

一株淡水水华胞甲藻的形态观察和系统发育分析

张琪¹, 郑凌凌¹, 李天丽¹, 宋会银^{1,2}, 刘国祥¹, 宋立荣^{1*}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 胞甲藻属 (*Cystodinium* Klebs) 是植甲藻目 (Phytodinales) 一种生活于淡水表层、漂浮、不运动的甲藻类群。由于胞甲藻属材料不易获取、人工培养困难等, 目前对该属的分类地位、分子系统发育和生活史等方面了解仍十分有限。2013年夏季, 我们从武汉市官桥基地一个发生严重胞甲藻水华的鱼塘中取样, 经过分离和培养, 于国内首次成功获得此甲藻, 将其编号为 FACHB-1781, 并保存于淡水藻种库中。经形态观察和分子鉴定, 确认该甲藻为胞甲藻属的巴达维亚胞甲藻 (*Cystodinium bataviense* Klebs), 其形态特征为: 营养细胞近新月形或长卵形, 两端渐窄、末端钝圆, 背腹侧常向外部隆起, 无刺或角状延伸。基于 SSU rDNA 序列的系统发育分析表明, 植甲藻目不是单系起源的类群, 巴达维亚胞甲藻与 *Cystodinium phaseolus* 亲缘关系密切且聚为一枝, 而另一些植甲藻类群(如 *Hemidinium nasutum* 和 *Gloedinium viscum*) 与其它已知 SSU rDNA 序列的甲藻类群亲缘关系不密切。

关键词: 巴达维亚胞甲藻; 胞甲藻属; 植甲藻目; 形态描述; 系统发育

中图分类号: Q949.24

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)04-0458-08

Morphological Observation and Phylogenetic Analysis of a Freshwater Blooming *Cystodinium* Strain

ZHANG Qi¹, ZHENG Ling-Ling¹, LI Tian-Li¹, SONG Hui-Yin^{1,2}, LIU Guo-Xiang¹, SONG Li-Rong^{1*}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Many immobile freshwater dinoflagellates, including the epineustonic genus *Cystodinium* Klebs, belong to the order Phytodinales. Due to limited cultivation and materials, knowledge on the taxonomy, phylogenetic position and life cycle of the genus *Cystodinium* is limited. An algal bloom was observed in a fish pond in Wuhan, Hubei Province, China in the summer of 2013. Cells were isolated from enriched samples using a micropipette. The clonal culture (FACHB-1781) was established and maintained in the Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences. The species was identified as *Cystodinium bataviense* Klebs by morphological and molecular evidence. The vegetative cells were lunate or shaped like an elongated oval with blunt horns. The poles were bluntly prolonged and without spines or projections. Phylogenetic results based on SSU rDNA sequences indicated that the order Phytodinales was not monophyletic. Some Phytodinales groups (e.g. *Hemidinium nasutum* and *Gloedinium viscum*) did not show any consistent affiliation with any other lineage. While *C. bataviense* clustered with *C. phaseolus*, the phylogenetic position of the *Cystodinium* clade was still unknown. Future work on this genus will help clarify its phylogenetic position within the dinoflagellates.

收稿日期: 2014-12-25, 退修日期: 2015-01-21。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2014AA022001)。

作者简介: 张琪(1985-), 男, 博士, 研究方向为藻类分类和系统发育(E-mail: zhangqiwx@sina.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: lrsong@ihb.ac.cn)。

Key words: *Cystodinium bataviense* Klebs; *Cystodinium* Klebs; Phytodinales; Morphological description; Phylogeny

甲藻广泛生活于海洋和淡水环境中, 有自养、异养、兼养寄生和共生营养类型, 是浮游生物的重要类群, 也是形成水华的主要类群之一^[1,2]。植甲藻目(Phytodinales)包含多数淡水不运动甲藻^[3], 在其生活史的主要阶段, 不运动的球状细胞色素体呈黄褐色, 周生、片状^[4]。胞甲藻属(*Cystodinium* Klebs)隶属于植甲藻目, 约有 14~28 种^[5,6], 该属甲藻的营养细胞自由漂浮、不运动, 呈长椭球形或新月状^[7]。此属甲藻具有多种不同的生殖方式, 如: 以动孢子、似亲孢子和静孢子方式进行无性繁殖; 以同配配子方式进行有性生殖; 通过寄生的变形虫方式进行生殖^[8]。由于野外很少采集并观察到淡水不运动甲藻, 因此胞甲藻属甲藻的分类界定仍不明确^[9,10]。由于胞甲藻属甲藻培养困难, 所获得的分子信息极少(目前仍无巴达维亚胞甲藻的任何分子序列信息), 故难以有效确定胞甲藻属的分类地位及其系统发育关系。

2013 年夏季, 武汉市官桥基地一鱼塘发生了严重甲藻水华, 藻类布满水面呈黄褐色。我们采集了样品并进行分离培养, 经形态观察及分子鉴定, 该水华藻种为巴达维亚胞甲藻(*Cystodinium bataviense* Klebs), 并对甲藻 SSU 序列的系统发育进行了研究, 以期阐明胞甲藻属在植甲藻目中的系统发育位置, 以及植甲藻目不同类群间的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

藻种样品采自武汉市官桥基地一个发生严重甲藻水华的鱼塘中(采集时间: 2013 年 6 月 28 日, 地理位置: 30° 32' 13" N, 114° 23' 44" E)。用毛细管挑取分离单个藻细胞, 并于 50 mL 三角瓶中扩大培养。采用 AF-6 培养基培养藻种^[11], 培养条件: 光暗周期 12 h : 12 h, 光照强度 2000 lx, 培养温度 25°C。藻种保存于中国科学院淡水藻种库(FACHB-collection), 藻种编号为 FACHB-1781。

1.2 实验方法

1.2.1 形态观察

采用 Olympus BX51 型显微镜观察甲藻细胞,

并用 Olympus DP71 型 CCD 采集图像。用 0.1% 吖啶橙对甲藻细胞核染色 10 min, 再经无菌水清洗, 然后于 Olympus BX51 落射荧光系统进行观察。数码拍照和数据测量通过 Olympus BX51 显微镜附带的图像分析软件 Image-Pro Express 6.0 完成。

1.2.2 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定

采用 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 方法(具体参见 Molecular Systematics^[12]) 提取甲藻基因组 DNA。用于 SSU rDNA 扩增和测序的引物为: uP18f (5'-AACCTGGTTGATCCT-GCCAG-3') 和 uP18r (5'-TGATCCTCTGCAG-GTTCACCTAC-3')^[13]。PCR 反应体系为 50 μL: 25 ng 模板基因组 DNA, 10 × 缓冲液 5 μL, 2 mmol/L 的 dNTP 5 μL, 20 μmol/L 的引物各 1 μL, Taq 酶 (TaKaRa ExTaq) 1.25 U, 最后以灭菌双蒸水补足至终体积。SSU rDNA PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 1 min, 56°C 退火 50 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 7 min。扩增产物用 Axygene 凝胶回收试剂盒纯化并送北京华大基因科技有限公司进行测序。序列提交至 NCBI 数据库(GenBank 序列号为 KM249872)。

1.2.3 系统发育分析

从 GenBank 下载序列相似的甲藻 SSU 序列, 利用 Clustal X 对基因序列进行比对^[14], 辅以 Bioedit 手工校正^[15]。使用软件 MEGA 4 计算碱基组成和转换/颠换值^[16]。

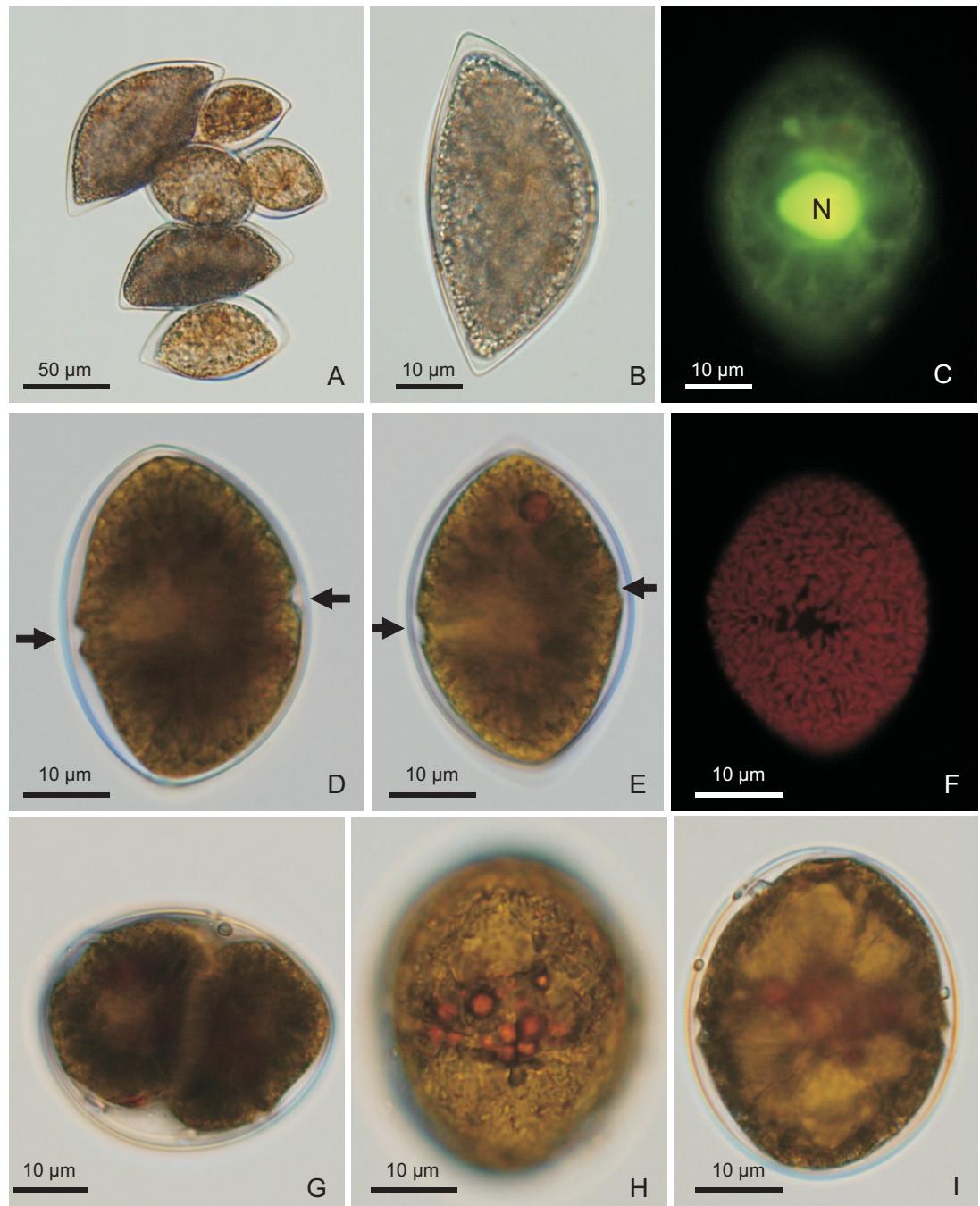
采用最大似然法(maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian inference, BI)构建 SSU rDNA 系统发育树。ML 和 BI 系统发育树分别采用 PAUP 4.0*(v4.0b10)^[17] 和 MrBayes (v3.1.2)^[18] 软件构建。ML 和 BI 系统发育树中替代模型的选择采用 Modeltest 3.07 程序进行分析^[19], 按等级似然比检验(hierarchical likelihood ratio tests, hLRTs)标准选择最适合的替代模型^[20]。在 ML 分析中, 选取了启发式搜索(heuristic searches)和临近分支交换算法(nearest neighbor interchange branch-swapping algorithm, NNI)进行构建, 并采用自展值分析(bootstraps, BP)进行重复检验。

在 BI 分析中, 采用马尔科夫链蒙特卡洛方法 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 设置 7 条链 (6 条热链, 1 条冷链) 运行 1 000 000 次, 并采用后验概率 (posterior probability, PP) 进行重复检验。

2 结果

2.1 形态描述

巴达维亚胞甲藻 (图 1: A~I)



A~C 为野外采集的甲藻营养细胞。A: 营养细胞; B: 单个细胞形态; C: 染色的细胞 (N 示甲藻核)。D~I 为人工培养的甲藻细胞。

D, E: 营养细胞 (箭头示横沟); F: 染色的细胞, 示杆状叶绿体; G: 细胞分裂; H, I: 动孢子。

A~C: Vegetative cells sampled from field. A: Vegetative cells; B: Single cell, showing cell shape; C: Stained cell, showing both dinokaryotic nuclei (N). D~I: Cultured cells. D, E: Vegetative cell, showing cingulum (arrow); F: Stained cell, showing rod-like chloroplasts; G: Cell division; H, I: Zoospore.

图 1 巴达维亚胞甲藻显微结构

Fig. 1 Light microscopy images of *Cystodinium bataviense*

Cystodinium bataviense Klebs 1912 Verh.

Nat. Med. Ver. Heidelberg. 11: 369-451.

营养细胞自由漂浮、不运动, 呈近新月形或长卵形, 背腹侧常向外部隆起(图1: A)。细胞两端渐窄, 末端钝圆, 无刺或角状延伸(图1: B)。叶绿体多数、短杆状, 黄褐色(图1: F)。没有观察到眼点。具有典型的甲藻核, 位于细胞中部(图1: C)。藻细胞有时含有红色油滴(图1: H)。营养细胞大小为80~140 μm \times 30~45 μm 。

生境: 淡水种类, 常出现于营养丰富的小水体或沼泽水体中。笔者采集的甲藻样品来自武汉市官桥基地的鱼塘, 由于夏季气温高、阳光直射, 使鱼塘中大量甲藻繁殖并漂浮于水面, 形成黄褐色水华。此时, 水体中通常还会伴生大量鞘藻属(*Oedogonium* spp.)藻类。

分布: 美国, 欧洲, 南亚, 中国。

野外采集的巴达维亚胞甲藻营养细胞形态与人工培养的细胞形态略有不同。野外采集的甲藻样品营养细胞横沟不明显, 背侧弯曲程度较大, 近新月形(图1: A, B), 而人工培养的巴达维亚胞甲藻营养细胞横沟明显, 背侧弯曲程度较小, 近长卵形(图1: D, E)。巴达维亚胞甲藻是一种群集性的水体表层漂浮生物(epineuston), 不论是野外采集的、还是人工培养的其营养细胞都会漂浮于水面; 观察发现人工培养的非营养时期的藻细胞(图1: G~I)会沉入水底。条件合适时, 营养细胞等分裂形成2个子代细胞(图1: G~I); 2个子代细胞继续发育形成动孢子或静孢子。有的藻细胞中部积

累大量橘红色油滴, 排列于细胞核外围(图1: H)。位于中部的细胞核区域与细胞周质(cell periphery)通过颜色较浅的原生质带相连(图1: I)。

2.2 序列分析

经测序及序列分析获得了该藻株的SSU序列, 其长度为1690 bp。以*Perkinsus marinus*为外类群, 搜集其它甲藻类群的相同基因序列, 并构建基于SSU基因的系统发育树。在SSU基因序列矩阵中, 含有36个长度为1653 bp的序列。所有位点中有539个可变位点(variable sites), 其中326个为可供简约分析的信息位点(parsimony-informative sites)、212个为单态位点 singleton sites)。A、T、C、G碱基的平均含量分别为26.0%、27.5%、20.1%、26.4%, 其中A+T的含量(53.5%)高于G+C的含量(46.5%), 碱基转换/颠换值为2.2。这些植甲藻目类群间的序列相似性为84.1%~99.9%, 遗传距离为 $p = 0.000 \sim 0.142$ (表1)。我们测序的巴达维亚胞甲藻藻株的SSU序列与其它植甲藻目类群相同基因序列之间的相似性介于84.5%~89.3%之间, 遗传距离为 $p = 0.112 \sim 0.142$ (表1)。这一高度的相似性进一步支持了我们对其形态学的鉴定结果。

2.3 系统发育分析

基于甲藻SSU序列的系统发育分析表明, 植甲藻目不是一个单系类群, 常形成一些长的分枝。系统发育树显示(图2): *Spiniferodinium galeiforme* (GU295203)和*S. palauense* (AB626150)形成一个具有高度支持的进化枝(BP/PP = 100/100),

表1 植甲藻目SSU rDNA序列间的遗传距离(成对未修正的 p -距离)(右上)和序列相似性(左下)

Table 1 Distance values (pairwise uncorrected p -distances) (upper right) and sequence identity (lower left) based on SSU rDNA of Phytodinales taxa

植甲藻目类群 Phytodinales taxa	<i>H. nasutum</i> AY443016	<i>P. sp.</i> EF058251	<i>S. galeiforme</i> GU295203	<i>S. palauense</i> AB626150	<i>G. viscum</i> L13716	<i>H. arenarium</i> AB036837	<i>C. phaseolus</i> EF058235	<i>C. bataviense</i> KM249872
<i>Hemidinium nasutum</i> AY443016	0	0.112	0.096	0.095	0.101	0.143	0.112	0.137
<i>Phytodinium</i> sp. EF058251	88.1%	0	0.089	0.089	0.094	0.133	0	0.122
<i>Spiniferodinium galeiforme</i> GU295203	89.6%	90.7%	0	0.009	0.065	0.116	0.089	0.114
<i>Spiniferodinium palauense</i> AB626150	89.7%	90.8%	98.9%	0	0.063	0.115	0.089	0.114
<i>Gloeodinium viscum</i> L13716	89.2%	90.3%	93.1%	93.3%	0	0.121	0.094	0.112
<i>Halostylocladum arenarium</i> AB036837	84.1%	85.3%	86.9%	87.1%	86.5%	0	0.133	0.142
<i>Cystodinium phaseolus</i> EF058235	88.0%	99.9%	90.6%	90.8%	90.3%	85.2%	0	0.112
<i>Cystodinium bataviense</i> KM249872	85.5%	87.4%	88.4%	88.4%	88.4%	84.5%	89.3%	0

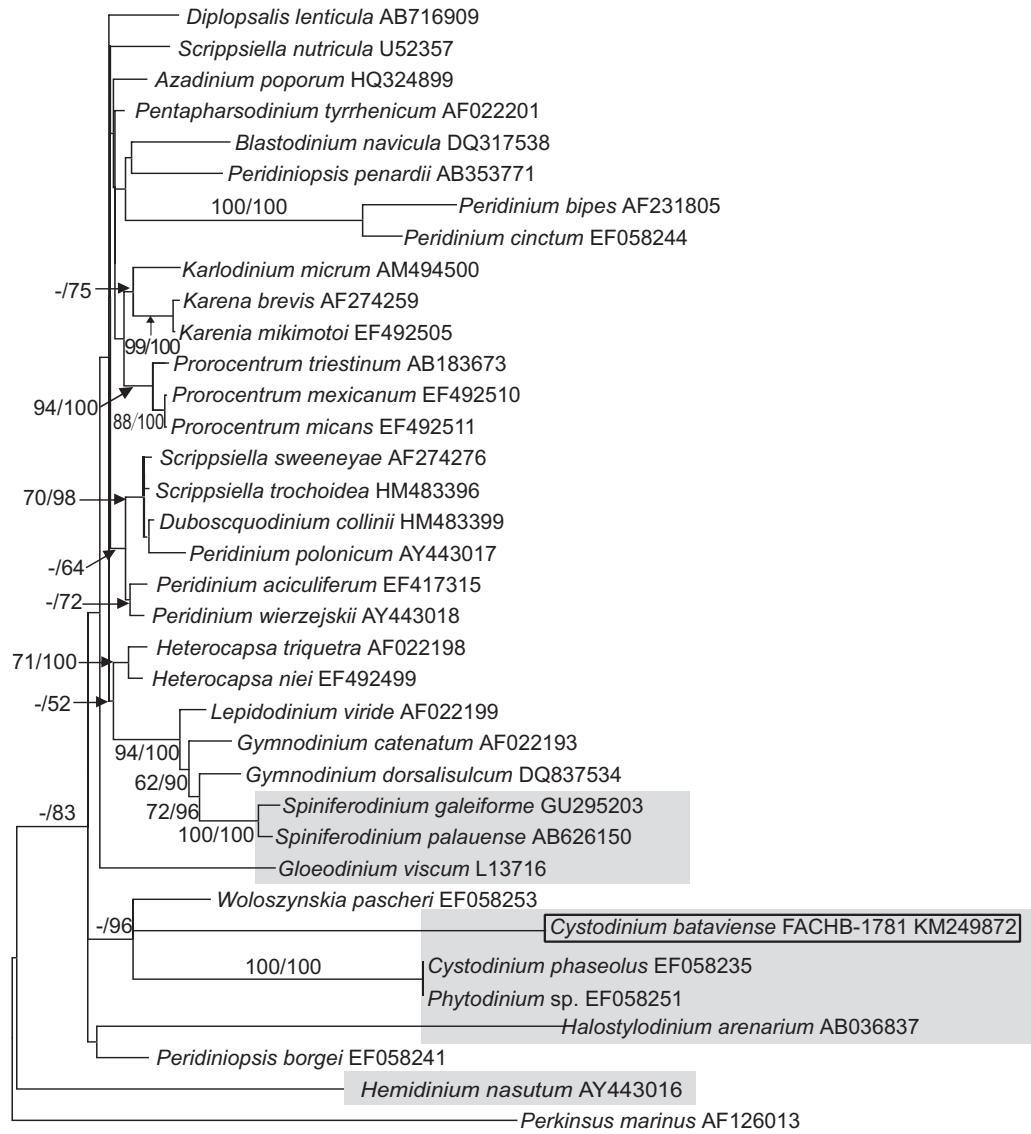


图 2 基于甲藻 SSU 序列构建的最大似然树
Fig. 2 Maximum likelihood phylogenies constructed from dinoflagellate small subunit ribosomal DNA (rDNA) sequences

与裸甲藻目中的 *Gymnodinium catenatum* (AF022193)、*G. catenatum* (AF022193) 等狭义裸甲藻属类群关系密切。植甲藻目中的巴达维亚胞甲藻 *Cystodinium bataviense* (KM249872)、*C. phaseolus* (EF058235)、*Phytodinium* sp. (EF058251) 与 Suessiales 目中的网甲藻属

Woloszynsksia pascheri (EF058253) 聚在一起, 但没有得到较高的自展支持 (BP/PP = -/96), 且在这一分枝中, *C. phaseolus* (EF058235) 没有和 *C. bataviense* (KM249872) 聚在一起, 而与 *Phytodinium* sp. (EF058251) 关系更为密切。*Halostylocladum arenarium* (AB036837) 与多甲藻

目中波吉拟多甲藻 *Peridiniopsis borgei* (EF058241) 关系密切 (没有得到较高的 BP 和 PP 支持); *He-midinium nasutum* (AY443016)、*Gloeodinium viscum* (L13716) 与其它已知甲藻类群都没有表现出较近的亲缘关系。

3 讨论

植甲藻目 (Phytodinales) 也称为球甲藻目 (Dinococcales)，目前仅有一科，即：植甲藻科 (Phytodiniaceae)，包括许多淡水不运动甲藻^[3,21]。但是，传统的球甲藻目成员还包括共生甲藻属 (*Symbiodinium* Freudenthal) 和梨甲藻属 (*Pyrocystis* Wyville-Thompson) 等类群，因此通常认为植甲藻目是一个比球甲藻目更为自然的分类单元而得到广泛接受^[22]。Loeblich^[3]认为植甲藻目包括 13 个属，可通过细胞形状和细胞表面附属物 (如胶、柄和盘) 来区分不同的属。近年来的研究又发现了一些植甲藻目新属，特别是新发现了一些海洋植甲藻目类群。如 Horiguchi 和 Chihara 在日本亚热带海滩上发现了一个不运动的、球状底栖新属 *Spiniferodinium* Horiguchi et Chihara^[23]，该类群是生活于海洋沿岸带或岸边附着的单细胞光合生物，具有许多椭球形叶绿体和典型的甲藻核以及盔状的细胞覆盖物；Horiguchi 等^[24]发现了一种具有柄、不运动的海洋球状甲藻，通过形态观察和分子鉴定认为应当为该物种建立一个新属——*Halostyloidinium* Horiguchi et Chihara。胞甲藻属是一类自由生活的、淡水、不运动甲藻，依据其生境及独特的形态可与其它植甲藻目近缘类群区分

(表 2)。目前对胞甲藻属物种的鉴定主要依据甲藻形态、大小和角的形状^[7]。Klebs 和 Popovský 等^[7,25]对巴达维亚胞甲藻的描述是，其形态新月形或近长卵形，细胞两端钝尖无刺，具多数杆状叶绿体，可形成动孢子，营养细胞大小 $80 \sim 140 \mu\text{m} \times 30 \sim 45 \mu\text{m}$ 。我们观察的甲藻样品的形态特征与前人描述相符，因此将此物种鉴定为巴达维亚胞甲藻 (*Cystodinium bataviense* Klebs)。*C. bataviense* 与 *C. phaseolus* 和 *C. cornifax* 形态非常相似，但它们在形态和角的形状上略有不同。*C. cornifax* 通常具有 2 个 (有时 1 个) 非常尖锐的角，而 *C. bataviense* 和 *C. phaseolus* 通常具有 2 个较钝的角；*C. bataviense* 细胞呈新月形，而 *C. phaseolus* 细胞为椭球形，背侧通常没有弯曲^[7, 25]。

巴达维亚胞甲藻为光合自养型，但也有吞噬营养型的报道^[10]，认为其能够通过动孢子、静孢子、同形配子和变形虫等不同的方式进行生殖。胞甲藻属生活史复杂，与植甲藻目近缘属间容易混乱。当胞甲藻属处于变形虫式寄生期时，其形态与球甲藻属 (*Dinococcus* Fott) 十分相似，因此有学者^[8]认为球甲藻属只是胞甲藻属的一个生活时期。Pfiester 等^[8]和刘国祥等^[26]发现采集的胞甲藻属样品中有些细胞类似于 *Hypnodinium* Klebs，而这两个属的区别仅形状不同，所以认为 *Hypnodinium* 是胞甲藻属的一个生活时期。巴达维亚胞甲藻是胞甲藻属的模式种，也是此属中研究相对较多的种类。Pfiester 和 Lynch^[8]尝试用不同培养基单种培养巴达维亚胞甲藻，但没有成功。2000 年刘国祥等^[26]最先在国内报道了巴达维亚胞甲藻，对

表 2 胞甲藻属及其相似属的形态和生境特征比较
Table 2 Morphological characteristics and habitat of *Cystodinium* and related genera

属名 Genus	形态特征 Morphological characteristics	生境特征 Habitat
胞甲藻属 <i>Cystodinium</i> Klebs	营养细胞近新月形或长卵形，两端渐尖、具或不具刺或角状延伸	淡水，常见于小水体或沼泽，营养细胞不运动、漂浮
四角甲藻属 <i>Tetradinium</i> Klebs	营养细胞三角形或四面体，角上具 1~2 个粗短的刺	淡水，营养细胞不运动，浮游或通过小柄固着
植甲藻属 <i>Phytodinium</i> Klebs	营养细胞卵圆形或椭球形，具厚的细胞壁	淡水，营养细胞不运动、漂浮
<i>Gloeodinium</i> Klebs	营养细胞椭球形至球形，具厚的多层胶质层	淡水，营养细胞固着
<i>Spiniferodinium</i> Horiguchi & Chihara	营养细胞盔形，具坚硬、多短刺的外壳；原生质体呈裸甲藻状，具多数椭球形叶绿体	海洋，营养细胞固着或附生
<i>Halostyloidinium</i> Horiguchi & Yoshizawa-Ebata	营养细胞球形或椭球形，具固着柄，甲藻板片格式为 Po, 5', 2a, 7", 7c, 6s, 5", 1p, 2"	海洋，营养细胞固着

其形态和生活史进行了描述，并采集含甲藻的原水样进行了培养，仅获得短暂存活的藻种。国际知名的德国哥廷根大学藻种库(Culture Collection of Algae at Goettingen University, 简称 SAG)成功培养了胞甲藻属另一物种 *Cystodinium phaseolus*^[13]。本研究通过单细胞分离的方法，于国内首次成功培养获得巴达维亚胞甲藻，编号为 FACHB-1781，藻种保存于中国科学院淡水藻种库(FACHB-collection)。由于胞甲藻属材料不易获取且人工培养困难，所以目前对该属的分类地位、系统发育位置和生活史等方面了解仍十分有限。

Timpano 和 Pfiester^[10]观察发现琼脂上培养的巴达维亚胞甲藻，能够形成静孢子，将这些细胞放入流动的培养基时，可以形成生命短暂的动孢子，然后变成不运动的静孢子(表层漂浮生活阶段)。本研究也观察到，细胞分裂后形成的子代细胞最初位于液体培养基底部，然后发育形成动孢子或静孢子，最后变成表层漂浮的营养细胞阶段。有研究认为，在巴达维亚胞甲藻生活史中，细胞分裂和母细胞壁瓦解对于动孢子或静孢子的形成非常重要。细胞分裂通常形成2个相等的细胞。子细胞刚分裂时仍保留着母细胞壁。每个子代细胞发育出良好的纵沟和横沟，母细胞壁凝胶化然后膨胀。母细胞壁破碎的早晚是决定最后发育成动孢子还是静孢子的关键，如果条件适合母细胞快速凝胶化且恰逢子细胞分裂，则会释放出动孢子；如果母细胞壁推迟破裂，则会形成静孢子^[27]。

由于胞甲藻属以及其它植甲藻目类群难以培养，因而获得相应的分子数据十分有限，对它们之间的系统发育关系仍不太明确。Logares 等^[13]对甲藻的系统发育研究表明，*Cystodinium phaseolus* 和 *Hemidinium nasutum* 分别形成单独的长枝，与其它类群关系都不密切。但本研究显示，*C. phaseolus* 和 *Phytodinium* sp. (EF058251) 的亲缘关系非常密切。Popovský^[7]通过系统发育研究认为植甲藻属(*Phytodinium*)可能是其它植甲藻目类群的合子，我们的研究结果也印证了这一观点。Logares 等^[13]认为 *Cystodinium phaseolus* 和 *Hemidinium nasutum* 这些淡水甲藻聚为的长枝显示出明显的序列趋异性，揭示了海洋和淡水甲藻的

分隔，也表明淡水入侵发生在很久以前或淡水入侵甲藻的分子变异速率大大提高。本研究中胞甲藻属的2个种类聚在一起，并且与 Suessiales 目的一些淡水种类(如 *Woloszynskia pascheri*)关系密切，但是胞甲藻属类群在整个甲藻类群中的系统发育位置仍不明确。

Thompson 等^[9]认为胞甲藻属有些物种在形态描述上有些混乱(如：不运动营养阶段长度、宽度和角等方面)。因此希望今后有更深入关于胞甲藻属形态和分子系统学方面的研究来澄清该属及其某些种类在甲藻中的分类位置。

参考文献：

- [1] Hackett JD, Anderson DM, Erdner DL, Bhattacharya D. Dinoflagellates: A remarkable evolutionary experiment [J]. *Am J Bot*, 2004, 91 (10): 1523–1534.
- [2] Murray S, Flø Jørgensen M, Simon YW, Patterson DJ, Jermiin LS. Improving the analysis of dinoflagellate phylogeny based on rDNA [J]. *Protist*, 2005 (3), 156: 269–286.
- [3] Loeblich III AR. Dinophyceae [M]// Parker SP ed. Synopsis and Classification of Living Organisms. New York: McGraw-Hill, 1982: 101–115.
- [4] Saldarriaga JF, Taylor FJR, Cavalier-Smith T, Menden-Deuer S, Keeling PJ. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates [J]. *Eur J Protistol*, 2004, 40 (1): 85–111.
- [5] Huber-Pestalozzi G. Das Phytoplankton des Süßwassers [M]// Thienemann A ed. Die Binnengewässer. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagabuchhandlung, 1968: 309–310.
- [6] Starmach K. Flora Słodkowodna Polski. Tom. 4: Cryptophyceae, Dinophyceae, Raphidophyceae [M]. Warsaw: Polska Akademia Nauk Instytut Botaniki, 1974: 519–520.
- [7] Popovský J, Pfiester LA. Dinophyceae (Dinoflagellida) [M]// Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D eds. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1990: 164–186.
- [8] Pfiester LA, Lynch RA. Amoeboid stages and sexual reproduction of *Cystodinium bataviense* and its similarity to *Dinococcus* (Dinophyceae)

- [J]. *Phycologia*, 1980, 19 (3): 178–183.
- [9] Thompson RH, Meyer R. *Cystodinium acerosum* sp. and certain “horned” species[J]. *Trans Kansas Acad Sci*, 1984, 87 (3–4): 83–90.
- [10] Timpano P, Pfiester LA. Colonization of the epineuston by *Cystodinium bataviense* (Dinophyceae): Behavior of the zoospore[J]. *J Phycol*, 1985, 21 (1): 56–62.
- [11] Andersen RA, Berges JA, Harrison PJ, Watanabe MM. Recipes for Freshwater and Seawater Media [M]// Andersen RA ed. Algal Culturing Techniques. Burlington: Elsevier Academic Press, 1997: 429–538.
- [12] Hillis DM, Moritz CM, Mable BK. Molecular systematics [M]. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Sunderland, 1996: 665.
- [13] Logares R, Shalchian-Tabrizi K, Boltovskoy A, Rengefors K. Extensive dinoflagellate phylogenies indicate infrequent marine-freshwater transitions [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 45 (3): 887–903.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25 (24): 4876–4882.
- [15] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24 (8): 1596–1599.
- [17] Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) [M]. Version 4th ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland, 2002: 1–140.
- [18] Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17 (8): 754–755.
- [19] Posada D, Crandall KA. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14 (9): 817–818.
- [20] Huelsenbeck JP, Crandall KA. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood[J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1997, 28: 437–466.
- [21] Borelly P. Les Algues d'Eau Douce. 3. Les Algues bleues et rouges Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadienes. Éditions N[M]. Paris: Boubée et Cie, 1970: 505–506.
- [22] Timpano P, Pfiester LA. Fine structure of the immobile dinococcacean *Cystodinium bataviense* (Dinophyceae) [J]. *J Phycol*, 1985, 21 (3): 458–466.
- [23] Horiguchi T, Chihara M. *Spiniferodinium galeiforme*, a new genus and species of benthic dinoflagellates (Phytodiniales, Pyrrhophyta) from Japan[J]. *Phycologia*, 1987, 26 (4): 478–487.
- [24] Horiguchi T, Yoshizawa-Ebata J, Nakayama Y. *Halostyloidinium arenarium*, gen. et sp. nov. (Dinophyceae), a coccoid sand-dwelling dinoflagellate from subtropical Japan[J]. *J Phycol*, 2000, 36 (5): 960–971.
- [25] Klebs G. Über Flagellaten- und Algen-ähnliche Peridineen [J]. *Verh Naturhist Med Vereins Heidelberg*, 1912, 11: 369–451.
- [26] 刘国祥, 胡征宇. 一种不运动的淡水甲藻的形态学和生活史观察[J]. 水生生物学报, 2000, 24(1): 67–71.
- [27] Thompson RH. Immobile Dinophyceae, I: New records and a new species[J]. *Am J Bot*, 1949, 36 (3): 301–308.

(责任编辑: 张平)