

남해안에서 분리한 유독 와편모조류 *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): 형태, 분자계통학적 특성 및 온도와 염분에 따른 성장 특성

한경하¹, Li Zhun¹, 강병준^{1,2}, 윤주연¹, 신현호^{1,*}

¹한국해양과학기술원 해양시료도서관, ²부경대학교 해양학과

Toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) from the southern coast of Korea: morphology, phylogeny and effects of temperature and salinity on growth

Kyong Ha Han¹, Zhun Li¹, Byeong Jun Kang^{1,2}, Joo Yeon Youn¹ and Hyeon Ho Shin^{1,*}

¹Library of Marine Samples, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Geoje 53201, Republic of Korea

²Department of Oceanography, Pukyong University, Busan 48513, Republic of Korea

*Corresponding author

Hyeon Ho Shin
Tel. 055-639-8440
E-mail. shh961121@kiost.ac.kr

Received: 31 December 2018

Revised: 2 February 2019

Revision accepted: 15 February 2019

Abstract: The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from the southern coast of Korea was described under light and scanning electron microscopy, and its large subunit (LSU) rDNA was sequenced. In addition, the effects of temperature and salinity on its growth were investigated. The cells of *G. catenatum*, as viewed under the electronic microscope, were green-brown color, 38.1–77.4 μm in length and 26.1–40.8 μm in width. The epicone was conical, while the hypocone was trapezoidal. The nucleus was located at the central part of the cell. The apical groove was horseshoe-shaped and small pores were irregularly distributed on the cell surface. Molecular phylogeny based on LSU rDNA gene sequences showed that the Korean *G. catenatum* and previously reported species formed a monophyletic clade within *Gymnodinium sensu stricto* clade. The maximum growth rate of 0.37 day^{-1} , was obtained at 25°C and 35 psu, and the maximum cell density of 1,073 cells mL^{-1} , was observed at 20°C and 25 psu. However, *G. catenatum* did not grow at temperature < 15°C and < 30°C. These results suggest that environmental conditions of summer and autumn in the southern coast of Korea may be favorable for the growth of *G. catenatum*.

Keywords: *Gymnodinium catenatum*, morphology, LSU rDNA, temperature, salinity

서 론

와편모조류(dinoflagellate)는 크게 유각(armoured)과 무각(unarmoured)의 형태로 구분된다. 유각 와편모조류

는 주로 판 배열(plate formula)과 판의 형태적 차이, 정공판(apical pore plate) 및 연쇄군 형성(chain formation)의 유무를 통해 종의 동정(identification)이 가능하고, 무각와편모조류는 상추구 모양(apical groove), 핵의 위치, 엽록

체의 위치 및 분포 등과 같은 형태적 특징을 바탕으로 종을 동정할 수 있다(Daugbjerg *et al.* 2000). 이러한 형태적 특징은 주로 광학현미경(light microscope)과 주사전자현미경(scanning electron microscope)으로 관찰이 가능하다(e.g. Ellegaard *et al.* 1993; Hansen *et al.* 2000). 하지만, 해석적 특성에서 기인하는 다양한 해양환경학적인 요인의 영향과 생활사(life cycle)에 따라 외편모조류의 형태적 변이가 발생할 수 있기 때문에(Kimball and Wood 1965; Yuki and Yoshimatsu 1987), 1990년대 이후부터 분자계통학적 특성 연구(phylogenetic analysis)를 통해 종의 분류 및 동정을 명확히 하고 있다(e.g. Bolch *et al.* 1999; Daugbjerg *et al.* 2000; Hansen *et al.* 2000). 특히, 외편모조류의 계통 분류 연구에는 리보솜 DNA 유전자(rDNA)의 소단위체(small subunit; SSU)와 대단위체(large subunit; LSU)가 주로 이용된다.

Gymnodinium catenatum Graham은 적조를 일으키고, 마비성 패류독(paralytic shellfish poison; PSP)을 생산하는 유해성 무각외편모조류이다(Graham 1943; Balech 1964). 이런 이유에서, 이 종의 전 세계적 분포 특성 및 확산과 관련하여 많은 연구가 수행되어 왔다(Matsuoka and Fukuyo 1994; Lee *et al.* 2001; Hallegraef *et al.* 2012). *G. catenatum*은 1939년 미국 California에서 형태적 특징에 대한 기록(morphological description)과 함께 처음으로 보고되었으며(Graham 1943), 아르헨티나, 멕시코 등의 온대해역에서 주로 나타나는 것으로 알려져 있다(Hallegraef *et al.* 2012; Cembella and Band-Schmidt 2018). 그리고, 한국과 가까운 일본에서도 1980년대에 서 일본의 일부 해역에서 출현이 처음으로 보고되었고, 1990년대에는 중앙 일본과 북 일본까지 출현 범위가 확장되었다(Matsuoka and Fukuyo 1994). 이 시기에 맞추어 1991년 한국에서도 처음으로 이 종의 출현에 관한 보고가 있었고(Kim *et al.* 1996), 현재는 남해안에서 광범위하게 나타나는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.* 2001). 하지만, 한국 연안에서 *G. catenatum*의 출현 기록은 주로 생태학적 연구를 기반으로 알려져 왔고, 구체적 형태와 분자계통학적 정보는 충분히 제시되어 있지 않다.

일반적으로 PSP의 발생은 패류의 먹이 원인 유해성 식물플랑크톤(harmful phytoplankton)의 종류와 섭취량에 의해 결정되는데, 적조와 같은 유해성 식물플랑크톤의 대발생(harmful algal bloom)이 PSP의 발생과 연관이 있는 것으로 알려져 있다(Oshima *et al.* 1987). *G. catenatum*의 적

조는 주로 호주 남동부인 Tasmania, 미국 Iberia 및 멕시코 태평양연안에서 보고되었다(Cembella and Band-Schmidt 2018). Tasmania에서는 1980년에 첫 적조가 관찰된 이후, 1986년부터 높은 패류독소가 검출되어 수산업에 악영향을 끼치고 있다(Blackburn *et al.* 1989; Hallegraef *et al.* 1995).

적조는 원인종의 대발생을 유도할 수 있는 수온, 염분, 영양염, 종간 경쟁 등 다양한 이화학적, 생물학적 요인에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다(Doucette and Harrison 1990; Steidinger *et al.* 1998; Wong *et al.* 1998). 특히, 연안해역에서 나타나는 수온과 염분은 적조의 발생과 소멸에 깊은 연관성이 있다(Juhl *et al.* 2000). 한국의 경우, *G. catenatum*을 원인으로 한 대규모 적조와 PSP 발생은 아직까지 보고된 적이 없다. 하지만, 이 종의 적조가 주로 온대해역에서 발생한다는 연구결과들은 *G. catenatum*이 한국에서도 적조를 발생할 수 있는 잠재적 원인 종이라는 것을 나타낸다.

따라서, 본 연구는 광학현미경과 주사전자현미경을 이용하여 한국 남해역에서 분리된 *G. catenatum*의 형태적 특징을 기록하고, LSU rDNA 분석을 통해 이 종의 계통학적 정보를 제시한다. 그리고 본 종의 성장 특성에 영향을 미치는 온도와 염분 조건을 파악한다.

재료 및 방법

1. *Gymnodinium catenatum* 분리 및 배양

*G. catenatum*의 분리를 위하여, 2016년 8월 16일 남해안(위경도: 34°29'7.68"N, 128°28'54.54"E)에서 플랑크톤 넷(20 µm mesh)를 이용하여 시료를 채집하였다(Fig. 1). 채집된 시료는 선상에서 광학현미경 관찰을 통해 Pasteur pipette을 이용하여 세포를 분리한 후, 96-well culture plate(Eppendorf, Hamburg, Germany)에 접종하였다. 접종된 세포는 실험실로 운반하기 전까지 선상에서 mini digital incubator(Benchmark Scientific, NJ, USA)를 이용하여 온도 20°C에서 배양하였다.

선상에서 확보한 세포는 광학현미경을 통해 세포 상태를 확인하고, 6-well culture plate(Eppendorf, Hamburg, Germany)에 접종하여 온도 20°C, 염분 30 psu 및 광량 100 µmol m⁻² s⁻¹에서 유지 배양을 하였다. 그리고, 이후 확보

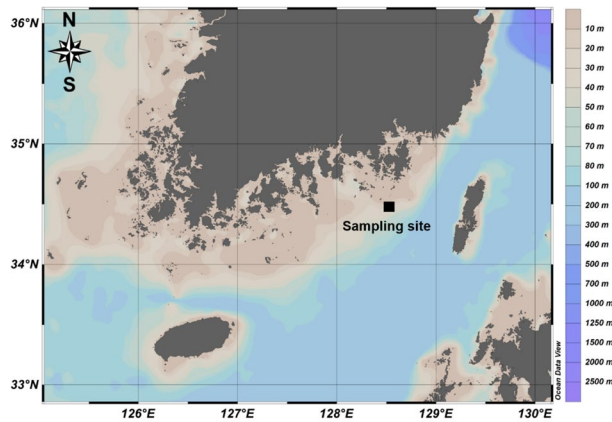


Fig. 1. Location of the sampling site in the southern coast of Korea.

된 배양주 (strain)는 한국해양과학기술원 해양시료도서관 (lims.kiost.ac.kr)에 위치한 해양식물플랑크톤 기탁등록보존기관에 LIMS-PS-2604로 등록하였다.

2. *Gymnodinium catenatum*의 형태적 관찰

*G. catenatum*의 형태적 특징은 광학현미경 (Primo Vert; Zeiss, Germany)과 주사전자현미경 (JOEL Ltd, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 주사전자현미경을 이용한 세포 관찰을 위해 배양주는 사산화오스뮴 (osmium tetroxide; OsO_4)을 최종농도 2%로 하여 혼합한 후 실내에서 1시간 동안 고정하였다. 이후 에탄올 시리즈 (10, 30, 50, 70, 90, 99%)로 15분씩 탈수하여 임계점건조법 (critical point drying method)으로 건조시켰다. 건조된 시료는 aluminum stub에 고정하고 백금코팅 (platinum) 한 후, 가속전압 5 kV에서 관찰 및 촬영하였다

3. Genomic DNA 추출, PCR 증폭 및 DNA 염기서열 분석

*G. catenatum*의 유전학적 특성을 파악하기 위해 LSU rDNA 구간 분석을 수행하였다. 이를 위해 대수성장기인 LIMS-PS-2604 배양주 1 mL을 1.5 mL tube에 옮긴 후, 원심분리기를 이용하여 농축시킨 후, 상등액은 제거하고 농축된 시료는 $-20^{\circ}C$ 의 냉동실에 보관하였다. Genomic DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 추출하였다. LSU rDNA 증폭은 forward primer: LSU D1R (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3'), reverse

primer: LSU R2 (5'-ATTCGGCAGGTGAGTTGTTAC-3')를 이용하였다 (Takano and Horiguchi 2006). PCR 반응액은 5 μ L 10X Ex Taq Buffer (Mg^{2+} plus), 1.25 U Ex Taq polymerase (Takara, Japan), 1 μ M primer와 1 μ L DNA를 포함하여 최종 50 μ L가 되도록 하였다. PCR 수행은 Eppendorf Mastercycler ep gradient (Eppendorf)를 사용했고, pre-denature는 $95^{\circ}C$ 로 2분, denature는 $95^{\circ}C$ 로 20초, annealing은 $55^{\circ}C$ 에서 1분, elongation은 $72^{\circ}C$ 로 1분, post-elongation은 $72^{\circ}C$ 로 5분간 수행하였다. 증폭 반응은 30회 반복 수행한 후, PCR 산물을 1% agarose gel에 전개하고 Midori Green Advance (NIPPON Genetics, Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 염색하여 UV 하에서 DNA 밴드를 확인하였다. 정제된 PCR product clone들의 DNA sequencing은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 이용하여 ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)에 의해 수행되었다.

4. 분자계통학적 분석

상기 실험에서 얻은 *G. catenatum*의 염기서열을 이용하여 종의 계통학적 위치를 확인하였다. 염기서열 비교를 위해서 계통수에 사용된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 획득하여 이용하였고, 총 65개 염기서열이 BioEdit v. 7.1.3 프로그램 (Hall 1999)으로 정렬 및 편집되었다. 그 결과, 총 길이 944 kb의 정렬된 염기서열 자료 (dataset)를 얻을 수 있었고 *Periknusus marinus* (AY8763262)을 out group으로 하여 jModelTest v. 2.1.4 프로그램으로 분석하였다 (Darriba et al. 2012). 계통학적 분석은 GTR+I+G 모델 (A: C: G: T=0.2276: 0.1917: 0.2855: 0.2952; p-inv=0.1030; gamma shape=0.6570)을 사용하였다. 그리고, 계통학적 유연관계 분석에서 베이스 추론 (Bayesian Inference; BI)은 MrBayes 3.1.2를 사용하였고, 최대유사분석 (Maximum-likelihood analysis; ML)은 PhyML (Guindon and Gascuel 2003; Ronquist and Huelsenbeck 2003)을 이용하였다. 최대 유사분석에서 계통수의 각 branch의 신뢰도는 1000회의 bootstrap을 이용하였다. 분석이 완료된 이후에는 분석결과를 바탕으로 하여 각 종 간의 계통유연관계를 밝히는 분자계통도를 작성하였고, 분자계통도의 확인은 Tree-View 4.5 프로그램으로 수행하였다.

5. 온도 및 염분 조건에 따른 성장 변화

*G. catenatum*의 성장은 6단계의 온도 조건(5, 10, 15, 20, 25, 30°C)과 5단계의 염분 조건(15, 20, 25, 30, 35 psu)을 조합한 30단계의 조건, 100 μmol m⁻² s⁻¹의 광량에서 실험을 수행하였다.

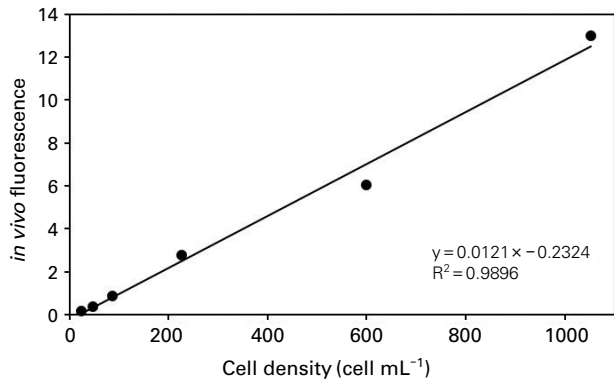


Fig. 2. Relationship between cell density and *in vivo* chlorophyll fluorescence of *Gymnodinium catenatum*.

대수성장기의 *G. catenatum*를 f/2-si 배지 30 mL가 주입된 배양튜브에 접종하여 최종세포밀도가 약 1.0 × 10² cells mL⁻¹이 되도록 하였다. 이후 이를 간격으로 동일한 시간에 형광광도계(10-AU-Fluorometer, Turner Designs, USA)로 *in vivo* chlorophyll 형광값을 측정하였고, 모든 실험은 triplicate로 수행하였다. 세포밀도는 형광값과의 상관관계를 통해 구하였다(Fig. 2). 성장속도(growth rate)는 대수성장을 보이는 기간 동안의 세포밀도를 이용하여 아래의 식에 대입하여 계산하였다(Guillard 1973). 각각의 실험조건은 triplicate로 진행하였고, 성장속도는 이들의 평균값으로 계산하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_0}$$

μ: 성장속도 (specific growth rate; day⁻¹)

N₀, N_t: 대수성장기에서 초기와 t시간(day) 후의 세포밀도

Δt: 대수성장기의 기간(day)

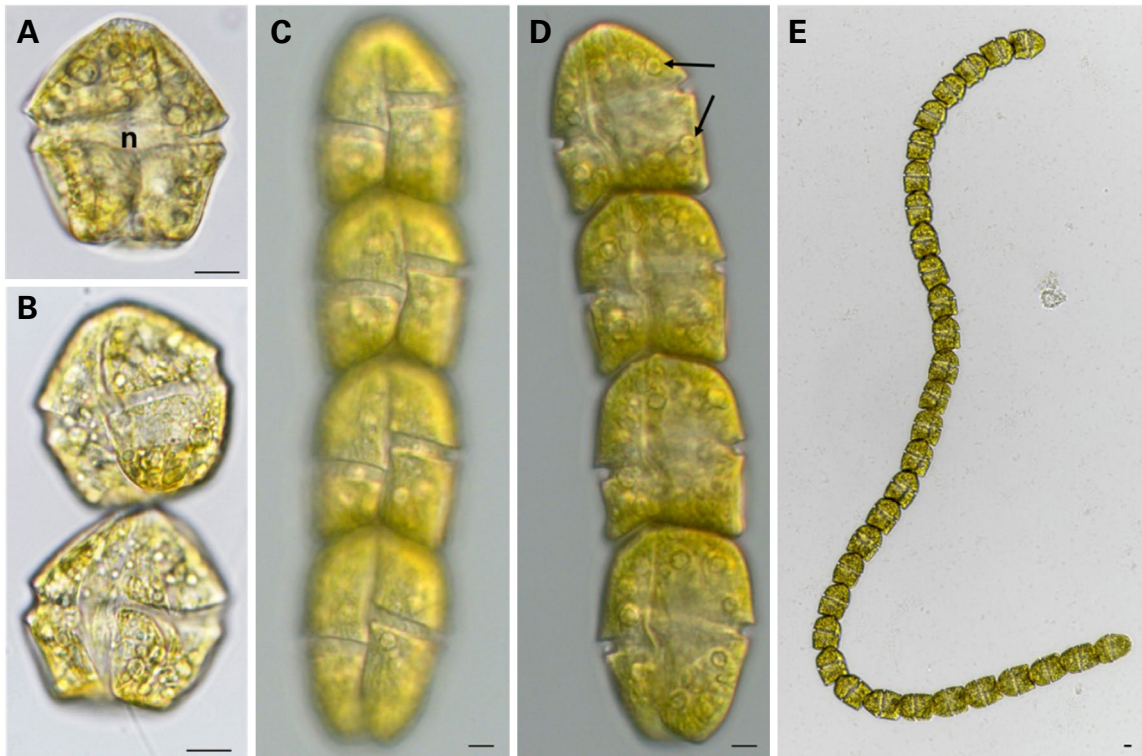


Fig. 3. Light micrographs of *Gymnodinium catenatum*. A. Ventral view, median focus showing the position of the nucleus (n). B. A two-celled chain. C. Surface focus of four-celled chain showing the position of the cingulum. D. Median focus of four-celled chain showing the internal lipid globules (arrows). E. 32-cell chain. Scale bars: 10 μm.

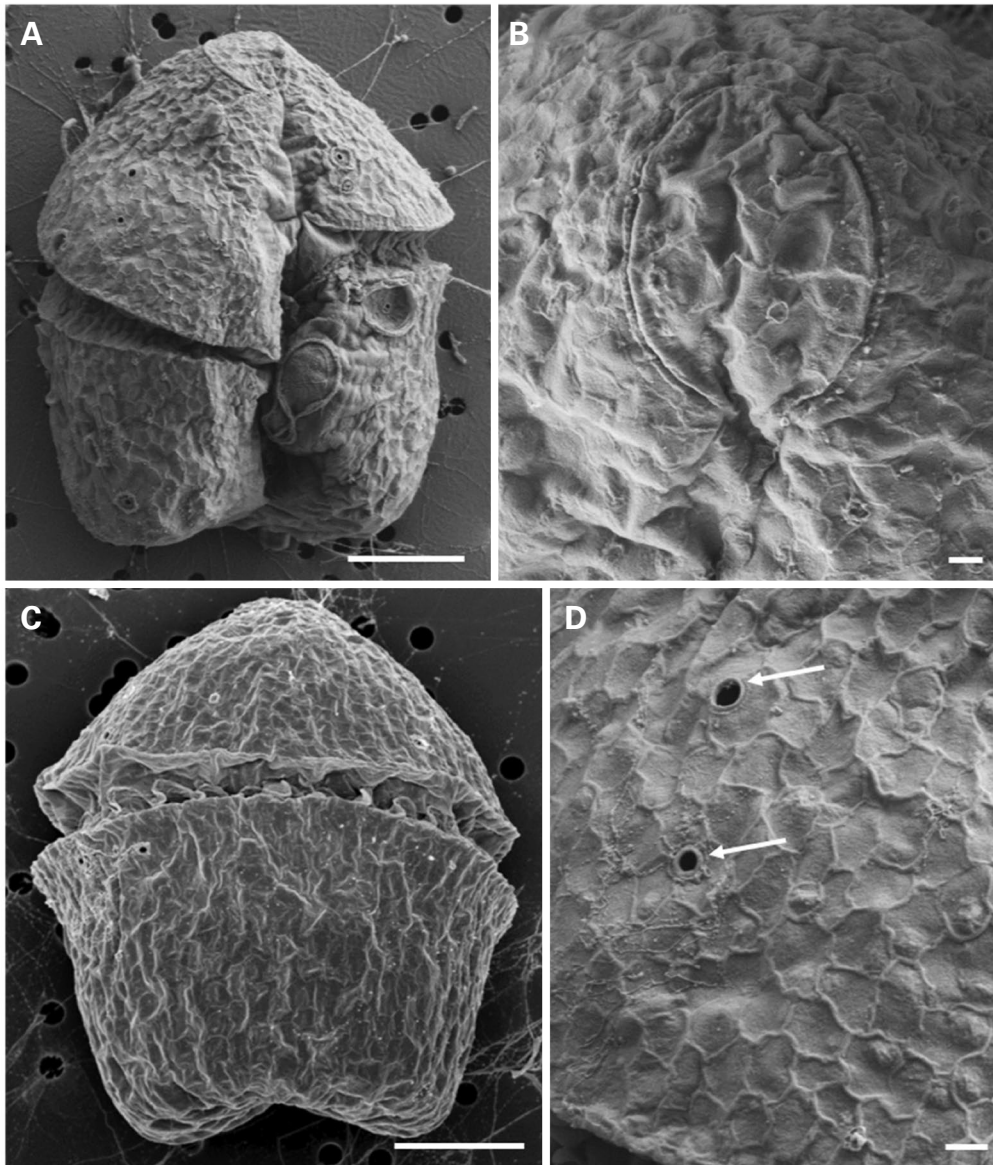


Fig. 4. Scanned electron micrographs of *Gymnodinium catenatum*. A. Ventral view showing the position of the cingulum. B. Details of apical groove. C. Dorsal view. D. Details of the cell surface showing the amphiasmal vesicles pattern and small pores (arrows). Scale bars: 10 μm (A, C) and 1 μm (B, D).

결과 및 고찰

1. *Gymnodinium catenatum*의 형태적 특징

*G. catenatum*의 세포는 세로로 길거나 세로와 가로의 길이가 유사한 오각형이었다(Fig. 3A and B). 세포의 길이(length)는 38.1~77.4 μm , 폭(width)은 26.1~40.8 μm 로 나타났다(average length: 54.4 \pm 3.5 μm , average width: 33.9 \pm

3.5 μm ; $n = 50$). 세포의 핵은 세포의 중심에 위치하였고, 엽록체는 노란색으로 세포 전체에 퍼져있었다(Fig. 3A). 실내배양환경에서 평균 연쇄군 형성은 4 세포로 나타났고(Fig. 3C and D), 최대 32 세포까지 연쇄군을 형성하였다(Fig. 3E). 상추(epicone)는 원뿔형으로 정단이 뭉툭하고 후단은 뭉툭하거나 둥글었다. 횡구는 단독세포일 경우에는 세포의 중간에 위치해 있고, 연쇄군을 형성한 경우에는 세포의 중간보다 약간 위에 있을 때도 있었다. 하추

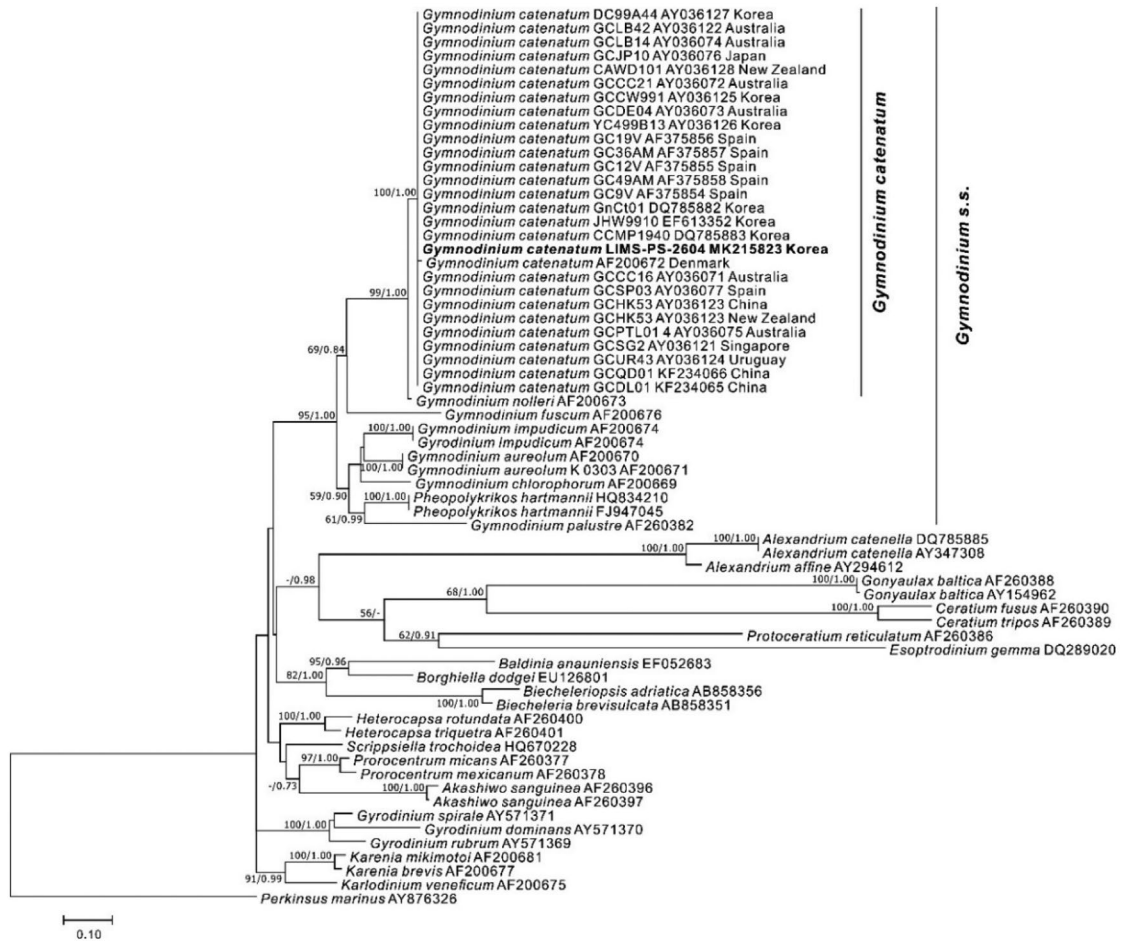


Fig. 5. Maximum Likelihood (ML) tree showing the phylogenetic position of *Gymnodinium catenatum* based on partial nuclear-encoded LSU rDNA sequences. Newly acquired sequences in this study are shown in bold. *Perkinsus marinus* was selected as the outgroup. The numbers on each node are the bootstrap values (%) and the Bayesian Posterior Probability (PP). Only bootstrap values above 50 and PP above 0.7 are shown. Scale bar=number of nucleotide substitutions per site.

(hypocone)는 역사다리꼴 모양이었다. 전자현미경으로 관찰한 *G. catenatum*의 종구는 일직선으로 상추의 정단까지 이어져 상추구와 연결되었고 (Fig. 4A), 상추구는 말굽의 편자 모양 (horseshoe-shaped)이었다 (Fig. 4B). 상추구는 종구에서부터 이어져 반시계방향으로 한바퀴 돌아서 타원형을 만들었고, 양 끝이 연결되지 않았다 (Fig. 4B). 상추는 하추에 비해 길이가 약간 짧았고 (Fig. 4C), 세포 표면은 그물형 (reticulation) 구조였고, 불규칙적인 구멍 (pore)이 있었다 (Fig. 4D).

*Gymnodinium*속 (genus)은 핵과 엽록체의 위치와 모양 등을 통해 형태적 분류를 할 수 있다 (Ellegaard and Oshima 1998; Bolch et al. 1999). 동일 속인 *Gymnodinium trapeziforme* Attaran-Fariman & Bolch는 핵의 위치가 세포

왼쪽에 길쭉한 모양으로 위치해 있고, *G. microreticulatum* Bolch, Negri & Hallegraeff은 상추에 둥근 모양으로 위치해 있어 (Attaran-Fariman et al. 2007), 핵의 형태적 특징으로 *G. catenatum*과 구별이 된다. 그리고 *G. aureolum* (Hulburt) Hansen는 상추구 모양이 loop-shaped으로 *G. catenatum*과 차이가 있다 (Hansen et al. 2000). 이외의 동일 속인 종들과는 상추구 모양이 타원형이고, 핵의 위치가 세포 중앙이라는 공통점을 보이지만, 연쇄군 형성과 세포 크기로 구별할 수 있다. 예를 들면, *G. impudicum* (Fraga & Bravo) Hansen & Moestrup은 더 작은 세포 크기와, 길게는 4 세포의 연쇄군을 형성하고, *G. nolleri* Ellegaard & Moestrup는 연쇄군을 형성하지 않는다 (Ellegaard et al. 1993; Nehring 1995).

*G. catenatum*의 세포 크기 및 형태는 배양주 간 또는 연쇄군 길이에 따라서 변이가 있다(Blackburn *et al.* 1989; Band-Schmidt *et al.* 2008). Band-Schmidt *et al.* (2008)은 해역이 다른 배양주들에서 세포 길이에 차이가 있다고 보고하였고, Cho *et al.* (2008)는 국내배양주(GnCt01)와 국외배양주(CCMP1940)에서 세포 표면의 주름 모양 및 주름수에 차이가 있다고 하였다. 본 연구결과와 비교했을 때, Cho *et al.* (2008)가 기록한 국내 배양주(GnCt01)는 세포모양이 세로로 긴 오각형이라 기록하였지만, 본 배양주에서는 정오각형 모양 또는 가로가 긴 오각형 모양도 종종 발견되었다. 즉, 세포표면에서 관찰되는 주름 모양과 수는 배양주의 차이로 나타나는 특징으로 보이지 않는다. 연쇄군 형성의 경우, 중국 황해에서 분리한 배양주는 실내 배양환경에서 주로 4~8 세포의 연쇄군을 형성하여(Gu *et al.* 2013), 본 배양주와 유사한 결과였다. 또한 *G. catenatum*의 상추구의 위치 및 형태, 핵의 위치와 세포 표면의 구멍 및 여러 특징들은 기존에 보고된 배양주들과 유사하다. 따라서 *G. catenatum*은 배양주에 따라 세포의 길이에는 약간의 변이가 관찰될 수 있지만, 형태적으로 큰 변이는 일으키지 않는 것으로 판단된다.

2. *Gymnodinium catenatum*의 계통 분류학적 특성

확보된 배양주의 LSU rDNA 분석을 통해 얻은 염기서열은 Genbank에 Accession No. LIMS-PS-2604로 등록하였다. 염기서열의 유사도 분석 결과(similarity analysis), 배양주 *G. catenatum* (LIMS-PS-2604)은 한국, 일본, 중국, 싱가포르, 우르과이, 호주, 뉴질랜드, 스페인에서 등록된 배양주들과 100% 일치하는 결과를 보였으며, *Gymnodinium sensu stricto* (*s.s.*) 분기군(clade)에 속하였다(Fig. 5). *Gymnodinium s.s.* 분기군에 속한 동일 속들은 본 배양주와 형태적으로 유사한 특징을 가진다(Ellegaard *et al.* 1993; Nehring 1995; Hansen *et al.* 2000; Attaran-Fariman *et al.* 2007). 특히, *G. nolleri* (AF200673)는 본 배양주와 염기유사도가 99% 일치하여 *G. catenatum*의 sister group으로 판단되었다

Adachi *et al.* (1997)는 일본, 스페인, 포르투갈 및 호주에서 분리한 배양주들의 5.8 S rDNA 분석을 하였고, 그 결과를 바탕으로 전 세계적으로 나타나는 *G. catenatum*의 배양주들은 동일 종이라고 판단하였다. 하지만, 형태가 같은 모든 와편모조류들이 동일한 분기군에 속하는 것은 아니다. 예를 들면, *Cochlodinium* (*a.k.a. Margalefidinium*) *polykrikoides*의 경우 배양주 간 형태적 특징은 차이가 없지

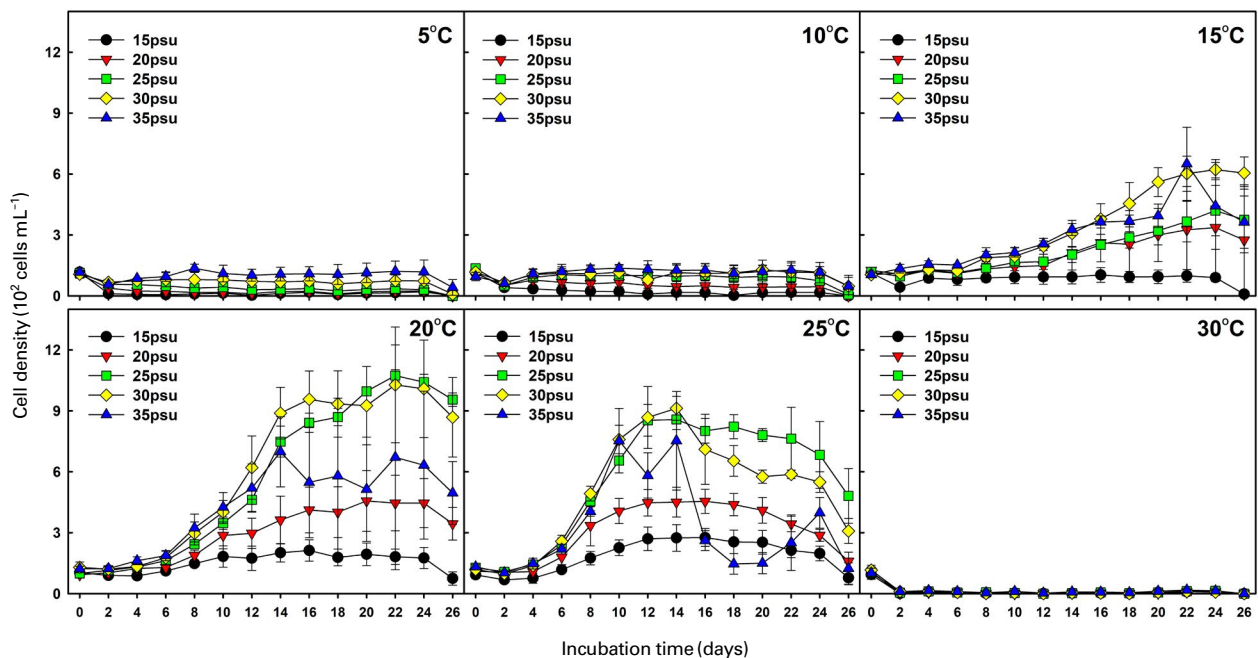


Fig. 6. Growth curves of *Gymnodinium catenatum* under different combinations of temperature and salinity. Different curves in each temperature panel represent experimental salinity.

만, 지리적 기원에 따라 동아시아, 필리핀, 미국/말레이시아로 총 3개의 분기군으로 나누어진다(Iwataki *et al.* 2008). 즉, 동일 종 내에서도 유전적 차이를 보일 수 있다. 그렇다 하더라도, *G. catenatum*은 LSU rDNA 염기서열에서 유전적 차이가 나타나지 않는 단일 계통(monophyly)으로 판단된다.

3. 온도와 염분 변화에 따른 *Gymnodinium catenatum*의 성장 특성

온도와 염분의 변화에 따른 *G. catenatum*의 세포 밀도 변화는 Fig. 6에 나타내었다. *G. catenatum*은 15~25°C의 온도 구간에서 성장을 보였지만, 15°C 미만의 저온과 30°C의 고온 조건에서는 성장을 보이지 않았고 20~25°C 온도 구간에서는 모든 염분 구간에서 성장을 보였다. 최대세포밀도(maximum cell density)는 온도 20°C, 염분 25 psu였으며, 세포밀도는 1,073 cells mL⁻¹였다.

*G. catenatum*의 성장에 영향을 주는 온도와 염분 인자를 통해 구한 성장속도의 contour plotting를 Fig. 7에 나타내었다. 그 결과 최적성장조건(optimum growth condition, 최

대성장속도의 80% 이내의 구간)을 보이는 온도는 25°C였고, 염분 구간은 25~35 psu였다. 최대성장조건(maximum growth condition)은 온도 25°C, 염분 35 psu에서 나타났고, 최대성장속도(maximum growth rate; μ)는 0.37 day⁻¹였다. 또한 최적온도조건($\mu > 0.30$ day⁻¹)은 온도 25°C였고, 모든 염분구간에서 성장이 가능했다. 즉, *G. catenatum*의 성장은 염분보다 온도에 민감하게 반응하는 혐온성 광염성 특징을 나타내었다.

*G. catenatum*의 최대성장속도와 최적 온도, 염분 조건에 대한 본 연구 결과와 이전 연구 결과의 비교 내용을 Table 1에 나타내었다. 본 배양주가 최대성장속도를 나타내는 온도와 염분 조건은 한국 남해의 여수 해역과 일본의 히로시마 만에서 분리된 배양주들과 유사하였지만(Lee *et al.* 2001; Yamamoto *et al.* 2002; Oh and Yoon 2004), 스페인과 호주에서 분리된 배양주들보다는 다소 다르게 나타났다(Blackburn *et al.* 1989; Bravo and Anderson 1994; Doblin *et al.* 1999). 성장속도에서는 호주에서 분리된 배양주(GCDE08)의 성장속도가 가장 낮은 것으로 나타났으며(0.24 day⁻¹), 한국의 여수해역과 스페인에서 분리한 배양주들이 높게 나타났고(각각 0.45 day⁻¹와 0.50 day⁻¹), 일본의 히로시마 만의 배양주(0.31 day⁻¹)와는 유사하게 나타났다.

Blackburn *et al.* (1989)과 Hallegraeff *et al.* (1995)의 연구 결과에 의하면, 호주 Tasmania에서 *G. catenatum*은 12월에서 6월 사이에 저 수온인 12~18°C, 염분 28~34 psu 범위에서 출현하거나 대발생을 일으킨다. 반면, 서 일본에서는 *G. catenatum*의 출현이 온도 6~27°C로 넓은 범위에서 나타난다(Kotani *et al.* 2000). 이는 저온에서 성장이 없었던 본 배양주 및 국내 배양주들의 성장조건과도 다소 차이를 보인다. 이러한 결과들을 종합하면, 전 세계적으로 분포하는 *G. catenatum*은 형태적으로 같거나 유전학적으로 단일 계통으로 분류되지만, 서식하고 있는 해역의 환경에 따라

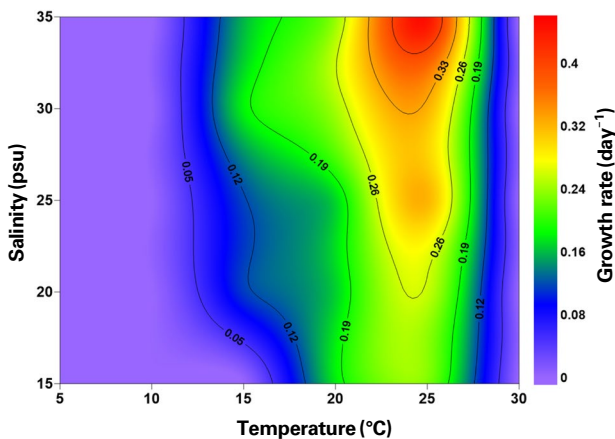


Fig. 7. Contour plots of growth rate (day⁻¹) of *Gymnodinium catenatum* under different combinations of salinity and temperature.

Table 1. Comparisons of growth rates and conditions of *Gymnodinium catenatum* as reported from previous studies

| Strains | Source | Growth rate (day ⁻¹) | Growth condition (temperature, salinity) | Reference |
|---------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| LIMS-PS-2604 | Southern coast, Korea | 0.37 | 25°C, 30 psu | This study |
| Not specified | Yeosu, Korea | 0.5 | 25°C, 30 psu | Oh and Yoon (2004) |
| Not specified | Yeosu, Korea | 0.45 | 25°C, 30-35 psu | Lee <i>et al.</i> (2004) |
| Not specified | Hiroshima bay, Japan | 0.31 | 25°C, 30 psu | Yamamoto <i>et al.</i> (2002) |
| Not specified | Galicia, Spain | 0.53 | 22-28°C | Bravo and Anderson(1994) |
| Not specified | Tasmania, Australia | No data | 12-18°C, 28-34 psu | Blackburn <i>et al.</i> (1989) |
| GCDE08 | Tasmania, Australia | 0.24 | 18°C, 28 psu | Doblin <i>et al.</i> (1999) |

성장조건은 다르게 나타난다고 할 수 있다.

*G. catenatum*은 한국연안에서 평균 수온이 20°C 이상인 여름-가을철에 출현과 최고세포밀도가 보고되고 있는데 (Kim and Shin 1997; Lee *et al.* 2001), 이는 본 배양주의 최적 온도 범위와 일치하는 결과이다. Lee *et al.* (2001)은 남해안에서 동일 시기에 출현하는 무각와편모조류 *G. catenatum*, *G. impudicum* 및 *C. polykrikoides*의 출현량을 파악하고 온도 및 염분에 대한 성장 실험을 수행하였다. 그 결과, 3종이 유사한 온도 및 염분 범위에서 유사한 성장속도를 보였지만, *C. polykrikoides*는 고조도의 광조건에서도 양호한 성장을 보였다. 한국연안에서 *C. polykrikoides*을 원인으로 한 대발생은 주로 여름철에 나타나며, 이 시기에는 광량이 매우 높다 (Na *et al.* 1997; Lee *et al.* 2001). 따라서, *G. catenatum*에게 남해안 여름-가을철의 온도와 염분은 최적의 성장환경이지만, 이 시기의 광조건이 성장을 방해하거나 *C. polykrikoides*와 같은 종과의 경쟁으로 인해 성장이 저해된 것으로 판단된다. 하지만, 본 연구는 온도와 염분에 따른 성장조건만 파악되었기 때문에, 남해안에서 *G. catenatum*의 성장 저해에 대한 정확한 원인을 알기 위해서는 다른 환경조건에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

적 요

남해안에서 분리한 *Gymnodinium catenatum*의 형태, 계통학적 분석 및 다양한 온도 및 염분에 반응하는 성장 조건을 파악하였다. *G. catenatum*의 세포는 세로로 길거나 세로와 가로로 길이가 유사한 오각형이었다. 세포의 길이는 38.1~77.4 μm , 폭은 26.1~40.8 μm 로 나타났다. 핵은 세포의 중간에 위치하였고, 상추구는 말굽의 편자 모양이었고, 이는 국내외 배양주와 형태적으로 매우 유사한 결과였다. 계통분석 결과도 염기유사도를 비교해 보았을 때, 기존에 보고된 배양주와 100% 일치하여 이 종은 단일 계통으로 판단되었다. 온도와 염분에 대한 성장실험에서 *G. catenatum*은 15°C 이상의 온도에서 염분 15 psu를 제외한 모든 염분구간에서 성장을 보였으며, 고온인 30°C에서는 성장을 하지 않았다. 최대성장속도는 온도 25°C, 염분 35 psu에서 0.37 day⁻¹로 나타났고 최대세포밀도는 온도 20°C, 염분 25에서 1,073 cells mL⁻¹였다. 이 결과는 *G. catenatum*이 한국 남해안에서 여름철 및 가을철, 특히 평균 수온이 20°C 이상인 여름철에 최대 증식을 보일 수 있다는 것을 나타낸다.

사 사

이 논문은 2018년도 정부 (해양수산부)의 재원으로 해양수산과학기술진흥원 해양수산생명공학기술개발사업의 지원을 받아 수행되었습니다 (No. 20170431).

REFERENCES

- Adachi M, Y Sako and Y Ishida. 1997. Analysis of *Gymnodinium catenatum* Dinophyceae using sequences of the 5.8 S rDNA-ITS regions and random amplified polymorphic DNA. *Fish. Sci.* 63:701-707.
- Attaran-Fariman G, MF de Salas, AP Negri and CJ Bolch. 2007. Morphology and phylogeny of *Gymnodinium trapeziforme* sp. nov. (Dinophyceae): a new dinoflagellate from the south-east coast of Iran that forms microreticulate resting cysts. *Phycologia* 46:644-656.
- Balech E. 1964. El plancton de Mar del Plata durante el período 1961-1962 (Buenos Aires, Argentina). *Boletín del Instituto de Biología Marina.* 4:1-59.
- Band-Schmidt CJ, DI Rojas-Posadas, L Morquecho and NY Hernández-Saavedra. 2008. Heterogeneity of LSU rDNA sequences and morphology of *Gymnodinium catenatum* dinoflagellate strains in Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *J. Plankton. Res.* 30:755-763.
- Blackburn SI, GM Hallegraeff and CJ Bolch. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia 1. *J. Phycol.* 25:577-590.
- Bolch CJ, SI Blackburn, GM Hallegraeff and RE Vaillancourt. 1999. Genetic variation among strains of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 35:356-367.
- Bravo I and DM Anderson. 1994. The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from north-west Spain. *J. Plankton Res.* 16:513-525.
- Cembella AD and CJ Band-Schmidt. 2018. Harmful Algal Species Fact Sheet: *Gymnodinium catenatum*. pp. 605-612. In *Harmful Algal Blooms: A Compendium Desk Reference*. Wiley-Blackwell.
- Cho SY, JS Ki and MS Han. 2008. Morphological characteristics and molecular phylogeny of five unarmored dinoflagellates in Korean Coastal Waters. *Algae* 23:15-29.
- Darriba D, GL Taboada, R Doallo and D Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772.

- Daugbjerg N, G Hansen, J Larsen and Ø Moestrup. 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 unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39:302–317.
- Doblin MA, SI Blackburn and GM Hallegraef. 1999. Growth and biomass stimulation of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) by dissolved organic substances. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 236:33–47.
- Doucette GJ and PJ Harrison. 1990. Some effects of iron and nitrogen stress on the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62:293–306.
- Ellegaard M and Y Oshima. 1998. *Gymnodinium nollerii* Ellegaard 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 of *Gymnodinium catenatum*. *Phycologia* 37: 369–378.
- Ellegaard M, NF Christensen and Ø Moestrup. 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 (Øresund), Denmark 1. *J. Phycol.* 29:418–426.
- Graham HW. 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 62:259–261.
- Gu H, T Liu, P Vale and Z Luo. 2013. Morphology, phylogeny and toxin profiles of *Gymnodinium inusitatum* sp. nov., *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium microreticulatum* (Dinophyceae) from the Yellow Sea, China. *Harmful Algae* 28:97–107.
- Guillard RRL. 1973. Division rates. p. 472. In *Handbook of Phyiological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*, Stein JR (ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Guindon S and O Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Hallegraef GM, MA McCausland and RK Brown. 1995. Early warning of toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* in southern Tasmanian waters. *J. Plankton Res.* 17:1163–1176.
- Hallegraef GM, SI Blackburn, MA Doblin and CJS Bolch. 2012. Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 14:130–143.
- Hansen G, N Daugbjerg and P Henriksen. 2000. 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.
- Iwataki M, H Kawami, K Mizushima, CM Mikulski, GJ Doucette, JR Relox, A Anton, Y Fukuyo and K Matsuoka. 2008. Phylogenetic relationships in the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) inferred from LSU rDNA sequences. *Harmful Algae* 7:271–277.
- Juhl AR, V Velazquez and MI Latz. 2000. Effect of growth conditions on flow-induced inhibition of population growth of a red-tide dinoflagellate. *Limnol. Oceanogr.* 45:905–915.
- Kim CH and JB Shin. 1997. Harmful and toxic red tide algal development and toxins production in Korean coastal waters. *Algae* 12:269–276.
- Kim HG, K Matsuoka, SG Lee and KH An. 1996. The occurrence of a dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Chinhae Bay, Korea. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 29:837–842.
- Kimball Jr JF and EF Wood. 1965. A dinoflagellate with characters of *Gymnodinium* and *Gyrodinium*. *J. Protozool.* 12:577–580.
- Kotani Y, Y Mastuyama and S Sakamoto. 2000. Biological and ecological characteristics of *Gymnodinium catenatum* in Japan. In *Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms (conference abstracts)*. Hobart, Australia.
- Lee CK, HC Kim, SG Lee, CS Jung, HG Kim and W Lim. 2001. Abundance of harmful algae, *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* in the coastal area of South Sea of Korea and their effects of temperature, salinity, irradiance and nutrient on the growth in culture. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* 34:536–544.
- Matsuoka K and Y Fukuyo. 1994. Geographical distribution of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham in Japanese coastal waters. *Bot. Marina* 37:495–504.
- Na GH, KD Park, SH Lee, GH Kim and JB Nam. 1997. Dial migration of dinoflagellates, *Cochlodinium polykrikoides* in situ. *J. Aquaculture* 10:457–462.
- Nehring S. 1995. *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Europe: a growing problem? *J. Plankton Res.* 17:85–102.
- Oh SJ and YH Yoon. 2004. Effects of water temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* (Graham) isolated from Yeosuhae Bay, Korea. *Algae* 19:293–301.
- Oshima Y, M Hasegawa, T Yasumoto, G Hallegraef and S Blackburn. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. *Toxicon* 25:1105–1111.
- Ronquist F and JP Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian

- phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Steidinger KA. 1998. Bloom dynamics and physiology of *Gymnodinium breve* with emphasis on the Gulf of Mexico. pp. 135–153. In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer, New York.
- Takano Y and T Horiguchi. 2006. Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell 1. *J. Phycol.* 42:251–256.
- Wong GTF, GC Gong, KK Liu and SC Pai. 1998. 'Excess nitrate' in the East China Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 46:411–418.
- Yamamoto T, SJ Oh and Y Kataoka. 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* 68:356–363.
- Yuki K and S Yoshimatsu. 1987. Morphology of the athecate dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (isolated from Seto Inland Sea, Japan) in culture. *Bull. Plankton Soc. Japan* 34:109–117.