

# 厦门港纤小裸甲藻 (*Takayama pulchellum*) 的形态、生长及分子特征

顾海峰<sup>1,2</sup>, 孙 军<sup>3</sup>, 邹迎麟<sup>4</sup>, 方 琦<sup>2</sup>, 蓝东兆<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学, 青岛 266003; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005; 3. 中国科学院海洋研究所  
海洋生态和环境科学重点实验室, 青岛 266071; 4. 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266011)

**摘要:**在 2003 年厦门港发生的一次裸甲藻赤潮中分离得到了纤小裸甲藻 (*Takayama pulchellum*), 并对其形态学进行了光镜和电镜的观察, 该株藻细胞个体较小, 长约 20 ~ 23 μm, 宽约 14 ~ 20 μm。藻细胞外表卵圆形, 细胞上壳有一条明显的 S 形顶沟, 顶沟是特异性的反 S 形。与模式种相比, 这一株裸甲藻细胞核更靠上部, 大部分细胞横沟都没有偏移。纤小裸甲藻在盐度为 28 时比生长率最大, 达到 0.42, 随着盐度下降, 比生长率也跟着下降, 当盐度下降到 16 时, 生长率为 0。盐度范围在 8 ~ 16 时, 超过 80% 的藻类能存活 48h; 当盐度低于 4 时, 生长率和存活率都为 0。24 ~ 27 °C 是纤小裸甲藻的最适生长温度, 比生长率超过 0.50, 当温度升到 30 °C 时, 生长率急剧下降到约 0.35。毒素测定结果显示该株裸甲藻不含麻痹性贝毒和神经性贝毒。本株纤小裸甲藻大亚基 D1 ~ D2 区序列长度为 721bp, 与基因库中该种的一株相似种同源性超过 99%。对 18 株裸甲藻转录间隔区 (ITS) 序列建立的系统进化树显示, 纤小裸甲藻和 *Karlodinium micrum* 的距离最近, 通过 ITS 序列建立的系统发育树大致能够把 *Akashiwo* 属、*Karenia* 属、*Karlodinium* 属和 *Takayama* 属与 *Gymnodinium* 属区分开来。

**关键词:**厦门港; 纤小裸甲藻; 形态; 生长; 分子特征

文章编号: 1000-0933(2006)04-1021-07 中图分类号: Q178 文献标识码: A

## Morphology, growth and molecular character of *Takayama pulchellum* from Xiamen Harbor

GU Hai-Feng<sup>1,2</sup>, SUN Jun<sup>3</sup>, ZOU Ying-Lin<sup>4</sup>, FANG Qi<sup>2</sup>, LAN Dong-Zhao<sup>2</sup> (1. Ocean University of China Qingdao, Qingdao, 266003, China; 2. Third Institute of Oceanography Xiamen, 361005, China; 3. Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071, China; 4. The First Institute of Oceanography, Qingdao, 266011, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(4): 1021 ~ 1027.

**Abstract:** A strain of *Takayama pulchellum* was isolated during a bloom in Xiamen Harbor in 2003. Morphology was observed under LM and SEM. The vegetative cells are relatively small in size, ranging from 20 ~ 23 μm long and 14 ~ 20 μm wide. Cells are broadly oval with a conspicuous and well-defined sigmoid apical groove present on the epitheca. The apical groove is a characteristic reversed S-shape. The nucleus is located in the top part of the cell and most cells' cingulum do not displace, which are different from the type species. The growth rate reached the highest value, about 0.43, at salinity of 28 and dropped when salinity decreased. The cells ceased growing when salinity went down to 16, however, more than 80% of the cells could survive for 48h when salinity ranged from 8 to 16. Survival was not observed at salinity lower than 4. Best growth rate of *Takayama pulchellum* occurred at temperature of 24 and 27 °C, which was above 0.50. Growth rate dropped sharply to about 0.35 when temperature increased to 30 °C. PSP (paralytic shellfish poisoning) and NSP (neurotoxic shellfish poisoning) analysis did not

**基金项目:**国家重点基础研究发展规划资助项目(2001CB409702, 2001CB409709); 国家自然科学基金资助项目(40476053); 国家海洋局海底科学重点实验室资助项目(2004 ~ 2005)

收稿日期: 2005-01-18; 修订日期: 2005-09-04

作者简介: 顾海峰(1971 ~), 男, 浙江平湖, 硕士, 主要从事有害藻类生态学研究. E-mail: haifenggu@yahoo.com

**Foundation item:** This project was supported by State Key Basic Research and Development Plan (No. 2001CB409702, 2001CB409709), National Natural Science Foundation of China (No. 40476053) and SOA Sea Floor Science Key Laboratory (2004-2005)

Received date: 2005-01-18; Accepted date: 2005-09-04

**Biography:** GU Hai-Feng, Master, mainly engaged in harmful algae ecology. E-mail: haifenggu@yahoo.com

reveal any toxin in this strain. The D1-D2 region of LSU (large subunit) rDNA and total ITS1-5.8S-ITS2 were amplified, cloned and sequenced. The partial LSU has 721bp and shares more than 99% similarity to the same species whose data was deposited in the Genbank. A phylogenetic tree was constructed using ITS sequence of 18 species, showing that *Takayama pulchellum* is closely related to *Karlodinium micrum*. The genus of *Akashiwo*, *Karenia*, *Karlodinium* and *Takayama* could be separated from *Gymnodinium* genus approximately using ITS sequence.

**Key words:** Xiamen harbor; *Takayama pulchellum*; morphology; growth; molecular character

甲藻的一个重要特征是皮层有一层外围小泡,称之为皮层小泡<sup>[1,2]</sup>。小泡通常包含着纤维素组成的板,它们形成了甲藻的细胞壁或称之为甲板。甲板的排列模式即甲板方程式是甲藻分类的主要依据<sup>[3]</sup>。甲板的排列方式具有很大的稳定性,下壳通常比上壳更保守,而最保守的是纵沟和横沟<sup>[4]</sup>。裸甲藻的皮层小泡很小,只在顶部、横沟和纵沟等部位形成可分辨的结构<sup>[2]</sup>,因此裸甲藻没有甲板方程式,这给它们的鉴定增加了困难。

裸甲藻是一类重要的赤潮生物,其中有多种种类可以产生麻痹性毒素、神经性毒素和鱼毒素。最近很多研究人员利用大亚基序列、色素组成并结合形态学特征对裸甲藻属重新划分,把原来这个属的种类归到5个属中,它们是:*Gymnodinium*属(有1个马蹄形的顶沟和多甲藻素)、*Akashiwo*属(有1个顺时针螺旋形的顶沟和多甲藻素)、*Karenia*属(有1个直线型的顶沟和墨角藻黄素)、*Karlodinium*属(有1个较短的直线型顶沟、1个腹孔和墨角藻黄素)和 *Takayama*属(有1个S型的顶沟和墨角藻黄素)<sup>[5,6]</sup>。

纤小裸甲藻最早发现于日本,被认为是能产生鱼毒素、溶血性毒素和神经性毒素的种类<sup>[7]</sup>,1994年 Larsen 对它正式描述并定名为 *Gymnodinium pulchellum*<sup>[8]</sup>。纤小裸甲藻在美国和澳大利亚都引发过赤潮,并导致大量鱼类死亡<sup>[8,9]</sup>。最近纤小裸甲藻被更名为 *Takayama pulchellum*,由于缺少模式种的分子数据,这个种的定名上还有不清楚的地方<sup>[6]</sup>。

在厦门港采样分离到了纤小裸甲藻这种可能有毒的裸甲藻,研究了其形态学和生长特性,测定了该种的转录间隔区和大亚基 D1~D2 片段序列,为裸甲藻的分子分类提供了资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 藻株的培养

藻株(TPXM)2003年从厦门港九龙江口的赤潮水样中单细胞分离获得。藻细胞在不加硅的 f/2 培养液<sup>[10]</sup>中培养,其他条件为 20℃,3000lx,12h:12h 光照:黑暗。

### 1.2 形态学观察

藻细胞在奥林帕斯相差显微镜下活体观察。电镜样品的制备步骤为:离心收集指数期的细胞,采用终浓度 2%的戊二醛固定,系列酒精脱水,乙酸异戊酯置换,临界点干燥,喷金,用 Philips EC30 扫描显微镜观察和照相。

### 1.3 生长速率和存活率

在7个温度组(12,15,18,21,24,27,30℃)和7个盐度组(4,8,12,16,20,24,28)下测定生长速率,温度用控温箱调节,误差在±1℃,不同盐度的海水用正常海水和蒸馏水调配而成,其他共同的条件是光照强度 3000lx,光照周期 12h:12h,温度 20℃(当温度不是变量)。在进行温度梯度试验时,藻细胞在试验温度附近驯化 7d,盐度试验时则不驯化。藻细胞接种到3个装有 100ml f/2 培养液的烧杯中,使密度达到 4000 个细胞/ml。每两天计数细胞,至少计数 200 个细胞。比生长速率用公式:  $V = \ln(N_t/N_0)/t$  来计算。存活率 = 两天后的细胞密度/起始细胞密度 × 100。

### 1.4 麻痹性贝毒(PSP)和神经性贝毒(NSP)的检测

PSP 的检测采用小鼠毒性检测法和神经受体结合毒素检测法。小鼠毒性检测采用 AOAC 标准化方法<sup>[11]</sup>。受体结合检测方法如下:藻细胞以 0.1mol/L 乙酸提取毒素,超声破碎细胞后离心留取上清液。提取 6 周大鼠脑突触体准备液<sup>[12]</sup>,并通过蛋白测定来定量受体浓度。受体准备液分装于 2ml 冻存管置 -40℃ 保存。STX 毒

素标准在实验中按照 1000, 100, 30, 10, 3, 1, 0.1, 0.01 nmol/L 的浓度梯度制成标准曲线溶液。实验在特制的 Millipore 96 孔微量培养盘(孔底部垫有一层滤膜)中进行,在培养盘中加入一定量的 H<sup>3</sup>-STX, STX 标准毒素或样品和受体准备液,4℃ 条件下培养 1h,使受体与毒素充分结合。然后清洗并真空抽滤掉未结合的毒素,载有毒素受体结合体的滤膜被转移至闪烁瓶,加闪烁液后通过液体闪烁计数仪进行放射性计数,做出竞争曲线,计算未知样品中毒素含量。

NSP 的检测采用的是受体结合毒素检测法。藻细胞以甲醇提取毒素,超声破碎细胞后离心留取上清液。受体的准备同 PSP 受体方法。标准毒素采用短裸甲藻毒素 PbTx<sub>3</sub>,按照 10000, 1000, 100, 10, 0.1, 0.01 nmol/L 浓度梯度制成标准曲线溶液。实验步骤如 PSP。

### 1.5 PCR 扩增、纯化及克隆

离心收集 50ml 指数期末期的细胞,用 DNA 提取试剂盒(Sangon)提取总 DNA。ITS1-5.8S-ITS2 片段用 ITSA 和 ITSB 引物扩增<sup>[13]</sup>。PCR 反应程序为 94℃ 变性 4min, 然后是 94℃ 1min, 50℃ 2min, 72℃ 3min 循环 25 次,最后在 72℃ 延伸 7min。大亚基 D1 ~ D2 区域用 D1R 和 D2C 引物扩增<sup>[14]</sup>,PCR 程序与上述的相同,只有退火温度改为 42℃。PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒(华美)纯化,然后克隆到 pGEM-T 质粒(Promega),蓝白斑筛选,菌落 PCR 确定为阳性反应后送生工测序,序列存放在基因库中,序列号为 AY764718-19。

### 1.6 数据处理

序列首先用 BLAST 程序<sup>[15]</sup>与基因库中的序列比对,然后用 CLUSTAL W<sup>[16]</sup>程序进行多重比对,系统进化树用 Mega2.1 软件中的最大似然法建立<sup>[17]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 形态学

藻细胞个体较小,长约 20 ~ 23 μm, 宽约 14 ~ 20 μm。藻细胞外表呈卵圆形,背腹部稍有压缩。腹面较扁平,而背面较圆。细胞上壳有一条明显的 S 形顶沟(图 a ~ c)。顶沟是特异性的反 S 形。上壳比下壳略小一点。纵沟很深,向上侵入到上壳接近顶沟的位置,形成一个食指形的形状(图 d)。细胞核很大,几乎占据了整个细

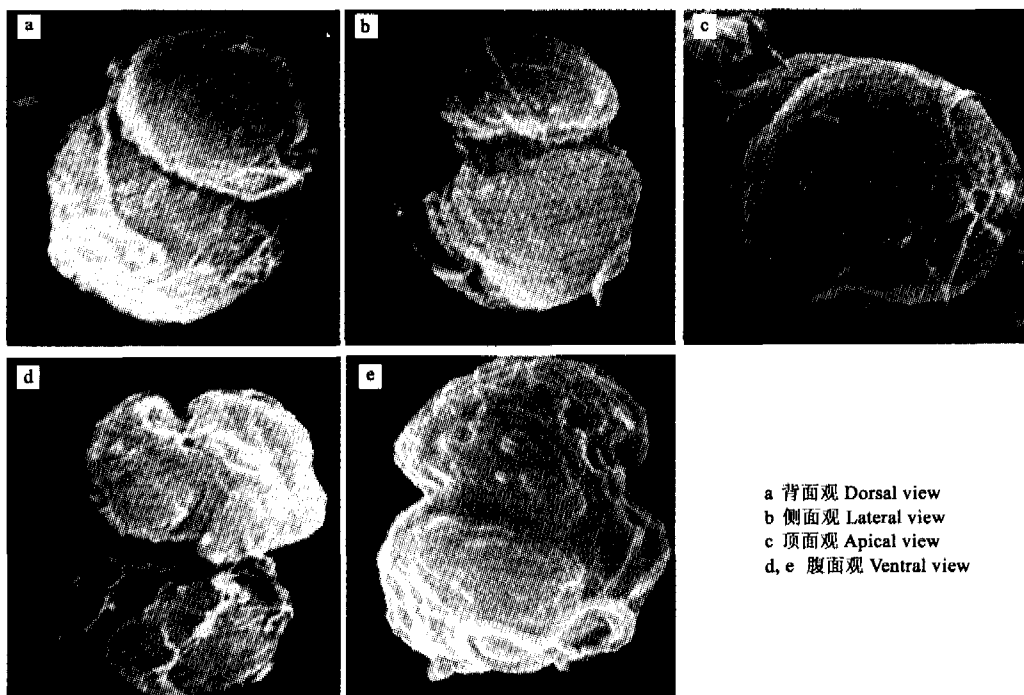


图 1 纤小裸甲藻的扫描电镜照片(标尺代表 1 μm)

Fig.1 SEM photos of *Takayama pulchellum* (bar represent 1 μm).

胞上半部。大部分细胞横沟都没有偏移(图 b,d),但个别细胞横沟偏移也能够达到横沟宽度的 1 倍多(图 e)。

## 2.2 生长特征

盐度对纤小裸甲藻生长的影响较大,当盐度为 28 时生长率最大,达到 0.42,随着盐度下降,比生长率也跟着下降,当盐度下降到 16 时,生长率为 0。盐度范围在 8~16 时,裸甲藻虽然不能生长,但依然有超过 80% 的藻类能存活下来;而当盐度下降到 4 时,生长率和存活率都为 0(表 1)。

表 1 在不同盐度下纤小裸甲藻的生长速率和存活率(括号中的数据为标准差)

Table 1 Growth rate and survival of *Takayama pulchellum* at different Salinity (The data in bracket are SD)

	盐度 Salinity						
	4	8	12	16	20	24	28
生长率 Growth rate	0	0	0	0	0.32(0.04)	0.37(0.01)	0.42(0.06)
存活率 Survival rate	0	0.84(0.19)	0.88(0.12)	0.89(0.14)			

温度对纤小裸甲藻生长的影响很大,24~27℃ 是它的最适生长温度,比生长率超过 0.50,当温度升到 30℃ 时,生长率急剧下降到约 0.35(图 2A)。厦门港各个季节海水温度的变化不大,冬季最低约为 15℃,夏季最高可达到 30℃(图 2B),因此理论上厦门港周年都适合纤小裸甲藻的生长。

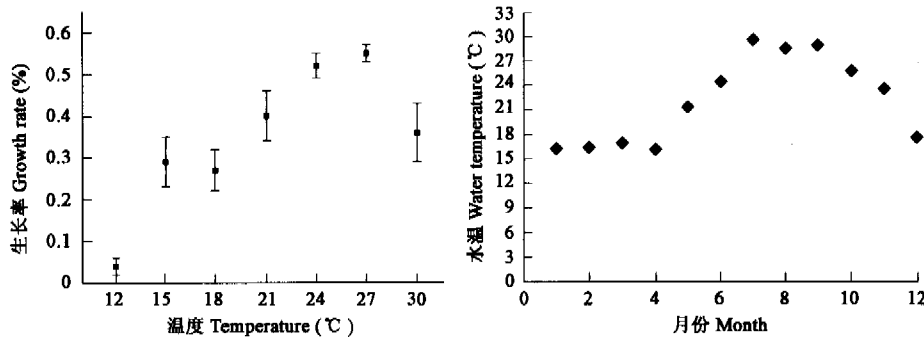


图 2 A: 温度对纤小裸甲藻生长的影响, B: 厦门港水温的季节性变化<sup>[18]</sup>

Fig. 2 A: Effect of temperature on growth of *Takayama pulchellum*, B: Seasonal variation of water temperature in Xiamen Harbor<sup>[18]</sup>

## 2.3 毒性

在本株裸甲藻的细胞提取液或藻培养液中未检测出麻痹性贝毒和神经性毒素。

## 2.4 分子特征

本株纤小裸甲藻大亚基 D1~D2 区序列长度为 721bp,与基因库中该种的一株相似种同源性超过 99%,证明了分离得到的确实是纤小裸甲藻。

纤小裸甲藻 ITS1 长 211, 5.8s 长 159, ITS2 长 217,对 18 株裸甲藻 ITS 序列建立的系统进化树显示(图 8),纤小裸甲藻和 *Karodinium micrum* 这两个种的距离最近,共同组成了一颗子树。*Akashiwo sanguinea* 和 *Gyrodinium instriatum* 以及两株 *Gymnodinium* sp. 共同组成了一颗子树。这两株 *Gymnodinium* sp. 可能也属于 *Akashiwo* 属。*Karenia* 属的两个种和 *Gymnodinium maguelonnense* 以及一株 *Gymnodinium* sp., 这一株 *Gymnodinium* sp. 在用大亚基序列建立的系统树中也是与 *Karenia* 属距离最近(结果未显示),因此可能也属于 *Karenia* 属。*Gymnodinium corii* 似乎是它们共同的祖先。

## 3 讨论

### 3.1 形态学

与 Larsen 描述的模式种相比,这一株裸甲藻形态上主要在两个地方有差异。模式种的横沟有偏移,幅度为横沟宽度的 1~1.5 倍,而本株只有个别细胞横沟有偏移;模式种细胞中央偏左位置处有一个椭圆形、较大的细胞核,而本株的细胞核靠上部。由于是在细胞分离一年之后才进行了电镜观察,在培养过程中细胞形态

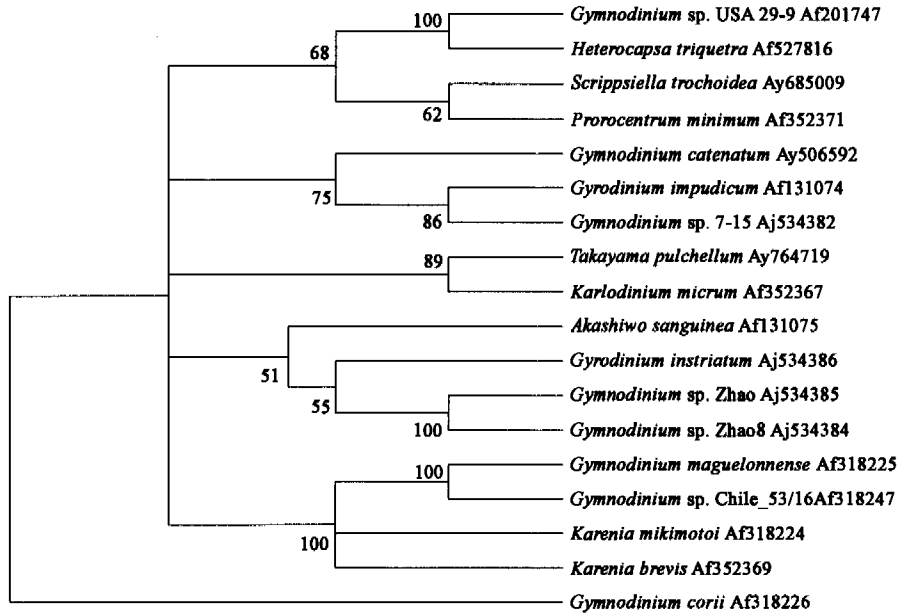


图3 用最大似然法建立的基于转录间隔区序列的系统发育树(节点旁的数字代表1000次计算的百分比)

Fig.3 Maximum parsimony consensus tree resolved from ITS-rDNA nucleotide sequence (Numbers next to branching points indicate percentage of 1000 bootstraps)

可能与真实的情况有一定的偏差,从细胞形态、大小和顶沟的形态学特征基本可以认为这一株裸甲藻应该是纤小裸甲藻。

### 3.2 生长特征

九龙江口水体盐度的变化很大,随着与外海的距离不同而有差异,在退潮时最低的可降到4,而涨潮时又回到28。本次赤潮持续时间超过了48h,虽然纤小裸甲藻在低盐度下不能生长,但大部分能存活下来,这为纤小裸甲藻赤潮的形成和维持创造了条件。

6月初和10月至11月的海水温度在纤小裸甲藻的最适生长温度范围内,也是该种发生赤潮可能性最大的时间。但是温度只是影响藻类生长的一个条件,其他如盐度、营养盐、光照条件都有一定的影响,而且藻类的快速生长只是赤潮发生的一个基本条件<sup>[19]</sup>,大部分的赤潮并不是藻类原地大量繁殖形成的,而是由其他区域的藻类通过特殊的海流聚集才会形成<sup>[20]</sup>,其他如浮游动物捕食的减少<sup>[21]</sup>也对赤潮形成有一定的贡献,这可能是厦门港仅仅在2003年6月发生了大规模裸甲藻赤潮的原因。

在过去的20年中,裸甲藻在中国海域曾多次引发过赤潮。比如珠江口1998年发生大规模的米金裸甲藻(*Karenia mikimotoi*)和红色裸甲藻(*Akashiwo sanguinea*)赤潮<sup>[22,23]</sup>,烟台1998年也发生大规模的红色裸甲藻赤潮<sup>[24]</sup>。厦门海域曾在1986年发生过一次裸甲藻赤潮,密度达到 $10^7$ 个/L<sup>[25]</sup>,据了解,沉寂了很多年后,2003年7月再次发生了大规模的裸甲藻赤潮,密度达到了 $10^6$ 个/L,而2004年也多次发生小规模裸甲藻赤潮。厦门海域裸甲藻赤潮发生的频率有增加的趋势。

3.3 本株裸甲藻未能检测到麻痹性贝毒和神经性贝毒,由于没有对当时的赤潮水样进行毒素检测,因此仍不能排除其他株系也是无毒的。

### 3.4 分子特征

通过ITS序列建立的系统发育树没有能够把*Karlodinium*属和*Takayama*属分开,而用28S序列建立的系统发育树则能够把它们区分开<sup>[6]</sup>,与28S序列相比,ITS序列进化速度更快,也经常用来在属和种的水平上作进化分析<sup>[26]</sup>,并成功地区分亚历山大属和斯氏藻属下的各个种<sup>[13,27]</sup>,但得到的结果却有点令人费解。从ITS碱基数来看,纤小裸甲藻与*Karlodinium micrum*最为接近,分别是212,159和216。而裸甲藻科其他种类这3个片

段的碱基数都和它们有较大的差异<sup>[28]</sup>,这也再次证明了 ITS 的长度可以作为一个有用的种类标志<sup>[29]</sup>。另外这两个属都有墨角藻黄素<sup>[6]</sup>,说明色素在分类上也具有重要的作用。通过 ITS 序列建立的系统发育树大致能够把 *Akashiwo* 属、*Karenia* 属、*Karlodinium* 属和 *Takayama* 属与 *Gymnodinium* 属区分开来,但多甲藻的种类和 *Gymnodinium* sp. 混在一起,而 *Gymnodinium* 属的种类并没有有效地聚合在一起,可能的原因是裸甲藻缺少有效的分类依据,还有待人们发现并进一步的细分种类,这从最近 *Takayama* 属根据 S 形的顶沟而从裸甲藻属分离出来能够得到验证;另外一个原因是目前采用的包括 18s, 28s 和 ITS 这些片段的序列用来区分裸甲藻都不是很有效<sup>[30,31]</sup>,需要寻找更适合的片段。

#### References:

- [ 1 ] Loeblich AR III. The amphiesma of dinoflagellate cell covering. Proc North Amer Paleontol Convention, Chicago, Kansas: Allen Press, 1969. 2: 867 ~ 929.
- [ 2 ] Netzel H, Dürr G. Dinoflagellate Cell Cortex. In: Spector D ed. Dinoflagellates. Academic Press, Orlando, 1984. 43 ~ 105.
- [ 3 ] Kofoid CA. On *Peridinium steinii* Jörgensen, with a note on the nomenclature of the skeleton of the Peridinidae. Arch Protistenkd, 1909, 16: 25 ~ 47.
- [ 4 ] Balech E. On thecal morphology of dinoflagellates with special emphasis on circular (sic) and sulcal plates. An Centro Cienc Mar Limnol Univ Nat Auton Mexico, 1980, 7: 57 ~ 68.
- [ 5 ] Daugbjerg N, Hansen G, Larsen J, Moestrup O. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU r DNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. Phycologia, 2000, 39:302 ~ 317.
- [ 6 ] Salas MF De, Bolch C J S, Botes L, et al. Takayama Gen. Nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), A new genus of unarmored dinoflagellates with sigmoid apical grooves, including the description of two new species. J. Phycol, 2003, 39:6, 1233 ~ 1246.
- [ 7 ] Onoue, K, Nozawa K, Kumanda K, et al. Occurrence of a toxic dinoflagellate, *Gymnodinium*-type 84" in Kagoshima Bay, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 1985, 51:1567.
- [ 8 ] Larsen J. Unarmoured dinoflagellates from Australian waters I. The genus *Gymnodinium* (Gymnodiniales, Dinophyceae). Phycologia, 1994, 33:342 ~ 349.
- [ 9 ] Steidinger KA, Landsberg J H, Truby E W, et al. First report of *Gymnodinium pulchellum* (Dinophyceae) in North America and associated fish kills in the Indian River, Florida. J. Phycol., 1998, 34:431 ~ 437.
- [ 10 ] Guillard, R R L, Ryther J H. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol., 1962, 8:229 ~ 239.
- [ 11 ] AOAC. Domoic acid in mussels. Sec. 49.9.02, Method 991.26., and Paralytic shellfish poison; Biological method. Sec.35.1.37, Method 959.08. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 1995, 16<sup>th</sup> ed., P. A. Cunniff Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, 1995.
- [ 12 ] Doucette G J, Logan M L, Van Dolah F M, et al. Development and preliminary validation of a microtiter plate-based receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins. Toxicon, 1997, 35(5): 625 ~ 636.
- [ 13 ] Adachi M, Sako Y, Ishida Y. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequence of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. J. Phycol., 1996.32:424 ~ 432.
- [ 14 ] Scholin CA, Herzog M, Sogin M, et al. Identification of group and strain specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae) II. Sequence analysis of a fragment of the LSU r RNA gene. J. Phycol., 1994, 30:999 ~ 1011.
- [ 15 ] Altschul S F, Thomas L M, Alejandro A S, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 1997, 25, 3389 ~ 3402.
- [ 16 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res., 1997, 24: 4876 ~ 4882.
- [ 17 ] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2; Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, 2001, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- [ 18 ] Chen Q, Zeng Z, Zhang S, et al. Report on the red tide occurred in Xiamen Harbor in 1987. Collected papers on red tide survey and study in Xiamen Harbor. Beijing: China Ocean Press, 1993. 1 ~ 19.
- [ 19 ] Smayda T J. Dinoflagellate bloom cycles: what is the role of cellular growth rate and bacteria? In: Yasumoto T, Oshima Y, and Yukuyo Y eds. Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Japan, 1996. 331 ~ 334.
- [ 20 ] Franks P J S. Spatial patterns in dense algal blooms. Limnol. Oceanogr., 1997, 42:1297 ~ 1305.
- [ 21 ] Sautour, B and Castel J. Grazing activity of mesoplankton copepods in a shallow bay during an algal spring bloom(Marennes-Oleron Bay, France). JMBA

- 1999, 79:73 ~ 84.
- [22] Huang C J, Dong Q X. Taxonomic and biological studies on causative organisms from a large scale red tide occurrence in Zhujiang River estuary in the spring, 1998 I. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(2):197 ~ 204.
- [23] Huang C J, Dong Q X. Taxonomic and biological studies on causative organisms from a large scale red tide occurrence in Zhujiang River estuary in the spring, 1998 II. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(3): 233 ~ 238.
- [24] Wu Y L, Zhou C X. Evolution and causes of formation of *Gymnodinium sanguineum* bloom in Yantai Sishili bay. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32(2):159 ~ 167.
- [25] Zhang S J, Xu K C, Chen Q H, *et al.* Observation of a red tide event in the western Harbor, Xiamen. *Acta Oceanologia Sinica*, 1988, 10(5):602 ~ 608.
- [26] Coleman A W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 2003, 19(7):370 ~ 375.
- [27] D'Onofrio, Marino D, Montresor M. Toward and assessment on the taxonomy of dinoflagellates that produce calcareous cysts (Calciodinelloideae, Dinophyceae): A morphological and molecular approach. *J. Phycol.*, 1999, 35:1063 ~ 1078.
- [28] Shao P, Chen YQ, Zhou H, *et al.* Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis. *Mar. Biol.*, 2004.144: 215 ~ 224.
- [29] Steane D A, McClure B A, Clarke A E, *et al.* Amplification of the polymorphic 5.8Ss rRNA gene from selected Australian gigartinean species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. *J. Phycol.*, 1991, 27:758 ~ 762.
- [30] Saunders C W, Hill D R A, Sexton J P, *et al.* Small subunit ribosomal RNA sequences from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypotheses with molecular systematics methods. *Plant Syst Evol Suppl*, 1997, 11:237 ~ 257.
- [31] Zardoya R E, Costas V, Lopez-Rodas, *et al.* Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J Mol Evol*, 1995, 41:637 ~ 645.

#### 参考文献:

- [18] 陈其焕,曾昭文,张水浸,等. 厦门港 1987 年赤潮调查报告. 厦门港赤潮调查研究论文集. 北京:海洋出版社,1993. 1 ~ 19.
- [22] 黄长江,董巧香. 1998 年春季珠江口海域大规模赤潮原因生物的形态分类和生物学特征 I. 海洋与湖沼,2000,31(2):197 ~ 204.
- [23] 黄长江,董巧香. 1998 年春季珠江口海域大规模赤潮原因生物的形态分类和生物学特征 II. 海洋与湖沼,2000,31(3):233 ~ 238.
- [24] 吴玉霖,周成旭. 烟台四十里湾海域红色裸甲藻赤潮发展过程及其成因. 海洋与湖沼,2001,32(2):159 ~ 167.
- [25] 张水浸,许昆灿,陈其焕,等. 厦门西港区一次赤潮的观测. 海洋学报,1988,10(5):602 ~ 608.