

以核內之內轉錄區間序列探討  
珊瑚共生藻系群的遺傳變異與演化

Genetic Variation and Evolution of *Symbiodinium* in Corals  
Based on Phylogeny Reconstructed from the Nuclear Internal  
Transcribed Spacer (ITS rDNA) Sequences

朱育民<sup>1,3,\*</sup> 陳啓祥<sup>1,2</sup> 蔣鎮宇<sup>3</sup> 蕭義勇<sup>1,2</sup> 方力行<sup>4</sup>

Yu-Min Ju<sup>1,3,\*</sup>, Chii-Shiang Chen<sup>1,2</sup>, Tzen-Yuh Chiang<sup>3</sup>, Yi-Young Hsiao<sup>1,2</sup>  
and Lee-Shing Fang<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 國立海洋生物博物館 屏東縣車城鄉後灣村後灣路 2 號

<sup>2</sup> 國立東華大學海洋生物科技研究所 屏東縣車城鄉後灣村後灣路 2 號

<sup>3</sup> 國立成功大學生命科學系 台南市大學路 1 號

<sup>4</sup> 正修科技大學運動健康與休閒系所 高雄縣鳥松鄉澄清路 840 號

<sup>1</sup> National Museum of Marine Biology and Aquarium, Pingtung, Taiwan

<sup>2</sup> Institute of Marine Biotechnology, National Dong Hwa University, Pingtung, Taiwan

<sup>3</sup> Department of Life Sciences, Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

<sup>4</sup> Department of Kinesiology, Health and Leisure Studies, Cheng Shiu University, Kaohsiung, Taiwan

\* 通訊作者：yumine@nmmba.gov.tw

\* Corresponding author: yumine@nmmba.gov.tw

## 摘 要

共生藻(*Symbiodinium*)與珊瑚所形成的互利共生(mutualism)在珊瑚生態系扮演著重要的角色。在珊瑚中常見的共生藻有 4 種系群(clade)，分別為 A、B、C 及 D 系群。本研究以珊瑚主要共生藻系群的細胞核之內轉錄區間(internal transcribed spacer; ITS rDNA)序列，探討共生藻基因組成上的差異、親緣關係與演化路徑。結果顯示，共生藻 ITS rDNA 序列平均總長度介於 526-576 bp，

G+C 百分比介於 47.5-53.8%，而 A 系群在序列長度及 G+C 百分比均低於 4 種共生藻系群的平均值。共生藻 ITS rDNA 區段在系群內的遺傳距離為 0.00-0.052，系群間的遺傳距離為 0.283-0.677，由親緣樹狀圖呈現系群間有明顯的分群現象，且 A 系群位於共生藻的最外群，而 A 系群在親緣網狀圖具有古老單型(haplotype)，顯示出在共生藻的分歧演化(divergent evolution)中，A 系群與其他系群有特殊的演化軌跡，而這可能與共生藻從寄生(parasitism)到互利共生(mutualism)的演化過程有關。

## Abstract

Mutualistic relationship between *Symbiodinium* and corals is crucial importance for the coral reef ecosystem. Using ITS rDNA sequences, we reconstructed the phylogeny of the *Symbiodinium*. The lengths of the sequences were 526 to 576 bp and the G+C contents were 47.5 to 53.8%. There were four major clades A to D with the genetic distances of 0.283 to 0.677 among the clades and 0.00 to 0.052 among the species within the clades, indicating that there was long divergence among the four clades. A phylogenetic neighbor-joining tree displayed a step-wise differentiation from Clade A, the basal lineage, through Clades D and B to Clade C. The minimum spanning network also revealed that Clade A was ancestral form and clades B, C and D were its evolutionary trajectories. The phylogenetic relationship of the four clades expressed the divergent evolution of *Symbiodinium* from parasitism to mutualism in corals.

**關鍵詞：**共生藻、細胞核內轉錄區間、演化

**Key words:** *Symbiodinium*, ITS rDNA (internal transcribed spacer), evolution

收件日期：99 年 7 月 27 日

接受日期：99 年 10 月 4 日

Received: July 27, 2010

Accepted: October 4, 2010

## 緒 言

共生藻是一種單細胞的渦鞭毛藻(dinoflagellates)，在許多的海洋無脊椎動物(如珊瑚與海葵)及單細胞生物(如有孔蟲)的宿主上形成共生(symbiosis)關係(Baillie *et al.* 2000; LaJeunesse 2001; Pawlowski *et al.* 2001; Pochon *et al.* 2001)。可存於造礁珊瑚組織的內胚層中並行光合作

用，提供宿主珊瑚成長所需要的 O<sub>2</sub> 及營養物質。相對的，宿主動物在氧化代謝的過程中，提供共生藻所需要的 CO<sub>2</sub> 及含氮營養鹽，兩者建立了互利共生(mutualism)關係(Goulet and Coffroth 2003)。共生藻的共生作用具有加速有機碳循環與形成珊瑚骨骼的功能，為熱帶珊瑚礁形成的先決條件，當珊瑚受到干擾而失去共生藻時，珊瑚出現白化(bleaching)現象，而長

時間的白化通常會造成珊瑚的死亡(Ware *et al.* 1996)。

共生藻的外觀顏色為黃褐色，形態幾乎相同而無法進一步區分，因此早年稱之蟲黃藻(zooxanthellae) (Taylor 1974)，然而經由核體28S 與葉綠體23S rDNA 基因之分子鑑定，可將共生藻分類為A-I等9個系群(clades) (Pochon and Gates 2010)，在珊瑚上的共生藻主要為A、B、C及D系群(Pochon *et al.* 2006)。A系群在遺傳序列上具有高度的歧異度(divergence) (Santos *et al.* 2003)，曾在刺細胞生物及軟體動物上發現，但未曾在有孔蟲(foraminifera)上發現(Pochon *et al.* 2006)，主要分布於西太平洋(Baker and Rowan 1997)及紅海區域(Barneah *et al.* 2004)。B系群常存於造礁珊瑚上，並曾在柳珊瑚(*Briareum* sp.)上發現(Santos *et al.* 2003, 2004; Lewis and Coffroth 2004)，廣泛存於西太平洋(Baker and Rowan 1997)。C系群廣泛存於造礁珊瑚上，曾在有孔蟲及纖毛蟲(ciliates)上發現(Lobban *et al.* 2002)，分布於印度—太平洋區域，為溫度敏感型(temperature sensitivity)，不耐高溫環境，與珊瑚在高溫環境下所造成之白化事件有關(Baker *et al.* 2004; Rowan 2004)。D系群常存於西太平洋、熱帶地區之造礁珊瑚上，為溫度耐受型(thermally tolerant)，可在增溫海域的白化珊瑚中發現(Baker *et al.* 2004; Rowan 2004)，並具有逆境適應性(Chen *et al.* 2003)。

rDNA 由於其序列高度保守及廣存於生物體，使其基因序列成為建構親緣關係與探討演化的重要工具(Pochon *et al.* 2004)。rDNA 為一群縱線排列(tandem array)的重複性基因族(repeated gene families)，位於染色體的核仁組成區域(nucleolar organizer region)。每個重覆單位(repeat unit)中，含有可轉錄區域，包括18S、5.8S及28S rDNA等3個基因，而在18S、5.8S及28S rDNA 基因間各有一個內轉錄間隔區(internal transcribed spacer; ITS)，在rDNA

中18S、5.8S及28S rDNA 基因序列，在不同物種間相當一致，但在ITS區域中，不同物種間之長度及序列上常有很大變異，使得ITS常被研究於屬間或屬內之親緣關係及演化上的探討(Baldwin *et al.* 1995; Chiang and Schaal 2000; Bellarosa *et al.* 2005)。因此，本研究嘗試從基因資料庫中所搜尋珊瑚的主要共生藻系群之ITS rDNA 序列，探討共生藻基因組成上的差異、親緣關係與演化路徑。

## 材料與方法

### 一、共生藻 ITS rDNA 區段序列搜尋

從已發表的文獻中查詢得到4種珊瑚共生藻系群(A, B, C及D系群) (Baillie *et al.* 2000; LaJeunesse 2001; Santos *et al.* 2002; Diekmann *et al.* 2003; Reimer *et al.* 2006; Reimer *et al.* 2007; Thornhill *et al.* 2007; Santiago-Vazquez *et al.* 2007; Reimer and Todd 2009)。將所得ITS rDNA 整區段序列，利用美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) GenBank 的BLAST 線上軟體(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)進行基因庫比對，再篩選出相似度高珊瑚共生藻ITS rDNA 區段序列(表1)，所得的序列以Clustal X 1.81 程式(Thompson *et al.* 1997)完成比對及排列，並將共生藻之ITS rDNA 序列，以位於18S和5.8S rDNA 之間定為ITS1；5.8S和28S rDNA 之間定為ITS2，逐一定義出共生藻ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 之相關位置(圖1)。由於ITS1與ITS2之鹼基變異較大，為盡量減少排列時所形成的gap 數目，因此將spacer區域以人工手動方式加以逐一挑出，再依同源性的原理逐一檢視與修正。

### 二、序列分析

利用DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution, Version 4.10) (Xia and Xie 2001)來計算鹼基組成的百分比。將排序後

表 1. 序列代碼與 NCBI 資料庫序列登錄號對照表

Table 1. A list of sample codes and NCBI accession numbers of four *Symbiodinium* clades (A-D)

A		B		C		D	
Code	NCBI	Code	NCBI	Code	NCBI	Code	NCBI
S1	AF186055	S33	AF458607	S58	DQ068038	S85	EU074902
S2	AF186058	S34	AF458608	S59	DQ068040	S86	EU074898
S3	AF186059	S35	AF458609	S60	DQ068042	S87	EU074901
S4	AF186060	S36	AF458611	S61	DQ068044	S88	AF174553
S5	AF186061	S37	AF458612	S62	DQ480631	S89	AF174554
S6	AF186062	S38	AF458613	S63	DQ889737	S90	AF174556
S7	AF186063	S39	AY876596	S64	DQ889741	S91	AF174566
S8	AF186069	S40	AY876598	S65	DQ889743	S92	AF174574
S9	AF195149	S41	AY876599	S66	DQ889744	S93	EU333710
S10	AB253789	S42	AY876600	S67	EU074885	S94	EU333714
S11	AF333505	S43	AY894809	S68	EU074887	S95	AF174544
S12	AF333508	S44	AY894810	S69	EU074892	S96	AF174545
S13	AF427466	S45	AY894812	S70	EU634159	S97	AF174546
S14	AB190281	S46	DQ238587	S71	EU074965	S98	AF174547
S15	AB190282	S47	EU074863	S72	AB207190	S99	AF174551
S16	AB190285	S48	EU074864	S73	AF427469	S100	AF174552
S17	AB207200	S49	EU074865	S74	DQ068025	S101	AF174562
S18	AB190283	S50	EU074866	S75	DQ068043	S102	EU074903
S19	AB207201	S51	EU074867	S76	DQ335307	S103	EU074904
S20	AB207202	S52	EU074868	S77	DQ335355	S104	EU074905
S21	AB207205	S53	EU074870	S78	DQ335356	S105	EU074909
S22	AB207206	S54	EU074871	S79	DQ335357	S106	EU074911
S23	AB207208	S55	EU074872	S80	DQ480598	S107	EU074912
S24	AB207209	S56	EU074874	S81	DQ480616		
S25	EU074856	S57	EU074875	S82	DQ480618		
S26	EU074858			S83	EU074963		
S27	EU074859			S84	EU074964		
S28	EU074860						
S29	EU074861						
S30	EU074862						
S31	EU074867						
S32	EU074962						



圖 1. ITS rDNA 示意圖(ITS rDNA 包含 ITS1-5.8S-ITS2 區段)。

Fig. 1. The ITS1-5.8S-ITS2 region of ITS rDNA sequences.

的 DNA 以 MEGA 4.0 套裝軟體，以雙參數模式(two-parameter model)的方法計算鹼基替代率及遺傳距離(Kimura 1980)，利用聚類分析法(neighbor-joining method)原理(Saitou and Nei 1987)構築出 4 種共生藻系群每一個基因的基因樹狀圖。NJ tree 中每一個 group 之可信度利用不加權重、重複 1,000 次的bootstrap 分析檢測(Felsenstein 1985)；bootstrap 數值大於 70 時，相當於統計學上 95% 信心水準支持(Hillis and Bull 1993)。由所得到的基因樹狀圖，可加以比對所篩選出的共生藻系群所屬類群。

### 三、親緣網狀圖

利用 MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007)軟體計算單型(haplotype)間的突變數，所得數據以 MINSNET 軟體(Excoffier and Smouse 1994)建構親緣網狀圖 minimum spanning network (Excoffier *et al.* 1992)，藉以追溯單型間的親緣關係與演化途徑。

## 結 果

從 NCBI 基因資料庫所搜尋到的珊瑚共生藻 ITS rDNA，含細胞核內部分 18S 和部分 28S rDNA，序列總長度約 730 bp，扣除 18S rDNA 及 28S rDNA 片段序列，ITS rDNA 序列平均總長度介於 526-576 bp，包含 ITS1 區、5.8S 區和 ITS2 區。其中 ITS1 區平均長度介於 202-227

bp、ITS2 區介於 164-198 bp、5.8S rDNA 區則介於 156-158 bp 之間。序列最長的為 D 系群(576 bp)，最短為 A 系群(526 bp)。由於 ITS2 區鹼基變異較大，經去除 space 排序後共生藻 ITS rDNA 總長度為 547 bp。分析序列中 4 種鹼基比例，在全段 ITS rDNA 區間序列，各系群平均的 G+C 百分比分別為 47.5% (A 系群)、53.8% (B 系群)、54.2% (C 系群)及 52.9% (D 系群)，4 種共生藻系群的平均 G+C 百分比為 52.1%，經分析 5.8S rDNA 基因的 G+C 百分比介於 50.6-61.6%；ITS1 及 ITS2 區域之 G+C 百分比分別介於 47.7-55.8% 及 44.3-51.9% 之間(表 2)。

4 種珊瑚共生藻 ITS rDNA 區段之遺傳距離範圍約在 0.00-0.677 之間，系群內最小的遺傳距離值為 0.00 (data not shown)，最大的遺傳距離為 A 系群的 0.052 (S15-S28)。系群間遺傳距離最小的是 B 系群和 C 系群；遺傳距離值為 0.283 (S52-S58)。最大的是 A 系群和 D 系群，遺傳距離值為 0.677 (S15-S99) (表 3)。

以 neighbor-joining (NJ) 法及 maximum parsimony (MP) 法所建構的基因樹狀圖中，其系群的組成結構完全相同。在樹狀圖上，A 系群首先被分出來，B 系群與 C 系群互成姐妹群，再分出 D 系群，整體呈現了 [(B, C), D], A 的親緣結構(圖 2)。親緣樹狀圖上的 bootstrap 值皆高於 75%。為了探究共生藻單型的演化路徑，進一步利用 minimum spanning network，

表 2. 共生藻系群 ITS rDNA 區域序列平均長度與 GC 百分比

**Table 2.** Sequence sizes (bp) and G+C contents (%) of four *Symbiodinium* clades (A-D) of the ITS rDNA

<i>Symbiodinium</i> clade	ITS1		ITS2		5.8S		Total length	
	Size	G+C	Size	G+C	Size	G+C	Size	G+C
A	202	47.7	164	44.3	158	50.6	526	47.5
B	211	55.8	198	51.9	156	53.6	567	53.8
C	223	54.0	192	47.0	157	61.6	574	54.2
D	227	55.6	190	50.4	157	52.7	576	52.9



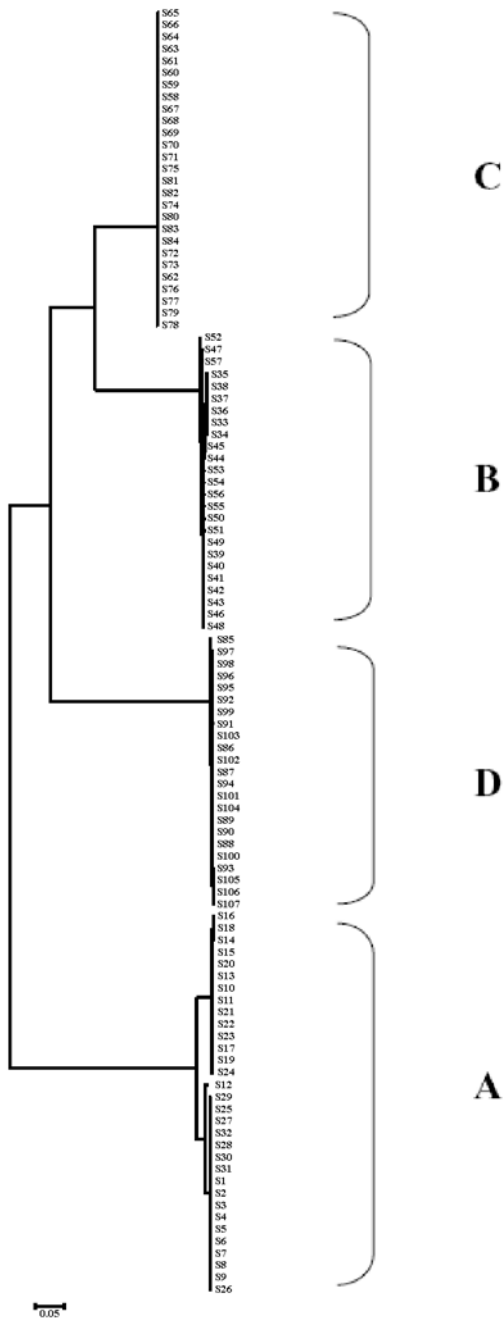


圖 2. 4 種共生藻系群 ITS rDNA 的 neighbor-joining 親緣樹狀圖。

Fig. 2. The neighbor-joining tree reconstructed from the ITS rDNA sequences of *Symbiodinium* (A-D, four major clades).

藉以追溯各單型間的親緣關係與演化路徑。從親緣網狀圖(圖 3)結果顯示，所有的單型可區分為 4 大型，其中 A 系群中 S1 等單型位於親緣網狀圖的中心位置，可能為 4 個系群的共生藻 ITS rDNA 區段中最古老的單型。

### 討 論

rDNA 在生物的蛋白質合成上扮演著重要的角色，影響著生物成長、發育及各項生理功能(Graves *et al.* 1994)。在本研究的共生藻中，ITS rDNA 序列平均長度為 561 bp，A 系群平均長度為 526 bp，明顯低於平均值。5.8S 基因區的序列長度介於 156-158 bp 之間(表 2)，5.8S 區域的平均基因相似度(similarity)有 76.6%，屬於保守的區域，但在 ITS1 與 ITS2 區域，不同系群間之序列長度及組成則有差異，5.8S 為具有功能性的 rDNA 部位，在功能限制(functional constraint) 的壓力下受到高度保留，序列的變異有限，但是 ITS1 和 ITS2 區域因不受功能限制，隨著演化路徑加長，可保留較多的突變量，並致使 ITS rDNA 序列有加長的跡象。此現象在其他的生物中亦有存在(Gardes *et al.* 1991; Kasuga *et al.* 1993)。

ITS rDNA 序列之 G+C 百分比，在大多數的物種中存在 GC 平衡(GC balance)共同演化(coevolution)現象(Torres *et al.* 1990)。根據結果顯示(表 2)，各共生藻 ITS1 與 ITS2 有著相似的 G+C 百分比，符合 GC 平衡共同演化的現象。然 A 系群的 G+C 百分比低於 4 種共生藻系群的總平均值(52.1%)，B、C、D 系群 G+C 百分比明顯高於 A 系群。G+C 百分比的增加，可能是生物體對環境的一種適應現象(Nazar *et al.* 1987)。

本研究以 ITS rDNA 基因建構 4 種珊瑚共生藻系群的演化樹，結果顯示共生藻在演化樹中各自形成獨立的系群，整體的親緣關係呈現 [(B, C), D], A 的樹形結構，此結果與 nr18S、

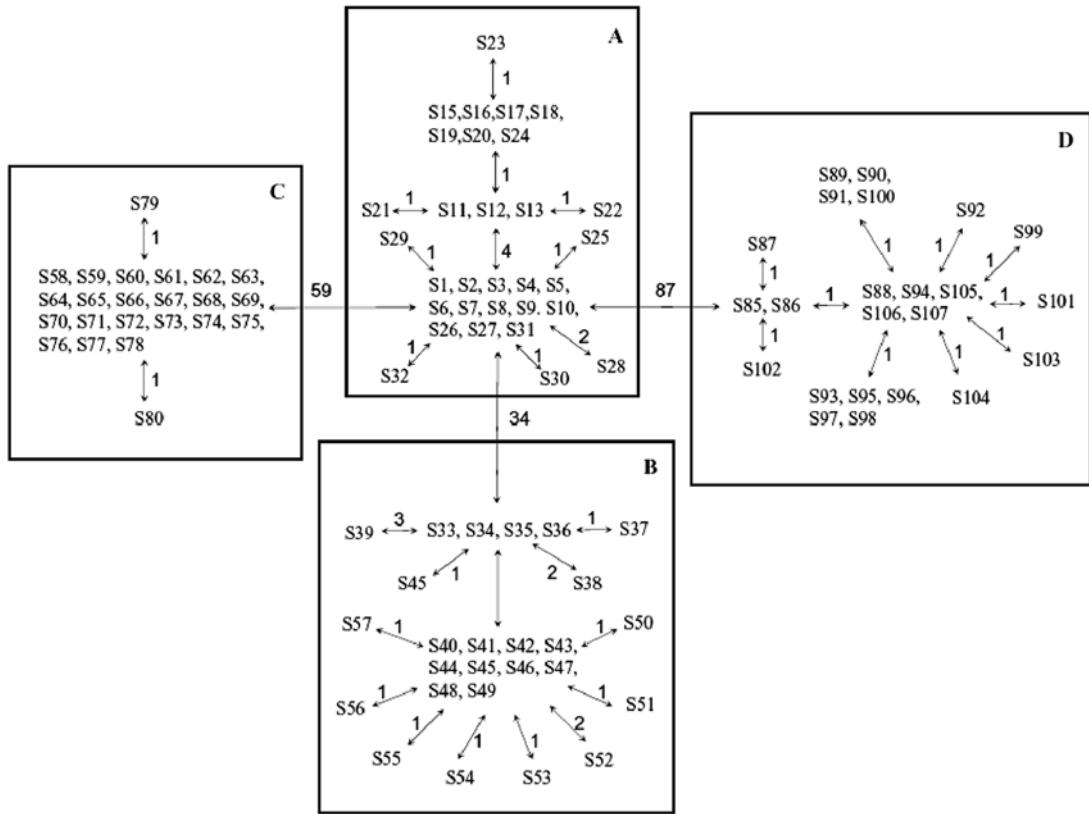


圖 3. 4 種共生藻系群 ITS rDNA 的親緣網狀圖。

Fig. 3. A minimum spanning network of four *Symbiodinium* clades (A to D) based on the ITS rDNA haplotypes.

nr28S 與 cp23S 所得的樹形圖完全一致(Santos *et al.* 2002; Pochon *et al.* 2006; Stat *et al.* 2008)。顯示此親緣關係的結構無論以核體 rDNA、ITS rDNA 或葉綠體的 rDNA 均有相同的支持度。但以葉綠體 *psbA* gene 分析時，卻呈現 [(C, D), B], A) 的樹形結構(Barbrook *et al.* 2006)，此可能是不同的分子標示在不同的物種內有不同的演化歷史所造成。然而在目前的研究中，無論以何種分子標示，均顯示出此 4 種珊瑚共生藻均為各自獨立的系群。

ITS rDNA 遺傳距離的分析結果顯示，在系群內的遺傳距離介於 0.00-0.052，在系群間的遺傳距離介於 0.683-0.677 (表 3)。系群內與系群間的遺傳距離並未有重疊現象，且系群間

彼此區隔有很高的遺傳距離。共生藻的 ITS1 區域曾被檢測出在系群間並無重組現象，並認為應達到「種」的分化層級(Mauricio 2003)，顯示 4 種共生藻系群間的遺傳分化相當明顯。

親緣網狀圖可提供物種可能的親緣模式及遺傳變異分布，其中位於網狀圖的邊緣位置為近代起源之單型(Golding and Taberlet 1994)，而存在於網狀圖內部位置者為古老的單型(Crandall and Templeton 1993)。由 ITS rDNA 所建構的親緣網狀圖顯示，A 系群可能為 4 種珊瑚共生藻系群中的古老型，B、C、D 系群由古老型的 A 系群擴展而來(圖 3)。

本研究的分析結果顯示，A 系群在 ITS rDNA 的序列長度及 G+C 百分比均低於 4 種共

生藻系群的平均值，而無論以何種分子標示所呈現的親緣樹狀圖，亦顯示A系群均位於共生藻的最外群，在共生藻的分歧演化(divergent evolution)中，顯示出A系群與其他系群有著特殊的演化軌跡。在共生藻與宿主的共生演化過程中，當共生藻進入宿主體內時，並非立刻就達到共生階段，而應是先有了寄生(parasitism)的起始階段(ancestral state)，經過了一段時間與宿主演化，進而達到互利共生(Holte *et al.* 2001)。A系群被認為存有寄生現象，而C系群則為互利共生關係(Stat *et al.* 2008; Stat and Gates 2008)。在本研究中 ITS rDNA 親緣網狀圖的分析顯示，A系群可能為古老型，而在親緣樹狀圖上，A系群為最外群，B、C、D系則群聚成一大類群，若C系群為互利共生，則B、D系群應與C系群有相似之功能。從nr28S與cp23S的分子時鐘推測，共生藻可能於50 MYA分歧出A系群與B、C、D系群的祖先型(Pochon *et al.* 2006)。因此，共生藻的演化，應是由早期的寄生關係，經過了長期的演化，進而形成了互利共生與多樣性系群。

## 引用文獻

- Baillie, B. K., C. A. Belda-Baillie and T. Maruyama. 2000. Conspecificity and Indo-Pacific distribution of *Symbiodinium* genotypes (Dinophyceae) from giant clams. *Journal of Phycology* 36: 1153-1161.
- Baker, A. C., C. J. Starger, T. M. McClanahan and P. W. Glynn. 2004. Coral reefs: Corals' adaptive response to climate change. *Nature* 430: 741.
- Baker, A. C. and R. Rowan. 1997. Diversity of symbiotic dinoXagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and eastern Pacific. *Proceeding of the 8th International Coral Reef Symposium* 2: 1301-1306.
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell and M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Barbrook, A. C., S. Visram, A. E. Douglas and C. J. Howe. 2006. Molecular diversity of dinoflagellate symbionts of Cnidaria: The *psbA* minicircle of *Symbiodinium*. *Protist* 157: 159-171.
- Barneah, O., V. M. Weis, S. Perez and Y. Benayahu. 2004. Diversity of dinoflagellate symbionts in Red Sea soft corals: Mode of symbiont acquisition matters. *Marine Ecology Progress Series* 275: 89-95.
- Bellarosa, R., M. C. Simeone, A. Papini and B. Schirone. 2005. Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Molecular Phylogenetics Evolution* 34: 355-370.
- Chen, C. A., K. K. Lam, Y. Nakano and W. S. Tsai. 2003. A stable association of the stress-tolerant zooxanthellae, *Symbiodinium* clade D, with the low-temperature-tolerant coral, *Oulastrea crispata* (Scleractinia: Faviidae) in subtropical non-reefal coral communities. *Zoological Studies* 42: 540-550.
- Chiang, T. Y. and B. A. Schaal. 2000. The internal transcribed spacer 2 region of the nuclear ribosomal DNA and the phylogeny of the moss family Hylocomiaceae. *Plant Systematics and Evolution* 224: 127-137.
- Crandall, K. A. and A. R. Templeton. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.

- Diekmann, O. E., J. L. Olsen, W. T. Stam and R. P. M. Bak. 2003. Genetic variation within *Symbiodinium* clade B from the coral genus *Madracis* in the Caribbean (Netherlands Antilles). *Coral Reefs* 22: 29-33.
- Excoffier, L. and P. E. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 343-359.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA data. *Genetics* 131: 479-491.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gardes, M., T. J. White, J. A. Fortin, T. D. Bruns and J. W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* 69: 180-190.
- Golding, L. and P. Taberlet. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbcL* sequence. *Molecular Biology and Evolution* 11: 769-777.
- Goulet, T. L. and M. A. Coffroth. 2003. Stability of an octocoral-algal symbiosis over time and space. *Marine Ecology Progress in Series* 250: 117-124.
- Graves, D. J., B. L. Martin and J. H. Wang. 1994. Co- and Post- Translational Modification of Proteins: Chemical Principles and Biological Effects. Oxford University Press, New York.
- Hillis, D. M. and J. J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 41: 182-192.
- Holte, A., M. Houck and N. Collie. 2001. Potential role of parasitism in the evolution of mutualism in astigmatid mites: *Hemisarcoptes cooremani* as a model. *Experimental and Applied Acarology* 25: 97-107.
- Kasuga, T., C. Woods, S. Woodward and K. Mitchelson. 1993. *Heterobasidion annosum* 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer sequence: Rapid identification of European intersterility groups by ribosomal DNA restriction polymorphism. *Current Genetics* 24: 433-436.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- LaJeunesse, T. C. 2001. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: In search of a species level marker. *Journal of Phycology* 37: 866-880.
- Lewis, C. L. and M. A. Coffroth. 2004. The acquisition of exogenous algal symbionts by an octocoral after bleaching. *Science* 304: 1490-1492.
- Lobban, C. S., M. Schefter, A. G. B. Simpson, X. Pochon, J. Pawlowski and W. Foissner. 2002. *Maristentor dinoferus* n.gen. n.sp., a giant heterotrich ciliate (Spirotrichea: Heterotrichida) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Marine Biology* 140: 411-423.
- Mauricio, R. L. 2003. Evolving lineages of *Symbiodinium*-like dinoflagellates based on ITS1 rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 152-168.
- Nazar, R. N., W. M. Wang and J. L. Abrahamson.

1987. Nucleotide sequence of the 18-25S ribosomal RNA intergenic region from a thermophile, *thermomyces lanuginosus*. *Journal of Biological Chemistry* 262: 7523-7527.
- Pawlowski, J., M. Holzmann, J. F. Fahrni, X. Pochon and J. J. Lee. 2001. Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 2. Dinoflagellates. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 368-373.
- Pochon, X., T. C. LaJeunesse and J. Pawlowski. 2004. Biogeographic partitioning and host specialization among foraminiferan dinoflagellate symbionts (*Symbiodinium*, Dinophyta). *Marine Biology* 146: 17-27.
- Pochon, X. and R. D. Gates. 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 492-497.
- Pochon, X., J. I. Montoya-Burgos, B. Stadelmann and J. Pawlowski. 2006. Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 20-30.
- Pochon, X., J. Pawlowski, L. Zaninetti and R. Rowan. 2001. High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Marine Biology* 139: 1069-1078.
- Reimer, J. D. and P. A. Todd. 2009. Preliminary molecular examination of zooxanthellate zoanthid (Hexacorallia: Zoantharia) and associated zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) diversity in Singapore. *The Raffles Bulletin of Zoology (Supplement)* 22 : 103-120.
- Reimer, J. D., K. Takishita, S. Ono, T. Maruyama and J. Tsukahara. 2006. Latitudinal and intracolony ITS-rDNA sequence variation in the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium* (Dinophyceae) in *Zoanthus sansibaricus* (Anthozoa: Hexacorallia). *Phycological Research* 54: 122-132.
- Reimer, J. D., S. Ono, J. Tsukahara, K. Takishita and T. Maruyama. 2007. Non-seasonal clade-specificity and subclade microvariation in symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) in *Zoanthus sansibaricus* (Anthozoa: Hexacorallia) at Kagoshima Bay, Japan. *Phycological Research* 55: 58-65.
- Rowan, R. 2004. Thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature* 430: 742.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 406-425.
- Santiago-Vazquez, L. Z., N. C. Newberger and R. G. Kerr. 2007. Cryopreservation of the dinoflagellate symbiont of the octocoral *Pseudopterogorgia eli sabethae*. *Marine Biology* 152: 549-556.
- Santos, S. R., D. J. Taylor, R. A. Kinzie 3rd, M. Hidaka, K. Sakai and M. A. Coffroth. 2002. Molecular phylogeny of symbiotic dinoflagellates inferred from partial chloroplast large subunit (23S)-rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 97-111.
- Santos, S. R., C. Gutierrez-Rodriguez, H. R. Lasker and M. A. CoVroth. 2003. *Symbiodinium* sp. associations in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* in the Bahamas: High levels of genetic variability and population structure in symbiotic dinoXagellates. *Marine Biology* 143: 111-120.
- Santos, S. R., T. L. Shearer, A. R. Hannes and M. A. Coffroth. 2004. Fine-scale diversity and specificity in the most prevalent lineage of

- symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyceae) of the Caribbean. *Molecular Ecology* 13: 459-469.
- Stat, M. and R. D. Gates. 2008. Vectored introductions of marine endisymbiotic dinoflagellates into Hawaii. *Biological Invasions* 10: 579-583.
- Stat, M., E. Morris and R. D. Gates. 2008. Functional diversity in coral-dinoflagellate symbiosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 105: 9256-9261.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 : 1596-1599.
- Taylor, D. L. 1974. Symbiotic marine algae: taxonomy and biological fitness. pp. 245-262. *In*: W. B. Vernberg (ed). *Symbiosis in the Sea*. University of South Carolina Press, Columbia.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Thornhill, D. J., T. C. Lajeunesse and S. R. Santos. 2007. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: How intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Molecular Ecology* 16: 5326-5340.
- Torres, R. A., M. Ganal and V. Hemleben. 1990. GC balance in the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *Journal of Molecular Evolution* 30: 170-181.
- Ware, J. R., D. G. Fautin and R. W. Buddemeier. 1996. Patterns of coral bleaching: Modeling the adaptive bleaching hypothesis. *Ecological Modelling* 84: 199-214.
- Xia, X. and Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.