

Pheopolykrikos hartmannii (W. Zimmermann) Matsuoka & Fukuyo 휴면포자와 유영세포: 형태적 특징 및 계통 분류, 발아에 미치는 온도 영향

곽경윤¹, 윤주연¹, 김현정¹, 한경하^{1,2}, Li Zhun³, 신현호^{1,*}

¹한국해양과학기술원 해양시료도서관, ²한양대학교 환경과학과, ³한국생명공학연구원 생물자원센터

Resting cysts and vegetative cells of *Pheopolykrikos hartmannii* (W. Zimmermann) Matsuoka & Fukuyo (Dinophyceae): Morphology, phylogeny, and effect of temperature on germination

Kyeong Yoon Kwak¹, Joo Yeon Youn¹, Hyun Jung Kim¹, Kyong Ha Han^{1,2}, Zhun Li³ and
Hyeon Ho Shin^{1,*}

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

²Department of Environmental Science, Hanyang University, Seoul 04763, Republic Korea

³Biological Resource Center/Korean Collection for Type Cultures (KCTC), Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongseup 56212, Republic Korea

*Corresponding author

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

Received: 21 September 2022

Revised: 26 October 2022

Revision accepted: 28 October 2022

Abstract: The germination characteristics of the resting cysts of *Pheopolykrikos hartmannii* collected from the southern coastal sediments of Korea were studied at different temperature conditions, and the morphology and phylogeny of the germlings were examined. The resting cysts of *Ph. hartmannii* were round and characterized by a red accumulation body and many arrow-like spines and could germinate at temperature of 10 to 30°C. High germination rates (>90%) were observed at 15 and 20°C, indicating that the resting cysts could act as seed populations for the bloom initiation of *Ph. hartmannii* in Korean coastal waters in early summer or early fall. The morphology of the germlings was generally consistent with the previous description, and an apical groove characterized by a fully enclosed loop was observed. Phylogenetic analysis based on large SubUnit (LSU) rRNA gene sequences revealed that the germlings shared an identical sequence with the Korean and American isolates of *Ph. hartmannii* and was a sister clade of *Polykrikos* species.

Keywords: morphology, LSU rRNA, germination, temperature, *Polykrikos*, *Pheopolykrikos*

서 론

해양에서 와편모조류 (dinoflagellate)는 규조류 (diatom)

와 함께 기초생산자 (primary producer)로서 역할을 하는 중요한 생물군이지만, 연안역에서 발생하는 유해, 유독 적 조 발생 (harmful algal bloom)의 원인 중이기도 하다. Hop-

penrath *et al.* (2009)의 연구 결과에 따르면, 현존하는 약 2,500여 종의 해양 와편모조류 중 20% 정도가 생활사(life cycle) 중에 휴면포자(resting cyst)를 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 휴면포자는 유영세포와 다른 독특한 형태적 특징을 하고 있으며, 유영능력이 없고, 외벽이 유기질(organic wall)로 구성이 되어 있기 때문에, 해저 퇴적층에서 오랜 기간 보존될 수 있다(Head 1996). 그리고 수온, 염분, 영양염, 빛 등 다양한 환경요인에 의해 자극을 받아 발아(germination)하여 운동성을 가진 유영세포(vegetative cell)로 돌아갈 수 있다(Matsuoka and Fukuyo 2000).

Pheopolykrikos hartmannii (W. Zimmermann) Matsuoka & Fukuyo는 무각의 와편모조류(unarmoured dinoflagellate)로 2개의 세포가 연결된 콜로니(colony) 형태를 하고 있으며, 광합성을 하고 생활상 중에 휴면포자를 형성할 수 있다(e.g. Matsuoka and Fukuyo 1986; Hoppenrath *et al.* 2010; Tang *et al.* 2013). 이 종은 한국을 포함한 일본, 중국, 캐나다, 미국 등 전 세계 연안역에서 출현하며 보통은 낮은 농도로 관찰된다(Steidinger and Williams 1970; Godhe *et al.* 2000; Huang and Dong 2001; Gárate-Lizárraga *et al.* 2008). 하지만, Florida의 Indian River Lagoon과 한국의 진해만에서 이 종을 원인으로 한 대증식(bloom) 기록이 있다(Kim *et al.* 1990; Bady-lak and Philips 2004).

*Ph. hartmannii*는 *Polykrikos*종과 형태적으로 매우 유사하기 때문에, *Ph. hartmannii*에 관한 연구는 유영세포의 형태

와 분자계통학적 위치 규명에 관한 연구가 대부분이다(e.g. Huang and Dong 2001; Gárate-Lizárraga *et al.* 2008; Kim *et al.* 2008; Hoppenrath *et al.* 2009). 최근에는 Tang *et al.* (2013)에 의해 *Ph. hartmannii*의 농도에 따른 어류 독성 평가가 이루어졌지만, 이 종의 생리, 생태학적 성장에 대한 규명 연구는 진행되지 않았다. 특히, 한국 연안에서 *Ph. hartmannii*는 그 출현과 대발생이 기록되어 있는데도 불구하고, 휴면포자와 유영세포의 형태, 분자계통에 관한 기록이 명확하지 않고, 휴면포자의 발아에 영향을 미치는 환경요인에 대한 연구도 전무하다.

따라서, 본 연구는 남해안의 퇴적물에서 *Ph. hartmannii*의 휴면포자를 확보하여 형태적 특징을 제시하고 발아에 영향을 미치는 온도 범위를 파악하고자 하였으며, 발아 실험을 통해 나타나는 유영세포의 형태와 분자계통학적 위치를 명확히 하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 퇴적물 시료 채취와 휴면포자 분리

한국 남해역에 출현하는 와편모조류 휴면포자 관찰을 위하여 2020년 3월에 내경 5 cm의 중력코어(gravity core)를 이용하여 퇴적물을 채취하였다(Fig. 1). 채취한 코어 퇴적물은 현장에서 상부 2 cm를 분취한 후, 냉암소에 보관

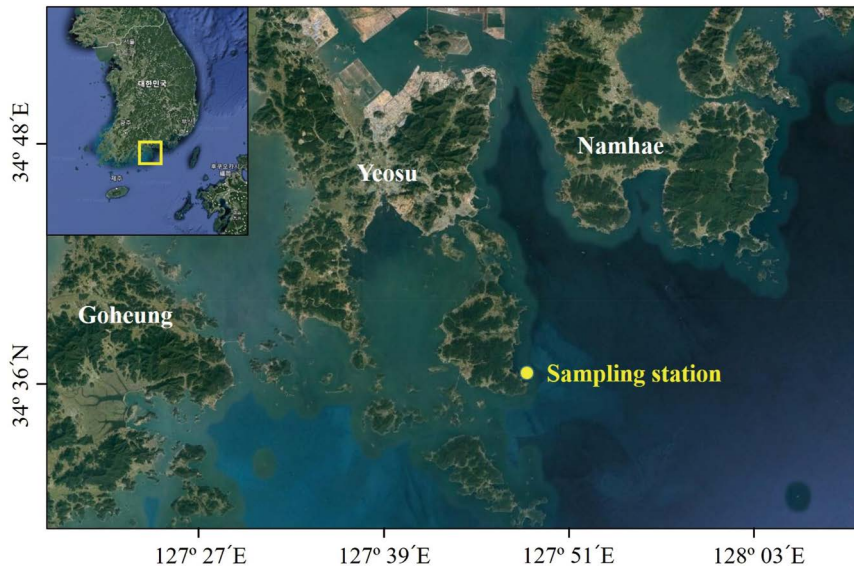


Fig. 1. Location of the sampling station on the southern coast of Korea.

하여 실험실로 운반하였다. 퇴적물로부터 휴면포자 분리는 Matsuoka and Fukuyo (2000)가 제시한 방법에 따라 진행하였다. 즉, 퇴적물 2g을 비이커에 넣고 초음파 분쇄기로 30초간 조사한 후, 120 µm와 20 µm의 중첩된 체(sieve)에서 퇴적물을 구분하였고, 20 µm에 남겨진 퇴적물은 여과 해수를 이용하여 시계접시(watch glass)에 옮긴 후 panning법을 통해 부유하고 있는 유기물을 피펫으로 확보하여 10 mL 용량의 시료병에 옮겨 담았다. 그리고 시료병에서 1 mL을 분취하여 chamber에 옮긴 후, 광학현미경(Primo Vert, Zeiss, Germany)을 이용하여 형태적 관찰과 동시에 휴면포자를 분리하였다. 시료에서 *Ph. hartmannii*의 휴면포자 분리는 Matsuoka and Fukuyo (1986), Hoppenrath *et al.* (2010)과 Tang *et al.* (2013)이 기록한 형태적 특징을 참고하였다.

2. 휴면포자의 발아 실험

시료에서 분리한 *Ph. hartmannii*의 휴면포자는 광학현미경(Primo Vert; Zeiss, Germany)을 이용하여 형태적 특징을 촬영한 후, f/2-Si 배지가 채워진 96 well plate에 접종하였다. 본 연구에서 발아 실험을 위한 온도 조건은 5°C에서 30°C까지 5°C 간격으로 진행하였다. 그리고 염분은 시료를 채집한 해역의 염분(33 psu)으로 하였으며, 광량은 100 µmol m⁻² s⁻¹, 광주기는 12L : 12D로 하여 발아 실험을 진행하였다. 본 실험에서 휴면포자는 20개씩 분리 후, 3배수로 하여 진행하였고, 발아율은 전체 휴면포자에서 발아한 휴면포자의 수를 계산하여 산출하였다.

3. 유영세포의 형태 관찰

휴면포자에서 발아한 발아체(germling)는 피펫으로 분리한 후, 광학현미경(Primo Vert; Zeiss, Germany)을 이용하여 형태적 특징을 관찰 및 촬영하였다. 그리고 주사전자현미경(JSM7600, Jeol Ltd., Tokyo, Japan)을 이용한 유영세포의 관찰을 위해, 발아체의 증식으로 확보된 시료를 사산화오스뮴(Osmium tetroxide; OsO₄) (최종농도 1%)으로 45분 동안 고정하고 초순수로 세척한 후, 농도가 다른 에탄올 시리즈(10, 30, 50, 70, 90, 99, and 99%)에서 각각 12분 탈수를 진행하였고, 임계점건조법(Critical Point Drying method)을 통해 건조시켰다. 건조된 시료는 aluminum stub에 고정하여 백금 코팅을 한 후, 유영세포의 형태를 관찰하였다.

4. Genomic DNA 추출, PCR 증폭 및 염기서열 분석

본 연구에서 유영세포의 분자계통학적 위치는 large Sub Unit (LSU) rRNA gene sequence의 분석을 통해 결정되었다. Genomic DNA의 추출은 휴면포자에서 발아한 유영세포를 피펫으로 분리하여 PCR tube에 넣고 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 진행하였다. LSU rRNA gene sequence 증폭을 위한 primer pair에서 forward primer는 D1R, reverse primer는 R2를 이용하였다(Takano and Horiguchi 2006). PCR 수행은 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 pre-denature 98°C에서 5분, denature는 98°C에서 10초, annealing은 58°C에서 15초, elongation은 65°C에서 5분으로 하여 30회로 증폭 반응을 설정하여 진행하였고, Final elongation은 65°C에서 5분으로 하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전개하고 Midori Green Advance (NIPPON Genetics, Co., Ltd., Tokyo, Japan)로 염색하여 UV하에서 DNA 밴드를 확인하였다. 정제된 PCR product clone들의 DNA sequencing은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하였고, Cycle-sequencing reaction은 ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하였다.

5. 계통 분석

계통 분석에 사용된 염기서열 정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov)를 통해 수집하였고, 발아체를 통해 확보된 염기서열을 포함한 총 50개의 염기서열이 Mega v. 7.0.26 프로그램(Kumar *et al.* 2016)으로 정렬 및 편집되었다. 확보된 배양주의 LSU rRNA gene sequence 분석을 통해 얻은 염기서열은 Genbank에 등록하였다(accession no. OP482173-7). 그 결과, 총 길이 1,221 bp의 정렬된 염기서열 자료(dataset)를 얻을 수 있었고, *Oxyrrhis marina* (EF613360)를 out group으로 하여 jModelTest version 2.1.4 프로그램으로 분석하였다(Darriba *et al.* 2012). 계통 분석은 TIM3+I+G 모델(A : C : G : T = 0.2355 : 0.2098 : 0.3007 : 0.2540; p-inv = 0.1920; gamma shape = 0.4990)을 사용하였다. 계통학적 유연관계 분석에서 베이즈 추론(BI; Bayesian Inference)은 MrBayes 3.1.2를 사용하였고, 최대우사분석(ML; Maximum-likelihood analysis)은 RAxML을 이용하였다(Ronquist and Huelsenbeck 2003; Stamatakis 2014). 최대우사분석에서 계통수의 각

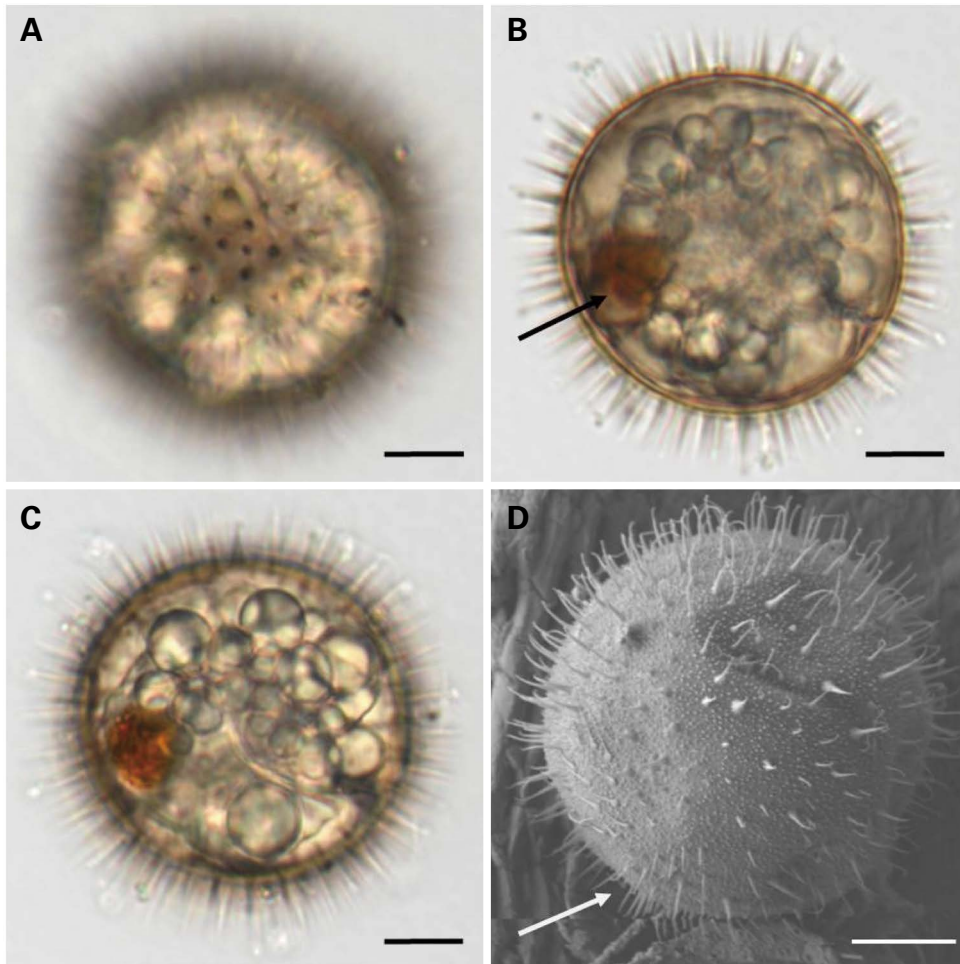


Fig. 2. Resting cyst of *Pheopolykrikos hartmannii* collected from surface sediments of the southern coast of Korea. A–C. Light micrographs of resting cysts of *Ph. hartmannii* showing spines and a red accumulation body (black arrow). D. Scanning electron micrograph of a resting cyst of *Ph. hartmannii* showing knobs and spines (white arrow). Scale bars: 10 μ m.

branch 신뢰도는 1,000회의 bootstrap으로 하였다. 이후 분석 결과를 바탕으로 각 종 간의 계통유연관계를 밝히는 분자계통도를 작성하였고, 분자계통도의 확인은 Tree-View 4.5 프로그램으로 수행하였다.

결과 및 고찰

1. *Pheopolykrikos hartmannii* 휴면포자의 형태적 특징

한국 남해역의 퇴적물에서 분리한 *Ph. hartmannii* 휴면포자의 형태는 이전 연구에서 기록된 형태적 특징과 같다 (e.g. Matsuoka and Fukuyo 1986; Steidinger and Tangen 1997;

Hoppenrath *et al.* 2010; Tang *et al.* 2013; Chai *et al.* 2020). 휴면포자는 구형으로 밝은 갈색을 띠고 있으며, 크기는 $46.60 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ($n = 5$)이다 (Fig. 2A~C). 광학현미경 관찰에서 휴면포자는 표면이 매끄럽게 보인다 (Fig. 2A~C). 하지만, 주사전자현미경 관찰에서 휴면포자의 표면은 매우 작은 혹 (knob)이 빼곡하게 분포해 있고 (Fig. 2D), 표면으로부터 돌출된 비슷한 길이의 길고 날카로운 돌기물 (spine)들도 밀집되어 분포하고 있다 (Fig. 2A~D). 그리고 그 돌기물의 길이는 $5.68 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 이다 (Fig. 2B~D). 휴면포자 내부에는 원형 질과 함께 한 개의 붉은색 색소체 (red accumulation)가 관찰되며, 그 색소체는 휴면포자의 가장자리에 위치해 있다 (Fig. 2B~C).

Ph. hartmannii 휴면포자는 형태적으로 *Echinidinium gra-*

nulatum Zonneved과 매우 유사하다(e.g. Zonneveld 1997). 하지만, *E. granulatum*은 *Ph. hartmannii*보다 크기에서 작고, 돌기물은 두꺼우며, 돌기물이 *Ph. hartmannii*처럼 밀집되어 있지 않아서 구분이 가능하다. 그리고 *Ph. hartmannii*의 유영세포와 유사한 형태적 특징을 가지는 *Polykrikos*종의 휴면포자와는 크기와 형태, 돌기물의 구조에서 구분이 된다(Matsuoka and Cho 2000; Nagai et al. 2002).

Hoppenrath et al. (2010)은 *Ph. hartmannii*의 배양에서 투명한 색상을 띠고, 연한 노란색 색소체를 가진 휴면포자를 관찰하였다. 이 형태적 특징은 한국 남해역의 퇴적물에서 확보한 *Ph. hartmannii* 휴면포자의 특징과 구분된다. 퇴적물 시료와 유영세포의 배양을 통해 생산된 휴면포자에서 형태적 차이는 이전 연구에도 기록이 되어 있다(e.g. Tang and Gobler 2012; Li et al. 2014). Tand and Gobler (2012)는 퇴적물에서 휴면포자는 생지화학적 과정(biotic or chemical process)에 의해 휴면포자의 돌기물과 장식물이 다양하게 나타날 수 있다고 하였다. 하지만, 퇴적물에서 확보된 *Ph. hartmannii* 휴면포자 돌기물은 Hoppenrath et al. (2010)이 기록한 배양주에서 생산된 휴면포자의 돌기물과 큰 차이를 보이지 않았기 때문에, 다양한 해역의 퇴적물과 배양주에서 확보된 휴면포자들의 형태적 차이에 대해 비교 연구가 필요하다.

2. 온도 변화에 따른 *Pheopolykrikos hartmannii* 휴면포자의 발아율

본 연구에서 *Ph. hartmannii* 휴면포자는 5°C를 제외한 모

든 온도 구간에서 발아하였다(Fig. 3). 발아한 온도 구간에서 발아율은 온도에 따라 다르게 나타나고, 접종 후 초기 발아 시기도 다르게 나타났다(Fig. 3A). 온도에 대한 휴면포자의 높은 발아율(> 80%)은 15°C, 20°C, 25°C에서 나타났다(Fig. 3B). 그리고 10°C에서 발아율은 63.4%, 30°C에서 발아율은 30.1%로 나타났다. 발아율이 높은 온도 구간(15°C, 20°C, 25°C)에서 휴면포자의 초기 발아는 5일 이내에 나타났고 7일 이내에 발아율은 약 80%까지 도달하였다. 하지만, 10°C에서 초기 발아는 접종 후 10일에 나타났으며, 이후 5일 이내에 발아율은 60%까지 도달하였다. 그리고 가장 낮은 발아율을 보인 30°C에서 초기 발아는 10°C에서보다 빠르게 나타났으며, 초기 발아는 접종 후 4일에 나타났다(Fig. 3A).

외편모조류가 생산한 휴면포자의 발아에는 수온, 염분, 영양염 농도, 빛, 용존산소 등 다양한 환경요인이 영향을 미친다(Kremp and Anderson 2000; Itakura and Yamaguchi 2001; Kim et al. 2002; Vahtera et al. 2014; Natsuike et al. 2017). 특히, 수온은 유독, 유해 외편모조류 휴면포자의 발아에 큰 영향을 미치고, 유영세포의 대증식(bloom)과도 밀접한 연관이 있다(Itakura and Yamaguchi 2001; Kim et al. 2002; Natsuike et al. 2017). 본 연구에서 *Ph. hartmannii* 휴면포자의 발아율이 높은 온도(15°C, 20°C, 25°C)는 한국 남해역에서 늦은 봄과 여름, 가을에 나타난다(Choi et al. 2017; KODC: Korea Oceanographic Data Center). 그리고 Tang et al. (2013)의 연구 결과에 따르면, *Ph. hartmannii* 대발생은 미국 뉴욕의 Forge 하구에서 여름과 이른 가을에 발생하고, Badylak

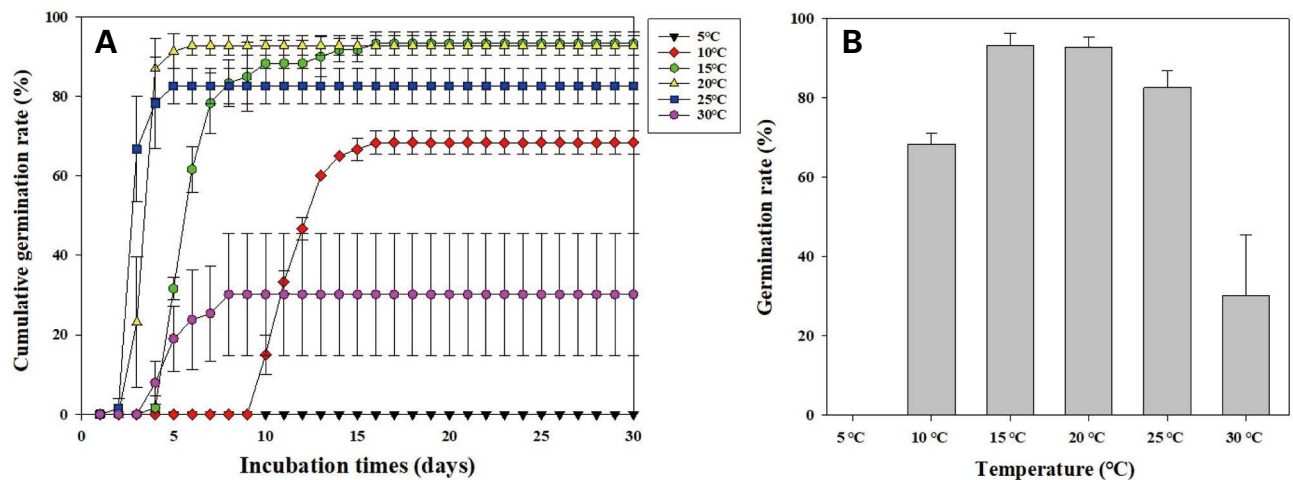


Fig. 3. Changes in the cumulative germination rates (A) and germination rates (B) of the resting cysts of *Pheopolykrikos hartmannii* at six different temperatures.

and Philips (2004)는 *Ph. hartmannii*의 대발생은 비교적 온난한 시기에 나타난다고 하였다. 즉, 수온이 높은 시기에 *Ph. hartmannii* 휴면포자 발아는 수주에서 유영세포의 대발생에 씨앗개체군 (seed population)으로서 역할을 하는 것으로 판단된다. 한국 연안에서도 1988년 여름철에 *Ph. hartmannii*의 대발생이 기록되어 있지만 (Kim *et al.* 1990), 이후 수온이 높은 시기의 *Ph. hartmannii*의 대발생은 현재까지 기록이 되어 있지 않다. 따라서, 휴면포자로부터 발아한 *Ph. hartmannii* 유영세포의 증식에는 수주에서 다양한 환경요인에 의해 결정되는 것으로 추정된다.

Ph. hartmannii 휴면포자의 온도에 대한 발아 실험에서 흥미로운 결과는 높은 온도 ($\geq 15^{\circ}\text{C}$)에서는 초기 발아가 5일 이내에 시작되고, 낮은 온도 (10°C)에서는 초기 발아가

접종 후 10일째부터 나타난다는 것이다. 일반적으로 외편모조류의 휴면포자는 종마다 다른 휴면기를 가지는 것으로 알려져 있다 (Pfiester 1977; Anderson and Keafer 1987; Pfiester and Anderson 1987; Perez *et al.* 1998). 하지만, 현재까지 *Ph. hartmannii*의 휴면기에 대한 기록은 없다. 본 연구에서 *Ph. hartmannii* 휴면포자는 퇴적물에서 분리되었기 때문에, 남해역의 퇴적물을 고려한다면 (e.g. Shin *et al.* 2012), 충분한 휴면기를 가졌을 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고, 온도에 따른 초기 발아 시기는 차이를 보인다. 이 결과는 충분한 휴면기를 가진 휴면포자라 하더라도 발아가 가능한 적정 수온에서 발아능 (germination capability) 형성까지 일정 시간 (약 5일)이 소요되고, 그 발아능 형성은 낮은 수온보다 높은 수온에서 빨리 나타나는 것으로 나타난다.

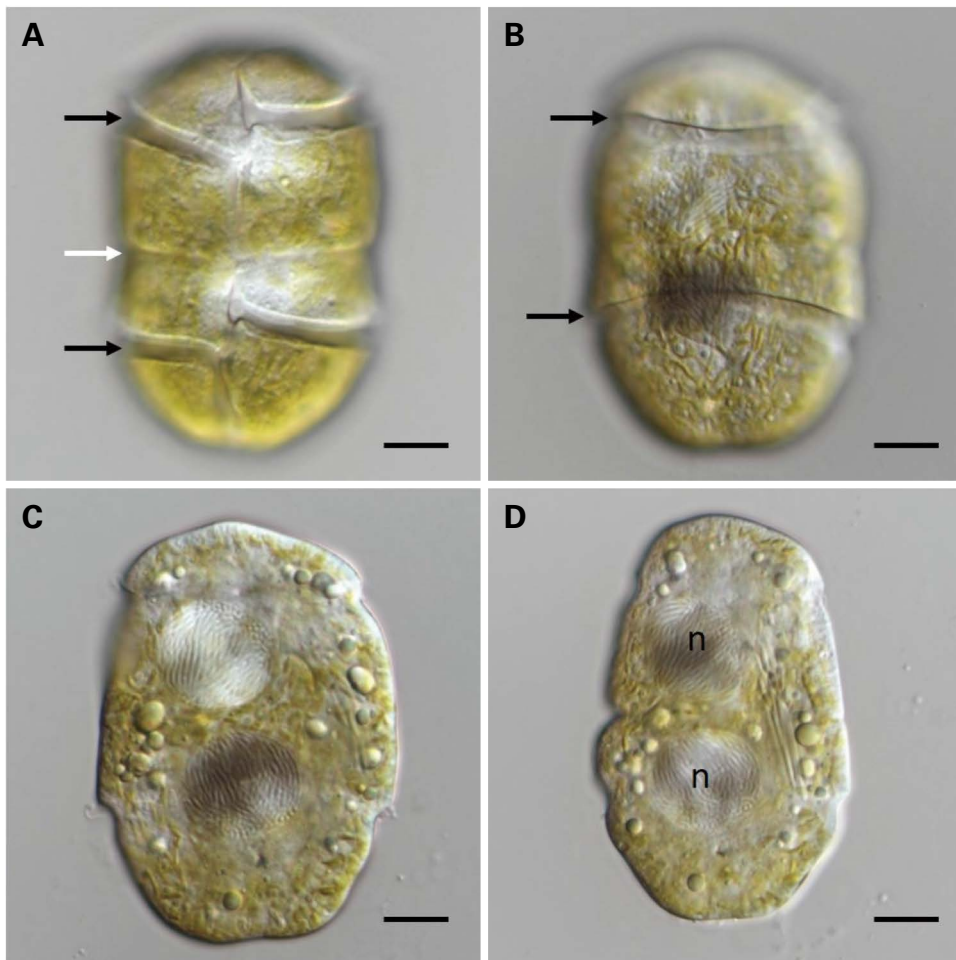


Fig. 4. Light micrographs of germling cells from the resting cysts of *Pheopolykrikos hartmannii*. A, B. Ventral and dorsal view of a colony of two cells showing two transverse furrows (black arrows) and the visible border between the two zooids (white arrow). C, D. Deep focus of dorsal and left lateral view showing two nuclei (n). Scale bars: 10 μm .

3. *Pheopolykrikos hartmannii* 유영세포의 형태적 특징과 계통 분류

휴면포자에서 발아한 유영세포의 형태적 특징과 계통도를 Figs. 4~6에 나타내었다. 유영세포의 형태적 특징은 이전에 기록된 *Ph. hartmannii*와 일치하였다(Matsuoka and Fukuyo 1986; Hoppenrath *et al.* 2010; Tang *et al.* 2013; Chai *et al.* 2020). 세포는 2개의 세포로 된 콜로니(two-celled colony) 형태로 관찰되었고(Fig. 4), 콜로니 사이로 경계가 뚜렷이 나타났다(Fig. 4A). 색상은 옅은 노랑색을 띠고 있었으며, 크기는 폭이 $33.52 \pm 2.1 \mu\text{m}$ ($n=12$), 길이가 $59.03 \pm 5.8 \mu\text{m}$ 로 타원형의 형태를 하고 있었다. 전방세포(anterior cell)에서 상각과 후방세포(posterior cell)에서 하각은 둥글고, 정면에서 넓은 cingulum이 각 콜로니에서 1개씩, 2개가 관찰되었다(Fig. 4A, B). Cingulum은 정면에서 넓이가 1.5~2배 정도 뒤틀려 있었다(Figs. 4A and 5A). Sulcus는 좁고 각 클로니의 epicone까지 연결되어 있었다. 2개의 핵(nucleus)이 뚜렷하게 관찰되었으며, 전방세포의 하각(hypocone), 후

방세포의 상각(epicone)에서 관찰되었다(Fig. 4C, D). 광학 현미경하에 관찰된 세포의 외형에서 나타난 특징은 주사전자 현미경 관찰에서는 두 개의 cingulum 위에 두 개의 횡편모가 관찰되었고(Fig. 5A, C, D), 전방세포의 상추구에서 고리 모양의 apical groove가 관찰되었다(Fig. 5E, F). 고리 모양의 apical groove는 닫혀 있었으며, sulcus와 연결되어 있었다.

휴면포자로부터 발아한 유영세포의 염기서열 분석 결과 미국과 이전에 한국 연안에서 확보된 분리주(isolate)의 염기서열과 일치하였다(Fig. 6). 그리고 이 분기군은 *Polykrikos lebourae*와 *P. schwartzii*와 *P. kofoidii*와 근연 관계로 확인되었다.

*Ph. hartmannii*는 Zimmermann (1930)에 의해 *P. hartmannii*로 형태적 특징이 최초로 기록되었다. 이후 Matsuoka and Fukuyo (1986)은 *Ph. hartmannii*가 *Polykrikos*종과 구분이 되는 형태적 차이와 자가영양성의 특징을 바탕으로 *P. hartmannii*를 *Ph. hartmannii*로 기록하였지만, Hoppenrath

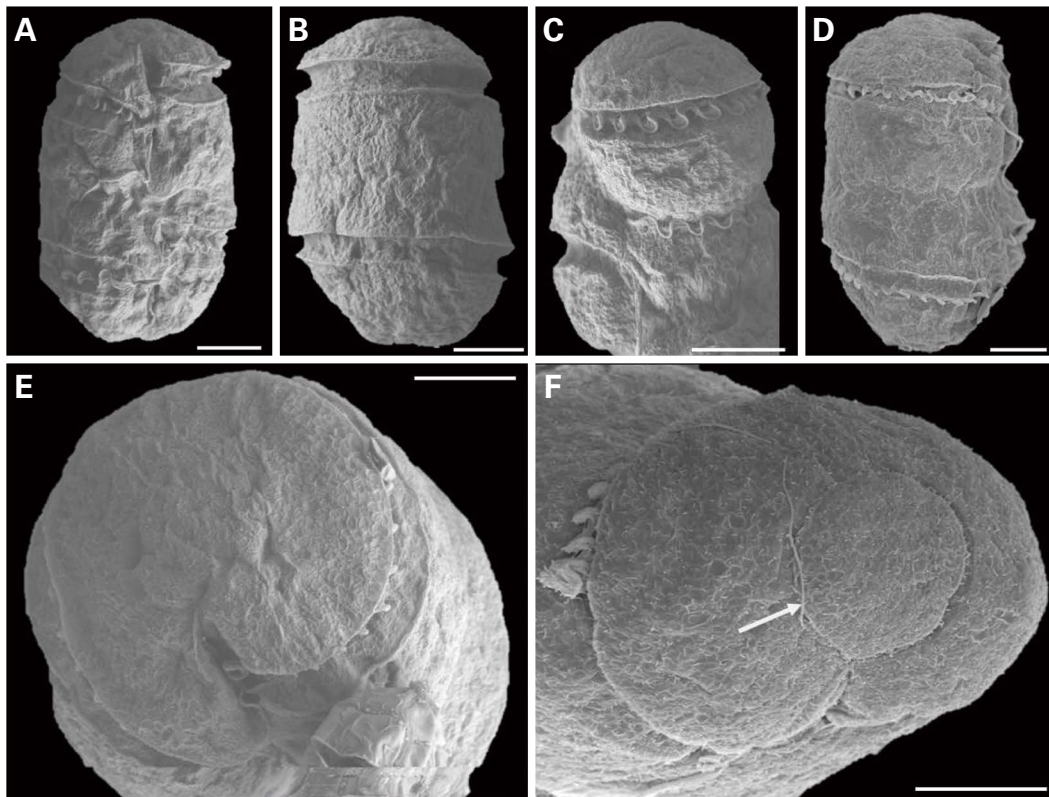


Fig. 5. Scanning electron micrographs (SEM) of germling cells from the resting cysts of *Pheopolykrikos hartmannii*. A. Ventral view, B. Dorsal view, C. Left lateral view, D. Right lateral view, E. Antapical view, and F. Apical view with apical groove (white arrow). Scale bars: 10 μm .

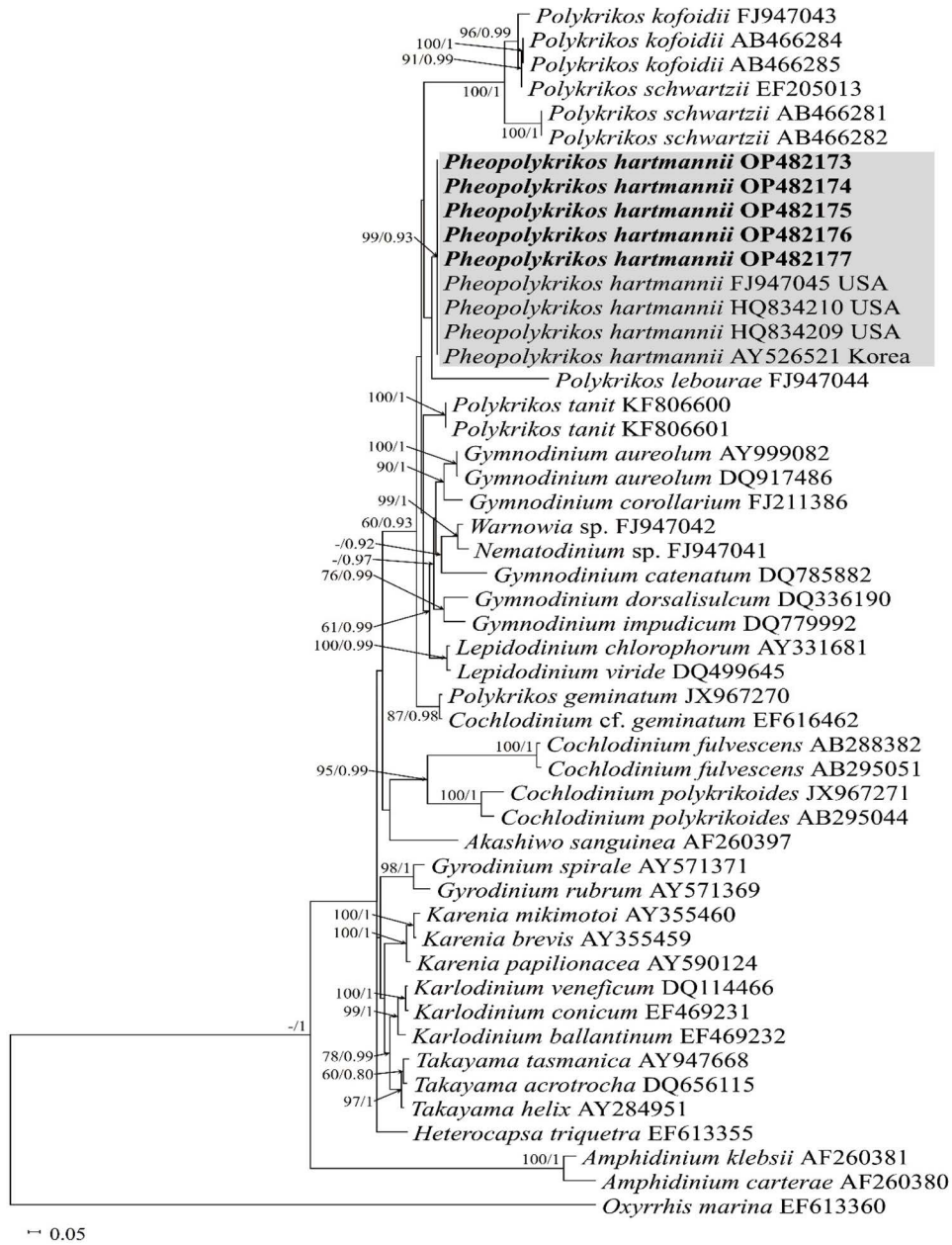


Fig. 6. Maximum-likelihood phylogenetic tree for germling cells from the resting cysts of *Pheopolykrikos hartmannii* based on LSU rRNA gene sequences. Sequences newly acquired in this study are shown in bold. *Oxyrrhis marina* was used as the outgroup. Scale bar: number of nucleotide substitutions per site.

et al. (2010)은 투과전자현미경 관찰에서 나타나는 *Ph. hartmannii*와 *Polykrikos*종의 초미세구조(ultrastructure)에서 유사성을 바탕으로 재차 *Ph. hartmannii*를 *P. hartmannii*로 기록하였다. 이런 상황에서, Tang et al. (2013)은 *Ph. hartmannii*의 분자계통학적 위치와 주사전자현미경을 통해 관찰되는 apical groove의 형태에서 *Ph. polykrikos*가 *Polykrikos*종

과 구분이 되는 것을 확인하고, 재차 *P. hartmannii*를 *Ph. hartmannii*로 기록하였다. 본 연구에서도 휴면포자에서 발아한 발아체는 Tang et al. (2013)이 기록한 apical groove의 형태를 가지고 있었으며 (Fig. 5E, F), 그 발아체는 또한 Matusoka and Fukuyo (1986)가 기록한 *Ph. hartmannii*의 형태적 특징을 가지고 있다.

와편모조류는 종에 따라 다양한 형태를 가진 휴면포자를 형성할 수 있다(Matsuoka and Fukuyo 2000). 최근에는 이런 휴면포자의 형태적 차이가 와편모조류의 분류 연구에 중요한 데이터로 이용되고 있다(e.g. Shin *et al.* 2014; Mertens *et al.* 2019; Li *et al.* 2020; Shin *et al.* 2021; Gu *et al.* 2022). 본 연구와 이전의 연구 결과에서 기록된 것과 같이 *Ph. hartmannii*의 휴면포자는 구형이고 가늘고 긴 돌기물(spine)을 가진다. 하지만, *Polykrikos*종의 휴면포자는 타원형이고, 그 물망 모양 혹은 가로형 줄무늬 모양의 돌기물을 가지기 때문에, 형태적으로 *Ph. hartmannii*의 휴면포자와 뚜렷하게 구분이 된다(e.g. Matsuoka *et al.* 2009; Tillmann and Hoppenrath 2013). 따라서, Zimmermann이 기록한 *P. hartmannii*는 *Ph. hartmannii*로 기록되어야 할 것으로 판단된다.

적 요

한국 남해역의 퇴적물에서 분리한 *Pheopolykrikos hartmannii* 휴면포자는 구형으로 밝은 갈색을 띠고 있으며, 표면에는 길고 날카로운 돌기물이 관찰되고 내부에는 원형 질과 함께 한개의 붉은색 색소체(red accumulation)가 있다. 이 휴면포자는 5°C를 제외하고, 10°C에서 30°C 사이의 온도에서 발아하였고, 15°C와 20°C에서 높은 발아율(>90%)을 보였다. 휴면포자로부터 발아한 유영세포는 2개의 세포로 된 콜로니(two-celled colony) 형태로 관찰되었고, 전방세포의 상추구에서 고리 모양의 apical groove가 관찰되었다. 그리고 분자계통 분석 결과, *Pheopolykrikos hartmannii*는 *Polykrikos*종과 근연 관계로 확인되었다.

CRedit authorship contribution statement

KY Kwak: Formal analysis, data curation, writing-original draft and writing-review & editing. JY Youn: Investigation and data curation. HJ Kim: data curation. KH Han: Investigation and data curation. Z Li: data curation. HH Shin: Formal analysis, Experiment design, data curation, writing-original draft and writing-review & editing.

사 사

본 연구는 해양생물 마이크로바이옴 분석과 적용 연구를 통한 마린바이오텍스 개발사업(20210469)과 해양생명

자원기탁등록보존기관 운영사업(2022M01100), 한국연구재단의 한국형 광합성 미생물 소재 확보 및 활용 협력 센터 사업(NRF-2022M3H9A1083416)의 연구비로 수행되었음.

REFERENCES

- Anderson DM and BA Keafer. 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Nature* 325:616–617. <https://doi.org/10.1038/325616a0>
- Badylak S and EJ Philips. 2004. Spatial and temporal patterns of phytoplankton composition in subtropical coastal lagoon, the Indian River Lagoon, Florida, USA. *J. Plankton Res.* 26:1229–1247. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh114>
- Chai ZY, ZX Hu, YY Liu and YZ Tang. 2020. Proof of homothally of *Pheopolykrikos hartmannii* and details of cyst germination process. *J. Oceanol. Limnol.* 38:114–123. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-9077-x>
- Choi MH, HS Seo and DS Kim. 2017. A study on the distribution of summer water temperatures of the central coast of the southern sea of Korea using numerical experimentation. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.* 23:83–90. <https://doi.org/10.7837/kosomes.2017.23.1.083>
- Darriba D, GL Taboada, R Doallo and D Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Gárate-Lizárraga I, CJ Band-Schmidt and T Grayeb del Alamo. 2008. Myrionecta, *Gyrodinium* and *Katodinium* bloom in Gulf of California. *Harmful Algae News* 37:6–7.
- Godhe A, I Karunasagar, I Karunasagar and B Karlson. 2000. Dinoflagellate cysts in recent marine sediments from SW India. *Bot. Marina* 43:39–48. <https://doi.org/10.1515/BOT.2000.004>
- Gu H, KN Mertens, A Derrien, G Bilien, Z Li, P Hess, V Séchet, B Krock, A Amorim, Z Li, V Pospelova, KF Smith, L MacKenzie, JY Youn, HJ Kim and HH Shin. 2022. Unraveling the *Gonyaulax baltica* species complex: Cyst-theca relationship of *Impagidinium variaseptum*, *Spiniferites pseudodelicatus* sp. nov. and *S. ristingensis* (Gonyaulacaceae, Dinophyceae), with descriptions of *Gonyaulax bohaisensis* sp. nov., *G. amoyensis* sp. nov. and *G. portimonensis* sp. nov. *J. Phycol.* 58:465–486. <https://doi.org/10.1111/jpy.13245>
- Head MJ. 1996. Modern dinoflagellate cysts and their biological affinities. pp. 1197–1248. In: *Palynology: Principles and Applications* (Jansonius J and DC McGregor, eds.). American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation.
- Hoppenrath M, M Elbrachter and G Drebes. 2009. Marine phytoplankton, selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. *J. Phycol.* 46:622–625.

- <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00842.x>
- Hoppenrath M, N Yubuki, TR Bachvaroff and BS Leander. 2010. Re-classification of *Pheopolykrikos hartmannii* as *Polykrikos* (Dinophyceae) based partly on the ultrastructure of complex extrusomes. Eur. J. Protistol. 46:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2009.08.003>
- Huang CJ and QX Dong. 2001. Taxonomic and biological studies on organisms causing a large scale red tide in Zhujiang River Estuary in spring, 1998 III. Oceanol. Limnol. Sin. 32:1–6. https://doi.org/10.1142/9789812799555_0001
- Itakura S and M Yamaguchi. 2001. Germination characteristics of naturally occurring cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Hiroshima Bay, Inland Sea of Japan. Phycologia 40:263–267. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-3-263.1>
- Kim HG, JS Park and SG Lee. 1990. Coastal algal blooms caused by the cyst-forming dinoflagellates. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 23:468–474.
- Kim KY, M Iwataki and CH Kim. 2008. Research Note: Molecular phylogenetic affiliations of *Dissodinium pseudolunula*, *Pheopolykrikos hartmannii*, *Polykrikos* cf. *schwartzii* and *Polykrikos kofoidii* to *Gymnodinium sensu stricto* species (Dinophyceae). Phycol. Res. 56:89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00489.x>
- Kim YO, MH Park and MS Han. 2002. Role of cyst germination in the bloom initiation of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Masan Bay, Korea. Aquat. Microb. Ecol. 29:279–286. <https://doi.org/10.3354/ame029279>
- Kremp A and DM Anderson. 2000. Factors regulating germination of resting cysts of the spring bloom dinoflagellate *Scrippsiella hangoei* from the northern Baltic Sea. J. Plankton Res. 22:1311–1327. <https://doi.org/10.1093/plankt/22.7.1311>
- Kumar S, G Stecher and K Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Li Z, K Matsuoka and HH Shin. 2020. Revision of the life cycle of the harmful dinoflagellate *Margalefidinium polykrikoides* (Gymnodiniales, Dinophyceae) based on isolates from Korean coastal waters. J. Appl. Phycol. 32:1863–1873. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02125-0>
- Li Z, MS Han, K Matsuoka, SY Kim and HH Shin. 2014. Identification of the resting cyst of *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae, Gymnodiniales) in Korean coastal sediments. J. Phycol. 51:204–210. <https://doi.org/10.1111/jpy.12252>
- Matsuoka K and HJ Cho. 2000. Morphological variation in cysts of the gymnodinialean dinoflagellate *Polykrikos*. Micropaleontology 46:360–364.
- Matsuoka K and Y Fukuyo. 1986. Cyst and motile morphology of a colonial dinoflagellate *Pheopolykrikos hartmannii* (Zimmermann) comb. nov. J. Plankton Res. 8:811–818. <https://doi.org/10.1093/plankt/8.4.811>
- Matsuoka K and Y Fukuyo. 2000. Technical Guide for Modern Dinoflagellate Cyst Study. WESTPAC-HAB, Japan Society for the Promotion of Science. Tokyo, Japan. p. 43.
- Matsuoka K, H Kawami, S Nagai, M Iwataki and H Takayama. 2009. Re-examination of cyst-motile relationships of *Polykrikos kofoidii* Chatton and *Polykrikos schwartzii* Bütschli (Gymnodiniales, Dinophyceae). Rev. Palaeobot. Palynology 154:79–90. <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2008.12.013>
- Mertens KN, H Gu, PR Gurdebeke, Y Takano, D Clarke, H Aydin, Z Li, V Pospelova, HH Shin, Z Li, K Matsuoka and MJ Head. 2019. A review of rare, poorly known, and morphologically problematic extant marine organic-walled dinoflagellate cyst taxa of the orders Gymnodiniales and Peridiniales from the Northern Hemisphere. Mar. Micropaleontol. 159:101773. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2019.101773>
- Nagai S, Y Matsuyama, H Takayama and Y Kotani. 2002. Morphology of *Polykrikos kofoidii* and *P. schwartzii* (Dinophyceae, Polykrikaceae) cysts obtained in culture. Phycologia 41:319–327. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-4-319.1>
- Natsuike M, K Yokohama, G Nishitani, Y Yamada, I Yoshinaga and A Ishikawa. 2017. Germination fluctuation of toxic *Alexandrium fundyense* and *A. pacificum* cysts and the relationship with bloom occurrences in Kesenuma Bay, Japan. Harmful Algae 62:52–59. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.018>
- Perez CC, S Roy, M Levasseur and DM Anderson. 1998. Control of germination of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) cysts from the lower St Lawrence Estuary (Canada). J. Phycol. 34:242–249. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340242.x>
- Pfiester LA. 1977. Sexual reproduction of *Peridinium gatouense* (Dinophyceae). J. Phycol. 13:92–95. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1977.tb02893.x>
- Pfiester LA and DM Anderson. 1987. Dinoflagellate reproduction. pp. 611–648. In: The Biology of Dinoflagellates (Botanical Monographs, Vol. 21) (Taylor FJR, ed.). Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.
- Ronquist F and JP Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19:1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Shin HH, JS Park, YO Kim, SH Baek, DI Lim and YH Yoon. 2012. Dinoflagellate cyst production and flux in Gamak Bay, Korea: A sediment trap study. Mar. Micropaleontol. 94:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2012.06.005>
- Shin HH, Z Li, YO Kim, SW Jung, MS Han, WA Lim and YH Yoon. 2014. Morphological features and viability of *Scrippsiella trochoidea* cysts isolated from fecal pellets of the polychaete

- Capitella* sp. Harmful Algae 28:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.005>
- Shin HH, Z Li, HJ Kim, BS Park, JH Lee, AY Shin, TG Park, KW Lee, KH Han, JY Youn, KY Kwak, MH Seo, DK Kim, MH Son, DJ Kim, KS Shin and WA Lim. 2021. *Alexandrium catenella* (Group I) and *A. pacificum* (Group IV) cyst germination, distribution, and toxicity in Jinhae-Masan Bay, Korea. Harmful Algae 110:102122. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2021.102122>
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Steidinger KA and J Williams. 1970. Dinoflagellates. Memoirs of the Hourglass Cruise Volume II. Marine Research Laboratory, Florida Department of Natural Resources. St. Petersburg, FL. p. 251.
- Steidinger KA and K Tangen. 1997. Dinoflagellates. pp. 387–584. In: Identifying Marine Phytoplankton (Tomas CR, ed.). Academic Press. San Diego, CA.
- Takano Y and T Horiguchi. 2006. Acquiring scanning electron microscopical, light microscopical and multiple gene sequence data from a single dinoflagellate cell. J. Phycol. 42: 251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00177.x>
- Tang YZ and CJ Gobler. 2012. The toxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) produces resting cysts. Harmful Algae 20:71–80. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.08.001>
- Tang YZ, MJ Harke and CJ Gobler. 2013. Morphology, phylogeny, dynamics, and ichthyotoxicity of *Pheopolykrikos hartmannii* (Dinophyceae) isolates and blooms from New York, USA. J. Phycol. 49:1084–1094. <https://doi.org/10.1111/jpy.12114>
- Tillmann U and M Hoppenrath. 2013. Life cycle of the pseudo-colonial dinoflagellate *Polykrikos kofoidii* (Gymnodiniales, Dinoflagellata). J. Phycol. 49:298–317. <https://doi.org/10.1111/jpy.12037>
- Vahtera E, BG Crespo, DJ McGillicuddy Jr, K Olli and DM Anderson. 2014. *Alexandrium fundyense* cyst viability and germling survival in light vs. dark at a constant low temperature. Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr. 103:112–119. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.05.010>
- Zimmermann W. 1930. Neue und wenig bekannte Kleinalgen von Neapel I–V. Zeitschrift für Botany 23:419–442.
- Zonneveld KAF. 1997. New species of organic walled dinoflagellate cysts from modern sediments of the Arabian Sea (Indian Ocean). Rev. Palaeobot. Palynology 97:319–337. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(97\)00002-X](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(97)00002-X)