

수산학석사 학위논문

한국 연안 일대의 외편모조류 휴면포자 분포와
저질 내 *Cochlodinium polykrikoides* 의 검출

지도교수 김 창 훈



2005년 2월

부경대학교대학원

수산생물학과

박 기 홍

박기홍의 수산학석사 학위논문을 인준함

2004년 12월 23일

주 심 이학박사 김 동 수 (인)

위 원 이학박사 김 종 명

위 원 농학박사 김 창 훈



목 차

Abstract	iii
Figure legends	v
Table legends	vi

제1장 한국 연안 일대의 외편모조류 휴면포자의 시공간적 분포

1-1 서 론	1
1-1-1 조사 정점	2
1-2 재료 및 방법	5
1-2-1 휴면포자 분포 조사 방법 비교	5
1-2-2 고생물학적 방법	5
1-3 결 과	8
1-3-1 휴면포자 분포 조사 방법 비교	8
1-3-2 새만금 해역에서 휴면포자의 분포	10
1-3-3 진해만 수정리에서 휴면포자의 분포	15
1-4 고 찰	18

제2장 한국 남해 연안 저질 내에서 종 특이적 **Oligonucleotide** 쌍을 이용한 유해성 외편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*의 검출

2-1 서 론	22
---------------	----

2-2 재료 및 방법	24
2-2-1 총 DNA 추출	24
2-2-2 <i>C. polykrikoides</i> 의 분자계통 해석	25
2-2-3 PCR 조건 및 <i>C. polykrikoides</i> 특이적 oligonucleotide 쌍 디자인	25
2-2-4 CPOLY01, CPOLY02의 반응 특이성	25
2-2-5 CPOLY01, CPOLY02의 검출 감도	26
2-2-6 저질 내에서 bulk DNA 추출과 <i>C. polykrikoides</i> 검출	26
2-3 결과 및 고찰	28
2-3-1 <i>C. polykrikoides</i> 의 분자계통 해석	28
2-3-2 <i>C. polykrikoides</i> 특이적 oligonucleotide 쌍의 <i>Tp</i>	29
2-3-3 CPOLY01, CPOLY02의 반응 특이성	30
2-3-4 CPOLY01, CPOLY02의 검출 감도	31
2-3-5 저질 내에서 bulk DNA 추출과 <i>C. polykrikoides</i> 검출	33
요 약	36
감사의 글	38
참고문헌	39

Distribution of Dinoflagellate Resting Cysts and Detection of *Cochlodinium polykrikoides* in Sediments of Coastal Areas of Korea

Gi-Hong Park

*Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University
Pusan 608-737, Korea*

Abstract

Dinoflagellate resting cysts can perform as "a seed population" and provide important information for prediction about occurring time and place in early harmful algal blooms (HAB). In order to know an ecological role as the source seedlings, they were examined the distribution by palynological processing and the existence by molecular probe.

The spatio-temporal distribution of dinoflagellate resting cysts was investigated to understand the HAB potential of the sediment in Saemangeun in 2003 and Sujeongri, Jinhea Bay in 2004. In total, thirty-two dinoflagellate species were identified, and their concentrations were in the range of 6-1,618 cysts $\cdot$ g⁻¹ in Saemangeun and 1,733-4,476 cysts $\cdot$ g⁻¹ in Sujeongri (dry weight). In both areas, the concentrations of resting cysts were higher in spring and summer than in autumn and winter. The composition rate of the heterotrophic dinoflagellate species to the total, which was closely related to the eutrophication process, ranged 6-29%

(Saemangeun) and 19-39% (Sujeongri). The most dominant species was toxic *Alexandrium tamarense/catenella* belonging to *Alexandrium* spp.. Given the high abundance of the toxigenic dinoflagellate species, Saemangeun and Sujeongri were considered to have the great potential for HABs in the future.

Although harmful *Cochlodinium polykrikoides* is a notorious HAB species causing great economic damage, a complete knowledge of the life cycle has not been known. We analyzed the sequence of the large subunit (LSU) LSU ribosomal DNA (rDNA) D1-D3 region of *C. polykrikoides* designed the *C. polykrikoides*-specific PCR oligonucleotide set, CPOLY01 and CPOLY02, and developed PCR detection assays for its sensitive, accurate HAB monitoring. CPOLY01 and CPOLY02 specifically amplified *C. polykrikoides* and did not cross-react with any dinoflagellates tested in this study or environmental water samples. The effective annealing temperature (T_p) of CPOLY01 and CPOLY02 was 67°C. At this temperature, the conventional and two-step PCR assays were sensitive over a wide range of *C. polykrikoides* cell numbers with detection limits of 0.05 and 0.0001 cells·reaction⁻¹, respectively. This technique was applied to extracted bulk DNA from sediments in southern coastal areas of Korea. In result, *Alexandrium tamarense/catenella* was probed in all sediments as positive, but *C. polykrikoides* was detected in Chilchundo, Gaduckdo, South Sea c and Youngdo.

Figure legends

- Fig. 1-1 The study area showing the location of sampling stations (solid lines, a dike; broken lines, entrances of a dike).
- Fig. 1-2 Analytical processes of dinoflagellate resting cysts in sediment using the Primuline staining method; Yamaguchi et al., 1995 (A) and Sodium polytungstate-density gradient centrifugation method; Bolch, 1997 (B).
- Fig. 1-3 Spatio-temporal distribution of dinoflagellate resting cysts in the sediment of the Saemangeum area in 2003.
- Fig. 1-4 Seasonal distribution of resting cysts of total dinoflagellates, *Alexandrium* species and *A. tamarense/catenella* in the sediment of the Saemangeum area in 2003.
- Fig. 1-5 Monthly distribution of resting cysts of total dinoflagellates, *Alexandrium* species and *A. tamarense/catenella*.
- Fig. 2-1 The molecular phylogeny of the diverse dinoflagellate taxa based on their sequences of the LSU rDNA D1 and D3 domains. *Toxoplasma gondii* was used as the outgroup.
- Fig. 2-2 The effective annealing temperature (T_p) of the *Cochlodinium polykrikoides*-specific PCR primer set, CPOLY01 and CPOLY02. M = size marker.
- Fig. 2-3 The specificity of the *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, CPOLY01 and CPOLY02. M = size marker, 1 = *Akashiwo sanguinea*, 2 = *Alexandrium affine*, 3 = *Al. catenella*, 4 = *Al. fraterculus*, 5 = *Al. tamarense*, 6 = *Gymnodinium catenatum*, 7 = *Gymnodinium* sp., 8 = *Gyrodinium instriatum*, 9 = *Heterocapsa triquetra*, 10 = *Lingulodinium polyedrum*, 11 = *Pheopolykrikos hartmannii*, 12 = *Prorocentrum micans*, 13 = *Protoceratium reticulatum*, 14 = *Pyrophacus steinii*, 15 = *Scrippsiella trochoidea*, 16 = the heterogeneous environmental DNA, 17 = *Cochlodinium polykrikoides*, 18 =

a negative control.

Fig. 2-4 The detection limit (cells/reaction) of the *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, CPOLY01 and CPOLY02 (A) by the conventional PCR assay and (C) by the nested PCR assay after the amplification of the LSU rDNA D1-D3 region (B). Each arrowhead indicates the minimum detection limit. M = size marker.

Fig. 2-5 The detection of the LSU rDNA D1-D3 region by the conventional PCR assay (A) by the nested PCR with *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set (B) and *Alexandrium tamarense* specific primer (C) after the amplification of the LSU rDNA D1-D3 region; 1= Chilchundo, 2=Youngdo, 3=Hansando, 4=Gaduckdo, 5,6,7=South Sea a,b,c, 8= a negative control.

Fig. 2-6 Biogeographical mapping of *Cochlodinium polykrikoides* and *Alexandrium tamarense* in sediments of South Sea of Korea.

Table legends

Table 1-1 The comparison of processing methods for dinoflagellate resting cysts

Table 1-2 Spatio-temporal distribution of dinoflagellate resting cysts in the sediment of the Saemangeum area in 2003

Table 1-3 Monthly distribution of dinoflagellate resting cysts in the sediment of the Sujeongri in 2004

Table 2-1 Composition of enrichment 'GPM'. Stock

제 1 장

한국 연안 일대의 와편모조류 휴면포자의 시공간적 분포

1-1 서 론

최근 들어 와편모조류에 의한 적조 (harmful algal bloom 또는 red tide)는 산업화에 따른 연안해역의 부영양화와 이상 기후로 인해 발생 규모가 광역화되고 그 빈도도 또한 점차 증가하고 있다. 이러한 현상은 수산양식업에 막대한 피해를 줄뿐만 아니라 해양환경, 관광사업, 인류보건에도 문제를 야기하고 있어 지속적인 모니터링이 요구되고 있다 (Hallegraeff, 2003). 와편모조류 중 일부는 부적합한 환경조건에서 유성생식 과정을 통해 내구성 있는 휴면포자를 형성하고, 다시 환경이 좋아지면 발아하는 생활사를 가지는데, 현재까지 전체의 약 5%인 100여 종에서 이러한 휴면포자의 존재가 확인되었다 (Matsuoka and Fukuyo, 2000; Anderson et al., 2003). 이들은 적조발생 초기에 "씨앗개체군" 역할을 수행하는 것으로 알려져 있어 (Anderson, 1980), 이들의 생물지리적 분포는 적조 발생 장소와 시기를 예측할 수 있는 중요한 단서를 제공한다 (Anderson and Wall, 1978; Nehring, 1997; Anderson et al., 2003). 예를 들어, 마비성 패독 (PST: Paralytic Shellfish Toxins)을 생산하는 것으로 알려진 일부 *Alexandrium* 종들, *Gymnodinium catenatum* 및 *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*에 의한 적조는 대체로 그 형성기간이 짧아서 모니터링하기 어렵기 때문에, 이들의 경우에는 저질 내 휴면포자 분포 조사가 오히려 경제적이며 신뢰할 만하다 (Bolch, 1997).

지금까지 알려진 휴면포자 분포 조사 방법은 Panning 처리법 (Bolch and Hallegraeff, 1990), Primuline 형광 염색법 (Primuline-staining method; Yamaguchi et al., 1995), 해수/휴면포자/Sodium polytungstate (SPT)의 비중차이를 이용한 밀도구배원심법 (SPT-density gradient centrifugation method; Bolch, 1997), 그리고 고생물학적 방법 (Palynological processing; Matsuoka and Fukuyo, 2000; Cho and Matsuoka, 2001; Anderson et al., 2003)이 있으며, 실험 목적별로 처리 방법을 다르게 하여야 한다.

우리나라에서 휴면포자 분포 조사는 적조가 많이 발생하는 남해 연안을 중심으로 이루어져 왔으나, 최근 황해 연안에서도 적조가 발생하여 그 조사 범위가 더욱 확대되고 있는 실정이다 (Kim et al., 2001). 하지만 이러한 연구의 대다수는 일정한 시기에 국한된 조사에 그치고 있어, 해양환경 변화에 따른 지속적인 휴면포자 분포 조사가 필요하다.

이 연구는 대규모 간척사업이 시행되고 있는 황해 새만금 해역과 매년 적조가 빈번하게 발생하는 남해 진해만 수정리에서 저질 내 외편모조류 분포량을 정점별, 계절별로 정량·정성 분석하여 이 지역에서의 적조 발생 잠재력을 예측하였다.

1-1-1 조사 정점

조사 정점은 황해 새만금 해역과 남해 진해만 수정리를 대상으로 하였다. 최근 새만금에는 '새만금간척개발사업'에 따른 해양환경의 변화와 해양생태계에 대한 전반적인 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이 해역에 방조제가 완공되면 남북으로의 해수 흐름이 제한되고 하천수가 고군산 열도 남쪽의 신시 갯문과 가력 갯문으로만 유출되어 고군산 열도를 기준으로 남쪽과 북쪽의 해양환경이 크게 바뀔 뿐만 아니라 (MAF, 1999; MOMAF, 2003a, 2003b) 적조 발생에도 유리한 조건이 형성 될 가능성이 있다 (Yoo et al., 2002). 또한 남해 진해만은 마비성 패독이 대규모로 발생한 1993년 이후 이매패류 채취

금지 및 출하정지가 매년 계속되고 있으며, 이 일대의 패독 원인 생물들에 대한 조사가 중점적으로 되고 있는 곳이다 (Kim, 1994; Kim, 1995; Kim and Lee, 1996). 특히, 진해만 수정리에서는 최근에 진주조개 양식장 근처까지 매립사업이 실시되어 이 곳 역시 해양환경의 변화가 일어나고 있다.

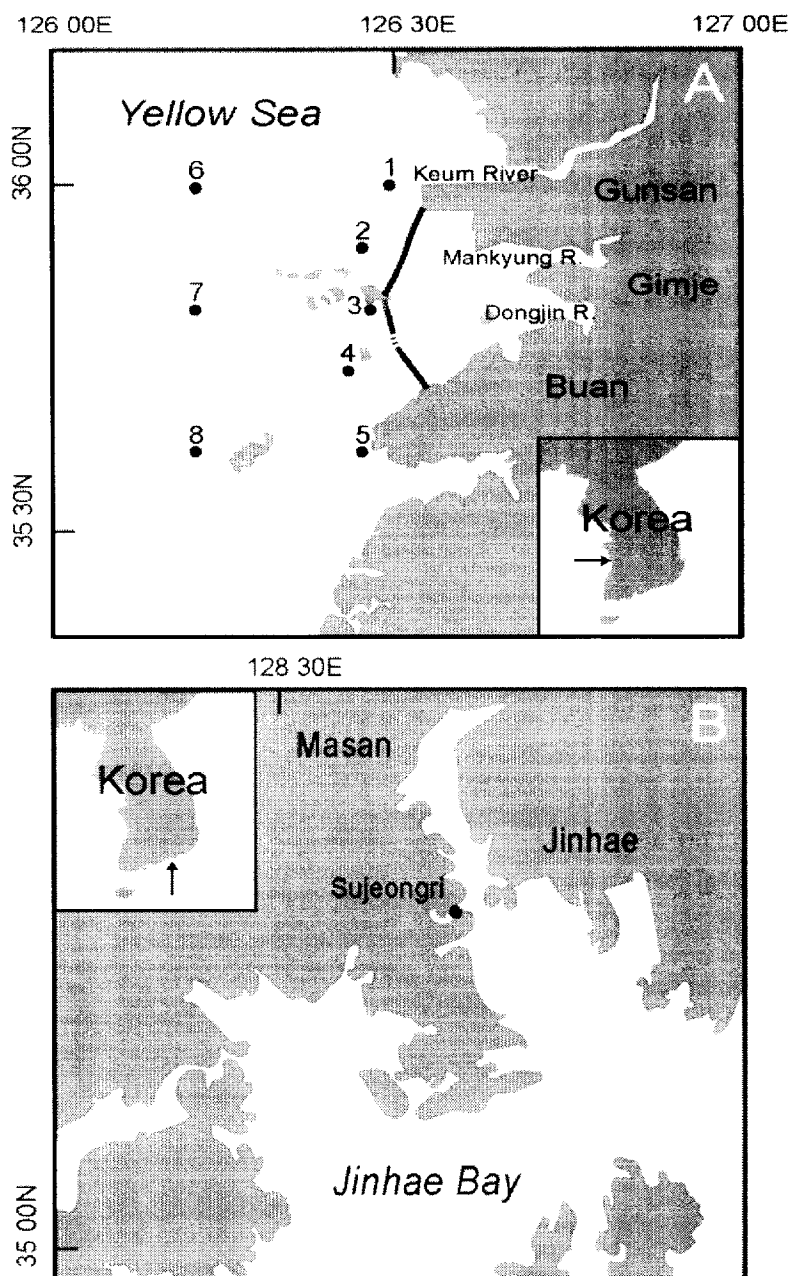


Fig. 1-1 The study area showing the location of sampling stations. A: Saemangeum (solid lines, a dike; broken lines, entrances of a dike), B: Sujeongri, Jinhae Bay.

1-2 재료 및 방법

1-2-1 휴면포자 분포 조사 방법 비교

분석에 가장 적합한 방법을 찾기 위하여 새만금 시료 중 2003년 8월에 Stn 6에서 채집된 저질을 대상으로 Seiving 처리만 한 것, Primuline 형광 염색법 (Primuline-staining method; Yamaguchi et al., 1995), 해수/휴면포자/Sodium polytungstate (SPT)의 비중차를 이용한 밀도구배원심법 (SPT-density gradient centrifugation method; Bolch, 1997) 그리고 고생물학적 방법 (Palynological processing; Matsuoka and Fukuyo, 2000; Cho and Matsuoka, 2001; Anderson et al., 2003)의 결과를 비교하였다 (Fig. 1-2).

1-2-2 고생물학적 방법

이 조사에 사용된 시료는 2003년 2, 5, 8, 11월에 계절별로 새만금의 8개 정점과 2004년 매 달 진해만 수정리의 1개 정점에서 저질을 채집하였다 (Fig. 1-1). 시료는 Van Veen Grab 채취기를 이용하여 표층 3 cm의 저질을 채집한 후, 분석 전까지 암냉소에 보관하였으며 고생물학적 방법(Cho and Matsuoka, 2001)으로 처리하였다. 저질의 함수비를 측정하기 위하여 먼저 골고루 섞은 저질을 70 °C에서 12 시간 건조시켜 무게 (3회 평균값)를 구하였다. 동일한 시료를 15 mL 원심튜브에 1-2 mg 정도 넣고 무게를 측정한 후 10 mL의 10% HCl을 첨가하고 24 시간 방치하여 저질 내의 탄산질 (유공충, 패각 등)을 제거하였다. 이후 시료를 증류수로 세척한 후 10 mL의 47% HF를 첨가하고 24 시간 방치하여 규산질 (모래, 진흙 입자, 규조류 등)을 녹였다. 다시 증류수로 세척한 시료를 Ultrasonic Cleaner (5210, BRANSON)를 이용하여 30 초간 초음파 처리하고, ϕ 125 μ m Nylon mesh에 여과한 뒤, ϕ 20 μ m Nylon mesh 위에 걸러진 입자를 모아 증류수를 일정량 첨가하였다. 준비된 시료는 1-0.5 mL씩 덜어 도립현미경 (Axiovert 200, ZEISS)으로 검경하고 Matsuoka and Fukuyo

(2000)에 따라 동정하였다. 시료 처리 과정에서 형태가 변하여 식별하기 어려운 휴면포자는 미동정 중에 포함시켰으며, 최종 휴면포자 개체 수는 아래의 식에 따라 저질 내 수분을 제외한 건중량으로 환산하였다.

$$\text{cysts} \cdot \text{g}^{-1} = N \{W(1-R)\}^{-1}$$

N: 관찰된 휴면포자 수, W: 처리된 저질 무게, R: 저질의 함수비

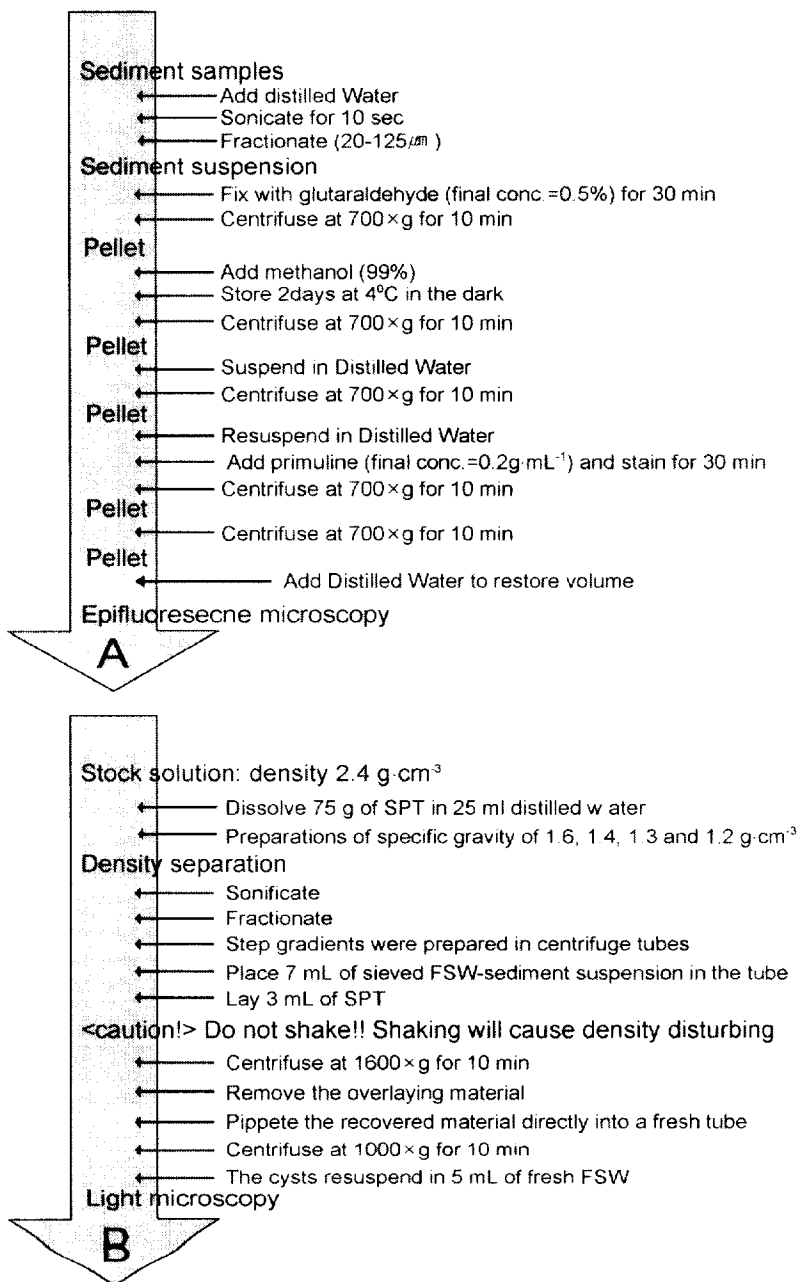


Fig. 1-2 Analytical processes of dinoflagellate resting cysts in sediment using the Primuline staining method; Yamaguchi et al., 1995 (A) and Sodium polytungstate-density gradient centrifugation method; Bolch, 1997 (B).

1-3 결 과

1-3-1 휴면포자 분포 조사 방법 비교

와편모조류 휴면포자 분포량 조사를 위한 처리 방법들을 비교한 결과, sieving 처리법으로는 총 10종의 321 cysts · g⁻¹이, Primuline 형광 염색법으로는 7종의 509 cysts · g⁻¹이, 밀도구배원심법으로는 총 14종의 395 cysts · g⁻¹이, 고생물학적 방법으로는 총 22종의 1,618 cysts · g⁻¹이 관찰되었다 (Table 1-1). Sieving 처리법과 밀도구배원심법에서 관찰된 와편모조류 휴면포자의 출현종과 출현량은 서로 유사하였지만, Primuline 형광 염색법으로는 Gonyaulacales 목의 7종만이 관찰되었다. 고생물학적 방법은 다른 처리 방법들에 비해 휴면포자의 출현종 수와 출현량에서 2-3배 정도 많이 관찰되었다. Primuline 형광 염색법 (Yamaguchi et al., 1995)은 저질 시료의 처리 시간이 짧고 *Alexandrium tamarense/catenella*와 같은 특징적인 형태를 지닌 종의 동정은 쉽지만, 일부 종 외에는 계수와 동정에 한계가 있으며 시료 처리 후에는 발아실험이 불가능하다. 밀도구배원심법 (Bolch, 1997)은 생물에 무해한 SPT를 사용하므로 관찰 이후에 발아가 가능하지만, 계수에 있어서 재현성이 떨어진다. 반면, 고생물학적 방법 (Matsuoka and Fukuyo, 2000; Cho and Matsuoka, 2001; Anderson et al., 2003)은 석회질 벽을 가지는 Cladodiniellaceae 과에 속하는 종의 휴면포자를 제외한 대부분의 종들이 관찰되므로 정확한 계수와 동정이 가능하나, 처리기간이 오래 걸리며 발아실험이 불가능하고 유해한 시약들을 사용하므로 주의해서 다루어야한다. 이러한 결과는 실험 목적별로 휴면포자 처리 방법을 달리 할 수 있음을 보여준다. 즉 발아 실험을 할 경우에는 밀도구배원심법을, *A. tamarense/catenella*와 같은 특정 종의 신속한 동정에는 Primuline 형광 염색법을, 출현종의 정량 · 정성 분포 파악에는 고생물학적 방법을 사용하는 것이 효과적일 것이다.

Table 1-1 The comparison of processing methods for dinoflagellate resting cysts

(cysts · g ⁻¹ : dry weight)					
Species	Method	Sieving	Primuline-staining	SPT-density gradient centrifugation	Palynological processing
Gonyaulacales					
<i>Alexandrium tamarense/catenella</i>		82	254	119	716
<i>Alexandrium</i> spp. (spherical)		71	141	105	290
<i>Gonyaulax scrippssea</i>		10	7	14	121
<i>Gonyaulax spinifera</i>		-	7	-	48
<i>Gonyaulax spinifera</i> complex		-	14	10	-
<i>Gonyaulax verior</i>		10	71	14	97
<i>Lingulodinium polyedrum</i>		-	-	5	8
<i>Protoceratium reticulatum</i>		-	-	5	48
<i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>		-	-	-	4
<i>Pyrophacus steinii</i>		-	7	-	12
Gymnodiniales					
<i>Cochlodinium</i> sp.		15	-	10	4
<i>Gymnodinium catenatum</i>		25	-	-	4
<i>Gymnodinium impudicum</i>		-	-	5	-
<i>Pheopolykricos hartmannii</i>		-	-	14	56
Peridiniales					
<i>Diplopelta parva</i>		5	-	5	36
<i>Protoperidinium conicum</i>		41	-	38	76
<i>Protoperidinium oblongum</i>		-	-	-	4
<i>Protoperidinium pentagonum</i>		-	-	-	4
<i>Protoperidinium</i> sp. (spherical, brown)		-	-	-	28
<i>Protoperidinium</i> spp.		-	-	-	24
<i>Scrippsiella trochoidea</i>		46	-	38	28
<i>Zygabikodinium lenticulatum</i>		5	-	5	8
Unidentified		10	7	10	-
Total		321	509	395	1,618

1-3-2 새만금 해역에서 와편모조류 휴면포자의 시공간적 분포

새만금 해역의 와편모조류 휴면포자 분포 조사 결과, 동계인 2월에는 총 24종이 25-728 cysts·g⁻¹ 범위로 출현하였으며, Stns 2, 6, 7에서 분포량이 많았으나, Stns 1, 3, 4에서는 상대적으로 적었다(Table 1-2). 해역의 부영양화와 관련이 있다고 알려진 전체 출현 종에 대한 타가영양성 종의 분포비 (Matsuoka, 1999; Cho and Matsuoka, 2001; Dale, 2001; Matsuoka, 2001)는 분포량이 가장 적었던 Stns 3, 4를 제외하면 8-141 cysts·g⁻¹로 12-29%를 차지하였으며, *Gonyaulax scrippsea*, *A. tamarensse/catenella*, *Gonyaulax spinifera*, *Gonyaulax verior*, *Scrippsiella trochoidea*, *Protoceratium reticulatum*이 각각 12%, 9%, 6%, 6%, 6%, 6%로 우점 하였으며, 많은 종이 조류 독을 생산한다고 알려진 *Alexandrium* 속에 속하는 종 (Balech, 1995; Landsberg, 2002)은 전체의 38% (Stn 2에서 최대 310 cysts·g⁻¹)를 차지하였다 (Figs. 1-2, 1-3).

춘계인 5월은 총 26종이 64-1,101 cysts·g⁻¹범위로 출현하였고, Stns 1, 5, 6, 8에서 분포량이 많았으나 Stns 3, 4에서는 상대적으로 적었다 (Table 1-2). 타가영양성 종은 7-153 cysts·g⁻¹로 6-18%를 차지하였으며, *A. tamarensse/catenella*, *G. scrippsea*가 각각 42%, 7%로 우점 하였고, *Alexandrium* 속은 전체의 62% (Stn 6에서 최대 781 cysts·g⁻¹)를 차지하였다 (Figs. 1-2, 1-3).

하계인 8월에는 총 30종이 81-1,618 cysts·g⁻¹범위로 출현하였으며, 전 정점 최대 출현양인 1,618 cysts·g⁻¹의 Stn 6을 포함한 Stns 1, 2, 7, 8에서는 분포량이 많았지만, Stns 3, 4는 100 cysts·g⁻¹이내로 적었다 (Table 1-2). 타가영양성 종은 28-181 cysts·g⁻¹로 11-22%를 차지하였고, 우점 종으로는 2월과 5월에 관찰되었던 *A. tamarensse/catenella*, *G. scrippsea*, *P. reticulatum* 외에 *Diplopelta parva*가 각각 30%, 8%, 6%, 5%로 우점하였다. 이중 *Alexandrium* 속은 전체의 50% (Stn 6에서 전 정점 최대 1,006 cysts·g⁻¹)를 차지하였다 (Figs. 1-2, 1-3).

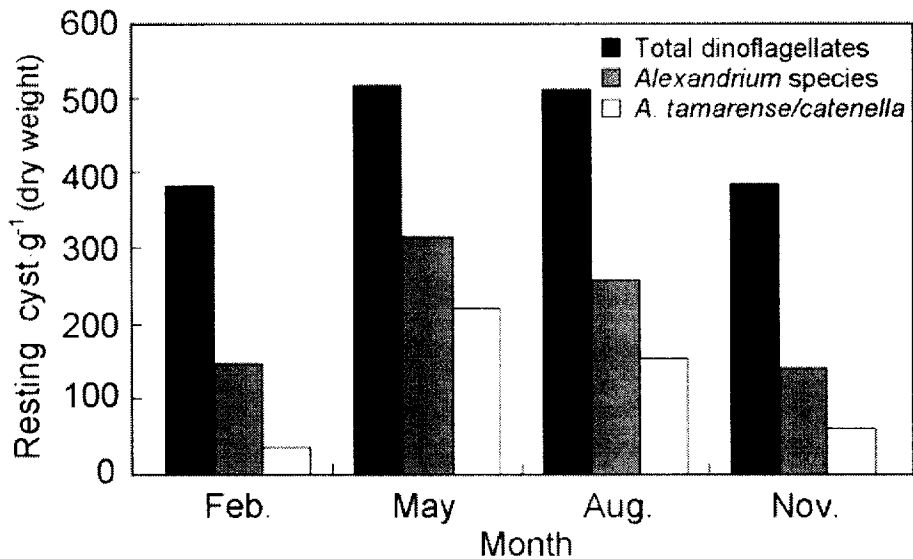


Fig. 1-3 Spatio-temporal distribution of dinoflagellate resting cysts in the sediment of the Saemangeum area in 2003.

추계인 11월의 휴면포자 분포는 4계절 중 가장 다양한 총 32종이 6-1,150 cysts·g⁻¹범위로 출현하였으며, Stns 2, 5, 6, 7에서 분포량이 많았으나 Stns 1, 3, 4에서 11 cysts·g⁻¹이하로 가장 적었다 (Table 1-2). 타가영양성 종은 57-229 cysts·g⁻¹로 전체의 15-28%를 차지하였고, *A. tamarense/catenella*, *G. scrippsea*, *Pheopolykrikos hartmannii*, *D. parva*, *G. spinifera*, *P. reticulatum*이 각각 16%, 10%, 6%, 5%, 5%, 5%로 우점 하였으며, *Alexandrium* 속은 전체의 37%이었다 (Fig. 1-4).

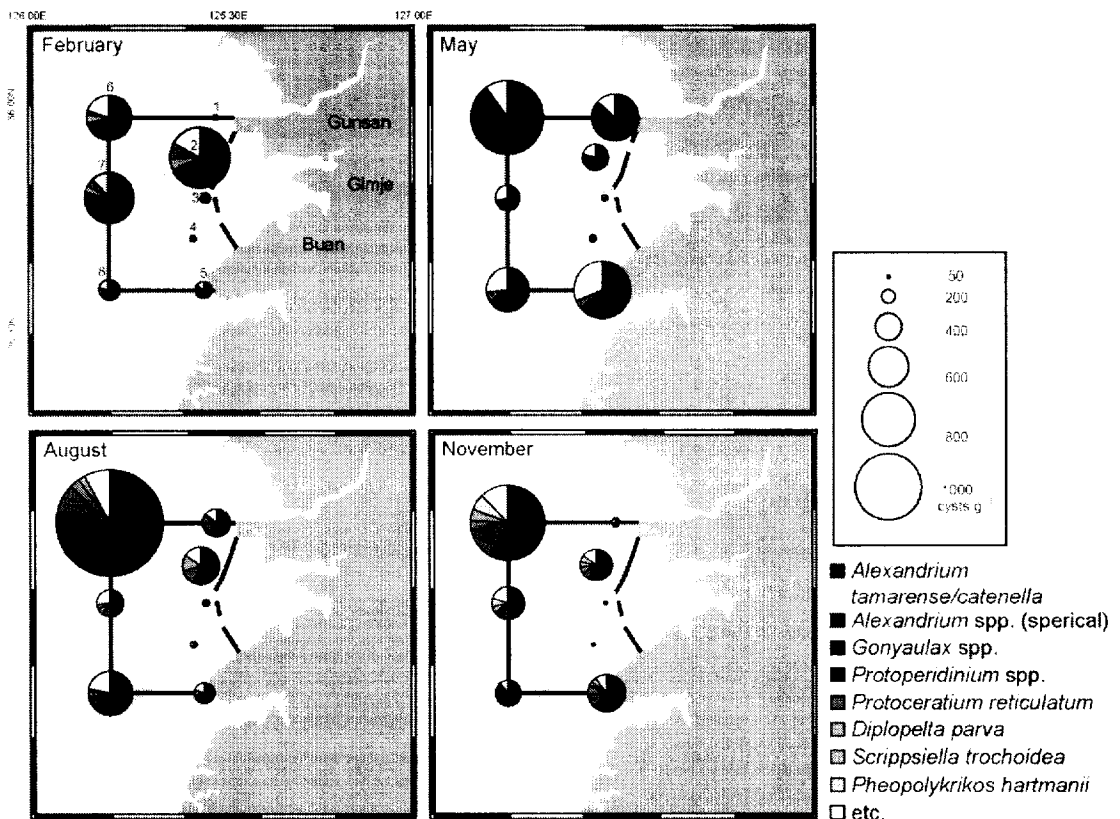


Fig. 1-4 Seasonal distribution of resting cysts of total dinoflagellates, *Alexandrium* species and *A. tamarense/catenella* in the sediment of the Saemangeum area in 2003.

Table 1-2 Spatio-temporal distribution of dinoflagellate resting cysts in the sediment of the Saemangeum area in 2003; Asterisk (*): heterotrophic species

		(cysts · g ⁻¹ : dry weight)															
Species	Station	February								May							
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Gonyaulacales																	
<i>Alexandrium</i>		-	71	3	4	7	66	90	41	438	185	7	63	171	613	40	237
<i>tamarense/catenella</i>		-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alexandrium</i> spp. (spherical)		-	239	28	24	73	228	211	91	49	50	18	16	250	168	96	110
<i>Gonyaulax elongata</i>		-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gonyaulax scrippsae</i>		8	111	14	4	37	44	108	44	8	32	11	-	46	108	53	47
<i>Gonyaulax spinifera</i>		-	61	14	12	20	29	56	6	49	4	4	-	19	27	-	21
<i>Gonyaulax spinifera</i> complex		-	-	-	4	3	-	-	19	-	-	4	-	5	-	-	-
<i>Gonyaulax verior</i>		-	47	-	16	17	48	56	-	16	18	-	-	32	30	37	13
<i>Lingulodinium polyedrum</i>		-	17	-	-	-	7	-	-	8	-	4	-	-	7	6	21
<i>Protoceratium reticulatum</i>		-	74	31	4	-	22	39	6	8	11	-	4	74	7	31	13
<i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-
<i>Pyrophacus steinii</i>		-	10	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	9	-	3	-
Gymnodiniales																	
<i>Cochlodinium</i> sp.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gymnodinium catenatum</i>		-	13	3	-	-	4	4	-	-	7	-	-	5	7	-	-
<i>Gymnodinium impudicum</i>		-	3	-	-	-	15	4	6	16	4	4	8	28	13	6	17
<i>Pheopolykrikos hartmannii</i>		-	27	-	-	-	18	22	22	8	7	4	-	23	27	22	30
<i>Polykrikos kofoidii/schwartzii</i> *		-	20	7	-	13	18	9	-	-	7	-	-	-	13	6	-
Peridinales																	
<i>Diplopelta parva</i> *		-	24	-	-	13	29	17	25	20	7	7	-	69	7	3	34
<i>Diplopsalis lenticula</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Protoperidinium americanum</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Protoperidinium claudicans</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Protoperidinium conicum</i> *		-	20	-	-	10	15	4	6	-	-	-	-	5	20	9	4
<i>Protoperidinium leonis</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-
<i>Protoperidinium oblongum</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Protoperidinium pentagonum</i> *		-	7	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
<i>Protoperidinium</i> sp. (spherical, brown)*		-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	7	-	-	3
<i>Protoperidinium</i> spp.*		-	50	10	4	27	26	34	19	19	7	-	-	35	24	6	39
<i>Scrippsiella trochoidea</i>		12	57	10	-	13	40	30	22	32	21	4	-	9	24	9	34
<i>Zygabikodinium lenticulatum</i> *		-	20	-	4	7	26	26	13	-	7	-	-	37	7	3	17
Unidentified		4	20	3	-	3	11	4	6	-	-	-	-	-	-	12	4
Heterotrophic species (%)		-	16	14	11	29	18	12	19	8	8	11	-	18	6	11	15
Total		25	892	125	75	242	648	728	326	686	374	64	90	828	1,101	356	643

Table 1-2 (continued)

Species	Station	August								November							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8	
Gonyaulacales																	
<i>Alexandrium</i>		157	134	-	4	66	716	44	107	5	80	-	-	65	207	58	69
<i>tamarense/catenella</i>		66	101	-	12	78	290	87	205	3	107	-	-	133	211	68	114
<i>Alexandrium</i> spp. (spherical)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gonyaulax elongata</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gonyaulax scrippsea</i>		22	60	4	12	27	121	32	67	-	27	4	-	60	130	55	34
<i>Gonyaulax spinifera</i>		-	4	-	8	8	48	24	13	-	4	-	-	60	72	13	9
<i>Gonyaulax spinifera</i> complex		-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	4	22	10	9
<i>Gonyaulax verior</i>		7	-	-	8	12	97	12	18	-	36	-	-	34	27	15	26
<i>Lingulodinium polyedrum</i>		7	-	4	-	-	8	8	4	-	-	-	-	9	9	-	3
<i>Protoceratium reticulatum</i>		33	78	-	-	4	48	32	31	-	31	-	3	43	45	23	14
<i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>compressum</i>		7	-	-	-	4	4	-	-	-	-	-	-	4	9	5	-
<i>Pyrophacus steinii</i>		4	-	-	-	8	12	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-
Gymnodiniales																	
<i>Cochlodinium</i> sp.		-	-	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	9	13	5	3
<i>Gymnodinium catenatum</i>		4	-	-	-	-	4	-	13	-	27	-	3	4	31	48	9
<i>Gymnodinium impudicum</i>		4	7	-	-	-	-	8	22	-	-	-	-	-	4	5	3
<i>Pheopolykrikos hartmannii</i>		-	22	-	4	23	56	36	36	3	31	4	-	26	81	40	14
<i>Polykrikos kofoidii/schwartzii</i> *		-	7	-	4	4	-	8	-	-	4	-	-	-	4	6	-
Peridinales																	
<i>Diplopelta parva</i> *		17	78	-	4	27	36	20	9	-	27	-	-	22	58	28	17
<i>Diplopsalis lenticula</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	9	4	8	3
<i>Protooperidinium americanum</i> *		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-
<i>Protooperidinium claudicans</i> *		18	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-
<i>Protooperidinium conicum</i> *		-	4	-	-	-	76	20	36	-	9	-	-	4	67	20	14
<i>Protooperidinium leonis</i> *		-	-	-	-	-	-	8	-	-	4	-	-	-	9	3	-
<i>Protooperidinium oblongum</i> *		5	-	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	9	13	8	4
<i>Protooperidinium pentagonum</i> *		-	-	-	-	-	4	4	4	-	-	-	-	-	4	3	3
<i>Protooperidinium</i> sp. (spherical, brown)*		15	7	73	-	-	16	-	-	-	3	-	-	22	21	26	8
<i>Protooperidinium</i> spp.*		17	15	-	-	8	36	12	9	-	15	-	-	38	24	17	6
<i>Scrippsiella trochoidea</i>		22	41	-	4	-	28	28	45	-	13	-	-	17	45	5	20
<i>Zygabikodinium lenticulatum</i> *		10	4	-	12	8	8	16	13	-	9	-	-	9	4	18	-
Unidentified		-	7	-	4	12	-	4	9	-	4	-	-	-	4	-	6
Heterotrophic species (%)		20	20	89	33	16	11	22	11	-	18	-	-	19	20	28	15
Total		413	570	81	85	289	1,618	401	641	11	454	7	6	581	1,150	481	388

1-3-3 진해만 수정리에서 와편모조류 휴면포자의 월간 분포

진해만 수정리의 와편모조류 휴면포자 분포 조사를 2004년 매달 1개의 고정 정점에서 하였다. 동계인 1, 2, 3월에는 총 27종이 1,733-3,245 cysts·g⁻¹ 범위로 출현하였고, 3월에는 1,733 cysts·g⁻¹로 연중 분포량이 가장 적었다 (Table 1-3). 타가영양성 종은 377-753 cysts·g⁻¹로 22-26%를 차지하였으며, *A. tamarense/catenella*, Unidentified sp.1, *Protoceratium reticulatum*, *Zygabikodinium lenticulatum*이 각각 20%, 8%, 7%, 5%로 우점 하였고, 이중 *Alexandrium*속의 종은 전체의 34%를 차지하였다 (Fig. 1-5).

춘계인 4, 5, 6월은 4계절 중 가장 다양한 총 30종이 2,014-4,039 cysts·g⁻¹ 범위로 출현하였는데, 특히 5월은 앞선 달들보다 전체와 *A. tamarense/catenella*의 분포량에서 2배 이상 현저히 증가하였다 (Table 1-3). 타가영양성 종은 383-768 cysts·g⁻¹로 16-23%로 연중 가장 적었으며, *A. tamarense/catenella*, Unidentified sp.1, *P. reticulatum*, *Z. lenticulatum*이 각각 25%, 12%, 5%, 5%로 동계와 동일한 종들이 우점 하였고, *Alexandrium* 속은 전체의 39%를 차지하였다 (Fig. 1-5).

하계인 7, 8, 9월에는 총 28종이 1,855-4,476 cysts·g⁻¹ 범위로 출현하였으며, 9월은 4,476 cysts·g⁻¹로 연중 최대였을 뿐만 아니라 *A. tamarense/catenella* (1,213 cysts·g⁻¹)와 *Alexandrium* spp. (669 cysts·g⁻¹)도 가장 많이 분포하였다 (Table 1-3). 타가영양성 종은 423-1,088 cysts·g⁻¹로 23-29%를 차지하였으며, *A. tamarense/catenella*, Unidentified sp.1, *P. reticulatum*, *Z. lenticulatum*, Unidentified sp.2가 각각 22%, 9%, 6%, 5%, 5%로 이전과 동일한 종들이 우점 하였고, *Alexandrium* 속은 전체의 38%를 차지하였다 (Fig. 1-5).

추계인 10, 11, 12월의 휴면포자 분포는 총 25종이 3,637-3,756 cysts·g⁻¹ 범위로 출현하였으며 (Table 1-3), 다수의 *Protoperidinium conicum*의 출현으로 인해 타가영양성 종은 1,142-1,432 cysts·g⁻¹로 연중 가장 높은 비율인 30-39%를 차지하였다. *A. tamarense/catenella*, Unidentified sp.1, *P. conicum*, *P.*

reticulatum, *Z. lenticulatum*이 각각 20%, 9%, 9%, 5%, 5%로 우점 하였고, *Alexandrium* 속은 전체의 34%를 차지하였다 (Fig. 1-5).

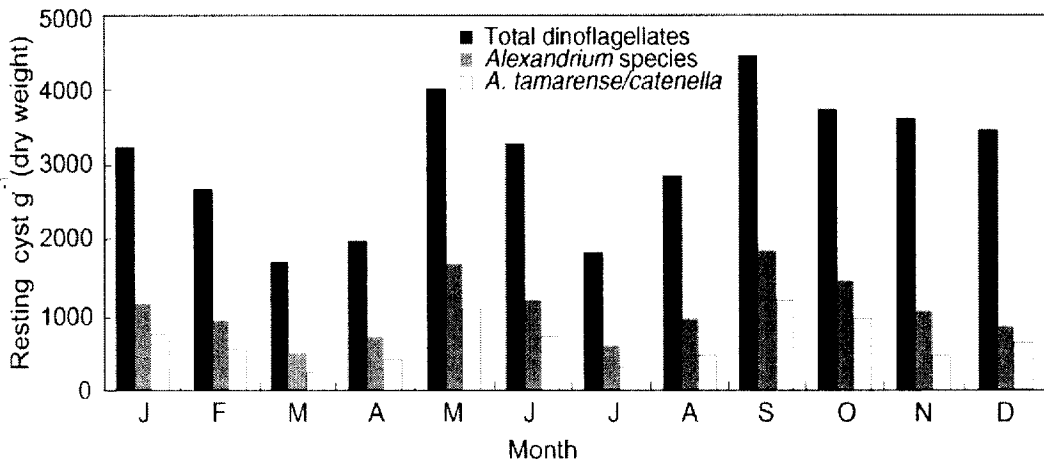


Fig. 1-5 Monthly distribution of resting cysts of total dinoflagellates, *Alexandrium* species and *A. tamarense/catenella*.

Table 1-3 Monthly distribution of dinoflagellate resting cysts in the sediment of the Sujeongri in 2004; Asterisk (*): heterotrophic species

(cysts · g⁻¹: dry weight)

Species	Month											
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
Gonyaulacales												
<i>Alexandrium</i>	753	554	257	443	1103	748	329	488	1213	975	493	608
<i>tamarense/catenella</i>												
<i>Alexandrium</i> spp. (spherical)	412	375	257	282	591	472	282	488	669	499	563	221
<i>Gonyaulax scrippsea</i>	72	125	34	-	59	59	-	21	42	95	117	83
<i>Gonyaulax spinifera</i>	-	54	-	40	39	20	23	-	42	-	-	-
<i>Gonyaulax spinifera</i> complex	126	89	86	60	158	39	117	42	84	143	141	83
<i>Gonyaulax verior</i>	72	107	17	40	177	98	47	85	146	119	117	166
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	90	54	51	20	39	138	-	-	105	-	-	-
<i>Protoceratium reticulatum</i>	305	161	103	161	177	118	70	276	188	119	235	304
<i>Pyrodinium bahamense</i> var. compressum	36	-	34	-	20	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pyrophacus steinii</i>	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	23	28
Gymnodiniales												
<i>Cochlodinium</i> sp.	108	54	34	-	59	20	23	21	21	-	-	-
<i>Gymnodinium catenatum</i>	143	89	69	161	79	157	70	64	188	166	94	110
<i>Gymnodinium impudicum</i>	-	-	-	20	-	20	-	-	21	-	23	-
<i>Pheopolykrikos hartmannii</i>	54	18	34	-	39	79	23	21	-	48	-	55
<i>Polykrikos kofoidii/schwartzii</i> *	36	54	34	20	79	-	23	85	105	143	164	55
Peridinales												
<i>Diplopelta parva</i> *	18	-	-	-	-	-	23	21	-	-	-	-
<i>Diplopsalis lenticula</i> *	18	-	17	-	-	20	-	-	21	-	23	28
<i>Protoperidinium americanum</i> *	18	54	34	20	-	-	23	21	-	-	23	-
<i>Protoperidinium claudicans</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	-
<i>Protoperidinium conicoides</i> *	54	36	-	20	-	20	23	21	-	24	23	-
<i>Protoperidinium conicum</i> *	54	18	34	-	20	20	23	85	105	285	399	221
<i>Protoperidinium compressum</i> *	-	-	-	20	20	-	-	-	-	-	47	-
<i>Protoperidinium denticulatum</i> *	-	-	-	-	20	-	-	-	-	-	-	55
<i>Protoperidinium leonis</i> *	72	89	34	40	59	98	23	21	126	24	117	138
<i>Protoperidinium oblongum</i> *	54	107	17	20	39	59	23	42	126	166	164	249
<i>Protoperidinium pentagonum</i> *	126	71	17	20	99	98	23	85	63	119	94	28
<i>Protoperidinium</i> sp. (spherical, small, brown)*	54	54	86	60	79	118	94	148	105	166	94	276
<i>Protoperidinium</i> spp.*	126	54	51	20	79	138	94	148	146	48	94	55
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	90	36	69	60	217	79	117	148	84	24	94	166
<i>Zygabikodinium lenticulatum</i> *	126	179	51	141	158	197	47	148	272	166	188	249
Unidentified sp.1. (spherical, big, brown)	161	250	172	262	453	374	164	254	418	404	282	331
Unidentified sp.2.	72	18	137	81	158	98	164	127	167	24	23	-
Heterotrophic species (%)	23	26	22	19	16	23	23	29	24	30	39	39
Total	3245	2698	1733	2014	4039	3287	1855	2863	4476	3756	3637	3508

1-4 고 찰

새만금 해역에서 휴면포자 분포 변화는 각 계절별 평균 383, 518, 512, 385 cysts·g⁻¹로 5월과 8월, 2월과 11월이 서로 유사하였으며 전 정점에서 총 32종이 6-1,618 cysts·g⁻¹범위로 출현하였다 (Fig. 1-4). 휴면포자 분포량은 정점별로 방조제 외해 북부 지역인 Stn 6에서 연중 가장 많았고, 배수갑문 앞의 Stns 3, 4에서는 6-125 cysts·g⁻¹범위로 현저히 적었다. 이러한 결과는 2호 방조제 양단 (신시배수갑문, 가력배수갑문)의 빠른 해류 때문인 것으로 사료되며 고군산 열도 남부해역의 퇴적물이 모래질펄에서 모래질로 변한 침식현상 (MOMAF, 2003b)과 잘 일치하고 있다. 한편, 군장국가 산업단지 (군산지구) 앞의 Stns 1, 2는 특이적으로 큰 폭의 변화량을 보이고 있어, 금강 희석수의 계절적 변동과 4공구 물막이 공사로 인해 저질의 재배치가 일어나고 있음을 추측할 수 있다.

진해만 수정리는 부분적인 매립사업에도 불구하고 달 별로 큰 오차 범위 없이 1,733-4,476 cysts·g⁻¹내에 분포하였으며, 우점종의 비율 또한 유사하였다. 휴면포자의 분포는 흥미롭게도 3월 (1,733 cysts·g⁻¹)과 7월 (1,855 cysts·g⁻¹)에 가장 적은 양이 출현하였으나, 각각 2달 뒤인 5월 (4,039 cysts·g⁻¹)과 9월 (4,476 cysts·g⁻¹)에는 2배 이상의 많은 양이 출현하는 경향을 보였다 (Fig. 1-5). 5월의 휴면포자 분포는 가장 많은 양을 차지하는 *A. tamarense/catenella*가 수온이 낮은 동계에 높은 발아율로 현장에 유입되며 수온이 상승하는 시기에는 발아율과 영양세포의 수가 낮아지는 Kim (1994)과 Kim and Shin (1997)의 결과와 비교할 수 있다. 더군다나 Lee 등 (2003)과 Park 등 (2004)이 마산만과 진해만 일대에서 조사한 *A. tamarense*의 발아 경향도 이와 유사하여, 영양세포 단계였던 *A. tamarense/catenella*가 휴면포자로 5월의 분포량에 영향을 주고 있음을 알 수 있다. 하지만 9월의 경우에는 고수온기인 하계에

거의 받아하지 않는 *A. tamarense* (Park, 2004)가 아닌 Kim and Shin (1997)이 언급한 *Alexandrium*속 내 다른 종의 휴면포자가 원인일 수도 있을 것이다. 실제로 수정리 현장에서 영양세포 단계에 분리한 *Alexandrium*속 중에는 염기서열 분석결과 *Alexandrium* sp. *catenella* (Jul., 2000), *A. fraterculus* (Oct., 2001), *A. satoanum* (Jul., 2000)등 이 포함 되어 있었다 (미발표자료). 또한 *Alexandrium*속의 휴면포자는 Anderson and Keafer (1987)가 강조한 것처럼 내재된 발아 연주기 (Endogenous circannual rhythm)에 따라 영양세포로 유입을 가져다 줄 수 있는 생태학적 중요성을 가지고 있는 것으로 시사된다.

새만금 해역의 전체 와편모조류 휴면포자 분포량은 전 정점에서 총 32종이 $6\text{-}1,618 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$ 범위로 출현하였는데, 이러한 결과는 황해 외해에서 조사한 12종의 $4,598\text{-}7,566 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$ (Cho and Matsuoka, 2001)보다 출현 종 수는 다양하였지만 분포량은 최대 5배 정도 적었다.

수정리의 경우, 총 32종이 $1,733\text{-}4,476 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$ 범위로 출현하였으며, 남해 외해에서 31종의 $660\text{-}2,600 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$ (Cho et al., 2003)보다 분포량이 2배 정도 많았다. 남해 내만 해역과 비교했을 때, 보성만에서 19종의 $184\text{-}672 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$ (Cho et al., 2003)와는 종 수에서 2배, 분포량에서 6배 정도 많았고, 광양만에서 25종의 $115\text{-}2,188 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$ (Kim et al., 2003a)보다 분포량에서 2배 정도 많았다.

해양 환경의 부영양화 진행과 관련이 있는 전체 출현 종에 대한 타가영양성 종의 비율 (Matsuoka, 1999; Cho and Matsuoka, 2001; Dale, 2001; Matsuoka, 2001)은 새만금 해역의 경우, 휴면포자의 분포량이 가장 낮았던 Stns 3, 4를 제외한 전체에서 6-29%를 차지하였다. 이러한 결과는 이 조사 정점과 동일한 위도에 위치한 황해 외해 정점 (0.5%; Cho and Matsuoka, 2001)보다는 현저히 높았다.

한편 수정리는 19-39%로 남해 외해 (21-46%; Cho et al., 2003)보다는 약간 낮았고, 남해 내만 해역과 비교했을 때, 가막만 (23-46%; Lee et al., 1999)과 대

단위 공업시설이 있는 광양만(0-3 cm, 30-54%; Kim et al., 2003b)에 비해 서도 낮았다. 이 두 조사 해역은 부영양화가 진행되었을 것이라고 예상되는 남해 내만 지역들에 비해 타가영양성 종의 비율이 낮지만, 지속적인 모니터링을 통해 해역내의 부영양화 진행과정을 관찰할 필요가 있다.

새만금 조사 해역에서 연중 우점 하는 종들은 *A. tamarense/catenella*, *G. scrippsea*, *P. reticulatum*이었으며, 수정리는 *A. tamarense/catenella*, Unidentified sp.1, *P. reticulatum*, *Z. lenticulatum*이었다. 이중 많은 종이 조류 독을 생산한다고 알려진 *Alexandrium* 속에 속하는 종 (Balech, 1995; Landsberg, 2002)은 새만금에서는 계절별로 각각 147, 314, 258, 140 cysts·g⁻¹로 분포하였고 전체의 46%를 (Fig. 1-4) 수정리에서는 36%를 (Fig. 1-5) 차지하였다. 이 결과는 황해 외해, 남해 외해 및 남해 내만에서 *Gonyaulax* spp.가 우점 하는 것과는 (Cho and Matsuoka, 2001; Cho et al., 2003; Kim et al., 2003a) 다른 경향을 나타냈다. 특히 마비성 패독을 생산하며 전 세계적으로 널리 분포하는 *A. tamarense/catenella*는 두 지역에서 각각 전체의 25% (Fig. 1-4), 22% (Fig. 1-5)로 가장 많이 차지하였으며, yessotoxin (YTX)과 그 유도체를 생산하는 *P. reticulatum* (Satake et al., 1999)이 전체의 6-5%를 차지하였다. 또한 *Gymnodinium catenatum*, *Lingulodinium polyedrum*, *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*과 같은 유독 종들(Landsberg, 2002)도 소량으로 분포하였다. 이 중 *P. bahamense* var. *compressum*은 태평양과 인도양의 아열대 지역에서 발견되는 온대성 종으로 국내에서는 이 조사에서 최초로 보고 되었다. 이 종의 휴면포자는 가늘고 긴 원통형에 끝부분이 *capitate*형 돌기물을 가지고 있어 *P. reticulatum*과 혼동될 수 있지만, 크기가 더 크고 돌기물이 휘어져 있어 *P. reticulatum*과 구분된다(Matsuoka et al., 1989; Fukuyo et al., 1990; Steidinger and Tangen, 1997). 실제로 포자로부터 발아해 나온 영양세포는 상각과 하각의 높이가 거의 동일하며 깊은 횡구와 납작한 외부형상을 하고 있었을 뿐만 아니라 6-8 세포의 연쇄군체를 형성하여 전형적인 *P. bahamense* var.

*compressum*의 형태를 보였다 (미발표 자료). *G. catenatum*의 휴면포자는 전체의 4-2% 미만을 차지하였지만, 1988년 호주 Tasmania Esperance 항에서 이 종의 휴면포자가 1% ($3 \text{ cysts} \cdot \text{g}^{-1}$)임에도 불구하고 (Bolch and Hallegraeff, 1990) 그 해에 이 종에 의한 적조가 발생하여 양식 조개류 내 2,052 g PSP100 g⁻¹에 달하는 마비성 패독이 검출된바 있다 (Hallegraeff et al., 1995). 이 조사 해역에서도 분포량이 많은 *A. tamarense/catenella*, *P. reticulatum*뿐만 아니라 분포량이 적은 *G. catenatum*, *L. polyedrum*과 같은 종들에 대해서도 지속적인 모니터링이 필요하다.

제 2 장

한국 남해 연안 저질 내에서 종 특이적 Oligonucleotide쌍을 이용한 유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*의 검출

2-1 서 론

유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides* Margaref 적조는 국내에서 1982년에 처음 보고 된 이후 1995년 남해안과 동해안에 걸쳐 대규모로 적조를 일으켰으며, 해마다 연안 역에서 광범위하고 지속적으로 발생하고 있어 수산업과 적조구제에 막대한 경제적 손실을 주고 있다 (Kim, 1997; Kim et al., 2001b). *C. polykrikoides* 적조는 예전에는 남해안에 국한되었으나 점점 동해와 황해로도 확산되어 우리나라 전 연안에 발생하고 있는 실정이며, 최근에는 전 세계적으로 *Cochlodinium* sp. 적조가 확산되고 있다 (Yuki and Yoshimatsu, 1989; Whyte et al., 2001). 한국에서는 이 무각종의 대규모 적조 현상에 관한 생태적 연구 (Suh et al., 2000; Kim et al. 2002 Lim et al., 2002), 증식 생리에 관한 연구 (Kim et al. 1999, 2000; Kim et al., 2001a; Lee et al., 2001), 유전적 연구 (Park and Park, 1999; Cho et al., 2000, 2001; Kim et al. 2004) 등이 있어왔지만, 정확한 형태동정의 어려움과 불명확한 생활사 등으로 인하여 이 종에 대한 초기 발생 기작의 해명과 신속·정확한 적조 확산 모니터링에 많은 어려움이 따르고 있다.

C. polykrikoides 적조발생 모니터링을 위해서는 신속하고 정확한 동정과 계수가 전제조건이 되어야 하지만, 광학현미경 하에서 관찰하는 전통적인 방법으로는 많은 시간과 노력이 소모 될 뿐더러 고정 후에 세포가 변형되어

관찰하는 데 어려움이 따른다. 이런 문제를 극복하기 위하여 최근에는 lectin, antibody, oligonucleotide probe를 이용한 PCR, FISH (fluorescence in situ hybridization), Sandwich-hybridization, Southern blot 등과 같은 분자생물학적 기법의 활용이 활발하게 이루어지고 있다 (Scholin et al., 2003). 특히 LSU rRNA 유전자는 보존성이 높아 다양한 분류군 간의 계통해석에 널리 사용될 뿐만 아니라 일부 영역은 유전적 변이가 매우 높아 종간 혹은 개체군간의 구별이 가능하다 (Zardoya et al., 1995; Scholin et al., 1994, Rehnstam-Holm et al., 2002; Edvardsen et al., 2003; John et al., 2003b). 더군다나 LSU rDNA D2 영역은 유전적 변이가 매우 높아 (Wuyts et al., 2001) 계통적으로 유사한 종간의 구별뿐만 아니라 oligonucleotide primer 또는 probe를 제작할 수 있으며, 실제로 이 영역을 이용해서 유해한 미세조류를 검출하기도 하였다 (Scholin et al., 1997; Miller and Scholin, 1998; Puel et al., 1998; Rehnstam-Holm et al., 2002; John et al., 2003a). 하지만 이것들은 영양세포를 대상으로 하고 있어, 해양 저질로부터 추출한 bulk DNA를 주형으로 하는 시도가 필요하다 (e.g., Godhe et al., 2002). 현재까지 *C. polykrikoides*의 휴면포자는 실험실 내에서 형성된 'hyaline cyst' (Kim et al., 2002) 이외에 해양 저질 내에서의 존재가 밝혀지지 않고 있지만, *C. polykrikoides*를 포함한 유독유해 적조생물의 저질 내 휴면포자의 존재 여부는 앞으로의 적조발생 잠재력을 예측할 수 있는 중요한 생물지표로 사용될 수 있다는 점에서 이들 포자의 생물지리적 분포를 파악하는 것은 적조 모니터링에 매우 유용하다 (Anderson and Wall, 1978; Nehring, 1997).

이 실험에서는 *C. polykrikoides*의 LSU rDNA D1-D3 영역 염기서열 정보를 바탕으로 민감하고 정확한 종 특이적 oligonucleotide 쌍을 제작하고, 이를 two-step PCR 검출법으로 저질내의 *C. polykrikoides* 모니터링에 적용하였다.

2-2 재료 및 방법

2-2-1 총 DNA 추출

이 실험에 사용된 BSW0109 *Cochlodinium polykrikoides* 배양주는 부산에서 분리하였으며, GPM 배지 (Loeblich, 1975) 를 이용해 실험실 내에서 (20℃, ca. 50 mol photons·m⁻²·s⁻¹ and 14L:10D) 계대 배양하였다 (Table 2-1). 지수성장기에 수확한 *C. polykrikoides*를 Hong et al. (1995)에 따라 총 DNA 추출하였으며 (RNase 처리), 세포당 총 DNA 양을 계산하기 위하여 Gene Quant Pro (Amersham pharmacia, Sweden)로 DNA를 정량하였다.

Table 2-1 Composition of enrichment 'GPM'. Stock

Ingredients	GPM
KNO ₃	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.035 g
P II metals	30 ml
Vitamin B ₁₂	1 µg
Biotin	2 µg
Thiamine · HCl	1 mg
Soil extract	15 ml
Sea water	800 ml
Glass-distilled water	124 ml
pH	8.0
P II metals in mg·L⁻¹	
Na ₂ EDTA	1.27
H ₃ BO ₃	1.14
FeCl · 6H ₂ O	0.0484
MnCl · 4H ₂ O	0.144
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.004
ZnCl ₂	0.0104
The pH of the trace element solution is adjusted to 7.5	

2-2-2 *C. polykrikoides*의 분자계통 해석

계통수를 그리기 위하여 이 연구에 사용 된 *C. polykrikoides*과 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)에서 제공받은 36종의 다양한 와편모조류 LSU rDNA 염기서열 자료를 비교하였다. LSU rDNA D1-D3 영역의 염기서열은 *Toxoplasma gondii* (Wuyts et al., 2001)의 2차 구조 정보와 함께 Clustal W (Thompson et al., 1994)를 사용하여 정렬하였고, LSU rDNA D2 영역은 2차 구조 변이가 심해서 계통해석에서 제외 시켰다. *T. gondii* (GenBank accession number: X75453)는 outgroup으로 사용되었다. 생물 간의 계통관계 해석을 위하여 Bayesian 추론과 Maximum-likelihood tree를 그렸다

2-2-3 PCR 조건 및 *C. polykrikoides* 특이적 oligonucleotide 쌍 디자인

PCR 반응액은 최종 50 μ L 용량으로 1 *Ex Taq*TM Buffer, 2 mM dNTPs, 0.2 M primers, 1 unit *TaKaRa Ex Taq*TM (TaKaRa, Japan), 1 L 주형 DNA (0.05 g·mL⁻¹ c. 1400 cells)를 사용하였다. PCR 반응은 초기 94℃ 5분간 반응시켰고, 25회 반복 반응 (94℃ 30초 55℃ 1분 72℃ 1분) 후, 최종 72℃에서 7분간 반응시켰다. LSU rDNA D1-D3 영역의 증폭에 사용 된 universal primer 쌍은 D1R (5'-ACC CGC TGA ATT TAA GCA TA-3')과 D3B (5'-TCG GAG GGA ACC AGC TAC TA-3') (Scholin et al., 1994, Nunn et al., 1996)을 사용하였다. *C. polykrikoides* 특이적 oligonucleotide 쌍은 GenBank 에 등록된 95개의 다른 와편모조류 LSU rDNA D1-D3 영역과 비교한 후 CPOLY01 (5'-GTA CAC GGC TTG CAC TTG CA-3'), CPOLY02 (5'-TGG TCG TAG ACG TGT GTC AG-3')로 디자인하였다.

2-2-4 CPOLY01, CPOLY02의 반응 특이성

디자인 한 oligonucleotide 쌍의 반응 특이성을 알기 위하여 실험실 내에서 배양된 15종의 다양한 와편모조류 분리주들 (*Akashiwo sanguinea*, *Alexandrium affine*, *Al. catenella*, *Al. fraterculus*, *Al. tamarense*, *Gymnodinium*

catenatum, *Gymnodinium* sp., *Gyrodinium instriatum*, *Heterocapsa triquetra*, *Lingulodinium polyedrum*, *Pheopolykrikos hartmannii*, *Prorocentrum micans*, *Protoceratium reticulatum*, *Pyrophacus steinii*, *Scrippsiella trochoidea*)과 진해만에서 식물플랑크톤 네트로 채집된 현장시료에서 추출된 bulk DNA를 주형으로 하여 CPOLY01, CPOLY02의 반응 특이성을 검증하였다.

2-2-5 CPOLY01, CPOLY02의 검출 감도

CPOLY01, CPOLY02의 유효한 결합 온도 (T_p) 값을 구하기 위하여 55℃에서부터 2℃씩 높여가며 PCR 반응을 하였으며, 여기서 구해진 T_p 값을 이후의 PCR 반응에서 결합 온도로 사용하였다. 또한 CPOLY01, CPOLY02의 PCR 검출 감도를 알기 위하여 주형 DNA의 농도를 단계적으로 희석시켜가며 PCR 반응을 실시하였다. 검출 감도를 더 높이기 위하여 Two-step PCR 반응을 실시한 경우에는 D1R-D3B primer 쌍을 이용한 결합 온도 55℃에서 1차 PCR 증폭한 후, 그 산물을 주형으로 하여 CPOLY01, CPOLY02로 2차 PCR 증폭하였다.

2-2-6 저질 내에서 bulk DNA 추출과 *C. polykrikoides* 검출

저질은 남해 일대 7개 지역 (칠천도, 영도, 한산도, 가덕도, 남해 외해 3정점: Fig. 2-6)에서 2003년 4월 28일, 동일한 날짜에 채집하고 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 분석을 위하여 저질 2 g 과 1 mL의 denaturing solution [4 M guanidine isothiocyanate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 mM EDTA, 0.5% 2-mercaptoethanol], 2 g의 sea sand를 막자사발에 넣고 액체질소를 부어주며 완전히 분쇄하였다. 분쇄된 저질은 50 mL 튜브에 옮겨 extraction buffer [100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 1% CTAB, 2% SDS]를 첨가한 뒤 65℃에서 1시간 동안 교반하여 bulk DNA를 저질에서 분리하였다 (Hurt et al., 2001). 분리된 bulk DNA

는 저질 내에 불순물이 많이 섞여 있으므로 Hong et al. (1995)에 따라 총 DNA를 한 번 더 추출하였고, humic acid와 기타 광물질 등의 제거를 위하여 정제 (QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit, QIAGEN)하였다. 정제된 DNA를 Gene Quant Pro (Amersham pharmacia, Sweden)로 정량한 후 주형으로 사용하였다. PCR 조건은 최종 50 μ L 용량으로 1 *Ex Taq*TM Buffer, 200 M dNTPs, 0.2 M universal primers D1R (5'-ACC CGC TGA ATT TAA GCA TA-3') 과 D3B (5'-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GA-3') (Scholin et al., 1994, Nunn et al., 1996), 1.25 unit *Ex Taq*TM (TaKaRa, Japan), 50 ng·L⁻¹주형 DNA를 94℃ 5분간 반응 후, 25회 (94℃ 30초, 55℃ 1분, 72℃ 1분) 반복 증폭 후 72℃에서 7분간 반응 (My Cyclor, Bio-Rad)하였다. 앞선 실험과 같이 검출 감도를 더 높이기 위하여 1차 PCR 증폭된 산물을 주형으로 하여 CPOLY01, CPOLY02로 2차 PCR 증폭하였다. Positive는 남해 일대에 보편적으로 존재하는 *Alexandrium tamarense*를 사용하여 실험을 검증하였으며, 증폭 된 산물은TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA [pH 8.0])를 용매로 한 1% agarose gel에 전기영동하고 EtBr (0.5 g·mL⁻¹)로 염색한 뒤 자외선을 조사하여 확인하였다.

2-3 결과 및 고찰

2-3-1 *C. polykrikoides*의 분자계통 해석

*C. polykrikoides*는 Bayesian 계통수와 ML 계통수에서 *Amphidinium*과 *Gymnodinium*이 유전적 근연성을 보였다 (Fig. 2-1). 이러한 근연성은 Bayesian 추론에서는 잘 지지되나 ML 해석에서는 bootstrap 값이 낮아 잘 지지되지 않았다.

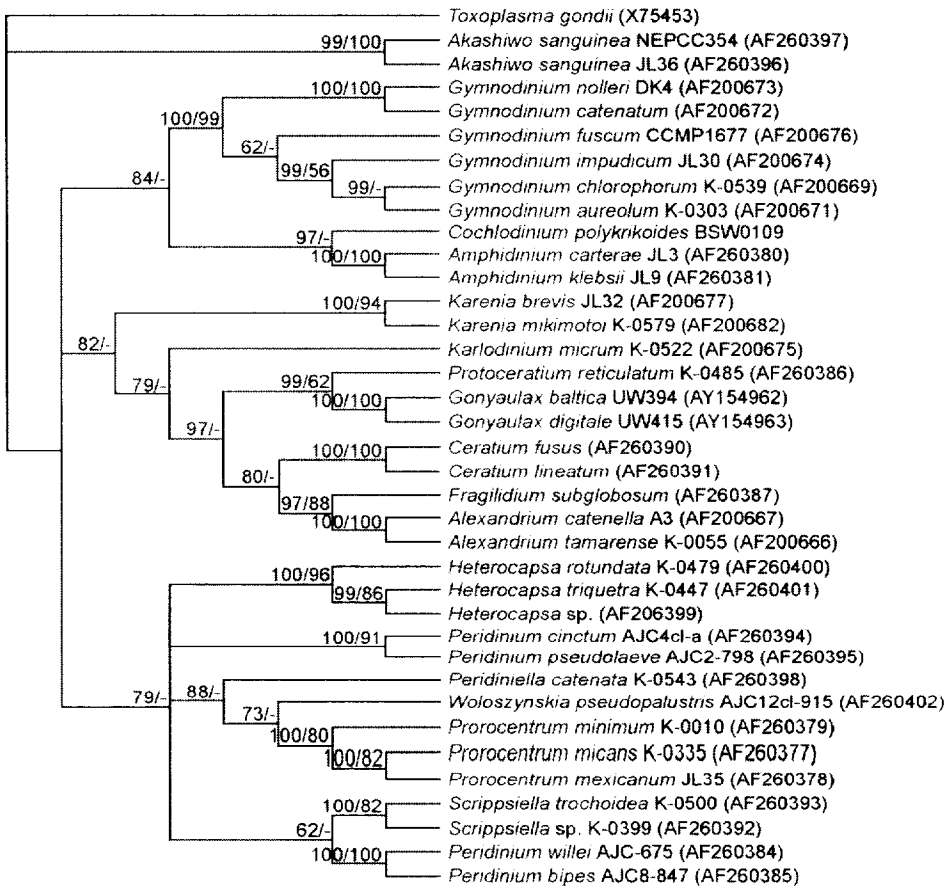


Fig. 2-1 The molecular phylogeny of the diverse dinoflagellate taxa based on their sequences of the LSU rDNA D1 and D3 domains. *Toxoplasma gondii* was used as the outgroup.

2-3-2 *Cochlodinium polykrikoides* 특이적 oligonucleotide 쌍의 T_p

이 연구에서는 유해성 적조생물인 *C. polykrikoides*의 효율적인 모니터링을 위하여 유전적 변이가 매우 높은 LSU rDNA의 염기서열 정보를 바탕으로 종 특이적인 oligonucleotide 쌍 (CPOLY01, CPOLY02)을 제작하였다. 제작된 CPOLY01, CPOLY02의 T_p 를 찾기 위한 PCR 반응 실험에서 결합온도가 67℃까지는 PCR 산물량의 변화가 없다가 그 이상의 온도에서는 PCR 산물량이 현저히 감소한 것으로 보아 67℃까지가 적합한 결합 온도임을 알 수 있다 (Fig. 2-2). PCR 반응에서 결합 온도를 높이는 것은 계통적으로 유사한 종들의 비 특이적 증폭을 예방할 수 있으며, 총 반응 시간도 단축시킬 수 있는 장점이 있기 때문이다 (Saiki, 1994; Wu et al., 1991; Sharrocks, 1994).

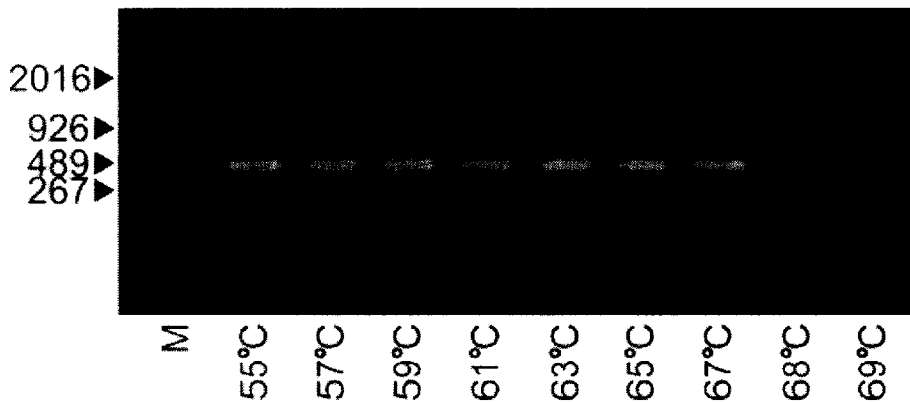


Fig. 2-2 The effective annealing temperature (T_p) of the *Cochlodinium polykrikoides*-specific PCR oligonucleotide set, CPOLY01 and CPOLY02.

M = size marker.

2-3-3 CPOLY01, CPOLY02의 반응 특이성

C. polykrikoides 특이적인 CPOLY01, CPOLY02의 반응 특이성을 검증하기 위하여 다양한 와편모조류 분류군에 속하는 15종의 배양주와 진해만에서 채집한 플랑크톤 시료로부터 추출된 DNA를 주형으로 사용하여 PCR 증폭 반응을 실시하였다. 이 중에서는 *C. polykrikoides*와 형태적으로 매우 흡사하여 식별이 비교적 어렵다고 알려진 *Gymnodinium catenatum*, *G. impudicum*이 포함되어 있었지만 (Lee et al., 2001), positive control (*C. polykrikoides*의 총 DNA)을 제외한 다른 어떤 것과도 반응하지 않아, 이 연구에서 디자인된 CPOLY01, CPOLY02는 높은 반응 특이성을 나타내고 있음을 보여주었다 (Fig. 2-3).



Fig. 2-3 The specificity of the *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, CPOLY01 and CPOLY02. M = size marker, 1 = *Akashiwo sanguinea*, 2 = *Alexandrium affine*, 3 = *Al. catenella*, 4 = *Al. fraterculus*, 5 = *Al. tamarense*, 6 = *Gymnodinium catenatum*, 7 = *Gymnodinium* sp., 8 = *Gyrodinium instriatum*, 9 = *Heterocapsa triquetra*, 10 = *Lingulodinium polyedrum*, 11 = *Pheopolykrikos hartmannii*, 12 = *Prorocentrum micans*, 13 = *Protoceratium reticulatum*, 14 = *Pyrophacus steinii*, 15 = *Scrippsiella trochoidea*, 16 = the heterogeneous environmental DNA, 17 = *Cochlodinium polykrikoides*, 18 = a negative control.

2-3-4 CPOLY01, CPOLY02의 검출 감도

PCR 검출 감도를 알기 위하여 주형 DNA의 농도를 점차적으로 희석시키며 CPOLY01, CPOLY02의 PCR 검출 감도를 시험한 결과, 0.05 cell (1.867 fmol)까지 증폭이 되었다 (Fig. 2-4A). 이러한 결과는 *Pfiesteria piscicida*의 SSU 유전자를 real-time PCR 반응한 검출 한계 0.6 cell (Bowers, 2000)보다 12배정도 민감하며, *Karenia brevis*의 *rbcL* 유전자를 이용한 real-time 역전사 PCR에서의 1cell까지의 감도 (Gray, 2003)보다 20배정도 민감하였다.

PCR 검출 감도를 더 높이기 위한 two-step PCR 반응 (Sharrocks, 1994)으로 universal primer 쌍인 D1R과 D3B로 1차 PCR 증폭을 실시한 후, CPOLY01, CPOLY02로 2차 PCR 반응을 실시한 결과 검출 한계는 10^{-4} cell (3.734 amol)로 높아졌다 (Figs. 2-4B, C). 또한 PCR detection의 경우 lectin, antibody, rRNA-targeted DNA probe 보다 검출 한계가 뛰어났다.

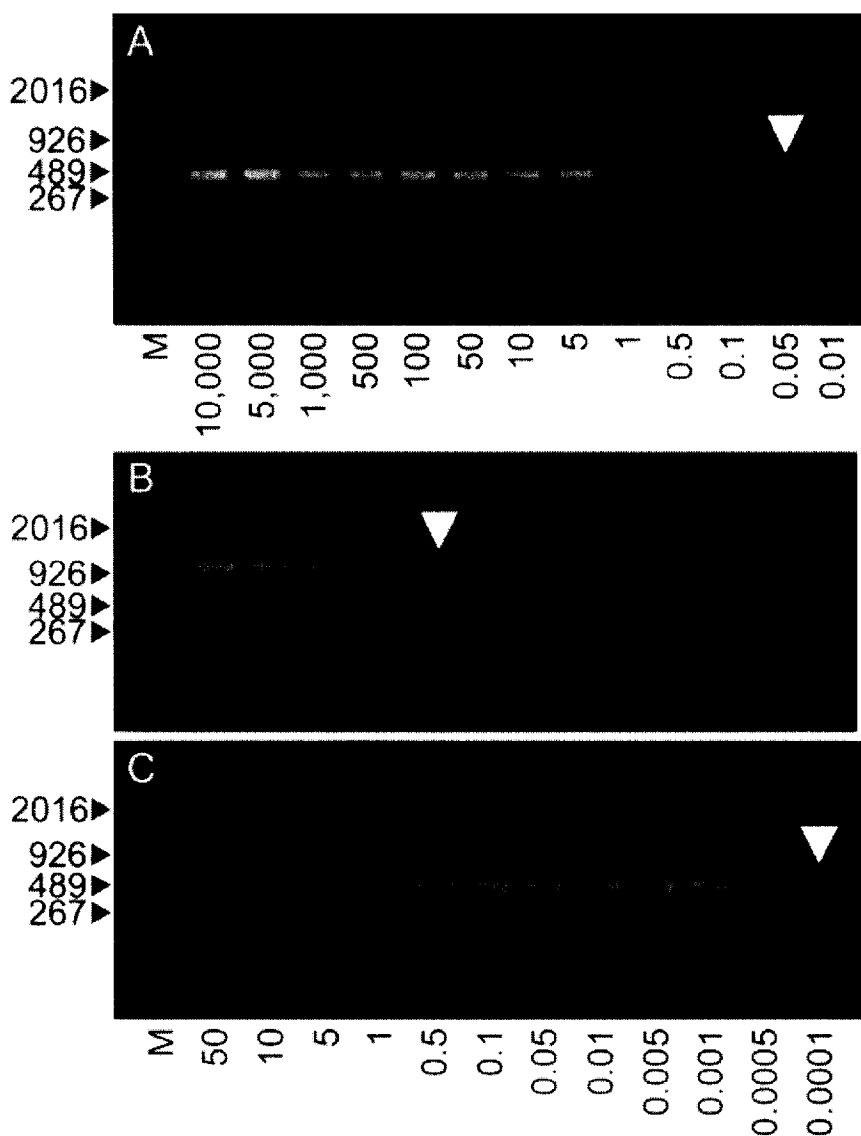


Fig. 2-4 The detection limit (cells·reaction⁻¹) of the *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, CPOLY01 and CPOLY02 (A) by the conventional PCR assay and (C) by the nested PCR assay after the amplification of the LSU rDNA D1-D3 region (B). Each arrowhead indicates the minimum detection limit. M = size marker.

2-3-5 저질 내에서 bulk DNA 추출과 *C. polykrikoides* 검출

이 실험에서 제작된 CPOLY01, CPOLY02는 반응 감도와 특이성이 매우 높아, 정확한 종 동정뿐만 아니라 저질 내에 있는 *C. polykrikoides*를 모니터링 하는데 응용하였다. 남해 일대 7개 정점의 저질에서 추출된 bulk DNA를 주형으로 하고, 앞선 검출 감도 실험과 같이 two-step PCR 반응하였다. 그 결과 D1R, D3B로 1차 증폭한 산물은 *C. polykrikoides*와 *A. tamarense*의 영양세포를 주형으로 사용한 구간에서 확연하게 밴드가 나타나나 그 외의 구간에서는 희미하거나 거의 표시가 나지 않았다. 하지만 이것을 주형으로 다시 2차 증폭한 산물에서는 칠천도, 영도, 가덕도, 남해 외해 정점 c에서 *C. polykrikoides*가 검출되었으며, Positive로 한 *A. tamarense*는 모든 정점에서 양성반응을 보였다 (Figs. 2-5, 2-6). 특히 우리나라에서 *C. polykrikoides* 적조는 대체로 여름에서 늦가을까지 발생하는 특징을 가지는데, 이 실험에 사용된 저질은 모두 2003년 4월 28일에 채집한 것이므로 이전에 발생했던 영양세포의 DNA가 분해 되지 않고 저질에 남아 있는 경우를 제외한다면 이 실험에서 검출된 *C. polykrikoides*는 휴면포자 형태일 가능성이 높다.

이 실험은 채집한 저질의 상태에 많이 의존하므로 임의의 정점에서 CPOLY01, CPOLY02를 사용하여 저질 내에서 *C. polykrikoides*가 존재하는지 알기 위해서는 적어도 2차례 이상의 시료를 채집하여 반복실험을 하고 검출된 *C. polykrikoides*는 그 염기서열을 분석해야 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이며, 이 종의 생활사 규명, 해양 저질에서의 Biogeographical mapping 등에 활용될 수 있을 것이다 (Fig. 2-6). 더 나아가 초기 적조 발생 모니터링 기술의 확립을 위해서는 정량이 가능한 real-time PCR 기법 (Bowers, 2000)과 같은 방법을 통한 검출 시간 단축과 kit화 (Scholin et al., 2003)를 통한 현장적용 가능성을 높여야 할 것이다.

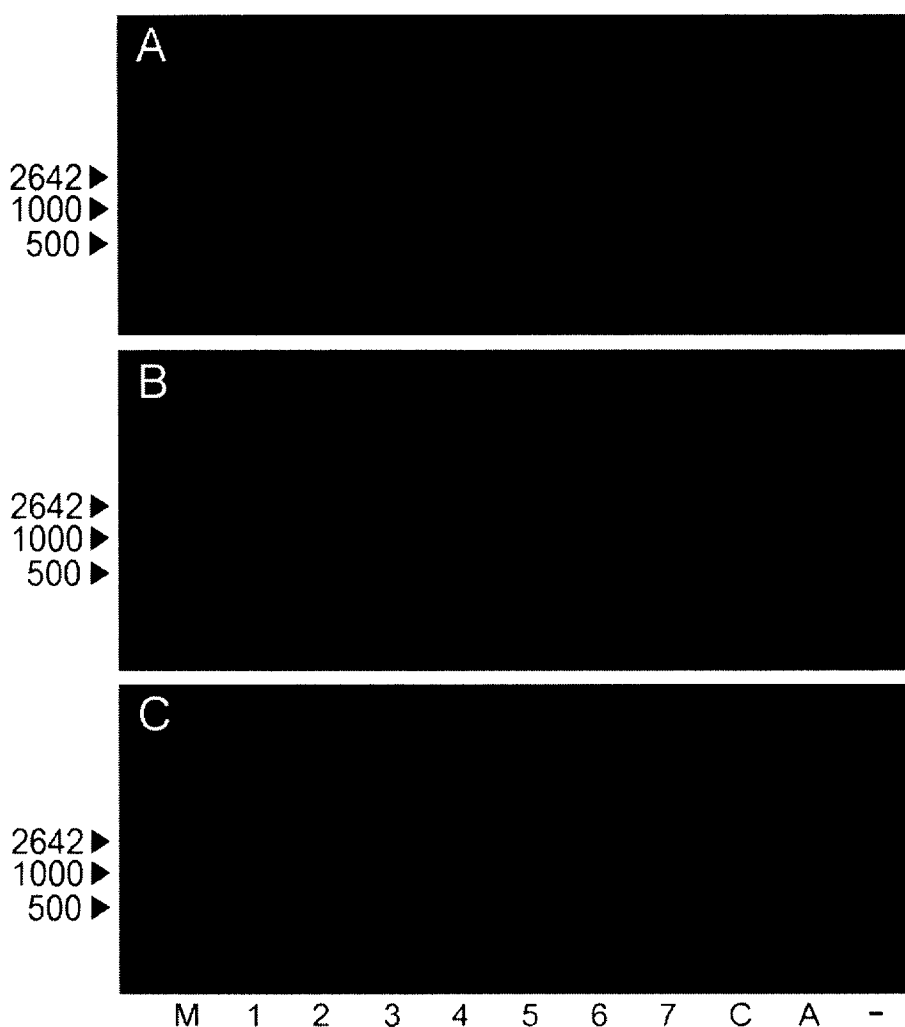


Fig. 2-5 The detection of the LSU rDNA D1-D3 region by the conventional PCR assay (A) by the nested PCR with *Coclodinium polykrikoides*-specific primer set (B) and *Alexandrium tamarense* specific primer (C) after the amplification of the LSU rDNA D1-D3 region; 1= Chilchundo, 2=Youngdo, 3=Hansando, 4=Gaduckdo, 5,6,7=Stns a,b and c of South Sea, 8= a negative control.

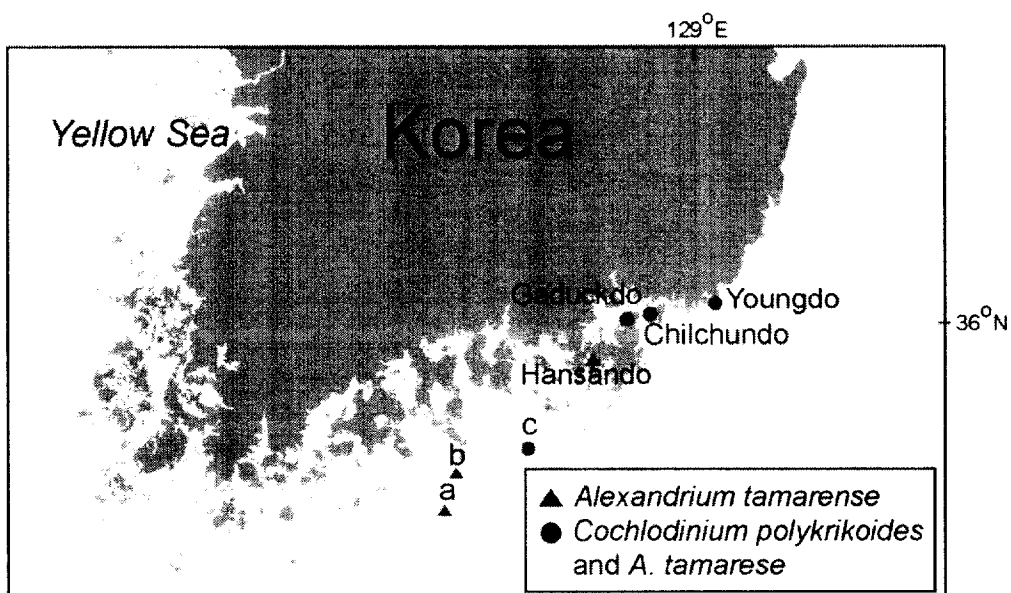


Fig. 2-6 Biogeographical mapping of *Cochlodinium polykrikoides* (●) and *Alexandrium tamarense* (▲) in sediments of South Sea of Korea.

요 약

와편모조류의 휴면포자는 적조발생 초기에 "씨앗개체군" 역할을 수행하며 적조 발생 장소와 시기를 예측할 수 있는 중요한 단서를 제공한다. 하지만 유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*는 해마다 한국 연안에 피해를 주는 종임에도 불구하고 휴면포자의 존재가 명확하지 않아 적조 초기 발생 기작과 신속·정확한 모니터링에 많은 어려움이 따르고 있다.

이 연구에서는 황해의 대규모 간척사업이 시행되고 있는 새만금 해역과 매년 적조가 빈번하게 발생하는 남해 진해만 수정리를 대상으로 해양환경의 변화에 따른 저질 내 와편모조류 분포량을 정점별, 계절별로 정량·정성 분석하여 이 두 지역에서의 적조 발생 잠재력을 예측하였다. 새만금 해역에서는 전 정점 총 32종 6-1,618 cysts·g⁻¹로, 진해만은 전 정점 총 32종 1,733-4,476 cysts·g⁻¹의 휴면포자가 분포하였다. 새만금 조사 해역에서 연중 우점하는 종들은 *A. tamarense/catenella*, *G. scrippsea*, *P. reticulatum*이었으며, 수정리는 *A. tamarense/catenella*, Unidentified sp.1, *P. reticulatum*, *Z. lenticulatum*이었다. 두 지역 모두 봄철과 여름철에 휴면포자의 양이 많았으며, 이중 많은 종이 조류 독을 생산한다고 알려진 *Alexandrium* 속으로 각각 46%, 36%로 우점하였다. 특히 마비성 패독을 생성하는 *Alexandrium tamarense/catenella*는 각각 25%, 22%로 전체 종에서 가장 많이 차지하여 이 종에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다.

또한 우리는 지금까지 알려지지 않았던 *C. polykrikoides*의 휴면포자의 존재 유무를 알기 위하여, 영양세포의 LSU rDNA D1-D3 영역을 분석하고 종 특이적인 oligonucleotide 쌍 (CPOLY01, CPOLY02)을 제작하였다. CPOLY01, CPOLY02가 주형에 결합하는 온도는 67℃까지 유효하였으며 전통적인 PCR과 two-step PCR을 사용하면 각각 0.05, 0.0001 cells·reaction⁻¹까지 검출할 수

있는 높은 반응 감도와 종 특이성을 나타내었다. 이를 Two-step PCR을 이용하여 저질내의 *C. polykrikoides* 검출에 적용한 결과 칠천도와 영도, 가덕도, 남해 외해 c 정점의 저질 내에서 *C. polykrikoides*를 검출 할 수 있었다.

감사의 글

먼저 한결같은 믿음으로 아낌없이 지도편달 해주신 김창훈 선생님과 좋은 환경에서 실험하게 해주신 김동수 선생님, 힘들 때마다 상담자 되어주신 김종명 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 친남매처럼 지내온 잊을 수 없는 실험실식구들에게 진심으로 감사하며 이 조그만 결실을 바칩니다. 마지막으로 하늘과 땅의 우리가족들 모두 사랑합니다.

참고 문헌

- Anderson, D.M. 1980. Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarens* (Dinophyceae) hypnozygotes. J. Phycol., 16: 166-172.
- Anderson, D.M. and D. Wall. 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarens* and *G. excavata* in initiation toxic dinoflagellate blooms. J. Phycol., 14: 224-234.
- Anderson, D.M., Y. Fukuyo and K. Matsuoka. 2003. Cyst methodologies. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson and A.D. Cembella, eds. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, France, pp. 165-189.
- Balech, E. 1995. The Genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Sherkin Island, Co. Cork, Ireland. 151 pp.
- Bolch, C.J. and G.M. Hallegraeff. 1990. Dinoflagellate cysts in Recent marine sediment from Tasmania, Australia. Bot. Mar., 33: 173-192.
- Bolch, C.J.S. 1997. The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. Phycologia, 36: 472-478.
- Bowers, H.A., T. Tengs, H.B. Glasgow Jr., J.M. Burkholder, P.A. Rublee and D.W. Oldach. 2000. Development of real-time PCR assay for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4641-4648.
- Cho, E.S., G.Y. Kim, B.C. Oh, L.L. Rhodes and J.D. Lee. 2000. Discrimination of three species of dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium*

- impudicum* and *Gymnodinium catenatum* using FITC-lectins. *Algae*, 15: 175-178.
- Cho, E.S., G.Y. Kim, B.D. Choi, L.L. Rhodes, T.J. Kim, H.G. Kim and J.D. Lee. 2001. A comparative study of the harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Gyrodinium impudicum* using transmission electron microscope, fatty acid composition, carotenoid content, DNA quantification and gene sequences. *Bot. Mar.*, 44: 57-66.
- Cho, H.J. and K. Matsuoka. 2001. Distribution of dinoflagellate cysts in surface sediments from the Yellow Sea and East China Sea. *Mar. Micropaleontol.*, 42:, 103-123.
- Cho, H.J., C.H. Kim, C.H. Moon and K. Matsuoka. 2003. Dinoflagellate cysts in Resent sediment from the southern coastal waters of Korea. *Bot. Mar.*, 46: 332-337.
- Dale, B. 2001. Marine dinoflagellate cysts as indicators of eutrophication and industrial pollution: A discussion. *Sci. Total Environ.*, 264: 235-240.
- Edvardsen, B., K. Shachian-Tabrizi, K. Jakobsen, L.K. Medlin, E. Dahl, S. Brubak and E. Paasche. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysisspecies* (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analysis of rDNA. *J. Phycol.*, 39: 395-408.
- Fukuyo, Y., Takano, H., Chihara, M. and Matsuoka, K. 1990. Red Tide Organisms in Japan, An Illustrated Taxonomic Guide. Uchida Rokakuho, Tokyo, Japan. 407 pp.
- Godhe, A., A.-S. Rehnstam-Holm, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2002. PCR detection of dinoflagellate cysts in field sediment samples from tropic and temperate environments. *Harmful Algae*, 1: 361-373.
- Gray, M., B. Wawrik, J. Paul and E. Casper. 2003. Molecular detection and

- quantitation of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol., 69: 5726-5730.
- Hallegraeff, G.M. 2003. Harmful algal blooms: a global overview. In: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson and A.D. Cembella, eds. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, France, pp. 19-49.
- Hallegraeff, G.M., M.A. McCausland and R.K. Brown. 1995. Early warning of toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* in southern Tasmanian waters. J. Plankton Res., 17: 1163-1176.
- Hong Y.K., S.D. Kim, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. J. Appl. Phycol., 7: 101-107.
- John, U., A. Cembella, C. Hummert, M. Elbrhter, R. Groben and L. Medlin. 2003a. Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. Eur. J. Phycol., 38: 25-40.
- John, U., R.A. Fensome and L.K. Medlin. 2003b. The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* "species complex" (Dinophyceae). Mol. Biol. Evol., 20: 1015-1027.
- Kim, C.H. 1994. Germinability of resting cysts associated with occurrence if toxic dinoflagellate *Alexandrium* species. J. Aquaculture., 7: 251-264. (in Korean)
- Kim, C.H. 1995. Paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Alexandrium* species isolated from benthic cysts in Jinhae Bay, Korea. J. Korean Fish. Soc., 28: 364-372.

- Kim, C.H. and Lee, J.S. 1996. Occurrence of toxic dinoflagellate and PSP toxic profiles in *Alexandrium* spp. from Jinhae Bay, Korea. In: Yasumoto T., Oshima Y. and Fukuyo Y. eds. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, 1996, pp. 61-64.
- Kim, C.H. and Shin, J.B. 1997. Harmful and toxic red tide algal development and toxic production in Korean coastal waters. *Algae*, 12: 269-276. (in Korean)
- Kim, C.H., H.J. Cho, J.B. Shin, C.H. Moon and K. Matsuoka. 2002. Regeneration from hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. *Phycologia*, 41: 667-669.
- Kim, C.S., S.G. Lee and H.G. Kim. 2000. Biochemical response of fish exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 254: 131-141.
- Kim, C.S., S.G. Lee, C.K. Lee, H.G. Kim and J. Jung. 1999. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Plankton Res.*, 21: 2105-2115.
- Kim, H.C., C.K. Lee, S.G. Lee, H.G. Kim and C.K. C.K. Park. 2001a. Physico-chemical factors on the growth of *Cochlodinium polykrikoides* and nutrient utilization. *J. Kor. Fish. Soc.*, 34: 445-456. (in Korean)
- Kim, H.G. 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. *Ocean Res.*, 19: 185-192.
- Kim, H.G., C.S. Jung, W.A. Lim, C.G. Lee, S.Y. Kim, S.H. Youn, Y.C. Cho and S.G. Lee. 2001. The spatio-temporal progress of *Cochlodinium polykrikoides* blooms in the coastal waters of Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 34: 691-696. (in Korean)

- Kim, H.G., C.S. Jung, W.A. Lim, C.G. Lee, S.Y. Kim, S.H. Youn, Y.C. Cho and S.G. Lee. 2001b. The spatio-temporal progress of *Cochlodinium polykrikoides* blooms in the coastal waters of Korea. J. Kor. Fish. Soc., 34: 691-696. (in Korean)
- Kim, S.H., K.Y. Kim, C.H. Kim, W.S. Lee, M. Chang and J.H. Lee. 2004. Phylogenetic analysis of harmful algal blooming (HAB)-causing dinoflagellates along the Korean coasts based on the SSU rRNA gene. J. Microbiol. Biotechnol., (in press)
- Kim, S.Y., C.H. Moon and H.J. Cho. 2003a. Relationship between dinoflagellate cyst distribution in surface sediments and phytoplankton assemblages from Gwangyang Bay, a southern coastal area of Korea. J. Korean Soc. Oceanogr., 8: 111-120. (in Korean)
- Kim, S.Y., C.H. Moon and H.J. Cho. 2003b. Vertical distribution of dinoflagellate cysts in sediments from Gwangyang Bay, Korea. J. Kor. Fish. Soc., 36: 290-297. (in Korean)
- Landsberg, J.H. 2002. Effects of algal blooms on aquatic organisms. In: Reviews in Fisheries Science. Stickney, R.R. ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 118-125.
- Lee, C.K., H.C. Kim, S.G. Lee, C.S. Jung, H.G. Kim and W.A. Lim. 2001. Abundance of harmful algae, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* in the coastal area of south sea of Korea and their effects of temperature, salinity, irradiance and nutrient on the growth in culture. J. Kor. Fish. Soc., 34: 536-544. (in Korean)
- Lee, H.O., K.H. Choi and M.S. Han. 2003. Spring bloom of *Alexandrium tamarense* in Chinhae Bay, Korea. Aquat. Microb. Ecol., 33: 271-278.
- Lee, M.H., J.B. Lee, J.A. Lee and J.G. Park. 1999. Community structure of

- flagellates and dynamics of resting cysts in Kamak Bay, Korea. *Algae*, 14: 255-266. (in Korean)
- Lim, W.A., C.S. Jung, C.K. Lee, Y.C. Cho, S.G. Lee, H.G. Kim and I.K. Jung. 2002. The outbreak, maintenance and decline of the red tide dominated by *Cochlodinium polykrikoides* in the coastal waters off southern Korea from August to October, 2000. *J. Kor. Soc. Oceanogr.*, 7: 68-77. (in Korean)
- Loeblich, A. R., III. 1975. A seawater medium for dinoflagellates and the nutrition of *Cachonina niei*. *J. Phycol.*, 11: 80-86.
- MAF (Ministry of Agriculture and Forestry). 1999. Studies on tidal land reclamation and creation of environment amenity. Ministry of Agriculture and Forestry, pp. 346-347. (in Korean)
- Matsuoka, K. 1999. Eutrophication process recorded in dinoflagellate cyst assemblages - a case of Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan. *Sci. Total Environ.*, 231: 17-35.
- Matsuoka, K. 2001. Further evidence for a marine dinoflagellate cyst as an indicator of eutrophication in Yokohama Port, Tokyo Bay, Japan. Comments on a discussion by B. Dale. *Sci. Total Environ.*, 264: 221-233.
- Matsuoka, K. and Y. Fukuyo. 2000. Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study. WESTPAC-HAB, Asian Natural Environmental Science Center, Tokyo, 29 pp.
- Matsuoka, K., Fukuyo, Y. and Gonzales, C. L. 1989. A new discovery of cysts of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* from the Samar Sea, Philippines. In: *Red Tides, Biology, Environmental Science and Toxicology*. Okaich, T., Anderson, D. M. and Nemoto, T. eds. Elsevier, New York. pp. 301-304.
- Miller, P.E. and C.A. Scholin. 1998. Identification and enumeration of cultured and wild *Pseudo-nitzschia*(Bacillariophyceae) using species-specific LSU

- rRNA-targeted fluorescent probes and filter-based whole cell hybridization. J. Phycol., 34: 371-382.
- MOMAF (Ministry of Maritime Affairs and Fisheries). 2003a. Integrated preservation study in the oceanic environment in the Saemangeum area (1st year): hydrography and water movement. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, pp. 205. (in Korean)
- MOMAF (Ministry of Maritime Affairs and Fisheries). 2003b. Integrated preservation study in the oceanic environment in the Saemangeum area (1st year): marine geological processes from tidal flats to inner shelf. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, pp. 76-124. (in Korean)
- Nehring, S. 1997. Dinoflagellate resting cysts from Recent German coastal sediments. Bot. Mar., 40: 307-324.
- Nunn, G.B., B.F. Theisen, B. Christensen and P. Arctander, 1996. Simplicity-correlated size growth of the nuclear 28S ribosomal RNA D3 expansion segment in the crustacean order Isopoda. J. Mol. Evol., 42: 211-223.
- Park, J.G. and Y.S. Park. 1999. Comparison of the morphological characteristics and the 24S rRNA sequences of *Cochlodinium polykrikoides* and *Gyrodinium impudicum*. The Sea (J. Kor. Soc. Oceanogr.), 4: 363-371. (in Korean)
- Park, M.H., Y.O. Kim, S.Y. Cho and M.S. Han. 2004. Effect of environment conditions on germination of *Alexandrium tamarense* cysts from Masan Bay, Korea. Korean J. Environ. Biol., 22: 200-205. (in Korean)
- Puel, O., F. Galgani, C. Dalet and P. Lassus. 1998. Partial sequence of the 28S rRNA and polymerase chain reaction based assay for the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 55: 597-604.

- Rehnstam-Holm, A.S., A. Godhe and D.M. Anderson. 2002. Molecular studies of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Sweden and North America. *Phycologia*, 41: 348-357.
- Saiki, R.K. 1994. The design and optimization of the PCR. In: PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, Erlich, H.A. ed. Oxford University Press, New York, pp. 7-16.
- Satake, M., T. Ichimura, K. Sekiguchi, S. Yoshimatsu and Y. Oshima. 1999. Confirmation of yessotoxin and 45,46,47-trinoryessotoxin production by *Protoceratium reticulatum* collected in Japan. *Nat. Toxins* 7: 147-150.
- Scholin, C., P. Miller, K. Buck, F. Chavez, P. Harris, P. Haydock and J. Howard. 1997. Detection and quantification of *Pseudo-nitzschia australis* in cultured and natural populations using LSU rRNA-targeted probes. *Limnol. Oceanogr.*, 42: 1265-1272.
- Scholin, C.A., E. Vrieling, L. Peperzak, L. Rhodes and P. Rublee. 2003. Detection of HAB species using lectin, antibody and DNA probes. In: Manual on Harmful Marine Microalgae, Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson and A.D. Cembella eds. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO, Paris, pp. 131-163.
- Scholin, C.A., M. Herzog, M. Sogin and D.M. Anderson. 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.*, 30: 999-1011.
- Sharrocks, A.D. 1994. The design of primers for PCR. In: PCR Technology: Current Innovations. Griffin, H.G. and A.M. Griffin eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 5-11.
- Steidinger, K. A. and Tangen, K. 1997. In: Identifying Marine Phytoplankton,

- Dinoflagellates. Tomas, C. R. ed. Academic Press, California, USA. pp. 387-590.
- Suh, Y.S., J.H. Kim and H.G. Kim. 2000. Relationship between sea surface temperature derived from NOAA satellites and *Cochlodinium polykrikoides* red tide occurrence in Korean coastal waters. J. Kor. Environ. Sci. Soc., 9: 215-221. (in Korean)
- Whyte, J.N.C., N. Haigh, N.G. Ginther and L.J. Keddy. 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiniales, Dinophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada. Phycologia, 40: 298-304.
- Wu, D.Y., L. Ugozzoli, B.K. Pal, J. Qian and R.B. Wallace. 1991. The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. DNA Cell Biol., 10: 233-238.
- Wuyts, J., P. De Rijk, Y. Van de Peer, T. Winkelmans and R. De Wachter. 2001. The European large subunit ribosomal RNA database. Nucleic Acids Res., 29: 175-177.
- Yamaguchi, M., S. Itakura, I. Imai, and Y. Ishida. 1995. A rapid and precise technique for enumeration of resting cysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in natural sediment. Phycologia, 34: 207-214.
- Yoo, Y.D., Jeong, H.J., Shim, J.H., Park, J.Y., Lee, K.J., Yih, W., Kweon, H.K., Pae, S.J., Park, J.K. 2002. Outbreak of Red Tides in the coastal waters off the Southern Saemankeum areas, Jeonbuk, Korea I. Temporal and spatial variations in the phytoplankton community in the summer-fall of 1999. J. Korean Soc. Oceanogr., 7: 129-139. (in Korean)
- Yuki, K. and S. Yoshimatsu. 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium*

from Harima-Nada, Seto Inland Sea, Japan. In: Red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology, Okaichi, T., D.M. Anderson and T. Nemoto eds. Elsevier, New York, pp. 451-454.

Zardoya, R., E. Costas, V. Lpez-Rodas, A. Garrido-Pertierra and J.M. Bautista. 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. J. Mol. Evol., 41: 637-645.