综 述

水华藻类的分子鉴定研究进展

王高鸿[1] 黄家权[1,2] 李敦海[1] 刘永定[1*] 尹黎燕[1]
(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学, 武汉 430070)

THE ADVANCES IN MOLECULAR IDENTIFICATION FOR THE WATER-BLOOM ALGAE

WANG Gao-Hong[1] HUANG Jia-Quan[1,2] LI Dun-Hai[1] LIU Yong-Ding[1] and YIN Li-Yan[1]
(1. *Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072,
2. *Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070)

关键词: 分子鉴定; 藻类; 水华; rDNA
Key words: Molecular identification; Algae; Water bloom; rDNA
中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)02-0207-06

1 研究背景

1.1 水华藻类及其危害

水华藻类包含有原核藻类和真核藻类, 广泛存在于淡水水体和海水中, 其中包括形成赤潮的生物和使湖泊和沼泽发生水华的蓝藻。这些生物产生的毒素往往是次生代谢产物, 种类繁多, 包括肝毒素(Hepatotoxins), 神经毒素(Neurotoxins)和皮炎毒素(Dermatoxins), 其中淡水水华产生的最主要的两种毒素为微囊藻毒素(Microcystin)和节球藻毒素(Nodularins), 其毒性作用的位点是抑制蛋白磷酸酶活性[1], 从而影响细胞功能[2,3], 因此对公共卫生、人体安全和动物安全造成了极大的威胁[4,5]。据调查, 生长在蓝藻水华多发区的人群, 其肝癌的发病率远远高于其他区域, 在巴西由于蓝藻毒素甚至发生过严重的死亡事件[5]。因此, 有关水华藻类的研究引起了全球的广泛关注和重视, 包括我国在内的各国政府现在启动了一些重要的研究计划, 用于研究与蓝藻有关的水体安全, 蓝藻产毒机制, 蓝藻控制技术和污染水体修复等项目, 有力地促进了水华藻类的研究工作。

1.2 水华藻类鉴定常规方法的局限性

作为水华藻类研究的第一步, 水体中蓝藻的鉴定和分离一直是研究的一个重点。传统的藻类学鉴定方法是通过形态学的观察来划分的, 这需要大量细致的工作, 时间要求长。一般的形态学从色素, 色素体, 贮藏物质等的差别来辨别不同种的藻类细胞, 这是一件费时费力的事, 而且不同的种属差别很细微, 非长期从事该工作的专业人员难胜任这项工作, 并且藻的形态学观察的结果显示, 环境对藻类的形态有很大的影响, 鉴定出具体的种存在的困难较多, 如在节旋藻和螺旋藻的分类中, 藻丝体形态多种多样, 随着培养条件的变化而变化, 另外, 要实现传统方法的鉴定, 往往需要分离培养纯的藻株, 根据生活史对其进行鉴定。而有些天然水体中的藻种的纯系培养不能保证完全可以存活, 因此有时也限制了鉴定的进行。为此需要从分子上找出直接的证据以鉴别不同的藻类, 从而保证结果的可靠性[6,7]。

1.3 藻类分子鉴定的基本原理

分子生物学方法由于其操作容易和结果直接可靠被广泛应用在环境微生物群体的测定和鉴别上,

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2003-12-15
基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-12); 973 项目(2002CB412300); 国家重大环境课题"滇池蓝藻水华污染控制技术研究"(K99-05-35-01); 中国科学院方向性创新课题(No. 220316)资助
作者简介: 王高鸿(1972—)男, 陕西省眉县人, 主要从事藻类环境生理学研究
* 通讯作者: 刘永定, liuyd@ihb.ac.cn

其工作原理如图1所示。实际上,这种方法不单单适用于水生环境,在许多的研究领域,如土壤、冰、蓝藻结皮,生物膜甚至于血液中都可以应用。分子生物学方法应用于生物类别和活性研究之所以应用广泛而且对于微生物研究具有革命性是因为它可以在无需培养未知微生物的条件下提供很好的信息,而培养未知微生物在常规研究中存在许多问题,而且常常有完全不能成功的危险。许多分子方法都涉及PCR技术。PCR利用引物(核苷酸顺序需要特殊设计)作为DNA复制的起点,如果操作得当,结果就是感兴趣核苷酸片断的扩增产物,通过简单的凝胶电泳就可分离产物。

选择不同的基因用于扩增取决于需要解决的问题。在原核生物研究中,应用于鉴定工作最广泛的是16SrRNA基因。把复杂环境中的DNA分离出来,利用不同的通用引物(如大概定位于基因的保守区)去扩增混合的16SrRNA已经成为常规的做法[6]。在这个基础平台上,许多有关的工作都可以开展,如利用足迹法来估计生物的种类,分析扩增基因的序列,定量样品中基因的数目等等。随着测序费用的下降和网上提供的免费生物信息学资源和建树资源的增多,测序工作变得越来越容易,从而使得分子鉴定被广泛应用在各个领域,如藻种的鉴定、产毒藻株的鉴别、水体生物演替等研究方面。现就相关工作介绍如下。

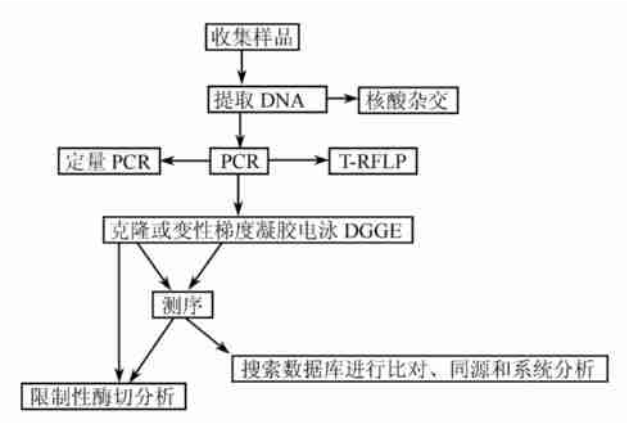


图1 通用分子鉴定方法流程图

Fig 1 Common program for the molecular identification

2 利用 rRNA 基因序列鉴定藻类

rRNA存在于所有的细菌中,功能稳定,因此常用于系统发生树的构建,绝大部分细菌rRNA基因以16S rRNA-23S rRNA-5S rRNA的顺序操纵子的形式存在于细菌基因组中,每一种rRNA基因被ITS(Internally Transcribed spacers)隔开,16S rRNA和23S rRNA之间的ITS序列长度和组成变化多样,既可以只含有$tRNA^{Glu}$或$tRNA^{Ala}$的编码序列,也可以同时包含$tRNA^{Glu}$和$tRNA^{Ala}$基因编码序列[8]。

5S rRNA一级和二级结构简单,因此在许多细菌上率先得以测序,并建立了5S rRNA序列的数据库,但在蓝藻中很少有通过5S rRNA基因的测序建立系统进化关系或鉴定藻的种类。随着大量的DNA测序工作的进行,许多16S rRNA基因的序列得以测出,这就能通过选择合适的引物,直接从细菌基因组中扩增出相应的rRNA基因序列进行系统发生关系及分子鉴定的研究。16S rRNA在原核生物中相对的高保守性和广泛存在性使其成为研究不同原核生物相互关系的最佳方法,也能利用这个特点做蓝藻的分子鉴定[9,10]。根据16S rRNA的特点,已经有一系列通用引物设计出来用以扩增16S rRNA基因片段[11],但属以下不能用这种方法区分[12,13]。同时位于16S rRNA和23S rRNA之间的ITS区由于其特点,不但能区分属,而且属以下的类别也能被区分开来。利用rRNA基因的特点能对蓝藻从分子水平上进行较为系统的分类和鉴定研究。

利用16S rRNA区分出了波罗的海中节球藻属(*Nodularia*)中形态上有差异的两簇(Cluster),即:无毒性和伪空泡的节球藻和具毒性和伪空泡的节球藻[14]。Moffitt[15]等通过比较21种节球藻16S rRNA基因序列,也得到了相似的结果,并通过16S rRNA基因序列的比较,设计出了产节球藻毒素的株系的特异性引物,从而能通过PCR扩增区分出产毒藻株和非产毒的节球藻。在卷曲鱼腥藻(*Anabaena circinalis*)中的研究也表明利用16S rRNA基因测序结果而生成的进化树也可用来区分产贝毒素和不产贝毒素两类[16],以上研究可区分表型明显的属间种,如产毒和不产毒的种,从系统进化树上看,在划分到一组的一些种之间的差别很小,可能不能用这种方法区分,柱孢藻属(*Cylindrospermum*)内7个藻株的16S rRNA基因的序列测定相似形达到了>99.8%[17],对5个平裂藻(*Merismopedia*)的16S rRNA基因测序,其相似程度在96%—97%[18],更加说明了这一点。单纯利用16S rRNA基因鉴定属内所有种带来难度,但区分属以上该方法有巨大的优越性。

从鱼腥藻PCC7120(*Anabaena* PCC7120)中设计引物扩增16S rRNA和23S rRNA基因间的ITS区,得到了两种形式的ITS序列,但其中一种似乎是另一种序列的一部分,比较这两种序列和已知的ITS序

列, 推导出了 ITS 的保守区和变化区, 能利用这来设计引物或寡核苷酸探针在不同的分类水平上鉴定蓝藻的种类[19], 该方法已经成功的应用于将微囊藻属(*Microcystis*)划分为三个簇, 从而更加精细的描述了属以下的相互关系[20], 也为藻种更细致的分子鉴定提供了基础。

通过 *rpoC*1 基因的扩增和测序也可区分出不同种, 但不能鉴定出不同的株系, 从而进一步通过序列比对建立了一对特异的 PCR 引物对, 用该基因建立的进化树 STRR 技术建立起来的进化树相似。

对淡水藻类的 DNA 序列知之甚少, 需要对数据库查找, 以找出保守的位点设计引物来开展工作。可通过对标准培养物的 PCR 扩增和测序来作为分子鉴定的标准, 取自然条件下的水样来扩增, 利用扩增产物的序列和标准比较就可以了。引物设计在许多文献中都有提及, 可利用已知的引物或利用登陆的序列再设计引物, 这是比较简单的事。

3 利用编码蛋白的基因序列进行的分子鉴定

编码蛋白的基因也可用来构建系统发生树, 但由于这些基因存在的主要目的是其编码的蛋白质在生物中所起的生理功能, 因此只要蛋白质的组成, 或更进一步, 蛋白质的保守结构域不发生变化, 他们的就不会被淘汰。由于兼并密码子的存在, 可能使这些功能蛋白的基因核苷酸水平上发生一点变化, 也不会影响到蛋白质的组成和其正常的生理功能, 因此即使是在保守的蛋白质结构域中, 核苷酸水平在不同的藻种中也可能不同。这和 rRNA 基因由于在生命活动中需要的是它们特异的二级结构, 因此核苷酸的组成在特定的区域不发生变化的情况大大不同。因此, 功能性蛋白的基因能被用于进行更精细的藻种鉴定, 在蓝藻中已报道的几种用于分子鉴定的蛋白质基因包括藻蓝蛋白基因, DNA 依赖的 RNA 聚合酶基因 *rpoC*1, 和特定毒素合成有关的基因, 和异形胞形成有关的基因。后两种在环境监测中有重要的意义。

3.1 藻蓝蛋白(PC)的序列测定

PC 是在蓝藻门, 红藻门及隐藻门光合系统 II 中天线色素分子之一[21]。其中蓝藻在淡水藻类中是最常见的, 蓝藻中整个 PC 操纵子编码两个藻胆色素亚基 β 和 α(分别定义为 *cpcB* 和 *cpcA*)以及 3 个连接多态[22], *cpcB* 和 *cpcA* 之间的基因间隔区(Intergenic Spacer, IGS)是一个高变区, 可用作蓝藻株系的鉴定[23]。利用 PC 的 IGS 序列的长度就能准确地预测来自水样中蓝藻的属, PCR 产物的测序能区分不同的藻种[24]; 利用 PC 的 IGS 序列能区分开巴西微囊藻的 15 个种[25], 已报道的一个例外是对 14 种澳大利亚泡沫节球藻的 *cpcBA*-IGS 的测序结果没有差异, 但用 RAPD 扩增出现了多态性[26]。

3.2 *rpoC*1 基因的序列测定

*rpoC*1 编码 RNA 聚合酶的 γ 亚基, 在基因组中以单拷贝的形式存在[27], *rpoC*1 被认为是一个更能体现差异的基因[28], 通过 *rpoC*1 基因的扩增和测序可区分不同的藻, 在利用柱孢藻(*Cylindrospermopsis raciborskii*)的 *rpoC*1 的测序结果的基础上, 设计了一对柱孢藻专一性引物, 从而能专一性的扩增这种柱孢藻[29]。在卷曲鱼腥藻(*Anabaena circinalis*)的研究中也有类似的报道, 而且专一性的扩增可简化为直接采用水样[30]。

3.3 毒素合成基因序列用于有毒藻株的鉴别

有关用分子方法鉴定有毒藻类的文章数目在近年里剧增。在微囊藻毒素合成基因簇发表以前, 虽然有一些分子起点的鉴定有毒藻类的研究进行, 但取得的结果不尽理想。最近, 随着发表的微囊藻毒素合成基因 *mcy*[31, 32] 所提供的专一性目标的出现, 有力地促进这方面的工作。这些序列被全球的研究者应用于设计和构建基于 PCR 方法的毒素基因检测。由于 PCR 的扩增使得这个方法极其灵敏。随着测序和毒素合成途径基因的发表, 分子方法会很快用于这些基因的检测。在这个研究领域, 我国的研究人员开发出一种利用全细胞 PCR 技术进行鉴别有毒微囊藻株系的方法, 通过它不但可以快速准确地对实验室培养物进行鉴别, 而且对自然水体中的微囊藻进行鉴别[33, 34], 因此对水体的安全评价有着重要的意义。而在其它有毒藻类研究领域, 现在已经有与节球藻毒素和柱孢藻毒素合成有关的基因的检测也有报道, 可以预见, 相关的分子鉴定会很快开展起来。

3.4 其它蛋白基因序列的测定

以上是几种常用于藻类鉴定中的基因, 它们在蓝藻中广泛存在, 同时还有一部分基因, 如和固氮有关的基因 *nifH*[35—37], 以及形成伪空泡的基因 *gvp*[38], 它们虽然只在一部分蓝藻中存在, 但在实际研究中如水华形成的机理, 水体中毒素的监测中同样具有重要的意义。

4 以 PCR 为基础的带型多态性鉴定不同的藻种

4.1 利用 PCR 产物的酶切多态性进行藻种的鉴定

利用 PCR 扩增 rDNA, rDNA-ITS, 及 PC-IGS 的序

列,所得到的序列酶切后检查片段长度的多态性(即RFLP技术),也可用于藻种的鉴定。但这种检验实际上也是利用了扩增后的序列差异,只是不需要对PCR的产物进行测序,而只需要进行一个或多个酶切反应,这就会使不同的序列酶切的多态性可能差别极大,有的序列甚至找不到酶切位点,为藻的分子鉴定带来困难。

由于rRNA基因在生物界广泛存在,因此可以利用保守区设计的引物扩增几乎所有原核生物的基因组产生相应的条带,甚至能利用起源于细菌的植物叶绿体中扩增测序的结果推断植物之间的相互关系。而且由于前面做了相当多的工作,因此在GENEBANK中也累积了相当多的序列信息,使人们在对序列的处理上更得心应手。PC等蓝藻特有的基因只能在蓝藻或蓝藻中特有的种之间利用,一方面限制了鉴定的范围但同时也提高了鉴定的准确性和特异性。

4.2 以扩增基因组中未知区产生的带型多态性鉴定不同的藻种

通过RAPD技术,鉴定出浮游植物 *Chattanella* 不同种的差别[39, 40]。该方法的好处是随机的从全基因组中扩增部分序列,不需要设计特异的引物,可直接购买公司的引物产品做实验,有多个引物可供选择;由于蓝藻中存在长串联重复单位(Long tandemly repeated repetitive, LTRR)和短的串联重复单位(Short tandemly repeated repetitive, STRR),也可利用这特点设计和它们结合的引物直接扩增,建立不同藻的指纹图谱[41],以达到分子鉴定的目的。这两种方法产生的多态性程度较高;实验中的基因组DNA只需要少量的就可以了;检测的速度快。可利用混合的模板扩增,通过特征带的显示,理论上可知道用于模板的组成混合物的种或属,这为从水体中直接取水样检测提供了方便。但随着样本量的增多,对条带的处理也就越来越复杂。这种方法可以在前述的测序的基础上进行更加精细的辨别不同的株系,而不适合多个属,多个种的分子鉴定。但RAPD的重复性不是很好,可增加样本的量和细致的标准化操作来解决问题,也可以回收凝胶上种特异的带,测定序列,沿着模板方向延长引物的长度来提高特异性。要通过电泳分离的片段大小鉴定不同的种或属,需要大量的引物对才能确定,增加了工作量。如果直接测序,不如用rDNA和藻蓝蛋白基因直接。同时以PCR的特异性为基础,有人研究开展了DGGE, QPCR, T-RFLP等鉴定方法,用于鉴定藻种,已经取得了许多可喜的成绩。

5 展望

Carl Woese利用rRNA序列对生物进行分类,引起了生物系统学研究的一场革命[42],他把生物界分为:细菌、真核生物和古细菌(Archaea)。他认为rRNA的核苷酸突变率很慢而且稳定,足以保证这些基因作为分子钟(Molecular clock)。从那时起,利用基因序列去确定、发现和理解进化关系成为普遍现象。近年来随着基因组计划的发展,生物信息学的出现和蓬勃发展,有力地促进了整个生物学的进步。生物信息学是利用数学方法研究储存于信息库中的核苷酸和蛋白质的结构与功能的科学。简单地讲,就是利用计算机程序去分析核苷酸和蛋白质序列,从而揭示它们的身份、异同、结构及功能等。比如,一个未知序列可以被用于BLAST分析,以寻找相同的或最相配(Best matches)的序列。同时Blast也可用于遗传成分的系统进化以及生物来源的分析。尤其值得注意的是,随着生物新技术的发展,原先被认为是费时费力费钱的测序工作在当前变得费用低廉和快速容易,为更多的物种基因测序提供了机会,进而引起生物信息学资源的剧增,为进一步生物学研究提供有力的帮助。

就藻类的分子鉴定而言,随着网上提供的生物信息学资源和建树资源的增多,这项工作较以往变得更加容易和准确。利用不同基因的序列进化研究结果为藻类的分子鉴定提供了条件,为将来扩增的片段进行比对提供了基础。利用序列测定就可以根据研究对象中一个基因的保守区设计一对引物,扩增出一个基因的片段后测序,根据已知的基因库(GENEBANK)中的序列,可大致的划分所研究种的归属。如最常用的16S rDNA序列,该序列在原核生物的核基因组和真核基因的叶绿体基因组中存在广泛的同源性。其余的基因序列如藻蓝蛋白,只能用于蓝藻的系统进化或分子鉴定中。

利用PCR扩增rDNA, rDNA-ITS, 及PC-IGS的序列,所得到的序列酶切后检查片段长度的多态性(即RFLP技术),也可用于藻种的鉴定。但这种检验实际上也是利用了扩增后的序列差异,只是不需要对PCR的产物进行测序,而只需要进行一个或多个酶切反应,这就会使不同的序列酶切的多态性可能差别极大,有的序列甚至找不到酶切位点,为藻的分子鉴定带来困难。

另外通过其他的方法也可确定不同的种或属。

如利用制备的单克隆抗体和藻类表面抗原相结合的原理,可鉴别具有特定抗原的表面蛋白。利用电子显微镜观察藻类细胞的微观结构来鉴定,但相对而言,分子鉴定的方法具有快速简便的特点。利用蛋白质的带也可以鉴定,利用编码蛋白的基因序列鉴定藻分子种,利用 PsbA 基因及 SSU V4 也经常被用来做系统进化树分析。

总之,分子鉴定方法在国际上已经被广泛地应用在水华藻类的鉴定上,并且取得了许多很好的结果。如藻种的鉴定、产毒藻株的鉴别、水体生物演替等研究方面,发表的相关研究报告逐年快速激增,但相比较而言,我国当前的研究则比较少。尤其对于我国这样一个平均可用水资源较少的国度,水体的安全尤为重要,面对我国日益严峻的水污染问题,继而可能引发的水体生态系统破坏和危及水安全,利用分子手段能快速准确地对水体中的生物(包括藻类)进行鉴定,从而为国家决策和人民的饮水安全判定提供正确的科学依据。因此有必要加强相关研究的投入,建立相应的研究网络,实现资源和信息共享,加大群众科学普及和参与力度,为保护水环境做出贡献。

参考文献:

[1] Chorus I, Bartram J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management[M]. London: E&FN Spon. 1999, 41—111

[2] Liu Y D, Song L R, Li X Y, *et al*. The toxic effects of microcystin-LR on embryo-larval and juvenile development of loach, Misgurnus mizolepis Gunthe[J]. *Toxicon* 2002, **40**: 395—399

[3] Li X Y, Liu Y D, Song L R. Cytological alterations in isolated hepatocytes from common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystin-LR[J]. *Environ. Toxicol.* 2001, **16**: 517—522

[4] Li X Y, Liu Y D, Song L R, *et al*. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR[J]. *Toxicon* 2003, **42**, 85—89

[5] Li X Y, Song L R, Liu Y D. The production, detection and Toxicology of Microcystins[J]. *Acta Hydrobiological Sinica* 1999, **23**(5): 517—523[李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究. 水生生物学报, 1999, **23**(5): 517—523]

[6] Quellette A J A, Wilhelm S W. Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. [J] *Front. Ecol. Environ* 2003, **1**(7): 359—366

[7] Song L R, Lei L M, He Z R, *et al*. Growth and Toxin Analysis in two toxic Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis viridis* isolated from Dianchi Lake [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 1999, **23**: 402—408[宋立荣, 雷腊梅, 何振荣, 等. 滇池水华蓝藻铜锈微囊藻和绿色微囊藻的生长生理特性及其毒素分析[J]. 水生生物学报, 1999, **23**: 402—408]

[8] Srivastava A K, Schlessinger D. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing[J]. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990, 44, 105—129

[9] Bryant A B. The molecular biology of Cyanobacteria[M]. Kluwer, Dordrecht, 1994, 1—25

[10] Vandamme P, Pot B, Gillis M, *et al*. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics[J]. *Microbio. Reviews* 1996, **60**(2), 407—438

[11] Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics[M], New York: John Wiley and Sons, 1991, 115—175

[12] Li R H, Carmichael W W, Liu Y D, *et al*. Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences[J]. *Hydrobiologia*, 2000, **438**: 99—105

[13] Fox G E, Wisotzkey J D, Jurtshuk J R. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity [J]. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992. **42**: 166—170

[14] Lehtimäki J, Lyra C, Suomalainen S *et al*. Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods[J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000, **50**: 1043—1053

[15] Moffitt M C, Blackburn S I, Neilan B A. rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*[J]. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 2001, **51**: 505—512

[16] Beltran E C, Neilan B A. Geographical segregation of the neurotoxin-producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*[J]. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**: 4468—4474

[17] Saker M L, Neilan B A. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia[J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, **67**: 1839—1845

[18] Palinska K A, Liesack W, Rhiel E, Krumbein W E. Phenotype variability of identified genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates. *Arch. Microbiol.* 1996, **166**: 224—233

[19] Iteman I, Rippka R, Tandeau de Marsac N, *et al*. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology*. 2000, **146**: 1275—1286

[20] Otsuka S, Suda S, Li R, *et al*. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999. **172**: 15—21

[21] Dubbs J M, Bryant D A. Molecular cloning and transcriptional analysis of the *cpc*. BA operon of the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC7409[J]. *Mol. Microbiol.* 1991, **5**: 3073—3085

[22] Belknap W R, Hazelkorn R. Cloning and light regulation of expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Anabaena* [J] *EMBO. J.* 1987. **6**: 871—884

[23] Neilan B A, Jacobs D, Goodman A E. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphism within the phycocyanin locus[J]. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1995, **61**: 3875—3883

[24] Baker J A, Neilan B A, Entsch B, *et al*. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis[J]. *Environ. Toxicol.*, 2001, **16**: 472—482

[25] do Carmo Bittencourt-Oliveira M, de Oliveira MC, Bolch CJS. Genetic variability of Brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (cpcBA) [J]. *J. Phycol.*, 2001, **37** (5): 810—818

[26] Bolch C J S, Orr P T, Jones G J, *et al*. Genetic, morphological, and toxicological variation among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria) [J]. *J. Phycol*. 1999, **35**: 339—355

[27] Bergsland K J, Haselkorn R. Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC*1 gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *J. Bacteriol*. 1991, **173**: 3446—3455

[28] Palenik B, Haselkorn R. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll-containing prokaryotes [J]. *Nature* 1992. **355**: 265—267

[29] Wilson K M, Schembri M A, Baker P D, *et al*. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and Design of a Species-Specific PCR [J]. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000, **66**: 332—338

[30] Fergusson K M, Saint C P. Molecular Phylogeny of Anabaena circinalis and Its Identification in Environmental Samples by PCR[J]. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000, **66**: 4145—4148

[31] Tillett D, Parker D L, Neilan B A. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001, **67**: 2810—2818

[32] Peschek G A. Loeffelhardt W, Schmetterer G. The phototrophic prokaryotes[M]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishing Corp. 1999, 615—621

[33] Pan H, Song L, Liu Y, *et al*. Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples[J]. *Arch. Microbiol*. 2002, **178**: 421—427

[34] Pan H, Song L R, Liu Y D, *et al*. Characterization of toxic waterbloom forming cyanobacteria by modified PCR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2001, **25**(2): 159—166[潘卉, 宋立荣, 刘永定, 等. 水华蓝藻产毒特性的 PCR 检测法. 水生生物学报 2001, **25**(2): 159—166]

[35] Berr Porath J, Carpenter E J, Zehr J P. Genotypic relationships in *Trichodesmium* (Cyanophyceae) based on *nifH* sequence comparisons [J]. *J. Phycol*. 1993, **29**: 806—810

[36] Berr Porath J., Zehr JP. Detection and characterization of cyanobacterial *nifH* genes[J]. *Appl. Environ. Microbiol*. 1994, **60**: 880—887

[37] Zehr J P, Mellon M T, Hiorns W D. Phylogeny of cyanobacterial evolutionary implications and potential applications to natural assemblages [J]. *Microbiology*. 1997, **143**: 1443—1450

[38] Barker G L A, Hayes P K, O'Mahony S L, *et al*. Molecular and phenotypic analysis of *Nalularia* (cyanobacteria) from the Baltic Sea [J]. *J. Phycol* 1999, **35**: 931—937

[39] Murayama-Kayano E, Yoshimatsu S, Kayano T, *et al*. Application of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to distinguishing species of the red tide phytoplankton Chattonella (*Raphydophyceae*) [J] *J. Ferment. Bioengeer*. 1998, **85**: 343—345

[40] Pan H, Song L R, Li S D, *et al*. Phylogenetic Relationship Among Seven Strains of Microcystis Based on the Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 1999, **23**: 470—480[潘卉, 宋立荣, 李寿东, 等. 七种微囊藻系统进化关系的 RAPD 分析. 水生生物学报, 1999, **23**: 470—480]

[41] Rasmussen U, Svenning M M. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences [J]. *Appl. Environ. Microbiol*. 1998, **64**: 265—272

[42] Woese C R. Bacterial evolution[J]. *Microbiol Rev* 1987, **51**: 221—271