



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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](#)

수 산 학 석 사 학 위 논 문

Real-time PCR을 이용한 유해성  
와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*의  
발생 잠재력 조사



2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 보 람

수 산 학 석 사 학 위 논 문

Real-time PCR을 이용한 유해성  
와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*의  
발생 잠재력 조사

지도교수 김 창 훈

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.



2011년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

이 보 략

이보람의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2011년 2월 25일



주 심 이학박사 남 윤 권 (인)

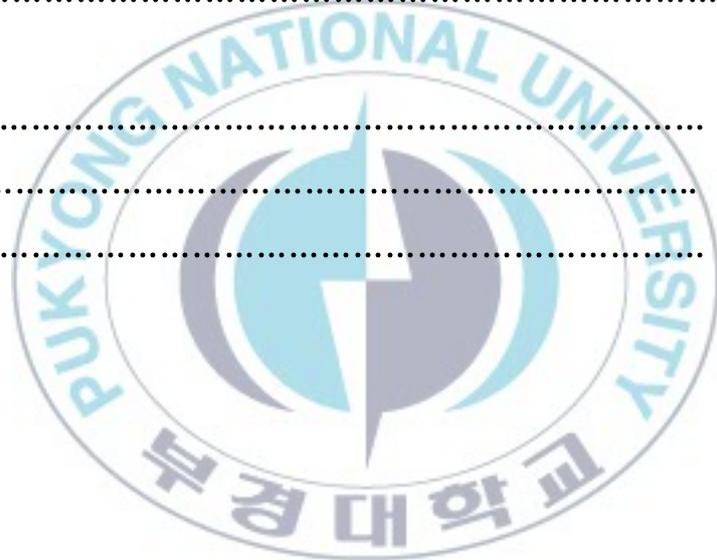
위 원 이학박사 김 중 명 (인)

위 원 농학박사 김 창 훈 (인)

# 목 차

Figure legends .....	iii
Table legends .....	v
Abstract .....	vi
1. 서 론 .....	1
2. 재료 및 방법 .....	4
2.1 배양 .....	4
2.2 시료 채집 .....	4
2.3 DNA 추출 .....	8
2.3.1 배양주 DNA 추출 .....	8
2.3.2 저질 시료 DNA 추출 .....	8
2.3.3 해수 시료 DNA 추출 .....	8
2.4 Standard PCR .....	9
2.5 Real-time PCR .....	10
2.6 Standard curve 작성 .....	11
2.6.1 휴면포자 정량을 위한 standard curve .....	11
2.6.2 영양세포 정량을 위한 standard curve .....	12
3. 결과 .....	14
3.1 Standard PCR .....	14
3.2 휴면포자 정량을 위한 standard curve .....	17

3.3	영양세포 정량을 위한 standard curve	17
3.4	Real-time PCR	20
A.	자란만 인근 해역	20
B.	사랑도 인근 해역	27
C.	여수 인근 해역	28
D.	완도 인근 해역	29
E.	미조면 인근 해역	30
F.	통영 인근 해역	32
G.	욕지도 인근 해역	33
4.	고찰	34
요약		38
감사의 글		40
참고문헌		41



## Figure legends

Fig. 1. Sampling stations of sediment and seawater samples investigated in this study. (A, Jaran Bay; B, Saryangdo; C, Yeosu; D, Wando; E, Mijomyeon; F, Tongyoung; G, Yokjido).

Fig. 2. The detection of *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, ITSF and ITSr in sediment.

(M, size marker; JR, Jaran Bay sediment DNA; SR, Saryangdo sediment DNA; YS, Yeosu sediment DNA; WD, Wando sediment DNA; MJ, Mijomyeon sediment DNA; TY, Tongyeong sediment DNA; YJ, Yokjido sediment DNA; P, *C. polykrikoides* gDNA; A, *Alexandrium catenella* gDNA; N, non-template).

Fig. 3. The detection of plamid DNA containing the ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, CPITSF and CPITSR2.

(M, size marker; a, *C. polykrikoides* gDNA; b, plamid DNA  $10^5$ ; c, plamid DNA  $10^4$ ; d, plamid DNA  $10^3$ ; e, plamid DNA  $10^2$ ; f, plamid DNA 10; g, *Alexandrium catenella* gDNA).

Fig. 4. Linear relationship between the Ct values and plamid containing the ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides*

( $R^2=0.997$ ). The standard curve was used to quantify the rDNA copy numbers of the target species in sediment samples.

Fig. 5. Linear relationship between the Ct values and ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides* ( $R^2=0.999$ ). The standard curve was used to quantify the target species in seawater samples.

Fig. 6. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Jaran Bay 2009.

Fig. 7. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Jaran Bay 2010.

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

Fig. 9. Comparison of rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in sediment with vegetative cell numbers in filter seawater.

Fig. 10. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Saryangdo.

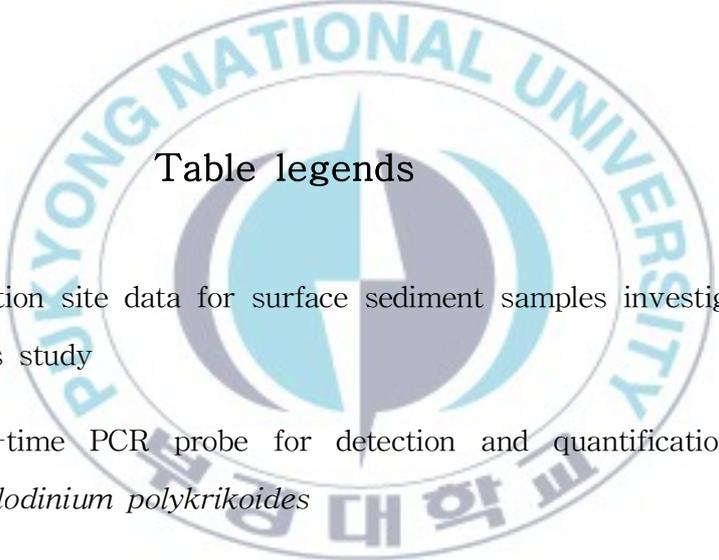
Fig. 11. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Yeosu.

Fig. 12. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Wando.

Figure 13. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Mijomyeon.

Figure 14. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Tongyeong.

Figure 15. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Yokjido.



### Table legends

Table 1. Collection site data for surface sediment samples investigated in this study

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

Table 3. Primers used to amplify ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides* for plasmid DNA standard curve

**Bloom Potential of Harmful Dinoflagellate  
*Cochlodinium polykrikoides* in the Southern Coast of Korea  
as assessed by Real-time PCR Assay**

**BORAM LEE**

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

**Abstract**

Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* is a notorious harmful algal blooms (HABs) species that has caused massive fish mortality along the Korean coasts with increasing frequency.

Many dinoflagellate species have been reported to form resting cysts or other types of resting stages as part of their life cycle. Cysts are more resistant to unfavorable environments as compared to vegetative cells, and play an important role as the seed population for seasonal blooms after the subsequent year. The rapid and accurate identification and enumeration of the target species of interest are prerequisites for HABs monitoring programs. Real-time PCR assay has been used for rapid detection and enumeration of harmful dinoflagellates in waters

and sediments. The method uses a cloned fragment of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) rDNA gene as a standard for cyst quantification.

*C. polykirkoides* was detected in sediment samples from the coast of Southern Sea. Of total 115 sediment samples, Jaran Bay samples were positive for *C. polykirkoides* continually, other location samples were detected. The abundances of these species in the coast of Jaran Bay were relatively higher than other location (100 rDNA copies for *C. polykirkoides* per cm<sup>3</sup> of wet sediment obtained from top layer of centrifuged 30g of sediment). *C. polykirkoides* was detected from the coasts of Saryangdo, Yeosu, Wando, Mijomyeon, Tongyeong, Yokjido from 10 to 30 rDNA copies per cm<sup>3</sup> of wet sediment.

Since 1995, *C. polykirkoides* blooms occurred almost every year (except in 2006, and 2008~2010) mostly in the coast of Korea. The results of real-time PCR showed that *C. polykirkoides* is prevalent in sediments of Southern sea. The results enhanced our understanding of the geographic distribution of *C. polykirkoides* in sediments, and also suggest the need to include sediment samples for monitoring of *C. polykirkoides* blooms and its cysts in sediment.

# 1. 서론

HABs (Harmful Algal Blooms, 유해성 조류 발생)는 수중에 사는 미세조류들이 일시적으로 대량 번식하여 해양환경 뿐만 아니라 인간사회에 유해한 영향을 끼쳐 경제적·사회적으로 문제를 야기하는 현상이다. 적조 (red tide)현상에서 유해성을 강조한 용어으로써 최근에 많이 쓰이고 있으며, HABs을 유발하는 미세조류에 관한 연구 또한 활발히 진행되고 있다.

유해성 와편모조류 중 *Cochlodinium polykrikoides*는 1982년 최초로 발견된 이래 1983, 1986, 1987, 2006, 2008~2010년 현재를 제외하고 매년 발생하고 있다. 특히 1995년도에 대규모로 발생하여 막대한 수산 피해를 일으킨 바 있으며, 2007년도에 남해연안에 *C. polykrikoides*의 적조가 발생하여 대략 100억원 상당의 피해금액을 기록하였다 (NFRDI, 2008). 와편모조류 중 일부는 부적합한 환경조건에서 유성생식 과정을 통해 내구성 있는 휴면포자를 형성하고, 다시 환경이 좋아지면 발아하는 생활사를 가지는데, 현재까지 전체의 약 5%인 100여종에서 이러한 휴면포자의 존재가 확인되었다 (Matsuoka and Fukuyo, 2000; Anderson et al., 2003). 이들은 적조발생 초기에 “씨앗개체군 (Seed population)” 역할을 수행하는 것으로 알려져 있어 (Anderson, 1980), 이들의 생물지리적 분포는 적조발생 장소와 시기를 예측할 수 있는 중요한 단서로 이용할 수 있다 (Anderson and Wall, 1978; Nehring, 1997; Anderson et al., 2003).

우리나라에서 휴면포자 분포 조사는 적조가 많이 발생하는 남해 연안을 중심으로 이루어져 왔으나, 최근 황해 연안에서도 적조가 발생하여 그 조사범위가 더욱 확대되고 있는 실정이다 (Kim et al., 2001). 하지만 일정한 시기에 국한된 조사와 연구에 그치고 있어, 해양환경 변화에 따른 지

속적인 휴면포자 분포 조사를 통해 적조발생을 모니터링 할 필요가 있다. 다양한 방법으로 휴면포자 분포 조사를 해왔으나, *C. polykrikoides*의 휴면포자 실체가 완전히 밝혀지지 않아 생활사의 규명과 휴면포자의 형태와 분포 등에 대한 결과의 부족으로 적조 발생을 뒷받침할 수 있는 충분한 해명이 되지 않고 있다. 이런 문제를 극복하기 위해 본 연구에서는 real-time PCR 기법을 이용하였다.

Real-time PCR법은 PCR 증폭산물의 형광감도 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이다. 단계적으로 희석한 표준시료를 사용하여 real-time PCR 반응을 하면 초기 DNA량이 많은 순서로 같은 간격으로 늘어선 증폭곡선이 얻어진다. 여기서 적당한 지점에 threshold를 설정하면 threshold와 증폭곡선이 교차하는 지점 (Ct값, Threshold cycle)이 산출된다. Ct값과 초기 주형량 간에는 직선적인 관계가 있어 검량선을 만들 수 있다. 표준시료로 만들어진 검량선을 통해 미지시료 DNA량을 정량할 수 있다 (KamiKawa et al., 2007).

본 연구에서는 형광표식 probe중에서 TaqMan probe를 이용하였다. 이는 5'말단에는 형광물질 (FAM), 3'말단에는 quencher물질 (TAMRA)로 수식한 oligonucleotide이며, probe가 quencher에 의해 형광 발색이 억제되지만, extension 반응시에 Taq DNA polymerase가 갖는 5' → 3' exonuclease 활성으로 형광색소가 probe에서 유리되면서 quencher에 의한 억제가 해제되어 형광을 나타내는 원리이다 (Holland et al., 1991; Livak et al., 1995). 이 형광색소를 기계가 인식하여 수식으로 전환, 데이터 값을 해석할 수 있다. 종 특이적인 primer와 probe를 이용하여 좀 더 정확한 동정과 검출, 정량이 이루어지게 된다.

그리하여 *C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지인 자란만을 중심으로 사랑도, 미조, 여수 및 통영 인근 해역과 기타로 완도지역을 대상으로 *C.*

*polykrikoides*의 ITS rDNA영역을 통해 만들어진 primer와 probe를 이용하여 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 조사, 검출을 하여 적조발생 잠재력을 파악하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 2.1 배양

국립수산과학원 (NFRDI, 2009)에서 분양받은 *Cochlodinium polykrikoides*의 영양세포를 f/2 배지에 계대배양 (20℃, ca. 90  $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$  and 12L:12D)하였다. DNA 염기서열 분석을 통한 유전자 동정으로 종 확인하였다.

### 2.2 시료 채집

남해안에서 *C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지인 자란만, 사량도, 미조, 여수 및 통영 인근 해역과 기타로 완도지역을 대상으로 조사하였다. 정점 48곳 (Fig. 1, Table 1)에서 Box-corer 또는 Wildcocothers를 이용해 저질 시료를 채집하였다. 특히 자란만 일대를 중점지역으로 지정하여 저질시료와 더불어 표층해수시료도 채수하였다. 저질시료는 500 ml 통에 담아 4℃, 암소에 다음 분석까지 보관하였으며, 표층해수 20 L 현장 농축한 시료를 GF/C (47mm Ø, Whatman International Ltd.)로 여과하여 -80℃에 다음 분석까지 보관하였다.

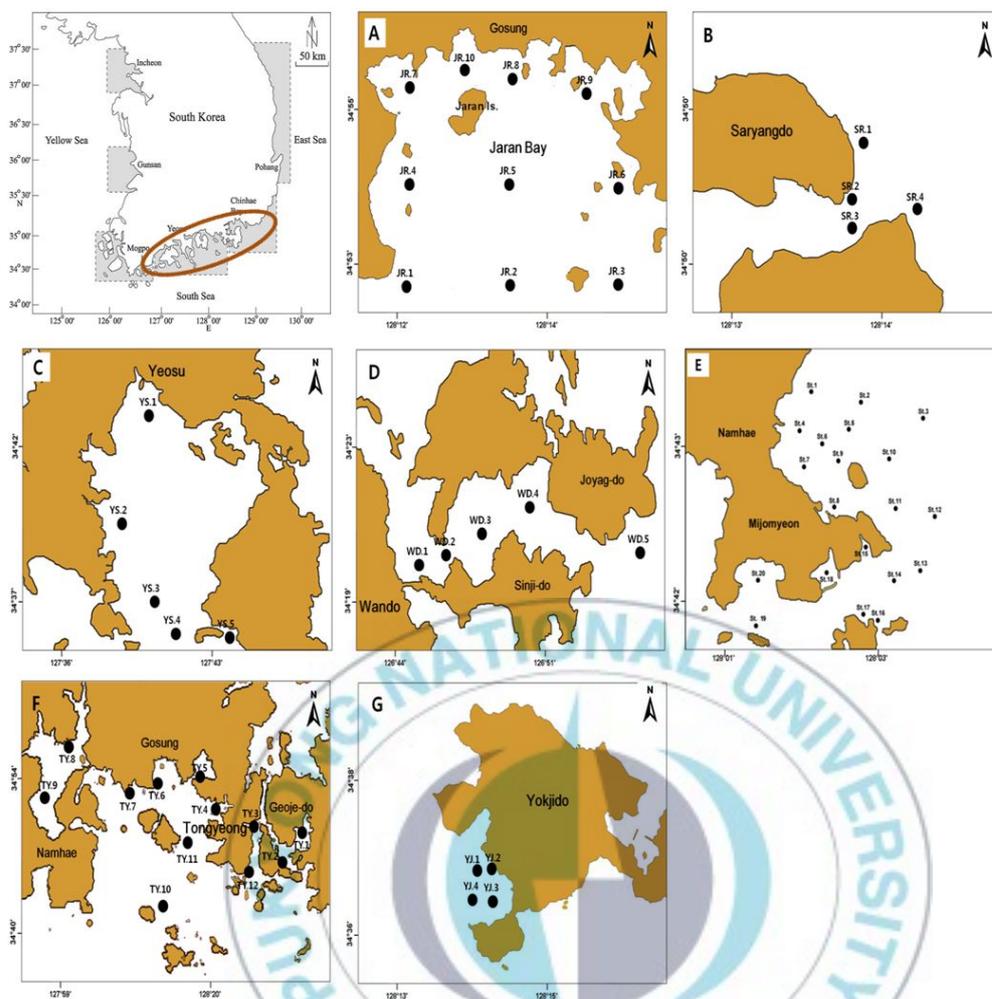


Fig. 1. Sampling stations of sediment and seawater samples investigated in this study.  
 (A, Jaran Bay; B, Saryangdo; C, Yeosu; D, Wando; E, Mijomyeon; F, Tongyeong; G, Yokjido).

**Table 1. Collection site data for surface sediment samples investigated in this study**

Sampling station	Geographic location	Sampling date
A. The coast of Jaran Bay		
1	34°53' 08" N, 128°12' 30" E	May 2009 ~ April 2010
2	34°53' 09" N, 128°14' 09" E	May 2009 ~ April 2010
3	34°53' 11" N, 128°15' 52" E	May 2009 ~ April 2010
4	34°54' 26" N, 128°12' 34" E	May 2009 ~ October 2010
5	34°54' 25" N, 128°14' 08" E	May 2009 ~ April 2010
6	34°54' 42" N, 128°15' 07" E	May 2009 ~ April 2010
7	34°55' 37" N, 128°12' 33" E	May 2009 ~ October 2010
8	34°55' 42" N, 128°14' 11" E	May 2009 ~ October 2010
9	34°55' 37" N, 128°12' 33" E	May 2009 ~ April 2010
10	34°56' 15" N, 128°13' 19" E	May 2009 ~ October 2010
B. The coast of Saryangdo		
1	34°50' 46" N, 128°13' 58" E	May 2009 ~ July 2010
2	34°50' 32" N, 128°13' 51" E	May 2009 ~ July 2010
3	34°50' 23" N, 128°13' 48" E	May 2009 ~ July 2010
4	34°50' 23" N, 128°14' 19" E	May 2009 ~ July 2010
C. The coast of Yeosu		
1	34°43' 38" N, 127°40' 04" E	April, June 2010
2	34°39' 41" N, 127°39' 09" E	April, June 2010
3	34°37' 32" N, 127°40' 52" E	April, June 2010
4	34°36' 23" N, 127°40' 58" E	April, June 2010
5	34°36' 06" N, 127°44' 09" E	April, June 2010
D. The coast of Wando		
1	34°20' 28" N, 126°45' 33" E	April 2010
2	34°20' 44" N, 126°46' 53" E	April 2010
3	34°21' 28" N, 126°48' 40" E	April 2010
4	34°22' 11" N, 126°50' 46" E	April 2010
5	34°20' 55" N, 126°56' 19" E	April 2010
E. The coast of Mijomyeon		
1	34°43' 58" N, 128°02' 36" E	May, August 2009
2	34°43' 54" N, 128°03' 04" E	May, August 2009
3	34°43' 41" N, 128°03' 45" E	May, August 2009
4	34°43' 37" N, 128°02' 24" E	May, August 2009
5	34°43' 35" N, 128°03' 02" E	May, August 2009
6	34°43' 27" N, 128°02' 38" E	May, August 2009
7	34°43' 17" N, 128°02' 31" E	May, August 2009
8	34°42' 56" N, 128°02' 92" E	May, August 2009

Table 1. (Continued)

Sampling station	Geographic location	Sampling date
9	34°43 ' 20 " N, 128°02 ' 58 " E	May, August 2009
10	34°43 ' 20 " N, 128°03 ' 29 " E	May, August 2009
11	34°42 ' 54 " N, 128°03 ' 40 " E	May, August 2009
12	34°42 ' 35 " N, 128°04 ' 05 " E	May, August 2009
13	34°42 ' 29 " N, 128°03 ' 57 " E	May, August 2009
14	34°42 ' 22 " N, 128°03 ' 39 " E	May, August 2009
15	34°42 ' 36 " N, 128°03 ' 16 " E	May, August 2009
16	34°41 ' 59 " N, 128°03 ' 24 " E	May, August 2009
F. The coast of Tongyeong		
1	34°48 ' 48 " N, 128°33 ' 29 " E	April, July 2010
2	34°46 ' 51 " N, 128°31 ' 12 " E	April, July 2010
3	34°49 ' 59 " N, 128°26 ' 47 " E	April, July 2010
4	34°51 ' 28 " N, 128°21 ' 13 " E	April, July 2010
5	34°55 ' 39 " N, 128°18 ' 53 " E	April, July 2010
6	34°54 ' 34 " N, 128°13 ' 24 " E	April, July 2010
7	34°52 ' 28 " N, 128°07 ' 30 " E	April, July 2010
8	34°57 ' 14 " N, 128°00 ' 00 " E	April, July 2010
9	34°52 ' 39 " N, 127°56 ' 12 " E	April, July 2010
10	34°43 ' 03 " N, 128°15 ' 00 " E	April, July 2010
11	34°48 ' 35 " N, 128°17 ' 41 " E	April, July 2010
12	34°45 ' 59 " N, 128°26 ' 35 " E	April, July 2010
G. The coast of Yokjido		
1	34°37 ' 22 " N, 128°14 ' 06 " E	August 2010
2	34°37 ' 24 " N, 128°14 ' 22 " E	August 2010
3	34°37 ' 14 " N, 128°14 ' 23 " E	August 2010
4	34°37 ' 12 " N, 128°13 ' 53 " E	August 2010

## 2.3 DNA 추출

### 2.3.1 배양주 DNA 추출

배양된 영양세포 50 ml를 tube에 담아 원심분리 (2000 rpm, 20분)하여 배지를 제거 후 PCI (Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol, 25:24:1)법을 이용하여 DNA를 추출하여, 저질시료 검량선 작성할 때 사용될 plasmid insert DNA와 real-time PCR에서 positive control로 사용하였다.

### 2.3.2 저질 시료 DNA 추출

채집한 저질 30 g를 tube에 담은 후 원심분리 (2000 rpm, 5분)하여 해수를 제거하였다. 그 후 0.3 M NaCl 5 ml넣고 원심분리 (2000 rpm, 20분)하여 상등액을 제거 후 저질 상층 1 g을 lysis buffer와 beads가 포함된 tube에 넣었으며, DNA 추출은 UltraClean Soil DNA Kit (MoBio Laboratories Inc.)을 이용하였다.

### 2.3.3 해수 시료 DNA 추출

표층 해수 20 L 현장 농축한 시료를 GF/C로 여과한 filter를 배양주 DNA추출과 동일하게 PCI 법으로 DNA를 추출하여 -70°C에 보관하였다.

## 2.4 Standard PCR

Real-time PCR 진행 전 저질 속에 *C. polykrikoides*가 존재여부를 PCR로 확인하였으며, 정점 48곳 중 지역별 정점을 무작위로 선별하여 PCR을 진행하였다. PCR 반응액 조성은 2  $\mu$ l template DNA, primer는 각각 1  $\mu$ l, AccuPower PCR Premix (Bioneer)와 PCR grade water로 총 volume 20  $\mu$ l로 조절하였다. PCR에 사용한 primer는 Table 3에 정리하였으며, 반응은 초기 94°C 5분간 반응시켰고, 30회 반복반응 (94°C 30초, 55°C 1분, 72°C 1분)후, 최종 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 TAE buffer를 용매로 한 1% Agarose gel에 전기영동하고 EtBr로 염색한 뒤 자외선을 조사하여 확인하였다.

Standard curve 작성을 위해 제작된 plasmid DNA도 standard PCR을 통해 real-time PCR primer와 반응특이성을 갖는지도 확인하였으며, 사용된 primer는 Table 2에 정리하였다. PCR 반응액 조성과 반응조건은 위와 동일하다.

## 2.5 Real-time PCR

저질시료와 해수시료에서 추출한 DNA을 이용하여 real-time PCR을 진행하였다. PCR 반응액 조성은 0.5  $\mu$ l template DNA, primers와 probe (0.3과 0.15  $\mu$ M), 5  $\mu$ l Premix Ex Taq (TAKARA Bio Inc.) 그리고 PCR grade water로 총 volume 10  $\mu$ l로 조절하였다. Real-time PCR에 사용한 primer와 probe는 Table 2에 정리하였으며, real-time PCR 조건은 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 2분, 그리고 45회 반복반응 (95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 45초)하였다. 분석은 Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Research, Sydney, Australia)를 이용하여 3반복 실험하였다.



## 2.6 Standard curve 작성

### 2.6.1 휴면포자 정량을 위한 standard curve

*C. polykrikoides*의 휴면포자는 아직 생활사가 완벽하게 밝혀지지 않았기 때문에 실험실 내부에서 휴면포자를 만들 수 없고, 현장 시료에서도 대량으로 확보하기가 어렵다. 그렇기 때문에 영양세포 DNA를 통해 plasmid DNA를 제작하여 standard curve를 작성해야한다. *C. polykrikoides* 영양세포 DNA에서 real-time PCR에 사용되는 primer와 probe를 포함하는 종 특이적 ITS 영역을 증폭하였다 (Table 3). Standard PCR 반응은 초기 94°C 5분간 반응시켰고, 30회 반복반응 (94°C 30초, 55°C 1분, 72°C 1분)후, 최종 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물은 TAE buffer를 용매로 한 1% Agarose gel에 전기영동하고 EtBr로 염색한 뒤 자외선을 조사하여 확인하였다. 확인된 산물은 gel extraction kit를 이용하여 정제한 후 pGEM-T Easy Vector System 1 (Promega)을 이용하여 plasmid DNA를 만든 후 competent cell에 삽입하여 LB배지에 배양하였다. 배양된 cell을 Plasmid Purification Mini Kit (Promega)를 이용하여 plasmid DNA를 확보하여 standard curve를 제작하였다. Plasmid DNA template를 이용하여 standard curve를 만들기 전 plasmid DNA의 길이를 이용하여 무게를 정량화 하였으며, 이를 copy수에 맞는 농도로 계산하여 plasmid DNA를 10배수로 희석하였다. 희석된 plasmid DNA를 이용하여 real-time PCR을 진행하였으며, 반응조건은 2.4 와 동일하다.

## 2.6.2 영양세포 정량을 위한 standard curve

휴면포자 정량과는 다르게 *C. polykrikoides*의 영양세포는 대량배양이 가능하므로, 배양된 세포를 Sedgwick-rafter Chamber를 이용하여 계수하였다. 계수된 세포 2 ml (4,900 cells/ml)을 tube에 담아 원심분리 (14,000 rpm, 10분)후 배지를 제거하고 2.3.1. 과 동일한 방법인 PCI법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 이용하여 단계별로 희석한 후 휴면포자 standard curve 작성과 동일한 방법과 반응조건으로 real-time PCR을 진행하였다.



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

Primer	Sequence(5'→3')	Reference
CPITSF	CGGCAACCTTTGTCAAACA	
CPITSR2	GGTTTGCTGATCTAACTTCATGTCT	Park et al. (2009)
CPITSP	FAM-CAACCGTGATACCCGCTAGCTTTGC-TA MRA	

**Table 3. Primers used to amplify ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides* for plasmid DNA standard curve**

Primer	Sequence(5'→3')	Reference
ITSF	GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	Park et al. (2009)
ITSR	CCCTGTTTCATTCGCCATTAC	

## 3. 결과

### 3.1 Standard PCR

총 115개 저질시료 중 18개의 지역별 시료에서 약 500bp 크기의 band가 확인되었으며 (Fig. 2), positive control로 사용한 *C. polykrikoides* gDNA에서도 같은 위치에 band가 확인되어 남해안 저질 속에 *C. polykrikoides*가 존재하고 있음을 확인하였다. 같은 외편모조류의 일종인 *Alexandrium catenella* gDNA와 target DNA를 넣지 않은 상태에서 PCR을 진행한 산물에서는 PCR band가 확인되지 않았으며, 이는 PCR에 사용된 primer가 종 특이적 반응을 하였고, 오염되지 않은 상태에서 실험이 진행되었음을 알 수 있다.

Standard curve 작성을 위해 제작된 plasmid DNA를 10배수로 단계별로 희석하여 시료를 만들었고, 만들어진 시료를 CPITSF, CPITSR2 primer 쌍을 이용하여 PCR한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. PCR 산물 위치가 약 200bp에서 확인되었으며, positive control로 사용한 *C. polykrikoides* gDNA 역시 같은 위치에서 PCR band가 확인되었으며, negative control로 사용한 *Alexandrium catenella* gDNA에서는 band가 나오지 않아 real-time PCR에 사용될 primer의 종 특이성을 확인하였다.

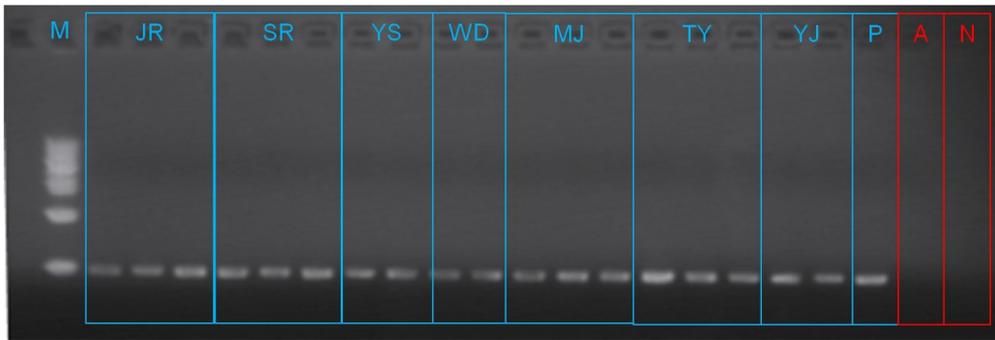
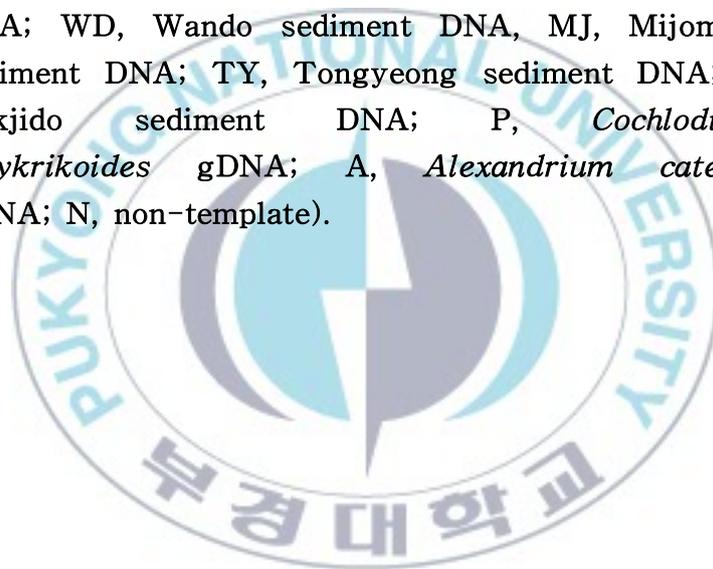


Fig. 2. Agarose gel image show the results of PCR amplified by the *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, ITSF and ITSr in sediment (M, size marker; JR, Jaran Bay sediment DNA; SR, Saryangdo sediment DNA; YS, Yeosu sediment DNA; WD, Wando sediment DNA, MJ, Mijomyeon sediment DNA; TY, Tongyeong sediment DNA; YJ, Yokjido sediment DNA; P, *Cochlodinium polykrikoides* gDNA; A, *Alexandrium catenella* gDNA; N, non-template).



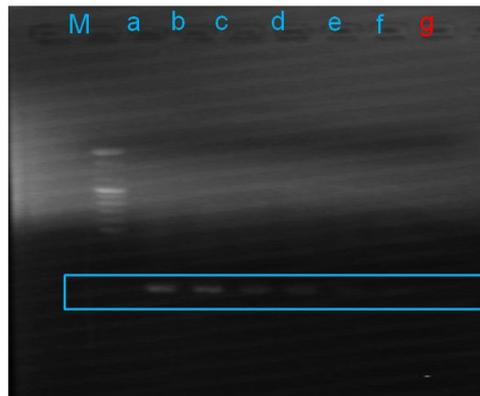


Fig. 3. The detection of plasmid DNA containing the ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides*-specific primer set, CPITSF and CPITSR2 (M, size marker; a, *C. polykrikoides* gDNA; b, plasmid DNA  $10^5$ ; c, plasmid DNA  $10^4$ ; d, plasmid DNA  $10^3$ ; e, plasmid DNA  $10^2$ ; f, plasmid DNA 10; g, *Alexandrium catenella* gDNA).

## 3.2 휴면포자 정량을 위한 standard curve

*C. polykrikoides* 영양세포의 ITS 영역을 standard PCR로 제작된 plasmid DNA를 단계별로 희석 (10, 100, 1,000, 10,000, 100,000 plasmid DNA copies/g)하여 real-time PCR을 진행하였다. 이때 Ct값이 약 20, 23, 25, 27, 29로 나왔으며 이 값을 토대로 standard curve를 작성하였다.

Plasmid DNA copy 수와 Ct 값은 Fig. 4와 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* 영양세포에서 실시간 반응을 확인할 수 있었고 negative control로 멸균한 초순수를 사용하였을 때 반응이 나오지 않아, 본 실험에 다른 영향이 없었음을 알 수 있었다.

## 3.3 영양세포 정량을 위한 standard curve

*C. polykrikoides* 영양세포에서 추출한 DNA를 단계별로 희석 (9.8, 98, 980, 9,800 cells/ml)하여 real-time PCR을 진행하였을 때 Ct값이 약 23, 27, 30, 33이 나왔으며 이 값을 토대로 standard curve를 작성하였다.

*C. polykrikoides* 영양세포 DNA양과 Ct 값은 Fig. 5와 같이 높은 선형 상관관계 ( $R^2 > 0.99$ )를 나타내어 standard curve로 사용할 수 있었다.

Real-time PCR을 진행할 때 positive control로 사용한 *C. polykrikoides* 영양세포에서 실시간 반응을 확인할 수 있었고 negative control로 멸균한 초순수를 사용하였을 때 반응이 나오지 않아, 본 실험에 다른 영향이 없었음을 알 수 있었다.

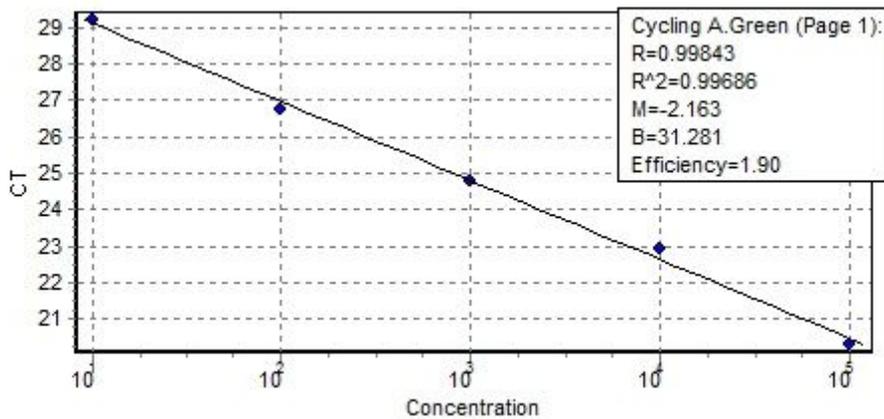
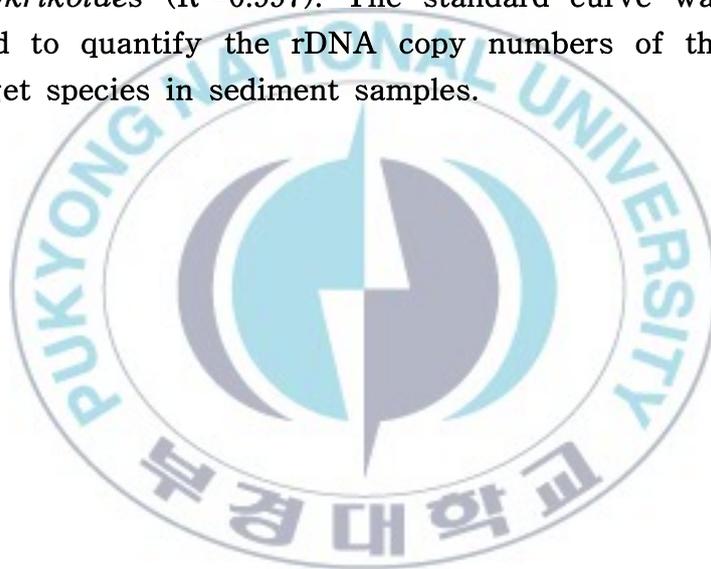


Fig. 4. Linear relationship between the Ct values and plasmid containing the ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides* ( $R^2=0.997$ ). The standard curve was used to quantify the rDNA copy numbers of the target species in sediment samples.



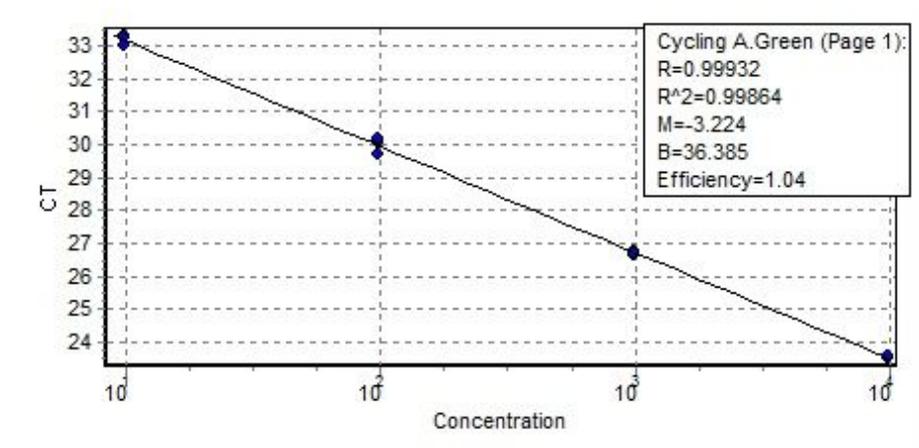


Fig. 5. Linear relationship between the Ct values and ITS rDNA of *Cochlodinium polykrikoides* ( $R^2=0.999$ ). The standard curve was used to quantify the target species in seawater samples.



## 3.4 Real-time PCR

### A. 자란만 인근 해역

2009년 자란만 인근 해역을 조사하였을 때, 정점 4, 7, 8, 10을 제외한 나머지 정점 6개 정점에서는 휴면포자가 검출되지 않았다 (Fig. 6). 정점 4의 검출량을 살펴보면, 6월에는 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되었는데 7월, 8월, 9월에는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 10월에는 다시 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 검출되었다. 정점 7에서는 정점 4와 유사하게 7월에는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 8월에는 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 증가추세를 보였으나, 9월과 10월에는 검출되지 않았다. 정점 8에서 6월에는 17 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 7월에는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 정점 7과는 반대 양상을 보였으나, 8월에는 33 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 10개 정점 중 최고치를 나타내었다. 9월 이후에는 감소하여 10월에는 검출되지 않았다.

2010년 자란만 인근 해역을 조사하였을 때, 3월 정점 4, 7에서 각각 10, 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되었고 4월에서는 정점 7과 10에서 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 검출되어 2009년에 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출된 정점 8을 제외하고 나머지 정점 6곳에는 여전히 검출되지 않았다 (Fig. 7). 따라서 2010년 5월~8월 정점 4, 7, 8, 10 해역만 집중적으로 조사하였다. 분석결과, 2009년과 전혀 다른 양상으로 검출되었는데, 5월에는 4개의 정점 모두 최대치를 보였다. 정점 4에서는 30 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 정점 7에서는 50 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 정점 8에서는 100 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment를 보였으며 정점 10에서는 80 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment의 검출량을 보였다. 그 후 모든 정점에서 검출

량이 감소하였는데 정점 7에서는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 정점 8에서는 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 정점 10에서는 50 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되었으며, 정점 4에서는 검출되지 않았다. 7월과 8월에는 정점 4곳 모두 검출되지 않았다.



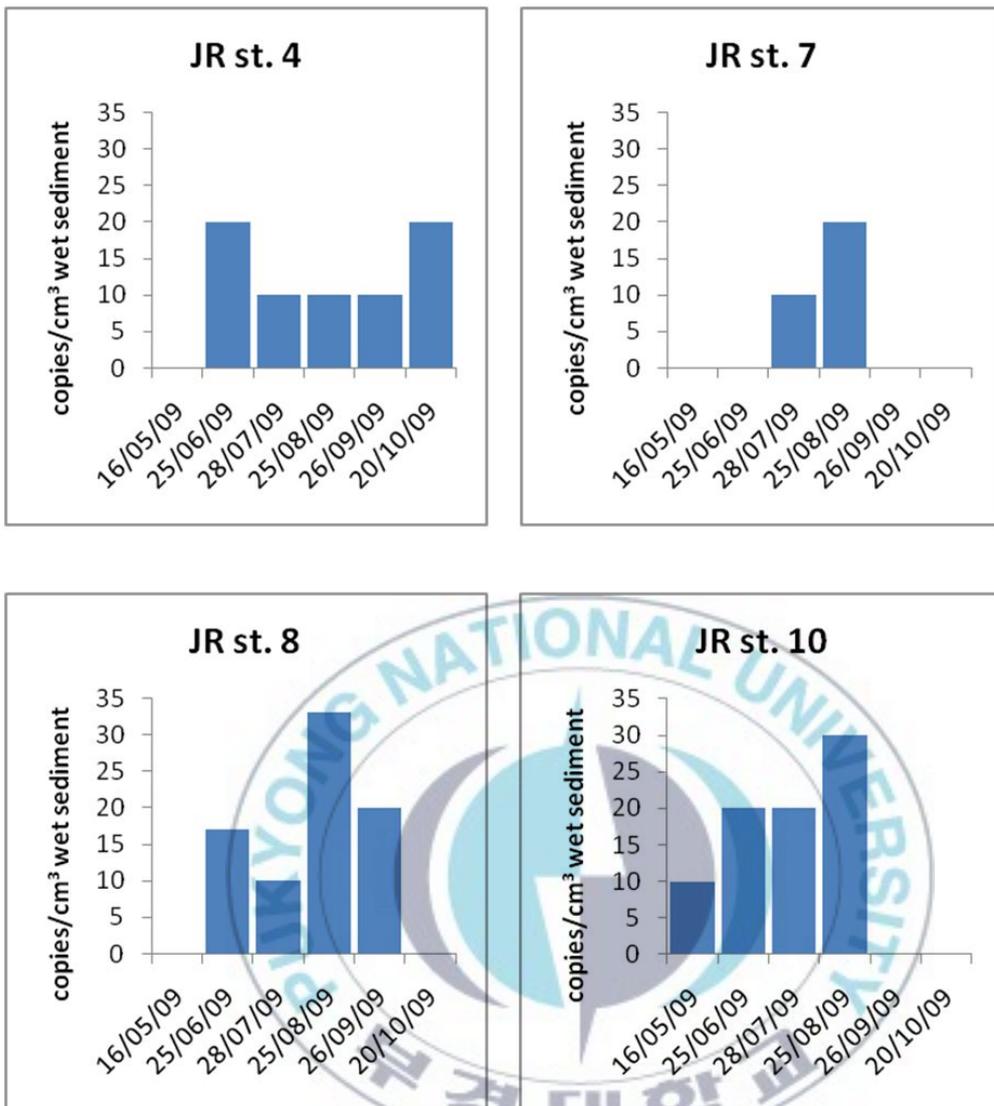


Fig. 6. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* from sediment in the coast of Jaran Bay in 2009.

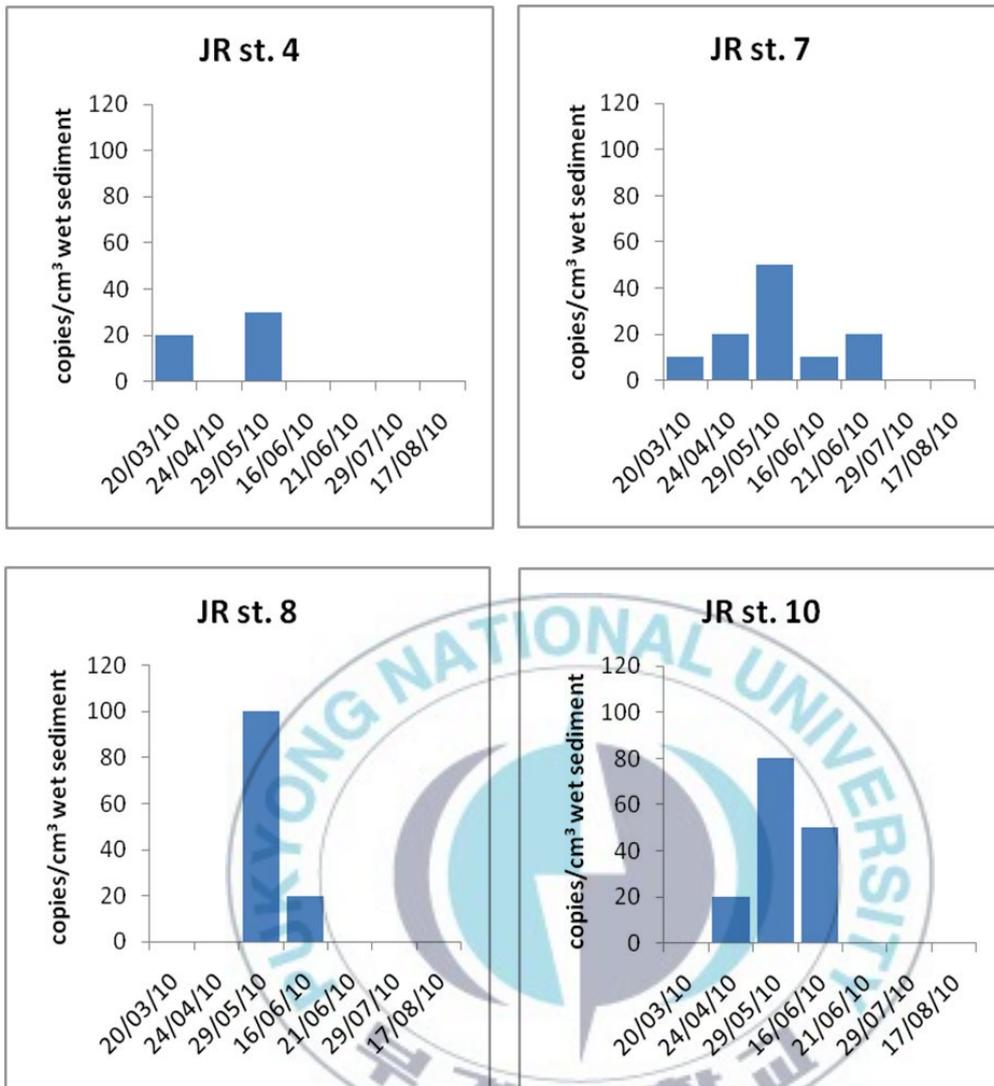


Fig. 7. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* from sediment in the coast of Jaran Bay in 2010.

2009년~2010년 자란만 정점 4, 7, 8, 10의 저질시료에서 *C. polykrikoides* rDNA copy수 변동량을 살펴보면 2009년에는 변동폭이 작았으나( $10\sim 20$  copies/cm<sup>3</sup> wet sediment), 2010년에는 눈에 띄게 크게 나타났으며, 2009년에는 8월에 검출량이 제일 높았으나, 2010년에는 5월에 가장 높게 나타났다 (Fig. 8).

이와 비교하기 위해 표층 해수 20 L 현장 농축한 시료를 GF/C로 여과한 filter를 DNA추출하여 real-time PCR로 검출한 결과를 살펴보면, 정점 10을 제외한 나머지 정점 3곳 저질 시료의 rDNA copy수가 감소하면 해수 시료의 rDNA copy수가 증가하였다 (Fig. 9).



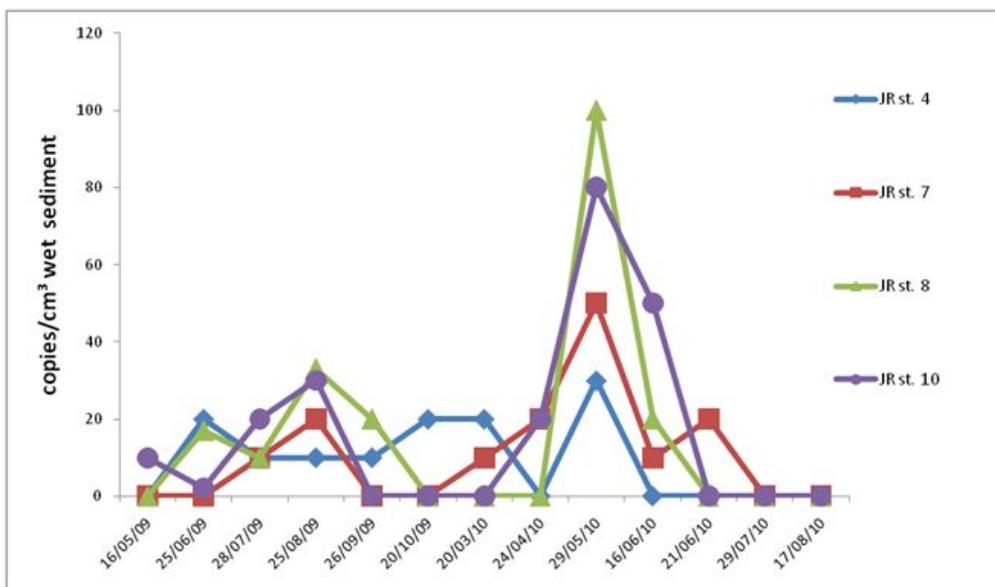
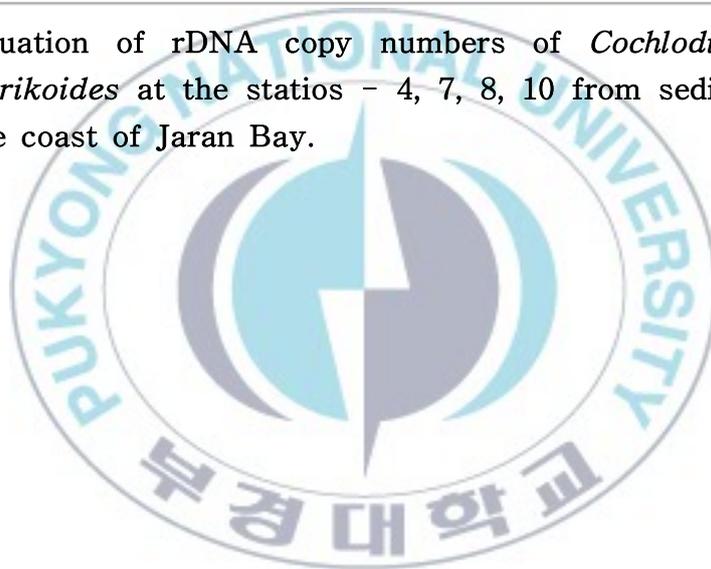


Fig. 8. Fluctuation of rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* at the stations - 4, 7, 8, 10 from sediment in the coast of Jaran Bay.



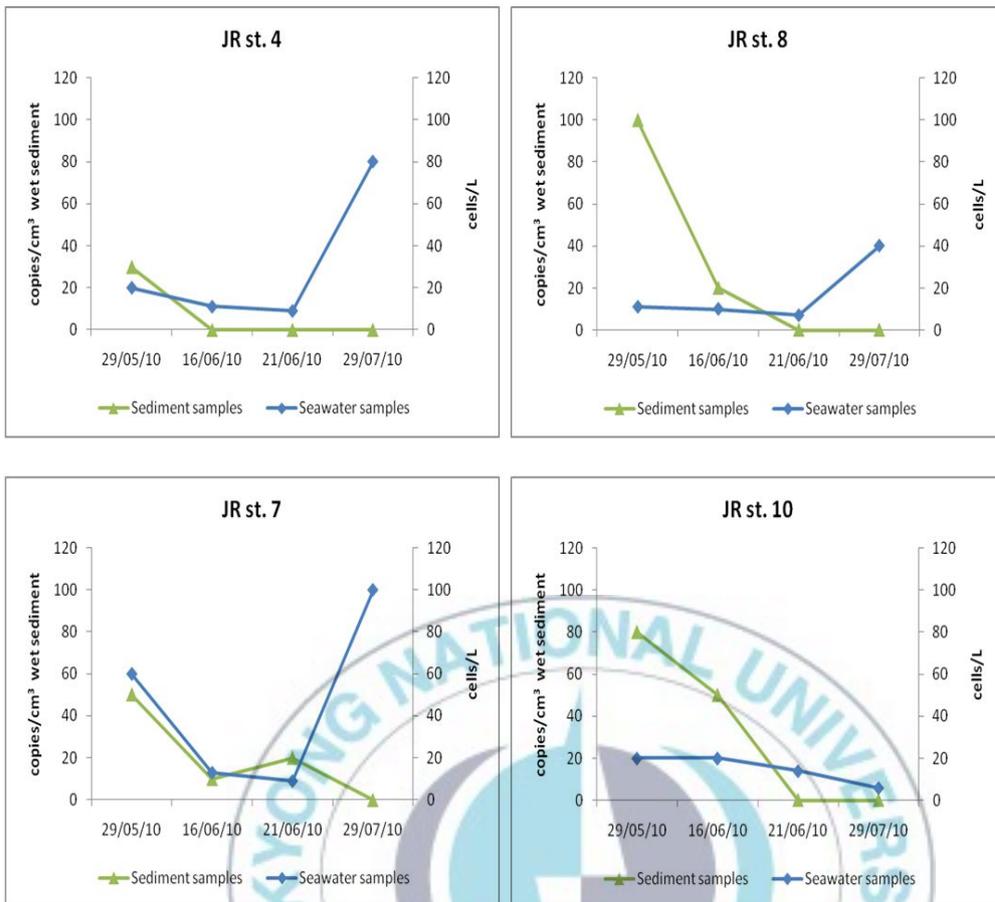


Fig. 9. Comparison of rDNA copy numbers of *Cochlostinium polykrikoides* in sediment with vegetative cell numbers in filter seawater.

## B. 사랑도 인근 해역

2009년 5월부터 2010년 7월까지 채집한 시료를 real-time PCR 분석 결과, 2009년 5월~2010년 3월에는 검출되지 않았다. 하지만 2010년 4월 사랑도 인근 해역 정점 4곳 모두에서만 검출되었으며, 정점 2에서 30 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 최대값이 나왔다 (Fig. 10). 나머지 3 정점에서는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 동일한 값이 확인되었다. 그러나 그 후 5, 6, 7월 조사에서는 모든 정점에서 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되지 않았다.

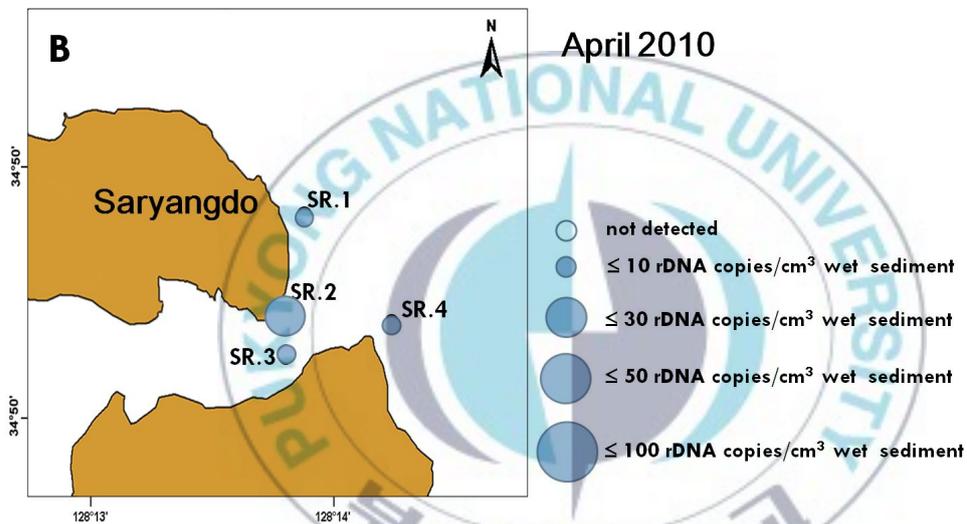


Fig. 10. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Saryangdo.

### C. 여수 인근 해역

여수 인근 해역은 2010년 4월과 6월 두 차례 조사하였다. 2010년 4월 여수 인근 해역에서 채집한 저질 DNA를 이용하여 real-time PCR 분석 결과, 정점 3에서는 검출되지 않았으며, 정점 1에서는 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 나머지 정점 2, 4, 5에서는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 검출되었다 (Fig. 11).

그러나 6월 조사에서는 5개 정점에서 *C. polykrikoides* rDNA copy가 확인되지 않았다.

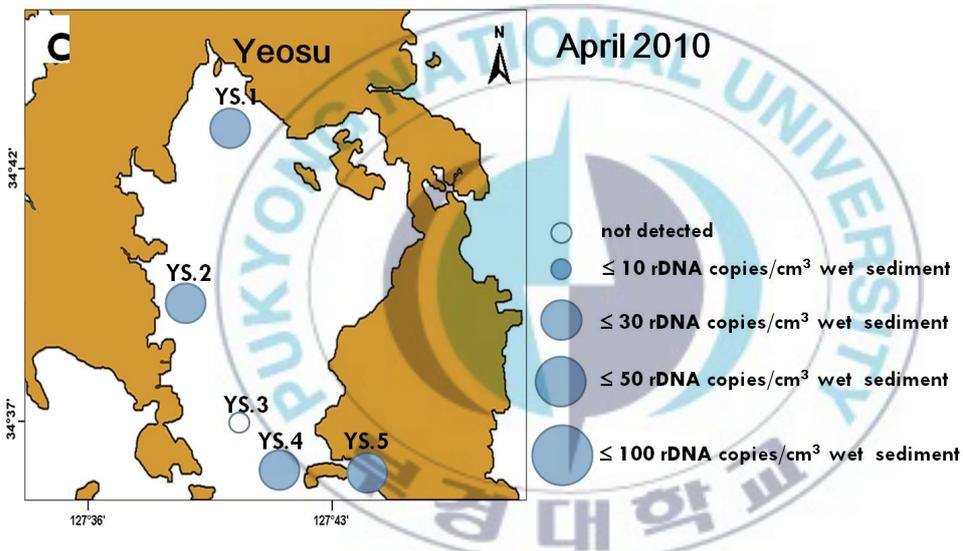


Fig. 11. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Yeosu.

#### D. 완도 인근 해역

2010년 4월 완도 인근 해역에서 채집한 저질을 이용하여 real-time PCR 분석 결과를 Fig. 12에 나타내었다. 정점 5에서만 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 검출되었으며, 나머지 정점에서는 검출되지 않았다.

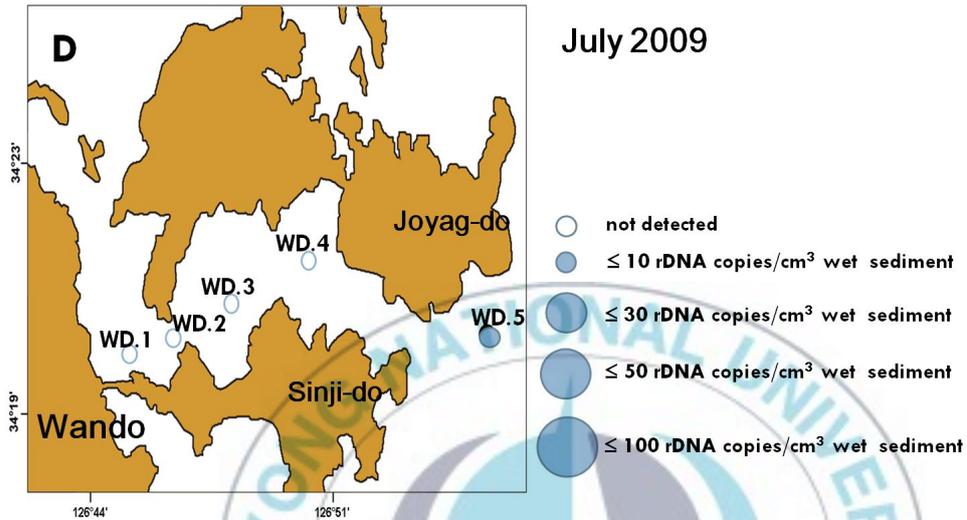


Fig. 12. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Wando.

## E. 미조면 인근 해역

미조 인근 해역에서는 2009년 5월 조사 때 정점 1, 2, 6, 10, 13, 15에서 검출되었으며, 정점 1, 2, 6, 10, 15에서 20 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 정점 13에서 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment 확인되었다. 2009년 8월 조사에서는 정점 1에서는 30 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 2에서는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되었으며 (Fig. 13), 나머지 정점에서는 확인되지 않았다.



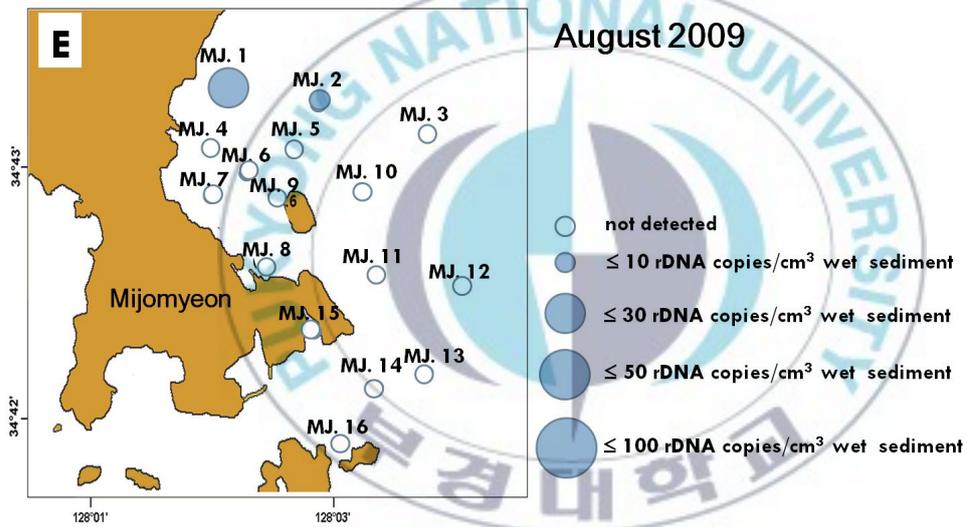
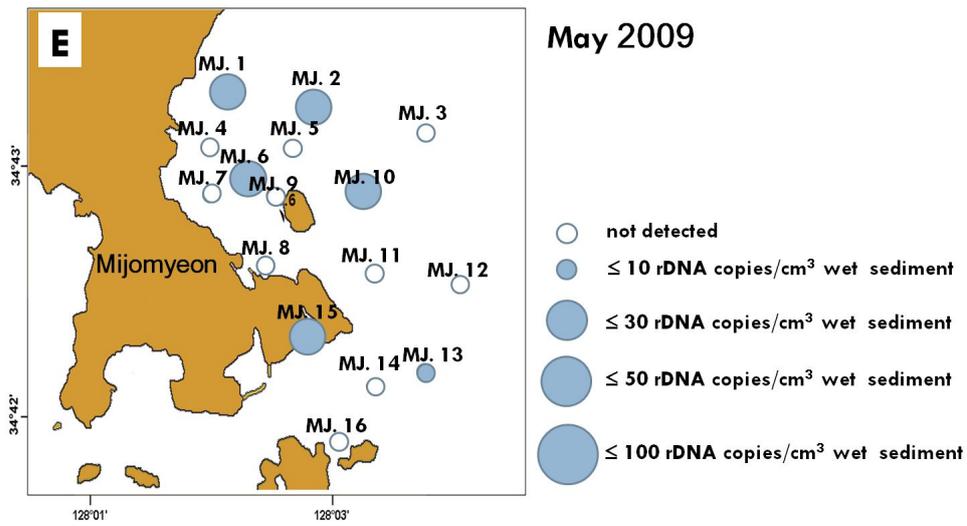


Fig. 13. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Mijomyeon.

## F. 통영 인근 해역

2010년 4월 통영 인근 해역 정점 모두에서는 검출되지 않았다. 그러나 7월 조사 때에는 정점 1에서 30 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 정점 9에서 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되었으며, 나머지 정점에서는 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되지 않았다 (Fig. 14).

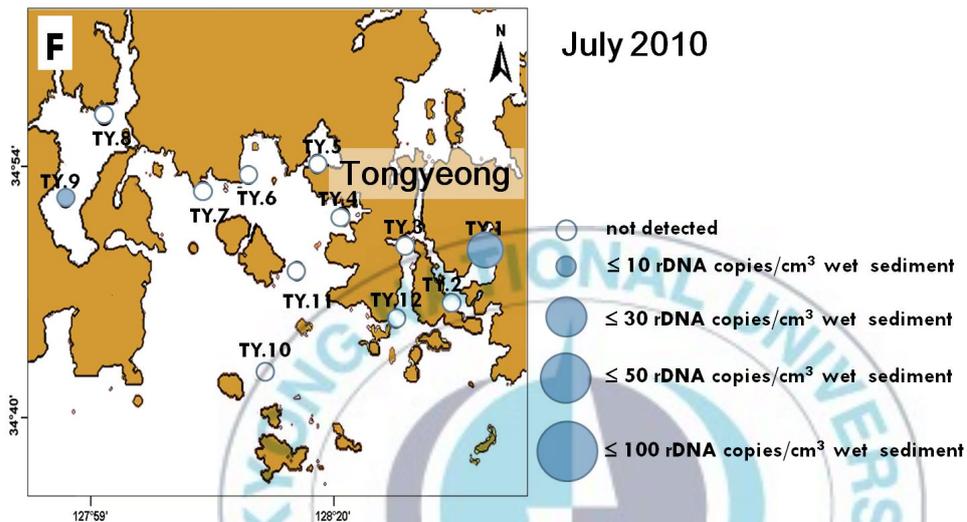


Fig 14. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Tongyeong.

## G. 옥지도 인근 해역

2010년 8월 조사한 옥지도 인근 해역 중 정점 2에서 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 검출되었으며, 나머지 정점에서는 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되지 않았다 (Fig. 15).

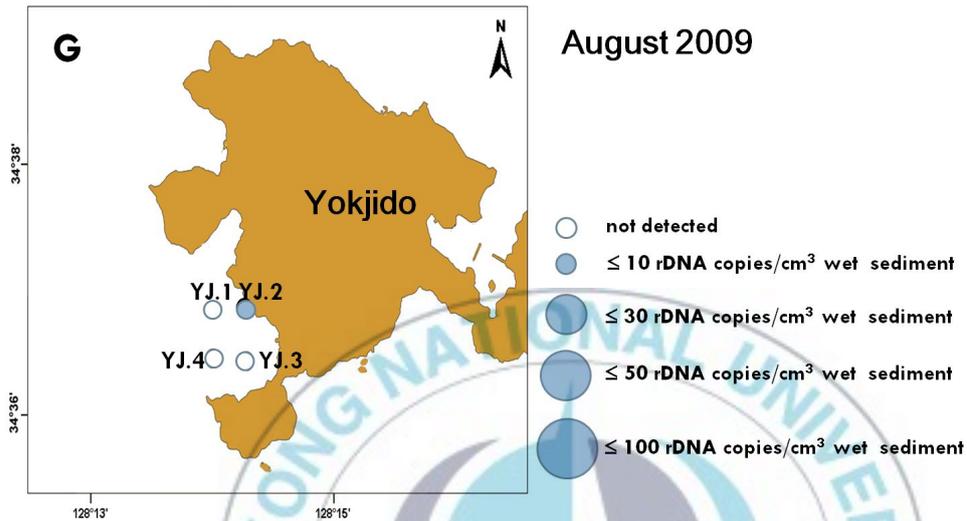


Fig. 15. rDNA copy numbers of *Cochlodinium polykrikoides* in the coast of Yokjido.

## 4. 고찰

본 연구에서는 real-time PCR를 통해 현장 시료에서 유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides* 검출 및 정량화를 시도하였다. Park et al. (2009)에 의해 보고된 *C. polykrikoides* 종 특이적인 primer와 probe를 이용하여 우리나라 적조 상습 발생 지역인 남해안 일대 시료를 분석하였다. 현장시료에는 PCR을 방해하는 유기·무기물질을 포함될 수 있으며, 이것은 target DNA와 함께 추출되어 결과의 오류를 유발한다. 그렇기 때문에 DNA시료를 희석하거나 추가적으로 정제하여 PCR 방해 인자를 제거하여 보다 더 정확한 검출을 할 수 있다 (Lin et al., 2006; Zhang et al., 2005). 본 연구에서는 DNA를 10배수로 희석하여 PCR 방해인자를 제거 후 real-time PCR을 진행하였다.

2009년~2010년 자란만 일대 해역에서 조사결과를 보면, 자란만 내만에서 지속적으로 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되고 있다 (Figs. 6, 7). 이상의 결과와 같이 다른 해역에 비해 자란만 해역에서는 *C. polykrikoides*의 휴면포자 검출량이 높게 나타난 것은 오랫동안 *C. polykrikoides*가 발생과 소멸을 반복하는 적조상습지역임을 제시하였으며, 특히 내만 안쪽에 *C. polykrikoides*의 잠재적 발생 원인인자가 집중적으로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그리고 자란만 정점에서 *C. polykrikoides* 발아체의 출현과 휴면포자 현존량의 변동을 조사한 결과를 비교하여 보면, *C. polykrikoides* rDNA copy가 감소된 뒤 발아체가 증가하는 패턴을 보였다 (Fig. 9). 이는 표층해수의 수온이 춘계에서 하계로 갈수록 상승하여 저질 속 휴면포자가 발아하기 적합한 환경조건이 이루어져 영양세포로 발아하여 휴면포자 개체수는 감소하고 발아체와 영양세포 수가 증가한 것으로 보인다. 그러나 7월에 내린 강우로 인해 수온이 약 5

~6°C까지 낮아졌다. 또한 8월 태풍의 영향으로 두 정점 모두 다소 낮아졌다. 잦은 비와 태풍과 같은 외부영향인자로 인해 예상과 달리 영양세포가 대량 발생하지 못하여 2010년에는 *C. polykrikoides* 적조가 발생하지 않았다.

사랑도, 여수, 완도, 미조면, 통영, 옥지도에서는 자란만 일대 만큼 집중적으로 조사하지는 못하였으나, 2010년 4월 사랑도 인근 해역에서 최대 30 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되었다 (Fig. 10). 완도지역에서는 그동안 *C. polykrikoides*에 의한 적조는 보고되지 않았으나 본 연구결과, 정점 5에서는 10 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment가 확인되어 *C. polykrikoides*의 휴면포자가 일부지역에서 검출됨에 따라 향후 적조발생 잠재력은 있다고 판단된다(Fig. 12). 통영의 결과는 정점 1과 9와 같이 내만인 지역에서 휴면포자가 집적되어 있음을 나타내었고 적조발생 가능성은 높다고 판단된다(Fig. 14).

Park et al.(2010) 결과를 보면 2007년 진해만 저질시료에서는 약 15,000 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment, 여수에서는 약 560,000 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment의 값이 보고되었다. 하지만 본 연구에서 2009년과 2010년에 채집한 시료의 copy수는 현저하게 낮은 결과가 나왔다. 그 원인을 적조발생을 통해서 비교해 보면, 1995년 이후 매년 *C. polykrikoides* 적조가 발생하다가, 2006년과 2008년~2010년 현재까지는 적조발생이 확인되지 않았다. 그러나 Park et al.(2010)의 연구시기인 2007년에는 여수와 목포연안, 진해만 등에서 *C. polykrikoides*의 적조가 발생하였고 발생 직후 시료를 채집하여 조사하였다. 그 결과 *C. polykrikoides* ITS2 rDNA의 copy수가 증가한 것으로 보아 대량 발생 후 증식이 감소하면서 유성생식을 통해 휴면포자를 형성한 것으로 파악된다. 그러나 본 연구 조사시기인 2009~2010년에는 *C. polykrikoides*의 적조가 발생하지 않았으며, 자란만 표층해

수에서 추출한 DNA를 real-time PCR법으로 분석하였을 때 세포수가 리터당 100 cells 정도로 낮은 세포수를 보여 (Fig. 9), 유성생식을 통해 휴면포자를 만들기에는 세포수가 적다고 생각된다. 그리고 2009년과 2010년에는 잦은 비로 인해 일조량이 적어 미세조류가 대량으로 번식하기에 힘든 환경조건이 형성되었으며, 이로 인해 영양세포 출현 수가 적어지게 되므로 휴면포자 개체수도 줄어들게 된 것으로 생각된다. 사랑도, 여수, 완도, 미조, 통영 및 옥지도지역과 자란만 일대를 비교하면 상대적으로 적은 수의 *C. polykrikoides* rDNA copy가 검출되었으나, 자란만 일대 조사와 달리 나머지 지역은 일시적으로 저질시료만 조사하였으며, 표층해수 DNA는 분석하지 않았다. 그리고 이들 정점에서는 *C. polykrikoides*의 적조가 발생하지 않아 조사시기와 정점을 정하기가 어려웠다.

그러나 적은 수이지만 남해안 일대 저질에서 *C. polykrikoides*의 rDNA가 지속적으로 확인되고 있고, 이는 ‘잠재적 씨앗개체군 (seed population)’으로써 앞으로 적조를 일으킬 가능성이 있는 지역을 조사한 결과를 토대로 휴면포자 분포 지도를 제작하여 *C. polykrikoides*의 적조 발생기작을 집중적으로 연구할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있다고 생각된다.

정량분석을 위해서는 *C. polykrikoides*의 휴면포자나 plasmid DNA를 단계별로 희석하여 standard curve를 만들어야 한다. 그러나 아직까지 *C. polykrikoides*의 휴면포자가 완전하게 파악되지 않았고, 생활사가 불분명하여 실험실 내에서 휴면포자를 만들어 낼 수 없다. 그래서 본 연구에서 rDNA copy수 파악이 가능한 plasmid DNA를 이용하여 standard curve를 작성하였다 (Fig. 4). 만약 완전한 생활사가 밝혀져서 실험실 내에서 다량의 휴면포자를 확보 할 수 있다면, 보다 정확한 휴면포자 개체수를 파악하여 적조발생 모니터링을 효과적으로 할 수 있을 거라 생각된다.

*C. polykrikoides*는 무각 외편모조류로써 현장에서 시료를 고정할 경우, 터지거나 형태적인 특성을 알 수 없게 변형되기 때문에 정확한 조사가 불가능하다. 따라서 현장에서 바로 해수시료를 농축·고정 보관하여 종 특이적인 DNA probe를 이용한 real-time PCR을 실시함으로써 정확한 종의 식별과 정량화까지 가능하게 되었고, 보다 빠른 검출을 통해 시간을 절약할 수 있게 된다. 이를 바탕으로 *C. polykrikoides*의 초기 발생과 적조 확산에 걸친 광범위한 연구에 적용함으로써 정확한 적조 발생 예측과 모니터링이 가능할 것으로 기대된다. 또한 저질 중의 휴면포자 개체군의 정확한 동정과 지역적 잠재력을 파악하는 데에도 이용 가능한 수준이어서 생활 사 단계별 형태학적 식별법과 접목하면 좀 더 정확한 적조 발생기작을 파악할 수 있을 것으로 생각된다.



## 요 약

유해성 와편모조류 *Cochlodinium polykrikoides*는 1995년 남해안에서 대규모 발생하여 수백억원의 수산피해를 발생시켰으며, 매년 여름철마다 광범위하게 발생하여 막대한 경제적 손실과 사회적인 문제를 야기하고 있다. 와편모조류 중 일부는 부적합한 환경조건에서 유성생식 과정을 통해 내구성의 휴면포자 (cyst)를 형성하는 생활사를 갖는다. 이들은 적조발생 초기에 ‘씨앗개체군 (Seed population)’ 역할을 수행하는 것으로 알려져 있어, 이들의 생물지리적 분포는 적조 발생장소와 시기를 예측할 수 있는 중요한 단서가 된다.

그러나 *C. polykrikoides*의 명확한 생활사를 밝혀지지 않아 발생기작 또한 명확히 설명되지 못하고 있어 적조 예측이 어렵다. 그리하여 본 연구에서는 다양한 유전적 방법 중 종 특이적인 ITS rDNA영역을 통해 만들어진 primer를 이용하여 실시간으로 PCR 증폭산물을 모니터링하는 real-time PCR기법을 통해 *C. polykrikoides*의 휴면포자를 조사하였으며, *C. polykrikoides*의 주요 적조 발생지인 자란만 일대를 중심으로 사랑도, 미조, 여수 및 통영 인근 해역과 기타로 완도지역을 대상으로 조사하여 *Cochlodinium polykrikoides*의 검출 및 정량화하여 적조발생 잠재력을 파악하였다.

48정점 중 자란만 일대 정점 저질시료에서 *C. polykrikoides*의 rDNA copy수가 100 copies/cm<sup>3</sup> wet sediment로 다른 정점보다 높게 나왔으며, 이 일대 *C. polykrikoides* 발아체와 휴면포자 현존량의 변동을 조사한 결과, 4~5월 저질시료에서 *C. polykrikoides* rDNA copy수가 증가하였다가 6월 이후에는 감소하는 패턴과 반대로 해수시료에서는 6월 이후 증가하다가 8월에 감소하는 패턴으로 나타났다. 6월 이후 증가하는 영양세포들은

저질 속 *C. polykrikoides*의 휴면포자가 발아하여 나와 세포수가 증가한 것으로 생각된다.

본 연구를 토대로 저질 속 검출된 *C. polykrikoides* rDNA copy수는 ‘잠재적 씨앗개체군 (Seed population)’으로써 앞으로 적조를 일으킬 가능성이 있는 지역을 휴면포자 분포 지도화하여 *C. polykrikoides*의 적조발생기작을 집중적으로 연구 할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있다고 생각된다.



## 감사의 글

부족한 저를 아낌없이 지도해 주신 김창훈 교수님께 먼저 감사의 말을 전하고 싶습니다. 때로는 아버지처럼 다정하게 돌봐주신 은혜 잊지 않겠습니다. 그리고 저의 논문을 위해 많은 지도과 조언을 해주신 남윤권 교수님과 김종명 교수님께 감사드립니다. 아울러 학부생 때부터 지금까지 많은 가르침을 주신 허성범 교수님, 조재운 교수님, 장영진 교수님, 김동수 교수님, 배승철 교수님, 공승표 교수님께도 감사의 인사 전합니다.

바쁜 일정에도 불구하고 제가 도움을 청하면 언제든지 들어주신 박태규 박사님께도 감사드립니다. 그리고 실험에 도움 주신 국립수산과학원 박사님들께도 감사드리고, 고성 수산과학기술센터에서 고생해주신 윤창호 부장님, 김충재 박사님, 하승진 선배님께도 감사인사 전합니다. 사회생활 하느라 힘든 와중에서도 항상 신경써주신 황철희 선배님, 박정경 선배님 감사드립니다. 그리고 실험실에서 물신양면으로 도움 준 진주언니, 아방언니, 지효오빠, 정수오빠, 수영오빠, 하나, 민 정, 란 그리고 Hossein 진심으로 고맙고 사랑합니다. 대학원 생활에 큰 힘이 되었던 동기님들 철희오빠, 경미언니 감사하고 실험에 필요한 물품들 언제든지 빌려줬던 경묘언니, 상윤선배, 민균 고맙습니다. 항상 귀찮게 해도 웃는 얼굴로 도와주신 수희언니, 경림언니 고맙습니다. 언제나 제 옆에서 고민 들어주면서 함께 해준 친구들 그리고 대학생활에 또 다른 재미를 준 선배님, 동기들 그리고 후배님들께도 고맙고 여러분들의 사랑과 관심이 많은 도움이 되고 큰 힘이 되었습니다.

마지막으로 언제나 든든한 부모님 그리고 동생 승현 고맙고 사랑한다는 말을 전합니다.

## 참고문헌

- Anderson, D.M. 1980. Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *J. Phycol.* 16: 166-172.
- Anderson, D.M., Wall, D. 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *Gonyaulax excavata* initiating toxic dinoflagellate blooms. *J. Phycol.* 14: 224-234.
- 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.
- Cho, E.S., Kim, G.Y., Choi, B.D., Rhodes, L.L., Kim, T.J., Kim, G.H., Lee, J.D. 2001. A comparative study of the harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Gyrodinium impudicum* using transmission electron microscopy, Fatty acid composition, carotenoid content, DNA quantification and gene sequences. *Botanica Marina.* 44: 57-66.
- Cho, E.S., Kim, G.Y., Oh, B.C., Rhodes, L.L., Lee, J.D. 2000. Discrimination of three species of dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* using FITC-lectins. *Algae.* 15: 175-178.
- Dale, B. 1993. The cyst-motile stage relationships of the

dinoflagellates *Diplopelta symmertica* and *Diplopsalopsis latipeltata*.  
*Eur. J. Phycol.* 28: 129–137.

Hallegraeff, G.M. 2003. Taxonomic principles. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D.(Eds), Manual on harmful marine microalgae. UNESCO, Monographs on Oceanographic Methodology II, pp. 383–388.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5–3 exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7276–7280.

Iwataki, M., Kawami, H., Matsuoka, K., 2007. *Cochlodinium fylvescens* sp. Nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new chain-forming unarmored dinoflagellate from Asian coasts. *Phycol. Res.* 55: 231–239.

Iwataki, M., Kawami, H., Mizushima, K., Mikulski, C.M., Doucette, G.J., Relox Jr, J.R., Anton, A., Fukuyo, F., Matsuoka, K. 2008. Phylogenetic relationships in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrioides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences. *Harmful Algae* 7: 271 - 277.

Kamikawa, R., Nagai, S., Hosoi-Tanabe, S., Itakura, S., Yamaguchi, M., Uchida, Y., Baba, T., Sako, Y. 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.

- Ki, J.S., Jang, G.Y., Han, M.S. 2005. Integrated method for single-cell DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of ribosomal DNA from harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Alexandrium catenella*. *Mar. Biotech.* 6: 587–593.
- Kim, C.H., Cho, H.J., Shin, J.B., Moon, C.H., Matsuoka. 2002a. Overwintering potential of hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae): an annual red tide organism along the Korean coast. *Phycologia* 41: 667–669.
- Kim, C.H., Cho, H.J., Shin, J.B., Moon, C.H., Matsuoka, K. 2002b. Regeneration from hyaline cysts of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae), a red tide organism along the Korean coast. *Phycologia*. 41(6), 667–669.
- Kim, C.J., Kim, H.G., Kim, C.H., Oh, H.M., 2007. Life cycle of the ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters. *Harmful Algae* 6: 104–111.
- Kim, C.J., Park, G.H., Kim, K.Y. 2004. Sensitive, accurate PCR assays for detecting harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* using a specific oligonucleotide primer set. *J. Fish. Tech.* 7(3), 122–129.
- Kim, C.S., Lee, S.G., Lee, C.K., Kim, H.G. 2000. Biochemical responses of fish exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *JEMBE* 254: 131–141.

- Kim, C.S., Lee, S.G., Lee, C.K., Kim, H.G., Jung, J. 1999. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Plankton Research* 21(11), 2015-2115.
- Kim, D.K., Oda, T., Muramatsu, T., Kim, D.I., Matsuyama, Y., Honjo, T. 2002. Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton. *CBP Part C* 132: 415-423.
- Kim, H.G., 1997. Recent harmful algal blooms and mitigation strategies in Korea. *Ocean Res.* 19: 185-192.
- Kim, H.G., Lee, S.G., An, K.H., Youn, S.H., Lee, P.Y., Lee, G.K., Cho, E.S., Kim, J.B., Choi, H.G., Kim, P.J. 1997. Recent red tides in Korean coastal waters. *Nat. Fish. Res. and Dev. Insti.* 228 (in Korean).
- Lee, Y.S. 2006. Factors affecting outbreaks of high-density *Cochlodinium polykrikoides* red tides in the coastal seawaters around Yeosu and Tongyeong, Korea. *Marine Pollution Bulletin* 52: 1249-1259.
- Liavk, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provides a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 4:

357-362.

- Lim, W.A., Jung, C.S., Lee, C.K., Cho, Y.C., Lee, S.G., Kim, H.G., Chung, I.K. 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. *JKSO* Vol. 7 (2), 68-77.
- Lin, S., Zhang, H., Dubois, A. 2006. Wide distribution and low abundance of *Pfiesteria piscicida* as detected by mtDNA-18S rDNA real-time PCR. *J. Plankton Res.* 28: 667-681.
- Love, J.L., Scholes, P., Gilpin, B., Savil, M., Lin, S., Samuel, L. 2006. Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. *JMICMETH.* 67: 349-356.
- Margalef R. 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta.* 1: 493-509.
- Matsuoka, K., Iwataki, M., Kawami, H. 2008. Morphology and taxonomy of chain-forming species of the genus *Cochlodinium* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 7: 261-207.
- Nehring, S. 1997. Dinoflagellate resting cysts from Recent German coastal sediments. *Bot. Mar.* 40: 307-324.
- NFRDI. Data on Red Tides. (written in Korean)  
<http://www.nfrdi.re.kr/redtideInfo>.
- Paerl, H.W. 1983. Nuisance phytoplankton blooms in coastal estuarine,

- and inland waters. *Limnol. Oceanogr.* 33: 823-847.
- Park, J.G., Jeong, M.K., Lee, J.A., Cho, K.J., Kwon, O.S. 2001. Diurnal vertical migration of a harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae), during a red tide in coastal waters of Namhae Island, Korea. *Phycologia*. 40(3), 292-297.
- Park, T.G., Park, G.H., Park, Y.T., Kang, Y.S., Bae, H.M., Kim, C.H., Jeong, H.J., Lee, Y. 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., Park, Y.T. 2010. Detection of *Cochlodinium polykrikoides* and *Gymnodinium impudicum* (Dinophyceae) in sediment samples from Korea using real-time PCR. *Harmful Algae* 9: 59 - 65.
- Priestern L.A., Anderson, D.M. 1987. Dinoflagellate reproduction. In: The biology of dinoflagellates, edited by Taylor, F.J.R., Blackwell Scientific Publications, Oxford. 611-648.
- Rosales-Loessener F., Matsuoka, K., Fukuyo, Y., Sanchez, E.H. 1996. Cysts of harmful dinoflagellates found from pacific coastal water of guatemala. In: Harmful and toxic algal blooms, edited by Yasumoto T., Ochima Y., Fukuyo, Y., Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 193-195.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D. 2004. Real-time

quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European J. Plant Pathology* 110: 893 - 908.

Whyte, J.N.C., Haigh, N., Ginther, N.G., Keddy, L., 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiniales, Dinophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada. *Phycologia*. 40(3), 298-304.

Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4199-4201.

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

