

日本沿岸海域における無殻渦鞭毛藻 *Gymnodinium microreticulatum* の 初報告

岩滝光儀¹・川見寿枝²・高山晴義³・吉田天士⁴・広石伸互⁴・松山幸彦⁵・Juan R. Relox Jr.⁶・松岡數充¹

¹長崎大学環東シナ海洋環境資源研究センター (〒 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14)

²長崎大学大学院生産科学研究科 (〒 852-8521 長崎県長崎市文教町 1-14)

³広島県立水産海洋技術センター (〒 737-1207 広島県呉市音戸町波多見 6-21-1)

⁴福井県立大学生物資源学部 (〒 917-0003 福井県小浜市学園町 1-1)

⁵水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所 (〒 739-0452 広島県廿日市市丸石 2-17-5)

⁶フィリピン漁業水産資源局 (860 Arcadia Bldg., Quezon Avenue, Quezon City 1100, Philippines)

Mitsunori Iwataki¹, Hisae Kawami², Haruyoshi Takayama³, Takashi Yoshida⁴, Shingo Hiroishi⁴, Yukihiko Matsuyama⁵, Juan R. Relox Jr.⁶ and Kazumi Matsuoka¹: First report of *Gymnodinium microreticulatum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in Japanese coastal waters. Jpn. J. Phycol. (Sôrui) 54: 77-83, July 10, 2006

Motile cells of unarmored dinoflagellates *Gymnodinium microreticulatum* and *Gymnodinium cf. nolleri* collected from Japanese coastal waters were observed and identified by using LM, SEM and molecular phylogeny based on SSU and partial LSU rDNAs. Cell of *G. microreticulatum* has a nucleus located in the anterior part, and chloroplasts located peripherally and aligned parallel in the longitudinal axis. *Gymnodinium cf. nolleri* exhibits normal gymnodinoid characteristics, e.g. the cingulum surrounds the middle part of the cell, and reticulate chloroplasts situated in the periphery. Both species possess a horseshoe-shaped apical groove. In phylogenetic trees constructed based on SSU rDNA and partial LSU rDNA, both species showed the affinity to *Gymnodinium catenatum* and formed a monophyletic clade. Especially the partial LSU sequences, *G. microreticulatum* were almost identical to those of samples used for the original descriptions. However, *Gymnodinium cf. nolleri* branched with *G. microreticulatum* rather than *G. nolleri*. This is the first report of these two species in Japanese coastal waters. *G. catenatum*, *G. microreticulatum* and *G. nolleri* are known to form microreticulate cysts. Since the superficial structure of the cyst was characteristic compared to other dinoflagellate cyst, presences of microreticulate cyst have so far been used for distribution studies of a paralytic shellfish poisoning causative species, *G. catenatum*. Two putative microreticulate cyst-forming dinoflagellates are found also in coastal Japan, therefore, comparison to these species should be required for cyst identification of *G. catenatum*.

Key Index Words: cyst, dinoflagellate, Dinophyceae, Gymnodinium, *G. catenatum*, *G. microreticulatum*, *G. nolleri*

¹Institute for East China Sea Research, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo, Nagasaki, 852-8521 Japan

²Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo, Nagasaki, 852-8521 Japan

³Hiroshima Prefectural Fisheries and Marine Technology Center, 6-21-1 Hatami, Ondo-cho, Kure, Hiroshima, 737-1207 Japan

⁴Faculty of Biotechnology, Fukui Prefectural University, 1-1 Gakuen, Obama, Fukui, 917-0003 Japan

⁵National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima, 739-0452 Japan

⁶Bureau of Fisheries and Aquatic Resources, 860 Arcadia Bldg., Quezon Avenue, Quezon City 1100, Philippines

渦鞭毛藻類の一部の種は、生活環の中で遊泳細胞とは形態の異なる休眠細胞(シスト)を形成することが知られている。渦鞭毛藻シストは、輪郭や色の違いに加え外被構造として様々な形状の刺や突起をもち、これらの形状は多くの場合種特異的である(Matsuoka & Fukuyo 2000)。無殻渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* Graham は麻痺性貝毒原因種として知られ、球形で表面に網目模様をもつ特徴的なシストの形状が同種より初めて報告された(Anderson *et al.* 1988)。その後、同種の分布はシストの存在によっても議論されてきた(e.g. Matsuoka & Fukuyo 1994)。しかし近年、形態的に *G. catenatum* に類似したシストを形成する *Gymnodinium* 属

2種が確認され、それぞれ *Gymnodinium nolleri* Ellegaard et Moestrup と *Gymnodinium microreticulatum* Bolch et Hallegraeff として、デンマークとオーストラリアより記載された(Bolch *et al.* 1999, Ellegaard & Moestrup 1999)。これら2種の遊泳細胞は、大きさや核の位置、さらに連鎖群体を形成しない等の形態形質により *G. catenatum* と明確に識別することができる。しかし、これら3種のシストは共に球形で表面に網目模様をもつなど形状が酷似しているが、シストの細胞直径(*G. catenatum* は 36-62 μm , *G. nolleri* は 25-40 μm , そして *G. microreticulatum* は 17-29 μm 程度)や、そして偽横溝中の網目の列数における種間

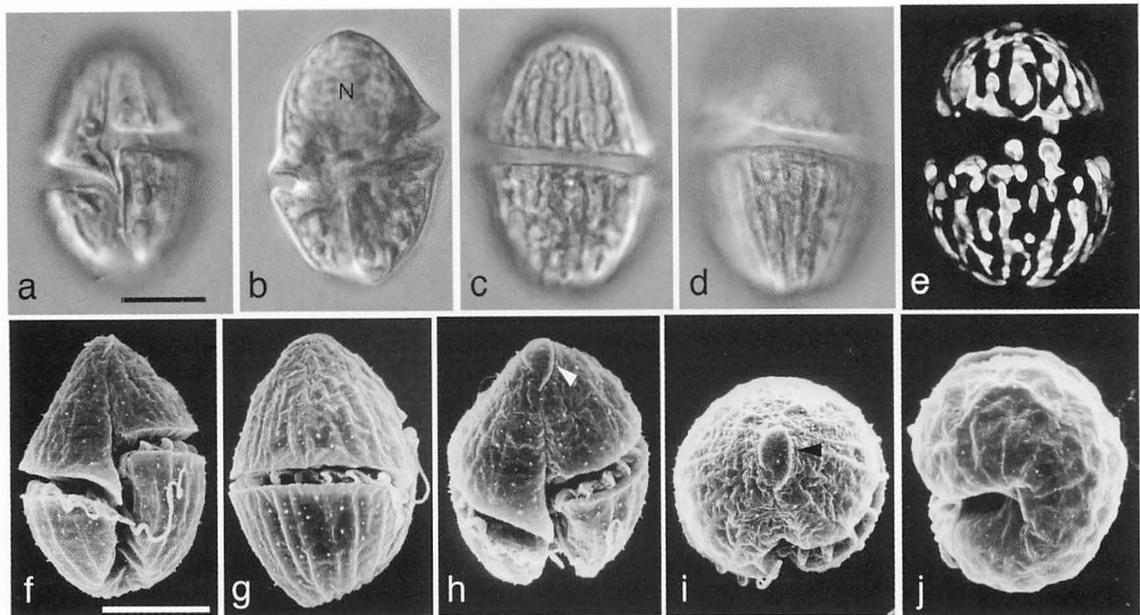


Fig. 1. Motile cells of *Gymnodinium microreticulatum*, LM (a-e) and SEM (f-j). (a) Ventral view showing the end of cingulum descends and the sulcus elongates into the epicone. (b) Deeper focus of a cell revealing a spherical nucleus located in the epicone. (c and d) Dorsal view showing chloroplasts align in the longitudinal direction. (e) Alignment of chloroplasts under a confocal microscope. (f) Ventral view. (g) Dorsal view showing longitudinal furrows. (h and i) Apico-ventral and apical views, note the horseshoe shaped apical groove surrounding the apex. (j) Antapical view. N, nucleus; arrowhead, apical groove. Scale bars: 10 μ m.

の違いが指摘されている (Bolch & Reynolds 2002)。しかし、シスト径の範囲は種間で重複するために同定は非常に困難となっている。また、このようなシストの形態的類似により、*G. microreticulatum* と *G. nolleri* の記載報告以前の *G. catenatum* のシスト分布調査にはこれら 2 別種が含まれている可能性もあるため、これら 3 種を識別したシスト分布の再調査が行われている (Bolch & Reynolds 2002)。現在までの形態情報をもとに *G. nolleri* は模式産地であるデンマークの他にスウェーデン、ドイツ、イタリア、ナミビア、モロッコ、ソマリア、イエメン、パキスタン (Nehring 1994, 1995, 1997, Zonneveld 1997, Montresor *et al.* 1998, Ellegaard & Moestrup 1999, Persson *et al.* 2000, Zonneveld *et al.* 2001)、そして *G. microreticulatum* は模式産地のあるオーストラリアの他にウルグアイ、中国、ポルトガル (Qi *et al.* 1996, Amorim & Dale 1998, Bravo & Ramillo 1999, Amorim *et al.* 2001) に分布することが確認されてきた (Bolch & Reynolds 2002)。本邦沿岸域においては、麻痺性貝毒原因種 *G. catenatum* の遊泳細胞とシストの出現は数多く報告されているが、*G. nolleri* と *G. microreticulatum* の報告はまだない。しかし、球形で網目模様のシストでも比較的小型のものが報告されているため (Matsuoka & Lee 1994)、*G. microreticulatum* もしくは *G. nolleri* が日本にも生存している可能性が指摘されていた (Bolch & Reynolds 2002)。本研究では *G. catenatum* に類似する無殻渦鞭毛藻類の再調査を、特に同種の出現報告の多い西日本沿岸域を中心に行った。光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡を用いた形態観

察に加え、LSU rRNA 遺伝子 (rDNA) の部分配列と SSU rDNA を用いた分子系統解析により種同定を行った結果、*G. microreticulatum* の出現を福井県小浜湾と長崎県佐世保湾より、そして *G. nolleri* 類似種の遊泳細胞を広島湾より確認したので報告する。

材料と方法

観察に供した *Gymnodinium* 属藻類は、1999 年に広島県広島湾、2000 年 9 月に福井県小浜湾、2002 年 8 月に長崎県佐世保湾の海水試料より採集し、単藻培養株を確立した。*Gymnodinium catenatum* の培養株は、2003 年 10 月にマニラ湾 (フィリピン) で採集された。培養株は ESM 培地 (Watanabe *et al.* 2000) を用いて維持している。細胞形態は光学顕微鏡 (Olympus BX51)、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM510 META)、走査型電子顕微鏡 (Hitachi S-800) で観察した。走査電顕用試料は、2% のオスミウム酸で固定後にエタノール系列で脱水し、さらに酢酸イソアミルに置換した後に、臨界点乾燥機 (Hitachi HCP-2) を用いて乾燥した。試料は金パラジウム蒸着後に観察した。

分子系統解析に用いる DNA 塩基配列を決定するため、SepaGene (三光純薬社) を用いて total DNA を抽出・精製した。SSU rDNA を増幅するためのプライマーには SR-1 と SR-12、そして LSU rDNA の D1-D2 領域を増幅するために、DIR と 28-1483R を用いた (Scholin *et al.* 1994, Nakayama *et al.* 1996, Daugbjerg *et al.* 2000)。それぞれの配列を増幅させる PCR 反応は、0.2 ml PCR チューブで

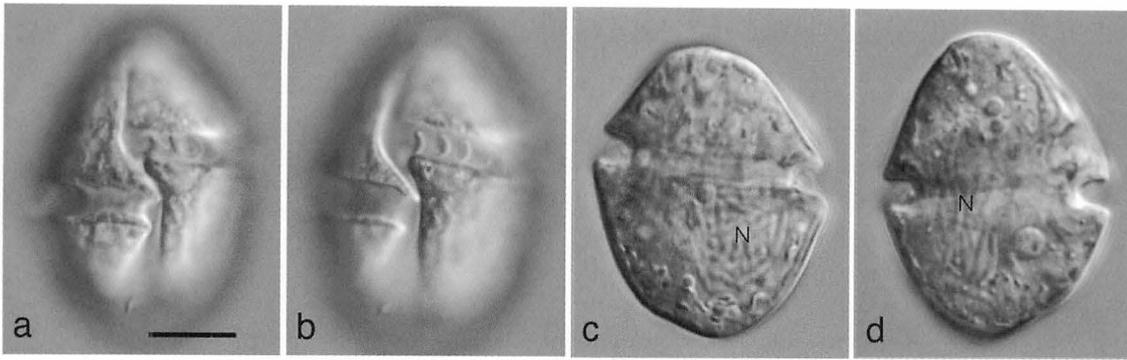


Fig. 2. Motile cells of *Gymnodinium* cf. *nolleri*, LM. (a and b) Ventral views, showing the end of cingulum curves downward and the sulcus invades into the epicone. (c and d) Dorsal and lateral views in deeper foci revealing an ellipsoidal nucleus situated in the dorsal side. N, nucleus. Scale bar: 10 μ m.

KOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて全 20 μ l で行った。増幅は 95°C で 10 分間熱変性させた後に 95°C 1 分, 55°C 1 分, 72°C 3 分の反応を 35 サイクル行い, 最終的に 72°C で 10 分間伸張させた。これらの PCR 反応は Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer) を用いて行った。試料の 2 μ l を抽出し, アガロースゲル電気泳動により増幅を確認した。増幅を確認した PCR 産物をスピнкаラム (Microcon100, Millipore) で精製し, 増幅に用いたプライマーを除去した。BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), SSU rDNA と (Nakayama *et al.* 1996, Takano & Horiguchi 2004), LSU rDNA の D1-D2 の配列を決定する中間プライマー (Hansen 2000) を用いてサイクルシーケンシングを行い, 精製した後に DNA シークエンサー ABI PRISM 377 DNA Sequencer を用いて配列を決定した。

決定した DNA 塩基配列に既に公開されている渦鞭毛藻類の配列を加え, 近隣結合法 (NJ 法) と最尤法 (ML 法) により PAUP*4.0 を用いて系統樹を作製した。塩基配列は clustal x (Thompson *et al.* 1997) を用いて相同な部位を並べ, さらに The European Ribosomal RNA Database (<http://oberon.fvms.ugent.be:8080/rRNA/index.html>) に公開されている rRNA の二次構造を参照してアライメントを修正した。SSU rDNA と LSU rDNA の配列は, ModelTest 3.04 (Posada & Crandall 1998) を用いて適した進化モデルを選択し, NJ 法と ML 法による系統樹は共に Γ 補正して作製した。選択されたモデルは, SSU rDNA と LSU rDNA の部分配列は共に TrN (Tamura & Nei 1993) + I + G となり, SSU rDNA では I = 0.6562, G = 0.6438, そして LSU rDNA では I = 0.2164, G = 0.7521, となった。ブートストラップ値も同様の設定を用いてそれぞれ 1000 回反復計算し, 分岐に示した。

結果

小浜湾産・佐世保湾産 *Gymnodinium* の遊泳細胞は典型的な無殻種の形態をしており, 上錐と下錐はほぼ同じ大きさ

で, 細胞長 22.5-31.5 μ m, 幅 14.0-24.0 μ m である (Fig. 1)。横溝の段差は横溝の 1.5-2 倍程度で, 横溝は細胞後方に曲がりながら縦溝と接するため, 上錐右側が縦溝後方に向かって細く入り込む (Fig. 1a)。縦溝は横溝と比べて狭く, 細胞後端に達する付近で幅は広くなる。また, 縦溝は上錐にも深く入り込み, やや左に曲がり上錐溝とは接しない。上錐溝は左巻きの馬蹄形で, 典型的な *Gymnodinium* 属のそれと同様である (Fig. 1h, i)。核は球形で上錐中に位置する (Fig. 1b)。葉緑体は細胞の中心付近より放射状に伸び, 細胞膜付近では細胞長軸に沿って平行に伸びる (Fig. 1b-e)。この葉緑体の構造と同様に, 細胞表面も波打っており, この特徴は特に下錐に置いて顕著である (Fig. 1g, j)。細胞は連鎖群体を形成しない。これらの特徴は小浜湾産と佐世保湾産の株で共通する。培養株中でシストの形成は観察されなかった。

広島湾産 *Gymnodinium* の遊泳細胞は, 長さ 28.5-47.0 μ m, 幅 17.0-33.0 μ m で, 前述した *G. microreticulatum* と比較するとやや大きい (Fig. 2)。上錐と下錐は等しいか下錐が大きく, 上錐は円錐形, 下錐は半球形である (Fig. 2a)。上錐の右側下部がやや尖っており, 縦溝に向けて入り込む (Fig. 2b)。上錐溝は馬蹄形である。葉緑体は細胞膜に沿って網目状に配置する。核は細胞長軸方向に細長く伸び, 背面に位置する (Fig. 2c, d)。連鎖群体は形成しない。培養株中にはシスト形成を確認していない。

小浜湾産・佐世保湾産・広島湾産 *Gymnodinium* とフィリピン産 *G. catenatum* それぞれについて, SSU rDNA 全塩基配列と LSU rDNA の部分配列 (D1-D2 領域) を決定した (accession numbers = AB265962-AB265969)。SSU rDNA による系統樹を Fig. 3, LSU rDNA の部分配列による系統樹を Fig. 4, そして LSU rDNA による供試株と類縁種の遺伝的距離を Table 1 に示す。それぞれの遺伝子種について Γ 補正により重みづけした NJ 法と ML 法で系統樹を構築したが, 供試株を含む狭義の *Gymnodinium* 属 (*Akashiwo* 属, *Karenia* 属, *Karlodinium* 属を含まない, *Gymnodinium* F. Stein emend. G. Hansen et Moestrup ex Daugbjerg *et al.*

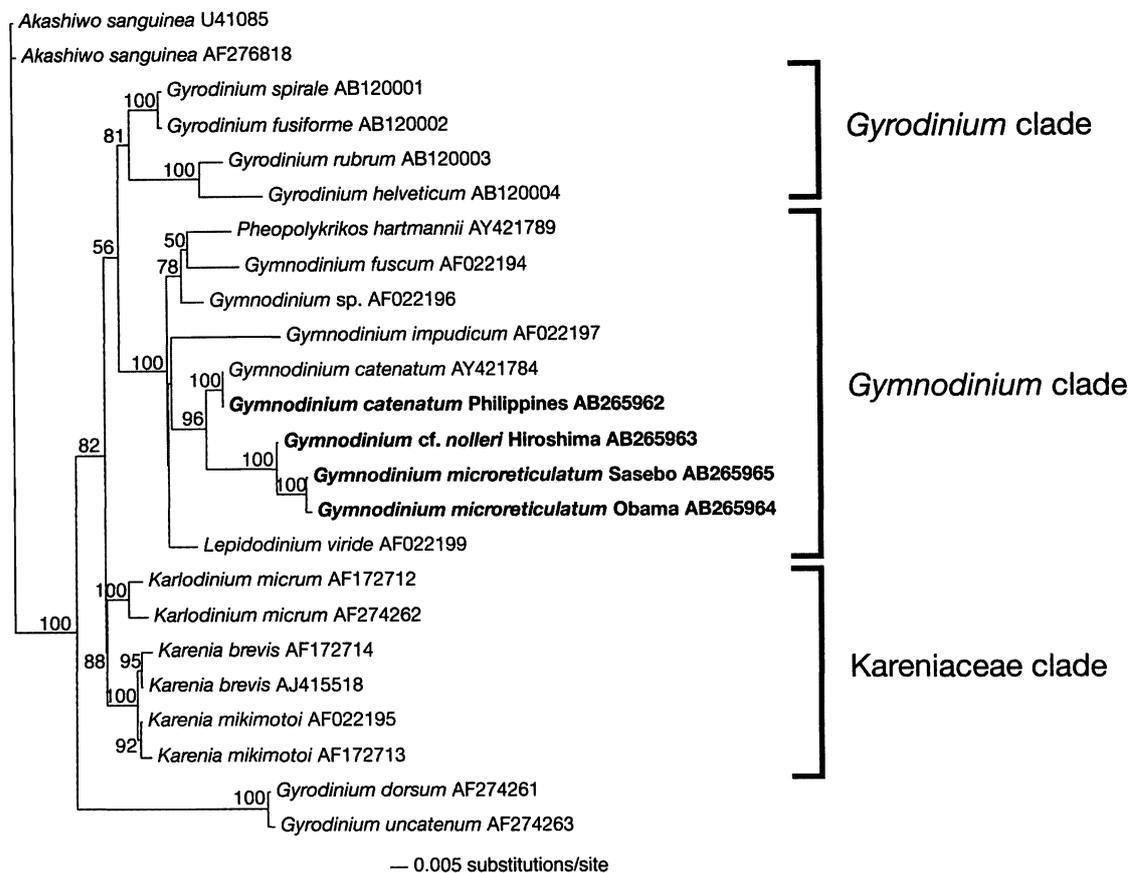


Fig. 3. Phylogenetic tree inferred from gamma weighted NJ analyses using PAUP* ver. 4.0b10, based on SSU rDNA sequences. Parameters chosen by ModelTest were; TrN + I (0.6562) + G (0.6438); assumed nucleotide frequencies A = 0.2652, C = 0.2018, G = 0.2536, T = 0.2794; substitution rate matrix with A-G = 2.9677, C-T = 6.5364. Bootstrap support (BS) values above 50% are shown. Accession numbers are indicated after species names in each taxon. Boldface indicates *Gymnodinium* species analysed in this study.

2000 の定義による) の樹形には大きな違いが見られなかったため、Fig. 3 にはそれぞれについて NJ 法により作製した系統樹を示した。SSU rDNA による系統樹で無殻渦鞭毛藻類は、狭義の *Gymnodinium* 属、狭義の *Gyrodinium* 属、そして *Karenia* 類 (*Karenia* 属、*Karodinium* 属、*Takayama* 属を含む) の3つの系統群に分かれた。この中で今回解析した培養株は全て狭義の *Gymnodinium* 属の系統群に含まれ、*G. catenatum* と単系統群を形成した。佐世保湾産と小浜湾産の *Gymnodinium* はほぼ同一の配列 (塩基置換 2/1755bp, 0.11%) で、広島湾産株は *G. catenatum* よりも上述した2株に近縁であった。LSU rDNA の D1-D2 領域を用いた系統樹においても、無殻渦鞭毛藻類は狭義の *Gymnodinium* 属、狭義の *Gyrodinium* 属そして *Karenia* 類の3つの系統に分かれた。今回解析した培養株は、全て狭義の *Gymnodinium* 属の系統群に含まれ、*G. catenatum* と単系統群を形成した。この中で佐世保湾産と小浜湾産の *Gymnodinium* は記載に用いられた *G. microreticulatum* と非常に近縁であった。一方、形態的に *G. noller* に類似する広島湾産株は、デンマーク産 *G. noller* ではなく、佐世保湾産と小浜湾産株を含む *G.*

microreticulatum と近縁であることが示された。

考察

小浜湾と佐世保湾産の *Gymnodinium* の遊泳細胞は、核が上錐中に位置すること、横溝段差の形状、そして葉緑体が細胞長軸に沿って平行に伸びる点が特徴的である。*G. microreticulatum* の記載時に特徴とされている細胞表面の畝状構造 (Bolch *et al.* 1999) も、SEM により確認することができた。これらの形態の特徴より小浜湾産と佐世保湾産の2株は、*G. microreticulatum* と同定できる。分子系統解析の結果においても、これら2株は狭義の *Gymnodinium* 属に含まれると共に、LSU rDNA の部分配列を用いた系統樹では *G. microreticulatum* の記載報告に用いられたタスマニア産株と非常に近縁であることが示され、形態形質による同定結果が支持された。

広島湾産 *Gymnodinium* の遊泳細胞には特徴的な形態形質が少ないため、種同定が非常に困難であった。細胞の形状、縦溝が上錐に深く入り込む点、そして上錐右側下部が尖って縦溝方向に入り込む点においては *G. noller*

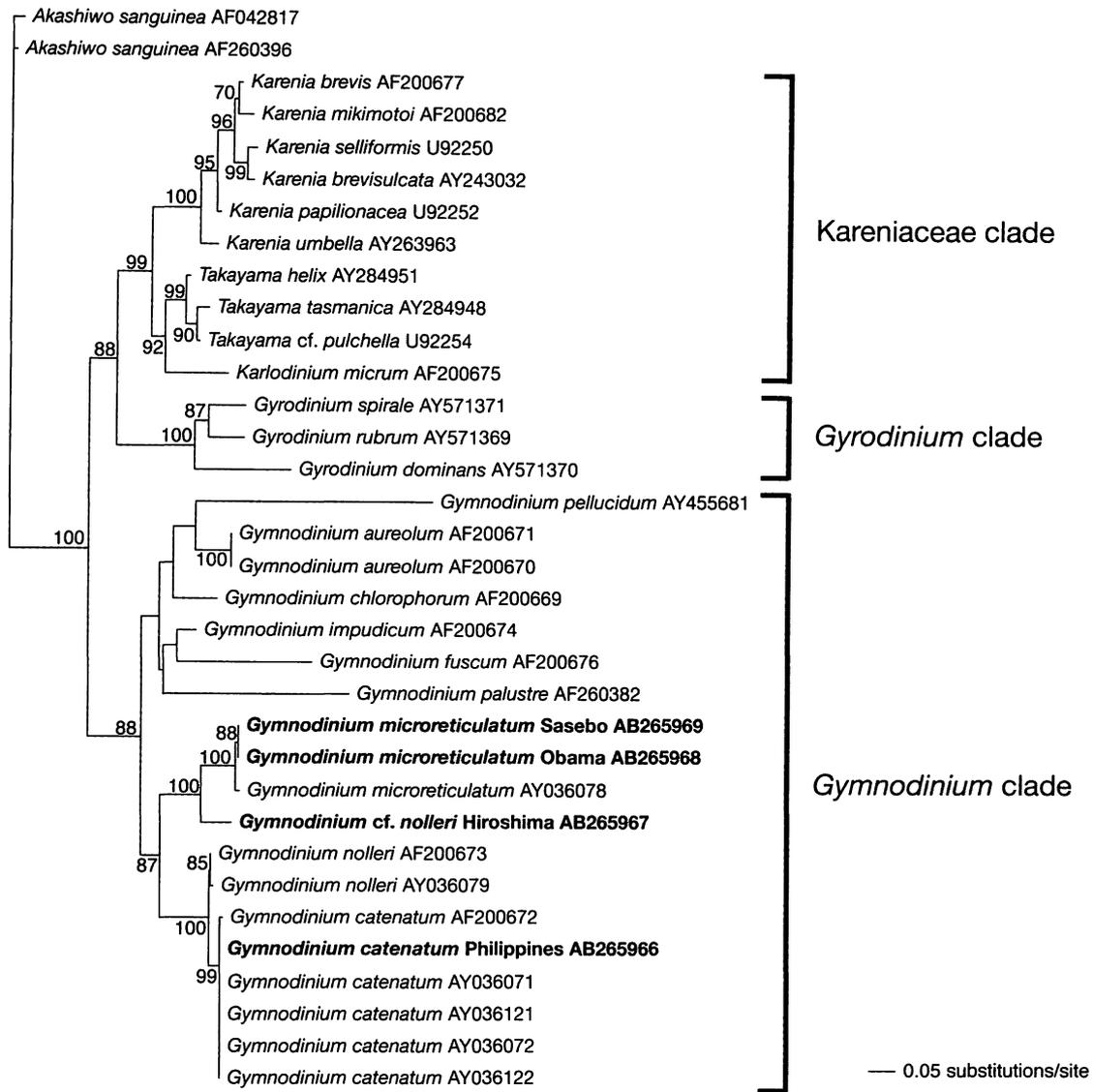


Fig. 4. Phylogenetic tree constructed by gamma weighted NJ analyses based on partial LSU rDNA sequences covering domains D1-D2. Parameters chosen by ModelTest were; TrN + I (0.2164) + G (0.7521); assumed nucleotide frequencies A = 0.2263, C = 0.2114, G = 0.2882, T = 0.2741; substitution rate matrix with A-G = 1.9489, C-T = 5.9186. BS values above 50% are shown. Accession numbers are indicated in each taxon. Taxa analysed in this study are indicated in boldface.

と一致する。本研究では、同種を仮に *Gymnodinium* cf. *nolleri* と同定した。休眠シストを観察することができれば、*G. nolleri* のシスト外被構造と比較することができるが、本研究では培養株中に休眠シストの形成を確認することができなかった。広島湾産 *Gymnodinium* cf. *nolleri* の系統的位を見ると、SSU rDNA による系統樹では、*G. catenatum* や *G. microreticulatum* などの球形網目模様のシストを形成する *Gymnodinium* の系統群に含まれ、中でも *G. microreticulatum* に近縁であることが示された。しかし、既報の LSU rDNA 部分配列では、デンマーク産 *G. nolleri* は *G. microreticulatum* よりも *G. catenatum* に近い事が示されていたため (Bolch *et al.* 1999), LSU rDNA の部分配列を

用いた系統解析を加えて行った。その結果、LSU rDNA を用いた系統解析でも広島湾産 *Gymnodinium* cf. *nolleri* は *G. catenatum* や形態的に類似する *G. nolleri* ではなく、むしろ *G. microreticulatum* に近縁であることが示された。広島湾産株は、*G. microreticulatum* とは形態的・遺伝的に明確に識別することができると共に、形態的に類似する *G. nolleri* とも遺伝的に離れていることが明らかとなった。現在までの観察結果では、*G. nolleri* と識別可能な形態形質は見つかっていないが、広島湾産株を新種として記載報告するためには、シストを含めた形態観察に基づいて *G. nolleri* との形態的な違いを明示する必要がある。広島湾産 *Gymnodinium* の培養株からはシスト形成を確認できていないが、系統的に類縁があ

Table 1. Sequence divergence among microreticulate cyst forming *Gymnodinium* species based on 669 bp of partial LSU rDNA sequences (D1-D2). Percentages of uncorrected distance are given above the diagonal and gamma corrected distances are below the diagonal.

	<i>G. catenatum</i> AF200672	<i>G. catenatum</i> AB265966	<i>G. micro.</i> AY036078	<i>G. micro.</i> AB265969	<i>G. micro.</i> AB265968	<i>G. nolleri</i> AF200673	<i>G. cf. nolleri</i> AB265967
<i>G. catenatum</i>	-	0.747	16.937	16.936	16.936	2.987	15.878
<i>G. catenatum</i>	0.774	-	16.182	16.181	16.181	2.239	15.272
<i>G. microreticulatum</i>	27.761	25.773	-	1.054	1.054	15.706	9.634
<i>G. microreticulatum</i>	27.867	25.870	1.079	-	0.000	15.706	9.635
<i>G. microreticulatum</i>	27.867	25.870	1.079	0.000	-	15.706	9.635
<i>G. nolleri</i>	3.287	2.401	24.883	24.977	24.977	-	14.498
<i>G. cf. nolleri</i>	25.903	24.241	12.523	12.560	12.560	22.691	-

る *G. catenatum*, *G. microreticulatum* として *G. nolleri* の球形網目模様シストの形成を考慮すると、本株はこれらと類似したシスト形成能を有することが予想される。本系統群の遊泳細胞とシスト形態の分化や分布、そして有害種の識別を考える上で同種のシストの有無は重要な研究課題である。

無殻渦鞭毛藻 *G. microreticulatum* の記載は新しく、麻痺性貝毒原因種 *G. catenatum* と比較すると遊泳細胞は小型で同定が困難であるため、現在までに日本からの出現報告はなかった。今回、長崎県佐世保湾と福井県小浜湾で *G. microreticulatum* の遊泳細胞が確認されたことにより、同種は少なくとも西日本の日本海側に分布すると考えられる。現在までに、西日本沿岸域からは麻痺性貝毒原因種 *G. catenatum* の遊泳細胞とシストの出現が多く報告されてきた。これらの調査の一部で、*G. catenatum* と同様の特徴をもちながら直径が比較的小型であるシストが対馬浅茅湾や伊万里湾から報告されていたが、種同定には至っていなかった (Matsuoka & Lee 1994)。今回 *G. microreticulatum* の遊泳細胞の出現が確認されたことにより、西日本沿岸域に確認されてきた小型の球形網目模様のシストは同種のものであることが強く示唆される。一方、*G. nolleri* に関しては、デンマークで記載されて以来大西洋やインド洋沿岸域より出現が確認されているものの、太平洋岸での報告はなかった。今回同定した広島湾産 *Gymnodinium* cf. *nolleri* においても、形態的には *G. nolleri* の遊泳細胞と識別することはできなかったが、系統的には *G. nolleri* と異なる類似種であることが確認された。

麻痺性貝毒原因種である *G. catenatum* の分布は同種のシストの存在からも調査されてきたが、今後この結果より、麻

痺性貝毒原因種でない *G. microreticulatum* やその類縁種と、*G. catenatum* のシストを確実に識別した上での分布調査が必要となる。

謝辞

本研究の一部は長崎県地域結集型共同研究事業「マイクロ海洋生物の生理機能活用技術の開発」、文科省科学研究費補助金 (課題番号 18340166) に援助を受けている。お礼申し上げます。

引用文献

- Amorim, R. & Dale, B. 1998. Distribution of cysts from toxic or potential toxic dinoflagellates along the Portuguese coast. pp. 64-65. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L. & Wyatt, T. (eds.) Harmful Microalgae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- Amorim, A., Dale, B., Godinho, R. & Brotas V. 2001. *Gymnodinium catenatum*-like cysts (Dinophyceae) in recent sediments from the coast of Portugal. *Phycologia* 40: 572-582.
- Anderson, D. M., Jacobson, D., Bravo, I. & Wrenn, J. H. 1988. The unique, microreticulate cyst of the naked dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham. *J. Phycol.* 24: 255-262.
- Bolch, C. J. S., Negri, A. P. & Hallegraeff, G. M. 1999. *Gymnodinium microreticulatum* sp. nov. (Dinophyceae): a naked, microreticulate cyst-producing dinoflagellate, distinct from *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium nolleri*. *Phycologia* 38: 301-313.
- Bolch, C. J. S. & Reynolds, M. J. 2002. Species resolution and global distribution of microreticulate dinoflagellate cysts. *J. Plankton Res.* 24: 565-578.

- Bravo, I. & Ramillo, I. 1999. Distribution of microreticulate cysts from the Galician and Portuguese coast. *Bull. Mar. Sci.* 63: 45-50.
- Daugbjerg, N., Hansen, G., Larsen, J. & Moestrup, Ø. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39: 302-317.
- Ellegaard, M. & Moestrup, Ø. 1999. Fine structure, with emphasis on the flagellar apparatus, and morphological details of *Gymnodinium nolleri* (Dinophyceae) sp. nov.- an unarmoured dinoflagellate producing a microreticulate cyst. *Phycologia* 38: 289-300.
- Hansen, G. 2000. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *J. Phycol.* 36: 394-410.
- Matsuoka, K. & Fukuyo, Y. 1994. Geographical distribution of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Japanese coastal waters. *Bot. Mar.* 37: 495-503.
- Matsuoka, K. & Fukuyo, Y. 2000. Technical guide for modern dinoflagellate cyst study. WESTPAC-HAB, Tokyo, 29 pp.
- Matsuoka, K. & Lee, J. -B. 1994. Dinoflagellate cysts in surface sediments of Aso Bay and Mine Bay in Tsushima Island, West Japan. *Bull. Fac. Lib. Arts. Nagasaki Univ. (Nat. Sci)* 34: 121-132.
- Montresor, M., Zingone, A. & Sarno, D. 1998. Dinoflagellate cyst production at a coastal Mediterranean site. *J. Plankton Res.* 20: 2291-2312.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. & Inouye, I. 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* 44: 47-55.
- Nehring, S. 1994. Spatial distributions of dinoflagellate resting cysts in recent sediments of Kiel Bight, Germany (Baltic Sea). *Ophelia* 39: 137-158.
- Nehring, S. 1995. *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Europe: a growing problem. *J. Plankton Res.* 17: 85-102.
- Nehring, S. 1997. Dinoflagellate resting cysts from recent German coastal sediments. *Bot. Mar.* 40: 307-324.
- Persson, A., Godhe, A. & Karlson, B. 2000. Dinoflagellate cysts in recent sediments from the west coast of Sweden. *Bot. Mar.* 43: 69-79.
- Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Qi, Y. -Z., Hong, Y., Zheng, L., Kulis, D. M. & Anderson, D. M. 1996. Dinoflagellate cysts from recent marine sediment of the south and east China Seas. *Asian Mar. Biol.* 13: 87-103.
- Scholin, C. A., Herzog, M., Sogin, M. & Anderson, D. M. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.* 30: 999-1011.
- Takano, Y. & Horiguchi, T. 2004. Surface ultrastructure and molecular phylogenetics of four unarmored heterotrophic dinoflagellates, including the type species of the genus *Gyrodinium* (Dinophyceae). *Phycol. Res.* 52: 107-116.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Watanabe, M. M., Kawachi, M., Hiroki, M. & Kasai, F. 2000. NIES-collection. List of strains, ed. 6. Microalgae and protozoa. National Institute of Environmental Studies, Tsukuba, 159 pp.
- Zonneveld, K. A. F. 1997. Dinoflagellate cyst distribution in surface sediments from the Arabian Sea (northwestern Indian Ocean) in relation to temperature and salinity gradients in the upper water column. *Deep-Sea Res. II* 44: 1411-1443.
- Zonneveld, K. A. F., Hoek, R. P., Brinkhuis, H. & Willems, H. 2001. Geographical distributions of organic walled dinoflagellate cysts in surface sediments of the Benguela upwelling region and their relationship to upper ocean conditions. *Prog. Oceanogr.* 48: 25-72.

(Received June 28, 2005; Accepted July 30, 2006)

