

北部湾三角棘原甲藻(甲藻门原甲藻目)的形态观察和 18S rDNA 序列分析

龙超, 陈宪云, 陈波, 何碧娟, 高程海, 王一兵

广西科学院 广西近海海洋环境科学重点实验室, 广西 南宁 530007

摘要: 利用光学显微镜、分子生物学方法, 对分离自广西北部湾海域的三角棘原甲藻 *Prorocentrum triestinum* BBW-02 藻株的形态特征进行了描述, 并探讨了其分子系统进化关系。三角棘原甲藻 BBW-02 细胞呈长卵形或披针形, 细胞长 20~26 μm , 宽 10~14 μm , 顶刺形如矛尖, 刺丝胞孔数量较少, 排列不规则, 主要分布于壳板边缘, 距离细胞底端 1/3 处壳板两侧各有 2 个近于对称排列的刺丝胞孔。18S rDNA 序列同源检索和系统进化分析表明, 三角棘原甲藻 BBW-02 与其他地理株系的三角棘原甲藻聚为一支, 亲缘关系密切, 遗传差异仅为 0.000~0.001。与其他种类相比, 三角棘原甲藻 BBW-02 与同属中的 *P. gracile* 亲缘关系最近。

关键词: 三角棘原甲藻 *Prorocentrum triestinum*; 形态特征; 分子系统进化; 北部湾

中图分类号: P735 文献标识码: 文章编号: 1009-5470(2014)02-0066-06

Morphological and phylogenetic analysis of *Prorocentrum triestinum* isolated from the Beibu Gulf

LONG Chao, CHEN Xian-yun, CHEN Bo, HE Bi-juan, GAO Cheng-hai, WANG Yi-bing

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

Abstract: *Prorocentrum triestinum* BBW-02 strain, isolated from the Beibu Gulf of Guangxi province, was described on the basis of morphological characteristics and phylogenetic evolution relationship using light microscopy and molecular sequencing. The cells are lanceolate or heart-shaped, 20–26 μm long and 10–14 μm wide. The anterior spine is spearhead-shaped. The thichocysts of the surface are few, and mainly distribute around the margin irregularly. Two thichocysts distribute approximate symmetrically in the two-third of the theca. Homologous retrieval and system evolution analysis showed that *P. triestinum* BBW-02 was closely related to the other analysed *P. triestinum*. Compared with other species, *P. triestinum* BBW-02 had the most intimate relationship with *P. gracile*.

Key words: *Prorocentrum micans*; morphological characteristics; molecular phylogeny; Beibu Gulf

三角棘原甲藻 *Prorocentrum triestinum* 隶属于甲藻门 Pyrrophyta、双鞭甲藻纲 Dinophyceae、纵裂甲藻亚纲 Desmokontae、原甲藻目 Prorocentrales、原甲藻属 *Prorocentrum* Ehrenberg 1833(辜小莲等, 2002)³³⁵, 广泛分布于世界各地近岸海域, 在我国东海和南海均有分布(辜小莲等, 2002; Tsuji, et al, 1984; Flores-Moya, et al, 2008; Ault, 2000; 李扬, 2009)。三角棘原甲藻为广温低盐类群体, 在春季丰

度较高(李扬等, 2010)⁶²²。该种甲藻赤潮曾于 2000 年 5 月在香港水域、珠江口和长江口水域同时出现(王红霞等, 2012)¹⁵⁵, 翌年 5 月在长江口外又爆发了该种甲藻赤潮, 细胞密度高达 $0.71 \times 10^7 \sim 2.3 \times 10^7$ 个 $\cdot \text{m}^{-3}$ (李道季等, 2002); 2007 年春季, 在南麂列岛海域的 9 个调查站位中发现三角棘原甲藻赤潮, 其细胞数量均在 10^5 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 以上(李扬等, 2010)⁶²²。该种赤潮的发生可消耗海水中大量溶解氧, 对水产养

收稿日期: 2013-03-04; 修订日期: 2013-04-25。孙淑杰编辑

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、2011GXNSFE018002)

作者简介: 龙超(1984~), 男, 湖北省黄冈市人, 实习研究员, 研究方向为海洋生物学。E-mail: Clongflying@163.com

殖业的影响不容忽视。

目前,有关三角棘原甲藻的报道主要以分类学研究为主,尤其是形态学研究。Dodge(1965)于1965 年对分离于英国普利茅斯海域的三角棘原甲藻进行了简单的描述;Hernández-Becerril 等(2000)于 2000 年利用电子显微镜技术对采自于墨西哥附近海域的三角棘原甲藻的形态特征、板孔数量及排列方式进行了描述;Lu 等(2001)³⁴¹⁻³⁴²于 2001 年通过电子显微镜对分离于东海的 5 种原甲藻属甲藻进行了形态学观察,其中简单地描述了三角棘原甲藻的形态特征。上述研究均为形态学鉴定,并未通过分子生物学方法加以证明。王红霞等(2012)于 2012 年利用形态学和核糖体基因 ITS 序列对采自于东海的三角棘原甲藻进行了鉴定。该研究中,作者在原甲藻 ITS 序列的选择上存在一定的主观性,用于建树的序列较少,对三角棘原甲藻东海株系统进化关系的确定影响较大。由于三角棘原甲藻形态多变,在鉴定上有一定难度,本文试图利用甲片染色方法对采自于广西北部湾的三角棘原甲藻 BBW-02 的形态特征进行详细的描述,并通过 GenBank 数据库,尽可能多地搜集原甲藻属甲藻的 18S rDNA 序列信息,构建系统进化树,明确三角棘原甲藻 BBW-02 的系统进化地位,以期为该藻的准确鉴定提供科学依据,从而提高对赤潮藻监测和预警的科学性。

1 材料与方法

1.1 藻种分离与培养

海水样品于 2012 年 3 月采集于防城港企沙海域。在实验室采用逐级稀释法并结合毛细管分离法,获得三角棘原甲藻纯系,编号为 BBW-02。实验藻种在 f/2 培养液中培养,光暗比为 12 h : 12 h,光照强度为 3000~4000lx,培养温度为 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$,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

取指数期三角棘原甲藻细胞,用 2% 戊二醛固定,在尼康 T-100 型光学显微镜下观察并测量细胞大小,利用 $\text{I}_2\text{-KI}$ -水合氯醛染色液对海洋原甲藻甲片染色(钱峰 等, 1995),并拍照。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增

基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法(Rogers, et al, 1988)。18S rDNA 基因片段用 18ScomFI(5'-GCTTG TCTCA AAGATTAAGCCATGC-3')和 18ScomRI(5'-CACCTACGGAAACCTTGTTACGAC-3')引物进行扩增,PCR 反应程序为: 94°C 3min, 94°C 20s, 50°C

30s , 72°C 40s 循环 30 次, 72°C 7min, 15°C 保持。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 Blast 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(NJ)建立系统进化树。所用比对序列来源如表 1 所示。

2 结果与分析

2.1 三角棘原甲藻的形态特征

从图 1 可见,细胞呈长卵形或披针形,前端较圆,中部最宽,后端逐渐变尖。细胞长 $20\sim 26\mu\text{m}$,宽 $10\sim 14\mu\text{m}$,由左右两壳板组成,壳板向外突出,如凸透镜,顶刺与副刺着生于左壳板顶端。顶刺形如矛尖,具翼,长约 $4\mu\text{m}$,副刺较短。细胞壳板一侧较平直,另一侧呈弧形向外突出。细胞壳面平滑,仅有少量刺丝胞孔,至少有 8 个。距离细胞底端 $1/3$ 处,壳板两侧各有 2 个近于对称排列的刺丝胞孔,其余刺丝胞孔沿壳板边缘排布。不同地理株系三角棘原甲藻的形态特征详见表 2。

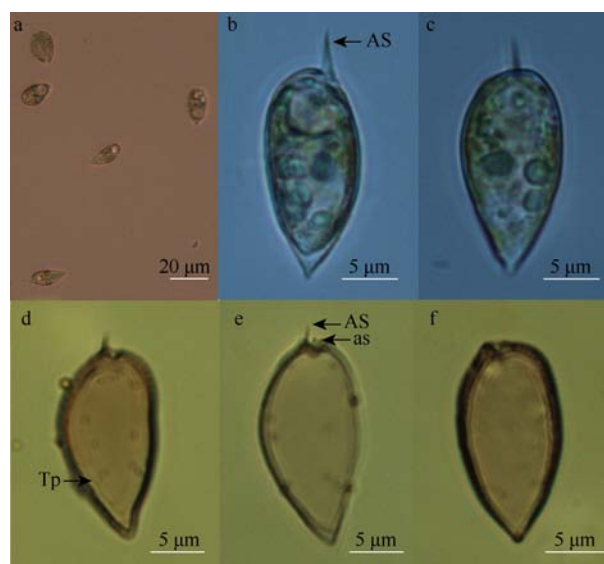


图 1 三角棘原甲藻 BBW-02 形态特征

a. 个体细胞形态; b. 壳面观; c. 侧面观; d. 左壳板,显示刺丝胞孔; e. 左壳板,顶刺和副刺; f. 右壳板。AS: 顶刺; as: 副刺; Tp: 刺丝胞孔
Fig. 1 The morphological characteristics of *Prorocentrum triestinum* BBW-02 strain. (a) Group of *P. triestinum*; (b) valve view; (c) side view; (d) left valve, showing trichocyst pores (arrow); (e) left valve, apical spine and ancillary spine (arrows); and (f) right valve. AS: Apical spine; as: Ancillary spine; Tp: Trichocyst pore

2.2 三角棘原甲藻系统进化分析

2.2.1 序列分析

三角棘原甲藻 BBW-02 测序所得 18S rDNA 序

表 1 基于 18S rDNA 序列进行的系统发育分析中所用藻种来源
Tab. 1 Origin of materials for the18S rDNA sequences used in the phylogenetic analysis

种名	登录号	株系	来源
三角棘原甲藻 <i>Prorocentrum triestinum</i>	—	BBW-02	广西北部湾
	AB183673	MBIC11147	—
	DQ004734	PtriC	中国南海
	EF492512	UTEX1657	—
纤细原甲藻 <i>Prorocentrum gracile</i>	AY443019	CCCM 765	美国华盛顿普吉特海湾
慢原甲藻 <i>Prorocentrum rhathymum</i>	EU287487	S7	美国佛罗里达州
墨西哥原甲藻 <i>Prorocentrum mexicanum</i>	EU287485	CCMP687	美国佛罗里达州
海洋原甲藻 <i>Prorocentrum micans</i>	EU780638	CCMP1589	奈特甘石特海湾
	AY585526	CCMP1589	西布斯贝港
<i>Prorocentrum tsawwassenense</i>	EF657885	—	不列颠哥伦比亚边界海湾
微小原甲藻 <i>Prorocentrum minimum</i>	AY803740	1	中国南海
	AY421791	PmiPrMu21	韩国沿海
东海原甲藻 <i>Prorocentrum donghaiense</i>	DQ336054	—	中国东海
具齿原甲藻 <i>Prorocentrum dentatum</i>	DQ336057	CCMP1517	南太平洋
<i>Prorocentrum arenarium</i>	Y16234	PMAYD1	印度洋
<i>Prorocentrum bimaculatum</i>	HQ890882	IFR10-166	阿拉伯湾
<i>Prorocentrum concavum</i>	Y16237	PPAN04	太平洋沿海巴拿马海湾
<i>Prorocentrum consutum</i>	HQ890884	IFR10-096	阿拉伯湾
<i>Prorocentrum glenanicum</i>	GU327679	IFR1080	南布列塔尼
<i>Prorocentrum levis</i>	FJ489617	VGO880	—
利玛原甲藻 <i>Prorocentrum lima</i>	Y16235	#151	日本太平洋沿海
<i>Prorocentrum maculosum</i>	Y16236	PPAN20	巴拿马孔塔多拉岛
<i>Prorocentrum panamensis</i>	Y16233	PPAN06	巴拿马孔塔多拉岛
<i>Prorocentrum pseudopanamense</i>	GU327677	IFR709	南布列塔尼
夜光藻 <i>Noctiluca scintillans</i>	AF022200	—	—

注：“—”表示缺失信息。

表 2 不同地理株系三角棘原甲藻的形态特征
Tab. 2 The morphological characters of different geographical *P. triestinum*

藻种来源	形状	长/μm	宽/μm	顶刺/μm	刺丝胞孔	文献来源
北部湾	披针形或长卵形	20~26	10~14	约 4	刺丝胞孔主要分布于壳板边缘, 距离细胞底端 1/3 处, 壳板两侧各有 2 个近于对称排列的刺丝胞孔	本研究
大亚湾	长亚梨形	25~35	10~15	约 5	少量呈不规则排列的刺丝胞孔	辜小莲 等, 2002
东海	长卵形或披针形	19~25	11~16	—	刺丝胞孔稀疏而不规则地分布于壳板边缘, 底端刺丝胞孔分布较多	王红霞 等, 2012
东海	前端圆后端尖	15~22	7~12	—	刺丝胞孔主要分布在壳板边缘	Lu, et al, 2001
日本相模湾	—	15~22	7~12	—	刺丝胞孔排列不规则	Toriumi, et al, 1980
墨西哥马萨特兰	披针形或心形	19~24	9~14	—	刺丝胞孔分布于壳板边缘	Hernández-Becerril, et al, 2000

注：“—”表示原文未提及该信息。

列长度为 1666bp, 其中 GC 含量为 46.3%。经 Blast 同源检索比对后发现, 三角棘原甲藻 BBW-02 与三角棘原甲藻 (AB183673) 和三角棘原甲藻 (DQ004734) 仅有 1 个碱基缺失位点的差异, 相似性最高, 为 99.94%; 与三角棘原甲藻 (EF492512) 和纤细原甲藻 (AY443019) 相差 2 个碱基, 相似性为 99.88%; 与慢原甲藻、墨西哥原甲藻、海洋原甲藻、纤细原甲藻、东海原甲藻和 *P. tsawwassenense* 的相似性均高于 99.00%, 但相对差异较大。

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 (ME) 和最大简约法 (MP) 构建系统发育树, 所得结果基本一致。因此本文只显示用邻接法构建的系统进化树 (图 2)。三角棘原甲藻 BBW-02 与三角棘原甲藻 (DQ004734) 聚成一支, 支持率为 63%, 并与三角棘原甲藻 (AB183673) 聚为一簇, 连同三角棘原甲藻 (EF492512) 和纤细原甲藻 (AY443019) 聚成一大支, 支持率为 97%。此外,

海洋原甲藻、慢原甲藻和墨西哥原甲藻聚成一支，并与 *P. tsawwassenense* 组成一大支，该进化支与三角棘原甲藻较为密切。

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。结果表明，三角棘原甲藻 BBW-02 与三角棘原甲藻(DQ004734)

和三角棘原甲藻(AB183673)的遗传差异最小，均为 0.000，与三角棘原甲藻(EF492512)和纤细原甲藻(AY443019)的遗传差异为 0.001，与慢原甲藻的遗传差异为 0.006，与墨西哥原甲藻和海洋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，与外群种夜光藻的遗传差异最大，为 0.105。

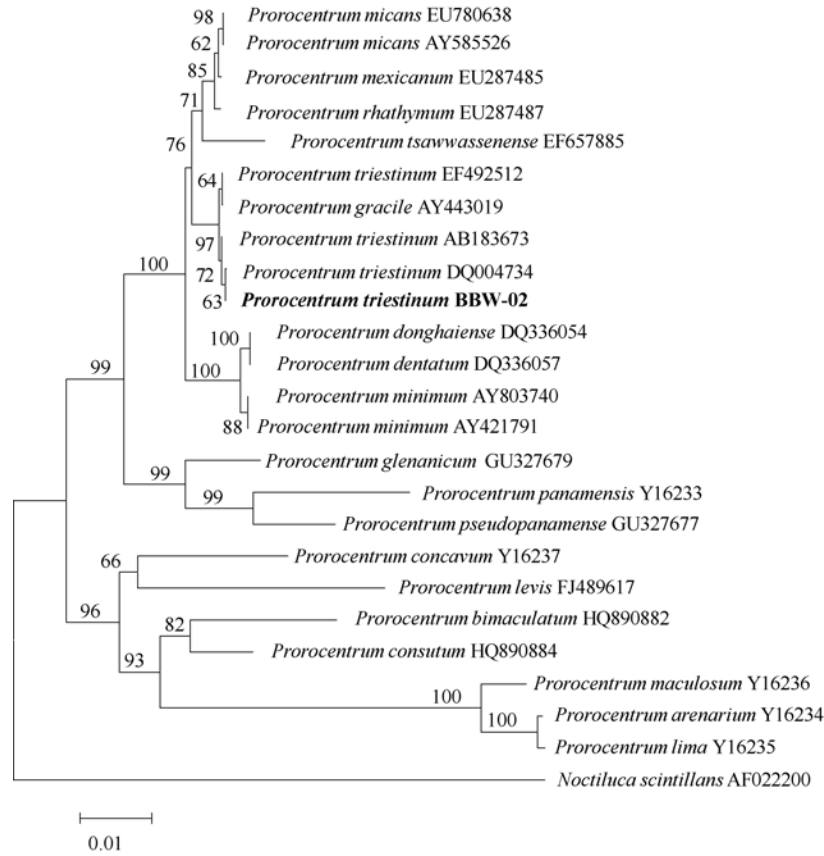


图 2 *Noctiluca scintillans* AF022200 由 NJ 法构建的系统树(夜光藻为外类群)

Fig. 2 Phylogenetic tree of 18S rRNA gene sequences constructed in NJ manner. *N. scintillans* was used as outgroup member

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

Tab. 3 Jukes-Cantor corrected distance based on 18S rDNA sequences of part of the related *Prorocentrum*

	<i>P. triestinum</i> BBW-02	<i>P. triestinum</i> (AB183673)	<i>P. triestinum</i> (DQ004734)	<i>P. triestinum</i> (EF492512)	<i>P. gracile</i> (AY443019)	<i>P. rhathymum</i> (EU287487)	<i>P. mexicanum</i> (EU287485)	<i>P. micans</i> (EU780638)	<i>P. micans</i> (AY585526)
<i>P. triestinum</i> BBW-02									
<i>P. triestinum</i> (AB183673)	0.000								
<i>P. triestinum</i> (DQ004734)	0.000	0.001							
<i>P. triestinum</i> (EF492512)	0.001	0.001	0.001						
<i>P. gracile</i> (AY443019)	0.001	0.001	0.001	0.000					
<i>P. rhathymum</i> (EU287487)	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006				
<i>P. mexicanum</i> (EU287485)	0.007	0.006	0.007	0.006	0.006	0.002			
<i>P. micans</i> (EU780638)	0.007	0.006	0.007	0.006	0.006	0.002	0.001		
<i>P. micans</i> (AY585526)	0.007	0.006	0.007	0.006	0.006	0.002	0.001	0.000	

表明不同地理株系的三角棘原甲藻 18S rDNA 序列变异率很低, 且与纤细原甲藻在系统进化上具有密切的亲缘关系。

3 讨论

三角棘原甲藻 Schiller 1918 与 *Prorocentrum redfeldii* Bursa 1959 和 *Prorocentrum pyrenoideum* Bursa 1959 为同种异名(Toriumi, et al, 1980), 与 Hada 描述的采自于日本濑户内海的 *Prorocentrum setouti* Hada 和 *Prorocentrum shikokuensis* Hada 为同一物种(Dodge, 1975)。在我国报道中出现的三角棘原甲藻、尖叶原甲藻、三叶原甲藻实为同一种类, 对应同一个拉丁名。三角棘原甲藻形态多变, 外形与海洋原甲藻相似, 但细胞较小, 底端尖削, 壳板表面光滑, 刺丝胞孔稀疏, 排列不规则, 且主要分布于壳板边缘。

研究者对三角棘原甲藻的形态描述不尽相同。Lu 等(2001)³⁴¹⁻³⁴² 将其概括为前端圆后端尖, 实际上很多原甲藻都符合这一特征, 而自然海水中大多数三角棘原甲藻的形态还是以披针形为主, 尖叶状, 仅有少量细胞呈长卵形。不同地理株系的三角棘原甲藻细胞大小也存在差异。研究表明, 三角棘原甲藻大亚湾株的细胞长度为 25~35 μm , 其范围大大超出了其他地理株系, 而辜小莲等(2002)³³⁶⁻³³⁷ 对其形态的描述极为简单, 仅概括为“与海洋原甲藻相似, 细胞略显细长”, 有关壳板及刺丝胞孔的描述也是引用自 Hernández-Becerril 等(2000)的研究。该种是否为三角棘原甲藻, 值得怀疑, 还需做进一步鉴定。本研究中三角棘原甲藻 BBW-02 与其他地理株系的三角棘原甲藻的细胞大小范围基本一致, 而 Lu 研究的东海株和 Saburo 研究的日本相模湾株的细胞整体略小, 这可能与地理和生存环境的差异有关(王红霞等, 2012; Lu, et al, 2001; Toriumi, et al, 1980;

Hernández-Becerril, et al, 2000)。此外, 壳板上刺丝胞孔的数量和排列方式是原甲藻种间差异的重要特征。三角棘原甲藻不同于海洋原甲藻、慢原甲藻、纤细原甲藻等其他原甲藻, 其刺丝胞孔的数量较少, 排列也不规则, 主要分布于壳板边缘。本研究发现, 距离三角棘原甲藻细胞底端 1/3 处壳板两侧各有 2 个近于对称排列的刺丝胞孔, 这一特征可区别于其他种类。

18S rDNA 序列广泛应用于不同生物种类之间的系统进化分析, 常常作为生物种类鉴定的依据(陈月琴 等, 2002; Grzebyk, et al, 1998; 韩笑天 等, 2006)。Anderson 等(1998)曾利用 18S rDNA 序列和 28S rDNA 序列分析不同种类亚历山大藻的碱基差异, 提出核糖体 DNA 可用于亚历山大藻种类鉴定的观点。罗立明等(2006)发现, 东海原甲藻与从 CCMP 引进的具齿原甲藻在 18S rDNA 序列中有 4 个碱基的差异, 两者碱基差异值仅为 0.000, 而与其他种的碱基差异为 0.002~0.116; 结合 ITS 序列分析, 得出东海原甲藻与 CCMP 具齿原甲藻应为同一物种。本研究 18S rDNA 序列分析显示, 三角棘原甲藻 BBW-02 与纤细原甲藻(AY443019)有 2 个碱基的差异, 遗传差异仅为 0.001, 理论上属于种内差异, 应为同一物种。纤细原甲藻(AY443019)藻种来源于加拿大微生物培养中心(CCCM), 自然水体中纤细原甲藻的大小约为三角棘原甲藻的 2 倍, 且顶刺、胞孔类型与分布等其他特征也存在明显差异, Saldarriaga 等从形态上将二者混淆的可能性不大(Saldarriaga, et al, 2004)。由此可见, 18S rDNA 序列到底能不能用于生物种类的鉴定值得思考。18S rDNA 序列比较保守, 进化速率相对较慢, 种间差异往往较小, 甚至有种内差异大于种间差异的情况出现。尽管如此, 18S rDNA 序列分析仍然是确定物种进化关系使用频率最高的分子生物学方法。

参考文献

- 陈月琴, 王宁, 周惠, 等. 2002. 棕囊藻赤潮原因种的分子鉴定和起源分析[J]. 海洋学报, 24(6): 99-103.
- 辜小莲, 齐雨藻, 陈菊芳, 等. 2002. 大亚湾水域原甲藻调查与鉴定[J]. 热带亚热带植物学报, 10(4): 335-339.
- 韩笑天, 郑立, 俞志明, 等. 2006. 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, 16(8): 864-869.
- 李道季, 曹勇, 张经. 2002. 长江口尖叶原甲藻赤潮消亡期叶绿素连续观测[J]. 中国环境科学, 22(5): 400-403.
- 李扬, 吕颂辉, 江天久, 等. 2009. 南麂列岛海域原甲藻种群动态及其环境影响因子分析[J]. 水生生物学报, 33(2): 236-245.
- 李扬, 李欢, 吕颂辉, 等. 2010. 南麂列岛海洋自然保护区浮游植物的种类多样性及其生态分布[J]. 水生生物学报, 34(3): 618-628.
- 罗立明, 胡鸿钧, 李夜光, 等. 2006. 东海原甲藻的分子鉴定[J]. 海洋学报, 28(1): 127-131.
- 钱峰, 齐雨藻, 朱从举. 1995. 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, 16(1): 127-130.

- 王红霞, 陆斗定, 何飘霞. 2012. 东海三叶原甲藻(*Prorocentrum triestinum*) 的形态特征及其 ITS 序列分析[J]. 海洋学报, 34(4): 155–162.
- ANDERSON D M, CEMBELLA A D, HALLEGRAEFF G M. 1998. Physiological ecology of harmful algal blooms[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 337–349.
- AULT T R. 2000. Vertical migration by the marine dinoflagellate *Prorocentrum triestinum* maximises photosynthetic yield[J]. *Oecologia*, 125(4): 466–475.
- DODGE J D. 1965. Thecal fine-structure in the dinoflagellate genera *Prorocentrum* and *Exuviaella*[J]. *J Mar Biol Ass U K*, 45: 607–614.
- DODGE J D. 1975. The proro-centrales (dinophyceae). . Revision of the taxonomy within the genus *prorocentrum*[J]. *Bot J Linnean Soc*, 71(2): 103–125.
- FLORES-MOYA A, COSTAS E, LÓPEZ-RODAS V. 2008. Roles of adaptation, chance and history in the evolution of the dinoflagellate *Prorocentrum triestinum*[J]. *Naturwissenschaften*, 95(8): 697–703.
- GRZEBYK D, YOSHIHIKO S. 1998. Phylogenetic analysis of nine species of (dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequence, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. [J]. *J Phycol*, 34(6): 1055–1068.
- HERÁNDEZ-BECERRIL D U, CORTES-ALTAMIRANO R, ALONSO R. 2000. The dinoflagellate genus *Prorocentrum* along the coast of the Mexican Pacific[J]. *Hidrobiologia*, 418(1): 111–121.
- LU DOU DING, GOEBEL J. 2001. Five red tide species in genus *Prorocentrum* including the description of *Prorocentrum donghaiense* Lu sp. nov. from the East China sea[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 19(4): 337–344.
- ROGERS O S, BENDICH A J. 1988. Extraction of DNA from plant tissue[J]. *Plant Mol Biol Manual*, A6: 1–10.
- SALDARRIAGA J F, TAYLOR F J R, CAVALIER-SMITH T, et al. 2004. Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates[J]. *European Journal of Protistology*, 40(8): 85–111.
- TORIUMI S. 1980. *Prorocentrum* species (dinophyceae) causing red tide in Japanese coastal waters[J]. *Bull Plankton Soc Japan*, 27(2): 105–112.
- TSUJI T, NISHIKAWA T. 1984. Automated identification of red tide phytoplankton *Prorocentrum triestinum* in coastal areas by image analysis[J]. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 40(6): 425–431.