Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety
Technical Report
Vol. 24, No. 7, pp. 967-972, December 31, 2018, ISSN 1229-3431(Print) / ISSN 2287-3341(Online) https://doi.org/10.7837/kosomes.2018.24.7.967

Single-cell PCR을 이용하여 분석한 득량만 *Chattonella* 종 (Raphidophyceae)의 분자계통학적 특성

김진주* · 송선영** · 박태규**†
*, ** 국립수산과학원 남동해수산연구소

Molecular Phylogeny of *Chattonella* (Raphidophyceae) Species from Deungnyang Bay, Korea Using Single-Cell PCR

Jin Joo Kim* · Seon Yeung Song** · Tae Gyu Park**†
*, ** Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Tongyeong 53085, Korea

요 약 : 최근 우리나라 연안에서 출현빈도가 점차 늘어나고 있는 침편모조류에 속하는 *Chattonella*는 대표적인 유해조류 중 하나로, 이들 종은 세포벽이 없어, 단순히 세포의 형태나 크기 등 광학현미경 관찰만으로는 정확하게 동정하는 것이 어렵다. 따라서 본 연구에서는 2017년 득량만에서 발생한 *Chattonella* 적조 시료를 대상으로 단일 세포를 분리하고, 이들 시료의 28s rDNA, *rbc*L, *psa*A 영역을 대상으로 single-cell PCR 기법을 이용하여 종 동정을 실시하였다. 현미경 관찰 결과 장축은 평균 74.0±10.1 ㎛이고 단축은 평균 33.1±3.6 ㎛로 일반적인 *Chattonella*의 형태적 특징을 보였다. 28s rDNA, *rbc*L, *psa*A 영역을 대상으로 한 염기서열 비교 결과에서는 세 영역 모두에서 하나의 종으로 명확히 구분되지는 않았다. 하지만 *C. marina, C. marina* var. *antiqua, C. marina* var. *ovata* 그룹과 99~100 % 높은 서열 유사성을 보였다.

핵심용어: *Chattonella*, 28S rDNA, *psa*A, *rbc*L, Single-cell PCR

Abstract : *The genus Chattonella belonging to the class raphidophyceae, is a harmful algal bloom species. Recently, its occurrence has been increasing and expanding along the Korean coast. Species identification of the genus Chattonella only by morphological observation is difficult due to the lack of rigid cell walls. In this study, the morphological characteristics and genetic affinity of Chattonella sp. isolated from Deungnyang Bay in 2017 were examined. We carried out single-cell isolation from field samples then sequenced three different areas using the single-cell PCR method: 1) parts of ribosomal operon, the large subunit (LSU) of the rDNA, 2) the chloroplast-encoded subunit psaA of Photosystem I, and 3) rbcL encoding the large subunit of the Rubisco gene. The cells were morphologically very similar to the general genus Chattonella (74.0±10.1 ㎛ in length, 33.1±3.6 ㎛ in width). The three partial gene sequences were insufficient to justify distinction at the species rank. However, they clustered at 99-100 % sequence similarity with C. marina, C. marina var. antiqua and C. marina var. ovata.*

Key Words : *Chattonella, 28S rDNA, psaA, rbcL, Single-Cell PCR*

1. 서 론

침편모조류(Raphidophyceae)에 속하는 대표적인 유해조류 중 하나인 *Chattonella*는 열대, 아열대 및 온대해역에 광역적으로 출현하며, 대량 발생 시 해양생물 및 수산자원에 막대한 경제적 손실을 입히는 대표적인 적조생물로 알려져 있다(Imai and Yamaguchi, 2012). 특히, 일본 세또 내해에서 발생하는 대표적인 어패류 폐사 원인종으로 알려져 있다(Imai et al., 2006).

우리나라 연안 및 내만 해역에서는 1983년 남해동부의 진동만에서 *Chattonella* sp.에 의한 적조가 처음으로 보고되었으며(Park et al., 1988), 최근 남해 연안 및 서해중부의 태안반도 주변해역에서 이들 종의 출현빈도 및 세포밀도가 증가하고 있다(NIFS red tide homepage, http://www.nifs.go.kr /redtideInfo).

*Chattonella*는 세포의 크기 및 모양, 엽록체의 세부형태 등의 형태학적 분류키를 통해 총 *Chattonella antiqua, C. marina*,

* First Author : bleu0327@nate.com, 055-640-4753
† Corresponding Author : taegyupark@korea.kr, 055-640-4752

C. minima, *C. ovata*, *C. subsalasa*, *C. globosa, C. verruculosa*의 7종이 알려져 있다(Hallegraeff and Hara, 1995; Demura et al. 2009). 하지만, Chang et al.(2012)는 LSU rDNA 염기서열 분석을 통해 *C. globosa*가 무각 형태의 *Dictyocha fibula* var. *stapedia*(Dictyochophyceae, Heterokontophyta)로 밝혀졌음을 보고하였고, 18S rDNA 염기서열 분석 및 주사전자현미경 관찰을 통해 *C. verruculosa*가 *Pseudochattonella* 종으로 Dictyochophyceae에 속하는 새로운 종으로 보고하였다.

따라서, 단순한 크기의 비교 및 엽록체의 숫자 등의 형태적 분류만으로는 종 동정이 어렵기 때문에(Imai, 2000; Katano et al., 2009) Nuclear ribosomal DNA(rDNA), Photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein(*psa*A), Ribulose bisphosphate carboxylase gene(*rbc*L) 등의 다양한 생물학적 마커를 이용한 염기서열분석 방법 또한 종 동정에 이용되고 있다(Orsini et al., 2002; Beszteri, 2005; Hosoi-Tanabe et al., 2006).

국내에서는 아직까지 *Chattonella* 적조에 의한 수산피해는 없고, 해마다 발생하는 종은 아니기 때문에 이들 *Chattonella*에 대한 발생기록 혹은 영양염 등의 환경적 성장요인에 대한 연구(Noh et al., 2009; 2010) 외에는 기본적인 정보가 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 득량만 *Chattonella* 적조 발생 해역에서 채수한 시료에서 분리한 *Chattonella* 시료를 대상으로 single-cell PCR 기법을 이용하여 28S rDNA, *rbc*L, *psa*A의 염기서열분석을 통한 종 분석을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료채집 및 단세포 분리

본 연구에 사용한 시료는 2017년 7월 전라남도 고흥군 득량만 중부 해역의 득량도 상부해역 (34°61′67″N, 127°10′70″E)에서 발생한 *Chattonella* 적조(70~350 cells mL^{-1})시료로 Niskin 채수기를 사용하여 표층해수 시료 2 L를 채수하였다. 채수 즉시 1 L 채수병 두 개에 나누어 담아 ice box에 보관하여 실험실로 운반하였다. 이 후 도립현미경 하에서 생시료를 관찰하면서 유영력이 있는 *Chattonella* 세포들을 모세관 피펫을 이용하여 분리하고 멸균해수를 이용하여 2~3회 반복 세척한 후 한 세포씩 분리하여 PCR 튜브에 옮겨 담아 사용하였다.

2.2 Single-cell PCR

*Chattonella*의 종 동정을 위해 유용한 유전체 영역들인 28S rDNA, 엽록체 핵에 존재하는 Rubisco 유전자, Ribulose bisphosphate carboxylase gene(*rbc*L)와 Photosystem I P700 chlorophyll *a* apoprotein(*psa*A)의 세 영역의 핵산염기서열 정보를 분석하였다. 득량만에서 분리한 세포 중 17세포는 28S rDNA, 5세포는 *rbc*L, 6세포는 *psa*A를 증폭하는데 사용하였다. 본 실험에 사용된 Primer 정보는 Table 1과 같다. PCR 증폭은 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix(Takara, Japan)를 이용한 PCR 완충액에 5 pmol oligonucleotide primer는 1 ㎕, 여기에 모세관 피펫을 이용해 분리한 세포를 template DNA로 첨가하고 증류수로 최종 반응 부피를 20 ㎕로 맞추었다. PCR 증폭은 ProFlex PCR System(Life Technologies, USA)를 사용하여 수행하였다. Hot-start PCR 과정으로 98℃에서 1분간 pre-denaturation을 수행하였고, 98℃에서 10초, 58℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초의 조건으로 총 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 AccuPrep PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였다. 유전자 서열 분석은 ㈜마크로젠에 의뢰하여 수행하였다.

2.3 DNA 염기서열 결정 및 계통수 작성

Chattonella 종의 28S rDNA, *rbc*L와 *psa*A의 세 영역의 염기서열 비교를 위해 결정된 염기서열과 GenBank database에 등록된 동일 분류군의 염기서열을 Blast network service를 이용하여 비교하였다. 또한 genetic distance는 Kimura 2-parameter 분석모델을 이용하여 계산하였으며, similarity score를 구하였

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used for the amplification of *Chattonella* DNA

Forward / Reverse	Name	Sequence (5'→3')	Author
Forward	D1R-F	ACCCGCTGAATTTAAGCATA	Orsini et al., 2002
Reverse	D3Ca-R	ACGAACGATTTGCACGTCAG	
Forward	psaA-F3	GCTTACCGTGTAGATCCAGTTCC	Beszteri, 2005
Reverse	psaA-R3	CCTTCTAATTTACCAACAACTG	
Forward	psaA-0223f	CA(C/T)TTTGGTCA(A/G)(C/T)TAGCAAT	
Reverse	psaA-1516r	AGYTAYGCTTTTGGKGGTGA	
Forward	rbcL-0130F	AACWACWACTTGGATTTGGAA	Modified of Yoon et al., 2002
Reverse	rbcL-1600R	GCATGAATATGMTGWACCAT	
Forward	rbcL-0068f	ACGCTAAAATGGGTTA(C/T)TGG	
Reverse	rbcL-1421r	CTAC(T/A)GATACAGC(A/T)GACTTC	

다. 계통분석은 PAUP*4.0b10을 이용하여 Kimura 2-parameter의 근린결합분석(neighbor-joining; NJ)(Saitou and Nei, 1987)을 실시하였다. 계통수의 분지에 대한 지지도를 측정하기 위해 NJ의 bootstrap 값을 1,000회 반복하였다.

28S rDNA에서는 *Heterosigma akashiwo*(GenBank acquisition AB217644, AB217645), *rbc*L와 *psa*A에서는 *H. akashiwo* (GenBank acquisition EU168190, EU168191)와 *Fibrocapsa japonica* (GenBank acquisition AX067619, JX067625)는 outer group으로 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 세포 형태 관찰

2017년 7월 득량만 중부의 표층해수에서 총 28세포의 *Chattonella*를 분리하였다. 도립현미경 하에서 관찰한 *Chattonella* 세포들의 모습은 Fig. 1와 같은 형태로 관찰이 되었다. 또한, 분리한 총 28 세포들 중 17 세포의 길이를 측정한 결과(Table 2) 장축은 평균 74.0 ± 10.1 ㎛이고 단축은 평균 33.1 ± 3.6 ㎛이었다. 기존에 보고된 *Chattonella* 세포 크기를 비교하면 *C. antiqua*는 장축 74 ~ 90 ㎛, *C. marina*는 장축 30 ~ 70 ㎛, *C. ovata*는 장축 55 ~ 65 ㎛을 보였다(Table 2). 본 연구에서는 장축 74.0 ± 10.1 ㎛으로 *C. antiqua*와 유사한 길이를 보였다. 하지만 배양조건 혹은 환경조건에 따라 *Chattonella* 세포 크기 및 형태에 변형이 발생한다고 보고되었다(Oyama and Yoshimatu, 2007). 따라서 세포 크기 및 형태만으로는 종 식별이 어려웠으며, 아래와 같이 분자계통 분석을 실시하였다.

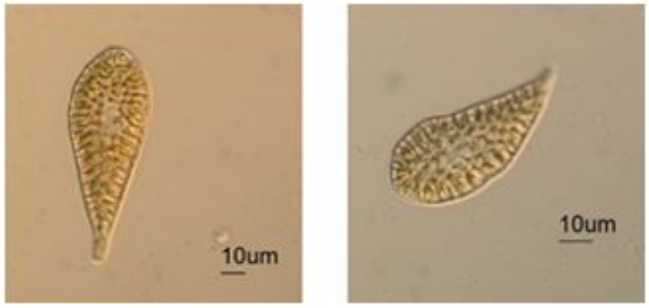


Fig. 1. Light micrographs of *Chattonella* isolated from Deungnyang Bay. Scale bar = 10 ㎛.

3.2 Single-cell PCR을 이용한 분자계통 분석

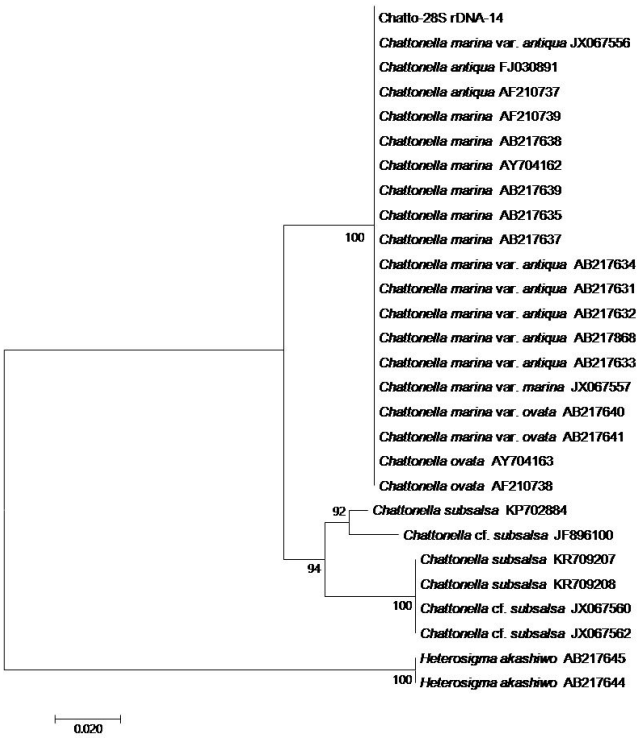
득량만 시료에서 분리한 세포 중 17세포는 28S rDNA, 5세포는 *rbc*L, 6세포는 *psa*A를 증폭하는데 사용하였다. 증폭된 산물을 0.7 % agarose gel로 전기영동한 결과, 28S rDNA에서는 10개, *rbc*L는 5개, *psa*A는 5개의 시료에서 뚜렷한 약 1 ~ 1.5 kb의 PCR 산물을 얻었다. 해당 시료를 대상으로 핵산염기서열 정보를 해독한 결과, 28S rDNA 영역에서는 848 bp, *rbc*L영역에서는 1,256 bp, *psa*A영역에서는 1,201 bp의 결과물을 얻었으며, 모두 *Chattonella*로 검색되었다. 이들 염기서열 정보는 Genbank에 Accession No. MK257155 ~ 58로 등록하였다.

최근 single-cell PCR 기법이 현장시료로부터 식물플랑크톤 종을 유전적으로 식별하는데 활용되고 있다. 예를 들면, Hamilton et al.(2015)는 single-cell PCR을 이용하여 현장시료에 있는 규조류의 *rbc*L, 18S, *psb*A 염기서열을 성공적으로 분석하여 분자계통수를 보고하였다. 본 연구에서는 *rbc*L, 28S,

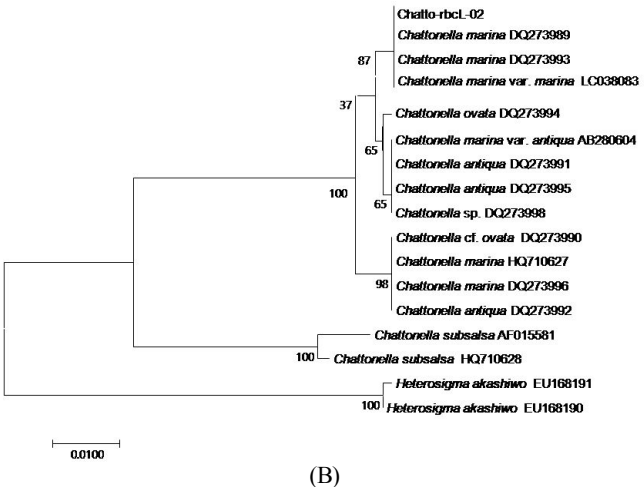
Table 2. Morphological data of *Chattonella* isolated from Deungnyang Bay (in this study) and other references

Species	Isolation source	Length (㎛)	Width (㎛)	Cell shape	Reference
Chattonella	Deungnyang Bay (n=17)	74.0±10.1	33.1±3.6	Oblong to obovoid shape	This study
Chattonella antiqua	NIES-1	80-90	30-40	with posterior tail	Hosoi-Tanabe et al., 2006
	Aichi, Japan	74.1±9.31	34.2±3.03	-	Oyama and Yoshimatsu, 2007
	Nagasaki, Japan	83.6±8.7	27.9±1.9	-	Nagasoe et al., 2011
Chattonella marina	MS-3-P	30-40	20-30	Oblong to obovoid with posterior tail	Hosoi-Tanabe et al., 2006
	Kagawa, Japan	67.7±10.04	31.2±3.89	-	Oyama and Yoshimatsu, 2007
	Nagasaki, Japan	35.2±3.5	18.9±1.8	-	Nagasoe et al., 2011
	Hokkaido, Japan	30-70	20-30	Oblong to obovoid shape with two flagella	Shimada et al., 2016
Chattonella ovata	Ovata-P	55-65	35-45	Oblong to obovoid with a shallow depression at the anterior end, no protrusion at the posterior end	Hosoi-Tanabe et al., 2006

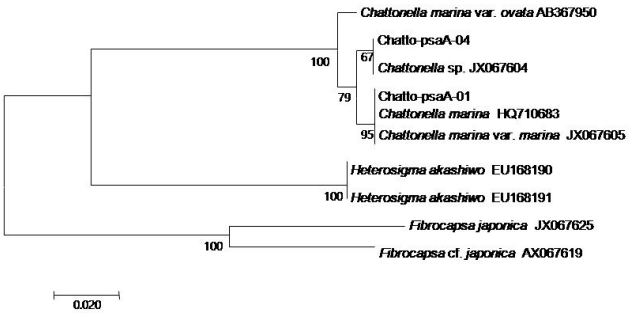
*psa*A 염기서열을 single-cell PCR로 분석하였다. 염기서열 분석결과는 Genbank에 등록되어 있는 *Chattonella*의 *rbc*L, 28S, *psa*A 유전정보를 이용하여 이들의 유전적 유사도를 비교한 결과, 28S rDNA의 유전형은 동일 분류군 간에 높은 유사도를 보였으며, *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. marina* var. *antiqua*, *C. marina* var. *marina*, *C. marina* var. *ovata*, *C. ovata* 등의 국내· 외 배양주간의 유전자형이 동일하였다(< 99.9 % 염기 유사도)(Fig. 2-A). *rbc*L영역에서는 *Chattonella* cf. *ovata*, *C. marina*, *C. antiqua* 등의 배양주와 높은 유사도를 보였다(< 99.9 % 염기유사도)(Fig. 2-B).



(A)



(B)



(C)

Fig. 2. Neighbor joining (NJ) phylogenetic trees of selected sequences of three genetic markers with accompanying base pair differences and bootstrap values. Branch lengths indicate genetic distances (scale bars are shown in individual trees). Raphidophytes other than *Chattonella* were used as outgroups (*Heterosigma akashiwo* or *Fibrocapsa japonica*). A. NJ tree of 27 selected 28S rDNA sequences of *Chattonella* species. B. NJ tree of 16 selected *rbc*L sequences of *Chattonella* species. C. NJ tree of 8 selected *psa*A sequences of *Chattonella* species.

Hirashita et al.(2000)와 Hosoi-Tanabe et al.(2006)는 *Chattonella* 중 *Chattonella marina*, *C. antiqua*, *C. ovata*의 3개 종은 광학현미경 상으로 관찰되는 형태적 특징을 통해 최초의 종 동정이 이루어졌으나, LSU rDNA를 이용하여 염기서열 비교를 한 결과 세 종은 높은 서열 유사성이 관찰된다고 보고하였다. 또한, Demura et al.(2009)는 *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata* 세 종의 형태적 동정과 더불어 ITS, *rbc*L, COI의 마커를 이용하여 유전적 다양성을 비교한 결과 *C. marina*의 경우 *C. marina* var. *antiqua*, *C. marina* var. *ovata* 등 *C. marina*의 다양한 유전적 형태로 존재함을 보고하였고, Yamaguchi et al.(2008)는 cyst에서 분리한 *C. marina*의 유전적 분석을 통해 *C. marina*의 한 가지로 C. *marina* var. *marina*를 보고하였다.

반면에, *psa*A영역에서는 각각의 염기서열 결과물이 2개의 유전자형으로 나뉘었으며, 그 2개의 유전자형들 사이에 총 5개의 위치에서 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism, SNP)이 존재하는 것으로 확인하였다(미발표 자료). 이는 계통분석 결과에서도 하나의 그룹은 C. *marina* var. *marina*, 다른 그룹은 *C. marina* var. *ovata*로 분리가 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-C). Klopper et al.(2013)는 침편모조류의 종 동정을 위해 *psa*A를 사용하여 분석을 한 결과, *C. marina*와 유사하고 염기서열 내에서의 유전적 다형성이 나타났다고 보고하였다. 이와 같이 *Chattonella* 종들 간의 유전적 형태적 특징이 매우 유사하여 최근에는 *C. antiqua*와 *C. ovata*를 *C.*

*marina*의 아종으로 분류하고 이들을 “marina complex”로 제시하고 있다(Demura et al., 2009).

4. 결 론

본 연구에서는 2017년 득량만에서 발생한 *Chattonella* 적조 시료를 대상으로 단일 세포를 분리하고, 이들 시료의 28s rDNA, *rbc*L, *psa*A영역을 대상으로 single-cell PCR 기법을 이용하여 종 동정을 실시하였다. 현미경 관찰 결과 일반적인 *Chattonella*와 유사한 형태적 특징을 보였으나 세포 크기 및 형태만으로는 종 식별이 어려웠다. 28s rDNA, *rbc*L, *psa*A 영역을 대상으로 한 염기서열 비교 결과에서는 세 영역 모두에서 *C. marina, C. marina* var. *antiqua*, *C. marina* var. *ovata*와 높은 서열 유사성을 보여 *C. marina* 혹은 아종이 득량만에서 출현함을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2018년도 국립수산과학원 수산과학연구사업(R2018030)의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

References

[1] Beszteri, B.(2005), Morphometric and molecular investigations of species limits in *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae) and closely related species, PhD dissertation, University of Bremen.

[2] Chang, F. H., M. McVeagh, M. Gall and P. Smith(2012), *Chattonella globosa* is a member of Dictyochophyceae: reassignment to *Vicicitus* gen. nov., based on molecular phylogeny, pigment composition, morpohology and life history, Phycologia, Vol. 51, No. 4, pp. 403-420.

[3] Demura, M., M-.H. Noel, F. Kasai, M. M. Watanabe and M. Kawachi(2009), Taxonomic revision of *Chattonella antiqua*, *C. marina*, and *C. ovata* (Raphidophyceae) based on their morphological characteristics and genetic diversity, Phycologia, Vol. 48, pp. 518-535.

[4] Hallegraeff, G. M. and Y. Hara(1995), Taxonomy of harmful marine raphidophytes, In: Hallegraeff GM, Anderson DM, and Cembella A (eds), Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC manuals and guides No. 33 UNESCO, pp. 365-371.

[5] Hamilton, P. B., K. E. Lefebvre and R. D. Bull(2015), Single cell PCR amplification of diatom using fresh and preserved samples, Frontiers in Microbiology, Vol. 6:1084.

[6] Hirashta, T., K. Ichimi, S. Montani, M. Nomura and S. Tajima(2000), Molecular analysis of ribosomal RNA gene of red tide algae obtained from the Seto Inland Sea, Marine Biotechnology, Vol. 2, pp. 267-273.

[7] Hosoi-Tanabe, S., I. Otake and Y. Sako(2006), Phylogenetic analysis of noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *C. ovata*, and *C. verruculosa* (Raphidophyceae) based on the rRNA gene family, Fisheries Science, Vol. 72, pp. 1200-1208.

[8] Imai, I.(2000), Current problems in classification and identification of marine raphidoflagellates (raphidophycean flagellates): from the view point of ecological study, Bulletin of the Plankton Society of Japan, Vol. 47, pp. 55-64 (in Japanese with English abstract).

[9] Imai, I. and M. Yamaguchi(2012), Life cycle, physiology, ecology and red tide occurrences of the fish-killing raphidophyte *Chattonella,* Harmful Algae, Vol. 14, pp. 46-70.

[10] Imai, I., M. Yamaguchi and Y. Hori(2006), Eutrophication and occurrences of harmful algae blooms in the Seto Inland Sea, Japan, Plankton and Benthos Research, Vol. 1, pp. 71-84.

[11] Katano, T., M. Yoshida, J. Lee, M. S. Han and Y. Hayami(2009), Fixation of *Chattonella antiqua* and *C. marina* (Raphisophyceae) using Hepes-buffered paraform aldehyde and glutaraldehyde for flow cytometry and light microscopy, Phycologia, Vol. 48, pp. 473-479.

[12] Klopper, S., U. John, A. Zingone, O. Mangoni, W. H. C. F. Kooistra and A. Cembella(2013), Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Meiterranean Sea: what is *C. subsalsa*?, European Journal of Phycology, Vol. 48, No. 1, pp. 79-92.

[13] Nagasoe, S., K. Suzuki, T. Yurimoto, R. Fuseya, T. Fukao, T. Yamatogi, K. Kimoto and Y. Maeno(2011), Clearance effects of the pacific oyster *Crassostrea gigas* on the fish-killing algae *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua,* Aquatic Biology, Vol. 11, pp. 201-211.

[14] Noh, I. H., S. J. Oh, H. H. Shin, I. S. Kang and Y. H. Yoon(2010), The effect of environmental factors on the advent of *Chattonella* (Raphidophyceae) in Yeosu coastal waters, Korea, and the effect of nutrients on the grwoth of *Chattonella,* Korean Journal of fisheries and aquatic sciences, Vol. 43, No. 4, pp. 362-372

[15] Noh, I. H., S. J. Oh, J. S. Park, H. H. Shin and Y. H.

Yoon(2009), Growth kinetics on the nutrient of the harmful algae *Chattonella marina* and *C. ovata* (Raphidophyceae) isolated from the south sea of Korea, Korean Journal of fisheries and aquatic sciences, Vol. 42, No. 6, pp. 674-682

[16] Orsini, L., D. Sarno, G. Procaccini, R. Poletti, J. Dahlmann and M. Montresor(2002), Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillsriophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species, European Journal of Phycology, Vol. 37, pp. 247-257.

[17] Oyama, K. and S. Yoshimatsu(2007). The changes in the size and form of *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* by investigating cultured strains over a long period, Bulletin of the Akashiwo Research Institute of Kagawa Prefecture, No. 6.

[18] Park, J. S., H. G. Kim and S. K. Lee(1988), Red tide occurrence and succession of its causative organisms in Jinhae Bay. Bulletin of the Fisheries Research and Devolment Agency, Vol. 41, pp. 1-26.

[19] Saitou, N. and M. Nei(1987), The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, Vol. 4, pp. 406-425.

[20] Shimada, H., S. Sakamoto, M. Yamaguchi and I. Imai(2016), First record of two warm-water HAB species *Chattonella marina* (Raphidophyceae) and *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) on the west coast of Hokkaido, northern Japan in summer 2014, Regional studies in Marine Science, Vol 7, pp. 111-117.

[21] Yamaguchi, M., H. Yamaguchi, G. Nishitani, S. Sakamoto and S. Itakura(2008), Morphology and germination characteristics of the cysts of *Chattonella ovata* (Raphidophyceae), a novel red tide flagellate in the Seto Inland Sea, Japan, Harmful Algae, Vol. 7, pp. 459-463.

[22] Yoon, H. S., J. D. Hackett and D. Bhattacharya(2002), A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflaellates through teriary endosymbiosis, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Vol. 99, pp. 11724-11729.

Received : 2018. 11. 07.
Revised : 2018. 12. 19.
Accepted : 2018. 12. 28