

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00577

## 基于 SSU rDNA 和线粒体 *cox 1* 序列分析甲藻中不同生态类群的演化规律

唐晨<sup>1,2</sup>, 董丽<sup>1</sup>, 饶涛<sup>1</sup>, 贾睿<sup>1</sup>, 于克锋<sup>1</sup>, 吴维宁<sup>1</sup>, 王金辉<sup>2</sup>, 徐韧<sup>2</sup>, 何培民<sup>1</sup>

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

2. 国家海洋局 东海环境监测中心, 上海 200137

**摘要:** 应用 SSU rDNA 和线粒体 *cox 1* 序列研究甲藻(Dinoflagellate)中不同生态类群的演化关系。通过 PCR 扩增和测序获取 4 株甲藻 SSU rDNA 及其线粒体 *cox 1* 部分片段, 结合 GenBank 中 24 株甲藻的相关序列, 以 *Plasmodium falciparum* 为外群, 构建 ML 树和 NJ 树, 并采用自展支持度评估进化树分支结构, 通过计算后验概率评估进化树整体结构, 应用 1sKH、SH、ELW 和 2sKH 等方法评估两株 ML 树间的拓扑结构。结果显示, 在由上述两序列构建的进化树上, 底栖原甲藻均未与浮游原甲藻聚类, 且前沟藻具有独特演化地位。表明联合选择 SSU rDNA 和线粒体 *cox 1* 序列构建的进化树在一定程度上能够反映出甲藻的演化规律。这为从基因层面深入探索甲藻中不同生态类群的演化关系初步奠定了基础。

**关键词:** 浮游型甲藻; 底栖型甲藻; 利玛原甲藻; 强壮前沟藻; SSU rDNA; *cox 1*

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)04-0577-09

甲藻(Dinoflagellate)是海洋中重要的初级生产者, 它们种类丰富、数量庞大, 分布于世界各个海域, 部分种类可引起有害藻华<sup>[1]</sup>, 严重危害生态环境及人类健康。由于海洋环境复杂多变, 它们逐渐形成相应的生态习性, 并发展成浮游型和底栖型等几大类群<sup>[2]</sup>。以往, 国际上侧重对浮游型甲藻的相关研究<sup>[3]</sup>, 对底栖型甲藻的综合认识相对较少, 但随着各国加强海洋环境保护及海洋生物资源利用, 底栖型甲藻独特的生态特性和研究价值被逐渐知晓<sup>[4]</sup>。

甲藻多样的辐射演化(evolutionary radiation)规律在古生物学和形态学研究中已被证实<sup>[5]</sup>, 所展示的系统树将甲藻各大类群的分类地位大致划

定。而分子生物学技术的出现极大丰富了系统学研究的手段, 通过对海洋环境中甲藻 DNA 多样性调查及各类群演化关系研究, 扩展了辐射演化规律的适用范围<sup>[6]</sup>, 将分类界限延伸至单系群体与“种”之间, 这对探索甲藻的演化规律提供了强有力的帮助。甲藻生态习性的形成与遗传进化和自然条件等因素密切相关<sup>[1]</sup>, 这一过程中各因素间相互影响并可能产生某一特定的演化规律。为初步弄清这一问题, 本研究尝试从遗传进化的角度进行解析。针对包括 2 株底栖型产毒甲藻、1 株浮游型甲藻和 1 株共生型甲藻在内的 4 株藻株, 选取 SSU rDNA(small subunit ribosomal DNA, 核糖体 DNA 小亚基)和线粒体 *cox 1*(cytochrome

收稿日期: 2011-09-29; 修订日期: 2012-02-01.

基金项目: 上海市优秀学科带头人计划项目(08XD1403700); 上海市科委国际合作项目(08540702600); 上海市科委农业重点攻关项目(10391901900); 海洋公益性行业科研专项经费 (200905010); 国家海洋局重点实验室开放研究基金资助项目(MATHAB200907).

作者简介: 唐晨(1986-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 藻类分子生物学, E-mail: tangchen0423@gmail.com

通信作者: 何培民, 教授, 研究方向: 藻类学, E-mail: pmhe@shou.edu.cn;

徐韧, 高级工程师, 研究方向: 海洋生态环境监测和赤潮研究, E-mail: xrhyp@163.com

coxidase 1, 细胞色素氧化酶 1) 序列的部分片段作为标记基因, 测定序列并结合 GenBank 中 24 株典型甲藻的相应序列, 联合用于系统分析。本研究借助可靠且被广泛使用的核酸替换模型(HKY85 和 GTR+I+ $\Gamma$ )<sup>[7]</sup>, 并通过多种检测方法验证进化树拓扑结构的稳定性, 以获得针对甲藻中不同生态类群较为信赖的演化关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料来源及培养

研究所用 4 株海洋甲藻(表 1)中, 利玛原甲藻(*Prorocentrum lima*)为暨南大学藻类保种室赠送, 强壮前沟藻(*Amphidinium carter*)、海洋原甲藻(*Prorocentrum micans*)及小亚德里亚共生甲藻(*Symbiodinium microadriaticum*)取自上海海洋大学藻类生物技术实验室。藻种均置于恒温光照培养箱中培养, 温度设为(20±1)℃, 光照强度为 4 000 lx, 光照/黑暗周期为 12 h : 12 h。培养基参考 Guillard 等<sup>[8]</sup>改良的 f/2 培养基配置, 按比例加入灭菌海水中供藻类培养。

### 1.2 DNA 提取及 PCR 扩增

离心收集适量对数期藻液, 采用 CTAB 改良法<sup>[9]</sup>提取基因组 DNA。使用真核生物通用引物<sup>[10]</sup>对 4 株甲藻的 SSU rDNA 序列进行扩增, 上游引物 AACCTGGTTGATCCTGCCAGT, 下游引物 GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC。反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 循环温度, 94℃ 45 s、59℃ 45 s、72℃ 1.5 min, 35 次循环; 72℃ 延伸 10 min。参照 Lin 等<sup>[11]</sup>的报道, 用甲藻 *cox 1* 特异性引物进行扩增, 上游引物 AAAAATTGTAATCATAAACGCTTAGG, 下游引物 TGTTGAGCCACCTATAGTAAACATTA。反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 循环温度, 94℃ 45 s、47℃ 45 s、72℃ 1.5 min, 30 次循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后, 交由上海生工生物技术有限公司克隆后测序。

### 1.3 序列及分子系统学分析

获取 4 株甲藻 SSU rDNA 和 *cox 1* 的测序结果, 经在线 BLAST 程序同源性比对及分析后, 结

合选取自 GenBank 中的 24 株甲藻(隶属于 9 个属)的相关序列(其中部分藻种的 *cox 1* 序列缺失, 故未分析), 使用软件 Clustal X ver. 2.0.12<sup>[12]</sup>进行多序列对位分析, 再运行 BioEdit 软件手动修改几处对位错误的位点, 并截取公共区域以便后续分析时使用。

指定与甲藻亲缘关系较近的 *Plasmodium falciparum* 作为外群, 并基于 SSU rDNA(1 674 bp, 非全长序列)和 *cox 1*(390 bp, 非全长序列)序列构建进化树。使用 Phyml ver. 3.0<sup>[13]</sup>进行最大似然法分析, 选取 HKY85 模型构建 ML(maximum likelihood)树, 1 000 次重复自展(bootstrap)验证。使用 Tree-Puzzle ver. 5.2<sup>[14]</sup>计算 Gamma 分布中的  $\alpha$  值, Gamma 速率类别设为 8, 异质率模型选择混合型(Invariable + Gamma rate), 采用 GTR 模型来构建 ML 树。对序列进行邻接法分析, 使用分子遗传学软件 Phylip ver. 3.69<sup>[15]</sup>, 选择 Kimura 2-parameter 模型, 构建 NJ 树, 自展分析 1 000 次。同样, 对 23 株甲藻的 SSU rDNA+ *cox 1* 序列(2 064 bp)进行多序列对位分析。分别使用 Phyml ver. 3.0 和 Tree-Puzzle ver. 5.2 构建 ML 树, 使用 phylip ver. 3.69 构建 NJ(Neighbor Joining)树, 模型选择及数理分析同前。再使用分子遗传学软件 Mrbayes ver. 3.1.2<sup>[16]</sup>, 采用 GTR+I+ $\Gamma$ <sup>[17]</sup>模型, 通过贝叶斯法对甲藻的 SSU rDNA、*cox 1* 及 SSU rDNA+ *cox 1* 序列进行分析。在使用马可夫链-蒙特卡罗(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)法计算后验概率时, 标记运算总量为 100 000 代, 且每 100 代取样 1 次, 并从最终样本中舍弃 250 个老化样本后总结得到共识树。

系统进化树的拓扑结构评估。为验证模型的稳定性, 本研究针对性地从所用 28 株甲藻中选取亲缘较近的 14 株, 并结合它们的 SSU rDNA、*cox 1* 及 SSU rDNA+ *cox 1* 序列。使用 Tree-Puzzle ver. 5.2 分别构建 ML 树, 采用 GTR 核酸替换模型, 选择 Gamma 异质率模型, Gamma 速率设为 8。再使用软件 Phyml ver. 3.0, 选取 HKY85 模型, 1 000 次重复自展分析, 构建 ML 树。之后, 使用 Tree-Puzzle ver. 5.2 对两株生成的 ML 树进行拓扑结构

表 1 本研究用于进化分析的甲藻种类相关信息  
Tab. 1 Dinoflagellate species included in the phylogenetic analyses of this study

种类 species	生态习性 habitat	毒素 toxin	品系或来源 strain or source	登录号 accession number	
				SSU rDNA	<i>cox 1</i>
利玛原甲藻 <i>Prorocentrum lima</i>	底栖型	DSP	CCMP2579	JN717143	JN717140
海洋原甲藻 <i>Prorocentrum micans</i>	浮游型	None	浙江	JN717145	JN717144
强壮前沟藻 <i>Amphidinium carterae</i>	底栖型	CFP	海南	JN717139	JN717138
小亚德里亚共生甲藻 <i>Symbiodinium microadriaticum</i>	共生型	None	海南	JN717147	JN717146

验证, 模型选择和设置同前。分析采用 1sKH、SH、ELW 和 2sKH 等 4 项评估方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列分析

测序结果经 BLAST 程序在线比对, 发现表 1 中 4 株甲藻的 SSU rDNA 与 GenBank 中已知序列相似度颇高, 均达到 99%。而对于 *cox 1* 序列, 利玛原甲藻、强壮前沟藻、海洋原甲藻和小亚德里亚共生甲藻与 GenBank 中已知序列相似度分别为 98%、97%、97%和 94%。以上 8 条序列均提交至 GenBank, 登录号见表 1。

运行 Clustal X ver. 2.0.12 对 28 株甲藻及 *Plasmodium falciparum* 的 SSU rDNA(1 674 bp)和 *cox 1*(390 bp)序列进行对位分析。利玛原甲藻与底栖原甲藻类群(benthic *Prorocentrum*)的差异度仅为 1%; 海洋原甲藻与浮游原甲藻类群(planktonic *Prorocentrum*)的相似度达到 99%。就整体而言, 底栖原甲藻类群的序列与浮游原甲藻类群的存在明显不同, 差异度在 8%以上。但强壮前沟藻与 *Amphidinium operculatum* 等的相似性较高, 而小亚德里亚共生甲藻的 SSU rDNA 和 *cox 1* 序列分析结果却略有不同, 与对应的 *Symbiodinium sp.* 的差异度分别为 1%和 4%。

### 2.2 进化分析

基于 SSU rDNA 构建的进化树(图 1-A)将甲藻划分为大区域: *Amphidinium* 和 *Gonyaulax* 组成外围支系, 显示出与大多数甲藻迥异之处; 底栖原甲藻类群也展示出独特一面, 它们与浮游原甲藻分隔在较远区域, 在遗传上展示出明显不同; 而浮游原甲藻类群分成两大支系, ML 树和 NJ 树(自展值大于 70)也强烈支持这一结果; 另外, 浮

游原甲藻类群与 *Karenia* 和 *Dinophysis acuminata* 共同组成一大支系, 为 *Pfiesteria* 与 *Symbiodinium* 构成一对姐妹类群。由 *cox 1* 展现的甲藻谱系关系(图 1 B)与 SSU rDNA 的略有不同。可以看到, *Amphidinium* 独立聚为一支; 而 *Alexandrium*、*Karenia*、*Pfiesteria* 及浮游原甲藻类群这四大族系相对独立, 底栖原甲藻与它们之间存在一定的遗传距离。SSU rDNA+ *cox 1* 序列的分析结果(图 1 C)同 *cox 1* 序列的类似: *Amphidinium* 为外缘支系; *Alexandrium* 同底栖原甲藻共聚一支; *Karenia* 与浮游原甲藻紧密联系; 而底栖原甲藻显示出不同于浮游原甲藻的进化轨迹。总的来说, 3 株进化树将 28 株甲藻的演化关系清楚展示: 底栖型甲藻基本上都位于进化树的起始端, 演化地位相对独特; 浮游型甲藻多半位于树的中部或末端, 它们与底栖型甲藻遗传差异明显, 并呈现多样化演化的特点, 与辐射演化规律相符。而 *Symbiodinium* 与 *Pfiesteria* 也展示出独特的演化地位, 但其演化规律还不明显, 有待进一步的研究。

### 2.3 系统进化树拓扑结构评估

对 SSU rDNA 的评估(表 2)中, 采用 GTR+I 模型的 Puzzle 树与采用 HKY85 模型的 Phyml 树的结构稳定性差异值为 106.14, 前者的误差值为 18.48, 说明后者的结构更稳定。1sKH、SH 和 ELW 等评估分析显示, Puzzle 树中前三者的 *P* 值均为 0, 而 Phyml 树中的则都为 1, 说明后者推导出的结果可信度更高; 在 2sKH 评估中, Phyml 树所展示的结构组成也更优。而在这两株 ML 树(图 2 - A 所示)中, 计算出的自展值有所不同, 结构划分略有差异(图中未显示); 采用 Chi-square 检测时, *Karenia brevis*、*Symbiodinium sp.* 及 5 株营浮游生活的原甲藻的 *P* 值颇高( $P>0.99$ ), 证实它们自身

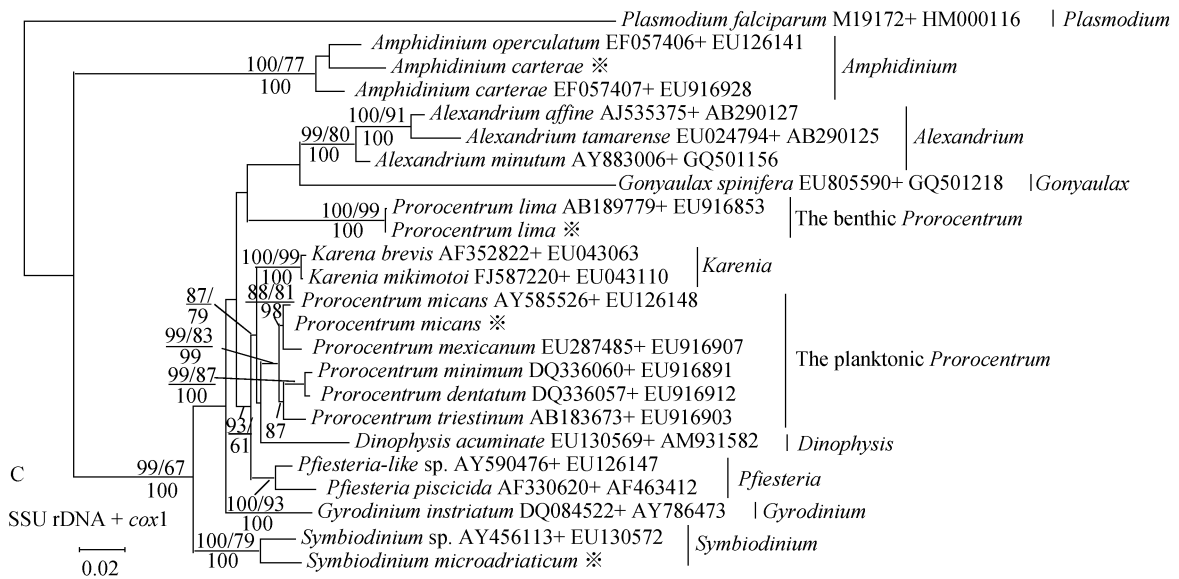
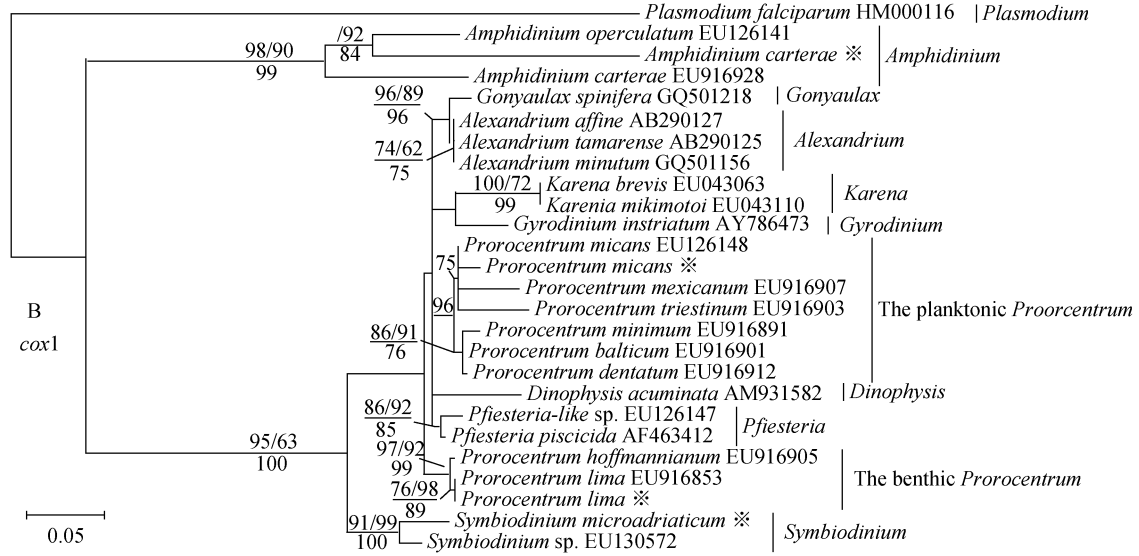
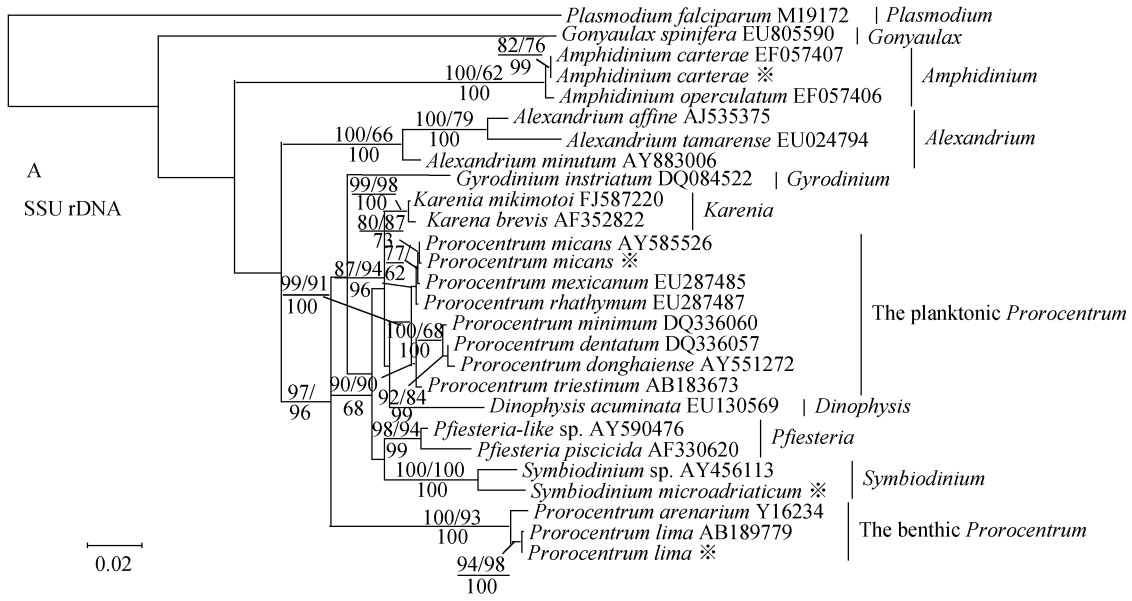


图 1 甲藻 SSU rDNA(A)、*cox 1*(B)和 SSU rDNA+*cox 1*(C)构建的系统发育树

左下角数值表示核苷酸位点替换值, 系统发育树分支长度与之按一定比例展示. 图中分支上方数值表示 ML 树自展值 (Bootstrap support values), 左侧和右侧部分分别选择 HKY85 和 GTR+I+ $\Gamma$  核苷酸替换模型构建 ML 树; 下方数值表示为 NJ 树自展值(选择 Kimura 2-parameter 模型). 图中仅当自展值  $\geq 60\%$  时才显示, 而当贝叶斯后验率  $>95\%$  时(选择 GTR+I+ $\Gamma$  模型), 则将该值所示发育树分支加粗以示区分. “ ” 标记为本次实验所使用藻株, 其余的藻类序列下载自 GenBank, 登录号已在图中标识.

Fig. 1 Phylogenetic tree of dinoflagellates organisms based on SSU rDNA (part A), *cox 1*(part B) and SSU rDNA+*cox 1*(part C) Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site (see scale bar). The results of ML bootstrap support values are shown above the branches, whereas HKY85 (left of slash mark) and GTR+I+ $\Gamma$  model (right of slash mark); and NJ Bootstrap support values are shown below the branches. Only when Bootstrap values  $\geq 60\%$ , the thicker branches denote a Bayesian posterior probability  $>95\%$ . “ ” is signed as the dinoflagellate species used in this study. The other sequences are available in GenBank, and the accession numbers for those of dinoflagellates are shown on this figure.

的结构稳定性较高。在对 *cox 1* 序列的评估(表 2)中, Puzzle 树与 Phyml 树的拓扑结构的评估结果相似, 但差异值与偏差值有所减少; 使用 1sKH、SH、ELW 和 2sKH 等方法进行评估, 树的  $P$  值大于 0, 但仍低于 Phyml 树的值, 可以说明 Phyml 树的拓扑结构更为稳定。图 2-B 中, 仅 *Prorocentrum triestinum* 和 *P. micans* 的  $P$  值大于 0.99。而 SSU rDNA+*cox 1* 序列的分析结果(表 2)同 *cox 1* 序列的相近, 差异值和偏差值都较低; 1sKH 等测试都支持 Phyml 树的拓扑结构较 Puzzle 树的更优。需要说明的是, 该 ML 树(图 2-C)显示 *Pfiesteria-like sp.*、*Karenia brevis* 及部分营浮游生活的原甲藻所处的分支位置与前两株进化树(图 2-AB)中的均不同, 但经 Chi-square 检测获取的  $P$  值却都大于 0.99。综上所述, HKY85 模型用于本研究时获得的结果更可靠。

### 3 讨论

各基因的进化速率不同, 将它们分别用于分子系统学研究时获得的结果可能不一致<sup>[18]</sup>。但从另一层面来说, 这让研究人员可以从多角度、更为全面的了解物种的遗传进化规律, 有助于深入

探索生物的遗传特性。核基因组(rDNA 及其内转录间隔区 ITS)作为一个成熟的分子标记, 是甲藻分子系统学首选研究区域<sup>[19]</sup>。而线粒体基因组也是一个较好的遗传标记, 它在微藻中的结构较为简单, 多为环状<sup>[20]</sup>, 相对于核基因组, 突变率更高, 在除近缘种群外的所有种群中都可能发生遗传变异<sup>[21]</sup>。联合这两处基因用于藻类系统学研究, 所得结果趋近真实<sup>[22]</sup>。我们联合 SSU rDNA 和线粒体 *cox 1* 序列用于本研究时发现, 这两段基因可以清楚展示出各群系的演化关系, 但在探讨分子演化地位与分类地位间的联系时不同生态类群所显现的结果却不同。针对大多数浮游类群, 它们所划定的分子演化地位与传统分类地位一致。如图 1 和图 2 所示, 裸甲藻科(Gymnodiniaceae)的 *Karenia* 和 *Gyrodinium* 紧密相连, 它们位于进化树末端, 在不同树上的位置相对固定; 隶属膝沟藻科的 *Gonyaulax* 和 *Alexandrium* 遗传距离相近, 与大多数浮游型甲藻聚集, 位于进化树的中段或中后段。Zhang 等<sup>[23]</sup>借助 *cob* 和 *cox 1* 序列研究部分甲藻的演化关系时也发现大部分浮游甲藻的分子演化地位与其分类地位基本相同。但针对底栖

表 2 基于 SSU rDNA、*cox 1* 和 SSU rDNA+*cox 1* 序列构建的 ML 树间的拓扑结构评估Tab. 2 Testing the ML tree topology that organisms based on the SSU rDNA, *cox 1* and SSU rDNA+*cox 1* sequences

基因 gene	进化树 phylogenetic tree	lg L	差异 difference	标准误差 SE	P-1sKH	P-SH	P-ELW	P-2sKH
SSU rDNA	Puzzle tree	-5507.64	106.14	18.4800	0.0000 -	0.0000 -	0.0000 -	-
	Phyml tree	-5401.50	0.00	<---- best	1.0000 +	1.0000 +	1.0000 +	best
<i>cox 1</i>	Puzzle tree	-1426.90	4.88	4.8003	0.1470 +	0.1510 +	0.1721 +	+
	Phyml tree	-1422.02	0.00	<---- best	1.0000 +	1.0000 +	0.8279 +	best
SSU rDNA + <i>cox 1</i>	Puzzle tree	-6983.41	11.32	5.7412	0.0400 -	0.0350 -	0.0278 -	-
	Phyml tree	-6972.09	0.00	<---- best	1.0000 +	1.0000 +	0.9722 +	best

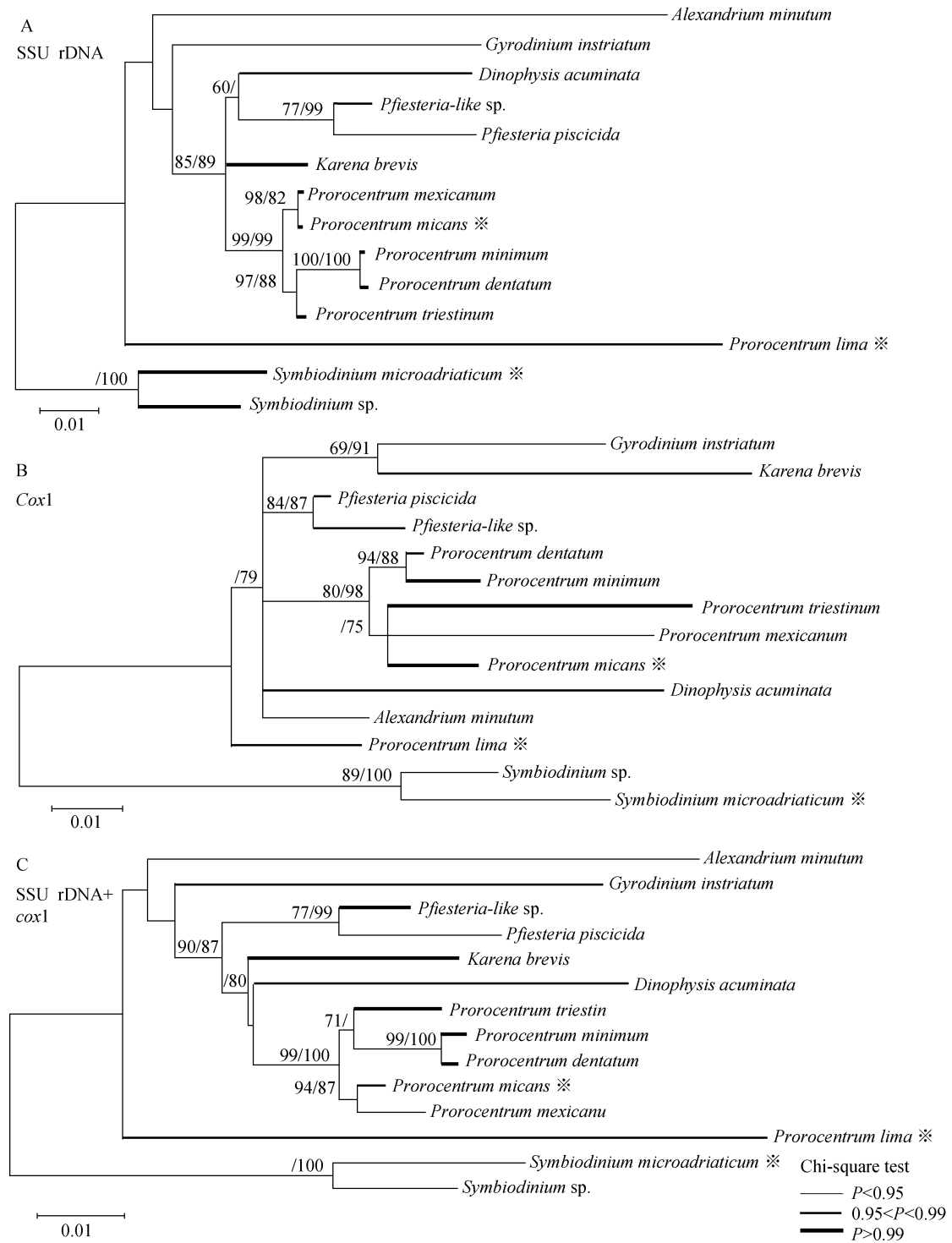


图 2 由 14 株甲藻 SSU rDNA(A)、*cox 1*(B)和 SSU rDNA+*cox 1*(C)序列构建的 ML 进化树  
 进化树分支长度与核苷酸位点替换值(左下角)按一定比例展示。Tree-Puzzle ver. 5.2 和 Phym1 ver. 3.0 软件构建 ML 树时产生的  
 自展值分列于树分支上方的左右两侧。应用 Chi-square 验证法评估两株 ML 树拓扑结构,在图中  $P$  值可划分为 3 部分来表示,  
 当  $P < 95\%$  时,分支线段最细,当  $P = 95\%$  时,分支线段依次加粗。“\*”标记为本次实验所使用藻株。

Fig. 2 Phylogenetic tree of 14 dinoflagellates organisms based on SSU rDNA (A), *cox 1*(B) and SSU rDNA+*cox 1*(C) sequences  
 Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site (see scale bar). The results of ML bootstrap support values are  
 shown above the branches, whereas by Tree-Puzzle ver. 5.2 software (left of slash mark) and Phym1 ver. 3.0 software (right of slash  
 mark). Testing two ML tree topology by Chi-square, the thin branches denote  $P < 95\%$  and the thicker branches denote  $P > 95\%$ .  
 “\*” be signas as the dinoflagellate species used in this study.

甲藻时, 所得结果却不同。底栖甲藻类群 *Amphidinium* 在不同基因的进化树(图 1)中都被稳定的划分在树的基部, 其与同“科”的 *Karenia* 和 *Gyrodinium* 存在明显的遗传差异, 后验率( $P$  95%)和自展分析(值大于 70)都证明该结果稳定可靠。而底栖原甲藻类群与同属的浮游原甲藻类群间的遗传距离较大, 两者所展示的亲缘关系甚至不及与 *Alexandrium* 的紧密; Chi-square 检测(图 2)证明该区域结构稳定( $P$  95%), 结果的可信度较高。这些问题也是目前底栖甲藻研究中的难题, 使得部分底栖甲藻在分类上的划分存在争议<sup>[24]</sup>, 以至于越来越多的学者在底栖甲藻的研究中将分子数据视作重要的参考依据<sup>[25]</sup>。而 *Symbiodinium* 和 *Pfiesteria* 在由不同基因构建的进化树上(图 1)展示的演化地位却不同, 并与形态相近的裸甲藻科藻株的遗传差异明显。

基因的演化存在一定规律<sup>[7]</sup>, 借助合适的数学模型可以梳理出不同类群的演化关系。以往研究中, 生物学家已经成功借助分子技术从基因层面对甲藻的起源<sup>[26]</sup>、古甲藻与现代甲藻的演化规律<sup>[27]</sup>等问题进行探讨。在此基础上, 本研究对甲藻中不同生态类群的演化关系进行研究, 并发现如下规律: 在由 SSU rDNA 和 *cox 1* 序列分别构建的进化树中, 底栖型甲藻基本上都位于树的基部, 演化地位相对独特; 浮游型甲藻多半位于树的中部或末端, 与底栖型甲藻的遗传差异明显, 并呈现多样化演化的特点; 但具有特殊生活习性的 *Symbiodinium* 和 *Pfiesteria* 的特点却不显著。这与 Zhang<sup>[28]</sup>和 Hackett<sup>[29]</sup>等的观点类似。不过, 这一规律却无法通过形态特征来展现。因为, 同一生态类群并非严格地聚集在“目”、“科”、“属”等分类阶元下, 它们之间存在明显的形态差异; 而不同生态类群可能会被划分在“科”甚至“属”一级较低的阶元下, 它们之间的形态特征却可能非常接近<sup>[30]</sup>。对此, 以形态特征为线索的探讨显得杂乱无章。同时, 一些学者<sup>[31]</sup>也认为形态性状的演化过程可能是极其复杂的, 它受制的条件颇多, 且不固定, 借助该特征推导出的系统分类结果让人难以信服。此外, 藻细胞内脂肪酸含量或

类型也被用来研究甲藻中不同生态类群的演化关系。但是 Usup 等<sup>[32]</sup>测定采集自马来西亚海域的几株浮游和底栖甲藻的脂肪酸含量与类型后, 发现前者与后者的含量相近、类型也基本相同, 而在不同的底栖甲藻间也几无差异, 该指标无法达到预期目的。从上述实例中也可以说明分子数据对甲藻演化规律研究的意义重大。接下来的实验中, 为验证该演化规律的广泛性, 我们将借助更多基因并在更多的藻种中进行探讨。

#### 参考文献:

- [1] Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D, et al. Manual on harmful marine microalgae[M]. Paris: UNESCO Publishing, 2003: 8–36.
- [2] Laza-Martinez A, Orive E, Miguel I. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the southeastern Bay of Biscay[J]. Eur J Phycol, 2011, 46 (1): 45–65.
- [3] Gescher C, Metfies K, Medlin L K. The ALEX CHIP— Development of a DNA chip for identification and monitoring of *Alexandrium*[J]. Harmful Algae, 2008, 7: 485–494.
- [4] Sparrmann S F, Leander B S, Hoppenrath M. Comparative morphology and molecular phylogeny of *Apicoporus* n. gen.: a new genus of marine benthic dinoflagellates formerly classified within *Amphidinium*[J]. Protist, 2008, 159 (3): 383–399.
- [5] Fensome R A, Saldarriaga J F, "MAX" Taylor F J R. Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies[J]. Grana, 1999, 38 (2–3): 66–80.
- [6] Taylor F J R. Illumination or confusion? Dinoflagellate molecular phylogenetic data viewed from a primarily morphological standpoint[J]. Phycol Res, 2004, 52 (4): 308–324.
- [7] Yang Z H. Computational molecular evolution[M]. Oxford: Oxford University Press, 2006: 3–36.
- [8] Guillard R R L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W L and Chanley M H (ed.), Culture of marine invertebrate animals[A]. Plenum Press: New York, 1975: 26–60.
- [9] Polne-fuller M. A two-hour method for extraction of DNA from seaweeds[J]. Phycolog NewsL, 1991, 23: 2.
- [10] Medlin L, Elwood H J, Stickel S, et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryote 16S-like rRNA-coding regions[J]. Gene, 1988, 71: 491–499.

- [11] Lin S J, Zhang H, Hou Y B, et al. High-level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by assessment of mitochondrial *cox 1* and *cob* genes for dinoflagellate DNA barcoding[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2009, 75 (5): 1279–1290.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (24): 4876–4882.
- [13] Guindon S, Dufayard J F, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0[J]. *System Biol*, 2010, 59 (3): 307–321.
- [14] Schmidt H A, Strimmer K, Vingron M, et al. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18 (3): 502–504.
- [15] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69[Z]. Distributed by the author. Seattle (WA): Department of Genome Sciences, University of Washington, 2009.
- [16] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19 (12): 1572–1574.
- [17] Simionato E, Ledent V, Richards G, et al. Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics [J]. *BMC Evolut Biol*, 2007, 7: 33.
- [18] Murray S, Ip C L C, Moore R, et al. Are procoenocid dinoflagellates monophyletic? A study of 25 species based on nuclear and mitochondrial genes[J]. *Orig Res Art*, 2009, 160 (2): 245–264.
- [19] Attaran-Fariman G, Bolch C J S. *Scrippsiella irregularis* sp. nov. (Dinophyceae), a new dinoflagellate from the southeast coast of Iran[J]. *Phycologia*, 2007, 46 (5): 572–582.
- [20] 张静, 王绪敏, 刘涛, 等. 藻类线粒体 DNA 研究进展[J]. *高技术通讯*, 2010, 20 (2): 214–220.
- [21] Beebe T J C, Rowe G. 张丽军(译). *分子生态学*[M]. 广州: 中山大学出版社, 2009: 26–54.
- [22] Zhang H, Bhattacharya D, Lin S. Phylogeny of dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons[J]. *J Phycol*, 2005, 41: 411–420.
- [23] Zhang H, Bhattacharya D, Maranda L, et al. Mitochondrial *cob* and *cox 1* Genes and Editing of the Corresponding mRNAs in *Dinophysis acuminata* from Narragansett Bay, with Special Reference to the Phylogenetic Position of the Genus *Dinophysis*[J]. *Appl Envir Microbiol*, 2008, 74 (5): 1546–1554.
- [24] McLachlan J L, Boalch G T, Jahn R. Reinstatement of the genus *Exuviaella* (Dinophyceae, Procoenocididae) and an assessment of *Procoenocentrum lima*[J]. *Phycologia*, 1997, 36: 38–46.
- [25] Sparmann S F, Leander B S, Hoppenrath M. Comparative Morphology and Molecular Phylogeny of *Apicoporus* n. Gen.: A New Genus of Marine Benthic Dinoflagellates Formerly Classified within *Amphidinium*[J]. *Protist*, 2008, 159 (3): 383–399.
- [26] Saldarriaga J F, "MAX" Taylor F J R, Cavalier-Smith T, et al. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates [J]. *Eur J Protistol*, 2004, 40: 85–111.
- [27] John U, Fensome R A, Medlin L K. The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Allexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) [J]. *Molec Biol Evol*, 2003, 20 (7): 1015–1027.
- [28] Zhang H, Bhattacharya D, Lin S J. A three-gene dinoflagellate phylogeny suggests monophyly of Procoenocidales and a basal position for *Amphidinium* and *Heterocapsa*[J]. *J Molec Evol*, 2007, 65: 463–474.
- [29] Hackett J D, Anderson D M, Erdner D L, et al. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment[J]. *Am J Botany*, 2004, 91 (10): 1523–1534.
- [30] Fensome R A, Taylor F J R, Norris G, et al. A classification of living and fossil dinoflagellates[M]. *Micropaleontology Special Publication 7*. Hanover: Sheridan Press, 1993: 5–40.
- [31] Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*[M]. Oxford: Oxford University Press, 2000: 3–11.
- [32] Usup G, Hamid S Z, Chiet P K, et al. Marked differences in fatty acid profiles of some planktonic and benthic marine dinoflagellates from Malaysian waters[J]. *Phycologia*, 2008, 47 (1): 105–111.



## Analysis of the evolution of different ecological groups of dinoflagellates based on SSU rDNA and mitochondrial *cox 1* sequences

TANG Chen<sup>1,2</sup>, DONG Li<sup>1</sup>, RAO Tao<sup>1</sup>, JIA Rui<sup>1</sup>, YU Kefeng<sup>1</sup>, WU Weining<sup>1</sup>, WANG Jinhui<sup>2</sup>, XU Ren<sup>2</sup>, HE Peimin<sup>1</sup>

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

2. East China Sea Monitoring Center, East China Sea Branch, State Oceanic Administration, Shanghai 200137, China

**Abstract:** In this paper, we analyze the evolution of different ecological groups of dinoflagellates, based on SSU rDNA and mitochondrial *cox 1* sequences. After PCR and sequencing, we obtained partial sequences of SSU rDNA and mitochondrial *cox 1* for 4 dinoflagellates. By combining with related sequences of 26 dinoflagellates downloaded from GenBank, their maximum likelihood (ML) and neighbor-joining trees were constructed, using *Plasmodium falciparum* as the outgroup. The tree branch structure was evaluated by bootstrap support and calculation of the posterior probability was employed to assess the overall tree structure. This was followed by assessment of the two ML tree topologies by 1sKH, SH, ELW and 2sKH tests. This analysis indicated that benthic *Prorocentrum* did not cluster with planktonic *Prorocentrum* in phylogenetic trees based on different genes. Analysis of *Amphidinium carterae* further supported their unique evolutionary positions. We conclude that the phylogenetic tree based on SSU rDNA and mitochondrial *cox 1* substantially reflects the evolution of dinoflagellates. The results of this study laid a foundation for further research on the evolution between different ecological groups of dinoflagellate from the genetic level.

**Key words:** Planktonic dinoflagellates; benthic dinoflagellates; *Prorocentrum lima*; *Amphidinium carterae*; SSU rDNA; *cox 1*

**Corresponding author:** HE Peimin, E-mail: pmhe@shou.edu.cn; XU Ren, E-mail: xrhyp@163.com