

对小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*) 分类地位的重新认识

石娟^①, 潘克厚^{①*}, 王晓青^②, 陈放^②, 周蜜^②, 朱葆华^①, 卿人韦^{②*}

① 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003;

② 四川大学生命科学学院, 成都 610064

* 联系人, E-mail: qingrw@email.scu.edu.cn, khpan@ouc.edu.cn

2007-06-28 收稿, 2007-12-03 接受

国家重点基础研究发展计划(编号: 2005CCA02400)资助项目

摘要 小新月菱形藻是一种海洋真核单细胞硅藻, 是水产养殖中应用广泛的饵料之一。先前认为, 该藻属于硅藻门, 硅藻纲, 硅藻目, 硅藻科, 菱形藻属。本文对小新月菱形藻进行了微分干涉相差(differential interference contrast microscopy, DIC)显微镜形态观察; 分别用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)和气相色谱(gas chromatography, GC)分析了该藻及三角褐指藻(舟形藻目)的色素、脂肪酸组成; 应用简并性引物策略、PCR 或结合 RACE 技术分别得到了小新月菱形藻的 18S rDNA 部分序列、全长 5.8S rDNA、*ITS1* 和 *ITS2* 序列、部分 28S rDNA 序列、actin 基因、一个类似 $\Delta 5$ 脱饱和酶全长 cDNA, 并在转基因酵母中鉴定其具有 $\Delta 5$ 脱饱和酶功能。从生化及分子水平系统比较了小新月菱形藻、三角褐指藻和新月细柱藻(硅藻目)的亲缘关系, 揭示小新月菱形藻 18S rDNA 与三角褐指藻株系相似性为 99.9% 以上; 小新月菱形藻 5.8S rDNA 序列与三角褐指藻的相似性为 100%, 而与新月细柱藻的相似性为 96.2%; 小新月菱形藻 *ITS1* 和 *ITS2* 序列与三角褐指藻的相似性均为 98.6%, 而与新月细柱藻的相似性分别为 38.2% 和 37.04%; 小新月菱形藻 actin 蛋白质序列与三角褐指藻的相似性为 100%; 小新月菱形藻的 $\Delta 5$ 脱饱和酶氨基酸残基序列与三角褐指藻相关酶序列的相似性为 99.4%。因此, 本研究认为, 小新月菱形藻在系统分类上应不属于硅藻目, 硅藻科, 菱形藻属, 而应该属于舟形藻目, 褐指藻科, 褐指藻属, 并极有可能是三角褐指藻的一株。

关键词

小新月菱形藻
三角褐指藻
新月细柱藻
分类

小新月菱形藻(*Nitzschia closterium* f. *minutissima*)是一种真核海洋单细胞硅藻, 因富含蛋白质、碳水化合物及多不饱和脂肪酸而被作为优良饵料广泛应用于水产养殖, 是多种软体动物、甲壳类幼体和浮游动物(如轮虫)的主要食源^[1-4]。

小新月菱形藻的形态特征为: 细胞纺锤形, 中央膨大, 两端渐尖, 朝同一个方向弯曲似月牙形; 细胞长 12~23 μm , 宽 2~3 μm ; 细胞核位于细胞中央; 色素体黄褐色, 2 片, 位于细胞核两侧^[3-6]。其分类鉴定最早由 Allen 和 Nelson 于 1910 年完成, 主要根据该藻的形态特征将其归入硅藻门, 硅藻纲, 硅藻目, 硅藻

科, 菱形藻属^[4-7]。然而近年来对小新月菱形藻的分类地位和学名确定也引起了一些藻类学工作者注意, 我们在克隆该藻的脱饱和酶基因时得到一个与三角褐指藻的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因几乎完全一致的序列, 这使我们意识到小新月菱形藻目前的分类地位的确值得进一步探讨。国外也有实验室认为小新月菱形藻其实是硅藻门, 硅藻纲, 舟形藻目, 褐指藻科, 褐指藻属的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)的一株, 如美国的 CCMP (National Culture Collection of Marine Phytoplankton), 但研究资料未见发表。由于仅依据传统的形态学特征分类并不可靠, 容易出现

错误^[8]. 本文在生化水平上分析了小新月菱形藻和三角褐指藻的色素及脂肪酸组成, 在分子水平上对小新月菱形藻、三角褐指藻及属于硅藻门, 硅藻纲, 硅藻目, 硅藻科, 细柱藻属的新月细柱藻(*Cylindrotheca closterium*)^[9]作了比较系统的亲缘关系研究.

1 材料和方法

(i) 材料培养. 小新月菱形藻和三角褐指藻都取自中国海洋大学微藻种质库(Microalgae Culture Collection, MACC), 编号分别为 B228 和 B253. 实验藻种进行抗生素平板筛选(f/2 固体培养基 + 50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素 + 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨基青霉素), 所得单克隆培养至指数末期, 培养条件为 f/2 培养基, $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照 $60 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光暗比 12 h:12 h, 离心收集藻细胞用于实验或经液氮速冻后于 -80°C 保存备用.

(ii) 藻细胞形态观察. 使用微分干涉相差显微镜(differential interference contrast microscopy, DIC)观察藻细胞, Axiocam MRc 相机(Zeiss)拍摄照片, 图片用 Axiovision4.1 处理(Carl Zeiss S.A.S, LePecq, France).

(iii) 色素分析. 小新月菱形藻和三角褐指藻的色素分析方法参见文献^[10].

(iv) 脂肪酸分析. 小新月菱形藻的脂肪酸分析参见文献^[11].

(v) DNA 和 RNA 提取及 RNA 反转录. 采用 CTAB 法^[12]提取基因组 DNA. 用植物 RNA 提取试剂盒(Watson, 上海)提取总 RNA, 用 Rneasy Mini Kit (Qiagen)和 RNase-free DNase set (Qiagen)纯化 RNA, -80°C 储存. 用 first-strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa, 大连)合成 cDNA 第一链.

(vi) 小新月菱形藻相关功能基因及 rDNA 克隆.

(1) 小新月菱形藻 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因克隆. 根据已知的三角褐指藻 $\Delta 5$ -脱饱和酶(GenBank 登录号: AX951581)和海链藻(*Thalassiosira pseudonana*) $\Delta 5$ -脱饱和酶(CS160915)设计简并引物 Ncfmd-1 (5'-CA(C/T)CA(C/T)GC(T/G)TA(C/T)ACCAATCAC-3')和 Ncfmd-2 (5'-TG(G/A)TG(T/C)TC(A/C)AC(C/T)TGAAAGTTG-AG-3'), 以 cDNA 为模板做 PCR, 所得片段亚克隆到载体 pMD18T (TaKaRa, 大连)中测序. 根据测序结果, 用 GeneRacer TM kit (Invitrogen)分别做 5'和 3' RACE 得到全长 cDNA, 称为 NcfmDesA.

(2) 小新月菱形藻 18S rDNA, ITS1 (internal transcribed spacer 1), 5.8S rDNA, ITS2 (internal tran-

scribed spacer 2)和 28S rDNA 的克隆. 首先, 根据已知硅藻的 18S rDNA 序列设计引物 Ncfm18S1 (5'-GCTCGTCTCAAAGATTAAGCC-3')和 Ncfm18S2 (5'-GTTACGACTTCACCTTCCTCT-3'), 以基因组 DNA 为模板 PCR 扩增, 所得片段亚克隆测序, 即得到 18S rDNA 序列; 根据测序结果设计上游引物 Ncfm18S3 (5'-GTTGGTTGCGAGAACTTGTC-3'), 根据已知硅藻的 28S rDNA 序列设计下游引物 Ncfm28S4 (5'-GACTGTGCAGCCATTGCTG-3'), 以基因组 DNA 为模板做 PCR, 所得片段亚克隆测序, 即得到全长的 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, 部分 18S rDNA 序列和部分 28S rDNA 序列.

(3) 小新月菱形藻 actin 基因克隆. 根据 *Nitzschia thermalis* 和三角褐指藻的 actin 基因序列(GenBank 登录号分别为 AY713395, AY713398)设计简并引物 Nactjb1 (5'-C(T/C)TGAC(C/G)GAGCGTGG-TTACTC-3')和 Nactjb2 (5'-GC(C/G)A(A/G)AAT(A/T)G-A(T/C)CCTCCAATCCA-3'), 以 cDNA 为模板做 PCR, 所得片段亚克隆测序, 根据测序结果做 5'和 3' RACE 得到全长 cDNA.

(vii) NcfmDesA 的功能鉴定. 用于在酵母 *S. cerevisiae* Invsc1 株 (Invitrogen)异源表达 NcfmDesA 的全长引物分别为 NcfmdNK (5'-GCGGTACCA-TGGCTCCGGATGCGGATAAGCT-3', 下画线表示 *Kpn* I 酶切位点, 黑体字碱基表示翻译的起始密码子)和 NcfmdCE (5'-GCGAATTC^{*TTACGCCCCGTCCGG-TCAAGGGATT*}-3', 下画线表示 *EcoR* I 酶切位点, 斜体表示翻译框的终止密码子), 用高保真酶(Vent, New England Biolabs, USA)进行 RT-PCR, 所得片段克隆于 pYES2 (Invitrogen)的相应多克隆位点, 得到的新质粒称为 pYNcfmd, 处于启动子 Gal1 的控制之下. 分别把新构建的 pYNcfmd 质粒和空载 pYES2 质粒用醋酸锂方法转化酵母, 所得转基因酵母用不含尿嘧啶的基本培养基培养^[13]. 诱导表达用含 2% (质量体积比)半乳糖的诱导培养基, 同时在培养基中添加多不饱和脂肪酸 $20:3^{\Delta 8,11,14}$ 和 $20:4^{\Delta 8,11,14,17}$ 至 $50 \mu\text{mol/L}$, 在 20°C 下培养转基因酵母 3 d, 收集酵母, 按 Tonon 等人^[11]方法用气相色谱(gas chromatography, GC)测定所得酵母的总脂肪酸, 所得结果与 37 FAMES mixture (Supelco)标准品比较, 鉴定转基因酵母所含脂肪酸种类, 进而确定脱饱和酶的类型.

(viii) 其他相关基因和 DNA 序列的获得. 三角

褐指藻的相关基因和 DNA 序列直接来源于 NCBI 或三角褐指藻 CCAP 1055 全基因组数据库(<http://genome.jgi-psf.org/>)。新月细柱藻的相关序列直接来源于 NCBI 数据库。

(ix) 序列分析。用软件 Clustal X 1.83 进行序列的比对分析^[14]。

2 结果

2.1 藻体形态观察

小新月菱形藻和三角褐指藻形态见图 1, 实验所用小新月菱形藻细胞形态与文献[4~6]报道的一致。

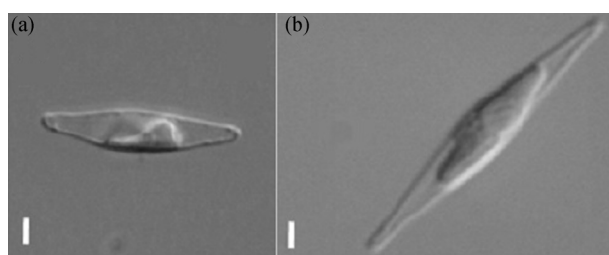


图 1 小新月菱形藻(a)和三角褐指藻(b)的形态特征
标尺示 3 μm

2.2 色素分析结果

小新月菱形藻和三角褐指藻的色素组成见图 2, 由图可知, 二者色素组成没有差异。

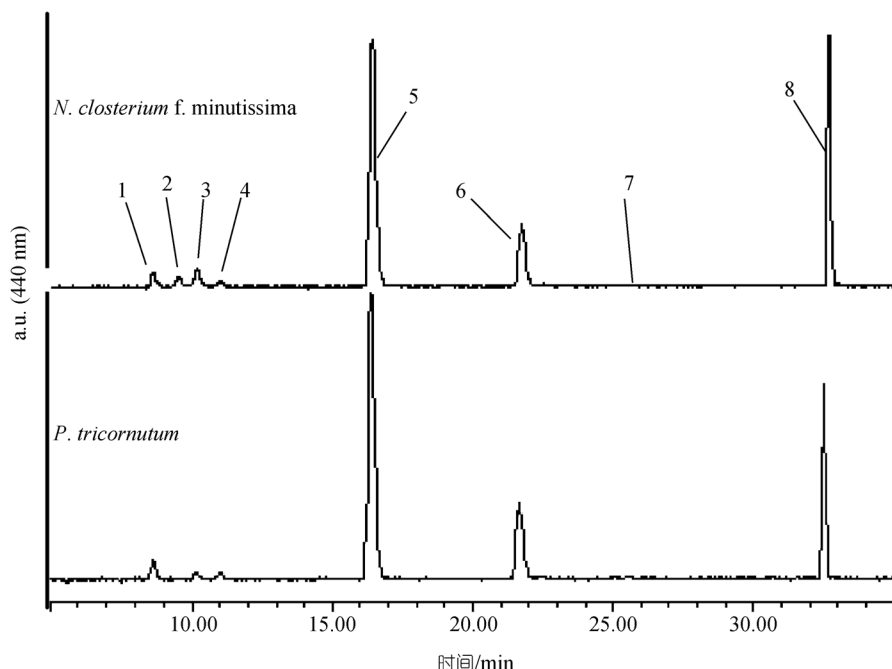


图 2 小新月菱形藻和三角褐指藻的色素组成

1, 植基叶绿素 a ; 2, 叶绿素 c_2 ; 3, 叶绿素 c_1 ; 4, 甲基脱植基叶绿素 a ; 5, 岩藻黄素; 6, 硅甲藻黄素; 7, 硅藻黄素; 8, 叶绿素 a

2.3 脂肪酸分析结果

小新月菱形藻和三角褐指藻的脂肪酸组成见图 3, 由图可知, 二者脂肪酸组成没有明显差异, 都属于含长链多不饱和脂肪酸 EPA(二十碳五烯酸, eicosapentaenoic acid, $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$)的海洋微藻, 且小新月菱形藻 EPA 的相对含量略高于三角褐指藻。

2.4 小新月菱形藻脱饱和酶基因鉴定及与三角褐指藻 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因比较

本研究克隆得到的小新月菱形藻 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因全长 1410 bp, 编码 469 个氨基酸残基, 申请 GenBank 号为 EF553462。所构建的转基因酵母用外源二高 γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid, $20:3^{\Delta 8,11,14}$)和二十碳四烯酸(eicosatetraenoic acid, $20:4^{\Delta 8,11,14,17}$)饲喂后, 在转基因酵母的脂肪酸中检测到了相应新峰的存在, 通过与标准品比较, 新峰分别为多不饱和脂肪酸 $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ 和 $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$, 其结果见图 4, 说明转基因酵母具有把 $20:3^{\Delta 8,11,14}$ 和 $20:4^{\Delta 8,11,14,17}$ 分别转变为 $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ 和 $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ (EPA)的能力, 因此, 本研究所克隆的脱饱和酶 cDNA, NcfmDesA 鉴定为 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因。与三角褐指藻 CCAP1055 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因序列(AX951581)的相似性为 99.0%, 蛋白序列的相似性为 99.4%。

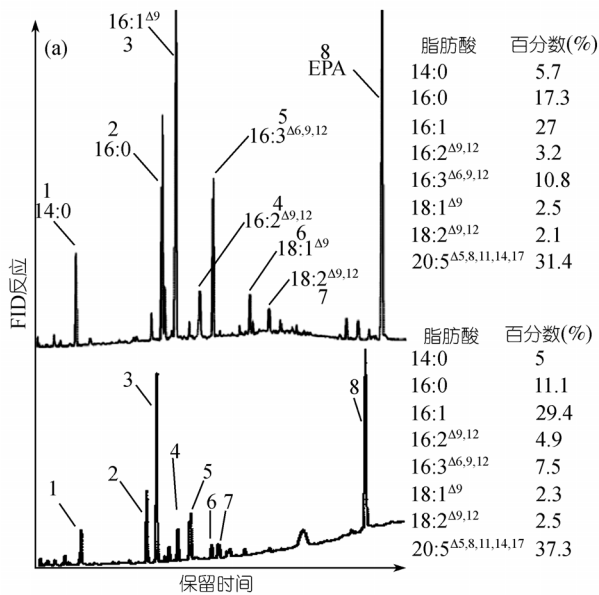


图 3 三角褐指藻(a)和小新月菱形藻(b)的脂肪酸组成
(a)的有关数据来源于文献[15]

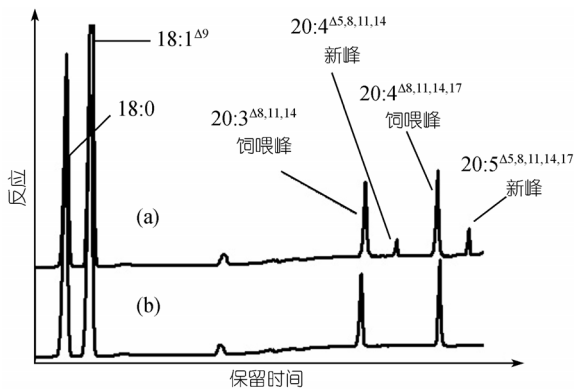


图 4 转基因酵母的脂肪酸 GC 分析
(a) 带有质粒 pYNcfmd 的转基因酵母; (b) 带有质粒 pYes2 的转基因酵母

2.5 小新月菱形藻与三角褐指藻 18S rDNA 的比较

本研究克隆得到的小新月菱形藻 18S rDNA 长 1776 bp (EF553459), 接近全长, 仅缺失 5'端, 与三角褐指藻 CCAP 1055 (EF553458)和 CS-29 (EF140622) 的相似性为 100%, 与三角褐指藻 CCAP 1052 (DQ402479)的相似性为 99.9%.

2.6 小新月菱形藻与三角褐指藻、新月细柱藻 5.8S rDNA 的比较

本研究克隆得到了小新月菱形藻 5.8S rDNA 的全长序列, 共 168 bp (EF553459), 与三角褐指藻

CCAP 1055 (EF553458)的相似性为 100%, 与新月细柱藻(AF289049)的相似性为 96.2%(图 5).

2.7 小新月菱形藻与三角褐指藻、新月细柱藻 ITS1 比较

本文研究得到了小新月菱形藻 ITS1 的全长序列, 共 288 bp (EF553459), 与三角褐指藻 CCAP 1055 (EF553458)的相似性为 98.6%, 而与同为菱形藻科的新月细柱藻(AF289049)的相似性仅为 38.2%(图 6).

2.8 小新月菱形藻与三角褐指藻、新月细柱藻 ITS2 比较

本研究克隆得到了小新月菱形藻 ITS2 的全长序列, 共 439 bp (EF553459), 与三角褐指藻 CCAP 1055 (EF553458)、CCAP1052 (DQ085802)、CCMP630 (DQ-085805)和新月细柱藻(AF289049)的 ITS2 序列比对结果见表 1. 小新月菱形藻与三角褐指藻 CCAP 1055 的相似性为 98.6%, 与 CCMP630 的相似性为 100%, 而与同为菱形藻科的新月细柱藻的相似性仅为 37.04%.

2.9 小新月菱形藻与三角褐指藻 actin 基因比较

本研究克隆到了小新月菱形藻 actin 基因 cDNA 全长, 共 1134 bp (EF553460), 编码 377 个氨基酸残基, 与三角褐指藻 CCAP 1055 的 actin 基因(EF553461)序列相似性为 99.6%, 蛋白质序列相似性为 100%.

3 讨论

海洋微藻种类繁多, 最初的分类鉴定主要依据形态特征, 但仅从形态对其进行分类并不可靠[8,16], 需进一步从生理生化甚至分子水平进行系统研究[8]. 目前, 海藻的色素组成、脂肪酸组成都是研究分类的重要依据[17,18]. 我们测定并比较了小新月菱形藻和三角褐指藻的色素组成及脂肪酸组成, 结果表明, 二者的色素及脂肪酸组成一致, 仅个别成分的相对含量有所不同, 说明二者亲缘关系很近.

为了进一步验证这一推论, 我们又在分子水平上进行了探索. 已知核糖体RNA基因和actin基因在进化上是高度保守的, 它们作为分类的重要依据已得到广泛应用[19,20]. 而ITS1 和ITS2 及功能基因, 如 Δ^5 -脱饱和酶基因, 在同种生物中具有较高的保守性, 而在不同物种间具有较大的差异性[21,22]. 因此如果将这两类基因结合起来进行比较分析, 能够更加充分地反应物种间的进化关系. 本实验克隆了小新月菱形藻的 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 和actin基

```
Ncfm228      AATACATTACAACTTTCAGCAATGGATGTCTAGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCG
Pt1055       AATACATTACAACTTTCAGCAATGGATGTCTAGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCG
Cclosterium  -----GTACAACTTTCAGCGGTGGATGTCTAGGTTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCG

                *****

Ncfm228      AAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAGACCTCGTGAATCATTAAAGATTTTGAACGCACA
Pt1055       AAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAGACCTCGTGAATCATTAAAGATTTTGAACGCACA
Cclosterium  AAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAGACCTCGTGAATCATTAAAGATTTTGAACGCACA

                *****

Ncfm228      TTGCGCTTCCGGGATTTTCCCGGGAGCATGCTTGTCTGAGTGTCAAGC-
Pt1055       TTGCGCTTCCGGGATTTTCCCGGGAGCATGCTTGTCTGAGTGTCAAGC-
Cclosterium  TTGCGCTTCCGGGATTTTCCCGGGAGCATGCTTGTCTGAGTGTCTGTG

                *****
```

图 5 小星月菱形藻与相近藻株的 5.8S rDNA 比较

Ncfm, 小新月菱形藻; Pt, 三角褐指藻; Cclosterium, 新月细柱藻

```
Ncfm228      TTACCACACATCGATCCACGATCTTTCTTAACCGTGAAATCCAAACCCAAACCAACCAC
Pt1055       TTACCACACATCGATCCACGATCTTTCTTAACCGTGAAATCCAAACCCAAACCAACCAC
Cclosterium  -----TAACAAGGTTCCGTAGTGAACCT---GCGGAAGGATCATTACCACACCGATCCAA

                *** * *** * ** * * * * *

Ncfm228      GACGGAGAGGGG--ACGGATTTACAGGTACTTTGTGCGTAAGTGCAGTGTGACTGTGAGT
Pt1055       GACGGAGAGAGGAGATGGAATTACAGGTACTTTGTGCGTAAGTGCAGTGTGACTGTGAGT
Cclosterium  GATCTTCTTTATT-GTGAAATGTTGGTTGTTTCTCTCGGGAGACAACCGTGCTATTCTAG

                ** * * * * * * * * *

Ncfm228      CCTTTGATCTCGGCGTCTTTTACCACGACGCATTTTCCAATGCGACGCGAGAACCAGGAC
Pt1055       CCTTTGATCTCGGCGTCTTTTACCACGACGCATTTTCCAATGCGGCGGAGAACCCGAGC
Cclosterium  CAACCACTCAGAGTACTCTTGTAGTATTCTGTTTACCAAATT-----GACCAGTC

                * ** * * * * * * * * *

Ncfm228      TTGATCCAGTGAAGCATGAAACCCGAGGAAGACGGATCCAC-TAGTGTATGTAGACAAGC
Pt1055       TTGATCCAGTGAAGCATGAAACCCGAGGAAGACGGATCCAC-TAGTGTATGTAGACAAGC
Cclosterium  TTGAT--AATACTGATCTAAAGCAAAGAGTGCTGCCTGAACCTAGTGTGTTGGGCCCTCGA

                *****

Ncfm228      AAATGCGCGTCTACGACGCAATAGTGGTCCGATTCCAAATATTATTACC
Pt1055       AAATGCGCGTCTACGACGCAATAGTGGTCCGATTCCAAATATTATTACC
Cclosterium  AAATATA-ATCTA-----
```

图 6 小星月菱形藻与相近藻株的 ITS1 序列比较

表 1 小新月菱形藻与相近藻株的 ITS2 序列相似性

	NcfmB228	PtCCAP1055	PtCCAP1052	PtCCMP630	Cclosterium
NcfmB228	100%	99.32%	99.32%	100.00%	37.04%
Cclosterium	37.04%	39.44%	39.44%	37.04%	100%

因, 克隆并鉴定了一个 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因, 然后将这些序列分别与三角褐指藻(舟形藻目)和新月细柱藻(硅藻目)的相关序列进行比较, 结果显示, 小新月菱形藻与三角褐指藻的 18S rDNA, 5.8S rDNA 和 actin 基因的相似性均在 99.6%以上, 甚至达到 100%, 而与新月细柱藻 5.8S rDNA 的相似性为 96.2%; 小新月菱形藻与三角褐指藻的 *ITS1*, *ITS2* 的相似性均在 98%以上, 而与新月细柱藻的相似性均不到 40%; 此外,

小新月菱形藻与三角褐指藻的 $\Delta 5$ -脱饱和酶基因序列相似性达到 99.0%, 蛋白序列相似性为 99.4%. 可见, 在分子水平上小新月菱形藻与新月细柱藻存在较大差异, 而与三角褐指藻有很高的同源性.

综上所述, 我们认为小新月菱形藻在自然分类系统中并不属于硅藻目, 硅藻科, 菱形藻属, 而应属于舟形藻目, 褐指藻科, 褐指藻属, 并且极有可能是三角褐指藻的一个藻株.

致谢 感谢中国海洋大学于志刚教授实验室在对海藻色素测定和分析上提供的帮助; 感谢法国 Laboratory of Diatom Signaling and Morphogenesis 的 Chris Bowler 博士拍摄了小新月菱形藻和三角褐指藻的微干涉相差显微镜照片.

参考文献

- Leonardos N, Lucas I. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larva. Aquaculture, 2000, 182: 301—315[DOI]
- Robert R, Parisi G, Liliana R, et al. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. Aquaculture, 2001, 192: 333—346[DOI]
- 陈明耀. 生物饵料培养. 北京: 中国农业出版社, 1995
- Peach E A, Drummond J C. On the culture of the marine diatom *Nitzschia closterium* f. minutissima in artificial sea-water. Biochem J, 1924, 18: 464—468
- Allen E J, Nelson E W. On the artificial culture of marine plankton organisms. J Micr Sci, 1910, 60: 361—371
- Harvey H W. Substances controlling the growth of a diatom. J Mar Biol Ass, 1939, 23(2): 499—520
- Lee R E. Phycology. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 414—453
- Sina M A D L, Alastair G B S, Mark A F, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. J Eukaryot Microbiol, 2005, 52: 399—451[DOI]
- Apoya-Horton M D, Yin L, Underwood G J C, et al. Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). J Phycol, 2006, 42: 379—390[DOI]
- Zapata M, Rodríguez F, Garrido J L. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. Mar Ecol Prog Ser, 2000, 195: 29—45[DOI]
- Tonon T, Sayanova O, Qing R W, et al. Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. FEBS J, 2005, 272: 3401—3412[DOI]
- Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11—15
- Giniger E, Barnum S M, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of Yeast. Cell, 1985, 40: 767—774[DOI]
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876—4882[DOI]
- Domergue F, Spiekermann P, Lerchl J, et al. New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Plant Physiol, 2003, 131: 1648—1660[DOI]
- Hausmann K, Hulsmann N, Radek R. Protistology, 3rd ed. Stuttgart: Schweizerbart'sche, 2003. 379—396
- van Lenning K, Latasa M, Estrada M, et al. Pigment signatures and phylogenetic relationships of the Pavlovophyceae (Haptophyta). J Phycol, 2003, 39: 379—389
- Volkman J K, Barrett S M, Blackburn S I, et al. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. Org Geochem, 1998, 29(5-7): 1163—1179[DOI]
- Wang Z, Johnston P R, Takamatsu S, et al. Toward a phylogenetic classification of the leotiomycetes based on rDNA data. Mycologia, 2006, 98: 1065—1075
- Flakowski J, Bolivar I, Fahrni J, et al. Actin phylogeny of Foraminifera. J Foraminifer Res, 2005, 35: 93—102[DOI]
- Xu P, Han Y, Wu J, et al. Phylogenetic analysis of the sequences of rDNA internal transcribed spacer (ITS) of *Phytophthora sojae*. J Genet Genomics, 2007, 34: 180—188[DOI]
- Alonso D L, Garcia-Maroto F, Rodriguez-Ruiz J, et al. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. Biochem System Ecol, 2003, 31: 1111—1124[DOI]