

海洋超微型浮游植物多样性研究方法进展*

MOLECULAR METHODS APPLIED TO THE RESEARCH OF MARINE ULTRAPHYTOPLANKTON DIVERSITY

陈纪新 黄邦钦 郑微云

(厦门大学国家海洋环境科学教育部重点实验室 环境科学研究中心 361005)

海洋超微型浮游植物 (Ultraphytoplankton) 是一类粒径微小 ($<5 \sim 10 \mu\text{m}$) 的光能自养型浮游生物, 它包括所有的微微型浮游植物 (Picophytoplankton, $0.2 \sim 2 \mu\text{m}$) 和部分微型浮游植物 (Nanophytoplankton, $2 \sim 20 \mu\text{m}$); 由原核浮游植物及真核浮游植物组成。微微型原核浮游植物主要是单细胞的蓝细菌 (藻) (聚球藻 *Synechococcus*) 和原绿球藻 *Prochlorococcus*。海洋超微型光合真核生物主要包括定鞭藻类、金藻类、隐藻类和绿藻类等。现有的研究表明, 超微型浮游植物广泛分布于包括南极水域在内的水体中, 在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着十分重要的作用, 在微生物食物网中, 超微型浮游植物是重要的初级生产者, 在热带海域对浮游植物生物量贡献可达 80% 以上, 在亚热带海域可达 60% ~ 80%^[7], 其通过微型浮游动物的摄食进入经典的微食物环, 在热带和亚热带的寡营养海域, 以超微型浮游植物为起点的微型生物食物网在海洋食物网中占有十分重要的地位, 此外, 超微型浮游植物在维持生态系统稳定性中亦起着重要作用。超微型浮游植物由于其细胞微小, 细胞比表面积比较大, 对环境变化的反应较为敏感, 可作为环境指示生物。

据 Pantensky 等 1997 年报道, 超微型浮游植物个体微小, 一般为球藻或具鞭毛藻, 形态特征较难分辨, 而且不同的培养条件下它们的形态特征存在着差异。另外, 在超微型群落中, 多数种类的微型生物无法进行纯化培养, 因此难以用一些经典的分析方法来研究超微型生物的多样性, 近年来, 由于基于核酸分子生物学的分子技术的引入, 海洋环境中的微生物多样性的研究得到极大的发展^[10]。这些技术主要开始于对细菌的研究, 之后逐渐引入到海洋微型浮游生物的

研究中, 目前这些应用多数还集中在遗传多样性和自然种群亲缘关系的研究。本文就目前在国内外发展的可应用于超微型浮游植物多样性的 DNA 序列和相应的分子技术方法进行简要介绍。

1 分子技术所应用的基因序列类型

1.1 原核细胞基因类型

1.1.1 16S rRNA 基因

原核生物核糖体的 16S rRNA 基因, 是最早应用于海洋学研究的核酸分子, 也是目前应用得最多的序列。1990 年, Giovannoni 等应用 PCR 方法来扩增分析 16S rRNA 基因, 初步建立了马尾藻海浮游细菌系统发生树。

虽然任何基因可以作为分子标志, 但是, 16S rRNA 基因有其特殊的优点: (1) rRNA 基因在所有的细胞生物中均存在^[3], 同时具有相嵌的高度保守区域和可变异或高度变异的区域^[8], 所以可以根据不同水平的分类来设计 PCR 引物, 准确地确定物种之间的亲缘关系, 特别是对于较远的亲缘关系。(2) 现已建立了大量的 16S rRNA 基因的序列数据库, 有较多的生物系统多样性信息。这对基因序列的比较分析十分有

* 国家重点基础研究发展规划 G1999043706 号,

G2000078502 号和国家自然科学基金 40076031 号。

第一作者: 陈纪新, 出生于 1978 年, 硕士研究生, 研究方向为海洋微型藻类生态, 现主要参与科研项目: 国家自然科学基金 (40076031); 近岸海域超微型浮游植物生物多样性研究; 国家 973 项目 (G19990437); 东黄海生态系统动力学及防治机制研究。E-mail: smmd@sohu.com

收稿日期: 2001-04-16 修回日期: 2002-01-08

用。(3)核糖体在细胞中大量存在,其生物合成量正比于细胞生长速度,在生态学研究,很容易用专一性分子探针筛选 rDNA 分子^[3]。

1.1.2 16S~23S 间隔区序列

利用 16S 来研究原核生物多样性仍然存在一些缺陷,原因如下:(1)16S 基因分子大小较为恒定的(长度一般为 1550 ± 200 bp),这样不同的基因就不能通过大小来区分开来。(2)尽管 16S 序列具有高度变异的区域,但是对于许多亲缘关系较近种群而言,其无法提供有效的区分标记,比如相同属内的种,对蓝藻来说,16S rRNA 可用于鉴定种以上的株系,但对于种以下水平,分辨率不够^[3]。

相对来说,大分子 rRNA 即 16S rRNA 和 23S rRNA 基因之间的间隔区是一个特殊的区域,具有较高的突变速率,可作为精细的分子指标,用于亲缘关系较密切的原核超微型藻如蓝藻的属内的分类鉴定。多数已知的原核生物的基因将不同的核糖体 RNA 编码成为一个功能性转录单位的操纵子。这些操纵子通常定位于复制起始点的两侧。一个操纵子中不同亚基的排列结构最常见的形式是 16S~23S~5S 顺序如图 1 所示^[11-13]。

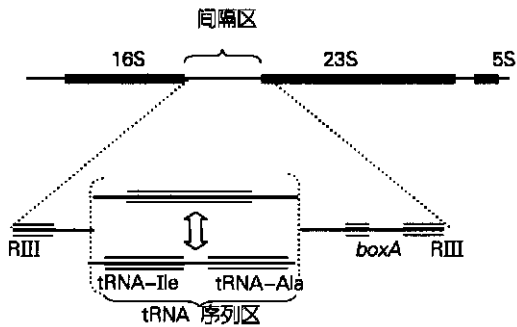


图 1 16S~23S 间隔区代表模型及其功能区域结构

在 16S 与 23S 之间,以及 23S 与 5S 之间存在着不同长度的间隔区。这种间隔区的大小可因不同的物种而变化,这种长度上变化主要是由于在间隔区中存在着多种功能单位,如 tRNA 基因,在已研究的多数微型生物的间隔区发现^[3]。这个区域还有其它的一些功能单位,如可识别核糖核酸酶 III 的序列和在转录中起抗终止作用的序列 boxA。这些序列在所有微型生物中普遍是不保守的,即使是在亲缘关系很近的情况

下往往仍表现出特异性。这些功能性单位在间隔区中不超过 50%,剩下的区域是由一些不重要(或者目前尚未发现其功能)的序列组成,容易发生插入与丢失现象,而这种序列的变化对其生长并没有影响,理论上可以表现较大的多样性。同时,在亲缘关系较近的物种之间,间隔区中一些核苷酸序列也相当保守^[3]。间隔区的这些特征,有利于原核微型生物的研究。间隔区的大小多样性提供了一个通过大小来分离 PCR 产物的方法,可以使用较为方便的琼脂糖电泳。另一方面,可以利用一个定位于 16S 基因的引物扩增得到 16S-23S 间隔区的克隆。由于现在已经有较为丰富的 16S 基因序列库,而已知的 5S 与 23S 的基因序列较少,因此对 16S~23S 间隔区的研究要比 23S~5S 间隔区的研究要有利。

1.1.3 光合基因序列

对超微型原核浮游植物而言,利用它们有别于细菌的基因——光合基因来研究其多样性,有利于消除自然群落中细菌 DNA 污染的影响。

Phycocyanin(PC)是一种藻蓝蛋白,它是蓝藻光合系统 II 集光色素的主要载体。整个 PC 启动子包括编码 2 个后胆色素亚基的基因,以及 3 个连接多肽。在 2 个后胆色素亚基之间的间隔区(IGS),是一个高突变区,可作为蓝藻株系之间的鉴定。海洋超微型浮游植物原绿球藻细胞可以生活在比较广的光辐射范围,从水表面层至低于真光层下限深度均能进行光合作用。这种非凡的光合效率必然涉及到光合器官高度有效的适应机制和丰富的遗传多样性。目前在利用原绿球藻光合基因分子研究自然种群多样性方面,国际上进行了较多的工作。Hess 等 1996 年在对原绿球藻深水种 *P. marinus* SS120 的色素研究中发现具有功能性的 *cpeA/B* 基因,编码藻胆素的两个亚基,而在海表层的原绿球藻群落中分离的 DNA 中没有发现相关的序列,这种藻红蛋白基因可做深水种类原绿球藻 *P. marinus* 的特异性标记。LaRooche 等对海洋不同深度的两种原绿球藻天线色素基因 *pcb* (Prochlorophyte chlorophyll a/b-Protein) 进行测序,发现两种原绿球藻 *pcb* 序列之间的同源性仅有 76%,这表明不同深度的原绿球藻群落间存在着较大的多样性距离。Hess 1995 年等对原绿球藻 PSII 反应中心的 D1 蛋白基因 *psbA* 的序列进行分析比较,证实了其于蓝细菌的紧密的亲

表 1 超微型浮游植物不同分类水平的探针^[6]

分类水平	探针名称	特异性	目标序列(5'→3')	起启位点	参考物种	文献来源
Domain	Euk-309R	Eukaryotes	AGGTCTGTGATGCC			Urn 等, 1993
Supra-Class	CHL001	Chlorophytes	CACCACCAGCGTGGAGC	1 152	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Simon 等, 1995
Class	CHL002	Chlorophytes	AAAGTTGGGGGCTCGAAG	973	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Simon 等, 1995
	NCHL01	Non-Chlorophytes	CACCACCAGGAGTGGAGC	1 152	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Simon 等, 1995
Class	PRYMN01	Prymnesiophyceae	AGCATTTGCCAGGGATGT	946	<i>Phaeocystis globosa</i>	Lange 等, 1996
	PRYMN02	Prymnesiophyceae	GTCAGGGGCACTCGTATTCC	877	<i>Phaeocystis globosa</i>	Simon 等, 1995
Class	PELA01	Pelagophyceae	AGCGTCGAACAAGGACGT	957	<i>Pelagomonas calceolata</i>	Simon 等, 1995
	PELA02	Pelagophyceae	GATTGGGATTGATTGTTGC	1 554	<i>Pelagomonas calceolata</i>	Simon 等, 1995
Class	CHRY01	Chrysophyceae	GACCTTGGTCTATTTTGT	809	<i>Ochromonas danica</i>	Simon 等, 1995
Class	PHAE001	Phaeocystis	ACGAGTCCACCTCGACCG	1 488	<i>Phaeocystis globosa</i>	Lange 等, 1996
Genus	Micro/Manto01	<i>Mantoniella squamata</i>	CGACCTCGTTCTGCGGTG			
		<i>Micromonas pusilla</i>		219	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Knauber 等, 1996
Genus	Micro/Manto02	<i>Mantoniella squamata</i>	TCATACGCTACT			
		<i>Micromonas pusilla</i>	CTTAGCGCAGTGACT	1 330	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Knauber 等, 1996
Genus	Pycno	<i>Pseudosourfieldia marina</i> , <i>Pycnococcus provasolii</i>	ATCTCGACTTCGGAAGAGACG	178	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Knauber 等, 1996
Genus	CCMP1194	未鉴定 <i>coccoid prasinophytes</i> (CCMP1194, CCMP1202 和 CCMP1407)	ACCAATCGCTTCGGCGTTT	228	CCMP1194	Knauber 等, 1996

缘关系。Urbach 等 1998 年利用流式细胞分选仪分选的样品, 进行 DNA 的 PCR 扩增、克隆, 通过测定不同的原绿球藻的光合色素基因 *petB/D* 等位基因来建立原绿球藻的遗传多样性^[6]。

1.2 真核超微型浮游植物基因

同原核生物一样, 18S rRNA 基因序列是真核超微型浮游生物遗传多样性研究的主要靶位序列。通过

18S rRNA 基因测序, 鉴定不同分类水平的特异性区域, 并设计出不同分类水平的寡核苷酸探针进行杂交, 识别出特异性的种群, 目前已经利用 18S rRNA 基因序列设计出从界到种水平的特异性探针(表 1)^[8]。Kooista 等利用 18S rRNA 基因序列研究硅藻的起源与多样性, 提出与硅藻形态分类不同的分类方式。

核糖体 18S rRNA 和 24S rRNA 基因的转录间隔区

ITS (Internal Transcribed Spacer), 是国际上公认的生物各类群属下种间水平比较研究的一个很好的分子指标。已经在动物、被子植物、绿藻等方面得到广泛的应用。Adachi 等以 rDNA TTS 区作为多样性指标对日本海域和中国海域的甲藻 *Alexandrium catenella* 与 *Alexandrium tamarense* 不同地理株进行分析, 认为这些海域 *Alexandrium* 属间不同种间序列存在显著差异, 而在种内个体间 ITS 序列非常相似。Zechman 等通过对 4 种硅藻的研究认为 ITS 在研究硅藻种间亲缘关系时十分有用。

2 常用 DNA 分子技术

2.1 基因测序

对超微型生物细胞直接进行基因测序可以为遗传多样性研究提供丰富准确的信息。上述的基因序列均可以通过测序得到详细的序列信息进行比较分析。通过序列数据的比较较为精确, 一般可以衡量别的多样性分析方法效果。由于测序需要较多的时间与资金, 不适用于快速多样性分析、群落水平或数目较多的样品分析^[5]。一般来说, 通过测序得到的序列数据可以进行遗传水平多样性分析, 而这些序列数据可以补充现有的数据库, 增加多样性信息。

Medlin 等通过 16S rDNA 测序比较中肋骨条藻 4 个株系, 来确立了一个新种 *S. Pseudocostatum*。Ena Urbach 等对原绿球藻 (*Prochlorococcus*) 和聚球藻 (*Synechococcus*) 基因 *petB* / *D* 的测序比较建立这两类重要超微型浮游原核植物的遗传标记。

2.2 DGGE 与 RISA

DGGE (变性梯度凝胶电泳) 是 16S rRNA 基因测序中经常用的一项 DNA 分离技术。由于不同种个体的 16S rRNA 基因的长度较稳定, 琼脂糖电泳不能将相同大小的不同 DNA 分子区分开来。而 DGGE 能够将大小相似的不同序列 DNA 区分开, 得到纯化的单种 16S rDNA, 以便进行测序。Nabel 等 1997 年把蓝藻 DNA 通过 PCR 扩增后, 将蓝藻 rRNA 基因片段有选择地扩增出来, 再通过 DGGE 获得片段进行测序, 获得 16S rRNA 基因的核苷酸信息。

另外, DGGE 还是一种重要的群落印迹分析方法。群落印迹技术是用于比较整个群落, 评价群落时空动态变化。通过 DGGE 可以得到整个群落 16S rRNA 序列的电泳图谱, 通过不同 DGGE 图谱比较可以了解

群落的结构变化和时间空间变化程度。据 Santegodes 等 1996 年报道, 在土壤生态学中, 它被用于描述土壤细菌种群, 研究土壤细菌受影响的群落变化情况。在水生生态学中, DGGE 已被应用于研究淡水和海洋环境中原核生物的时间和空间变化^[9]。这些研究表明了 DGGE 技术适用于海洋微生物群落时空动态的研究^[12]。Schauer 2000 年通过形态分析、DGGE、类胡萝卜素分析三种方法比较^[10], 认为 DGGE 对于群落样品中生物多样性的分析是比较真实、合理的, 是一种调查自然微型生物群落的有利工具。比起测序来说, DGGE 对含有多个物种的样品处理的工作量要少得多。

但是 DGGE 要求特殊聚丙烯酰胺和特定电泳设备。另外还需要有较长的引物, 而且只能扩增出几百个碱基的 16S rDNA 片段。一种更简便的群落印迹技术是 RISA (rDNA 间隔区序列分析), 它利用 16S ~ 23S 间隔区大小变异显著的特点, 通过大小差异来得到整个群落的琼脂糖电泳图谱。Amann 等 1995 年对地中海不同深度的浮游细菌水样进行 RISA 分析, 证实时细菌种群结构随深度不同的变化, 这个结果与 Acinas 等 1997 年应用 ARDRA (扩增 rDNA 限制分析) 技术得到的结果相似。

2.3 RADP 的应用

RADP (Random Amplified Polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA), 由 1990 年 Williams 等人创立, 用于分析生物基因组的遗传多样性, 它使用一系列具有 10 个碱基的随机引物, 对基因组的 DNA 全部进行 PCR 扩增。若遗传特性存在差异, 经 PCR 扩增后表现其差异性。RAPD 的研究不需要合成特定序列的引物, 具有高效性与灵敏性, 能在短期内获得大量的多态性 DNA 片段, 只要遗传特异性发生变化, 即使亲缘关系很近的个体也能识别。

Neilan 在原 RAPD 的基础上加以改良, 即一般 RAPD 使用单引物, 而新方法则使用双引物, 提高了重复性, 获得高度重复性的 RAPD 图案, 将 11 个形成水华与产毒的蓝藻株系通过 8 个单引物和 1 个双引物的 PCR 反应得到每个株系的遗传距离。Jensen 等用 RAPD 分析了 118 个钝形脆杆藻 (*Fragilaria capricornis*) 株系的遗传指纹图谱, 指出不同环境条件下种群间存在遗传变异。

2.4 RFLP 技术应用

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, 限制性片段长度多态性) 是 Grodzicker 在 1974 年创立的, 主要原理是由于生物种群之间染色体结构或碱基的改变使 DNA 片段的酶切位点发生变化, 用限制性内切酶切割改变的 DNA, 则产生长短、种类、数目不同的限制性片段。这些片段经聚丙烯酰胺电泳分离后, 在凝胶上呈现不同的带状分布, 具有差异性的 DNA 片段可通过 Southern 杂交检测出来。然后利用 Southern 转移将带状分布 DNA 移到膜上去, 再利用探针进行杂交后, 洗去多余探针, 经放射性自显影即可得到靶 DNA。

Neilan 等 1995 年采用 RFLP 分析方法来鉴定蓝藻的株系, 其先运用 PCR 扩增出 PC 启动子, 再运用 9 种限制性内切酶进行酶解反应; Scanlan 等利用光合基因 *rbcL*, *rbcS*, *wxaA*, *psbA* 制备的探针来进行 Southern 杂交, 鉴别比较不同潮流深度中的原绿球藻; 陈月琴等 1999 年应用 PCR 与 RFLP 结合对我国南海的有毒赤潮藻进行了分子鉴定。

2.5 原位杂交 (ISH)

原位杂交 (ISH, *in situ* hybridization) 是采用与特异性基因序列互补的荧光或放射性标记的寡核苷酸探针, 协同表面荧光显微技术或流式细胞术来鉴定各种系统发生水平上 (从界到种) 各种复杂样品中的遗传多样性。一般来说, 原位杂交的特异性基因序列采用 rRNA 序列 (原核为 16S rRNA, 真核为 18S rRNA)。由于 ISH 方法依赖于细胞内特异性目标的数目来提供可检测的信号, 而许多自然环境中生长缓慢或休眠的微生物的 rRNA 分子较少, 会影响信号的强弱。所以多数定位于 rRNA 探针的应用技术被限定于研究营养相对丰富环境下的浮游微型种群。目前也利用多 rRNA 定位荧光探针, 多核糖体核苷酸探针, 或更紧密的荧光染色来提高杂交信号强度, 这有助于提高 ISH 所描述的微生物群落结构的稳定性。

Delong 和 Fuhrman 等应用同位素标记的核苷酸探针的方法研究了大西洋和太平洋温带近岸海域、南极无光区及寒带水域的浮游细菌的多样性。Simon 等运用 18S rRNA 探针原位杂交的技术来研究真核超微浮游植物的生物多样性; 他们在分析 18S rRNA 的特异性片段序列的基础上, 设计一个与特异性片段互补的

短寡核苷酸链 (如 20 个碱基, 然后结合上荧光分子, 这样就可以运用荧光显微镜或流式细胞仪分辨特异的细胞。这些探针要根据所要鉴定的目、属、种不同等级差异而进行扩增。

2.6 原位反转录 (ISRT) 和原位 PCR

原位反转录 (ISRT, *in situ* Reverse Transcription) 是 Chen 等^[4,5]建立的一种应用于水体中原核生物遗传多样性与活性分析研究的方法。在完整的原核细胞中, 导入与特定 16S rRNA 或 mRNA 序列互补的荧光标记寡核苷酸引物, 在反转录酶作用下, 每个细胞产生带荧光标记的 cDNA。ISRT 可以提供比 ISH 更强的信号, 尤其是定位于 mRNA 时, 具有更高的灵敏性。荧光标记的寡核苷酸对 cDNA 多倍整合提供了复杂微型生物群体中表达特异性功能基因的细胞的检测的高敏感性。Chen 等应用定位于 16S rRNA 特异性区域的引物, 通过 ISRT 检测和计量出复杂细菌群落中两种木质素降解菌 *Microbacter hydrolyticus* IRE-31 and *Sagittula stellata* E-37^[4]。

原位 PCR 用于检测真核细胞中的 DNA 或 RNA 细菌。其利用特异性的引物对细胞中稀有的基因进行扩增而不需要从细胞中提取 DNA。在原核生物研究中, 结合原核原位 PCR 技术 (PIPCR) 与原位反转录技术, 可以显示原核特异的功能基因 (质粒或染色体) 和它们的表达 (mRNA)^[5]。PIPCR 可用研究复杂微型生物群落中具有特异基因的微生物细胞和了解原核细胞基因对环境条件的应答。这种方法已经成功应用于检测海洋细菌群落 *Pseudomonas* 细胞的 *nahA* 基因转录的 mRNA, 检测 *Aerobacter vinelandii* 的 *nifH* 基因和 *Pseudomonas putida* F1 的 *todC1* 基因^[4]的存在与表达。

2.7 流式细胞技术的应用

流式细胞技术 (Flow Cytometry, 简称 FCM) 是将样品细胞悬浮于液体中, 在流动过程中细胞一个个地经过测量区进行快速测量。它的最大特点是可同时测量每个细胞的多个参数, 根据这些特征参数对细胞群体进行分类分选, 进而对各亚群分别进行研究。当前流式细胞技术在细胞生物学、免疫学、肿瘤学、血液学、遗传学、病理学、临床检验等领域应用十分广泛。近年来也开始应用于海洋浮游植物研究。

80 年代海洋生物学家应用流式细胞技术发现了

海洋中的另一类生物——原绿球藻。这类微小植物在水柱(层)深处的弱光环境中十分丰富,这些细胞对强光十分敏感,在差视显微镜连续照射下即溶解或消失。而使用流式细胞计,因细胞流经测量光区的时间极短(10^{-5} s),因此可以发现这些原绿球藻体^[3]。1994年Courties等通过流式细胞技术在地中海发现迄今为止所记录的最小的微微型光合真核生物(绿藻类) *Ostreococcus tauri*。基于超微型细胞在流式细胞仪生物光学特性, Li 1997年提出细胞粒径多样性(Cytometric diversity)概念,根据流式细胞仪能够测定单个浮游植物细胞色素的自荧光和粒径大小,用于衡量超微型浮游生物群落结构多样性,而不需要鉴定群落中种群的组成。

另外流式细胞仪在超微型浮游植物研究中可作为特异性荧光检测器,它可以特异性检出结合有荧光染色剂、寡核苷酸荧光探针的细胞,可作为原位杂交的高效检测器。Simon等运用流式细胞技术来检测真核超微型浮游植物 18S rRNA 荧光探针原位杂交结果。

3 结束语

分子生物学技术在海洋微藻多样性研究中的引入,使这一领域得到飞速发展。目前在每一个多样性和系统遗传水平上均已发展了相应的研究靶基因与分子技术。不同的基因与分子技术的选择依赖于所要处理的样品的数量、要求的时间以及研究的水平。应用分子生物学技术进行海洋学研究目前还处于早期阶段,尚需要进一步完善和改良所应用的分子生物学方法,使之更适应超微型浮游植物多样性和系统发生学研究的需要。

参考文献

- 1 庄丽、陈月琴. 蓝藻分子系统学研究进展, 中山大学学报自然科学版, 1999 38(1): 74~78
- 2 张利华. 流式细胞术在海洋浮游植物研究中的应用, 东海海洋, 1998 16(1): 59~63
- 3 Anton A. L., Martinez-Murcia A. J., Rodriguez-Valera F. . Sequence diversity in the 16S~23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the Escherichia coli ECOR collection. *J. Mol. Evol.*, 1998 47: 62~72
- 4 Chen F., Dustman W. A. and Hodson R. E. . Detection of

- toluene dioxygenase gene and gene expression in *Pseudomonas putida* FL in a toluene exposed seawater using in situ PCR and hybridization *Hydrobiologia Appl. Environ. Microbiol.*, 1999 401: 131~138
- 5 Chen F., Wendy D., Mary A. M., Robert E. H. . *In situ* PCR methodologies for visualization of microscale genetic and taxonomic diversities of prokaryotic communities *Mol. Microbiol. Ecol. Manual*, 1998 1~17
- 6 Ena U., Sallie W. C. . Genetic diversity in *Prochlorococcus* populations flow cytometrically sorted from Sargasso Sea and Gulf Stream *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998 43(7): 1615~1630
- 7 Huang B. Q., Hong H. and Wang, H. . Size-Fractionated Primary Productivity and the Phytoplankton-Bacteria Relationship in the Taiwan Strait *Mar. Ecol. Ser.*, 1999, 183: 28~29
- 8 Jesus Garcia-Martinez, Silvia G. A., Ana I. A., Francisco R. V. J. . Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity, *Microbiol. Methods*, 1999 36:55~64
- 9 Lindstrom E. S. . Bacterioplankton community composition in a boreal forest lake *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1998 27: 163~174
- 10 Michael S., Ramon M., Carlos P. A. . Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2000 33: 51~59
- 11 Pisaharro A., Comeia A., Martin J. . Characterization of the *rrnB* operon of the plant pathogen *Rhodococcus fascians* and targeted integrations of exogenous genes at *rrn* loci *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998 64: 1276~1282
- 12 Riemann L., Steward G. F., Fandino, L. B. . Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of rRNA genes *Deep-Sea Res.*, 1999 46: 1791~1811
- 13 Roth A., Fischer M., Hamid M. E., Mauch H. J. . Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S~23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences *Clinic Microbiology*, 1998, 36: 139~147

(本文编辑: 刘珊珊)