

국내 남해안에 발생한 적조원인생물들의 24S rRNA 유전자 염기서열분석

이수웅 · 이희우 · 박종규¹ · 이진애² · 박영식
인제대학교 미생물학과, ¹인제대학교 환경연구소, ²인제대학교 환경학과

Molecular Phylogeny of Phytoplakton Isolated from Red Tides in Southern Coast of Korea

SOO WOONG LEE, HEE WOO LEE, JONG GYU PARK¹, JIN AE LEE² AND YOUNG SHIK PARK

Department of Microbiology, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

¹Institute of Environmental Research, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

²Department of Environmental Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

국내 남해안의 적조발생지역에서 채집한 *Prorocentrum minimum*, *P. micans*, *P. triestinum*, *P. balticum*, *Gymnodinium sanguineum*, *Alexandrium catenella*, *Scrippsiella trochoidea*, *Heterosigma akashiwo*를 순수배양하고 이로부터 PCR을 이용해 약 700 bp에 해당되는 24S rRNA 유전자의 D1과 D2 변이부위를 증폭하고 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열들을 이미 밝혀진 적조원인종들의 것과 ClustalW 프로그램을 사용하여 배열하고 계통수를 구성한 결과 *Prorocentrum*과 *Alexandrium* 속의 것들은 형태적인 분류결과와 종수준까지 거의 일치함을 보여주었다. 이러한 연구결과는 그 24S rRNA 유전자의 염기서열분석이 국내에서 발생하는 적조원인종들에 대한 종 수준에서의 신속한 확인에 이용될 수 있음을 제시한다.

Cultured isolates of *Prorocentrum minimum*, *P. micans*, *P. triestinum*, *P. balticum*, *Gymnodinium sanguineum*, *Alexandrium catenella*, *Scrippsiella trochoidea*, and *Heterosigma akashiwo* from red tides in southern coast of Korea were phylogenetically compared on the basis of their 24S rRNA genes. For each isolate approximately 700 bp of 24S rDNA, encompassing D1 and D2 hypervariable domains, was amplified using the polymerase chain reaction and sequenced. The sequences were aligned with those reported in Genbank by using ClustalW program and phylogenetic tree was generated to show that morphospecies designations in the *Alexandrium* and *Prorocentrum* species are congruent with terminal taxa defined by phylogenetic analysis of the 24S rRNA fragment. Our results suggest that the molecular phylogeny approach could facilitate identification of domestic dinoflagellates which have ambiguous morphologies.

서 론

적조원인생물의 분류는 현미경을 사용한 형태적인 관찰에 의존하고 있으나 종간의 미세한 구조를 식별하는데 많은 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점을 보완하기 위해서 그동안 생화학적인 방법과 함께 rRNA 유전자들의 염기서열을 이용한 방법 등을 연구하고 있다(Lenaers *et al.*, 1988, 1989; Maroteux *et al.*, 1992; Rowan and Powers, 1992). 최근에는 RFLP (restriction fragment length polymorphism)방법을 이용하여 동일한 형태를 가지는 적조원인생물들간에도 24S rRNA 유전자의 염기서열 상에 유전적인 변이가 존재한다는 사실이 밝혀지면서(Scholin and Anderson, 1994), 여러 가지 적조원인생물들의 24S rRNA 유전자 염기서열들이 분석되었다(Scholin *et al.*, 1994a, 1994b; Zardova *et al.*, 1995; Yeung *et al.*, 1996). 특히

rRNA 유전자의 염기서열분석은 *Pseudonitzschia* 종들의 경우 독성과 비독성 종의 구분까지 가능함을 보여주어(Douglas *et al.*, 1994; Scholin *et al.*, 1994b), 이 분석방법이 매우 유용하게 이용될 수 있음을 제시하고 있다. 그렇지만 아직까지 rRNA 유전자의 염기서열이 밝혀진 적조원인생물은 수십종에 국한되어 있어 *Alexandrium*이나 *Prorocentrum* 종들을 제외하고는 데이터베이스로서의 구실을 다하지 못하고 있다. 아울러 이들 적조원인생물의 rRNA 유전자 염기서열은 발생지역에 따라 약간의 변이를 보여주고 있어(Scholin *et al.*, 1994a), 국내에서 채집된 종들에 대한 독자적인 연구가 요망되고 있다.

본 연구에서는 1997년 봄 남해 연안의 적조발생 해역에서 수거된 시료로부터 적조원인생물들을 분류하여 순수배양하고 이들의 24S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 기존에 발표된 적조원인종들의 염기서열들과 상동성을 비교분석하였다.

재료 및 방법

시료는 적조가 발생하였을 때 부정기적으로 현장에 찾아가서 20 l 시료병에 채집하였으며, 시료의 흔들림을 방지하기 위하여 해수는 시료병에 최대한 가득 담았다. 시료의 배양을 위하여 실험실에서는 해부현미경(Olympus BO71)으로 적조원인생물을 분리해 낸 다음, 6 hole multi-chamber에 넣어 1차 세척해 주고 이를 다시 2 회 이상 씻어 준 다음, 24 hole multi-chamber에 최종적으로 배양하였다. 시료는 24 시간 광을 주고 20°C 내외의 일정한 수온을 유지해 주었다.

PCR 증폭에 사용한 primer들은 24S ribosomal RNA의 D1과 D2 변이부위를 증폭할 수 있도록 고안된 것으로(Scholin *et al.*, 1994a) *Prorocentrum micans* Ehrenberg LSU rRNA(Lenaers *et al.*, 1989)의 24-43 위치와 733-714 위치에 상응하는 염기서열을 가지고 있다(sense: 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3', anti-sense: 5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGA-3'). 배양액 상태의 적조원인종을 원심분리하여 침전시키고 미량의 증류수에 부유시켜 직접 PCR 반응물에 첨가하여 24S rRNA 유전자증폭에 사용하였다. PCR 반응물의 조성은 1X 완충용액(10mM Tris-HCl, 50mM KCl, pH 9), 1.5mM MgCl₂, 200μM dNTPs, 10 pmol씩의 primer들로서 마지막에 2.5 units의 Taq polymerase를 포함하여 전체 부피가 50 μl가 되도록 조절하여 반응을 진행하였다. PCR 반응은 90°C에서 4분간 가열한 후 90°C 1 분, 50°C 1 분, 72°C 1 분의 3 단계 주기를 40 회 반복하였다. 마지막에는 72°C에서 7분간 처리한 후 반응을 중단하였다.

PCR로 증폭된 DNA는 1% agarose gel에서 예상되는 710 bp 정도의 크기를 확인한 후 반응물 1 μl 씩을 pCR2.1-TOPO vector kit(Invitrogen)를 사용하여 클로닝을 실시하였다. IPTG가 첨가된 ampicillin 배지에서 흰색의 콜로니들을 선택한 후 플라스미드를

얻어내어 *Eco* RI 제한효소로 잘라 삽입된 DNA의 크기를 확인하였다.

확인된 형질전환체들의 플라스미드를 QIAGEN kit를 사용하여 정제한 후 fmol DNA sequencing kit(Promega)를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 이때 사용된 sequencing primer들은 vector 내의 T7과 M13 reverse primer들과 Scholin *et al.*(1994a)에 의해 고안된 증폭된 DNA 내부에 존재하는 "D1C" primer(reverse: 5'-ACTCTCTTTTCAAAGTCC TT-3')와 "D2Ra" primer(forward: 5'-TGAAAAGGACTTTGAAAAGA-3')를 사용하였다.

각 clone들의 읽혀진 염기서열들은 Genbank database에서 상동성을 분석하고 ClaustalW computer program을 사용하여 배열하고, TreeView program을 사용하여 계통도를 그렸다.

결과 및 고찰

적조원인생물들의 분류 및 순수배양

국내 남해안에서 적조발생시 채집하여 순수배양한 적조원인 생물 8 종에 대한 분류자료를 Table 1에 정리하였으며 이들의

Table 1. List of red-tide forming phytoplankton isolates

Species	Isolate description	Isolation date and locale
<i>Prorocentrum minimum</i>	Dino-1	Masan Bay(97/5/23)
<i>P. micans</i>	Dino-2	Chinhae Bay(97/6/19)
<i>P. triestinum</i>	Dino-3	Chinhae Bay(97/6/19)
<i>P. balticum</i>	Dino-4	Masan Bay(97/5/23)
<i>Gymnodinium sanguineum</i>	Dino-5	Hengam Bay(97/4/24)
<i>Alexandrium fraterculus</i>	Dino-6	Chinhae Bay(97/6/19)
<i>Scrippsiella trochoidea</i>	Dino-7	Chinhae Bay(97/6/19)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	Dino-8	Masan Bay(97/5/23)

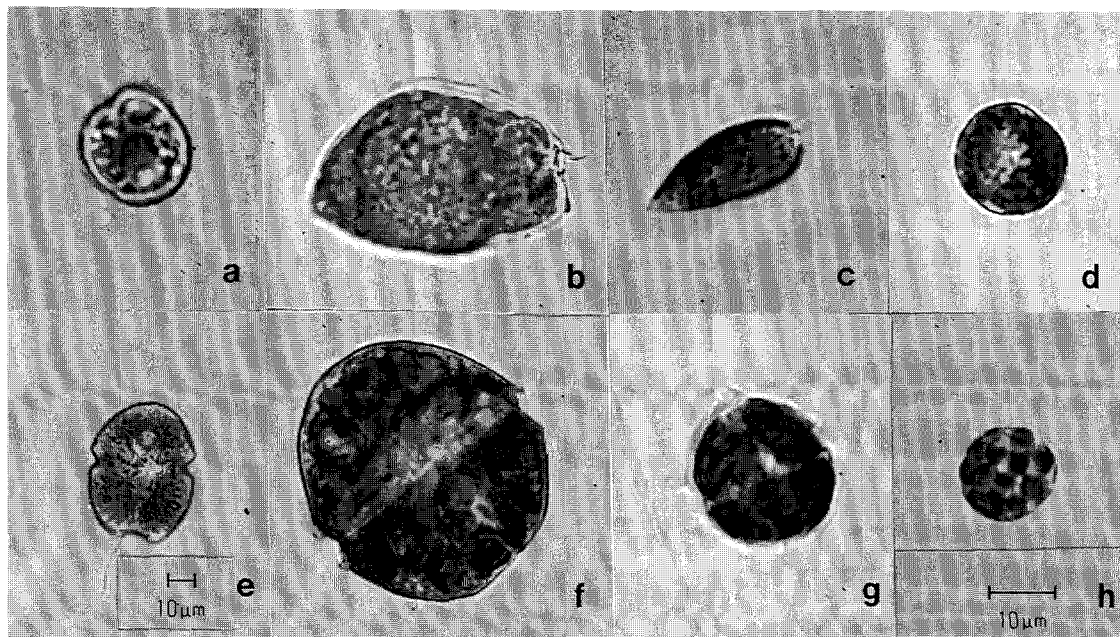


Fig. 1. Microscopic observations of pure cultured phytoplankton species: (a) *Prorocentrum minimum*, (b) *P. micans*, (c) *P. triestinum*, (d) *P. balticum*, (e) *Gymnodinium sanguineum*, (f) *Alexandrium catenella*, (g) *Scrippsiella trochoidea*, (h) *Heterosigma akashiwo*. The scale bar underneath (e) is valid only for *G. sanguineum* and the scale bar beneath (h) applies to all of the other specimens.

광학현미경 사진을 Fig. 1에 제시하였다.

순수배양된 적조원인생물들의 24S rRNA 유전자 증폭

순수배양된 적조원인생물 각각의 24S rRNA 유전자중 D1과 D2 부위를 PCR을 이용하여 증폭하였다(Fig. 2A). 각 시료에서 증폭된 DNA는 Dino-6과 Dino-8을 제외하고는 모두 700 bp 정도의 예상되는 크기와 부합되는 단일한 종류의 DNA들만이 증폭된 것으로 나타났다. Dino-8의 경우 작은 크기의 DNA를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과 적조생물의 24S rRNA pseudogene과 높은 상동성을 보여(결과 미제출), Dino-6과 Dino-8에서 증폭된 다른 크기의 DNA들은 배양된 시료내에 공존하는 미생물에서 비롯된 것이 아니라, 비특이적인 증폭에 기인하는 것으로 추정되었다. 증폭된 DNA가 한가지 적조원인종으로부터 증폭된 단일종의 것인지를 확인하기 위하여 4 자리의 염기서열을 인식하는 *Rsa* I 제한효소를 사용하여 자르고 agarose 겔 전기영동을 실시하여 절편들의 크기를 비교분석하였다(Fig. 2B). 시료마다 DNA 절편들의 합은 절단되지 않은 원래의 크기와 거의 일치하고 있어, 각 시료에서 증폭된 DNA들은 각기 단일종의 DNA로 구성된 것임을 확인할 수 있었다.

클로닝된 24S rDNA들의 염기서열분석

각 시료에서 증폭된 24S rDNA들을 플라스미드에 클로닝하고 삽입된 DNA들을 *Rsa* I 제한효소로 잘랐을 때 Fig. 2에서 보여주는 RFLP 유형과 동일하게 나타남을 확인하였다(결과 미제출). 확인된 클론들의 24S rDNA 각각의 전체 염기서열을 분석하고 Genbank database에서 상동성을 분석한 결과 모두 적조원인생물에 해당되는 것들과 가장 높은 상동성을 보여주었다. D1과 D2 부위에 해당되는 24S rRNA 유전자 염기서열이 밝혀진 적조원인생물들의 염기서열자료를 Genbank에서 받아 ClustalW로 상동성을 분석한 결과를 Fig. 3에 계통수로 그려놓았다. 전체적으로 *Prorocentrum* 속에 해당되는 Dino-1, -2, -3, -4의 염기서열들과 *Alexandrium* 속의 Dino-6 염기서열은 동일 속의 염

기서열과 가장 가까운 가치를 형성하여 형태적인 분류 결과와 일치하고 있다. 이들 8종의 적조원인종들에 대한 염기서열은 Genbank에 보고되었다(Accession numbers: Dino-1; AF042813, Dino-2; AF042814, Dino-3; AF042815, Dino-4; AF042816, Dino-5; AF042817, Dino-6; AF042818, Dino-7; AF042819, Dino-8; AF042820).

*P. minimum*으로 분류된 Dino-1의 염기서열은 동종의 염기서열 L38636(Zardoya *et al.*, 1995)과 높은 연관을 보여주긴 하지만(Fig. 3), 이보다는 오히려 *P. balticum*으로 분류된 Dino-4의 염기서열이 L38636과 보다 높은 연관을 보여주고 있다. Dino-1과 Dino-4의 염기서열은 L38636과 각각 6 개 썩의 염기서열에서 차이를 보여 99.1% 썩의 상동성을 보여주었다. 그렇지만 Dino-1과 Dino-4간에는 단지 2 개의 염기에서만 차이를 보여주고 있다. *P. minimum*과 *P. balticum* 간의 형태적인 차이는 매우 미미하며, *P. balticum*의 경우 그 24S rRNA 유전자염기서열이 처음 밝혀진 것이기 때문에 *P. minimum*과의 높은 유전적 연관관계에 대한 확실한 논의를 위해서는 앞으로 Dino-1과 Dino-4 간의 형태적 차이에 대한 추가적인 분석과 더불어 보다 많은 시료에 대한 염기서열분석이 필요할 것이다. *P. micans*로 분류된 Dino-2의 염기서열은 동종의 염기서열인 X16108(Lenaers *et al.*, 1989)과 가장 높은 연관을 가지는 것으로 분석되었으나(Fig. 3), 염기서열 상으로는 95.4%의 비교적 낮은 상동성을 보여주었다. 이러한 차이는 지역적으로 다른 곳에 서식하는 동일종간의 유전적 차이에

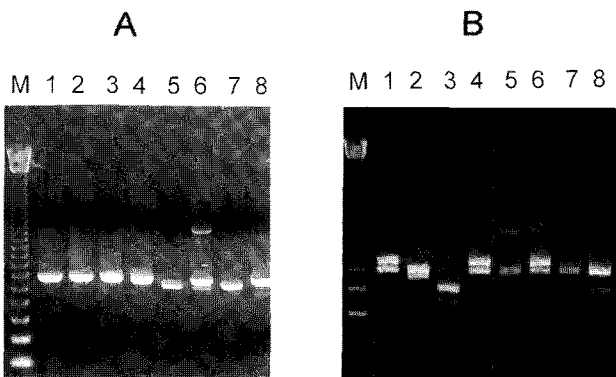


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified rDNAs from the dinoflagellate isolates. (A) PCR amplified rDNAs were electrophoresed on 1.5% agarose gel. (B) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of PCR amplified 24S rDNAs. PCR amplified rDNAs shown in (A) were digested with *Rsa* I and resolved in 2% agarose gel. The size marker of 123 bp ladder is described as M and the lane numbers correspond to the isolates described in Table 1.

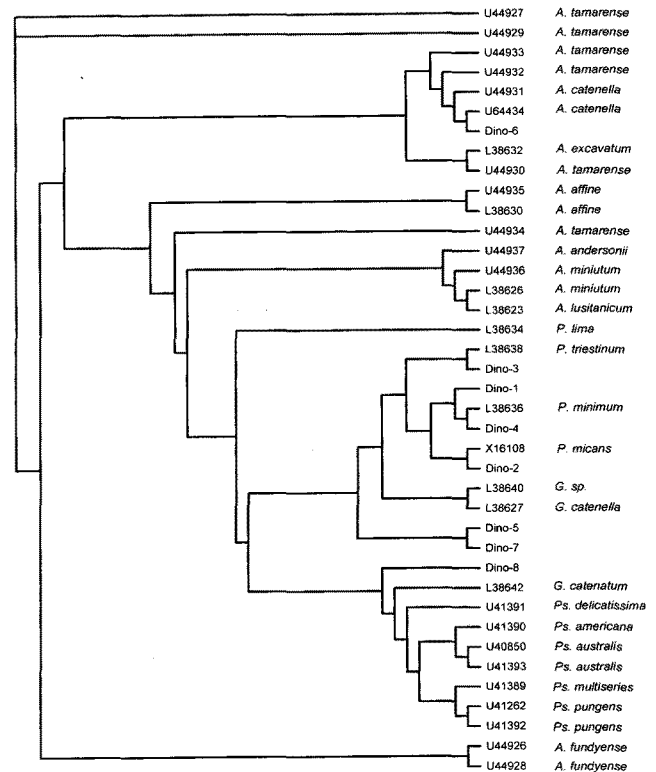


Fig. 3. Molecular phylogenetic tree inferred from aligned dinoflagellate 24S rDNA sequences. The nucleotide sequences were aligned with ClustalW and phylogenetic tree was constructed with TreeView. The number for each species indicates Genbank accession number of the rDNA sequence.

기인할 수도 있으며(Scholin *et al.*, 1994a), 이를 확인하기 위해서는 앞으로 국내에서 채집된 *P. micans*들에 대한 추가적인 분석이 요망된다. Dino-2와는 달리 *P. triestinum*으로 분류된 Dino-3의 경우는 동종의 염기서열인 L38638(Zardoya *et al.*, 1995)과 99.7%에 이르는 높은 상동성을 보여주었다.

*Alexandrium catenella*로 분류된 Dino-6은 동종의 염기서열 U64434와 가장 높은 연관을 보여주었다. Dino-6의 염기서열을 U64434와 함께 동종의 U44931과 배열해본 결과, 홍콩해안에서 채집한 *A. catenella*의 염기서열 U64434(Yeung *et al.*, 1996)의 경우는 내부적으로 누락된 염기서열을 제외한다면 99.3%의 상동성을 보여주었다. 일본의 Ofunato 만에서 분리된 *A. catenella*의 염기서열인 U44931(Scholin *et al.*, 1994)의 경우도 이질성을 보이는 일부 염기서열부분들을 제외한다면 단지 한 개의 염기서열에서만 차이를 보여주는 것으로 계산되었다.

*Gymnodinium sanguineum*으로 분류된 Dino-5의 경우 같은 속의 *G. catenella*(L38627)나 *G. catenatum*(L38642), 그리고 미확인 *Gymnodinium* 종(L38640)과는 높은 연관을 보여주지 않았다(Fig. 3). 그렇다고 이러한 결과가 Dino-5가 *G. sanguineum*에 해당되지 않음을 보여주는 것은 아니다. *G. catenella*(L38627)과 *G. catenatum*(L38642)의 경우도 다른 가치를 형성하고 있으며, 같은 가치를 이룬 *G. catenella*(L38627)과 *Gymnodinium* 종(L38640) 간의 상동성도 79.7%에 그치고 있다. 이와 같은 종간의 많은 차이는 *G. galatheanum*, *G. varians*, *G. simplex*에 대한 ssRNA를 분석에서도 보고되었다(Rowan and Powers, 1992). 형태적인 차이에 의존하는 *Gymnodinium* 속들의 분류체계에 대한 본격적인 논의에는 자료가 충분치 않으나, 이러한 결과들은 적어도 *Gymnodinium* 종에 대한 현 분류체계에 문제점을 제시할 수는 있을 것이다. 그리고 Dino-5가 *Scrippsiella trochoidea*로 분류된 Dino-7과 같은 가치를 형성하기는 하지만 염기서열상의 상동성은 76.1%에 그치는 것으로 계산되었다. *Scrippsiella trochoidea*로 분류된 Dino-7, *Heterosigma akashiwo*로 분류된 Dino-8의 경우도 그 염기서열이 처음 보고되는 것으로 이들의 24S rRNA 유전자염기서열은 특정 적조원인종들의 것들과 높은 연관을 보여주지 않았다(Fig. 3). *Heterosigma carterae*(*H. akashiwo*와 동일종)는 18S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 계통수 분석에서도(Cavalier-Smith and Chao, 1996) *Alexandrium*이나 *Prorocentrum*과는 비교적 먼 유연관계를 가지는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 국내연안에서 적조발생시 채집한 8종의 적조원인생물들에 대한 24S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하고 보고하였다. 그리고 이미 외국에서 보고된 적조원인생물들의 24S rRNA 유전자 염기서열과 비교하여 계통수를 분석한 결과 *Prorocentrum*과 *Alexandrium* 종들의 경우 형태적인 분류와 거의 일치하는 종수준의 분류가 가능함을 확인할 수 있었다. *Gymnodinium sanguineum*, *Scrippsiella trochoidea*, *Heterosigma akashiwo*에 해당되는 적조원인종들은 그 24S rRNA 유전자의 염기서열들이 처음으로 밝혀진 것들로 현재로서는 비교가 불가능한 상태이다. 이러한 결과는 앞으로 보다 많은 국내 적조원인생물들에 대한 염기서열분석이 이루어지면 24S rRNA 유전자에 대한 분석을 통해 국내에서 발생하는 적조원인종들에 대한 종수준에서의 신속한 확인 및 적조의 발생기전에 대한 연구에 유

용하게 이용될 수 있음을 제시하고 있다.

사 사

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성 연구비(BSRI-96-4445)의 연구지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Cavalier-Smith, T. and E.E. Chao, 1996. 18S rRNA sequence of *Heterosigma carterae* (Raphidophyceae), and the phylogeny of heterokont algae (Ochrophyta). *Phycology*, **35**: 500—510.
- Douglas, D.J., D. Landry and S.E. Douglas, 1994. Genetic relatedness of toxic isolates of the marine diatom *Pseudonitzschia* (Bicillariophyceae): phylogenetic analysis of 18S rRNA sequences. *Nat. Toxins*, **2**: 166—174.
- Lenaers, G., H. Nielson, J. Engberg and M. Herzog, 1988. The secondary structure of large-subunit rRNA divergent domains, a marker for protist evolution. *Biosystems*, **21**: 215—222.
- Lenaers, G., L. Maroteaux, B. Michot and M. Herzog, 1989. Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.*, **29**: 40—51.
- Maroteaux, L., M. Herzog and M.O. Soyer-Gobillard, 1985. Molecular organization of dinoflagellate ribosomal DNA: evolutionary implications of the deduced 5.8S rRNA secondary structure. *Biosystems*, **18**: 307—319.
- Rowan, R. and D.A. Powers, 1992. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, **89**: 3639—3643.
- Scholin, C.A. and D.M. Anderson, 1994. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). I. RFLP analysis of ssu rRNA genes. *J. Phycol.*, **30**: 744—754.
- Scholin, C.A., M. Herzog, M. Sogin and D.M. Anderson, 1994a. Identification of group- and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (dinophyceae). II. Sequence analysis of a fragment of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.*, **30**: 999—1011.
- Scholin, C.A., M.C. Villac, K.R. Buck, J.M. Krupp, D.A. Powers, G.A. Fryxell and F.P. Chavez, 1994b. Ribosomal DNA sequences discriminate among toxic and non-toxic *Pseudonitzschia* species. *Nat. Toxins*, **2**: 152—165.
- Yeung, P.K.K., K.F. Kong, F.T.W. Wong and J.T.Y. Wong, 1996. Sequence data of two large subunit ribosomal RNA genes from an Asian strain of *Alexandrium catenella*. Direct Submission to Genbank (Accession No. U64434).
- Zardoya, R., E. Costas, V. Lopez-Rodas, A. Garrido-Pertierra, and J.M. Baustista, 1995. Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Mol. Evol.*, **41**: 637—645.

1998년 1월 8일 원고 접수

1998년 3월 16일 수정본 채택