

## 한국 연안에 출현하는 무각와편모조류 5종에 대한 형태 및 분자계통학적 특성

조수연 · 기장서 · 한명수\*

(한양대학교 자연과학대학 생명과학과)

### Morphological Characteristics and Molecular Phylogeny of Five Unarmored Dinoflagellates in Korean Coastal Waters

Soo-Yeon Cho, Jang-Seu Ki and Myung-Soo Han\*

Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Many species in Gymnodiniales, which are unarmored dinoflagellates, are responsible for marine algal blooms and some of them have potent toxin in the cell. Their taxonomy has so far been well-defined, and several genera (e.g. *Akashiwo*, *Gymnodinium*, *Karenia*) have recently been re-described. In Korea, few works have been carried out on their taxonomical and molecular studies. This study focused on comparison of both morphological and molecular characteristics of five unarmored dinoflagellates on Korean coastal water: *Akashiwo sanguinea*, *Cochlodinium polykrioides*, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium impudicum* and *Karenia aureolum* (= *K. mikimotoi*). Morphological characteristics observed here was in good accordance with the original descriptions of individual species. In addition, none of difference was found in morphological comparisons between the Korean and foreign strains. Furthermore, molecular analysis showed that the SSU rDNA sequences were generally identical according to each species. In some distinct features, *A. sanguinea*, which has generally the same morphological features, were divided into two groups: one was Korean isolates including European isolates, the other was American isolates. In the two groups, the nucleus was positioned differently: middle of the cells in the Korean isolates (GnSg02, GnSg03), near the epicone in American isolates (CCMP1593, CCMP1837). In addition, this was strongly supported by phylogenetic analysis, inferred from the SSU rDNA sequences. *K. aureolum* (GrAr01) was corresponded to European *G. aureolum* (= *K. mikimotoi*) in shape and position of nucleus, chloroplast, however, which is similar to *K. digitata* in view of having a finger-like sulcus. This was in good agreement with phylogenetic study of these species. *G. catenatum* have identical morphology except the ridge location, and their genotype of SSU rDNA was also identical to GenBank data of the same species. From this study, we found that the five Korean unarmored dinoflagellates are identical morphological characteristics and genotype to each species of foreign isolates.

**Key Words:** morphology, phylogeny, SSU rDNA, taxonomy, unarmored dinoflagellates

#### 서 론

국내 적조는 연안환경의 부영양화로 인하여 1980년대 중반 이후 매년 발생하고 있다. 특히 남해안은 반폐쇄성 수역이 많고, 연안도시에서 배출된 유기물질로 인한 부영양화가 심화되어 적조의 발생이 더욱 빈번하다(김 2005). 이들 적조의 특징을 살펴보면, 1970년대에는 주로 규조류에 의해 국소적으로 단기간 발생하였으며, 1980년대에는 유해성 편모조

류에 의해 발생빈도가 증가하고 장기화 되었다(김과 신 1997). 최근에는 점점 외양에서도 적조가 발생되고 있는 것이 특징이다. 적조 원인종은 대부분 와편모조류이며(한 1990; 이 등 1993; 김 등 1998; 이 1999), 이들 중 무각와편모조류 Gymnodiniales 목에 속하는 *Cochlodinium*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium* 속의 종들은 1981년 이후 그 발생 빈도수가 증가하여 왔다(김과 신 1997; 김 등 1998; 이 1999).

무각와편모조류 Gymnodiniales 목은 Actiniscaceae, Gymnodiniaceae, Hemidiniaceae, Lophodiniaceae, Polykrikaceae, Warnowiaceae로 구성된다. 이 들 중

\*Corresponding author (hanms@hanyang.ac.kr)

Gymnodiniaceae 과에 속하는 *Cochlodinium*, *Gymnodinium*, *Gyrodinium* 속의 종들은 횡구(cingulum)의 위치, 단차(횡구 시단과 종단의 높이차), 교차(횡구 시단과 종단의 엇갈림차)가 중요한 분류기로 활용되고 있는데, *Gymnodinium*과 *Gyrodinium*은 횡구 양단의 단차를 기준으로 그 차이가 세포 길이의 1/5 이상이면 *Gyrodinium*, 이하이면 *Gymnodinium*으로 구분한다. 또한 횡구 교차가 세포 횡단면의 1/2 이상이면 *Cochlodinium*, 1/2이 되지 않으면 *Gyrodinium*으로 구분한다(Kofoed and Swezy 1921). 그러나 횡구의 단차나 교차의 경계부근에 있는 종이 많아 이러한 분류 기준으로 종과 속을 구분하기 어렵다(Takayama 2000). 또한 이들은 성장환경에 따라 세포의 형태적 변이가 심하고, 근연종 간에 유사한 형태를 보이며, 야외 채집세포와 실내 배양 세포간의 형태적 변이가 심하여 종의 분류가 매우 까다롭다. 실제로 이러한 형태적 특징들을 이용한 분류학적 연구에서 종뿐만 아니라 속 간의 분류에 많은 혼동이 있어왔다(Kimball and Wood 1965; Yuki and Yoshimatsu 1987).

Daugbjerg *et al.*(2000)에 의해 무각와편모조류의 분류체계가 새롭게 정립된 이후, 상추구(apical groove)의 모양, 핵과 엽록체의 위치 및 형태 등이 형태적 분류의 기준이 되고 있다. 또한 세포 내부의 특징을 관찰하기 위해 TEM (Transmission Electron Microscope)을 이용하거나(Ellegaard *et al.* 1993; Costas *et al.* 1995; Hansen *et al.* 2000a, b; Hansen 2001, Bergholtz *et al.* 2005; Hansen *et al.* 2007), HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 색소 성분 분석(Tangen and Bjørnland 1981; Bolch *et al.* 1999b; Hansen *et al.* 2000a; Stæhr and Cullen 2003; Richardson and Pinckney 2004; Hansen *et al.* 2007) 등 다양한 방법이 형태적 분류에 이용되고 있다. 최근 유전자 분석 기술의 진보로 많은 유전정보가 규명되고 있으며, 이를 와편모조류의 계통분류학적 연구에 활용하고 있다(Ki 2005; Ki and Han 2005; Kim 2005). 실제로 무각와편모조류의 rDNA 정보(Ellegaard and Oshima 1998; Bolch *et al.* 1999a, b; Kim *et al.* 1999; Hansen *et al.* 2000a; Cho *et al.* 2001; Shao *et al.* 2004; Bergholtz *et al.* 2005; Hansen *et al.* 2007), plastid의 유전정보(Takishita and Uchida 1999; Takishita *et al.* 2000), 미토콘드리아의 유전정보(Zhang *et al.* 2005) 등을 중심으로 이들의 계통분류학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 rDNA는 진화적으로 안정되게 보존되며 종간의 변이가 뚜렷할 뿐 아니라 세포 내에 다중(multicopy)으로 존재하고 비교 가능한 유전정보가 다른 유전자에 비하여 많이 규명되어 있어 분류 및 계통학적 연구에 폭넓게 활용되고 있다.

현재까지 국내에서 실시된 와편모조류의 형태 분류와 분포에 대한 연구는 대부분 유각류를 중심으로 실시되어왔다(한과 유 1983b; 유와 이 1986; 이 1991; Han *et al.* 1992; 이

등 1993; 문 등 1995; Shim 1994; Shin 1999). 무각와편모조류의 분류학적 연구로 심 등(1981)이 *Amphidinium*, *Gymnodinium* 속 등 총 4속 7종을 처음으로 기재하였으며, 한과 유(1983a)가 광학현미경을 이용하여 진해만 일대의 *Akashiwo sanguinea*, *Amphidinium longum*, *Dissodinium pseudolunula* 등의 형태적 분류를 수행하였다. 이후 Jung (2001)이 남해안 일대에서 채집한 시료를 광학현미경과 전자현미경을 이용하여 *C. polykrikoides*, *G. catenatum*, *G. impudicum* 등의 형태적 분류를 하였으며, *G. aureum*, *G. corsicon*, *Nematodinium armatum*을 국내에 처음으로 보고하였다. 무각와편모조류의 형태적 분류의 문제점을 보강하기 위하여 1990년대 후반 이후 유전자 분석을 병행한 연구가 수행되기 시작하여 Kim *et al.*(1999)은 ITS rDNA 유전자를 이용하여 *A. sanguinea*와 *G. impudicum*의 분자생물학적 분류를 시도하였으며, 박과 박(1999)이 24S rDNA 유전자를 이용하여 *C. polykrikoides*와 *G. impudicum*을 비교 분석하였다. 또한 Cho *et al.*(2001)은 ITS rDNA를 이용하여 *G. impudicum*과 *C. polykrikoides*의 계통분류학적 연구를 수행하였다. 그러나 국내종과 국외종의 배양주를 이용한 형태 및 유전자 정보의 비교연구는 아직까지 체계적으로 수행되지 못하였다.

본 연구는 한국 연안에 출현하는 무각와편모조류 5종 [*Akashiwo sanguinea* (Hiraska) G. Hansen and Moestrup, *Cochlodinium polykrikoides* Margalef, *G. catenatum* Graham과 *G. impudicum* (Fraga and Bravo) G. Hansen and Moestrup, *Karenia aureolum* (Hulburt) G. Hansen and Moestrup (= *Karenia mikimotoi*)]을 중심으로 국내·외 배양주를 이용하여 각각의 형태적 특징을 관찰하여 서로 비교 검토하였다. 또한 이들 배양주로부터 SSU rDNA의 유전자 정보를 분석하여 이들의 분자 계통학적 유연관계를 파악하며, 형태적 분류와 비교 검토하였다.

## 재료와 방법

### 배양주 및 배양조건

본 연구에서 연구된 12개 배양주는 국내·외 조류배양기관-한국해양연구원(Korea Ocean Research & Development Institute; KORDI), 국립수산물과학원(National Fisheries Research & Development Institute; NFRDI), 부경대학교(Pukyong National University; PKNU), CCMP(Provasoli-Guillard National Center for Marine Phytoplankton; CCMP)-로부터 분양 받았다(Table 1). 배양은 f/2-Si 배지를 사용하였으며(Guillard and Ryther 1962), 광도 100~120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 12:12 h LD cycle, 온도 20°C에서 실시하였다.

**Table 1.** List of strains used in this study

Species	Strain (or isolate)	Locality	Source
<i>Akashiwo sanguinea</i>	GnSg02	Jangmok Bay, Korea	KORDI
	GnSg03	Jangmok Bay, Korea	KORDI
	CCMP1593	Narragansett Bay, USA	CCMP
	CCMP1837	Harington Sound, USA	CCMP
<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	CcPk02	Tongyeong, Korea	KORDI
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCCW991	Jindong, Korea	PKNU
	GnCt01	Jinhae Bay, Korea	KORDI
	CCMP1940	Ria de Vigo, Spain	CCMP
<i>Gymnodinium impudicum</i>	GI-1cp	Yeosoo, Korea	NFRDI
	GrIp02	Gunsan, Korea	KORDI
	CCMP1678	Gippsland Lakes, Australia	CCMP
<i>Karenia aureolum</i> (= <i>K. mikimotoi</i> )	GrAr01	Chilcheon-do, Korea	KORDI

### 광학현미경 관찰

형태는 광학현미경(Axioplan, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) 400-1000배로 DIC (differential interference contrast illumination) 또는 bright-field에서 관찰하였다. 종의 동정은 세포의 크기, 형태, 상추(epicone)와 하추(hypocone) 끝의 모양, 황구의 단차 및 위치, 상추구의 형태, 종구(sulcus)의 함입 정도 등의 세포 외형적인 특징과 엽록체의 모양 및 위치, 피레노이드의 유무, 핵의 위치 및 모양 등에 따라 분류하였으며 종의 기재는 Daugbjerg *et al.* (2000)의 분류학적 체계에 따라 기재하였다. 사진은 MC80 camera system (Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 Technical Pan Film (Kodak, NY, USA)으로 촬영하였으며, 인화지는 Kodabrome II RC F3 (Kodak, USA)를 사용하였다.

### DNA 추출 및 PCR 증폭

대수증식기에 이른 배양주 50 ml를 8,000 rpm에서 15분간 원심분리(TOMY model TX-160, Japan) 한 후, DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. SSU rDNA 를 증폭하기 위해 AT18F01(5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3'), AT18R01(5'-TGATCCTTCYGCAGGTTACC-3')을 primer로 이용하였다(Ki and Han 2005). PCR 반응은 0.1 mg 이하의 genomic DNA, 10X PCR buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin), 각각 2.5 mM의 dNTP, 0.2 unit의 Taq polymerase(Genemed Inc., Korea), 각각 10 pmol의 primer pair를 총 25  $\mu$ l로 조성하여 UNO-II Thermoblock (Biometra, Göttingen, Germany)로 수행하였다. DNA 증폭 시 최초 95°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 95°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분의 조건으로 35 cycle을 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 반응 후 증폭을 종결하였다.

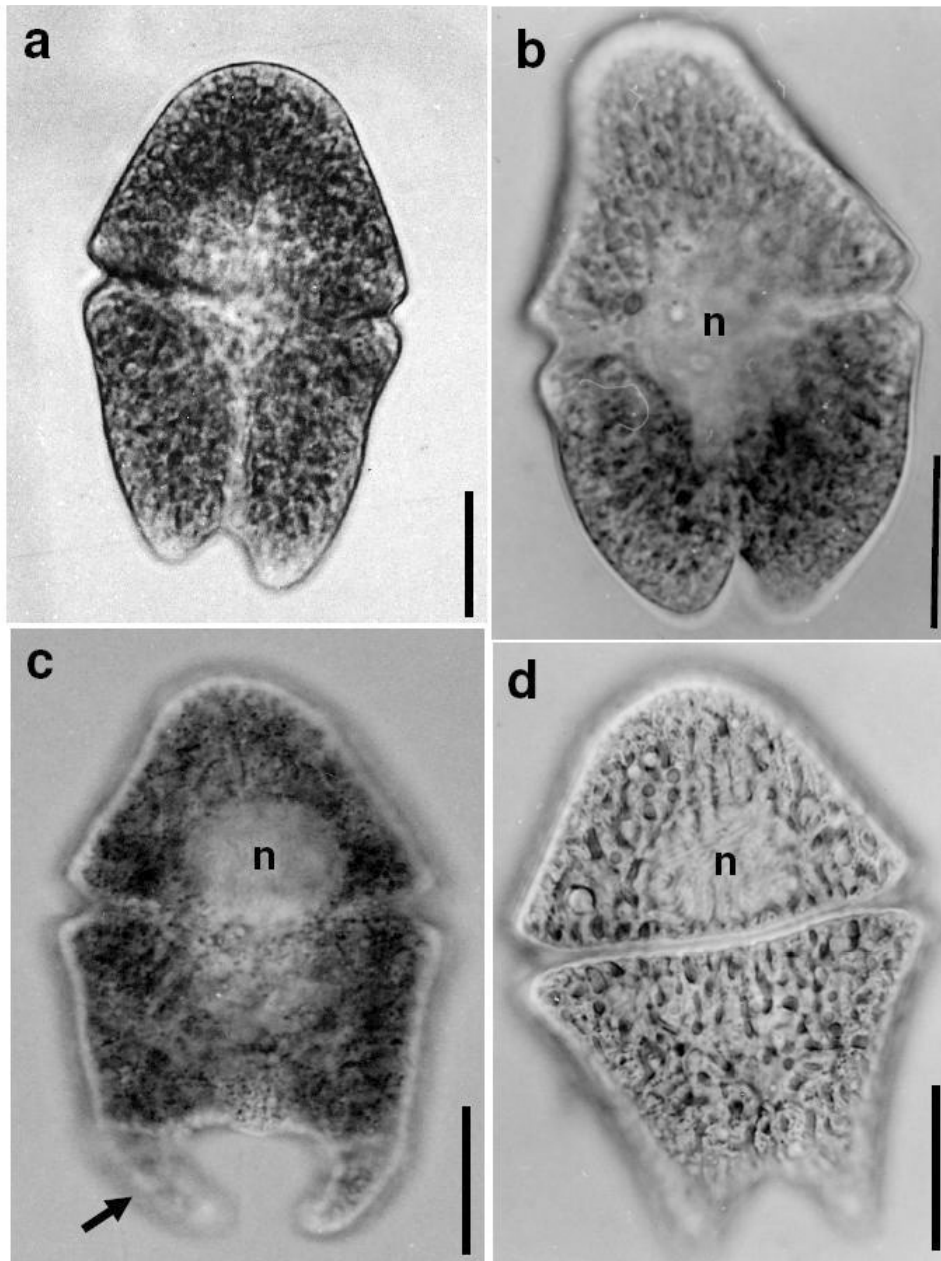
### DNA 염기서열 결정 및 분석

Ki *et al.* (2004)의 방법에 따라, 증폭된 PCR 산물(3-6  $\mu$ l)을 주형으로 하여 sequencing primer가 주입된 ThermoSequenase Version 2.0 Cycle Sequencing Kit(USB, Cleveland, OH, USA)로 DNA cycle sequencing reaction을 수행하였다. Sequencing primer(SAT18F01, SAT18R01)는 5' 말단을 IRD(infrared dye)로 표지하였으며, DNA 단편은 Dual Dye Automated Sequencer(LONG READIR 4200, Li-cor, NE, USA)를 이용하여 분리하였다. 염기서열 비교를 위해 결정된 염기서열과 GenBank에 등록된 동일 분류군의 염기서열을 Clustal W를 사용하여 정렬하였다(Thomson *et al.* 1994). 또한 genetic distance는 Kimura 2-parameter model (Kimura 1980)을 이용하여 계산하였으며, similarity score를 구하였다. 계통분석은 PAUP\*4.0b10 (Swofford 2002)을 이용하여, Kimura 2-parameter의 근린결합분석(neighbor-joining; NJ)과 최대절약분석(maximum parsimony; MP), 최대유사분석(maximum likelihood; ML)을 실시하였다. NJ분석과 ML 분석은 Modeltest 프로그램(V. 3.06, Posada and Crandall 1998)을 이용하여 최적의 진화모형을 결정하여 실시하였다. 분석은 model -Ln = TrN + I + G model (-LnL = 5156.03; A:C:G:T = 0.2651:0.1929:0.2587:0.2833; pinv = 0.6068; gamma shape = 0.6327)로 실시하였다. 계통수의 분지에 대한 지지도를 측정하기 위해서 NJ, MP의 bootstrap 값을 500 회 반복하였고, ML은 100회 반복하였다.

### 결 과

#### *Akashiwo sanguinea* (Hiraska) G. Hansen and Moestrup 2000(Fig. 1a-d)

Synonyms: *Gymnodinium sanguineum* Hiraska 1922 (Steiginger and Tangen 1997, p. 451. Pl. 19; Shim 1994, p.



**Fig. 1.** Light micrographs of *Akashiwo sanguinea* from three strains, GnSg02 (a, b), CCMP1593 (c) and CCMP1837 (d). Whole cell structure of GnSg02 (a) with the bell-like epicone (b). An arrow head represents the hook-like lobe on the dorsal view of CCMP1593 (c). A nucleus is marked as "n". Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

419, fig. 525; Jung 2001, Pl. 2, figs. 3-5, Pl. 11, figs. 3-4, Pl. 12, figs. 1, 3, 4)

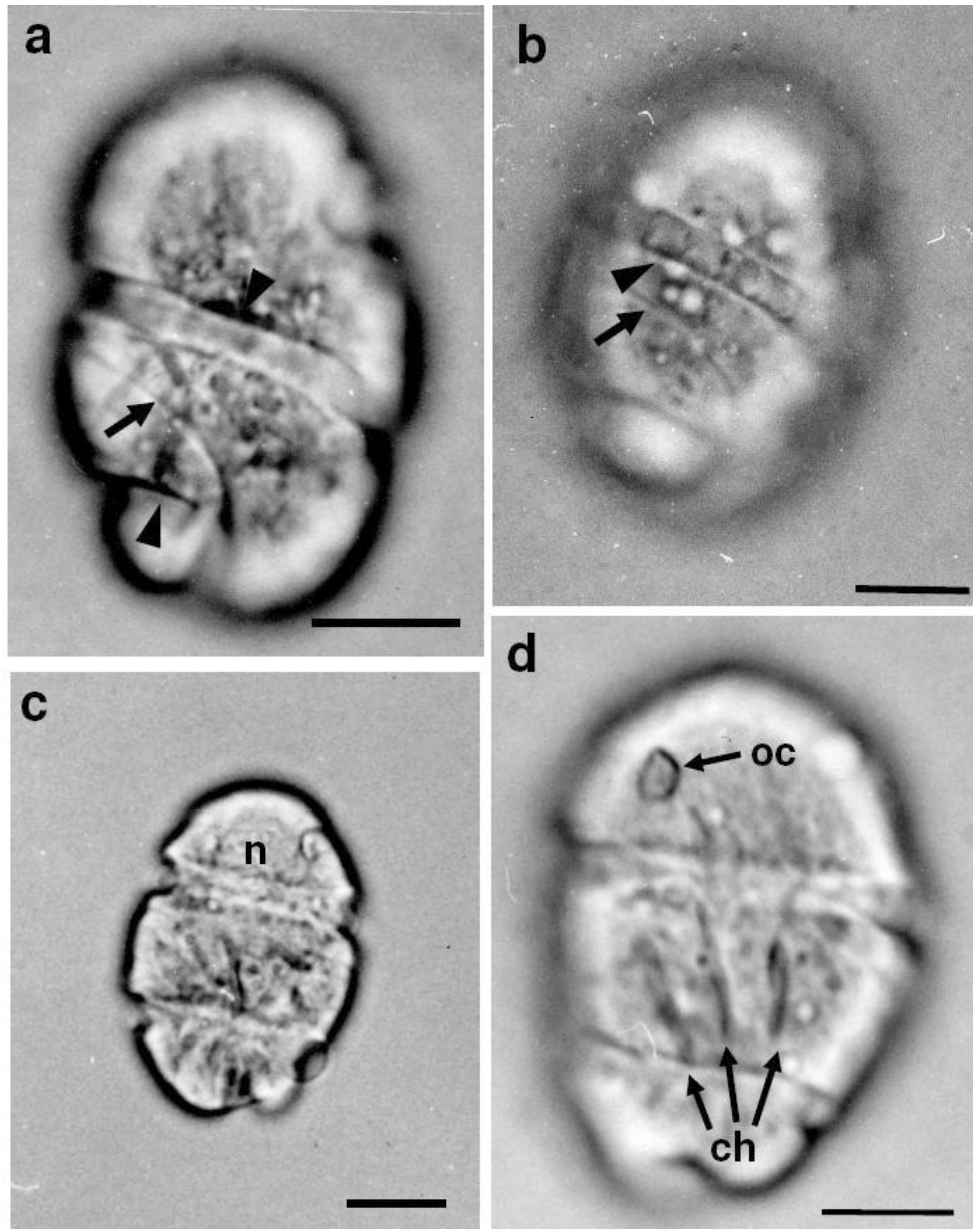
*Gymnodinium splendensi* Lebour 1925 (Lebour 1925, p. 43, Pl. 5, fig. 1; Schiller 1937, p. 417, fig. 438; Dodge 1982, p. 88, figs. 9 E-G)

*Gymnodinium nelsoni* Martin 1929 (Hulburt 1957, pp. 203-205, Pl. 2, fig. 1; Adachi and Irie 1981, pp. 33-34, fig. 23)

세포는 오각형 또는 계란형으로 등배가 편압되었다. 세포는 길이 35.0-85.0  $\mu\text{m}$ , 폭 20.0-65.0  $\mu\text{m}$ 로 폭에 대한 길이의 비율이 1.06-1.78배였다. 상추는 반구형 또는 원뿔형이었으

며 하추는 종구가 등측까지 연결되어 두 개의 열편(lobe)으로 나뉘었다(Fig. 1a-d). 상추가 하추보다 짧아 횡구는 세포 중앙에서 약간 위쪽에 위치하였고 단차는 횡구 폭 정도였다. 종구는 하추로 곧게 내려가며 저단으로 내려올수록 폭이 넓어져 두 열편 사이가 벌어졌다. 상추는 모든 배양주에서 종(?) 모양이 관찰되었으나 세로로 길게 확장되어 상추와 하추의 길이가 같아지기도 하였다(Fig. 1b). 하추는 모양의 변화가 심해 열편 양 끝이 내부로 휘어지거나 앞 뒤로 휘어지는 것이 관찰되기도 하였다(Fig. 1c). 핵은 구형 또는 장방형으로 국내 배양주에서는 세포 중앙에 존재했지만(Fig. 1a, b),





**Fig. 2.** Light micrographs of *Cochlodinium polykrikoide* CcPk02. Cingulums are marked as arrowheads and sulcus as arrows, ventral view (a) and lateral view (b) of the cell. A nucleus (n) is located on apical part of the cell (c). An ocellus (oc) is situated on apical part and chloroplasts (ch) in the shape of a stick (d). Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

국의 배양주에서는 세포 상추에 존재하였다(Fig. 1c, d). 엽록체는 갈색의 봉상(棒狀)으로 핵을 중심으로 방사상으로 세포 전체에 고루 분포하였다(Fig. 1d).

***Cochlodinium polykrikoide* Margalef 1961 (Fig. 2a-d)**

Synonyms: *Cochlodinium heterolobatum* Silva 1967 (Silva 1967, pp. 745-754, Pls. 1-5)

*Cochlodinium polykrikoide* Margalef 1961 (Steidinger and Tangen 1997, p. 446, Pl. 17; Hallegraeff *et al.*, 1995, pp. 286-287, fig. 15.3; Jung 2001, Pl. 1, figs. 1-2, Pls. 7-8)

세포는 상추와 하추 모두 반구형으로 세로로 긴 계란형이었다(Fig. 2a). 상추는 대부분 반구형이나 원뿔형의 세포도 관찰되었다. 길이는 25.0-45.0  $\mu\text{m}$ , 폭은 16.0-35.0  $\mu\text{m}$ 로 세포 길이는 폭의 1.28-1.88배 정도였다. 횡구 폭은 세포 길이의 1/13-1/12 정도로, 세포 정단(apex) 부분의 세포 길이 1/4 정도 되는 곳에서 시작하여 약 1.8-1.9 바퀴를 돌아 후단(antapex)에서 끝났다(Fig. 2a). 종구는 횡구가 시작되는 부분 바로 아래에서 시작하여 세포의 후단으로 내려갈수록 넓어졌다(Fig. 2b). 하추는 종구에 의해 2개의 열편으로 나뉘며, 때때로 세포 표면에 세로로 난 굵은 주름(ridge)을 볼 수 있

었다. 엽록체는 노란색의 긴 봉상 모양으로 세포의 하부에 방사상으로 퍼져있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2c, d). 핵은 세포의 상부에 존재하였으며 장방형의 타원형이었다(Fig. 2c). 안점(ocellus)은 주로 세포 상부, 등측에서 관찰되는데(Fig. 2d), 때때로 세포 아래쪽에서 발견되기도 하였다. 대체로 배양하는 *C. polykrikoides*는 좀처럼 긴 사슬을 형성하지 않았으나, 사슬을 형성하는 세포는 세포 상부와 하부가 응축되어 단독으로 유영하는 세포보다 크기가 작았다.

#### *Gymnodinium catenatum* Graham 1943 (Fig. 3a-f)

Morey-Gaines 1982, pp. 154-163, figs. 1-13; Yuki and Yoshimatsu 1987, pp. 109-117, fig. 1, Pls. I, II, III; Hallegraeff *et al.* 1995, pp. 287-288, figs. 15.5, 15.10; Steidinger and Tangen 1997, p. 447, Pl. 18; Jung 2001, Pl. 1, figs. 3-6, Pl. 9, figs. 2-4, Pl. 10, figs. 1-4, Pl. 11, figs. 1-2

세포는 세로로 긴 오각형이었다. 세포의 길이는 35.0-71.5  $\mu\text{m}$ , 폭은 32.5-71.0  $\mu\text{m}$ 로 길이는 폭에 대해 1.07-1.79배였다. 상추는 원뿔형으로 정단이 뾰족하고 후단은 뾰족하거나 둥글었다(Fig. 3a). 횡구는 세포 중앙 약간 위쪽에 위치하였으며, 단차는 횡구 폭의 2-3배 정도였다. 종구는 일직선으로 상추의 정단 부위까지 함입되어 상추구와 접하였다. 상추구는 타원형이며 종구와 거의 맞닿아 시작하여 반시계 방향으로 정단을 한 바퀴 도는데 그 양 끝은 만나지 않았다(Fig. 3b). 세포 표면은 그물망구조이며, 여러 개의 원형 또는 부정형의 액포가 발견되었다(Fig. 3a). 세포의 표면에 넓고 깊은 주름이 관찰되었는데(Fig. 3c, d), 국외 배양주인 CCMP1940는 주름을 상·하추 모두 일직선 상에 형성하였으나(Fig. 3c), 국내 배양주 GnCt01은 상·하추에 주름이 엇갈려 있고, 주름의 수에도 차이를 나타냈다(Fig. 3d). 엽록체는 노란색이며 굵고 짧은 실모양으로 분지되어 세포 전체에 골고루 분포하였다. 핵은 거의 원형에 가까운 형태로 존재하였으며 세포 중앙, 횡구 부위에 위치하였다(Fig. 3e). 또한 세포 표면에 직선 또는 곡선을 형성하는 작은 알갱이들이 분포하였으며 특히 GnCt01에서 이들에 의해 생긴 세로로 길고 가느다란 선들이 관찰되었다(Fig. 3f).

#### *Gymnodinium impudicum* (Fraga and Bravo) G. Hansen and Moestrup 2000 (Fig. 4a-d)

*Synonyms:* *Gyrodinium impudicum* Fraga and Bravo 1995 (Fraga *et al.* 1995, pp. 514-521; Jung 2001, Pl. 16, figs. 1-4, Pl. 17, figs. 1-3, Pl. 18, figs. 1-4)

세포는 조금 긴 구형 또는 계란형으로, 상추는 원형 또는 원뿔형이며 하추는 거의 뾰족하거나 원형에 가까웠다(Fig. 4a, b). 길이가 20.0-40.0  $\mu\text{m}$ , 폭 16.0-37.0  $\mu\text{m}$ 이었으며 길이에 대한 폭의 비율은 1.05-1.63배였다. 횡구 폭은 세포 길이

의 1/8-1/7 정도로 폭이 넓은 편이고 단차는 세포 길이의 1/3정도였다. 종구는 세포의 후단까지 거의 일직선으로 내려오며 종구 상단은 상추구와 접하였다(Fig. 4b). 상추구는 세포의 정단을 반시계방향으로 회전하였으며 정단은 볼록하게 솟아 있었다(Fig. 4b). 구형의 핵은 세포의 중앙, 횡구 부분에 존재하였다(Fig. 4a, c). 엽록체는 갈색의 작은 타원형으로 세포 전체에 골고루 분포하였다(Fig. 4c). 세포 내부에 다수의 색소립으로 구성되어 있는 붉은색의 색소체가 응집하여 존재하였으며, 이들은 1개에서 4개까지 관찰되었고 대부분 2개를 포함하고 있었다(Fig. 4c). 8세포 사슬 형성 시 4세포와 나머지 4세포는 연결부위의 세포가 편압되지 않고 양 끝의 세포가 살짝 붙어 있거나 꺾어져 붙어있는 것을 관찰할 수 있었다. 본 종은 2세포 사슬 형성 시, 세포의 크기가 아주 다른 개체들을 관찰할 수 있었으며 정상 크기의 세포와 소형의 세포 크기 차가 2배 이상에 이르는 것을 관찰하였다(Fig. 4d).

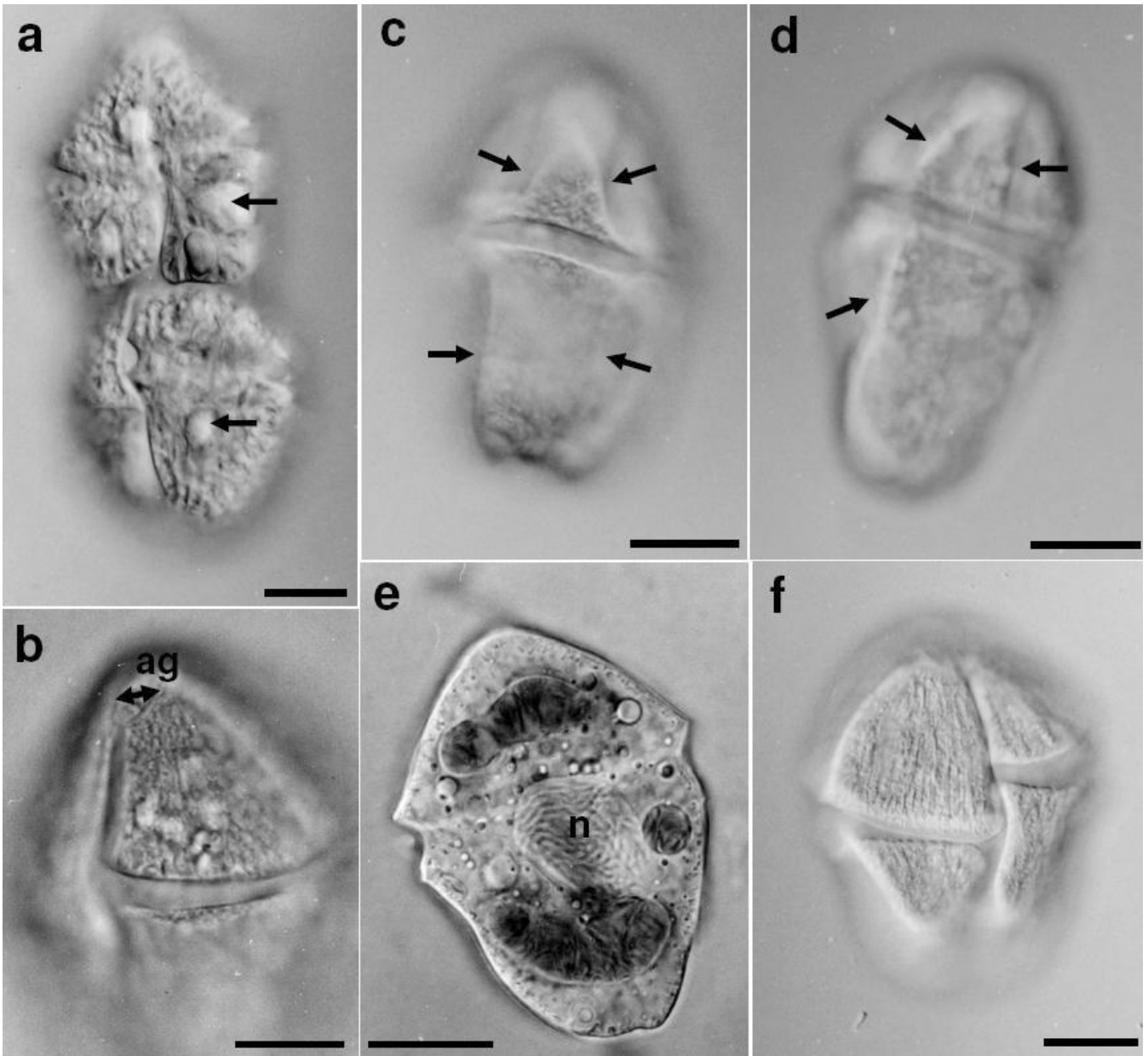
#### *Karenia aureolum* (Hulburt) (= *Karenia mikimotoi*) G. Hansen and Moestrup 2000 (Fig. 5a-d)

*Synonyms:* *Gyrodinium aureolum* Hulburt 1957 (Hulburt 1957, pp. 196-219, Pl. 2, figs. 8-9; Von Drebes 1974, p. 117, fig. 100; Takayama *et al.* 1998, Pl. I, fig. 1; Hansen *et al.* 2000a, pp. 394-410, figs. 1-20, 22-35, 37-40, 44; Jung 2001, Pl. 3, figs. 1-2, Pls. 13-14; Yang *et al.* 2000, pp. 463-470)

세포는 계란형이며 때때로 구형의 세포가 관찰되었다. 세포의 길이 25.0-46.5  $\mu\text{m}$ , 폭 20.0-39.0  $\mu\text{m}$ 로 길이가 폭의 1.00-1.44배였다. 상추와 하추의 후단은 반구형이었으며, 하추가 상추보다 길어 횡구가 세포 중앙에서 약간 위쪽에 존재하였다. 단차는 세포 길이의 1/5 이상이었다. 종구는 세포 오른쪽으로 45° 정도로 굴곡되어 새끼 손가락 모양으로 상추를 함입하였다(Fig. 35a). 또한 후단으로 갈수록 폭이 넓어졌으며, 하추 왼쪽 열편의 영향으로 굴곡이 생겨 종구가 세포 왼쪽으로 휘어졌다(Fig. 5a, b). 상추구는 종구와 거의 맞닿아 정단을 일직선으로 가로지르며 상추 등쪽 1/2 정도 지점까지 이어졌다(Fig. 5a, c). 핵은 구형으로 세포 중앙부에 위치하였으며, 황색의 구형 또는 부정형의 엽록체는 내부에 피레노이드를 포함하였다(Fig. 5d).

#### 무각와편모조류의 분자계통 분석

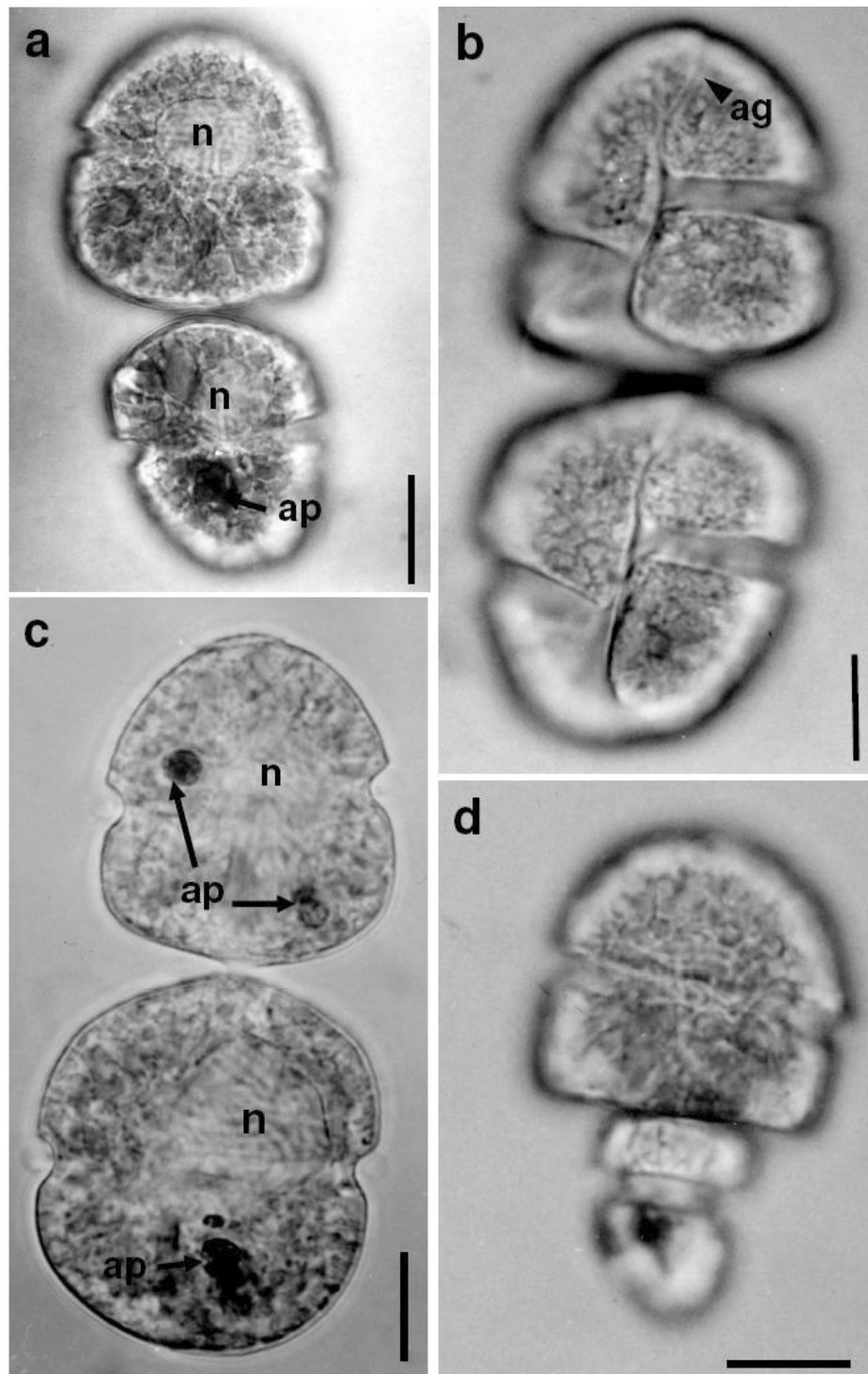
형태분석에 사용한 국내·외 12개 배양주의 genomic DNA를 추출하여 핵의 SSU rDNA를 PCR을 통해 분리하였다. 각각의 PCR 산물을 염기분석에 사용하여 SSU rDNA 약 1,750 bp를 얻었으며, Genbank에 Accession No. AY831410, AY831412, AY347309로 등록하였다. 또한 기존에 GenBank에 등록되어 있는 무각와편모조류의 SSU rDNA를 이용하여



**Fig. 3.** Light micrographs of *Gymnodinium catenatum*. Reticulating cell surface and vacuoles (arrow) are shown in the cells of a strain GnCt01 (a). A horse hoof-shaped apical groove (double arrow) is shown on the cell of strain GCCW991 (b). Arrows represent ridge structure on the cells of strain CCMP1940 (c) and strain GnCt01 (d). A nucleus (n) is positioned on central part of the cell. Chloroplasts are aggregated when the cell has aged (e). Fine lines on the surface of strain GnCt01 are clearly shown (f). Scale bar = 20  $\mu$ m.

이들의 염기유사도(similarity)와 유전적 거리(genetic distance)를 비교하였다(Table 2). SSU rDNA를 이용한 유전형은 동일 분류군 간에 높은 유사도를 보였다(> 99.0% 염기 유사도, < 0.0000 유전적 거리). *Cochlodinium polykrikoides*는 국내 배양주 간의 유전자형이 동일 하였으며(100% 염기 유사도, 0.0000 유전적 거리), *Gymnodinium catenatum* (< 99.9% 염기유사도, 0.0000 유전적 거리)과 *Gymnodinium impudicum* (< 99.9% 염기유사도, < 0.0006 유전적 거리)도 국내·외 배양주간의 유전자형이 동일하였다. *Akashiwo sanguinea* 국내

배양주(GnSg02, 03)간의 유전형은 염기유사도 99.8%, 유전적 거리 0.0006으로 조사되었으며, 북미해안에서 분리된 배양주(CCMP1593, 1837)간의 유전형은 염기유사도 99.8%, 유전적 거리 0.0012로 거의 동일하였으나, 지리적 차이에 따른 배양주 간의 유전형 비교에서는 <99.1% 염기유사도, 유전적 거리 >0.0067로 차이를 보였다. 특히 북미해안의 *A. sanguinea* CCMP1593, 1837은 같은 북미해안에서 분리된 GSU41085, AF276818과 높은 유사도(>99.5%, 미발표자료)를 보였으며, 이는 계통분석 결과에서도 같은 양상을 나타내



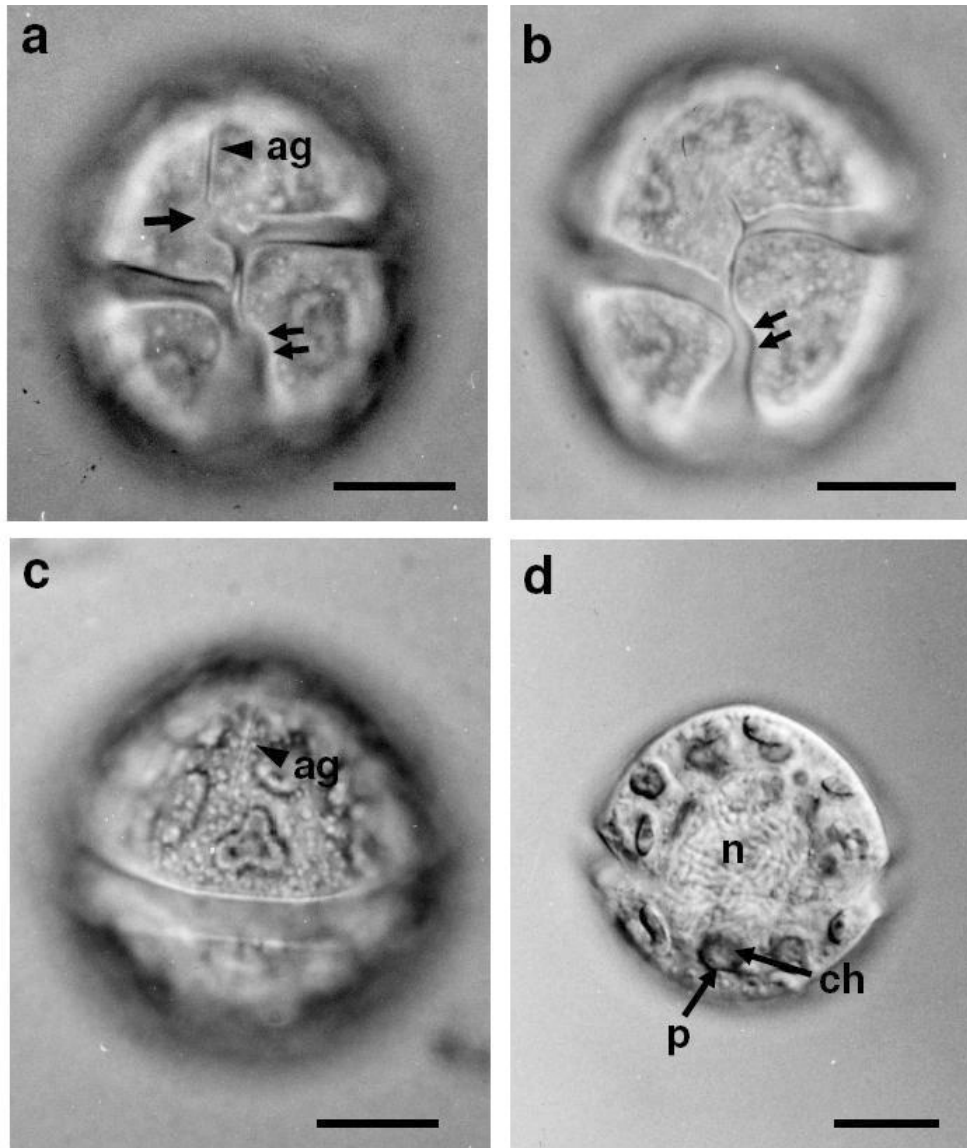
**Fig. 4.** Light micrographs of *Gymnodinium impudicum* from three strains Gnlp02 (a, c), GI-1cp (d) and CCMP1678 (b). An apical groove (arrowhead) is shown clearly on the epicone, and a nucleus (n) is located on central part of the cell; Aggregated pigments (ap) are occurred in the cells of strain Gnlp02 (a, c). Different sized cells in strain GI-1cp (d) from a chain or attach each other. Scale bar = 10  $\mu$ m.

었다 .

Gymnodinales 목을 구성하는 종의 SSU rDNA 염기서열을 이용하여 계통분석을 실시한 결과 NJ 방법과 MP방법에 의한 계통분석에서 크게 4개 분기군으로 구분되었다(Fig. 6):

Cluster I: *Amphidinium longum*, *Karlodinium micrum*, *Karenia brevis*, *Karenia aureolum*; Cluster II: *Akashiwo*, *Cochlodinium*; Cluster III: *Gyrodinium*; Cluster IV: *Gymnodinium*. ML에 의한 분석에서도 위와 유사한 분기군을 형성하였다(Fig. 7).





**Fig. 5.** Light micrographs of *Karenia aureolum* (= *Karenia mikimoto*) GrAr01. A cell has a linear apical groove (ag), finger-like extension on epicone as an arrow, and a curved sulcus as double arrows (a). Sulcus presses down the left lobe of hypocone and makes a shape of tie knot (b). An apical groove (ag) extended to dorsal part of the cell (c) and a nucleus (n) is located on central part of the cell; Chloroplasts (ch) are enclosed with pyrenoids (p). Scale bar = 10  $\mu$ m.

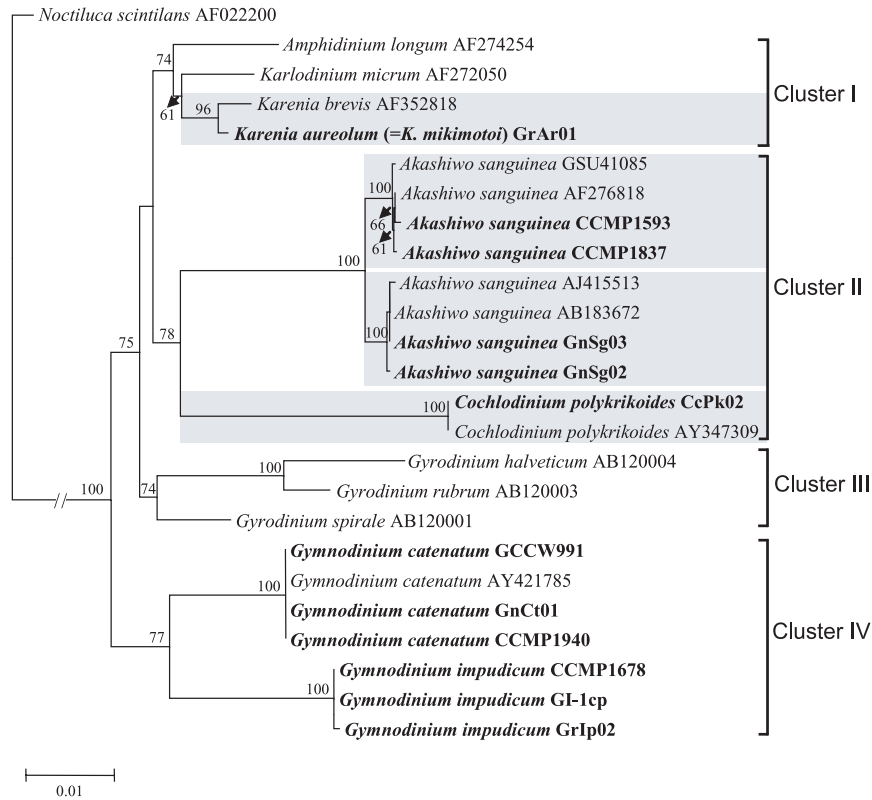
*Gymnodinium catenatum*과 *Gymnodinium impudicum*은 각각의 종이 동일 군집 내에서 뚜렷하게 분리되었으며, 배양주에 관계없이 종간에는 계통학적으로 동일한 위치를 형성 하였다 (100% bootstraps support). *K. aureolum*은 다른 *Gymnodinium* 속의 종들과 뚜렷이 분리되어 *Karenia*, *Karlodinium*의 종들과 동일 분기군을 이루었다.

## 고 찰

무각와편모조류인 Gymnodiniales는 Daugbjerg *et al.* (2000)에 의해 새로운 분류체계가 정립된 이후, 유럽(Hansen 2001; Botes *et al.* 2003; Hansen and Daugbjerg 2004;

Hansen and Moestrup 2005; Hansen *et al.* 2007), 호주(de Salas *et al.* 2003; 2004a, b), 뉴질랜드(Chang and Ryan 2004; Haywood *et al.* 2004), 일본(Takano and Horiguchi 2004), 중국(Shao *et al.* 2004), 홍콩(Yang *et al.* 2000; 2001) 등에서 활발하게 계통분류학적 연구가 진행되고 있다. 국내의 경우 이들의 분류학적 연구가 체계적으로 실시되지 않았기에, 국내 연안에 출현하는 대표적인 무각와편모조류 5종의 형태 및 분자계통학적 연구를 수행하였다.

국내에서 분리된 무각와편모조류 5종(*Akashiwo sanguinea*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium impudicum*, *Karenia aureolum*)의 형태적 특징은 기존의 문헌에 기재된 것과 거의 일치하였다. 이에 따라 국



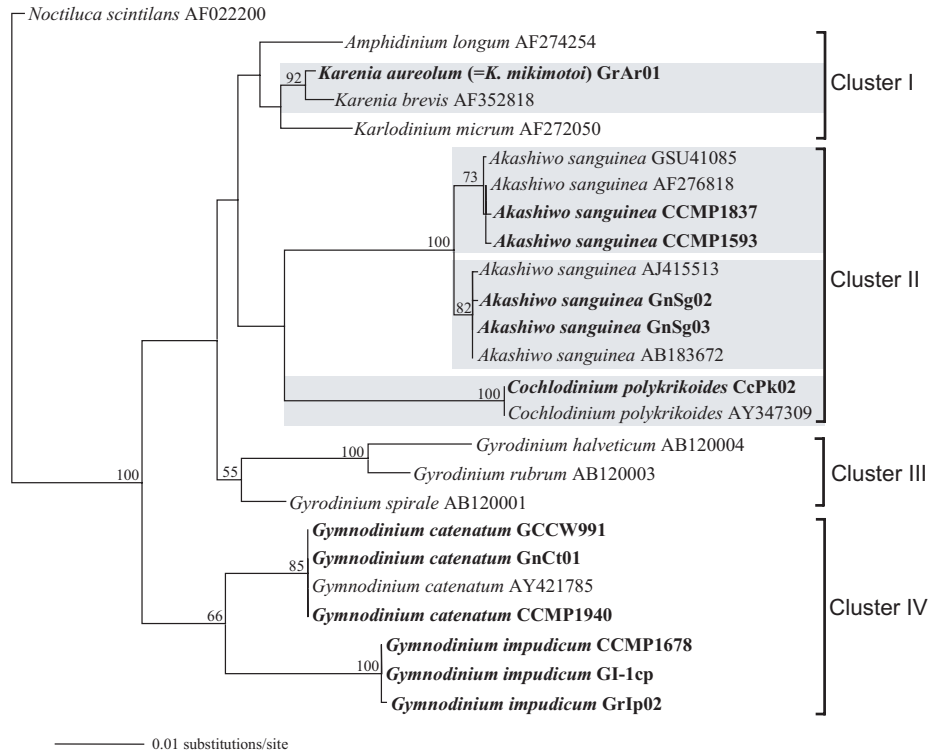
**Fig. 6.** Phylogenetic tree inferred by NJ method using PAUP\* 4.0b10 within the Gymnodiniales based on the SSU rDNA sequences. Bold represents SSU rDNA sequences revealed in this study. The dinoflagellate *Noctiluca scintilans* (Access. No. AF022200) was included as the out group. The numbers on the internal branches represent the values of bootstrap support (higher than 50%) in NJ Kimura 2-parameter model.

내 무각와편모조류는 해외에서 보고된 배양주와 형태적으로 차이가 거의 없다는 것이 본 연구를 통해 확인되었다. 특이점으로, *C. polykrikoides*의 엽록체는 세포 전체에 고루 분포한다고 보고되었으나(Hallegraeff *et al.* 1995; Steidinger and Tangen 1997; Jung 2001), 국내 배양주(CcPk02)의 엽록체는 주로 하부에 분포하였다(Fig. 2c). 이와 같은 차이는 *C. polykrikoides*의 현장시료와 배양주간에 나타나는 차이로서, *C. polykrikoides*의 현장 시료에서는 엽록체가 세포 전체에 고루 분포하는 것을 관찰 할 수 있었다(미발표자료). 또한 *C. polykrikoides*의 현장 시료와 CcPk02 배양주의 SSU rDNA 염기유사도에서도 현장 시료와 배양주 간의 유전적 동일함이 입증된 바 있다(Ki *et al.* 2004). 따라서 *C. polykrikoides*의 경우 엽록체의 위치는 분류기로 중요하지 않은 듯하다.

*Akashiwo sanguinea*는 세포의 형태적 변이가 크나 종구가 상추를 침입하지 않고 좌·우 열편이 뚜렷하게 나뉘어지는 점에서 다른 종과 쉽게 구별된다. 이와 같은 특징은 실험에 사용된 배양주(GnSg02, GnSg03, CCMP1593, CCMP1837)에서 모두 관찰되었다. 그러나 핵의 위치에서 국내 배양주인 GnSg02, GnSg03과 국외 배양주인 CCMP1593, CCMP1837 사이에 뚜렷한 차이를 보이고 있는데, 이는 SSU

rDNA의 염기서열 및 계통분석 결과에서도 유사한 결과를 보이고 있다(Fig. 6, 7). *A. sanguinea*는 GenBank에 등록된 다른 염기서열에서도 SSU rDNA가 뚜렷하게 두 개의 group으로 분리되는 것을 확인 할 수 있었다. Takayama and Matsuoka (1991), Hansen *et al.* (2000a)은 무각와편모조류에서 같은 종이라 할지라도 핵의 형태와 위치, 엽록체의 형태와 수 등의 형태적 차이가 관찰된다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 관찰된 *A. sanguinea*의 형태적 차이는 염기서열 차이에 의해 지지 받을 뿐 아니라, 이와 같은 유전적 차이는 ITS와 LSU rDNA 염기서열을 이용한 분석에서도 동일하게 나타나는 결과로서(미발표자료), 향후 이를 명확히 규명하기 위하여 색소분석과 TEM에 의한 미세구조 관찰과 같은 추가 연구가 필요하다.

*Cochlodinium*은 황구의 변위 및 편차 특징을 볼 때 *Gyrodinium*속과 매우 유사한데, 특히 사슬을 형성하는 측면에서 *Gymnodinium catenatum*이나 *Gymnodinium impudicum*과 유연관계가 가깝다고 판단되나, 유전자 분석에서는 독특한 분지 형태를 보였다. 즉, *Cochlodinium polykrikoides*는 두 개의 group으로 뚜렷이 분리된 *Akashiwo sanguinea*와 sister group을 형성하였다(Fig. 6, 7). 분류학적으로 *Gymnodini-*



**Fig. 7.** Phylogenetic tree inferred by ML method using PAUP\* 4.0b10 within the Gymnodiniales based on the SSU rDNA sequences. Bold represents SSU rDNA sequences revealed in this study. The dinoflagellate *Noctiluca scintilans* (Access. No. AF022200) was included as the out group. The numbers on the internal branches represent the values of bootstrap support (higher than 50%) in ML. The branch lengths are proportional to the number of substitutions per site.

nilaes에 속하는 *C. polykrikoides*는 유전자 분석을 통해 *A. sanguinea*와 같은 cluster를 형성하는 것이 최초로 밝혀졌다. 그러나 분자계통학적으로 근연 group을 형성한 북미산 *A. sanguinea*와 국내 *C. polykrikoides* 간의 형태적 유사성은 관찰할 수 없었다. 현재 *Cochlodinium*을 형성하는 종들 중, 국내에서 크게 문제가 되고 있는 *C. polykrikoides*에 대한 유전자 정보만이 국내 연구에서 유일하게 규명되었으므로 이들의 다양한 계통분석을 실시하지 못하였다. 향후 이들의 명확한 규명을 위해 다양한 배양주의 유전자를 이용한 계통분석에 관한 연구가 필요하다.

*Gymnodinium impudicum*의 형태적 특징은 기존의 기재 (Fraga *et al.* 1995)와 동일하였다. *G. impudicum*은 현장시료 관찰 시 *Cochlodinium polykrikoides*와 형태적으로 혼동을 일으킬 수 있으나, 횡구의 회전수와 분열방법에서 뚜렷하게 차이가 있음을 알 수 있었다. 외편모조류는 분열 방법이 다양하게 관찰되는데(Pfiester and Anderson 1987), 본 연구에서 *G. impudicum*은 딸세포가 모세포에서 작은 돌기처럼 생긴 후 차차 성장하여, 모세포의 크기와 동일해지는 분열방법이 관찰되었다. 이러한 분열 방법은 원생동물의 생식법인 출아법과 유사하여, *G. impudicum*의 분열 방법을 유사출아법 (budding-like division)이라 칭하였다. 이러한 분열 방법은

*G. impudicum*의 분열 중인 두 세포의 크기가 서로 큰 차이를 보이는 이유를 설명할 수 있다.

*Gymnodinium catenatum*은 정단이 뭉툭하며 세포 표면이 그물 구조를 이루고 때때로 굵은 주름이 관찰되어 다른 종과 쉽게 구별이 된다(Fig. 3). Takayama (2000)는 세포 표면의 주름 구조, 가는 선 구조, 유두상 구조 등이 *Gymnodinium* 속과 *Gyrodinium* 속 분류에 활용될 수 있음을 시사하였는데, 본 연구에서는 *G. catenatum*의 표면에서 유두상 구조에 의해 형성된 세선(細線)이 관찰되었다. 이는 표면의 주름 구조의 차이에 따른 유전적 차이가 동 종 내에서는 보이지 않는 것으로 나타나, 개체군 간 분류의 키로서는 활용이 어려울 것으로 판단된다. 유전자 분석결과에서 *Gymnodinium impudicum*과 *G. catenatum*은 배양주간의 유전적 차이가 거의 없는 것으로 조사되었으며, 두 종이 자매군을 형성하여 *Gymnodinium* 속의 유전적 유사성을 확인할 수 있었다.

*Gymnodinium aureolum*은 미국에서 기재되었던 종과 유럽에서 기재되었던 종 간의 동종 여부가 논란이 되었던 종으로서, 직선상의 상추구를 가지는 유럽산 *G. aureolum*은 *Karenia mikimotoi*의 이명으로 분류되고 있다(Daugbjerg *et al.* 2000). Hallegraef *et al.* (1995)과 Takayama *et al.* (1998)은 *G. aureolum*과 *K. mikimotoi*를 영양세포의 체폭, 유영 방식 그리

**Table 2.** Genetic distance (below diagonal) and similarity scores (above diagonal) estimated by the Kimura 2-parameter model between pairs of the aligned sequence data of the partial SSU rDNA from 13 *Gymnodiniales* strains (Similarity score = %)

No.	Species	Strain	Access. no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>A. sanguinea</i>	GnSg02	AY831410													
2	<i>A. sanguinea</i>	GnSg03	AY831412	0.0006												
3	<i>A. sanguinea</i>	CCMP2593	.	0.0073	0.0067											
4	<i>A. sanguinea</i>	CCMP1837	.	0.0073	0.0067	0.0012										
5	<i>C. polykrikoides</i>	CcPk02	.	0.0549	0.0543	0.0549	0.0549									
6	<i>C. polykrikoides</i>	CcPk06	AY347309	0.0549	0.0543	0.0549	0.0549	0.0000								
7	<i>G. catenatum</i>	GCCW991	.	0.0504	0.0510	0.0543	0.0536	0.0599	0.0599							
8	<i>G. catenatum</i>	GnCt01	.	0.0504	0.0510	0.0543	0.0536	0.0599	0.0599	0.0000						
9	<i>G. catenatum</i>	CCMP1940	.	0.0504	0.0510	0.0543	0.0536	0.0599	0.0599	0.0000	0.0000					
10	<i>G. aureolum</i>	GrAr01	.	0.0367	0.0361	0.0354	0.0348	0.0433	0.0433	0.0343	0.0343	0.0343				
11	<i>G. impudicum</i>	CCMP1678	.	0.0570	0.0576	0.0570	0.0563	0.0633	0.0633	0.0317	0.0317	0.0317	0.0381			
12	<i>G. impudicum</i>	GI-lcp	.	0.0570	0.0576	0.0570	0.0563	0.0633	0.0633	0.0317	0.0317	0.0317	0.0381	0.0000		
13	<i>G. impudicum</i>	Grip02	.	0.0576	0.0583	0.0576	0.0569	0.0639	0.0639	0.0324	0.0324	0.0324	0.0388	0.0006	0.0006	

고 핵의 위치와 형태에 따라 분류하였다. 본 연구에서 GrAr01은 엽록체의 수와 형태, 유영 방식, 핵의 위치와 형태에서 기존에 기재되었던 유럽산 *G. aureolum*과 거의 동일하였으나, 동중으로 기재된 *Karenia mikimotoi*의 다른 배양주와 비교했을 때 엽록체의 수와 형태, 핵의 위치와 형태에서 차이를 보였다(미발표자료). 또한 중구가 손가락 모양으로 상추구로 함몰되고 후단으로 만곡되어 내려가며, 좌·우 열편으로 뚜렷이 나뉘어 지지 않는 형태적 특징이 *K. mikimotoi*보다는 *Karenia digitata*와 유사하였다. SSU rDNA 분석에서도 GrAr01은 *Gymnodinium*이 포함된 분기군에 속하지 않고, *Karenia*를 포함하는 분기군에 속하였다(Fig. 7). 그러나 GrAr01은 회전하며 전진하는 유영 방식, 구형의 핵이 세포 중앙에 위치한다는 점과 엽록체의 수와 형태에서 *K. digitata*와 *K. mikimotoi*와 다른 형태적 특징을 보이고 있었다. 따라서 국내산 GnAr01의 정확한 분류학적 위치를 규명하기 위해서는 *K. digitata*와 *K. mikimotoi*의 초미세구조 및 유전자 분석 등의 비교 통해 이들의 관계를 명확하게 분석할 필요성이 있다.

본 연구를 통해 국내에서 보고된 무각와편모조류 5종의 형태적 특징이 명확하게 규명되었으며, 이들의 SSU rDNA 분석을 통해 해외에서 기재된 종과 거의 일치하지만 유영방법, 핵의 위치 및 엽록체의 형태와 수 등에서는 다소의 차이를 보이고 있었다. 이것은 국내에 출현하는 무각와편모조류인 *Akashiwo sanguinea*, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium impudicum*이 cosmopolitan species이지만, 지리적 차이에 따른 종의 분화 가능성을 시사하였으며, 이를 보다 구체적으로 규명하기 위해서는 종 수준 이하의 유전자분석이 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2006년 환경부의 한국자생생물 발굴조사사업(20060452) 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

김창훈, 신재범. 1997. 한국 연안의 유해·유독 적조 조류의 발생과 독생산. *Algae* 12: 269-276.  
 김학균. 2005. 해양적조. 다솜출판사. 467 pp.  
 김학균, 이삼근, 안경호. 1998. 한국연안의 적조-최근 적조의 발생 원인과 대책. 국립수산진흥원. 112 pp.  
 박종규, 박영식. 1999. *Cochlodinium polykoides*와 *Gyrodinium impudicum* 형태특성과 24S rRNA 유전자 염기서열 비교. 한국해양학회지 「바다」 4: 363-370.  
 문성기, 이삼근, 홍채규. 1995. *Prorocentrum* 속에 관한 연구. 한국환경생물학회지 4: 105-116.

유광일, 이준백. 1986. 마산만 일대 와편모조류의 분류학적 연구. I. *Prorocentrum* 속에 대하여. 한국해양학회지 21: 46-55.  
 심재형, 신은영, 최중기. 1981. 여수 근해의 쌍편모조류에 관한 분류학적 연구. 한국해양학회지 16: 57-98.  
 이삼근. 1991. 진해만에 출현하는 유독 와편모조류의 분류 및 분포에 관한 연구. 경상대학교 박사논문. 151 pp.  
 이삼근, 박주석, 김학균. 1993. 한국 남해 연안 해역에서 출현하는 유독 편모조류의 분류. 국립수산진흥원 연구보고 48: 1-24.  
 이진환. 1999. 한국연안에 있어서 적조발생과 식물플랑크톤 독성에 관한 개관. 환경생물학회지 17: 217-266.  
 한명수. 1990. 유독플랑크톤(와편모조류를 중심으로)에 관한 고찰. 한국수산학회지 23: 51-60.  
 한명수, 유광일. 1983a. 진해만의 쌍편모조류에 관한 분류학적 연구. 제 I 보: 유각류와 무각류. 해양연구소보 5: 37-47.  
 한명수, 유광일. 1983b. 진해만의 쌍편모조류에 관한 분류학적 연구. 제 II 보: 페리디니움목. 해양연구소보 5: 49-67.  
 Adachi M. and Irie H. 1981. *Red-tide manual*: II. Dinoflagellate. Red Tide Research Group, Tokyo, 172 pp.  
 Bergholtz T., Daugbjerg N., Moestrup Ø and Fernández-Tejedor M. 2005. On the identity of *Karlodinium veneficum* and description of *Karlodinium armiger* sp. nov. (Dinophyceae), based on light and electron microscopy, nuclear-encoded LSU rDNA, and pigment composition. *J. Phycol.* 42: 170-193.  
 Bolch C.J.S., Blackburn S.I., Hallegraeff G.M. and Vaillancourt R.E. 1999a. Genetic variation among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 35: 356-367.  
 Bolch C.J.S., Nergi A.P. and Hallegraeff G.M. 1999b. *Gymnodinium microreticulatum* sp. nov. (Dinophyceae): A naked, microreticulate cyst-producing dinoflagellate, distinct from *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium nolleri*. *Phycologia* 38: 301-313.  
 Botes L., Sym S.D. and Pitcher G.C. 2003. *Karenia cristata* sp. nov. and *Karenia bicuneiformis* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae): two new *Karenia* species from the South African coast. *Phycologia* 42: 563-571.  
 Chang F.H. and Ryan K.G. 2004. *Karenia concordia* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new nonthecate dinoflagellate isolated from the New Zealand northeast coast during the 2002 harmful algal bloom events. *Phycologia* 43: 552-562.  
 Cho E.S., Kim G.Y. and Cho Y.C. 2001. Molecular analysis of morphologically similar dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* based on internal transcribed spacer and 5.8S rDNA region. *Algae* 16: 53-57.  
 Costas E., Zardoya R., Bautista J., Garrido A., Rojo C. and Lopez-Rodas V. 1995. Morphospecies vs. genospecies in toxic marine dinoflagellates: An analysis of *Gymnodinium catenatum* / *Gyrodinium impudicum* and *Alexandrium minutum* / *A. lusitanicum* using antibodies, lectins, and gene sequences. *J. Phycol.* 31: 801-807.  
 Daugbjerg N., Hansen G., Larsen J. and Moestrup Ø. 2000. Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmored



- dinoflagellates. *Phycologia* **39**: 302-317.
- de Salas M.E., Bolch C.J.S. and Hallegraeff G.M. 2004a. *Karenia umbella* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new potentially ichthyotoxic dinoflagellate species from Tasmania, Australia. *Phycologia* **43**: 166-175.
- de Salas M.E., Bolch C.J.S. and Hallegraeff G.M. 2004b. *Karenia asterichroma* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new dinoflagellate species associated with finfish aquaculture mortalities in Tasmania, Australia. *Phycologia* **43**: 624-631.
- de Salas M.E., Bolch C.J.S., Botes L., Nash G., Wright W. and Hallegraeff G.M. 2003. *Takayama* gen. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new genus of unarmored dinoflagellates with sigmoid apical grooves, including the description of two new species. *J. Phycol.* **39**: 1233-1246.
- Dodge J.D. 1982. *Marine Dinoflagellates of the British Isles*. Her Majesty's Stationery Office, London, 303 pp.
- Ellegaard M., Christensen B.F. and Moestrup Ø. 1993. Temperature and salinity effects on growth of a non-chain-forming strain of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) established from a cyst from recent sediments in the sound (Oresund), Denmark. *J. Phycol.* **29**: 418-426.
- Ellegaard M. and Oshima Y. 1998. *Gymnodinium nolleri* Eliegaard et Moestrup sp. ined. (Dinophyceae) from Danish waters, a new species producing *Gymnodinium catenatum*-like cysts: molecular and toxicological comparisons with Australian and Spanish strains *Gymnodinium catenatum*. *Phycologia* **37**: 369-378.
- Fraga S., Bravo I., Delgado M., Franco J.M. and Zapata M. 1995. *Gyrodinium impudicum* sp. nov. (Dinophyceae), a non toxic, chain-forming, red tide dinoflagellate. *Phycologia* **34**: 514-521.
- Graham H.W. 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **62**: 259-261.
- Guillard R.R.L. and Ryther J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- Hallegraeff G.M., Anderson D.M. and Cembella A.D. 1995. *Manual on harmful marine microalgae*. IOC manuals and Guides No. 33. UNESCO. pp. 283-317.
- Han M.-S., Jeon J.K. and Kim Y.O. 1992. Occurrence of dinoflagellate *Alexandrium tamarense*, a causative organism of paralytic shellfish poisoning in Chinhae Bay, Korea. *J. Plankton. Res.* **14**: 1581-1592.
- Hansen G. 2001. Ultrastructure of *Gymnodinium aureolum* (Dinophyceae): Toward a further redefinition of *Gymnodinium sensu stricto*. *J. Phycol.* **37**: 612-623.
- Hansen G. and Daugbjerg N. 2004. Ultrastructure of *Gyrodinium spirale*, the type species of *Gyrodinium* (Dinophyceae), including a phylogeny of *G. dominans*, *G. rubrum* and *G. spirale* deduced from partial LSU rDNA sequences. *Protist* **155**: 271-294.
- Hansen G., Daugbjerg N. and Henriksen P. 2000a. Comparative study of *Gymnodinium mikimotoi* and *Gymnodinium aureolum*, comb. nov. (= *Gyrodinium aureolum*) based on morphology, pigment composition, and molecular data. *J. Phycol.* **36**: 394-410.
- Hansen G., Moestrup Ø. and Roberts K.R. 2000b. Light and electron microscopical observations on the type species of *Gymnodinium*, *G. fuscum* (Dinophyceae). *Phycologia* **39**: 365-376.
- Hansen G. and Moestrup Ø. 2005. Flagellar apparatus and nuclear chambers of the green dinoflagellate *Gymnodinium chlorophorum*. *Phycol. Res.* **53**: 169-181.
- Hansen G., Daugbjerg N. and Henriksen P. 2007. *Baldinia anauniensis* gen. et sp. nov.: a 'new' dinoflagellate from Lake Tovel, N. Italy. *Phycologia* **46**: 86-108.
- Haywood A.J., Steidinger K.A., Truby E.W., Bergquist P.R., Bergquist P.L., Adamson J. and MacKenzie L. 2004. Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand. *J. Phycol.* **40**: 165-179.
- Hulburt E.M. 1957. The taxonomy of unarmored dinophyceae of shallow embayment on Cape Cod, Massachusetts. *Biol. Bull. Mar. Lab. Woods Hole* **112**: 196-219.
- Jung M.K. 2001. *A taxonomical study on the free-living unarmored dinoflagellates in the South Sea of Korea*. Master's thesis, Inje University, Korea, 71 pp. (in Korean)
- Ki J.-S. 2005. *Development of single-cell PCR and low density microarray for the detection of harmful microalgae in aquatic ecosystem*. Ph. D thesis, Hanyang University, Korea, 179 pp.
- Ki J.-S. and Han M.-S. 2005. Molecular analysis of complete SSU to LSU rDNA sequence in the harmful dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Korean isolate, HY970328M). *Ocean Science Journal* **40**: 155-166.
- Ki J.-S., Jang K.-Y. and Han M.-S. 2004. Integrated method for single-cell DNA extraction, PCR amplification, and sequencing on ribosomal DNA from harmful dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoies* and *Alexandrium catenella*. *Mar. Biotechnol.* **6**: 587-593.
- Kim G.Y., Ha M.G., Cho E.S., Lee T.H., Lee S.J. and Lee J.D. 1999. Molecular identification of *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium sanguineum* by comparing the sequences of the internal transcribed spacers 1, 2 and 5.8S ribosomal DNA. *J. Fish. Sci. Tech.* **2**: 66-77.
- Kim K.Y. 2005. *Phylogenetic relationships of dinoflagellates in Korea based on nuclear ribosomal SSU and LUS region comparisons*. Ph. D thesis, Pukyong National University, Korea, 123 pp.
- Kimball J.F. and Wood E.J.F. 1965. A dinoflagellate with characteristics of *Gymnodinium* and *Gyrodinium*. *J. Protozool.* **12**: 577-580.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kofoed C.A. and Swezy O. 1921. *The free-living unarmored dinoflagellata*. Mem Univ. Calif., 564 pp.
- Lebour M.V. 1925. *The dinoflagellates of the Northern Sea*. Marine Biological Association of the United Kingdom, Plymouth, UK, 250 pp.
- Margalef R. 1961. Hidrografía y fitoplancton de un area marina de la costa meridional de Puerto Rico. *Inv. Pesq.* **18**: 33-96.
- Morey-Gaines G. 1982. *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): morphology and affinities with armoured forms. *Phycologia* **21**: 154-163.
- Pfiester L.A. and Anderson D.M. 1987. Dinoflagellate reproduction.

- In: Taylor F.J.R. (ed.). *The biology of dinoflagellates*. Blackwell, Oxford. pp. 611-648.
- Posada D. and Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.
- Richardson T.L. and Pinckney J.L. 2004. Monitoring of toxic dinoflagellate *Karenia brevis* using gyroxanthin-based detection methods. *J. Appl. Phycol.* **16**: 315-328.
- Schiller J. 1937. Dinoflagellatae(Peridiniaceae) in monographischer Behandlung. II. Teil, Lieferung 4. In: Rabenhorst L. (ed.), *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich and der Schweiz*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Germany. 417 pp.
- Silva E.S. 1967. *Cochlodinium heterolobatum* sp. nov.: Structure and some cytophysiological aspects. *J. Protozool.* **14**: 745-754.
- Shao P., Chen Y.-Q., Zhou H., Yuan J., Qu L.-H., Zhao D. and Lin Y.-S. 2004. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implications for species identification and phylogenetic analysis. *Mar. Biol.* **144**: 215-224.
- Shim J.H. 1994. *Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea, Vol. 34 Marine Phytoplankton*. Ministry of Education, Korea, 487 pp. (in Korean)
- Shin E.Y. 1999. *A taxonomical study on the thecate dinoflagellates of Korean coastal waters*. Ph. D thesis, Seoul National University, Korea, 240 pp.
- Stæhr P.A. and Cullen J.J. 2003. Detection of *Karenia mikimotoi* by spectral absorption signatures. *J. Plankton Res.* **25**: 1237-1249.
- Steidinger K.A. and Tangen K. 1997. Dinoflagellates. In: Tomas C.R. (ed.), *Identifying marine and dinoflagellate*. Academic Press, Inc., San Diego. pp. 387-588.
- Swofford D.L. 2002. *PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)*. V. 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA, 133 pp.
- Takano Y. and Horiguchi T. 2004. Surface ultrastructure and molecular phylogenetics of four unarmored heterotrophic dinoflagellates, including the type species of the genus *Gyrodinium* (Dinophyceae). *Phycol. Res.* **52**: 107-116.
- Takayama H. 2000. Morphological taxonomy of unarmored dinoflagellates *Gymnodinium* and *Gyrodinium*. *Bull. Plankton Soc. Japan* **47**: 44-46.
- Takayama H. and Matsuoka K. 1991. A reassessment of the specific characters of *Gymnodinium mikimotoi* Miyake et Kominami ex Oda and *Gymnodinium nagasakiense* Takayama et Adachi. *Bull. Plankton Soc. Japan* **38**: 53-68.
- Takayama H., Matsuoka K. and Fukuyo Y. 1998. A taxonomic study on *Gyrodinium aureolum* Hulnurt (Dinophyceae) from the morphological viewpoint based on materials collected in Japanese coastal waters. *Bull. Plankton Soc. Japan* **45**: 9-19.
- Takishita K., Nakano K. and Uchida A. 2000. Preliminary phylogenetic analysis of plastid-encoded genes from an anomalously pigmented dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* (Gymnodiniales, Dinophyta). *Phycol. Res.* **47**: 257-262.
- Takishita K. and Uchida A. 1999. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis psbA from the dinoflagellate: Origin of the dinoflagellate plastid. *Phycol. Res.* **47**: 207-216.
- Tangen K. and Björnland T. 1981. Observations on pigments and morphology of *Gyrodinium aureolum* Hulburt, a marine dinoflagellate containing 19'-hexanoyloxyfucoxanthin as the main carotenoid. *J. Plankton Res.* **3**: 389-401.
- Thompson J.D., Higgins D.G., and Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Von Drebes G. 1974. *Marine phytoplankton*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 117 pp.
- Yang Z.B., Hodgkiss I.J. and Hansen G. 2001. *Karenia longicanalis* sp. nov. (Dinophyceae): a new bloom-forming species isolated from Hong Kong, May 1998. *Bot. Mar.* **44**: 67-74.
- Yang Z.B., Takayama H. Matsuoka K. and Hodgkiss I.J. 2000. *Karenia digitata* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae), a new harmful algal bloom species from the coastal waters of West Japan and Hong Kong. *Phycologia* **39**: 463-470.
- Yuki K. and Yoshimatsu S. 1987. Morphology of the athecate dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in culture. *Bull. Plankton Soc. Japan* **4**: 109-117.
- Zhang H., Bhattacharya D. and Lin S. 2005. Phylogeny of Dinoflagellates based on mitochondrial cytochrome b and nuclear small subunit rDNA sequence comparisons. *J. Phycol.* **41**: 411-420.

---

Received 21 December 2007

Accepted 3 February 2008