

DOI: 10.12264/JFSC2024-0150

## 不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期及转录组比较分析

赵鹏珍<sup>1,2</sup>, 王云龙<sup>2</sup>, 马欣云<sup>1,2</sup>, 全为民<sup>2</sup>, 李楠楠<sup>2</sup>, 陈渊戈<sup>2</sup>, 范瑞良<sup>2</sup>, 张海燕<sup>2</sup>, 徐清<sup>3</sup>, 欧阳珑玲<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;
3. 自然资源部宁波海洋中心, 浙江 宁波 315012

**摘要:** 为研究不同增殖速度的东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)细胞周期时相分布特点以及内在调控机理, 利用流式细胞检测技术比较了两种不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期时相差异, 并利用 RNA-seq 技术对两组细胞转录模式进行了比较分析。结果显示, 相比增殖速度较快的实验组, 增殖速度较慢的实验组 S 期更短, 且部分细胞阻滞在 G2/M 期。因此, S 期的持续时间和 G2/M 期转换是否被阻滞可以决定东海原甲藻的增殖速率。两组细胞差异表达基因富集程度最大且富集最显著的 GO 分类均与微管和细胞骨架有关, 暗示两实验组细胞周期进程的差异由细胞中的微管动态变化不同造成。注释到 49 个细胞周期蛋白编码基因、74 个细胞周期蛋白依赖性激酶编码基因和 26 个细胞分裂周期蛋白编码基因。其中, 1 个 CYCB 和 2 个 CDK1 基因与调节东海原甲藻 G2/M 期阻滞有关, 1 个 CYCA、1 个 CYCU、4 个 CDK2 和 1 个 Cdc48 基因与藻细胞 S 期进程调控有关。

**关键词:** 东海原甲藻; 增殖速度; 细胞周期时相; 转录组; 差异表达基因; 赤潮

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)09-1116-13

东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)是我国近海主要的赤潮生物之一, 对环境适应能力较强, 赤潮暴发时对我国沿海生态系统平衡及海水养殖业造成严重危害<sup>[1]</sup>。东海原甲藻赤潮的发生是由其细胞在特定环境条件下短时间内快速增殖和聚集引发的, 因此了解环境影响下藻细胞快速增殖的内在机理是研究赤潮形成和预防措施的关键。课题组通过正交试验发现, 光照强度、盐度、pH、温度和氮磷比(N/P 比)不同水平的组合可造成东海原甲藻细胞增殖速度的极大差异(待发表), 但其内在机理尚不清楚。细胞周期是调控细胞分裂重要的生物学过程, 环境因子能够通过改变浮游植物的细胞周期进程来影响其增殖速度<sup>[2-6]</sup>。因此, 探究不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期特

点, 解析其分子调控机制可阐释藻细胞增殖速度对环境因素响应的内在机理。

东海原甲藻具有典型的真核生物细胞周期, 包括 G1 期、S 期、G2 期和 M 期<sup>[7-8]</sup>。随着蛋白质组学和转录组学技术的发展, 与东海原甲藻细胞周期相关的蛋白和基因逐步被鉴定出来<sup>[9-12]</sup>。Wang 等<sup>[8]</sup>利用定量蛋白质组学技术对东海原甲藻细胞周期调控进行了研究, 结果表明增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达量在 S 期达到峰值。张英娇<sup>[9]</sup>利用定量蛋白质组学技术研究了东海原甲藻细胞周期不同时相的蛋白质表达谱, 成功鉴定到了细胞分裂周期蛋白 48 (cell division cycle protein 48, Cdc48) 和细胞分裂周期蛋白(cell division cycle protein, Cdc) 2 种细

收稿日期: 2024-05-13; 修订日期: 2024-07-17.

基金项目: 中国水产科学研究院东海水产研究所基本科研业务费项目(2016T04).

作者简介: 赵鹏珍(1997-), 硕士研究生, 研究方向为藻类生理生态学. E-mail: zhao201903@126.com

通信作者: 欧阳珑玲, 副研究员, 研究方向为渔业水域生境保护与修复. E-mail: ouyangll@ecsf.ac.cn

胞周期相关蛋白。Shi 等<sup>[7]</sup>克隆了东海原甲藻的 G1/S 细胞周期蛋白基因, 并证实其功能与 G1 期到 S 期的转变有关。这些研究为了解东海原甲藻细胞周期特点及调控奠定基础, 但对于不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期进程的差异及其调控机制尚不能解析。

前期研究成果表明不同环境因子水平组合显著影响东海原甲藻细胞增殖速度(待发表), 基于此, 从中选择两种能够造成东海原甲藻细胞增殖速度显著差异的环境因子组合, 通过流式细胞检测技术对比分析了两实验组东海原甲藻细胞周期时相的差异; 利用转录组测序技术对比研究获得差异表达基因及参与途径; 鉴定与细胞周期相关的功能基因并解析其在细胞周期进程中的作用。本研究有助于深入理解外部环境如何通过影响藻细胞周期, 改变细胞增殖速度进而引发赤潮。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻种来源及同步化培养

东海原甲藻细胞购于上海光语生物科技有限公司。人工海水(盐度 30, pH 8.0)经 0.22 μm 混合纤维素滤膜过滤后, 121 °C 高温灭菌 20 min。待海水冷却后在超净工作台中加 f/2 培养基。随后加入卡那霉素、氨苄青霉素和链霉素, 终浓度依次为 50、50、25 μg/mL。配制完成后, 将藻细胞转移到培养液中。培养条件设置为温度 20 °C, 光照强度 37 μmol/(m<sup>2</sup>·s), 光暗比为 14 h : 10 h (光照时间 8:00~22:00, 黑暗时间 22:00~8:00)。

为使东海原甲藻细胞处于相同的细胞周期时相, 用连续黑暗处理的方法对藻细胞进行细胞周期同步化<sup>[13]</sup>。当藻细胞浓度长到  $1.5 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$  cells/mL 时, 用透气黑布对装有藻液的三角烧瓶进行避光处理, 连续避光培养 48 h, 完成细胞周期同步化。同步化效率用流式细胞仪进行检测。

### 1.2 实验设计与取样

根据前期正交试验结果(待发表), 分别选取东海原甲藻增殖速度较慢的环境因子组合(第 3 组)和增殖速度较快的环境因子组合(第 16 组)作为实验组。第 3 组的培养条件为: 光照强度 20 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、

盐度 25、pH 8.5、温度 25 °C、N/P (NO<sup>3-</sup>-N 浓度与 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P 浓度摩尔比) 32; 第 16 组的培养条件为: 光照强度 160 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、盐度 30、pH 7.5、温度 25 °C、N/P16。基于近年来我国东海海域中 NO<sup>3-</sup>-N 浓度, 将实验组培养基中 NO<sup>3-</sup>-N 浓度固定设置为 60 μmol/L。

同步化处理完成后的第 2 天进行转接。取 2 L 藻液, 4 °C 下 5500 g 离心 5 min, 去除上清后将藻细胞分别转移到已配制好的两实验组 3 L 新鲜培养液中, 使接种密度为  $1.2 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^5$  cells/mL, 随后将东海原甲藻细胞置于两种不同环境条件下培养 24 h 并取样。

**1.2.1 细胞计数取样** 转接当天的 18:00 开始取样, 每 2 h 取样 1 次。用 Lugol's 碘液固定 1 mL 藻细胞并用浮游植物计数板在光学显微镜下计数, 重复 2 次, 取平均值。

**1.2.2 细胞周期取样** 转接当天的 20:00 开始, 每 2 h 取样 1 次, 取 50 mL 藻液, 5500 g, 4 °C, 离心 5 min 弃去上清, 加入 1 mL PBS (Gibco™, USA) 重悬细胞。将 3 mL 经 -20 °C 预冷的无水乙醇缓慢加入细胞悬液中, -20 °C 固定过夜。固定好后 4 °C 下 5500 g 离心弃去上清。用 PBS 洗涤一次, 重复离心步骤弃去上清。加入 1 mL DNA staining solution (联科生物, 中国), 涡旋振荡 5~10 s 混匀。室温避光孵育 30 min, 使用 Attune NxT 流式细胞仪(Thermo Fisher, USA) 检测两实验组东海原甲藻细胞周期时相。

**1.2.3 转录组测序取样** 分别取第 3 组和第 16 组转接前(18:00), 转接后 19:00、8:00、10:00、14:00 共 10 个实验组的藻细胞样品。按时间先后顺序, 第 3 组的样品分别记为 C1、C2、C3、C4、C5, 第 16 组的样品分别记为 T1、T2、T3、T4、T5。收集的藻液于 4 °C 下 5500 g 离心 5 min 后去除培养基, 保留藻细胞, 速冻于液氮中。于 -80 °C 下保存备用, 每组样品设置 3 个平行样。

### 1.3 RNA 文库构建和测序

使用 Invitrogen TRIzol 试剂盒提取总 RNA。总 RNA 质量用琼脂糖凝胶电泳和 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测。检测合格后, 构建文库并进行质检与测序。

#### 1.4 原始数据的处理与拼接

测序完成后, 过滤、整理原始下机数据, 去除带接头、长度小于 50 bp、序列平均质量在 Q20 以下的 read, 并进行有效数据统计。随后使用 Trinity 2.15.1 软件对得到的高质量序列进行从头拼接得到 Unigene 集。

#### 1.5 基因功能注释

Unigene 基因功能注释所用到的数据库包括 NR (NCBI non-redundant protein sequences)、GO (gene ontology)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genome)、eggNOG (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups)、Swiss-Prot 和 Pfam。

#### 1.6 差异表达分析

使用转录组表达定量软件 RSEM 计算每个基因的 FPKM 值(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)。随后采用 DESeq 筛选出表达量差异显著的基因, 即表达差异倍数  $|\log_2 \text{foldchange}| > 1$ , 显著性  $P < 0.05$ 。使用 topGO 进行 GO 富集分析, 通过超几何分布方法计算  $P$ , 显著富集的标准为  $P < 0.05$ 。

#### 1.7 与细胞周期调控相关的差异表达基因筛选及验证

通过 DESeq 筛选出两实验组中与细胞周期调

控相关的表达量有差异显著的基因共 10 个, 为 cyclin A1-1 基因(CYCA, TRINITY\_DN37763\_c0\_g1)、G2/mitotic-specific cyclin-B 基因 (CYCB, TRINITY\_DN30072\_c0\_g2)、cyclin-U4-1 基因 (CYCU, TRINITY\_DN17614\_c0\_g1)、2 个 cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)基因(TRINITY\_DN7569\_c3\_g1、TRINITY\_DN56240\_c0\_g1)、4 个 cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)基因(TRINITY\_DN40606\_c0\_g1、TRINITY\_DN478\_c2\_g1、TRINITY\_DN59034\_c0\_g1、TRINITY\_DN11316\_c0\_g1)和 Cdc48 基因 (TRINITY\_DN12999\_c0\_g2)。

相较于转录组数据中基因的 FPKM 值而言, 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术通过与稳定的内参基因相比较, 能更加准确地反映差异基因的表达水平<sup>[14]</sup>。因此, 通过 qRT-PCR 技术分别对上述 10 个基因在第 3 组和第 16 组中的表达谱进行验证。目标基因验证引物用 Primer Premier 6.25 设计, 以东海原甲藻甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因为内参基因<sup>[7]</sup>。由上海派森诺生物科技股份有限公司合成(表 1)。RNA 提取完成后逆转录成 cDNA 链, 以 cDNA 为模板进行扩增, 每个样品设置 3 个重复。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行基因相

表 1 不同增殖速度的东海原甲藻差异表达基因的 qRT-PCR 验证引物序列信息

Tab. 1 qRT-PCR validation primer sequences for differentially expressed genes of *Prorocentrum donghaiense* with different proliferation rates

基因 gene	unigene ID	序列信息 sequence information	退火温度/°C $T_m$
CYCA	TRINITY_DN37763_c0_g1	F: AGATACTCGACCGCTACTGC R: TGCAGACCTTGTGAATTCC	60
CYCB	TRINITY_DN30072_c0_g2	F: AATTCTAGTGACTGGTT R: GATGTTGATTGTGAGGAA	62
CYCU	TRINITY_DN17614_c0_g1	F: TTCTATGACGACACCTACTA R: CTTGTTCAGGTCTTCAC	60
CDK1	TRINITY_DN7569_c3_g1	F: ACCATCTTCAGGATCATG R: GTAATTGGGCTCCAGAG	60
CDK1	TRINITY_DN56240_c0_g1	F: GTCACAGGAAGGAGGGTA R: TGGAGTCCGTTGATAAGGT	60
CDK2	TRINITY_DN40606_c0_g1	F: CCTCAAGATCTGCGATTTC R: TGTGGGGTAGGTGATG	60
CDK2	TRINITY_DN478_c2_g1	F: ATCCATCGTGACCTCAAG R: GAGTCGAAATCGCAGAT	62

(待续 to be continued)

(续表1 Tab. 1 continued)

基因 gene	unigene ID	序列信息 sequence information	退火温度/℃ $T_m$
CDK2	TRINITY_DN59034_c0_g1	F: GCGAGTCCTCCAGTAT R: GCGATGGATGATGTTACGA	60
CDK2	TRINITY_DN11316_c0_g1	F: GCTCGCCTCATTATTCTAT R: GAAGTCGCAGATCTTGAG	60
Cdc48	TRINITY_DN12999_c0_g2	F: AAGAGGTGGAGAAGAATGC R: TGGCTTGTCAACTTGG	60
GADPH	-	F: GTGTTCTYACCGACGAGAAGATC R: CGCARTTCATGTCAGTCTGTAGG	60

对表达量计算,  $\Delta C_t$ =目标基因  $C_t$  值-GAPDH 基因  $C_t$  值。

### 1.8 数据分析

鉴于样本量较小, 使用 IBM SPSS Statistics 29.0.2.0 软件中非参数检验方法(Mann-Whitney U test)对数据进行差异显著性分析。使用 R 语言 4.2.2 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同环境条件下东海原甲藻 24 h 内细胞密度变化

由图 1 可知, 两实验组东海原甲藻培养初始密度无显著性差异( $P>0.05$ )。转接 24 h 后, 第 16 组的细胞密度相较于初始密度显著增加( $P<0.01$ ), 增加幅度为 59.32%; 第 3 组的细胞密度相较于初始密度增加( $P<0.05$ ), 增加幅度为 17.02%; 此时两组细胞密度差异显著( $P<0.05$ )。培养过程中, 第 16 组细胞密度在 2:00~10:00 呈明显上升趋势,

10:00 其细胞密度达到峰值, 与初始密度相比增长 73.60%。

### 2.2 不同增殖速度的东海原甲藻 24 h 内细胞周期

由图 2 可知, 通过连续黑暗处理使东海原甲藻细胞同步化后, 藻细胞同步性良好, 在接入两实验组培养基时, 细胞周期时相 100%集中在 G1 期。转接后的 24 h 内, 两组细胞的细胞周期进程存在差异。两实验组 S 期的细胞占比呈先上升后下降的趋势, 至 4:00 均达到峰值。不同的是, 第 16 组在 24:00 有 0.94% 的细胞进入 S 期, 比第 3 组细胞提前 2 h; 第 3 组在 10:00 S 期的细胞周期占比降为 0, 而第 16 组在 14:00 占比降为 0。总体来看, 第 16 组 S 期时长比第 3 组多 6 h。

此外, 两实验组 G1 期和 G2/M 期细胞占比变化情况也有所不同(图 2)。随着细胞进入 S 期, 第 16 组 G1 期细胞占比相较第 3 组提前 2 h 开始下降, 至 4:00 均达到最低值后 G1 期细胞占比开始上升。然而, 第 3 组在 6:00 至 8:00 上升幅度大于

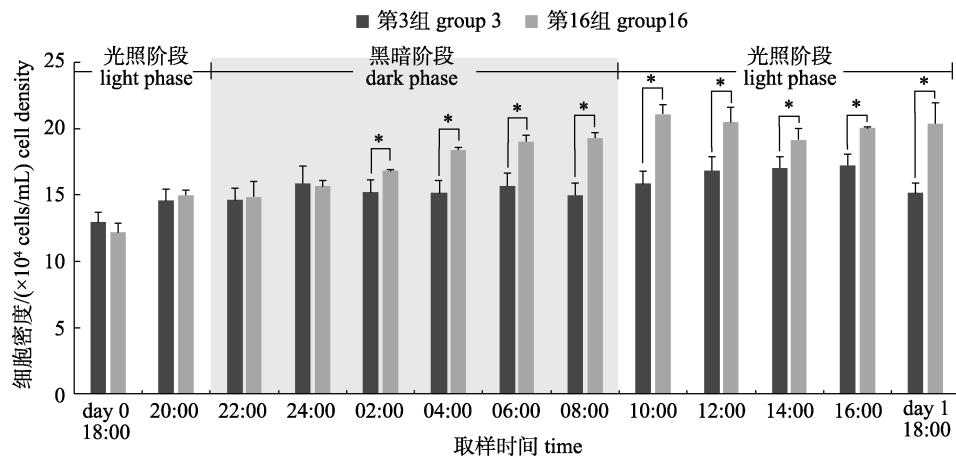


图 1 不同环境条件下东海原甲藻 24 h 内细胞密度变化

Fig. 1 Changes of cell density of *Prorocentrum donghaiense* during 24 h under different environmental conditions

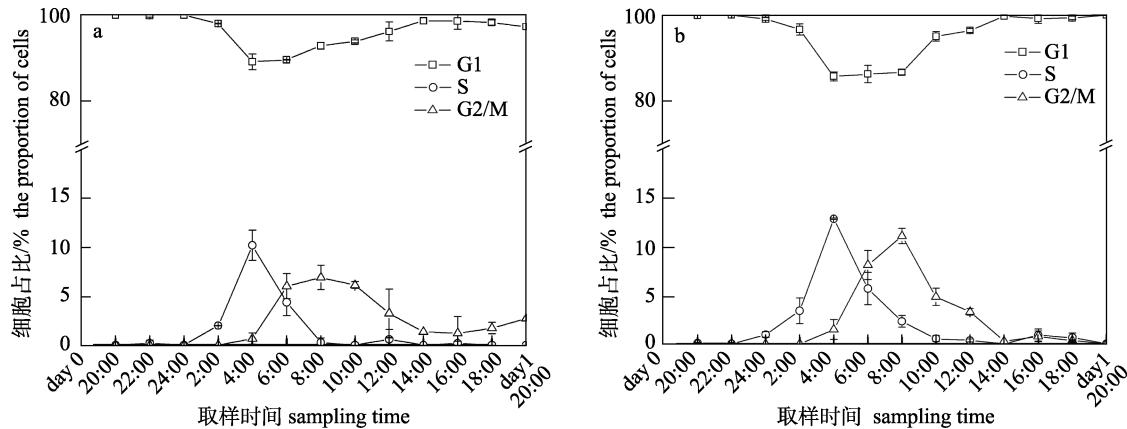


图 2 不同增殖速度的东海原甲藻细胞 24 h 内周期各时相占比

a: 第 3 组; b: 第 16 组.

Fig. 2 The proportion of *Prorocentrum donghaiense* cells with different proliferation rates in different cell cycle phases during 24 h  
a: Group 3; b: Group 16.

第 16 组, 且 8:00 第 3 组 G1 期细胞占比(92.83%)显著高于第 16 组(86.62%)( $P<0.01$ )。第 16 组在 8:00~10:00 G1 期细胞占比显著升高( $P<0.01$ ), 随后逐渐升高直至第 2 天 20:00 占比为 100%。两实验组至 4:00 起均有部分细胞进入 G2/M 期, G2/M 期细胞占比在 8:00 达到峰值, 且此时第 16 组的 G2/M 期细胞占比峰值高于第 3 组( $P<0.05$ )。第 16 组细胞在 14:00 至 20:00 细胞几乎全部进入 G1 期; 而第 3 组细胞从 14:00 开始至培养结束均有超过 1.3% 的细胞处在 G2/M 期。

### 2.3 测序与组装结果

两实验组的 10 个样品经过上机测序后生成原始读序(raw reads), 经过滤、整理、拼接后得到了 362814 个转录本, 总长度 378800006 bp, 平均长度 1044.06 bp, N50 为 1444 bp, GC 含量 64.26%。并得到 149219 个 unigene, 总长度 155893105 bp, 平均长度 1044.73 bp, N50 为 1501 bp, GC 含量 64.07% (表 2)。测序与组装结果符合后续注释分析的要求。原始数据上传至 NCBI 数据库, 序列登录号为 PRJNA1125908。

### 2.4 细胞周期相关蛋白基因汇总

细胞周期调控蛋白确保浮游植物细胞周期各时相有序正确完成, 这些蛋白包括细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)、细胞分裂周期蛋白(cell division cycle protein, Cdc)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CDK inhibitor, CKI)等<sup>[2]</sup>。

表 2 不同增殖速度的东海原甲藻细胞测序拼接后转录本结果统计

Tab. 2 Statistical analysis of transcriptome results of *Prorocentrum donghaiense* with different proliferation rates

项目名称 name	转录本 transcript	单基因 unigene
序列总长度/bp total length	378800006	155893105
序列总数 total number	362814	149219
最大序列长度/bp maximum length	35528	35528
平均序列长度/bp mean length	1044.06	1044.73
N50/bp	1444	1501
L50	82354	32936
N90/bp	473	452
L90	263068	106718
GC 比例/% GC ratio	64.26	64.07

在东海原甲藻中注释到多种细胞周期相关蛋白基因, 包括 49 个 cyclin 基因、74 个 CDK 基因、26 个 CDC 基因、11 个 PCNA 基因(表 3)。细胞周期蛋白基因共分为 11 类, 其中 CYCU 和 CYCB 数量最多, 分别注释到 16 个和 12 个 unigene。细胞周期蛋白依赖性激酶基因共分为 16 类, 其中 Cdc2 属于 CDK1 的一种<sup>[15]</sup>。在所有 CDK 基因中, Cdc2 数量最多, 共注释到 16 个 unigene。细胞分裂周期蛋白基因共分为 8 类, 其中 Cdc48 数量最多, 共注释到 15 个 unigene。增殖细胞核抗原基因共注释到 2 类, PCNA 和 PCNA2, 分别注释到 10 个和 1 个 unigene。由于浮游植物细胞周期调控蛋

**表3 东海原甲藻细胞周期相关蛋白基因注释汇总**  
**Tab. 3 Summary of the annotated cell cycle protein genes in *Prorocentrum donghaiense***

注释 annotation	单基因 数量 unigene number
细胞周期蛋白 cyclin	
细胞周期蛋白 A cyclin A	5
G2/M 期特定细胞周期蛋白 B G2/mitotic-specific cyclin-B	12
细胞周期蛋白 D cyclin D	1
细胞周期蛋白 H cyclin H	1
细胞周期蛋白 L cyclin L	2
细胞周期蛋白 P cyclin P	4
细胞周期蛋白 Q cyclin Q	1
细胞周期蛋白 U cyclin U	16
细胞周期蛋白 Y cyclin Y	5
细胞周期蛋白 1 cyclin 1	1
细胞周期蛋白 pch1 cyclin pch1	1
细胞周期蛋白依赖性激酶 cyclin-dependent kinases	
细胞周期蛋白依赖性激酶 1 cyclin-dependent kinase 1	14
细胞分裂周期蛋白 2 cell division cycle protein 2	16
细胞周期蛋白依赖性蛋白样激酶 1 cyclin-dependent kinase-like 1	1
细胞周期蛋白依赖性激酶 2 cyclin-dependent kinase 2	7
细胞周期蛋白依赖性蛋白样激酶 2 cyclin-dependent kinase-like 2	1
细胞周期蛋白依赖性激酶 3 cyclin-dependent kinase 3	7
细胞周期蛋白依赖性激酶 5 cyclin-dependent kinase 5	2
细胞周期蛋白依赖性蛋白样激酶 5 cyclin-dependent kinase-like 5	6
细胞周期蛋白依赖性激酶 10 cyclin-dependent kinase 10	1
细胞周期蛋白依赖性激酶 20 cyclin-dependent kinase 20	3
细胞周期蛋白依赖性激酶 A cyclin-dependent kinase A	1
细胞周期蛋白依赖性激酶 B cyclin-dependent kinase B	2
细胞周期蛋白依赖性激酶 C cyclin-dependent kinase C	1
细胞周期蛋白依赖性激酶 D cyclin-dependent kinase D	2
细胞周期蛋白依赖性激酶 F cyclin-dependent kinase F	8
细胞周期蛋白依赖性激酶 G cyclin-dependent kinase G	2
细胞分裂周期蛋白 cell division cycle protein	
细胞分裂周期蛋白 15 cell division cycle protein 15	2
细胞分裂周期蛋白 18 cell division cycle protein 18	1
细胞分裂周期蛋白 27 cell division cycle protein 27	2
细胞分裂周期蛋白 31 cell division cycle protein 31	2
细胞分裂周期蛋白 45 cell division cycle protein 45	1
细胞分裂周期蛋白 48 cell division cycle protein 48	15
细胞分裂周期蛋白 73 cell division cycle protein 73	1
细胞分裂周期蛋白 123 cell division cycle protein 123	2
增殖细胞核抗原 proliferating cell nuclear antigen	
增殖细胞核抗原 1 proliferating cell nuclear antigen 1	10
增殖细胞核抗原 2 proliferating cell nuclear antigen 2	1

白基因研究背景相对较弱, 本研究中转录组未注释到编码 CKI 基因。

## 2.5 差异表达基因数据统计

根据第3组和第16组细胞周期时相存在差异的时间点, 两两比较两实验组接种后 8:00 (C3、T3)、10:00 (C4、T4)和 14:00 (C5、T5)的基因表达量, 统计差异表达基因数量和差异表达基因的 GO 富集分类(表 4 和图 3)。

**表4 不同增殖速度的东海原甲藻细胞基因表达差异分析数据统计**

**Tab. 4 Statistical analysis of gene expression differences in *Prorocentrum donghaiense* cells with different proliferation rates**

对照组 control	处理组 treatment	上调基因 数量 up number	下调基因 数量 down number	差异表达 基因总数 DEG number
C3	T3	928	1687	2615
C4	T4	947	1736	2683
C5	T5	395	529	924

通过 GO 富集分析, T3 与 C3 相比富集程度较大且富集较为显著的 GO 分类依次为 ATP 酶活性、催化复合体、微管细胞骨架, 其次为超分子聚合物、超分子纤维、质膜边界细胞突起; T4 与 C4 相比富集程度较大且富集较为显著的前 3 种 GO 分类依次为有机环状化合物结合、杂环化合物结合、细胞骨架、催化复合体, 其次为微管细胞骨架、超分子聚合物、超分子纤维; T5 与 C5 相比, 上调基因数量与下调基因数量相较于前两个时间段均下降, 富集程度较大且富集较为显著的前 3 种 GO 分类依次为质膜边界细胞突起组织、微管束的形成、蛋白质发色团连接, 其次为纤毛依赖性细胞运动、纤毛或鞭毛依赖的细胞运动、鞭毛轴丝装配。

## 2.6 细胞周期调控蛋白基因的表达差异验证

在注释到的 49 个编码细胞周期蛋白的基因中, 两实验组差异表达的基因有 3 个, 即 CYCA、CYCB 和 CYCU。实时荧光定量 PCR 验证结果表明, 第 16 组中 CYCA 和 CYCB 相对表达量在转接后均呈现“先升后降”的趋势, 第 3 组中 CYCA 相对表达量在转接后呈现“先升后降又升”的趋势, CYCB 相对表达量与第 16 组一样在转接后呈现“先升后降”的趋势(图 4a, 图 4b)。第 3 组中 CYCA

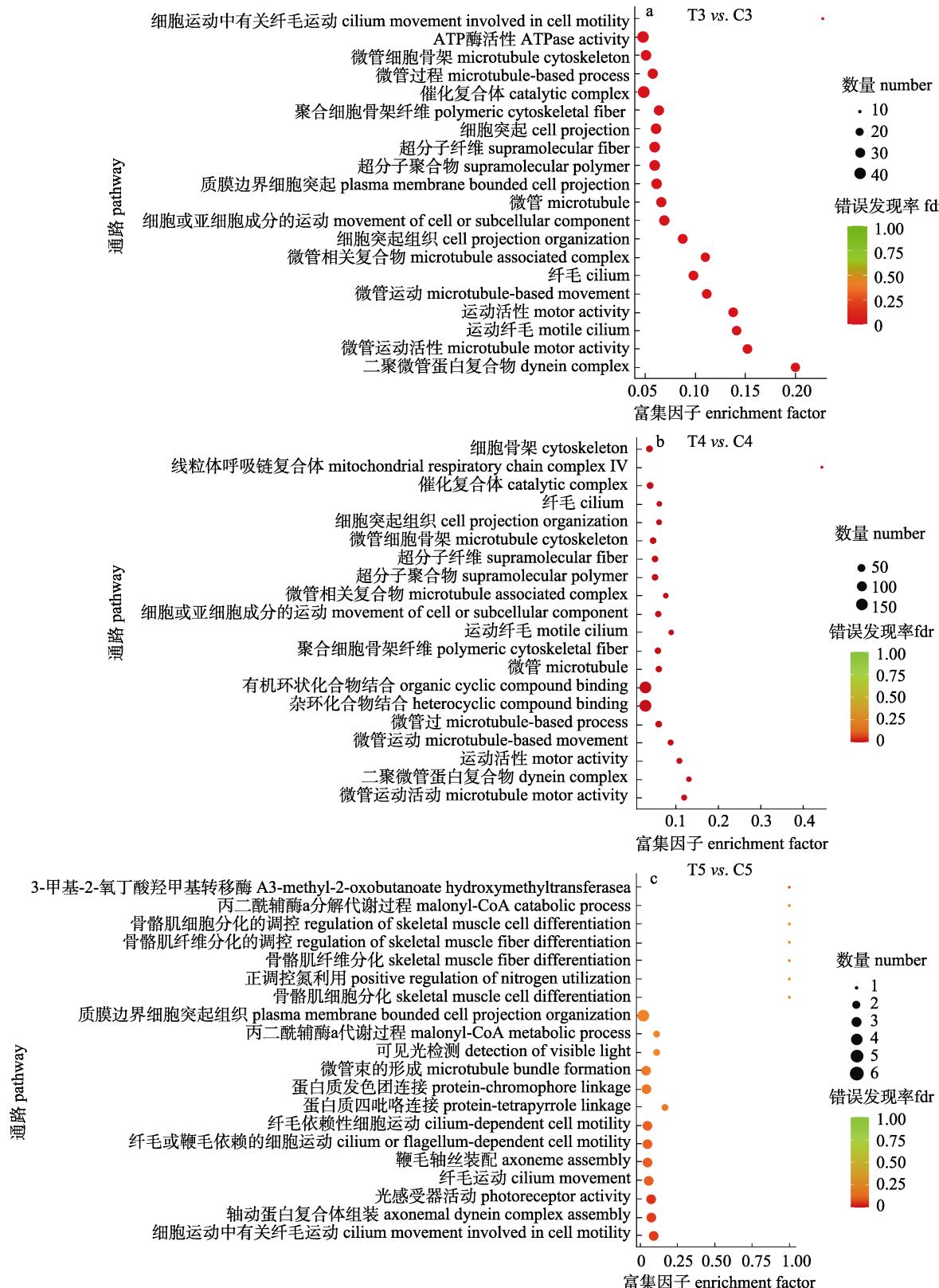


图3 不同增殖速度的东海原甲藻细胞差异表达基因GO富集分析气泡图

Fig. 3 Bubble diagram of GO enrichment analysis of differentially expressed genes in *Prorocentrum donghaiense* cells with different proliferation rates  
 a. T3 vs. C3; b. T4 vs. C4; c. T5 vs. C5.

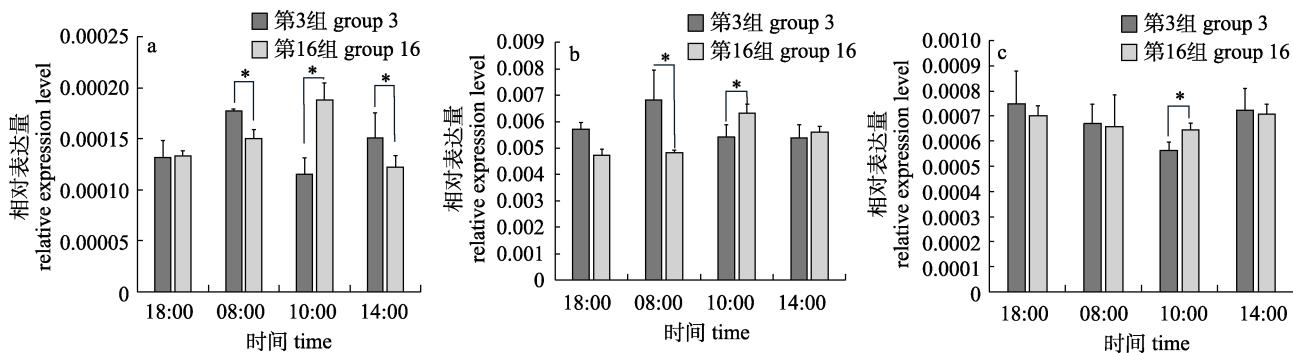


图 4 不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期蛋白差异表达基因表达模式

a. CYCA; b. CYCB; c. CYCU. \*表示差异显著( $P<0.05$ )。Fig. 4 Transcriptional profile of the differentially expressed genes encoding cyclin in *Prorocentrum**donghaiense* cells with different proliferation ratesa. CYCA; b. CYCB; c. CYCU. \* indicates significant difference ( $P<0.05$ ).

和 CYCB 相对表达量在 8:00 升高, 且此时这两个基因的相对表达量分别显著高于第 16 组中 CYCA 和 CYCB 的相对表达量( $P<0.05$ ); 第 16 组中 CYCA 和 CYCB 相对表达量在 10:00 升高, 且此时这两个基因的相对表达量分别显著高于第 3 组中 CYCA 和 CYCB 的相对表达量( $P<0.05$ )。CYCU 的相对表达量则表现为“先降后升”的趋势, 两实验组中 CYCU 的相对表达量最低值均出现在 10:00, 且此时第 16 组 CYCU 的相对表达量显著高于第 3 组( $P<0.05$ )。

在注释到的 74 个编码细胞周期蛋白依赖性激酶基因中, 两实验组差异表达的基因有 6 个, 包括 2 个 CDK1 基因、4 个 CDK2 基因。CDK1 基因 TRINITY\_DN7569\_c3\_g1 的相对表达量在第 3 组和第 16 组中均呈“先升后降”的趋势, 第 3 组中其最高值出现在 8:00, 第 16 组中出现在 10:00, 且此时其相对表达量显著高于第 3 组( $P<0.05$ )(图 5a)。CDK1 基因 TRINITY\_DN56240\_c0\_g1 的相对表达量在第 3 组中呈“先升后降”的趋势, 在第 16 组中则表达稳定, 且在接种后的 3 个时间点时第 3 组的相对表达量均显著高于第 16 组( $P<0.05$ )(图 5b)。编码 CDK2 的 4 个基因在第 16 组中均呈“先升后降”的趋势, 且接种后基因相对表达量最低值均出现在 14:00。然而, 这 4 个基因在第 3 组的表达模式则各有不同。CDK2 基因 TRINITY\_DN40606\_c0\_g1 在第 3 组中“先降后升”,

8:00 和 10:00 是其相对表达量显著低于第 16 组( $P<0.05$ )。CDK2 基因 TRINITY\_DN478\_c2\_g1 和 TRINITY\_DN11316\_c0\_g1 在第 3 组接种后两个时间点的相对表达量变化不大, 相对表达量在 10:00 均显著低于第 16 组( $P<0.05$ ); 在 14:00 相对表达量升高, 并显著高于第 16 组( $P<0.05$ )(图 5d 和图 5e)。第 3 组中 CDK2 基因 TRINITY\_DN59034\_c0\_g1 相对表达量在 8:00 升高后变化不大, 其相对表达量在 10:00 显著低于第 16 组, 在 14:00 则显著高于第 16 组(图 5f)。

注释到的 26 个编码细胞分裂周期蛋白基因中, 在两实验组中差异表达的基因有 1 个(图 6), 即 *Cdc48*。第 3 组中 *Cdc48* 的相对表达量较为稳定。在第 16 组中其相对表达量在 10:00 升高, 并显著高于第 3 组( $P<0.05$ ), 至 14:00, 其相对表达量下降至初始水平。

### 3 讨论

#### 3.1 细胞周期进程与增殖速度的关系

目前实现东海原甲藻细胞同步化的方法有多种, 包括一次性光限制同步化、连续光限制同步化、离心同步化、周期垂直移动同步化和黑暗诱导同步化等<sup>[9,13]</sup>。本研究使用黑暗诱导同步化方法使细胞 100%集中在 G1 期, 结果与李美贞<sup>[13]</sup>的研究结果一致, 表明实验用东海原甲藻的细胞同步化良好。

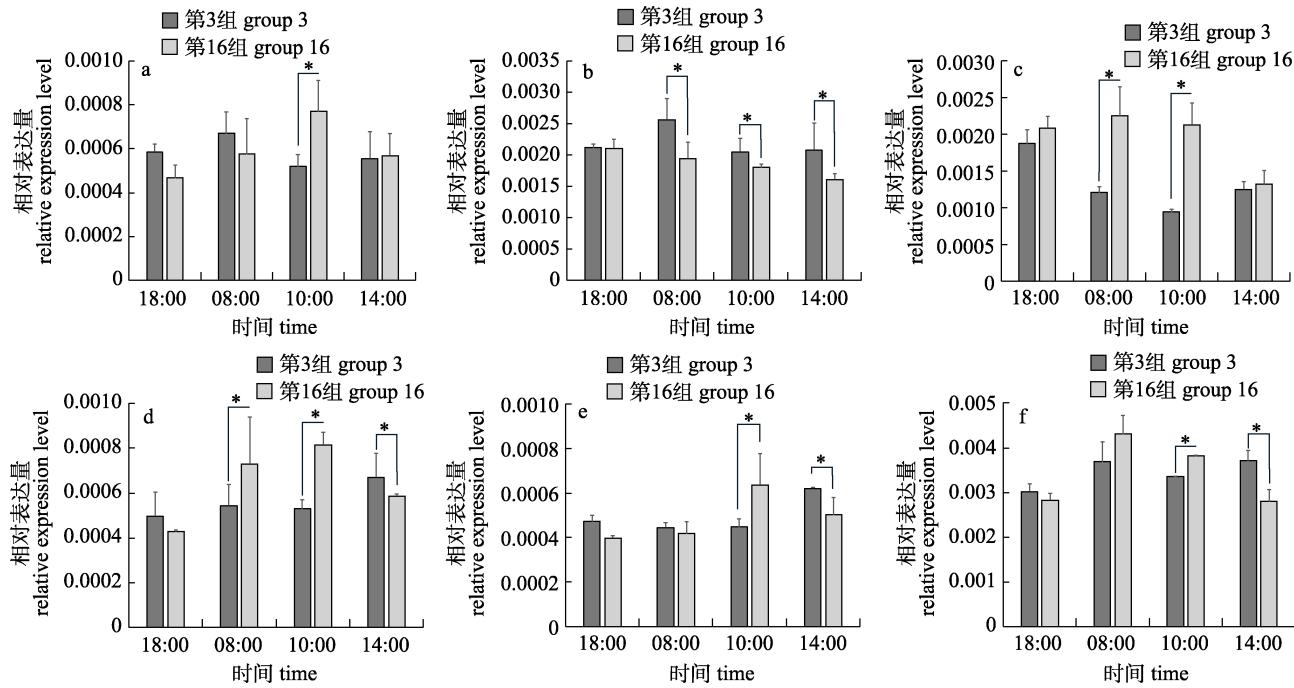


图5 不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期蛋白依赖性激酶差异表达基因表达模式

a. *CDK1* (TRINITY\_DN7569\_c3\_g1); b. *CDK1* (TRINITY\_DN56240\_c0\_g1); c. *CDK2* (TRINITY\_DN40606\_c0\_g1);  
d. *CDK2* (TRINITY\_DN478\_c2\_g1); e. *CDK2* (TRINITY\_DN11316\_c0\_g1); f. *CDK2* (TRINITY\_DN59034\_c0\_g1).

\*表示差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 5 Transcriptional profile of the differentially expressed genes encoding cyclin-dependent kinases in *Prorocentrum donghaiense* cells with different proliferation rates

a. *CDK1* (TRINITY\_DN7569\_c3\_g1); b. *CDK1* (TRINITY\_DN56240\_c0\_g1); c. *CDK2* (TRINITY\_DN40606\_c0\_g1);  
d. *CDK2* (TRINITY\_DN478\_c2\_g1); e. *CDK2* (TRINITY\_DN11316\_c0\_g1); f. *CDK2* (TRINITY\_DN59034\_c0\_g1).

\* indicates significant difference ( $P<0.05$ ).

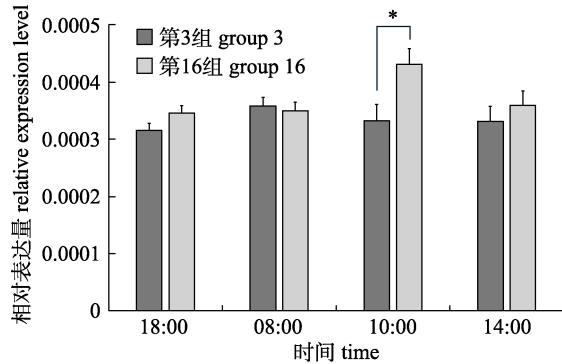


图6 不同增殖速度的东海原甲藻细胞分裂周期蛋白 *Cdc48* 差异表达基因表达模式

\*表示差异显著( $P<0.05$ )。

Fig. 6 Transcriptional profile of the differentially expressed genes encoding cell division cycle protein *Cdc48* in *Prorocentrum donghaiense* cells with different proliferation rates  
\* indicates significant difference ( $P<0.05$ ).

根据细胞周期时相检测发现，在8:00东海原甲藻G2/M期细胞占比最高，结合细胞密度在

10:00达到峰值推测该藻细胞分裂主要在8:00，此时细胞处于G2/M期<sup>[8]</sup>。然而，增殖速度较快的实验组(第16组)在8:00 G2/M期细胞占比显著高于增殖速度较慢的实验组(第3组)。第16组在10:00 G2/M期细胞占比下降幅度和G1期细胞占比上升幅度显著大于第3组，且第3组在8:00 G1期细胞占比开始上升，表明两实验组由G2/M期到G1期过渡的时间有差异。同样，第16组细胞在14:00~20:00细胞几乎全部进入G1期；而第3组细胞从14:00开始至培养结束均有超过1.3%的细胞处在G2/M期，这表明此时两实验组进入G1期，而第3组有部分细胞阻滞在G2/M期，没有完成细胞分裂回到G1期。此外，第16组比第3组细胞提前2 h进入S期，且S期时长比第3组多6 h。在李美贞<sup>[13]</sup>与张英娇<sup>[9]</sup>的研究中，增殖速度与16组接近的实验组，东海原甲藻的S期时长为14 h，与本研究结果相一致。因此，第3组的S期时长

更短, 从而导致进入 G2/M 期的细胞较少。综上所述, 两组细胞增殖速度的差异与第 3 组 S 期更短及 G2/M 期阻滞有关。

### 3.2 细胞周期相关基因对细胞周期的调控

根据细胞周期时相比较可知, 第 16 组和第 3 组在 8:00、10:00 和 14:00 这 3 个时间点细胞周期时相差异显著。因此, 对这 3 个时间点两实验组的转录组比较分析发现, 差异表达基因富集程度最大且富集最显著的 GO 分类均与微管和细胞骨架有关。微管是细胞骨架的重要组成部分, 与细胞内物质运输、细胞运动及纺锤体组装、染色体分离等有丝分裂过程密切相关, 微管的解聚与重组在整个细胞周期进程中起着重要作用<sup>[16-19]</sup>。通过微管抑制剂或 RNAi 技术降低微管蛋白基因表达量会使浮游植物细胞周期阻滞从而影响细胞分裂<sup>[20-22]</sup>。此外, 一些微管蛋白可通过调节 cyclin 蛋白或 Cdc 蛋白直接参与细胞周期进程的控制, 部分 Cdc 蛋白也可以调节微管动态变化<sup>[23-24]</sup>。因此, 细胞中的微管动态变化不同可引起两实验组细胞周期进程的差异。

细胞周期蛋白与细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞分裂控制蛋白相互作用共同调控细胞周期 G1/S 期的转变及 G2/M 期的转变<sup>[9,25]</sup>。CDK 蛋白是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 有着多种保守顺序, 包括 PSTAIRE、PCTAIRE、PSTALRE 等, 其活性在整个细胞周期进程中动态变化<sup>[26-27]</sup>。*CDK1* 与 *CYCB* 共同参与 G2 期到 M 期转变的调节<sup>[25,28]</sup>。本研究中, *CDK1* 基因 TRINITY\_DN56240\_c0\_g1 在第 16 组中表达稳定, 且其相对表达量在接种后的 3 个时间点时均为第 3 组显著高于第 16 组 ( $P<0.05$ )。然而, *CDK1* 基因 TRINITY\_DN7569\_c3\_g1 在第 16 组则“先升后降”, 且在 10:00 其相对表达量显著高于第 3 组, 与 *CYCB* 基因的表达模式一致。由于第 3 组部分藻细胞阻滞在 G2/M 期, 当细胞阻滞在 G2 期时, 需要足够量的 CDK 活性来维持 G2-specific 基因的转录水平, 如 *CYCA* 和 *CYCB* 等, 待环境适宜时继续进行分裂<sup>[29]</sup>。因此, *CDK1* 基因 TRINITY\_DN56240\_c0\_g1 和 TRINITY\_DN7569\_c3\_g1 在细胞阻滞在 G2/M 期时均发挥功能, 而当藻细胞由 G2 期向 M 期顺利转变时仅需

后者发挥作用。

*CYCA* 与 *CDK2* 能够形成复合体并在 S 期早期和 G2 期被激活<sup>[30]</sup>。东海原甲藻暴发时, *CDK2* 蛋白在 G2/M 期表达量最低, 而在 G1 后期和 S 期表达量较高<sup>[31]</sup>。此外, *CYCU* 在细胞周期中的 G1/S 期发挥调控作用, *CYCU/CDKA* 复合体能够促进 DNA 复制<sup>[32]</sup>。第 3 组藻细胞 S 期结束于 10:00, 而此时第 16 组仍有 2.31% 的藻细胞处于 S 期。因此, 10:00 *CYCA* 基因、*CYCU* 基因和 4 个编码 *CDK2* 蛋白的基因相对转录量均为第 16 组显著高于第 3 组, 它们在 S 期的延长中起到了重要作用。

*Cdc48* 最初是从温度敏感型裂殖酵母中分离得到的, 是 AAA (ATPase associated with various cellular activities) 超家族成员之一<sup>[33]</sup>。*Cdc48* 参与 DNA 的复制和修复, 对基因组稳定性和细胞活力至关重要<sup>[33]</sup>。Zhang 等<sup>[31]</sup> 在东海原甲藻中鉴定了 *Cdc48* 蛋白, 其在 S 期表达量最高, 与 DNA 复制密切相关。第 16 组中 *Cdc48* 基因表达量在 10:00 显著高于第 3 组, 使得第 16 组细胞 S 期较第 3 组更长。

## 4 结论

本研究利用流式细胞仪研究了不同增殖速度的东海原甲藻细胞周期的时相分布特点: 增殖速度较慢的实验组的 S 期时长更短, 且部分细胞会阻滞在 G2/M 期。结合细胞周期时相分布, 通过转录组测序以及 qRT-PCR 技术验证发现了 1 个 *CYCB* 和 2 个 *CDK1* 基因与调节东海原甲藻 G2/M 期阻滞有关, 1 个 *CYCA*、1 个 *CYCU*、4 个 *CDK2* 和 1 个 *Cdc48* 基因与藻细胞的 S 期进程调控有关。本研究仅对 10 个通过转录组技术鉴定出的差异基因的表达量进行 qRT-PCR 验证, 其他与细胞周期有关的基因仍需要进一步验证表达模式并进行后续的功能分析。

## 参考文献:

- [1] Lu S H, Ou L J, Dai X F, et al. An overview of *Prorocentrum donghaiense* blooms in China: Species identification, occurrences, ecological consequences, and factors regulating prevalence[J]. Harmful Algae, 2022, 114: 102207.
- [2] Zhao P Z, Ouyang L L, Shen A L, et al. The cell cycle of phytoplankton: A review[J]. Journal of the World Aquacul-

- ture Society, 2022, 53(4): 799-815.
- [3] Vítová M, Bišová K, Hlavová M, et al. *Chlamydomonas reinhardtii*: Duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by temperature[J]. *Planta*, 2011, 234(3): 599-608.
- [4] Cepák V, Přibyl P, Vítová M, et al. The nucleocytosolic and chloroplast cycle in the green chlorococcal alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae, Chlorococcales) grown under various temperatures[J]. *Phycologia*, 2007, 46(3): 263-269.
- [5] Liu Q, Zhang X F, Li T W, et al. Effect of light on growth rate, chlorophyll level and cell cycle in four alga species[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2006, 21(1): 24-30. [刘青, 张晓芳, 李太武, 等. 光照对4种单胞藻生长速率、叶绿素含量及细胞周期的影响[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 24-30.]
- [6] Chen D D, Wang P, Gao Y H, et al. Fitting relationships of silicon uptake and silicification with cell cycle in *Thalassiosira pseudonana*[J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(9): 931-935. [陈丹丹, 王鹏, 高亚辉, 等. 假微型海链藻硅吸收及硅化作用与细胞周期偶合关系的研究[J]. 自然科学进展, 2009, 19(9): 931-935.]
- [7] Shi X G, Ma M L, Lin S J. Cell cycle-dependent expression dynamics of G1/S specific cyclin, cellulose synthase and cellulase in the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1118.
- [8] Wang D Z, Zhang Y J, Zhang S F, et al. Quantitative proteomic analysis of cell cycle of the dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* (Dinophyceae)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63659.
- [9] Zhang Y J. Quantitative proteomic study of cell cycle regulation in Marine dinoflagellates: A case study of *Prorocentrum donghaiense*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2013. [张英娇. 海洋甲藻细胞周期调控的定量蛋白组学研究—以东海原甲藻为例[D]. 厦门: 厦门大学, 2013.]
- [10] Lin L. Studies on species-specific and physiological biomarkers of key harmful algal bloom species from the coast of China Sea[D]. Xiamen: Xiamen University, 2007. [林琳. 中国近海典型赤潮生物种间及生理指示生物标志物研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.]
- [11] Shi X G, Lin X, Li L, et al. Transcriptomic and microRNAomic profiling reveals multi-faceted mechanisms to cope with phosphate stress in a dinoflagellate[J]. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2017, 11(10): 2209-2218.
- [12] Zhang S F, Yuan C J, Chen Y, et al. Quantitative proteomics provides insight into the response of the marine dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* to changes in ambient phosphorus[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2022, 40(2): 563-576.
- [13] Li M Z. Effects of phosphorus deficiency and adenosine 5'-triphosphate (ATP) on growth and cell cycle of *Prorocentrum donghaiense* and *Amphidinium carterae* (Dinoflagellate)[D]. Xiamen: Xiamen University, 2017. [李美贞. 磷限制和三磷酸腺苷(ATP)对东海原甲藻和强壮前沟藻生长与细胞周期的影响[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.]
- [14] da Silva Santos P H, Manechini J R V, Brito M S, et al. Selection and validation of reference genes by RT-qPCR under photoperiodic induction of flowering in sugarcane (*Saccharum* spp. )[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: Article No.4589.
- [15] Nigg E A. Cyclin-dependent protein kinases: Key regulators of the eukaryotic cell cycle[J]. *BioEssays*, 1995, 17(6): 471-480.
- [16] Chen L, Fan D M, Tang J W, et al. Discovery of isopenicillin A, a meroterpenoid as a novel inhibitor of tubulin polymerization[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 525(2): 303-307.
- [17] Kume K, Nishikawa K, Furuyama R, et al. The fission yeast NDR kinase Orb6 and its signalling pathway MOR regulate cytoplasmic microtubule organization during the cell cycle[J]. *Open Biology*, 2024, 14(3): 230440.
- [18] Lucas J R. Appearance of microtubules at the cytokinesis to interphase transition in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cytoskeleton*, 2021, 78(7): 361-371.
- [19] Lin Y, Wei Y L, She Z Y. Kinesin-8 motors: Regulation of microtubule dynamics and chromosome movements[J]. *Chromosoma*, 2020, 129(2): 99-110.
- [20] Wong J T Y, Kwok A C M. Proliferation of dinoflagellates: Blooming or bleaching[J]. *BioEssays*, 2005, 27(7): 730-740.
- [21] Ng C K F, Lam C M C, Yeung P K K, et al. Flow cytometric analysis of nocodazole-induced cell-cycle arrest in the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1998, 10(6): 569-572.
- [22] Farnham G, Strittmatter M, Coelho S, et al. Gene silencing in *Fucus embryos*: Developmental consequences of RNAi-mediated cytoskeletal disruption[J]. *Journal of Phycology*, 2013, 49(5): 819-829.
- [23] Cuschieri L, Nguyen T, Vogel J. Control at the cell center: The role of spindle poles in cytoskeletal organization and cell cycle regulation[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(22): 2788-2794.

- [24] Lee K J, Zhou Q, Li Z Y. CRK2 controls cytoskeleton morphogenesis in *Trypanosoma brucei* by phosphorylating  $\beta$ -tubulin to regulate microtubule dynamics[J]. PLoS Pathogens, 2023, 19(3): e1011270.
- [25] Kalous J, Jansová D, Šušor A. Role of cyclin-dependent kinase 1 in translational regulation in the M-phase[J]. Cells, 2020, 9(7): 1568.
- [26] Gorman L M, Wilkinson S P, Kitchen S A, et al. Phylogenetic analysis of cell-cycle regulatory proteins within the Symbiodiniaceae[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): Article No.20473.
- [27] Oldenhof H, Bišová K, van den Ende H, et al. Effect of red and blue light on the timing of cyclin-dependent kinase activity and the timing of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(4): 341-348.
- [28] Ohba S, Tang Y J, Johannessen T C A, et al. PKM2 interacts with the Cdk1-CyclinB complex to facilitate cell cycle progression in gliomas[J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 844861.
- [29] Alvarez-Fernández M, Medema R H, Lindqvist A. Transcriptional regulation underlying recovery from a DNA damage-induced arrest[J]. Transcription, 2010, 1(1): 32-35.
- [30] Pagano M, Pepperkok R, Verde F, et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle[J]. The EMBO Journal, 1992, 11(3): 961-971.
- [31] Zhang H, Liu J L, He Y B, et al. Quantitative proteomics reveals the key molecular events occurring at different cell cycle phases of the *in situ* blooming dinoflagellate cells[J]. Science of the Total Environment, 2019, 676: 62-71.
- [32] Li J M, Nam K H. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase[J]. Science, 2002, 295(5558): 1299-1301.
- [33] Bègue H, Jeandroz S, Blanchard C, et al. Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta General Subjects, 2017, 1861(1): 3053-3060.

## Comparative analysis of the cell cycle progression and transcriptome of *Prorocentrum donghaiense* with different proliferation rates

ZHAO Pengzhen<sup>1,2</sup>, WANG Yunlong<sup>2</sup>, MA Xinyun<sup>1,2</sup>, QUAN Weimin<sup>2</sup>, LI Nannan<sup>2</sup>, CHEN Yuange<sup>2</sup>, FAN Ruiliang<sup>2</sup>, ZHANG Haiyan<sup>2</sup>, XU Qing<sup>3</sup>, OUYANG Longling<sup>2</sup>

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

3. Ningbo Marine Center, Ministry of Natural Resources, Ningbo 315012, China

**Abstract:** *Prorocentrum donghaiense* is one of the main red tide organisms in China's coastal waters. It is characterized by frequent outbreaks, a large area of influence, and serious harm. The cell cycle is an important biological process that regulates cell division. It can be affected by environmental factors, resulting in changes in the growth rate of phytoplankton. Therefore, it is valuable to investigate the differences in the cell cycle progression of *P. donghaiense* with different proliferation rates to help understand its proliferation characteristics. The cell cycle pattern of *P. donghaiense* has been preliminary explored. Genes and proteins related to the cell cycle have been isolated and identified using omics approaches. However, there is a lack of research on the characteristics of the cell cycle with different proliferation rates, as well as the molecular mechanism. Our previous studies demonstrated that the growth rate of *P. donghaiense* varies under different environmental conditions. To compare the cell cycle progression of *P. donghaiense* with different proliferation rates and understand its molecular mechanism, we selected two experimental groups with slower (group 3) and faster (group 16) proliferation rates, and analyzed them using flow cytometry and RNA sequencing technology. The results showed that group 3 cells had a shorter S phase and were partially blocked in G2/M phase. A total of 149219 unigenes were obtained, of which 6081 were annotated in the NR, GO, KEGG, eggNOG, Swiss-Prot, and Pfam databases. A total of 114358 unigenes were classified into three terms, namely, cellular components, molecular functions, and bioprocesses, with 57 categories in the GO database. The 30554 unigenes annotated in the eggNOG database were classified into 25 categories. GO classification and pathway enrichment results of differentially expressed genes (DEGs) between the two experimental groups showed that the most important DEGs were related to microtubules and the cytoskeleton. We hypothesized that the differences in cell cycle progression between the two experimental groups were caused by differences in the dynamic changes of microtubules. Among the annotated unigenes, 49 encoding cyclins, 74 encoding cyclin-dependent kinases (CDKs), and 26 encoding cell division cycle (CDC) proteins were related to cell cycle control. Ten of these comprising one *CYCA*, one *CYCB*, one *CYCU*, one *CDK1*, four *CDK2*, and one *Cdc48* genes were DEGs. The cyclinA-CDK2 and CDK1-cyclinB complexes participate in the cellular G2/M phase transition. Cells need to retain sufficient levels of CDK activity to maintain the transcription of G2-specific genes and retain their competence to recover from G2 arrest. Since cells in group 3 were partially arrested in G2/M, the transcriptional levels of CDKs, cyclinA, and cyclinB were higher in group 3 than in group 16. As *Cdc48* is involved in cellular DNA replication, the transcription level of *Cdc48* was significantly higher in group 16 than in group 3, which explained why the S phase duration was longer in group 16 than in group 3. In summary, the S phase duration and whether the G2/M phase transition is blocked may decide the rate of *P. donghaiense* cell proliferation, and one *CYCA*, one *CYCB*, one *CYCU*, two *CDK1*, four *CDK2*, and one *Cdc48* genes identified from the transcriptome analysis played important roles in cell cycle regulation.

**Key words:** *Prorocentrum donghaiense*; proliferation rate; cell cycle phase; transcriptome; differentially expressed genes; red tide

**Corresponding author:** OUYANG Longling. Email: ouyangll@ecsf.ac.cn