

渦鞭毛藻シストー栄養細胞対応関係確立への新方法

松岡敷充*・野上規子**・川見寿枝**・岩滝光儀*

*長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センター・**長崎大学生産科学研究科

New method for establishing the cyst-motile form relationship in modern dinoflagellates

Matsuoka Kazumi*, Nogami Noriko**, Hisae Kawami** and Mitsunori Iwataki*

*Institute for East China Sea Research, Nagasaki University, 1551-7 Taira-machi, Nagasaki, 851-2213, Japan (kazu-mtk@nagasaki-u.ac.jp); **Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki, 852-8521, Japan

Abstract. Dinoflagellates are one of major microplankton groups in marine coastal environments. Most dinoflagellates have several different stages in their life cycle consisting of motile and resting periods. Since chemical composition of the cyst is sporopollenin-like and resistant to physical, chemical, and biological decay, these cysts are preserved as fossils and are used as biostratigraphic index markers. Under these circumstances, motile cells of dinoflagellates have been mainly studied by biologists, and resting cysts by paleontologists. Therefore, many species which can produce resting cysts have two different names for different stages. Some of their relationships, however, are still unclear.

In this study molecular analytical method for dinoflagellate cysts is applied for elucidating the relationships between cysts and motile cells, and to identify uncertain cysts. Through this study, the following two subjects are conducted; (1) The efficiency of molecular analytical method using a single cyst was examined. *Pyrophacus steinii* of which motile cells and cysts relationships has been clarified by the cyst (= *Tuberculodinium vancampoeae*) incubation experiment was provided. The small subunit rDNA gene sequences of *P. steinii* cyst was detected and compared with that of the motile cell provided from the gene database. In the result, the base sequences of this cyst corresponded to that of the motile cell except for one undeterminable base. (2) Aspherical *Alexandrium*-like cyst without any prominent morphological features was identified by this method. The base sequence of this cyst corresponded to these of *Alexandrium hiranoi* motile cells provided from the gene database expecting undeterminable 14 bases.

These results suggest that molecular analytical method is applicable for identification on modern uncertain dinoflagellates cysts. It could be particularly useful for discrimination of morphologically similar cysts such as toxic *Alexandrium* species.

Key words: *Alexandrium hiranoi*, cyst-motile form relationship, dinoflagellate cyst, molecular phylogenetic analysis, *Pyrophacus steinii*, single cell PCR

はじめに

堆積物中には微化石と総称される様々な微小な生物遺骸が含まれている。化石渦鞭毛藻もその一員であるが、水中に浮遊している栄養細胞ではなく、多くの場合、有性生殖によって形成される休眠細胞（シスト）である（図1）。シストは物理的・化学的耐性をもつ有機質の細胞壁を備えていることから長期間堆積物中に保存される。確実に渦鞭毛藻類と識別される化石は中生代初期の堆積物から産し、それ以降、時代とともに多様な形態を持った種が出現することから、生層序学や古海洋学に活用される（Dale, 2001）とともに、渦鞭毛藻の系統進化考察の基礎情報として注目されている（Fensome *et al.*, 1993）。また、渦鞭毛藻シス

トが赤潮など有害藻類ブルームの初期発生に深く関与していることから、近年では堆積物表層部に保存されている渦鞭毛藻シストは水産学や海洋環境科学分野での研究対象ともなっている（例えば Anderson *et al.*, 1982; Dale *et al.*, 1999; Matsuoka, 1999）。しかし、栄養細胞とシストの形態が著しく異なるため、研究視点の違いによって1つの生物が異なった2つの生物名、すなわち栄養細胞と休眠細胞とに異なった生物名、が与えられている場合もあり、このことが渦鞭毛藻シスト研究に混乱をもたらしてきた。渦鞭毛藻古生物学をさらに進展させるには、化石として保存されるシストとそれに対応する栄養細胞との関係を正確に確立していくことが今後の重要な研究課題の一つである。これまでに、栄養細胞とシストとの対応関係を明ら

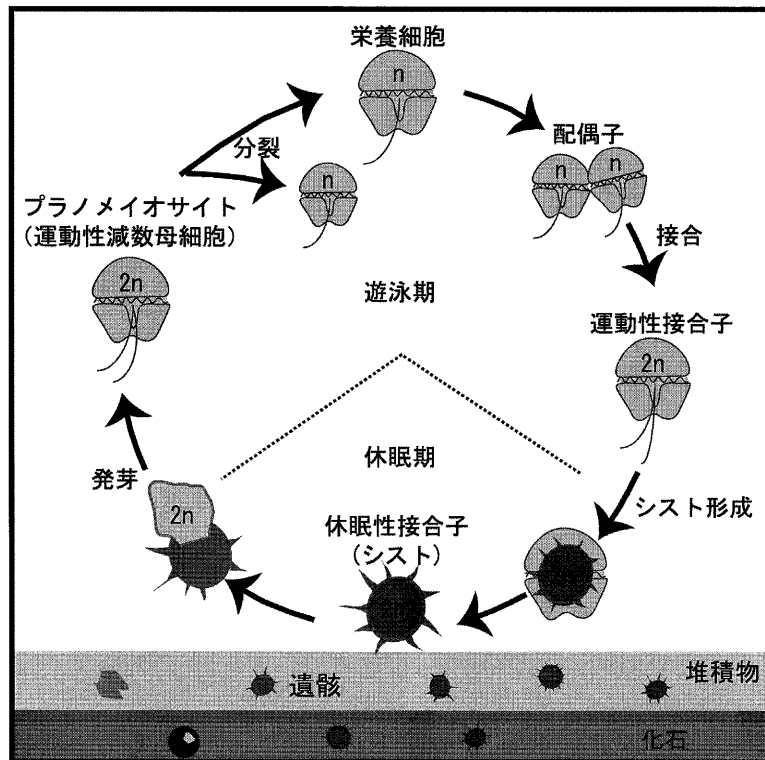


図1. 渦鞭毛藻の模式的な生活史。一般に運動性接合子は有性生殖によって形成され、その後には休眠性接合子（シスト）へと変化する。

Fig. 1. General life history of dinoflagellate. Hypnozygote (resting cyst) is produced from planozygote through sexual reproduction.

かにする目的でシスト発芽培養実験などが確立されてきたが、それらには次節に示した幾つかの問題点もあり、この方面の研究が進んでいるとはいえない。最近、それらの問題点を解決するために分子系統解析学的知見を活用する方法が示されている。例えば Bolch (2001) は PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いて抽出した核酸塩基配列が正確であることを検証するため、無殻の独立栄養性渦鞭毛藻 *Gymnodinium catenatum* を素材とし、実験室内での培養細胞（栄養細胞）、extracted DNA、培養中に形成されたシスト、野生のシストを分析したところ、全てのケースで核酸塩基配列は、extracted DNA と同一であったことを確認し、PCR 法による ribosomal RNA (rDNA) 領域の増幅法は、渦鞭毛藻シストや他の微細藻類休眠細胞とプランクトン細胞の対応関係を明らかにする研究に貢献する可能性があることを紹介した。さらに Ellegaard *et al.* (2003) では独立栄養性渦鞭毛藻の *Gonyaulax spinifera*-*Spiniferites* group の培養株の形態と LSU rDNA 配列を明らかにし、以前より *Gonyaulax spinifera* complex の一員とされてきた *Spiniferites elongatus* の栄養細胞を新種と認め、*G. elongata* comb. nov. を提唱した。本論では、このような状況を踏まえ、従来の形態形質のみによる栄養細胞と休眠細胞との対応確立手法とは異なり、分子系統学的技法を援用する新たな手法をこの研究に導入することについて、現在までに得た成果を基にその妥当性を検証する。

従来のシストと栄養細胞対応関係確立手法

これまでに用いられてきたシストと栄養細胞の対応関係を把握する方法を概観し、そこにある問題点を明らかにする。

生シスト直接培養法

この方法では、シスト（休眠性接合子）→プラノメイオサイト（運動性減数母細胞）→栄養細胞（？）の対応関係を確立する。表層堆積物として沈積している新鮮な原形質で満たされたシスト（生シスト）を1個体ずつマイクロピペットで拾い出して人工培養し、シストからプラノメイオサイトを発芽させる。プラノメイオサイトは鞭毛を備えた減数分裂前の細胞で、栄養細胞とほぼ同型であることからその形態により種同定が可能である。培養したシストや発芽して形成された遊泳細胞の同定に必要な形質を光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察し、それぞれの同定に必要な形質を確認することによって、シストと遊泳細胞の生物名を確定する。この方法では生シストを比較的容易に収集することが可能であり、また表層堆積物には異なった季節に生産されたシストが多数保存されていることから、多種多様なシストを入手することが容易である。

この方法ではシストの形態に関しては発芽後の空シストが残されているので、シストの種同定に重要な形質である発芽孔の形態情報を得ることができる。その一方で、

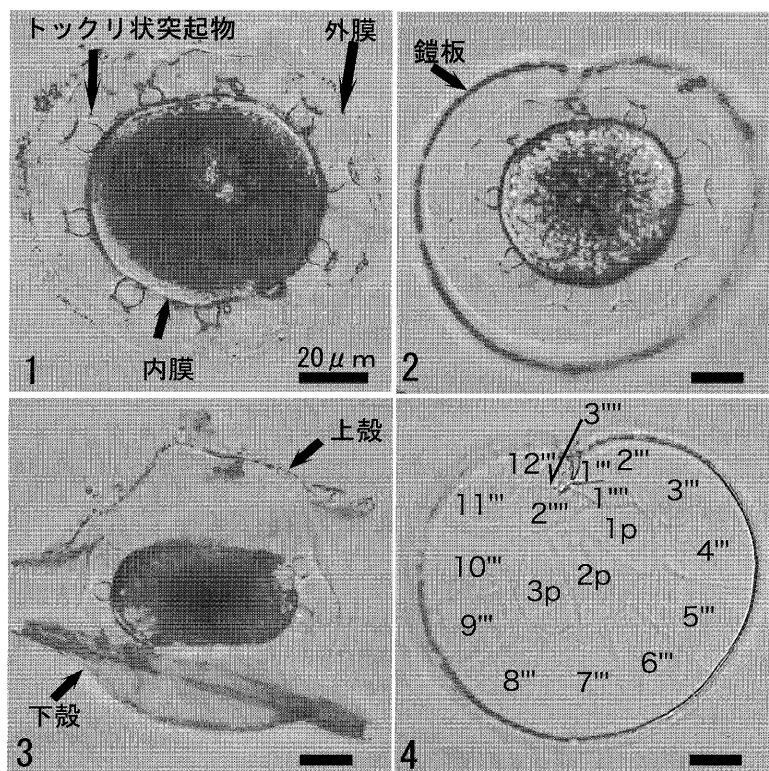


図2. 遺伝子解析に用いた *Pyrophacus steinii* (Schiller) Wall *et* Dale の細胞。(1) 標本番号 030702NGt-1, (2)~(4) 標本番号 040623NG-1。(1) シスト (*Tuberculodinium vancampoae* (Rossignol) Wall) の外膜と内膜の間にトックリ状突起物がみられる。(2) 運動性接合子殻内に休眠性接合子(シスト)が形成されている。(3) 細胞側面観。扁平な運動性接合子。(4) 運動性接合子下殻の鎧板配列。

Fig. 2. Hypnozygotes (resting cysts) provided for the present study were produced within the planozygote. These two forms were identical to *Pyrophacus steinii* (hypnozygote) and *Tuberculodinium vancampoae* (resting cyst), respectively. DNA sequences examined were extracted from these resting cysts directly.

この方法では人工培養環境下で発芽した遊泳細胞に、鎧板の枚数や形状などの外部形態にしばしば異常があり、その細胞の種同定が困難になる場合も *Protoperidinium conicum* などを事例にして報告されている(小林・松岡 1984)。

人工培養実験法

この方法では栄養細胞→配偶子→シストの対応関係を確認する。人工環境下で培養可能な独立栄養性種(一部の従属栄養性種を含む)では培養中にシスト形成が行われ、その過程を観察できる場合がある(例えば Ellegaard *et al.*, 2002, 2003)。加えてこの方法からはシスト形成に関わる有性生殖が同株接合か異株接合か、さらに、同形接合か異形接合かなどの情報を得ることもできる。また、培養条件を変更することによってシスト形成に係わる栄養塩や水温、塩分、光などの環境要因を把握することも可能である。しかし、この方法では、一部、餌料生物を与えることで培養可能な従属栄養性種、*Polykrikos kofoidii* Chatton や *P. schwartzii* Bütschli, なども対象となりうるが、人工培養の容易な独立栄養性種に限られる。

天然プランクトン群集観察法

この方法では、運動性接合子→シストの対応関係を確認する。天然プランクトン試料には鎧板で覆われた運動性接合子の中に休眠性シストが包含されている観察例がある(例えば Matsuoka, 1976; Dodge and Harland, 1991)。この場合、栄養細胞とほぼ同型の運動性接合子の鎧板配列を明らかにすることによって包含されているシストがいかなる種であるのかを知ることが可能である(例えば図2-2, 2-3)。しかし、一般的に運動性接合子内にシストが形成・保持される期間は短いため、プランクトン試料中に検出される場合は稀である。

試料と分析方法

研究対象とした試料は長崎周辺の海域に設置されたセディメント・トラップ、海底表層の堆積物、プランクトンネットで採取した細胞を用いた。海底堆積物は投げ込み式簡易採掘器(TFO コアラー)で採取し、原形質で充たされた生シストが多く含まれている表層2 cm を分析対象とした。これらの試料を目合い125 μm と20 μm のステンレス製の篩で分画し、20 μm 篩上の残渣から倒立型光学顕微鏡(OLYMPUS IX70)下で生シストを拾い出し、その

表 1. 本実験の PCR 法で用いたオリゴヌクレオチドプライマー.
Table 1. Oligonucleotide primers used for SSU rDNA analyses.

コード	複製の方向	配列 (5'→3')	アニーリング
SR1	Forward	TAC CTG GTT GAT CCT GCC AG	1-20
SR1b	Forward	GAT CCT GCC AGT AGT CTA ATG CTT	10-33
SR2kaw	Forward	AAG TTT CTG ACC TAT CAG CT	298-317
SR3	Reverse	AGG CTC CCT GTC CGG AAT C	394-376
SR4	Forward	AGG GCA AGT CTG GTG CCA G	548-566
SR5kaw	Reverse	ACT ACG AGC TTT TTA ACC GC	630-611
SR6	Forward	TCA GAG GTG AAA TTC TTG G	891-910
SR7	Reverse	TCC TTG GCA AAT GCT TTC GC	950-931
SR8kaw	Forward	GGA TTG ACA GAT TGA TAG CT	1224-1243
SR9	Reverse	AAC TAA GAA CGG CCA TGC AC	1286-1263
SR10	Forward	AGG TCT GTG ATG CCC TTA GA	1420-1439
SR11	Reverse	CGC TTA CTA GGA ATT CCT CG	1582-1563
SR12	Reverse	CCT TCC GCA GGT TCA CCT AC	1781-1762
SR12b	Reverse	CGG AAA CCT TGT TAC GAC TTC TCC	1762-1739

形態や原形質の状態を観察した。結果として rDNA の塩基配列を直接読み取ることができたシストは内腔の全体が粒状原形質で充たされていたものであった。

rDNA 系統解析では、これまで渦鞭毛藻の遺伝子情報として報告例が多い Small subunit ribosomal RNA 遺伝子 (SSU rDNA) 領域を標的とした。篩い分けした試料から、倒立型光学顕微鏡下でパスツールピペットを用いて生シストを拾い出し、スライドガラス上に滴下した 50 μ l 程度の蒸留水中に移した。シスト表面や突起物に付着した不純物や周囲の環境に含まれる核酸を除去するため、有柄針を用いて蒸留水中でシストを転がしつつ洗浄した。一回では洗浄が不十分な場合、新たな蒸留水中で再度シストを洗浄し、不純物が取り除かれるまでこの作業を繰り返した。この時点で形態分類に重要な形質を光学顕微鏡の下で観察し、外形や突起物などを写真記録として残した。十分に洗浄したシストを顕微鏡下で先端を丸めたガラス棒で潰し、ついでシスト壁及び内部に詰っていた原形質を蒸留水も合わせてパスツールピペットで吸引抽出した。それらを 10 μ l の滅菌水が入った PCR チューブに入れ、PCR 作業開始まで -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

分子系統解析手法は Takano and Horiguchi (2004) を参考にした。PCR 反応を行う際には保存していた PCR チューブを室温で解凍した後、水中で反応液を加えた。十分な DNA 増幅を行うため PCR 反応を 2 段階に分けて行った。第一段階では、プライマー SR1 と SR12 (Nakayama *et al.*, 1996, 表 1) を用い、アニーリング温度 55 $^{\circ}$ C, 35 サイクルで実施した。第 2 段階では、前段階の操作で得た PCR 産物 2 μ l をテンプレートとし、3 種類のプライマーセット (SR1b - SR5, SR4 - SR9, SR8 - SR12b) を用いて約 800 塩基ずつ、アニーリング温度 55 $^{\circ}$ C, 40 サイクルで伸長した。

2 段階の PCR が終了した試料 2 μ l をアガロースゲルに泳動した後、エチジウムブロマイドで染色して DNA の

増幅断片を確認した。DNA 増幅断片はスピンカラムで精製し、BigDye Terminator Ver.3.1 と 12 種類のプライマーを用いて、サイクルシーケンスを行った。得られた塩基配列を国際塩基配列データベース (GenBank) に収録されている種々の生物の塩基配列データと比較し、種同定を試みた。

結果

生シストから直接得た SSU rDNA 塩基配列情報で種の同定が可能か否かを検証するために、以下の 2 つの事例を検討した。1) すでに生シストの培養発芽実験から、形態学的特徴に基づいてシストと遊泳細胞との対応が確認されている例、2) シストの形態情報のみからでは対応する遊泳細胞の生物が決定できない例。

シストと遊泳細胞の対応が発芽実験によってこれまでに確認されている例

有性生殖によって形成されたシスト 1 個体から直接抽出した原形質からでも PCR による核酸塩基の増幅は可能であるかさらにその塩基配列が栄養細胞のそれと一致するのかについて、すでに生活史が把握されていてシストと栄養細胞との対応関係が明らかになっている有殻独立栄養性種 *Pyrophacus steinii* (Schiller) Wall *et* Dale を用いて検討した。用いた細胞は 2004 年 6 月に西九州大村湾で採取したプランクトン試料中に含まれていた *P. steinii* の運動性接合子の鎧板が残存するシスト (標本番号 040623NG-1) と、2003 年 7 月に回収した大村湾・長与浦に設置されたセディメント・トラップに捕捉されたシスト (標本番号 030702Ngt-1) である (図 2)。

標本番号 040623NG-1 の残存していた運動性接合子の外形はレンズ状で、上殻の鎧板配列は分解が進んでいたため確認できなかったが、下殻の鎧板配列は後帯板 12 枚、後挿間板 3 枚、底板 3 枚であった (図 2-4)。内包されていたシストは円盤形で、側面観では 4 列に並ぶ多数のトックリ状突起物を備えていた (図 2-2)。これら運動性接合子とシストは、それぞれの形態学的特徴から *P. steinii* 及び *Tuberculodinium vancampoeae* (Rossignol) Wall と同定できた。また、セディメント・トラップに捕捉されたシスト (番号 030702Ngt-1) も外形が円盤形でトックリ状の突起物を備えていたことから *T. vancampoeae* と同定できた。

これらのシストを試料にして分子系統解析を行ったところ、PCR 反応によって 040623NG-1 では 1748 塩基の 030702Ngt-1 では 1766 塩基の SSU rDNA を増幅させることができた。GenBank に登録されている三重県の矢湾から採取された *P. steinii* (NIES321) の SSU rDNA 塩基配列 (登録番号 AY 443024) と比較した結果、シストから得られた塩基配列は登録されている栄養細胞の配列と 1 塩基不明な箇所を除き、完全に一致した (図 3)。

シストの形態から対応する遊泳細胞の種同定ができない例
大村湾に設置したセディメント・トラップ試料には、

```

030702NGt-1: AGTCATATGC TTGTTTTGAA GGCTAAGCCA TGCATGTGCC AGTATCAACT CTTGGATGGT CAAGCTGCAA ATGGCTCATT ACATCAITTA CGACTTATGT
040623NG-1: AGTCATATGC TTGTTTTGAA GGCTAAGCCA TGCATGTGCC AGTATCAACT CTTGGATGGT CAAGCTGCAA ATGGCTCATT ACATCAITTA CGACTTATGT
AY443024: AGTCATATGC TTGTTTTGAA GGCTAAGCCA TGCATGTGCC AGTATCAACT CTTGGATGGT CAAGCTGCAA ATGGCTCATT ACATCAITTA CGACTTATGT

GGGAGCACGT GTAATGGGT AGCTATGGCA ATCCCGCAGC TAATTCATGC ATTTGGCATA ACTATGTAGG ACATGTGGTG GTTGTGACT AAATCAACAC
GGGAGCACGT GTAATGGGT AGCTATGGCA ATCCCGCAGC TAATTCATGC ATTTGGCATA ACTATGTAGG ACATGTGGTG GTTGTGACT AAATCAACAC
GGGAGCACGT GTAATGGGT AGCTATGGCA ATCCCGCAGC TAATTCATGC ATTTGGCATA ACTATGTAGG ACATGTGGTG GTTGTGACT AAATCAACAC

CAAGCCTACA CTTGGAGTGC ATGAGAAAAG GGCAACTGCA TTGATCTGGA CAGACTTTGG TGAATGCACCTA CTTAGGTTTC TGACCTATCA GCTATTGTGG
CAAGCCTACA CTTGGAGTGC ATGAGAAAAG GGCAACTGCA TTGATCTGGA CAGACTTTGG TGAATGCACCTA CTTAGGTTTC TGACCTATCA GCTATTGTGG
CAAGCCTACA CTTGGAGTGC ATGAGAAAAG GGCAACTGCA TTGATCTGGA CAGACTTTGG TGAATGCACCTA CTTAGGTTTC TGACCTATCA GCTATTGTGG

GTATGGTATT GGCCTACTCT GGCATTACGC GGTGACGGGG AATTAGGGTT TGAATCCGGA GAGGGAGCCT TAGAAAATGGC CACCACATCT AAGGAAGGCA
GTATGGTATT GGCCTACTCT GGCATTACGC GGTGACGGGG AATTAGGGTT TGAATCCGGA GAGGGAGCCT TAGAAAATGGC CACCACATCT AAGGAAGGCA
GTATGGTATT GGCCTACTCT GGCATTACGC GGTGACGGGG AATTAGGGTT TGAATCCGGA GAGGGAGCCT TAGAAAATGGC CACCACATCT AAGGAAGGCA

GCAGGCGCGC AAATTTCCCA ATCCTAGCGC AGGGAGGTAG TGACAAGATA TAACAATACA GGGCAATTAAT GTTTTGTAA TGGAAATGAAT TTAATTGTAAG
GCAGGCGCGC AAATTTCCCA ATCCTAGCGC AGGGAGGTAG TGACAAGATA TAACAATACA GGGCAATTAAT GTTTTGTAA TGGAAATGAAT TTAATTGTAAG
GCAGGCGCGC AAATTTCCCA ATCCTAGCGC AGGGAGGTAG TGACAAGATA TAACAATACA GGGCAATTAAT GTTTTGTAA TGGAAATGAAT TTAATTGTAAG

GCATTTTGTG ACTAGCAATT GGAGGGCAAG TCTGGTCCCA GCAGCCGCGG TAATTCACGC TCCAAGGCA TATATTAATA TTGTGGGGT TAAAAGGCTC
GCATTTTGTG ACTAGCAATT GGAGGGCAAG TCTGGTCCCA GCAGCCGCGG TAATTCACGC TCCAAGGCA TATATTAATA TTGTGGGGT TAAAAGGCTC
GCATTTTGTG ACTAGCAATT GGAGGGCAAG TCTGGTCCCA GCAGCCGCGG TAATTCACGC TCCAAGGCA TATATTAATA TTGTGGGGT TAAAAGGCTC

GTAGTGGGAC TGTATCAAGG GTGGGATGGT CTGCCCTCTG GGTAAAGCAT ACACCCCTCT TTGTTATGTT TTGTGAAAAT CTGGCTTGGC CTTGACTGTG
GTAGTGGGAC TGTATCAAGG GTGGGATGGT CTGCCCTCTG GGTAAAGCAT ACACCCCTCT TTGTTATGTT TTGTGAAAAT CTGGCTTGGC CTTGACTGTG
GTAGTGGGAC TGTATCAAGG GTGGGATGGT CTGCCCTCTG GGTAAAGCAT ACACCCCTCT TTGTTATGTT TTGTGAAAAT CTGGCTTGGC CTTGACTGTG

TGGTGGGTT GCTTGCACAT CTACTTTGAG GAAATCAGAG TGTCCACGC AAGTGTGCGC CATGAATATA ATAGCATGGG ATAGTCGAT GTATACATAG
TGGTGGGTT GCTTGCACAT CTACTTTGAG GAAATCAGAG TGTCCACGC AAGTGTGCGC CATGAATATA ATAGCATGGG ATAGTCGAT GTATACATAG
TGGTGGGTT GCTTGCACAT CTACTTTGAG GAAATCAGAG TGTCCACGC AAGTGTGCGC CATGAATATA ATAGCATGGG ATAGTCGAT GTATACATAG

ATATGTTTGT TGGTTCAAAA CGTGTGTTTA CTAACAAGAA TAGTTGGGG CATCTGTATT TGACTGTGAC AGGTGAAAAT CTTGGATTTT TCAAAGACAA
ATATGTTTGT TGGTTCAAAA CGTGTGTTTA CTAACAAGAA TAGTTGGGG CATCTGTATT TGACTGTGAC AGGTGAAAAT CTTGGATTTT TCAAAGACAA
ATATGTTTGT TGGTTCAAAA CGTGTGTTTA CTAACAAGAA TAGTTGGGG CATCTGTATT TGACTGTGAC AGGTGAAAAT CTTGGATTTT TCAAAGACAA

TCTACTGCAA ACGCATTTGC CAAATATGTT TCTATTGATC AAGAGCGAAA GTTAGGGGAT CGAAGACGAT CAGATACCGT CBTAGTCCTA ACCATAAAC
TCTACTGCAA ACGCATTTGC CAAATATGTT TCTATTGATC AAGAGCGAAA GTTAGGGGAT CGAAGACGAT CAGATACCGT CBTAGTCCTA ACCATAAAC
TCTACTGCAA ACGCATTTGC CAAATATGTT TCTATTGATC AAGAGCGAAA GTTAGGGGAT CGAAGACGAT CAGATACCGT CBTAGTCCTA ACCATAAAC

ATGCCAACTA AACATTGGAG GTTGTATATC GTTGTATGCT TCAGCACCTT ATGATAAATC AAAGTTTTTG GGTCCGCGGG GAGATATGGT CCGAAGGCTG
ATGCCAACTA AACATTGGAG GTTGTATATC GTTGTATGCT TCAGCACCTT ATGATAAATC AAAGTTTTTG GGTCCGCGGG GAGATATGGT CCGAAGGCTG
ATGCCAACTA AACATTGGAG GTTGTATATC GTTGTATGCT TCAGCACCTT ATGATAAATC AAAGTTTTTG GGTCCGCGGG GAGATATGGT CCGAAGGCTG

AAACTTAAAG GAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG AGCTTGCBCG TTAATTTGAT TCAACACGGG GAAACTCACC AAGCCCGGAC ATATTAGGA
AAACTTAAAG GAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG AGCTTGCBCG TTAATTTGAT TCAACACGGG GAAACTCACC AAGCCCGGAC ATATTAGGA
AAACTTAAAG GAATTGACGG AAGGGCACCA CCAGGAGTGG AGCTTGCBCG TTAATTTGAT TCAACACGGG GAAACTCACC AAGCCCGGAC ATATTAGGA

TTGACAGATT GAAAGCTCTT TCTTGATTCT ATGGGTGGTG GTGCATGGCC GTTCTTAGTT GGTGGAGTGA TTTGTCTGGT TAAATTCGTT AAGCAACGAG
TTGACAGATT GAAAGCTCTT TCTTGATTCT ATGGGTGGTG GTGCATGGCC GTTCTTAGTT GGTGGAGTGA TTTGTCTGGT TAAATTCGTT AAGCAACGAG
TTGACAGATT GAAAGCTCTT TCTTGATTCT ATGGGTGGTG GTGCATGGCC GTTCTTAGTT GGTGGAGTGA TTTGTCTGGT TAAATTCGTT AAGCAACGAG

ACCTTGTCTG ACTAAATAAT TACGTGCAGC TATCACTGCA TGGGCAATTT CTTAGAGGGA CTTTGGCTGC TTAACACAA GAAATTTGAG GTGATAACAG
ACCTTGTCTG ACTAAATAAT TACGTGCAGC TATCACTGCA TGGGCAATTT CTTAGAGGGA CTTTGGCTGC TTAACACAA GAAATTTGAG GTGATAACAG
ACCTTGTCTG ACTAAATAAT TACGTGCAGC TATCACTGCA TGGGCAATTT CTTAGAGGGA CTTTGGCTGC TTAACACAA GAAATTTGAG GTGATAACAG

GTCTGTGATG CCCTTAGATG TTTTGGGCTG CACGCGTCT ACACCTGGTT AATTAACGAG CTGCTGGTCT TGTTTGAAA GGTGGGGTAA ACTTTAATGT
GTCTGTGATG CCCTTAGATG TTTTGGGCTG CACGCGTCT ACACCTGGTT AATTAACGAG CTGCTGGTCT TGTTTGAAA GGTGGGGTAA ACTTTAATGT
GTCTGTGATG CCCTTAGATG TTTTGGGCTG CACGCGTCT ACACCTGGTT AATTAACGAG CTGCTGGTCT TGTTTGAAA GGTGGGGTAA ACTTTAATGT

AAATCGTGA TGGGGTGGAT TGTGCAATT ATGATCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTACG CCGAAGTCAT CAGCTTGGCC TGACTACGTC CTTGCCCTTT
AAATCGTGA TGGGGTGGAT TGTGCAATT ATGATCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTACG CCGAAGTCAT CAGCTTGGCC TGACTACGTC CTTGCCCTTT
AAATCGTGA TGGGGTGGAT TGTGCAATT ATGATCTTG AACGAGGAAT TCCTAGTACG CCGAAGTCAT CAGCTTGGCC TGACTACGTC CTTGCCCTTT

GTACACACCG CCCGTGCGTC CTACCGATTG AGTAATCCGG TGAATGCTT GGCTTGGCAG AGTGGTCATA AATGAGTGT GTGCAATAAG TCGTTTGAAC
GTACACACCG CCCGTGCGTC CTACCGATTG AGTAATCCGG TGAATGCTT GGCTTGGCAG AGTGGTCATA AATGAGTGT GTGCAATAAG TCGTTTGAAC
GTACACACCG CCCGTGCGTC CTACCGATTG AGTAATCCGG TGAATGCTT GGCTTGGCAG AGTGGTCATA AATGAGTGT GTGCAATAAG TCGTTTGAAC

CTTGTACTT AGAGGAAGGA GAAGCTGATA CAAG
CTTGTACTT AGAGGAAGGA GAAGCTGATA CAAG
CTTGTACTT AGAGGAAGGA GAAGCTGATA CAAG

```

図3. *Pyrophacus steinii* (Schiller) Wall et Dale (標本番号 030702NGt-1, 標本番号 040623NG-1) シストの SSU rDNA 塩基配列の一部と GenBank に登録されている *P. steinii* (AY443024) の SSU rDNA 塩基配列の対応。四角枠で示した 1 塩基を除いて一致した。

Fig. 3. Sequences of SSU rDNA collected from the cyst specimens of *Pyrophacus steinii* (030702NGt-104 and 040623NG-1) were correspond with those of *P. steinii* (AY443024) registered in GenBank except for one undeterminable base.

Fujii and Matsuoka (2006) が例示したような形態的特徴のみでは種同定が不可能なシスト (図4-3, 4-4) が多数捕捉されている。このようなシスト (標本番号 23.Katagami_T) を拾い出し、遺伝子解析を行った (図4-2)。分析したシストは直径約 30 μ m で球形、シスト壁は無色・平滑であり、種を同定できるだけの形態的特徴を備えていなかった。

本シストの遺伝子増幅を行い、1759 塩基の SSU rDNA 配列を得た。ついでその塩基配列と GenBank に登録されている既存の SSU rDNA の塩基配列とを比較した。その結果、今回の分析によって得られた 23.Katagami_T の SSU rDNA 塩基配列は GenBank に登録されている神奈川県ヶ島から採取された *Alexandrium hiranoi* Kita et Fukuyo (NIES612) の塩基配列 (登録番号 AY641564) と 14 塩基不明な箇所を除き一致した (図5)。

議論

生シストから直接増幅して読み出した遺伝子情報は種同定に使えるか

P. steinii の生活史や栄養細胞、シストの形態はすでに Wall and Dale (1971) や Matsuoka (1985), Pholpunthin et al. (1999) によって詳細な研究が行われており、両者の対応関係がすでに確立されている。それらの成果によると *P. steinii* の栄養細胞は単相世代で、異株・異型接合の結果、雌性配偶子と形態的特徴が一致する運動性接合子が形成される。運動性接合子は複相世代で、その鍍板配列は栄養細胞の配列と同一であることが確認されている。従って、今回の分析に供したシストを内包した運動性接合子はレンズ状の外形と鍍板配列や外形の形態学的特徴に基づいて *P. steinii* であると同定することができた。一方、運動性接合子の原形質が収縮・変成して形成されたシストは外

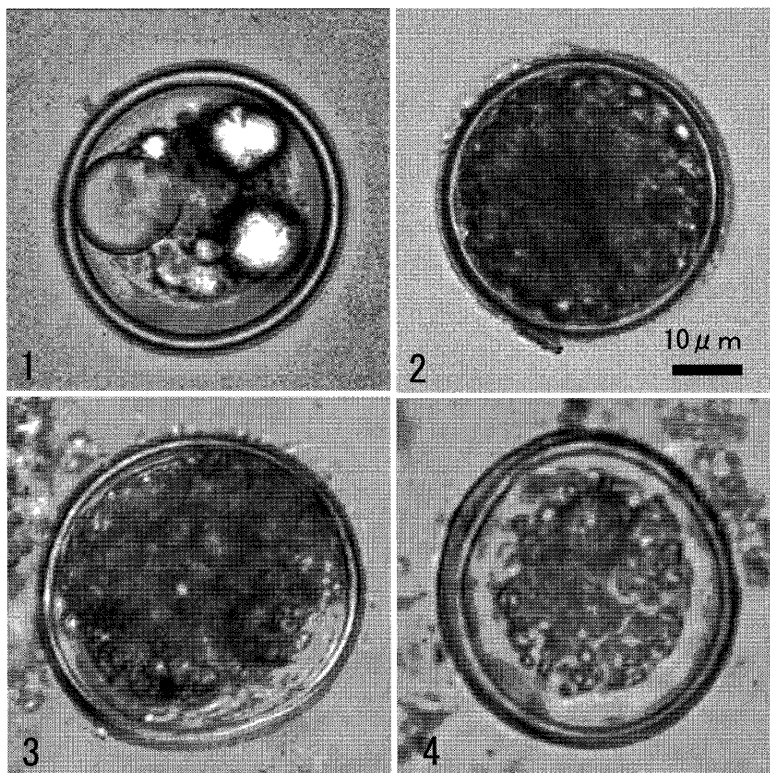


図 4. 球形で無色透明な細胞壁をもつシスト. (1) 発芽実験によって *Alexandrium affine* と同定されたシスト (Matsuoka and Fukuyo 2000; Pl. 16), (2) 標本番号 23.Katagami_T. (3)~(4) 大村湾のセディメント・トラップに捕捉された種が不明なシスト. このような形態を持つシストは *A. affine* や *A. pseudogonyaulax*, *A. hiranoi* によって形成されるが, シストの形態学的特徴のみでは種同定が不可能である.

Fig. 4. Spherical and transparent cysts without any ornaments on the surface like 23.Katagami_T (Fig. 4-2) are produced by *A. affine* (Fig. 4-1, after Matsuoka and Fukuyo 2000, Pl. 16), *A. pseudogonyaulax*, and *A. hiranoi*.

形が円盤状で, 側面から観ると多数のトックリ状突起物が 4 列に並んでいる特徴から, *T. vancampoe* と同定できた. Wall and Dale (1971) や Matsuoka (1985) は *T. vancampoe* が *P. steinii* の休眠性シストであることを培養発芽実験によって確認している.

本研究で形態的特徴から *T. vancampoe* と同定されたシスト (複相世代) の SSU rDNA 塩基配列はすでに GenBank に登録されている *P. steinii* 栄養細胞 (単相世代) のそれに 1 塩基を除き一致した. これらの事実は, 生シストから抽出した SSU rDNA を適切に増幅して塩基配列を読み取り, それを既知の栄養細胞の塩基配列データと比較検討することによって分析したシストに対応する栄養細胞を確認することが可能であること, すなわち生活史の異なった段階で著しく形態が異なる生物でも, 遺伝子という共通の基準を通して種同定が可能であることを示唆している.

シストの形態形質から種同定が困難でも核酸塩基配列から種同定は可能か

従来の研究成果によると, 球形で透明のシスト壁を持つ形態のシストは *Alexandrium affine* (Inoue et Fukuyo) Balech, *A. leei* Balech, *A. hiranoi* などの渦鞭毛藻が形成するとされてきた (例えば Matsuoka and Fukuyo, 2000).

しかし, このような外形が球形で単純な形態を持つ休眠細胞は渦鞭毛藻類以外の生物も形成する可能性がある.

本研究では形態形質だけでは種同定が困難な球形で無色透明な細胞壁をもつシストから直接 PCR を行い, SSU rDNA 増幅を行って塩基配列を明らかにし, ついで, それと GenBank に登録されている塩基配列情報と比較検討したところ, 両者は塩基配列が決定できなかった 14 塩基を除き一致した. このことから, 23.Katagami_T シストは *A. hiranoi* である可能性が極めて高いと結論した.

Alexandrium 属には麻痺性貝毒の原因種である *A. tamarense* (Lebour) Balech や *A. catenella* (Whedon et Kofoid) Balech, *A. minutum* Halim, *A. tamiyavanichii* Balech が含まれている. *A. tamarense* と *A. catenella* のシストは共に長楕円形であり, その長径には統計学的に有意な差がある (Itakura and Yamaguchi, 2005) とされるが, 光学顕微鏡下での識別は困難で, とりわけ 1 個体のシストを同定の対象とした場合には種同定は不可能である. また, 他の麻痺性貝毒原因種である *A. tamiyavanichii* のシストも球形で無色透明のシスト壁を持ち, 無毒種である *A. affine* (図 4-1) や *A. pseudogonyaulax* (Biecheler) Horiguchi, *A. hiranoi* のシストと識別が困難である. シストから SSU rDNA を直接抽出して種同定が可能であるという本研究で用いた

```

23. Katagami-T : CAGTAGTCAT ATGCTTGTCT CAAAGATTAA GCCATGCATG TTTCAGTATA AGCTTTAATT TGCCAAAACCT GCAAATGGCT CATTAAAAACA GTTATAATGC
AY641564 : CAGTAGTCAT ATGCTTGTCT CAAAGATTAA GCCATGCATG TTTCAGTATA AGCTTTAATT TGCCAAAACCT GCAAATGGCT CATTAAAAACA GTTATAATGC
ACTTGATGGT TGTGTTGCTTA CATGGATAAC TGTGGTAATC CTATAGCTAA TACATGCAC TCAAACCTGAC TCTTGTGGGA CATTAGTGTG CATTAGTGTG
ACTTGATGGT TGTGTTGCTTA CATGGATAAC TGTGGTAATC CTATAGCTAA TACATGCAC TCAAACCTGAC TCTTGTGGGA AGGTGTGTGT CATTAGTGTG
AGAACCAACC CAAGCTCTGC TTGGTATTTT GCTGATCCAG AATGGCTGAT TGAATTACAT GGCAATTGCT GGTAAATGAT CATTTCAGTT TCTGACCTAT
AGAACCAACC CAAGCTCTGC TTGGTATTTT GCTGATCCAG AATGGCTGAT TGAATTACAT GGCAATTGCT GGTAAATGAT CATTTCAGTT TCTGACCTAT
CAGCTCCCGA CGGTAAGGTA TTGGCTTACT GTGGCAATGA CGGGTAACGG AGGATTAGGG TTGATTCCG GAGAGGGAGC TTGAGAAATG GCTACCACAT
CAGCTCCCGA CGGTAAGGTA TTGGCTTACT GTGGCAATGA CGGGTAACGG AGGATTAGGG TTGATTCCG GAGAGGGAGC TTGAGAAATG GCTACCACAT
CTAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCTGAC ACAGGGAGGT AGTGACAAGA AATAACAATA CAAGGCATCC ATGTCTTGA CTGGAATGA
CTAAGGAAGG CAGCAGGCGC GCAAATTACC CAATCCTGAC ACAGGGAGGT AGTGACAAGA AATAACAATA CAAGGCATCC ATGTCTTGA CTGGAATGA
ATAGATTCTA AACCTTTCTA TTAGTATCAA TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC CAGCAGGCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTA AATTGTTGCG
ATAGATTCTA AACCTTTCTA TTAGTATCAA TTGGAGGGCA AGTCTGGTGC CAGCAGGCGC GGTAATTCCA GCTCCAATAG CGTATATTA AATTGTTGCG
GTAAAAAGC TCGTAGTTGG AANNNNNNN ATGGTGGTGA GTCCGCCCTN TGGGTTAGTA TGTGGCACAA CCACAGCAGC TCCCAAAAAC ATAACCTGCAC
GTAAAAAGC TCGTAGTTGG ATTTCTGCTG ATGGTGGTGA GTCCGCCCTN TGGGTTAGTA TGTGGCACAA CCACAGCAGC TCCCAAAAAC ATAACCTGCAC
TTGACTGTGT GGTGTGGTAT TGGGAAATTT TACTTTGAGG AAATCAGAGT GTTTCAAGCA GGCCATCCGCC TTGAATACAT TAGCATGGAA TAATAATA
TTGACTGTGT GGTGTGGTAT TGGGAAATTT TACTTTGAGG AAATCAGAGT GTTTCAAGCA GGCCATCCGCC TTGAATACAT TAGCATGGAA TAATAATA
GGATCTGGT TCTATTTTGT TGGTTTTTAT AGCCGAGGTA ATGACAATA GGGATAGTTG GGGGCAATCG TATTTAATTG TCAGAGGTGA AATTCTTGA
GGATCTGGT TCTATTTTGT TGGTTTTTAT AGCCGAGGTA ATGACAATA GGGATAGTTG GGGGCAATCG TATTTAATTG TCAGAGGTGA AATTCTTGA
TTTATTAAG ACGGACTACT GCGAAAGCAT TTGCCAAGGA TGTTTTCATT GATCAAGAAC GAAAGTTAGG GGATCGAAGA CGATCAGATA CCGTCGTAGT
TTTATTAAG ACGGACTACT GCGAAAGCAT TTGCCAAGGA TGTTTTCATT GATCAAGAAC GAAAGTTAGG GGATCGAAGA CGATCAGATA CCGTCGTAGT
CTTAACCCATA AACCATGCCA ACTAGAGATT GAAGTTGTTT ATTTATATGA TTCCCTCAGC ACCTTATGAG AAATCAAAGT CTTTGGGCTC CCGGGGGAGT
CTTAACCCATA AACCATGCCA ACTAGAGATT GAAGTTGTTT ATTTATATGA TTCCCTCAGC ACCTTATGAG AAATCAAAGT CTTTGGGCTC CCGGGGGAGT
ATGTCGCAAA GGCTGAAACT TAAAGGAATT GACGGAAGGG CACCACCAGG AGTGGAGCCT GCGGCTTAAT TTGACTCAAC ACCGGGAAAC TTACAGGTC
ATGTCGCAAA GGCTGAAACT TAAAGGAATT GACGGAAGGG CACCACCAGG AGTGGAGCCT GCGGCTTAAT TTGACTCAAC ACCGGGAAAC TTACAGGTC
CAGACATAAT AAGGATTGAC AGATTGATAG CTTTTCTTG ATTTCTATGG TGGTGGTGA TGGCCGTTG TAGTGGTGG AGTGAATTTG TGGTGAATT
CAGACATAAT AAGGATTGAC AGATTGATAG CTTTTCTTG ATTTCTATGG TGGTGGTGA TGGCCGTTG TAGTGGTGG AGTGAATTTG TGGTGAATT
CCGTTAAGCA ACGAGACCTT AACCTGTAA ATAGTTACAC ATAACCTCCG CTATGTGGGC AACCTCTTAG AGGGACTTTG TGTGTATAAC GCAAGGAAGT
CCGTTAAGCA ACGAGACCTT AACCTGTAA ATAGTTACAC ATAACCTCCG CTATGTGGGC AACCTCTTAG AGGGACTTTG TGTGTATAAC GCAAGGAAGT
TTGAGGCAAT AACAGGCTG TGATGCCCTT AGATGTTCTG GGCTGCACGC GCGCTACACT GATGTGTTCA ATGAGTTTTT TCCCTGCTG GAAAGGTTGG
TTGAGGCAAT AACAGGCTG TGATGCCCTT AGATGTTCTG GGCTGCACGC GCGCTACACT GATGTGTTCA ATGAGTTTTT TCCCTGCTG GAAAGGTTGG
GTAATCTGTT TAAAATGCAT CGTGATGGGG ATTGATTATT GCAATTATTG ATCTTAAACG AGGAATTCTG AGTAAAGCTG AGTCATCAGC TTGTGCTGAT
GTAATCTGTT TAAAATGCAT CGTGATGGGG ATTGATTATT GCAATTATTG ATCTTAAACG AGGAATTCTG AGTAAAGCTG AGTCATCAGC TTGTGCTGAT
TACGTCCTG CCGTTTGTAC ACACCCGCCG TCGCTCCTAC CGATTGAAGT ATCCGGTGAA TAATTCCGAC TGTAGCAGTG TTAGCTTCTT GAACAATGCA
TACGTCCTG CCGTTTGTAC ACACCCGCCG TCGCTCCTAC CGATTGAAGT ATCCGGTGAA TAATTCCGAC TGTAGCAGTG TTAGCTTCTT GAACAATGCA
ATGGAAGTT TAATGAACCT TATCACTTAT AGGAAGGTA AGTCGTAACA AGGTTTCCG
ATGGAAGTT TAATGAACCT TATCACTTAT AGGAAGGTA AGTCGTAACA AGGTTTCCG

```

図5. 標本番号 23.Katagami_T シストの SSU rDNA 塩基配列の一部と GenBank に登録されている *A. hiranoi* (AY641564) の SSU rDNA 塩基配列の対応。四角枠で示した 14 塩基を除いて一致した。

Fig. 5. Sequence of SSU rDNA collected from the specimen (23.Katagami_T) was mostly corresponded to those of *A. hiranoi* (AY641564) registered in GenBank excepting 14 undeterminable bases.

手法は、形態が類似しているシストを正確に種同定する場合に有効であることを示している。

遊泳細胞が確認されなくともシストからその種の存在を確認することができれば、有毒種出現の可能性を判断する上で重要な情報提供が可能になる。例えば沿岸域の堆積物中に有毒と予想される *Alexandrium* 属のシストが確認された場合に、これらのシストについて分子系統解析を実施することによってシスト群集の種構成や地理的分布を明らかにすることに繋がる (Tommasa *et al.*, 2004)。

前述のように、大村湾南部に設置したセディメント・トラップ試料には直径が異なるものその他の形態的特徴では種同定が不可能なシストが多数捕捉されている (図3-3, -4)。本研究で確立した方法を活用することによってこれらの種について対応する遊泳細胞を明らかにすることが可能であり、それを通して堆積物中の微小藻類遺骸群集がどのような種構成であるのかを明らかにすることができるとともに、いかなる生物が休眠細胞を形成するのかの理解にも貢献できる。

分子系統学的同定手法の優位性

シスト1個体を直接に分子系統解析すると発芽実験によらずとも栄養細胞と形態が著しく異なるシストの種同定が可能になることが判明した。細胞外被がセルロース質の遊泳細胞は無殻種の場合には全く保存不可能で、また有殻種でも分子系統解析を目的にしての長期保存は困難である。それに対して、シストは堆積物中でも発芽能力を

8年以上保有することがある (Mizushima and Matsuoka, 2004) ことから、遊泳細胞に比べて分析対象試料の保存・管理が容易で、取り扱いやすいといえる。

今後の課題

本研究で用いた分子系統解析方法では、比較対象となるべき栄養細胞の塩基配列が準備されていなくてはならない。現時点で渦鞭毛藻類約140種のSSU rDNAがGenBankに登録・公表されている。しかし、その多くは培養可能な独立栄養性種であり、従属栄養性種については少ない。したがって、今後単細胞PCR法を活用して、従属栄養性種の栄養細胞のSSU rDNA塩基配列情報も合わせて拡充していく必要がある。

またシストから抽出した核酸塩基配列の増幅を容易に行える方法を開発する必要がある。これまではDNA抽出の際に、先端を丸めたガラス棒を用いてスライドガラス上で直接シスト壁を破壊しているが、この方法はシスト壁が厚い種や、シストの直径が15 μm 以下の小型種には適していない。単離したシストをつぶさずにPCRチューブに入れ、液体窒素による凍結と95 $^{\circ}\text{C}$ 2分間の解凍を繰り返した後、真空状態で乾燥することでシスト壁を破壊する方法 (Bolch, 2001) や、同様にPCRチューブに移したシストを95 $^{\circ}\text{C}$ で2分以上の熱を加え、DNA分解酵素を失活させた後、乾燥させ収縮した状態のシスト壁をガラス棒で直接破壊する方法、さらには微細ステンレス針を用いて押

しつぷす方法などを試していく必要がある。DNA は乾燥後にも抽出可能であることからシストを適切に乾燥させる方法を改良することも求められる。

生シストから直接遺伝情報を読み出し、種同定が可能であることは、これまで不十分であった従属栄養種に関する情報が増加し、それによっていかなるシストの形態形質が渦鞭毛藻の系統進化を反映しているのかを考察するための素材の飛躍的な増加につながる。

謝辞

プランクトン試料やセディメント・トラップ試料採集については長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センター・沿岸環境学研究室のスタッフに依るところが大きい。記して感謝の意を表す。新潟大学・栗田裕司助教授と他の査読者には丁寧な校閲をもとに、有益なコメントを提供していただき、本稿の改善に役立った。厚くお礼申し上げる。

本研究には平成 18 年度科学研究補助金課題番号 (18340166) の一部を使用した。

引用文献

- Anderson, D. M., Aubrey, D. G., Tylar, M. A. and Coats, D. W., 1982. Vertical and horizontal distribution of dinoflagellate cysts in sediments. *Limnology and Oceanography*, **27**, 757-765.
- Bolch, C., 2001. PCR protocols for genetic identification of dinoflagellates directly from single cysts and plankton cells. *Phycologia*, **40**, 162-167.
- Dale, B., 2001. The sedimentary record of dinoflagellate cysts: looking back into the future of phytoplankton blooms. *Scientia Marina*, **65**, 257-272.
- Dale, B., Thorsen, T. A., and Fjellsa, A., 1999. Dinoflagellate cysts as indicators of cultural eutrophication in Oslofjord, Norway. *Estuarine, Coastal, and Shelf Sciences*, **48**, 371-382.
- Dodge, J. D. and Harland, R., 1991. The distribution of planktonic dinoflagellates and their cysts in the eastern and northeastern Atlantic Ocean. *New Phytologist*, **118**, 593-603.
- Ellegaard, M., Lewis, J. and Harding, I. 2002. *Gonyaulax baltica* sp. nov. (Dinophyceae) -cyst-theca relationships, life-cycle and environmentally induced morphological variations in the cyst of a new species from the Baltic. *Journal of Phycology*, **38**, 775-789.
- Ellegaard, M., Daugbjerg, N., Rochon, A., Lewis, J. and Harding, I. 2003. Morphological and LSU rDNA sequence variation within the *Gonyaulax spinifera*-*Spiniferites* group (Dinophyceae) and proposal of *G. elongata* comb. nov. and *G. membranacea* comb. nov. *Phycologia*, **42**, 151-164.
- Fensome, R. A., Taylor, F. J. R., Norris, G., Sarjeant, W. A. S., Wharton, D. I. and Williams, G. L., 1993. A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontology, Special Publication* no. 7, 1-351.
- Fujii, R. and Matsuoka, K., 2006. Seasonal change of dinoflagellates cyst flux collected in a sediment trap in Omura Bay, West Japan. *Journal of Plankton Research*, **28**, 131-147.
- Itakura, S. and Yamaguchi, M., 2005. Morphological and physiological difference between *Alexandrium* cysts (Dinophyceae) sampled from the Seto Inland Sea, Japan-evidence for differences between cysts of *A. catenella* and *A. tamarense*. *Plankton Biology and Ecology*, **52**, 85-91.
- 小林 聡・松岡数充 1984. *Protoperidinium conicum* (Gran) Balech (Dinophyceae) のシストと遊泳体. 藻類, **32**, 251-256.
- Matsuoka, K., 1976. Recent thecate and fossilized dinoflagellates off Hachinohe coast north-eastern Japan. *Bulletin of Seto Marine Biological Laboratory, Kyoto University*, **33**, 351-369.
- Matsuoka, K., 1985. Cyst and thecate forms of *Pyrophacus steinii* (Schiller) Wall and Dale, 1971. *Transaction and Proceedings of the Palaeontological Society of Japan, New Series*, no. 140, 240-262.
- Matsuoka, K., 1999. Eutrophication process recorded in dinoflagellates cyst assemblages - a case of Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan. *The Science of the Total Environment*, **231**, 17-35.
- Matsuoka, K and Fukuyo, Y., 2000. *Technical guide for modern dinoflagellates cyst study*. v+29 p., WESTPAC-HAB, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan.
- Mizushima, K. and Matsuoka, K., 2004. Vertical distribution and germination ability of *Alexandrium* spp. cysts (Dinophyceae) in the sediments collected from Kure Bay of the Seto Inland Sea, Japan. *Phycological Research*, **52**, 408-413.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. and Inouye, I. 1996. The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycological Research*, **44**, 47-55.
- Pholpunthin, P., Fukuyo, Y., Matsuoka, K. and Nimura, Y., 1999. Life history of a marine dinoflagellates *Pyrophacus steinii* (Schiller) Wall and Dale. *Botanica Marina*, **42**, 189-197.
- Takano, Y. and Horiguchi, T., 2004. Surface ultrastructure and molecular phylogenetics of four unarmored heterotrophic dinoflagellates, including the type species of the genus *Gyrodinium* (Dinophyceae). *Phycological Research*, **52**, 107-116.
- Tommasa, L. D., Danovaro, R., Belmonta, G. and Boero, F., 2004. Resting stage abundance in the biogenetic fraction of surface sediments from the deep Mediterranean Sea. *Biological Oceanography at the Turn of the Millennium. Scientia Marina*, **68** (Suppl.1), 103-111.
- Wall, D. and Dale, B., 1971. A reconsideration of living and fossil *Pyrophacus* Stein, 1883 (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, **7**, 221-235.