

东海多环旋沟藻的形态特征和系统进化分析*

王红霞 陆斗定^① 何飘霞 戴鑫烽 夏平 李冬融

(国家海洋局第二海洋研究所 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室 杭州 310012)

摘要 本文首次对分离自我国东海海域的多环旋沟藻(*Cochlodinium polykrikoides* Margalef)藻株进行了详细的分类学报道。通过运用光学显微镜、荧光显微镜、电子扫描电镜和分子生物学方法,对多环旋沟藻的形态和显微特征进行了详细的描述,并对其核糖体大亚基序列(LSU rDNA)进行了系统进化分析。该藻以单细胞或链状细胞形态存在。通常链状包括 2、4、8 和 16 个细胞。横沟宽且深围绕细胞近 2 圈,内含鞭毛。纵沟窄并浅紧挨着横沟延伸。具有 U 形顶沟,细胞核大而圆,分布在上锥的前端。叶绿体棒状,数量较多并呈簇状分布。测序获得核糖体大亚基 D1—D3 区序列为 870bp,通过构建系统发育树和 Jukes-Cantor 遗传距离矩阵可知东海多环旋沟藻藻株为东亚型。

关键词 多环旋沟藻; 东海; 形态特征; 系统进化

中图分类号 Q948

doi: 10.11693/hyhz20130700091

多环旋沟藻(*Cochlodinium polykrikoides* Margalef)为一种广布有毒藻,隶属于甲藻门(Dinophyta),甲藻纲(Dinophyceae),裸甲藻目(Gymnodiniales),裸甲藻科(Gymnodiniaceae),旋沟藻属(*Cochlodinium*)(陆斗定, 2008)。该藻裸露,以单细胞、2 个和 4 个细胞成串存在,偶尔有 8 个和 16 个细胞成串(Tomas *et al.*, 2008)。多环旋沟藻的同种异名有 *Cochlodinium heterolobatum* Silva(Silva, 1967), *Cochlodinium* sp. Schütt(Kumada *et al.*, 1980)和 *Cochlodinium catenatum* Okamura(Hargraves *et al.*, 1981)。Iwataki 等依据核糖体大亚基基因序列(LSU rDNA)所做的系统进化分析将多环旋沟藻分成了 4 支不同的地域亚型,包括东亚型(East Asian)、美国/马来西亚型(American/Malaysian)、菲律宾型(Philippines)和地中海型(Mediterranean)(Iwataki *et al.*, 2008; Rene *et al.*, 2013)。目前,旋沟藻属已大约有 40 种被描述,虽然其中一些在形态上相差甚大,但是都具有该属的特征,即横沟环绕细胞多于 1.5 圈(Iwataki *et al.*, 2007)。

Margalef(1961)于 1961 年首次对多环旋沟藻进行

了描述。近年来,多环旋沟藻在全球的各个海域陆续被报道,此藻形成的有害赤潮事件通常伴有鱼类的大量死亡,已在大西洋西岸、西太平洋、东太平洋和印度洋发生(Gárate-Lizárraga *et al.*, 2000; Morales-Blake *et al.*, 2001; Matsuoka *et al.*, 2004, 2009; Vargas-Montero *et al.*, 2004; Anton *et al.*, 2008; Azanza *et al.*, 2008; Gobler *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009a, b)。另外,该藻在亚太地区的地理分布格局已明显增加,包括日本、韩国、菲律宾、沙巴和马来西亚的热带到亚热带海域(Relox *et al.*, 2003; Azanza *et al.*, 2005; Anton *et al.*, 2008)。1995 年,在韩国由多环旋沟藻引发的赤潮导致的鱼类死亡造成了九千五百多万美元的经济损失(Kim, 1997)。而 2008—2009 年,发生在阿拉伯湾和阿曼湾的多环旋沟藻赤潮持续时间多达八个月之久,杀死了数千吨的养殖鱼(Richlen *et al.*, 2010)。

东海由于其特殊的地理条件和独特的富营养环境,已成为我国赤潮发生最严重的区域之一(张传松等, 2008)。该海域赤潮暴发在时间和规模上均有所加剧,并且有毒有害藻在不断增加(苏纪兰, 2001; 周名

*国家重点基础研究发展计划(973 计划), 2010CB428702 号; 国家自然科学基金, 41176141 号, 41376168 号; 海洋公益项目 201005015 号; 国家海洋局第二海洋研究所专项, JT1209 号, JG1223 号; 浙江省自然科学基金项目, LY12C03010 号。王红霞, 硕士, E-mail: wanghongxia0420@126.com

通讯作者: 陆斗定, 教授, 硕士生导师, E-mail: doudinglu@126.com

收稿日期: 2013-07-10, 收修改稿日期: 2013-08-10

江等, 2001), 比如新近报道的剧毒卡尔藻(*Karlodinium veneticum* J. Larsen)(王红霞等, 2011)。多环旋沟藻已在全球范围内扩张, 加之其对鱼类的有毒特性, 受到各国研究者的广泛关注。黄长江(2000)曾报道在 1998 年我国珠江口海域发生的大规模赤潮中发现了多环旋沟藻, 但在其所拍该藻的光学照片中并未见其分类特征, 而且与其相似的双胞旋沟藻(*Cochlodinium geminatum* Schütt)最近被报道在珠海发生赤潮(欧林坚等, 2010; Shen *et al.*, 2012), 因此并不能确定该藻为多环旋沟藻。本研究中将形态方法和分子方法相结合, 对分离自我国东海的多环旋沟藻藻株进行了详细的分类学描述和分子系统发育分析, 填补了我国在该藻分类学上的空白, 为多环旋沟藻在我国海域及东亚地区的地理分布情况提供科学依据, 进而为提高赤潮藻监测和预警质量奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 藻种的分离纯化和培养

实验所用藻种分离于 2011 年 7 月在东海温岭海域所采的赤潮水样。藻株分离采用逐级稀释法并结合毛细管分离法, 获得单细胞藻株(实验室编号为 LAMB110745)。藻种分离培养的条件是温度 25°C, 盐度为 30—31, 光暗循环为 L : D=12 : 12, 光照强度为 100mol/(m²·s)。

1.2 样品处理与形态观察

1.2.1 光学和荧光显微镜 利用光学显微镜(OLYMPUS CX31)观察多环旋沟藻的活体藻细胞达到一定的密度后, 取少许处于生长指数期的藻液, 用鲁哥染液固定, 然后选取 50 个藻细胞进行测量。在荧光显微镜(LEICA DM5000B)下观察多环旋沟藻细胞的叶绿体形态及分布。

1.2.2 扫描电镜 吸取指数期的藻液 5mL 于离心管中, 离心 5min(1343×g), 收集大约 0.5mL 浓缩的藻液, 然后用锇酸固定 1.5h, 并用去离子水进行洗脱。随后用一系列浓度梯度(10%、30%、50%、70%、80%、90%和 95%)的酒精各脱水 15min(De Salas *et al.*, 2008), 接着用 100%的酒精和 100%的丙酮各脱水两次。处理完后进行临界点干燥和喷金, 最后在扫描电镜(HITA CHIS-3000N)下观察结果。

1.3 分子测序与系统进化分析

1.3.1 分子测序 取指数期藻培养液 50mL, 离心 10min(1343×g), 收集藻细胞沉淀并将其转移至 EP

(Eppendorf tube)管中。然后利用 UNIQ-10 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA。提取的 DNA 序列作为 PCR 的模板来扩增大约 900bp 的 LSU rDNA 序列, 扩增引物为 D1RF 和 D3Car(Mikulski *et al.*, 2005)。PCR 的反应体系为 50μL, 包括正向引物 D1RF 和反向引物 D3Car 各 1μL, 10X 缓冲液 5μL, dNTP 混合液 4μL, TaqDNA 聚合酶 0.5μL, 基因组 DNA 提取液 2μL, 最后加无菌双蒸水至 50μL。PCR 的基本程序为: 预变性: 95°C, 5min; 94°C, 1min; 55°C, 1min; 72°C, 2min; 30 个循环; 延伸: 72°C, 5min。PCR 产物用琼脂糖凝胶进行电泳, 然后用浓度为 0.5%的 EB(溴化乙锭)染色, 最后在凝胶成像分析仪下进行凝胶成像与图谱分析。条带清晰的序列送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3.2 系统进化分析 所测得的核糖体大亚基 D1—D3 区序列先在 NCBI 中与其他藻株的序列进行比对。然后采用 ClustalW 软件包进行多序列匹配排列。其次利用 Mega4.1 软件包, 根据“Kimura 双参数”法则, 采用 Neighbor-joining(NJ)方法, 构建系统发育树, 各分支的重复数均为 1000。Jukes-Cantor 距离矩阵的构建, 则是用 Mega4.1 软件包, 采用 NJ 法, Jukes-Cantor 方式计算而获得。

2 结果

2.1 细胞形态特征

2.1.1 光学和荧光显微镜下细胞形态特征 多环旋沟藻东海藻株(LAMB110745)单细胞的大小为长 25—36μm, 宽 16—22μm。在光学显微镜下可看到细胞呈链状形态, 横沟较深且环绕细胞, 纵沟较细随着横沟延伸(图 1a)。细胞核较大, 位于上锥, 叶绿体呈条状或短棒状分布于整个细胞中(图 1b)。在荧光显微镜下可清晰看到多环旋沟藻的叶绿体为棒状, 数量较多并呈簇状分布(图 1c)。

2.1.2 扫描电镜下细胞形态特征 在扫描电镜下多环旋沟藻的单细胞上锥的顶端为圆锥形, 下锥为半球形。从细胞腹面观可见横沟宽且深, 左旋绕细胞两圈, 而且鞭毛镶嵌在横沟中。纵沟细且浅, 在上锥与横沟平行环绕细胞, 在下锥则发生错位延伸至细胞底部浅裂端(图 2a)。而从细胞背面观可见横沟在上下锥各绕细胞一圈, 在上锥纵沟在横沟下面紧挨着横沟延伸(图 2d)。在细胞的顶部有两条细且长的顶沟, 并行排列(图 2b)。从细胞的背顶面可清楚看到两条顶沟在最后端由一条短且细的沟相连, 呈 U 形(图 2e)。

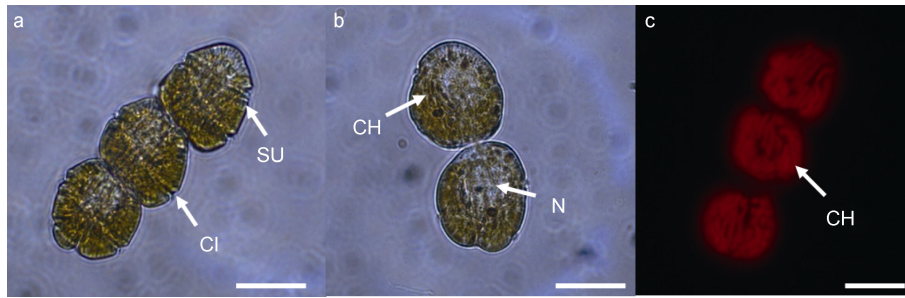


图 1 光学和荧光显微镜下多环旋沟藻(LAMB110745)的细胞形态

Fig.1 Light micrographs and laser scanning images of *Cochlodinium polykrikoides* (LAMB110745)

a. 细胞链状形态和横沟、纵沟(箭头所示); b. 细胞叶绿体和细胞核(箭头所示); c. 细胞棒状叶绿体(箭头所示)。CI: 横沟; CH: 叶绿体; N: 细胞核; SU: 纵沟。比例尺为 20 μ m

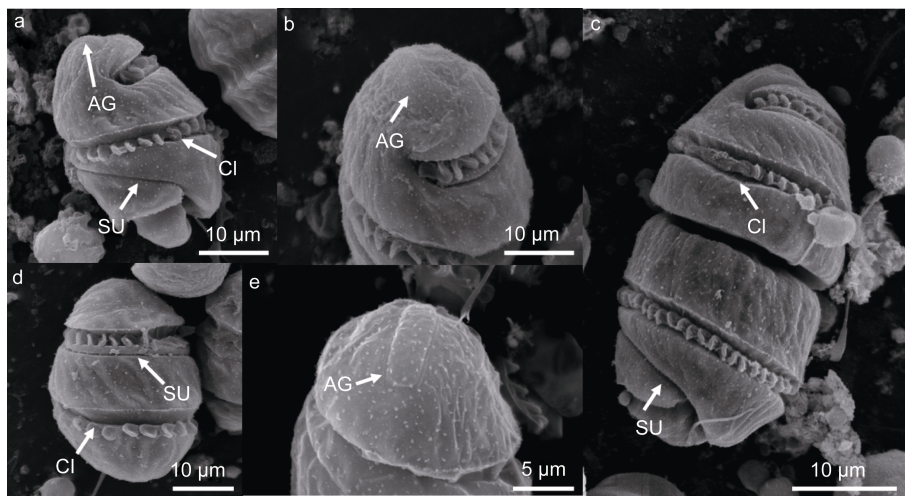


图 2 扫描电镜下多环旋沟藻(LAMB110745)的细胞形态

Fig.2 Scanning electron images of *C. polykrikoides* (LAMB110745)

a. 腹面观, 箭头示顶沟、横沟和纵沟; b. 腹面顶上看, 箭头示顶沟; c. 两个细胞连在一起腹面观, 箭头示横沟和纵沟; d. 背面观, 箭头示横沟和纵沟; e. 背面观, 箭头示 U 形顶沟。AG: 顶沟; CI: 横沟; SU: 纵沟

成串的前面细胞上锥较尖, 下锥圆且扁, 后面细胞的上锥钝圆且末端浅裂。细胞在经向稍被压缩, 横沟纵沟清晰可见, 在细胞的底部伸出一根细且长的鞭毛(图 2c)。

2.2 系统进化关系

通过正序引物“D1RF”和倒序引物“D3car”对东海藻株多环旋沟藻(LAMB110745)的核糖体大亚基 D1—D3 区进行扩序, 获得 870bp 的分子序列。将所获得的 D1—D3 区序列与 GenBank 中其他已报道的多环旋沟藻 D1—D3 区序列进行比对可知, 藻株 LAMB110745 与香港藻株(EF506623)相似度为 100%, 无碱基差异。

以 *Azadinium poporum*(KC286552)为种外群, 用邻接法构建系统发育树。从系统发育树上可知, 东海藻株(LAMB110745)与 GenBank 中的韩国藻株(EF506618、

AY725423、EF506620、EF506622、AY347309)、日本藻株(AB295045、AB288383)以及香港藻株(EF506623)聚在一起, 且支持率为 100%, 表明它们同属于东亚型。另外, 属于美国/马来西亚型的 6 株多环旋沟藻, 属于地中海型的 6 株和属于菲律宾型的 2 株藻株均以高支持率聚在一起, 表明多环旋沟藻藻株具有明显的地域差异。

利用 Mega4.1 软件包构建系统发育分析中各藻株间的遗传距离矩阵(表 1)。多环旋沟藻东海藻株(LAMB110745)与同属于东亚型的香港、韩国和日本藻株亲缘关系近, 遗传距离均为 0.000。而与美国/马来西亚型和菲律宾型的多环旋沟藻藻株的亲缘关系次之, 这与系统发育树相吻合。测序的东海藻株多环旋沟藻与种外群 *Azadinium poporum* 亲缘关系最远, 遗传距离为 0.121。

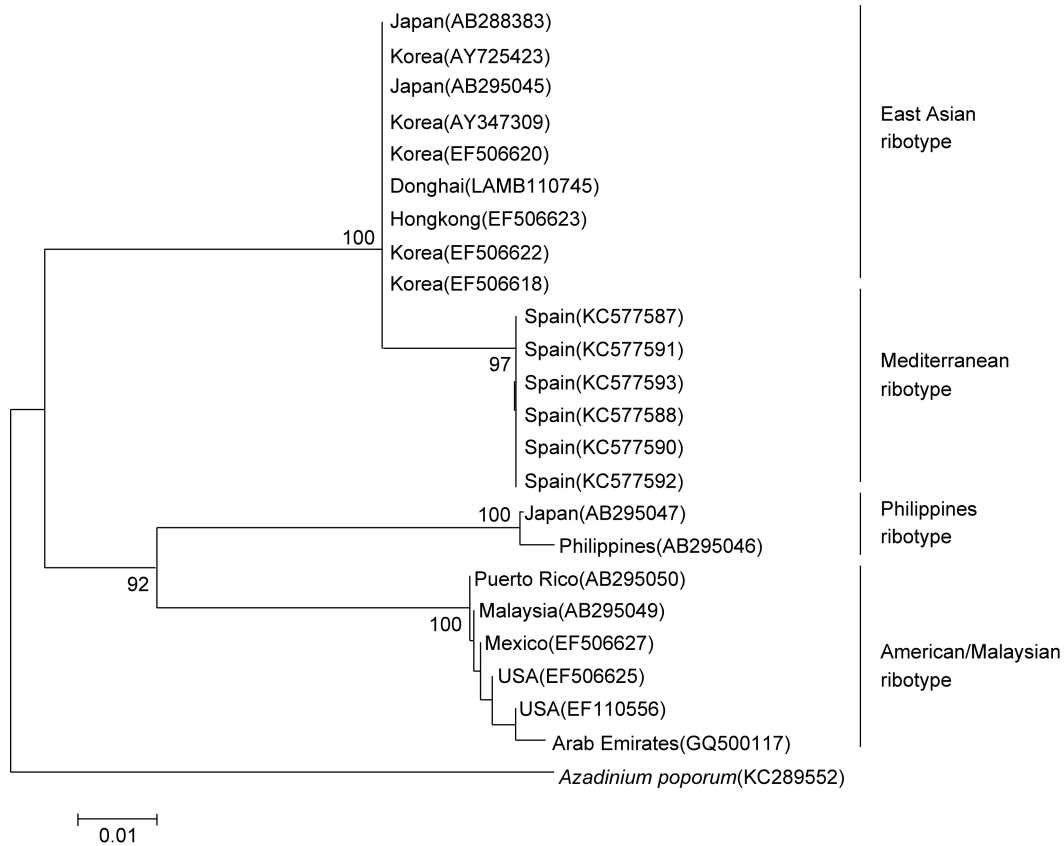


图3 基于核糖体大亚基 D1—D3 区所构建的多环旋沟藻的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic trees of the *C. polykrikoides* based on the D1—D3 rDNA sequences
重复抽样次数为 1000 次, *Azadinium poporum* 为种外参考群

3 讨论

有研究指出,多环旋沟藻的细胞形态和形成的赤潮周期存在密切关系(Tomas *et al.*, 2008)。此外,有效证据表明旋沟藻属可产生暂时性和休眠性孢子,这可能与它们的生活史相关,并导致该属在全球扩张(Kudela *et al.*, 2012)。

在对多环旋沟藻的鉴定和识别中,形态特征很重要,包括细胞大小和形状,棒状叶绿体和横沟的旋转度,横沟绕细胞 1.8—1.9 圈(Faust *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2008)。从马来西亚分离得到的多环旋沟藻标本长 50 μ m,而从日本、韩国和美国东北部分离的藻株较小些,为 30—40 μ m(Matsuoka *et al.*, 2008)。此外,Anton 等(2008)报道的分离于马来西亚沙巴州的多环旋沟藻藻株长为 28—40 μ m,宽为 20—22 μ m。该藻株与本研究中的东海藻株单细胞个体大小相近,可能是实验室培养条件没有达到最佳或是细胞处于生长前期所致。阿拉伯湾分离的多环旋沟藻藻株横沟绕细胞 1.6—1.9 圈(Richlen *et al.*, 2010),而

报道的马来西亚沙巴州的藻株横沟绕细胞近两圈,与东海藻株相似。棒状叶绿体对区分多环旋沟藻与相似种褐色旋沟藻(*Cochlodinium fulvescens* Iwataki, Kawami and Matsuoka)和卷曲旋沟藻(*Cochlodinium convolutum* Kofoid and Swezy)至关重要。多环旋沟藻东海藻株的叶绿体为棒状,且呈簇状并行分布。此外,多环旋沟藻的顶沟呈 U 形,且在细胞的背面与纵沟的延伸部分相连。在被描述的顶沟形态中,裸甲藻马蹄状的顶沟和多环旋沟藻的有些相似(Iwataki *et al.*, 2010)。

Shao 等(2004)从分子方面很好地证实了旋沟藻(*Cochlodinium*)与裸甲藻(*Gymnodinium*)、前沟藻(*Amphidinium*)、环沟藻(*Gyrodinium*)、卡尔藻(*Karlodinium*)及凯伦藻(*Karenia*)有明显的差异。多环旋沟藻与杀鱼费氏藻(*Pfisteria piscicida* Steidinger and Burkholder)和红色赤潮藻(*Akashiwo sanguinea* G. Hansen and Moestrup)聚成一支,更亲近些。基于 LSU rDNA 所做的系统进化分析可区分旋沟藻属的多环旋沟藻和褐色旋沟藻,且褐色旋沟藻是多环旋沟藻的姐妹群,亲

表 1 不同多环旋沟藻株 LSU rDNA D1—D3 区序列的 Jukes-Cantor 距离矩阵
Tab.1 Pairwise distance matrix of Jukes-Cantor among different *C. polykrikooides* strains

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
1 Donghai(LAMB110745)	0.000																							
2 Hongkong(EF506623)	0.000	0.000																						
3 Korea(EF506622)	0.000	0.000	0.000																					
4 Korea(EF506620)	0.000	0.000	0.000	0.000																				
5 Korea(EF506618)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																			
6 Korea(AY347309)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
7 Japan(AB288383)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																	
8 Japan(AB295045)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																
9 Korea(AY725423)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
10 Puerto Rico(AB295050)	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090														
11 Mexico(EF506627)	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.000	0.000													
12 USA(EF506625)	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.000	0.000	0.000												
13 Malaysia(AB295049)	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.090	0.000	0.000	0.000	0.000											
14 Japan(AB295047)	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.085	0.085	0.085	0.085	0.085										
15 USA(EF110556)	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.000	0.000	0.000	0.000	0.090	0.090									
16 Arab Emirates (GQ500117)	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.102	0.000	0.000								
17 Philippines(AB295046)	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.089	0.089	0.089	0.089	0.005	0.094	0.105	0.105							
18 Spain(KC577587)	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.118	0.118	0.118	0.118	0.123	0.119	0.121	0.127	0.127						
19 Spain(KC577588)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.118	0.118	0.118	0.118	0.123	0.119	0.121	0.127	0.000	0.000					
20 Spain(KC577590)	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.130	0.130	0.130	0.130	0.133	0.130	0.133	0.138	0.000	0.000	0.000				
21 Spain(KC577591)	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.118	0.118	0.118	0.118	0.123	0.119	0.121	0.127	0.000	0.000	0.000	0.000			
22 Spain(KC577592)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.119	0.119	0.119	0.119	0.124	0.120	0.121	0.128	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
23 Spain(KC577593)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.118	0.118	0.118	0.118	0.123	0.119	0.121	0.127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
24 <i>A. poporum</i> (KC286552)	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.129	0.129	0.129	0.129	0.137	0.129	0.129	0.136	0.128	0.129	0.105	0.128	0.128	0.128	

缘关系较近(Iwataki *et al*, 2008)。有研究指出,核糖体大亚基D1—D3区适用于多环旋沟藻种内藻株间水平的鉴定(Ki *et al*, 2008)。本实验选取 LSU rDNA D1—D3区作为分子指标来区分多环旋沟藻藻株不同的地域亚型,通过系统进化分析比较得出多环旋沟藻东海藻株(LAMB110745)属于东亚型。

多环旋沟藻为有毒有害赤潮藻,加之其在全球的扩张,对沿海区的渔业、生态环境和旅游业造成严重影响,已引起各国研究者的广泛关注。但是因其在形态结构上与旋沟藻属其他藻种相似,且这些藻很难进行培养,所以很难精确地对其进行分类鉴定。本研究对多环旋沟藻东海藻株进行了光学形态、显微结构和分子系统进化方面的分析,而关于其个体生态学、毒理学特性及扩张机制等有待进一步研究。

参 考 文 献

- 王红霞, 陆斗定, 黄海燕等, 2011. 东海剧毒卡尔藻的形态特征及其系统进化分析. 植物学报, 46(2): 179—188
- 苏纪兰, 2001. 中国的赤潮研究. 中国科学院院刊, 16: 339—342
- 张传松, 王江涛, 朱德弟等, 2008. 2005年春夏季东海赤潮过程中营养盐作用初探. 海洋学报, 30(2): 153—159
- 陆斗定, 2008. 甲藻门(Phylum Dinophyta, Pyrrophyta). 刘瑞玉编著. 中国海洋生物名录. 北京: 科学出版社, 175
- 欧林坚, 张玉宇, 李扬等, 2010. 广东珠海双胞胎旋沟藻 *Cochlodinium geminatum* 赤潮事件分析. 热带海洋学报, 29(1): 57—61
- 周名江, 朱明远, 张经, 2001. 中国赤潮的发生趋势和研究进展. 生命科学, 13(2): 54—59
- 黄长江, 董巧香, 2000. 1998年春季珠江口海域大规模赤潮原因生物的形态分类和生物学特征 II. 海洋与湖沼, 31(3): 233—238
- Anton A, Teoh P L, Mohd-Shaleh S R *et al*, 2008. First occurrence of *Cochlodinium* blooms in Sabah, Malaysia. Harmful Algae, 7(3): 331—336
- Azanza R V, David L T, Borja R T *et al*, 2008. An extensive *Cochlodinium* bloom along the western coast of Palawan, Philippines. Harmful Algae, 7(3): 324—330
- Azanza R V, Baula I U, 2005. Fish kills associated with *Cochlodinium* blooms in Palawan, the “last frontier” of the Philippines. Harmful Algae News, 29: 13—14
- De Salas M F, Laza-Martínez A, Hallegraeff G M, 2008. Novel unarmored dinoflagellates from the toxigenic family Karniaceae (Gymnodiniales): five new species of *Karlodinium* and one new *Takayama* from the Australian sector of the southern ocean. Journal of Phycology, 44(1): 241—257
- Faust M A, Gulledge R A, 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. Smithsonian Institution Contributions from the United States National Herbarium, 42: 1—144
- Gárate-Lizárraga I, Bustillos-Guzmán J J, Morquecho L *et al*, 2000. First outbreak of *Cochlodinium polykrioides* in the Gulf of California. Harmful Algae News, 21: 7
- Gobler C J, Berry D L, Anderson O R *et al*, 2008. Characterization, dynamics, and ecological impacts of harmful *Cochlodinium polykrioides* blooms on eastern Long Island, NY, USA. Harmful Algae, 7(3): 293—307
- Hargraves P E, Viquez R, 1981. The dinoflagellate red tide in Golfo Nicoya, Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 29(1): 31—38
- Iwataki M, Hansen G, Moestrup Ø *et al*, 2010. Ultrastructure of the harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides* (Dinophyceae) with reference to the apical groove and flagellar apparatus. Harmful Algae, 57(4): 308—321
- Iwataki M, Kawami H, Mizushima K *et al*, 2008. Phylogenetic relationships in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences. Harmful Algae, 7(3): 271—277
- Iwataki M, Kawami H, Matsuoka K, 2007. *Cochlodinium fulvescens* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new chain-forming unarmored dinoflagellate from Asian coasts. Phycological Research, 55(3): 231—239
- Ki J S, Han M S, 2008. Implications of complete nuclear large subunit ribosomal RNA molecules from the harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides* (Dinophyceae) and relatives. Biochemical Systematics and Ecology, 36(7): 573—583
- Kim H G, 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. Ocean Research (Seoul), 19: 185—192
- Kudela R M, Gobler C J, 2012. Harmful dinoflagellate blooms caused by *Cochlodinium* sp.: Global expansion and ecological strategies facilitating bloom formation. Harmful Algae, 14: 71—86
- Kumada K, Takeda K, Aramaki T, 1980. Yatsushiro Kaiiki, Tatsushiro Kai-2. In: Fisheries Agency, Fukuokaken Suisan Shikenjou, Sagaken Suisan Shikenjou, Nagasakiken Suisan Shikenjou, Kumamoto Suisan Shikenjou, Kagoshimaken Suisan Shikenjou eds. Kyushu Seikaiiki Akashio Yosatsu Chosa Hokokusho, 125—136
- Margalef R, 1961. Hidrografia y fitoplancton de un area marina de la costa meridionale de Puerto Rico. Investigaciones Pesqueras, 18: 33—96
- Matsuoka K, Iwataki M, 2009. Taxonomy and geographical distribution of the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides*. Bulletin of Plankton Society of Japan, 56: 27—30
- Matsuoka K, Iwataki M, Kawami H, 2008. Morphology and taxonomy of chainforming species of the genus *Cochlodinium* (Dinophyceae). Harmful Algae, 7(3): 261—270
- Matsuoka K, Iwataki M, 2004. Present status in study on a harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides* Margalef. Bulletin of Plankton Society of Japan, 51: 38—45
- Mikulski C M, Morton S L, Doucette G J, 2005. Development and application of LSU rRNA probes for *Karenia brevis* in the Gulf of Mexico, USA. Harmful Algae, 4(1): 49—60
- Morales-Blake A, Cavazos-Guerra C, Hernández-Becerril D, 2001. Unusual HABs in Manzanillo Bay, Colima, Mexico. Harmful Algae News, 22: 6
- Relox J J R, Bajarías F F A, 2003. Harmful algal blooms (HABs) in the Philippines. In: Furuya K, Fukuyo Y eds. Extended Abstracts of Workshop on Red Tide Monitoring in Asian Coastal Waters. University of Tokyo, Tokyo, Japan, March

- 10—12: 65—68
- Rene A, Garcés E, Camp J, 2013. Phylogenetic relationships of *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Gymnodiniales, Dinophyceae) from the Mediterranean Sea and the implications of its global biogeography. *Harmful Algae*, 25: 39—46
- Richlen M L, Morton S L, Jamali E A *et al*, 2010. The catastrophic 2008—2009 red tide in the Arabian gulf region, with observations on the identification and phylogeny of the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *Harmful Algae*, 9(2): 163—172
- Silva S E, 1967. *Cochlodinium heterolobatum* n. sp: Structure and some cytophysiological aspects. *Journal of Protozool*, 14(4): 745—754
- Shao P, Chen Y Q, Zhou H *et al*, 2004. Genetic variability in *Gymnodiniaceae* ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis. *Marine Biology*, 144(2): 215—224
- Shen P P, Li Y N, Qi Y Z *et al*, 2012. Morphology and bloom dynamics of *Cochlodinium geminatum* (Schütt) in the Pearl River Estuary, South China Sea. *Harmful Algae*, 13: 10—19
- Tang Y Z, Gobler C J, 2009a. Characterization of the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides* isolates from Northeast U.S. estuaries to finfish and shellfish. *Harmful Algae*, 8(3): 454—462
- Tang Y Z, Gobler C J, 2009b. *Cochlodinium polykrikoides* blooms and clonal isolates from the northwest Atlantic coast cause rapid mortality in larvae of multiple bivalve species. *Marine Biology*, 156(12): 2601—2611
- Tomas C R, Smayda T J, 2008. Red tide blooms of *Cochlodinium polykrikoides* in a coastal cove. *Harmful Algae*, 7(3): 308—317
- Vargas-Montero M, Freer E, Jiménez-Montealegre R *et al*, 2004. Extensive blooms due to *Cochlodinium polykrikoides*: new to Costa Rica. *Harmful Algae News*, 26: 7

MORPHOLOGY AND PHYLOGENY OF DINOFLAGELLATE *COCHLODINIUM POLYKRIKOIDES* FROM THE EAST CHINA SEA

WANG Hong-Xia, LU Dou-Ding, HE Piao-Xia, DAI Xin-Feng, XIA Ping, LI Dong-Rong
(*Lab of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012, China*)

Abstract A dinoflagellate strain *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (LAMB110745) was isolated from the East China Sea and the taxonomy reported first time in China. The strain is described in morphology using light microscope, fluorescence microscope, and scanning electron microscope, and in phylogeny using partial analysis for the large subunit ribosomal RNA gene (LSU rDNA). The results show that the cells are 26—35 μ m long and 15—22 μ m wide. The *C. polykrikoides* strain was shown as a single cell or chainlike cells. The number of cells in chain could be 2, 4, 8, and even 16. The cingulum is highly concave and encircles a cell nearly twice. The flagellate is intertwined in the cingulum. The sulcus runs closely down just below the cingulum. The nucleus is large and located at the anterior of the epicone. There are many chloroplasts distributed within cells and they are rod-like in shape. The LSU rDNA D1—D3 sequences is 870bp long. The phylogenetic tree and pairwise distances of Jukes-Cantor were acquired based on the D1—D3 sequences, indicating that the strain LAMB110745 is of the East Asian ribotype.

Key words *Cochlodinium polykrikoides*; morphology; phylogeny; East China Sea