

분자 모니터링을 이용한 서낙동강과 남해 연안 플랑크톤 군집 분석

김보경 · 이상래¹ · 이진애² · 정익교*

부산대학교 지구환경시스템학부

¹부산대학교 해양연구소

²인제대학교 환경공학부

Molecular Monitoring of Plankton Diversity in the Seonakdong River and Along the Coast of Namhae

BO KYUNG KIM, SANG-RAE LEE¹, JIN AE LEE² AND IK KYO CHUNG*

Division of Earth Environmental System, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

¹*Marine Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea*

²*School of Environmental Science and Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea*

플랑크톤의 종다양성은 특정 지역의 수계환경 변화 모니터링에 있어 중요 생태지표로서, 환경 평가에 유용한 정보로 사용되고 있다. 기존의 종다양성 평가는 주로 형태학적 형질에 근거한 종동정을 통해 이루어졌으나, 많은 시간과 전문성을 필요로 하고 연구자의 주관적 판단에 의존하는 단점이 있다. 따라서, 본 연구에서는 채수된 환경시료에 대해 보다 빠르고 정확한 플랑크톤 종다양성을 파악하기 위하여 분자마커를 활용한 분자모니터링 기법을 도입하였다. 서낙동강(김해교)과 남해 연안(남해도) 정점에서 각각 채수된 환경시료에서 DNA를 추출한 후 18S nuclear ribosomal RNA 유전자를 대상으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 클로닝 과정을 통해 만들어진 각각의 클론 라이브러리에서 클론을 무작위로 선택하여 제한효소절편다형성 패턴분석을 한 후 특이성을 가지는 클론을 선별하였다. 김해교에서는 60개 클론을 대상으로 44개의 특이적 클론을 선별하였고 남해에서는 150개 클론을 대상으로 27개의 클론을 선별하였다. 이들 클론들에 대한 염기서열 분석결과 다양한 계통분류군에 속하는 플랑크톤의 종조성 결과를 보여주었다(김해교: Heterokontophyta(7), Ciliophora(23), Dinophyta(1), Chytridiomycota(1), Rotifera(1), Arthropoda(11), 남해: Ciliophora(4), Dinophyta(3), Cryptophyta(1), Arthropoda(19)). 본 연구를 통하여 분자마커를 활용한 분자모니터링 기법이 기존 형태학적 형질에 근거한 분석이 가지는 한계를 보완하여 채수된 환경시료의 종조성 분석에 효율적으로 사용될 수 있다고 판단된다.

The biodiversity of eukaryotic plankton has commonly been used to evaluate the status of aquatic ecosystems. Therefore, an accurate and rapid method for species identification is needed to reveal the biodiversity of environmental water samples. To date, molecular methods have provided a great deal of information that has enabled identification of the hidden biodiversity in environmental samples. In this study, we utilized environmental polymerase chain reaction (PCR) and constructed the 18S nuclear ribosomal RNA clone library from environmental water samples in order to develop more efficient methods for species identification. For the molecular analysis, water samples were collected from the Seonakdong River (Gimhae Bridge) and the coast of Namhae (Namhaedo). Colony PCR and restriction fragment length polymorphism of PCR (PCR-RFLP) were then adopted to isolate unique clones from the 18S rDNA clone library. Restriction fragment length polymorphism pattern analysis of the Gimhae Bridge sample revealed 44 unique clones from a total of 60 randomly selected clones, while analysis of the Namhae sample revealed 27 unique clones from 150 clones selected at random. A BLAST search and subsequent phylogenetic analysis conducted using the sequences of these clones revealed hidden biodiversity containing a wide range of taxonomic groups (Heterokontophyta (7), Ciliophora (23), Dinophyta (1), Chytridiomycota (1), Rotifera (1) and Arthropoda (11) in the Gimhae Bridge samples Ciliophora (4), Dinophyta (3), Cryptophyta (1), Arthropoda (19) in the Namhae samples). Therefore, the molecular monitoring method developed here can provide additional information regarding the biodiversity and community structure of eukaryotic plankton in environmental samples and helps construct a useful database of biodiversity for aquatic ecosystems.

Keywords: Plankton, PCR-RFLP, Small Subunit Ribosomal RNA (18S rDNA), Diversity

*Corresponding author: ikchung@pusan.ac.kr

서 론

수생태계(aquatic ecosystem)에서 식물플랑크톤은 일차생산자로서 먹이 사슬의 바탕을 이루고, 동물플랑크톤은 일차소비자로 영양염 순환과정에 기여하는 동시에 어류나 다른 생물의 먹이로써 생태계의 먹이망 안에서 중요한 연결고리 역할을 한다(Boonsom, 1984; Kim *et al.*, 2000; Keckeis *et al.*, 2003). 플랑크톤 군집의 종다양성과 군집구조는 주변 환경의 물리화학적 변화에 민감하게 반응하기 때문에 플랑크톤은 수생태계의 상태를 반영해주는 생물학적 지표로 이용되고 있다(Leppard and Munawar, 1992; Cairns *et al.*, 1993; Bianchi *et al.*, 2003).

플랑크톤에 대한 종분류학적 연구는 주로 현미경 관찰을 통한 형태형질에 근거하는 종동정을 통해 이루어져 왔다. 그러나 형태형질에 근거한 종동정은 형태적 유사성에 따른 모호한 종개념 때문에 오랜 분류학적 지식과 경험을 가진 전문가 수준의 숙련도가 필요하며, 종동정에 있어 실험자 개인의 주관적인 견해가 많이 반영되기 때문에 정확한 종동정과 군집의 종다양성 데이터를 얻는 일에는 한계가 있다. 또한, 초미소 플랑크톤(picoplankton, 0.2-2.0 μm)과 같이 크기가 작은 경우에는 기존의 형태학적 연구에서 대부분 제외하였다. Campbell and Nolla(1994)는 이들이 해양생태계에서 일차생산 하는 생물 중에서 양적으로 우점하고 있고 서식지 또한 세계 여러 지역에 분포함에 따라 그 중요성을 강조한 바 있다. 이러한 형태형질에 따른 종동정의 단점을 보완하기 위해 최근에 분자마커를 활용한 분자생물학적인 방법을 종동정에 도입하고 있다. 박테리아나 단세포 진핵생물의 경우 이전부터 이런 한계에 따른 대안으로 분자생물학적인 방법을 사용해 왔고(Moon-van der Staay *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2005; Aguilo-Ferretjans *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008), Dawson and Pace(2002)는 small subunit ribosomal RNA(SSU rRNA) 염기서열을 바탕으로 무산소 퇴적물안의 초미

소 플랑크톤 군집과 진핵생물의 다양성을 밝힌 사례가 있다.

본 연구에서는 서낙동강의 김해교 인근의 담수역과 남해 소속도 근처 연안의 해수역을 대상으로 플랑크톤 종조성을 분자모니터링기법을 사용하여 비교하였다. 김해교의 경우 기존의 형태학적인 자료를 바탕으로 종조성 데이터가 많이 축적된 지역으로 환경시료에서 분자생물학적 방법을 사용한 연구는 아직 보고된 바 없어 기존의 연구와 비교하여 연구할만한 가치가 있다. 남해도 연안의 경우 현재까지 적조 원인종에만 국한되어 있으므로 유전정보를 바탕으로 하는 종다양성 연구는 본 연구에 사용된 결과로 생태계 기능을 파악하는 기초자료로 활용할 수 있을 것이다.

분자모니터링기법은 환경시료에서 DNA를 추출하여 18S rDNA 유전자를 대상으로 environmental Polymerase Chain Reaction(PCR)을 수행한 후 클로닝과 Restriction Fragment Length Polymorphism(PCR-RFLP)를 통해 확인된 유전자 염기서열 자료를 바탕으로 플랑크톤 종다양성을 분석하고자 하였다. 또한, 유전자 염기서열 정보를 구축하여 유전 정보에 기초한 계통분석을 통해 전반적인 수생태계의 플랑크톤 군집구조를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

조사지 개황

담수역 정점인 서낙동강의 김해교는 낙동강 본류와 달리 농업 용수를 공급하기 위해 만든 수문이 물의 자유로운 흐름을 방해하고 정체하게 만들어 부영양화가 심하다. 해수역 정점인 남해도 주변 해역은 가두리 어류양식과 패류양식, 생활하수에 의한 영양염 공급으로 인해 적조가 자주 일어나는 해역으로 기존보고에 의하면 특히, 여름에 *Cochlodinium*에 의한 적조현상이 빈번하게 나타난다(Fig. 1; 김과 신, 1997; 임 등, 2002).

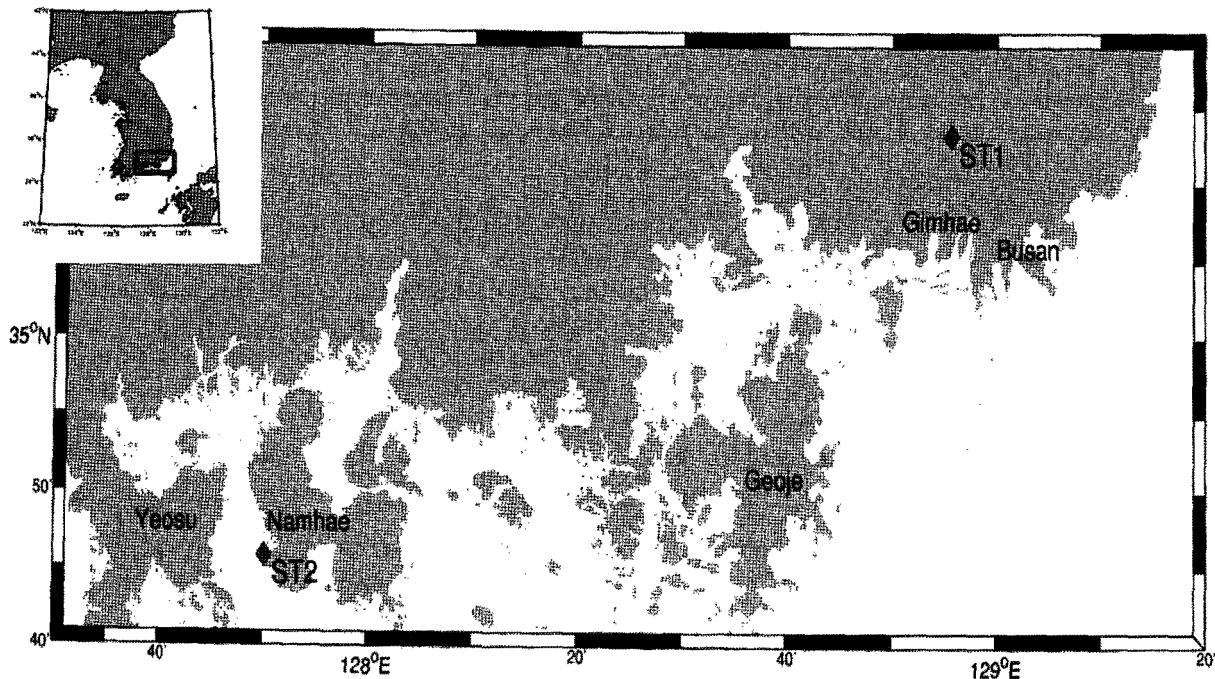


Fig. 1. The map of sampling sites (Gimhae Bridge and Namhae).

Table 1. The environmental parameter of freshwater sample at Gimhae Bridge (January, 2009) and seawater sample at Namhae (July, 2009)

	SA (Gimhae Bridge)	NH (Namhae)
Date (month, year)	January 3, 2009	July 30, 2009
Latitude, Longitude	35°13'17"N, 128°55'40"E	34°45'51"N, 127°50'09"E
Water Temperature (°C)	3.2	23.0
Salinity (psu)	0.29	28.00
DO (mg·L ⁻¹)	4.64 ± 0.05	2.36 ± 0.48
NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	0.710 ± 0.003	0.182 ± 0.016
NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	0.030 ± 0.001	0.019 ± 0.001
NH ₄ ⁺ (mg·L ⁻¹)	0.133 ± 0.022	0.005 ± 0.002
PO ₄ ⁻ (mg·L ⁻¹)	0.110 ± 0.019	0.067 ± 0.006
Chlorophyll <i>a</i> (μg·L ⁻¹)	2.46 ± 0.48	4.31 ± 1.21

채수 및 이화학적 분석

현장조사는 각기 정점에서 한 차례씩 이루어졌다(Table 1). 13:00 시에 채수한 시료는 분자생물실험에 이용하였고 물리, 화학적인 특성을 분석하기 위해 13:00 시를 포함해 전후, 10:00, 16:00 시로, 3시간 간격으로 채수 하여 냉장상태로 실험실로 운반하였다. 물리, 화학적인 요인을 분석할 시료는 채수기(Vandon water sampler)를 이용하였고, 분자 생물학적 분석용 시료는 시료의 오염을 최소화하기 위해 멸균된 플라스틱통을 이용하여 표층(해수표면에서 1 m)에서 채수하였다. 수온, 염분은 현장에서 CTD(Seabird, USA)를 이용하여 측정하였고 DO, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, PO₄⁻은 분광분석법으로(8453 UV-Visible Spectrophotometer, HP, USA)로 분석하였다(Parsons *et al.*, 1984). 환경시료에 존재하는 식물플랑크톤의 엽록소 추출을 위해 1 L씩 3번 GF/F filter(Glass fiber filter, 직경 47 mm, Advantec, pore size 0.7 μm)를 이용하여 여과한 후, 90% 아세톤 넣어 24시간 냉암소 상태에서 추출하여 분광분석법으로 측정하였다(Jeffrey and Humphrey, 1975).

DNA 추출

채수한 시료는 0.2 μm pore size filter(membrane filter mixed cellulose, 직경 47 mm, Advantec) paper로 여과한 뒤 여과지에 걸러진 생물을 DNeasy Plant Mini Kit(Quiagen, Germany)로 제조사의 프로토콜에 따라 DNA를 추출하였다. DNA 추출이 되었는지 확인하기 위해서 Lambda DNA/*Hind*III mark 3 μL, DNA 산물 3 μL을 100V, 45분 동안 1.8% agarose gel에서 전기영동하여 분리패턴을 확인한 후 -80 °C에서 보관하였다.

Environmental PCR

본 연구에서 사용된 environmental PCR, 클론 라이브러리구축 및 PCR-RFLP 과정은 Lee *et al.*(2010)에 따라 수행되었다. 추출한 총 DNA 산물 2 μL, DDW 8.5 μL, PCR master mix 2X(GenDEPOT, USA) 12.5 μL, forward primer, reverse primer를 각각 1 μL씩 첨가하여 반응부피를 25 μL로 맞춘 후 polymerase chain reaction (PCR)방법으로 증폭하였다(GeneAmp, PCR System 9700). 18S ribosomal RNA genes (18S rDNA)증폭을 위해 primer A(Medlin *et al.*, 1988)와 primer SSU-inR1(Lee *et al.*, 2010)를 사용하였다. 먼저, 95 °C에서 3분 동안 pre-denaturing 한 후, 94 °C에서 30초 동안 denaturing, 55 °C에서 30초 동안 annealing, 72 °C에서 1분 동

안 extension의 과정을 40회 반복 하였다. 마지막에는 72 °C에서 7분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR반응산물을 확인하기 위해서 100bp DNA Ladder marker Plus 3 μL, PCR반응산물 1 μL를 1.8% agarose gel에서 100V, 25분 동안 전기영동 후 확인하였다. 확인된 PCR반응산물은 High Pure PCR product Purification Kit(Roche, Germany)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 gel purification을 통하여 정제한 후 클로닝에 사용하였다.

클로닝(Cloning)

PCR과정을 통해 증폭된 PCR반응산물을 TOPO TA cloning Kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 클로닝을 실시하였다. LB plate의 흰색 colony를 선별하여 PCR master mix와 primer 한 쌍을 넣어 direct colony PCR을 수행하였다. PCR반응 결과물을 확인하기 위해서 colony PCR한 시료의 산물 1 μL, 100bp DNA Ladder marker Plus 1 μL를 100V, 25분 1.8% agarose gel에서 전기영동으로 분리한 결과를 확인하였다.

제한효소절편다형성(PCR-RFLP) 패턴 분석

4자리의 염기서열을 인식하는 제한효소 *Mse*I와 *Tsp*509I를 사용하여 반응시킨 후 100V, 1.8% agarose gel에서 25분 동안 전기영동한 후 RFLP 패턴 분석을 실시하였다(Lee *et al.*, 2010).

클론 염기서열과 계통분석

Colony PCR반응산물은 PCR purification kit(Roche, Germany)를 사용하여 정제하여 sequencing 할 시료를 만들었다. 정제한 산물은 100V, 35분 동안 1.8% agarose gel에서 전기영동한 결과를 확인하였다. 확인된 putative unique colony에 대한 colony PCR반응산물은 양방향으로 염기서열을 결정하였다(GenoTech, Korea). 분석된 electropherogram(chromatogram)들은 염기서열 분석프로그램 Sequencher 4.9(Genecode, USA)를 사용하여 개개의 peak의 염기서열을 분석한 후, 선택된 colony의 염기서열의 contig 서열을 확정하였다. 확인된 염기서열은 NCBI GenBank(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색을 통하여(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 유사도 분석(similarity analysis)을 실시하였다. 또한 분자계통분석을 위하여 분석된 GenBank내의 염기서열 중 유사도가 높은 순서대로 염기서열 정보들을 확보 한 후, 본 연구에서 밝혀진 클론 라이브러리의 18S rDNA 염기서열 분석 data matrix에

포함시켰다. 각 클론에 대해서 결정된 염기서열의 정렬은 Clustal X 프로그램(Jeanmougin *et al.*, 1998)과 MacClade 프로그램(Maddison and Maddison, 1991)을 이용하였고, 각 분류군의 계통학적인 분석을 위해 PAUP 4.0 프로그램에서 neighbor-joining방법(uncorrected-p model, midpoint rooting option(uncorrected-p model)으로 수정 보완하여 계통수를 완성하였다. Bootstrap 분석의 경우 2000 replicates를 적용하여 실시하였다(Swofford, 2001).

결 과

이화학적 특징

담수역과 해수역 정점을 대상으로 이화학적 특성을 분석한 결과 수온은 SA(김해교, 1월)시료에서 3.2 °C, NH(남해도 연안, 7월)시료에서 23.0 °C로 나타남에 따라 채수시기에 의해 값의 차이를 보였다. 한편, 염분은 SA에서 0.29 psu, NH에서 28.00 psu로 각각 담수와 해수의 특징을 나타냈다(Table 1).

DNA 추출, Environmental PCR 및 클로닝(Cloning)

DNA 추출 산물을 전기영동한 결과는 대략 Lambda DNA/*Hind*III marker의 10 kb에서 확인하였고, PCR결과 primer A/SSU-inR1에서 대략 600bp의 증폭산물을 확인하였다(Fig. 2).

Colony PCR 및 제한효소절편다형성(PCR-RFLP) 패턴 분석

Colony PCR한 산물은 전기영동으로 확인하였다. SA(김해교)시료는 60개 클론을 무작위로 택해서 RFLP 분석 하였다. 분석 결과 28개의 특이적 패턴을 확인하였고, NH(남해도 연안) 시료는 150개 클론을 무작위로 택해서 RFLP 패턴분석 한 결과 12개의 다른 패턴을 얻었다. 각기 시료의 염기서열 분석은 동일 RFLP 패턴내의 잠재적 염기서열 다양성을 고려하여 김해교 시료에서 44개, 남해시료에서 27개 클론을 분석하였다(Table 2).

분자계통학적 분석

각 정점에서 확인된 플랑크톤의 sequence 데이터에 대하여 분자계통분석을 실시하였다(Fig. 3과 4). SA(김해교)클론라이브러리의 경우 RFLP 패턴 분석을 통해 분석한 것 보다 염기서열 확인 후 더 많은 염기서열 다양성을 발견하였다. 계통분석 결과 Heterokontophyta (Bicosoecida(비코소에시다목 - 5%); Chrysophyceae, Synurophyceae

Table 2. Number of clone selection and RFLP pattern group

	Number of Clone	Number of Unique Pattern	Number of Sequencing
SA (Gimhae Bridge)	60	28	44
NH (Namhae)	150	12	27

(황갈조강, 시누라조강 - 11%)), Chytridiomycota(호상균문 - 2%), Ciliophora(섬모충류 - 53%), Dinophyta(외편모조식물문 - 2%), Arthropoda(Branchiopoda(새각류 - 16%); Crustacea(갑각류 - 7%); Copepoda(요각류 - 2%)), Rotifera(윤충류 - 2%)로 총 6개의 분류군으로 나타났고, Ciliophora가 클론 라이브러리에서 가장 많이 차지하였다. NH(남해도 연안) 데이터는 RFLP 패턴 분석 후 나누어진 그룹의 개수와 계통분석 결과의 그룹의 수가 동일하게 나타났다. 분류군은 Ciliophora(15%), Dinophyta(11%), Cryptophyta(은편모조식물문 - 4%), Arthropoda(Copepoda - 70%) 4개로 나타났고 Copepoda가 클론 라이브러리에서 가장 많이 차지하였다.

토 의

기존의 연구는 종동정을 위한 하나의 방편으로 플랑크톤 네트를 이용하여 채집한 시료를 토대로 형태형질에 근거하여 출현종을 확인하고 계절별년도별 자료를 축적하여 왔다. 하지만, 시료의 양에 비해 출현한 개체의 종류는 제한적인 결과를 보였다(정 등, 1994; 서 등, 2002; 이와 박, 2004). 이에 반해, 본 연구에서는 채수된 표층수 250 mL에서 얻어진 염기서열 데이터를 네트를 이용하여 얻어진 자료들과 비교해 본 결과 기존 지역에서 보고되지 않는 Fungi와 같은 분류군은 물론, 어느 한 개의 분류군에 치우치지 않고 다양한 분류군에 걸쳐 나타났다(Fig. 3과 4). 이는, 시료양적인 관점에서 상대적으로 더 효율적임을 알 수 있다.

RFLP 패턴분석에서는 SA(김해교)시료를 제한효소 2개만 사용하여 60개 클론중 28개의 각기 다른 패턴을 보인 결과와 달리 Medlin *et al.*(2006)는 다른 패턴 100개를 얻기 위해 제한효소를 8개 사용하여 colony selection하였다. 따라서, 본 연구는 제한효소 개수에서도 적고 앞선 연구보다 시간 및 비용 절감에서 효율적으로 사용할 수 있으며 재현성도 높다고 할 수 있다.

형태형질에 근거한 문(Phylum)수준의 상위분류계급(High level classification)의 경우, 연구자들 주관적 견해에 따라 상이한 그룹

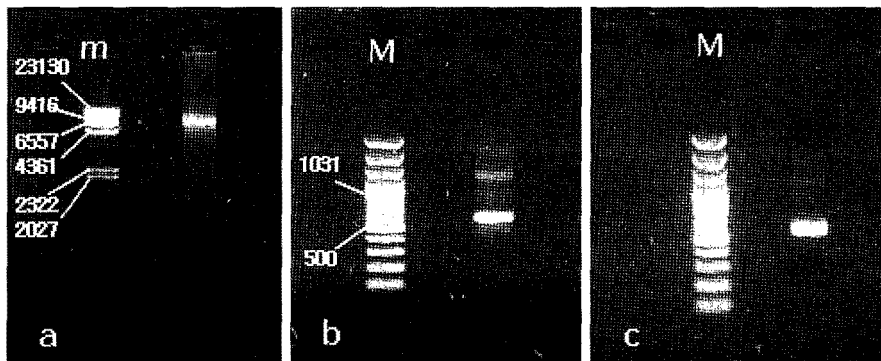


Fig. 2. Result of gel electrophoresis. (a) Total DNA extraction (b) Environmental PCR (c) Gel purification m: Lambda DNA/*Hind*III marker, M: 100bp DNA Ladder marker Plus.

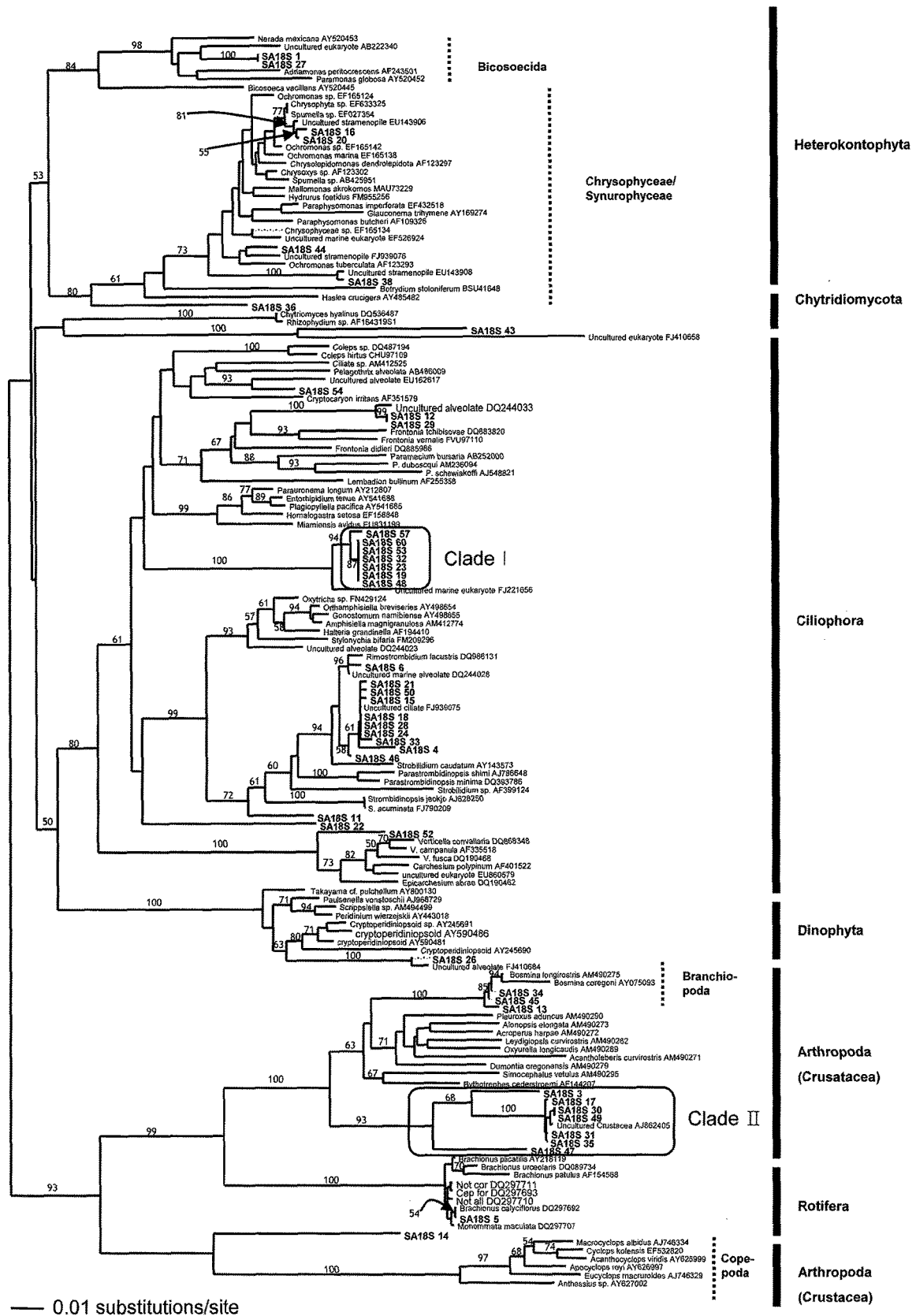


Fig. 3. Species diversity of the plankton sampled from SA (Gimhae Bridge). Phylogenetic tree obtained from 18S rDNA sequences of clone library.

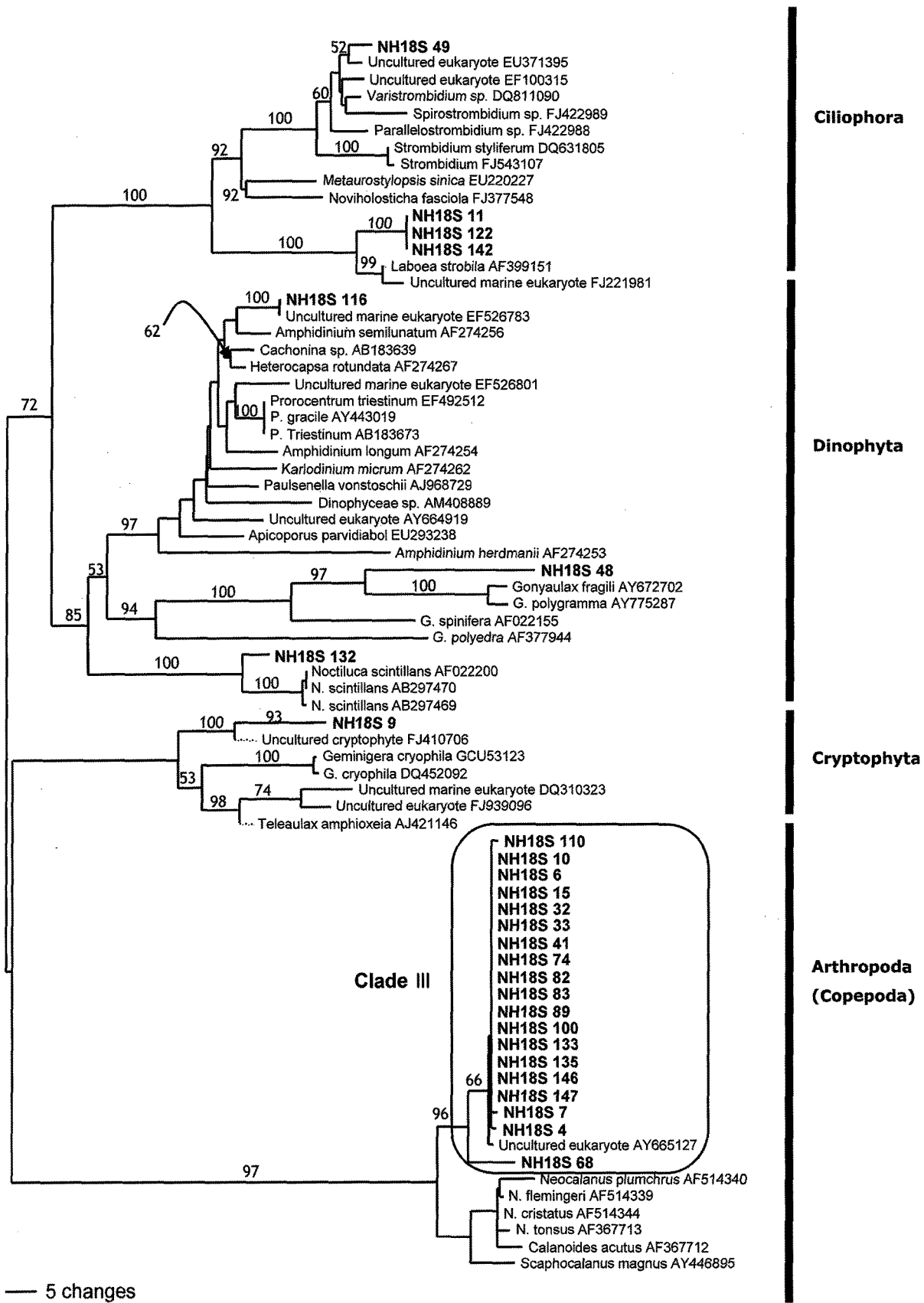


Fig. 4. Species diversity of the plankton sampled from NH (Namhae). Phylogenetic tree obtained from 18S rDNA sequences of clone library.

Table 3. SA(Gimhae Bridge) clones in clone libraries and phylogenetic affiliations of the representative clones sequence

Clone	Accession No.	Taxa (Phylum)	Blast search in NCBI	Size (bp)	Max score	Similarity
SA18S-1, 27	GU474385	Heterokontophyta	Uncultured eukaryote	504	763	AB222340, Identities = 485/516 (93%), Gaps = 19/516 (3%)
			<i>Nerada mexicana</i>		719	AY520453, Identities = 477/516 (92%), Gaps = 19/516 (3%)
			<i>Adriamonas peritocrescens</i>		717	AF243501, Identities = 478/518 (92%), Gaps = 19/518 (3%)
SA18S-3	GU474386	Arthropoda	<i>Bosmina longirostris</i>	549	808	AM490275, Identities = 519/556 (93%), Gaps = 16/556 (2%)
		Arthropoda	Uncultured Crustacea		787	AJ862405, Identities = 472/492 (95%), Gaps = 11/492 (2%)
SA18S-4	GU474387	Ciliophora	<i>Simocephalus vetulus</i>		765	AM490295, Identities = 517/563 (91%), Gaps = 21/563 (3%)
			Uncultured ciliate clone		911	FJ939075, Identities = 510/517 (98%), Gaps = 5/517 (0%)
SA18S-5	GU474388	Rotifera	<i>Rimostrombidium lacustris</i>		826	DQ986131, Identities = 491/518 (94%), Gaps = 6/518 (1%)
			<i>Brachionus calyciflorus</i>	529	974	DQ297692, Identities = 527/527 (100%), Gaps = 0/527 (0%)
SA18S-6	GU474389	Ciliophora	<i>Brachionus plicatilis</i>		957	AY218119, Identities = 524/527 (99%), Gaps = 0/527 (0%)
			<i>Brachionus urceolaris</i>		920	DQ089734, Identities = 509/514 (99%), Gaps = 2/514 (0%)
			<i>Brachionus patulus</i>		863	AF154568, Identities = 493/504 (97%), Gaps = 8/504 (1%)
SA18S-11	GU474390	Ciliophora	uncultured marine alveolate	517	944	DQ244028, Identities = 515/517 (99%), Gaps = 0/517 (0%)
			<i>Rimostrombidium lacustris</i>		880	DQ986131, Identities = 500/518 (96%), Gaps = 1/518 (0%)
SA18S-12, 29	GU474391	Ciliophora	uncultured alveolate	517	854	DQ244023, Identities = 495/511 (96%), Gaps = 2/511 (0%)
			<i>Oxytricha</i> sp. Ox_L1		830	FN429124, Identities = 497/520 (95%), Gaps = 4/520 (0%)
			<i>Halteria grandinella</i>		830	AF194410, Identities = 497/520 (95%), Gaps = 4/520 (0%)
SA18S-13	GU474392	Arthropoda	uncultured alveolate	495	898	DQ244033, Identities = 492/495 (99%), Gaps = 0/495 (0%)
			<i>Frontonia didieri</i>		710	DQ885986, Identities = 461/497 (92%), Gaps = 9/497 (1%)
			<i>Frontonia tchibisovae</i>		689	DQ883820, Identities = 458/498 (91%), Gaps = 10/498 (2%)
SA18S-14	GU474393	Arthropoda	<i>Frontonia vernalis</i>		676	FVU97110, Identities = 457/499 (91%), Gaps = 13/499 (2%)
			<i>Bosmina longirostris</i>	548	996	AM490275, Identities = 545/548 (99%), Gaps = 0/548 (0%)
			<i>Bosmina coregoni</i>		902	AY075093, Identities = 508/518 (98%), Gaps = 0/518 (0%)
SA18S-15	GU474394	Ciliophora	Cyclops kolensis	521	571	EF532820, Identities = 420/470 (89%), Gaps = 22/470 (4%)
SA18S-16	GU474395	Heterokontophyta	uncultured ciliate	516	944	FJ939075, Identities = 513/514 (99%), Gaps = 0/514 (0%)
			<i>Rimostrombidium lacustris</i>		852	DQ986131, Identities = 493/515 (95%), Gaps = 1/515 (0%)
			<i>Strobilidium caudatum</i>		804	AY143573, Identities = 485/516 (93%), Gaps = 5/516 (0%)
SA18S-17	GU474396	Arthropoda	uncultured stramenopile	516	937	EU143906, Identities = 513/516 (99%), Gaps = 0/516 (0%)
			Chrysophyta sp. JZH-2007-002		931	EF633325, Identities = 512/516 (99%), Gaps = 0/516 (0%)
			<i>Ochromonas</i> sp. CCMP1393		915	EF165142, Identities = 509/516 (98%), Gaps = 0/516 (0%)
SA18S-18, 24, 28	GU474397	Ciliophora	<i>Ochromonas marina</i>		898	EF165138, Identities = 507/517 (98%), Gaps = 2/517 (0%)
			Uncultured Crustacea	543	883	AJ862405, Identities = 482/484 (99%), Gaps = 0/484 (0%)
			<i>Bosmina longirostris</i>		774	AM490275, Identities = 510/552 (92%), Gaps = 13/552 (2%)
SA18S-19, 23, 32, 48, 53, 60	GU474398	Ciliophora	<i>Simocephalus vetulus</i>		723	AM490295, Identities = 512/565 (90%), Gaps = 30/565 (5%)
			uncultured ciliate	517	955	FJ939075, Identities = 517/517 (100%), Gaps = 0/517 (0%)
			<i>Rimostrombidium lacustris</i>		863	DQ986131, Identities = 497/518 (95%), Gaps = 1/518 (0%)
SA18S-20	GU474399	Heterokontophyta	<i>Strobilidium caudatum</i>		815	AY143573, Identities = 489/519 (94%), Gaps = 5/519 (0%)
			<i>Parastrombidinopsis minima</i>		808	DQ393786, Identities = 486/510 (95%), Gaps = 2/510 (0%)
			uncultured marine eukaryote	509	894	FJ221656, Identities = 502/510 (98%), Gaps = 3/510 (0%)
SA18S-21	GU474400	Ciliophora	<i>Cryptocaryon irritans</i>		662	AF351579, Identities = 471/523 (90%), Gaps = 17/523 (3%)
			<i>Pelagothrix alveolata</i>		658	AB486009, Identities = 468/520 (90%), Gaps = 16/520 (3%)
			uncultured stramenopile	516	948	EU143906, Identities = 515/516 (99%), Gaps = 0/516 (0%)
SA18S-22	GU474401	Ciliophora	Chrysophyta sp. JZH-2007-002		942	EF633325, Identities = 514/516 (99%), Gaps = 0/516 (0%)
			<i>Spumella</i> sp. GOT220		942	EF027354, Identities = 514/516 (99%), Gaps = 0/516 (0%)
			<i>Ochromonas</i> sp. CCMP1393		926	EF165142, Identities = 511/516 (99%), Gaps = 0/516 (0%)
SA18S-22	GU474401	Ciliophora	uncultured ciliate	517	950	FJ939075, Identities = 516/517 (99%), Gaps = 0/517 (0%)
			<i>Rimostrombidium lacustris</i>		857	DQ986131, Identities = 496/518 (95%), Gaps = 1/518 (0%)
			<i>Strobilidium caudatum</i>		809	AY143573, Identities = 488/519 (94%), Gaps = 5/519 (0%)
SA18S-22	GU474401	Ciliophora	uncultured alveolate	513	761	EU162617, Identities = 483/516 (93%), Gaps = 10/516 (1%)
			Ciliate sp. NCMS060		664	AM412525, Identities = 471/522 (90%), Gaps = 20/522 (3%)

Table 3. Continued.

Clone	Accession No.	Taxa (Phylum)	Blast search in NCBI	Size (bp)	Max score	Similarity
SA18S-26	GU474402		uncultured alveolate	523	920	FJ410684, Identities = 503/505 (99%), Gaps = 1/505 (0%)
		Dinophyta	<i>Paulsenella vonstoschii</i>		817	AJ968729, Identities = 500/527 (94%), Gaps = 7/527 (1%)
			Cryptoperidiniopsis sp. PLO21		797	AY245691, Identities = 496/527 (94%), Gaps = 6/527 (1%)
SA18S-30, 49	GU474403	Arthropoda	Uncultured Crustacea	543	889	AJ862405, Identities = 483/484 (99%), Gaps = 0/484 (0%)
SA18S-31, 35	GU474404	Arthropoda	Uncultured Crustacea	543	889	AJ862405, Identities = 483/484 (99%), Gaps = 0/484 (0%)
SA18S-33	GU474405	Ciliophora	uncultured ciliate	517	944	FJ939075, Identities = 515/517 (99%), Gaps = 0/517 (0%)
			<i>Rimostrombidium lacustris</i>		852	DQ986131, Identities = 495/518 (95%), Gaps = 1/518 (0%)
			<i>Strobilidium caudatum</i>		809	AY143573, Identities = 488/519 (94%), Gaps = 5/519 (0%)
SA18S-34, 45	GU474406	Arthropoda	<i>Bosmina longirostris</i>	548	1013	AM490275, Identities = 548/548 (100%), Gaps = 0/548 (0%)
			<i>Bosmina coregoni</i>		918	AY075093, Identities = 511/518 (98%), Gaps = 0/518 (0%)
SA18S-36	GU474407	Heterokontophyta	uncultured marine eukaryote	510	749	EF526924, Identities = 433/446 (97%), Gaps = 3/446 (0%)
			Chrysophyceae sp. CCCM41		749	EF165134, Identities = 433/446 (97%), Gaps = 3/446 (0%)
			<i>Ochromonas</i> sp. aestuarii		747	EF165124, Identities = 435/449 (96%), Gaps = 6/449 (1%)
SA18S-38	GU474408	Heterokontophyta	uncultured stramenopile	517	944	EU143908, Identities = 515/517 (99%), Gaps = 0/517 (0%)
			<i>Hydrurus foetidus</i>		804	FM955256, Identities = 494/521 (94%), Gaps = 10/521 (1%)
			<i>Mallomonas akrokomos</i>		782	MAU73229, Identities = 491/522 (94%), Gaps = 11/522 (2%)
SA18S-43	GU474409	Chytridiomycota	uncultured eukaryote	522	534	FJ410658, Identities = 387/433 (89%), Gaps = 12/433 (2%)
			<i>Chytrium hyalinus</i>		414	DQ536487, Identities = 429/525 (81%), Gaps = 26/525 (4%)
			<i>Rhizophydium</i> sp. UGA-F15		409	AF164319S1, Identities = 428/525 (81%), Gaps = 26/525 (4%)
SA18S-44	GU474410	Heterokontophyta	uncultured stramenopile	515	880	FJ939076, Identities = 506/519 (97%), Gaps = 8/519 (1%)
			<i>Ochromonas tuberculata</i>		861	AF123293, Identities = 499/515 (96%), Gaps = 2/515 (0%)
SA18S-46	GU474411	Ciliophora	uncultured ciliate	517	944	FJ939075, Identities = 515/517 (99%), Gaps = 0/517 (0%)
SA18S-47	GU474412	Arthropoda	<i>Bosmina longirostris</i>	547	675	AM490275, Identities = 496/555 (89%), Gaps = 25/555 (4%)
			Uncultured Crustacea		654	AJ862405, Identities = 450/493 (91%), Gaps = 20/493 (4%)
SA18S-50	GU474413	Ciliophora	uncultured ciliate	517	950	FJ939075, Identities = 516/517 (99%), Gaps = 0/517 (0%)
			<i>Rimostrombidium lacustris</i>		857	DQ986131, Identities = 496/518 (95%), Gaps = 1/518 (0%)
			uncultured eukaryote	499	845	EU860579, Identities = 484/497 (97%), Gaps = 2/497 (0%)
SA18S-52	GU474414	Ciliophora	<i>Vorticella campanula</i>		833	AF335518, Identities = 485/501 (96%), Gaps = 3/501 (0%)
			<i>Vorticella fusca</i>		826	DQ190468, Identities = 483/500 (96%), Gaps = 3/500 (0%)
			<i>Carchesium polypinum</i>		811	AF401522, Identities = 480/500 (96%), Gaps = 2/500 (0%)
			uncultured alveolate	514	856	EU162617, Identities = 484/494 (97%), Gaps = 2/494 (0%)
SA18S-54	GU474415	Ciliophora	Ciliate sp. NCMS0601		741	AM412525, Identities = 478/514 (92%), Gaps = 10/514 (1%)
			<i>Cryptocaryon irritans</i>		708	AF351579, Identities = 477/520 (91%), Gaps = 16/520 (3%)
			uncultured marine eukaryote	509	878	FJ221656, Identities = 499/510 (97%), Gaps = 3/510 (0%)

으로 나뉘고 있으므로, 본 연구에서는 클론 라이브러리 데이터는 문이상 분류군에서 van den Hoek *et al.* (1995)의 분류체계를 사용하였다. 각 정점에서 출현한 플랑크톤 18S sequence 데이터로 계통학적인 분석을 실시한 결과, SA(김해교)는 RFLP 패턴 분석으로 분류한 것 보다 염기서열 확인 후 분류했을 때 훨씬 더 많은 염기다양성을 보였다. 이는, 같은 RFLP 패턴을 보이더라도 제한 효소에 의해 잘리는 부위 이외의 구간에서 염기 변이가 포함될 수 있기 때문이다. 계통분석결과 SA(김해교)와 비교에서 NH(남해도 연안)은 상대적으로 적은 클론다양성을 보였고 패턴분석에서도 동일한 결과를 보였다(Table 2). 남해도 연안시료에서 더 많은 클론의 염기서열을 분석함에도 불구하고 이런 결과를 나타남에 따라 채수되었던 시료 환경을 대표하고 있을 것이라고 판단된다.

SA(김해교) 클론 라이브러리에서 Ciliophora가 차지하는 비율이 가장 높았다(Table 3; Fig. 3). 이런 결과는 무작위로 colony selection을 할 때 Ciliophora를 선택했을 가능성도 있지만 채수시기와 연관시켜서 실제로 많은 양을 차지 할 수도 있다고 판단된다. SA18S-

6은 uncultured alveolate DQ244028과 99%의 유사도를 보이고, 그 다음 밝혀진 종으로는 Ciliophora의 *Rimostrombidium lacustris*와 96%의 유사도를 보였다. 이 종은 우리나라 팔당호에서 섬모충 플랑크톤으로 보고되었던 것으로 크기는 대략 32~70 μm 이고, 시기로는 5월에 peak를 보이며, 부영영화 호에 출현함에 따라 주로 오염된 수역에서 서식하는 종으로 알려져 있다(문 등., 2004). 한편, 클론 SA18S-5, SA18S-12, SA18S-29, SA18S-34, SA18S-45는 속 (Genus)수준에서 알 수 있다. SA18S-12, 29는 uncultured alveolate DQ244033와의 유사도 값이 99%로 나타났지만 계통수의 분지 패턴(Fig. 3)을 보아 *Frontonia didieri*, *F. ichibisovae*, *F. vernalis*와 근연관계를 가지므로 *Frontonia* sp.로 판단하였다. *Frontonia* sp.는 해양과 담수에서 흔하게 발견되는 종이지만(Rosati *et al.*, 2001; Dias and D'Agosto, 2006; Long *et al.*, 2008), 형태데이터가 부족하여 기존의 현미경을 통한 종동정은 한계가 있으므로 구체적인 종명에 대해서는 추후 본 분류군에 대한 추가연구의 필요성을 제시하였다. SA18S-34, 45은 염기서열이 똑같고 Crustacea의 Banchiopoda

Table 4. NH(Namhae) clones in clone libraries and phylogenetic affiliations of the representative clones sequence

Clone	Accession No.	Taxa (Phylum)	Blast search in NCBI	Size (bp)	Max score	Similarity
NH18S-4	GU474373		Uncultured eukaryote	526	961	AY665127, Identities = 525/527 (99%), Gaps = 2/527 (0%)
		Arthropoda	<i>Neocalanus cristatus</i>		867	AF514344, Identities = 510/529 (96%), Gaps = 5/529 (0%)
NH18S-6, 15, 32, 33, 41, 74, 82, 83, 89, 100,133, 135, 146, 147	GU474374		Uncultured eukaryote	526	966	AY665127, Identities = 525/526 (99%), Gaps = 0/526 (0%)
		Arthropoda	<i>Neocalanus cristatus</i>		872	AF514344, Identities = 510/528 (96%), Gaps = 3/528 (0%)
			<i>Neocalanus tonsus</i>		861	AF367713, Identities = 505/524 (96%), Gaps = 2/524 (0%)
			<i>Neocalanus flemingeri</i>		856	AF514339, Identities = 506/529 (95%), Gaps = 5/529 (0%)
			<i>Neocalanus plumchrus</i>		854	AF514340, Identities = 507/530 (95%), Gaps = 7/530 (1%)
			<i>Calanoides acutus</i>		850	AF367712, Identities = 503/525 (95%), Gaps = 4/525 (0%)
NH18S-7	GU474375		Uncultured eukaryote	525	953	AY665127, Identities = 523/526 (99%), Gaps = 1/526 (0%)
		Arthropoda	<i>Neocalanus cristatus</i>		861	AF514344, Identities = 508/528 (96%), Gaps = 4/528 (0%)
NH18S-9	GU474376	Cryptophyta	Uncultured cryptophyte	555	795	FJ410706, Identities = 453/464 (97%), Gaps = 2/464 (0%)
		Cryptophyta	<i>Geminigera cryophila</i>		741	DQ452092, Identities = 459/486 (94%), Gaps = 8/486 (1%)
			<i>Teleaulax amphioxeia</i>		704	AJ421146, Identities = 443/472 (93%), Gaps = 8/472 (1%)
NH18S-10	GU474377		Uncultured eukaryote	527	961	AY665127, Identities = 525/527 (99%), Gaps = 1/527 (0%)
		Arthropoda	<i>Neocalanus cristatus</i>		869	AF514344, Identities = 510/529 (96%), Gaps = 4/529 (0%)
NH18S-11, 122, 142	GU474378	Ciliophora	<i>Laboea strobila</i>	517	863	AF399151, Identities = 502/518 (96%), Gaps = 6/518 (1%)
			uncultured marine eukaryote		852	FJ221981, Identities = 500/518 (96%), Gaps = 6/518 (1%)
NH18S-48	GU474379	Alveolata	<i>Gonyaulax polygramma</i>	523	695	AY775287, Identities = 481/530 (90%), Gaps = 13/530 (2%)
			<i>Gonyaulax fragilis</i>		593	AY672702, Identities = 439/492 (89%), Gaps = 24/492 (4%)
			<i>Gonyaulax spinifera</i>		555	AF022155, Identities = 441/506 (87%), Gaps = 21/506 (4%)
			<i>Gonyaulax polyedra</i>		429	AF377944, Identities = 418/504 (82%), Gaps = 27/504 (5%)
NH18S-49	GU474380		uncultured eukaryote	521	929	EU371395, Identities = 515/521 (98%), Gaps = 0/521 (0%)
		Ciliophora	<i>Varistrombidium</i> sp. Kielum		891	DQ811090, Identities = 505/516 (97%), Gaps = 1/516 (0%)
			<i>Parallelostrombidium</i> sp. GD-08031804		872	FJ422988, Identities = 505/521 (96%), Gaps = 1/521 (0%)
			<i>Spirostrombidium</i> sp. 1-GD-08010304		861	FJ422989, Identities = 503/521 (96%), Gaps = 1/521 (0%)
NH18S-68	GU474381		uncultured eukaryote	528	894	AY665127, Identities = 516/530 (97%), Gaps = 7/530 (1%)
		Arthropoda	<i>Neocalanus cristatus</i>		835	AF514344, Identities = 506/531 (95%), Gaps = 8/531 (1%)
NH18S-110	GU474382		uncultured eukaryote	526	961	AY665127, Identities = 524/526 (99%), Gaps = 0/526 (0%)
		Arthropoda	<i>Neocalanus cristatus</i>		867	AF514344, Identities = 509/528 (96%), Gaps = 3/528 (0%)
NH18S-116	GU474383		uncultured marine eukaryote	525	970	EF526783, Identities = 525/525 (100%), Gaps = 0/525 (0%)
		Dinophyta	<i>Amphidinium semilunatum</i>		874	AF274256, Identities = 511/529 (96%), Gaps = 8/529 (1%)
			<i>Amphidinium longum</i>		845	AF274254, Identities = 503/523 (96%), Gaps = 11/523 (2%)
			<i>Amphidinium herdmanii</i>		780	AF274253, Identities = 498/532 (93%), Gaps = 15/532 (2%)
NH18S-132	GU474384	Dinophyta	<i>Noctiluca scintillans</i>	511	867	AF022200, Identities = 497/511 (97%), Gaps = 0/511 (0%)

에 속하는 것으로 BLAST searching 유사도 분석결과 염기서열이 *Bosmina longirostris*와 100%일치하였다. 따라서, 이 클론들은 *Bosmina longirostris*라고 판단하였다. *Bosmina longirostris*는 대부분 부유성으로 연못이나 호수에서 서식하는 종으로 *Bosmina* sp.는 계절에 따라 형태가 변화함에 따라 형태학적으로 정확한 동정이 쉽지 않다는 결과가 있다(Kappes and Sinsch, 2002). SA18S-5은 *Brachionus calyciflorus*와 유사도는 100%를 보였고 밝혀진 종들과의 유사도 분석결과 윤충류에 속하는 *Brachionus calyciflorus*와 *B. urceolaris*, *B. patulus*와 근연관계에 있음을 알 수 있다. Fig. 3에서 Clade I과 Clade II로 묶여있는 클론들은 계통수에서의 분지형태를 보아 지금까지 보고되지 않은 독특한 진화 계통으로 판단된다. 따라서, 이러한 계통분류군의 존재는 환경시료에서 아직까지 밝혀지지 않은 높은 종다양성의 존재를 의미한다고 볼 수 있다.

한편, 해수역 정점은 담수역 정점과 달리 계통수가 단순하였고 Copepoda에 속하는 클론의 수가 가장 많았다(Table 4; Fig. 4). 남해도 연안 클론라이브러리에서 NH18S-11, 122, 142는 같은 RFLP 패턴을 보인 동시에 염기서열도 서로 일치하였다. 이 클론들은 *Laboea strobila*와 96% 유사도를 보였다. *Laboea strobila*는 미세동물플랑크톤(microzooplankton)의 빈섬모충류중 하나로 대략 60-100 µm 크기로, 전 세계 연안에 분포하며 혼합영양하는 종이다 (Stoecker et al., 1987). 우리나라 제주도에서 1998년 8월에 우점종으로 보고된 바 있지만 현재까지 한 종만 보고되었다(김과 이, 2003). NH18S-116은 BLAST searching을 통해서 유사도를 분석한 결과 uncultured eukaryote EF52683과 100%일치하고, *Amphidinium semilunatum*, *A. longum*, *A. herdmanii*와의 근연관계로 보아 *Amphidinium* sp. 분류군 수준에서 확인할 수 있다. *Amphidinium*

sp.는 저서 외편모조류로 전 세계적으로 모래에서 풍부하게 서식한다고 보고되어 있다(Fenchel, 1967). NH18S-48은 *Gonyaulax polygramma*, *G. fragilis*, *G. spinifera*, *G. polyedra*와 근연관계에 있는 종으로, *Gonyaulax* sp.라 볼 수 있다. *G. polygramma*는 우리나라 남해안을 포함하여 일본, 남아프리카에서 bloom을 일으키는 종으로 산소를 고갈시켜 어류 폐사의 원인이 되기도 한다고 알려져 있다(Grindley and Taylor, 1962; Morton and Villareal, 1998; Cho, 2005). NH18S-132은 *Noctiluca scintillans*와 97%의 유사도를 보였다. *Noctiluca scintillans*는 종속영양 외편모류인 적조생물로서, 전 세계 연안에서 대량 출현하는 종이다. 생태적 기능으로는 무독성이나 암모니아를 생산하고, 산소 고갈을 유도해서 수산생물에게 피해를 입히는 것으로 알려져 있다(Huang and Qi, 1997; Smayda, 1997; Montani et al., 1998). 남해가 적조발생이 빈번한 지역이라 볼때, 적조생물은 항상 편재해 있는 것을 알 수 있다. NH18S-10과 NH18S-7은 RFLP 패턴분석에서는 같은 그룹으로 속했지만, NH18S-147과 비교했을 때 염기서열이 각각 1bp, 2bp 차이가 나고 계통수의 분지패턴도 NH18S-147과 약간 다르게 나타났다. 이에 반해, Fig. 4에서 Clade III에 속하는 클론들은 염기서열이 같았다(NH18S-6; NH18S-15; NH18S-32; NH18S-33; NH18S-41; NH18S-74; NH18S-82; NH18S-83; NH18S-89; NH18S-100; NH18S-133; NH18S-135; NH18S-146; NH18S-147).

결 론

본 연구는 환경시료에서 플랑크톤 종조성 분석에 분자마커를 활용한 분자모니터링기법을 통해 생물다양성 자료를 구축하고자 하였다. 조사정점인 담수역의 서낙동강과 해수역의 남해도 연안시료에서 직접 DNA추출, PCR, 클로닝 과정을 통해 18S rDNA 클론 라이브러리를 확보하였으며, 제한효소 2개를 사용하여 보다 효율적으로 PCR-RFLP패턴을 확인 할 수 있었다. 18S rDNA 염기서열에 대한 계통학적인 분석결과 지금까지 보고된 바 없는 많은 수의 유전다양성과 특이적인 계통군을 발견할 수 있었다. 이는, 지금까지 현미경관찰을 통해 알려진 것 보다는 많은 생물종이 수생태계에 존재하고 있다고 판단된다. 따라서, 보다 세밀한 채수계획, 즉, 계절단위나 연간단위, 월별 단위 등 세분화 하여 지속적인 모니터링이 수행된다면 수생태계의 종다양성에 대한 보다 체계적이고 정확한 정보를 축적할 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 국토해양부 ‘해조류를 이용한 온실가스 저감기술 개발’ 연구개발사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 김요해, 이준백, 2003. 제주도 남부해역의 부유성 섬모충류의 종조성과 계절변동. 한국해양학회지 바다, 8: 59-69.
- 김창훈, 신재범, 1997. 한국 연안의 유해·유독 적조조류의 발생과 독성생산. Algae, 12: 269-276.
- 문은영, 김영옥, 김백호, 공동수, 한명수, 2004. 팔당호 섬모충 플랑크톤의 분류 및 생태학적 연구. 한국육수학회지, 37: 149-179.
- 서호영, 이인태, 윤양호, 최상덕, 이삼노, 한명일, 김병섭, 강운호, 이우범, 2002. 가막만에 출현하는 동물플랑크톤의 종조성과 계절별 출현 양상. 환경생물학회지, 20: 118-129.
- 이평강, 박철, 2004. 망목 크기가 동물플랑크톤 분포 자료 및 군집해석에 미치는 영향. 한국해양학회지 바다, 9: 13-19.
- 임월애, 정창수, 이창규, 조용철, 이삼근, 김학균, 정익교, 2002. 2000년 여름 남해안에 나타난 *Cochlodinium polykrikoides* 우점 적조의 발생 특성. 한국해양학회지 바다, 7: 68-77.
- 정준, 김한순, 김용재, 1994. 낙동강 하구댐의 식물플랑크톤 군집 구조. 한국육수학회지, 27: 33-46.
- Aguilo-Ferretjans, M.M., R. Bosch, C. Martin-Cardona, J. Lalucat and B. Nogales, 2008. Phylogenetic analysis of the composition of bacterial communities in human-exploited coastal environments from Mallorca Island (Spain). Syst. Appl. Microbiol., 31: 231-240.
- Bianchi, F., F. Aciri, F.B. Aubry, A. Berton, A. Boldrin, E. Camatti, D. Cassin and A. Comaschi, 2003. Can plankton communities be considered as bio-indicators of water quality in the Lagoon of Venice? Mar. Pollut. Bull., Pollution Bulletin, 46: 964-971.
- Boonsom, J., 1984. Zooplankton feeding in the fish *Trichogaster pectoralis* Regan. Hydrobiologia, 113: 217-221.
- Cairns, J., P.V. McCormick and B.R. Niederlehner, 1993. A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. Hydrobiologia, 263: 1-44.
- Campbell, L. and H.A. Nolla, 1994. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. Limnol. Oceanogr., 39: 954-961.
- Chen, M., F. Chen, Y. Yu and J. Ji, 2008. Genetic Diversity of Eukaryotic Microorganisms in Lake Taihu, a Large Shallow Subtropical Lake in China. Microb. Ecol., 56: 572-583.
- Cho, E.S., 2005. First report on *Gonyaulax polygramma* (Gonyaulacales, Dinophyceae) blooms in the Yeosu waters of the South Sea of Korea. J. Environ. Sci. (Korea), 14: 639-647.
- Dawson, S.C. and N.R. Pace, 2002. Novel kingdom-level eukaryotic diversity in anoxic environments. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 8324-8329.
- Dias, R.J.P. and M. D'Agosto, 2006. Feeding behavior of *Frontonia leucas* (Ehrenberg) (Protozoa, Ciliophora, Hymenostomatida) under different environmental conditions in a lotic system. Rev. Bras. Zool., 23: 758-763.
- Fenchel, T., 1967. The ecology of marine microbenthos. I. The quantitative importance of ciliates as compared with metazoans in various types of sediments. Ophelia, 4: 121-138.
- Grindley, J.R. and F.J.R. Taylor, 1962. Red water and marine fauna mortality near Cape Town. Trans. roy. Soc. S. Afr., 37: 111-130.
- Huang, C. and Y. Qi, 1997. The abundance cycle and influence factors on red tide phenomena of *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae) in Dapeng Bay, the south China Sea. J. Plankton Res., 19: 303-318.
- Jeanmougin, F., J.D. Thompson, M. Gouy, D.G. Higgins and T.J. Gibson, 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem. Sci., 23: 403-405.
- Jeffrey, S.W. and G.F. Humphrey, 1975. New Spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanz.,

- 167: 191–194.
- Kappes, H. and U. Sinsch, 2002. Morphological variation in *Bosmina longirostris* (O. F. Muller, 1785) (Crustacea: Cladocera): consequence of cyclomorphosis of indication of cryptic species? *J. Zoolog. Syst. Evol. Res.*, **40**: 113–122.
- Keckeis, S., C. Baranyi, T. Hein, C. Holarek, P. Riedler and F. Schiemer, 2003. The significance of zooplankton grazing in a floodplain system of the River Danube. *J. Plankton Res.*, **25**: 243–253.
- Kim, H.W., S.J. Hwang and G.J. Joo, 2000. Zooplankton grazing on bacteria and phytoplankton in a regulated large river (Nakdong River, Korea). *J. Plankton Res.*, **22**: 1559–1577.
- Lee, S.-R., J.H. Oak, I.K. Chung and J.A. Lee, 2010. Effective molecular examination of eukaryotic plankton species diversity in environmental seawater using environmental PCR, PCR-RFLP and sequencing. *J. Appl. Phycol.*, (DOI 10.1007/s10811-010-9509-7).
- Leppard, G.G. and M. Munawar, 1992. The ultrastructural indicators of aquatic ecosystem health. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**: 309–317.
- Long, H., W. Song, K.A.S. AL-Rasheid, Y. Wang, Z. Yi, S.A. Al-Quraishy, X. Lin and S.A. AL-Farraj, 2008. Taxonomic studies on three marine species of *Frontonia* from northern China: *F. didieri* n. sp., *F. multinucleata* n. sp. and *F. tchibisovae* Burkovsky, 1970 (Ciliophora: Peniculida). *Zootaxa*, **1687**: 35–50.
- Maddison, W.P. and D.R. Maddison, 1991. *MacClade: analysis of phylogeny and character evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Medlin, L.K., H.J. Elwood and S. Stickel, 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, **71**: 491–499.
- Medlin, L.K., K. Metfies, H. Mehl, K. Wiltshire and K. Valentin, 2006. Picoeukaryotic Plankton Diversity at the Helgoland Time Series Site as Assessed by Three Molecular Methods. *Microb. Ecol.*, **52**: 53–71.
- Montani, S., S. Pithakpol and K. Tada, 1998. Nutrient regeneration in coastal seas by *Noctiluca scintillans*, a red tide causing dinoflagellate. *J. Mar. Biotechnol.*, **6**: 224–228.
- Moon-van der Staay, S.Y., R. De Wachter and D. Vaulot, 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, **409**: 607–610.
- Morton, S.L. and T.A. Villareal, 1998. Bloom of *Gonyaulax polygramma* Stein (Dinophyceae) in a coral reef mangrove lagoon, Douglas Cay, Belize. *Bull. Mar. Sci.*, **63**: 1–4.
- Parsons, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli, 1984. *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*. Pergamon Press, New York, 173 pp.
- Richards, T.A., A.A. Vepritskiy, D.E. Gouliamova and S.A. Nierzwicki-Bauer, 2005. The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages. *Environ. Microbiol.*, **7**: 1413–1425.
- Rosati, G., L. Modeo, G. Petroni and S. Bertolini, 2001. Flagellated endosymbiotic bacteria in a marine *Frontonia* sp. (Oligohymenophorea, Peniculida). *Protistology*, **2**: 48–53.
- Smayda, T.J., 1997. What is bloom? A commentary. *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 1132–1136.
- Stoecker, D.K., A.E. Michaels and L.H. Davis, 1987. Large proportion of marine planktonic ciliates found to contain functional chloroplasts. *Nature*, **326**: 790–792.
- Swofford, D.L., 2001. *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- van den Hoek, C., D.G. Mann and H.M. Jahns, 1995. *Algae: An introduction to phycology*, Cambridge University Press, United Kingdom.

2010년 2월 14일 원고접수

2010년 2월 26일 수정본 채택

담당편집위원: 박명길