

氮、磷限制对塔玛亚历山大藻细胞周期及毒素含量和组成的影响

高越, 林琳, 王大志

(厦门大学环境科学研究中心 近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 优化了塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarensis* CI01 细胞同步化方法, 研究了 N、P 限制对 *A. tamarensis* CI01 细胞周期及毒素含量和组成变化的影响。结果表明, 采用前期驯化、细胞沉降分离和光限制诱导相结合的同步化方法, 细胞同步率提高了约 14%。N、P 限制条件下, 细胞分裂受抑制, 分别停滞于 G2/M 期和 G1 期。营养盐对毒素合成及组成影响比较明显: N 限制下单细胞毒素含量降低, P 限制下单细胞毒素含量升高。在正常营养和 P 限制条件下, C_{1,2} 占毒素总量的 98% 以上, GTX_{2,3} 占总毒素量的 2% 左右; N 限制条件下, C_{1,2} 所占比例下降到 90% 左右, 而 GTX_{2,3} 比例增长到约 10%。根据 C_{1,2} 和 GTX_{2,3} 在一个细胞周期内的变化规律推测, 毒素的合成受光诱导并在细胞周期 G1 期的特定时间内合成, 细胞可能先合成 GTX_{2,3} 毒素, 后被转化为 C_{1,2} 毒素。

关键词: 塔玛亚历山大藻; 营养盐限制; 细胞周期; 麻痹性毒素; 毒素合成

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2012)03-0352-06

Effects of nutrient limitation on cell cycle, toxin content and composition of *Alexandrium tamarensis* CI01

GAO Yue, LIN Lin, WANG Da-zhi

(Environmental Science Research Center/State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: This study optimized the cell synchronized method of *Alexandrium tamarensis* CI01 and investigated the effects of nutrient limitation on cell cycle, toxin content and composition of *A. tamarensis* CI01. The result showed that the synchronization ratio of *A. tamarensis* CI01 cells increased 14% compared to the traditional darkness induced method. Under nutrient limitation conditions, nitrate-limited cells were arrested at G2/M phase while phosphate-limited cells were arrested at G1 phase. Toxin content and composition of *A. tamarensis* CI01 varied significantly at the different cell cycle phases. Nitrate-limitation decreased toxin content while phosphate-limitation increased toxin content compared to the nutrient replete condition. Compared to nutrient replete and phosphate-limitation conditions, the ratio of C_{1,2} declined from 98% to 90%, and the ratio of GTX_{2,3} increased from 2% to 10% under nitrate-limitation. Toxin biosynthesis was induced by light and always occurred during a defined time frame within the G1 phase of the cell cycle. Analyzing toxin biosynthesis time and ratios of C_{1,2} and GTX_{2,3} toxins in cells, we postulate that GTX_{2,3} is synthesized firstly and then is transferred to C_{1,2} in *A. tamarensis* CI01.

Key words: *Alexandrium tamarensis*; cell cycle; N, P-limitation; toxin content and composition

亚历山大藻是一种产麻痹性贝毒(PSP)甲藻,其适应能力强、分布范围广,是重要的赤潮原因种之一。近20年来,亚历山大藻赤潮的爆发频率呈显著增加的趋势,已对近海生态系统、沿海养殖业、人民健康和生命财产安全构

成了严重威胁^[1-4]。研究发现,塔玛亚历山大藻细胞内的毒素合成和生产受遗传特征、共生微生物及各种环境因子的影响^[5-8],其中N、P营养盐的影响最为显著^[9-15]。N限制降低细胞内毒素含量而P限制则促进细胞内毒素

收稿日期: 2011-02-27, 修订日期: 2011-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(40776068, 40876059)

作者简介: 高越(1981-), 男, 河南省信阳人, 硕士研究生, 主要从事海洋藻类鉴定、生物毒素及蛋白质组学研究。E-mail: gaoyue9458@sina.com

通讯作者: 王大志, E-mail: dzwang@xmu.edu

的合成^[16-17]。其他一些研究则表明,细胞内毒素含量和组成在指数和稳定生长期是不同的^[18-20],说明毒素生产率和细胞生长率直接相关,这暗示着毒素合成与细胞周期密切相关^[21]。Taroncher-Oldenburg等^[22]用光限制的方法研究了同步化亚历山大藻 *Alexandrium fundyense* 不同细胞周期中毒素含量和组成的变化,他们发现毒素合成主要在细胞 G1 期的前 8 小时,并根据不同细胞周期毒素含量及组成的变化,推测 *A. fundyense* 细胞首先合成 C₂ 毒素,然后转化为 GTX_{2,3},再进一步转化为 STX。

本文以塔玛亚历山大藻 *Alexandrium tamarense* CI01 为研究对象,优化了细胞同步化培养方法,研究了不同营养条件下细胞毒素含量及组成随细胞周期的变化,探讨了毒素合成与细胞周期之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用藻种 *A. tamarense* CI01 由近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学)海洋微生物保种中心(CC-MBA)提供。藻种的保存采用 K-medium 培养基^[23],保种条件:温度 20 ℃,盐度 30,光照强度 60 μE/(m²·s) 和光暗周期 12 h:12 h。保种用海水取自台湾海峡。

1.2 方法

1.2.1 细胞同步化

1.2.1.1 *A. tamarense* CI01 的光限制同步化 培养 30 瓶各 4.5 L 的 *A. tamarense* CI01 (光暗周期 14 h:10 h、温度 20 ℃、K 培养基,以下同),当生长至指数期时,转移至黑暗处避光处理 36 h,取出后用 10 μm 筛绢过滤上层藻液,灭菌海水冲洗 3 次,离心至约 1 L,将离心的藻液转接到未加营养盐的消毒海水中,于 14 h:10 h 的光暗周期下静置 1 d,第 2 天加入 K 培养基。12 h 后再一次将细胞避光暗处理 36 h,操作过程同第一次。整个过程均保持无菌操作。

1.2.1.2 *A. tamarense* CI01 同步化方法的优化 培养 10 瓶各 2 L 的 *A. tamarense* CI01,当细胞生长到指数期时,200 r/min 20 ℃ 离心 2 min,取上清分别转入新配制的培养基中,当再次生长到指数期时,200 r/min 20 ℃ 离心 2 min。分别转入 10 个装有 4.5 L 灭菌海水的锥形瓶中,培养至指数期。选取活力较好的细胞按 1:3 比例转接到 30 瓶装有 4.5 L 灭菌海水的锥形瓶中,当生长到指数期时,选取活力较好的细胞,10 μm 筛绢过滤上层藻液,灭菌海水冲洗 3 次,转入新配制的培养基中,培养至指数期,将瓶子放在黑暗处避光 36 h,选择细胞活力较好的藻液 10 μm 筛绢过滤上层,灭菌海水冲洗 3 次,将冲洗后的细胞分别转接到未加营养盐的消毒海水中,于 14 h:10 h 的光暗周期下静置 1 d。第 2 d 加入 K 培养基。12 h 后再一次将藻细胞避光暗处理 36 h,操作同上。整个过程均保持无菌操作。

1.2.2 培养实验

选取同步化后细胞活力较好的藻细胞转接到经酒精和紫外消毒的三个方形玻璃缸中,培养体积 120 L,初始细胞密度约(3 500 ± 180) /mL 左右,充气培养。A 缸为正常营养,用作实验对照组,添加 K 培养基。B 缸和 C 缸为 N、P 限制实验组,分别添加不含 N、P 营养盐的 K 培养基。一个细胞周期(约 24 h)后,A 缸藻细胞长到(6 320 ± 125) /mL; B 缸和 C 缸分别长到(3 800 ± 110) /mL 和(3 880 ± 44) /mL。第二个光周期开始时即进行取样(8 点进入光周期,记为 T₀,10 点记作 T₂,以此类推),每 2 h 取一次样,连续取样 36 h,每缸取 3 × 1 mL 用做细胞计数、3 × 150 mL 做流式细胞分析、3 × 50 mL 用于毒素分析。所收集的样品除细胞计数样品保存室温,其他样品预处理后保存于 -80 ℃ 冰箱中,待样品分析时用。

1.2.3 细胞计数

每隔 2 h 取 3 × 1 mL 藻液放入 1.5 mL 离心管,用 0.02 mL 的 Lugol's 固定剂固定,取 0.1 mL 滴在浮游植物计数框上,在光学显微镜下进行细胞计数。

1.2.4 细胞周期分析

每隔 2 h 取 3 × 150 mL 同步化培养的藻液,离心去除培养基,灭菌海水洗涤一次。加入 1 mL 的磷酸盐缓冲液(1 × PBS)重悬,再加入 700 μL 的 70% 乙醇,-80 ℃ 储存备用。实验前离心,加入 70% 乙醇反复洗涤去除色素至上清无色,向沉淀中加入 1 mL 的 PBS 洗涤去上清,再加入 1 mL 用 PBS 配置的 0.3% Triton X-100,室温下静置 40 min,离心,PBS 洗涤,重悬,向重悬液中加入 4 μL 的 RNase A,37 ℃ 水浴 1 h,PBS 洗涤,重悬,加入 10 μL 的 2.5 mg/mL 碘化丙啶(PI)溶液,室温遮光 10 min,流式细胞仪 FL3 通道检测 DNA 含量(EPICS XL AK31078,美国 Beckman Coulter 公司),激发光波长 520 nm,收集 30 000 个细胞,用 MultiCycle 软件计算细胞处于 G₁,S,G₂ + M 期的相对百分比,运行 Win MDI 2.9 软件对实验数据进行分析。

1.2.5 毒素提取

取出冷冻保存的藻类样品,室温解冻。加 0.5 mL 50 mmol/L 的醋酸溶液振荡悬浮。藻悬浮液使用 Model 450 细胞超声破碎仪(Branson 公司,德国)进行破碎,功率 100 W,工作 3 s,间隙 5 s,冰浴冷却,镜检藻细胞完全破碎为止。然后 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液用 1.5 mL 超滤管(截留分子量为 3 000Da)超滤后进行 HPLC 分析。

1.2.6 毒素的分析

毒素分析采用 Oshima 等^[24]建立的经 Anderson 等^[25]修改的 HPLC 柱后衍生法。分析仪器采用 HP1100 高效液相色谱系统(Agilent 公司,美国)。包括以下组件:G1311 四元梯度泵、G1311 自动进样器、GL Science 公司生产的 Inertsil C8-3 反相色谱柱(150 × 4.6 mm,5 μm)。柱后衍生系统采用 Alltech 公司产品,衍生温度为 80 ℃;荧光检测器为 Agilent 生产的 G1321A,激发波长 330 nm,

发射波长 390 nm; Agilent 化学工作站软件管理系统。分析中所用溶剂均为 HPLC 级, 离子对试剂购自 Sigma 公司, 其他的化学药品均为分析纯试剂。分析用水为超纯水 (Millipore)。标准毒素部分购自加拿大海洋生物研究所 (NRC), 包括 GTX_{1,5}, neoSTX, STX, dcSTX, 标准毒素 C_{1,2} 由本实验室自制并标定浓度。

2 结果与讨论

2.1 A. tamarensis CI01 细胞同步化方法比较

A. tamarensis CI01 扩大培养至 60 瓶 4.5 L 三角瓶中, 当生长到指数期时, 平分 A、B 两组, 每组 30 瓶。分别采用 Taroncher-Oldenburg 等^[22] 的光限制诱导同步化方法和改良后的同步化方法对 A. tamarensis CI01 进行同步化处理。

经两次暗处理后, 分别选取活力较好的细胞 (A 组 6 瓶, B 组 18 瓶) 进行大体积培养。细胞数控制在 (3 500 ± 180) /mL 左右。一个细胞周期后, A 组细胞数由 T14 时的 (4 540 ± 186) /mL 增加到 T28 的 (7 850 ± 40) /mL, B 组在同一时间细胞数由 (6 320 ± 125) /mL 增加到 (11 780 ± 185) /mL (图 1)。A 组细胞同步率 (处于某一分裂时期的细胞数目与细胞总数之比) 为 72.9%, B 组细胞同步率为 86.4%。四次验证实验结果表明: 选择同步化 (早期驯化及细胞沉降分离法) 和诱导同步化 (光限制法) 相结合的方法与单纯的光限制诱导同步化相比, 细胞同步率提高了约 14%。该方法流程简单, 适合大批量处理, 没有药物诱导同步化带来的细胞非均衡生长、可逆性较差、细胞异常分裂和药物毒性等弊端。为甲藻大批量同步化细胞的获取和细胞周期研究提供了一种高效、快捷的工具。

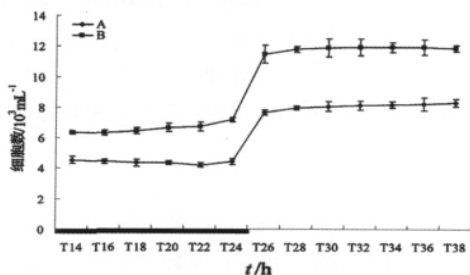


图 1 两种同步化方法对 A. tamarensis CI01 细胞同步效率的影响

(X 坐标轴上的黑色部分为暗周期, 其余为光周期; A. 光限制诱导方法, B. 改进后的方法)

Fig. 1 Effects of two synchronization methods on synchronization ratios of A. tamarensis CI01 cells

2.2 不同营养条件下 A. tamarensis CI01 一个细胞周期中细胞数变化

由图 2 可以看出, 细胞分裂主要集中在 T24 ~ T26 的 2 h 内。正常营养条件下, A. tamarensis CI01 在 24 h 内完成了一个完整的细胞周期, 细胞密度从 T24 的 (6 320 ± 125) /mL 到 T28 的 (11 780 ± 185) /mL, 约有 86.4% 的细

胞完成了一次分裂。细胞数在进入下一个周期前维持不变。N 限制条件下, 仅约 8% 细胞完成一次分裂, 细胞密度由 (3 800 ± 110) /mL 增加到 (4 150 ± 165) /mL; P 限制条件下, 约 15% 细胞完成了一次分裂, 细胞密度从 (3 880 ± 44) /mL 增加到 (4 520 ± 80) /mL。

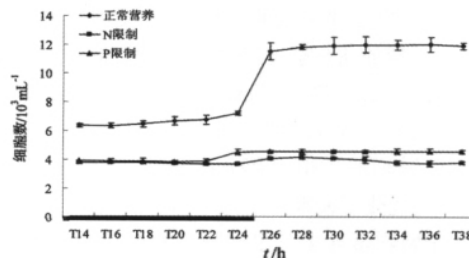


图 2 正常营养及 N、P 限制下 A. tamarensis CI01 一个细胞周期中细胞密度变化

(X 坐标轴上的黑色部分表示暗周期, 其余表示光周期)

Fig. 2 Variations of cell density of A. tamarensis CI01 in one cell cycle under nutrient replete and limitation (N and P) conditions

2.3 不同营养条件下 A. tamarensis CI01 一个细胞周期中各时相变化

运用流式细胞技术分析不同营养条件下 A. tamarensis CI01 一个细胞周期内 DNA 含量变化, 结果表明: 在正常营养条件下, A. tamarensis CI01 在 24 h 内完成了一个完整的细胞周期。其中 G1 期大于 14 h (T2 ~ T16), S 期约 6 h (T16 ~ T22), G2/M 少于 4 h (T22 ~ T26)。结合细胞计数数据可以推断 M 期主要集中在 T22 ~ T24 这一时段内。N 限制条件下, G1 期缩短, 约 12 h (T2 ~ T14), S 期延长 (T14 ~ T24), 除极小部分细胞维持分裂外, 绝大部分细胞分裂停滞于 G2/M 期。在 P 限制条件下, G1 期延长到 20 h 左右 (T2 ~ T18), S 期缩短 (T16 ~ T20), 绝大部分细胞分裂停滞于 G1 期。

2.4 N、P 限制下 A. tamarensis CI01 细胞毒素组成及含量随细胞周期的变化

A. tamarensis CI01 细胞毒素组分为 C_{1,2} 和 GTX_{2,3}, 没有检测到其它麻痹性毒素。其中以 C₂ 毒素为主 (约占 90%) 及痕量的 C₁ 和 GTX_{2,3}。N 限制对 A. tamarensis CI01 细胞内毒素组成 (mol%) 的影响非常明显: C_{1,2} 所占比例下降到 90% 左右, 而 GTX_{2,3} 的比例则从 2% 增长到约 10%。在正常营养和 P 限制条件下, C_{1,2} 占毒素总量的 98% 以上, GTX_{2,3} 占总毒素量的 2% 左右。

单位水体中 A. tamarensis CI01 细胞毒素含量变化和单细胞藻毒素含量变化如图 3 所示。正常营养和 P 限制下单位水体中藻毒素含量呈持续上升趋势, 其中 T22 ~ T34 上升较明显。N 限制下则基本维持不变 (图 3A); 正常营养和 P 限制下单细胞毒素在光周期开始 (T24) 前都维持在 24.5 fmol/cell 左右, 正常营养下随着细胞分裂下降到 17.3 fmol/cell, T30 后细胞毒素含量开始慢慢升高, 到 T38 时单细胞毒素含量达到 22.3 fmol, 接近分裂前的

浓度,至进入下一个周期前保持不变。P限制下单细胞毒素含量则持续增高,最后上升到45.3 fmol/cell。N限制下基本维持不变(图3B)。由于细胞中GTX_{2,3}在总毒素中所占比例极低,单细胞C毒素含量变化趋势和单细胞总毒素的变化一致(图3C)。正常营养和N、P限制下GTX_{2,3}在暗周期时有波动,变化不明显,光周期开始后,正常营养和P限制下表现为先下降后上升趋势,至T38时回复到前一天同时间点毒素水平,达到0.4 fmol/cell左右。而N限制在光周期开始后,GTX_{2,3}先下降后持续上升,至T38时由前天同时间点的0.9 fmol/cell上升到1.7 fmol/cell左右,增加了近一倍(图3D)。

正常营养条件下,当暗周期终结,光周期开始时,A. tamarensis C101细胞开始分裂,从T22(光周期开始前2h)至T28,有86.4%的细胞完成分裂,细胞数目几乎增加一倍。其中79.4%有分裂能力细胞集中在T2至T26这两个小时完成分裂。DNA含量分析结果显示,G1期大于14h(T2~T16),S期约6h左右(T16~T22),G2/M少于6h(T22~T26)。10点(T26)为下一个细胞周期G1期起始点。从图3A和3B可以看出,毒素含量的增加主要集中在早上10点(T26)到下午18点(T34)这一时间段,而该时段处于G1期早期。在细胞分裂时,原有的毒素平均分给了两个子细胞,导致每个细胞所含的毒素量减少(早上10点),与此对应的是细胞的个体变小,在接下来的几个小时内,细胞合成毒素,单细胞藻毒素含量逐渐增加,到下午18

点时,单细胞毒素含量已基本恢复到分裂前的水平,此时的细胞个体也恢复到原有水平。证明A. tamarensis C101细胞毒素的合成在G1期进行,而与此有密切关系的因素就是光照,因此推测毒素是由光诱导合成的。有研究表明,毒素的产生是受光影响^[8, 26-29],也有研究显示,有毒甲藻毒素合成是不连续的,而是遵从一个耦合它们细胞周期的严格时间区间,并且需要光^[22]。Taroncher-Oldenburg等^[22]研究A. fundyense同步化时发现,A. fundyense毒素是在G₁早期(early G₁ phase)合成的,即从暗光周期转换点开始合成毒素,而在其它时间不合成毒素。他们认为光在毒素合成中起着非常重要的作用,我们的实验结果进一步证实他们的论断。分析单细胞C_{1,2}毒素和GTX_{2,3}毒素含量在细胞周期中的变化时可以发现,在早上10点时,GTX_{2,3}毒素含量开始增加,且增加速度较快,而C_{1,2}毒素在早上10点过后的4h内(10点到14点即T26~T30)毒素没有什么增加,后毒素含量开始快速增加,同时在有丝分裂之前的G1晚期、S期、G2期GTX_{2,3}毒素呈下降趋势。我们推测A. tamarensis C101细胞可能先合成GTX_{2,3}毒素,后被转化为C_{1,2}。林琳等^[30]的研究表明,A. tamarensis C101中硫转运酶粗提物(sulfotransferase, ST)可将GTX_{2,3}毒素转化为C_{1,2}毒素,他们研究认为A. tamarensis C101细胞中毒素转化途径是从GTX_{2,3}毒素到C_{1,2}毒素。日本学者Sako等^[30]也得出了相同结论,但此结论与Taroncher-Oldenburg^[22]对毒素转化途径的阐述相反。

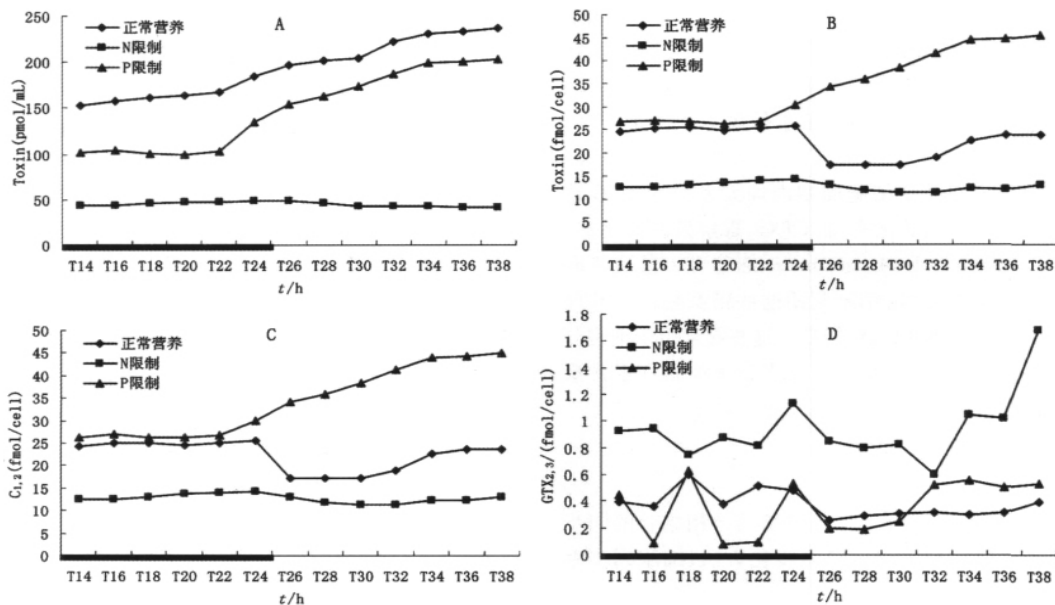


图3 正常营养和N、P限制下A. tamarensis C101毒素产量和含量随细胞周期的变化

(A. 单位水体藻毒素含量; B. 单细胞藻毒素含量; C. 单细胞C毒素含量; D. 单细胞GTX毒素含量; X轴轴上的黑色部分表示暗周期,其余表示光周期)

Fig. 3 Variations of toxin production and toxin content of A. tamarensis C101 with the cell cycle under nutrient replete and limitation conditions

N 限制条件下,细胞经过 G1 和 S 期后停滞于 G2/M 期,只有 8% 的细胞完成分裂,细胞数目有少量增加。在整个细胞周期内,单位水体藻毒素几乎没什么明显变化,毒素净产值接近于 0,单细胞毒素含量稍微下降,但不明显。与正常培养条件下相比,单位水体和单细胞毒素含量均明显下降至正常培养的 1/2 左右。从毒素组成上看,与正常营养和 P 限制相比,GTX_{2,3} 毒素所占总毒素比例上升到 10% 左右。麻痹性贝毒是一类富 N 化合物,N 在麻痹性贝毒分子中占 17% ~ 35% 的重量,而在 *Alexandrium* 和 *Gymnodinium* 中,麻痹性贝毒的 N 占到整个细胞总 N 的 5% ~ 10%,足够的 N 源是麻痹性贝毒合成的基础。Cembella^[32] 指出当 N 源不足时,细胞首先会将 N 源用在细胞所必需的代谢途径上,以合成维持细胞生存的氨基酸等物质,而麻痹性贝毒是次级代谢产物,并非细胞生存所必需,因此当 N 缺乏时,毒素合成降低。Wang 等^[33] 也认为,N 代谢过程中,细胞优先选择吸收 N 素并合成用于维持其生命活动所必需的氨基酸,蛋白质和其他含 N 活性物质。在 N 源不断消耗而得不到新 N 源补充的条件下,藻细胞内毒素的合成受到抑制,所吸收的 N 源主要用于维持细胞基本的生命活动。本研究结果表明,N 限制条件下,毒素的合成基本停止,细胞内的毒素主要用于维持细胞的生存。

P 限制条件下,细胞在暗周期时先后处于 G1 晚期和 S 期,这段时间内单位水体藻毒素基本上不变,光周期开始时,85% 以上细胞跳过 G2/M 期直接进入 G1 期。毒素是在 G1 早期(early G1 phase)合成的,故单位水体藻细胞毒素持续上升。G1 晚期不合成毒素,单位水体藻毒素含量保持稳定。可以看出在 P 限制下毒素净产生量是增加的。单细胞毒素变化趋势和单位水体藻毒素含量一样,毒素含量也是增加的。从毒素组分来看,*A. tamarense* CI01 的毒素组成在整个细胞周期内均无大的变动,C 毒素始终保持 98% 以上的比率,而 GTX_{2,3} 毒素只占不到 2% 的含量。P 限制条件下,*A. tamarense* 细胞可大量聚集麻痹性贝毒的前体-精氨酸,细胞利用这些精氨酸以及其他前体来大量合成麻痹性贝毒^[20, 34]。这些毒素由于细胞分裂中止而在胞内积累,导致单位水体和单细胞毒素含量上升。

3 结 论

(1) 采用细胞沉降分离与光限制诱导相结合的同步化方法优于常规的光限制诱导同步化方法,细胞同步率明显提高。

(2) *A. tamarense* CI01 细胞在 G1 早期合成毒素,并且需要光的诱导,其它细胞周期时相内不合成毒素。

(3) 营养盐对细胞毒素合成及毒素组成影响比较显著。N 限制下单细胞毒素含量降低,P 限制下单细胞毒素含量升高。N 限制条件下 C_{1,2} 比例从 98% 下降到 90% 左右,而 GTX_{2,3} 的比例从 2% 增长到约 10%。

(4) C_{1,2} 和 GTX_{2,3} 在一个细胞周期内合成时间及速率差异表明,在 *A. tamarense* CI01 中细胞首先合成 GTX_{2,3},在修饰酶的作用下,再进一步转化为 C_{1,2} 毒素。目前对毒素转化途径尚存在争议,表明甲藻麻痹性毒素的合成可能存在种间差异,这有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] ANDERSON D M, KULIS D M, DOUCETTE G J, et al. Biogeography of toxic dinoflagellates in the genus *Alexandrium* from the northeastern United States and Canada [J]. *Marine Biology*, 1994, 120: 467-478.
- [2] HALLEGRAEFF G M. Harmful algal blooms: A global overview [C]//Manual on harmful marine microalgae. Paris: Imprimerie Landais, 2005: 25-49.
- [3] ZHOU M J, ZHU M Y, ZHANG J. Status of harmful algal blooms and related research activities in China [J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2001, 13(2): 54-59.
- [4] HALLEGRAEFF G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. *Phyco*, 1993, 32(2): 79-99.
- [5] OGATA T, ISHIMARU T, KODAMA M. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis* [J]. *Mar Biol*, 1987, 95: 217-220.
- [6] HWANG D F, LU Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Toxicon*, 2000, 38: 1491-1503.
- [7] HAMASAKI K, HORIE M, TOKIMITSU A, et al. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* isolated from Hiroshima Bay, western Japan, as a reflection of changing environmental conditions [J]. *Plank Res*, 2001, 23: 271-278.
- [8] ETHERIDGE S, ROESLER C. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy [J]. *Deep-Sea Res II*, 2005, 52: 2491-2500.
- [9] HALL S. Toxins and toxicity of *Protogonyaulax* from the Northeast Pacific [D]. Fairbanks: Ph. D. Thesis, University of Alaska, 1982.
- [10] MATSUDA A, NISHIJIMA T T, FUKAMI K. Effects of nitrogen deficiency on the PSP production by *Alexandrium catanella* under axenic cultures [C]//Harmful and toxic algal blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 1996: 305-308.
- [11] PARKHILL J P, CEMBELLA A D. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada [J]. *Plankton Research*, 1999, 21: 939-955.
- [12] FLYNN K, FRANCO J M, FERNANDEZ P, et al. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen or phosphate stress [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1994, 111: 99-109.

- [13] FLYNN K, JONES K J, FLYNN K J. Comparisons among species of *Alexandrium* (dinophyceae) grown in nitrogen-or phosphorus-limiting batch culture [J]. *Marine Biology*, 1996, 126: 9-18.
- [14] FLYNN K J, FLYNN K, JOHN E H, et al. Changes in toxins intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity [J]. *Plank Res*, 1996, 18: 2093-2111.
- [15] 张玉娟, 曹宇. N、P 营养盐对塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*) 生长的影响 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(6): 482-486.
- [16] DENG F H, LU Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Toxicon*, 2000, 38: 1491-1503.
- [17] WANG C H, HSIEH D P H. Nutritional supplementation to increase growth and paralytic shellfish toxin productivity by the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. *Biochem Engin*, 2002, 11: 1310-135.
- [18] BOYER G L, SULLIVAN J J, ANDERSEN R J, et al. Effects of nutrient limitation on toxin production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* [J]. *Mar Biol*, 1987, 96: 123-128.
- [19] BOCAZR B A, BEITLER M K, LISTON J, et al. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88: 1285-1290.
- [20] ANDERSON D M, KULIS D M, SULLIVAN J J, et al. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp [J]. *Marine Biology*, 1990, 104: 511-524.
- [21] ANDERSON D M, KULIS D M, SULLIVAN J J, et al. Toxin composition variations in one isolate of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J]. *Toxicon*, 1990, 28: 885-893.
- [22] TARONCHER-OLDENBUGR G, KULIS D, ANDERSON D M. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J]. *Limnol Oceanogr*, 1997, 42: 1177-1188.
- [23] KELLER M D, SELVIN R C, CLAUS W, et al. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton [J]. *Phycol*, 1987, 23: 633-638.
- [24] OSHIMA Y, SUGINO K, YASUMOTO T. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins [J]. *Mycotoxins and phycotoxins*, 1989, 10: 319-326.
- [25] ANDERSON D M, KULIS D M, QI Y Z, et al. Paralytic shellfish poisoning in Southern China [J]. *Toxicon*, 1996, 34: 579-590.
- [26] OGATA T, ISHIMARU T, KODAMA M. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis* [J]. *Mar Biol*, 1987, 95: 217-220.
- [27] USUP G, KULIS D M, ANDERSON D M. Growth and toxin production of the toxic dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* Var. *compressum* in laboratory cultures [J]. *Natural Toxins*, 1994, 2: 254-262.
- [28] HWANG D F, LU Y H. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum* [J]. *Toxicon*, 2000, 38: 1491-1503.
- [29] HAMASAKI K, HORIE M, TOKIMITSU A, et al. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* isolated from Hiroshima Bay, western Japan, as a reflection of changing environmental conditions [J]. *Plank Res*, 2001, 23: 271-278.
- [30] 林琳, 张树刚, 洪华生, 等. 亚历山大藻细胞周期中毒素含量及组成的变化 [J]. *厦门大学学报*, 2007, 46: 111-114.
- [31] SAKO Y, YOSHIDA T, UCHIDA A, et al. Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2,3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) [J]. *Phycol*, 2001, 37: 1044-1051.
- [32] CEMBELLA A D. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae [C] // *Physiological ecology of harmful blooms*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1998: 381-403.
- [33] WANG D Z, HSIEH D P H. Effects of different nitrogen/phosphorus nutrient ratios on the growth and C₂ toxin bioproduction in *Alexandrium tamarense* Cl01 [J]. *Mar Poll Bull*, 2002, 45: 286-289.
- [34] SHIMIZU Y. Paralytic shellfish poisons [C] // *Progress in the chemistry of organic natural products*. Wien: Springer-Verlag, 1984: 235-264.