

赤潮藻毒素生物合成研究进展

彭喜春^a, 刘洁生^{b*}, 杨维东^b

(暨南大学, a. 食品科学与工程系; b. 生物科学与工程系, 广州 510632)

摘要: 合成毒素是赤潮藻类的一个常见特征, 已知能够产生毒素的微藻有 70 多种。作为次级代谢产物, 藻毒素的产生可能是一种压制或清除其它藻类竞争者的一种反应, 在群落演替、种间竞争中发挥重要作用。目前, 人们对藻毒素生物合成机理依然知之甚少, 相关基因的研究仍无明显突破。利用环境因子诱导毒素生成变化进而分离差异表达基因或者比较不同产毒藻株间基因表达的差异, 从中克隆藻毒素生物合成基因似乎是一种极具潜力的研究方向。

关键词: 赤潮; 海藻; 毒素的生物合成

中图分类号: Q948.86

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)01-0081-06

Studies on Biosynthesis of Algal Toxins in Red Tide: A Review

PENG Xi-chun^a, LIU Jie-sheng^b, YANG Wei-dong^b

(a. Department of Food Science and Technology, Jinan University;

b. Department of Biological Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The production of toxin is a feature in red tide. More than 70 species of microalgae produce toxins. As a secondary metabolite, the synthesis of algal toxin may be considered as an inhibition or rejection response to other phytoplanktons in the competition among communities and species. There is little understanding about the synthesis pathway of these toxins because the factors (algal species, sources, environment, conditions, etc.) that affect the production of toxin are complicated. In this review, the following aspects in studies on algae which from red tide are presented: ecological significance of red tide algae producing toxins, factors affecting the production of toxins by algae, possible biochemical pathway of toxin synthesis, and molecular aspects of toxin biosynthesis in study of marine algae.

Key words: Red tide; Marine algae; Algal toxin biosynthesis

随着工农业生产的发展、人口增多, 人们对海洋的依赖越来越大, 致使海洋污染加重, 赤潮发生的频率大大增加, 给生态环境和人类健康造成的危害日益严重。赤潮已成为全球性的海洋公害, 严重干扰着沿海国家的经济发展。

海洋浮游微藻是引发赤潮的主要生物, 在 4 000 多种浮游微藻中有 260 多种能形成赤潮, 中国沿海的赤潮生物有 148 种, 其中 43 种曾引发过赤潮 (red tide)^[1]。合成毒素是赤潮藻类的一个常见

特征, 已知能够产生毒素的微藻有 70 多种, 我国有 28 种^[2]。由于毒素在水体食物链中以一种类似于碳或能量的形式传递, 产毒藻种可能会对其它藻种产生一些巨大影响。同时, 随着毒素对大量有机体的变更、生长、繁殖及新种引进的影响, 产毒藻种可能对生态系统的演变产生巨大的冲击^[3]。本文就影响藻毒素生物合成的因素、藻毒素的生态学意义以及藻毒素生物合成相关分子生物学的研究进行综述, 并提出一种研究藻类毒素生物合成基因的可能途径。

收稿日期: 2005-07-04 接受日期: 2005-10-25

基金项目: 国家自然科学基金(30470321); 国家重点基础研究发展规划 973 项目(2001CB409709, 2001CB409710); 广东省自然科学基金项目(031885, 021168)资助

* 通讯作者 Corresponding author

1 赤潮藻类毒素生物合成的生态学意义

在赤潮发生前,赤潮发生的海域中生活着较丰富的浮游植物的种群,各种群间以一定的比例构成该区域海洋浮游植物的群落。赤潮形成过程中,浮游植物的种类将朝着单一化的方向发展,个别种类异常增殖,使其成为该海域的绝对优势种,并经常伴随对其它各种类的排斥作用(exclusion)^[4]。研究表明,由于赤潮藻细胞外有机物质(化感物质)的分泌导致浮游生物间产生交互作用,被认为是一种影响浮游植物继发的的重要因素^[5]。Keating^[6]报道蓝细菌(cyanobacteria)分泌的有毒物质能抑制硅藻的生长;Windust等^[7]发现微量的甲藻(dinoflagellate)毒素大田软海绵酸(okadaic acid, OA)及鳍藻毒素-1(dinophysistoxin-1, DTX-1)也能有效地抑制几种微藻的生长。我们的研究也发现,球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)合成的溶血毒素对东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)、海洋褐孢藻(*Chattoncella marina*)及卵状褐孢藻(*Chattoncella ova*)的生长都有一定的抑制作用(待发表)。

一般认为,植物在营养充足的条件下不会释放化感物质。化感效应是由于植物自身生存环境受到压迫时,为保证自身生存繁殖所需要的营养而激发的一种抑制其它竞争生物生长繁殖的功能^[8]。研究表明,在营养条件受到限制时很多赤潮藻会产生(或释放)一些化感物质。Myklestad等^[9]报道了P缺乏时*Chrysochromulina polylepis*能使中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)的生长受到强烈抑制。Granéli^[10]的研究表明,在N、P盐限制时,小定鞭金藻(*Prymnesium parvum*)所产毒素增加,其无细胞滤液对威氏海链藻(*Thalassiosira weissflogii*)、微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)和波罗的海红细胞藻(*Rhodomonas cf. baltica*)的生长也产生抑制,而营养盐充足时这几种藻的生长并未受到影响,提示当有毒定鞭金藻(Prymnesiophyta)营养条件受到限制时,分泌有毒代谢物可能是一种常见机制。

当营养条件受到限制时,浮游生物为获取营养,在生理上可能发生一些变化以增加其竞争能力。毫无疑问,就化感效应而言,产毒藻利用毒素对自己来说可能是最为有利的,因为这有助于产毒藻在其它更为高级的竞争者(如其它藻)存在的环境中繁殖,否则就有可能被清除。据报道,不仅浮游生物,一些其它微生物组织中,营养条件的限制与化

感活性的增强也有着密切关系^[11]。显然,在没有营养限制条件下,以其最优生长率生长时组织并不产生化感物质,但是当营养条件受到限制会导致生长率下降,其次生代谢过程就被激活,这样如果组织因其迅速的生长能有效地参与竞争的话,就不产生毒素,一旦不能有效地竞争,其毒素的产生机制就被激活^[10]。如果有毒物质的释放会抑制赤潮藻竞争者的生长,那么对其它浮游生物就有一种选择性的竞争优势。毒素的产生可能是一种抑制或清除其它藻类竞争者的一种策略,因而在几种浮游植物中体现出化感作用。

赤潮藻合成毒素的这种竞争策略可能通过以下几种机制来实现:1)有毒物质可能具有一些不可接受的气味或口味,使捕食者(predator)难以食用。其主要目的并不是毒害捕食者,而是抵制其进一步食用;2)藻类被食用后,在消化过程中有毒物质被释放出来,使捕食者呕吐而不敢进一步食用;3)藻类被捕食者消化后,有毒物质被释放出来,使捕食者产生生理紊乱(如麻痹、游动方式改变等),甚至导致其死亡;4)也可能使其繁殖力下降。当然,后面3种情况可能对某些单独个体并不适用,但是当藻类达到一定量的群体时,可以起到防御作用。在真核微藻中这几种机制均有可能出现,它们之间并不相互排斥^[12-16]。

当然,由于毒素生物合成的调控机制还不清楚,目前将赤潮藻的这种竞争机制完全定义为毒素的生物合成,这还为时尚早。近年来,化学物质的分离和分析技术的迅速发展,将其与基因扫描(基因组学)、基因表达(蛋白质组学)及代谢物相互作用(代谢物组学)技术结合并通过生物信息学翻译,应用于毒素的生态学研究,将有助于我们对毒素的合成与生态环境之间的相互关系有更为深入的理解。

2 影响有害藻华毒素生物合成的因素

赤潮藻毒素生物合成影响的因素极为复杂。赤潮藻物种、藻源、环境条件以及其它藻类的组成和丰度差异都可能是导致其毒素成分和含量变化的因素。

2.1 环境因素

许多研究显示,藻毒素的合成与营养水平、盐度、温度、光照等环境因子有关^[3,17]。尽管有充分的证据显示,微囊藻毒素的合成是由毒素肽合成酶基因

多基因控制的,并由肽合成酶复合体合成^[18]。但毒素的合成同样受环境因子包括光照、温度、营养水平及微量元素的影响^[19]。我们的研究发现,球形棕囊藻在不同的营养条件下,其溶血毒素的合成不同(另文发表),其中在N盐、P盐和Fe盐限制条件下其溶血毒素的产量明显增加。Johansson等^[20]对小定鞭金藻的研究也表明,在N盐和P盐的限制条件下其毒素的合成能力提高。Wang等发现N盐的限制和P盐的增加有利于塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)合成C₂毒素^[21],而N盐的增加和P盐的限制有利于该藻种膝沟藻毒素(GTX)的合成^[22]。Siu等发现链状亚历山大藻(*A. catenella*)在低温(10℃)条件下的产毒能力要强于常温(30℃)下^[23]。Huang等^[24]研究认为,微小亚历山大藻(*A. minutum*)能合成膝沟藻毒素1-4(GTX₁₋₄),其中GTX₁和GTX₄是其中的主要成分,而高盐浓度下膝沟藻毒素GTX₂和GTX₃的含量增加。Mitrovic等人^[25]的研究表明,Se和Fe元素对*Protoceratium reticulatum*合成虾夷扇贝毒素(Yessotoxin, YTX)有促进作用。显然,环境对赤潮藻类毒素合成的影响非常复杂。

2.2 生长周期

毒素生成也与细胞周期的关系非常密切^[24, 26, 27]。亚历山大藻(*A. fundyense*)的同步培养(synchronized cultures)实验表明,石房蛤毒素(saxitoxin, STX)是在细胞周期G₁期产生的^[26]。我们在研究中发现,球形棕囊藻(*P. globosa*)毒素的合成是到达平稳期时开始的,在对数生长期它并不合成溶血毒素(另文发表)。微小亚历山大藻合成的膝沟藻毒素1-4在生长平稳期后达到最多^[24]。Philip等^[27]的研究表明,所有产毒蓝藻中,微囊藻毒素的生成速率与细胞分裂速度存在线性关系;特殊生理环境、温度、光照等因素对藻毒素生成的影响是通过作用于细胞分裂速度而实现的,并非直接作用于毒素产生的代谢途径。

2.3 藻种和藻源因素

不同株系其产毒也可能存在差异性,这可能是由于在相同的生长条件下培养时,其生长速率的差异性导致的,也可能是确实存在毒素合成能力的遗传差异性^[9]。分类地位差别很大的不同甲藻种类,能产生相同的毒素;甲藻产毒个体差异性很大,产毒、不产毒甲藻的基因图谱并无本质差别^[9]。这一方面

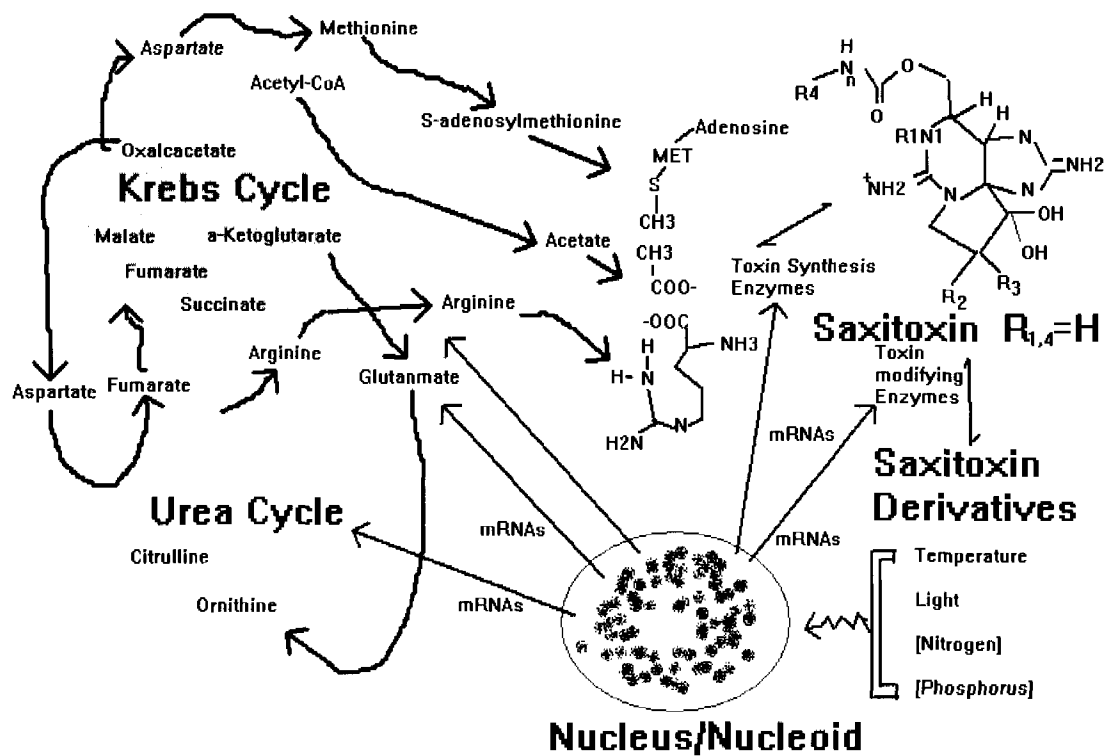
可能是与甲藻生长速率的不同和藻种在新环境下的适应性有关^[2];另一方面,可能与细菌或其它共存生物有关。

2.4 其它生物因素

有人认为,麻痹性贝毒的产生并非由遗传物质决定,而是由生存在其细胞内的共生细菌产生的^[28]。海洋细菌在有毒藻产毒过程中可能具有十分重要的作用^[29]。研究表明,实验室培养的有毒藻液和海洋中均可存在与赤潮藻种密切相关的自主产毒细菌。如首次报道能独立产腹泻性贝毒(PSP)的maraxella细菌就是分离于塔玛亚历山大藻,而随后的报道发现塔玛亚历山大藻中能独立产毒的细菌至少有两个种,并有不同产毒性能的菌株^[30];除了可独立产毒外,海洋细菌还可显著影响有毒藻的产毒能力,如有菌的伪菱形藻(*Pseudo-nitzschia multiseries*)培养液的毒性比无菌培养液要少8-38倍^[31-33]。这种影响因菌种和藻种的不同而异,在某种程度上存在特异的藻菌相互作用关系。海洋细菌既可明显提高有毒藻产毒能力,也可削弱有毒藻产毒能力,其对有毒藻产毒过程的影响非常复杂,是藻毒素产毒机理研究中的一个不容忽视的因素^[29]。除海洋细菌外,其它共存生物的生长也对赤潮藻合成毒素的能力有不同的促进作用—化感效应^[8-10]。如蓝藻(cyanobacteria)分泌的有毒物质抑制硅藻的生长;在P缺乏时*Chrysochromulina polylepsis*的毒素合成增加并强烈抑制中肋骨条藻(*Skeletonema costatum*)的生长^[9, 34]。

3 赤潮藻毒素的生物合成途径的研究

藻类毒素是一类次级代谢产物,其化学结构十分复杂^[11, 35],参与合成这些终产物的酶反应体系必须是高度专一的。目前人们对毒素的生化合成途径依然知之甚少,石房蛤毒素(STX)的生物合成途径是目前阐述得比较清楚的极少数合成途径之一。STX的化学结构类似于嘌呤碱,但并非源自于嘌呤代谢途径,而是一条与精氨酸、S-腺苷甲硫氨酸、乙酸及其它不甚明确的胞内代谢物的代谢有关的途径(图1)^[9]。藻种不同其合成的STX毒素的组分不同。显然,STX生物合成需要许多专一性的酶,而这些酶的表达也受不同基因控制,因此研究这些基因是探讨STX生物合成、演化及其在海洋HAB种群间转化的重要手段。由于毒素生物合成的底物及其

图 1 Saxitoxin 的生化合成可能途径^[1]Fig. 1 Proposed biochemical pathway of saxitoxin synthesis (after Plumley^[3])

中间产物还不甚明了,对其酶反应分析非常困难。

上世纪末,对大田软海绵酸(OA)的生物合成研究取得了突破。该毒素是由柠檬酸循环衍生物(可能是来自于 α -酮戊二酸的谷氨酸)与geranyl基(可能是来自于焦磷酸香叶酯geranyl pyrophosphate)缩聚的产物。而与此相对照的各种定鞭金藻类聚酯类毒素(如BTX等)的生物合成就要复杂得多了。一些早期的研究提示,Krebs循环中的乙酸类、二羧酸和(或)氨基酸可能是这些毒素的底物^[30]。

Shimizu等^[37]使用标记的前体化合物对PSP毒素的生物合成途径进行了深入研究,认为甲藻是通过一个乙酸单元或者它的衍生物与精氨酸或其等价物在 α 碳上的胺基进行Claisen聚合,随后失去羰基碳,并在相邻的羰基碳上形成咪唑环而合成的麻痹性贝毒。

显然,对赤潮藻毒素的生物合成研究涉及许多问题。有研究表明,毒素的合成并不是藻类新陈代谢所固有的,藻类生长环境对藻类毒素的积累及毒素组成都有着强烈的影响。然而,环境和水生因素

如何影响毒素的合成呢?这与藻类如何合成毒素是有关的。另外,哪条代谢途径与毒素的合成有关呢?表达毒素生物合成酶的基因是如何衍生呢?毒素合成相关基因如何向后代传递?这些基因是否会通过有性和(或)无性机制转移到其它物种?细菌是否也具备制造“藻”毒素的遗传机制?这些问题解决的前提有赖于分子生物学的发展以及对生化途径更为透彻的理解。

环境因素如何控制毒素的合成涉及到以下几个方面:1)需要获得更多有关环境因素对HAB物种的生长及毒素合成的影响数据;2)更多毒素合成的遗传信息;3)阐明毒素合成的途径;4)解释与毒素合成有关基因的分子基础。这一方案将为我们推断毒素生物合成的演化史,并为理解环境和水生因素如何影响毒素合成基因的表达建立一个相对清晰的框架。

4 赤潮藻毒素生物合成的分子生物学技术研究及其展望

HAB物种、藻源、环境条件以及其它藻类的组

成和丰度差异都可能是导致其毒素成分和含量变化的因素^[38, 39],这对研究者分离合成毒素的相关基因来说是极为重要的。理论上,用于鉴定毒素合成基因的方案可分成两大类:其一,经典的基因鉴定法,如基因突变技术和抗体技术等;其二,现代基因鉴定法,如杂交技术、PCR扩增技术和限制性酶切技术等,但是到目前为止还没有一种方法被成功地应用于海洋藻类。

基因突变技术是经典的基因鉴定技术中发展最早的一种。它是将大量细胞暴露于某种物理或化学介质中进行基因诱变,然后将这些细胞在固体培养基上培养,将诱变后的单个菌落挑出,筛选毒素生成能力缺失表型(*tox⁻*)株。抗体技术,主要用于鉴定蛋白质类产品,其操作流程如下:蛋白质→抗体→基因表达文库的筛选→产毒基因的鉴定。但是,很多藻类(如甲藻、定鞭金藻等)都有一个巨大的基因组及一个巨大的酶系统,采用这两种方法进行赤潮藻产毒相关基因的鉴定是不太可能的^[40]。

另外,也有研究显示,赤潮藻毒素生物合成基因可能是通过质粒DNA表达的,并通过细胞间的接合或种间的有性繁殖从一个机体转移到另一个机体的^[41]。但在对细菌、蓝细菌及双鞭藻的研究中还没有分离到与产毒相关的质粒^[42, 43],至于其它赤潮藻类中是否存在该类质粒,目前还未见相关报道。由于赤潮藻基因组巨大,将其完整地克隆于其它载体(如 *Escherichia coli* 或 *Yeast artificial chromosomes*)进行表达,其成功的可能性不大。

利用赤潮藻种、藻源、环境条件以及其它藻类的组成和丰度差异可导致其毒素成分和含量变化来研究 HABs 毒素生物合成基因似乎是一种极具潜力的研究方向。目前用于这种差异基因分析鉴定的技术主要有示差杂交(Differential hybridization)、cDNA 微阵杂交(cDNA microarray hybridization)、寡核苷酸微阵杂交(Oligonucleotide microarray hybridization),以及 cDNA 表现度示差分析(cDNA representational difference analysis, cDNA RDA)。但是这几种方法面临的一个共同难题是:在消减中不能克服差异基因丰度差别大的问题。理想的克隆系统是产生的差异表达基因代表性同等而与其转录丰度无关,在进行筛选前允许进行消减效率监控,以及能够最大限度地排除假阳性克隆。近年来发展迅速的抑制消减杂交(SSH),利用抑制 PCR 能选择性地指数扩增不同丰度差异基因,使高

低丰度差异基因得到同等的展示机会。运用这一技术结合消减 cDNA 文库的高通量筛选,可快速鉴定不同丰度差异基因,并确实地排除各种假阳性和假阴性克隆^[44, 45]。

参考文献

- [1] Su J L(苏纪兰). Research of Chinese red tide [J]. Bull Chin Acad Sci (中国科学院院刊), 2001, 5:339-342.(in Chinese)
- [2] Quan X Q(全先庆), Cao S D(曹善东). Harm, cause and control of red tide [J]. J Shandong Edu Inst (山东教育学院学报), 2002, 2: 87-88.(in Chinese)
- [3] Plumley F G. Marine algal toxins: Biochemistry, genetics, and molecular biology [J]. Limnol Oceanogr, 1997, 42(5, part 2): 1252-1264.
- [4] Zhang S J(张水浸). Red Tide and Its Countermeasure of Control [M]. Beijing: Marine Publishing Company, 1994. 1-236.(in Chinese)
- [5] Keating K I. Blue-green algal inhibition of diatom growth: transition from mesotrophic to eutrophic community structure [J]. Science, 1978, 199:971-973.
- [6] Keating K I. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake [J]. Science, 1977, 196:885-886.
- [7] Windust A J, Wright J L C, McLachlan J L. The effects of the diarrhetic shellfish poisoning toxins okadaic acid and dinophysistoxin-1, on the growth of microalgae [J]. Mar Biol, 1996, 126:19-25.
- [8] Han L(韩路), Wang H J(王海珍), Cao X C(曹新川). Plant allelopathy and its use in agriculture [J]. Environ Prot Xinjiang(新疆环境保护), 2000, 22(2):88-92.(in Chinese)
- [9] Mykkestad S M, Ramlo B, Hestmann S. Demonstration of strong interaction between the flagellate *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyta) and a marine diatom [A]. In: Lassus P, Arzul G, Erard-le D E, et al. Harmful Marine Algal Blooms [C]. New York: Lavoisier Intercept Ltd, 1995. 633-638.
- [10] Granéli E, Johansson N. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions [J]. Harmful Algae, 2003, 2:135-145.
- [11] Vining L. Genetic and environmental control of antibiotic production [A]. In: Vining L, Stuttard C. Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production [C]. London: Butterworth-Heinemann, 1995. 1-8.
- [12] Hua Z A(华泽爱). Components and their effect of toxins of red tide algae [J]. Trans Ocean Limn(海洋湖沼通报), 1994, 3:74-82.(in Chinese)
- [13] Huntley M E, Sykes P, Rohan S, et al. Chemically mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance [J]. Mar Ecol Progr Ser, 1986, 28:105-120.
- [14] Ives J D. Possible mechanisms underlying copepod grazing responses to levels of toxicity in red tide dinoflagellates [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1987, 112:131-145.

- [15] Turiff N, Runge J A, Cembella A D. Toxin accumulation and feeding behaviour of the planktonic copepod *Calanus finmarchicus* exposed to the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum* [J]. Mar Biol, 1995, 123:55-64.
- [16] Tumer J T, Tester P A, Hansen P J. Interactions between toxic marine phytoplankton and metazoan and protistan grazers [A]. In: Anderson D M, Cembella A D, Hallegraeff G. M. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms [C]. Heidelberg: Springer-Verlag, 1998. 452-474.
- [17] Parkhill J P, Cembella A D. Effect of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada [J]. J Plankton Res, 1999, 21(5):939-955.
- [18] Pan H (潘卉), Song L R (宋立荣), Liu Y D (刘永定). Characterization of toxic waterbloom-forming *Cyanobacteria* by modified PCR [J]. Acta Hydrobiol Sin (水生生物学报), 2001, 25(2):159-165.(in Chinese)
- [19] Li X Y (李效宇), Song L R (宋立荣), Liu Y D (刘永定). The production, detection and toxicology of *Microcystins* [J]. Acta Hydrobiol Sin (水生生物学报), 1999, 23(5):517-523.(in Chinese)
- [20] Johansson N, Granéli E. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Prymnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1999, 239:243-258.
- [21] Wang D Z, Hsieh D P H. Effects of nitrate and phosphate on growth and C₂ toxin productivity of *Alexandrium tamarense* CI01 in culture [J]. Mar Poll Bull, 2002, 45:286-289.
- [22] Wang D Z, Hsieh D P H. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* HK9301 isolated from the South China Sea [J]. Harmful Algae, 2005, 5:401-410.
- [23] Siu G K Y, Young M L C, Chan D K O. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella* [J]. Hydrobiologia, 1997, 35:117-140.
- [24] 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.
- [25] Mitrovic S M, Fernández A M, McKenzie L, et al. Effects of selenium, iron and cobalt addition to growth and yessotoxin production of the toxic marine dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* culture [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2004, 313(2):337-351.
- [26] Taroncher-Oldenburg G, Kulis D M, Anderson D M. Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* [J]. Limnol Oceanogr, 1997, 42:1178-1188.
- [27] Philip T O, Jones G J. Relationship between microcystin production and cell division rate in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures [J]. Limnol Oceanogr, 1998, 43(7):1604-1614.
- [28] Dantzer W R, Levin R E. Bacterial influence on the production of paralytic shellfish toxins by dinoflagellated algae [J]. J Appl Microbiol, 1997, 83:464-469.
- [29] Lin W (林伟), Zhou M J (周名江). Effect of marine bacteria on harmful algal blooms [J]. Mar Sci (海洋科学), 2001, 25(3): 34-38.(in Chinese)
- [30] Kopp M, Doucette G J, Kodama M, et al. Phylogenetic analysis of selected toxic and non-toxic *Alexandrium tamarense* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1997, 24:251-257.
- [31] Douglas D J, Bates S S. Production of domoic acid, a neurotoxic amino acid, by an axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* Hasle [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1992, 49-85.
- [32] Douglas D J, Bates S S, Bourque L A, et al. Domoic acid production by axenic and non-axenic cultures of the pennate diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* [A]. In: Smayda T J, Shimizu Y. Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea [M]. Amsterdam: Elsevier, 1993. 595-600.
- [33] Bates S S, Douglas D J, Doucette G J, et al. Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* [J]. Nat Toxins, 1995, 3:428-435.
- [34] Keating K I. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake [J]. Science, 1977, 196:885-886.
- [35] Cheng C Y (陈常英), Ding X Q (丁晓琴), Feng S (冯珊). Studies on electronic structure and structure-activity relationship of ciguatoxin (CTX) [J]. Acta Phys-Chem Sin (物理化学学报), 2000, 16(4):307-311.(in Chinese)
- [36] Garson M J. The biosynthesis of marine natural products [J]. Chem Rev, 1993, 93:1699-1733.
- [37] Shimizu Y. Microalgal metabolites [J]. Chem Rev, 1993, 93(5): 1685-1698.
- [38] Hashimoto T, Yamada Y. Alkaloid biogenesis: Molecular aspects [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1994, 45:257-285.
- [39] Jensen P R, Fenical W. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives [J]. Ann Rev Microbiol, 1994, 48:559-584.
- [40] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 2001.
- [41] Heinemann J J, Sprague G F. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast [J]. Nature, 1989, 340:205-209.
- [42] Baker J A, Entsch B, Neilan B A, et al. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:6070-6076.
- [43] Boczar 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.
- [44] Pan M H (潘美辉), Jin H L (金虎林), Yuan J G (袁建刚), et al. Research methods of differential gene expression [J]. Basic Med Sci Clin (基础医学与临床), 1997, 17(5):1-11.(in Chinese)
- [45] Zou S W (邹胜伟), Cheng Q X (陈清轩). Inquiry to the research methods of genes' differential display [J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2000, 21(2):80-82.(in Chinese)