

五种 株原甲藻核糖体小亚基 (18S rRNA) 基因克隆及序列分析*

王 波 米铁柱 吕颂辉 孙 军
李秀芹 甄 毓 李荣秀 于志刚¹⁾

(中国海洋大学 青岛 266003)

(暨南大学水生生物研究所 广州 510632)

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(上海交通大学 上海 200030)

提要 采用分子克隆及序列比对的方法,对五种 株赤潮原甲藻 18S rRNA 基因全长序列进行扩增、克隆和序列测定,并从 GenBank 上下载 13 个原甲藻 18S rRNA 基因接近全长的序列,用 NJ 法和 ME 法构建了原甲藻属的系统树。结果表明,五种 株原甲藻 18S rRNA 基因扩增序列长度为 1782—1783bp 其中来自南海(中国海域)和来自美国海域的两株微小原甲藻(*Prorocentrum minimum*)的序列完全一致;东海的赤潮原甲藻(*Prorocentrum* sp.)与具齿原甲藻(*P. dentatum*)的序列也完全一致,与微小原甲藻只有 5 个碱基的差异;而海洋原甲藻(*P. micans*)与微小原甲藻和具齿原甲藻的序列差异较大,分别为 27 个和 28 个碱基。通过 NJ 法和 ME 法构建的系统树基本一致。由系统树可以看到:原甲藻属大致分为两支,本实验的微藻全部分布在同一支上。18S rRNA 基因序列还将有助于有害赤潮藻快速鉴定的特异性分子探针的研制。

关键词 原甲藻属, 18S rRNA 基因, 系统分析

中图分类号 Q93

原甲藻属 (*Prorocentrum*) 属于甲藻门 (Dinophyta), 甲藻纲 (Dinophyceae), 原甲藻亚纲 (Procentrophycidae), 原甲藻目 (Procentrales), 原甲藻科 (Procentraceae)。该属微藻的藻体为单细胞, 个体小, 分布广泛, 是太平洋沿岸形成赤潮的主要藻种 (齐雨藻, 2003)。在中国由原甲藻引发的赤潮也比较多, 如 2000—2002 年及 2004 年在东海浙江附近海域爆发特大赤潮就是由原甲藻 (*Prorocentrum* sp.) 引起的, 面积都达几千平方公里, 严重破坏了海洋生态环境, 影响了海洋渔业生产 (王金辉等, 2003)。少数原甲藻种类不仅可引发赤潮, 而且会产生各种毒素, 如腹泻性贝

毒 (Diarhetic shellfish poisoning DSP) 和西加鱼毒 (Ciguater fish poisoning CFP) 等 (Morton, 1994; Grzebyk *et al.*, 1997; Levasseur *et al.*, 2001)。由于原甲藻属赤潮生物种多, 且危害较大, 所以关于原甲藻属微藻的研究越来越多 (张宝玉等, 2004; 顾海峰等, 2004; 王朝晖等, 2005)。

核糖体 RNA (rRNA) 基因序列由于在不同生物之间既有很高的保守性, 又存在一定的序列变异性, 已经成为生物分子鉴定和定量检测中最常用的分子指标 (张宝玉等, 2004; 门新荣等, 2005)。18S rRNA 基因是唯一具有信息分子和功能分子两种作用的编码核糖体的基因, 为高度重

* 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目, 2001AA635090 号; 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目, 2001CB409704 号; 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金, 01BS08 号。王 波, 硕士, E-mail oceanwangb@126.com

1) 通讯作者: 于志刚, 教授, E-mail zhigangyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2005-08-16 收修改稿日期: 2005-12-04

复序列, 约 800—10000 拷贝, 在细胞内连续排列。同时 18S rDNA 基因序列结构、功能十分保守, 若它们的序列存在变异就能成为一种稳定的 DNA 标记, 用于鉴别物种。近年来已开展了一些利用 18S rRNA 基因在分子水平对赤潮藻的研究 (Grzebyk *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002)。

当前国内对原甲藻的研究主要集中在生态学等方面如生物形态鉴定 (吕颂辉等, 2003)、生态调查 (辜小莲等, 2002)、营养生理 (胡晗华等, 2003)、动力学及生态模型的建立等 (谷颖等, 2002; 黄贯虹等, 2002)。在分子生物学方面, 国外已利用 18S rRNA 基因及 28S rRNA 基因序列开展了一些原甲藻物种的分子系统学研究 (Zardoya *et al.*, 1995; McLachlan *et al.*, 1997; Grzebyk *et al.*, 1998), 初步得出一些物种间的进化关系, 但国内对中国近海微藻种株的研究还较少 (董云伟等, 2004)。

本研究中作者测定了我国近几年来经常在东海引发特大赤潮的原甲藻 (*Prorocentrum* sp.)、与该藻形态相似的具齿原甲藻 (*P. dentatum*) 和我国的两种主要的赤潮原甲藻微小原甲藻 (*P. minimum*) 及海洋原甲藻 (*P. micans*) 的 18S rRNA 基因序列, 与 GenBank 数据库中已知种的序列一起构建系统树, 分析了这些藻的系统进化关系和遗传差异。研究结果将为特异分子探针的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 藻种来源及其培养

Prorocentrum sp. 由中国科学院海洋研究所提供, 2002年5月1日应用单细胞挑取法分离自东海赤潮频发区 (123°E, 31°N); *P. dentatum* (CCMP1517) 和 *P. minimum* 1 由暨南大学提供; *P. micans* 1 和 *P. minimum* 2 由美国康涅狄格大学 (Connecticut University) 提供。这五种 株微藻均培养于 *f*/2 培养基中, 培养温度为 18°C, 以日光灯

作为光源, 光照强度为 $2.0 \times 10^5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光照周期为 D:L=12:12。

1.2 基因组 DNA 的提取纯化

采用苟万里等提取 DNA 的方法提取基因组 DNA (苟万里等, 2003) (纯化试剂盒购自上海华舜生物公司)。

1.3 PCR 反应及产物的纯化

18S rRNA 基因扩增引物设计为真核生物通用, SSU-F: 5' ACCTGGTTGATCCTGCCAGT3' 和 SSU-R: 5' TCACCTACGGAAACCTTGT3', 由上海博亚生物公司合成。PCR 反应体系为 25 μ l 含有 50ng 模板 DNA, 2mmol/L 的 MgCl₂, dNTP 各 0.2mmol/L, 正反向引物各 0.5 μ l, 1.25 单位 Ex taq 酶 (大连宝生物公司) 和一倍缓冲液。循环条件为: 94°C 预变性 10min 接 94°C 变性 30s, 55°C 退火 45s, 72°C 延伸 90s 共 32 个循环; 再 72°C 延伸 10min。胶回收纯化产物。

1.4 扩增产物的克隆、测序

将扩增产物与 pMD18-T 载体 (大连宝生物公司) 连接, 转化感受态 *E. coli* DH α -5 用蓝白斑法挑选阳性克隆, 经质粒酶切鉴定确认后测序 (大连宝生物公司)。

1.5 序列分析

用 ClustalK 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) 软件对测得的 5 个序列与从数据库下载的原甲藻属 13 个 18S rRNA 基因序列 (表 1) 进行多序列对齐排列 (Multiple Alignment)。用 MEGA 2.1 软件中的 Kimura 双参数模型 (Kimura, 1980) 计算各序列间的距离, 采用邻接法 (Neighbour Joining Method, NJ) (Saitou *et al.*, 1987) 和最小进化法 (Minimum Evolution, ME) 构建系统树, 用自举检验 [(bootstrap test) Felsenstein, 1985] 估计系统树分支节点的置信度, 自举数据集为 1000 以多甲藻目中 *Noctiluca scintillans* (序列号 AF022200) 为外类群。

表 1 本研究所用材料的来源及其 18S rRNA 基因序列在基因库中的注册号码 (标* 者为本实验所测序列)

Tab. 1 Species and origins of the *Prorocentrum* in this study and 18S rRNA gene access ion numbers (those with asterisks were sequenced in our experiment)

种 (株) 名	来 源	注 册 号
<i>Prorocentrum</i> sp.	East China Sea	AY 803743*
<i>P. dentatum</i> (CCMP1517)	South Pacific, near South America	AY 803742
<i>P. minimum</i> 1	South China Sea	AY 803740*

续表

种(株)名	来 源	注 册 号
<i>P. m in inum</i> 2	American coast	AY 80374 f
<i>P. m icans</i> 1	American coast	AY 80373 g
<i>P. m in inum</i> 4 (P M u 2)	Korean coasts	AY 42179 1
<i>P. m in inum</i> 5	Unknown (NORWAY?)	A J415 520
<i>P. m icans</i> 2	Unknown (NORWAY?)	A J415 519
<i>P. m icans</i> 3 (LB 113614)	Cambridge algae collection	M 14649
<i>P. panamensis</i> (PPAN06)	Contadora Island, Panama	Y 16233
<i>P. arenarium</i> (PMAYDI)	Mayotte Island, S.W. Indian Ocean	Y 16234
<i>P. emarginatum</i> (PREU 2)	Réunion Island, S.W. Indian Ocean	Y 16239
<i>P. m in inum</i> 3 (Pm S1)	French Mediterranean coast	Y 16238
<i>P. concavum</i> (PPAN04)	Gulf of Panama, Pacific coast	Y 16237
<i>P. maculosum</i> (PPAN20)	Contadora Island, Panama	Y 16236
<i>P. lina</i> (# 151)	Japan, Pacific coast	Y 16235
<i>P. mexicanum</i> (PM0004)	French Polynesia, Pacific Ocean	Y 16232
<i>P. gracile</i> (CCMP765)	Cape Otway, Victoria, Australia	AY 443019

2 结果与分析

2.1 DNA的提取和 PCR 扩增

五种株原甲藻总 DNA 提取后电泳结果如图 1(上), 提取后的 DNA 分子量大小均一, 而且经过 PCR 扩增检验, 说明提取的 DNA 质量较好。对 18S rDNA 基因片段的扩增后电泳如图 1(下), 显示出扩增片段长度约 1700—1800bp 而且比较均一, 与预想的结果一致, 可基本断定其为预想片断。

2.2 五种株原甲藻 18S rRNA 基因序列分析

对扩增片段进行基因克隆、测序。*Prorocentrum* sp.、*P. dentatum*、*P. m in inum* 1、*P. m in inum* 2 四种株的序列长度均为 1782bp *P. m icans* 1 序列长 1783 bp。五个序列共有 30 个差异位点, 包括 29 个转换/颠换位点和 1 个插入缺失位点。*P. m in inum* 1 与 *P. m in inum* 2 两株原甲藻的 18S rRNA 基因序列完全相同, *Prorocentrum* sp. 与 *P. dentatum* 的 18S rRNA 基因序列也完全相同。*P. dentatum* 与 *P. m in inum* 有 5 个差异位点, 序列同源率为 99.72%; *P. m icans* 1 与 *P. dentatum* 及 *P. m in inum* 的差异位点分别为 28 个和 27 个, 序列同源率分别为 98.43% 和 98.49%。说明 *P. dentatum* 与 *P. m in inum* 系统进化距离很近, 而与 *P. m icans* 稍远一些。

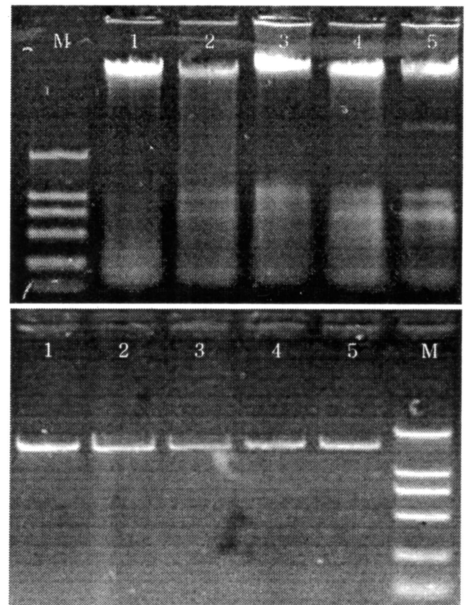


图 1 五种株原甲藻 DNA 提取(上)及 PCR 扩增目的片段(下)的电泳。M 为 DNA 分子标记 DL2000, 1—5 泳道分别为 *Prorocentrum* sp.、*P. dentatum*、*P. m in inum* 1、*P. m in inum* 2、*P. m icans* 1

Fig. 1 Electrophoresis of genomic DNA and amplified 18S rRNA gene in 15 species/strains of *Prorocentrum*. M is DNA marker DL2000. 1—5 lanes are *Prorocentrum* sp., *P. dentatum*, *P. m in inum* 1, *P. m in inum* 2 and *P. m icans* 1, respectively.

2.3 系统学分析

由于 *P. minimum* 1、*P. minimum* 2 和 *P. minimum* 序列完全相同, 因此以 *P. minimum* 1 为代表; 同样因 *Prorocentrum* sp 与 *P. dentatum* 序列完全相同, 故以 *P. dentatum* 为代表。在 15 种 株原甲藻排列过的序列中, 1766 个位点中有 313 个位点是变异位点 (图 2), 占总位点的 17.72%。由 Kimura 双参数模型计算得到遗传距离, 最大为 0.1148 平均为 0.0528。通过 NJ 法和 ME 法构建的系统树如图 3 和图 4。由图 3 图 4 可以看出, 同一种的不同株系首先聚在一起, 说明种间距离大于种内个体间的距离。NJ 法和 ME 法构建的系统树除 *P. marginatum* 的位置不确定外, 其他种的进化

关系完全一致, 而且大部分的节点自检支持率也比较高。原甲藻属可大致分为两大支, 底栖生活 (*benthic*) 的 *P. arenarium*、*P. lima*、*P. maculosum*、*P. concavum* 聚为一支, 而浮游和底栖-浮游生活 (*planktonic and benthoplanktonic*) 的 *P. micans*、*P. gracile*、*P. mexicanum*、*P. dentatum*、*Prorocentrum* sp、*P. minimum*、*P. panamensis* 聚为另一支 (*P. marginatum* 的分类地位有待于进一步研究)。本研究中的几种 株浮游微藻都处在浮游和底栖-浮游一支中, *P. minimum* 和 *P. dentatum* 首先聚在一起, 再和 *P. micans* 所在的支聚在一起, 无论 NJ 树还是 ME 树都有很高的自检支持率, 清楚地揭示了它们在属内的分化顺序及遗传距离关系。

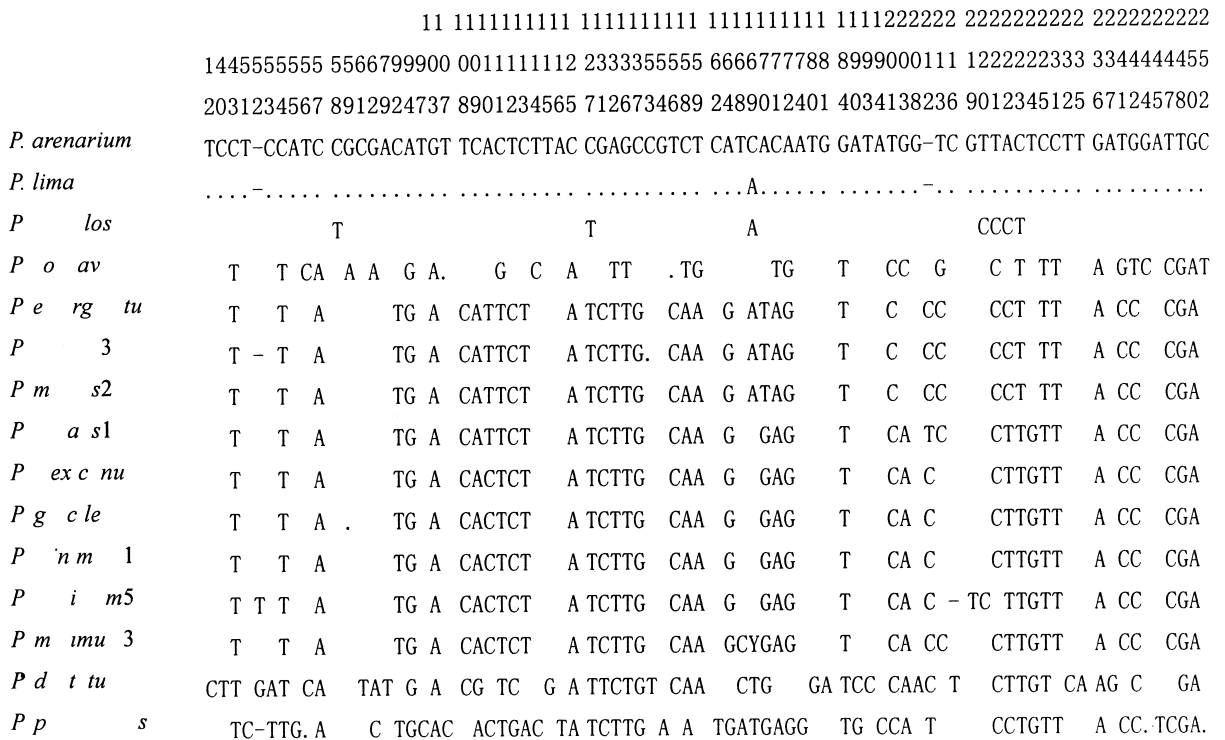


图 2 15 种 株原甲藻 18S rRNA 基因序列变异位点 (限于篇幅, 本图仅显示一部分)

Fig. 2 The nucleotide variation sites of 18S rRNA genes in the 15 species/strains of *Prorocentrum* (Only partial portion was shown duo to space limitation)

注: 上面的数字为差异位点的位置序号、点表示与第一个序列在此位点碱基相同

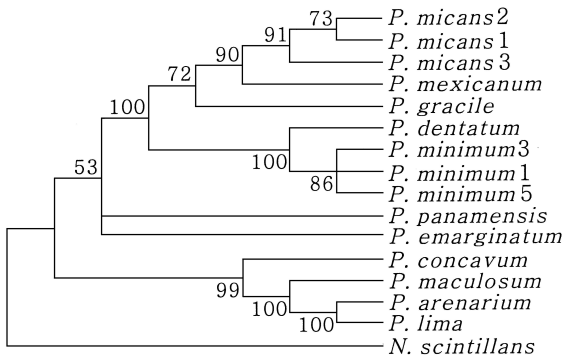


图3 由NJ法构建的系统树, *N. scintillans*为外类群

Fig. 3 Phylogenetic tree of 18S rRNA gene sequences constructed in NJ manner. *N. scintillans* was used as outgroup member

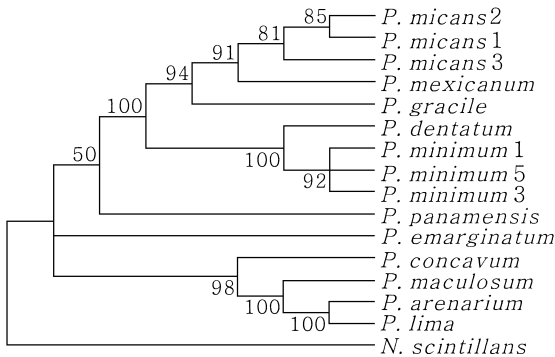


图4 由ME法构建的系统进化树, *N. scintillans*为外类群

Fig. 4 Phylogenetic tree of 18S rRNA gene sequences constructed in MP manner. *N. scintillans* was used as outgroup

3 讨论

通过对五株 *P. minimum* 18S rRNA 基因序列比较发现, 来自南海(中国海域)、美国海域及韩国海域的三株 1756bp 长的序列完全相同, 而分离自法国附近海域的一株也仅仅有一个碱基的差异。这说明 18S rRNA 基因序列的高度保守性; 而另外一株与前面几株有四个碱基的差异, 以及三株 *P. micans* 中 *P. micans1* 和 *P. micans2* 与 *P. micans3* 分别有 19 个和 18 个碱基的差异, 同样也说明了在高度保守的 18S rRNA 基因序列区, 不同种群间也会存在一定的差异。

近几年来频繁在东海海域爆发赤潮的原甲藻种 *Prorocentrum* sp. 的种名问题近来争论较大, 吕颂辉等通过将其与购自美国国家海洋藻种中心的 *P. dentatum* (CCMP1517) 进行电镜观察对比认为, 其为 *P. dentatum* (吕颂辉等, 2003), 而陆斗定等则认为其与 Stein 所描述的具齿原甲藻在形

态尤其是细胞长度上差异太大而把它作为一个新种, 定名为 *P. donghaiense* (陆斗定等, 2003)。通过此次实验发现, *Prorocentrum* sp. 与来自美国国家海洋藻种中心的 *P. dentatum* (CCMP1517) 的 18S rRNA 基因序列完全相同, 由此可大致推断它们为同一种。至于 *Prorocentrum* sp. 究竟是 *P. donghaiense* 还是物种 *P. dentatum* Stein 随世界分布海域的不同而形成的东海的一个地理生态型种群, 有待于进一步的研究。

原甲藻各种株间序列遗传距离平均为 0.0528, 最大值达到 0.1148, 可见 18S rRNA 基因序列用于原甲藻属内遗传进化的研究是较为合适的。由系统树可以看到, 现有的原甲藻种基本上存在两个大的分支。分析遗传距离可以看出两大分支之间的遗传距离较大, 如 *P. lima* 与浮游和底栖-浮游类群一支中的平均距离为 0.0912 (不包括 *P. emarginatum*)。在以前的研究中, Zardoya 等曾对原甲藻 28S rRNA 基因的部分序列进行研究, 发现 *P. lima* 与浮游物种在基因上存在着明显的不同 (Zardoya et al, 1995); McLachlan 根据这些研究结果, 结合形态分类的一些方法, 将以 *P. lima* 为代表的三种底栖原甲藻从其他原甲藻属中分离出来 (McLachlan et al, 1997)。Lopez-Rodas 用免疫化学的方法也得出 *P. lima* 等与 *P. minimum*、*P. micans* 等间关系较远的结论 (Lopez-Rodas et al, 1999)。Grzebyk 等通过对九种株原甲藻的 18S rRNA 基因序列及物种的形态特征的分析也认为, 只底栖生活的原甲藻应该作为一个新属 (Grzebyk et al, 1998)。而本研究作者从更多的序列信息上支持了将底栖原甲藻从原甲藻属中分离出来的观点。

由于海洋浮游生物物种繁多, 个体微小, 很多种间形状相似, 所以对它们的鉴定十分困难, 不利于海洋浮游生物的调查和赤潮发生时赤潮藻种的定性定量检测。而特异探针可以对其进行定性定量的检测, 这为浮游生物的检测提供了一种便捷的方法。rRNA 基因及 ITS 区序列已经成为核酸分子探针很好的靶区域 (Miller et al, 1996; Anderson et al, 1999; Tyrrellet al, 2002)。作者通过对五种株原甲藻 18S rRNA 基因序列的测定, 一方面对其序列进行分析, 探讨了我国近海常见原甲藻赤潮种间的亲缘关系, 并与 GenBank 中已有信息从更多的序列上构建了原甲藻属的分子系统进化树, 从中可了解到各个种/株在属

内的进化关系及遗传距离, 另一方面为特异探针的研制提供了重要的信息基础。

致谢 美国康涅狄格大学林森杰博士为本实验提供了部分藻种; 中国海洋大学杨官品教授对本文提出了建设性建议, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 门荣新, 杨官品, 刘永健等, 2005. 胶州湾浮游桡足类 18S 核糖体 RNA 基因扩增及序列变异初步研究. 海洋与湖沼, 36(1): 88—96
- 王金辉, 黄秀清, 2003. 具齿原甲藻的生态特征及赤潮成因浅析. 应用生态学报, 14(7): 1065—1069
- 王朝晖, 陈菊芳, 徐 宁等, 2005. 大亚湾汕头海域硅藻、甲藻的数量变动及其与环境因子的关系. 海洋与湖沼, 36(2): 186—192
- 吕颂辉, 张玉宇, 陈菊芳, 2003. 东海具齿原甲藻的扫描电子显微结构. 应用生态学报, 14(7): 1070—1072
- 齐雨藻编著, 2003. 中国沿海赤潮. 北京: 科学出版社, 19—21
- 张宝玉, 王广策, 张 炎等, 2004. 东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM) 的 5.8S rDNA 及其转录间隔区 (ITS) 的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 35(3): 264—272
- 谷 颖, 项有堂, 2002. 象山港海域富营养化与赤潮的关系. 海洋环境科学, 21(3): 67—69
- 陆斗定, 齐雨藻, Jeanette Goebel 等, 2003. 东海原甲藻修订及相关原甲藻的分类学比较. 应用生态学报, 14(7): 1060—1064
- 苟万里, 孙 军, 何闪英等, 2003. 几种角毛藻亲缘关系的分子生物学分析. 高技术通讯, 13(增刊): 68—73
- 胡晗华, 石岩峻, 丛 威等, 2003. 微小原甲藻的生长及其对锌限制的响应. 应用生态学报, 14(7): 1140—1142
- 顾海峰, 方 琦, 李瑞香等, 2004. 长江口甲藻孢囊的初步研究. 海洋与湖沼, 35(5): 413—423
- 黄贵虹, 黄伟健, 方 刚等, 2002. 大鹏湾优势藻引发赤潮的灰分析. 生态学报, 22(6): 822—827
- 董云伟, 董双林, 2004. 赤潮异弯藻和海洋原甲藻 LSU rDNA 扩增及序列分析. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 34(3): 358—364
- 辜小莲, 齐雨藻, 陈菊芳等, 2002. 大亚湾水域原甲藻调查与鉴定. 热带亚热带植物学报, 10(4): 335—339
- Anderson DM, Kulis DM, Keafer BA, 1999. Detection of the toxic Dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: variability in labeling intensity with physiological condition. J Phycol 35: 870—883
- Chen Yue-Qin, Wang Ning, Zhang Peng et al. 2002. Molecular evidence identifies bloom-forming *Prorocentrum* (Prymnesiophyta) from coastal waters of southeast China as *Prorocentrum globosa*. Biochemical Systematics and Ecology 30(1): 15—22
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783—791
- Grzebyk D, Denardou A, Berland B et al. 1997. Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. J Plankton Res 19(8): 1111—1124
- Grzebyk D, Yoshiko Saka 1998. Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequence: Morphological comparisons and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. Nov. J Phycol 34: 1055—1068
- Kinura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16: 111—120
- Levasseur M, Couture JY, Sauve G et al. 2001. Contamination of molluscs in Quebec by diarrhetic (DSP) and amnesic (ASP) phyco toxins and research into possible sources for DSP phyco toxins. Can Tech Rep Fish Aquat Sci 2350: 51
- Lopez-Rodas V, Costas E, 1999. Immunochemical characterization of morphospecies and strains of *Prorocentrum* (dinophyceae). J Exp Mar Biol Ecol 238(2): 293—308
- Mclachlan J L, Boalch G T, Jahn R, 1997. Reinstatement of the genus *Exuviaella* (Dinophyceae: Prorocentrophycidae) and an assessment of *Prorocentrum lima*. Phycologia 36: 38—46
- Miller P E, Scholin C A, 1996. Identification of cultured *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) using species-specific LSU rRNA-targeted fluorescent probes. J Phycol 32: 644—655
- Morton S L, 1994. Maximizing okadaic acid content from *Prorocentrum hoffmannianum*. Faust J Appl Phycol 6(1): 41—44
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406—425
- Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 24: 4876—4882
- Tyrrill John V, Connell Laurie B et al. 2002. Monitoring for *Heterosigma akashiwo* using a sandwich hybridization assay. Harmful Algae 1(2): 205—214
- Zaragoza R, Costas E, Lopez-Rodas V et al. 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis

CLONING AND SEQUENCES ANALYSIS OF 18S rRNA GENE OF FIVE *PROROCENTRUM* SPECIES/STRAINS

WANG Ba, MITIE-Zhu, LÜ Song-Hui, SUN Jun, LIXiu-Qin, ZHEN Yu

LI Rong-Xin, YU Zhigang

(Ocean University of China, Qingdao 266003)

(Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632)

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030)

Abstract In recent years, red tide or HAB broke out frequently in maritime China. Most HABs were caused by genus *Prorocentrum*. We carried out this molecular study aiming at revealing the phylogenesis of *Prorocentrum*, and also developing a molecular detection method to determine the HAB causer. Using gene cloning, sequencing and multiple alignment, we cloned and sequenced 18S rRNA genes in five species/strains of *Prorocentrum*. Thirteen of them can be retrieved in GenBank. After that, the phylogenetic trees of *Prorocentrum* were constructed in styles of NJ (neighbor-joining) and ME (minimum evolution). The results demonstrate that the 18S rRNA genes of five strains are 1782—1783 bp in length. The sequences of *P. minimum* from the South China Sea and American coast were identical, and *Prorocentrum* sp. separated from the East China Sea had the same 18S rRNA sequences as that of the *P. dentatum*, which is different from *P. minimum* in 5 nucleotide sites. *P. micans* had 27 different nucleotide sites from that of *P. minimum* and 28 from that of *P. dentatum*.

The phylogenetic trees in NJ and ME manners are almost identical. The 18S rRNA sequences of these *Prorocentrum* clustered in two clades. One includes *P. lima*, *P. arenarium* and others, and they are benthic type. Another clade contains *P. minimum*, *P. panamense* and others, and they are planktonic or benthic-planktonic type. All those we sequenced were within a clade. Therefore, we believed that the benthic *Prorocentrum* species should be singled out from the genus *Prorocentrum*.

Through the analysis on five strains of *P. minimum* and three strains of *P. micans*, we found that the 18S rRNA gene sequences among the same species are highly conservative.

Prorocentrum sp., which caused large HAB in the East China Sea these years, has the same 18S rRNA gene sequence to that of *P. dentatum* (CCMP 1517) and they should belong to the same species.

In sequence alignment, species-specific sequences can be found according which molecular probing technique could be developed for rapid detection of the HAB species.

Key words *Prorocentrum*, 18S rRNA gene, Phylogenetic analysis