



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

유해성 와편모조류 *Cochlodinium*
*polykrikoides*의 휴면포자 탐색



2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

의 생 명 융 합 공 학 협 동 과 정

김 민 정

공 학 석 사 학 위 논 문

유해성 와편모조류 *Cochlodinium*
*polykrikoides*의 휴면포자 탐색

지도교수 김 창 훈

이 논문을 공학석사 학위 논문으로 제출함



2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

의 생 명 융 합 공 학 협 동 과 정

김 민 정

김민정의 공학석사 학위논문을 인준함.

2014년 2월



주 심 이학박사 남 윤 권 (인)



위 원 이학박사 박 태 규 (인)



위 원 농학박사 김 창 훈 (인)



목 차

List of Figures	iii
List of Tables	vi
Abstract	vii
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1 현장 조사 정점	4
2.2 해수 내 <i>C. polykrikoides</i> 의 발생 관찰	7
2.3 퇴적물 내 <i>C. polykrikoides</i> 휴면포자 관찰	7
2.4 Real-time PCR을 통한 영양세포와 휴면포자 탐색	8
2.4.1 DNA 추출	8
A. 영양세포 DNA 추출	8
B. 해수 시료 DNA 추출	8
C. 퇴적물 시료 DNA 추출	9
2.4.2 Standard PCR	10
2.4.3 Real-time PCR	10
2.4.4 Standard curve 작성	10
3. 결과	13
3.1 <i>C. polykrikoides</i> 의 hyaline cyst 관찰	13
3.2 <i>C. polykrikoides</i> 의 temporary cyst 관찰	18

3.3 <i>C. polykrikoides</i> 초기 발아체 및 발달단계 관찰	20
3.4 Standard PCR	22
3.5 영양세포와 휴면포자 정량을 위한 standard curve	24
3.6 Real-time PCR을 통한 지역별 휴면포자 탐색	26
A. 자란만	26
B. 남해 물건항	28
C. 남해 미조	31
D. 통영 욕지	34
E. 남해 평산	36
F. 남해 앵강만	37
G. 여수 임포	38
4. 고찰	39
5. 요약	46
참고문헌	49
감사의 글	55

Figure legends

Fig. 1. Sampling stations of sediment and seawater samples investigated in this study.

(A, Jaran Bay; B, Mulgeon harbor; C, Mijomyeon; D, Pyeongsan; E, Yokjido; F, Aenggang Bay ; G, Impo, Yeosu)

Fig. 2. Hyaline cysts of *C. polykrikoides* in field water samples. Hyaline membrane (arrow). Scale bars: 10 μm .

Fig. 3. Hyaline cysts of *C. polykrikoides* under the optical microscope (A, C) and fluorescence microscope (B, D).

Fig. 4. Hyaline cysts formation of *C. polykrikoides*. A, vegetative cells of *C. polykrikoides*; B, red body formation; C, hyaline cysts.

Fig. 5. Reoccur of *C. polykrikoides* hyaline cyst after low temperature in a dark room.

Fig. 6. Planozygote formation of *C. polykrikoides*. A, a typical vegetative cell; B–E, planozygote of *C. polykrikoides* with two longitudinal flagella observed (arrows) and red accumulation body; F, completed with fused of *C. polykrikoides*. Scale bars; 10 μm .

Fig. 7. Germination process of *C. polykrikoides* temporary cyst. Scale bars; 10 μm .

Fig. 8. Germination process of a *C. polykrikoides*. A–B, cyst of *C. polykrikoides*; C, early germling of single cell; D, single vegetative cell; E, 2 chains; F, 4 chains; G, 8 chains.

Fig. 9. Agarose gel analysis showing *C. polykrikoides* selective PCR products. The PCR was carried out using the primer sets CPITSF and CPITSR2. M, 100 bp ladder molecular size marker (Bioneer); 1, positive control of *C. polykrikoides*; 2, *Alexandrium catenella*; 3, no template control.

Fig. 10. Linear relationship between the C_T values and ITS rDNA of *C. polykrikoides* ($R^2=0.999$). The standard curve was used to quantify the rDNA copy numbers of the target species in sediment and seawater samples.

Fig. 11. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* at the stations – 4, 7, 8, 10 from sediment in the coast of Jaran Bay.

Fig. 12. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* at the stations – 1, 2, 3 from sediment in the Mulgeon harbor.

Fig. 13. Comparisons of rDNA copy numbers (■, seawater samples; ◆, sediment samples) and vegetative cell numbers (▲) of *C. polykrikoides* of two stations of Mulgeon harbor in 2012.

Fig. 14. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* at the

stations - 1, 2, 3 from sediment in the coast of Mijo.

Fig. 15. Comparisons of rDNA copy numbers (■, seawater samples; ◆, sediment samples) and vegetative cell numbers(▲) of *C. polykrikoides* of three stations of Mijo coast in 2012.

Fig. 16. Comparison of rDNA copy numbers (■, seawater samples; ◆, sediment samples) and vegetative cell numbers(▲) of *C. polykrikoides* at Yokji station in 2012–2013.

Fig. 17. rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in the coast of Pyeongsan, Namhae, in August 2012.

Fig. 18. rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in the coast of Aenggang Bay in June 2012.

Fig. 19. rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in the coast of Impo, Yeosu in July 2012.

Fig. 20. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in sediment of Jaran Bay in 2010 and 2012.

Table legends

Table 1. Collection sites and dates for sediment and seawater samples in this study.

Table 2. Real-time PCR primer and probe for detection and quantification of *C. polykrikoides*.



Detection of harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* cysts

Min Jung Kim

Department of Interdisciplinary Program of Biomedical Engineering,
The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

The mixotrophic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef is a causative agent of the recurring harmful algal blooms (HABs). Many dinoflagellate species have been reported to form resting cysts or to produce other types of resting stages as part of their life cycle. These cysts play a key role in bloom initiation and decline, as well as dispersal and colonization of new areas. Information on cyst numbers and identity is essential for understanding and predicting blooms.

Previous studies have reported the identification of resting cysts of *C. polykrikoides* from sediments, but the identity of the observed cyst was not fully confirmed. In recent studies, real-time PCR assays have been used for the detection and quantification of harmful dinoflagellate cysts in water and sediment because real-time PCR technique provides highly sensitive, quantitative, and rapid detection. In this study, resting cysts of *C. polykrikoides* were observed and detected from the coast of the southern Sea of Korea using real-time PCR probes.

In this study, hyaline cysts of *C. polykrikoides* were observed after the

bloom period. Hyaline cysts of *C. polykrikoides* were similar to vegetative cells in size. On the contrary to vegetative cells, hyaline cysts were pale in color, immobile without chloroplasts. *C. polykrikoides* vegetative cells regenerated successfully from the hyaline cysts in the favorable conditions. It suggests that hyaline cyst is determined to be one stage of the life cycle of *C. polykrikoides*.

In addition, another kinds of temporary cysts were observed in indoor experimental condition. Temporary cysts (20–30 μm) were yellowish brown in color and round shape. Temporary cysts also successfully regenerated to vegetative cells like the hyaline cyst. The germination processes of *C. polykrikoides* were also observed in field seawater samples. The germling gradually developed into a gymnodinoid cell with the cingulum and sulcus being recognizable as a vegetative cell of *C. polykrikoides*.

C. polykrikoides rDNA was detected in the sediment before and after the blooming periods. In sediment samples of Jaran Bay, Mulgeon harbor and Mijo, the copy numbers of *C. polykrikoides* rDNA were opposite from rDNA copy numbers of seawater and direct counting numbers of vegetative cells. In Yokji, the maximum copy number in sediment was 235 copies/cm³ wet sediment (per cm³ of wet sediment obtained from top layer of centrifuged 30 g of sediment). However, the copy numbers of sediment were suddenly decreased before the blooming period, but the vegetative cell numbers were consistently increased. These results showed that *C. polykrikoides* might be persisted in the sediment as cyst forms. Furthermore, the results of this study will be helpful to predict the potential blooming site and clue for full elucidation of the *C. polykrikoides* life cycle.

1. 서론

적조현상이란 수중에 존재하는 플랑크톤이 일시적으로 대량 번식 및 집적하여 수색을 변화시키는 현상을 말한다. 이와 유사 개념인 HABs(Harmful Algal Blooms, 유해성 조류발생)는 1990년대 이후부터 발생기간의 장기화, 발생해역의 광역화, 적조 원인생물의 고밀도화 및 유독화 추세로 어장환경과 수산생물에 막대한 피해를 일으켜 사회·경제적으로 심각한 문제를 일으키고 있다(Park *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1994; Park, 1995; 김 등, 2001).

우리나라에 보고된 적조 주 원인종은 약 43종이며, 그 중 외편모조류가 약 20종이다(김과 김, 1999). 대표적인 적조 발생 외편모조류에는 *Heterocapsa akashiwo*, *Prorocentrum* spp. *Cochlodinium polykrikoides* 등이 있다(Kim *et al.*, 1997).

그 중 *C. polykrikoides*는 1982년 낙동강 하구와 가덕도 동쪽해역에서 처음 발견되었다(Kim, 1998). 1995년에는 대규모, 장기간 발생하여 총 764억에 달하는 막대한 수산 피해를 일으켰으며(국립수산진흥원, 1997a, 1997b, 1999, 2000; 국립수산과학원, 2002a), 해마다 남해안을 중심으로 발생하여 동해안 및 서해안으로 확산되었다가 소멸되는 현상을 반복하고 있다. 이후로도 2007년 남해연안에 100억원 상당의 피해액을 기록하였으며(국립수산과학원, 2008), 2012년과 2013년에도 대규모 적조가 발생하여 수억원의 피해액을 내었다.

우리나라에서 *C. polykrikoides*의 본격적인 연구는 1995년 *C. polykrikoides* 적조 대발생을 겪은 다음해인 1996년부터 시작되었다. *C. polykrikoides* 적조발생(Park *et al.*, 1988; Kim, 1990, 1997, 1998a, 1998b; Kim *et al.*, 1997, 1999; Lee *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 1999;

김, 1999; 김 등, 1995), 분리와 성장(Seo *et al.*, 1998; 김, 2007), 휴면포자에 관한 연구(Kim *et al.*, 2002, 2010; 박, 2005) 등 많은 연구가 이루어졌지만 초기 연구 시 *C. polykrikoides*의 생활사가 명확하지 않아 외부유입설과 같은 여러 가설이 제시되었으며, 발생생태를 설명하기 위해서 이 종의 생활사를 밝히는 연구가 활발히 진행되었다.

HABs를 유발하는 와편모조류 중 휴면포자를 형성하는 종은 약 20여종(Nehring, 1993)으로 알려져 있다. 휴면포자는 플랑크톤 단계에서 단독 혹은 군체로 유영생활을 하다가 환경조건이 적합하지 못하면 유성생식으로 변환하여 편모를 버리고 세포표면에 저항력이 강한 막을 형성하여 휴면포자(resting cyst)의 형태로 되어 부유능력을 잃고 해저면으로 침강한다(이 등, 1999). 이때 형성된 휴면포자는 HABs 발생 초기에 “씨앗개체군(Seed population)” 역할을 수행하며 이들의 지리적 분포는 적조발생의 장소와 시기를 예측할 수 있는 중요한 단서로 이용될 수 있다(Anderson and Wall, 1978; Nehring, 1997; Anderson *et al.*, 2003).

Matsuoka and Fukuyo(2000)는 *C. polykrikoides*의 여러 가지 휴면포자 형태를 제시하였으며, Kim *et al.*(2002)은 일세포자 형태인 hyaline cyst를 보고하였다. 그 이후 Kim *et al.*(2007)은 *C. polykrikoides*는 생활사에서 유성생식에 의해 생성되는 휴면포자를 가지며, 이 휴면포자에서 발생한 발아체가 무성생식에 의해 분열증식 또는 hyaline cyst를 형성하여 영양세포로 재가입한다는 가설을 제시하였다.

Park *et al.*(2009)와 Park and Park(2010)은 real time PCR을 통해 우리나라 남해연안 퇴적물 내 *C. polykrikoides*를 검출함으로써 *C. polykrikoides*의 seed population을 조사하였다. 이들의 연구에서는 현장내에서 휴면포자의 명확한 형태를 제시하지 못하였지만 *C. polykrikoides*의

“seed beds”가 존재하며 이는 *C. polykrikoides* 적조의 초기 발생에 중요한 요인으로 작용한다고 보고하였다.

한편 Tang and Gobler(2012)는 *C. polykrikoides* 영양세포의 mating 실험을 실행하여 실험실내에서 *C. polykrikoides*의 유성생식을 통한 포자를 생성하였다. 이는 *C. polykrikoides*가 생활사 내에서 일시적 포자를 가지며 또한 Park *et al.*(2009)과 Park and Park(2010)의 real-time PCR을 통한 퇴적물 내 *C. polykrikoides*의 휴면포자 검출결과에 대한 신뢰성을 높여 주었다.

본 연구에서도 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 검출하기 위해 real-time PCR 기법을 사용하였다. real-time PCR은 PCR 증폭산물의 형광감도 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이다. 단계적으로 희석한 표준시료를 사용하여 real-time PCR을 실행하면 초기 DNA 양이 많은 순서대로 일정한 간격의 증폭곡선을 얻을 수 있는데, 이 곡선에서 threshold를 설정하게 되면 threshold와 증폭곡선이 교차하는 지점(C_T 값, threshold cycle)이 산출된다. 산출된 C_T 값과 초기 주형량의 직선적인 관계를 통해 검량선을 만들 수 있으며 이를 통해 미지시료의 DNA 양을 정량할 수 있다(Kamikawa *et al.*, 2007).

본 연구에서 real-time PCR 실행 시 필요한 형광표식 probe는 TaqMan probe를 사용하였으며 *C. polykrikoides*의 ITS rDNA 영역을 통해 만들어진 종 특이적인 primer와 probe를 사용하여 보다 더 정확한 동정과 검출을 이루고자 하였다. 그리하여 *C. polykrikoides*의 적조 주요 발생지역인 자란만, 여수, 통영 욱지도, 남해 인근 해역을 대상으로 real-time PCR을 통한 휴면포자 검출과 *C. polykrikoides*의 발생단계를 관찰하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 현장 조사 정점

실험에 사용된 해수와 퇴적물 시료는 *C. polykrikoides*의 적조 주요 발생지역인 남해 동부 연안의 자란만, 여수 임포, 통영 욕지도, 남해 인근 해역(물건항, 미조, 평산, 앵강만)을 대상으로 조사하였다(Fig. 1, Table 1).

퇴적물 시료는 core sampler를 이용하여 상위 3 cm의 퇴적물만을 취하여 1 L 폴리에틸렌 통에 담아 4℃ 암소에서 다음 분석까지 보관하였으며 해수시료는 플랑크톤 네트(20 μm Ø)와 채수기를 이용하여 각 정점에서 채수하였다.



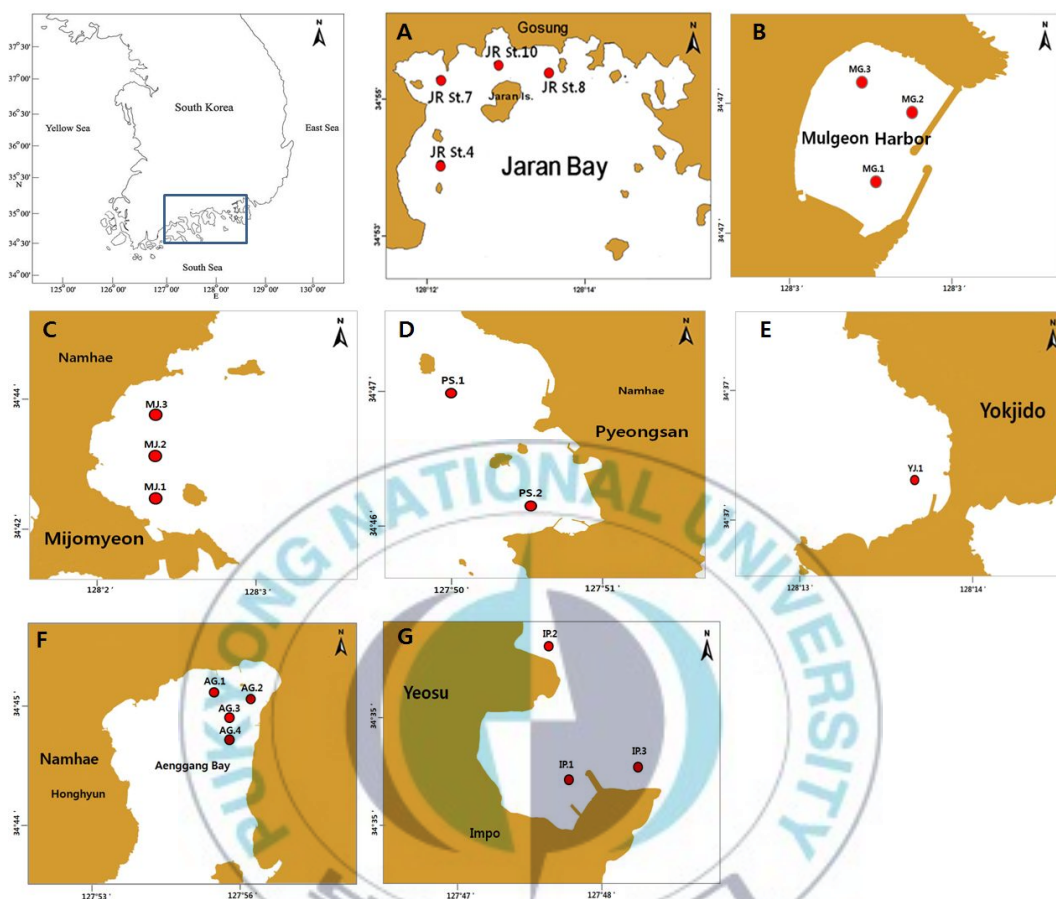


Fig. 1. Sampling stations of sediment and seawater samples investigated in this study.

(A, Jaran Bay; B, Mulgeon harbor; C, Mijomyeon; D, Pyeongsan; E, Yokjido; F, Aenggang Bay ; G, Impo, Yeosu).

Table 1. Collection sites and dates for sediment and seawater samples in this study

Stations	Geographic locations	Sampling dates
A. The Coast of Jaran Bay		
JR 4	34° 54 ' 26 "N, 128° 12 ' 34 " E	2012. 3~5
JR 7	34° 55 ' 37 "N, 128° 12 ' 33 " E	
JR 8	34° 55 ' 42 "N, 128° 14 ' 11 " E	
JR 10	34° 56 ' 15 "N, 128° 13 ' 19 " E	
B. The Coast of Mulgeon		
MG 1	34° 47 ' 39 "N, 128° 03 ' 26 " E	2012. 10~11
MG 2	34° 47 ' 54 "N, 128° 03 ' 31 " E	2013. 3~6, 8
MG 3	34° 48 ' 01 "N, 128° 03 ' 20 " E	2013. 3~6, 8
C. The Coast of Mijo		
MJ 1	34° 43 ' 11 "N, 128° 02 ' 49 " E	2012. 8
MJ 2	34° 43 ' 32 "N, 128° 02 ' 48 " E	
MJ 3	34° 44 ' 02 "N, 128° 02 ' 52 " E	
D. The Coast of Pyeongsan		
PS 1	34° 47 ' 00 "N, 127° 50 ' 08 " E	2012. 8,12
PS 2	34° 46 ' 16 "N, 127° 50 ' 39 " E	
E. The Coast of Yokji		
YJ 1	34° 37 ' 12 "N, 128° 14 ' 27 " E	2012. 8 2013. 3~7
F. The Coast of Aenggang Bay		
AG 1	34° 46 ' 20 "N, 127° 56 ' 07 " E	2012. 6
AG 2	34° 46 ' 15 "N, 127° 56 ' 44 " E	
AG 3	34° 45 ' 55 "N, 127° 56 ' 26 " E	
AG 4	34° 45 ' 40 "N, 127° 56 ' 16 " E	
G. The Coast of Impo (Yeosu)		
IP 1	34° 35 ' 48 "N, 127° 48 ' 15 " E	2012. 6
IP 2	34° 36 ' 02 "N, 127° 48 ' 13 " E	
IP 3	34° 35 ' 50 "N, 127° 48 ' 25 " E	

2.2. 해수 내 *C. polykrikoides*의 발생 관찰

*C. polykrikoides*의 발생 과정을 관찰하기 위해 현장에서 플랑크톤 네트를 이용하여 표층과 저층부를 채수한 해수 시료를 125 μm 와 20 μm sieve로 여과, 농축하여 6 well plate에 취해 형광도립현미경(Olympus IX70)하에서 검경하였다.

그리고 *C. polykrikoides* 출현 시기 파악과 직접계수를 위해 각 정점에서 해수 20 L를 채수하여 플랑크톤 네트를 이용해 현장에서 250 mL로 농축, 운반한 시료에서 2 mL를 Sedgwick-Rafter counting chamber에 취하여 형광도립현미경(Olympus IX70)하에서 검경하였다.

2.3. 퇴적물 내 *C. polykrikoides* 휴면포자 관찰

*C. polykrikoides*의 휴면포자를 관찰하기 위해 정점별 저층부 채수시료와 core sampler를 이용하여 상위 3 cm 만을 채집한 퇴적물 샘플을 사용하였다. 저층 채수 시료는 방법 2.2와 동일하게 처리하였다. 각 퇴적물 시료는 GF/C 필터지(47 mm Ø, Whatman international Ltd.)로 여과한 해수를 사용하여 현탁 시킨 후 125 μm 와 20 μm sieve로 여과, 농축해서 6 well plate에 취해 형광도립현미경(Olympus IX70)하에서 검경하였다.

2.4. Real-time PCR에 의한 영양세포와 휴면포자 탐색

2.4.1. DNA 추출

A. 영양세포 DNA 추출

국립수산물과학원(NFRDI, 2009)에서 분양받은 *C. polykrikoides* 영양세포와 본 연구 조사지역에서 *C. polykrikoides* 적조 발생 시 분리, 배양된 영양세포를 50 mL tube에 담아 원심분리(1000 rpm, 10분)하여 배지를 제거한 뒤 PCI(Phenol-chloroform-isoamyl alcohol, 25:24:1) DNA 추출방법을 이용하여 DNA를 추출하여 -20℃에서 보관하였다. 추출된 DNA는 Standard PCR과 real-time PCR 분석 시 positive control로 사용하였다.

B. 해수 시료 DNA 추출

DNA 추출에 사용된 해수 시료는 각 정점별로 20 L 정량채수 한 후 플랑크톤 네트를 이용하여 여과 농축하여 250 mL 폴리에틸렌 통에 담아 운반한 뒤 GF/C 필터지로 여과하여 -80℃에서 분석 전 까지 보관하였다. 보관된 GF/C 필터지는 영양세포 DNA 추출과 동일한 PCI 방법을 통해 DNA를 추출하여 -20℃에서 보관하였다.

C. 퇴적물 시료 DNA 추출

DNA 추출에 사용된 퇴적물 시료는 각 정점에서 core sampler를 이용하여 상층 3 cm를 채집하였다. 채집된 퇴적물 시료는 분석 전까지 4℃ 암소에서 보관 하였다. DNA 추출 시 퇴적물 시료 30 g을 50 mL tube에 담은 후 원심분리(2000 rpm, 5분)하여 해수를 제거한 후 사용하였다. 해수가 제거 된 퇴적물은 0.3M NaCl를 5 mL 첨가 한 후, 원심분리(2000 rpm, 20분)를 통해 상등액을 제거하여 최상층 1 g을 스푼을 이용해 lysis buffer와 beads가 포함된 tube에 담아 UltraClean Soil DNA kit(MoBio Laboratories Inc.)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.



2.4.2. Standard PCR

Real-time PCR을 수행하기 전 primer의 중 특이성과 본 연구에서 사용된 *C. polykrikoides* 영양세포에서 추출된 gDNA의 positive control로 사용가능성을 파악하기 위해 standard PCR을 진행하였다. PCR 반응액 조성은 template DNA 5 μ L, forward와 reverse primer는 각각 1.5 μ L, AccuPower PCR premix(Bionner)와 PCR grade water로 총 50 μ L로 조절하였다. PCR에 사용된 primer는 table.2 에 정리하였다. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 반응시킨 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 총 35회 반복 반응 시킨 다음 최종 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr로 staining 과정을 거친 뒤 자외선을 조사하여 확인하였다.

2.4.3. Real-Time PCR

퇴적물시료와 해수시료에서 추출된 DNA를 사용하여 real-time PCR을 진행하였다. real-time PCR 반응액 조성은 template DNA 0.5 μ L, forward와 reverse primer 각각 0.3 μ L, probe 0.15 μ L, Premix Ex Taq(Takara Bio Inc.) 5 μ L와 PCR grade water로 총 10 μ L로 조절하였다. real-time PCR에 사용된 primer와 probe는 Table 2 에 정리하였다. real-time PCR 조건은 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 2분, 초기 반응 시킨 다음 95 $^{\circ}$ C에서 10초, 60 $^{\circ}$ C에서 40초 총 40회 반복 반응을 실행하였다. 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument(Corbett Research, Sydney, Australia)를 이용하여 분석하였고 각 샘플 당 3반복 실험하였다.

2.4.4. Standard curve 작성

실험실 내에서 계대 배양되고 있는 *C. polykrikoides* 영양세포를 이용하여 Standard curve를 작성하였다. 계대 배양된 영양세포를 Sedgwick-rafter Chamber를 이용하여 계수한 뒤 계수된 세포 5 mL을 tube에 담아 원심분리 (13,000 rpm, 10분)후 배지를 제거 한 뒤 영양세포 DNA 추출법에 사용한 PCI법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 단계별로 희석하여 2.4.3 에서의 동일한 방법으로 real-time PCR을 진행하였다.



Table 2. Real-time PCR primer and probe for detection and quantification of *C. polykrikoides*

Primer	Sequence(5' → 3')	Reference
CPITSF	CGGCAACCTTTGTCAAACA	Park <i>et al.</i> (2009)
CPITSR2	GGTTTGCTGATCTAACTTCATGTCT	
CPITSP	FAM-CAACCGTGATACCCGCTAGCTTTGC -TAMRA	



3. 결과

3.1 *C. polykrikoides*의 hyaline cyst 관찰

*C. polykirkoides*의 hyaline cyst는 영양세포와 달리 적조 소멸 시기에 저층 net sample에서 주로 발견되었다.

영양세포에서 형성된 hyaline cyst는 영양세포와 비교하였을 때 크기는 비슷하였으나 투명한 색상에 chloroplast가 결여된 비운동성의 형태적 특징을 가지고 있었다. 세포의 표면에 sulcus와 cingulum의 희미한 흔적이 남아 있고 투과성의 얇은 막으로 둘러싸여 있었다. hyaline cyst는 단일세포부터 여러세포가 연결된 연쇄체가 발견되었으며, 본 연구에서 최대 10개체까지 관찰하였다. 각 세포는 red body를 가지고 있었다(Fig. 2).

형광도립현미경 하에서 검경하였을 때 hyaline cyst로 충분히 이행되지 않은 세포의 경우 chloroplast가 붉은색의 여기반응을 하는 것을 볼 수 있었다. 그 외에 red body에 해당하는 부분만이 반응하는 경우를 볼 수 있었는데 이는 포자상태로 진행된 것이었으며, 대부분이 투명한 외막을 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).



Fig. 2. Hyaline cysts of *C. polykrikoides* in field water samples. Hyaline membrane (arrow). Scale bars: 10 μm .

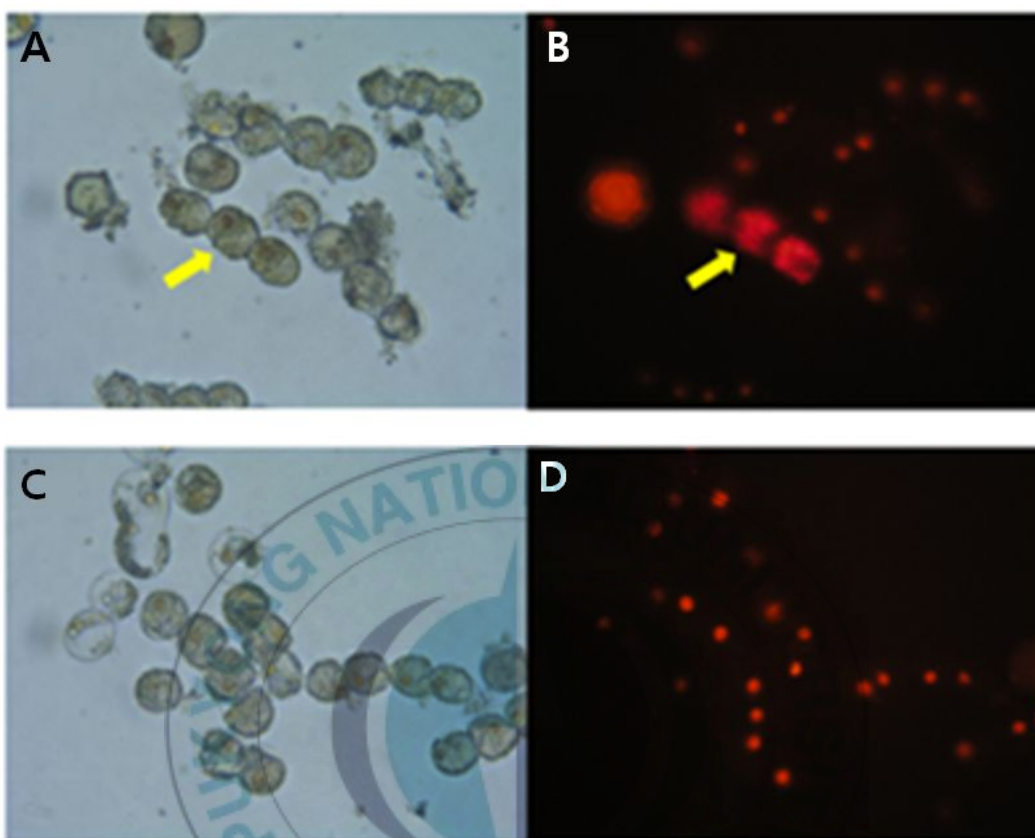


Fig. 3. Hyaline cysts of *C. polykrikoides* under the optical microscope(A, C) and fluorescence microscope(B, D).

*C. polykrikoides*의 적조 시기의 현장 해수 시료를 실험실 내에서 지속적인 관찰을 하였을 때 시간이 지남에 따라 영양세포가 red body를 형성한 후 투명한 막이 형성되는 hyaline cyst 형태로 변화는 과정을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4).

영양세포로부터 형성 된 hyaline cyst를 4℃ 암소에서 6개월간 보관 후 실온에서 관찰하였을 때 4개의 세포로 이어진 연쇄체가 각각의 세포로 분리된 것을 볼 수 있었으며 이는 각각 영양세포로 재출현했을 것으로 판단되어졌다 (Fig. 5).



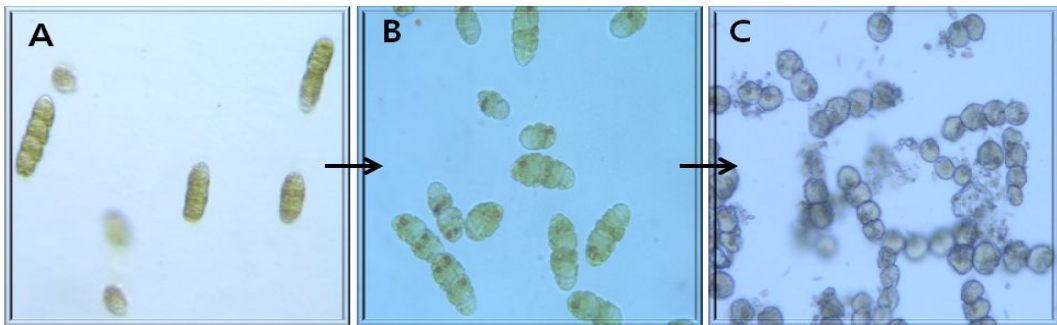


Fig. 4. Hyaline cysts formation of *C. polykrikoides*. A, vegetative cells of *C. polykrikoides*; B, red body formation; C, hyaline cysts.

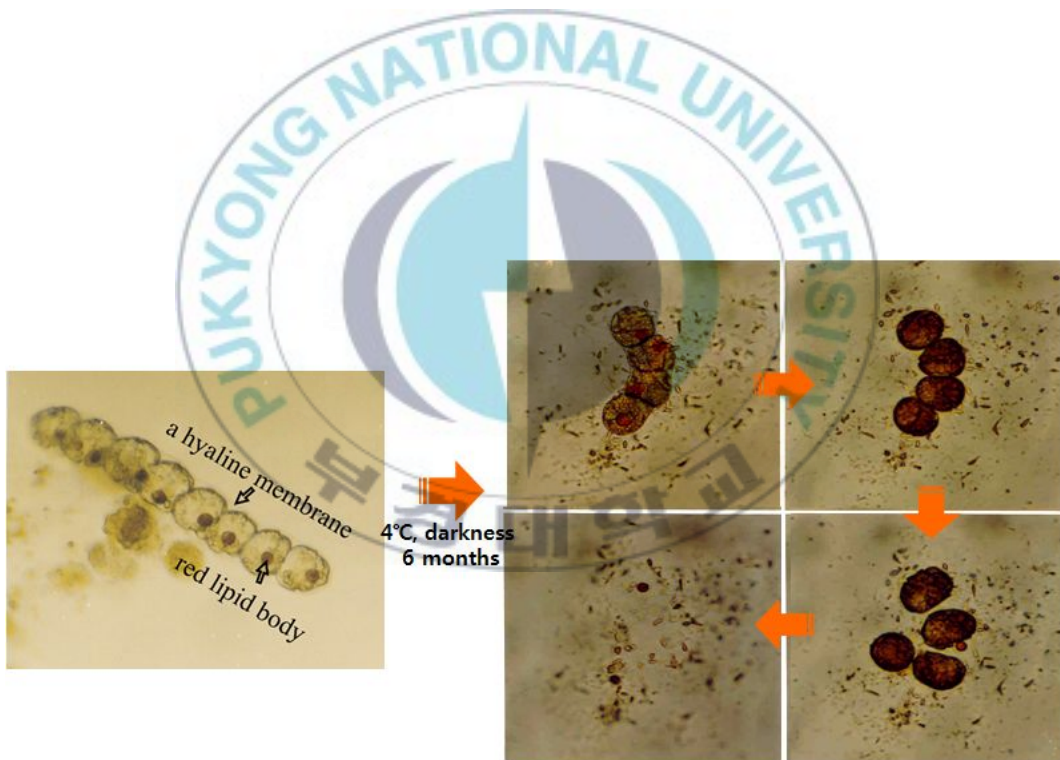


Fig. 5. Reoccur of *C. polykrikoides* hyaline cyst after low temperature in a dark room.

3.2. *C. polykrikoides*의 temporary cyst 관찰

*C. polykrikoides*의 적조 발생 시기에 플랑크톤 네트를 이용하여 채수한 뒤, 여과, 농축하여 6 well plate에 취하여 실험실 내에서 형광도립현미경 하에 지속적으로 관찰을 실행하였다. 관찰 기간 동안 *C. polykrikoides*의 영양세포 중 연쇄체들은 시간이 지남에 따라 단일세포로 분리 되는 것을 관찰 할 수 있었으며 분리된 단일세포가 각각 다시 결합하는 모습을 볼 수 있었다.

결합 과정 중의 두 단일세포는 Fig. 6 에서처럼 두 개의 편모를 볼 수 있었으며 2개 이상의 뚜렷한 red lipid body를 관찰 할 수 있었다. 결합 된 세포의 크기는 20-40 μm , 둥근 형태를 가지며 전체적으로 황색을 띄고 있었다. 이때 생성된 세포를 단일 분리하여 f/2-si 배지에서 배양하였을 때 뚜렷한 횡구를 가진 영양세포의 형태를 갖추었으며 시간이 지남에 따라 2개의 연쇄체를 이루었다(Fig. 7).

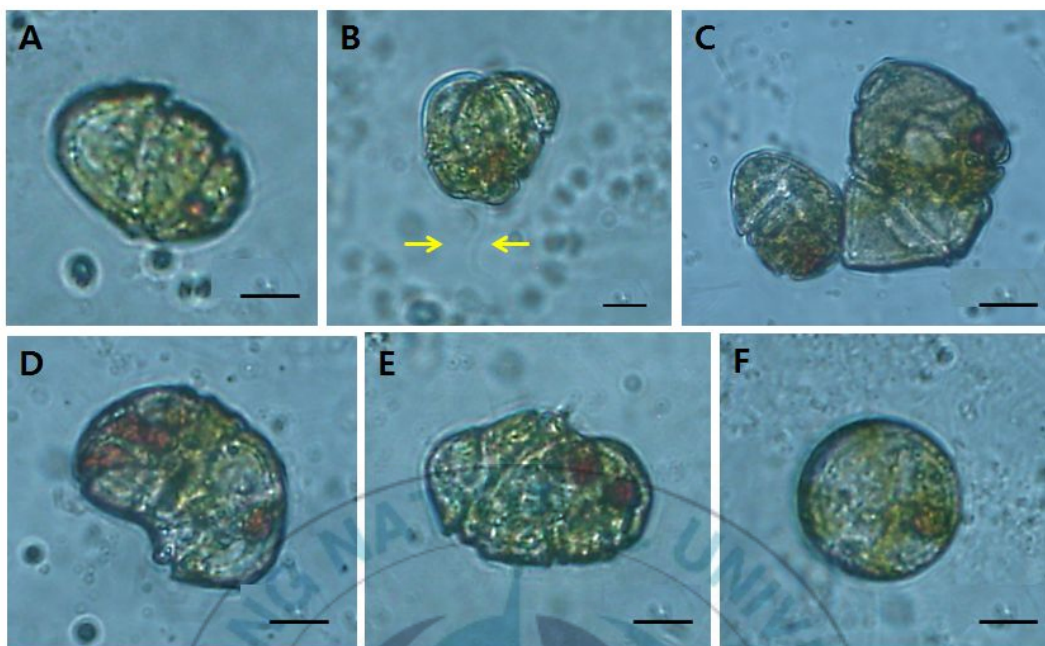


Fig. 6. Planozygote formation of *C. polykrikoides*. A, a typical vegetative cell; B–E, planozygotes of *C. polykrikoides* with two longitudinal flagella observed (arrows) and red accumulation body; F, completed with fused of *C. polykrikoides*. Scale bars; 10 μm .

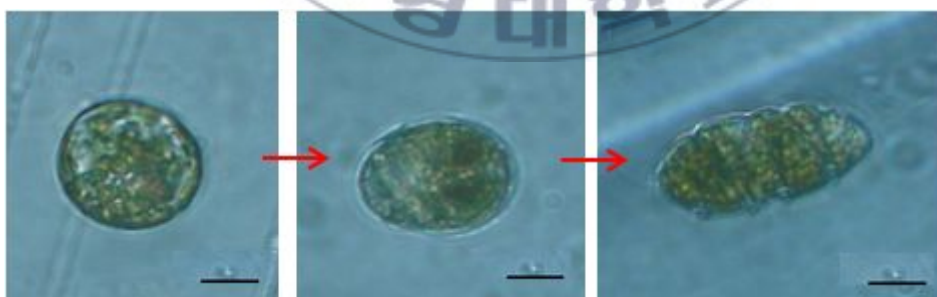


Fig 7. Germination process of *C. polykrikoides* temporary cyst. Scale bars; 10 μm .

3.3. *C. polykrikoides* 초기 발아체 및 발달 단계 관찰

*C. polykrikoides*의 발생단계 과정을 관찰하기 위해 해수 시료를 형광도립 현미경으로 직접 검정하는 과정 중 자란만 정점에서 *C. polykrikoides*의 초기 발아체를 관찰하였다.

*C. polykrikoides*의 초기 발아체는 Fig. 8의 C와 같았다. 체장은 25~45 μm 였고, 체폭은 20~30 μm 정도였으며 조사기간 내에 *C. polykrikoides*는 최대 8 chains 까지 확인되었다. 휴면포자에서 발아한 초기 발아체의 모습은 대부분의 외편모조류의 영양세포처럼 보였고, 휴면포자에서 발아해 나온 발아체는 뚜렷한 red body가 존재하였다. 그리고 1~2 chains의 경우 횡구가 세포면을 약 2회 정도 회전하고 있어 타 종과는 뚜렷이 구분할 수 있었다.



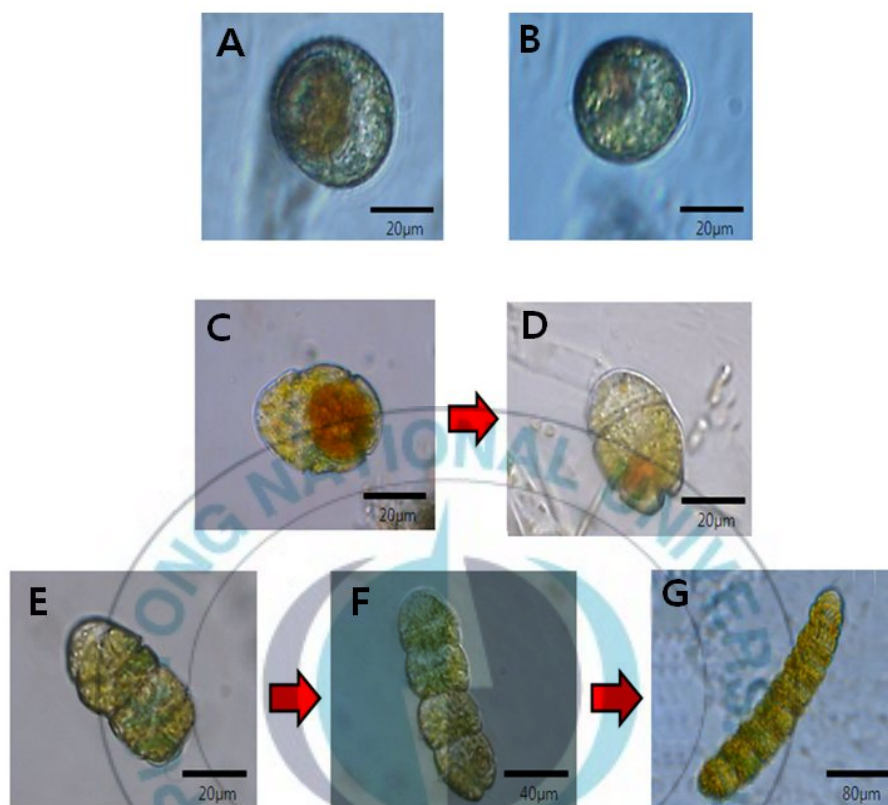


Fig. 8. Germination process of a *C. polykrikoides*. A–B, cyst of *C. polykrikoides*; C, early germling of single cell; D, single vegetative cell; E, 2 chains; F, 4 chains; G, 8 chains.

3.4 Standard PCR

Real-time PCR에 사용되는 primer의 중 특이성과 *C. polykrikoides* 영양 세포의 gDNA가 positive control로 적합한지 확인하기 위하여 CPITSF, CPITSR2 primer 쌍을 이용하여 PCR을 하였다.

C. polykrikoides gDNA의 PCR 산물의 위치는 약 150 bp에서 확인되었으며 negative control로 사용한 *Alexandrium catenella* gDNA에서는 band가 나오지 않았다. 이를 통해서 *C. polykrikoides* gDNA는 real-time PCR 시 positive control로 사용 가능하며 이때 사용되는 primer의 중 특이성을 확인하였다(Fig. 9).



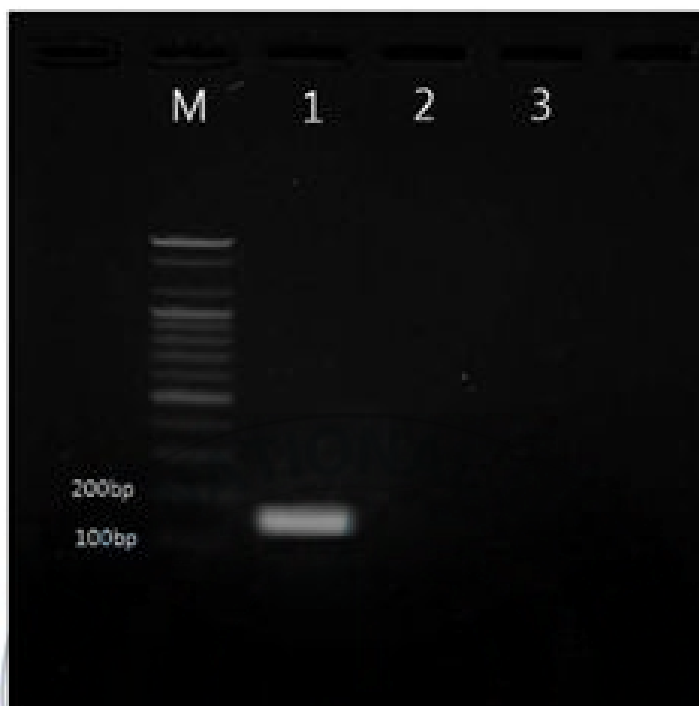


Fig. 9. Agarose gel analysis showing *C. polykrikoides* selective PCR products. The PCR was carried out using the primer sets CPITSF and CPITSR2. M, 100 bp ladder molecular size marker (Bioneer); 1, positive control of *C. polykrikoides*; 2, *Alexandrium catenella*; 3, no template control.

3.5 영양세포와 휴면포자 정량을 위한 standard curve

C. polykrikoides 영양세포에서 추출한 DNA를 단계별로 희석(10, 100, 1000, 10000, 100000)하여 real-time PCR을 진행하였을 때 C_T 값이 약 18, 21, 25, 28, 32로 나왔으며 이 값을 토대로 standard curve를 작성하였다. *C. polykrikoides* 영양세포 DNA양과 C_T 값은 Fig. 10 과 같이 높은 선형 상관관계($R^2 > 0.99$)를 나타내어 standard curve로 사용할 수 있었다.

Real-time PCR을 진행할 때 positive control로 사용된 *C. polykrikoides* 영양세포에서도 반응을 확인 할 수 있었으며 negative control로 멸균된 3차 증류수를 사용하였을 때는 반응이 나타나지 않았으므로 실험 시 다른 영향을 받지 않았음을 알 수 있었다.



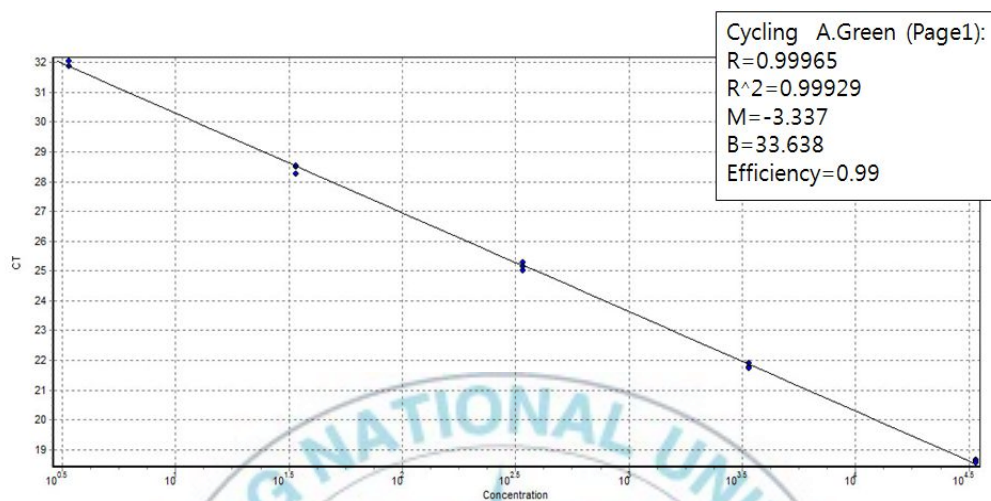


Fig. 10. Linear relationship between the C_T values and ITS rDNA of *C. polykrikoides* ($R^2=0.999$). The standard curve was used to quantify the rDNA copy numbers of the target species in sediment and seawater samples.

3.6 Real-time PCR을 통한 지역별 휴면포자 탐색

A. 자란만

본 연구에서의 조사 정점은 이(2011)와 김 등(2012)의 연구에서 *C. polykrikoides* rDNA가 검출된 된 정점 4, 7, 8, 10을 중심으로 조사하였다.

정점 4에서의 검출량은 3월에는 10 copies/cm³ wet sediment로 확인되었으며 4월에는 1 copies/cm³ wet sediment, 5월에는 검출되지 않았다.

정점 7에서의 검출량은 3월에는 4 copies/cm³ wet sediment, 4월 2 copies/cm³ wet sediment, 5월에는 검출되지 않았다.

정점 8에서의 검출량은 3월에는 5 copies/cm³ wet sediment, 4월 1 copies/cm³ wet sediment, 5월에는 검출되지 않았다.

정점 10에서의 검출량은 3월에는 3 copies/cm³ wet sediment, 4월 2 copies/cm³ wet sediment 5월에는 검출되지 않았다.

전체적인 검출 결과를 보면 모든 정점에서 3월에서 5월로 시간이 흐름에 따라 검출량이 감소하는 추세를 보였다(Fig. 11).

퇴적물 내 휴면포자 검출량과 비교하기 위해 표층 해수 20 L를 현장 농축한 시료를 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통한 검출과 직접계수 실행하였다. 본 연구의 채집 기간 동안의 자란만 모든 정점에서 *C. polykrikoides*의 rDNA copy와 영양세포가 검출, 관찰되지 않았다.

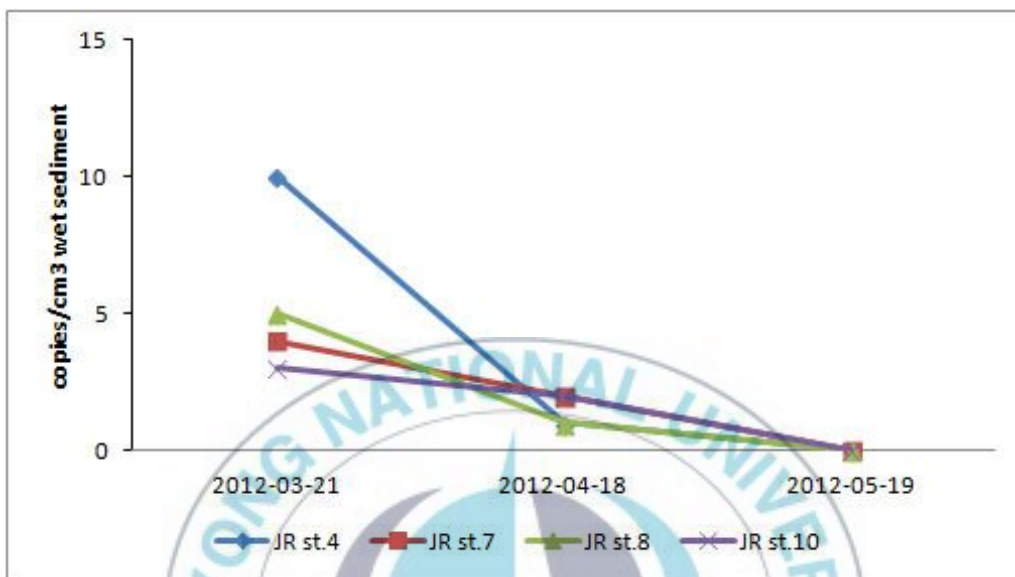


Fig. 11. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoies* at the stations - 4, 7, 8, 10 from sediment in the coast of Jaran Bay.

B. 남해 물건항

2012년 10월부터 11월에 정점1과 정점2 조사를 시작으로 2013년 3월부터 정점 3을 추가로 하여 총 9차례 조사를 시행하였다.

2012년 10월 5일 두 정점 모두에서 검출되지 않았으나 10월 25일 정점1과 정점2에서 각각 1 copies/cm³ wet sediment씩 동일하게 검출되었으며 11월 3일 정점1에서는 10 copies/cm³ wet sediment, 정점2에서는 2 copies/cm³ wet sediment이 검출되었다.

11월 15일 정점1에서는 4 copies/cm³ wet sediment, 정점2에서는 1 copies/cm³ wet sediment 검출되었다

2013년 3월에는 모든 정점에서 *C. polykrikoides* rDNA가 검출되지 않았으며 4월에는 정점1에서는 1 copies/cm³ wet sediment, 정점 2와 정점3에서 각각 2 copies/cm³ wet sediment 씩 검출되었다. 5월에는 정점1에서는 검출되지 않았으나 정점2에서는 3 copies/cm³ wet sediment, 정점3에서는 2 copies/cm³ wet sediment 씩 검출되었다.

2013년 8월 21일에는 모든 정점에서 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되지 않았으나 일주일 후인 8월 28일에는 정점 1에서는 1 copies/cm³ wet sediment, 정점2에서는 3 copies/cm³ wet sediment, 정점3에서는 5 copies/cm³ wet sediment로 검출되었다.

2012년과 2013년 조사결과 적조가 발생하기 전과 소강한 후에 퇴적물 내 *C. polykrikoides* rDNA 양이 증가하는 패턴을 보였다(Fig. 12).

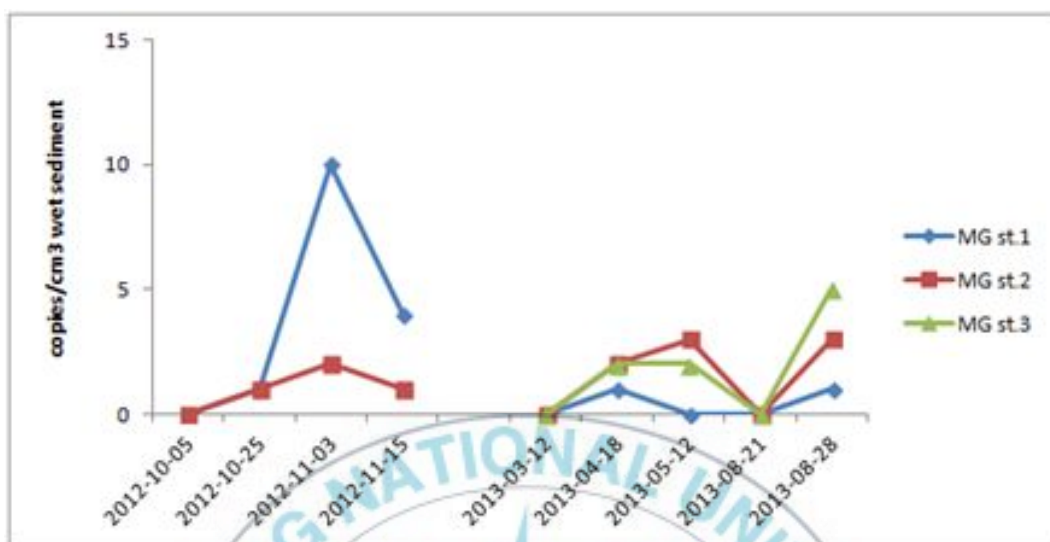


Fig. 12. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* at the stations - 1, 2, 3 from sediment in the Mulgeon harbor.

퇴적물 내 휴면포자 검출량과 비교하기 위해 표층 해수 20 L를 현장 농축한 시료를 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통한 검출과 직접계수 실행하였다. 해수 내 rDNA copy수는 2012년 10월 5일 1번 정점에서 최대 287 copies/L을 보였으며 시간이 지날수록 감소하는 추세를 보였다. 직접계수를 통한 해수 내 cell수는 2012년 10월 5일 2번 정점에서 최대 510 cells/L를 보였으며 rDNA copy수와 마찬가지로 시간이 지날수록 감소하는 추세를 보였다. 반대로 퇴적물 내 rDNA copy 수는 증가하는 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 13). 2013년의 해수샘플의 경우 모든 정점에서 rDNA copy 와 영양세포가 검출, 관찰되지 않았다.

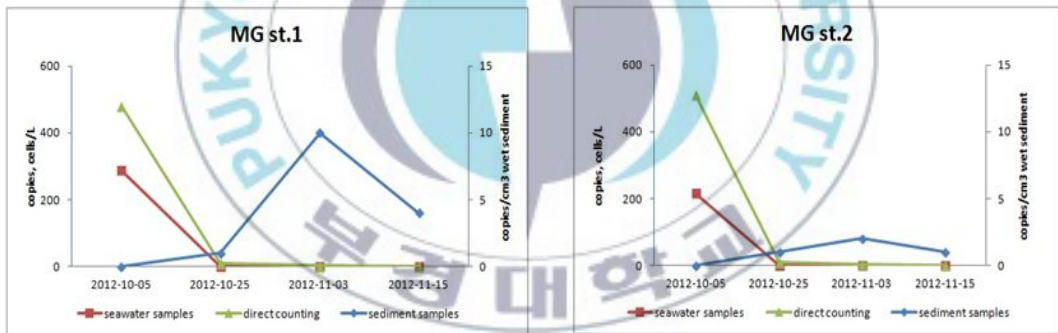


Fig 13. Comparisons of rDNA copy numbers (■, seawater samples; ◆, sediment samples) and vegetative cell numbers(▲) of *C. polykrikoides* of two stations of Mulgeon harbor in 2012.

C. 남해 미조

남해 미조해역은 2012년 8월 동안 5 차례 조사하였다.

8월 6일에 정점 1에서는 2 copies/cm³ wet sediment, 정점 2에서는 2 copies/cm³ wet sediment, 정점3에서는 검출되지 않았다.

8월 9일에 정점 1에서는 1 copies/cm³ wet sediment, 정점 2에서는 2 copies/cm³ wet sediment, 정점3에서는 검출되지 않았다.

8월 12일에는 모든 정점에서 검출되지 않았다.

8월 15일 정점 1에서는 6 copies/cm³ wet sediment, 정점2에서는 11 copies/cm³ wet sediment, 정점3에서는 3 copies/cm³ wet sediment 가 검출되었다.

8월 18일 정점1에서는 2 copies/cm³ wet sediment, 정점2에서는 3 copies/cm³ wet sediment, 정점3에서는 3 copies/cm³ wet sediment이 검출되었다(Fig. 14).

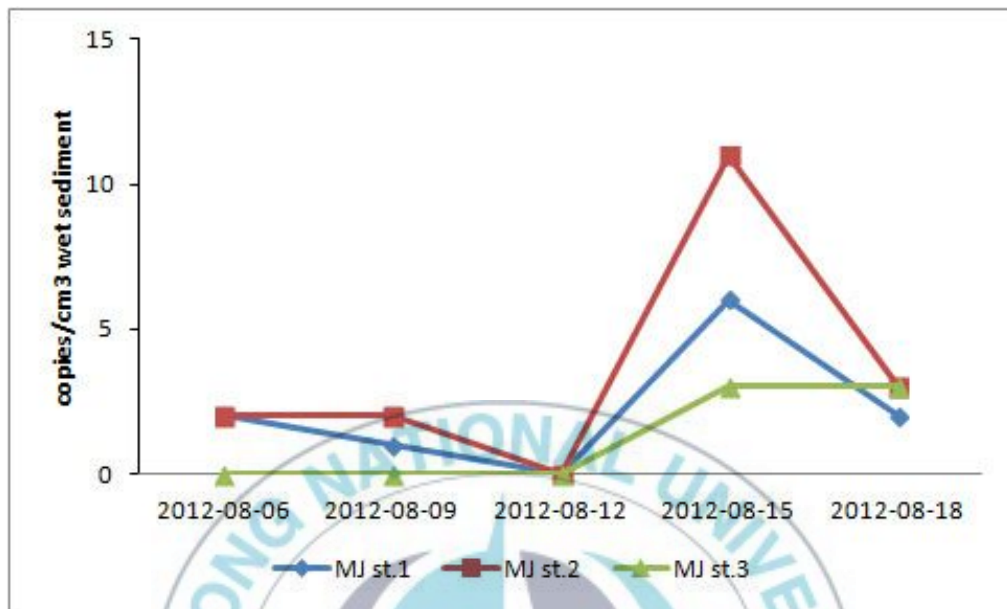


Fig. 14. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* at the stations - 1, 2, 3 from sediment in the coast of Mijo.

퇴적물 내 휴면포자 검출량과 비교하기 위해 표층 해수 20 L를 현장 농축한 시료를 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통한 검출과 직접계수 실행하였다. 해수 내 rDNA copy수는 2012년 8월 6일 3번 정점에서 최대 1,477 copies/L를 보였으며 시간이 지날수록 감소하는 추세를 보였다. 직접계수를 통한 해수 내 cell수는 2012년 8월 6일 2번 정점에서 최대 500 cells/L를 보였으며 rDNA copy수와 마찬가지로 시간이 지날수록 감소하는 추세를 보였다(Fig. 15).

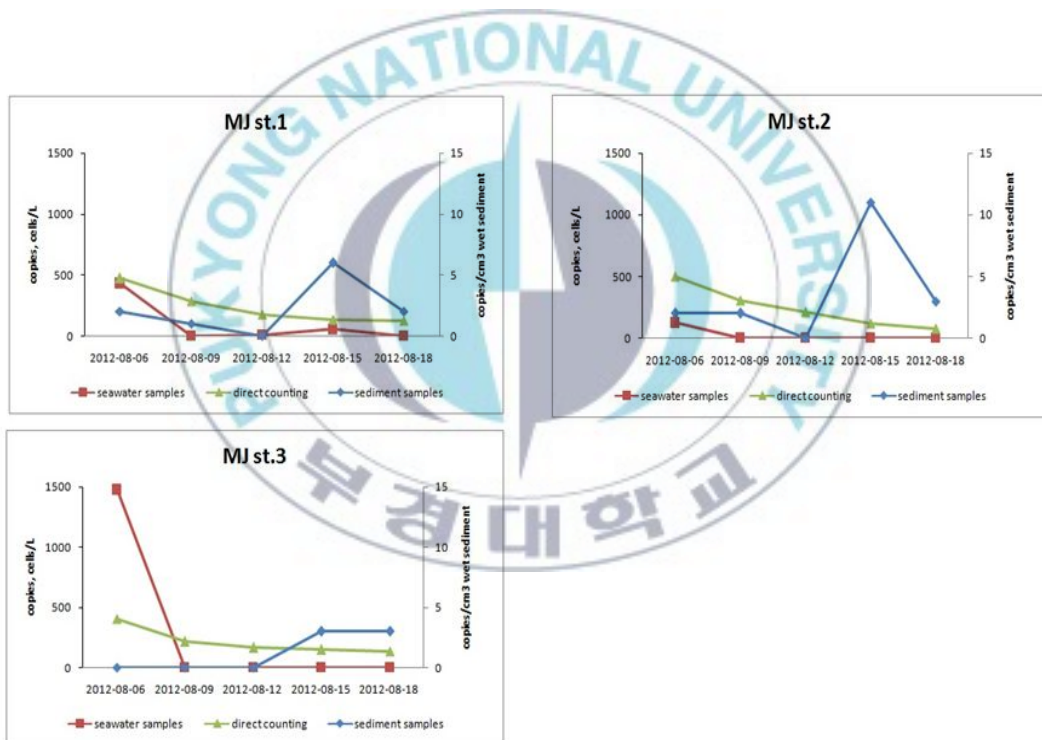


Fig. 15. Comparisons of rDNA copy numbers (■, seawater samples; ◆, sediment samples) and vegetative cell numbers(▲) of *C. polykrikoides* of three stations of Mijo coast in 2012.

D. 통영 욕지도

욕지도에서는 2012년 8월과 2013년 6월부터 7월까지 총 4차례 조사하였다.

2012년 8월에는 검출되지 않았으며 2013년 6월에는 21 copies/cm³ wet sediment 이 검출되었다. 7월 초 조사에서는 235 copies/cm³ wet sediment 의 높은 검출량을 보였으나 7월 중순 조사에서는 검출되지 않았다 (Fig. 16).

퇴적물 내 휴면포자 검출량과 비교하기 위해 표층 해수 20 L를 현장 농축한 시료를 DNA를 추출하여 real-time PCR을 통한 검출과 직접계수 실행하였다. 해수 내 rDNA copy수는 조사기간 동안 소수점 이하가 검출되었으며 직접계수를 통한 해수 내 cell수는 2012년 8월 21일 575 cells/L, 2013년 7월 18일 60 cells/L을 제외한 다른 일시에는 관찰되지 않았으며 퇴적물 내 rDNA 검출량과 반대 양상을 보였다(Fig. 16).

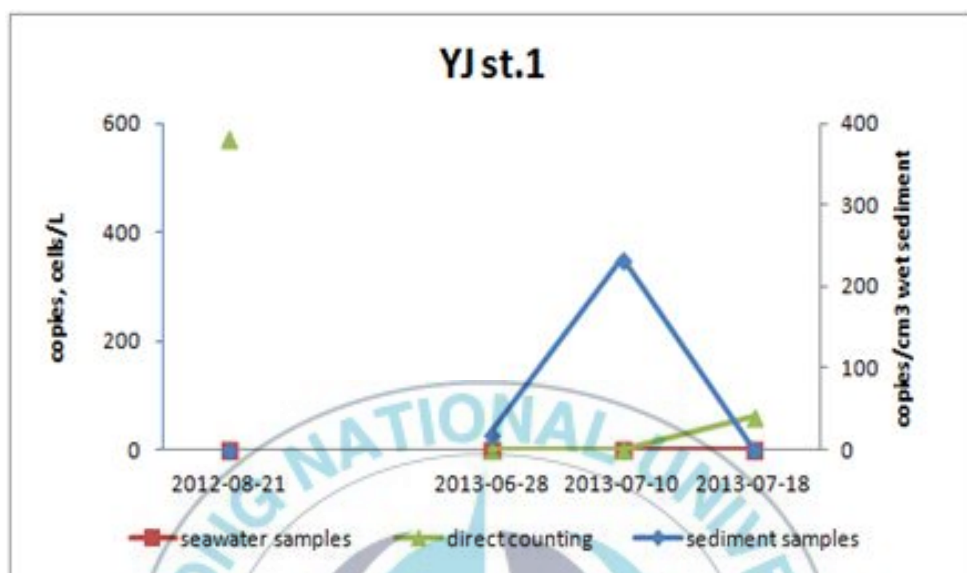


Fig 16. Comparison of rDNA copy numbers (■, seawater samples; ◆, sediment samples) and vegetative cell numbers(▲) of *C. polykrikoides* at Yokji station in 2012–2013.

E. 남해 평산

남해 평산 해역에서는 2012년 8월 한차례 조사하였다. 정점1에서는 2 copies/cm³ wet sediment, 정점2에서는 1 copies/cm³ wet sediment 검출되었다(Fig. 17).

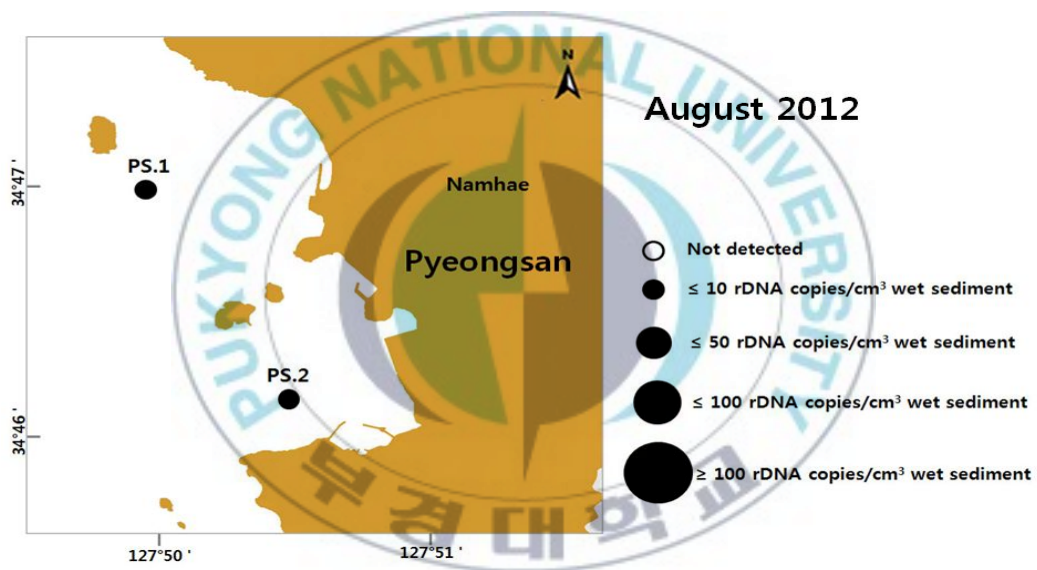


Fig. 17. rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in the coast of Pyeongsan, Namhae in August 2012.

F. 앵강만

2012년 6월에 앵강만 인근 해역에서 채집한 퇴적물시료를 real-time PCR을 한 결과 모든 정점에서 *C. polykrikoides* rDNA copy가 소수점 이하로 검출되었다(Fig. 18).

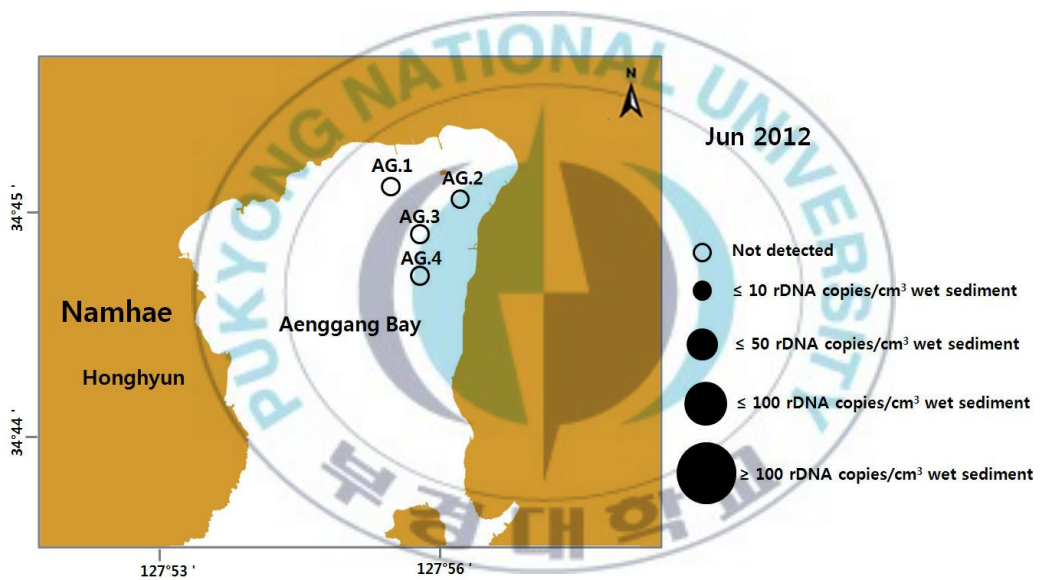


Fig. 18. rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in the coast of Aenggang Bay in June 2012.

G. 여수 임포

2012년 7월 여수 임포 해역에서 채집한 퇴적물에서는 모든 정점에서 *C. polykrikoides* rDNA copy가 소수점 이하로 검출되었다(Fig. 19).

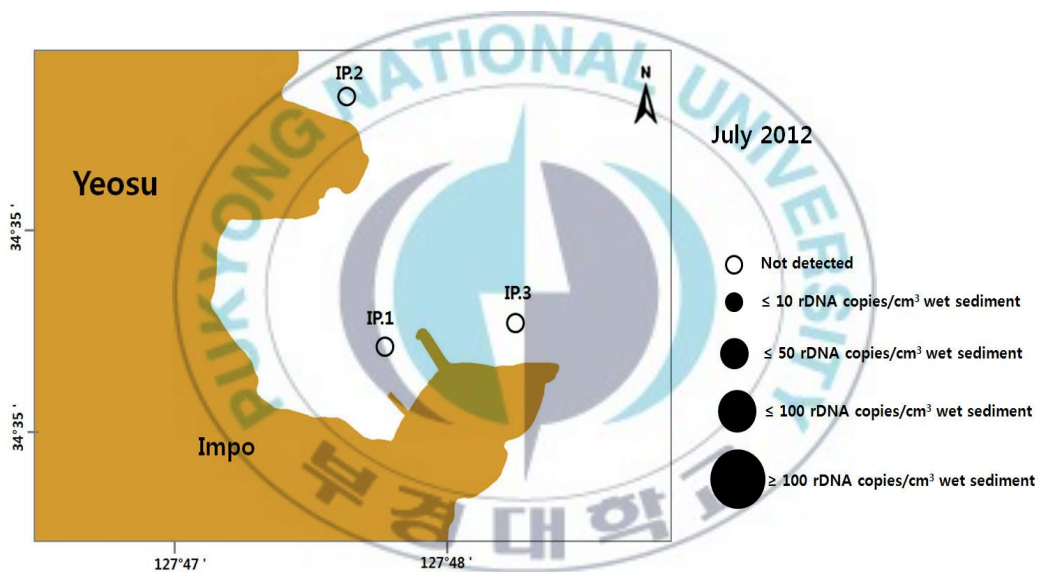


Fig. 19. rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in the coast of Impo, Yeosu in July 2012.

4. 고찰

본 연구에서는 적조 상승 발생지역인 남해 동부 연안을 중심으로 퇴적물 중의 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 관찰하고 *C. polykrikoides*의 발생과정과 real-time PCR을 이용하여 seed population의 존재 가능성을 파악하고자 하였다.

첫 번째로 현장에서 *C. polykrikoides*의 형성과 발아과정을 관찰을 위해 각 정점별로 해수와 퇴적물 시료를 여과, 농축하여 실험실 내에서 형광도립현미경을 통해 지속적인 관찰을 실행하였다.

적조 소멸 시기 현장 해수 시료에서 *C. polykrikoides*의 영양세포와 크기는 비슷하지만 투명한 막을 가지고 비운동성, chloroplast가 결여된 hyaline cyst를 관찰 할 수 있었으며, Kim *et al.*(2002)의 연구와 마찬가지로 실험실 내에서 영양세포로부터 hyaline cyst의 형성 과정을 확인할 수 있었다.

영양세포로부터 형성된 hyaline cyst를 형광도립현미경 하에서 관찰하였을 때 red body 부분이 붉게 빛나는 것을 확인하였으며, 실험실 내의 4℃, 암소에서 6개월 보관 한 뒤 호적한 환경에 두었을 때 영양세포로 다시 가입하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 hyaline cyst는 *C. polykrikoides*의 영양세포로부터 형성된 휴면포자이며 충분한 월동기간을 거친 후 재발생 함으로써 *C. polykrikoides*의 사멸단계가 아닌 생활사의 한 단계를 차지할 것이라 생각된다.

C. polykrikoides 적조 시기의 해수시료를 6 well plate에 분주하여 실험실 내에서 지속적으로 관찰하였다. 관찰 기간 동안 *C. polykrikoides*의 연쇄체들이 시간이 지날수록 단일세포로 나누어졌으며, 이 단일세포가 서로 결합하는 것을 관찰할 수 있었다. 결합 과정의 세포에서 두 개의 편모를 관찰할 수 있었으며 뚜렷한 red body를 관찰할 수 있었다. 시간이 경과하면서 뚜렷한 red

body를 가진 황색의 둥근 형태의 세포로 변화하는데 그 크기는 20-30 μm 이었으며(Fig. 6), 이는 Tang and Gobler(2012)의 연구에서 유성생식에 의해 형성된 cyst의 형태와 유사하였다. 단일세포로부터 형성된 세포를 단일 분리하여 호적한 환경에 두었을 때 사멸되지 않고 뚜렷한 횡구를 가진 영양세포로 재가입되는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 통해서 단일세포로부터 형성된 이 세포는 *C. polykrikoides*의 temporary cyst의 한 형태일 것으로 생각되어진다.

한편 자란만 내 해수 netting 시료에서 휴면포자(Fig. 8 A-B)가 최초로 분리되었으며 이로부터 *C. polykrikoides*의 초기발아체가 관찰되었고, 발아체는 뚜렷한 red body가 존재하였다. 그리고 1~2 chains의 경우 횡구가 세포면을 약 2회 정도 회전함으로써(Matsuoka *et al.*, 2008) 타 종과 뚜렷이 구분할 수 있었다.

본 연구에서 관찰된 *C. polykrikoides*의 영양세포로부터 형성된 두 가지 형태의 일시적 휴면포자와 현장 휴면포자로부터 초기 발아체의 발생과정을 확인함으로써 Kim *et al.*(2007)의 연구에서 제시한 *C. polykirkoides*의 생활사가설에서의 미흡한 부분을 해결할 수 있는 중요한 단서가 될 것이라 생각된다.

두 번째로 real-time PCR을 이용하여 해수와 퇴적물 중의 시공간적인 rDNA 검출하여 휴면포자의 존재와 지역개체군 발생의 잠재 가능성을 확인하고자 하였다. real-time PCR 분석은 해수와 퇴적물 내에는 PCR을 방해하는 유기·무기물질이 포함될 수 있으며 이는 target DNA와 함께 추출되어 결과에 오류를 범할 수 있다. 이 때 DNA시료를 희석하거나 정제했을 경우 PCR 방해 인자를 제거하거나 줄임으로써 보다 더 정확한 검출을 할 수 있다(Lin *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). 따라서 본 연구에서는 PCR 방해인자를 제거하기 위해 추출한 DNA를 10배수로 희석한 후 real-time PCR을 진행하

였다.

2012년 3월부터 5월까지 자란만 해역의 조사결과를 보면, 3월과 4월의 정점 4, 7, 8, 10 모두에서 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되었으며 정점 4에서 최대 10 copies/cm³ wet sediment가 검출되었다(Fig, 11). 자란만 해역의 *C. polykrikoides*의 영양세포의 초기 출현이 6월인 것으로 보았을 때(Kim *et al.*, 2012), 본 연구의 조사시기인 3월에서 5월은 *C. polykrikoides*의 영양세포가 출현하지 않는 시기이며 본 실험에서도 해수 내 영양세포와 rDNA 또한 관찰, 검출되지 않았다. 이를 통해 본 연구에서 3, 4월의 퇴적물 시료에서 검출된 *C. polykrikoides*의 rDNA는 *C. polykrikoides* 휴면포자일 가능성이 높을 것으로 생각된다. 2013년 7월 자란만 일대에 고밀도의 적조가 발생함에 따라 본 지역이 *C. polykrikoides*의 seed bed가 형성되어 있으며 *C. polykrikoides* 적조가 상습적으로 발생할 가능성이 높을 것으로 보여진다.

2010년 자란만의 퇴적물 내 *C. polykrikoides*의 rDNA 검출결과(Kim *et al.*, 2012)와 본 연구 결과를 비교해 보았을 때 각 정점에서 rDNA가 지속적으로 검출되었으나 Fig. 20에서와 같이, 같은 정점임에도 불구하고 검출량의 증·감소 패턴이 반대 양상을 띄는 것을 볼 수 있었다. 이를 통해서 real-time PCR 모니터링 뿐만 아니라 물리·환경적 요인을 함께 지속적으로 관찰한다면 보다 더 정확한 seed bed 형성 분포와 발아 요인을 해명하는데 중요한 단서가 될 것으로 보여진다.

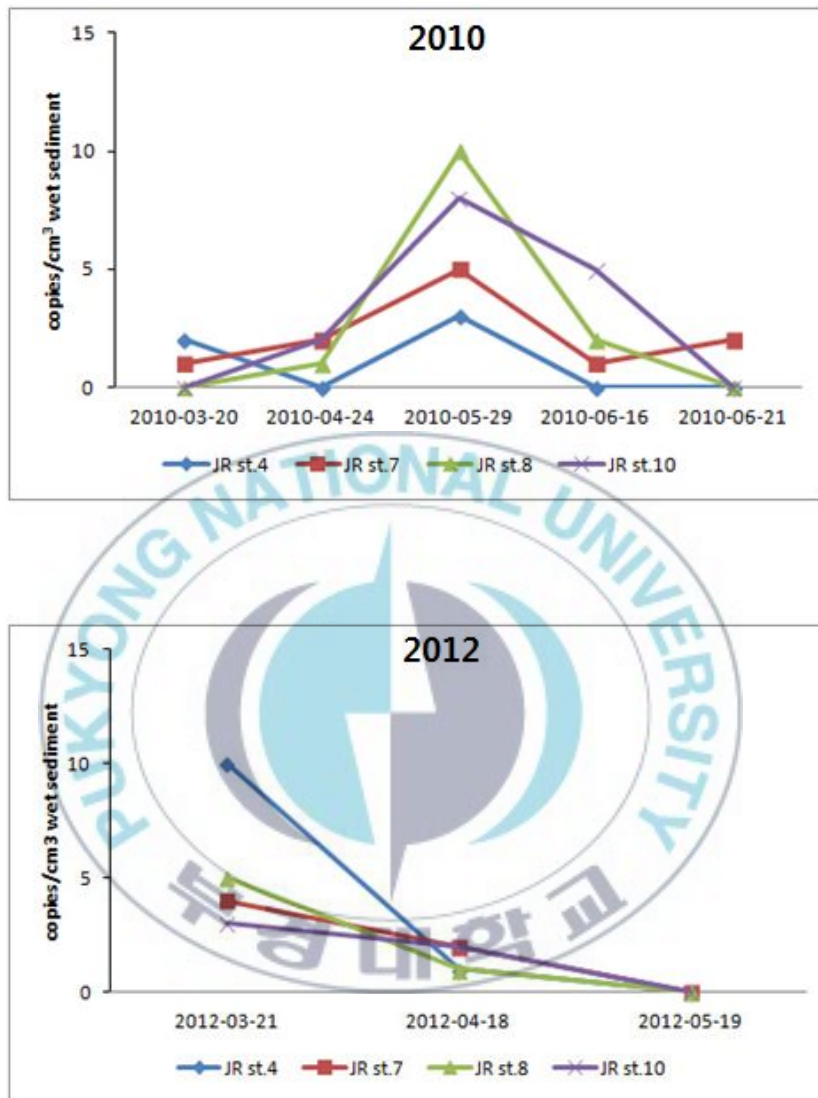


Fig. 20. Fluctuation of rDNA copy numbers of *C. polykrikoides* in sediment of Jaran Bay in 2010 and 2012.

남해 물건항의 조사결과를 보면 2012년 11월 3일 퇴적물내의 rDNA copy가 최대 10 copies/cm³ wet sediment 양이 검출되었으며 2013년 8월 21을 제외한 퇴적물에서는 지속적으로 rDNA가 검출되었다(Fig. 12). 표층 해수 내 존재하는 *C. polykrikoides* rDNA copy수와 직접계수를 통한 영양세포 수 값을 비교했을 때 수치상으로는 차이가 났지만 전체적인 추이가 비슷한 것을 볼 수 있었다. 또한 다음 두 값을 퇴적물 내 rDNA 값과 비교하여 보았을 때 영양세포 copy수와 직접 계수값이 감소함에 따라 퇴적물 내 copy수가 증가하는 패턴을 볼 수 있었다(Fig. 13). 이는 적조 사멸 이후 저층으로 가라앉은 *C. polykrikoides* 영양세포 또는 유성생식을 통해 형성된 일시적 휴면포자가 검출된 것이라고 생각된다.

남해 미조 연안의 경우도 물건항과 마찬가지로 해수내 *C. polykrikoides*의 영양세포와 rDNA의 copy수가 감소함에 따라 퇴적물내의 rDNA copy수가 증가하는 패턴을 보였다(Fig. 15). 이 또한 물건항의 경우와 같은 맥락인 것으로 사료되며, 물건항과 남해미조에는 *C. polykrikoides*의 seed bed가 형성되어 있으며 상습적으로 *C. polykrikoides* 적조가 나타날 것으로 예상된다.

통영 욕지도의 퇴적물 시료에서는 *C. polykrikoides* rDNA copy가 2012년 8월에는 검출되지 않았지만 2013년 6월 28일에는 21 copies/cm³ wet sediment, 7월 10일 조사에서는 235 copies/cm³ wet sediment 의 높은 검출량을 보였으나 7월 18일 조사에서는 검출되지 않았다(Fig. 16). 2013년도 국립수산물학원 적조속보에 의하면 7월 17일부터 *C. polykrikoides* 적조 주의보가 발령되었으며, 7월 18일 해수 내 *C. polykrikoides* 영양세포의 관찰 계수 값이 증가하였다. 이를 통해 직접계수 결과와 real-time PCR 검출결과를 비교해 보았을 때 *C. polykrikoides*의 발생 추이는 저층내 존재하는 휴면포자가 먼저 발생하여 퇴적물 내 검출량이 증가하였다가 표층의 발아체 수치

가 증가함에 따라 감소하는 양상을 볼 수 있으며, 수온의 변화와 같은 다양한 환경조건의 변화에 따라 발아체가 반응하는 것이라 생각된다.

남해안의 평산, 앵강, 임포 지역의 퇴적물내 *C. polykrikoides* rDNA는 소수점 이하의 copy수가 검출되었다. 이는 조사 시기상 *C. polykrikoides*의 발생 시기이므로 퇴적물 내 휴면포자가 발아하였기 때문에 검출되지 않은 것으로 생각된다. 해당 정점이 *C. polykrikoides*의 적조 상승 발생 지역인 것을 감안하여 *C. polykrikoides*의 발생 시기 전, 후의 퇴적물을 사용하여 real-time PCR을 실행한다면 *C. polykrikoides*의 rDNA가 검출 될 것이라 생각되며 해당 지역의 ‘씨앗개체군(seed population)’을 예측 가능 할 것이라 판단된다.

Park et al.(2010)의 결과를 보면 2007년 진해만 퇴적물시료에서는 약 15,000 copies/cm³ wet sediment, 여수에서는 약 560,000 copies/cm³ wet sediment 의 값이 보고 된 것에 비해 본 연구에서는 현저하게 낮은 값이 나왔다. 그 원인을 적조발생시기를 통해 비교해 보면 park et al.(2010)의 연구시기인 2007년의 진해와 여수에서 *C. polykrikoides* 적조 발생 직후의 시료를 채집하여 조사하였으며, 이 때 검출된 rDNA는 *C. polykrikoides*의 증식이 감소하면서 형성된 다량의 휴면포자가 검출된 것으로 보여진다. 한편 2009년부터 2011년 *C. polykrikoides*의 적조가 본 연구 지역에서 대량 발생 하지 않았으며 이전의 적조 발생시 형성된 다량의 휴면포자가 시간이 지나면서 부분 발생, 손상 또는 유실되어 개체수가 감소하면서 본 연구 결과에 영향을 미친 것으로 보여진다.

퇴적물 내에는 humic acid, 페놀성 화합물, 중금속 등 PCR 저해인자가 포함되어 있다. 특히 humic acid와 같은 성분은 DNA를 고정하는 역할을 하여

퇴적물 내에 사멸된 영양세포의 DNA가 시료 내에 고정되어 장기간 동안 잔류할 수 있다(England *et al.*, 1997; Park and Park, 2010). 본 연구에서는 PCR 방해인자를 줄이기 위해 채집된 퇴적물에서 추출한 DNA를 10배 희석하여 실험을 시행하였지만 퇴적물내에 *C. polykrikoides*의 유영세포가 유입되어 휴면포자와 함께 검출되었을 가능성이 있다. 따라서 현장 내 퇴적물에서 DNA로 역전사 가능한 RNA 추출과 RNA를 target으로 하는 종 특이적인 probe 개발이 확립된다면 살아있는 휴면포자만을 검출할 수 있는 효과적인 대안을 만들 수 있을 것이다(Park and Park, 2010).

또한 보다 더 정확한 휴면포자 양을 정량하기 위해서는 충분한 양의 휴면포자가 확보되어야 한다. 하지만 현장에서는 다량의 휴면포자의 확보가 어려우므로 실험실 내에서의 유성생식을 통한 휴면포자 확보를 통해 standard curve 작성 후 real-time PCR을 실시가 필요하다(Erdner *et al.*, 2010). *C. polykrikoides*의 경우 또한 현장에서의 휴면포자 확보가 어렵다. 따라서 본 연구에서 관찰, 생성한 일시적 휴면포자의 실험실 내 다량 확보를 통해 각 형태의 일시적 휴면포자의 DNA를 추출하여 real-time PCR을 실행, 비교·분석한 결과를 이용하여 지속적인 현장 모니터링을 실행한다면 적조 발생 가능 지역과 예측, 정확한 적조 발생기작, 그리고 *C. polykrikoides*의 생활사의 명확한 해명에 기여할 수 있을 것이다.

5. 요약

유해성 와편모조류인 *Cochlodinium polykrikoides*는 대증식 시 점액질을 생성하여 어류의 아가미에 부착되어 어류의 폐사를 일으키는 적조생물로서 사회·경제적으로 심각한 문제를 일으키고 있는 적조 원인 중 하나이다. *C. polykrikoides*가 속한 유해성 적조를 유발하는 와편모조류 중 중 휴면포자를 형성하는 종은 약 20여종으로 알려져 있으며, 이때 휴면포자는 씨앗개체군 (seed population) 역할을 하여 적조발생의 장소와 시기를 예측할 수 있는 중요한 단서로 이용될 수 있다.

*C. polykrikoides*의 경우 국내외적으로 대량발생과 확산에 의한 피해가 심각한 상태임에도 불구하고 현장 휴면포자의 실체와 역할에 대한 충분한 해명이 되어있지 않은 상태였으나 최근 real-time PCR을 이용한 퇴적물 내 휴면포자 검출을 통해 내부 적조발생 잠재력 존재 가능성이 제시되었다.

본 연구에서는 적조 상습 발생지역인 남해 동부 연안인 자란만, 여수 임포, 통영 옥지도, 남해 물건항, 미조, 평산, 앵강만 해역을 중심으로 *C. polykrikoides*의 발생단계와 real-time PCR을 통한 *C. polykrikoides*의 검출과 적조 발생 잠재력을 파악하고자 하였다.

본 연구에서 *C. polykrikoides* 적조 소강시기에 영양세포의 단성생식에 의하여 형성된 hyaline cyst를 관찰하였다. Hyaline cyst는 일정기간 동안 월동기간을 거친 후 호적한 환경에서 영양세포로 재발생되는 것을 확인함으로써 *C. polykrikoides*의 현장 개체군 발생에 크게 기여할 것으로 판단되어졌다. 또한 실험실 내에서 temporary cyst의 형성과 발아과정을 관찰하였으며, 저층 해수 netting 시료에서 *C. polykrikoides*의 휴면포자와 그 발생과정을 관찰함으로써 본 연구의 결과가 *C. polykrikoides*의 생활사 해명에 중요한 단서가 될 것으로 보여진다.

본 연구에서는 종 특이적인 ITS rDNA영역을 통해 제작된 primer와

probe를 이용하여 실시간으로 PCR 증폭산물을 모니터링을 하는 real-time PCR 기법을 사용하여 *C. polykrikoides* rDNA를 검출과 적조 발생 잠재력을 파악하였다.

C. polykrikoides rDNA는 자란만, 남해 물건항, 미조, 통영 옥지도의 퇴적물시료에서 검출되었으며, 남해 평산, 앵강만, 여수 임포 지역은 소수점 이하의 copy수가 검출되었으나 이는 조사시기상 *C. polykrikoides*의 발생 시기이므로 퇴적물 내 휴면포자가 발아하였기 때문에 검출되지 않은 것으로 생각된다.

자란만의 퇴적물 시료의 경우 rDNA copy수는 초기 발생 시기가 다가옴에 따라 점차적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 퇴적물내 존재하는 *C. polykrikoides* 휴면포자가 호적인 환경으로 인해 발아함으로써 검출되는 copy 수가 감소한 것으로 판단된다.

또한 2012년 대량 적조가 발생하였던 물건항과 미조 정점의 경우, 표층 해수의 *C. polykrikoides*의 rDNA copy수가 감소함에 따라 퇴적물 시료내의 copy수가 증가하였다. 이는 적조가 소강함에 따라 단성 또는 유성생식을 통해 형성된 휴면포자에서 검출된 것으로 보여진다.

통영 옥지도는 7월 최대 235 copies/cm³ wet sediment의 높은 검출량을 보였으며 단기간동안 검출량의 급격한 변화를 보였다. 하지만 본 연구에서 이에 대한 뚜렷한 결과를 얻지 못하였으므로 정확한 요인을 파악하기 위해 앞으로 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 보여진다.

본 연구에서는 적조 상습 발생지역에서 *C. polykrikoides*의 일시적 휴면포자와 초기발아체의 발생단계 과정을 관찰하였으며, 퇴적물 및 해수에서 *C. polykrikoides* rDNA 검출을 통해 남해 동부 연안의 휴면포자의 존재 가능성과 지역별 seed population을 확인 할 수 있었다. 본 연구 결과를 토대로 지속적인 모니터링을 실행한다면 *C. polykrikoides* 생활사의 명확한 해명, 보다

정확한 적조 발생 예측과 발생기작을 규명 할 수 있는 기초자료로 활용될 수
을 것으로 기대된다.



참고문헌

국립수산물과학원, 2006-2008. 한국연안의 적조발생 상황. 국립수산물과학원.

국립수산진흥원, 1997. 한국연안의 적조 -최근 적조의 발생원인과 대책-. 국립수산진흥원, 280 pp.

국립수산진흥원, 1997-2003. 어패류 위생에 관한 연구, 우리나라 남해안에서의 패류독성(마비성, 설사성, 기억상실성)의 발생 및 변동에 관한 연구. 국립수산진흥원 사업보고서.

김진주, 2007. 해저퇴적물이 유해적조생물 *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae) 증식에 미치는 영향. 부경대학교, 석사학위논문, 54 pp.

김창숙, 김학균, 1999. 적조원인 식물성 플랑크톤의 독성. 농업생명과학회지, 6: 8-14.

김창훈, 김동선, 오석진, 김충재, 배현민 등, 2012. 생활사 해명을 통한 코클로디니움 유해 적조의 제어기술개발. 농림수산물식품부 연구과제보고서, 226 pp.

김창훈, 배현민, 2006. 친환경적 적조구제 및 제어기술의 현장 실용성 평가. 해양수산물, pp. 424.

김학균, 박주석, 이필용 등, 1995. 부영양화 및 적조현상 규명에 관한 연구. 환경부·과학기술처, pp. 180-181.

김학균, 정창수, 임월애, 이창규, 김숙양, 윤성화, 조용철, 이삼근, 2001. 한국연안 *Cochlodinium polykrikoides* 적조 발생과 변천. 한수지, 34: 691-696.

김형철, 1999. 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*의 조류성장잠재력과 제한영양염 추정. 부경대학교, 석사학위논문, 78 pp.

김형철, 이창규, 이삼근, 김학균, 박청길, 2001. *Cochlodinium polykrikoides*의 성장에 미치는 물리, 화학적 요인과 영양염 이용. 한수지, 34(5), 445-456.

박기홍, 2005. 한국 연안 일대의 와편모조류 휴면포자 분포와 퇴적물 내 *Cochlodinium polykrikoides*의 검출. 부경대학교, 석사학위논문, 48 pp.

송지효, 2012. 자란만에서의 유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides* 발생과 환경 특성. 부경대학교, 석사학위논문, 49 pp.

심재형, 1994. 한국동식물도감 제 34권 식물편(해양식물플랑크톤). 교육부, 487 pp.

오석진, 윤양호, 김대일, Yohei Shimasaki, Yuji Oshima and Tsuneo Honjo, 2006. 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides* Margalef(Dinophyceae) 성장에 영향을 미치는 광량과 파장. Algae 21(3): 311-316.

이충일, 곽영세, 김대운, 1999. 해수의 무기영양염 농도와 제강슬래그가 와편모조류 휴면포자 발아에 미치는 영향. RIST 13(4): 539-542

이보람, 2011. Real-time PCR을 이용한 유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*의 발생 잠재력 조사. 부경대학교, 석사학위논문, 47 pp.

Anderson, D.M., D. Wall, 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarens* and *Gonyaulax excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. J. phycol. 14: 224-234.

Anderson, D.M., Y. Fukuyo, K. Matsuoka, 2003. Cyst methodologies. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology 11, UNESCO, pp. 165-190.

Bolch, C.J.S., M.F. de Salas, 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium* “tamarensis complex” to Australasia. Harmful Algae 6: 465–485.

England, L.S., Lee, H., Trevors, J.T., 1997. Persistence of *Pseudomonas aureofaciens* strains and DNA in Soil. Soil Biol. Biochem. 29: 1521–1527.

Erdner, D.L., L. Percy, B. Keafer, J. Lewis, and D.M. Anderson, 2010. A quantitative real-time PCR assay for the identification and enumeration of *Alexandrium* cysts in marine sediment. Deep Sea Res Part 2 Top Stud Oceanogr. 1; 57(3–4): 279–287.

Jung, S.Y., W.J. Choi, H.G. Kim, Y.G. Jung, J.B. Kim and W.A. Lim, 1999. Interrelation between *Cochlodinium polykrikoides* blooms and community structure of zooplankton in the coastal waters around Namhae Do in the south sea of Korea, 1998. Bull. Nat’l. Fish. Res. Dev. Inst., 57: 153–161.

Kamikawa, R., S. Nagai, S. Hosoi-Tanabe, S. Itakura, M. Yamaguchi, Y. Uchida, T. Baba, Y. Sako, 2007. Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. Harmful Algae 6, 413–420.

Kim, C.H., H.J. Cho, J.B. Shin, C.H. Moon and K. Mastuoka, 2002. Regeneration from hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. Phycologia, 41(6): 667–669.

Kim, C.H., T.G. Park and C.K. Lee, 2010. Harmful Dinoflagellates and Mitigation Strategies in Korea. Philippine J. Sci. 139(2): 139–147.

Kim, C.J., H.G. Kim, C.H. Kim and H.M. Oh, 2007. Life cycle of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters. Harmful algae, 6: 104–111.

Kim, H.G., 1990. Coastal algal blooms caused by the cyst-forming dinoflagellate. Bull. Korean Fish. Soc., 23(6): 468–474.

Kim H.G., 1997. Recent red tides in Korean coastal waters. ocean Res. 19: 185–192.

Kim H.G., 1988a. Harmful algal blooms in Korean coastal waters focused on three fish-killing dinoflagellate. inL Harmful Algal Blooms in Korea and China. Kim, H.G., S.G. Lee and C.K. Lee, Eds. nat' l Fish. Res. Dev. Insh., pusan, pp. 1–20.

Kim H.G., 1998b. *Cochlodinium polykrikoides* blooms in Korean coastal waters and their mitigation. in: Harmful Algae. Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fenandez and T. wyatt. Eds. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO, Vigom, pp. 227–228.

Kim, H.G., S.G. Lee, K.H. An, S.H. Youn, P.Y. Lee, G.K. Lee, E.S. Cho, J.B. Kim, H.G. Choi, P.J. Kim, 1997. Recent red tides in Korean coastal waters. Nat. Fish. Res. and Dev. Insti. 228(in Korean).

Kim, H.G., J.S. Park, B.A. Kim, S.S. Lee, S.G. Lee, K.H. An, J.M. Shim, P.Y. Lee, C.M. Kang, H.G. Choi, J.S. Park, G.Y. Kim, C.G. Kang, Y.C. Park, J.Y. Seo, 1994. A study on red tide mechanism and harmful algal blooms in Korean coastal waters. Tech. Rep. Nat. Fish. Res. Dev. Agency, 117, 130 pp(in Korean).

Lee, C.K., S.G. Lee and H.G. Kim, 1999. Occurrence and abundance of three morphologically similar dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* in southern coast of Korea. Bull. Nat' l. Fish. Res. Dev. Inst., 57: 131–139.

Lee M.O., J.H. Choi, I.H. Park, 2010. Outbreak conditions for *Cochlodinium polykrikoides* blooms in the southern coastal waters of Korea. Marine environmental research 70: 227–238.

Lin, S., H. Zhang, A. Dubois, 2006. Wide distribution and low abundance of *Pfiesteria piscicida* as detected by mtDNA–18S rDNA real–time PCR. J. plankton Res. 28: 667–681.

Nehring, S., 1993a. Mechanisms for recurrent nuisance blooms in coastal zones: resting cyst formation as life–strategy of dinoflagellates. In: Sterr, H., Hofsted, J., Plag, H.P. (eds.). Interdisciplinary Discussion of Coastal Research and Coastal Management Issues and Problems. Lang, Frankfurt/Main, pp. 454–467.

Nehring, S., 1997. Dinoflagellate resting cysts from Recent German coastal sediments. Bot. Mar. 40: 307–324.

Mastuoka, K., Y. Fukuyo, 2000. Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study. WESTPAC–HAB Asian Natural Environmental Science Center, Tokyo,. 29 pp.

Matsuoka, K., M. Iwataki, H. Kawami, 2008. Morphology and taxonomy of chain–forming species of the genus *Cochlodinium*(Dinophyceae). Harmful algae, 7: 261–207.

Omuts, T., M. Iwataki, V.M Borja, H. Takayama, Y. Fukuyo, 2012, Marine phytoplankton of the western pacific. Kouseisha kouseikaku Co.Ltd., 160 pp.

Park, J.S., 1995. Succession and control of red tide. Fish. Res. Kor., 12, 6~19(in Korean).

Park, J.S., H.G. Kim, S.K. Lee, 1988. Red tide occurrence and succession of its causative organism in Jinhae Bay. Bull. Nat, Fish. Res. Dev. Agency, 41, 1~26(in Korean).

Park, T.G., G.H. Park, Y.T. Park, Y.S. Kang, H.M. Bae, C.H. Kim, H.J. Jeong, Y. Lee, 2009. Identification of the dinoflagellate community during *Cochlodinium polykrikoides*(Dinophyceae) blooms using amplified rDNA melting curve analysis and real-time PCR probes. Harmful Algae 8: 430–440.

Park, T.G., Y.T. Park, 2010. Detection of *Cochlodinium polykrikoides* and *Gymnodinium impudicum*(Dinophyceae) in sediment samples from Korea using real-time PCR. Harmful Algae 9: 59–65.

Sea, P.S., S.J. Lee, Y. Kim, J.H. Lee, H.G. Kim and J.D. Lee, 1998. Axenic culture production and growth of a dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*. J. Korean Fish. Soc., 31: 71–76.

Tang, Y.Z., C. J. Gobler, 2012. The toxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*(Dinophyceae) produces resting cysts. Harmful Algae 20: 71–80.

Zhang, H., S. Lin, 2005. Development of a cob-18S rDNA gene real-time PCR assay for quantifying *Psiesteria shumwayae* in the natural environment. Appl. Environ. Microbiol. 71: 7053–7063.

감사의 글

학부 때부터 때로는 엄한 스승님으로 아낌없이 지도해주시고, 때로는 아버지 같이 저를 이끌어주신 김창훈 교수님 감사드립니다. 그리고 저의 논문을 위해 바쁘신 와중에도 논문 수정에 도움주시고 조언해주신 남윤권 교수님과 박태규 박사님 감사드립니다. 그리고 학부시절부터 많은 가르침 주신 허성범 교수님, 배승철 교수님, 김동수 교수님, 김종명 교수님, 공승표 교수님, 강성민 교수님 감사드립니다.

석사 실험하는 동안 제가 어려울 때 항상 내 일처럼 도와주고 희로애락을 함께한 가족 같은 실험실 식구들과 고성 수산과학기술센터 식구들, 김지일 선배님, 윤창호 부장님, 하승진 주사님, 경훈이오빠, 종석이오빠, 지홍이오빠, 성균이오빠, 재구오빠, 병권이, 민정이, 승룡이, 민주, 은지 감사합니다. Hossein, and Roksana I appreciate your help and kindness!! 그리고 논문 작성 시 많은 조언 주신 철희 선배님, 경미언니, 정수오빠, 보람언니 정말 감사합니다. 논문 실험 도와주시고 조언해주신 남동해 수산과학 연구소 연구원 언니들 감사합니다.

2년간의 학교생활에 큰 힘이 되어준 대학원 12학번 동기들 동욱오빠, 준형오빠, 병수오빠, 승한이, 초원이, 그리고 학교생활에 많은 도움 주신 상운선배, 현호오빠, 기태오빠, 효선언니, 민균오빠, 9호관 갈 때 마다 반갑게 맞아주던 사료방 식구들 그리고 학과사무실 조교 다래언니, 경묘언니 감사합니다.

지칠 때마다 활력을 불어넣어주는 07동기 친구들 하나, 나리, 윤영, 민정, 쾌재 그리고 학교생활에 힘들어 할 때마다 힘내라고 용기 주던 소영이, 은령이, 아름이 감사합니다. 필리핀을 통해 더 가까워지고 긍정기운 넣어준 기현오빠, 수현, 여진, 경은이, 민정이언니 감사합니다.

마지막으로 항상 걱정해주고 절 뒷받침해주는 사랑하는 가족들에게 감사드리며 그 외에도 저의 힘이 되어주신 모든 지인분들께 감사드리며 항상 성실하게 살면서 다른 이의 힘이 될 수 있도록 하겠습니다.