

北部湾海洋原甲藻的形态特征及其系统进化分析

龙超*, 陈波, 何碧娟, 高程海

(广西科学院, 广西近海海洋环境科学重点实验室, 南宁 530007)

摘要: 为探讨广西北部湾海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)的形态特征及其系统进化意义,利用光学显微镜、分子生物学方法,对海洋原甲藻 BBW-01 藻株的形态特征进行了描述,并分析了其分子系统进化关系。结果表明,各地理株系的海洋原甲藻的形态特征相似,仅在细胞大小上存在差异。海洋原甲藻 BBW-01 与采自于广东大亚湾的海洋原甲藻形态特征最为接近,其壳板后端的 7 个呈“V”字形对称排列的大孔可作为海洋原甲藻鉴定的重要指标。18S rDNA 序列同源检索和系统进化分析表明,海洋原甲藻 BBW-01 与源自中国南海的海洋原甲藻的亲缘关系最近,并与其他 2 株海洋原甲藻聚成一支,属于浮游、兼性浮游类原甲藻。因此,对赤潮原因种的准确识别有助于预防和减轻赤潮对海洋环境和人类带来的危害。

关键词: 海洋原甲藻; 形态特征; 系统进化; 北部湾

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.04.006

Morphological and Phylogenetic Analysis of *Prorocentrum micans* Isolated from the Beibu Gulf

LONG Chao*, CHEN Bo, HE Bi-juan, GAO Cheng-hai

(Guangxi Key Laboratory of Marine Environmental Science, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: The aim was to understand morphological characteristics and phylogenetic evolution significant of *Prorocentrum micans*. The morphological characters of *P. micans* BBW-01 strain, isolated from Beibu Gulf of Guangxi Province, was described under light microscopy, and phylogenetic evolution relationship was studied on the basis of molecular sequences. The morphological characters of different geographical *P. micans* tested in this study were similar, except of the range of cell size. The morphology of *P. micans* BBW-01 was more close to that isolated from Daya bay of Guangdong Province. Seven big pores arranged symmetrically with V-shape at the posterior end could be an important indicator of identification of *P. micans*. Homologous Blast and system evolution analysis on the basis of 18S rDNA sequence showed that *P. micans* BBW-01 had close relation with *P. micans* (DQ004735), and clustered together with two other *P. micans*, belonging to planktonic or facultative planktonic *Prorocentrum*. Therefore, the precise identification of the causative species was helpful to prevent and reduce the harm of red tide on marine environment and human beings.

Key words: *Prorocentrum micans*; Morphological characteristics; Molecular phylogeny; Beibu Gulf

原甲藻属(*Prorocentrum*)隶属于甲藻门 纲(Desmokyontae)原甲藻目(Prorocentrales)^[1], 种类遍
(Pyrrophyta)双鞭甲藻纲(Dinophyceae)纵裂甲藻亚 及世界各大海域,在我国东海、南海等海域均有发

收稿日期: 2012-09-27 接受日期: 2013-01-21

基金项目: 广西科学院基本科研业务费资助项目(12YJ25HY10); 广西自然科学基金项目(2012GXNSFEA053001); 广西自然科学基金项目(2011GXNSFE018002)资助

作者简介: 龙超(1984~),男,硕士,实习研究员,主要研究方向为海洋生物研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: Clongflying@163.com

现,是重要的赤潮原因种^[1-3]。目前,在我国沿海海域可引发赤潮的原甲藻有东海原甲藻、海洋原甲藻、微小原甲藻、尖叶原甲藻、利玛原甲藻以及反曲原甲藻^[1-4]。其中,东海原甲藻是我国沿海海域赤潮的第一优势种,2007-2010年我国沿海共发生赤潮205次,由东海原甲藻引发的赤潮有45次,约占赤潮总次数的22%^[4-7]。此外,利玛原甲藻不仅能引发赤潮,还能产生赤潮藻毒素^[8],其产生的腹泻性贝毒DSP(Diarrhetic shellfish poisoning)可以通过食物链的积累,对海洋生物及人类健康构成巨大威胁^[4]。

海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)最早由Ehrenberg发现,是原甲藻属的代表种^[9],也是我国近岸水域常见赤潮种,曾在香港水域引发5次赤潮^[10],在深圳湾发生过2次大面积赤潮,细胞密度高达 $10^7 \sim 10^8 \text{ cells L}^{-1}$ ^[11]。赤潮发生时,海边会散发出浓重的腥味,赤潮后期海水中营养盐浓度急剧下降,对海洋生态平衡以及海洋环境造成严重危害。由于海洋原甲藻的形态多变,在鉴定上具有一定难度,鉴于此,本文试图从形态学角度将分离于广西北部湾的海洋原甲藻与其他地理株系进行对比,并从分子生物学角度描述该种的系统进化地位,以期为该藻的鉴定工作提供科学的依据,从而提高对海洋原甲藻监测和预警的可靠性。

1 材料和方法

1.1 藻种分离与培养

海水样品于2012年3月采集于广西防城港企沙海域。在实验室采用逐级稀释法并结合毛细管分离法,获得海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)纯系,编号为BBW-01。实验藻种在f/2培养液,光暗比为12h:12h,光照强度为 $40 \sim 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,培养温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的条件下培养,并保存于广西科学院北部湾赤潮藻种质资源库。

1.2 形态观察

取指数生长期的海洋原甲藻细胞,用2%戊二醛固定,在尼康T-100型光学显微镜下测量细胞大小,利用 $\text{I}_2\text{-KI}$ -水合氯醛染色液对海洋原甲藻甲片染色^[11],并拍照。

1.3 DNA提取、PCR扩增

基因组DNA的提取采用CTAB法^[12]。对

18S rDNA基因片段进行扩增,所用引物分别是18ScomF1: 5'-GCTTGTCTCA AAGATTAAGCCATGC-3'和18ScomR1: 5'-CACCTACGGAAACCTTGTACGAC-3'。PCR反应程序为:94℃ 3 min, 94℃ 20 s, 50℃ 30 s, 72℃ 40 s,共30次循环,最后72℃延伸7 min,于15℃保存。PCR产物送华大基因技术有限公司进行测序。

1.4 数据处理

登陆NCBI网站(<http://www.ncbi.nih.gov>),将测得的序列用Blastn进行同源搜索,确认获得的序列为相应的序列,采用CLUSTAL X程序对序列进行多重比对,用Mega 4.0软件中的邻接法(Neighbor-Joining method, NJ)建立系统进化树。

2 结果和分析

2.1 海洋原甲藻的形态特征

从图1可见,海洋原甲藻BBW-01的细胞呈斜水滴形,前端较圆,中部最宽,后端逐渐变尖。细胞长 $42 \sim 57 \mu\text{m}$,宽 $23 \sim 33 \mu\text{m}$,由左右两壳板组成,顶刺与副刺着生于左壳板顶端。顶刺较长,形如矛尖,具翼,约 $7 \mu\text{m}$,副刺较短,一般与顶刺相向而生。细胞壳面布满了排列规则的小孔。壳板中部以下,两侧各有2排自中部向壳面边缘呈辐射状延伸的细长孔,两侧细长孔对称分布,中间无连接,数量自上而下依次增多,分别为3个和5个。壳面大孔主要分布于细胞前端边缘与后端边缘。后端7个大孔特征明显,呈“V”字形对称排列。

海洋原甲藻BBW-01与采自其他海域的海洋原甲藻的形态特征基本一致(表2),但在细胞大小上有一定差异。本研究中,海洋原甲藻BBW-01与采自广东大亚湾^[1]和墨西哥太平洋^[4]的大小基本一致,比采自东海^[2]和广东大鹏湾^[3]的海洋原甲藻细胞略小,与Cohen-Fernandez等^[15]报道的墨西哥太平洋海洋原甲藻的细胞大小相差较大。

2.2 海洋原甲藻系统进化分析

2.2.1 序列分析

从海洋原甲藻BBW-01提取18S rDNA,经测序表明其序列长度为1666 bp,其中G+C含量为45.6%。BLAST同源检索比对的结果表明,海洋原甲藻BBW-01与海洋原甲藻(DQ004735)仅有

表 1 基于 18S rDNA 序列进行的系统发育分析中所用藻种来源

Table 1 Origin of materials for the 18S rDNA sequences used in the phylogenetic analysis

种 Species	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	株系 Strain	来源 Source
海洋原甲藻 <i>Prorocentrum micans</i>	—	BBW-01	广西北部湾 Beibu Gulf, Guangxi
	DQ004735	PmicC	中国南海 South China Sea
	EU780638	CCMP1589	美国罗得岛州纳拉干塞特湾 Narragansett Bay
	AY585526	CCMP1589	西波特兰北部港口 West Boothbay Harbor
慢原甲藻 <i>P. rathymum</i>	EU287487	S7	美国佛罗里达州 Florida, USA
墨西哥原甲藻 <i>P. mexicanum</i>	EU287485	CCMP687	美国佛罗里达州 Florida, USA
三角棘原甲藻 <i>P. triestinum</i>	AB183673	MBIC11147	—
	DQ004734	PtriC	中国南海 South China Sea
纤细原甲藻 <i>P. gracile</i>	AY443019	CCCM 765	美国华盛顿普吉特海湾 Puget sound, Washington, USA
<i>P. tsawwassenense</i>	EF657885	—	不列颠哥伦比亚 British Columbia
微小原甲藻 <i>P. minimum</i>	AY803740	1	中国南海 South China Sea
	AY421791	PmiPrMu21	韩国沿海 Korean Coasts
东海原甲藻 <i>P. donghaiense</i>	DQ336054	—	中国东海 East China Sea
具齿原甲藻 <i>P. dentatum</i>	DQ336057	CCMP1517	南太平洋 South Pacific
<i>P. arenarium</i>	Y16234	PMAYD1	印度洋 Indian Ocean
<i>P. bimaculatum</i>	HQ890882	IFR10-166	阿拉伯海湾 Arabian Gulf
<i>P. concavum</i>	Y16237	PPAN04	Gulf of Panma, Pacific Coast
	HQ890884	IFR10-096	阿拉伯海湾 Arabian Gulf
<i>P. glenanicum</i>	GU327679	IFR1080	法国南布列塔尼 South Brittany
<i>P. levis</i>	FJ489617	VGO880	—
利玛原甲藻 <i>P. lima</i>	Y16235	#151	日本太平洋沿海 Japan, Pacific Coast
<i>P. maculosum</i>	Y16236	PPAN20	巴拿马塔多拉岛 Contadora Island, Panama
<i>P. panamensis</i>	Y16233	PPAN06	巴拿马塔多拉岛 Contadora Island, Panama
<i>P. pseudopanamense</i>	GU327677	IFR709	法国南布列塔尼 South Brittany
夜光藻 <i>Noctiluca scintillans</i>	AF022200	—	—

—: 缺失信息。

—: Missing information.

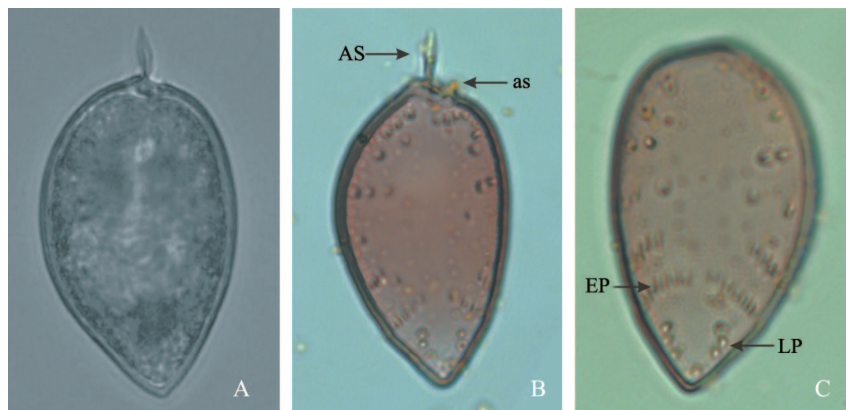


图 1 海洋原甲藻 BBW-01 形态特征。A. 海洋原甲藻壳面观; B. 左壳板, 顶刺和副刺; C. 右壳板, 辐射状延伸的细长孔以及“V”字形排列的大孔。AS: 顶刺; as: 副刺; EP: 细长孔; LP: 大孔。

Fig. 1 Morphological characters of *Prorocentrum micans* BBW-01 strain. A. Valve surface view; B. Left valve, showing apical spine and ancillary spine (arrows); C. Right valve, showing radially extended elongated pores and V-shape arranged large pores (arrows). AS: Apical spine; as: Ancillary spine; EP: Elongated pore; LP: Large pore.

表 2 不同地理株系海洋原甲藻的形态特征

Table 2 The morphological characters of different geographical *Prorocentrum micans*

藻种来源 Origin of algae	形状 Shape	长 (μm) Length	宽 (μm) Width	长宽比 Ratio of length to width	顶刺 Apical spine (μm)	刺丝胞孔 Trichocyst pore	文献 Reference
北部湾 Beibu Gulf, Guangxi	斜水滴形 Oblique drop-shaped	42 ~ 57	23 ~ 33	< 2	≈ 7	布满了排列规则的小孔;自中部向壳面边缘呈辐射状延伸的细长孔;大孔主要分布于壳板前端边缘,后端 7 个大孔呈“V”字型对称排列 Valve surface regularly distributed many small pores. Elongated pores radially distributed from middle to edge. Large pores mainly distributed at anterior end, and seven V-shaped arranged big pores at posterior end	本文 This paper
大亚湾 Daya Bay, Guangdong	亚梨形 Oblique pear-shaped	45 ~ 55	20 ~ 30	—	7 ~ 9	刺丝胞孔主要呈放射状延伸至壳板边缘 Trichocyst pores radially extended to the edge	[1]
墨西哥 Mexico	卵圆至披针形 Oval-lanceolate	40 ~ 57	26 ~ 30	—	—	刺丝胞孔主要呈放射状延伸至壳板边缘,另有大量刺丝胞孔散落在壳板边缘 Trichocyst pores radially extended to the edge, and others scattered the edge	[13]
大鹏湾 Dapeng Bay, Guangdong	卵形 Oval	35 ~ 70	20 ~ 50	—	—	刺丝胞孔呈放射状排列 Trichocyst pores radially arranged	[3]
东海 East China Sea	斜水滴形 Oblique drop-shaped	35 ~ 70	20 ~ 50	—	7	边缘覆盖呈放射状排列的刺丝胞孔 Numerous trichocyst pores radially arranged around edge	[2]
墨西哥 Mexico	前端圆后端尖 Rounded anteriorly, pointed posteriorly	19.6 ~ 86.5	8.6 ~ 36.4	< 2	6.2 ~ 8.0	壳板表面分布许多规则的凹陷小槽;自中部向壳面边缘呈辐射状延伸的细长孔;少量大孔 Valve surface regularly distributed many depression small groove. Elongated pores radially distributed from middle to edge. A few of large pores	[14]

—:原文未提及。

—:Not mentioned in original paper.

3 个碱基差异(包括两个缺失位点),相似性最高,达 99.82%;与海洋原甲藻(EU780638)和海洋原甲藻(AY585526)的相似性为 99.76%;与慢原甲藻(*P. rhathymum*)、墨西哥原甲藻(*P. mexicanum*)、三角棘原甲藻(*P. triestinum*)、纤细原甲藻(*P. gracile*)和 *P. tsawwassenense* 的相似性均大于 99.00%。说明 18S rDNA 序列比较保守,变异率小,但利用 BLAST 同源检索仍能清晰地分辨各序列间的碱基差异和相似性。此外,比对结果还表明,同为南海株系的海

洋原甲藻 BBW-01 与海洋原甲藻(DQ004735)的遗传关系最为密切。

2.2.2 系统进化分析

依据表 1 中 18S rDNA 序列构建系统进化树,分别用邻接法(NJ)、最小进化法(Minimum evolution, ME)和最大简约法(Maximum parsimony, MP)构建系统发育树,所得结果基本一致。从用邻接法构建的系统进化树(图 2)来看,海洋原甲藻 BBW-01 与海洋原甲藻(DQ004735)聚成一支,支

持率为 79%, 并与另外两株海洋原甲藻聚为一簇, 与他们关系较密切的还有慢原甲藻(EU287487)和墨西哥原甲藻(EU287485), 它们连同三角棘原甲藻、纤细原甲藻、*P. tsawwassenense*、东海原甲藻(*P. donghaiense*)、具齿原甲藻(*P. dentatum*)、微小原甲藻(*P. minimum*)、*P. glenanicum*、*P. panamensis*

和 *P. pseudopanamense* 组成浮游、兼性浮游类原甲藻族群, 另有由 *P. arenarium*、*P. bimaculatum*、*P. concavum*、*P. consutum*、*P. levis*、利玛原甲藻(*P. lima*)和 *P. maculosum* 组成底栖生活的原甲藻族群。
结合表 3, 利用 Mega 4.0 软件的 Kimura 2-parameter 模型计算各藻株间的遗传距离。结果表

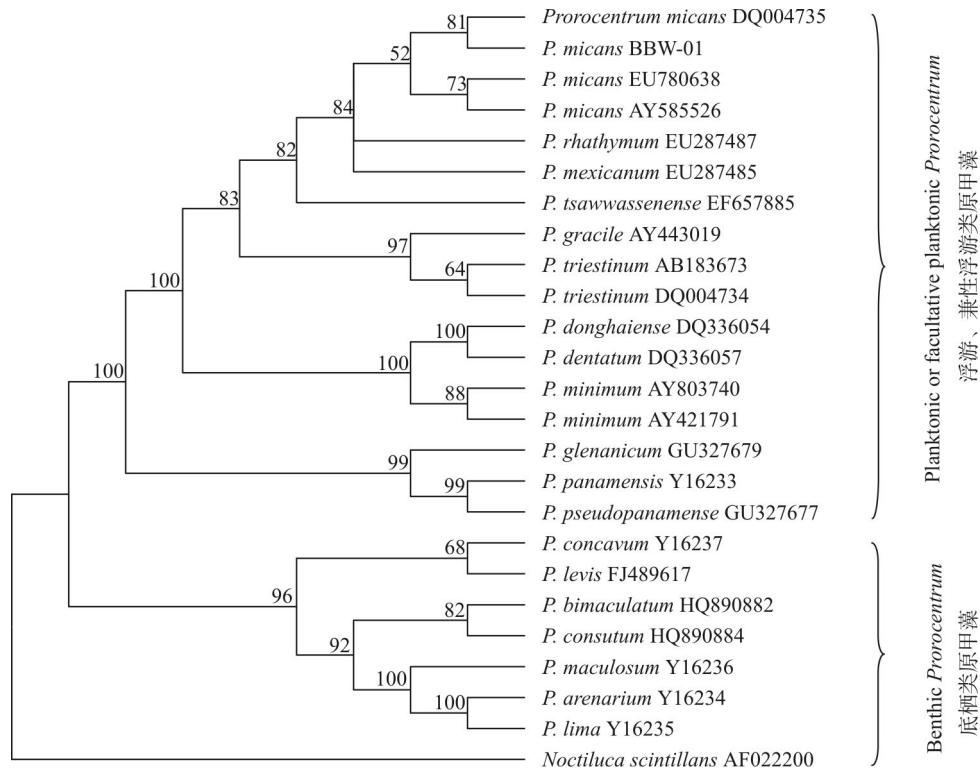


图 2 由邻接法(NJ)构建的系统树。以夜光藻为外类群。

Fig. 2 Phylogenetic tree based 18S rDNA gene sequence by Neighbour-Joining method. *Noctiluca scintillans* as outgroup.

表 3 部分原甲藻 18S rDNA 序列的 Jukes-Cantor 距离矩阵

Table 3 Jukes-Cantor corrected distance based on 18S rDNA sequences in *Prorocentrum*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0.001								
3	0.001	0.002							
4	0.001	0.002	0.000						
5	0.002	0.002	0.002	0.002					
6	0.002	0.003	0.001	0.001	0.002				
7	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006	0.006			
8	0.007	0.007	0.007	0.007	0.006	0.007	0.001		
9	0.007	0.007	0.006	0.006	0.006	0.006	0.001	0.001	
10	0.011	0.012	0.010	0.010	0.012	0.010	0.013	0.014	0.013

1: *Procentrum micans* (BBW-01); 2: *P. micans* (DQ004735); 3: *P. micans* (EU780638); 4: *P. micans* (AY585526); 5: *P. rhathymum* (EU287487); 6: *P. mexicanum* (EU287485); 7: *P. triestinum* (AB183673); 8: *P. triestinum* (DQ004734); 9: *P. gracile* (AY443019); 10: *P. tsawwassenense* (EF657885).

明,海洋原甲藻 BBW-01 与其他 3 株海洋原甲藻的遗传差异最小,均为 0.001,与慢原甲藻和墨西哥原甲藻的遗传差异为 0.002,与三角棘原甲藻和纤细原甲藻的遗传差异为 0.007,与其他原甲藻的遗传差异均大于 0.010,与外类群夜光藻(*Noctiluca scintillans*)的遗传差异最大,为 0.109。说明不同地理株系的海洋原甲藻 18S rDNA 的序列变异率很低,且海洋原甲藻与慢原甲藻和墨西哥原甲藻在系统进化上具有密切的亲缘关系。

3 讨论

海洋原甲藻分布于世界各个海域,许多研究者对该藻的形态特征做了大量研究。海洋原甲藻与纤细原甲藻(*P. gracile*)形态相似,极易混淆。Okamura^[15]曾将纤细原甲藻疑似为海洋原甲藻。二者细胞大小范围部分重叠,均有具翼顶刺,刺丝胞孔的排列方式也极其相似。其区别主要有以下四点:①海洋原甲藻呈斜水滴形,细胞个体较大,中部最宽,长宽比小于 2,而纤细原甲藻细胞略长,稍小,呈披针形,长宽比大于 2;②均有 1 个具翼顶刺,但纤细原甲藻的顶刺略长;③纤细原甲藻壳板末端有一刺状突起,而海洋原甲藻则没有这一特征^[14]。④海洋原甲藻壳板后端有 7 个大孔,排列呈“V”字形,这一新特征可区别于其他种类。

藻细胞大小是种类鉴定的一个重要指标。我们通过分析比较各海域的海洋原甲藻,结果表明,同是采自墨西哥太平洋的海洋原甲藻, Hernández-Becerril^[13]和 Cohen-Fernandez^[14]对它们细胞大小的描述差异较大。其原因可能是 Cohen-Fernandez 研究的可能含有其他相似种,亦或是存在变种的可能。王波^[16]对几株原甲藻的 28S rDNA 基因进行分析,认为采自南海的海洋原甲藻(DQ004735)与其他海域的海洋原甲藻的种内遗传距离大于与海洋原甲藻(DQ004735)和慢原甲藻、墨西哥原甲藻的种间距离,海洋原甲藻(DQ004735)与慢原甲藻和墨西哥原甲藻聚成一支,区别于其他海域的海洋原甲藻,表明海洋原甲藻南海株系可能在进化方向上不同于其他海洋原甲藻株系。墨西哥太平洋的海洋原甲藻是否存在变种,同一地理株系的海洋原甲藻在细胞大小和分子进化方面是否存在差异,仍需进一步研究。

许多研究者利用核糖体基因构建的系统进化

树将原甲藻属甲藻划分为两大类群^[17-20],一类是浮游类和兼性浮游类原甲藻,该类细胞形态多变,多为不对称结构;另一类是底栖类原甲藻,这类细胞形态对称,变化较小^[19,21]。原甲藻在系统进化上的多源进化学说得到了部分研究者的认同,这些研究者建议恢复 *Exuviaella* 属的地位^[22],但分类学家仍然坚持原甲藻为单源进化,此观点最近在多基因和非核糖体基因系统进化方面也得到了一些证据^[23-24]。尽管如此,目前所有的研究均有待检验,原甲藻的分类和起源问题仍需结合原甲藻的形态特征和多样的分子标记方法进行更深层次的探讨和研究。

参考文献

- [1] Gu X L, Qi Y Z, Chen J F, et al. Species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) in Daya Bay, China [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2002, 10(4): 335-339.
辜小莲, 齐雨藻, 陈菊芳, 等. 大亚湾水域原甲藻调查与鉴定 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2002, 10(4): 335-339.
- [2] Lu D D, Goebel J. Five red tide species in genus *Prorocentrum* including the description of *Prorocentrum donghaiense* Lu sp. nov. from the east China Sea [J]. *Chin J Ocean Limnol*, 2001, 19(4): 337-344.
- [3] Qi Y Z, Qian F. Taxonomic studies on red tide causative dinoflagellates in Dapeng Bay, south China Sea [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 1994, 25(2): 206-210.
齐雨藻, 钱峰. 大鹏湾几种赤潮甲藻的分类学研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(2): 206-210.
- [4] Han X T, Zhen L, Yu Z M, et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of HAB *Prorocentrum* using small subunit ribosomal DNA genes [J]. *Chin High Technol Lett*, 2006, 16(8): 864-869.
韩笑天, 郑立, 俞志明, 等. 赤潮生物原甲藻 *Prorocentrum* 分子识别和系统发育学研究 [J]. *高技术通讯*, 2006, 16(8): 864-869.
- [5] State Oceanic Administration. Bulletin of China's Marine Environmental Status of China for the year of 2010 [M]. Beijing: State Oceanic Administration, 2011: 20-22.
国家海洋局. 2010年中国海洋环境质量公报 [M]. 北京: 国家海洋局, 2011: 20-22.
- [6] State Oceanic Administration. Bulletin of China's Marine Environmental Status of China for the year of 2009 [M]. Beijing: State Oceanic Administration, 2010: 50-52.
国家海洋局. 2009年中国海洋环境质量公报 [M]. 北京: 国家海洋局, 2010: 50-52.
- [7] State Oceanic Administration. Bulletin of China's Marine Environmental Status of China for the year of 2008 [M]. Beijing: State Oceanic Administration, 2009: 66-69.

- 国家海洋局. 2008年中国海洋环境质量公报 [M]. 北京: 国家海洋局, 2009: 66–69.
- [8] Bravao I, Fernandez M L, Ramiloa I, et al. Toxin composition of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* Dodge isolated from different locations along the Galician coast (NW Spain) [J]. *Toxicon*, 2001, 39(10): 1537–1545.
- [9] Ehrenberg C G. Oranisation in der Richtung des Kleinberg Raumes. Dritter Beitrag zur Erkenntnis grosser Oranisationen in der Richtung des kleinsten Rames [J]. *Abh Akad Wiss*, 1834, 307(3): 307–308.(in German)
- [10] Zhu M Y, Li R X, Wang F. Proceedings of the Second Meeting of Chinese Committee of SCOR-IOC HAB Working Group [C]. Qingdao: Qingdao Press, 1996: 120–121.
- [11] Qian F, Qi Y Z, Zhu C J. Methodological studies on dinoflagellate taxonomy: I. Thecal isolation and staining [J]. *J Jinan Univ (Nat Sci Med)*, 1995, 16(1): 127–130.
钱峰, 齐雨藻, 朱从举. 赤潮甲藻分类学方法研究(一) —— 有壳甲藻甲片的解离、染色及观察 [J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 1995, 16(1): 127–130.
- [12] Scott O R, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissue [J]. *Plant Mol Biol Manual*, 1988, A6(1): 1–10.
- [13] Hernández-Becerril D U, Cortés-Altamirano R, Alonso R. The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coasts of the Mexican Pacific [J]. *Hydrobiologia*, 2000, 418(1): 111–121.
- [14] Cohen-Fernandez E J, Castillo E M C, Ugarte I H S, et al. Contribution of external morphology in solving a species complex: The case of *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum gracile* and *Prorocentrum sigmoides* (Dinoflagellata) from the Mexican Pacific Coast [J]. *Phycol Res*, 2006, 54(4): 330–340.
- [15] Okamura K. An annotated list of plankton microorganisms of the Japanese coast [J]. *Annot Zool Japan*, 1907, 6: 125–151.
- [16] Wang B, Mi T Z, Lü S H, et al. Cloning and sequences analysis of 18S rRNA gene of five *Prorocentrum* species/strains [J]. *Oceanol Limnol Sin*, 2006, 37(5): 450–456.
- 王波, 米铁柱, 吕颂辉, 等. 五种/株原甲藻核糖体小亚基(18S rRNA)基因克隆及序列分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(5): 450–456.
- [17] Grzebyk D, Sako Y, Berland B. Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov [J]. *J Phycol*, 1998, 34(6): 1055–1068.
- [18] Saldarriaga J F, Taylor F J R, Cavalier-Smith T, et al. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates [J]. *Eurp J Protistol*, 2004, 40(1): 85–111.
- [19] Faust M A, Vandersea M W, Kibler S R, et al. *Prorocentrum levis*: A new benthic species (Dinophyceae) from a mangrove island, Twin Cays, Belize [J]. *J Phycol*, 2008, 44(1): 232–240.
- [20] Chomérat N, Sellos D Y, Zentz F, et al. Morphology and molecular phylogeny of *Prorocentrum consutum* sp. nov. (Dinophyceae): A new benthic dinoflagellate from south Brittany (northwestern France) [J]. *J Phycol*, 2010, 46(1): 183–194.
- [21] Hoppenrath M, Leander B S. Morphology and molecular phylogeny of a new marine sand-dwelling *Prorocentrum* species, *P. tsawwassenense* (Dinophyceae, Prorocentrales), from British Columbia, Canada [J]. *J Phycol*, 2008, 44(2): 451–466.
- [22] McLachlan J L, Boalch G T, Jahn R. Reinstatement of the genus *Exuviaella* (Dinophyceae, Prorocentrophycidae) and an assessment of *Prorocentrum lima* [J]. *Phycologia*, 1997, 36(1): 38–46.
- [23] Zhang H, Bhattacharya D, Lin S. A three-gene dinoflagellate phylogeny suggests monophyly of Prorocentrales and a basal position for *Amphidinium* and *Heterocapsa* [J]. *J Mol Evol*, 2007, 65(4): 463–474.
- [24] Murray S, Ip C L C, Moore R, et al. Are proro-centroid dinoflagellates monophyletic? A study of 25 species based on nuclear and mitochondrial genes [J]. *Protist*, 2009, 160(2): 245–264.