

*Heterosigma akashiwo*의 핵형분석을 통한 생활사 연구를 위한 DAPI이용 기법

이주연, 한명수*

한양대학교 환경학과, *한양대학교 생명과학과 환경과학과

ABSTRACT

The goals of this study is to elucidate life cycle and to detect genetic differences within a single species of *Heterosigma akashiwo*. To elucidate life cycle of *H. akashiwo*, have to study of benthic stage and vegetative cell. So we studied identification of *H. akashiwo* cyst. The relative contents of DNA in nuclei were determined in *Heterosigma akashiwo*. Different stages of the life history were obtained from culture and natural sediments, and examined by microfluorometry after staining with the DNA-specific fluorochrome 4'-6-dianudubi-2-phenylindole(DAPI). Large cells mainly in exponensial stage, while small cell, pre-encystment cells(?), showed in the end of the late growth stage. Type of DNA content showed the different with growth stage. Usually the small cell has the high level of IOD.

I. 서 론

*Heterosigma akashiwo*는 열대나 아열대 지방뿐만 아니라 온대지역에 널리 분포하여 적조를 일으키며 어류 등을 폐사시켜 양식업에 막대한 손실을 초래하고 있다 (Yamochi 1984b, 1989a, Park et al. 1989, Honjo 1993, Taylor and Haigh 1993, Smayda 1998, etc.). 이러한 피해를 줄이기 위해 *Heterosigma* 적조에 대한 각 지역의 물리, 화학, 생물학적 환경요인들이 분석되어 왔다 (Tomas 1978a, Park et al. 1989, Pazos et al. 1995, Smayda 1998). 최근 분자생물학적 연구는 활발하게 되어지고 있지만 genomic DNA수준에서의 분석은 아직 완벽하게 조사되지 못해 생활사가 규명되지 않았다. 따라서 본 연구

는 국내 연안에서 분포하는 *Heterosigma akashiwo*의 배양 strain을 이용하여 이들의 DNA content 분석을 통해 생활사에 따른 *H. akashiwo*의 핵형 변화 패턴을 조사하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. Cyst isolation from sediment

*Heterosigma akashiwo*는 마산만에서 core를 이용해 채집하였다. 채집해온 sediment는 45와 5 μ m sieve를 이용하여 전처리 후 capillary method로 isolation한다.

2. Strain and culture condition

Strain의 경우 axenic은 아니지만 unialgal인 국립 수산 진흥원 분양 받은 *Heterosigma akashiwo*를 test tube에서 배양했으며 Media는 O-3 (McIntosh and Cattolico 1978)로 하였다. culture condition의 경우 20°C, 12L:12D의 광주기, 60 μ mol m⁻²s⁻¹의 광도에서 배양하였다.

3. Analysis DNA contents

*H. akashiwo*의 핵형 분석을 위해 UV하에 형광을 내는 DAPI(4'-6-dianudubi-2-phenylindole)를 사용하여 DNA양을 결정하였고 *H. akashiwo*의 영양세포의 핵형을 조사하였다. 영양세포 핵형 조사는 spread and dry법(M. Yamaguchi and I. Imai 1994)을 사용하였다. 배양한 strain 몇 방울을 slide glass위에 떨어 뜨려 50°C stretching table위에서 건조시켰다. 완전 건조 후 결정화된 소금을 distilled water로 씻어낸다. 또한 chlorophyll extraction을 위해 cold methanol(99%)에 담가 4°C 암상태로 하루 동안 보관하였다(Yamaguchi 1992). 그 후 micro slides를 UV에 의한 형광도의 초기 감소를 방지하기 위해 Tris buffer(10mM Tris, 10mM EDTA-2Na, 100mM NaCl, 10mM 2-mercapto-ethylamin hydrochloride, pH=7.4) (Hamada and Fujita 1983)로 세척한다. 핵염색을 위하여 4'-6-dianudubi-2-phenylindole(DAPI)를

Tris buffer($0.5\mu\text{g ml}^{-1}$)에 몇 방울 떨어뜨려 30분 동안 정치하였다. Nuclear DNA contents는 epifluorescence microscope(Axioplan, ZISS)를 사용하여 330~385 nm excitation filter와 >420 nm emission filter를 사용하여 UV광선 하에 관찰하였다. 현미경상의 영상은 3-CCD Color Vision Camera Module (Donpisha)와 Image analysis software(Image-Pro Plus version 4.1)와 frame grabber(Color BioCapt ver 99.02s)가 장착된 Computer를 이용하여 각각의 세포에 대한 IOD 값을 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

*Heterosigma akashiwo*의 morphology의 경우 $10\mu\text{m}$ 정도의 크기에 구형이며 age와 상관없이 점액질에 둘러싸여 있다. chloroplast가 고르게 분포 되어있다. *Heterosigma akashiwo* DNA contents 분석 결과는 growth stage 별 결과가 조금씩 다른 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 LM 그리고 DAPI로 염색 후 형광에서 관찰했을 때 역시 그 크기가 stage 별로 다른 것을 알 수 있다. Exponential stage 때는 $10\sim 18\mu\text{m}$ 정도로 큰 size의 cell이 많이 목격된 반면 접종 후기가 되면서 cell size가 $3\sim 8\mu\text{m}$ 정도로 작은 size와 큰 size의 cell이 혼합되어 출현되었다. 반면 death stage가 되어 감에 따라 cell density

IV. 결 론

*Heterosigma akashiwo*의 cyst morphology 속지는 benthic stage의 핵형 분석에도 유용하게 이용할 것이다. 뿐만 아니라 DAPI를 이용해서 *H. akashiwo* growth stage별로 특이한 morphology에 따른 조금씩 다른 핵형을 가지고 있음을 쉽게 확인 할 수 있다. 이를 미루어 보았을 때 다른 형태의 핵형으로 bloom을 일으키는데 유의를 차지할 수 있는 다양한 생존전략을 구사할 것이라는 추측을 가능하게 한다.

REFERENCES

- M. Yamaguchi and I.Imai . 1994. A microfluorometric analysis of nuclear DNA at different stage in the life history of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae) *Phycologia* 33(3): 163-170
- M. Yamaguchi. 1992. DNA synthesis and the cell cycle oin the noxious red-tide dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense*. *Marine Biology*, Berlin 112: 191-198
- S. Hamada and S. Fujita. 1983. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 79: 219-226
- McIntosh, J and Cattolico, R.A. 1978. Preservation of algal and higher plant ribosomal RNA integrity during extraction and electrophoretic quantitation. *Anal. biochem.* 91: 600-612
- Yamochi, S. 1984. Mechaniasms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay, Japan. *J. Oceanogr. Soc. Jpn.* 40:343-348
- Yamochi, S. 1989. Mechamisms for outbreak of *Heterosigma akashiwo* red tide in Osaka Bay. In Okaishi, T., Anderson, D.M. and Nemoto, T.[Eds.] *Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, Amsterdam, pp 253-256
- Park, J.S. Kim, H.G. and Lee, S.G. 1989. Studies on red tide phenomena in Korean coastal waters. In Okaishi, T., Anderson, D. M. and Nemoto, T.[Eds.] *Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York, pp 37-40
- Honjo, T. 1993. Overciew on bloom dynamics and physiological ecology of *Heterosigma akashiwo*. In Smyda, T.J. and Shimisz, Y. [Eds.] *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp 33-41
- Taylor, F.J.R. and Haigh, R. 1993. The ecology of fish-killing blooms of the chromonad flagellate *Heterosigma* in the strait of Georgia and adjacent waters. in Smyda, T.J. and Shimizu, Y. *Toxic Phytoplknkton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp 705-710
- Smayda, T. 1998. Ecophysiology and bloom dynamics of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) In Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraeff, G.M. [Eds.] *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Berlin, pp 113-131
- Tomas, C.R. 1978. *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae) Effects of salinity and temperature on growth, motility and surbibal. *J. Phycol.* 14: 309-313
- Pazos, Y., Figueiras, F.G., Amares-Salgano, X.A. and Roson, G. 1995. The control of succession in the red tide species in the Ria de Arousa (NW Spain) by upwelling and stability. In Lassus, P., Arzul, G., Erard-LeDenn, E., Gentien, P. and Marcaillou-LeBaut. C. [Eds.] *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Paris, pp 645-650