



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

제주도 사질 조간대에서 서식하는  
저서 외편모조류의 출현 및  
계통분류학적 연구

제주대학교 대학원

지구해양과학과

강 수 민

2023 년 2 월

제주도 사질 조간대에서 서식하는  
저서 외편모조류의 출현 및  
계통분류학적 연구

지도교수 김진호

강 수 민

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2023년 2월

강수민의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장	이준백	이준백
위원	김진호	(인)
위원	기장서	(인)
위원	백승호	(인)
위원	신현호	(인)

제주대학교 대학원

2023년 2월

## 국문 요지

저서와편모조류는 저서생태계의 중요한 일차생산자로 해조류 및 산호 등에 부착하거나 사질 조간대에 서식한다. 이들은 전세계적으로 약 190 종이 보고되었고, 대부분 열대 및 아열대 해역에 분포하였으며, 일부 종은 독성을 가지고 있어 경제적, 보건적, 생태적으로 인간에게 피해를 끼칠 수 있기 때문에 과학자, 정부, 양식업 및 관광산업 종사자들에게 저서와편모조류의 출현은 중요한 관심사이다. 국내에서 해조류에 부착하는 저서와편모조류의 출현 및 분포 현황에 대한 연구가 많이 보고되었으나 사질 조간대에서 서식하는 저서와편모조류의 계절적 출현 및 종다양성에 대한 연구는 매우 적다. 특히, 제주 인근 해역은 최근 지구온난화에 따른 해수온 상승으로 온대 해역에서 아열대 해역으로 변화하고 있으며, 열대 및 아열대 저서와편모조류의 출현이 증가할 것으로 추측되기 때문에 이들에 대한 지속적인 모니터링 및 종다양성에 관한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 제주 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류의 종다양성 및 계절적 출현을 확인하고, 조사기간 중 출현 및 분리 배양된 와편모조류들 중 *Heterocapsa* 2종, *Amphidinium* 1종, 미동정 와편모조류 1종에 대한 계통분류학적 연구를 수행하였다.

제주 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류의 종다양성을 조사하기 위해 2017년부터 2021년까지 제주 사질 해변 16개 정점에서 저서와편모조류를 분리 및 배양하였다. 형태학적 분석 결과, 조사 기간 중 총 12속 22종이 출현하였으며, 그중 기록종 9종, 미기록종 3종, 신종을 포함한 미동정 종 10종이 관찰되었다. 특히, 조사 정점 중 표선 해변에서 가장 다양한 12속의 저서와편모조류가 확인되었다.

2022년 3월부터 8월까지 표선 해변 12개 정점을 선정하여 저서와편모조류의 계절적 출현 및 분포 현황에 대해 조사하였다. 저서와편모조류의 현존량은 6월에 가장 높았으며, 출현종수는 3월에 가장 많았다. 또한, 6월과 7월에 조간대 상부보다 조간대 하부에서 와편모조류의 출현 종 수가 많았다. 또한, 잠재독성종 *Amphidinium carterae*, *A. operculatum*, *Prorocentrum concavum*, *P. rhathymum*의 출현을 확인하였다.

2018년 4월 하도 해변과 2020년 3월 표선 해변에서 *Heterocapsa* 속 2종을 분리 및 배양하였다. 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경을 이용한 형태학적 분석 결과, 기존 국내에 형태적 특징이 보고되지 않은 *H. pseudotriquetra*와 *H. horiguchii* 두 종으로 동정되었으며, 이들의 형태적 특징은 기존 문헌에 기재된 특징과는 일치하였다. 또한, SSU와 LSU rDNA를 활용한 분자계통학적 분석 결과, *H. pseudotriquetra*와 *H. horiguchii*의 유전 분자계통학적 위치가 일치하였으며, 다른 *Heterocapsa* 종들과는 뚜렷하게 구분되었다.

2019년 3월 신양 해변에서 *Amphidinium* 속에 속하는 미동정 저서와편모조류를 분리 및 배양하였다. 광학현미경, 주사전자현미경을 이용한 형태적 분석 결과, 피지(Fiji)에서 발견된 *A. fijiense*와 형태적 특징이 유사하였다. ITS 및 LSU rDNA를 활용한 분자계통학적 분석 결과, 피지(Fiji) 배양주의 염기서열과 같은 분기군을 형성하였으며, 다른 *Amphidinium* 종들과는 뚜렷하게 분리되었다. 결과적으로, 신양 해변에서 분리 및 배양된 *Amphidinium* 종을 국내 미기록종 *A. fijiense*로 보고하였다.

마지막으로, 2020년 3월 표선 해변에서 *Testudodinium*과 형태적으로 유사한 세포를 분리 및 배양하였다. 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경을 이용한

형태학적 분석 결과, 표선 해변에서 배양된 미동정 저서와편모조류는 형태적으로 가장 유사한 *Testudodinium*과 구별되는 apical groove의 형태와 pyrenoid의 부재 등의 형태적 특징이 관찰되었고, 이러한 형태적 특징들은 기존 *Amphidinium* 속으로 기재되었던 *A. mootonorum*과 유사하였다. SSU 와 LSU rDNA를 활용한 분자계통학적 분석 결과, 표선 해변에서 발견된 배양주와 *A. mootonorum* 그룹은 *Testudodinium* 속과 *Amphidinium sensu stricto*와는 분리된 독립적인 분기군을 형성하였으며, 유전적 거리에서도 표선 해변 배양주와 *A. mootonorum* 그룹과 *Amphidinium* 속과의 유전적 거리차이값이 다른 속간의 차이값보다 큰 것으로 나타났다. 결과적으로, 기존의 *Testudodinium*, *Amphidinium* 속과는 구분되는 신속 *Paraamphidinium*을 설립하였으며, 표선에서 분리 배양한 종을 신종 *P. jejuensis*로 기재하고, *A. mootonorum*을 *P. mootonorum*으로 이속하였다.

결론적으로 제주 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류의 생물다양성 및 표선 해변에서 춘계와 하계의 저서와편모조류의 출현 및 분포를 확인하였다. 조사 기간 중 발견한 배양주의 계통분류학적 정보를 통해 신속/신종 *Paraamphidinium jejuensis* 및 미기록종 *Amphidinium fijiense*를 발굴하였으며, *Heterocapsa* 2종의 형태적 특징을 재기재하였다. 본 연구를 통해 제주도 고유 생물자원을 확보하고 제주도 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류의 종다양성을 파악하였으며, 본 연구의 결과들은 저서 생태계의 연구를 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료된다.

# 목차

국문 요지.....	2
List of Tables.....	9
List of Figures.....	10
1. 서론.....	13
2. 제주 사질 조간대에서 서식하는 저서외편모조류의 출현 및 분포.....	18
2.1. 서론.....	18
2.2. 재료 및 방법.....	19
2.2.1. 제주 사질 조간대 시료 채집 및 배양.....	19
2.2.2. 광학현미경 검경.....	20
2.2.3. 표선 해변 시료 채집.....	21
2.2.4. 영양염 분석.....	23
2.2.5. 저서 미세조류 정량분석 및 저서외편모조류 정성분석.....	23
2.2.6. 통계분석.....	24
2.3. 결과.....	25
2.3.1. 5년간 출현한 저서외편모조류.....	25
2.3.2. 미기록종 2종의 형태적 특징.....	29
2.3.3. 표선 해변에서 서식하는 저서외편모조류의 출현 및 분포현황.....	31
2.4. 토의.....	48

3. 제주 사질 조간대에서 분리된 <i>Heterocapsa</i> 2 종의 재기재 .....	54
3.1. 서론.....	54
3.2. 재료 및 방법.....	55
3.2.1. 모래 시료 채집 및 <i>Heterocapsa</i> 2 종 배양주 확립 .....	55
3.2.2. 형태적 관찰.....	58
3.2.3. DNA 추출.....	59
3.2.4. PCR 증폭 및 염기서열 분석.....	60
3.2.5. 분자계통학적 분석.....	61
3.3. 결과.....	64
3.3.1. <i>Heterocapsa</i> 2 종의 형태적 특징 .....	65
3.3.2. <i>Heterocapsa</i> 의 계통분류학적 분석.....	71
3.4. 토의.....	74
4. 제주 신양 해변에서 분리한 국내 미기록종 <i>Amphidinium fijiense</i> 의 형태 및 분자계통학적 연구 .....	78
4.1. 서론.....	78
4.2. 재료 및 방법.....	79
4.2.1. 모래 시료 채집 및 배양주 확립 .....	79
4.2.2. 현미경 검경 및 이미지 촬영 .....	80
4.2.3. DNA 추출.....	81
4.2.4. PCR 증폭 및 염기서열 분석.....	82
4.2.4. 분자계통학적 분석.....	83
4.3. 결과.....	86

4.3.1. <i>Amphidinium fijiense</i> 의 형태적 특징 .....	86
4.3.2. <i>Amphidinium fijiense</i> 의 분자계통학적 분석 .....	89
4.4. 토의 .....	92
<b>5. 제주 표선 해변에서 분리한 저서외편모조류의 형태 및 계통분류학적 분석을 통한 신속, 신종 설립 .....</b>	<b>102</b>
5.1. 서론 .....	102
5.2. 재료 및 방법 .....	104
5.2.1. 모래 시료 채집 및 배양주 확립 .....	104
5.2.2. 현미경 검경 및 이미지 촬영 .....	104
5.2.3. DNA 추출 .....	106
5.2.4. PCR 증폭 및 염기서열 분석 .....	117
5.2.5. 분자계통학적 분석 .....	108
5.2.6. 분자적 차이 분석 .....	109
5.3. 결과 .....	114
5.3.1. 분류학적 기재 .....	114
5.3.2. 형태적 특징 .....	115
5.3.3. 분자계통학적 분석 .....	119
5.3.4. <i>Amphidinium</i> 종들 간의 SSU 및 LSU rDNA 염기서열의 유전적 차이 .....	121
5.4. 토의 .....	124

6. 결론.....	130
참고문헌.....	132
Abstract.....	156

## List of Tables

Table 1.1. The toxic species of benthic dinoflagellates reported from Korea .....	15
Table 2.1. Sand-dwelling dinoflagellates list of for 5 years .....	26
Table 2.2. List of species of sand-dwelling dinoflagellates of Pyoseon Beach .....	44
Table 3.1. Sample information of two <i>Heterocapsa</i> strains used in this study .....	58
Table 3.2. Information of sequence for phylogenetic analyses .....	62
Table 3.3. Comparison of morphological feature of <i>Heterocapsa</i> species .....	76
Table 4.1. Information of sequence for phylogenetic analyses. ....	84
Table 4.2. Morphological comparisons of the Korean isolate of <i>Amphidinium</i> <i>fijiense</i> (gray boxed) with other <i>Amphidinium</i> species .....	97
Table 5.1. Information of sequence using molecular analyses .....	110
Table 5.2. Comparison of the morphological characteristics of <i>Paraamphidinium</i> <i>jejuensis</i> sp. nov., <i>Paraamphidinium mootonorum</i> comb. nov., <i>Testudodinium</i> and <i>Amphidinium</i> species .....	126

## List of Figures

<b>Figure 2.1.</b> Sampling stations of sand-dwelling dinoflagellates at intertidal zone in Jeju Island.....	20
<b>Figure 2.2.</b> Sampling stations from March to August 2022 in Pyoseon Beach, Jeju Island. ....	22
<b>Figure 2.3.</b> Distribution of sand-dwelling dinoflagellates around Jeju Island for 5 years.....	25
<b>Figure 2.4.</b> Light micrographs of (A) <i>Ankistrodinium semilunatum</i> and (B-D) <i>Thecadinium arenarium</i> .....	30
<b>Figure 2.5.</b> A. Monthly variation of water temperature, salinity and mean abundance of benthic microalgae in Pyoseon Beach from March and August, 2022. B. Monthly variation of salinity near the st. 2 of intertidal zone in Pyoseon Beach from March and August, 2022 .....	32
<b>Figure 2.6.</b> A. nitrate + nitrite ( $\text{NO}_x$ ) and ammonium and B. silicate and phosphate in Pyoseon Beach from March to August, 2022 .....	33
<b>Figure 2.7.</b> A. The abundance of benthic microalgae of all stations from March to August, 2022. B. Monthly variation of abundance of UZ, MZ and LZ from March to August, 2022 (*; ANOVA, $p < 0.05$ ) .....	35
<b>Figure 2.8.</b> Benthic taxon abundance from March to August, 2022.....	37
<b>Figure 2.9.</b> Monthly distribution of benthic diatom, dinoflagellates and other taxa in Pyoseon Beach from May to August, 2022.....	38
<b>Figure 2.10.</b> A. relationships between benthic microalgae abundance and water temperature or salinity in Pyoseon Beach from March to August, 2022. B. Distributions of loading factors by PCA in Pyoseon Beach.....	40
<b>Figure 2.11.</b> The number of sand-dwelling dinoflagellates species of all stations from March to August, 2022 .....	42

<b>Figure 2.12.</b> Diversity Index (H') of sand-dwelling dinoflagellates.....	43
<b>Figure 2. 13.</b> Light micrographs of sand-dwelling dinoflagellates from Pyoseon Beach.....	46
<b>Figure 2.14.</b> Light micrographs of sand-dwelling dinoflagellates from Pyoseon Beach.....	47
<b>Figure 3.1.</b> Light micrographs of <i>Heterocapsa horiguchii</i> (culture strain HH-2003PS-01) .....	65
<b>Figure 3.2.</b> Scanning electron micrographs of <i>Heterocapsa horiguchii</i> (culture strain HH-2003PS-01) .....	66
<b>Figure 3.3.</b> Light micrographs of <i>Heterocapsa pseudotriquetra</i> (culture strain HP-1804HD-01) .....	68
<b>Figure 3.4.</b> Scanning electron micrographs of <i>Heterocapsa pseudotriquetra</i> (culture strain HP-1804HD-01) .....	69
<b>Figure 3.5.</b> Transmission electron micrographs of <i>Heterocapsa pseudotriquetra</i> (culture strain HP-1804HD-01) .....	70
<b>Figure 3.6.</b> Maximum likelihood tree of genus <i>Heterocapsa</i> using ITS1+5.8S+ITS2 sequences.....	72
<b>Figure 3.7.</b> Maximum likelihood tree of genus <i>Heterocapsa</i> using LSU rDNA sequences.....	73
<b>Figure 4.1.</b> Light micrographs of <i>Amphidinium fijiense</i> (culture strain AF-1903SY-04) .....	87
<b>Figure 4.2.</b> Scanning electron micrographs of <i>Amphidinium fijiense</i> (culture strain AF-1903SY-04) .....	88
<b>Figure 4.3.</b> Maximum likelihood tree of <i>Amphidinium</i> sensu stricto using ITS1+5.8S+ITS2 sequences.....	90

<b>Figure 4.4.</b> Maximum likelihood tree of dinoflagellate LSU rDNA sequences with emphasis of <i>Amphidinium fijiense</i> .....	91
<b>Figure 5.1.</b> Micrographs of <i>Paraamphidinium jejuensis</i> sp. nov. (culture strain PJ-2003PS-01) .....	117
<b>Figure 5.2.</b> Transmission electron micrographs of <i>Paraamphidinium jejuensis</i> sp. nov. (culture strain PJ-2003PS-01) .....	118
<b>Figure 5.3.</b> Maximum likelihood tree of <i>Paraamphidinium</i> gen. nov. using SSU rDNA sequences .....	120
<b>Figure 5.4.</b> Maximum likelihood tree of <i>Paraamphidinium</i> gen. nov. using LSU rDNA sequences .....	121
<b>Figure 5.5.</b> Nucleotide divergences of the dinoflagellates SSU rDNA and LSU rDNA sequences based on corrected pairwise genetic distance ( <i>p</i> -distance), including <i>Paraamphidinium</i> gen. nov. ....	123
<b>Figure 5.6.</b> Line drawing of <i>Paraamphidinium jejuensis</i> sp. nov., <i>Testudodinium corrugatum</i> (as <i>Amphidinium corrugatum</i> ), <i>Amphidinium thermaeum</i> .	127

## 1. 서론

식물플랑크톤은 해양생태계의 일차생산자로 생태계 피라미드의 기반을 구성하는 중요한 위치를 차지하고 있으며, 각 해역의 해양학적 특성에 따라 시간적, 공간적 군집 분포 및 동태가 다르다(Lee et al. 1990). 이러한 식물플랑크톤 중 하나인 와편모조류(dinoflagellates)는 황구에 꼬인 형태로 위치하는 황편모와 종구에 위치하는 종편모 두 개의 편모를 가진 단세포 편모조류로 진핵생물에 속한다. 전세계적으로 3,500여 종이 보고되었으며, 그 중 절반 이상이 광합성 생물로 보고되었고(Guiry and Guiry 2022), 광합성을 통한 독립영양 뿐만 아니라 혼합영양, 섭식영양 등 다양한 영양 형태를 보이기 때문에 해양 먹이 그물망에서 중요한 역할을 수행한다(Dodge 1982, Tosteson et al. 1989, Jeong et al. 2010). 또한, 이들은 연안, 외해에 서식하거나 사질 조간대 및 해조류 및 산호 등에 부착하여 서식하는 등 다양한 환경에 서식하고 있다.

이 중 저서와편모조류(benthic dinoflagellates)는 저서생태계의 중요한 구성요소 중 하나로 와편모조류 2,000여 종 중 약 10%를 차지하고(Taylor et al. 2008), 대부분의 저서와편모조류는 사질에서 서식한다(Hoppenrath et al. 2014). 이들은 전세계적으로 45속 189종이 보고되었으며(Hoppenrath et al. 2014), 이들의 생태적 중요성 및 관련 연구의 증가로 인해 지속적으로 신속, 신종이 보고되고 있다. 이러한 저서와편모조류는 대부분 열대 및 아열대 해역에 분포한다고 보고되었으나(Fukuyo 1981, Besada et al. 1982, Morton and Faust 1997, Aligizaki et al. 2008, Almazán-Becerril et al. 2015, Leung et al. 2018), 최근 지구온난화로 인해 열대 및 아열대 해역에 서식하는 일부 저서와편모조류 종의 분포가 온대 해역으로 확대되었다(Selina and Levchenko 2011, Pistocchi et al.

2011, Shah et al. 2013). 또한, 저서와편모조류 중 *Gambierdiscus caribaeus*, *Ostreopsis ovata*, *Amphidinium carterae*, *Prorocentrum rhathymum* 와 같은 종들은 각각 ciguatoxin, palytoxin, amphidinols, okadaic acid와 같은 독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있어(Hoppenrath et al. 2014, Tester et al. 2020), 경제적, 보건적, 생태적으로 인간에게 피해를 끼칠 수 있기 때문에 이들의 출현은 과학자, 정부, 양식업 및 관광산업 종사자들에게 중요한 관심사이다. 특히, 독성종 중 *Amphidinium carterae*와 *Prorocentrum rhathymum*과 같은 많은 독성종들이 해조류에서 부착하면서 서식할뿐만 아니라 사질 조간대에도 서식하는 것으로 알려져 있으나(Hoppenrath et al. 2014), 사질 조간대에서 서식하는 저서와편모조류의 모니터링은 수행된 바 없다.

우리나라는 최근 10년간 저서와편모조류가 보고되었으나(Baek 2012b, Jeong et al. 2012a, b, Kang et al. 2013, Lee et al. 2013, Lim et al. 2013, Shah et al. 2013, Kang and Lee 2018a, Jang et al. 2018, Kim and Seo 2019, Lee and Park 2020, Park et al. 2021), 여전히 국내에 발견되지 않은 저서와편모조류가 많을 것으로 추정된다. 보고된 저서와편모조류 50여 종 중 대부분은 제주도에서 발견되었는데, 사질 간극에서 보고된 종이 35종, 해조류 등 부착성 종이 15종이다. 현재까지 국내에는 11종의 잠재적인 독성종이 보고되었다(Table 1.1). 국내의 저서와편모조류 연구 현황을 보면, 이들의 단순 출현 및 분포 현황에 대한 연구가 대부분이었고(Kim et al. 2011, Baek 2012a, Shah et al. 2014a, Kim et al. 2015), 해조류에 부착해서 서식하는 부착성 와편모조류에 대한 연구에 대부분 치우쳐 있다(Kim et al. 2011, Baek 2012a). 비록 제주에 서식하는 저서와편모조류에 대한 출현은 Shah 등(2014a)에서 보고하였으나 계절별 사질 조간대에서 서식하는 저서와편모조류의 출현 및 생물다양성 연구는 보고되지 않았다.

Table 1.1. The toxic species of benthic dinoflagellates reported from Korea.

Species	Location	Species reported reference	Toxin identified reference
<i>Amphidinium carterae</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	Shah et al. 2014b (Non-toxic)
<i>A. gibbosum</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	
<i>A. operculatum</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	Shah et al. 2014b (Cytotoxicity)
<i>Coolia malayensis</i>	Jeju Island	Jeong et al. 2012b	Shah et al. 2014b (Non-toxic)
<i>Gambierdiscus caribaeus</i>	Jeju Island	Jeong et al. 2012a	
<i>G. yasumotoi</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	
<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	Jeju Island	Kang et al. 2013	Hwang et al. 2018 (Cytotoxicity/ Osterol B)
<i>Prorocentrum concavum</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	
<i>P. emarginatum</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	
<i>P. lima</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	Yang et al. 2017; Lee et al. 2019 (Cytotoxicity/Limalol)
<i>P. rhathymum</i>	Jeju Island	Shah et al. 2013	Shah et al. 2014b (Non-toxic)

제주도는 한반도 남쪽에서 약 90 km 떨어진 화산섬으로 면적은 약 1,830 km<sup>2</sup> 이고, 대마난류, 제주난류, 양쯔강 유출수 등 다양한 해류의 영향을 받는 온대 지역에 위치하고 있다. 그러나, 지구온난화로 인해 지난 50 년간 제주도 인근 해역의 해수온은 평균 1.03 °C 상승하여 같은 기간 전세계 평균 해수온의 상승 수치인 0.49 °C보다 0.54 °C 더 상승하였다(Han and Lee 2020). 이에 제주도 인근 해역은 온대 해역에서 아열대 해역으로 변화함에 따라 국내 고유 생물종 서식지의 북방한계선이 북상하고, 열대 해양생물의 출현이 증가하는 등 제주도 해역의 생물상은 급변하고 있기 때문에, 제주도 사질 해변에 서식하는 저서와편모조류의 종조성 또한 빠르게 변화할 것으로 추측된다.

와편모조류는 각의 유무에 따라 무각와편모조류와 유각와편모조류로 구분되며, 세포의 형태, 횡구의 위치 및 단차, 종구의 위치, 핵과 엽록체의 위치 및 형태, pyrenoid 의 유무, apical groove 의 유무 및 위치, body scale 의 유무 및 모양, 각의 배열 등이 형태적 분류의 기준으로 사용되고 있다. 그러나 이들은 성장 환경에 따라 형태 변이가 심하고, 근연종 간에 유사한 형태를 보이기 때문에 형태적으로 종을 분류 및 동정하기 어렵다(Nagahama and Fukuyo 2005, Murray et al. 2007, Laza-Martinez et al. 2011, Murray et al. 2012). 따라서, 최근에는 유전자 정보를 활용한 분자생물학적인 방법으로 종의 계통분류학적 정보를 확인하고 있으며, 특히 small subunit (SSU), internal transcribed spacer (ITS), large subunit (LSU) rDNA 를 활용한 와편모조류의 계통분류학적 연구가 활발히 진행되고 있다(Cho et al. 2008, Jeong et al. 2012a, b). 예를 들어, *Amphidinium* 과 *Gymnodinium* 속은 횡구의 위치에 따라 분류되었으나(Kofoed and Swezy 1921), 최근 전자현미경 등을 활용한 세밀한 형태학적 특징 및 분자생물학적 정보를 토대로한 계통분류학적 연구를 통해 *Amphidinium* 과 *Gymnodinium* 속이 재정의 되었다. *Amphidinium* 속에 속하는 일부 종들은 *Ankistrodinium*, *Apicoporus*, *Bindiferia*, *Testudodinium*, *Togula* 등 새로운 속으로 분리되었고(Flø Jørgensen et al. 2004a, Sparmann et al. 2008, Hoppenrath et al. 2012, Horiguchi et al. 2012, Borchhardt et al. 2021), *Gymnodinium* 속에 속하는 일부 종들은 *Akashiwo*, *Karenia*, *Karlodinium*, *Takayama* 등 새로운 속으로 분리되었다 (Daugbjerg et al. 2000, Salas et al. 2003). 또한, 두 속 중 일부 종이 포함된 *Nusuttodinium* 속이 설립되었다(Takano et al. 2014). 계통분류의 정확한 재정립과 형태학적 특징의 재기재는 와편모조류 종의 분화와 진화를 이해하는 데 매우 중요하다(Hackett et al. 2004, Orr et al. 2012).

본 연구에서는 5 년 간 제주 사질 조간대의 서식하는 와편모조류의 출현을 확인하였고, 2022 년 제주 표석 해변에 서식하는 저서와편모조류의 계절별 출현 양상을 조사하였다. 조사기간 중 발견된 저서와편모조류 중 4 종의 정확한 종동정을 위하여 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경을 사용하여 형태적 특징을 관찰하고 SSU, ITS, LSU rDNA 영역의 염기서열을 활용한 분자계통학적 위치를 확인하여 종을 기재하였다. 3 장에서 2018 년, 2020 년 사질 조간대 하도와 표석 해변에서 발견된 *Heterocapsa pseudotriquetra* 와 *H. horiguchii* 를 분리 및 배양하여 형태적 특징 및 분자계통학적 차이를 확인하고 재기재 하였다. 4 장에서 2019 년 신양 해변에서 발견된 *Amphidinium* 속에 속하는 미동정 저서와편모조류의 형태적 특징 및 분자계통학적 위치를 확인하여 국내 미보고된 *A. fijiense* 를 보고하였다. 5 장에서 2020 년 표석 해변에서 발견된 *Testudodinium* 속과 유사한 형태의 저서와편모조류의 형태적 특징을 기술하고, 계통분류학적 정보를 제시하여 이를 통해 신속을 설립하고 신종을 보고하였다.

## 2. 제주 사질 조간대에서 서식하는 저서와편모조류의 출현 및 분포

### 2.1. 서론

와편모조류는 해양생태계의 주요 일차생산자이고, 독립영양, 혼합영양, 섭식영양 등 다양한 영양 형태를 보이기 때문에 해양 먹이 그물망에서 중요한 역할을 수행한다(Dodge 1982, Tosteson et al. 1989, Jeong et al. 2010). 또한, 저서와편모조류는 저서 생태계의 중요한 일차생산자이며, 많은 저서와편모조류가 모래에서 서식한다(Hoppenrath et al. 2014). 이러한 저서와편모조류는 대부분 열대 및 아열대 해역에 분포한다고 보고되었으나(Fukuyo 1981, Besada et al. 1982, Morton and Faust 1997, Aligizaki et al. 2008, Almazán-Becerril et al. 2015, Leung et al. 2018), 온대지역에서도 출현이 보고되는 등(Selina and Levchenko 2011, Pistocchi et al. 2011, Shah et al. 2013) 서식 범위가 확산되고 있음을 알 수 있다. 저서와편모조류 중은 독성을 가지며 어류를 폐사시키는 등 경제적 피해를 끼치며 인간에게 질병을 일으킨다고 알려졌기 때문에(Tester et al. 2020) 저서와편모조류의 출현 및 독성종의 존재는 중요한 관심사이다.

저서와편모조류의 국내 연구는 2011년부터 시작되었고(Kim et al. 2011), 50종 이상의 저서와편모조류가 보고되었으며 그 중 대부분이 제주에서 발견되었다(Jeong et al. 2012a, b, Kang et al. 2013, Lee et al. 2013, Lim et al. 2013, Shah et al. 2013, Kang and Lee 2018a, Jang et al. 2018, Kim and Seo 2019, Lee and Park 2020, Park et al. 2021). 국내 저서와편모조류의 출현 및 분포현황에 대한 연

구는 부착성 종에 초점을 맞추고 있어(Kim et al. 2011, Baek 2012a), 모래에 서식하는 저서와편모조류의 출현과 분포에 대한 연구는 매우 미흡하다.

따라서, 본 연구는 먼저 제주 사질 조간대에서 서식하는 저서와편모조류의 종 다양성을 조사하기 위하여, 제주 모래 해변에서 5년간(2017년 - 2021년) 저서와편모조류를 분리 및 배양하였다. 배양된 저서와편모조류는 광학현미경을 이용한 형태적 관찰을 통해 종을 동정하였다. 이후 2022년 3월부터 8월까지 제주 표선 해변에 서식하는 저서와편모조류의 계절적 출현 양상을 조사하였다.

## 2.2. 재료 및 방법

### 2.2.1. 제주 사질 조간대 시료 채집 및 배양

2017년부터 2021년까지 총 16개 정점에서 제주 사질 조간대에서 모래 시료 약 50g을 채집하였다(Fig. 2.1). 채집한 모래 시료를 IMK 배지(Daigo IMK, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 100 mL가 담긴 투명한 6 oz 플라스틱 컵에 담고, 규조류의 성장을 억제하기 위해  $\text{GeO}_2$  1 mL를 첨가하여 배양하였다. 배양된 시료는 세포의 성장을 확인하기 위하여 이틀에 한 번씩 확인되었고, 광학현미경 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) 200배 배율에서 파스퇴르 피펫을 사용하여 단일 세포로 분리되었다. 분리된 세포는 IMK 배지 2 mL가 담긴 24-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China)에 이동되었고, 온도  $16^\circ\text{C}$ , 광량  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 12:12 시간 명암 주기로 배양되었다.

### 2.2.2. 광학현미경 검경

광학현미경 관찰을 위해 시료는 포름알데히드(formaldehyde) 최종 농도 1% 또는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2%로 고정되었다. 고정된 시료는 종을 동정하기 위하여 광학현미경(LM; Axioplan, Cal Zeiss, Overkochen, Germany) 400배 배율에서 관찰되었으며, AxioCam ERc 5s 카메라(Cal Zeiss, Overkochen, Germany)로 촬영되었다.

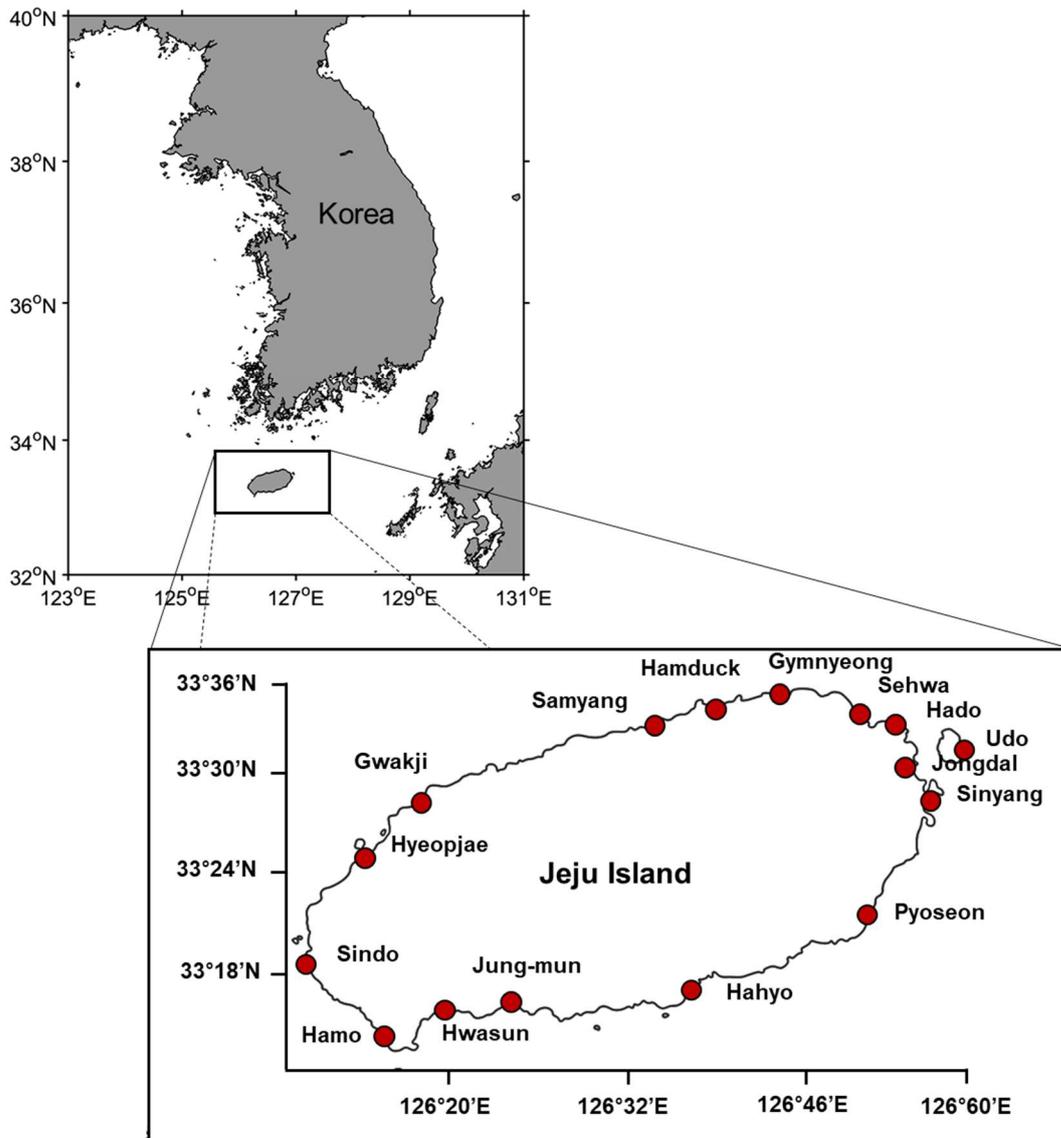
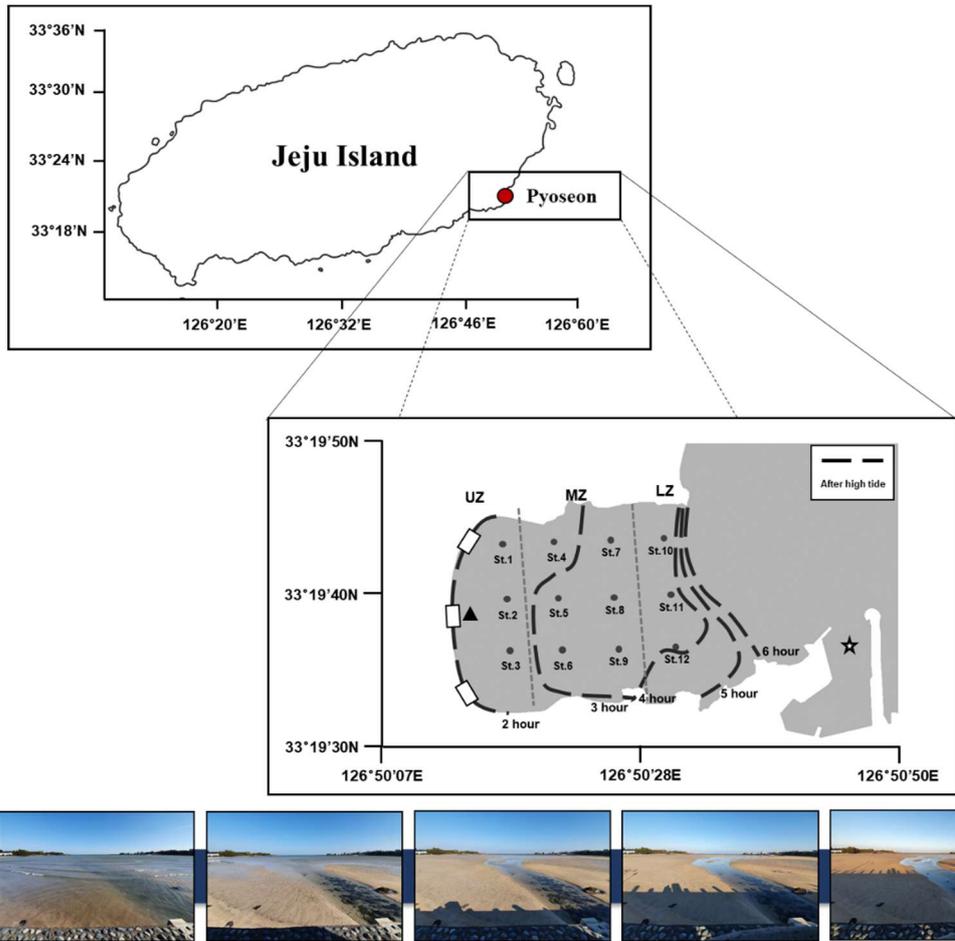


Figure 2.1. Sampling stations of sand-dwelling dinoflagellates at intertidal zone in Jeju Island, Korea.

### 2.2.3. 표선 해변 시료 채집

모래 시료는 2022년 3월부터 8월까지 제주 표선 해변에서 채집되었다. 정점은 만조 후 1시간 간격으로 해수면의 위치를 관측한 결과를 토대로 12개를 선정하였으며, 정점 1-3은 조간대 상부, 정점 4-9은 조간대 중부, 정점 10-12는 조간대 하부로 구분하였다(Fig. 2.2). 시료는 지름 4cm, 길이 20cm의 코어 샘플러를 사용하여 표면에서 5cm 깊이까지의 모래를 채집하였다. 여과해수 1 L를 모래 시료에 넣고 100  $\mu\text{m}$  체로 모래 및 저서동물체를 제거하였다. 여과된 시료는 Lugol 시약 최종 농도 1%가 되도록 고정되었다. 표선 해변 해수의 수온과 염분은 YSI 측정기 (Professional Plus, YSI Inc., Ohio, USA)를 이용하여 현장에서 측정하였고, 조간대 상부 중앙에 위치한 수로에서 염분측정기(S/Mill-E, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 염분을 확인하였다(Fig. 2.2). 영양염 분석을 위해, 현장해수 100 mL는 GF/F 여과지(25mm diameter, Whatman, Floreham Park, NJ, USA)로 여과되었고, 여과된 시료는  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관되었다.



**Figure 2.2.** Sampling stations from March to August, 2022 in Pyoseon Beach, Jeju Island. Three rectangle are a waterway exit. UZ; st.1 – st.3, the upper intertidal zone. MZ; st.4 – st.9, the middle intertidal zone. LZ; st.10 – st.12, the lower intertidal zone. Asterisk: measure environmental data using YSI. Triangle: measure salinity using salt meter.

#### 2.2.4. 영양염 분석

영양염 분석을 위하여, 냉동보관된 여과해수를 실온에서 해동시킨 후 자동 분석기(New QuAAtro39, SEAL Analytical, Southampton, United Kingdom)를 사용하여 질산염( $\text{NO}_3^-$ ; nitrate), 아질산염( $\text{NO}_2^-$ ; nitrite), 암모늄( $\text{NH}_4^+$ ; ammonium), 인산염( $\text{PO}_4^{3-}$ ; phosphate), 규산염( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ; silicate)을 측정하였다.  $\text{NO}_x$  (nitrate + nitrite)의 농도는 질산염( $\text{NO}_3^-$ ; nitrate)과 아질산염( $\text{NO}_2^-$ ; nitrite)의 합으로 정의하였다.

#### 2.2.5. 저서 미세조류 정량분석 및 저서와편모조류 정성분석

고정된 시료는 24시간 이상 정치시킨 후 상등액을 제거하여 100 mL가 되도록 10배 농축하였다. 균질하게 혼합시킨 농축된 시료 중 1 mL를 Sedwick-Rafter Chamber에 분주하여 광학현미경(BX50, Olympus, Tokyo, Japan) 200배 배율에서 계수를 실시하였고, 단위면적 당 세포 수(cells/cm<sup>3</sup>)로 표시하였다. 저서와편모조류의 종 동정은 Hoppenrath 등(2014)을 참고하였고, 광학현미경에서 ProgRes C3 카메라(Jenoptik, Jena, Germany)로 촬영되었다. 또한, 저서와편모조류 출현종 및 현존량 자료를 이용하여, 다양도 지수( $H'$ , Shannon and Wiener 1963)를 계산하였다.

$$\text{다양도 지수: } H' = - \sum P_i \times \ln(P_i)$$

$P_i$ :  $i$  번째 종의 점유율

#### 2.2.6. 통계분석

저서 미세조류 현존량 및 저서외편모조류 종다양성의 조건대 상부, 중부, 하부 간 유의차 검정을 위해 IBM SPSS statistics 25를 이용하여 일원 배치 분산 분석 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)을 실시하였고, 유의수준은  $p < 0.05$ 를 기준으로 하였다. 수온, 염분, 저서 미세조류 현존량은 IBM SPSS statistics 25를 이용하여 피어슨 상관계수를 분석하였다. 또한, 측정된 해양환경 요인과 저서 미세조류 분류군별 현존량은 IBM SPSS statistics 25를 이용하여 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)을 하였다. 주성분은 누적 기여율 70%를 기준으로 계산하였다.

## 2.3. 결과

### 2.3.1. 5년간 출현한 저서와편모조류

2017년부터 2021년까지 8개 정점에서 저서와편모조류 12속 22종을 분리하였다 (Fig. 2.3, Table 2.1). 표선 해변에서 12속으로 가장 많은 속이 분리되었고, 다음으로 하도 해변에서 8속이 분리되었다. *Amphidinium* 속과 *Gymnodinium* 속은 대부분의 정점에서 관찰되었다. 22종은 기록종 9종(*Amphidinium massartii*, *A. herdmanii*, *Bispinodinium angelaceum*, *Heterocapsa horiguchii*, *H. pseudotriquetra*, *H. psammophila*, *Prorocentrum lima*, *Thecadinium kofoidii*, *Togula jolla*), 국내 미기록종 3종(*Amphidinium fijiense*, *Ankistrodinium semilunatum*, *Thecadinium arenarium*), 미동정종 10종(*Amphidinium* sp., *Bysmatrum* sp., *Gymnodinium* sp., *Gyrodinium* sp., *Heterocapsa* sp., *Polykrikos* sp., *Prorocentrum* sp., *Testudodinium* sp., *Thecadinium* sp., *Togula* sp.)이었다.

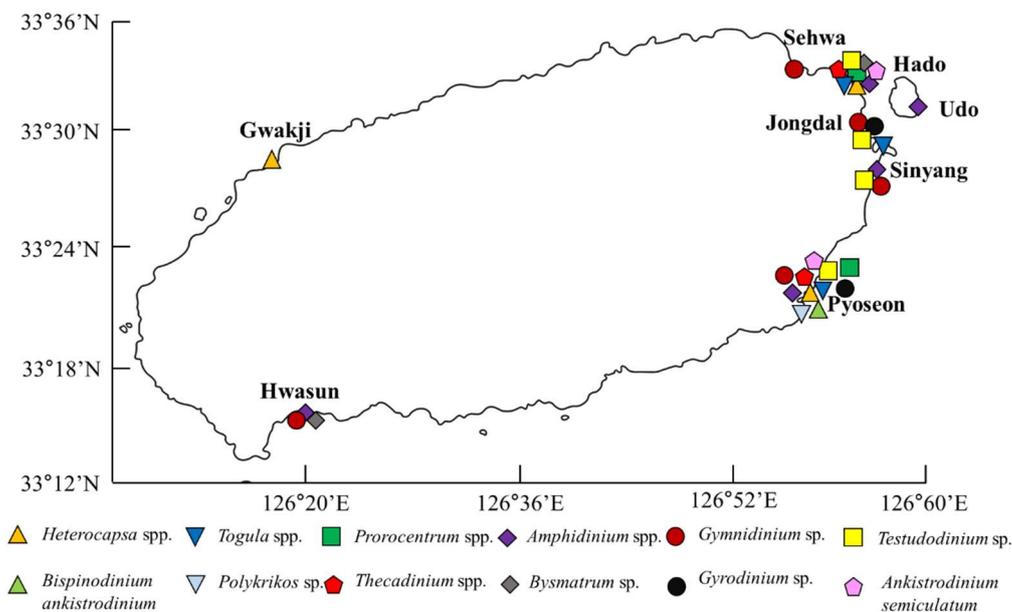


Figure 2.3. Distribution of sand-dwelling dinoflagellates around Jeju Island for 5 years.

Table 2.1. Sand-dwelling dinoflagellates list of for 5 years.

Species	Date	Sampling site	Temperature (°C)	Salinity (psu)
<i>Heterocapsa</i> sp.	2017.02.16	Gwakji Beach	15.2	34.6
<i>Togula jolla</i>	2017.02.16	Pyoseon Beach	15.6	35.2
<i>Amphidinium herdmanii</i>	2018.03.02	Pyoseon Beach	13.8	32.9
<i>Amphidinium</i> sp.	2018.03.02	Hado Beach	14.1	24.7
<i>Amphidinium</i> sp.	2018.03.02	Sinyang Beach	13.1	34.7
<i>Gyrodinium</i> sp.	2018.03.02	Sinyang Beach	13.1	34.7
<i>Gyrodinium</i> sp.	2018.03.02	Pyoseon Beach	13.8	32.9
<i>Heterocapsa pseudotriquetra</i>	2018.03.02	Pyoseon Beach	13.8	32.9
<i>Heterocapsa</i> sp.	2018.03.02	Pyoseon Beach	13.8	32.9
<i>Prorocentrum</i> sp.	2018.03.02	Pyoseon Beach	13.8	32.9
<i>Togula</i> sp.	2018.03.02	Sinyang Beach	13.1	34.7
<i>Amphidinium</i> sp.	2018.04.12	Hado Beach	21.3	33.1
<i>Ankistrodinium semilunatum</i>	2018.04.12	Hado Beach	21.3	33.1
<i>Gymnodinium</i> sp.	2018.04.12	Pyoseon Beach	18.5	30
<i>Gymnodinium</i> sp.	2018.04.12	Sehwa Beach	19.5	26.6
<i>Heterocapsa pseudotriquetra</i>	2018.04.12	Hado Beach	21.3	33.1
<i>Heterocapsa pseudotriquetra</i>	2018.04.12	Pyoseon Beach	18.5	30
<i>Heterocapsa</i> sp.	2018.04.12	Hado Beach	21.3	33.1
<i>Prorocentrum lima</i>	2018.04.12	Hado Beach	21.3	33.1
<i>Prorocentrum</i> sp.	2018.04.12	Hado Beach	21.3	33.1
<i>Thecadinium kofoidii</i>	2018.04.12	Pyoseon Beach	18.5	30

Species	Date	Sampling site	Temperature (°C)	Salinity (psu)
<i>Bysmatrum</i> sp.	2018.04.13	Hwasun Beach	26.7	26.5
<i>Amphidinium</i> sp.	2019.01.16	Hwasun Beach	14.2	32.4
<i>Amphidinium</i> sp.	2019.03.21	Sinyang Beach	14.2	33
<i>Amphidinium fijiense</i>	2019.03.21	Sinyang Beach	14.2	33
<i>Amphidinium massartii</i>	2019.03.21	Sinyang Beach	14.2	33
<i>Gymnodinium</i> sp.	2019.03.21	Sinyang Beach	14.2	33
<i>Amphidinium</i> sp.	2019.04.19	Hwasun Beach	19.4	29.4
<i>Amphidinium</i> sp.	2019.04.20	Hado Beach	21.1	32.7
<i>Amphidinium</i> sp.	2019.04.22	U-do Beach		
<i>Amphidinium</i> sp.	2020.03.11	Hado Beach	15.2	26.9
<i>Amphidinium</i> sp.	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Bispinodinium angelaceum</i>	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Bysmatrum</i> sp.	2020.03.11	Hado Beach	15.2	26.9
<i>Gymnodinium</i> sp.	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Heterocapsa horiguchii</i>	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Polykrikos</i> sp.	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Prorocentrum</i> sp.	2020.03.11	Hado Beach	15.2	26.9
<i>Testudodinium</i> sp.	2020.03.11	Hado Beach	15.2	26.9
<i>Thecadinium</i> sp.	2020.03.11	Hado Beach	15.2	26.9
<i>Thecadinium arenarium</i>	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Togula</i> sp.	2020.03.11	Hado Beach	15.2	26.9
<i>Togula</i> sp.	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7

Species	Date	Sampling site	Temperature (°C)	Salinity (psu)
<i>Testudodinium</i> sp. ( <i>Paraamphidinium jejuensis</i> sp. nov.)	2020.03.11	Pyoseon Beach	15.4	32.7
<i>Gymnodinium</i> sp.	2020.04.26	Jong-dal Beach	16.5	34.2
<i>Gyrodinium</i> sp.	2020.04.26	Jong-dal Beach	16.5	34.2
<i>Togula</i> sp.	2020.04.26	Jong-dal Beach	16.5	34.2
<i>Prorocentrum</i> sp.	2020.04.26	Jong-dal Beach	16.5	34.2
<i>Amphidinium</i> sp.	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Gymnodinium</i> sp.	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Heterocapsa psammophila</i>	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Polykrikos</i> sp.	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Testudodinium</i> sp.	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Thecadinium kofoidii</i>	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Togula</i> sp.	2021.02.13	Pyoseon Beach	16.3	29.3
<i>Amphidinium</i> sp.	2021.03.13	Pyoseon Beach	15.9	28.8
<i>Gymnodinium</i> sp.	2021.03.13	Pyoseon Beach	15.9	28.8
<i>Heterocapsa</i> sp.	2021.03.13	Pyoseon Beach	15.9	28.8
<i>Prorocentrum</i> sp.	2021.03.13	Pyoseon Beach	15.9	28.8
<i>Testudodinium</i> sp.	2021.03.13	Pyoseon Beach	15.9	28.8
<i>Amphidinium</i> sp.	2021.05.22	Pyoseon Beach	22.7	34.6
<i>Ankistrodinium semilunatum</i>	2021.05.22	Pyoseon Beach	22.7	34.6
<i>Bispinodinium angelaceum</i>	2021.05.22	Pyoseon Beach	22.7	34.6
<i>Heterocapsa</i> sp.	2021.05.22	Pyoseon Beach	22.7	34.6
<i>Prorocentrum</i> sp.	2021.05.22	Pyoseon Beach	22.7	34.6

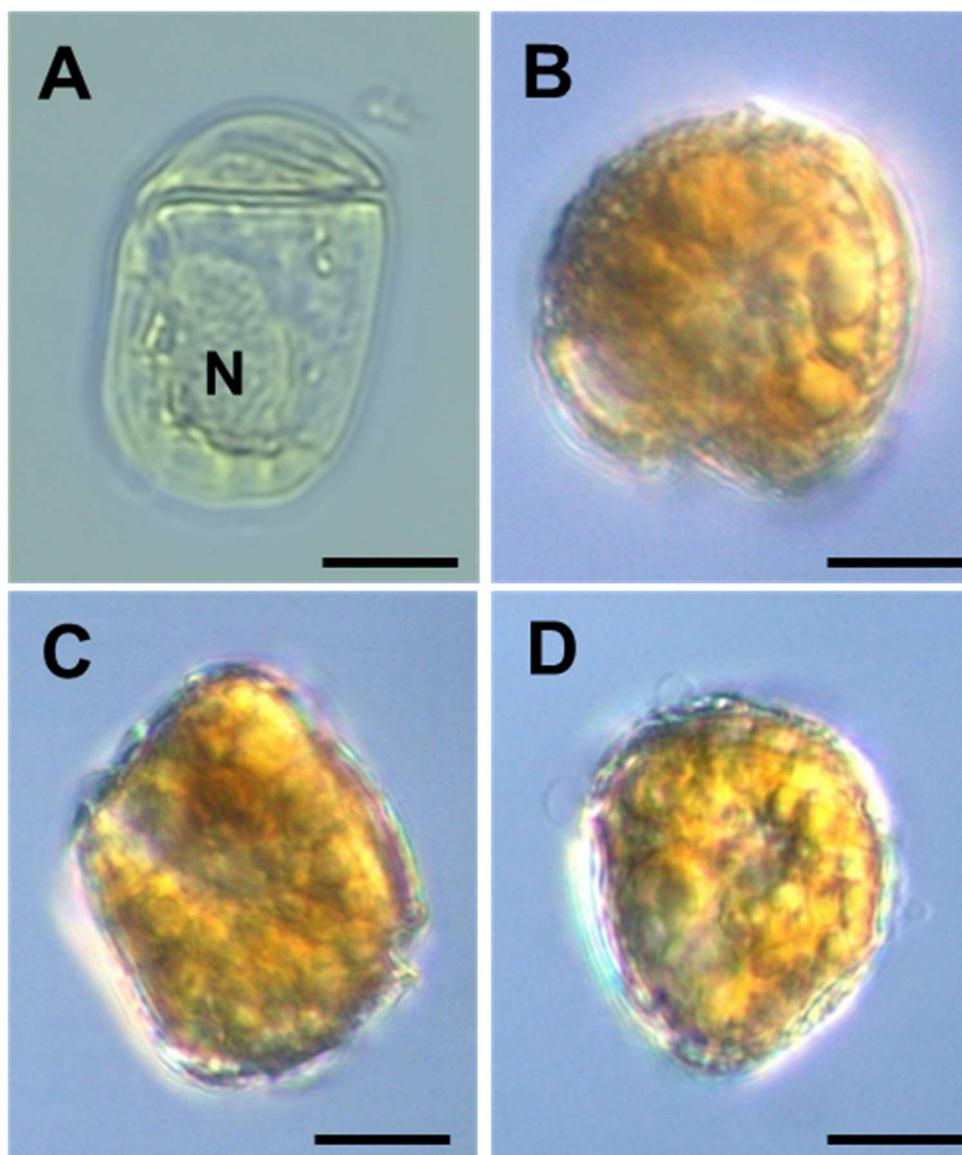
### 2.3.2. 미기록종 2 종의 형태적 특징

*Ankistrodinium semilunatum* (Herdman) Hoppenrath, Murray, Sparmann et Leander 2012 (Fig. 2.4 A)

세포의 길이는 30 - 45  $\mu\text{m}$ , 너비는 40 - 48  $\mu\text{m}$  이다. 세포는 둥근 사각형 형태이고, 측면으로 편평하다. 상추는 작은 돛 형태이고, 하추는 매우 크고, 배면은 둥글고 등면은 곧으며 등면이 배면보다 약간 높다. 횡구는 폭이 깊고, 좁으며 단차를 가지고 있고. 세포를 완전히 둘러쌌다. 종구는 하부로 갈수록 넓어지고, 하추의 등면 끝까지 확장되었다. 핵은 하추의 중간에 위치하였다.

*Thecadinium arenarium* Yoshimatsu, Toriumi et Dodge 2004 (Fig. 2.4. B - D)

세포의 길이는 35 - 40  $\mu\text{m}$ , 너비는 25 - 30  $\mu\text{m}$  이다. 상각은 하각에 비해 매우 작고, apical view에서 원형의 형태를 보인다(Fig. 2.4B). 횡구는 세포를 둘러싸고 단차를 보인다(Fig. 2.4B, C). 세포는 타원형의 형태이고, 측면으로 편평하다(Fig. 2.4C, D). 엽록체가 존재한다.



**Figure 2.4.** Light micrographs of (A) *Ankistrodinium semilunatum* and (B–D) *Thecadinium arenarium*. A. Lateral view showing the nucleus (N). B. Apical view. C. Lateral view. D. Lateral view. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.3. 표선 해변에서 서식하는 저서와편모조류의 출현 및 분포현황

#### 2.3.3.1. 환경 요인

조사기간 중 해수온의 범위는  $13.7 - 26.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  (평균  $19.7 \pm 4.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ )이고, 3 월이  $13.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 가장 낮고 8 월이  $26.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 가장 높았다(Fig. 2.5A). 염분의 범위는  $30.9 - 34.8\text{ psu}$ (평균  $33.1 \pm 1.3\text{ psu}$ )이고, 5 월이  $34.8\text{ psu}$ 로 가장 높았고 8 월이  $30.9\text{ psu}$ 로 가장 낮았다(Fig. 2.5A). 월평균 현존량의 범위는  $30 - 50\text{ cells/cm}^3$ 로 3 월이 가장 낮고 6 월에 가장 높았다(Fig. 2.5A). 정점 2 근처에 존재하는 작은 수로의 염분 범위는  $27 - 33\text{ psu}$  ( $29.8 \pm 2.3\text{ psu}$ )로 3 월에 가장 높고 8 월에 가장 낮았다(Fig. 2.5B).

영양염류 중 질산염 및 아질산염( $\text{NO}_x$ )의 범위는  $2.7 - 8.4\text{ }\mu\text{M}$  (평균  $5.1 \pm 2.3\text{ }\mu\text{M}$ )이고, 4 월에  $2.7\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 낮고 7 월에  $8.4\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 높았다(Fig. 2.6A). 암모늄의 범위는  $0.02 - 1.08\text{ }\mu\text{M}$  (평균  $0.76 \pm 0.39\text{ }\mu\text{M}$ )이고, 4 월에  $0.02\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 낮고 7 월에  $1.08\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 높았다(Fig. 2.6A). 규산염의 범위는  $5.77 - 26.14\text{ }\mu\text{M}$  (평균  $15.69 \pm 6.77\text{ }\mu\text{M}$ )이고, 5 월에  $5.77\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 낮고 7 월에  $26.14\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 높았다(Fig. 2.6B). 인산염의 범위는  $0.15 - 0.46\text{ }\mu\text{M}$  (평균  $0.28 \pm 0.12\text{ }\mu\text{M}$ )이고, 8 월에  $0.15\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 낮고 7 월에  $0.46\text{ }\mu\text{M}$ 로 가장 높았다(Fig. 2.6B).

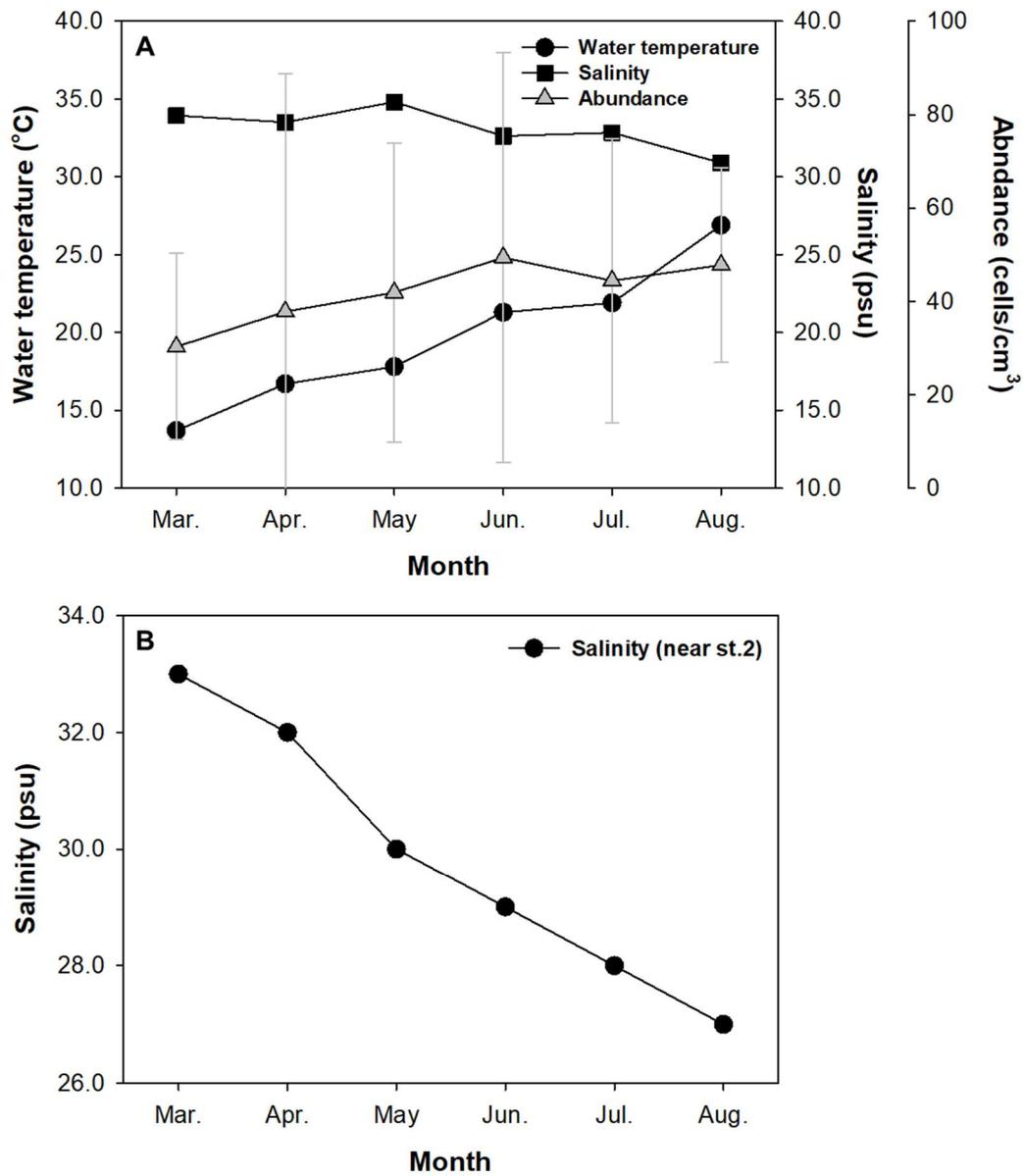


Figure 2.5. A. Monthly variation of water temperature, salinity and mean abundance of benthic microalgae in Pyoseon Beach from March and August, 2022. B. Monthly variation of salinity near the st. 2 of intertidal zone in Pyoseon Beach from March and August, 2022.

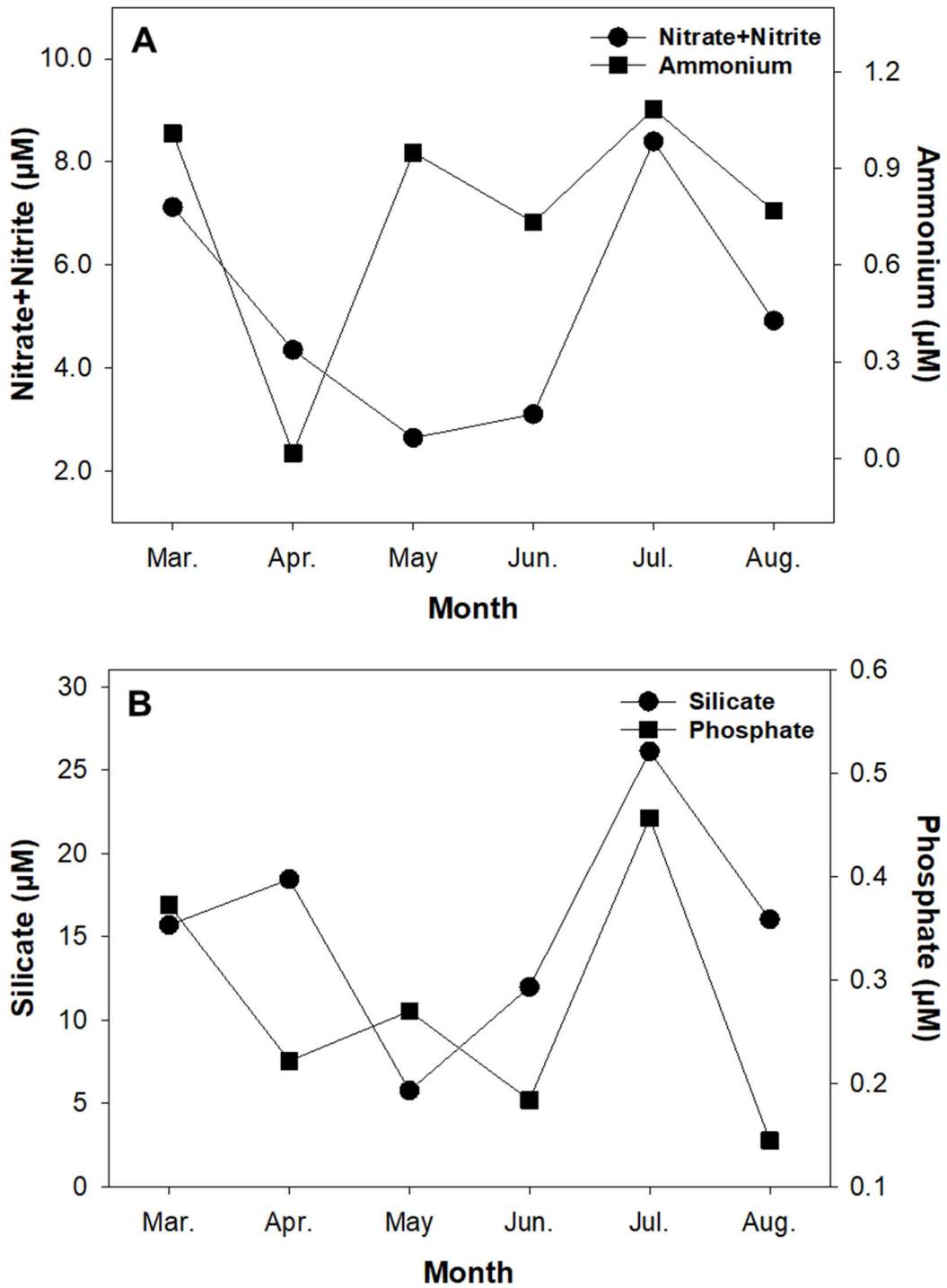


Figure 2.6. A. nitrate + nitrite ( $\text{NO}_x$ ) and ammonium and B. silicate and phosphate in Pyoseon Beach from March to August, 2022.

### 2.3.3.2. 저서 미세조류 현존량

조사기간 중 제주 저서 미세조류 군집의 현존량은 14 - 175 cells/cm<sup>3</sup> (평균 41.9 ± 28.6 cells/cm<sup>3</sup>)로 3 월 정점 11 과 4 월 정점 10 에서 14 cells/cm<sup>3</sup> 로 가장 낮고 6 월 정점 2 에서 175 cells/cm<sup>3</sup> 로 가장 높았다(Fig. 2.7A). 전 정점에서 7 월을 제외하고 정점 2 에서 현존량이 가장 높았고, 7 월은 정점 3 에서 가장 높았다(Fig. 2.7A). 조간대 상부(UZ; st. 1 - st. 3)의 월별 평균 현존량은 51 - 86 cells/cm<sup>3</sup> 이고 3 월에 가장 낮고 6 월에 가장 높았다(Fig. 2.7B). 정점 2 를 제외한 조간대 상부의 월별 평균 현존량은 34 - 57 cells/cm<sup>3</sup> 로 3 월에 가장 낮고 7 월에 가장 높았다(Fig. 2.7B). 조간대 중부(MZ; st. 4 - st. 9)의 월별 평균 현존량은 26 - 48 cells/cm<sup>3</sup> 로 3 월에 가장 낮고 8 월에 가장 높았다(Fig. 2.7B). 조간대 하부(LZ; st. 10 - st. 12)의 월별 평균 현존량은 18 - 42 cells/cm<sup>3</sup> 로 3 월에 가장 낮고 6 월에 가장 높았다(Fig. 2.7B). 조간대 상부의 월별 평균 현존량이 조간대 중하부의 월별 평균 현존량보다 높았으나, 조간대 정점별 현존량의 차이는 5 월을 제외하고 유의하지 않았다.

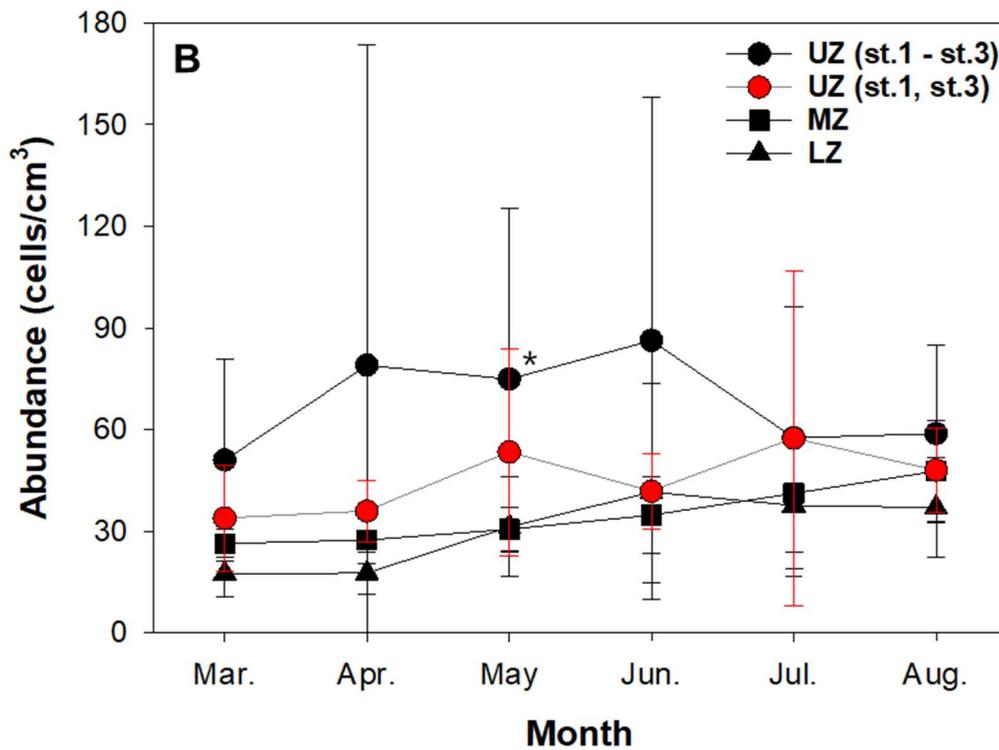
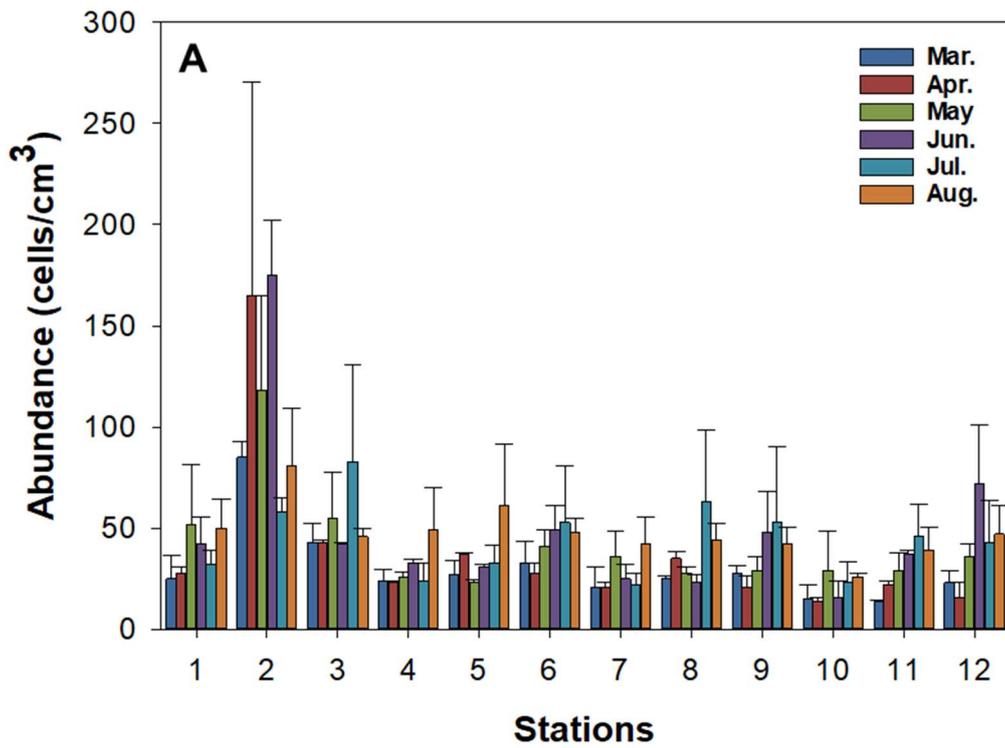


Figure 2.7. A. The abundance of benthic microalgae of all stations from March to August, 2022. B. Monthly variation of abundance of UZ, MZ and LZ from March to August, 2022 (\*; ANOVA,  $p < 0.05$ ).

### 2.3.3.3. 저서 미세조류의 분류군별 현존량 및 분포

저서 미세조류 중 저서 규조류의 월별 평균 현존량의 범위는 30 - 36 cells/cm<sup>3</sup>로 3 월에 가장 적고 8 월에 가장 많았다(Fig. 2.8). 저서와편모조류의 월별 평균 현존량의 범위는 4 - 10 cells/cm<sup>3</sup>로 3 월에 가장 적고 6 월에 가장 많았다(Fig. 2.8). 기타 편모조류의 월별 평균 현존량의 범위는 2 - 5 cells/cm<sup>3</sup>로 3 월에 가장 적고 6 월에 가장 많았다(Fig. 2.8). 저서 미세조류 조성비의 월별 변화를 보면, 저서 규조류의 비율은 64 - 79%의 범위를 보이고 6 월에 가장 낮고, 4 월에 가장 높았다(Fig. 2.8). 저서와편모조류의 비율은 15 - 23%로 6 월에 가장 높았다(Fig. 2.8). 기타 편모조류의 비율은 5 - 13%로 4 월에 가장 낮고, 6 월에 가장 높았다(Fig. 2.8).

12 개 정점에서 저서 미세조류의 분류군별 월별 분포를 보면, 저서 규조류의 현존량은 9 - 160 cells/cm<sup>3</sup>의 범위를 보이고, 3 월부터 6 월까지 정점 2 에 현존량이 가장 많고 조간대 하부에 비해 조간대 상부에 많이 분포하였다(Fig. 2.9). 저서와편모조류의 현존량은 1 - 23 cells/cm<sup>3</sup>의 범위를 보이고, 3 월 현존량은 조간대 하부에 많이 분포하였다(Fig. 2.9). 3 월부터 6 월까지 와편모조류의 현존량이 점차 증가하였고 6 월에 조간대 중하부에 많이 분포하였다(Fig. 2.9). 기타편모조류는 1 - 16 cells/cm<sup>3</sup> 범위를 보이고, 3 월에서 6 월로 갈수록 점차 증가하였고, 분포의 경향성은 관찰되지 않았다(Fig. 2.9).

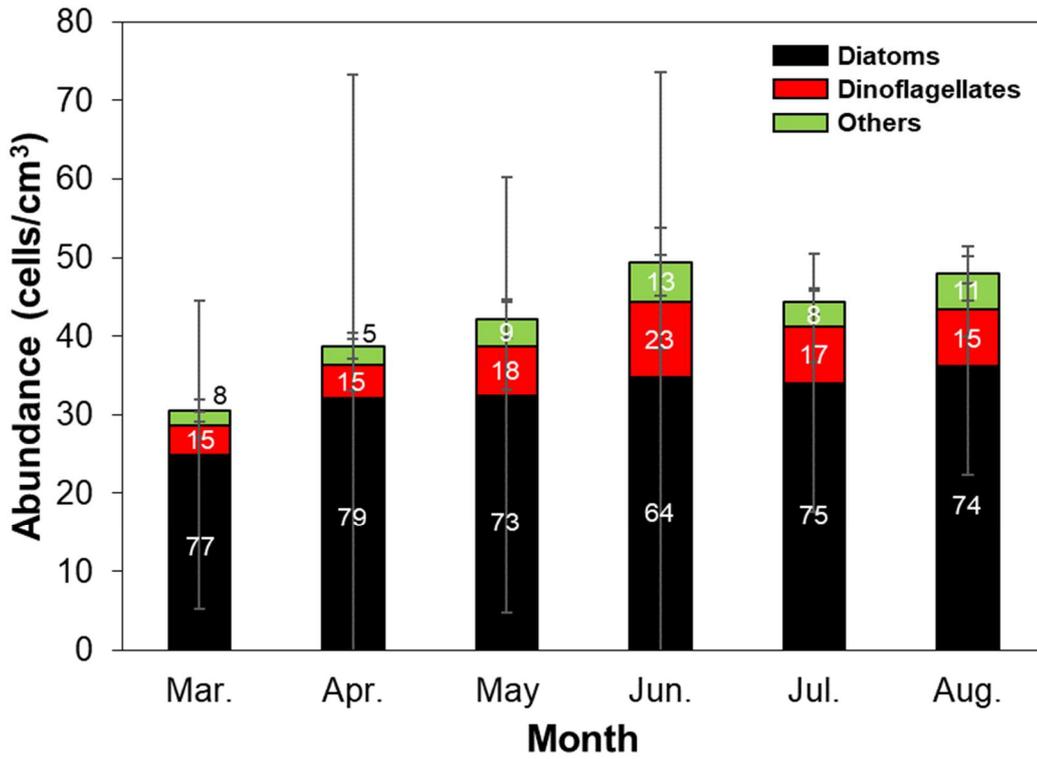


Figure 2.8. Benthic taxon abundance from March to August, 2022. The numbers represent the species composition ratio.

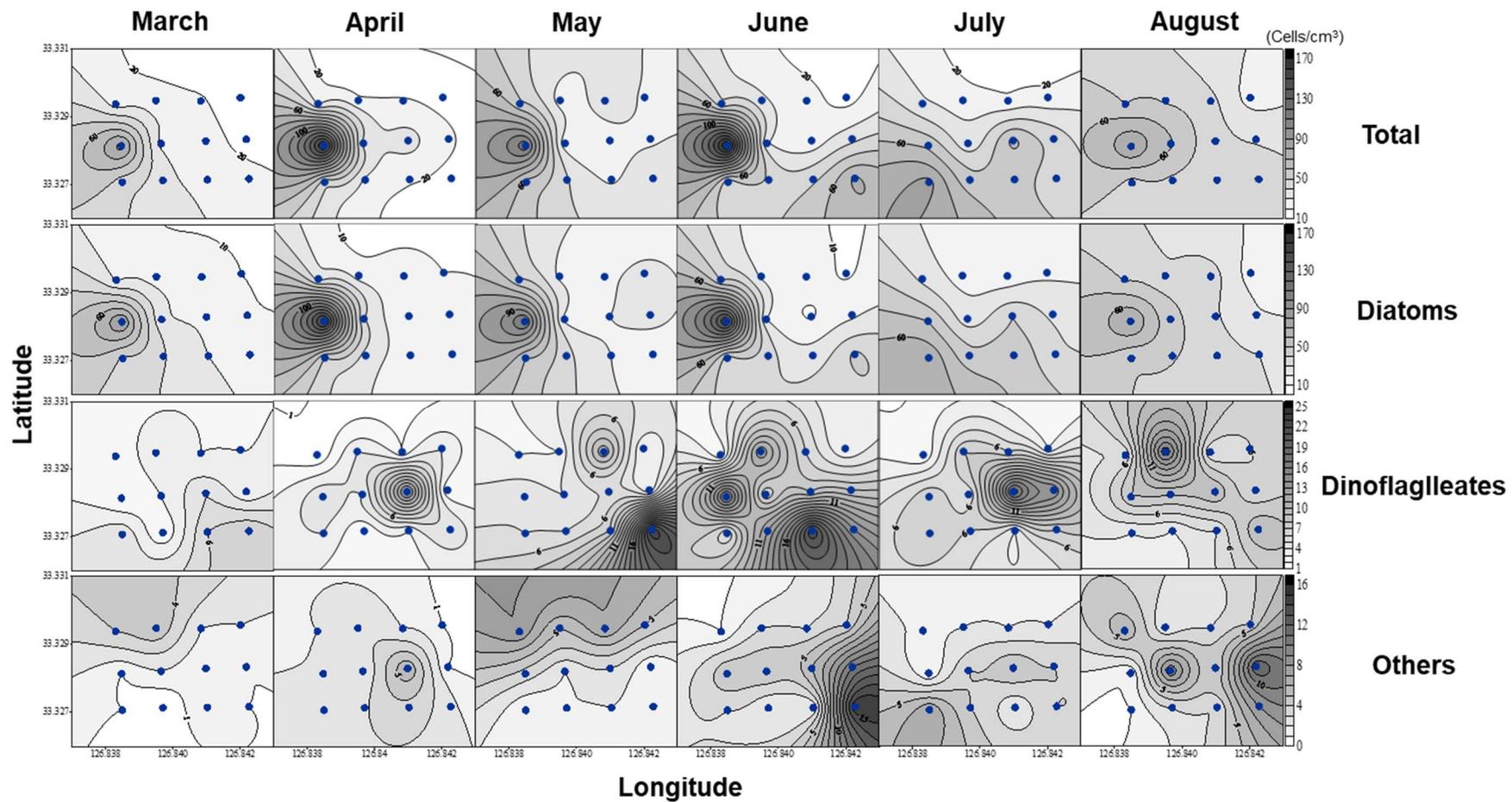
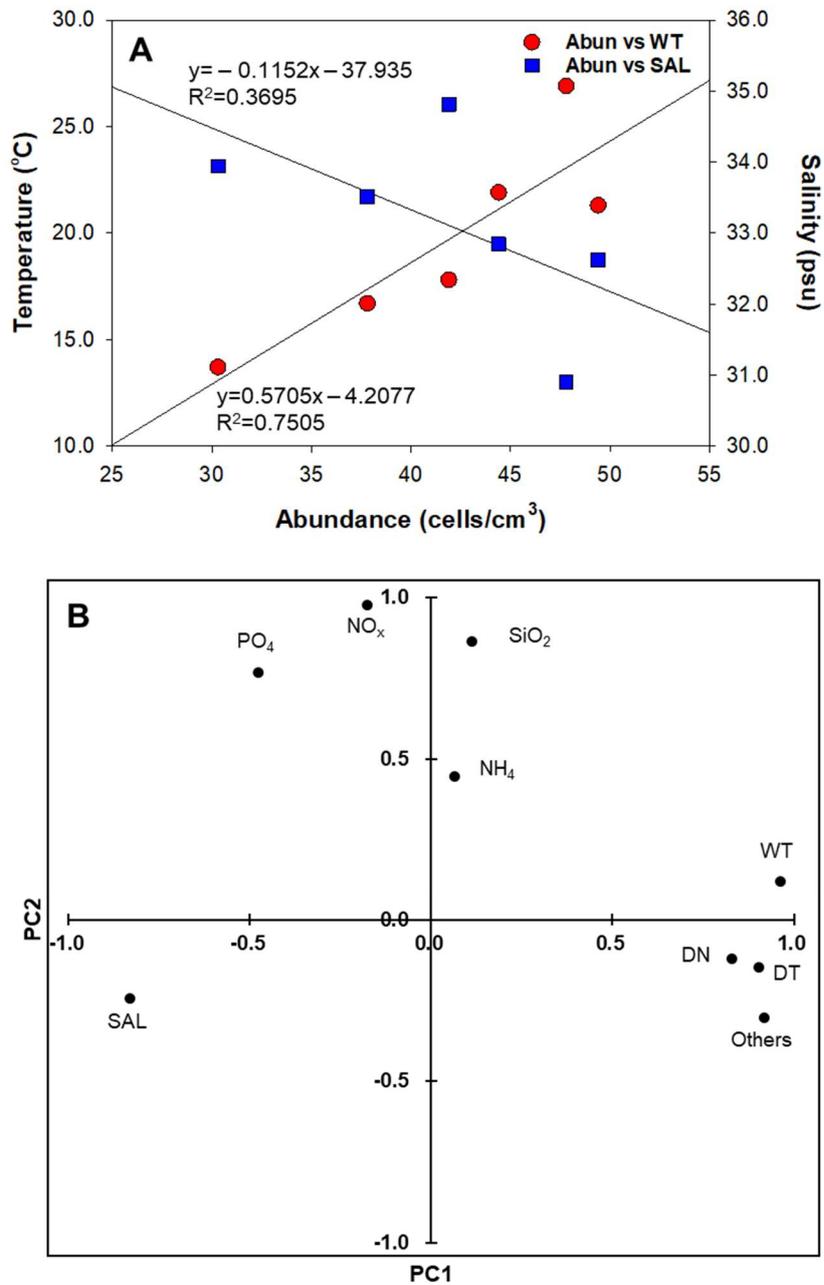


Figure 2.9. Monthly distribution of benthic diatom, dinoflagellates and other taxa in Pyoseon Beach from May to August, 2022.

#### 2.3.3.4. 저서 미세조류와 환경요인과의 관계

저서 미세조류 현존량과 수온의 상관관계는 0.866 으로 높은 양의 상관성을 나타내며, 통계적으로  $p < 0.05$  수준에서 유의하다. 그러나, 저서 미세조류 현존량과 염분은  $-0.688$  로 음의 상관을 나타내지만 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2.10A).

누적기여율 70%로 주성분 분석을 수행한 결과 제 2 주성분까지 도출하였다. 인자부하량에서 제 1 주성분은 수온, 저서 규조류, 저서와편모조류, 기타편모조류의 현존량에 강한 양의 관계를 보였고, 염분과 강한 음의 관계를 보였고(Fig. 2.10B), 수온 변화에 따른 저서 미세조류의 현존량 변화와 관련이 높은 것으로 해석되었다. 제 2 주성분은 질산염 및 아질산염( $\text{NO}_x$ ), 규산염, 인산염과 강한 양의 관계를 보였고, 암모늄과는 약한 양의 관계를 보였고(Fig. 2.10B), 영양염 간의 변화와 관련이 높은 것으로 해석되었다.



**Figure.2.10.** A. relationships between benthic microalgae abundance and water temperature or salinity in Pyoseon Beach from March to August, 2022. B. Distributions of loading factors by PCA in Pyoseon Beach. WT; water temperature, SAL; salinity, NO<sub>x</sub>; nitrate + nitrite, NH<sub>4</sub>; ammonium, SiO<sub>2</sub>; silicate, PO<sub>4</sub>; Phosphate, DT; benthic diatoms, DN; benthic dinoflagellates, Others; benthic flagellates.

#### 2.3.3.5. 저서와편모조류의 출현종

사질 조간대에 서식하는 와편모조류의 정점별 출현종수는 2 - 13 종으로 3 월 정점 2 에서 가장 적고 6 월 정점 9 에서 가장 많았다(Fig. 2.11). 다양도 지수는 0.25 - 2.31 (평균  $1.48 \pm 0.37$ ) 범위를 보였다(Fig. 2.12). 조간대 상부와 하부의 월별 평균 다양도 지수는 8 월을 제외하고 상부보다 하부가 높았다(Fig. 2.12). 통계적으로 조간대 상부, 중부, 하부의 평균 다양도 지수의 차이는 4 월에서만 유의하였으나(ANOVA,  $p < 0.05$ , Fig. 2.12), 전체적으로 조간대 상부에서 하부로 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2.12).

조사기간 중 표선 해변에서 총 23 속 48 종의 저서와편모조류가 출현하였다(Table 2.2, Fig. 2.13, 2.14). 48 종 중 잠재독성종 4 종(*Amphidinium carterae*, *A. operculatum*, *Prorocentrum concavum*, *P. rathymum*), 국내 미기록종 8 종(*Amphidiniopsis hexagona*, *Ankistrodinium semilunatum*, *Carinadinium striatum*, *Herdmania litoralis*, *Planodinium striatum*, *Sinophysis grandis*, *S. microcephala*, *Psammadinium inclinatum*), 미동정 저서와편모조류 17 종(*Adenois* sp., *Amphidiniella* sp., *Amphidinium* sp., *Apicoporus* sp., *Bysmatrum* sp., *Durinskia* sp., *Gymnodinium* sp., *Gyrodinium* sp., *Heterocapsa* sp., *Katodinium* sp., *Planodinium* sp., *Prorocentrum* sp., *Protoperidinium* sp., *Roscoffia* sp., *Sinophysis* sp., *Testudodinium* sp., *Thecadinium* sp.)이 포함되었다. 3 월부터 8 월까지 가장 많이 출현한 속은 10 종이 출현한 *Amphidinium* 속이었다. 그 다음으로 *Prorocentrum* 속 6 종, *Heterocapsa*, *Sinophysis*, *Testudodinium* 이 각각 3 종씩 출현하였다. *Amphidinium gibbosum*, *Amphidinium massartii*, *Heterocapsa psammophila*, *Thecadinium kofoidii* 와 같은 종들은 조사기간 중 빈번하게 출현하는 것으로

나타났다. *Heterocapsa* sp.는 매월 출현하였으며, 6월부터 개체수가 증가하였고 8월에 가장 많이 출현하였다. 또한, *Ankistrodinium semilunatum* 과 *Katodinium asymmetricum* 은 6월에 20 cells/cm<sup>3</sup> 이상 출현하였다. 잠재독성종 4종 중 *P. concavum* 은 4월과 6월에 출현하였고, *A. carterae* 는 5월과 7월에 출현하였다. *A. operculatum* 과 *P. rhathymum* 은 6월부터 출현하였다. 잠재독성종 *Amphidinium operculatum* 은 수온이 21℃ 이상인 하계에서만 출현하였다.

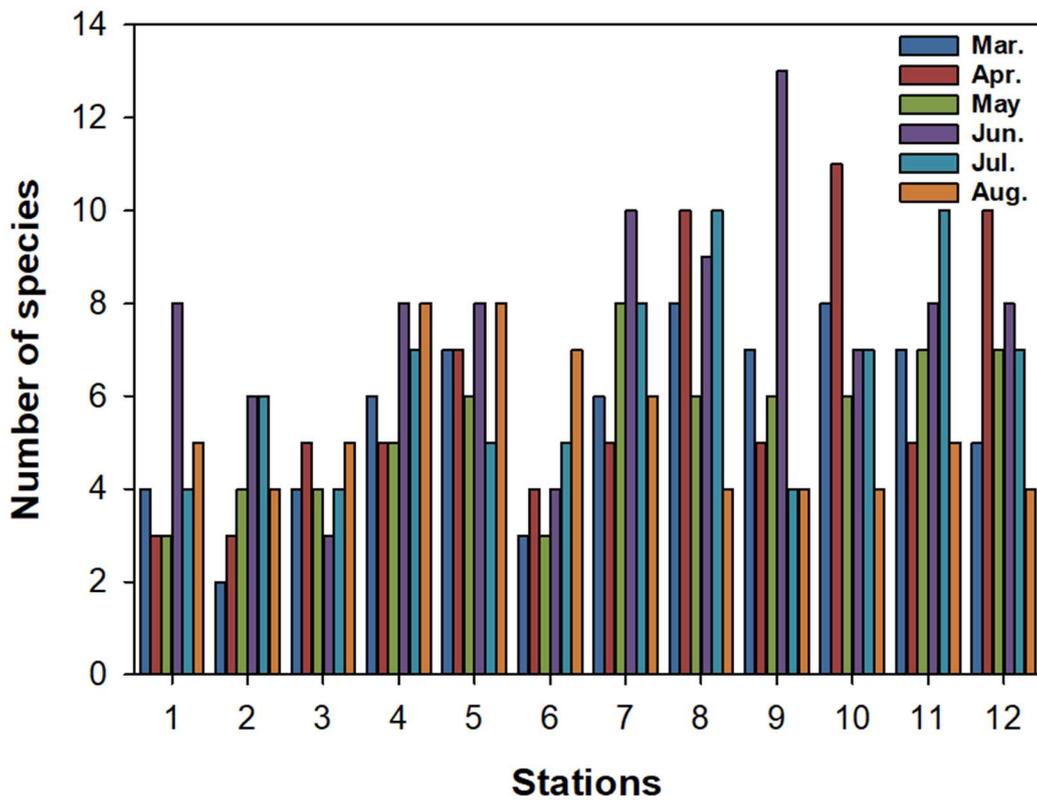
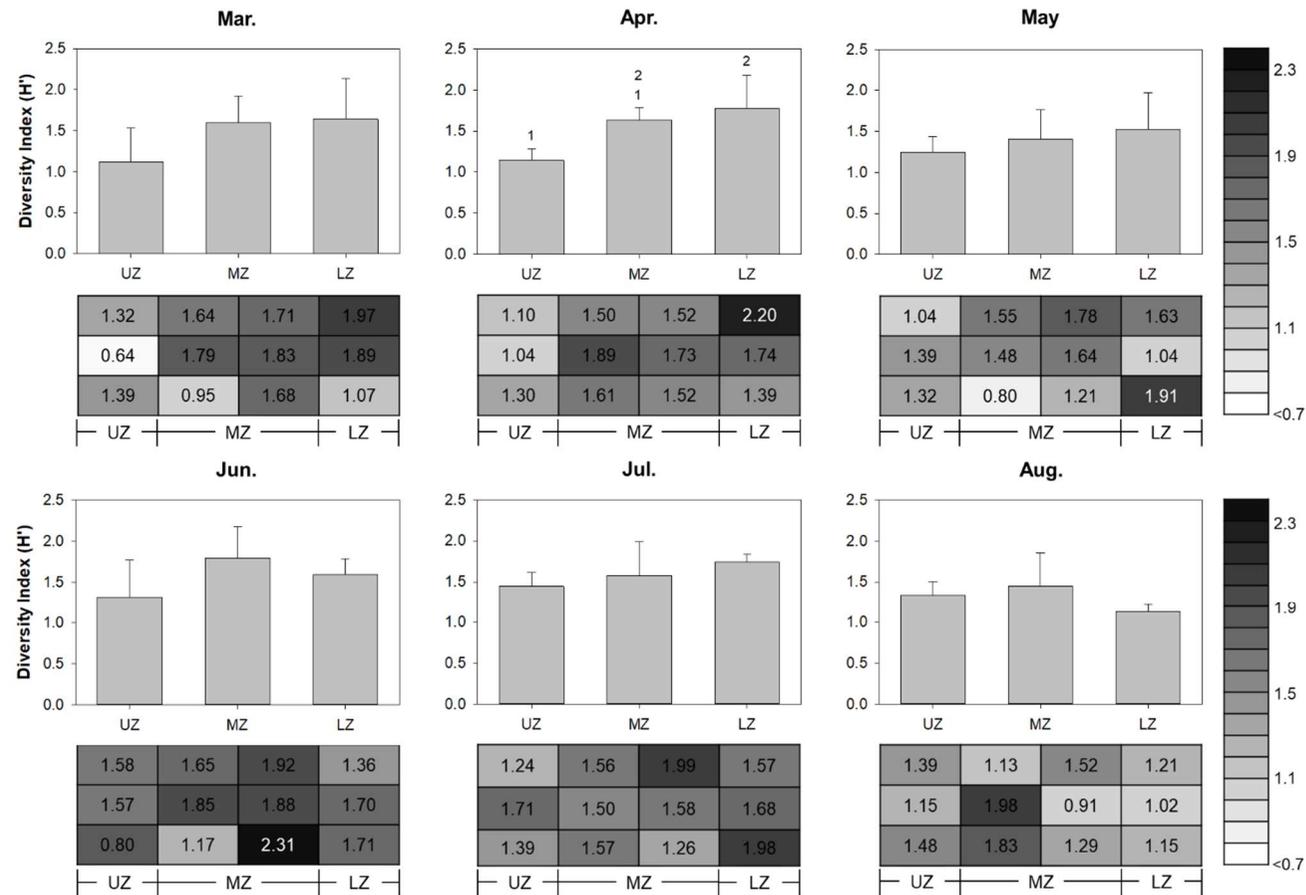


Figure 2.11. The number of sand-dwelling dinoflagellates species of all stations from March to August, 2022.



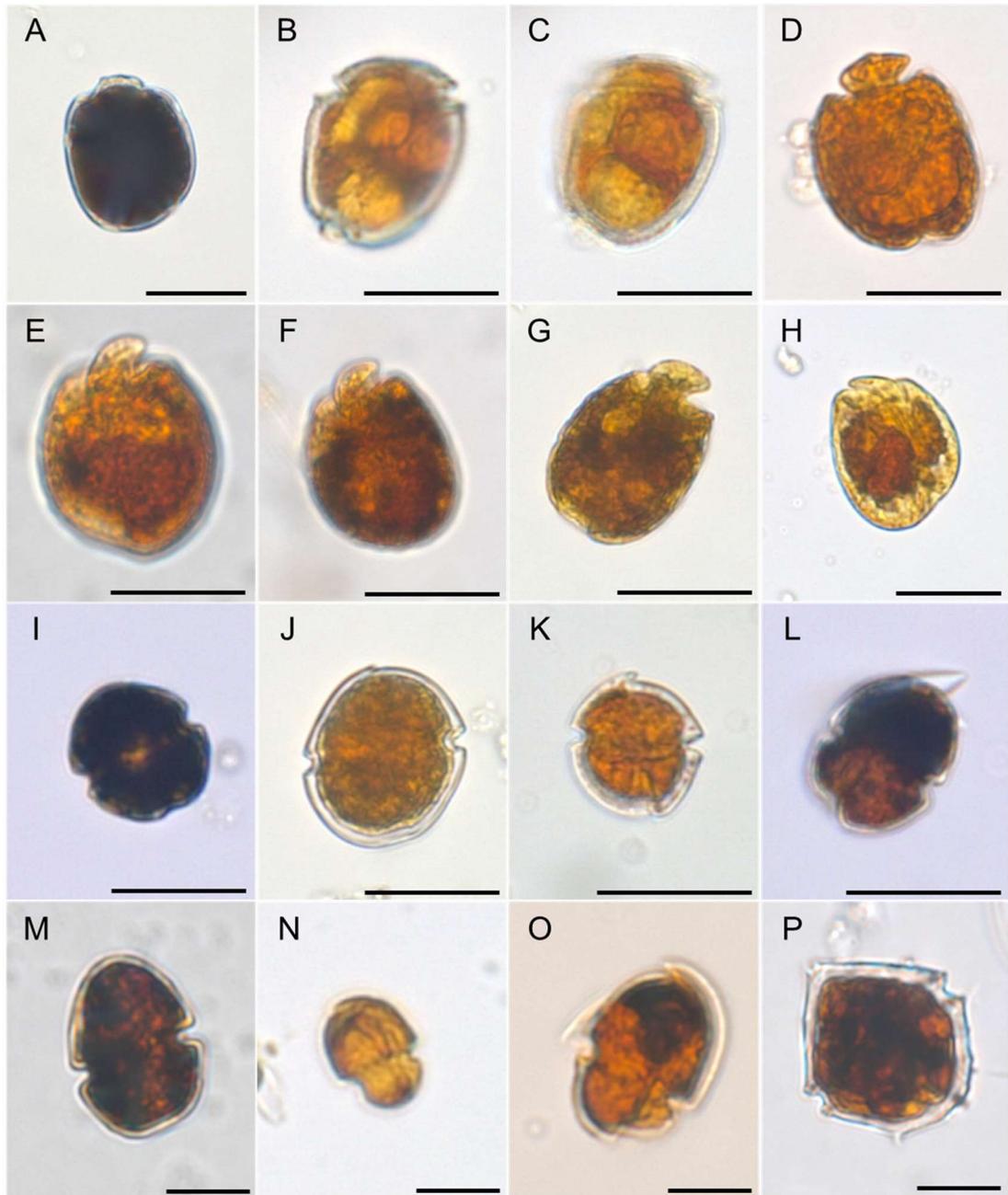
**Figure 2.12.** Diversity Index ( $H'$ ) of sand-dwelling dinoflagellates. The table shows diversity Index for each stations. The bar graph shows the monthly mean diversity Index of the upper, middle, lower intertidal zone. The numbers indicate difference between by Duncan test. The table shows diversity Index of stations.

Table 2.2. List of species of sand-dwelling dinoflagellates of Pyoseon Beach.

	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug
<i>Adenois eludens</i>	+					
<i>Adenois</i> sp.		+				
<i>Amphidiniella</i> sp.				+		
<i>Amphidiniopsis hexagona</i> *		+		+	+	
<i>Amphidinium bipes</i>			+	+		
<i>Amphidinium carterae</i>			+		+	
<i>Amphidinium herdmanii</i>	+					
<i>Amphidinium incoloratum</i>	+	+	+		+	
<i>Amphidinium latum</i>	+	+				
<i>Amphidinium massartii</i>	+	+		+	+	+
<i>Amphidinium operculatum</i>				+	+	+
<i>Amphidinium steinii</i>	+	+	+	+	+	
<i>Amphidinium trulla</i>	+					+
<i>Amphidinium</i> sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Ankistrodinium semilunatum</i> *		+	+	+++	+	+
<i>Apicoporus</i> sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Bysmatrum</i> sp.	+					
<i>Carinadinium ovatum</i>				+		
<i>Carinadinium striatum</i> *						+
<i>Durinskia</i> sp.	+					
<i>Gymnodinium</i> sp.	++	+	+	+	+	+
<i>Gyrodinium</i> sp.	+	+	+	+		+
<i>Herdmania litoralis</i> *				+		
<i>Heterocapsa horiguchii</i>		+				
<i>Heterocapsa psammophila</i>	+	+	+	+	++	+
<i>Heterocapsa</i> sp.	+	+	+	++	++	+++
<i>Katodinium asymmetricum</i>	+			+++	++	+
<i>Katodinium</i> sp.	+		+		+	+

<i>Planodinium striatum</i> *	+					
<i>Planodinium</i> sp.			+			
<i>Prorocentrum clipeus</i>	+					
<i>Prorocentrum concavum</i>			+		+	
<i>Prorocentrum fukuyoi</i>	+				+	
<i>Prorocentrum lima</i>						+
<i>Prorocentrum rathymum</i>					+	+
<i>Prorocentrum</i> sp.	+	+	+	+		+
<i>Protoperidinium</i> sp.	+	+	+		+	+
<i>Psammodinium inclinatum</i> *	+			+		
<i>Roscoffia</i> sp.			+	+	+	+
<i>Sinophysis grandis</i> *	+				+	+
<i>Sinophysis microcephala</i> *	+	+			+	
<i>Sinophysis</i> sp.	+	+	+	+		+
<i>Testudodinium testudo</i>	+					
<i>Testudodinium corrugatum</i>						+
<i>Testudodinium</i> sp.	+	+	+			
<i>Thecadinium kofoidii</i>	+	+	+	+		+
<i>Thecadinium</i> sp.				+		
<i>Togula jolla</i>	+					

\*: unrecorded species, +:  $n < 10$  cells/cm<sup>3</sup>, ++:  $10 \leq n < 20$ , +++:  $20 \text{ cells/cm}^3 \geq n$ , Red-colored species: potential toxic species classified by related papers.



**Figure 2. 13.** Light micrographs of sand-dwelling dinoflagellates from Pyoseon Beach. A. *Adenois eludens*; B, C. *Amphidiniopsis hexagona*; D. *Amphidinium herdmanii*; E. *Amphidinium incoloratum*; F, G. *Amphidinium operculatum*; H. *Amphidinium* sp.; I. *Gymnodinium* sp.; J, K. *Herdmania litoralis*; L, M. *Heterocapsa psammophila*; N, O. *Katodinium asymmetricum*; P. *Protoperidinium* sp. Scale bars = 20  $\mu$ m (A – L) and 10  $\mu$ m (M – P).

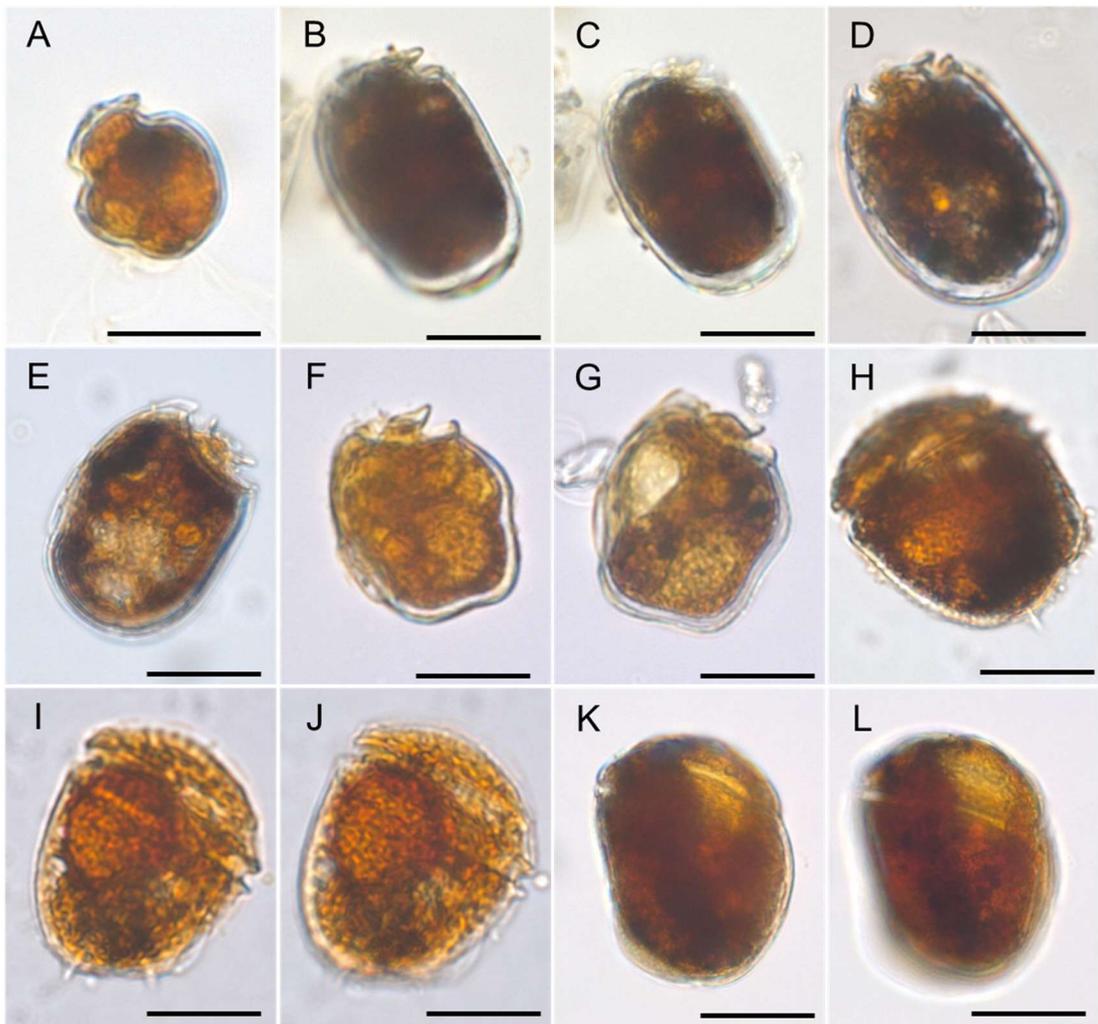


Figure 2.14. Light micrographs of sand-dwelling dinoflagellates from Pyoseon Beach. A. *Roscoffia* sp.; B, C. *Sinophysis grandis*; D, E. *Sinophysis microcephala*; F, G. *Sinophysis* sp.; H – J. *Carinadinium ovatum*; K, L. *Psammodinium inclinatum*. Scale bars = 20  $\mu$ m.

## 2.4. 토의

5년간 제주 사질 조간대 8개 정점에서 총 12속 21종을 분리하였다(Fig. 2.3, Table 2.1). 대부분 제주도 동부에 많이 관찰되었고, 표선해변에서 가장 많은 속이 관찰되었다. 이는 쿠로시오 해류의 영향으로 인해 저서와편모조류의 유입이 많을 것으로 생각되었던 제주도 동부의 채집빈도가 다른 지역에 비해 많았기 때문이다. 다른 지역의 경우, 제주도 남부(서귀포 인근)는 사질 조간대가 형성되지 않았고, 제주도 서부 중 중문은 파랑이 강해 저서와편모조류가 관찰되기 어려웠다.

*Heterocapsa* 속은 *Heterocapsa psammophila* 를 제외하고는 연안에서 서식한다고 알려져 있다. 그러나, 본 연구에서는 5년의 조사기간 동안 제주 사질 조간대에서 *Heterocapsa* 종을 분리 및 배양하였다. 시료는 모래와 간극수가 채집되었다. 사전 연구에서 *Heterocapsa* 배양주를 직경 4cm, 20cm 깊이의 코어 시료에 접종 후, 12 시간 뒤 시료의 생존을 확인하였을 때, 세포는 12 시간 뒤에도 생존하고 있음을 확인하였다. 또한, 20cm 시료를 5cm 간격으로 분리하여 세포 수를 확인 하였을 때, 6 - 10cm 범위의 시료에서도 관찰되었다. 따라서, *Heterocapsa* 가 모래시료에서 적응할 수 있는 가능성을 보여주었으며, 이를 통해 제주 사질 조간대에서 분리 및 배양된 종이 저서 생태계에 서식하던 종일 수 있다고 추측된다. 그러나, 저서 생물의 경우, 실제 조석간만의 차에 의한 수온, 염분 변화와 같은 저서 환경에 더 잘 적응할 것으로 생각되어, *Heterocapsa* 배양주의 생리적 연구가 필요하다.

표선 해변은 제주도 남동부에 위치하고 있는 사질 해변이다. 조간대는 약 550m 의 범위를 가지고 폭은 약 360m 이며, 완만한 경사를 가지고 있다.

직사각형의 넓은 지대가 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류의 분포를 조사하기 용이하여 연구를 진행하였다.

정점 2 의 저서 미세조류 현존량은 7 월을 제외하고 다른 정점에 비해 2 배 이상 높게 나타난다(Fig. 2.7). 표선 해변의 조간대 상부 위에는 작은 수로 3 곳이 존재하는데, 이 중 정점 2 근처에 존재하는 수로는 만조에서 간조가 진행됨에도 유지된다. 조간대 상부 정점 2 근처에 위치한 수로의 염분은 해수의 염분보다 낮았으며, 5 월 이후에는 30 psu 보다 낮은 염분이 관찰되었다(Fig. 2.5). 이러한 결과는 담수를 통한 영양염 유입의 가능성을 나타낸다. 또한, 일반적인 조간대 상부의 지표면이 공기에 노출되는 시간에 비해 표선 해변의 조간대 상부는 수로로 인해 모래의 함수량이 일반적인 조간대 상부보다 상대적으로 높아 생물이 받는 스트레스가 적어 정점 2 근처에 높은 현존량이 나타났다고 추측된다. 이는 조간대 상부의 현존량이 조간대 중하부의 현존량보다 높은 이유가 될 수 있다. 추가적으로, 정점 2 에서의 높은 현존량이 담수를 통한 영양염의 유입과 관련이 있는지 확인하기 위해 수로의 해수를 채수하여 추가적인 영양염 분석이 필요하다.

저서 미세조류 현존량과 수온의 경우, 높은 양의 상관을 보였으며, 통계적으로 유의하였다(Fig. 2. 10). 또한, 주성분 분석에서도 수온과 저서 규조류, 저서와편모조류, 저서 기타편모조류가 제 1 주성분과 강한 양의 관계를 보였다(Fig. 2.10). 이를 통해 저서 미세조류의 현존량 변화는 수온의 변화와 관련이 있음을 알 수 있다.

표선 해변에서 총 48 종의 모래에서 서식하는 와편모조류가 발견되었고, 그 중 미기록종 8 종과 미동정종 17 종이 포함되었다. 미동정종의 비율은 발견된 종 중

1/3 이상을 차지하고 있으므로, 계통분석의 추가적인 가능성을 보여준다. 미기록종 8종 중 *Amphidiniopsis hexagona*는 일본, 호주 보타니만, 베트남에서 보고되었다(Yoshimatsu et al. 2000, Van and Bing 2021). 유각와편모조류이고, Po, 4', 2a, 7", 4s, 5"', 2''''의 plate formula 를 가지고 있다. *Carinadinium striatum* 은 유각와편모조류로, APC, 3', 1a, 6", 6c, 5?s, 5"', 2''''의 plate formula 를 가진다(Hoppenrath et al. 2021). *Herdmania litoralis* 는 배면으로 납작하고, 세포의 왼쪽 측면을 가리키는 작은 갈고리 모양의 뾰족한 돌기를 가지고 있다(Dodge 1981). 프랑스, 러시아, 캐나다 등에서 보고되었다(Yamaguchi et al. 2011, Azovsky et al. 2013, Gómez and Artigas 2014). *Planodinium striatum* 는 중속영양생물이다. 타원형의 형태를 가지고 측면으로 납작하다. 상각은 하각보다 매우 작고, 횡구는 수평적으로 존재한다(Gómez and Artigas 2014). *Psammodinium inclinatum* 은 유각와편모조류이고, APC, 3', 7", ?c, ?s, 5"', 1p, 2''''의 plate formula 를 가진다(Reñé and Hoppenrath 2019). *Sinophysis* 속은 *Dinophysis* 속과 유사한 작은 왕관 모양의 상각과 상대적으로 큰 하각을 가지고 옆면으로 납작한 형태를 보인다. *S. grandis* 는 온대종, *S. microcephala* 는 열대종으로 보고되었다(Hoppenrath 2000, Mohammad-Noor et al. 2007).

표선 해변에 서식하는 와편모조류의 종다양성은 쿠웨이트(55 종), 캐나다 밴쿠버(52 종), 호주 브룸(50 종), 브리티시컬럼비아 해안 지역(41 종)에서 보고된 종 수와 비슷하다(Hoppenrath et al. 2014). 그러나, 독일 북해 해안(67 종), 러시아 피오르트대제만(67 종)보다는 종다양성이 낮고, 호주 보타니만(36 종), 일본(32 종), 말레이시아(24 종)보다는 높았다(Hoppenrath et al. 2014, Selina 2016). *Amphidinium* 속은 다른 지역과 마찬가지로 다양하게

출현하였다. 또한, 국내 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류의 출현 연구와 비교할 때, 서해안 동호에서 출현한 저서와편모조류 27 종(Kim et al. 2015)과 제주 8 개 해변에서 출현한 30 종(Shah et al. 2014a)보다 종다양성이 높았다. 2012 년 11 월부터 2014 년 2 월까지 조사된 서해안 동호에서 출현한 종과 동일한 11 종이 출현하였다(Kim et al. 2015). 2011 년 3 월부터 2012 년 2 월까지 조사된 제주 해변에서 출현한 30 종 중 15 종이 동일한 출현종으로 확인되었다(Shah et al. 2014a).

표선 해변에서는 잠재독성종 4 종(*A. carterae*, *A. operculatum*, *P. concavum*, *P. rhathymum*)이 출현하였고, 서해안 동호에서는 잠재독성종 2 종(*Amphidinium carterae*, *A. operculatum*)이 출현하였는데 표선 해변과는 반대로 춘계와 동계에서 출현하였다(Kim et al. 2015). Shah 등 (2014a)에서 *A. carterae* 는 4 월, 7 월, 12 월에 출현하였고, 본 연구에서는 5 월, 7 월에 출현하였다. *A. operculatum* 는 6 월에 출현하였고, 본 연구에서는 6, 7, 8 월에 출현하였다. *P. rhathymum* 은 출현하지 않았으나, 본 연구에서는 6, 7 월에 출현하였다. *A. carterae* 와 *A. operculatum* 은 Amphidinols, caribenolides 등 생리활성 화합물을 생성하고, 항암효과가 있다고 보고되었다(Samarakoon et al. 2013, Mejía-Camacho et al. 2021). *Prorocentrum concavum* 과 *P. rhathymum* 은 생리활성 화합물로 Okadaic Acid 를 합성한다고 보고되었다(Zuo et al. 2020, Cailaud et al. 2010).

표선 해변에서 서식하는 와편모조류의 월별 현존량은 4 - 10 cells/cm<sup>3</sup> 의 범위로 6 월에 가장 많이 출현하지만 봄, 여름철에 변동량이 크지 않다. 그러나, 러시아 피오르트대제만의 경우, 겨울-봄 기간에 사질 조하대에서 서식하는 저서와편모조류의 현존량이 매우 높는데 이는 우점도가 높은 2 종의

출현때문이다(Selina 2016). 두 우점종이 출현하지 않는 계절에는 외편모조류 출현이 아예 관찰되지 않거나 매우 적었다.

조간대는 조석에 따른 노출 시간의 차이, 파랑, 함수량 등 환경의 영향에 의해 저서생물 분포에 영향을 준다. 노출 스트레스가 큰 조간대 상부의 경우 환경변화에 적응을 잘하는 종들이 서식하고, 하부로 갈수록 노출 스트레스가 적어지고 생물다양성이 증가한다. 이에 따라, 조간대 하부에 저서외편모조류의 종다양성이 높게 나타난다(Fig. 2.12). 조간대 상부와 하부의 월별 평균 다양도 지수는 8 월을 제외하고 조간대 상부에서 조간대 하부로 갈수록 증가하는 경향을 보인다. 8 월의 경우, 조간대 상부보다 조간대 하부의 평균 다양도 지수가 높았는데, 이는 조간대 중부에서 저서외편모조류의 현존량이 조간대 하부에 비해 많고, *Heterocapsa* 가 우점하면서 나타난 결과이다. 조간대 상부와 조간대 중부에서도 *Heterocapsa* 가 우점한 경우, 다양도 지수가 낮게 나타났다. 또한, 3 월 정점 2, 5 월 정점 6 에서 1 미만의 다양도 지수가 나타났는데, 5 월의 경우에는 *Heterocapsa* 가 우점하여 다른 외편모조류 출현종이 적었고, 3 월의 경우, 다른 월에 비해 낮은 현존량과 정점 2 에서 상대적으로 높은 현존량에 의한 것으로 추측된다.

본 연구의 결과, 제주 사질 조간대에 서식하는 저서외편모조류의 종다양성을 확인하였다. 표선 해변에서 출현한 저서외편모조류의 종조성이 다른 사질 조간대에서 출현하는 저서외편모조류의 종들과 유사하였다. 국내 미기록종 8 종과 미동정 17 종이 출현하였다. 하계에는 잠재독성종 4 종의 출현을 확인하였고, 추계와 동계에 출현하는지에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다. 또한, 가을, 겨울 기간의 시료를 분석하여 계절적 변동을 확인하고, 외편모조류의 출현과 수온의 상관관계를 보다 명확히 알기 위하여 퇴적물의

온도측정, 조간대 상부, 중부, 하부에 따른 저서 미세조류의 현존량 차이를 이해하기 위한 함수율 분석, 박테리아 분석 연구가 추가적으로 수행되어야 한다.

### 3. 제주 사질 조간대에서 분리된 *Heterocapsa* 2 종의 재기재

#### 3.1. 서론

*Heterocapsa* 속은 1883 년 Stein 에 의해 설립되었으며, 상대적으로 크기가 작은 유각외편모조류로 전세계적으로 분포한다(Matsuyama 1999, Iwataki 2008). 그 중 *H. circularisquama*, *H. rotundata*, *H. triquetra* 는 유해 적조를 유발한다고 보고되었다(Horiguchi 1995, Matsuyama et al. 1995, 1997, Nagai et al. 1996, Matsuyama 1999, Iwataki 2008). *Heterocapsa* 속의 모든 종은 얇은 각판을 가지고 있으며 plate formula 는 Po, cp, x, 5', 3a, 7", 6c, 5s, 5", 2"이다 (Iwataki 2008). 일반적으로 유각외편모조류의 경우, 각판의 배열구조인 plate formula 가 종을 동정하는 중요한 형태적 특징이지만, *Heterocapsa* 속은 각 종의 plate formula 가 동일하므로 세포의 형태, 핵의 위치와 형태, pyrenoid 의 위치, body scale 의 구조에 의해 동정된다(Iwataki et al. 2004, Iwataki 2008). 또한, 최근에는 분자적인 분석이 발달함에 따라 외편모조류의 계통분류학적 연구에 활용하고 있다(Yoshia et al. 2003). 현재까지 *Heterocapsa* 속은 약 20 종이 기술되었고(Iwataki 2008, Guiry and Guiry 2022), *H. psammophila* 를 제외한 모든 종은 부유성이다(Tamura et al. 2005).

국내에는 12 종의 *Heterocapsa* 가 보고되었다(Han and Yoo 1983, Shah et al. 2013, Lee and Kang 2017, Kang and Lee 2018b, Lee et al. 2019, Choi and Kim 2021). 이 중 *H. pseudotriquetra* 는 2017 년, *H. horiguchii* 는 2018 년에 제주 연안 해역에서 발견되어 동정되었다(Lee and Kang 2017, Kang and Lee

2018b). 하지만 plate formula, body scale 의 존재 등과 같은 형태적 특징이 자세하게 설명되지 않았으며, 유전자 마커 등을 활용한 계통분류학적 정보는 기재되지 않았다.

본 연구는 2018 년 4 월 제주 하도 해변과 2020 년 3 월 제주 표선 해변에서 출현하여 분리 및 배양에 성공한 *Heterocapsa* 2 종의 형태적 특징을 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경을 통해 관찰하였으며, 기존에 출현했던 *H. horiguchii*와 *H. pseudotriquetra*와 비교하였다. 또한, 28S 및 ITS rDNA 영역의 염기서열을 분석하여 기존에 보고된 *Heterocapsa* 간의 분자계통학적 차이를 확인하였다.

## 3.2. 재료 및 방법

### 3.2.1. 모래 시료 채집 및 *Heterocapsa* 2종 배양주 확립

2018년 4월 하도 해변과 2022년 3월 표선 해변의 모래 시료 약 50g을 채집하였다. 채집한 모래 시료를 IMK 배지(Daigo IMK, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 100 mL가 담긴 투명한 6 oz 플라스틱 컵에 담고, 규조류의 성장을 억제하기 위해  $\text{GeO}_2$  1 mL를 첨가하여 배양하였다. 배양된 시료는 세포의 성장을 확인하기 위하여 이틀에 한 번씩 확인되었고, *Heterocapsa* 속에 속하는 세포들은 광학현미경 (IX71, Olympus, Tokyo, Japan) 200배 배율에서 파스퇴르 피펫을 사용하여 단일 세포로 분리되었다. 분리된 세포는 IMK 배지 2 mL가 담긴 24-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China)에 이동되었고, *H. horiguchii*와 *H. pseudotriquetra*를 각각 온도 16°C, 18°C에서 광량  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 12:12 시간 명암 주기로

배양되었다. 세포 수가 증가함에 따라 12-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China), 50ml culture flask (JET BIOFIL, Guangzhou, China)로 순차적으로 이동된 후, 최종적으로 2개의 배양주가 설립되었다(Table 3.1).

Table 3.1. Sample information of two *Heterocapsa* strains used in this study

Species	Strain No.	Sampling station	Sampling Date	Latitude	Longitude	Culture temperature(°C)
<i>Heterocapsa horiguchii</i>	HH-2003PS-01	Pyoseon Beach	2020.03.11	33°18'38.69"N	126°49'34.28"E	16
<i>Heterocapsa pseudotriquetra</i>	HP-1804HD-01	Hado Beach	2018.04.12	33°31'5.63"N	126°54'4.82"E	18

### 3.2.2. 형태적 관찰

*Heterocapsa* 2종의 광학현미경 관찰을 위해 배양주는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2%로 고정되었고, 광학현미경(LM; Axioplan, Cal Zeiss, Overkochen, Germany) 400배 배율에서 AxioCam ERc 5s 카메라(Cal Zeiss, Overkochen, Germany)로 촬영되었다.

주사전자현미경을 이용하여 세포 표면의 세부적 관찰을 위해 배양주는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2%로 1시간 고정된 후, 사산화오스뮴(osmium tetroxide, OsO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich, Massachusetts, United States) 최종 농도 1%로 10분간 고정되었다. 고정된 배양주는 2 μm polycarbonate 멤브레인 필터(25mm diameter, Whatman, Floreham Park, NJ, USA)를 통해 고정액을 여과시킨 후, 멸균된 여과해수와 증류수를 사용하여 15분간 순차적으로 수세하였다. 이후 30, 50, 70, 90, 95, 100% 농도의 에탄올로 10분씩 탈수하였고, 마지막으로 100% 에탄올에서 1시간동안 탈수하였다. 탈수된 시료의 건조를 위해 임계점 건조기(EMS 3000, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA; EM CPD300, Leica microsystems, Wetzlar, Germany)를 이용하였고, 건조된 시료는 백금으로 코팅(Q150R, Quarum, Laughton, U.K.)한 후, 주사전자현미경(SEM; JSM-6700F, JEOL, Tokyo, Japan; MIRA 3, TESCAN, Brno, Czech Republic)을 사용하여 가속전압 5-15kV에서 관찰 및 촬영되었다.

투과전자현미경 관찰을 위해 배양주는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2.5%로 2시간 동안 고정하였다. 고정된 시료는 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 이후 미디어를 1 mL 추가하여 세척하고 나서 8,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하였고, OsO<sub>4</sub>

최종농도 1%로 1시간 동안 고정하였다. 이후 30, 50, 80, 90, 95, 100%농도의 에탄올로 탈수 하였고, AGAR Low Viscosity Resin Kit(Agar Scientific Ltd., UK)를 사용하여 시료를 포매 및 절편하였다. 절편된 시료는 Formvar-coated grid에 배치된 후, 투과전자현미경(TEM; JEM-100SX, JEOL, Tokyo, Japan)으로 관찰 및 촬영되었다.

### 3.2.3. DNA 추출 및 PCR 증폭

배양주의 DNA 분석을 위해, 배양액 2 mL를 2 mL microcentrifuge tube에 분취하였고, 3000 rpm에서 10분 간 원심분리 한 후, 상등액을 제거하였다. 이후 800  $\mu$ L의 extraction buffer [100 mM Tris-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 100 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)]를 첨가한 후, DNA 추출 전까지 -20°C 냉동보관 하였다. 냉동 보관되었던 2 mL microcentrifuge tube를 액체질소와 65°C 수조를 사용하여 급속 냉동 및 해동 3회 반복 실시하였다. 이어서, 단백질을 분해시키기 위해 8  $\mu$ L의 proteinase K (10 mg mL<sup>-1</sup> in 1×TE buffer)를 첨가한 후, 37°C에서 30분간 배양한 후, 20% Sodium dodecyl sulphate (SDS) 80  $\mu$ L를 tube에 넣고 65°C에서 2시간 배양하였다. 배양 후 2 mL microcentrifuge tube에 동일한 부피의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)을 추가한 후, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액은 새로운 1.7 mL microcentrifuge tube에 옮겨졌고, 상등액의 0.1 부피의 3 M sodium acetate (pH 5.1, prepared in ddH<sub>2</sub>O)와 상등액과 동일한 부피의 순도 99% 이상의 isopropanol를 추가하였다. 2 mL microcentrifuge tube는 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 한

후 상등액은 제거하였다. 이후 70% 에탄올 1 mL를 추가하여 14,000 rpm에서 20분 간 시료를 세수 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 농축된 시료는 건조된 후 100  $\mu$ L의 1 $\times$  TE buffer로 DNA를 현탁시켰다.

#### 3.2.4. PCR 증폭 및 염기서열 분석

28S large subunit (LSU)와 Internal transcribed spacer (ITS) rDNA 영역은 와편모조류 범용 primer 쌍 18F01 (forward: 5'-CAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG-3')과 PM28-R1318 (reverse: 5'-TCG GCA GGT GAG TTG TTA CAC AC-3')을 사용하여 증폭되었다(Ki et al. 2005). PCR 반응액은 3차 증류수 11.8  $\mu$ L, 10 $\times$  Ex PCR buffer (TaKaRa, Shiga, Japan) 2  $\mu$ L, dNTP mix (각 4 mM) 2  $\mu$ L, 각 primer 1  $\mu$ L (500 nM), Ex Taq polymerase (2.5 U) 0.2  $\mu$ L, 주형 DNA 2  $\mu$ L의 조성으로 최종 용량이 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. PCR 증폭은 thermal iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 3 분간 initial denaturation을 거쳐 94 $^{\circ}$ C에서 30초의 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 40초의 annealing, 68 $^{\circ}$ C에서 5분의 extension 과정을 40회 반복하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 final extension과정을 수행하였다. PCR 산물은 Midori<sup>Green</sup> (Nippon Genetics Europe, GmbH, Germany)으로 염색한 1% agarose gel (Promega, Madison, WI)에서 전기영동하여 확인하였다.

증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Germany)로 정제되었고, 염기서열 분석은 ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, CA)를 이용하여 수행되었다. 각 염기서열 단편은 Sequencher 4.7 software (Gene Codes, Ann

Arbor, MI)를 활용하여 단일 염기서열로 조합되었다.

### 3.2.5. 분자계통학적 분석

각 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 검색을 통해 획득하였다(Table 3.2). 분자계통학적 분석은 NCBI에서 검색된 와편모조류의 ITS 및 LSU rDNA 염기서열을 활용하여 수행되었다. 두 배양주의 ITS 및 LSU rDNA 염기서열은 BLAST 검색된 2속 19종의 IST rDNA 염기서열과 2속 18종의 LSU rDNA 염기서열 MEGA v. 7.0의 Clustal W를 사용하여 정렬하였고, 공백 및 결측 데이터는 제거되었다(Kumar et al. 2016). Maximum-Likelihood (ML) 분석은 ITS (625 alignment sites)와 LSU (684 alignment sites) rDNA 염기서열로 이루어진 데이터 조합을 이용하여 RAxML 7.0.4 프로그램에서 GTR+G+I nucleotide substitution 모델을 통해 추정되었다(Stamatakis 2006). 분석을 통해 작성된 계통수의 각 branch에 대한 지지도는 bootstrap 1,000회 반복을 통해 확인되었다. 계통수의 작성은 MEGA v. 7.0 (Kumar et al. 2016)를 통해 출력되었다.

**Table 3.2.** Information of sequence for phylogenetic analyses.

<b>Species</b>	<b>Strain</b>	<b>Gene</b>	<b>Accession No.</b>	<b>Reference</b>
<i>H. arctica</i>	CCMP445	ITS	AB084095	Yoshida et al. 2003
	CCMP445	LSU	AY571372	Hansen and Daugbjerg 2004
	CCMP445	ITS	JQ972677	Stern et al. 2012
<i>H. bohaiensis</i>	isolate 1-14	ITS	MF471313	Xlao et al. 2018
	isolate 2-13	ITS	MF471314	Xlao et al. 2018
	isolate 3-2	LSU	MF471315	Xlao et al. 2018
	isolate 3-3	LSU	MF471316	Xlao et al. 2018
	isolate 4-2	LSU	MF471318	Xlao et al. 2018
<i>H. busanensis</i>	LOMME05	ITS	MW003709	Choi and Kim 2021
	LOMME05	LSU	MW003725	Choi and Kim 2021
<i>H. circularisquama</i>	HA92-1	LSU	AB049709	Yoshida et al. 2003
	OA1	ITS	AB084089	Yoshida et al. 2003
	OK1	ITS	AB084090	Yoshida et al. 2003
	OK3	ITS	AB084091	Yoshida et al. 2003
<i>H. claromecoensis</i>	LPCc-005	LSU	MK684238	Sunesen et al. 2020
	LPCc-005	ITS	MK684239	Sunesen et al. 2020
	Arg-B5	LSU	MN509451	Sunesen et al. 2020
	Arg-B5	ITS	MN509452	Sunesen et al. 2020
<i>H. horiguchii</i>	FK6-D47	ITS	AB084097	Yoshida et al. 2003
	NIES-614	ITS	AB084099	Yoshida et al. 2003
	SB19-2	ITS	ON459703	
	HH-2003PS-01	ITS	OP970958	This study
	HH-2003PS-01	LSU	OP970958	This study
<i>H. huensis</i>		ITS	AB445394	Iwataki et al. 2009
<i>H. illdefina</i>	CCMP446	ITS	AB084092	Yoshida et al. 2003
	CCMP446	ITS	JQ972687	Stern et al. 2012
<i>H. lanceolata</i>	TK6-D57	ITS	AB084096	Yoshida et al. 2003
<i>H. minima</i>	JK2	ITS	KF031311	
	JK2	LSU	KF031312	
	CAWD302	LSU	LC541733	
	LOMME03	ITS	MW626888	Choi and Kim 2021
<i>H. niei</i>		LSU	MW177916	
		ITS	JN020158	
<i>H. ovata</i>	NIES-472	ITS	AB084098	Yoshida et al. 2003
<i>H. philippinensis</i>	GBNW14	LSU	LC621346	Benico et al. 2021
		ITS		
<i>H. pseudotriquetra</i>	NIES-473	ITS	AB084100	Yoshida et al. 2003
	GeoB 222	ITS	AY499509	
	FIU11	LSU	EU165273	Scorzetti et al. 2009
	UTEX2722	ITS	FJ823556	Stern et al. 2012
	GeoB 222	LSU	MF423367	Tillmann et al. 2017
	HP-1804HD-01	ITS	OP968025	This study

	HP-1804HD-01	LSU	OP968025	This study
<i>H. pygmaea</i>		ITS	AB084093	Yoshida et al. 2003
	CCMP2770	LSU	EU165271	Scorzetti et al. 2009
	UTEX2421	LSU	EU165306	Scorzetti et al. 2009
	CCMP1734	LSU	EU165312	Scorzetti et al. 2009
	CCMP1322	LSU	FJ939577	
	QUCCCM85	ITS	KX853191	Al Muftah et al. 2016
	QUCCCM85	LSU	KX853175	Al Muftah et al. 2016
	QUCCCM87	ITS	KX853193	Al Muftah et al. 2016
	QUCCCM87	LSU	KX853177	Al Muftah et al. 2016
	QUCCCM88	LSU	KX853178	Al Muftah et al. 2016
<i>H. cf. pygmaea</i>	CCMP1490	ITS	AB084094	Yoshida et al. 2003
	HtrITSC2-3	ITS	AF352363	
	HtrITSC3	ITS	AF352364	
	UTEX2421	ITS	FJ823558	Stern et al. 2012
		ITS	JX661020	
<i>H. rotundata</i>	K-0479	LSU	AF260400	Daugbjerg et al. 2000
	K-0483	ITS	KF240777	
	K-0483	LSU	KF240778	
<i>H. steinii</i>	NIES7	ITS	AB084101	Yoshida et al. 2003
	GSW0206-2	LSU	EF613355	Scorzetti et al. 2009
	CCMP448	LSU	EU165307	
	st 1-2	LSU	HQ902267	
	st 3-1	LSU	HQ902268	
	St 3-1	ITS	HQ902268	
	UTKG1	ITS	MF423346	Tillmann et al. 2017
	UTKG1	LSU	MF423346	Tillmann et al. 2017
	UTKG3	ITS	MF423347	Tillmann et al. 2017
	UTKG4	ITS	MF423348	Tillmann et al. 2017
	UTKG4	LSU	MF423348	Tillmann et al. 2017
	UTKG7	ITS	MF423355	Tillmann et al. 2017
	UTKG7	LSU	MF423356	Tillmann et al. 2017
<i>Heterocapsa</i> sp.	FIU10	LSU	EU165272	Scorzetti et al. 2009
	FIU12R	LSU	EU165274	Scorzetti et al. 2009
	HCBC88	LSU	JN119844	
<i>Azadinium poporum</i>	TIO048	LSU	MH685491	
<i>Prorocentrum micans</i>		ITS	MK405477	Tillmann et al. 2019

### 3.3. 결과

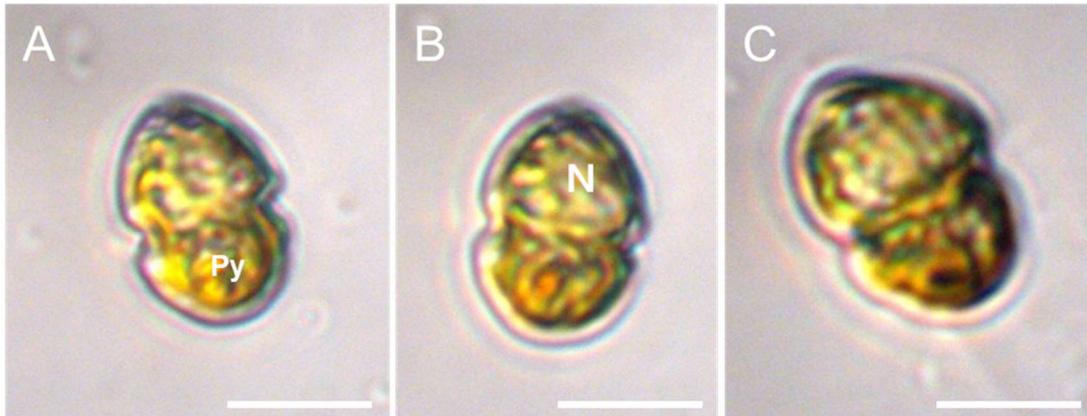
#### 3.3.1. *Heterocapsa* 2종의 형태적 특징

##### *Heterocapsa horiguchii* Iwataki, Takayama et Matsuoka 2002

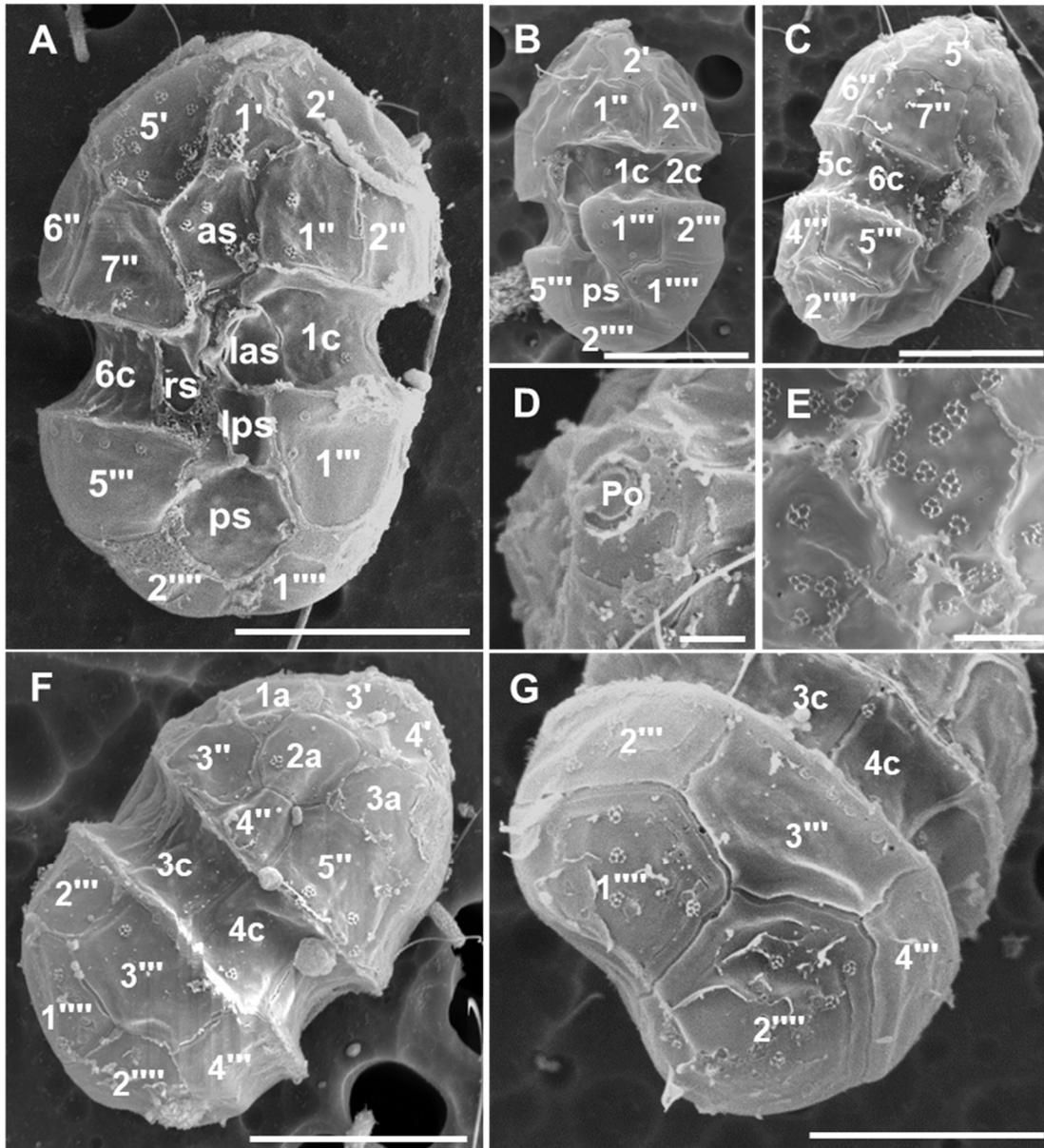
세포의 길이는 15.0 - 17.0  $\mu\text{m}$ , 너비는 10.0 - 12.0  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 세포의 전체 형태는 타원형이고 상각과 하각의 크기가 동일하며, 상각과 하각은 반구형이다(Fig. 3.1A). 횡구는 세포의 중앙에 위치하고 횡구의 폭은 세포 크기의 1/3이다(Fig. 3.1A). Pyrenoid는 하각의 상부에 위치한다(Fig. 3.1A). 세포의 핵은 상각에 위치하고 있으며, 크고 둥근 형태이다(Fig. 3.1B). 하각에 안점이 존재한다(Fig. 3.1B). 종구는 얇고 antapex에 도달한다(Fig. 3.1C).

주사전자현미경 관찰 결과, plate formula는 Po, cp, x, 5', 3a, 7", 6c, 5s, 5"', 2'''로 조사되었다(Fig. 3.2). 횡구는 세포의 중앙에 위치하며 왼쪽에 비해 오른쪽이 하강하는 단차를 가진다(Fig. 3.2A). 종구는 antapex로 갈수록 넓어진다(Fig. 3.2A, B). 상각은 1개의 apical pore plate, 5개의 apical plate, 3개의 intercalary plate, 7개의 precingular plate로 구성되어 있다(Fig. 3.2 A-D, F). Apical pore plate (Po)는 상각에 위치한다(Fig. 3.2D). Apical plate 중 5' plate가 가장 크다(Fig. 3.2A). 3개의 intercalary plate는 등면에서 관찰된다(Fig. 3.2F). Precingular plate는 대부분 오각형이지만 4", 7" plate는 사각형이다(Fig. 3.2A, C, F). 횡구는 6개의 plate로 구성되어 있다(Fig. 3.2A - C, F). 종구는 5개의 plate로 구성되어 있다(Fig. 3.2A, B). Anterior sulcal plate (as)는 precingular plate에 위치한다. Posterior sulcal plate (ps)는 크고 넓으며, 1"', 5''' plate에 닿는다 (Fig. 3.2A). Body scale의 basal plate는 원형이고(Fig. 3.2E) 세포 전체를 덮고 있으나, 때로는 아예 존재하지 않을 때도 있다. 하각은

5개의 postcingular plate, 2개의 antapical plate로 구성되어 있다(Fig. 3.2 A-C, F, G). 2개의 antapical plate는 크고 오각형이다(Fig. 3.2G).



**Figure 3.1.** Light micrographs of *Heterocapsa horiguchii* (culture strain HH-2003PS-01). A. Ventral view showing the pyrenoid (Py). B. Ventral view showing the nucleus (N). C. Ventral view showing cingulum and sulcus. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3.2.** Scanning electron micrographs of *Heterocapsa horiguchii* (culture strain HH-2003PS-01). A. Ventral view showing the cingulum and the sulcus (anterior sulcal; as, left anterior sulcal; las, right sulcal; rs, left posterior sulcal; lps and posterior sulcal; ps). B. Lateral view. C. Lateral view. D. Apical pore complex (APC) (apical pore plate; Po). E. High-magnification of cell surface with body scales. F. Dorsal view. G. Antapical view. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A – C, F and G), 1  $\mu\text{m}$  (D) and 100nm (E).

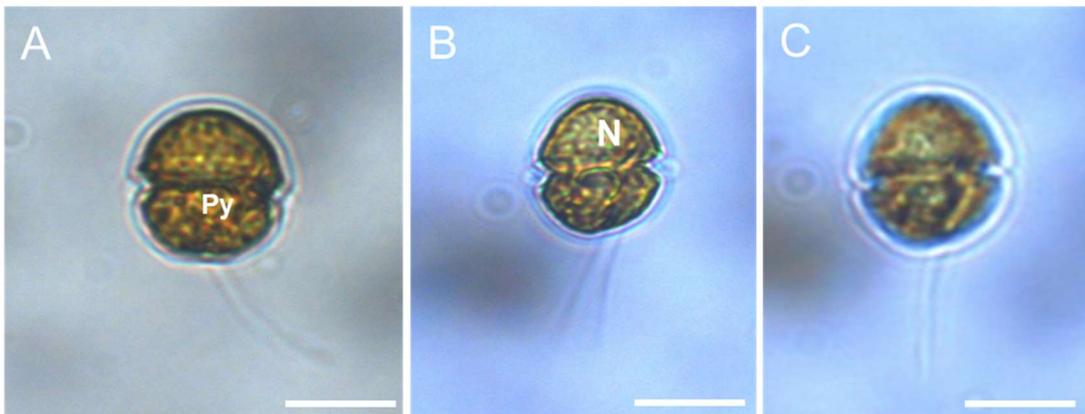
*Heterocapsa pseudotriquetra* Iwataki, Hansen et Fukuyo 2002

세포의 길이는 20.0 - 23.0  $\mu\text{m}$ , 너비는 12.0 - 17.0  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 세포의 전체 형태는 타원형이고 상각과 하각의 크기가 같거나 상각이 약간 더 크며, 상각과 하각은 반구형이다(Fig. 3.3). Pyrenoid는 세포의 중앙 또는 하각에 위치한다(Fig. 3.3A). 세포의 핵은 상각에 위치하고 있으며, 크고 둥근 형태이다(Fig. 3.3B). 황구는 세포의 중앙에 위치한다(Fig. 3.3C). 종구는 앞고 antapex에 도달한다(Fig. 3.3C).

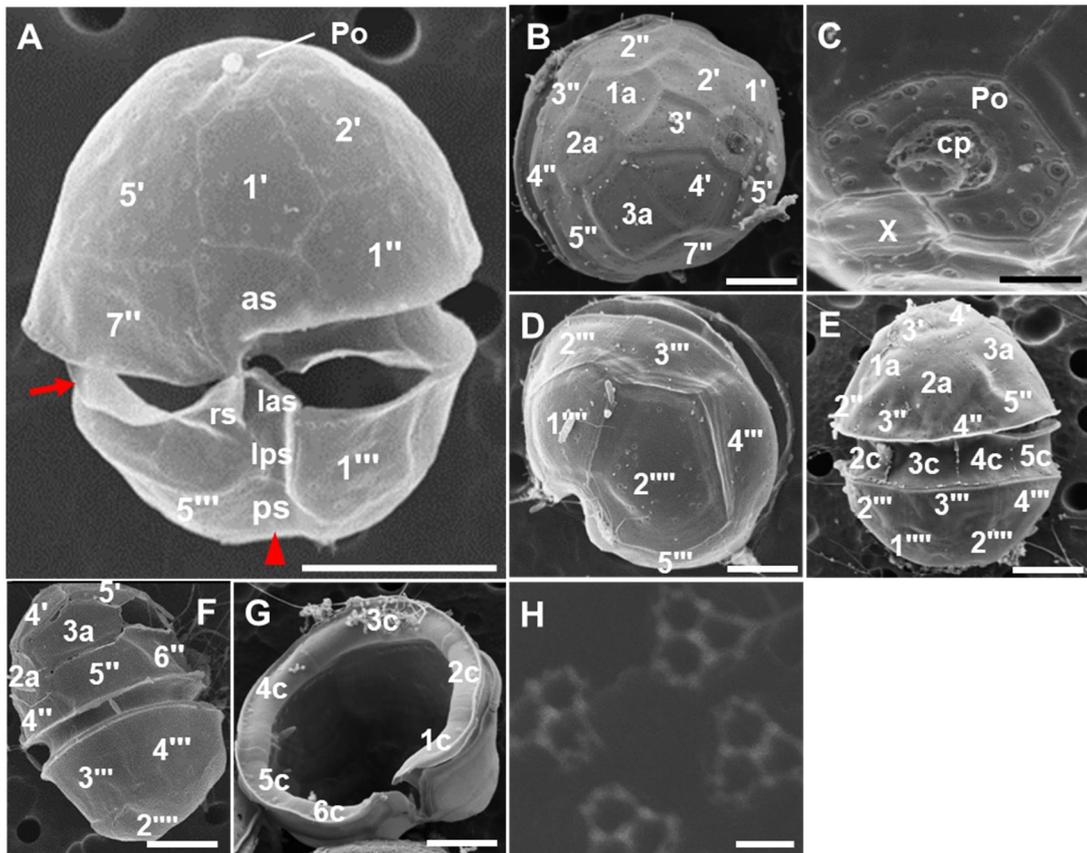
주사전자현미경 관찰 결과, plate formula는 Po, cp, x, 5', 3a, 7", 6c, 5s, 5"', 2'''로 조사되었다(Fig. 3.4). 광학현미경에서 관찰한 결과와 마찬가지로 상각과 하각의 크기가 동일하거나 상각이 약간 크다(Fig. 3.4A). 황구는 세포의 중앙에 위치하며 오른쪽이 약간 아래로 내려간다(Fig. 3.4A). 종구는 antapex로 갈수록 넓어진다(Fig. 3.4A). 상각은 1개의 apical pore plate, 5개의 apical plate, 3개의 intercalary plate, 7개의 precingular plate로 구성되어 있다(Fig. 3.4 A, B, E, F). Apical pore plate (Po)는 상각에 위치하고 하트 모양이며 pore를 포함하고 있다(Fig. 3.4C). X plate (cp)는 apical pore plate, 1', 5' plate와 맞닿으며, 세포의 오른쪽에 위치한다(Fig. 3.4C). Apical plate 중 5' plate가 가장 크다. Anterior intercalary plate 중 1a, 3a plate는 오각형, 2a plate는 육각형이다(Fig. 3.4E). Precingular plate는 대부분 오각형이지만 4", 7" plate는 사각형이다(Fig. 3.4A, E, F). 황구는 6개의 plate로 구성되어 있다(Fig. 3.4G). 하각은 5개의 postcingular plate, 2개의 antapical plate로 구성되어 있다(Fig. 3.4 A, D). 2개의 antapical plate는 크고 오각형이다. 종구는 5개의 plate로 구성되어 있다. Anterior sulcal plate (as)는 precingular plate에 위치한다. Posterior sulcal plate (ps)는 크고 넓으며, 1"', 5''' plate에 맞닿는다 (Fig. 3.4A). Body scale의

basal plate는 삼각형이고(Fig. 3.4H) 세포 전체를 덮고 있으나, 때로는 아예 존재하지 않을 때도 있다.

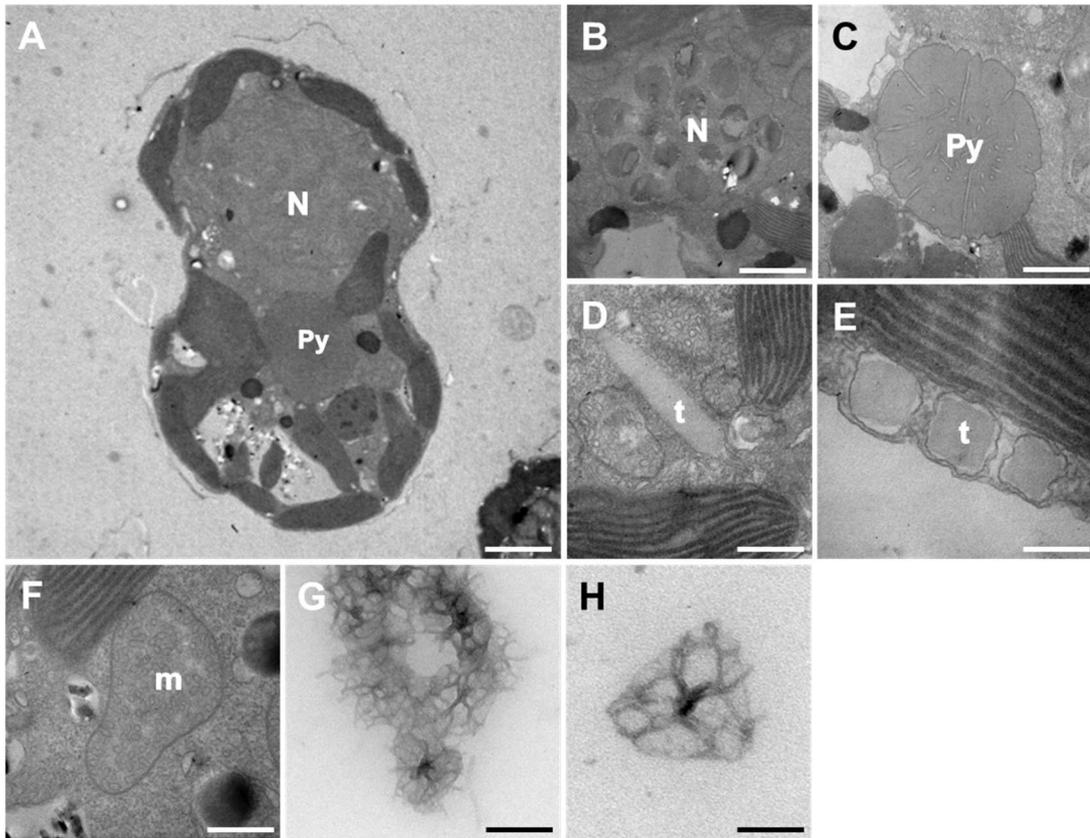
투과전자현미경 관찰 결과, 핵은 둥글고 상각에 위치한다(Fig. 3.5 A, B). Pyrenoid가 한 개 존재하며, 세포의 중앙에 위치하고 원형이다(Fig. 3.5 A, C). 그러나, starch sheath는 관찰되지 않았다. 미토콘드리아, 엽록체, trichocyst도 관찰되었다(Fig. 3.5 D-F). Body scale은 basal plate와 가시를 가지고 있었으며, basal plate는 삼각형이고, 끝이 약간 둥글다(Fig. 3.5 G, H).



**Figure 3.3.** Light micrographs of *Heterocapsa pseudotriquetra* (culture strain HP-1804HD-01). A. Ventral view showing the pyrenoid (Py). B. Ventral view showing the nucleus (N). C. Ventral view showing cingulum and sulcus. scale bar = 10  $\mu$ m.



**Figure 3.4.** Scanning electron micrographs of *Heterocapsa pseudotriquetra* (culture strain HP-1804HD-01). A. Ventral view showing the cingulum (arrow) and sulcus (arrowhead) (anterior sulcal; as, left anterior sulcal; las, right sulcal; rs, left posterior sulcal; lps and posterior sulcal; ps). B. Apical view. C. High-magnification of apical pore complex (APC) (apical pore plate; Po, cover plate; cp and x; canal plate). D. Antapical view. E. Dorsal view. F. Lateral view. G. Cingulum. H. Body scale. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A, B, D - G), 1  $\mu\text{m}$  (C) and 100nm (H).



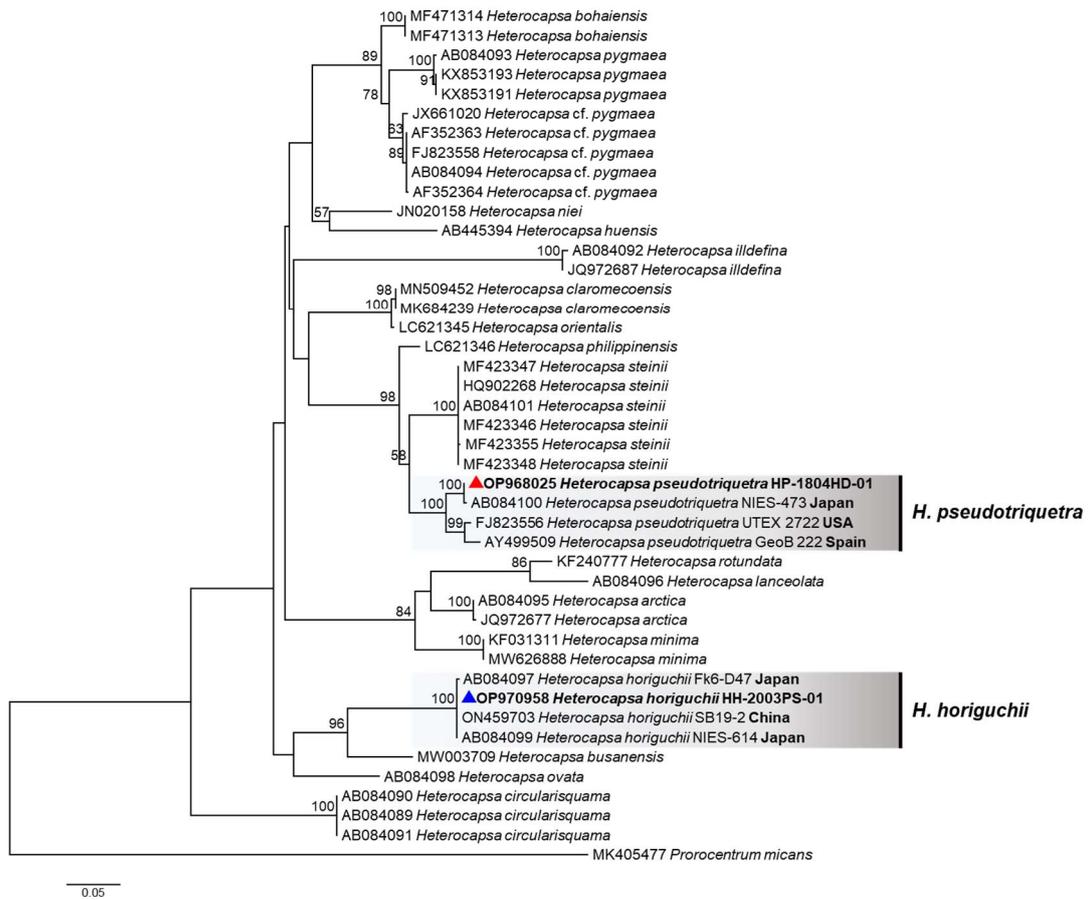
**Figure 3.5.** Transmission electron micrographs of *Heterocapsa pseudotriquetra* (culture strain HP-1804HD-01). A. Longitudinal section showing the organelles. B. N; nucleus, C. Py; pyrenoid, D. t; trichocyst (longitudinal section), E. trichocyst (transverse section); F. m; mitochondria, G. Body scales, H. one body scale. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A), 1  $\mu\text{m}$  (B – E), 200nm (F and G) and 100nm (H).

### 3.3.2. *Heterocapsa*의 계통분류학적 분석

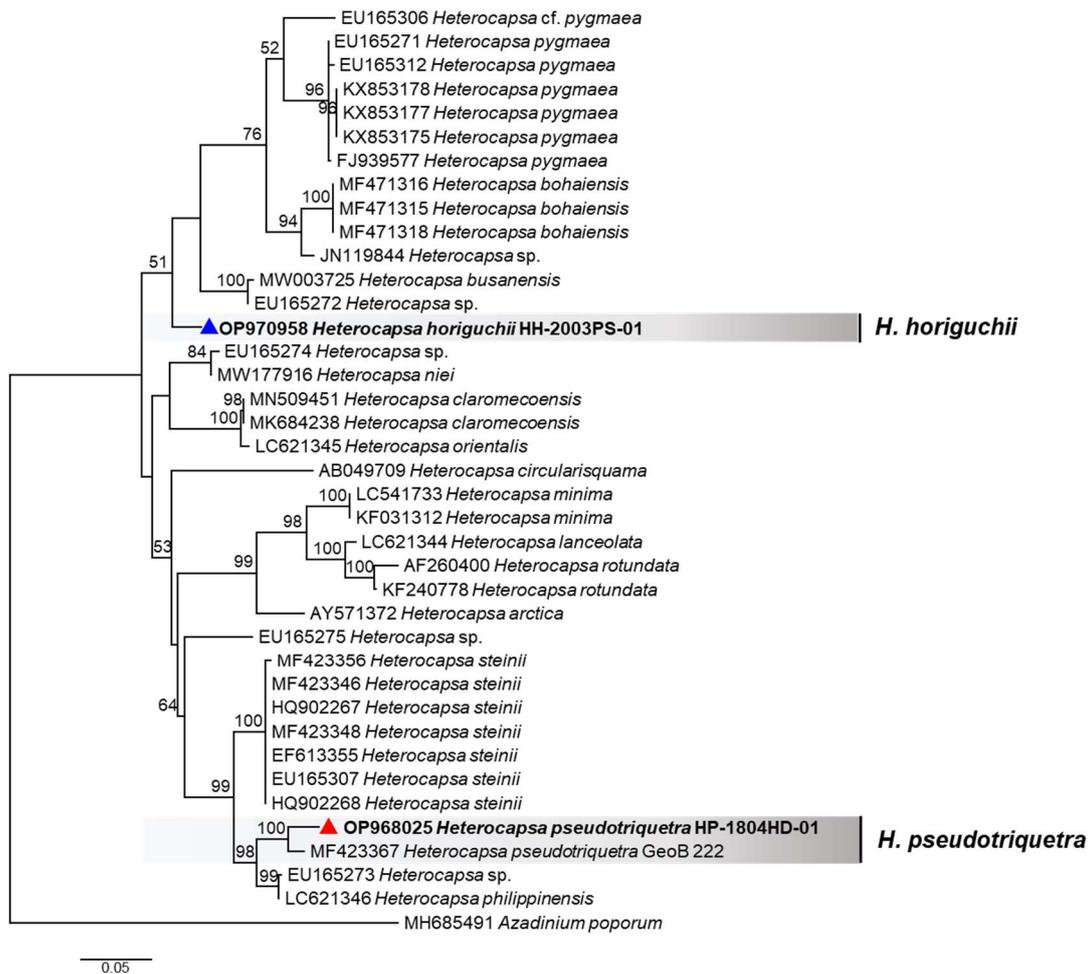
표선 배양주 HH-2003PS-01와 하도 배양주 HP-1804HD-01의 염기서열 정보는 GenBank에 각각 Accession No. OP970958와 OP968025로 등록되었다. *Heterocapsa horiguchii*의 ITS rDNA 염기서열 (599 bp)은 중국 배양주 SB19-2 (ON459703) 및 일본 배양주 NIES-614 (AB084099)와 100%의 유사도를 보이고, 일본 배양주 FK6-D47 (AB084097)와 99.8%의 유사도를 보였다. *H. pseudotriquetra*의 ITS rDNA 염기서열 (593 bp)은 일본 배양주 NIES-473 (AB084100)과 99.8%의 유사도를 보이고, 미국 배양주 UTEX 2772 (FJ823556), 스페인 배양주 GeoB 222 (AY499509)와 각각 95.6%, 94.6%의 유사도를 보였다. *H. pseudotriquetra*의 LSU rDNA 염기서열 (1396 bp)은 스페인 배양주 GeoB 222 (MF423367) 97.7%의 유사도를 보였다.

ITS rDNA 염기서열의 계통수에서 표선과 하도 배양주는 각각 *H. horiguchii*와 *H. pseudotriquetra*와 분기군을 형성하였다 (*H. horiguchii*; AB084097, AB084099, ON459703, *H. pseudotriquetra*; AB084100, AY499509, FJ823556). *H. ovata*, *H. busanensis*는 *H. horiguchii*와 자매 그룹을 형성하였고, *H. steinii*와 *H. philippinensis*는 *H. pseudotriquetra*와 자매 그룹을 형성하였다.

LSU rDNA 염기서열의 계통수에서 *H. horiguchii*는 NCBI에 등록된 LSU rDNA 염기서열이 존재하지 않아 염기서열을 비교할 수 없었다. *H. pseudotriquetra*는 스페인 배양주 GeoB 222와 2.3%의 유사도 차이를 보였으나, 같은 분기군을 형성하였다.



**Figure 3.6.** Maximum likelihood tree of genus *Heterocapsa* using ITS1+5.8S+ITS2 sequences. The numbers on each node are the bootstrap values (%). Korean *H. horiguchii* is marked in blue triangle and Korean *H. pseudotriquetra* is marked in red triangle. Scale bar = 0.05 nucleotide substitutions per site.



**Figure 3.7.** Maximum likelihood tree of genus *Heterocapsa* using LSU rDNA sequences. The numbers on each node are the bootstrap values (%). Korean *H. horiguchii* is marked in blue triangle and Korean *H. pseudotriquetra* is marked in red triangle. Scale bar = 0.05 nucleotide substitutions per site.

### 3.4. 토의

*Heterocapsa* 속의 동정은 세포의 크기와 형태, 핵의 형태와 위치, pyrenoid의 위치, body scale의 형태 등을 통해 분류된다(Iwataki 2008).

제주 표선 해변과 하도 해변에서 분리 및 배양된 두 배양주를 *Heterocapsa* 종들과 비교하였을 때, 표선 배양주 *H. horiguchii*는 최초로 보고된 *H. horiguchii* (Iwataki et al. 2002)와 하도 배양주 *H. pseudotriquetra*는 *H. pseudotriquetra* (Iwataki et al. 2004)와 형태가 일치하였다(Table 3.3). 광학현미경을 이용하여 관찰한 결과, 두 종 모두 동일한 크기의 상각과 하각, 핵의 모양과 위치, pyrenoid의 위치와 같은 형태적 특징이 관찰되었다. 표선 배양주의 길이와 너비가 일본 *H. horiguchii*의 길이와 너비에 포함되고, 하도 배양주의 평균 길이와 너비는 일본 *H. pseudotriquetra*의 평균 길이와 너비에 포함된다(Table 3.3). 또한, 표선과 하도 배양주의 주사전자현미경 관찰 결과, *Heterocapsa* 속의 plate formula인  $Po, cp, x, 5', 3a, 7'', 6c, 5s, 5''', 2''''$ 와 body scale의 존재를 확인하였다. Plate formula는 외편모조류의 형태학적 분류에 중요한 기준이지만, *Heterocapsa*속은 모든 종이 동일한 plate formula를 가지고 있어 *Heterocapsa*의 분류기로 사용하기 어렵다. 따라서, 세포막 외부에 존재하는 3차원 구조의 body scale을 통해 *Heterocapsa* 종들을 분류하였다(Iwataki et al. 2004). 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 하도 배양주 *H. pseudotriquetra*의 body scale의 형태 역시 기존에 보고된 *H. pseudotriquetra*와 일치하는 것이 확인되었다. 이들의 형태적 특징은 본 연구에서 관찰한 종이 *H. horiguchii*와 *H. pseudotriquetra*임을 제시하였다.

ITS 와 LSU rDNA 의 염기서열의 두 배양주는 각각 NCBI 에 등록된 *H. horiguchii* 와 *H. pseudotriquetra* 와 같은 분기군이 형성되었다(Fig. 3.6, Fig. 3.7). 또한, 이들의 분기군은 다른 *Heterocapsa* 종들과는 분리되었다. 따라서, 두 종의 rDNA 서열의 고유성을 확인하였다. ITS rDNA 계통수에서 *H. horiguchii* 는 99.8-100%의 유사도를 보였다. *H. pseudotriquetra* 는 일본 배양주와는 99.8%의 유사도를 보여 유전적 차이가 매우 낮았으나, 미국과 스페인 배양주와는 95.6%과 94.6%를 보여 일본과 한국 배양주와 다른 분기군을 형성 하였다(Fig. 3.6). 미국과 스페인 배양주 *H. pseudotriquetra* 의 형태학적 특징을 확인할 수 없었으나, 4.4%와 5.4%의 유전적 차이를 통해 *H. pseudotriquetra* 가 ITS 영역에서 변이가 큰 것으로 보인다. 또한, 지리학적 분포에 의한 유전적 차이가 있다고 추측된다. LSU rDNA 계통수에서 *H. horiguchii* HH-2003PS-01 은 NCBI 에 등록된 비교 염기서열이 존재하지 않기 때문에 독립적인 분기군을 보여주었다(Fig. 3.7). *H. pseudotriquetra* HP-1804HD-01 은 ITS rDNA 계통수의 결과와 마찬가지로 스페인 배양주와 분기군을 형성하였으나 2.3%의 유사도 차이를 보였다(Fig. 3.7). LSU rDNA 의 경우에도 두 배양주의 채집 위치의 거리가 멀리 떨어져 있으므로 지리학적 분포에 의한 유전적 차이로 추측된다.

본 연구의 결과 제주 사질 조간대에서 발견된 *Heterocapsa* 두 종의 형태 및 분자계통학적 특징을 분석하여 *H. horiguchii* 와 *H. pseudotriquetra* 로 동정하였으며, 분류학적 특징을 보고하였다.

Table 3.3. Comparison of morphological feature of *Heterocapsa* species.

Species	Length ( $\mu\text{m}$ )	Width ( $\mu\text{m}$ )	Cell shape	Nucleus		Pyrenoid	Basal plate of Body scale <sup>1)</sup>	Ecologica l type
				Position	Shape			
<i>H. arctica</i> <sup>1</sup>	22.5 – 37.5	10.0 – 15.0	Ellipsoid, larger epitheca	Middle	Elongated	Hypotheca	Triangular	Planktonic
<i>H. bohaiensis</i> <sup>2</sup>	9.9 – 16.5	6.7 – 12.4	Ellipsoid, larger epitheca	Middle	Ellipsoid	Epitheca	Triangular	Planktonic
<i>H. busanensis</i> <sup>3</sup>	17.0 – 27.0	10.2 – 12.5	Ellipsoid, larger epitheca	Left side	Elongated	Epitheca	Triangular	Planktonic
<i>H. circularisquama</i> <sup>4</sup>	20.0 – 28.8	13.8 – 20.0	Ellipsoid, epi- and hypotheca equal size	Left side	Elongated	Middle	Circular	Planktonic
<i>H. claromecoensis</i> <sup>5</sup>	16.0 – 30.0	12.0 – 25.0	Ovoid, epi- and hypotheca equal size	Hypotheca	Spherical	Epitheca	Triangular	Planktonic
<i>H. horiguchii</i> <sup>6</sup>	13.2 – 20.8	10.0 – 13.6	Ellipsoid, epi- and hypotheca equal size	Epitheca	Spherical	Hypotheca	Circular	Planktonic
<i>H. horiguchii</i> *	15.0 – 17.0	10.0 – 12.0	Ellipsoid, epi- and hypotheca equal size	Epitheca	Spherical	Hypotheca	NA	Benthic
<i>H. huensis</i> <sup>7</sup>	13.6 – 22.4	9.6 – 16.8	Ellipsoid, epi- and hypotheca equal size	Hypotheca	Spherical	Epitheca	Triangular	Planktonic
<i>H. illdefina</i> <sup>8</sup>	22.0 – 25.0	13.0 – 17.0	Ellipsoid, epi- and hypotheca equal size	Middle	Elongated	Middle	Triangular	Planktonic
<i>H. lanceolata</i> <sup>6</sup>	16.4 – 25.0	10.0 – 15.0	Laceolata	Middle	Elongated	Epitheca	Hexagonal	Planktonic
<i>H. minima</i> <sup>9</sup>	10.0 – 13.0	6.9 – 9.1	Ellipsoid, larger epitheca	Middle	Elongated	Epitheca	Circular	Planktonic
<i>H. niei</i> <sup>10</sup>	17.0 – 20.0	11.0 – 12.0	Ellipsoid, epi- and hypotheca equal size	Hypotheca	Spherical	Epitheca	Triangular	Planktonic

<i>H. orientalis</i> <sup>11</sup>	18.4 – 34.4	16.0 – 24.0	Ovoid, epi-and hypotheca equal size	Hypotheca	Spherical	Epitheca	Triangular	Planktonic
<i>H. ovata</i> <sup>11</sup>	23.6 – 33.2	18.4 – 28.0	Ovoid, epi-and hypotheca equal size	Epitheca	Spherical	Hypotheca	Triangular	Planktonic
<i>H. pacifica</i> <sup>12</sup>	45	30	Ellipsoid	Right side	Spherical	–	–	Planktonic
<i>H. philippinensis</i> <sup>13</sup>	21.3 – 32.1	15.0 – 26.0	Ovoid	Dorsal	Sausage	Middle	Roundish	Planktonic
<i>H. pseudotriquetra</i> <sup>14</sup>	18.4 – 27.2	14.4 – 21.6	Ovoid	Epitheca	Spherical	Hypotheca	Triangular	Planktonic
<i>H. pseudotriquetra</i> <sup>*</sup>	20.0 – 23.0	12.0 – 17.0	Ovoid, epi- and hypotheca equal size	Epitheca	Spherical	Hypotheca	Triangular	Benthic
<i>H. pygmaea</i> <sup>15</sup>	9.8 – 15.8	6.1 – 10.0	Ellipsoid	Hypotheca	Elongated	Epitheca	Circular	Planktonic
<i>H. rotundata</i> <sup>16</sup>	9.0 – 11.7	-	Ellipsoid, larger epitheca	Dorsal	Elongated	Epitheca	Triangular	Planktonic
<i>H. steinii</i> <sup>17</sup>	17.8 – 25.9	13.0 – 17.6	Ellipsoid	Epitheca	Spherical	Hypotheca	Triangular	Planktonic
<i>H. psammophila</i> <sup>18</sup>	9.0 – 12.0	6.0 – 9.0	Ovoid	Hypotheca	Spherical	Epitheca	Triangular	Benthic

<sup>1</sup>Horiguchi 1997; <sup>2</sup>Xiao et al. 2018; <sup>3</sup>Choi and Kim 2021; <sup>4</sup>Horiguchi 1995; <sup>5</sup>Sunesen et al. 2020; <sup>6</sup>Iwataki et al. 2002; <sup>7</sup>Iwataki et al. 2009; <sup>8</sup>Herdman and Sweeney 1976; <sup>9</sup>Salas et al. 2014; <sup>10</sup>Loeblich 1968; <sup>11</sup>Iwataki et al. 2003; <sup>12</sup>Kofoed 1907; <sup>13</sup>Benico et al. 2021; <sup>14</sup>Iwataki et al. 2004; <sup>15</sup>Uysal et al. 2003; <sup>16</sup>Hansen 1995; <sup>17</sup>Tillmann et al. 2017; <sup>18</sup>Tanura et al. 2005.

Note: <sup>1)</sup> Body scale referred to Iwataki et al. 2004, Choi and Kim 2021; \* This study

## 4. 제주 신앙 해변에서 분리한 국내 미기록종 *Amphidinium fijiense*의 형태 및 분자계통학적 연구

### 4.1. 서론

*Amphidinium* 속은 무각외편모조류로 약 100 종이 보고되었다(Guiry and Guiry 2022). 그들은 대부분 독립영양생물이고 전 세계적으로 분포하며 연안, 염습지, 저서 환경 등 다양한 서식지에서 서식한다(Dodge 1982, Murray and Patterson 2002, Flø Jørgensen et al. 2004b, Dolapsakis and Economou-Amilli 2009, Hoppenrath et al. 2014.). 특히, 이들은 전 세계 사질 조간대에서 가장 다양하고 풍부하게 존재한다고 알려져 있다(Hoppenrath 2000, Murray and Patterson 2002). *A. carterae*와 *A. operculatum*과 같은 종은 용혈성 독소물질 및 ciguatera fish poisoning (CFP)과 관련이 있다고 보고되었으며, 이 독소가 어류를 독화시켰다(Hallegraeff 1993, Nayak and Karunasagar 1997, Ge et al. 2009, Meng et al. 2010).

*A. operculatum* Claperède & Lachmann은 *Amphidinium* 속의 기준종(type species)이다(Claperède and Lachmann 1859). 초기에 기재된 *Amphidinium*의 형태적 특징은 세포의 전체 크기에 비해 작은 상추로 정의되었으나(Claperède and Lachmann 1859), 이 특징만으로 이 속에 속하는 종들을 분류학적으로 충분히 설명하기에는 불충분했다(Daugbherg et al. 2000). 핵, 엽록체, pyrenoid, 수낭, 안점, scale의 수, 존재, 위치와 생활사와 같은 다양한 형태적 특징이 *Amphidinium* 종들을 동정하기 위해 사용되었지만(Borchhardt et al. 2021), 최근 분자적 도구를 활용한 분류학적 연구들은 *Amphidinium* 속이 다계통 분류군임을 보여줬다(Flø Jørgensen et al. 2004b). 따라서 이 분류군에 속하는

약 100종의 생물들은 더 엄격한 기준에 따라 재분류가 될 필요가 있다. 분기적 및 분자적 분석에 기초하여 *Amphidinium* 속에 속하는 종들은 하추의 배면 상부를 덮는 작고 불규칙한, 배면을 기준으로 왼쪽으로 치우쳐진 삼각형 또는 초승달 형태의 상추를 가진 종으로 재정의되었고, 이들을 "진정한" *Amphidinium sensu stricto*로 분류하였다(Flø Jørgensen et al. 2004b). 그 외에 *Amphidinium sensu stricto*의 속하지 않는 다른 종들은 넓은 범위를 의미하는 *Amphidinium sensu lato*로 분류되고 있다.

2019년 3월, 저서와편모조류 생물다양성 조사과정 중 미동정된 *Amphidinium* 종을 관찰하였고, 이를 분리 및 배양주를 확보하였다. 본 연구는 *Amphidinium* 속의 최신 형태분류학적 정보를 요약하고 광학현미경과 주사전자현미경을 사용한 형태적 관찰과 ribosomal RNA 유전자를 활용한 분자계통학적 분석을 통해 신양 해변에서 분리된 *Amphidinium* 종을 보고하고자 한다.

## 4.2. 재료 및 방법

### 4.2.1. 모래 시료 채집 및 배양주 확립

2019년 3월 21일 제주 신양 해변(33° 26'1.67"N, 126° 55'21.88"E)에서 모래 시료 약 50g을 채집하였다. 채집한 모래 시료를 IMK 배지(Daigo IMK, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 100 mL가 담긴 투명한 6 oz 플라스틱 컵에 담고, 규조류의 성장을 억제하기 위해 GeO<sub>2</sub> 1 mL를 첨가하여 배양하였다. 배양된 시료는 세포의 성장을 확인하기 위하여 이틀에 한 번씩 확인되었고, 8일 간의 배양 후 *Amphidinium*과 유사한 형태의 저서와편모조류 세포들은 광학현미경 200배 배율에서 파스퇴르 피펫을 사용하여 단일 세포로

분리되었다. 분리된 세포는 IMK 배지 2 mL가 담긴 24-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China)에 이동되었고, 온도 16°C, 광량  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 12:12 시간 명암 주기로 배양되었다. 세포 수가 증가함에 따라 12-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China), 50ml culture flask (JET BIOFIL, Guangzhou, China)로 순차적으로 이동된 후, 최종적으로 배양주 AF-1903SY-04이 확보되었다.

#### 4.2.2. 현미경 검경 및 이미지 촬영

광학현미경 관찰을 위해 배양주는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2%로 고정되었고, 광학현미경(LM; Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 400배 배율에서 관찰되었으며, AxioCam ERc 5s 카메라(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 촬영되었다.

주사전자현미경을 이용하여 세포를 관찰하기 위해 배양주는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2%로 1시간 고정된 후, 사산화오스뮴( $\text{OsO}_4$ ; Sigma-Aldrich, Massachusetts, United States) 최종 농도 1%로 10분간 고정되었다. 고정된 배양주는  $2 \mu\text{m}$  polycarbonate 멤브레인 필터(25mm diameter, Whatman, Floreham Park, NJ, USA)를 통해 고정액을 여과시킨 후, 멸균된 여과해수와 증류수를 사용하여 순차적으로 15분간 세척하였다. 이후 30, 50, 70, 90, 100% 농도의 에탄올로 10분씩 탈수하였고, 마지막으로 100% 에탄올에서 1시간동안 탈수하였다. 세포는 임계점 건조기(EM CPD300, Leica microsystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 건조하였고, 백금으로 코팅(Q150R, Quorum, Laughton, U.K.)한 후, 주사전자현미경(SEM;

MIRA 3, TESCAN, Brno, Czech Republic)으로 가속전압 5–15kV에서 관찰 및 촬영되었다.

#### 4.2.3. DNA 추출

배양주의 DNA 분석을 위해, 배양액 2 mL를 2 mL microcentrifuge tube에 분취하였고, 3000 rpm에서 10분 간 원심분리 한 후, 상등액을 제거하였다. 이후 800  $\mu$ L의 extraction buffer [100 mM Tris-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 100 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)]를 첨가한 후, DNA 추출 전까지 -20°C 냉동보관 하였다. 냉동 보관되었던 2 mL microcentrifuge tube를 액체질소와 65°C 수조를 사용하여 급속 냉동 및 해동 3회 반복 실시하였다. 이어서, 단백질을 분해시키기 위해 8  $\mu$ L의 proteinase K (10 mg mL<sup>-1</sup> in 1×TE buffer)를 첨가한 후, 37°C에서 30 분간 배양한 후, 20% Sodium dodecyl sulphate (SDS) 80  $\mu$ L를 tube에 넣고 65°C에서 2시간 배양하였다. 배양 후 2 mL microcentrifuge tube에 동일한 부피의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)을 추가한 후, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액은 새로운 1.7 mL microcentrifuge tube에 옮겨졌고, 상등액의 0.1 부피의 3 M sodium acetate (pH 5.1, prepared in ddH<sub>2</sub>O)와 상등액과 동일한 부피의 순도 99% 이상의 isopropanol를 추가하였다. 2 mL microcentrifuge tube는 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상등액은 제거하였다. 이후 70% 에탄올 1 mL를 추가하여 14,000 rpm에서 20분 간 시료를 세수 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 농축된 시료는 건조된 후 100  $\mu$ L의 1× TE buffer로 DNA를 현탁시켰다.

#### 4.2.4. PCR 증폭 및 염기서열 분석

Small subunit (SSU), large subunit (LSU), Internal transcribed spacer (ITS) rDNA 영역은 외편모조류 범용 primer 쌍 18F01 (forward: 5'-CAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG-3')과 PM28-R1318 (reverse: 5'-TCG GCA GGT GAG TTG TTA CAC AC-3')을 사용하여 증폭되었다(Ki et al. 2005). PCR 반응액은 3차 증류수 11.8  $\mu$ L, 10 $\times$  Ex PCR buffer (TaKaRa, Shiga, Japan) 2  $\mu$ L, dNTP mix (각 4 mM) 2  $\mu$ L, 각 primer 1  $\mu$ L (500 nM), Ex Taq polymerase (2.5 U) 0.2  $\mu$ L, 주형 DNA 2  $\mu$ L의 조성으로 최종 용량이 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. PCR 증폭은 thermal iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 3 분간 initial denaturation을 거쳐 94 $^{\circ}$ C에서 30초의 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 40초의 annealing, 68 $^{\circ}$ C에서 5분의 extension 과정을 40회 반복하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 final extension 과정을 수행하였다. PCR 산물은 Midori<sup>Green</sup> (Nippon Genetics Europe, GmbH, Germany)으로 염색한 1% agarose gel (Promega, Madison, WI)에서 전기영동하여 확인하였다.

증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Germany)로 정제되었고, 염기서열 분석은 ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, CA)를 이용하여 수행되었다. 각 염기서열 단편은 Sequencher 4.7 software (Gene Codes, Ann Arbor, MI)를 활용하여 단일 염기서열로 조합되었다.

#### 4.2.5. 분자계통학적 분석

각 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blst.cgi>) 검색을 통해 획득하였다(Table 4.1). 분자계통학적 분석은 NCBI에서 검색된 와편모조류의 ITS 및 LSU rDNA 염기서열을 활용하여 수행되었다. 표선 배양주의 ITS 및 LSU rDNA 염기서열은 BLAST 검색된 3속 17종의 ITS rDNA 염기서열 및 11속 33종의 LSU rDNA 염기서열과 MAFFT software를 사용하여 정렬하였고(Katoh et al. 2019), Gblocks v 0.91b 프로그램을 사용하여 정렬된 염기서열의 공백 및 결측 데이터를 제거하였다(Castresana 2000). Maximum-Likelihood (ML) 분석은 ITS (170 alignment sites)와 LSU (564 alignment sites) rDNA 염기서열로 이루어진 데이터 조합을 이용하여 RAxML 8.2.4 프로그램에서 GTR+G+I nucleotide substitution 모델을 통해 추정되었다(Stamatakis 2014). 분석을 통해 작성된 계통수의 각 branch에 대한 지지도는 bootstrap 5,000회 반복을 통해 확인되었다. 계통수의 작성은 MEGA X (Kumar et al. 2018)에서 출력되었다.

**Table 4.1.** Information of sequence for phylogenetic analyses.

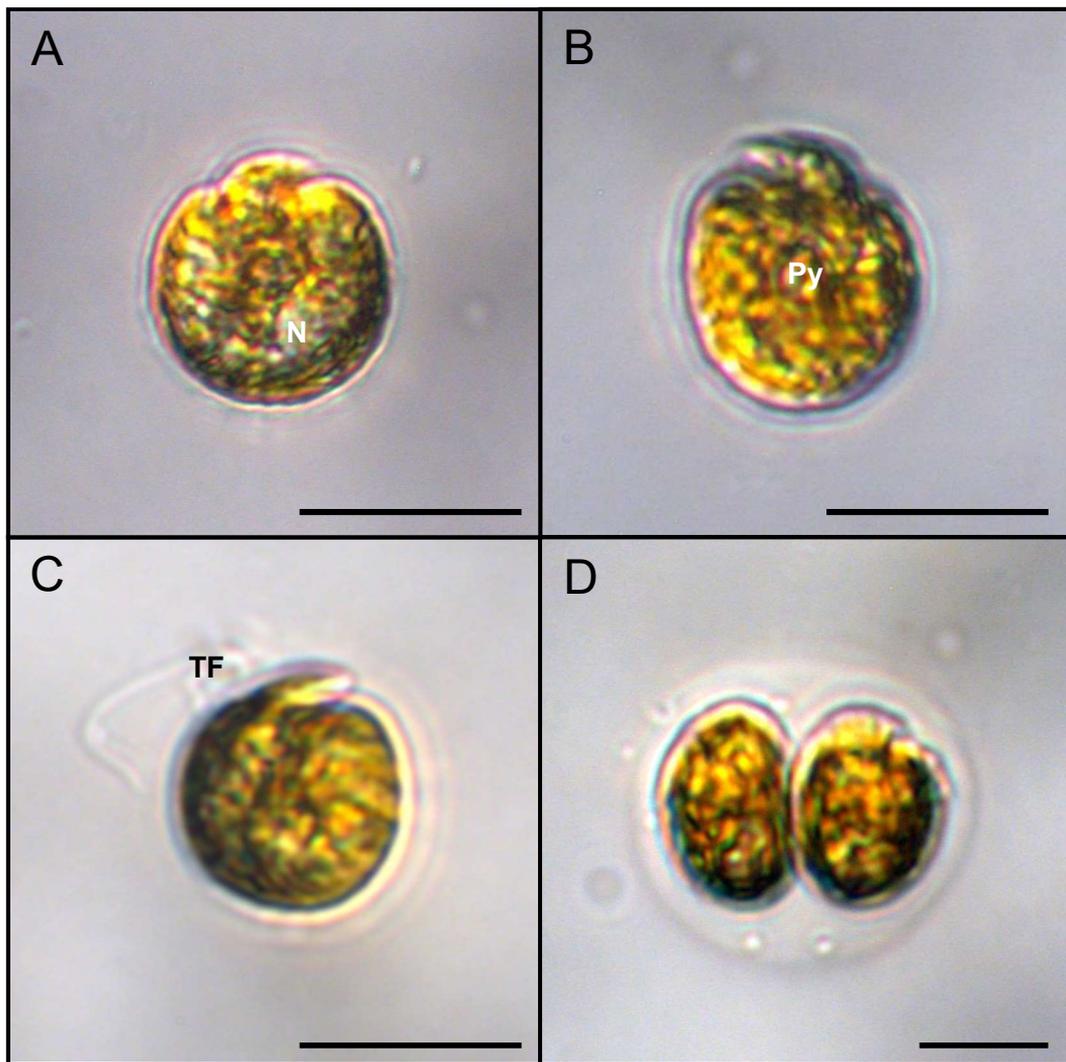
Species	Strain	Gene	Accession No.	Reference
<i>Akashiwo sanguinea</i>	CCMP 1321	LSU	AY831412	Ki and Han 2005
<i>Amphidinium carterae</i>	Amca1506-4	ITS	KY697954	Karafas et al. 2017
	CCMP 122	LSU	KY697980	Karafas et al. 2017
<i>A. cupulatisquama</i>	TM-96	LSU	AB477346	Tamura et al. 2009
<i>A. eilatiensis</i>	CCMP2100	ITS	AJ417900	Lee et al. 2003
		LSU	AJ417899	Lee et al. 2003
<i>A. fijiense</i> (as <i>A. fijiensis</i> )	CMSTAC020 Amfi0508-2	SSU	EU046336	—
		ITS	KY697936	Karafas et al. 2017
		LSU	EU046329	Karafas et al. 2017
	CMSTAC021 Amfi0508-1	ITS	KY697937	Karafas et al. 2017
		LSU	EU046330	Karafas et al. 2017
		AF-1903SY-04	SSU	OP555754
		ITS		This study
		LSU		This study
<i>A. incoloratum</i>	—	LSU	AY455677	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. gibbosum</i>	CMSTAC018 Amgo0406-1	ITS	KY697975	Karafas et al. 2017
	CCMP120	LSU	AY455672	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. herdmanii</i>	K-0655	LSU	KY455675	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. klebsii</i>	CMSTAC018	LSU	EU046328	—
<i>A. magnum</i>	Amma0206-4	ITS	KY697947	Karafas et al. 2017
	ARC73	LSU	MW774097	—
<i>A. massartii</i>	CMSTAC025 Amma0607-1	ITS	KY697952	Karafas et al. 2017
	CCMP 1821	LSU	AY455670	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. operculatum</i>	UTEX 1946	ITS	FJ823532	Stern et al. 2012
	K-0663	LSU	AY455674	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. pagoense</i>	G5	ITS	MZ851802	Phua et al. 2022
<i>A. paucianulatum</i>	Ampa0606-1	ITS	KY697965	Karafas et al. 2017
	ARC117	LSU	MW774120	—
<i>A. pseudomassartii</i>	AKLV01	ITS	KY697945	Karafas et al. 2017
<i>A. steinii</i>	TIO181	ITS	MZ359142	Luo et al. 2022
	SM17	LSU	AY455673	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. theodorei</i> (as <i>A. theodori</i> )	CMSTAC023 Amth0702-1	ITS	KY697942	Karafas et al. 2017
	Amth1303-1	LSU	KY697986	Karafas et al. 2017
<i>A. tharmaeum</i>	CS-109	ITS	JQ6647426	Murray et al. 2012

Species	Strain	Gene	Accession No.	Reference
<i>A. thermaeum</i>	ARC386	LSU	MW774176	—
<i>A. tomasii</i>	Amt01412-1	ITS	KY974334	Karafas et al. 2017
	Amt01412-2	LSU	KY697984	Karafas et al. 2017
	SKLMP_Ve072	ITS	MK590194	—
<i>A. trulla</i>	K-0657	LSU	AY455671	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>A. uduigamense</i>	I76	ITS	MZ851800	Phua et al. 2022
<i>Ankistrodinium armigerum</i>	—	LSU	AB858350	Watanabe et al. 2014
<i>An.semilunatum</i>		LSU	AY455678	Flø Jørgensen et al. 2004b
<i>Bindiferia boggaya</i>	CAWD164	ITS	MW722976	Borchhardt et al. 2021
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCCW991	LSU	DQ779989	Ki and Han 2007b
<i>Gyrodinium rubrum</i>	—	LSU	AY571369	Hansen and Daugbjerg 2004
<i>Gyrodinium spirale</i>	—	LSU	AY571371	Hansen and Daugbjerg 2004
<i>Heterocapsa arctica</i>	CCMP 445	LSU	AY571372	Hansen and Daugbjerg 2004
<i>H. niei</i>	IFR10-193	LSU	JQ247713	Nézan et al. 2012
<i>Karenia mikimotoi</i>	KMWL01	LSU	EF469238	Salas et al. 2008
<i>Karlodinium micrum</i>	—	LSU	AY245692	Litaker et al. 2003
<i>Kirithra asteri</i>	H-1-46	ITS	MW267275	Gottschling et al. 2021
<i>Noctiluca scintillans</i>	—	LSU	GQ380592	Ki 2010
<i>Paragymnodinium asymmetricum</i>	Vnd299	LSU	LC516500	Yokouchi et al. 2020
<i>P. inerme</i>	JGD	LSU	LC516502	Yokouchi et al. 2020
<i>Togula britannica</i>	K-0658	LSU	AY455679	Flø Jørgensen et al. 2004a
<i>T. compacta</i>	K-0659	LSU	AY568562	Flø Jørgensen et al. 2004a
<i>T. jolla</i>	CAWD 58	LSU	AY568561	Flø Jørgensen et al. 2004a

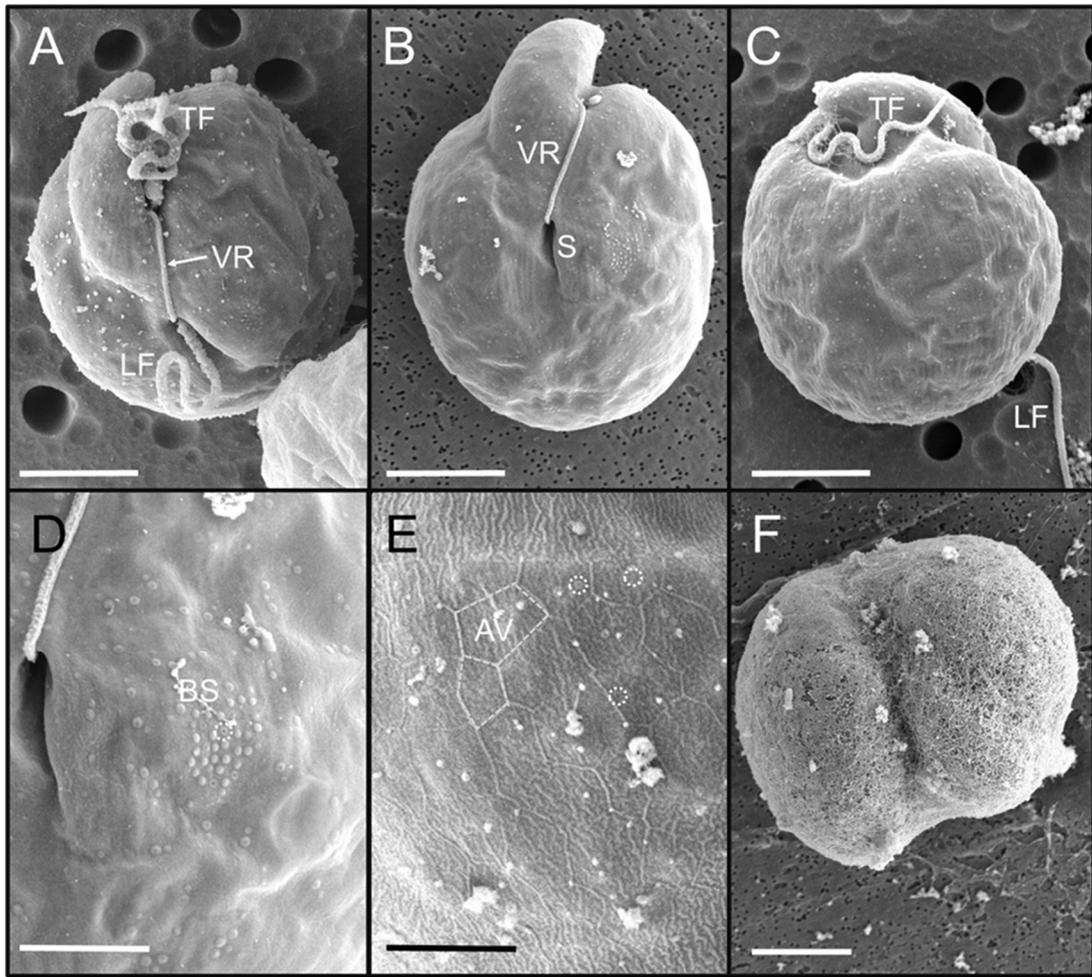
### 4.3. 결과

#### 4.3.1. *Amphidinium fijiense*의 형태적 특징

세포의 길이는 13.0 - 15.0  $\mu\text{m}$ , 너비는 10.0 - 13.0  $\mu\text{m}$  이며, 길이와 너비의 비율은 0.8 - 0.9였다. 세포는 원형 또는 타원형이며 배면에서 편평하다(Fig. 4.1). 핵은 하부에 위치하고, pyrenoid는 세포 중앙에 위치한다(Fig. 4.1 A, B). 그러나 수낭은 관찰되지 않았다. 광학현미경 상에서 상대적으로 두꺼운 편모가 관찰된다(Fig. 4.1C). 상대적으로 두꺼운 편모가 광학현미경에서 관찰되었다(Fig. 4.1C). 세포는 일시적인 hyaline cyst를 형성하며 분열된다(Fig. 4.1D). 둥근 형태의 매우 작은 상추는 왼쪽으로 구부러져 있고, 끝이 둥글다(Fig. 4.2 A - C). Ventral ridge는 짧고 곧으며, 두 개의 편모 삽입구와 연결된다(Fig. 4.2 A, B). 종편모는 세포 중앙에 위치한다(Fig. 4.2A). 종구는 얇고 하추의 antapex에 도달하지 못했다(Fig. 2B). 하추는 상추보다 크고 타원형 또는 원형이며(Fig. 4.2B, C), 하추의 상부는 대칭이다(Fig. 4.1B, 4.2B). 세포의 표면에 세로줄무늬가 관찰된다(Fig. 4.2B - D). 또한, 세포 표면에서 작은 링모양의 body scale이 관찰되었고, 황구 왼쪽에 밀집되어있다(Fig. 4.2B, D). 희미한 다각형의 amphiesmal vesicles이 관찰된다(Fig. 4.2E). Cyst 형태의 분열 세포는 유기물로 둘러싸여있다(Fig. 4.2F).



**Figure 4.1.** Light micrographs of *Amphidinium fijiense* (culture strain AF-1903SY-04). A. Ventral view showing the nucleus (N). B. Dorsal view showing the pyrenoid. C. Ventral view showing transverse flagellum (TF). D. The temporary hyaline cyst including two non-motile cells. Scale bars = 10  $\mu\text{m}$ .

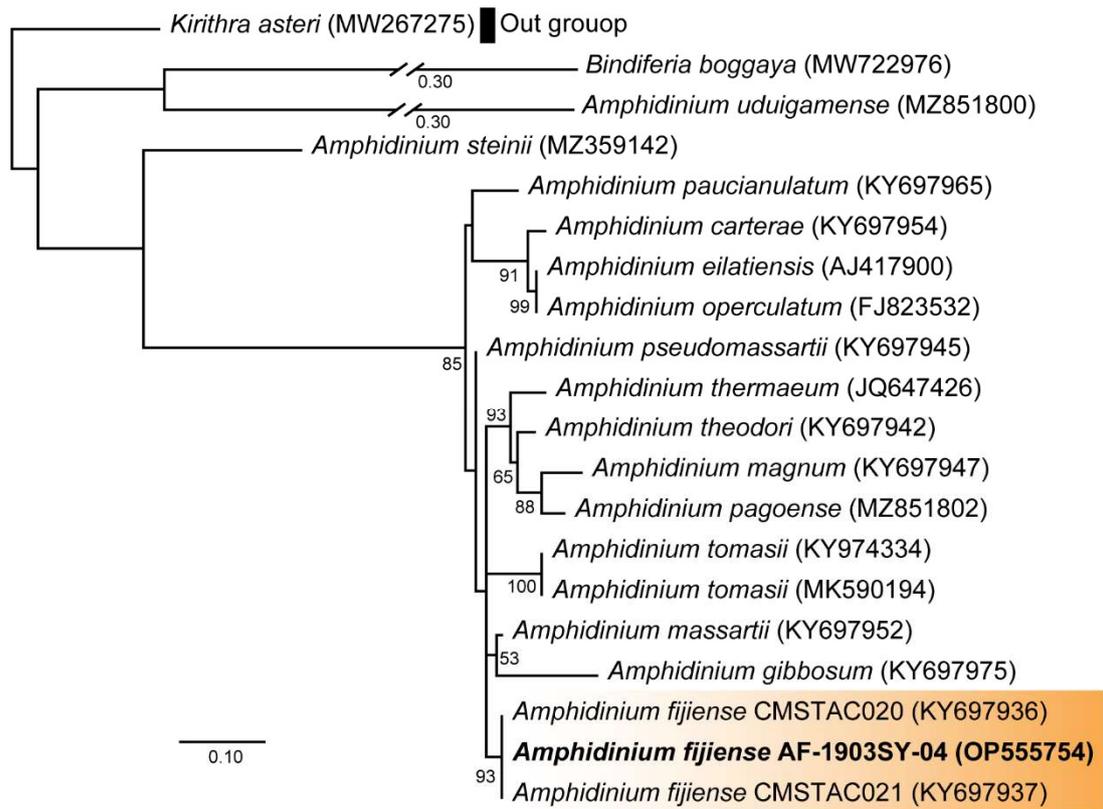


**Figure 4.2.** Scanning electron micrographs of *Amphidinium fijiense* (culture strain AF-1903SY-04). A. Anterior view showing the ventral ridge (VR) (transverse flagellum; TF and longitudinal flagellum; LF). B. Ventral view showing the sulcus (S) C. Dorsal view showing coiled transverse flagellum. D. High-magnification of the right of hypocone. Protruding Body scales (BS) visible on the surface of the cell. E. Pattern of polygonal amphiesmal vesicles (AV). F. Cell divide as non-motile cells in hyaline temporary cyst stages. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A - C and F) and 2  $\mu\text{m}$  (D and E).

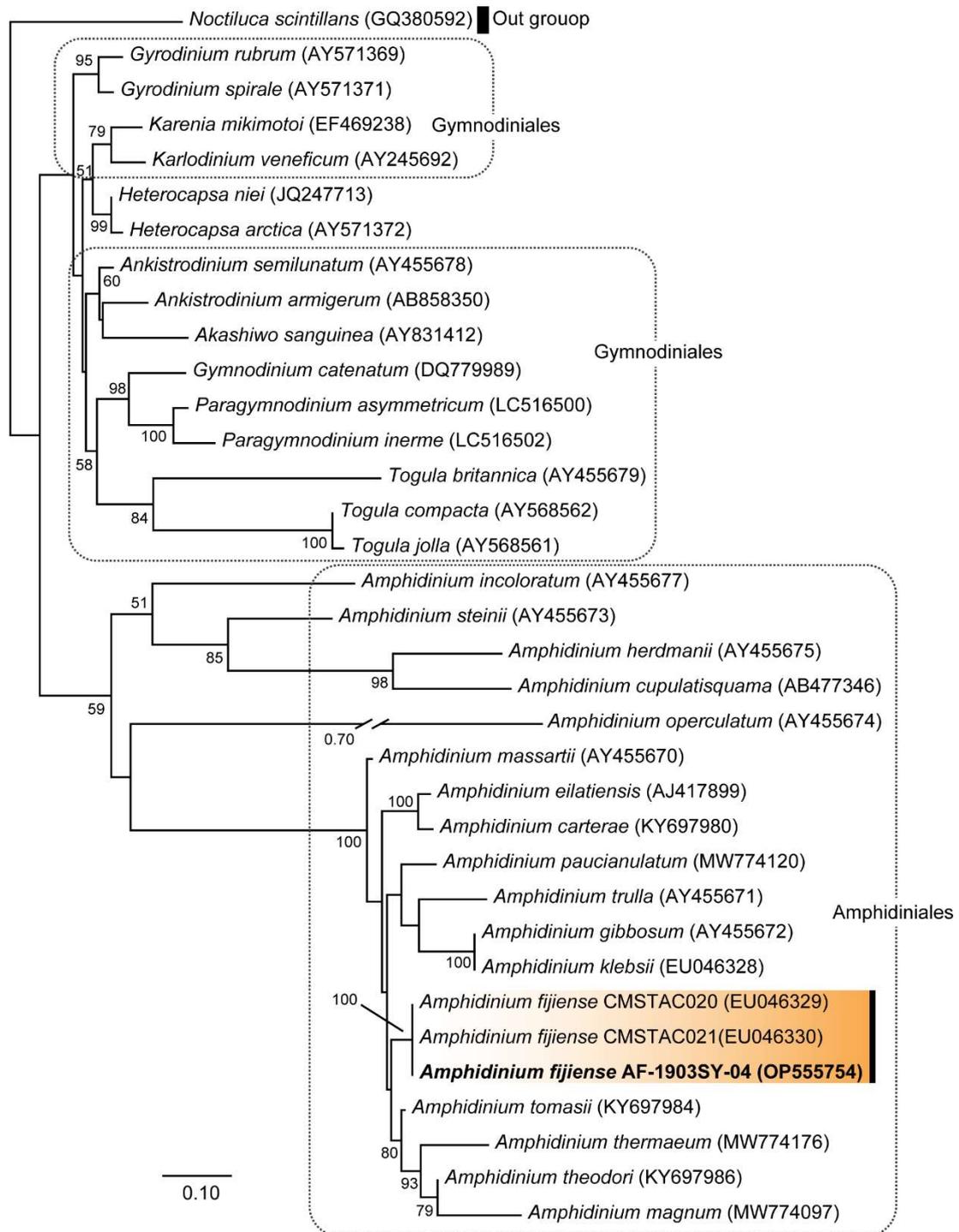
#### 4.3.2. *Amphidinium fijiense* 의 분자계통학적 분석

한국 배양주 AF-1903SY-04 의 SSU, ITS, LSU rDNA 영역 1,773 bp, 463 bp, 1,247 bp 의 염기서열 정보는 Genbank 에 Accession No. OP555754 로 등록되었다. SSU rDNA 염기서열은 기존에 보고된 피지(Fiji) 배양주 *A. fijiense* (EU046336)와 99.8% 이상의 높은 유사도를 보였다. 또한, ITS 와 LSU rDNA 염기서열은 피지(Fiji) 배양주 *A. fijiense* (KY697937, EU046329)와 각각 99.3%, 99.8%로 높은 유사도를 보였다.

ITS 및 LSU rDNA 염기서열의 계통분석 결과, 한국 배양주는 피지(Fiji) 배양주 *A. fijiense* 와 분기군을 형성하였다. ITS rDNA 계통수에서 한국 배양주 AF-1903SY-04 를 포함한 *A. fijiense* 는 같은 분기군을 형성하고(93% bootstrap value), 다른 *Amphidinium* 종들과 분리되었다(Fig. 4.3). LSU rDNA 계통수에서 한국 배양주 AF-1903SY-04 는 *A. fijiense* (EU046329, EU046330)와 100% bootstrap 지지도를 보이며 분기군을 형성하였고, 다른 *Amphidinium* 종과 완전히 분리되었다(Fig. 4.4).



**Figure 4.3.** Maximum likelihood tree of *Amphidinium* sensu stricto using ITS1+5.8S+ITS2 sequences. The numbers on each node are the bootstrap values (%). The GenBank accession number was added in parenthesis. Korean *Amphidinium fijiense* is marked in bold. Scale bar = 0.1 nucleotide substitutions per site.



**Figure 4.4.** Maximum likelihood tree of dinoflagellate LSU rDNA sequences with emphasis of *Amphidinium fijiense*. The numbers on each node are the bootstrap values (%). The GenBank accession number was added in parenthesis. Korean *Amphidinium fijiense* is marked in bold. Scale bar = 0.1 nucleotide substitutions per site.

#### 4.4. 토의

과거 *Amphidinium* 은 형태적 특징이 불충분하고 유전적 다양성이 높아 종을 동정하기 어려웠다. 그러나, *Amphidinium* 속의 기준종을 기준으로 형태적 특징을 재정의하였고, 재정의된 특징에 따라 일부 종이 *Amphidinium sensu stricto* 로 분류되었다(Flø Jørgensen et al. 2004b).

*Amphidinium fijiense* Karafas & Tomas 는 남태평양 서부, 피지에서 수입된 “live rock”에서 처음 보고되었다(Karafas et al. 2017). 이 종의 분류학적 특징은 *Amphidinium sensu stricto* 에 속한다. 세포는 왼쪽으로 향하는 작은 상추와 원형, 타원형, 배 모양의 세포 형태를 가졌다. 제주 신양 해변에서 분리된 *Amphidinium* AF-1903SY-04 의 형태적 특징이 기존의 *A. fijiense* 의 작고 왼쪽으로 편향된 상추, 세포 중앙에 위치한 longitudinal flagellum insertion 과 pyrenoid, 세포 하부에 위치한 핵, 세포분열 시 일시적인 hyaline cyst 형성과 같은 형태적 특징과 유사하였다(Table 4.2). 또한, 한국 배양주의 최대 세포 크기는 더 작았으나, 원래 기재된 세포 크기 범위에 포함되었다(Table 4.2). 피지 *A. fijiense* 의 세포 형태는 원형, 타원형, 배모양 등 다양했지만, 한국 배양주는 배모양의 형태는 관찰되지 않았다(Table 4.2). 또한, 피지 배양주에서는 body scale 이 관찰되지 않았으나, 한국 배양주에서는 작은 원형의 body scale 이 관찰되었다(Fig. 4.2D, Table 4.2). *Heterocapsa* 속과 같은 소수의 외편모조류는 세포막 외부에 유기적인 body scale 을 가지고 있다(Iwataki et al. 2003, Iwataki et al. 2009, Benico et al. 2021). *Heterocapsa* 종의 경우, 뚜렷한 3 차원 구조의 body scale 이 중요한 분류키가 되었지만(Iwataki et 2002), *Amphidinium* 종을 분류하는 주요한 형태적 특징이 되기는 어렵다. Body scale 의 형성은 *Amphidinium* 종의 독특한 특성이지만,

많은 초기 분류학 연구들에서는 body scale 에 대해 기술하지 않았다. 또한, 이러한 단순한 둥근 형태의 body scale 은 여러 종에서 유사하며, 세포 표면이 젤라틴질로 덮여 있기 때문에 때때로 관찰되지 않았다(Sekida et al. 2003). 추가적으로, 한국 배양주 AF-1903SY-04 는 매끄러운 세포 표면과 매우 희미한 amphiesmal vesicles 가 관찰되었으나(Fig. 2.2B - E), 피지(Fiji) 배양주는 더 거친 표면과 뚜렷한 amphiesmal vesicles 이 관찰되었다(Karafas et al. 2017). 이러한 배양주 간의 형태학적 차이는 전자현미경을 통해 세포를 관찰할 때 보다 엄격하고 일관된 전처리 기준이 필요할 수 있음을 시사한다.

### ***Amphidinium sensu stricto* check list**

Class Dinophyceae West et Fritsch

Order Amphidinales Moestrup et Calado

Family Amphidiniaceae Moestrup et Calado

Genus *Amphidinium* Claperède et Lachmann

*Amphidinium carterae* Hulburt #, <sup>B</sup>

*Amphidinium cupulatisquama* Tamura et Horiguchi #, <sup>B</sup>

*Amphidinium eilatiensis* Lee

*Amphidinium fijiense* Karafas et Tomas \*, <sup>B</sup>

*Amphidinium gibbosum* (Maranda et Shimizu) Flø Jørgensen et Murray #, <sup>B</sup>

*Amphidinium herdmanii* Kofoid et Swezy #, <sup>B</sup>

*Amphidinium incoloratum* Campbell <sup>B</sup>

*Amphidinium magnum* Karafas et Tomas <sup>B</sup>

*Amphidinium massartii* Biecheler #, <sup>B</sup>

*Amphidinium operculatum* Claperède et Lachmann #, <sup>B</sup>

*Amphidinium pagoense* Phua et Wakeman <sup>B</sup>

*Amphidinium paucianulatum* Karafas et Tomas

*Amphidinium pseudomassartii* Karafas et Tomas

*Amphidinium steinii* (Lemmermann) Kofoid et Swezy #, <sup>B</sup>  
*Amphidinium stirisquamtum* Luo, Wang et Gu <sup>B</sup>  
*Amphidinium theodorei* Tomas et Karafas  
*Amphidinium thermaeum* Dolapsakis et Economou-Amilli #  
*Amphidinium tomasii* Karafas  
*Amphidinium trulla* Murray, Rhodes et Flø Jørgensen #, <sup>B</sup>  
*Amphidinium uduigamense* Phau et Wakeman <sup>B</sup>

*Amphidinium sensu stricto* 는 총 20 종이 보고되었으며, 그 중 9 종(#으로 표시)이 국내에 출현하였다(Lee et al. 2013, Shah et al. 2013, Lee and Kim 2017). 제주 신양 해변에서 분리된 AF-1903SY-04 배양주(\*로 표시)는 위에서 설명한 형태학적 특성에 따라 미기록종 *A. fijiense* 로 확인되었다. 현재까지 14 종(B 로 표시)이 저서 환경에서 기록되었지만, 나머지 6 종의 채집 정보는 확인 할 수 없었다. 많은 조사에 따르면, *Amphidinium* 종의 개체수는 연안 보다는 저서 환경에서 더 풍부한 것으로 추정된다(Hoppenrath 2000, Murray and Patterson 2002).

기재된 *Amphidinium sensu stricto* 종들의 형태적 특징을 바탕으로 형태학적 분류키를 통해 20 종을 동정할 수 있다(Table 4.2).

***Amphidinium sensu stricto* 검색표**

1a Antapical shape of hypocone is rounded..... 2  
 1b Antapical shape of hypocone is pointed..... 9  
 1c Antapical shape of hypocone varies..... 13  
 1d Antapical shape of hypocone is indented..... *A. herdmanii*  
 2a Longitudinal flagellum insertion is middle of cell ..... 3  
 2b Longitudinal flagellum insertion is posterior 1/3 of cell ..... 8

2c Longitudinal flagellum insertion is anterior 1/3 of cell.....	<i>A. theodorei</i>
3a Pyrenoid is present, central.....	4
3b Pyrenoid is present, lateral.....	<i>A. pseudomassartii</i>
3c Pyrenoid varies.....	<i>A. tomasii</i>
3d Pyrenoid is absent.....	<i>A. incoloratum</i>
4a Dividing cells are motile.....	5
4b Dividing cells are non-motile (cyst form) .....	7
5a Hypocone is symmetrical.....	6
5b Hypocone is asymmetrical.....	<i>A. paucianulatum</i>
6a Cell has reticulated lobes .....	<i>A. carterae</i>
6b Cell has 6 finger-like, lateral and peripheral ventrally projecting lobes.... .....	<i>A. eilatiensis</i>
7a Hypocone is symmetrical.....	<i>A. fijiense</i>
7b Hypocone is asymmetrical.....	<i>A. thermaeum</i>
8a Pyrenoids are present, central .....	<i>A. uduigamense</i>
8b Pyrenoid is absent.....	<i>A. operculatum</i>
9a Longitudinal flagellum insertion is anterior 1/3 of cell.....	10
9b Longitudinal flagellum insertion is middle of cell .....	<i>A. massartii</i>
9c Longitudinal flagellum insertion is posterior 1/3 of cell... <i>A. stirisquamtum</i>	
10a Dividing cells are motile.....	11
10b Dividing cells are non-motile (cyst form) .....	<i>A. steinii</i>
11a Body scales is absent.....	12
11b Body scale is present.....	<i>A. cupulatisquama</i>
12a Cell shape is hump-back .....	<i>A. gibbosum</i>
12b Cell shape is not hump-back.....	<i>A. trulla</i>
13a Longitudinal flagellum insertion is middle of cell .....	<i>A. pagoense</i>
13b Longitudinal flagellum insertion is posterior 1/3 of cell .....	<i>A. magnum</i>

형태학적으로 가장 유사한 *A. carterae* 와 비교하였을 때, 세포의 형태, 종편모의 삽입 위치, pyrenoid 와 핵의 존재와 위치가 유사하다(Table 4.2). 상추의 형태도 유사하지만 *A. carterae* 는 더 날카로운 상추를 가지고 있다(Murray et al. 2004). *A. fijiense* 가 *A. carterae* 와 가장 다른 특징은 세포 분열 시 일시적으로 생성되는 hyaline cyst 의 존재이며, *A. carterae* 는 이를 생성하지 않는다(Table 4.2).

**Table 4.2.** Morphological comparisons of the Korean isolate of *Amphidinium fijiense* (gray boxed) with other *Amphidinium* species.

	<i>A. fijiense</i> , Korea	<i>A. fijiense</i> , Fiji <sup>1</sup>	<i>A. Carterae</i> <sup>2</sup>	<i>A. cupulatisquama</i> <sup>3</sup>	<i>A. eilatiensis</i> <sup>4</sup>	<i>A. gibbosum</i> <sup>2</sup>	<i>A. herdmani</i> <sup>5</sup>
Length (μm)	13 – 15	10 – 23	10 – 20	30 – 59	13	24 – 43	20 – 31
Width (μm)	10 – 13	6 – 15	9 – 13	19 – 43	8	17 – 23	15 – 25
Cell shape	round or oval	round, oval, pear-shaped	round, elliptical	oval		elliptical "hump-back"	round, oval
Antapex shape	round	round	round, elliptical	round	round	pointed	indented
Epicone shape	curved	curved	crescent	boomerang-shaped, curved		triangular, flat	flat
Symmetry of anterior hypocone	yes	yes	yes	no	yes	no	no
LF insertion	mid 1/3	mid 1/3	mid 1/3	anterior 1/3	mid	anterior 1/3	anterior to middle
Ventral ridge	short, straight	short, straight	short, straight	short, straight		short, straight	N.A.
Pyrenoid	present	present	present	present	present	present	present
Pyrenoid location	central	central	central	central	central	central	central
Body scales	yes	no	no	yes	N.A.	N.A.	N.A.
Cell division	non-motile	non-motile	motile	motile	N.A.	motile	N.A.
Toxic	N.A.	no	yes	N.A.	N.A.	yes	N.A.

	<i>A. incololatum</i> <sup>5</sup>	<i>A. magnum</i> <sup>1</sup>	<i>A. massartii</i> <sup>2</sup>	<i>A. operculatum</i> <sup>2</sup>	<i>A. pagoense</i> <sup>6</sup>	<i>A. paucianulatum</i> <sup>1</sup>	<i>A. pseudomassartii</i> <sup>1</sup>
Length (μm)	27 – 38	26 – 47	6 – 21	29 – 50	17 – 32	17 – 41	13 – 21
Width (μm)	17 – 24	14 – 36	5 – 17	15 – 36	13 – 29	12 – 35	8 – 19
Cell shape	oval, egg-shaped	oval	round, oval, elliptical	ovoid, ellipsoid	oval, round	elliptical, pear-shaped	round, elliptical
Antapex shape	round	round	slightly pointed	round	round or slightly pointed	flat, slightly rounded	round
Epicone shape	crescent	flat	crescent, flat	triangular, flat	crescent	flat	crescent, round tip
Symmetry of anterior hypocone	no	yes	no	no	no	no	no
LF insertion	mid 1/3	slightly posterior	mid 1/3	lower 1/3	mid	mid 1/3	mid 1/3
Ventral ridge	straight	long, curved	straight	long	long, curved	short, straight	short, straight
Pyrenoid	absent	present, 2 – 4	yes	no	yes, two	yes	present
Pyrenoid location		lateral	central		central	central	lateral
Body scales	N.A.	no	yes	no	no	yes	no
Cell division	non-motile	motile	motile	motile	motile	motile	motile
Toxic	N.A.	yes	no	N.A.	yes	yes	yes

	<i>A. steinii</i> <sup>2</sup>	<i>A. stirisquamtum</i> <sup>7</sup>	<i>A. theodorei</i> <sup>1</sup>	<i>A. thermaeum</i> <sup>8</sup>	<i>A. tomasii</i> <sup>1</sup>	<i>A. trulla</i> <sup>2</sup>	<i>A. uduigamense</i> <sup>6</sup>
Length (μm)	20 – 38	30 – 37	13 – 21	10 – 30	19 – 42	18 – 31	35 – 44
Width (μm)	10 – 32	24 – 30	10 – 17	8 – 20	13 – 25	12 – 22	27 – 38
Cell shape	oval, elliptical	oval	oval, elliptical	round, oval	round, oval, elliptical	oval, elliptical	oval
Antapex shape	slightly pointed	pointed at the left side	round	round	round	slightly pointed	slightly rounded
Epicone shape	triangular, curved	triangular	flat	tongue-like	curved, round	crescent, curved	flat
Symmetry of anterior hypocone	no	no	no	no	varies	no	yes
LF insertion	anterior 1/3	lower 1/3	anterior 1/3	mid 1/3	mid 1/3	anterior 1/3	lower 1/3
Ventral ridge	short, straight	long	short, straight	straight	straight	short, straight	short, straight
Pyrenoid	present	present	present	present	varies	present	present
Pyrenoid location	central	central	central	central	central	central	central
Body scales	N.A.	yes	yes	N.A.	no	N.A.	no
Cell division	non-motile	motile	non-motile	non-motile	motile	motile	motile
Toxic	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes

N.A.: not available; <sup>1</sup>Kafaras et al. 2017; <sup>2</sup>Murray et al. 2004; <sup>3</sup>Tamura et al. 2009; <sup>4</sup>Lee et al. 2003; <sup>5</sup>Murray and Patterson 2002; <sup>6</sup>Phua et al. 2022; <sup>7</sup>Luo et al. 2021; <sup>8</sup>Dolapsakis and Economou-Amilli 2009.

ITS와 LSU rDNA를 기반으로 한 계통수는 한국 배양주 *A. fijiense*가 명확히 *A. fijiense* 분기군에 속하는 것을 확인하였다(Fig. 4.3, 4.4). SSU, ITS, LSU rDNA에서 각각 99.8%, 99.3%, 99.8%의 유사도를 보이고, LSU rDNA 계통수에서 피지 배양주와 한국 배양주 *A. fijiense* 분기군이 100% 지지도를 보였고, 계통분석을 통해 남반구 남태평양 서부에 위치한 피지(Fiji) 배양주와 북반구 북태평양 중부에 위치한 한국 배양주는 지역이 멀리 떨어져 있음에도 유전적 차이가 거의 없음이 확인되었다. 피지(Fiji)는 남적도 해류와 동오스트레일리아해류의 영향을 받는 해역에 위치한다. 두 해류는 남태평양 순환의 영향을 미치므로 피지(Fiji)에서 출현한 *A. fijiense*가 해류에 의해 한국까지 이동하기 어렵다고 추측된다. 오히려 남중국해에서 발견된 *A. fijiense*는 피지(Fiji) 배양주 *A. fijiense*와 LSU rDNA 염기서열에서 97.4%의 유사도를 보여 한국 배양주보다 유전적 차이가 높았고, 계통수에서도 피지(Fiji) 배양주와 중국 배양주는 자매 분기군을 형성하여, 지리학적 분포에 따른 유전적 차이가 있음을 보여준다(Luo et al. 2022). 이에 따라, 한국의 *A. fijiense*의 출현은 해류에 의한 유입보다는 다른 요인이 있을 수 있다. 선박 평형수는 해양 외래종 확산의 주요 원인 중 하나로 알려져 있으며, *Ostreopsis*와 같은 저서와편모조류 출현 분포의 확산 중 잠재적인 원인으로 선박 평형수의 영향이 보고되었다(Shears and Ross 2009). 따라서, 피지(Fiji) 배양주와 한국 배양주의 높은 유사도가 선박 평형수에 따른 이동 가능성이 있을 수 있음을 보여준다.

결론적으로, 2019년 3월 신양 해변에서 분리된 한국 배양주 AF-1903SY-04의 형태 및 계통분류학적 분석 결과, 국내 미기록종인 *A. fijiense*로 동정되었다. 추가적으로, 기존에 기재되지 않은 body scale의 형태학적 특징이

보고되었다. 또한, 형태학적 특징을 요약하고 *Amphidinium sensu stricto* 에 대한 분류키를 제공하였다.

## 5. 제주 표선 해변에서 분리한 저서와편모조류의 형태 및 계통분류학적 분석을 통한 신속, 신종 설립

### 5.1. 서론

*Amphidinium* 속은 무각와편모조류로 약 100 종이 보고되었으며 (Guiry and Guiry 2022), *A. operculatum* Claperède & Lachmann을 기준종으로 한다 (Claperède and Lachmann 1859). 초기에는 세포의 전체 크기에 비해 작은 상추로 정의되었으나 (Claperède and Lachmann 1859), 최근 형태 및 분자적 특징을 기반으로 하추의 배면 상부를 덮는 작고 상추를 가지며, 상추가 배면을 기준으로 왼쪽으로 치우쳐진 특징을 가진 종으로 재정의되었고, 약 20종이 *Amphidinium* sensu stricto로 분류되었다 (Flø Jørgensen et al. 2004b). 이에 따라 원래 *Amphidinium* 속의 구성원으로 간주되었던 *Amphidinium* sensu lato 종들은 *Togula*, *Prosoaulax*, *Apicoporus*, *Ankistrodinium*, *Bindiferia*와 같은 새로운 속으로 이속되었다 (Flø Jørgensen et al. 2004a, Calado and Moestrup 2005, Sparmann et al. 2008, Hoppenrath et al. 2012, Borchhardt et al. 2021). 또한, *Amphidinium* sensu stricto 그룹에 속했던 *A. testudo*와 *A. corrugatum*은 형태 및 분자계통학적 분석을 기반으로 *Testudodinium* 속으로 재정립되었다 (Horiguchi et al. 2012).

*Amphidinium* sensu stricto에서 분리된 *Testudodinium* 속은 작고 왼쪽으로 향하는 상추가 하추에 둘러싸여 있고 longitudinal furrow가 위치하는 것이 특징이다. 또한, 계통학적 위치 역시 *Amphidinium* sensu stricto와 뚜렷하게

구분되었다. 따라서, 형태적 특징 및 계통학적 위치에 따라 신속을 설립하였고, *Amphidinium sensu stricto*에 속했던 2종을 *Testudodinium*속으로 이속하였다.

2020년 3월, 제주 사질 조간대에 서식하는 저서와편모조류 조사 중 표선 해변에서 *Testudodinium*과 유사한 형태의 저서와편모조류가 분리되어 배양주를 확보하였다. 이 와편모조류는 광학현미경, 주사전자현미경, 투과전자현미경을 이용한 형태적 분석과 LSU와 ITS rDNA를 활용한 분자계통학적 분석을 통해 신속을 설립하고 신종을 보고하고자 한다.

## 5.2. 재료 및 방법

### 5.2.1. 모래 시료 채집 및 배양주 확립

2020년 3월 11일 제주 표선 해변(33° 18'38.69"N, 126° 49'34.28"E)에서 모래 시료 약 50g을 채집하였다. 채집한 모래 시료를 IMK 배지(Daigo IMK, Nihon Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 100 mL가 담긴 투명한 6 oz 플라스틱 컵에 담고, 균조류의 성장을 억제하기 위해  $\text{GeO}_2$  1 mL를 첨가하여 배양하였다. 배양된 시료는 세포의 성장을 확인하기 위하여 이틀에 한 번씩 확인되었고, *Amphidinium*과 유사한 저서와편모조류 세포들은 광학현미경 200배 배율에서 파스퇴르 피펫을 사용하여 단일 세포로 분리되었다. 분리된 세포는 IMK 배지 2 mL가 담긴 24-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China)에 이동되었고, 온도 16°C, 광량  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 12:12 시간 명암 주기로 배양되었다. 세포 수가 증가함에 따라 12-well culture plate (JET BIOFIL, Guangzhou, China), 50ml culture flask (JET BIOFIL, Guangzhou, China)로 순차적으로 이동된 후, 최종적으로 배양주 PJ-2003PS-01이 설립되었다.

### 5.2.2. 현미경 검경 및 이미지 촬영

광학현미경 관찰을 위해 배양주는 포름알데히드(formaldehyde) 최종 농도 1%로 고정되었고, 광학현미경(LM; Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 400배 배율에서 관찰되었으며, AxioCam ERc 5s 카메라(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 촬영되었다.

주사전자현미경을 이용하여 세포를 관찰하기 위해 배양주는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2%로 1시간 고정된 후, 사산화오스뮴(OsO<sub>4</sub>; Sigma-Aldrich, Massachusetts, United States) 최종 농도 1%로 10분간 고정되었다. 고정된 배양주는 2 μm polycarbonate 멤브레인 필터(25mm diameter, Whatman, Floreham Park, NJ, USA)를 통해 고정액을 여과시킨 후 멸균된 여과해수와 증류수를 사용하여 15분간 순차적으로 수세하였다. 이후 10, 30, 50, 70, 90, 100% 농도의 에탄올로 10분씩 탈수하였고, 마지막으로 100% 에탄올에서 1시간동안 탈수하였다. 세포는 임계점 건조기(EM CPD300, Leica microsystems, Wetzlar, Germany)를 사용하여 건조되었고, 백금으로 코팅(Q150R, Quarum, Laughton, U.K.)된 후, 주사전자현미경(SEM; MIRA 3, TESCAN, Brno, Czech Republic) 가속전압 5-15kV에서 관찰 및 촬영되었다.

투과전자현미경 관찰을 위해 배양주 15 mL를 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 0.1M cacodylate buffer (pH 7.3)을 추가하여 5분씩 수세하였다. 수세된 시료는 글루타르알데히드(Glutaraldehyde) 최종 농도 2.5%로 고정된 후 OsO<sub>4</sub> 최종 농도 1%로 2시간 동안 고정되었다. 고정된 시료는 50, 60, 70, 80, 90 % 농도의 에탄올에서 20분간 탈수되었고, 100% 농도의 에탄올로 20분간 3회 반복하여 탈수되었다. 이후 100% 농도의 Propylene Oxide로 30분간 2회 반복하여 치환되었고, Epon 812를 사용하여 시료를 포매하였다. 포매된 시료는 70mm 두께로 절편되었으며 cooper grid에 배치된 후, 투과전자현미경(TEM; JEM-1400 Plus, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 120kV에서 관찰 및 촬영되었다.

### 5.2.3. DNA 추출

배양주의 DNA 분석을 위해, 배양액 2 mL를 2 mL microcentrifuge tube에 분취하였고, 3000 rpm에서 10분 간 원심분리 한 후, 상등액을 제거하였다. 이후 800  $\mu$ L의 extraction buffer [100 mM Tris-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 100 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)]를 첨가한 후, DNA 추출 전까지 -20°C 냉동보관 하였다. 냉동 보관되었던 2 mL microcentrifuge tube를 액체질소와 65°C 수조를 사용하여 급속 냉동 및 해동 3회 반복 실시하였다. 이어서, 단백질을 분해시키기 위해 8  $\mu$ L의 proteinase K (10 mg mL<sup>-1</sup> in 1×TE buffer)를 첨가한 후, 37°C에서 30분간 배양한 후, 20% Sodium dodecyl sulphate (SDS) 80  $\mu$ L를 tube에 넣고 65°C에서 2시간 배양하였다. 배양 후 2 mL microcentrifuge tube에 동일한 부피의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)을 추가한 후, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액은 새로운 1.7 mL microcentrifuge tube에 옮겨졌고, 0.1 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.1, prepared in ddH<sub>2</sub>O)와 상등액과 동일한 부피의 순도 99% 이상의 isopropanol를 추가하였다. 2 mL microcentrifuge tube는 14,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상등액은 제거하였다. 이후 70% 에탄올 1 mL를 추가하여 14,000 rpm에서 20분 간 시료를 세수 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 농축된 시료는 건조된 후 100  $\mu$ L의 1× TE buffer로 DNA를 현탁시켰다.

#### 5.2.4 PCR 증폭 및 염기서열 분석

Small subunit (SSU)와 large subunit (LSU) rDNA 영역은 와편모조류 범용 primer 쌍 18F01 (forward: 5'-CAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG-3')과 PM28-R1318 (reverse: 5'-TCG GCA GGT GAG TTG TTA CAC AC-3')을 사용하여 증폭되었다(Ki et al. 2005). PCR 반응액은 3차 증류수 11.8  $\mu$ L, 10 $\times$  Ex PCR buffer (TaKaRa, Shiga, Japan) 2  $\mu$ L, dNTP mix (각 4 mM) 2  $\mu$ L, 각 primer 1  $\mu$ L (500 nM), Ex Taq polymerase (2.5 U) 0.2  $\mu$ L, 주형 DNA 2  $\mu$ L의 조성으로 최종 용량이 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. PCR 증폭은 thermal iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 3 분간 initial denaturation을 거쳐 94 $^{\circ}$ C에서 30초의 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 40초의 annealing, 68 $^{\circ}$ C에서 5분의 extension 과정을 40회 반복하였으며, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 final extension과정을 수행하였다. PCR 산물은 Midori<sup>Green</sup> (Nippon Genetics Europe, GmbH, Germany)으로 염색한 1% agarose gel (Promega, Madison, WI)에서 전기영동하여 확인하였다.

증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Germany)로 정제되었고, 염기서열 분석은 ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, CA)를 이용하여 수행되었다. 각 염기서열 단편은 Sequencher 4.7 software (Gene Codes, Ann Arbor, MI)를 활용하여 단일 염기서열로 조합되었다.

#### 5.2.5. 분자계통학적 분석

유전적 정보 확인은 신양 해변 배양주의 SSU 와 LSU rDNA 염기서열을 기반으로 한 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 통해 수행되었다. 그 후, 신양 해변 배양주와 *Amphidinium mootonorum* (Table 5.1) 사이의 SSU 와 LSU rDNA의 유사도 분석을 위해 BioEdit v.7.1.3 프로그램(Hall 1999)으로 정렬 및 편집하였다.

또한, 계통 분석을 위해 표선 해변 배양주는 27속 50종의 SSU rDNA 염기서열과 25종 45속의 LSU rDNA 염기서열에 각각 추가되어(Table 5.1) MAFFT software를 사용하여 정렬되었으며(Katoh and Standley 2013), Gblocks v 0.91b 프로그램을 통해 공백 및 결측 데이터가 제거되었다(Castresana 2000). Maximum-Likelihood (ML) 분석은 RAxML 8.2.4 프로그램에서 GTR+G+I 모델을 사용하여 SSU와 LSU rDNA 영역에 대해 수행되었다(Stamatakis 2014). 추가적으로 Bayesian (BI) 분석은 MrBayes 3.2.7a 프로그램에서 GTR+G+I 모델을 사용하여 수행되었다(Ronquist et al. 2012). Markov chain Monte Carlo (MCMC) 과정은 4개의 chain으로 설정하고 100세대 당 1개의 샘플링 빈도로 1,000,000 세대를 실시하였다. 이 분석 후, 최초의 2,000 계통수는 삭제되었고 일치된 계통수가 구축되었다. 분석을 통해 작성된 계통수의 작성은 TreeView v. 1.6.6 (Page 1996)에서 출력되었다. Bayesian posterior probabilities (>0.50)과 bootstrap 값은 계통수의 각 branch node에 표시되었다.

#### 5.2.6. 분자적 차이 분석

SSU와 LSU rDNA의 분자적 차이는 표선 해변 배양주와 *Amphidinium*속을 포함하여 *Amphidinium*에서 새롭게 설립된 4개 속(*Ankistrodinium*, *Apicoporus*, *Testudodinium*, *Togula*)과 비교하기 위해 분석 되었다(Table 5.1). *Togula* 속과 *Testudodinium*속의 염기서열이 GenBank에서 제한적이었기 때문에 각각 SSU와 LSU rDNA에서 제외되었다. 정렬된 염기서열의 염기쌍 유전적 거리(p-distance)는 MEGA X에서 Kimura 2-parameter 모델을 사용하여 수행 되었다(Kumar et al. 2018). Nucleotide 차이에 대한 통계적 분석은 SPSS 10.0.7 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다.

**Table 5.1.** Information of sequence using molecular analyses (Abbreviation: unpubl., unpublished; SSU, 18S small subunit ribosomal DNA; LSU, 28S large subunit ribosomal DNA).

<i>Species</i>	<i>Strain</i>	<i>Gene</i>	<i>Accession No.</i>	<i>Reference</i>	<i>Analyses</i>
<i>Akashiwo sanguinea</i>	CCMP 1321	SSU, LSU	AY831412	Ki and Han 2007a	phylogeny
<i>Alexandrium catenella</i>	ACY12	SSU	AB088280	Kim et al. 2004	phylogeny
<i>Alexandrium catenella</i>	AT08-7	LSU	KX519400	Shin et al. 2017	phylogeny
<i>Amphidinium carterae</i>	ACWGTNZ CAWD10	SSU	AF009217	Haywood et al. (unpubl. 1997)	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium carterae</i>	CCMP122	LSU	KY697980	Karafas et al. 2017	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium cupulatisquama</i>	HG149	SSU	LC056067	Yamada et al. 2015	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium cupulatisquama</i>	TM-96	LSU	AB477346	Tamura et al. 2009	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium gibbosum</i>	NY004	SSU	AB863027	Yamada et al. 2014	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium gibbosum</i>	CCMP 120	LSU	AY455672	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium herdmannii</i>	CCCM 532	SSU	AF274253	Saldarriaga et al. 2001	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium herdmannii</i>	K-0655; MFJ10	LSU	AY455675	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium klebsii</i>	CMSTAC018	SSU	EU046335	Cyronak 2007	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium massartii</i>	CCCM 439	SSU	AF274255	Saldarriaga et al. 2001	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium massartii</i>	CCMP 1821	LSU	AY455670	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium operculatum</i>	TAK-0	SSU	AB704006	Horiguchi et al. 2012	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium operculatum</i>		LSU	AY455674	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium steinii</i>	HG220	SSU	LC054921	Yamada et al. 2015	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium steinii</i>	SM17	LSU	AY455673	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium theodori</i>	Amth1303-1	LSU	KY697986	Karafas et al. 2017	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium tomasii</i>	Amtol412-2	LSU	KY697984	Karafas et al. 2017	phylogeny and molecular divergence
<i>Amphidinium trulla</i>	K-0657; MFJ2	LSU	AY455671	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Ankistrodinium armigerum</i>		SSU	AB858349	Watanabe et al. 2014	phylogeny and molecular divergence
<i>Ankistrodinium armigerum</i>		LSU	AB858350	Watanabe et al. 2014	phylogeny and molecular divergence
<i>Ankistrodinium semilunatum</i>		SSU	JQ179861	Hoppenrath et al. 2012	phylogeny and molecular divergence

<i>Ankistrodinium semilunatum</i>		LSU	AY455678	Flø Jørgensen et al. 2004b	phylogeny and molecular divergence
<i>Apicoporus glaber</i>		SSU	EU293235	Sparmann et al. 2008	phylogeny and molecular divergence
<i>Apicoporus glaber</i>		LSU	JQ179867	Hoppenrath et al. 2012	molecular divergence
<i>Apicoporus parvidiaboli</i>		SSU	EU293238	Sparmann et al. 2008	molecular divergence
<i>Barrufeta bravensis</i>	DAG8	SSU	MH732694	Luo et al. 2018	phylogeny
<i>Barrufeta resplendens</i>	GM17	SSU	KY688183	Wang et al. 2017	phylogeny
<i>Barrufeta resplendens</i>	GM17	LSU	KT203382	Gu et al. 2015	phylogeny
<i>Dinophysis acuminata</i>	DacmO3-26	SSU	AJ506972	Edvardsen et al. 2003	phylogeny
<i>Dinophysis acuminata</i>	SC277	LSU	AY277639	Hart et al. 2007	phylogeny
<i>Dinothrix quadrilobata</i>		SSU	LC583319	Yamada et al. 2020	phylogeny
<i>Diplopsalis lenticula</i>	M2	LSU	DQ444226	Gribble and Anderson 2006	phylogeny
<i>Gonyaulax baltica</i>	K-0487	LSU	AF260388	Daugbjerg et al. 2000	phylogeny
<i>Gonyaulax digitale</i>	UW394	LSU	AY154963	Ellegaard et al. 2003	phylogeny
<i>Gonyaulax polygramma</i>		SSU	AJ833631	Jeong et al. 2005	phylogeny
<i>Gonyaulax spinifera</i>	CCMP409	SSU	AF022155	Saunders et al. 1997	phylogeny
<i>Gymnodinium aureolum</i>		LSU	KJ508392	Nézan et al. 2014	phylogeny
<i>Gymnodinium catenatum</i>	MUCC273	SSU	AF022193	Saunders et al. 1997	phylogeny
<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCCW991	LSU	DQ779989	Ki and Han 2007b	phylogeny
<i>Gymnodinium fuscum</i>		SSU	AF022194	Saunders et al. 1997	phylogeny
<i>Gymnodinium smaydae</i>	GSSW10	SSU	HG005135	Kang et al. 2014	phylogeny
<i>Gyrodinium helveticum</i>		SSU	AB120004	Takano and Horiguchi 2004	phylogeny
<i>Gyrodinium rubrum</i>		LSU	AY571369	Hansen and Daugbjerg 2004	phylogeny
<i>Gyrodinium spirale</i>		SSU	AB120001	Takano and Horiguchi 2004	phylogeny
<i>Gyrodinium spirale</i>		LSU	AY571371	Hansen and Daugbjerg 2004	phylogeny
<i>Heterocapsa arctica</i>	CCMP 445	LSU	AY571372	Hansen and Daugbjerg 2004	phylogeny
<i>Heterocapsa niei</i>	IFR10-193	LSU	JQ247713	Nézan et al. 2012	phylogeny
<i>Heterocapsa triquetra</i>	MUCC285	SSU	AF022198	Saunders et al. 1997	phylogeny
<i>Karenia brevis</i>	CCMP718	SSU	AF172714	Tengs et al. 2000	phylogeny

<i>Karenia mikimotoi</i>	GMKUSJAP CAWD05	SSU	AF009131	Haywood et al. (unpubl. 1997)	phylogeny
<i>Karenia mikimotoi</i>	KMWL01	LSU	EF469238	Salas et al. 2008	phylogeny
<i>Karlodinium jejuense</i>	LMBEV136	SSU	MG365892	Li and Shin 2018	phylogeny
<i>Karlodinium veneficum</i>	Pim05JulC4	SSU, LSU	AY245692	Litaker et al. 2003	phylogeny
<i>Kryptoperidinium foliaceum</i>	GeoB 459	SSU, LSU	KY693721	Kretschmann et al. 2018	phylogeny
<i>Margalefidinium polykrikoides</i>	CCPK06	SSU	AY347309	Ki and Han 2008	phylogeny
<i>Margalefidinium polykrikoides</i>	LM2D349	LSU	LC438753	Thoha et al. 2019	phylogeny
<i>Noctiluca scintillans</i>		SSU, LSU	GQ380592	Ki 2010	phylogeny
<i>Paraamphidinium jejuensis</i>		SSU		This study	DNA similarity, phylogeny and molecular divergence
<i>Paraamphidinium jejuensis</i>		LSU		This study	DNA similarity, phylogeny and molecular divergence
<i>Paraamphidinium mootonorum</i>		SSU	GU295202	Hoppenrath and Leander 2010	DNA similarity, phylogeny and molecular divergence
<i>Paraamphidinium mootonorum</i>	AmDH2	LSU	KT371435	Kim et al. 2015	DNA similarity, phylogeny and molecular divergence
<i>Paraamphidinium mootonorum</i>		LSU	GU295205	Hoppenrath and Leander 2010	DNA similarity, phylogeny and molecular divergence
<i>Paragymnodinium asymmetricum</i>	vnd299	SSU	LC516501	Yokouchi et al. 2020	phylogeny
<i>Paragymnodinium asymmetricum</i>	vnd299	LSU	LC516500	Yokouchi et al. 2020	phylogeny
<i>Paragymnodinium inerme</i>	JGD	SSU	LC516503	Yokouchi et al. 2020	phylogeny
<i>Paragymnodinium inerme</i>	JGD	LSU	LC516502	Yokouchi et al. 2020	phylogeny
<i>Paragymnodinium shiwaense</i>	Jeong2006-1	SSU	AM408889	Kang et al. 2010	phylogeny
<i>Pfiesteria piscicida</i>	PPSB27	SSU	DQ991382	Park et al. 2007	phylogeny
<i>Pheopolykrikos beauchampii</i>		SSU	DQ371294	Hoppenrath and Leander 2007a	phylogeny
<i>Pheopolykrikos hartmannii</i>		LSU	FJ947045	Hoppenrath et al. 2009	phylogeny
<i>Polykrikos herdmanae</i>		SSU	DQ975470	Hoppenrath and Leander 2007b	phylogeny
<i>Polykrikos kofoidii</i>		SSU	DQ371292	Hoppenrath and Leander 2007a	phylogeny
<i>Polykrikos kofoidii</i>		LSU	FJ947043	Hoppenrath et al. 2009	phylogeny
<i>Polykrikos schwartzii</i>		LSU	EF205013	Moestrup and Daugbjerg 2007	phylogeny
<i>Preperidinium meunieri</i>	cell1_clone14	LSU	EF152925	Gribble and Anderson 2007	phylogeny
<i>Prorocentrum lima</i>		SSU	Y16235	Grzebyk et al. 1998	phylogeny

<i>Prorocentrum minimum</i>	SERC	LSU	EU780639	Handy et al. 2009	phylogeny
<i>Pseliodinium fusus</i>	IFR1100	LSU	KJ508394	Nézan et al. 2014	phylogeny
<i>Scrippsiella acuminata</i>	CCCM 602	SSU	AF274277	Saldarriaga et al. 2001	phylogeny
<i>Takayama acrotrocha</i>	MC728-D5	SSU	HM067010	Henrichs et al. 2011	phylogeny
<i>Testudodinium corrugatum</i>	HG-163	SSU	AB704004	Horiguchi et al. 2012	phylogeny and molecular divergence
<i>Testudodinium maedaense</i>	MAE-18	SSU	AB704005	Horiguchi et al. 2012	phylogeny and molecular divergence
<i>Testudodinium magnum</i>	HG229	SSU	LC159582	Pinto et al. 2017	phylogeny and molecular divergence
<i>Testudodinium testudo</i>	KOM-30	SSU	AB704002	Horiguchi et al. 2012	phylogeny and molecular divergence
<i>Togula britannica</i>	K-0658; MFJ15	LSU	AY455679	Flø Jørgensen et al. 2004a	phylogeny and molecular divergence
<i>Togula compacta</i>	SCAPP K-0659	LSU	AY568562	Flø Jørgensen et al. 2004a	phylogeny and molecular divergence
<i>Togula jolla</i>	CAWD 58	LSU	AY568561	Flø Jørgensen et al. 2004a	phylogeny and molecular divergence
<i>Torquentidium convolutum</i>	LIMS-PS-2394	SSU	MF948385	Shin et al. 2019	phylogeny
<i>Torquentidium convolutum</i>	LIMS-PS-2394	LSU	MF948386	Shin et al. 2019	phylogeny
<i>Torquentidium pirum</i>	PHJZB1	SSU	MH469533	Hu et al. 2020	phylogeny
<i>Torquentidium pirum</i>	PHJZB1	LSU	MH469535	Hu et al. 2020	phylogeny

### 5.3. 결과

#### 5.3.1. 분류학적 기재

##### *Paraamphidinium* gen. nov.

**Description:** Unarmored marine dinoflagellate. The cells are dorsoventrally flattened. The epicone is smaller than the hypocone and has faint apical groove. The cingulum is surrounded by hypocone. Nucleus is located in the center of hypocone. The sulcus is shallow, opening into a teardrop-shaped and not reaching the antapex. There are two types of life cycle: motile cell and sessile cell. Sessile cells are surrounded by hyaline layer.

**Type species:** *Paraamphidinium mootonorum* comb. nov.

**Etymology:** The name “*paraamphidinium*” is combination of the greek ‘para-’ and *Amphidinium*, meaning next to the genus *Amphidinium*.

##### *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov. Figs 5.1, 5.2

**Description:** The cell is oval from the ventral side, and dorsoventrally flattened. 35 – 38  $\mu\text{m}$  long, 27 – 30  $\mu\text{m}$  wide. The epicone is very smaller than hypocone and is embedded into the hypocone in the sessile state. There is a faint apical groove at the posterior end of epicone. The cingulum is almost surrounded the epicone, but the end is not connected. The sulcus is small and shallow, located in the center of the cell. Nucleus is spherical, located in the center of the hypocone. Many small chloroplasts present.

**Holotype:** Thy type specimen was deposited in National Institute of Biological Resources (NIBR) as NIBRDN0000001796.

**Representative figures:** Figs 5.1, 5.2.

**Type locality:** Pyoseon Beach, Jeju Island, Korea (33° 18'38.69"N, 126° 49'34.28"E).

**Etymology:** The name “jejuensis” is a collection site, Jeju Island, Korea.

**Habitat:** marine sandy sediments.

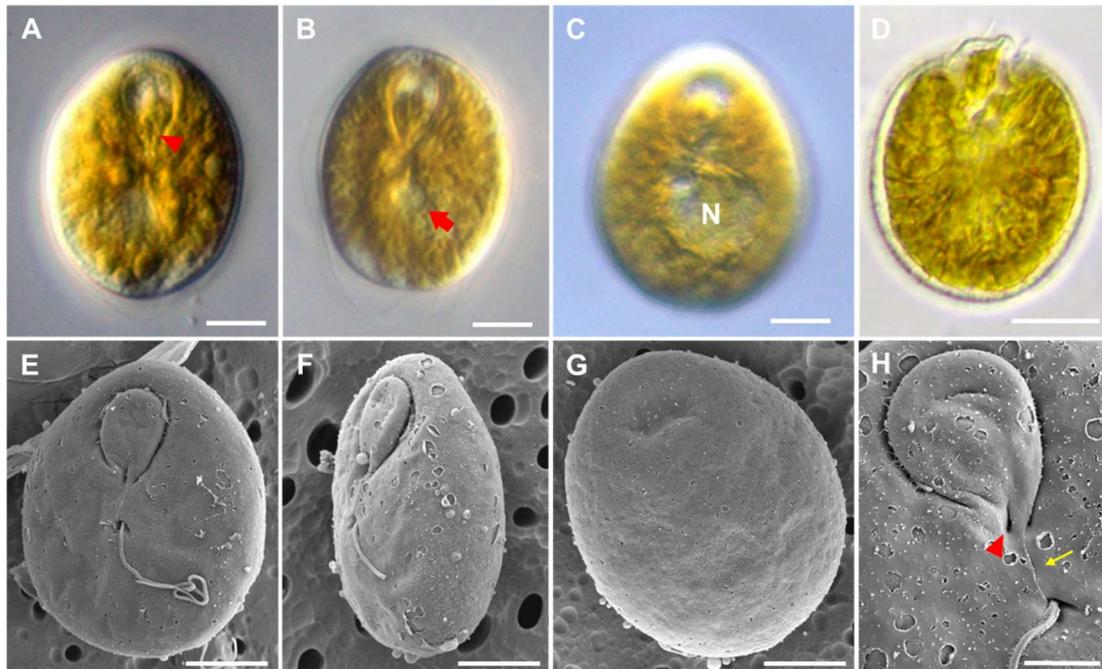
### 5.3.2. 형태적 특징

세포의 길이는 35.0 – 38.0  $\mu\text{m}$  (n = 10), 너비는 27.0 – 30.0  $\mu\text{m}$  (n = 10)이다. 세포의 길이 대 너비 비율은 약 1.3 이다. 세포는 배면에서 타원형이고 배등면으로 편평하다(Fig. 5.1). 하추는 크고 타원형이다(Fig. 5.1). 세포가 고착 상태일 때, 세포는 배면에서 편평하며, 등면에서 약간 볼록하다(Fig. 5.1F). 배면의 상추는 매우 작고 편평하며, 하추에 둘러싸여있다(Fig. 5.1 A, B, E, F, H). 또한, 상추는 상부가 넓고 하부로 갈수록 좁아지는 반전된 작은 물방울 형태이며, 비대칭이다(Fig. 5.1 A, E, H). 상추하부에는 짧은 apical groove 가 존재하며, 수직적으로 확장한다(Fig. 5.1 A, E, H). 횡구는 상추를 둘러싸지만 apical groove 가 위치하는 지점에서 횡구가 연결되지 않는다(Fig. 5.1 A, E, H). 핵은 원형이고 크며, 하추의 중앙에 위치한다(Fig. 5.1C). 횡구와 종구를 연결하는 짧고 곧은 ventral ridge 가 관찰되었다(Fig. 5.1H). 종구는 짧고 얇으며, antapex 에 도달하지 않고 세포의 중앙에 위치한다(Fig. 5.1 B, E). 광학현미경

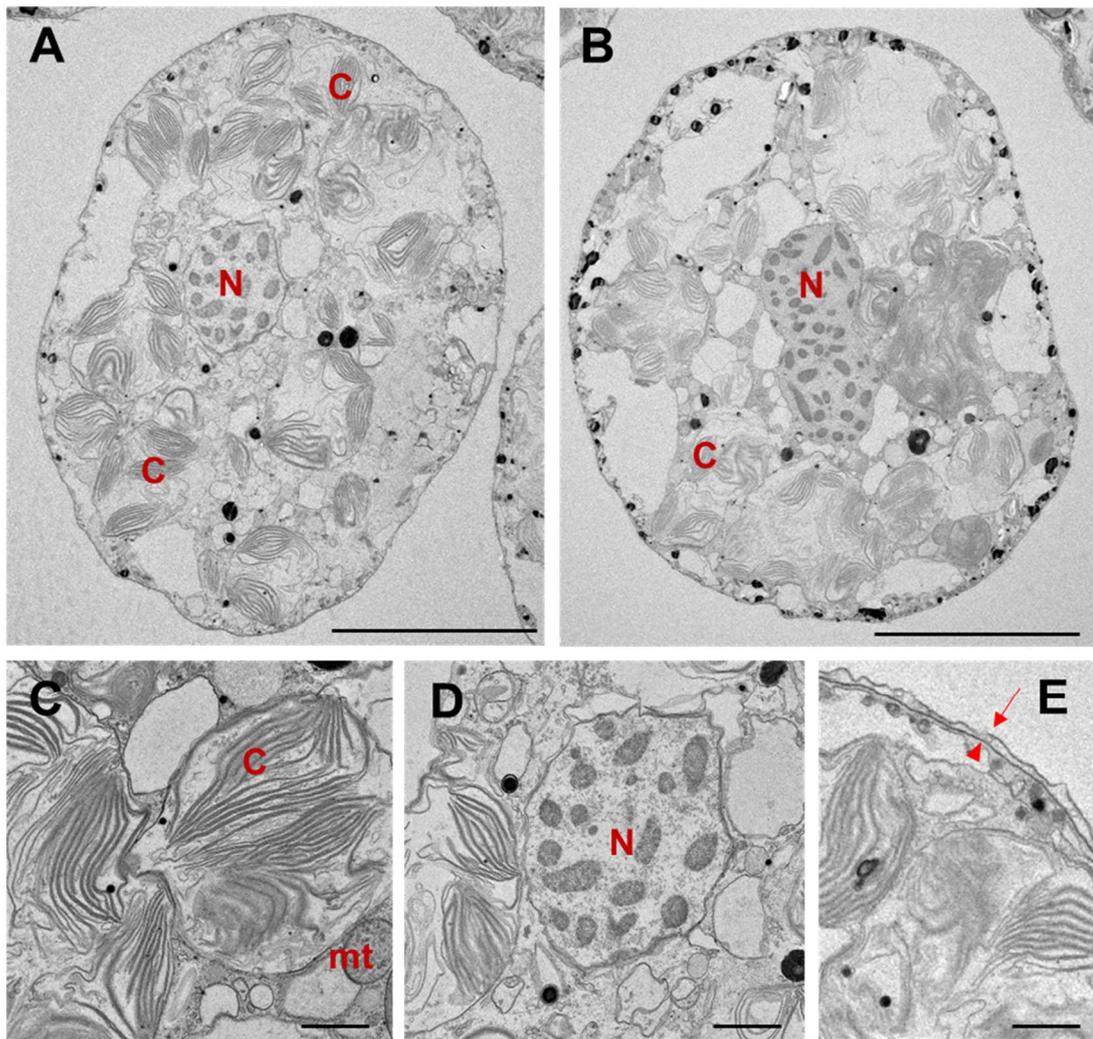
상에선 눈물방울 형태로 관찰된다(Fig. 5.1B). 종편모는 세포 중앙에서 삽입된다(Fig. 5.1E). Pyrenoid 는 광학현미경 상에서 관찰되지 않았다. 세포의 표면은 매끄러웠고(Fig. 5.1G), 구멍이 존재하며, 가끔 다각형의 amphiesmal pattern 이 관찰되었다.

세포는 2 가지 형태(고착 형태와 운동 형태)로 관찰되었으며(Fig. 5.1 A, D), 대부분 고착 형태의 세포가 우점하였다. 운동성 형태일 때, 세포는 타원형이고, 작고 왼쪽을 향하는 상추를 가지고 있다(Fig. 5.1D). hyaline layer 는 관찰되지 않았다.

투과전자현미경 관찰 결과, dinokaryotic 핵을 포함한 일반적인 초미세구조가 관찰되었다(Fig. 5.2). 엽록체는 세포 전체에 분포하고 있으며, (Fig. 5.2A, B). 또한, 전형적인 미토콘드리아가 관찰되었다(Fig. 5.2C). 핵은 세포의 많은 엽록체를 포함하고 있으며, 중앙에 위치하고 있다(Fig. 5.2 A, D). Amphiesmal layer 는 out amphiesmal vesicle membrane 과 inner amphiesmal vesicle membrane 이 관찰되었다(Fig. 5.2E). Pyrenoid 는 관찰되지 않았다.



**Figure 5.1.** Micrographs of *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov. (culture strain PJ-2003PS-01). A – D. Light micrographs. A. Ventral view showing apical groove (arrowhead). B. Ventral view showing teardrop sulcus (arrow). C. Ventral view showing the nucleus (N). D. Motile cell. E – H. Scanning electron micrographs. E. Ventral view. F. Left lateral view. G. Dorsal view. H. High-magnification of epicone. Apical groove (arrowhead) visible under the epicone. Ventral ridge connected the cingulum and the sulcus (arrow). Scale bars = 10  $\mu$ m (A – G) and 5  $\mu$ m (H).



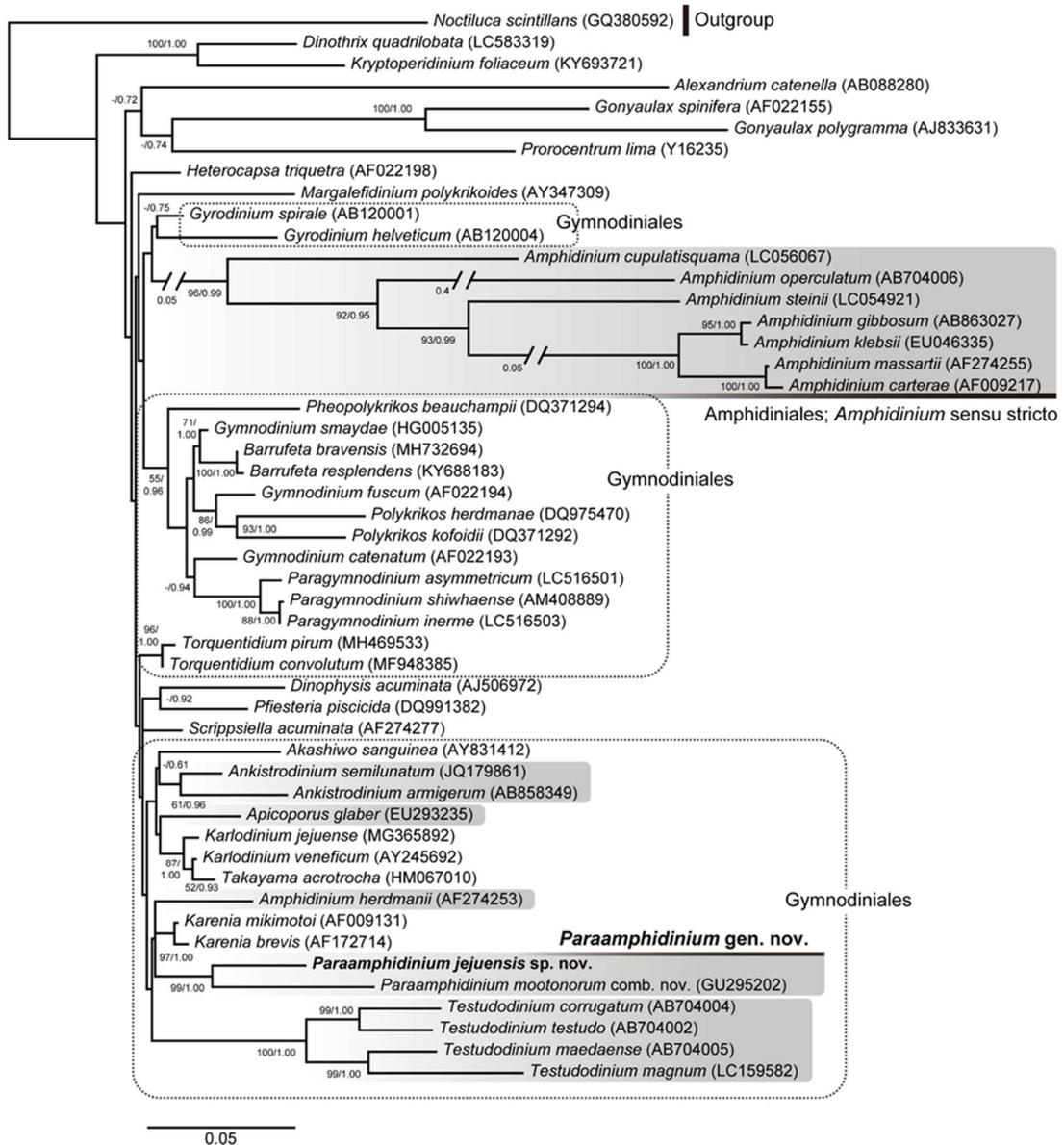
**Figure 5.2.** Transmission electron micrographs of *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov. (culture strain PJ-2003PS-01). A, B. Longitudinal section showing the nucleus (N) and the chloroplasts (C). C. High-magnification of the chloroplast and mitochondrion (mt). D. High-magnification of the nucleus (N). E. Detail of amphiesmal vesicles. The electron opaque layer (arrowhead) exists below the amphiesmal vesicles layer. Arrow is out amphiesmal vesicle membrane. Arrowhead is inner amphiesmal vesicle membrane Scale bar = 10  $\mu\text{m}$  (A and B) and 1  $\mu\text{m}$  (C – E).

### 5.3.3. 분자계통학적 분석

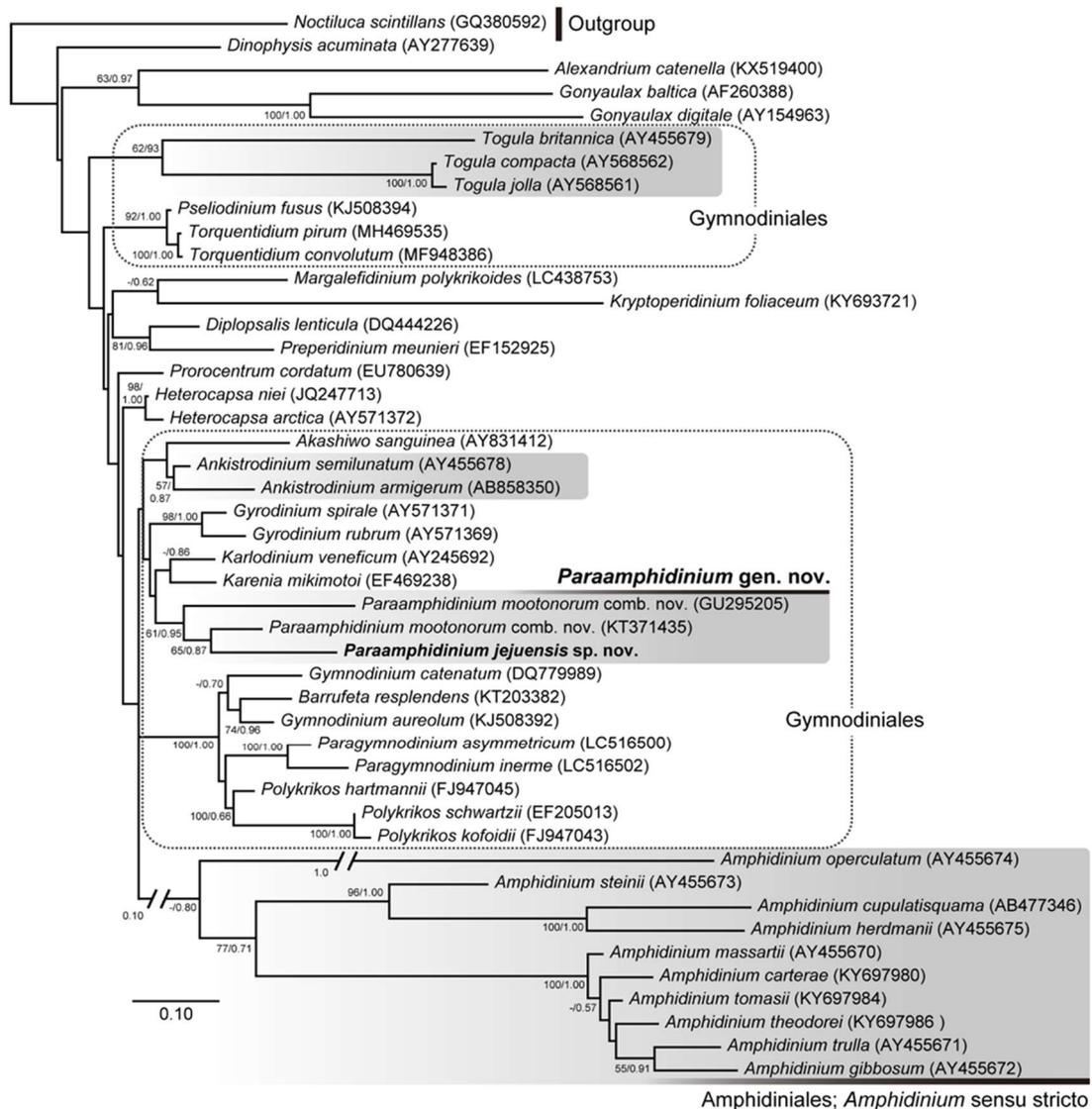
SSU rDNA 염기서열(1,777bp)의 유사도 분석 결과, 한국 배양주 PJ-2003PS-01 은 *Amphidinium mootonorum* (GU295202) (= *Paraamphidinium mootonorum*)과 93.4%의 유사도를 보였다. LSU rDNA 염기서열(907bp)의 유사도는 캐나다와 한국 배양주 *P. mootonorum* (GU295205, KT371435)과 각각 79.8%와 83.3%의 차이를 보였다.

우리의 염기서열을 포함하여 27 속 50 종의 SSU rDNA 서열과 25 속 45 종의 LSU rDNA 서열을 분석하였다. SSU rDNA 계통수에서 *P. jejuensis* 와 *P. mootonorum* 은 높은 지지도(99% BP, 1.00 PP)를 보이며 분기군을 형성하였다(Fig. 5.3). LSU rDNA 계통수도 높은 지지도(61% BP, 0.95 PP)를 보이는 분기군이 확인되었다(Fig. 5.4). 그러나, 자매 그룹과는 낮은 지지도를 보였다.

또한, Amphidinales 목과 Gymnodinales 목에 속하는 종들의 계통분류를 조사하였다(Fig. 5.3, 5.4). SSU rDNA 계통수는 Amphidinales 목의 분기군이 뚜렷하게 구분되었으며, *A. herdmanii* 와 *P. mootonorum* 이 *Amphidinium sensu stricto* 그룹과 분리되는 것을 보여주었다(Fig. 5.3). 그러나, LSU rDNA 계통수에서의 *A. herdmanii* 는 *Amphidinium sensu stricto* 분기군에 속하였다(Fig. 5.4).



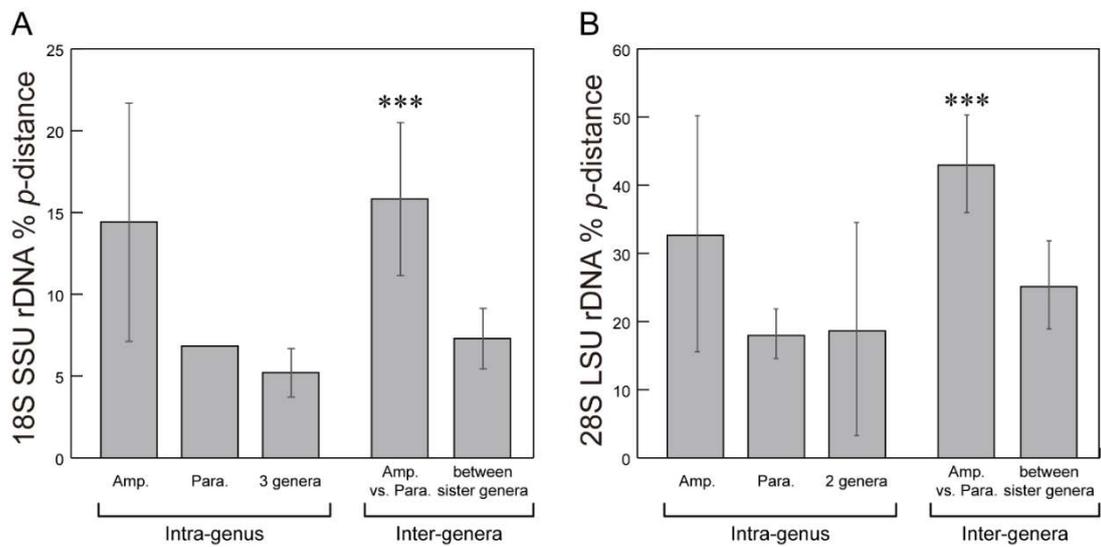
**Figure 5.3.** Maximum likelihood tree of *Paraamphidinium* gen. nov. using SSU rDNA sequences. Additional Bayesian (BI) analysis generated similar topology of the ML tree, and thus its Posterior probabilities (PP) were incorporated into the tree. The first and second numbers at the nodes display BP (> 50%) in ML and posterior probabilities (PP; > 0.50) in Bayesian analysis, respectively. Branch lengths are proportional to the scale given. Sequence from the genus *Amphidinium* in past and present are highlighted. Species and genus in bold represents our sequence. Scale bar = 0.05 nucleotide substitutions per site.



**Figure 5.4.** Maximum likelihood tree of *Paraamphidinium* gen. nov. using LSU rDNA sequences. Additional Bayesian (BI) analysis generated similar topology of the ML tree, and thus its Posterior probabilities (PP) were incorporated into the tree. The first and second numbers at the nodes display BP (> 50%) in ML and posterior probabilities (PP; > 0.50) in Bayesian analysis, respectively. Branch lengths are proportional to the scale given. Sequence from the genus *Amphidinium* in past and present are highlighted. Species and genus in bold represent our sequence. Scale bar = 0.05 nucleotide substitutions per site.

#### 5.3.4. *Amphidinium* 종들 간의 SSU 및 LSU rDNA 염기서열의 유전적 차이

*Amphidinium*, *Paraamphidinium*, *Ankistrodinium*, *Apicoporus*, *Testudodinium*, *Togula* 속의 SSU 및 LSU rDNA 차이는 Kimura 2-parameter 모델로 계산한 %p-distance로 비교되었다(Fig. 5.5). 각 속에 속하는 종간의 유전적 차이를 비교한 결과, *Amphidinium* 속의 SSU 및 LSU rDNA 유전적 차이가 가장 높았다(Fig. 5.5). *Amphidinium*과 *Paraamphidinium* 속 사이의 % p-distance 점수는 *Amphidinium* 속 내 p-distance 점수보다 더 높은 값을 보여줬다(Fig. 5.5). 또한, 속 간의 % p-distance 점수는 더 큰 차이를 보였다. 예를 들어, SSU rDNA 분석 결과, *Amphidinium* 속과 *Paraamphidinium* 속 사이에서는 15.83 (SD = 4.67, N = 16), *Paraamphidinium* 속과 자매 속 사이에서는 7.30 (SD = 1.85, N= 20)의 측정값을 얻었다. LSU rDNA 분석에서는 *Amphidinium* 속과 *Paraamphidinium* 속 사이의 측정값은 42.93 (SD = 7.71, N = 30), *Paraamphidinium* 속과 자매 속 사이의 측정값은 25.13 (SD = 6.46, N = 11)으로 나타났다. 속 간 점수 차이는 통계적으로 유의하였다(t-test,  $P < 0.001$ ) (Fig. 5.5).



**Figure 5.5.** Nucleotide divergences of the dinoflagellates SSU rDNA and LSU rDNA sequences based on corrected pairwise genetic distance ( $p$ -distance), including *Paraamphidinium* gen. nov. Genetic distances between each paired sequence were calculated by Kimura 2-parameter model. Bar heights indicate %  $p$ -distance measured for intra-genera [e.g., *Amphidinium* (Amp.), *Paraamphidinium* (Para.), 3 genera including *Ankistrodinium* (An.), *Apicoporus* (Ap.) and *Testudodinium* (Te.) in SSU rDNA analysis and 2 genera including An., and *Togula* (To.) in LSU rDNA analysis] and inter-genera [e.g., Amp. vs. Para. and between sister genera, including An. vs Ap., An. vs Te., Ap. vs Te. in SSU rDNA analysis and An. vs To., An. vs Ap., To. vs Ap. in LSU rDNA analysis]. The values are shown as mean  $\pm$ SD (Standard Deviation). Statistical analysis showed that the Nucleotide divergence were significantly higher in Amp. vs. Para. than that calculated between tested sister genera (t-test, \*\*\*  $P < 0.001$ ,  $N = 36$  in 18S analysis and  $N = 41$  in 28S analysis).

## 5.4. 토의

2020년 3월 표선 해변에서 분리된 저서와편모조류 배양주 PS-2003PS-01은 본 연구에서 신속 *Paraamphidinium* gen. nov.의 새로운 종인 *P. jejuensis*로 기술되었다. 대부분의 형태적 특징이 *Amphidinium mootonorum* (= *Paraamphidinium mootonorum*)과 유사하였고, 운동 상태일 때는 *Amphidinium sensu stricto* 의 주요 형태적 특징인 왼쪽으로 향하는 작은 상추가 관찰되었으며, 고착 상태일 때는 *Testudodinium* 속의 형태적 특징과 유사하였으므로 각 종의 형태적 특징을 비교하였다(Table 5.2).

먼저, *Paraamphidinium mootonorum*으로 재명명된 *Amphidinium mootonorum*은 국내에는 2013년에 처음으로 보고되었다(Shah et al. 2013). 한국 배양주 *A. mootonorum*은 제주에서 발견되었으며, 기존 문헌에 기재된 *A. mootonorum*과 동일한 형태적 특징을 가졌다. 이러한 *P. mootonorum*은 *P. jejuensis*와 유사한 형태를 가지고 있다(Table 5.2). 예를 들어, 세포가 고착 상태일 때, 상부가 넓고 하부로 갈수록 좁아지는 상추가 하추에 둘러싸이며, 작고 짧은 apical groove가 상추 하부에 위치하고 수직적으로 확장된다(Table 5.2). 종구는 눈물방울 형태를 보이며, 핵은 세포 중앙에 위치하고, pyrenoid는 관찰되지 않는다(Table 5.2). 그러나 표선 해변 배양주 *P. jejuensis*와 *P. mootonorum*은 상추 종구의 위치와 핵의 모양으로 구별된다(Table 5.2).

*Paraamphidinium* 속은 *Testudodinium* 종의 세포가 고착 상태일 때, 상추가 하추에 둘러싸이는 형태적 특징이 유사하다(Fig. 5.6). 그러나, *Testudodinium*의 주요 형태적 특징인 상추에 존재하는 longitudinal furrow가 *Paraamphidinium* 속에선 관찰되지 않았고, pyrenoid도 관찰되지 않았다(Table 5.2, Fig. 5.6).

반대로 *Testudodinium* 속에선 *Paraamphidinium*과 핵의 위치에서 차이를 보였다(Table 5.2).

*Amphidinium herdmani*는 *A. mootonorum*과 *Amphidinium* sensu stricto로 분류되었고, *A. mootonorum*이 운동 상태 일 때, 상추의 형태가 유사하고 apical groove과 관찰되는 유사한 형태적 특징 있으나, *Paraamphidinium* 속과 세포의 크기, 하추의 하부의 모양, 고착 상태 세포의 유무, 종구의 위치, pyrenoid의 유무 등 형태적 차이로 구별되었다(Table 5.2).

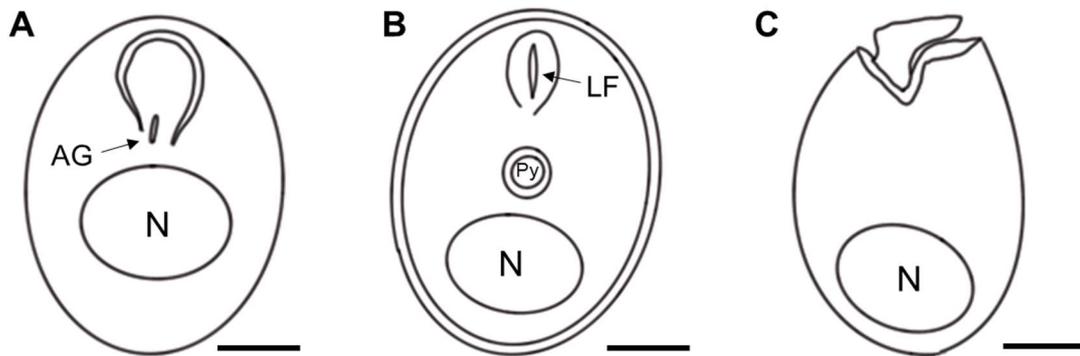
*Amphidinium operculatum*은 *Amphidinium*의 기준종이고, *Amphidinium* sensu stricto에 속한다. *Paraamphidinium*의 운동 상태 세포와 비교하였을 때, 왼쪽으로 향하는 작은 상추를 가진 특징이 유사하지만, 고착 상태의 세포가 존재하지 않고, 핵의 위치, 종구의 위치에서 형태적으로 차이를 보였다(Table 5.2, Fig. 5.6).

따라서, 형태학적으로 *Paraamphidinium*은 *Testudodinium* 및 *Amphidinium*과 구별됨을 확인하고, 이러한 형태학적 차이를 통해 신속으로 분리할 수 있음을 보여준다.

**Table 5.2.** Comparison of the morphological characteristics of *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov., *Paraamphidinium mootonorum* comb. nov., *Testudodinium* and *Amphidinium* species.

Character	<i>Paraamphidinium jejuensis</i>	<i>P. mootonorum</i> Korea <sup>1</sup>	<i>P. mootonorum</i> <sup>2</sup>	<i>Testudodinium corrugatum</i> <sup>3</sup>	<i>T. maedaense</i> <sup>3</sup>	<i>T. magnum</i> <sup>4</sup>	<i>T. testudo</i> <sup>3</sup>	<i>Amphidinium herdmannii</i> <sup>5</sup>	<i>A. operculatum</i> <sup>6</sup>
Length (L, μm)	35.0 – 38.0	38.0 – 52.0	30.0 – 50.0	25.0 – 32.5 (29.3)	20.0 – 27.5 (24.8)	37.5 – 55.0 (45.6)	27.5 – 35.0 (30.8)	20.0 - 31.0	29.0 - 50.0
Width (W, μm)	27.0 – 30.0	28.0 – 42.0	24.0 – 44.0	15.0 – 25.0 (22.7)	15.0 – 20.0 (16.6)	27.5 – 52.5 (43.0)	20.0 – 27.5 (22.5)	15.0 - 25.0	21.0 - 28.0
Cell shape	Oval	Oval	Oval	Oval or circular	Oval	Subcircular	Oval	Ovoid or Round	Ovoid or ellipsoidal
Embedded epicone	Yes	Yes	NA	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
Presence of pyrenoids	No	NA	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Apical groove / longitudinal furrow	Apical groove	NA	Apical groove	Longitudinal furrow	Longitudinal furrow	Longitudinal furrow	Longitudinal furrow	Apical groove	NA
Position of sulcus	Center of cell	NA	0.7 of cell length	Center of cell	Center of cell	Faint sulcus	One-third of cell length	Below end of the cingulum	Lower one-third of the cell
Shape of sulcus (LM)	Tear drop	Tear drop	Tear drop	–	–	–	–	–	–
Position of nucleus	Center of the hypocone	Center of the hypocone	Center of the hypocone	Posterior end	Posterior end	Posterior end	Posterior end	Posterior	Posterior end
Shape of nucleus	Circular	Elongate oval	Elongate oval	NA	NA	Kidney shape	NA	Crescent	Crescent or oval
Sessile cells	Yes	NA	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No

NA; not available; <sup>1</sup>MShah et al. 2013; <sup>2</sup>Murray and Patterson 2002; <sup>3</sup>Horiguchi et al. 2012; <sup>4</sup>Pinto et al. 2017; <sup>5</sup>Murray et al. 2004; <sup>6</sup>Lee et al. 2013



**Figure 5.6.** Line drawing of *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov., Genus *Testudodinium*, *Amphidinium operculatum*. A. *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov. There is an apical groove (AG) at the posterior end of epicone. The nucleus (N) is located in the center of the hypocone. B. Genus *Testudodinium*. Longitudinal furrow (LF) is located in the epitheca. Pyrenoid (Py) is located in the center of cell. The nucleus is located in the posterior part of the hypocone. C. *Amphidinium operculatum*. The epicone is deflected to the left. The nucleus is located in the posterior part of the hypocone. (N; nucleus, VR; ventral ridge, Py; pyrenoid). Scale bars = 10  $\mu$ m.

본 연구에서 SSU와 LSU rDNA 계통수는 *Amphidinium* sensu stricto와 *Amphidinium* sensu lato, *Paraamphidinium* 속을 포함한 관련 분류군의 관계를 설명하였다. 예를 들어, *Amphidinium* sensu lato에 속하는 *Ankistrodinium*, *Apicoporus*, *Togula* 속은 뚜렷한 분기군을 보였고, *Amphidinium* 속과 명확하게 분리되었다(Fig. 5.3, Fig. 5.4).

*P. jejuensis*와 *P. mootonorum*는 매우 작고 왼쪽으로 향하는 상추가 관찰되며, 이는 *Amphidinium* sensu stricto의 형태적 정의에 속한다(Flø Jørgensen et al. 2004b). 그러나, 계통수에서 *Amphidinium* sensu stricto와 유전적으로 먼 유연관계를 보였다(Fig. 5.3, 5.4). 과거 연구에서 *A. corrugatum*, *A. testudo*, *A. mootonorum*은 형태적 특징과 분기적 분석에 의해 *Amphidinium* sensu stricto로 분류되었다(Flø Jørgensen et al. 2004b). 하지만 *Testudodinium* 속에 대한 최근 연구는 *Amphidinium* sensu stricto과의 유전적 변이를 드러냈고, 몇몇 종에 대한 재조사를 필요로 했다(Horiguchi et al. 2012). 이전 연구와 *Testudodinium*과 *Paraamphidinium*의 단일 계통 branch는 이들이 유전적으로 서로 분리되어 있음을 시사한다(Fig. 5.3).

LSU rDNA 계통수에서 *Paraamphidinium* 속의 계통은 SSU rDNA 계통수의 지지도보다 낮은 지지도를 보였다. 그러나, *Ankistrodinium*과 *Paraamphidinium*속 사이의 유사한 bootstrap 값과 % p-distance 분석은 *P. jejuensis*와 *P. mootonorum*이 동일한 속으로 분기군을 형성할 수 있음을 보여준다(Fig. 5.4, Fig. 5.5). 반면에, *A. herdmanii*는 *Paraamphidinium*과 분기군을 형성하지 않았으며, LSU rDNA 계통수에서는 *Amphidinium* sensu stricto와 분기군을 형성하였다(Fig. 5.4). *A. herdmanii*의 서로 다른 branch topology가 가능한 이유는 두 계통수에서 분석된 염기서열이 서로 다른

배양주에서 얻어져 분자적 특성의 차이를 보이기 때문이다.

이전 연구에서 *A. herdmanii*와 *A. mootonorum*의 계통분류학적 관계는 뚜렷하게 구분되지 않았다(Flø Jørgensen et al. 2004, Karafas et al. 2017). 예를 들어, 배양주 *A. herdmanii* K-0655 (AY455675)와 배양주 *A. mootonorum* K-0656 (AY455676)은 같은 분기군을 형성하였다(Karafas et al. 2017). 그러나 본 연구에서 배양주 *A. mootonorum* AmDH2(KT371435)와 캐나다 배양주 (GU295205)는 *A. herdmanii*와 같은 분기군을 형성하지 않는다. 종구의 형태, pyrenoid의 부재 등의 형태적 특징을 고려할 때, *A. mootonorum*의 유전적 특징은 *A. herdmanii*보다 *P. jejuensis*에 더 가까워야 한다. 따라서, 한국 배양주와 캐나다 배양주가 *A. mootonorum*으로 간주하였고, 배양주 K-0656은 LSU rDNA 계통수에서 제외하였다.

본 연구는 2020년 3월 제주 표선 해변에서 출현한 저서와편모조류의 형태 및 계통분류학적 특성을 분석하였다. 형태학적 분석 결과, 표선 해변에서 배양된 미동정 저서와편모조류는 형태적으로 가장 유사한 *Testudodinium*과 구별되는 sulcus의 형태와 pyrenoid의 부재 등의 형태적 특징이 관찰되었고, *Amphidinium mootonorum*에서도 같은 특징이 관찰되었다. 분자계통학적 분석 결과, 표선 해변 배양주와 *A. mootonorum* 그룹은 *Testudodinium* 속과 *Amphidinium sensu stricto*와는 분리된 독립적인 분기군을 형성하였다. 결과적으로, 신속 *Paraamphidinium* gen. nov.을 설립하고, 제주 표선 해변에서 발견된 저서와편모조류를 신종 *Paraamphidinium jejuensis* sp. nov.로 명명하며, *A. mootonorum*을 *Paraamphidinium mootonorum* comb. nov.로 이속할 것을 제안한다.

## 6. 결론

본 연구에서 2017년부터 2021년까지 제주 사질 조간대에서 출현하는 저서외편모조류 총 12속 22종을 분리 및 배양하였고, 국내 미기록종 3종, 신속/신종 1종, 미동정 종 10종을 광학현미경으로 관찰하였다. 그 중 4종의 배양주를 현미경을 사용한 형태학적 분석과 SSU, ITS, LSU rDNA를 활용한 분자계통학적 분석을 수행하였다. *Heterocapsa horiguchii*와 *H. pseudotriquetra*의 형태 및 계통분류학적 특징을 기재하였다. *Amphidinium*의 경우, *A. fijiense*의 형태 및 계통분류학적 특징을 기재하고, *Amphidinium sensu stricto*의 형태분류학적 정보를 요약하여 제공하였다. 또한, 춘계와 하계에서 사질 조간대에 서식하는 저서외편모조류의 출현 및 분포를 확인하기 위해, 2022년 3월부터 8월까지 표선 해변에서 조사를 진행하였다. 저서 미세조류의 현존량은 춘계에서 하계로 갈수록 점차 증가하는 추세를 보였다. 전체적으로 저서 규조류 점유율이 가장 높았으며, 정점 2에서 높은 현존량을 보였다. 통계분석 결과, 저서 미세조류의 현존량 변화가 수온의 변화와 높은 상관성을 보였다. 저서외편모조류는 조간대 상부보다 조간대 하부에서 종다양성이 높았다. 춘계와 하계에 저서외편모조류는 23속 48종이 출현하였고, 그 중 국내 미기록종 8종, 잠재독성종 4종, 미동정종 18종이 출현하였으며, 잠재독성종의 출현은 인체 건강에 대한 잠재적인 위험성을 보여줄 수 있다. 이러한 결과에서 저서외편모조류의 시공간적 분포는 수온의 영향을 받을 수 있으며, 지속적인 모니터링이 필요하다. 본 연구를 통해, 제주도 고유 생물자원을 확보하고 제주도 사질 조간대에 서식하는 저서외편모조류의 생물다양성 파악 및 저서 생태계의 연구를 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료된다.

표선 해변에서의 저서 미세조류 현존량은 정점 2 에서 다른 정점에 비해 높았으며, 이는 정점 2 근처에 존재하는 담수의 유입이 있는 수로로 인한 영향으로 추측된다. 이를 확인하기 위하여 조간대 상부의 수로에서 채집한 시료의 영양염 분석이 추가되어야 한다. 저서와편모조류의 경우, 조간대 상부보다 조간대 하부에서 현존량 및 종다양성이 높았다. 그러나, 6 월에 경우 조간대 중부가 더 높은 현존량과 종다양성을 보였고, 혼합영양생물인 *Ankistrodinium semilunatum* 과 *Katodinium asymmetricum* 의 현존량이 6 월에 가장 많았다. 외편모조류는 섭식되는 박테리아에도 영향을 받기 때문에 박테리아 정량분석이 추가적으로 진행되어야 한다. 그리고, 조간대 상부, 중부, 하부에 따른 저서 미세조류의 현존량 차이를 이해하기 위한 함수율 분석과 퇴적물 온도 측정도 추가적으로 연구되어야 한다.

제주 사질 조간대에서 분리 및 배양된 *H. horiguchii* 와 *H. pseudotriquetra* 는 기존에 이번연구에서 처음으로 저서에서 발견되었다. 사전 연구를 통해 두 종이 모래 간극에서의 이동성과 생존 가능성을 확인하였지만, 실제 저서 생태계에 서식하는지를 확인하기 위하여 생리적 연구를 추가적으로 진행되어야 한다.

## Reference

- Aligizaki, K., Nikolaidis, G. and Fraga, S. 2008. Is *Gambierdiscus* expanding to new area? Harmful Algae News, 36: 6 – 7.
- Almazán–Becerril, A., Escobar–Morales, S., Rosiles–González, G. and Valadez, F. 2015. Benthic–epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System. Botanica marina, 58: 115 – 128.
- Al Muftah, A., Selwood, A.I., Foss, A.J., Al Jabri, H.M.S.J., Potts, M. and Yilmaz, M. 2016. Algal toxins and producers in the marine waters of Qater, Arabian Gulf. Toxicon, 122: 54 – 66.
- Azovsky, A., Saburova, M., Tikhonenkov, D., Khazanova, K., Esaulov, A. and Mazei, Y. 2013. Composition, diversity and distribution of microbenthos across the intertidal zones of Ryazhkov Island (the White Sea). European Journal of Protistology, 49: 500 – 515.
- Baek, S.H. 2012a. Frist record for appearance and distribution patterns of the epiphytic dinoflagellates in the Korean peninsula. Korean Journal of Environmental Biology, 30: 355 – 361.
- Baek, S.H. 2012b. Occurrence of the toxic benthic dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. in the uninhabited Baekdo Islands off southern coast and Seopsum Island in the Vicinity of Seogwipo, Jeju Province, Korea. Ocean and Polar Research, 34: 65 – 71.
- Benico, G., Lum, W.M., Takahashi, K., Yñiguez, A.T. and Iwataki, M. 2021. Thecal tabulation, body scale morphology and phylogeny of *Heterocapsa philippinensis* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae) from Philippines. European Journal of Protistology, 80: 125811.
- Besada, E.G., Loeblich, L.A. and Loeblich, A.R. III. 1982. Observations on

- tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera–endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science*, 32: 723 – 735.
- Borchhardt, N., Chomérat, N., Bilien, G., Zentz, F., Rhodes, L., Murray, S.A. and Hoppenrath, M. Morphology and molecular phylogeny of *Bindiferia* gen. nov. (Dinophyceae), a new marine, sand–dwelling dinoflagellate genus formerly classified within *Amphidinium*. *Phycologia*, DOI: 10.1080/00318884.2021.1978040.
- Caillaud, A., de La Iglesia, P., Campás, M., Elandaloussi, L., Fernández, M., Mohammad–Noor, N., Andree, K. and Diogène, J. 2010. Evidence of okadaic acid production in a cultured strain of the marine dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum* from Malaysia. *Toxicon*, 55: 633 – 637.
- Calado, A.J. and Moestrup, Ø. 2005. On the freshwater dinoflagellates presently included in the genus *Amphidinium*, with a description of *Prosoaulax* gen. nov. *Phycologia*, 44: 112–119.
- Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 540 – 552.
- Cho, S.Y., Ki, J.S. and Han, M.S. 2008. Morphological characteristics and molecular phylogeny of five unarmored dinoflagellates in Korean coastal waters. *Algae*, 23: 15 – 29.
- Choi, H and Kim, S. 2021. *Heterocapsa busanensis* sp. nov. (Peridiniales, Dinophyceae): A new marine thecate dinoflagellate from Korean coastal waters. *European Journal of Protistology*, 79: 1 – 12. (125797?)
- Claparède, E. and Lachmann, J. 1859. Études sur les infusoires et les rhizopodes. *Mémoires de l' Institut National Genevois* 6: 261 – 482.
- Cyronak, T.J. 2007. A comparative morphological, phylogenetic, and Autecological study of new *Amphidinium* species of dinoflagellate.

- Biology and Marine Biology Master's of Science Thesis. University of North Carolina, Wilmington, pp. 56.
- 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.
- Dodge, J.D. 1981. Three new generic names in the Dinophyceae: *Herdmania*, *Sclerodinium* and *Triadinium* to replace *Heteraulacus* and *Goniodoma*. *British Phycological Journal*, 16: 273 – 280.
- Dodge, J.D. 1982. Marine Dinoflagellates of the British Isles. Her Majesty's Stationery Office, London, U.K.
- Dolapsakis, N.P. and Economou–Amilli, A. 2009. A new marine species of *Amphidinium* (Dinophyceae) from Thermaikos Gulf, Greece. *Acta Protozoologica*, 48: 153 – 170.
- Edwardsen, B., Shalchian–Tabrizi, K., Jakobsen, K.S., Medlin, L.K., Dahl, E., Brubak, S. and Paasche, E. 2003. Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *Journal of Phycology*, 39: 395 – 408.
- Ellegaard, M., Daugbjerg, N., Rochon, A. Lewis, J. and Harding, I. 2003. Morphological and LSU rDNA sequence variation within the *Gonyaulax spinifera*–*Spiniferites* group (Dinophyceae) and proposal of *G. elongata* comb. nov. and *G. membranacea* comb. nov. *Phycologia*, 42: 151 – 164.
- Flø Jørgensen M., Murray, S. and Daugbjerg, N. 2004b. *Amphidinium* revisited. I. Redefinition of *Amphidinium* (Dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 40: 351 – 365.
- Flø Jørgensen, M., Murray, S., and Daugbjerg, N. 2004a. A new genus of athecate interstitial dinoflagellates, *Togula* gen. nov., previously

- encompassed within *Amphidinium* sensu lato: Inferred from light and electron microscopy and phylogenetic analyses of partial large subunit ribosomal DNA sequences. *Phycological Research*, 52: 284 – 299.
- Fukuyo, Y. 1981. Taxonomic study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs. *Bulletin of the Japanese Society of the Science of Fisheries*, 47: 967 – 978.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heinzen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H. and Muir, A.J. 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment–induced viral clearance. *Nature*, 461: 399 – 401.
- Gómez, F. and Artigas, L.F. 2014. High diversity of dinoflagellates in the intertidal sandy sediments of Wimereux (North–East English Channel, France). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 94: 443 – 457.
- Gottschling, M., Carbonell–Moore, M.C., Mertens, K.N., Kirsch, M., Elbrächter, M. and Tillmann, U. 2021. *Fensomea setacea*, gen. & sp. nov. (Cladopyxidaceae, Dinophyceae), is neither gonyaulacoid nor peridinioid as inferred from morphological and molecular data. *Scientific reports*, 11: 1 – 14.
- Gribble, K.E. and Anderson, D.M. 2006. Molecular phylogeny of the heterotrophic dinoflagellates, *Protoperidinium*, *Diplopsalis* and *Preperidinium* (Dinophyceae), inferred from large subunit rDNA. *Journal of Phycology*, 42: 1081 – 1095.
- Gribble, K.E. and Anderson, D.M. 2007. High intraindividual, intraspecific, and interspecific variability in large–subunit ribosomal DNA in the heterotrophic dinoflagellates *Protoperidinium*, *Diplopsalis* and *Preperidinium* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 46: 315 – 324.
- Grzebyk, D., Sako, Y. and Berland, B. 1998. Phylogenetic analysis of nine

- species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. *Journal of Phycology*, 34: 1055 – 1068.
- Gu, H., Luo, Z., Mertens, K.N., Price, A.M., Turner, R.E. and Rabalais, N.N. 2015. Cyst–motile stage relationship, morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of gymnodinioid dinoflagellate *Barrufeta resplendens* comb. nov., formerly known as *Gyrodinium resplendens*, isolated from the Gulf of Mexico. *Journal of Phycology*, 51: 990 – 999.
- Guiry, M.D. and Guiry, G.M. 2022. AlgaeBase. World–wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 03 November 2022.
- Hackett, J.D., Anderson, D.M., Erdner, D.L. and Bhattacharya, D. 2004. Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *American Journal of Botany*, 91: 1523 – 1534.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposia Series*, 41: 95 – 98.
- Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32: 79 – 99.
- Han, I.S. and Lee, J.S. 2020. Change the annual amplitude of sea surface temperature due to climate change in a recent decade around the Korean Peninsula. *Journal of the Korean Society of Marine Environment*, 26: 233 – 241.
- Han, M.S. and Yoo, K.I. 1983. A taxonomical study on the dinoflagellates in Chinhae Bay II. Peridinales. *Bull. KORDI*, 5: 49 – 67.
- Handy, S.M., Bachvaroff, T.R., Timme, B.R., Wayne Coats, D., Kim, S. and Dewiche, C.F. 2009. Phylogeny of four dinophysacean genera

- (Dinophyceae, Dinophysiales) based on rDNA sequences from single cells and environmental samples. *Journal of phycology*, 45: 1163 – 1174.
- Hansen, G. 1995. Analysis of the thecal plate pattern in the dinoflagellate *Heterocapsa rotundata* (Lohmann) comb. nov. (= *Katodinium rotundatum* (Lohmann) Loeblich). *Phycologia*, 34: 166 – 170.
- 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.
- Hart, M.C., Green, D.H., Bresnan, E. and Bolch, C.J. 2007. Large subunit ribosomal RNA gene variation and sequence heterogeneity of *Dinophysis* (Dinophyceae) species from Scottish coastal waters. *Harmful Algae*, 6: 271 – 287.
- Henrichs, D.W., Sosik, H.M., Olson, R.J. and Campbell, L. 2011. Phylogenetic analysis of *Brachidinium capitatum* (Dinophyceae) from the Gulf of Mexico indicates membership in the Kareniaceae. *Journal of Phycology*, 47: 366 – 374.
- Herdman, E.M. and Sweeney, B.M. 1976. *Cachonina illdefina* sp. nov. (Dinophyceae): chloroplast tubules and degeneration of the pyrenoid. *Journal of Phycology*, 12: 198 – 205.
- Hoppenrath, M. 2000. Morphology and taxonomy of six marine sand-dwelling *Amphidiniopsis* species (Dinophyceae, Peridinales), four of them new, from the German Bight, North Sea. *Phycologia*, 39: 482 – 497.
- Hoppenrath, M., Bachvaroff, T.R., Handy, S.M., Delwiche, C.F. and Leander, B.S. 2009. Molecular phylogeny of ocelloid-bearing dinoflagellates (Warnowiaceae) as inferred from SSU and LSU rDNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 1 – 15.
- Hoppenrath, M. and Leander, B.S. 2007a. Character evolution in polykrikoid

- dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 43: 366 – 377.
- Hoppenrath, M. and Leander, B.S. 2007b. Morphology and phylogeny of the pseudocolonial dinoflagellates *Polykrikos lebourae* and *Polykrikos herdmanae* n. sp. *Protist*, 158: 209 – 227.
- Hoppenrath, M. and Leander, B.S. 2010. Dinoflagellate phylogeny as inferred from heat shock protein 90 and ribosomal gene sequences. *PloS One*, 5: e13220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013220>
- Hoppenrath, M., Murray, S., Sparmann, S.F. and Leander, B.S. 2012. Morphology and molecular phylogeny of *Ankistrodinium* gen. nov. (Dinophyceae), a new genus of marine sand-dwelling dinoflagellates formerly classified within *Amphidinium*. *Journal of Phycology* 48: 1143 – 1152.
- Hoppenrath, M., Reñé, A., Satta, C.T., Yamaguchi, A. and Selina, M.S. 2021. Molecular phylogeny and morphology of *Carinadinium* gen. nov. (Dinophyceae, Gonyaulacales), including marine sand-dwelling dinoflagellate species formerly classified within *Thecadinium*. *European Journal of Protistology*, 81: 125835.
- Hoppenrath, M., Shauna, A.M., Chomérat, N. and Horiguchi, T. 2014. Marine Benthic Dinoflagellates—Unveiling Their Worldwide Biodiversity. Vol. 54. Kleine Senckenberg Reihe, Germany.
- Horiguchi, T. 1995. *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae): a new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycological Research*, 43: 129 –136.
- Horiguchi, T. 1997. *Heterocapsa arctica* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae), a new marine dinoflagellate from the arctic. *Phycologia*, 36: 129 – 136.
- Horiguchi, T., Tamura, M., Katsumata, K. and Yamaguchi, A. 2012. *Testudodinium* gen. nov. (Dinophyceae), a new genus of sand-dwelling dinoflagellates formerly classified in the genus *Amphidinium*.

- Phycological Research 60: 137 – 149.
- Hu, Z., Deng, Y., Luo, Z., Shang, L., Kong, F., Gu, H., Zhao, Z. and Tang, Y.Z. 2020. Characterization of the unarmored dinoflagellate *Pseliodinium pirum* (Ceratoperidiniaceae) from Jiaozhou Bay, China. Phycological Research, 68: 3 – 13.
- Hwang, B.S., Yoon, E.Y., Jeong, E.J., Park, J., Kim, E.H. and Rho, J.R. 2018. Determination of the absolute configuration of polyhydroxy compound ostreol B isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. The Journal of Organic Chemistry, 83:194 – 202.
- Iwataki, M. 2008. Taxonomy and identification of the armored dinoflagellate genus *Heterocapsa* (Peridinales, Dinophyceae). Plankton and Benthos Research, 3: 135 – 142.
- Iwataki, M., Botes, L., Sawaguchi, T., Sekiguchi, K. and Fukuyo, Y. 2003. Cellular and body scale structure of *Heterocapsa ovata* sp. nov. and *Heterocapsa orientalis* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae). Phycologia, 42: 529 – 637.
- Iwataki, M., Hansen, G., Sawaguchi, T., Hiroishi, S. and Fukuyo, Y. 2004. Investigations of body scales in twelve *Heterocapsa* species (Peridinales, Dinophyceae), including a new species *Heterocapsa pseudotriquetra* sp. nov. Phycologia, 43: 394 – 403.
- Iwataki, M., Kawami, H., Van Nguyen, N., Luong, Q.D., Ton, T.P., Fukuyo, Y. and Matsuoka, K. 2009. Cellular and body scale morphology of *Heterocapsa huensis* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae) found in Hue, Vietnam. 2009. Phycological Research, 57: 87 – 93.
- Iwataki, M., Takayama, H., Matsuoka, K. and Fukuyo, Y. 2002. *Heterocapsa lanceolata* sp. nov. and *Heterocapsa horiguchii* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae), two new marine dinoflagellates from coastal Japan. Phycologia, 41: 470 – 479.

- Jang, S.H., Jeong H.J. and Yoo, Y.D. 2018. *Gambierdiscus jejuensis* sp. nov., an epiphytic dinoflagellate from the waters of Jeju Island, Korea, effect of temperature on the growth, and its global distribution. *Harmful algae*, 80: 149 – 157.
- Jeong, H.J., Lim, A.S., Jang, S.H., Yih, W.H., Kang, N.S., Lee, S.Y., Yoo, Y.D. and Kim, H.S. 2012b. First report of the epiphytic dinoflagellate *Gambierdiscus caribaeus* in the Temperate Waters off Jeju Island, Korea: Morphology and molecular characterization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 637 – 650.
- Jeong, H.J., Yih, W., Kang, M.S., Lee, S.Y., Yoon, E.Y., Yoo, Y.D., Kim, H.S. and Kim, J.H. 2012a. First report of the epiphytic benthic dinoflagellates *Coolia canariensis* and *Coolia malayensis* in the waters off Jeju Island, Korea: Morphology and rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 114 – 133.
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Kim, J.S., Seong, K.A., Kang, N.S. et Kim, T.H. 2010. Growth, feeding, and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal*, 45: 65 – 91.
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Seong, K.A., Kim, J.H., Park, J.Y., Kim, S.H., Lee, S.H., Ha, J.H. and Yih, W.H. 2005. Feeding by the mixotrophic red-tide dinoflagellate *Gonyaulax polygramma*: mechanisms, prey concentration, and grazing impact. *Aquatic Microbial Ecology*, 38: 249 – 257.
- Kang, N.S., Jeong, H.J., Lee, S.Y., Lim, A.S., Lee, M.J., Kim, H.S. and Yih, W. 2013. Morphology and molecular characterization of the epiphytic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the temperate waters off Jeju Island, Korea. *Harmful Algae*, 27: 98 – 112.
- Kang, N.S., Jeong, H.J., Moestrup, Ø., Lee, S.Y., Lim, A.S., Jang, T.Y. Lee, K.H., Lee, M.J., Jang, S.H., Potvin, E., Lee, S.K. and Noh, J.H. 2014. *Gymnodinium smaydae* n. sp., a new planktonic phototrophic

- dinoflagellate from the coastal waters of western Korea: morphology and molecular characterization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61: 182 – 203.
- Kang, N.S., Jeong, H.J., Moestrup, Ø., Shin, W., Park, J.Y., De Salas, M.F., Kim, K.W. and Noh, J.H. 2010. Description of a new planktonic mixotrophic dinoflagellate *Paragymnodinium shiwhaense* n. gen., n. sp. from the coastal waters off western Korea: morphology, pigments, and ribosomal DNA gene sequence. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57: 121 – 144.
- Kang, S.M. and Lee, J.B. 2018a. New records of benthic dinoflagellates of four genera (*Bispinodinium*, *Cabra*, *Prorocentrum*, *Sinophysis*) from the coastal beach of Korea. *The Korean Journal of Environment Biology*, 36: 252 – 259.
- Kang, S.M. and Lee, J.B. 2018b. New records of genus *Dinophysis*, *Gonyaulax*, *Amphidinium*, *Heterocapsa* (Dinophyceae) from Korean waters. *The Korean Journal of Environment Biology*, 36: 260 – 270.
- Karafas, S., Teng, S. T., Leaw, C. P., and Alves-de-Souza, C. 2017. An evaluation of the genus *Amphidinium* (Dinophyceae) combining evidence from morphology, phylogenetics, and toxin production, with the introduction of six novel species. *Harmful Algae*, 68: 128 – 151.
- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinformatics*, 20: 1160 – 1166.
- Katoh, K. and Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772 – 780.
- Ki, J.S. 2010. Nuclear 28S rDNA phylogeny supports the basal placement of *Noctiluca scintillans* (Dinophyceae; Noctilucales) in dinoflagellates.

- European journal of protistology, 46: 111 – 120.
- 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: 43 – 54.
- Ki, J.S. and Han, M.S. 2007a. Complete sequence and secondary structure of the large subunit ribosomal RNA from the harmful unarmored dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*: full length researcher paper. DNA sequence, 18: 19 – 25.
- Ki, J.S. and Han, M.S. 2007b. Cryptic long internal repeat sequences in the ribosomal DNA ITS1 gene of the dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae): a 101 nucleotide six-repeat track with apalindrome-like structure. Genes & Genetic systems, 82: 161 – 166.
- Ki, J.S. and Han, M.S. 2008. Implications of complete nuclear large subunit ribosomal RNA molecules from the harmful unarmored dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) and relatives. Biochemical Systematics and Ecology, 36: 573 – 583.
- Kim, C.J. Sako, Y., Uchida, A. and Kim. C.H. 2004. Molecular phylogenetic relationships within the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) based on the nuclear-encoded SSU and LSU rDNA D1–D2 sequences. Journal of the Korean society of Oceanography, 39: 172 – 185.
- Kim, H.S., Yih, W., Kim, J.H., Myung, G. and Jeong, H.J. 2011. Abundance of epiphytic dinoflagellates from coastal waters off Jeju Island, Korea during Autumn 2009. Ocean Science Journal, 46: 205 – 209.
- Kim, S. and Seo, H. 2019. Distribution and molecular phylogeny of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* sp. in the coastal waters off Jeju Island, Korea. The Sea, 24: 236 – 248.
- Kim, S.J., Yoon, J. and Park, M.G. 2015. Occurrence and molecular phylogeny characteristics of benthic sand-dwelling dinoflagellates in the intertidal

- flat of Dongho, west coast of Korea. *The Sea*, 20: 141 – 150.
- Kofoed, C.A. 1907. Dinoflagellata of the San Diego region, III. Descriptions of new species. *University of California Publications in Zoology*, 3: 299 – 340.
- Kofoed, C.A. and Swezy, O. 1921. The free-living unarmored Dinoflagellata. *Memoirs of the University of California*, 5: 1 – 562.
- Kretschmann, J., Čalasan, A.Ž. and Gottschling, M. 2018. Molecular phylogenetics of dinophytes harboring diatoms as endosymbionts (Kryptoperidiniaceae, Peridniales), with evolutionary interpretations and a focus on the identity of *Durinskia oculata* from Prague. *118*: 392 – 402.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1457 – 1549.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tanura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870 – 1874.
- Laza-Martinez, A., Orive, E. and Miguel, I. 2011. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology*, 46: 45 – 65.
- Lee, B. and Park, M.G. 2020. Distribution and genetic diversity of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Korea. *Harmful Algae*, 96: 101820.
- Lee, J.B., Go, Y.B. and Choa, J.H. 1990. The structure and dynamics of phytoplankton communities around the coastline of Cheju Island, Korea. *The Korean Journal of Phycology*, 5: 159 – 171. (in Korean)
- Lee, J.B. and Kang, S.M. 2017. New records of dinoflagellates in five genera

- of Peridinales (Dinophyceae) from Korean waters. The Korean Journal of Environment Biology, 35: 251 – 264.
- Lee, J.J., Olea, R., Cevalco, M., Pochon, X., Correia, M., Shpigel, M. and Pawlowski, J. 2003. A marine dinoflagellate, *Amphidinium eilatiensis* n. sp., from the benthos of a mariculture sedimentation pond in Eilat, Israel. Journal of Eukaryotic Microbiology, 50: 439 – 448.
- Lee, K.H., Jeong, H.J., Park, K. Kang, N.S., Yoo, Y.D., Lee, M.J., Lee, J.W., Lee, S., Kim, T., Kim, H.S. and Noh, J.H. 2013. Morphology and molecular characterization of the epiphytic dinoflagellate *Amphidinium massartii*, isolated from the temperate waters off Jeju Island, Korea. Algae, 28: 213 – 231.
- Lee, S., Yang, AR., Yoo, YD., Jeong, EJ. & Rho, J-R. 2019. Relative configurational assignment of 4-hydroxyprorocentrolide and prorocentrolide C isolated from a benthic Dinoflagellate (*Prorocentrum lima*). Journal of Nature Products, 82:1034 – 1039.
- Lee, S.Y., Jeong, H.J., Kwon, J.E., You, J.H., Kim, S.J., Ok, J.H., Kang, H.C. and Park, J.Y. 2019. First report of the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa minima* in the Pacific Ocean: morphological and genetic characterizations and the nationwide distribution in Korea. Algae, 34: 7 – 21.
- Leung, P.T.Y., Yan, M., Lam, V.T.T., Yiu, S.K.F., Chen, C.Y., Murray, J.S., Harwood, D.T., Rhodes, L.L., Lam, P.K.S. and Wai, T.C. 2018. Phylogeny, morphology and toxicity of benthic dinoflagellates of the genus *Fukuyo* (Gonoidomataceae, Dinophyceae) from a subtropical reef ecosystem in the South China Sea. Harmful Algae, 74: 78 – 97.
- Li, Z. and Shin, H.H. 2018. Morphology and phylogeny of an unarmored dinoflagellate, *Karlodinium jejuensis* sp. nov. (Gymnodiniales), isolated from the northern East China Sea. Phycological Research, 66: 318 – 328.

- Lim, A.S., Jeong, H.J., Jang, T.Y., Kang, N.S., Lee, S.Y., Yoo, Y.D. and Kim, H.S. 2013. Morphology and molecular characterization of epiphytic dinoflagellate *Prorocentrum* cf. *rhathymum* in temperate waters off Jeju Island, Korea. *Ocean Science Journal*, 48: 1 – 17.
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Steidinger, K.A., Millie, D.F., Bendis, B.J., Pigg, R.J. and Tester, P.A. 2003. Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and Pfiesteria-like organisms using internal transcribed spacer-specific PCR assays. *Journal of Phycology*, 39: 754 – 761.
- Loeblich III, A.R. 1968. A new marine dinoflagellate genus *Cachonina* in axenic culture from the Salton Sea California with remarks on the genus *Peridinium*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 81: 91 – 96.
- Luo, Z., Hu, Z., Tang, Y., Mertens, K.N., Leaw, C.P., Lim, P.T., Teng, S.T., Wang, L. and Gu, H. 2018. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Wangodinium sinense* gen. et sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae) and revisiting of *Gymnodinium dorsalisulcum* and *Gymnodinium impudicum*. *Journal of Phycology*, 54: 744 – 761.
- Luo, Z., Wang, N., Mohamed, H.D., Liang, Y., Pei, L., Huang, S. and Gu, H. 2021. *Amphidinium stirisquamtum* sp. nov. (Dinophyceae), a new marine sand-dwelling dinoflagellate with a novel type of body scale. *Algae*, 36: 241 – 261.
- Luo, Z., Zhang, H., Li, Q., Wang, L., Mohamed, H.F., Lü, S. and Gu, H. 2022. Characterization of *Amphidinium* (Amphidinales, Dinophyceae) species from the China Sea based on morphological, molecular, and pigment data. *Journal of Oceanology and Limnology*, 40: 1191 – 1219.
- Matsuyama, Y. 1999. Harmful effect of dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on shellfish aquaculture in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 33: 283 – 293.

- Matsuyama, Y., Nagai, K., Mizuguchi, T., Fugiwara, M., Ishimura, M., Yamaguchi, M., Uchida, T. and Honjo, T. 1995. Ecological features and mass mortality of pearl oysters during red tides of *Heterocapsa* sp. in Ago Bay in 1992. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 61: 35 – 41.
- Matsuyama, Y., Uchida, T. and Honjo, T. 1997. Toxic effects of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on clearance rate of blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology progress series*, 146: 73 – 80.
- Mejía–Camacho, A., Durán–Riveroll, L.M. and Cembella, A. 2021. Toxicity bioassay and cytotoxic effects of the benthic marine dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Journal of Xenobiotics*, 11: 33 – 45.
- Meng Y., Van Wagoner, R.M., Misner, I., Tomas, C. and Wright, J.L.C. 2010. Structure and biosynthesis of amphidinol 17, a hemolytic compound from *Amphidinium carterae*. *Journal of Natural Products*, 73: 409 – 415.
- Moestrup, Ø. and Daugbjerg, N. 2007. 12 on dinoflagellate phylogeny and classification. London: CRC press. p. 215.
- Mohammad–Noor, N., Daugbjerg, N., Moestrup, Ø. and Anton, A. 2007. Marine epibenthic dinoflagellates from Malaysia: A study of live cultures and preserved samples based on light and scanning electron microscopy. *Nordic Journal of Botany*, 24: 629 – 690.
- Morton, S.L. and Faust, M.A. 1997. Survey of toxic epiphytic dinoflagellates from the Belizean barrier reef ecosystem. *Bulletin of marine science*, 61: 899 – 906.
- Murray, S., Flø Jørgensen, M., Daugbjerg, N. and Rhodes L. 2004. *Amphidinium* revisited. II. Resolving species boundaries in the *Amphidinium operculatum* species complex (Dinophyceae), including the descriptions of *Amphidinium trulla* sp. nov. and *Amphidinium gibbosum*. comb. nov. *Journal of Phycologia*, 40: 366 – 382.

- Murray, S., Garby, T., Hoppenrath, M. and Neilan, B.A. 2012. Genetic diversity, morphological uniformity and polyketide production in dinoflagellates (*Amphidinium*, Dinoflagellata). PLOS ONE, 7, e38253.
- Murray, S., Nagahama, Y. and Fukuyo, Y. 2007. Phylogenetic study of benthic, spine-bearing proro-centroids, including *Prorocentrum fukuyoi* sp. nov. Phycologia Research, 55: 91 – 102.
- Murray, S. and Patterson, D.J. 2002. The benthic dinoflagellate genus *Amphidinium* in south-eastern Australian waters, including three new species. European Journal of Phycology, 37: 279 – 298.
- Nagahama, Y. and Fukuyo, Y. 2005. Redescription of *Cryptomonas lima*, collected from Sorrento, Italy, the basionym of *Prorocentrum lima*. Plankton Biology and Ecology, 52: 100 – 106.
- Nagai, K., Matsuyama, Y., Uchida, T., Yamaguchi, M., Ishimura, M., Nishimura, A., Akamatsu, S. and Honjo, T. 1996. Toxicity and LD<sub>50</sub> levels of the red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on juvenile pearl oysters. Aquaculture, 144: 149 – 154.
- Nayak, B. and Karunasagar, I. 1997. Influence of bacteria on growth and hemolysin production by the marine dinoflagellate *Amphidinium carterae*. Marine Biology, 130: 35 – 39.
- Nézan, E., Siano, R., Boulben, S., Six, C., Bilien, G., Chéze, K., Duva, A., Panse, S.L., Quéré, J. and Chomérat, N. 2014. Genetic diversity of the harmful family Kareniaceae (Gymnodiniales, Dinophyceae) in France, with the description of *Karlodinium gentienii* sp. nov.: A new potentially toxic dinoflagellate. Harmful Algae, 40: 75 – 91.
- Nézan, E., Tillmann, U., Bilien, G., Boulben, S., Chéze, K., Zentz, F., Salas, R. and Chomérat, N. 2012. Taxonomic revision of the dinoflagellate *Amphidoma caudata*: transfer to the genus *Azadinium* (Dinophyceae) and proposal of two varieties, based on morphological and molecular

- phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 48: 925 – 939.
- Orr, R.J.S., Murray, S.A., Stüken, A., Rhodes, L. and Jakobsen, K.S. 2012. When naked became armored: an eight-gene phylogeny reveals monophyletic origin of *Theca* in Dinoflagellates. *PLOS ONE*, 7: e50004.
- Page, R.D.M. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bionformatics*, 12: 357 – 358.
- Park, J.S., Li, Z., Kim, H.J., Kim, K.H., Lee, K.W., Youn, J.Y., Kwak, K.Y. and Shin, H.H. 2021. First report of the marine benthic dinoflagellate *Bysmatrum subsalsum* from Korean tidal pools. *Journal of marine science and engineering*, 9: 649.
- Park, T.G., Bolch, C.J.S. and Hallegraeff, G.M. 2007. Morphological and molecular genetic characterization of *Cryptoperidiniopsis brodyi* (Dinophyceae) from Australia-wide isolates. *Harmful Algae*, 6: 718 – 733.
- Phua, Y.H., Husnik, F., Lemer, S. and Wakeman, K.C. 2022. Phylogeny of *Amphidinium* (Dinophyceae) from Guam and Okinawa, with descriptions of *A. pagoense* sp. nov. and *A. uduigamense* sp. nov. *Phycologia*, 61: 241 – 254.
- Pinto, S.K., Terada, R. and Horiguchi, T. 2017. *Testudodinium magnum* sp. nov. (Dinophyceae), a novel marine sand-dwelling dinoflagellate from subtropical Japan. *Phycologia*, 56: 136 – 146.
- Pistocchi, R., Pezolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, C., Dell' Aversano, C. and Fattorusso, E. 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon*, 57: 421 – 428.
- Reñé, A. and Hoppenrath, M. 2019. *Psammodium inclinatum* gen. nov. et comb. nov. (= *Thecadinium inclinatum* Balech) is the closest relative to the toxic dinoflagellate genera *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*. *Harmful*

- Algae, 84: 161 – 171.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. and Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61: 539 – 542.
- Salas, M.F., Bolch, C.J.S., Botes, L., Nash, G., Wright, S.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. *Journal of Phycology*, 39: 1233 – 1246.
- Salas, M.F., Laza–Martinez, A. and Hallegraeff, G.M. 2008. Novel unarmored dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmored dinoflagellates. *Phycologia*, 39: 302 – 317.
- Salas, R., Tillmann, U. and Kavanagh, S. 2014. Morphological and molecular characterization of the small armored dinoflagellate *Heterocapsa minima* (Peridinales, Dinophyceae). *European Journal of Phycology*, 49: 413 – 428.
- Saldarriaga, J.F., Taylor, F.J.R., Keeling, P.J. and Cavalier–Smith, T. 2001. Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *Journal of Molecular Evolution*, 53: 204 – 213.
- Samarakoon, K.W., Ko, J.Y., Rahman, S.M., Lee, J.H., Kang, M.C., Kwon, O.N., Lee, J.B. and Jeon, Y.J. In vitro studies of anti-inflammatory and anticancer activities of organic solvent extracts from cultured marine microalgae. *Algae*, 28: 111 – 119.
- Saunders, G.W., Hill, D.R.A., Sexton, J.P. and Andersen. R.A. 1997. Small-subunit ribosomal RNA sequences from selected dinoflagellates: testing classical evolutionary hypotheses with molecular systematic methods. In

- Origins of algae and their plastids. Springer, Vienna. p. 237 – 259.
- Scorzetti, G., Brand, L.E., Hitchcock, G.L., Rein, K.S., Sinigalliano, C.D. and Fell, J.W. 2009. Multiple simultaneous detection of Harmful Algal Blooms (HABs) through a high throughput bead array technology, with potential use in phytoplankton community analysis. *Harmful Algae*, 8: 196 – 211.
- Sekida, S., Okuda, K., Katsumata, K. and Horiguchi, T. 2003. A novel type of body scale found in two strains of *Amphidinium* species (Dinophyceae). *Phycologia*, 42: 661 – 666.
- Selina, M.S. 2016. Seasonal and long-term dynamics of sand-dwelling dinoflagellates (Dinoflagellata) in Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 42: 458 – 470.
- Selina, M.S. and Levchenko, E.V. 2011. Species composition and morphology of dinoflagellates (Dinophyta) of epiphytic assemblages of Peter the Great Bay in the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 37: 23 – 32.
- Shah, M.M.R., An, S.J. and Lee, J.B. 2013. Presence of benthic dinoflagellates around coastal waters of Jeju Island including newly recorded species. *Journal of Ecology and Environment*, 36: 347 – 370.
- Shah, M.M.R., An, S.J. and Lee, J.B. 2014a. Occurrence of sand-dwelling and epiphytic dinoflagellates including potentially toxic species along the coast of Jeju Island, Korea. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 9: 141 – 156.
- Shah, M.M.R., Samarakoon, K.W., Ko, J.Y., Lakmal, H.H.C., Lee, J.H., An, S.J., Jeon, Y.J. and Lee, J.B. 2014b. Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *African Journal of Biotechnology*, 13:792 – 805.
- Shannon, C.E. and Wiener, W. 1963. The mathematical theory of communication. University Illinois Press, Urbana. p. 360.

- Shears, N.T., and Ross, P.M. 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful algae*, 8: 916 – 925.
- Shin, H.H., Li, Z., Lee, K.W. and Matsuoka, K. 2017. Which species, *Alexandrium catenella* (Group I) or *A. pacificum* (Group IV), is really responsible for past paralytic shellfish poisoning outbreaks in Jinhae–Masan Bay, Korea? *Harmful Algae*, 68: 31 – 39.
- Shin, H.H., Li, Z., Lee, K.W. and Matsuoka, K. 2019. Molecular phylogeny of *Torquentidium* gen. et comb. nov. for *Cochlodinium convolutum* and allied species (Ceratomyxidae, Dinophyceae). *European Journal of Phycology*, 54: 249 – 262.
- Sparmann, S.F., Leander, B.S. and Hoppenrath, M. 2008. Comparative morphology and molecular phylogeny of *Apicoporus* n. gen.: A new genus of marine benthic dinoflagellates formerly classified within *Amphidinium*. *Protist* 159(3): 383 – 399.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML–VI–HPC: maximum likelihood–based phylogenetic analysis with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688 – 2690.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post–analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30: 1312 – 1313.
- Stern, R.F., Andersen, R.A., Jameson, I., Küpper, F.C., Coffroth, M.A., Vaultot, D., Gall, F.L., Véron, B., Brand, J.J., Skelton, H. Kasai, F., Lilly, E.L. and Keeling, P.J. 2012. Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate dinoflagellate barcode marker. 2012. *PLOS ONE*, 7: e42780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042780>.
- Sunesen, I., Rodríguez, F., Tardivo Kubis, J.A., Juárez, D.A., Risso, A., Lavigne, A.S., Wietkamp, S., Tillmann, U. and Sar, A.E. 2020.

- Morphological and molecular characterization of *Heterocapsa claromecoensis* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae) from Buenos Aires coastal waters (Argentina). *European Journal of Phycology*, 55: 490 – 506.
- Takano, Y. and Horiguchi, T. 2004. Surface ultrastructure and molecular phylogenies of four unarmored heterotrophic dinoflagellates, including the type species of the genus *Gyrodinium* (Dinophyceae). *Phycological Research*, 52: 107 – 116.
- Takano, Y., Yamaguchi, H., Inouye, I., Moestrup, Ø. and Horiguchi, T. 2014. Phylogeny of five species of *Nusuttodinium* gen. nov. (Dinophyceae), a genus of unarmored kleptoplastidic dinoflagellates. *Protist*, 165: 759 – 778.
- Tamura, M., Iwataki, M. and Horiguchi, T. 2005. *Heterocapsa psammophila* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae), a new sand-dwelling marine dinoflagellate. *Phycological Research*, 53: 303 – 311.
- Tamura, M., Takano, Y. and Horiguchi, T. 2009. Discovery of a novel type of body scale in the marine dinoflagellate, *Amphidinium cupulatisquama* sp. nov. (Dinophyceae). *Phycological Research*, 27: 304 – 312.
- Taylor, F.J.R., Hoppenrath, M. and Saldarriaga, J.F. 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation*, 17: 407 – 418.
- Tengs, T., Dahlberg, O.J., Shalchian-Tabrizi, K., Klaveness, D., Rudi, K., Delwiche, C.F. and Jakobsen, K.S. 2000. Phylogeny analyses indicate that the 19'-hexanoyloxy-fucoxanthin-containing dinoflagellates have tertiary plastids of haptophyte origin. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 718 – 729.
- Tester, P.A., Litaker, R.W. and Berdalet, E. 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae*, 91, 101655.
- Thoha, H., Intan, B., Mariana, D., Rachman, A., Sianturi, O.R., Sidabutar, T.,

- Iwataki, M., Takahashi, K., Avarre, J.C. and Masseret, E. 2019. Resting cyst distribution and molecular identification of the harmful dinoflagellate *Margalefidinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) in Lampung Bay, Sumatra, Indonesia. *Frontiers in Microbiology*, 10. 306.
- Tillmann, U., Hoppenrath, M. and Gottschling, M. 2019. Reliable determination of *Prorocentrum micans* Ehrenb. (Prorocentrales, Dinophyceae) based on newly collected material from the type locality. *European Journal of Phycology*, 54: 417 – 431.
- Tillmann, U., Hoppenrath, M., Gottschling, M., Kusber, W.H. and Elbrächter, M. 2017. Plate pattern clarification of the marine dinophyte *Heterocapsa triquetra* sensu Stein (Dinophyceae) collected at the Kiel fjord (Germany). *Journal of Phycology*, 53: 1305 – 1324.
- Tosteson, T.R., Ballantine, D.L., Tosteson, C.G., Hensley, V. and Bardales, A.T. 1989. Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 137 – 141.
- Uysal, Z., Iwataki, M. and Koray, T. 2003. On the presence of *Heterocapsa pygmaea* AR Loeb. (Peridinales, Dinophyceae) in the northern Levantine basin (Eastern Mediterranean). *Turkish Journal of Botany*, 27: 149 – 152.
- Van, T.H. and Bing, H.N. 2021. Study of marine sand-dwelling dinoflagellate with four new records from the central south coast of Viet Nam. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 28: 367 – 378.
- Wang, N., Luo, Z., Mertens, K.N., McCarthy, F.M., Gu, L. and Gu, H. 2017. Cyst-motile stage relationship and molecular phylogeny of a new freshwater dinoflagellate *Gymnodinium plasticum* from Plastic Lake, Canada. *Phycological Research*, 65: 312 – 321.
- Watanabe, K., Miyoshi, Y., Kubo, F., Onuma, R., Murray, S. and Horiguchi, T.

2014. *Ankistrodinium armigerum* sp. nov. (Dinophyceae), a new species of heterotrophic marine sand-dwelling dinoflagellate from Japan and Australia. *Phycological Research*, 62: 125 – 135.
- Xiao, J., Sun, N., Zhang, Y., Sun, P., Li, Y., Pang, M. and Li, R. 2018. *Heterocapsa bohaiensis* sp. nov. (Peridiniales: Dinophyceae): a novel marine dinoflagellate from the Liaodong Bay of Bohai Sea, China. *Acta Oceanologica Sinica – English edition –*, 37: 18 – 27.
- Yamada, N., Sakai, H., Onuma, R., Kroth, P.G. and Horiguchi, T. 2020. Five non-motile dinotom dinoflagellates of the genus *Dinothrix*. *Frontiers in plant science*, 11. 1764.
- Yamada, N., Tanaka, A. and Horiguchi, T. 2014. cPPB-aE is discovered from photosynthetic benthic dinoflagellates. *Journal of Phycology*, 50: 101 – 107.
- Yamada, N., Tanaka, A. and Horiguchi, T. 2015. Pigment compositions are linked to the habitat types in dinoflagellates. *Journal of Plant Research*, 128: 923 – 932.
- Yamaguchi, A., Hoppenrath, M., Pospelova, V., Horiguchi, T. and Leander, B.S. 2011. Molecular phylogeny of the marine sand-dwelling dinoflagellate *Herdmania litoralis* and an emended description of the closely related planktonic genus *Archaeoperidinium* Jörgensen. *European Journal of Phycology*, 46: 98 – 112.
- Yang, A.R., Lee, S., Yoo, Y.D., Kim, H.S., Jeong, E.J. and Rho, J.R. 2017. Limaol: a polyketide from the benthic marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of Natural Products*, 80:1688 – 1692.
- Yokouchi, K., Takahashi, K., Nguyen, V.N., Iwataki, M. and Horiguchi, T. 2020. Ultrastructure and systematics of two new species of dinoflagellate, *Paragymnodinium asymmetricum* sp. nov. and *Paragymnodinium inerme* sp. nov. (Gymnodiniales, Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 56: 730 –

746.

- Yoshida, T., Naka, R., Seto, H, Wang, M., Iwataki, M. and Hiroishi, S. 2003. Sequence analysis of 5.8S rDNA and the internal transcribed spacer region in dinoflagellate *Heterocapsa* species (Dinophyceae) and development of selective PCR primers for the Bivalve Killer *Heterocapsa circularisquama*. *Microbes and Environments*, 18: 216 – 222.
- Yoshimatsu, S., Toriumi, S. and Dodge, J.D. 2006. Light and scanning microscopy of two benthic species of *Amphidiniopsis* (Dinophyceae), *Amphidiniopsis hexagona* sp. nov. and *Amphidiniopsis swedmarkii* from Japan. *Phycological Research*, 48: 107 – 113.
- Zuo, J., Li, Q., Lu, S., Dong, Y., Chen, H., Zheng, C. and Cui, L. 2020. The first benthic harmful dinoflagellate bloom in China: morphology and toxicology of *Prorocentrum concavum*. *Marine Pollution Bulletin*, 158: 111313.

## Abstract

Benthic dinoflagellates are important primary producers of benthic ecosystem, attached to algae or coral, or inhabiting sandy sediments. About 190 species have been reported worldwide. Most of benthic dinoflagellates have been reported in tropical and subtropical regions, and some species are toxic, raising interest in the occurrence of benthic dinoflagellates. In Korea, many studies have been reported on the occurrence and distribution of epiphytic dinoflagellates, but no studies have been reported on the seasonal occurrence and species diversity of sand-dwelling dinoflagellates in intertidal zone. In particular, Jeju Island have recently changed from temperate to subtropical regions due to rising sea temperatures due to global warming, and the appearance of tropical and subtropical benthic dinoflagellates is estimated to increase, requiring continuous monitoring. Therefore, it is necessary to study the occurrence and species diversity of sand-dwelling dinoflagellates in Jeju Island.

In this study, the species diversity and seasonal appearance of sand-dwelling dinoflagellates in the intertidal zone of Jeju Island were identified, and phylogenetic analysis was conducted on two *Heterocapsa* species, one *Amphidinium* species and one new species that appeared and cultured during the investigation period.

In order to investigate the species diversity of sand-dwelling dinoflagellates in the intertidal zone of Jeju Island, these were isolated and established at 16 stations from 2017 to 2022. As a result of morphology, a total of 12 genera 22 species appeared, and among them, 9 recorded species, 3 unrecorded species and 10 unidentified species were included. In particular, 8 genera appeared on Pyoseon Beach. From March to August 2022, samples were collected at 12 stations at Pyoseon Beach to study the

seasonal occurrence of sand-dwelling dinoflagellates. The abundance of sand-dwelling dinoflagellates was the highest in June, and the number of species was highest in March. In addition, in June and July, there were more number of species in the lower part than in the upper part. *Amphidinium carterae*, *A. operculatum*, *Prorocentrum concavum* and *P. rhathymum*, known as toxic species, appeared.

Two *Heterocapsa* species were isolated and incubated at Hado beach in April 2018 and Pyoseon Beach in March 2020. As a result of morphology using LM, SEM and TEM, the morphology of *H. pseudotriquetra* and *H. horiguchii* were consistent with those described. In addition, molecular analysis using ITS and LSU rDNA showed that *H. pseudotriquetra* and *H. horiguchii* had identical phylogenetic positions and were distinct from other *Heterocapsa* species.

In March 2019, *Amphidinium* species were isolated and incubated at Sinyang Beach. As a result of morphology using LM and SEM, morphology was similar to those of Fiji strain *A. fijiense*. As a result of phylogenetic analysis using ITS and LSU rDNA, Sinyang strain formed the same clade as sequence of Fiji strain *A. fijiense* and were distinctly separated from other *Amphidinium* species. As a result, *Amphidinium* species isolated at Sinyang Beach and incubated were reported as unrecorded species *A. fijiense*.

Finally, cells that are morphologically similar to *Testudodinium* were isolated at Pyoseon Beach and incubated in March 2020. Morphological analysis showed that unidentified species isolated at Pyoseon Beach were found to morphological characteristics such as the absence of pyrenoid and the teardrop-shape sulcus, and the same characteristics were observed in the *Amphidinium mootonorum*. As a result of

phylogenetic analysis, Pyoseon strain species and *A. mootonorum* group formed an independent clade separated from the genus *Testudodinium* and *Amphidinium* sensu stricto. As a result, new genus *Paraamphidinium* established, the taxonomic features of new species *P. jejuensis* were described and *A. mootonorum* was transferred to *P. mootonorum*.

In conclusion, we identified the sand-dwelling dinoflagellates and confirmed the appearance of sand-dwelling dinoflagellates in the intertidal zone on Pyoseon Beach. Based on this, new genus/new species and unrecorded species were discovered and morphological features of the two *Heterocapsa* species were re-described. Some benthic dinoflagellates have been estimated to be affected by sea temperature, and the appearance of subtropical species of toxic species may show potential risks to human health. Therefore, continuous monitoring of sand-dwelling dinoflagellates is important.