15 000 种 mRNA 中,有效地鉴别并克隆差别表达的基因。它是一种差减 cDNA 克隆原理和 PCR 的结合,直观筛选差别表达基因的新方法,可以广泛地应用于生理和病理过程特异基因的检出、克隆和序列分析,通过这种方法可以分离出一些重要的基因,寻找一些重要的特异性标记,使这种标记更有针对性。在海藻方面基本上很少见到有所报道。

### 3 蓝藻质粒及基因工程载体系统

20 世纪 70 年代发现蓝藻质粒以来,已在 50 余株单细胞及丝状体蓝藻中证明了质粒的存在。迄今

为止构建的蓝藻质粒载体都是嵌入细菌遗传标记的重组质粒,能在细菌和蓝藻中复制,称为复制载体。研究表明:不同藻系的不同质粒或同一藻系的不同质粒具有同源序列,并推测可能含有与细菌相似的可转移元件。

藻类基因工程亦称藻类遗传工程或藻类重组 DNA 技术,是以海藻为研究对象将某种生物基因通过基因载体或其他手段运送到海藻活细胞中,并使之增殖(克隆)和行使正常的功能(表达),从而创造出藻类新品种的遗传技术。单细胞藻外源基因的整合和表达已经有很多报道<sup>[45-46]</sup>,外源基因在伞藻(*Acetabularia*)中的稳定表达已经实现,并且已经构建了杀死蚊子的 *Cyanobacteria* 转基因模式,外源基因在团藻(*Volvox Carteri*)中表达的研究结果也已经有所报道。Dunahay 等<sup>[47]</sup>克隆了 CoA 基因 *accl*,而且构建了许多 *and accl* 基因克隆,用 *accl* 自身作为启动子和终止子,然后转移到小环藻(*Cyclotella spp.*)中,并使之表达。在鱼腥藻(*Aphanobaena*)PCC 7120 等藻类中也构建了相似的基因。外源基因在海洋硅藻小环藻(*Cyclotella Cryptica*)和舟形藻(*Navicula Saprophila*)中的转化和稳定表达也有相关的报道。真核微球藻的遗传转化带动了大型海藻的遗传转化研究的进展。从 90 年代初,大型藻类基因工程研究也发展起来,将含有 CaMV35 启动子和 *Gus* 基因的质粒 PVW426 用基因枪方法转入藻类中,并且检测到了 *Gus* 基因的瞬间表达,Kubler<sup>[48]</sup>将 *Gus* 基因转入紫菜(*Porphyra miniata*),秦松<sup>[49]</sup>成功地将 *Gus* 基因导入海带(*Laminariales*)中,诸多的研究报道还表明:CaMV35S、NOS、SV40 不仅在真核微藻中,而且在大型藻类中具有通用性。Qin 等<sup>[50]</sup>建立了海带模式转化系统,即以海带雌配子体为受体,以 *cat* 作为选择标记基因,用基因枪转化,经孤雌生殖与氯霉素筛选,得到了再生的纯系转基因海带。

上述海藻转基因的研究的报道中,所有引入大型海藻的外源基因都是瞬间表达,而且,外源基因的表达缺乏重现性,其原因尚无明确答案。可见,通过基因工程方法对海藻的遗传进行改良,最后达到培育新品种的目的,需要对海藻的基因组结构、基因间的相互关系及基因表达的调控机制深入了解。然而,海藻遗传背景的分子生物学研究基础还相当薄弱,只有在累积足够的基础资料后,才能真正实现外源基因在海藻中的稳定表达和遗传,实现培育新品种的目的。

蓝藻质粒和海藻基因工程载体的构建为海藻的分子生物学方面的研究提供了更新的思路,为海藻基因的分离和克隆奠定了基础,表达系统的建立和转化体的筛选,使海藻的应用前景越来越广阔。

## 4 结语

一种良好的分子生物学技术具有以下优点:①直接的形式表现;②数量极多;③多态性高;④表现为“中性”;⑤有许多分子标记表现为显性、共显性,能够鉴别出纯合型和杂合型,提供完整的遗传信息遗传育种等实践的利用。同工酶蛋白质显然不能达到这个要求和所研究的目的,它仅限于编码蛋白质(通常是可溶性酶类)的基因,不能检测大多数分子遗传变异的类型。事实上,只能检测极少数已发生所有氨基酸变化的类型,虽然同工酶被广泛应用于遗传图谱、种群分析等研究中,然而其数量却非常有限,加之是结构基因的表达产物,只代表植物基因组的一个小部分,同时极易受到环境因素的影响,这些都限制了它在海藻种群遗传学方面的应用和发展。虽然同工酶已在红藻、褐藻、甲藻类、绿藻等藻类系统演化研究中的分析应用已经十分广泛,且通过比较同属中的不同种的同工酶,可以计算出种群间的遗传距离,但在系统演化研究中使用同工酶资料时还应考虑到,尽管某些酶的同工酶资料在某些情况下对系统演化研究有用,可在大多数情况下,单纯用同工酶资料对亲缘关系比较远的藻类种间、属间以及更高级的类群建立系统树时可能存在较大的偏差,在研究海藻种群遗传学的研究中必须和别的分子生物学技术结合使用,以期结果的精确和进一步的完善。

RFLP 是基于 Southern 杂交分析的标记技术,一般只代表单克隆或低拷贝的序列,只能分析基因组中的基因富含区<sup>[51]</sup>,且此技术需要用同位素标记作为探针,检测多态性的费用较高,操作程序复杂,难以普遍开展。RAPD 技术具有许多优点,如不需要探针、一套引物可用于多种生物基因的研究、操作简便、快速、免去克隆制备、同位素标记、杂交等等。但它也有局限性如 RAPD 为显性分子标记扩增条件极为严格易受外界因素影响、实验重复结果差等,但在海藻种群遗传学中却利用了它的优点,成为应用最

为广泛的一种分子生物技术手段。AFLP 它具有稳定性和反应快速、灵敏的特点且扩增条带多(50~100 条)。大多数扩增片段与基因组的单一位置相对反应,实验重复性高,为孟德尔式遗传。然而由于该技术的费用成本较高,此外该技术已申请专利等不利方面原因,在某种程度上限制了这种技术的应用开展。不过在海藻种群遗传学方面的应用还是有一些有关的报道。微卫星(SSR, multi-locus DNA, minisatellite DNA)等是一种短串联的重复序列,重复的长度变化极大,多态性丰富,共显性,因此作为遗传标记受到人们的普遍关注。但是,由于微卫星等操作复杂,劳动量大,首先需建立基因组文库以筛选合适的 SSR 等,这些都是该技术目前在应用上的局限,在海藻种群遗传学方面的应用有较少报道,ISSR 作为微卫星技术的一种因其有特别的优越性已经在动植物中有众多的应用,在藻类中也有所报道<sup>[52]</sup>。微卫星由于其自身的优越性,从发展前景看具有巨大的发展潜力。DNA、RNA(叶绿体 DNA)测序这种分子生物学技术虽然在实际的操作中也存在一些缺点,但是它能完整地提供生物个体种群的遗传信息,尤其是对特异的序列,在解决种群遗传学中是一种很理想的方法,并且在海藻的种群遗传学的研究中最广泛。mRNA(SSH)由于海藻自身发展缓慢,海藻 cDNA 文库的不健全及 mRNA 本身的难以操作性,这种生物技术在海藻种群遗传学中应用报道几乎很少。蓝藻质粒和海藻基因工程载体的构建和外源基因的转运与表达目前在海藻中已经有广泛的研究。

随着分子生物学技术的进一步发展和完善,相信不久的将来会使海藻的研究有所日新月异的发展,虽在研究海藻时所用分子生物学技术应该切合我们研究的实际情况,应用其中较为理想的而能说明情况的一种,我们还是迫切希望把应用于高等植物方面的分子学方法能够更好地在研究海藻分子生物学方面得以应用,而不是相隔距离遥远,真正实现海藻的利用与开发。

#### 参考文献:

- [1] Chang L O, Srb A M, Steward F C. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora* [J]. *Nature*, 1962, 193: 756 - 759.
- [2] Fredrick J F. Polyacrylamide gel studies of the isozymes involved in polyglucoside-synthesis in the algae [J]. *Phyton (Argentina)*, 1964, 21: 85 - 89.
- [3] Fredrick J F. Biochemical evolution of glucosyl transferase isozymes in the algae [R]. The Second Conference on Multiple Molecular Forms of Enzymes. New York Academy of Sciences, 1967.
- [4] Gallagher J C. Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay [J]. *J Phycol*, 1980, 16: 464 - 474.
- [5] Fujio Y, Kldaka P L G, Hara M. Genetic differentiation and amount genetic variability in natural population of the haploid laver *Porphyra yezoensis* [J]. *Jap J Genet*, 1985, 60: 347 - 354.
- [6] Pearson E A, Murray S N. Patterns of reproduction, genetic diversity, and genetic differentiation in California population of the geniculate coralline algae *Lithothrix aspergillum* (Rhodophyta) [J]. *J Phycol*, 1997, 33: 753 - 763.
- [7] Matlock D B, Romeo C. Interspecific variability within the genus *Gracilaria* (Rhodophyta) on Gallagher J C. Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay [J]. *J Phycol*, 1980, 16: 464 - 474.
- [8] Hahyome B A, Anderson D M, Kulis D M, et al. Variation among congeneric dinoflagellates from the northeastern United States and Canada. I. Enzyme electrophoresis [J]. *Mar Biol*, 1989, 101: 427 - 435.
- [9] Chinain M, Germain M, Sako Y, et al. Intraspecific variation in the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). I. Isozyme analysis [J]. *J Phycol*, 1997, 33: 36 - 43.
- [10] Zhou Z G, Wu C Y, Wang S J. Application of isoenzyme in the crossbreeding of *Laminaria* [A]. Proceedings of the Fourth International Symposium on the Efficient Application and Preservation of Marine Biological Resources [C]. Korea: Kangnung national university and Kangwon provincial government, 1998, 131 - 157.
- [11] Bostein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314 - 331.
- [12] Mariela Gonzalez, Rolando Montoya, Arturo Candia, et al. Organellar DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and nuclear random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of morphotypes of *Gracilaria* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) from Chile [J]. *Hydrobiologia*, 1996, 326/327: 229 - 234.
- [13] Shigeru Araki, Takemaro Sakurai, Tuyosi Oohusa, et al. Comparative restriction endonuclease analysis of *Rhodoplast* DNA from different species *Porphyra* (Bangiales, *Rhodophyta*) [J]. *Bull Jap Soc Sci Fish*, 1992, 58 (3): 477 - 480.
- [14] Christopher A. Scholin, Donald M. Anderson. LSU rDNA-based RFLP assays for discriminating species and strains of *Alexandrium* (Dinophyceae)

- [ J ]. *Phycol* ,1996 ,32 :1022 – 1035.
- [ 15 ] Michelle Wood A ,David Townsend. DNA polymorphism within the WH7803serogroup of marine *Synechococcus* spp.( *Cyanobacteria* ) [ J ]. *Phycol* , 1990 ,26 :576 – 585.
- [ 16 ] Leieux B , Lemieux C. Extensive sequence rearrangements in the chloroplast genomes of the green algae *Chlamydomonas eugametos* and *Chlamydomonas reinhardtii*[ J ]. *Curr Genet* ,1985 ,10 :213 – 219.
- [ 17 ] Fain S R. Phylogenetic studies of the *Laminariales* utilizing chloroplast DNA restriction fragment analysis[ J ]. *J Phycol* ,1987 ,23( Suppl. ) :13.
- [ 18 ] Fain S R , Druehl L D , Baillie D L. Repeat and single copy sequences are differentially conserved in the evolution of kelp chloroplast DNA[ J ]. *J Phycol* ,1988 ,24 :292 – 302.
- [ 19 ] Williams J G , Kubelik A R , Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [ J ]. *Nucl Acids Res* , 1990 ,18( 22 ) :6531 – 6535.
- [ 20 ] Welsh J , Mc Clelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[ J ]. *Nucl Acids Res* ,1990 ,18( 24 ) :7213 – 7218.
- [ 21 ] Mizukami Y , Kunimoto M , Kobayashi M. Effect of DNA preparation from laver( *Porphyra yezoensis* ) thalli on reproducibility of RAPD ( random amplified polymorphic DNA ) pattern[ J ]. *J Appl Phycol* , 1998 ,10 :23 – 29.
- [ 22 ] Miesch A H , Frank S , Jos U , et al. Random amplified polymorphic DNA markers ( RAPDs ) as tools for gene mapping in *Chlamydomonas eugametos*( *Chlorophyta* ) [ J ]. *J Phycol* ,1996 ,32 :1043 – 1048.
- [ 23 ] Mohsin U , Patwary John P , van der Meer. Application of RAPD markers in an examination of heterosis in *Gelidium vagum*( *Rhodophyta* ) [ J ]. *J Phycol* ,1994 ,30 :91 – 97.
- [ 24 ] Julie A D , Donald F K. Random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) identification of genetic variation in three species of *Rorphyra*( *Rhodophyta* ) [ J ]. *J Appl Phycol* ,1994 ,6 :267 – 273.
- [ 25 ] Billot C , Bour S , Benet H , et al. Development of RAPD markers for parentage analysis in *Laminaria digitata*[ J ]. *Bot Mar* ,1999 ,42 :307 – 314.
- [ 26 ] Zebeau M , Voss P. Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting[ J ]. *European Pattern Application* , 92402629 ,1993.
- [ 27 ] Donaldson J A , Chopin T , Saunders G W. Amplified fragment length polymorphism ( AFLP ) as a source of genetic markers for red algae[ J ]. *J Appl Phycol* , 1998 ,10 :365 – 370.
- [ 28 ] Jeffreys A J , Wilson V , Thein S L. Hypervariable “ minisatellite ” regions in human DNA[ J ]. *Nature* , 1985 ,314 :67 – 73.
- [ 29 ] Jeffreys A J , Wilson V , Thein S L. Individual-specific “ fingerprints ” of human DNA[ J ]. *Nature* , 1985 ,316 :76 – 79.
- [ 30 ] Burke T , Bruford M W. DNA fingerprints in birds[ J ]. *Nature( London)* ,1987 ,327 :149 – 152.
- [ 31 ] Sharma P C , Hutt B , Winter P , et al. The potential of microsatellite for hybridizations and polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting of *Qdichipea* ( *Cicer arietinum* L ) and related species[ J ]. *Electrophoresis* ,1995 ,16 :1755 – 1761.
- [ 32 ] Rogstad S H , Herwaldt B L , Schlesinger P H , et al. The M13 repeat probe detects RFLPs between two strains of the protozoan malaria parasite *Plasmodium falciparum*[ J ]. *Nucl Aucl Acids Res* ,1989 ,17 :3610.
- [ 33 ] Lieckfeldt E , Meyer W , Borner T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting[ J ]. *J Basic Microbiol* ,1993 ,33 :413 – 426.
- [ 34 ] James A C , Deborah L R , Randall S A. Genetic variability within a population and between diploid/haploid tissue of *Macrocystis Pyrifera* ( *Phaeophyceae* ) [ J ]. *J Phycol* ,1994 ,30 :545 – 552.
- [ 35 ] James A C , Diana L R , Randall S A. Genetic variability and parentage in *Macrocystispyrifera*( *Phaeophyceae* ) using multi-locus DNA fingerprinting [ J ]. *J Phycol* ,1995 ,31 :819 – 823.
- [ 36 ] Billot C , Rousvoal S , Estoup A , Epplen J T , et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown algae *Laminaria digitata*( *Phaeophyceae* ) [ J ]. *Mol Ecol* ,1998 ,7 :1771 – 1778.
- [ 37 ] Remi W , John F D , Christophe , et al. Single locus microsatellites in *Gracilariales*( *Rhodophyta* ) :High level of genetic variability within *Gracilaria Graciles* and conservation in related species[ J ]. *J Phycol* ,1997 ,33 :868 – 880.
- [ 38 ] Yuzuru Mizukami , Hitoshi Kito , Masahiko Kunimoto , et al. Cloning and characterization of G + C-rich ,highly repeated DNA sequences from *Porphyra yezoensis* ( laver ) *Rhodophyta* [ J ]. *J Appl Phycol* 2000 ,12 :131 – 138.
- [ 39 ] Bhattacharya D , Druehl L D. Morphological and DNA sequence variation in the kelp *Costaria costata* ( *Phaeophyta* ) [ J ]. *Mar Biol* ,1989 ,102 :15 – 23.
- [ 40 ] Kazuhiro kogame ,Takeo Horiguchi ,Michio Masuda. Phylogeny of the order *Scytosiphonales* ( *Phaeophyceae* ) based on DNA sequences of *rbcl* , partial *rbcs* , and partial *LSU nrDNA*[ J ]. *Phycologia* ,1999 ,38( 6 ) :496 – 502.
- [ 41 ] Tara L R , Robert G S , Morgan L , et al. Systematics and biogeography of the *Compsoogonales* ( *Rhodophyta* ) with emphasis on the freshwater families in North America[ J ]. *Phycologia* ,1999 ,38( 6 ) :517 – 527.
- [ 42 ] Gary W S , Louis D D. Nucleotide sequences of the small-subunit ribosomal RNA genes from selected *Laminariales*( *Phaeophyta* ) :implication in evolution[ J ]. *J Phycol* ,1992 ,25 :544 – 549.

- [ 43 ] Wiebe H C , Kooistra F , Wytze T S , et al . Biogeography of *Cladophoropsismenbranacea* ( Chlorophyta ) based on comparisons of nuclear rDNA its sequences [ J ] . J Phycol , 1992 , 28 : 660 - 668 .
- [ 44 ] Christopher A S , Michel H , Mitchell S , et al . Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* ( Dinophyceae ) . II . Sequence analysis of a fragment of the LUS rRNA gene [ J ] . Phycol , 1994 , 30 : 999 - 1011 .
- [ 45 ] Neuhaus G , Neuhaus-Url G , de Groot , et al . High yield and stable transformation of the unicellular green alga *Acetabularia* by microinjection of SV40 and PSV2neo [ J ] . EMBO J . 1986 , 5 : 1437 - 1444 .
- [ 46 ] Drapier D , Girard-Bascou J , Wollman F A . Evidence for nuclear control of the expression of the *aptA* and *aptB* chloroplast genes in *Chlamydomonas* [ J ] . Plant Cell , 1992 , 4 : 283 - 295 .
- [ 47 ] Treei G D , Eric E J , Paul G R . Genetic transformation of the Diatoms *Cyclotella Cryptica* and *Navicula Saprophila* [ J ] . J Phycol , 1995 , 31 : 1004 - 1012 .
- [ 48 ] Kubler J E , Minocha S C , Matyieson A C . Transient expression of the *GUS* reporter gene in protoplasts of *Porphyra miniata* ( Rhodophyta ) [ J ] . J Mar Biotech , 1994 , 1 : 165 - 169 .
- [ 49 ] 秦松 , 张健 , 李文斌 , 等 . 用基因枪将 *GUS* 基因导入褐藻细胞中的表达 [ J ] . 海洋与湖沼 , 1994 , 25 ( 4 ) : 353 - 356 .
- [ 50 ] Qin S . The expression of foreign genes in *Laminaria japonica* ( Phaeophyta ) [ A ] . The Marine Biology of the South China Sea [ M ] . HongKong : Hong Kong University Press , 1998 . 209 - 217 .
- [ 51 ] Gill K S , Gill B S , Endo T R , et al . Identification and high-density mapping of genetic-rich regions in chromosome group 5 of wheat [ J ] . Genetics , 1996 , 143 : 1001 - 1002 .
- [ 52 ] Morgan L . Inter-simple sequence repeats ( ISSR ) molecular markers to distinguish gametophytes of *Batrachospermum boryanum* ( Batrachospermales , Rhodophyta ) [ J ] . Phycologia , 1999 , 38 ( 1 ) : 70 - 73 .

## 来稿须知

一、《上海水产大学学报》为上海水产大学主办、以水产科学技术为主的综合性学术刊物。

本刊主要刊载渔业资源、水产养殖与增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究等方面的论文、研究简报、少量刊载综述等文章。

本刊被《中国科学引文索引》、《水产文摘》、《中国水产文摘》、《水科学和渔业文摘》(ASFA)、美国《化学文摘》(CA)等多种权威检索刊物收录。最近本刊又被俄罗斯《文摘杂志》收录,成为其新收录的102种期刊中的一种。根据中国科技信息研究所信息分析研究中心最新提供的2001年版《中国科技期刊引证报告》,本刊2000年影响因子和总被引频次分别为0.183和54,在全国水产类学术期刊中排名第3和第6位。

### 二、注意事项

1. 来稿文责自负。要求论点明确,数据可靠,简明扼要,文字精练(包括文章题名、图表和文献的运用),用第三人称撰写。着重撰述作者的新方法、新观点和新成果等。材料方法、基本原理及公式推导等从简。

2. 论文不超过6000字,综述7000字,研究简报4000字,其他文稿1500字。各数字内均含图、表等。

3. 来稿一式二份,请用打印稿,正文以四号字,宽行打印,改返时随附软盘。本刊对来稿有删改权,必要时退作者修改、精减交清稿。不录用稿不予退稿,请作者见谅。文章刊登后,将酌致稿酬,并赠送若干册当期的本刊。

4. 本刊也接受校外作者撰写的稿件,来稿请寄上海市军工路334号38信箱《上海水产大学学报》编辑部。

邮编 200090,电话 021-65710892,电子信箱 xuebao@shfu.edu.cn,传真 021-65680965。