



BSPE99512-11488-3

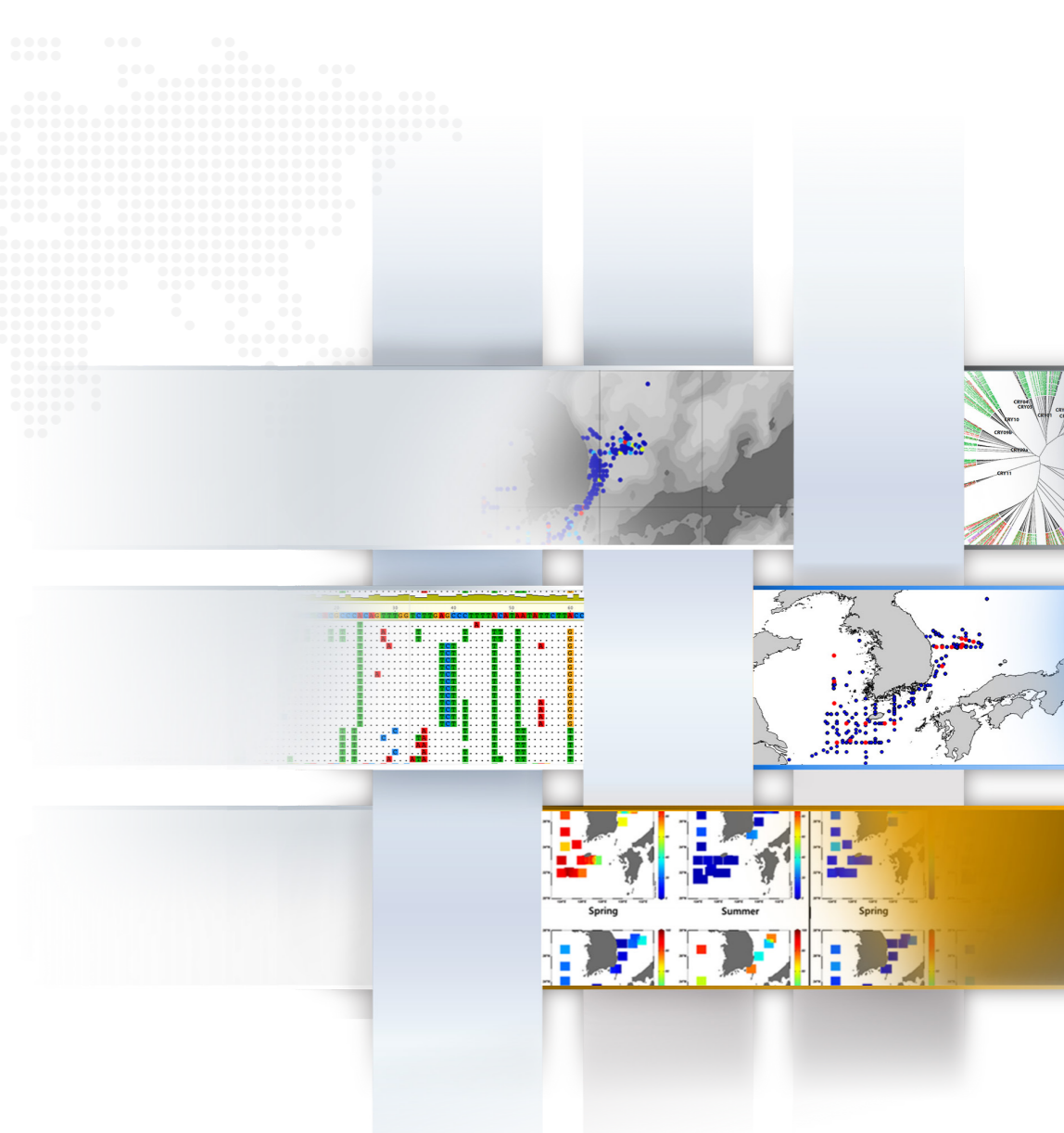
해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구

2018.2

KIOST 한국해양과학기술원

# 해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구

2018. 2



해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구  
2018. 2

### [ 주의 ]

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

**KIOST** 한국해양과학기술원  
KOREA INSTITUTE OF OCEAN SCIENCE & TECHNOLOGY  
 49111 부산광역시 영도구 해양로 385 (동삼동 1166)  
 Tel : 051-664-3000 Fax : 051-405-9330 www.kiost.ac.kr

**KIOST** 한국해양과학기술원  
KOREA INSTITUTE OF OCEAN SCIENCE & TECHNOLOGY

# 해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구

2018. 2

# 제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2018. 2.

총괄연구책임자 : 노재훈

참 여 연 구 원 : 김은영, 김지훈, 안성민,  
양원석, 양은찬, 유장연,  
이연정, 이호원, 조성태,  
조혜경, 최동한, 현명진



## 보고서 요약

|  |                       |   |                                  |             |  |
|--|-----------------------|---|----------------------------------|-------------|--|
| 과제고유번호   | E99512                | 해당단계<br>연구기간  | 2015.01.01. -<br>2017.12.31      | 단계 구분       | 없음   |
| 연구사업명  | 중사업명                  | 기관고유사업  |                                  |             |  |
|  | 세부사업명                 | 주요사업 (고유임무형사업)  |                                  |             |  |
| 연구과제명  | 중과제명                  | 바다자원찾기: 지속가능한 해양생태계관리 및 미래유용자원<br>탐색활용                              |                                  |             |  |
|  | 세부과제명                 | 해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구  |                                  |             |  |
| 연구책임자  | 노재훈                   | 해당단계<br>참여연구원   | 총 : 47 명<br>내부: 12 명<br>외부: 35 명 | 해당단계<br>연구비 | 정부: 404,000 천원<br>기업: 0 천원<br>계 : 404,000 천원 |
|  |                       | 총 연구기간<br>참여연구원   | 총 : 47 명<br>내부: 12 명<br>외부: 35 명 | 총 연구비       | 정부: 404,000 천원<br>기업: 0 천원<br>계 : 404,000 천원 |
| 연구기관 및<br>소속부서   | 한국해양과학기술원<br>생태기반연구센터 |   | 참여기업명                            | 없음          |  |
| 요 약  |                       |   |                                  | 보고서면수       | 104  |
| <p>해양생태계의 미세조류는 일차생산자로서 유기물을 생성, 먹이망 유지, 물질순환 등 해양 생태계의 주요 기능을 담당하고 있다. 지역적 및 전지구적 환경변화에 따른 급격한 변동이 지속적으로 해양생태계에 영향을 주고 있으며 주요 구성원인 광합성 미세조류 다양성도 급변하고 있어 미래의 해양생태계 구조 및 기능적 변화가 예측된다. 본 연구의 목적은 우리나라 주변해의 광합성 미세조류 다양성 현황 자료구축을 통하여 현재 해양생태계의 구조 및 기능을 이해하고 미래변화에 대응하며 관련 연구발전을 위한 기반 연구환경 조성에 있다.</p> <p>NGS 분석기술을 적용하여 우리나라 주변해의 미세조류 다양성 현황정보 (2003-2017년 719개 정점 3,000여개 시료 분석)를 확보하였으며, 데이터베이스 (592 정점 4078 시료 정보)를 구축하였다. 미세조류의 시공간적 변동성 분석을 통하여 우리나라 주변해 진핵성 미세조류가 계절 및 지역별 큰 변이를 나타냄을 확인하였다. 초미소남세균은 <i>Synechococcus</i> clades I, II, IV가 우점하였다. 봄철 표층수에는 Mamiellophyceae 녹조류가 동중국해와 동해에는 규조류가 우점하였다. 여름에는 표층과 수심 20 m 모두 Prymnesiophyceae 착편모조류가 가장 우점하였다. 가을에는 녹조류와 착편모조류가 우점하였으며, 겨울에는 녹조류가 가장 우점하였다. 태안 근소만 저서성 돌말류 52종 64배양주를 확보하며 비교분석하여 색소체 <i>rbcL</i> 유전자의 분자마커 가용성을 검증하였다. 2011-2012년 갯벌시료의 NGS 분석으로 저서성 규조류 3강 30목 57과 140속 445 분류군의 970만 reads를 확보 비교분석하여 지점 및 시기별 군집변동을 확인하였다. 우리나라 주변해 난류성 와편모조류의 분포과정 분석을 통하여 5개 군집 11속 98종을 확인하였으며, 하계 동중국해 장강저염수의 확장이 고온고염종의 복상을 제한하는 주요요인임을 밝혔다. 기능 유형별 식물플랑크톤 다양성 연구에서는 우리나라 해역별 질소고정세균 분포 차이를 확인하였다. 동중국해 쿠로시오 분지류 영향해역에서는 Prymnesiophyceae와 공생하는 UcinA 그룹 및 사상체 질소고정자인 <i>Trichodesmium</i> 등 남세균 계통이 50% 이상을 차지하였다. 우리나라 주변해 춘계중식 은편모조류 다양성 분석을 위한 분자마커 개발에는, 40개의 주요 배양주를 확보하여 이용하였다. 총 14개 유전자 정보를 비교분석하여 다양성 연구를 위한 최적의 분자마커로 <i>rbcL</i>, <i>psaA</i> 및 <i>dnaK</i>를 제안하였다. 우리나라 주변해 시료의 은편모조류 <i>rbcL</i> amplicon 분석을 통하여 동해, 서해 및 남해 춘계대중식 후보 7개 clades를 확인하였다. 착편모조류의 분자마커 탐색 및 다양성 분석에는 24개 배양주 31개 미토콘드리아 및 색소체 유전자를 선정하여 비교분석하였다. 변이를 고려하여 <i>rbcL</i>을 선정하였으며, <i>rbcL</i> amplicon 분석 결과, 우리나라 인근해 착편모조류는 6개의 알려진 clades와 최소 9개의 unidentified clades로 구성됨을 발견하였다.</p> <p>본 연구를 통하여 우리나라 주변해의 광합성 미세생물 다양성에 대한 체계적인 기초자료를 확보하였다. 본 자료는 우리나라 주변 해양생태계 미세조류 현황을 이해하고, 기후변화에 따른 미래 해양생태계 구조 및 기능 변화를 예측하고 대응하기 위한 기초자료로 활용될 것이다.</p> |                       |   |                                  |             |  |
| 색인어  | 한 글                   | 일차생산자, 미세조류 다양성, 해양생태계, 기후변화  |                                  |             |  |
|  | 영 어                   | Primary producer, algal diversity, marine ecosystem, climate change |                                  |             |  |



# 요 약 문

## I. 제목

해양 서식처별 일차생산자 다양성의 계절적 특성 연구

## II. 연구의 목적 및 필요성

### 1. 연구목적

한반도 주변해의 광합성 미세조류 다양성 현황 자료 구축을 통하여 현재 해양생태계의 구조 및 기능을 이해하고 미래 변화에 대응하며 관련 연구 발전을 위한 기반 연구환경 조성

### 2. 연구목표

- 한반도 주변해 광합성 미세조류 다양성 현황 파악
- 미세조류 다양성의 시·공간적 변화 특성 이해
- 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 현황 파악

### 3. 연구개발의 필요성

- 기후변화에 따른 해양생태계 변화를 관리·예측하기 위해 주요 구성원의 현재 구조 및 기능 다양성에 대한 기초자료의 확보가 필요함
- 해양식물플랑크톤은 유기물합성과 에너지 및 물질순환의 핵심기능을 하는 기능그룹으로써, 생태변동 모델화를 위한 핵심정보를 제공할 것임

- 우리나라 주변해의 광합성 미세조류의 다양성 현황 파악이 미비하며, 해양 아열대화, 산성화 등 주변해 주요 환경변화 및 생물상 변동 대응을 위한 광역자료기반 구축이 필요함

### Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

- 한반도 주변해의 미세조류 다양성 현황 파악
  - 다양한 조합의 분석기술 (microscopy, flow cytometry, FlowCAM, HPLC)을 이용한 분류군별 미세조류 다양성 분석
  - 차세대 염기서열 분석기술 (NGS)을 이용한 다양성 자료 대량 생산
  - 다양한 분류군으로 NGS 기술 이용 확대
  - 해양 서식처별 미세조류 종 목록 작성
- 미세조류 다양성의 시·공간적 변화 특성 이해
  - 미세조류 다양성의 서식지별 계절변화 특성 파악
  - 해류에 의한 다양성 변화 및 생물다양성 집중지역 (biodiversity hotspot) 파악
  - 난류 기원 아열대화 지표종의 선정 및 분포 특성 파악
- 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 현황 파악
  - 기능 유전자를 이용한 PFTs 다양성 분석
  - 기능유형별 식물플랑크톤 (PFTs)의 다양성 현황 자료 구축을 통해 미래 해양 생태계의 주요 기능변화 연구를 위한 기반 환경 제공

### Ⅳ. 연구개발결과

#### 1. 미세조류 다양성 연구

- NGS 기술을 적용한 우리나라 주변해 미세조류 다양성 분석 수행
  - 2003-2017년 확보한 719개 정점 3,000여개 시료를 분석
  - 광합성 초미소진핵생물의 다양성은 시·공간적으로 큰 변이를 나타냄
  - 초미소남세균 시·공간적 변동성 (지역 및 계절별) 비교분석 결과, 우리나라 주변해 우점하는 그룹은 *Synechococcus* clades I, II, IV임



- 봄철 표층수에는 Mamiellophyceae 녹조류가 우점하며, 규조류는 동중국해와 동해의 표층 및 수심 20m에서 높은 비율로 출현하고, 서해와 독도 주변해에는 Prymnesiophyceae 착편모조류가 40-50%의 높은 비율로 나타남
  - 여름철에는 표층과 수심 20m 모두에서 Prymnesiophyceae 착편모조류가 가장 우점함
  - 가을철에는 녹조류와 Prymnesiophyceae 착편모조류가 가장 우점하며, 동중국해에서는 규조류도 높게 나타남
  - 겨울철에는 녹조류가 가장 높은 비율로 나타났으며, Prymnesiophyceae, Cryptophyceae 및 규조류도 고루 높은 분포를 보임
- 우리나라 주변해 미세조류 데이터베이스 구축
- 총 592 정점의 4,078 시료에 대한 자료입력을 완료하였으며, 일부 정점별 meta-data, CTD data, chemical data, biological data 및 미소조류 다양성 정보의 입출력이 가능함
- 규조류 배양체 확보, 분자마커 검토 및 개발
- 근소만에서 저서성 돌말류 52종 64 배양주를 확보하여 분석함
  - 저서돌말류의 형태, 분류정보, BLASTn 결과를 종합하여 Naviculaceae 20종, Entomoneidaceae 4종 등을 확인
  - 61개 돌말류 배양주의 핵 18S rRNA와 색소체 *rbcL* 유전자를 비교한 결과, *rbcL*이 2배 이상의 높은 sequence distance를 보이며 다양성 분석을 위한 *rbcL*의 유용가능성을 보여줌
  - 새로운 *rbcL* 프라이머 (read length = 450 bp)를 디자인하여 돌말류 특이성을 확인하였으며, 근소만 갯벌시료 (2011-2012년, 10개 정점)의 NGS 적용
- 근소만 갯벌 저서성 규조류의 시·공간적 변동성 분석 수행
- 총 3강 30목 57과 140속 445 분류군의 *rbcL* 970만 reads를 확보
  - 상대적으로 높은 빈도를 보인 10개 속은 전체 돌말류의 60% 이상을 차지하며, 시·공간적으로 다른 변이를 보임
  - 2011년 10월에는 *Navicula*속과 *Amphora*속이 대부분의 정점에서 우점
  - 2012년 1월에는 *Nitzschia*속과 *Navicula*속이 우점함
- 우리나라 주변해 난류성 와편모조류의 분포과정 분석
- 북서태평양 시료의 군집분석 결과 5개 군집 11속 98종 확인

- 우리나라 주변해는 난류의 유입에 의한 고온고염성 지표종의 분포 변화는 기후변화에 따른 쿠로시오 분지류 영향 판별자료 제공
- 하계 동중국해 장강저염수의 확장은 고온고염종의 북상 (우리나라 남해로의 이동)을 제한하는 주요요인임
- 따라서 외편모조류 지표종 분포 결과는 기후변화에 따른 해양생태계 변동성 연구에 적용 가능성을 보임

## 2. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 연구

- 우리나라 주변해의 질소고정세균 분포는 해역에 따라 차이를 보임
  - 동중국해의 쿠로시오 분지류 영향해역에서는 Prymnesiophytes에 공생하는 UcynA 그룹, 사상체 질소고정자인 *Trichodesmium* 등 남세균 계통이 50% 이상을 차지
  - 동중국해 해역에서는 *deltaproteobacteria* 등 다양한 종속영양성 세균이 크게 우점
  - 따라서, 우리나라 주변해의 질소고정자 분포는 쿠로시오 분지류에 의한 이류의 큰 영향을 받음
- 춘계증식 은편모조류 다양성 분석을 위한 분자마커 개발
  - 40개 배양주를 대상으로 20개 색소체 CDS 프라이머의 가용성 검토하여, 27개 배양주의 14개 유전자 정보를 확보함 (핵 18S rRNA, 색소체 16S 및 23S rRNA 와 *atpA*, *atpB*, *chlI*, *clpC*, *dnaK*, *psaA*, *psbA*, *rbcL*, *rpoC1*, *tufA*, *secA*임)
  - Alignment 중 분류군간 보존부위 비율은 rRNA가 대체적으로 높았으며 CDS는 대체적으로 낮으며, 변이율은 정반대임
  - 은편모조류의 alignment indel (gap), saturation test를 고려했을 때 적절한 변이율을 가지는 유전자는 *rbcL* (*P*-distance 평균 12.73%), *psaA* (평균 16.98%), *dnaK* (평균 22.13%)임
  - 은편모조류 특이 *rbcL*-amplicon 자료 분석 결과 동해, 서해 및 남해에서 춘계 대증식 후보 7개 clades (CRY03 *Hemiselmis* clade, CRY06 *Rhodomonas* clade, CRY07 *Rhinomonas* clade, CRY08 Unknown clade, CRY09 *Teleaulax* clade, CRY11 *Proteomonas* clade, Unknown clade 2)를 확인
- 우리나라 주변해의 착편모조류 분자마커 탐색 및 다양성 분석
  - 착편모조류 24개 배양주를 이용하여 우리나라 및 근연해 착편모조류 다양성 및 생태계 모니터링을 위한 기초자료 확보

- 미토콘드리아 및 색소체 CDS 총 31개 (mtDNA: *cob*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad5*, ptDNA: *atpA*, *cbbX*, *ccs1*, *ccsA*, *clpC*, *minD*, *petB*, *petD*, *psaA*, *psaB*, *psaD*, *psbA*, *psbB*, *psbV*, *rbcL*, *rbcS*, *rpl2*, *rpl3*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *rps2*, *rps3*, *secY*, *tufA*)를 비교분석함
- 31개 유전자간 비교에서 GC content (%)와 identical site (%)가 유의한 양의 상관관계 ( $b = 3.65$ ,  $R^2 = 0.7765$ )를 보임
- *rbcL* amplicon 계통수 구축결과 우리나라 인근해 착편모조류는 6개의 알려진 clades와 최소 9개 unidentified clades로 구성됨을 발견함

## V. 연구결과의 대외기여 및 활용계획

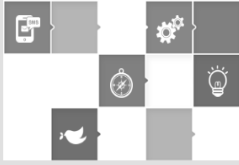
- 우리나라 주변해의 광합성 미세생물 다양성 정보에 대한 체계적인 기초자료를 확보함
- 우리나라 주변해의 일차생산자의 다양성 정보는 시·공간적으로 우점하는 그룹에 대한 사전 지식을 제공함으로써, 추후 배양을 통한 환경 반응 분석 및 평가를 위한 사전 정보로 활용될 수 있음
- 주요 기능 미세조류 그룹의 다양성 분석 기법을 개발함으로써, 관련 분야의 다양성 연구의 질적 발전과 연구 활성화에 기여함
- 해양 일차생산자 다양성 및 기능 그룹에 대한 연구는 초기단계로, 지속적인 연구를 통해 선진 해양생태 연구 그룹과 경쟁이 가능할 것
- 본 연구결과는 해양생태계의 현황을 파악하는데 활용되며, 미래에 나타날 해양생태계 변화를 이해하고 대응할 수 있는 기반을 제공할 것으로 사료됨
- 기후변화에 따른 해양생태계의 현재와 미래 기능변화 연구를 위한 기반 자료로 활용가능





# 목 차

|   |          |
|---|----------|
| <b>제1장 서론</b> .....                           | <b>1</b> |
| 1절 연구 필요성 .....                               | 3        |
| 1. 기초과학 및 기술적 측면 .....                        | 3        |
| 2. 경제·산업적 측면 .....                            | 5        |
| 3. 사회·문화적 측면 .....                            | 6        |
| 4. KIOST 임무 및 경영목표 등과의 연계성 .....              | 6        |
| 2절 연구목적 .....                                 | 6        |
| 3절 연구목표 및 범위 .....                            | 7        |
| 1. 연구의 최종목표 .....                             | 7        |
| 2. 연차별 연구목표 및 내용 .....                        | 7        |
| <br>  |          |
| <b>제2장 연구현황</b> .....                         | <b>9</b> |
| 1절 국내연구 현황 .....                              | 11       |
| 1. 한반도 주변 해역의 미세조류 다양성 연구 .....               | 11       |
| 2. 지표종을 이용한 아열대화 연구 .....                     | 12       |
| 3. 기능유형별 식물플랑크톤 다양성 연구 .....                  | 12       |
| 2절 국외연구 현황 .....                              | 13       |
| 1. 해양 생물다양성 국제연구 프로그램 .....                   | 13       |
| 2. 식물플랑크톤 군집 다양성 및 기능 유형별 다양성 연구 방법의 발달 ..... | 14       |
| 3절 현재 연구기술의 한계 .....                          | 17       |
| 1. 미세조류의 다양성 현황 파악 .....                      | 17       |
| 2. 아열대화 지표성 플랑크톤의 연구 개발 현황 .....              | 17       |
| 3. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 현황 파악 .....       | 17       |



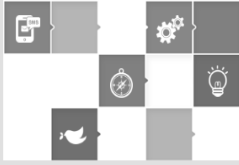
## 목 차

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| 4절 KIOST 연구역량 및 전망 .....             | 18        |
| 1. 미세생물 다양성 연구 .....                 | 18        |
| 2. 우리나라 주요해역 및 주변해 선행연구 .....        | 18        |
| <b>제3장 연구내용 및 결과 .....</b>           | <b>19</b> |
| 1절 연구내용 .....                        | 21        |
| 1. 연구추진 전략 및 체계 .....                | 21        |
| 2절 연구방법 .....                        | 24        |
| 1. 미세조류 다양성 연구 .....                 | 24        |
| 2. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 연구 ..... | 31        |
| 3절 연구결과 .....                        | 34        |
| 1. 미세조류 다양성 연구 .....                 | 34        |
| 2. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 연구 ..... | 70        |
| <b>제4장 연구결과 대외기여 및 활용계획 .....</b>    | <b>91</b> |
| <b>참고문헌 .....</b>                    | <b>97</b> |



## 표 목 차

|   |    |
|---|----|
| 표 1. DB 입력변수 .....  | 39 |
| 표 2. DB에 포함된 정점 및 시료 수 .....  | 41 |
| 표 3. 저서돌말류 형태 및 분류정보. 각 종명은 GenBank BLASTn 결과를<br>표시함 .....   | 45 |
| 표 4. 각 속별 18s RNA 및 <i>rbcL</i> 유전자의 Jukes and Cantor model을 이용한<br>genetic distance .....  | 55 |
| 표 5. 본 연구에서 새로 디자인한 <i>rbcL</i> 프라이머의 돌말류 분류군별 적합성 ...  | 57 |
| 표 6. 새로 디자인한 프라이머를 이용하여 구축한 저서돌말류 클론라이브러리의<br>BLASTn 결과 .....   | 58 |
| 표 7. MiSeq 분석을 통해 얻은 각 샘플별 read 수와 pre-processing에 따른<br>read 수 .....   | 61 |
| 표 8. 각 지점별 operational taxonomic units (OTUs), abundance-based<br>coverage estimators, (ACEs), Chao 1 richness values 및 Shannon and<br>inverse Simpson 다양성 지수 ..... | 63 |
| 표 9. 본 연구에 사용한 40개 은편모조류 배양주 리스트 .....  | 74 |
| 표 10. 은편모조류 14개 유전자의 염기서열 특성 비교 .....   | 79 |
| 표 11. 본 연구에 사용한 착편모조류 24개 배양주의 NGS 결과 요약과 GenBank<br>Organelles Genome DB에서 가용한 7종의 mtDNA 및 ptDNA 정보 ...  | 85 |
| 표 12. 착편모조류 분자마커 탐색에 사용한 mt 및 pt CDS 정보 .....   | 86 |



## 그림 목 차

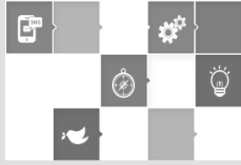
|   |    |
|---|----|
| 그림 1. 해양 식물플랑크톤은 지구생물계 주요 일차생산자임 .....  | 3  |
| 그림 2. 북서태평양 지역 및 전지구적 규모의 자연적 및 인위적 환경변화가 해양생태계 변화를 초래함 .....                       | 4  |
| 그림 3. 수생태계에는 다양한 크기의 식물플랑크톤이 존재하며 세포크기를 기준으로 3um 이하를 초미소 식물플랑크톤이라 통칭함 .....         | 5  |
| 그림 4. 최근의 NGS 분석기술을 적용한 target amplicon sequencing은 초미소 식물플랑크톤 다양성 연구에 적용 가능함 ..... | 12 |
| 그림 5. 국제해양생태 연구 프로그램인 Census of Marine Life와 TARA Expeditions 웹사이트 및 관련 정보 .....    | 14 |
| 그림 6. Bigelow 해양연구소의 단세포유전체분석센터 (SCGC) 안내, 워크플로우 및 예시 .....                         | 15 |
| 그림 7. NGS를 이용한 대양 진핵성미소조류 (PPE) 다양성 연구 예시 .....                                     | 16 |
| 그림 8. 본 연구의 추진 체계도 .....  | 21 |
| 그림 9. 본 연구에 사용한 우리나라 연안 및 인근해 시료 정점 (총 1,408개) ...                                  | 22 |
| 그림 10. 다양성 분석을 위해 사용한 다양한 접근방법 .....  | 23 |
| 그림 11. 연구개발 3개년도 총괄 로드맵 .....   | 23 |
| 그림 12. 본 연구에 사용한 시료의 채집지점 .....   | 24 |
| 그림 13. 본 연구 조사지점 .....  | 26 |
| 그림 14. 저서돌말류 NGS 분석에 시용한 태안 근소만 시료 채집지 (D01-D10) ...                                | 28 |
| 그림 15. 우리나라 주변해 표층수에 우점하는 picocyanobacteria 분포도 .....                               | 35 |
| 그림 16. 우리나라 주변해 수심 20m에 우점하는 picocyanobacteria 분포도 ...                              | 36 |
| 그림 17. 우리나라 주변해 표층수에 우점하는 광합성 초미소조류 분포도 ...   | 37 |
| 그림 18. 우리나라 주변해 수심 20m에 우점하는 광합성 초미소조류 분포도 ...                                      | 38 |
| 그림 19. 본 연구를 통해 구축한 웹 DB .....  | 40 |





## 그림 목 차

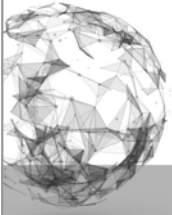
|  |    |
|--|----|
| 그림 20. DB에서 선택한 정점에서의 CTD 프로파일과 조류다양성 정보 화면 ...  | 42 |
| 그림 21. DB에서의 자료다운로드 화면 .....   | 42 |
| 그림 22. 본 연구를 통해 확보한 돌말류 배양주의 형태기반 분류정보 .....   | 43 |
| 그림 23. <i>Navicula</i> 속 및 <i>Seminavis</i> 속 저서 돌말류 광학현미경 사진 .....                    | 44 |
| 그림 24. 저서돌말류 SEM 이미지 .....   | 51 |
| 그림 25. 저서 돌말류 61개 배양주 ML 계통수 .....   | 52 |
| 그림 26. <i>Navicula sensu stricto</i> 의 18s rRNA (a) 및 <i>rbcL</i> (b) 계통수 .....        | 53 |
| 그림 27. <i>Nitzschia sensu stricto</i> 의 18s rRNA (a) 및 <i>rbcL</i> (b) 계통수 .....       | 54 |
| 그림 28. <i>rbcL</i> 유전자 염기서열의 유사도를 기준으로한 저서돌말류 종 수<br>(왼쪽) 및 OTUs 수 (오른쪽) 추정치 .....     | 59 |
| 그림 29. 10개 지점 (D01-D10)에서 발견한 돌말류 genotypes간 Maximum<br>likelihood 계통수 및 지점별 출현율 ..... | 62 |
| 그림 30. 태안 근소만 저서돌말류 10개 주요속의 2011년 10월과 2012년 1월<br>출현빈도 .....                         | 64 |
| 그림 31. MiSeq read의 reference DB에 대한 유사도 분포 .....                                       | 65 |
| 그림 32. 그룹별 외편모조류 출현종수의 북서태평양 분포도 .....   | 67 |
| 그림 33. 독도수역에 출현하는 난류성 외편모조류 .....  | 68 |
| 그림 34. 질소고정 남세균의 형광현미경 사진 .....  | 71 |
| 그림 35. 우리나라 주변해의 해역별 질소고정자 다양성을 보여주는 그래프 ....  | 72 |
| 그림 36. 전형적인 은편모조류 (Cryptophytes)의 모식도와 다양한<br>은편모조류 .....                              | 73 |
| 그림 37. 우리나라 남해 및 서해에 출현하는 은편모조류 예시 이미지 .....   | 73 |
| 그림 38. 은편모조류 색소체 <i>psbA</i> DB .....  | 75 |
| 그림 39. 은편모조류 색소체 16S DB .....  | 75 |



## 그림 목 차

|  |    |
|--|----|
| 그림 40. 우리나라 연안 및 인근해 분포하는 은편모조류 clades를 plastid 16S 자료를 이용하여 판별함 .....                                     | 76 |
| 그림 41. 대표적인 은편모조류인 <i>Rhodomonas salina</i> 색소체 유전체 지도와 선택한 20개 유전자 .....                                  | 77 |
| 그림 42. Sanger sequencing이 성공한 은편모 배양주의 계통수 및 시퀀스 유무 .....  | 78 |
| 그림 43. 은편모조류 14개 유전자의 <i>P</i> -distance 분포 .....  | 80 |
| 그림 44. 은편모조류 11개 clades의 <i>rbcL</i> alignment의 변이좌위만 나타낸 condensed alignment .....                        | 81 |
| 그림 45. <i>rbcL</i> -amplicon에 기반한 우리나라 동해, 서해 및 남해에 출현하는 은편모조류 7개 clades .....                             | 82 |
| 그림 46. 우리나라 동해, 서해 및 남해 시기별 출현하는 은편모조류 7개 clades .....   | 83 |
| 그림 47. 착편모조류 16S rRNA 및 <i>psbA</i> 계통수 .....  | 84 |
| 그림 48. 착편모조류 mt 및 pt 31개 CDS의 GC content (%) 및 multiple sequence alignment 중 identical site (%) 비교 .....   | 87 |
| 그림 50. Reference <i>rbcL</i> 및 amplicon <i>rbcL</i> 자료를 통합 분석한 우리나라 인근해 착편모조류 Maximum likelihood 계통수 ..... | 88 |
| 그림 49. 착편모조류 31 CDS Identical site와 GC content 간의 상관관계 .....   | 89 |

해양 서식처별 일차생산자 다양성의  
계절적 특성 연구



## 제1장

# 서론



# 제1장 서론

## 1절 연구 필요성

### 1. 기초과학 및 기술적 측면

#### 1.1. 한반도 주변해 광합성 미세조류 다양성 현황 파악미비

기후변화에 따른 생태계변화를 관리하며 미래를 준비하기 위해서는, 해양생태계 주요 구성원의 구조 및 기능다양성에 대해 시간적 및 공간적 규모에서의 변화 특성을 이해 할 수 있어야 한다. 특히 식물플랑크톤은 해양생태계의 구조와 기능을 결정하는 주요 요소 (그림 1)로서, 현재 해양의 생태계 구조와 기능에 대한 이해를 높이고 이해하며 미래변화에 대응하기 위한 다양성 기초정보 구축이 절실하다. 최근 빠르게 발전한 차세대염기서열 분석방법은 HPLC, Flow cytometry 등 다양한 생태분석방법과 함께 객관적이며 검증 가능한 정량자료의 대량 생산이 가능하게 하며 생태연구의 수월성을 제공한다.

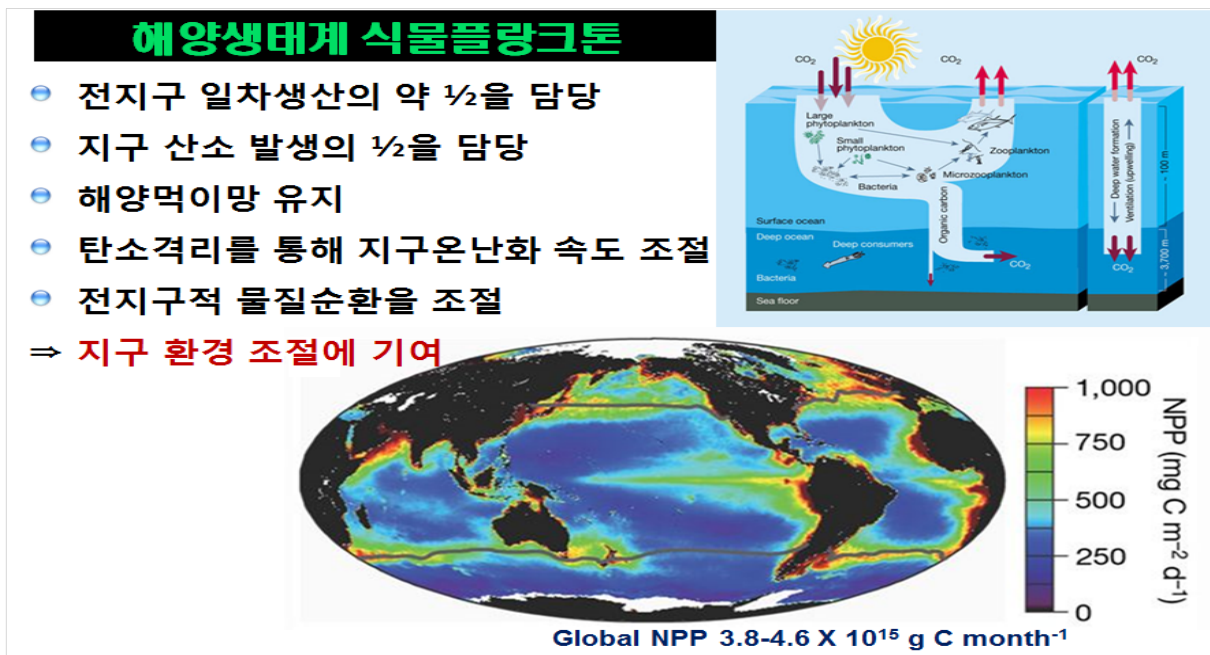


그림 1. 해양 식물플랑크톤은 지구생물계 주요 일차생산자임

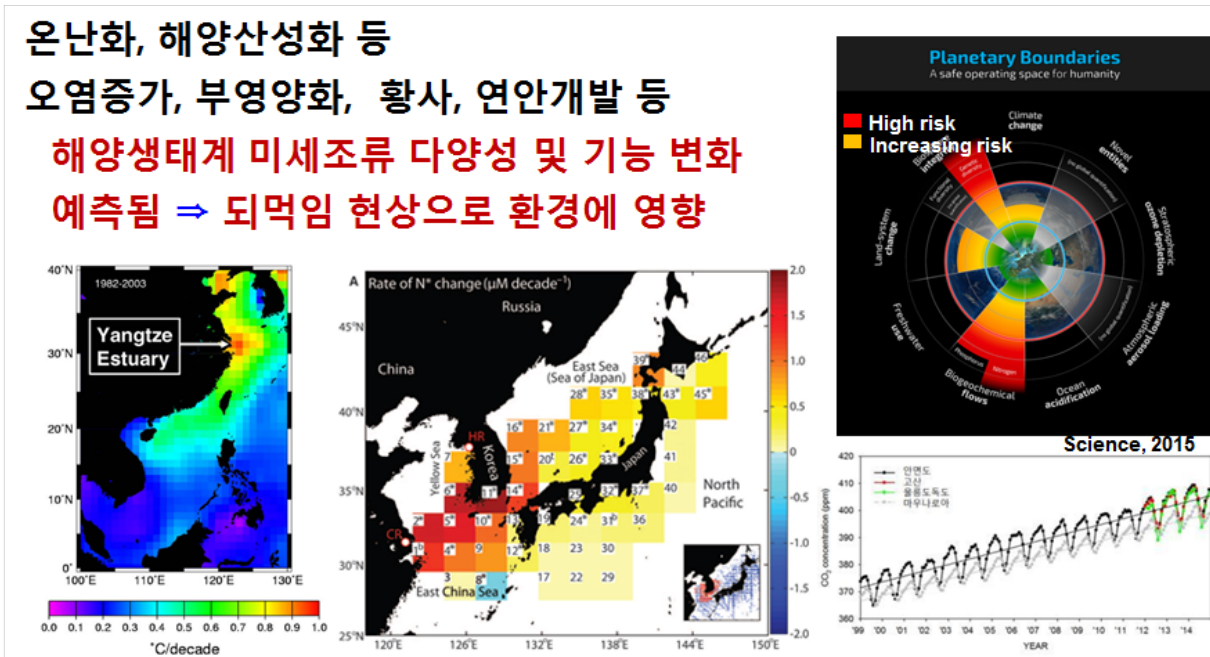


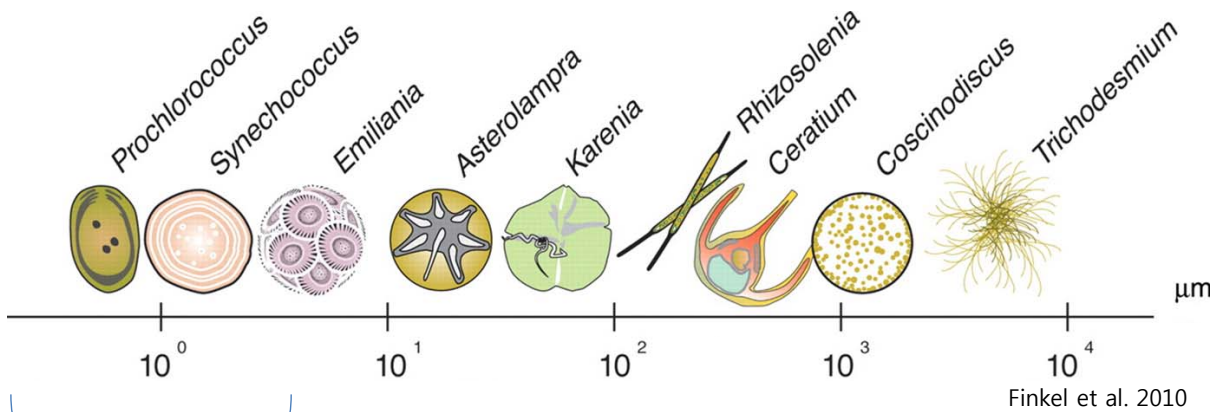
그림 2. 북서태평양 지역 및 전지구적 규모의 자연적 및 인위적 환경변화가 해양생태계 변화를 초래함

### 1.2. 아열대화 지표종 선정 및 분포특성 정보 요구

해양 온난화, 산성화 등 우리나라 주변해 주요 환경변화 대응을 위한 광역적 조사자료 기반구축이 필요하다. 특히 해양환경변화 (그림 2)에 따라 난류로 이동되는 식물플랑크톤 계절별 분포 특성과 적응 가능한 내성 범위에 근거한 아열대화 지표종 선정 및 적용범위에 대한 자료검토가 필요하다. 이를 바탕으로 한 아열대화 지표종을 이용 기후변화의 생태계 영향의 지속적인 모니터링 역시 요구된다.

### 1.3. 기능유형별 식물플랑크톤의 (PFTs) 다양성 기반정보 확보

초미소 식물플랑크톤 (그림 3)은 유광대의 질소 공급원으로 중요한 역할을 담당하나, 우리나라 주변해에 분포하는 질소고정자의 다양성에 대한 심도 깊은 연구는 현재까지 이루어지지 않았다. 특히 기후변화에 의해 성층이 강화되는 미래 해양환경에선 질소 고정자의 생태계 기능이 강화될 것으로 최근의 연구결과들이 예측하고 있다. 따라서 *nifH* 유전자를 이용한 질소 고정자 다양성과 생태계 역할에 대한 이해가 필요하다. 또한 우리나라 주변해의 은편모류와 착편모류 등 식물플랑크톤의 다양성에 대한 현황자료를 구축하여 미래 해양생태계 연구를 위한 기반을 확보해야 한다.



| Photosynthetic Picoproteobacteria (PPPs) |                   |
|--|-------------------|
| • Cyanobacteria                          | Cyanophyceae      |
| Photosynthetic Picoeukaryotes (PPEs)     |                   |
| • Dinophyta                              | Dinophyceae       |
| • Chlorophyta                            | Mamiellophyceae   |
|  | Prasinophyceae    |
|  | Trebouxiophyceae  |
| • Haptophyta                             | Prymnesiophyceae  |
| • Cryptophyta                            | Cryptophyceae     |
| • Rhodophyta                             | Bangiophyceae     |
| • Discoba                                | Euglenophyceae    |
|  | Bacillariophyceae |
| • Heterokonts                            | Chrysophyceae     |
|  | Dictyochophyceae  |
|  | Eustigmatophyceae |
|  | Pelagophyceae     |
|  | Phaeophyceae      |
|  | Raphidophyceae    |

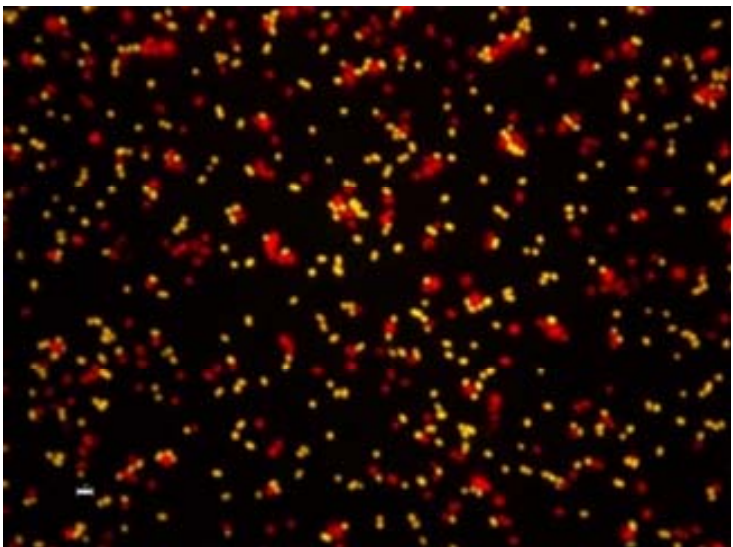


그림 3. 수생태계에는 다양한 크기의 식물플랑크톤이 존재하며 세포크기를 기준으로 3 μm 이하를 초미소 식물플랑크톤이라 통칭함

## 2. 경제·산업적 측면

생물권에서 해양식물플랑크톤은 유기물합성과 에너지순환의 핵심기능을 광합성을 통하여 수행한다 (그림 1; Marinov et al. 2006). 식물플랑크톤은 생물학적 펌프로써 탄소, 질소 등 주요 물질순환에 역할을 하며 대기 및 해양의 이산화탄소 감축에도 기여한다 (Raven & Falkowski 1999, Takahashi et al. 2002). 식물플랑크톤 군집구조는 연쇄적인 해양생태계 변동현상을 예측하는데 필수적인 연구 분야이며 관련 산업에 막대한 영향을 미친다. 예를 들어, 식물플랑크톤의 발생은 해양수온상승 (El Nino 등)에 의한 심층수 수직혼합 약화로 저해되며, 이산화탄소 고정량 감소 및 어장형성 방해 등의 결과로 이어진다.

### 3. 사회·문화적 측면

IPCC 제4차 기후변화 2007 리포트에 따르면, 전지구적 규모의 온난화와 기후 및 환경변화는 지속적으로 일어나고 있으며, 앞으로 더욱 심화될 것으로 예측된다 (그림 2). 해양환경변화에 따른 구체적인 과학적이며 예측가능한 생태계변동 정보를 제공하여 대안수립의 사회적 공감대를 형성이 필요하다. 해양식물플랑크톤 연안 및 대양생태계에서의 변동예측은 매우 중요한 기반요소으로 해양환경변화와 생물상변화에 따른 생태계 기능변화의 핵심적인 정보를 제공할 것이다.

### 4. KIOST 임무 및 경영목표 등과의 연계성

본 연구는 해양과기원 정관상 설립 목적인 ‘해양과학기술의 창의적 원천기초연구, 응용 및 실용화 연구와 해양분야 우수 전문 인력의 교육·훈련을 통하여 국내·외적으로 해양과학기술의 연구개발을 선도하고 그 성과를 확산’에 부합한다. ‘해양과학기술 및 해양산업 발전에 필요한 원천연구, 응용 및 실용화연구’ 등의 임무와 연계가능하며, 해양과기원 발전 전략 (2012-2020)에 따른 주요 기능의 ‘해양관측·탐사, 해양환경 및 기후 변화에 관한 연구’로 12대 중점연구분야 중 ‘해양환경 및 생태계 보전기술’ 및 ‘기후변화 예측 및 대응기술’에 포함된다. 정부 140대 국정과제 중 ‘해양 신성장 동력 창출 및 체계적 해양관리’, ‘해양환경 보전과 개발의 조화’, ‘온실가스 감축 등 기후변화 대응’에 부합하며, 제3차 과학기술기술훈합계획 5대전략, 19개 분야, 78개 추진과제 중 중점과제로 선정된 ‘기후변화 대응력 강화’, ‘환경보전·복원시스템 고도화’에 부합한다.

## 2절 연구목적

본 연구의 목적은 한반도 주변해의 미세조류 다양성 현황 자료 구축을 통해 현재 해양생태계의 구조 및 기능을 이해하고 관련 연구의 지원 및 미래 변화에 대응하기 위한 기반 환경 조성에 있다.



### 3절 연구목표 및 범위

#### 1. 연구의 최종목표

##### 1.1. 한반도 주변해의 미세조류 다양성 현황 파악

- 다양한 조합의 분석기술 (microscopy, flow cytometry, FlowCAM, HPLC)을 이용한 분류군별 미세조류 다양성 분석
- 차세대 염기서열 분석기술 (NGS)을 이용한 다양성 자료 대량 생산
- 다양한 분류군으로 NGS 기술 이용 확대
- 해양 서식처별 미세조류 종 목록 작성

##### 1.2. 미세조류 다양성의 시·공간적 변화 특성 이해

- 미세조류 다양성의 서식지별 계절변화 특성 파악
- 해류에 의한 다양성 변화 및 생물다양성 집중지역 (biodiversity hotspot) 파악
- 난류 기원 아열대화 지표종의 선정 및 분포 특성 파악

##### 1.3 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 현황 파악

- 기능 유전자를 이용한 PFTs 다양성 분석
- 기능유형별 식물플랑크톤 (PFTs)의 다양성 현황 자료 구축을 통해 미래 해양생태계의 주요 기능변화 연구를 위한 기반 환경 제공

#### 2. 연차별 연구목표 및 내용

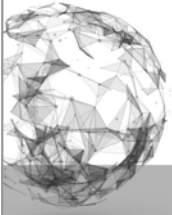
| 1차년도 (2015)                   |   |
|-------------------------------|---|
| 성 과 목 표                       | 연 구 내 용   |
| 한반도 주변해의<br>미세조류 다양성 현황<br>파악 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 미세조류 다양성 현황 파악               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Flow cytometer, HPLC, NGS 분석 방법을 이용한 다양성 분석</li> <li>- Picophytoplankton 종/clades 목록작성</li> </ul> </li> <li>○ NGS 분석 기술 확대               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 저서성 diatom의 다양성 분석을 위한 분자마커 제작 진행</li> </ul> </li> </ul> |

| 1차년도 (2015)                |   |
|----------------------------|---|
| 성 과 목 표                    | 연 구 내 용   |
| 다양성의 시·공간적 변화 특성 이해        | ○ 다양성의 시·공간적 변화 분석<br>- 난류기원 picophytoplankton의 분포과정 분석<br>- Picophytoplankton 다양성의 집중지역 파악 |
| 기능유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 파악 | ○ 질소고정자의 다양성 분석<br>- 질소고정 관련 유전자 ( <i>nifH</i> )이용 난류의 영향을 받는 해역을 대상으로 질소고정 플랑크톤의 다양성 분석    |

| 2차년도 (2016)                |  |
|----------------------------|--|
| 성 과 목 표                    | 연 구 내 용  |
| 한반도 주변해의 미세조류 다양성 현황 파악    | ○ 미세조류 다양성 현황 파악<br>- NGS분석기반 미세조류 다양성의 광역 분포 파악<br>- 형태분류기반 와편모조류 종 목록 작성<br>○ NGS 분석 기술 확대<br>- 부유성 diatom의 NGS 분석을 위한 mtDNA 분자마커 제작 및 시범 분석 |
| 다양성의 시·공간적 변화 특성 이해        | ○ 와편모조류 다양성의 시·공간적 변화 분석<br>- 난류기원 와편모조류의 분포 특성 분석<br>- 아열대화 지표성 와편모조류 선정  |
| 기능유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 파악 | ○ <i>nifH</i> 유전자 다양성 및 활성도 분석<br>○ 춘계 증식 Cryptophyta 분자마커 제작<br>○ Haptophyta 분자마커 탐색  |

| 3차년도 (2017)                |  |
|----------------------------|--|
| 성 과 목 표                    | 연 구 내 용  |
| 한반도 주변해의 미세조류 다양성 현황 파악    | ○ 미세조류 출현 종 목록 작성<br>- 부유성 규조류 종 목록 작성<br>- Haptophyta 종 목록 작성<br>- Cryptophyta 종 목록 작성<br>○ NGS 분석 기술 확대<br>- 부유성 diatom의 NGS 분석을 통한 다양성 규명 |
| 다양성의 시·공간적 변화 특성 이해        | ○ 규조류 다양성의 시·공간적 변화 분석<br>- 난류기원 diatom의 분포과정 분석<br>- 아열대화 지표성 diatom 종 선정   |
| 기능유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 파악 | ○ 주요 생태기능 조류의 시·공간적 변동<br>- 춘계 증식 Cryptophyta 다양성 분석<br>- Haptophyta 다양성 분석  |

해양 서식처별 일차생산자 다양성의  
계절적 특성 연구



## 제2장

### 연구현황



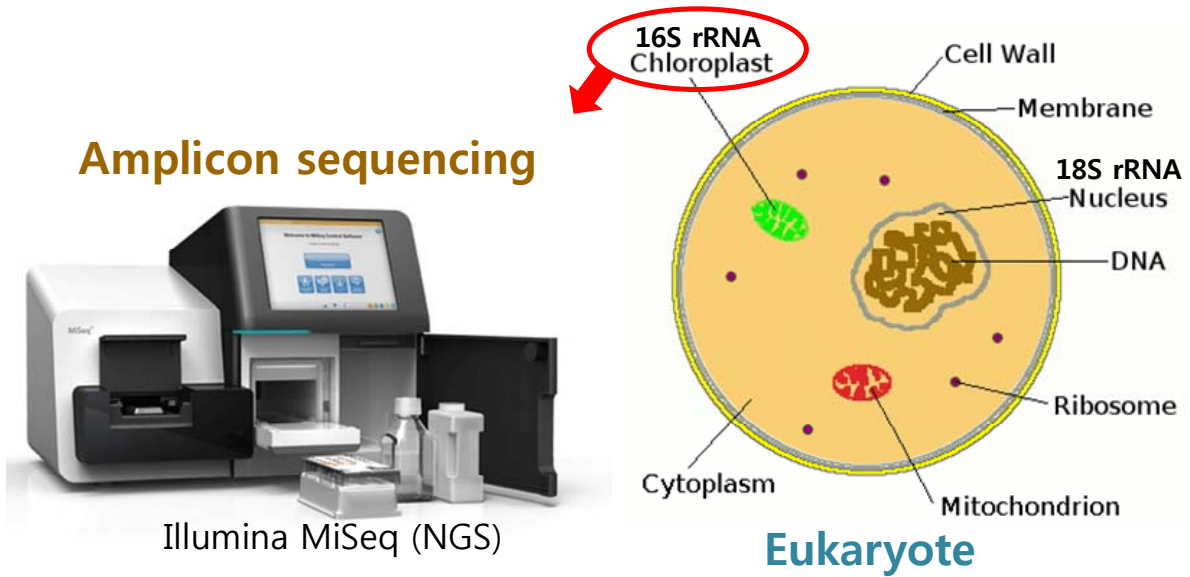
## 제2장 연구현황

### 1절 국내연구 현황

#### 1. 한반도 주변 해역의 미세조류 다양성 연구

미세조류에 대한 대부분의 다양성 연구는 현미경 등 형태 분류학적 분석에 의존하여 수행되었거나, 분자 생물학적 연구는 적조 생물 및 남세균 등 일부 한정된 그룹에 대해서만 연구가 수행되었다. ‘갯벌 미세생물 활용기술 (인하대 이철균)’ 등의 일부 종에 대한 실용화 목적의 연구가 진행된 바 있으나, 군집 수준의 다양성 평가를 통해 생태계의 현재와 미래 변화를 파악하기 위한 기반 연구는 상대적으로 매우 적다. ‘장기해양생태계연구 (포항공대 강창근)’ 등에서 계절적 다양성을 다루고 있으나, 광양만 및 후포 뱅크 등 제한된 해역에 국한되어 연구가 되었다. 해양수산부 및 국토부의 지원에 의해 동중국해 및 독도 주변해역에서 일차생산자의 군집 구조 연구가 수행된 바 있으나, 분자 생태학적 다양성 연구를 포함한 심도 있는 연구는 수행되지 못하였다. 질소고정, 규산염 순환 및 탄산염 농축 등 생지화학적 물질 순환 및 해양 산성화에 연관된 기능 그룹의 다양성 연구는 본 연구 그룹에 의해 일부 시도된 바 있으나, 시·공간적으로 대규모의 연구는 거의 수행되지 못하였다. 법정 조사인 ‘해양생태계기본조사’를 2005년부터 우리나라 주변 해역의 조사를 10년 주기로 계획하여 진행중이나, 주로 조사 정점이 연안에 집중되어 있으며 미세조류의 연구도 전통적인 형태 분류에 근거하여 연구되고 있는 한계가 있다.

해양 식물플랑크톤의 이전 연구는 대부분 현미경 관찰에 의한 종 동정이 주로 수행되었다. 이는 크기가 작은 초미소 진핵식물플랑크톤과 같이 현미경으로 형태 동정하기 어려운 그룹의 연구에는 적합하지 못함. 따라서 분자생태학적 연구 기법의 적용이 반드시 필요하다 (그림 4). 현미경 관찰을 통한 종 동정을 위해서는 숙련된 연구자가 많은 시간을 소요하여야 한다. 따라서, 시·공간적으로 광범위한 많은 수의 시료에 대한 체계적인 연구는 매우 제한적이다. 일부 적조 생물 등의 형태 및 분자 생물학적 연구가 진행된 바 있다. 그러나 생태적으로 우점하거나 중요한 그룹 (저서 규조류, 춘계대변성 편모류 그룹 haptophyta, cryptophyta 등, calcifying organisms 등)의 분포에 대해서는 거의 연구된 바 없다.



| Platform        | GS-FLX (1/8 region) | MiSeq (1 run)     |
|-----------------|---------------------|-------------------|
| Coast           | ₩3,300,000          | ₩3,300,000        |
| Target gene     | 18S rRNA            | Plastid 16S r RNA |
| No. of reads    | 100,000             | 10,000,000        |
| % of autotrophs | 30-40%              | 100%              |

그림 4. 최근의 NGS 분석기술을 적용한 target amplicon sequencing은 초미소 식물플랑크톤 다양성 연구에 적용 가능함

## 2. 지표종을 이용한 아열대화 연구

식물플랑크톤을 이용한 아열대화 연구는 제주도 주변해변해역에서 난류성 외편모조류를 이용한 연구가 있었으나, 쿠로시오, 동해, 서해를 포함하여 해류 및 계절적인 환경 변화가 고려된 지표종 연구 자료는 매우 부족한 상태이다.

## 3. 기능유형별 식물플랑크톤 다양성 연구

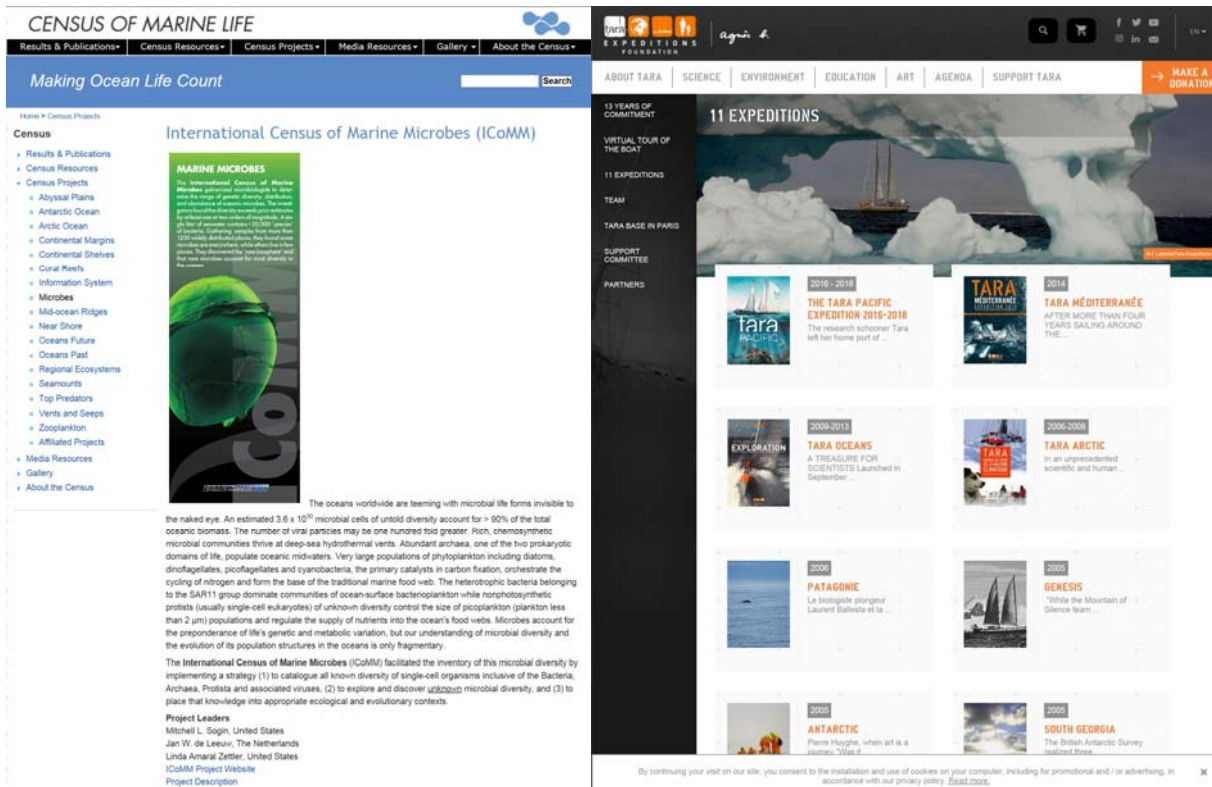
해양질소순환에서 중요한 역할을 보이는 질소고정자와 같은 기능유형별 식물플랑크톤의 다양성 연구는 진행된바 없다. 질소고정과 같은 기능 유전자를 이용한 다양성 연구는 UCSC (University of California, Santa Cruz)의 Jonathan Zehr 그룹에 의해 1990년경부터 다양한 해역에서 많이 연구되었다. 그러나, 우리나라 주변해 질소고정 미

소생물 다양성 연구는 거의 초기 단계로 파악된다. DNA-probe hybridization 방법에 의한 식물플랑크톤의 (기능)그룹에 대한 분포 연구가 최근 수행되었으나, probe의 특이성에 대한 면밀한 검토가 요구되며, 시·공간적 규모의 연구를 위해서는 많은 수의 시료를 분석하기 위한 연구 기법의 개발이 요구된다.

## 2절 국외연구 현황

### 1. 해양 생물다양성 국제연구 프로그램

21세기에 접어들면서 해양 생태계는 지구의 생지화학적 순환과 기후의 조절에 결정적인 역할을 한다는 인식하에 해양 생물의 다양성 (구조, 진화와 dynamics)에 대한 전지구적 규모의 국제적 프로그램이 진행되었다. 2000년에 창립된 Census of Marine Life (CoML; 그림 5) 프로그램을 통해 80여개국 2,700여명의 과학자가 10여년 에 걸쳐 540회 이상의 탐사를 통해 획득한 결과물이 2010년에 발표되어 해양 생물이 25만여 종에 이르는 것으로 추산되었으며, 각 해양 생물의 지구적 분포에 대한 웹 데이터베이스 및 DNA 바코딩 정보를 제공하고 있다. 2012년 유럽해양위원회는 “해양생물 다양성 유럽과학로드맵” 보고서를 출판하였음. 이 보고서는 해양생물다양성의 시·공간적 변화, 생태계 기능에서의 생물다양성의 역할, 인간에 대한 해양생태계의 이익 제공에 대한 더욱 완전한 지식을 획득하기 위한 미래의 연구 필요와 우선사항을 제시하였다. 프랑스를 포함한 35개국 126명의 과학자가 참여한 Tara Ocean Expedition (그림 5)은 2009년부터 2012년까지 30개월간 대규모 해양 탐사를 통해 부유생태계 및 산호초 생태계의 생물 다양성을 150개 지점에서 2만 7천개의 시료를 채취 분석하여, 생물 진화, 생태계 이해 및 기후 변화에 의한 생태계 영향 예측 등에 활용하고자 하였다. 유럽에서는 EMBOS (European Marine Biodiversity Observing System)를 통해 유럽의 관측 거점들을 광역적으로 연결함으로써 자연적/인위적 영향 구배를 고려하여 해양 생물 다양성의 장기적 변화와 이의 원인을 평가하고자 한다. 미국의 스크립스 해양연구소는 ‘해양종다양성·보존센터’를 두고 해양생태계의 과거 현황을 파악하고, 현재를 이해하며, 미래를 예측하기 위한 연구를 수행하고 있음. 캘리포니아 연안의 생물 다양성 연구 및 생물다양성에 미치는 기후 변화의 영향 등을 연구하고 있다.



<http://www.coml.org>

<https://oceans.taraexpeditions.org>

그림 5. 국제해양생태 연구 프로그램인 Census of Marine Life와 TARA Expeditions 웹사이트 및 관련 정보.

## 2. 식물플랑크톤 군집 다양성 및 기능 유형별 다양성 연구 방법의 발달

해외 선진 연구 그룹에서는 질소고정, 대번성, 적조, 해양산성화 등 생태계의 기능 유지에 중요하거나 환경 변화에 민감한 기능 그룹의 다양성 및 생태적 특성을 연구하기 위한 연구기법을 개발하여 활발히 연구를 수행하였거나 수행 중에 있다. -미국 Bigelow 연구소의 'Single Cell Genomics Center'에서는 전통적인 방법으로는 분리하기 어려운 배양되지 않은 미생물의 다양성 및 유전적 특성을 규명하기 위한 연구기법을 개발하여 전세계 연구자에게 서비스하고 있다 (<https://scgc.bigelow.org/>; 그림 6). 주요 식물플랑크톤 그룹에 특이적인 probe sequence가 규명되어 각 그룹의 환경 내 분포에 대한 연구가 시도된 바 있다 (Kirkham et al. 2011).



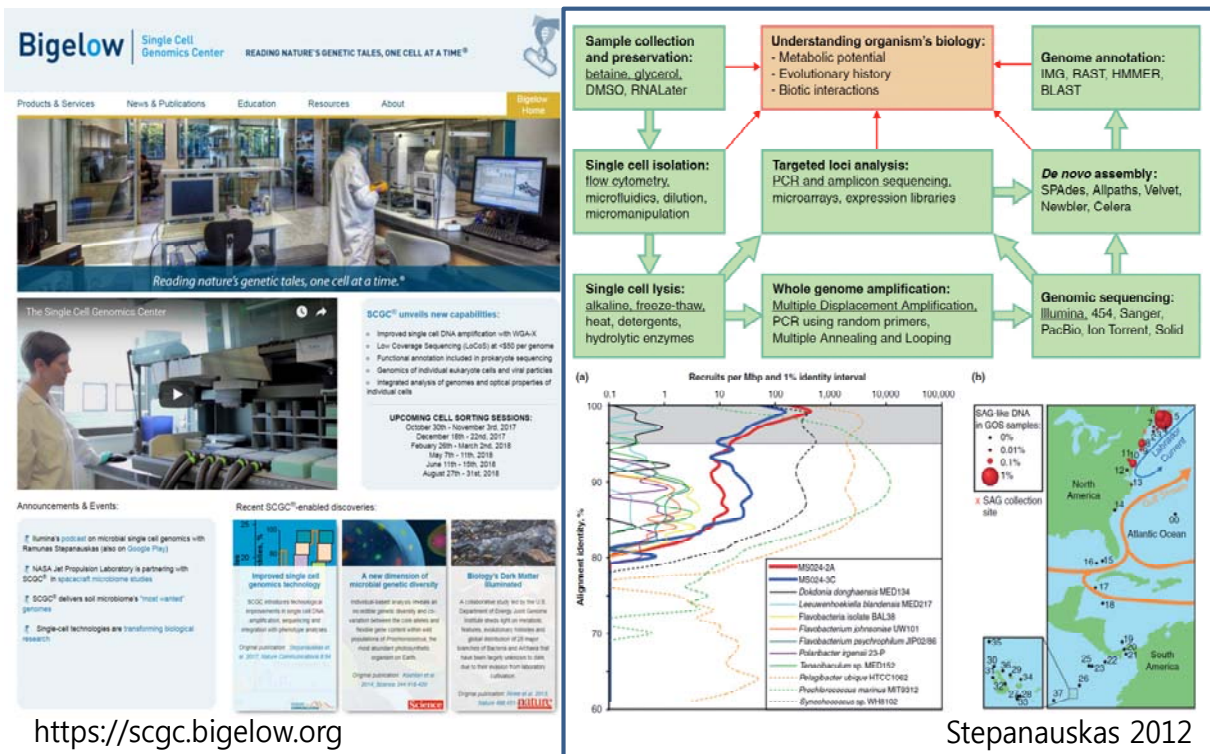
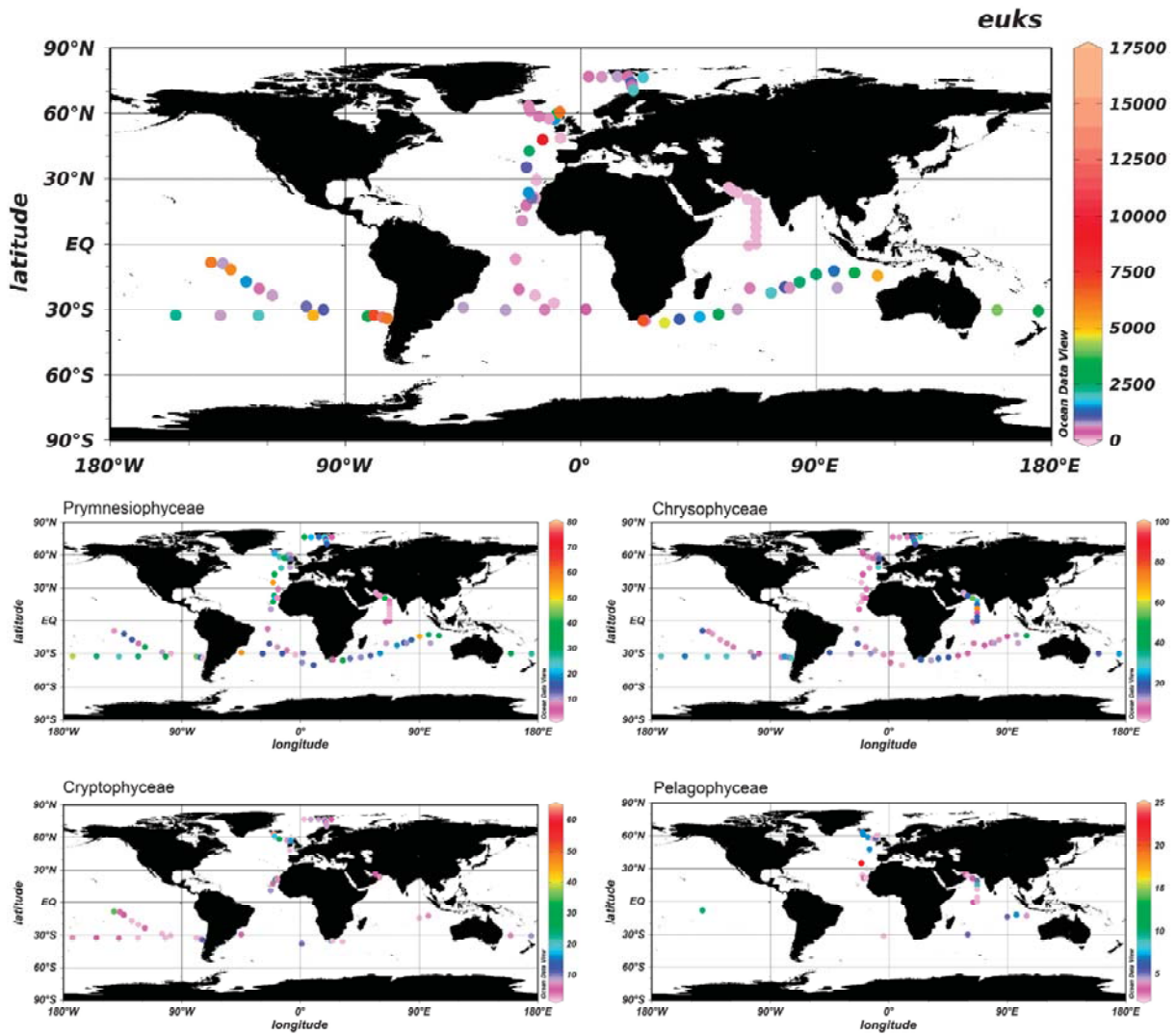


그림 6. Bigelow 해양연구소의 단세포유전체분석센터 (SCGC) 안내, 워크플로우 및 예시

비교적 최근에 plastid-encoded 16S rRNA 유전자 시퀀싱 방법으로 광합성 식물플랑크톤의 다양성을 연구할 수 있는 기법이 개발되어, 지구적 규모에서 식물플랑크톤 다양성의 분포에 대한 연구 결과를 얻었다 (Kirkham et al. 2013; 그림 7). 차세대 염기서열 분석법의 비약적 발달로 우점하는 분포를 보이는 식물플랑크톤 (*Osterococcus*, *Chroomonas*, *Bathycoccus*, *Micromonas*)에 대한 유전체 분석이 완료되어 이들의 진화, 생태 및 환경 적응 등에 대한 연구가 활발히 진행되었다.



Kirkham et al. 2013

그림 7. NGS를 이용한 대양 진핵성미소조류 (PPE) 다양성 연구 예시

### 3절 현재 연구기술의 한계

#### 1. 미세조류의 다양성 현황 파악

시·공간적으로 광범위한 해상력의 미세생물 다양성 연구를 위해서는 기존의 분자생물학적 기법에 부가적으로 대량 시료 분석이 가능한 최신 NGS 기법과의 융합이 필요하다. 또한, 다양한 서식처에서 계절적인 시료를 획득하기 위해서는 많은 시간과 재원이 요구된다. 따라서, 시료의 확보 방법에 대한 충분한 검토가 필요하다.

#### 2. 아열대화 지표성 플랑크톤의 연구 개발 현황

식물플랑크톤은 해류에 의해 이동되기 때문에 난류 기원의 아열대 지표종으로 선정하기 위해서는 열대해역의 다양성 연구가 반드시 선행되어야 할 필요가 있다.

#### 3. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 현황 파악

우리나라 주변해의 다양한 서식처에서 중요한 기능 그룹을 먼저 파악하기 위한 연구가 선행되어야 한다. 특히, 우리나라 연안에 잘 발달된 갯벌에 우점하는 규조류의 다양성 연구와 같은 특정 그룹의 연구를 위해서는 그룹 특이적인 분자마커의 개발이 반드시 병행되어야 한다. 해양 환경의 변화에 따른 해양 생태계의 변동을 예측하고 대응 체계를 수립하기 위해서는 다양성에 기반한 기초 자료의 확보가 반드시 선행될 필요가 있음에도 불구하고, 우리나라 주변해의 미세조류 다양성 연구는 거의 없는 실정이다.

## 4절 KIOST 연구역량 및 전망

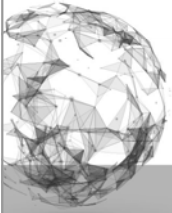
### 1. 미세생물 다양성 연구

KIOST는 미세생물의 형태 (현미경, flow cytometry, FlowCAM), 생화학 (HPLC) 및 분자생물학 (PCR 등)적 다양성 연구를 위한 분석 기술 및 장비를 이미 구축하여 활발히 연구를 수행하고 있다. 이를 통해 초미소남세균의 우리 근해 (Choi et al. 2013) 및 북서태평양 해역 (Choi et al. 2014)의 분포에 대한 연구를 수행한 바 있다. 최근에는 식물플랑크톤의 다양성 연구에 최신 NGS 장비인 MiSeq을 통해 분석할 수 있는 방법을 개발중이며 이를 통해 저비용 고효율로 다양성을 분석할 수 있을 것으로 기대된다. 다양한 저서 규조류의 미토콘드리아 유전체 분석을 완료하거나 분석 중에 있으며, 이들 자료를 이용하여 규조류의 다양성 분석을 위한 분자마커 개발을 위한 기반을 구축 중이다. 이러한 연구 방식은 다른 주요 기능 그룹의 분자마커 개발에 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

국제적으로 볼 때, 미세조류의 다양성 연구는 초기 단계에 있으며, 다양한 기능 그룹에 대한 연구도 또한 초기 수준에 위치하는 것으로 판단된다. 따라서, KIOST 연구팀의 선행 연구 결과와 경험을 활용한 연구의 추진을 통해 선진 연구 그룹과의 경쟁이 가능할 것으로 여겨진다. ‘북서태평양의 해양환경 변화가 한반도 주변해에 미치는 영향 연구’, ‘독도의 지속 가능한 이용 연구’ 등의 연구를 통해 미세생물의 군집 구조를 형태 및 색소 분석을 통해 규명하였으며, 분자생물학적 방법을 이용하여 초미소남세균의 시·공간적 다양성에 대한 연구를 수행하여 국내 및 국외 저널에 다수 발표하였다. ‘미토콘드리아 유전체를 통한 돌말류의 계통 및 진화’ 연구를 통해 규조류의 분자 마커 개발을 위한 기반 연구를 수행 중에 있으며, 2건의 미토콘드리아 유전체에 대해 국외 저널에 발표하였다.

### 2. 우리나라 주요해역 및 주변해 선행연구

한국해양과학기술원이 2006-2014년 사이에 진행한 과제 ‘북서태평양의 해양환경 변화가 한반도 주변해에 미치는 영향 연구’의 분야책임자로 참여 분자생물학적 분석방법을 사용한 미세조류의 다양성 및 분포 연구를 수행하였으며 수편의 연구 논문을 국제학회지에 제출하였다. 식물플랑크톤의 대표적 PFTs 그룹인 질소고정 식물플랑크톤의 해역별 분포 특성을 규명 해외학회에 발표하였다. 또한 2006년부터 해양수산부 정책사업 “독도의 지속가능한 이용연구”의 분야책임자로서 동해울릉분지의 식물플랑크톤 다양성에 대한 연구를 수행하며 자료를 축적하였다.



## 제3장

# 연구내용 및 결과



## 제3장 연구내용 및 결과

### 1절 연구내용

#### 1. 연구추진 전략 및 체계

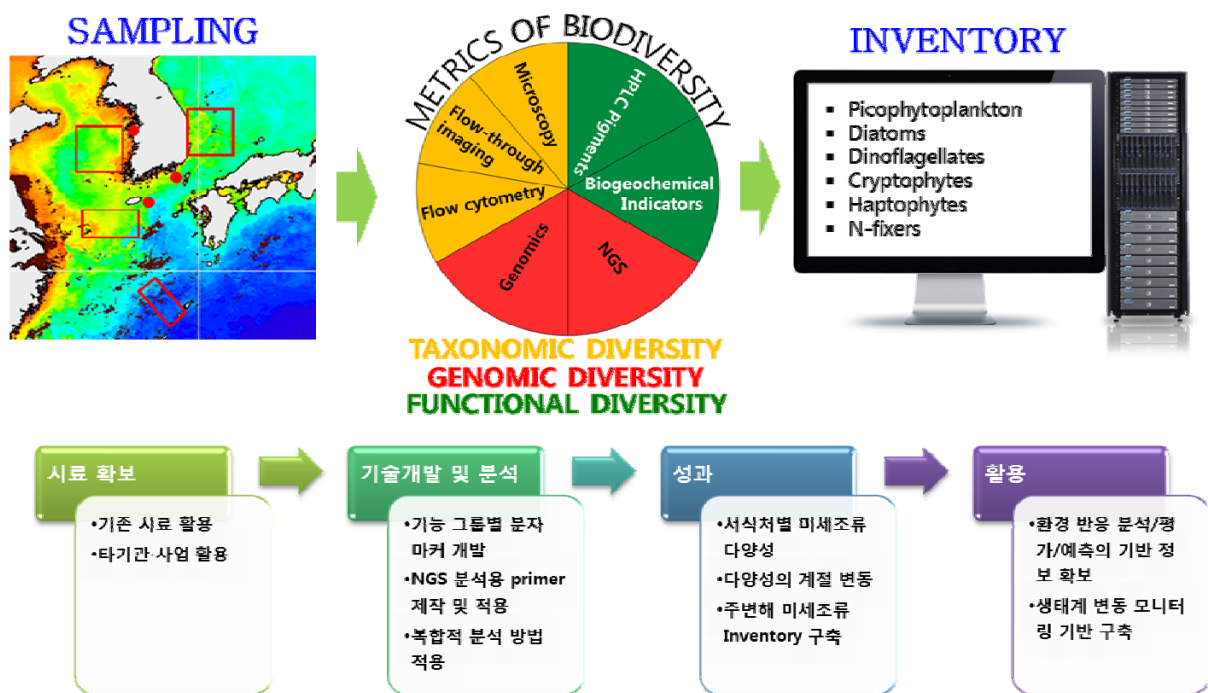


그림 8. 본 연구의 추진 체계도

#### 1.1. 기 확보된 시료의 활용

본 연구에서는 지난 10여 년간 북서태평양을 포함한 한반도 주변 해역에서 채집한 시료 자원을 적극적으로 활용하여 시·공간적 해상력을 높이고자 하였다 (그림 9).

#### 1.2. 타 기관 및 타 연구 사업의 해양 조사와 협력

국립수산과학원의 격월 정선 조사 및 본원 내 타 사업의 해양 조사 사업과 협력을 통해 자료의 질적·양적 향상을 추구하였다.

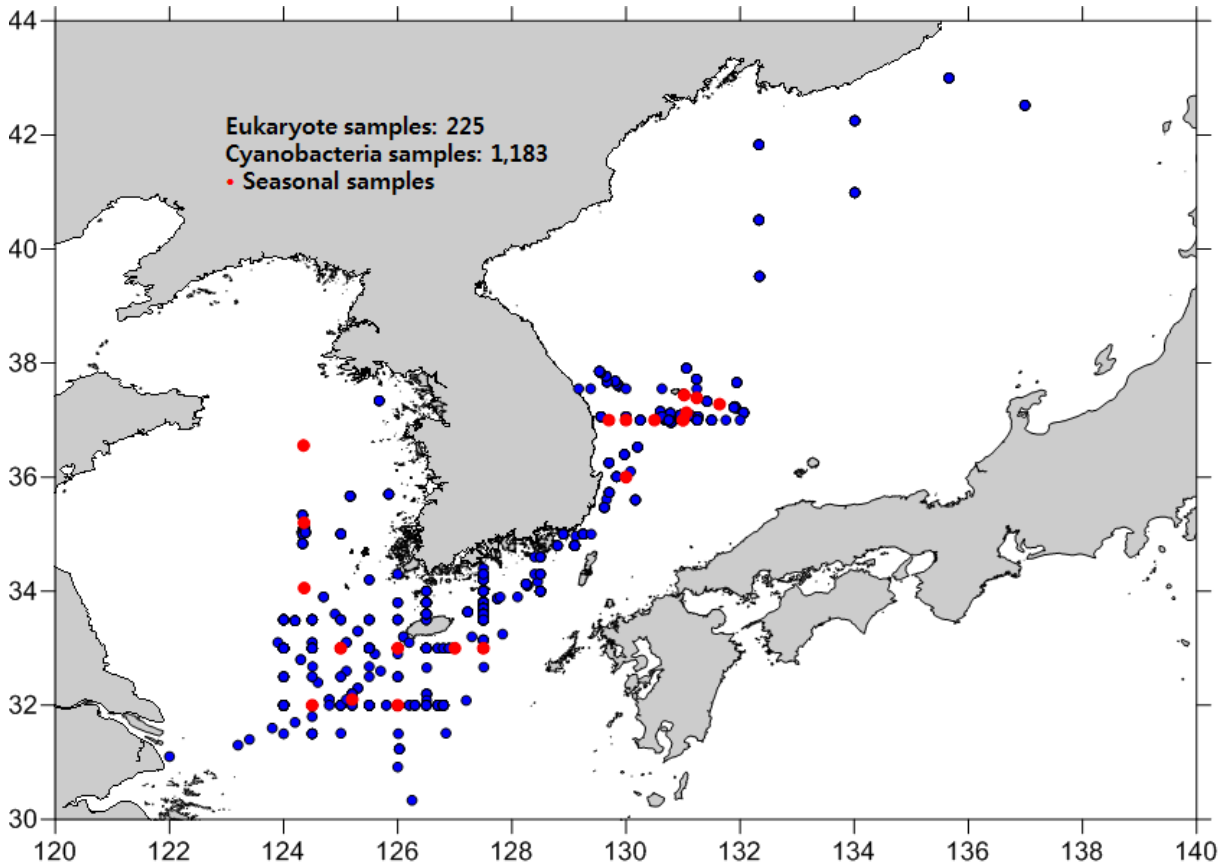


그림 9. 본 연구에 사용한 우리나라 연안 및 인근해 시료 정점 (총 1,408개).  
빨간색은 사계절 시료를 확보한 정점을 표시함

### 1.3. NGS 기술을 활용한 미세조류 다양성 연구 방법의 개발 및 활용

NGS 기술의 비약적 발달로 현재 약 386개의 시료에 대한 동시 다양성 분석이 가능해졌으며, 얻을 수 있는 염기서열의 수와 길이도 약 15백만개와 500bp로 진보하였다(그림 10). 미세조류의 다양성 연구를 위한 NGS 기법은 현재까지 개발되지 않았으나, 약 500bp 미만의 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머의 개발을 통해 NGS 적용이 가능할 것이다. 특히, 기능 그룹의 세밀한 다양성 분석을 위해 NGS에 적용에 적합한 분자마커의 개발이 필수적이다.



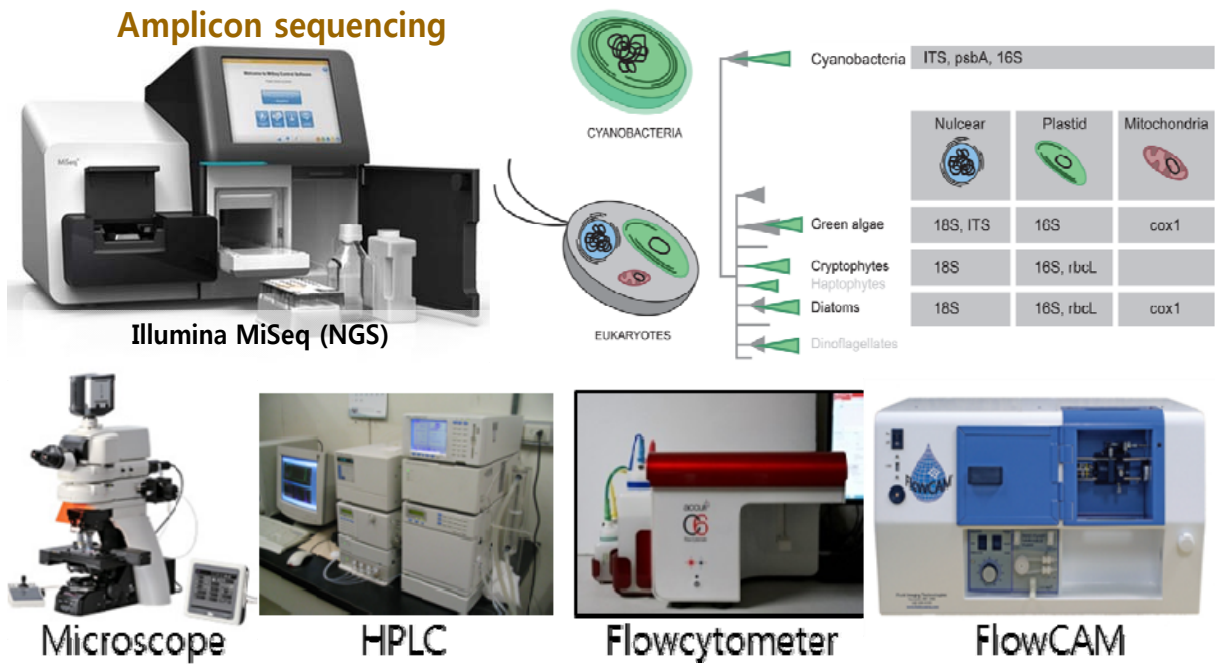


그림 10. 다양성 분석을 위해 사용한 다양한 접근방법

## 2. 연구개발 로드맵

| 핵심기술          | 요소기술                      | 1차년도<br>(2015년)              | 2차년도<br>(2016년)              | 3차년도<br>(2017년)      | Target 성과물               |
|---------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------|
| 미세조류<br>다양성   | •NGS 분석                   | NGS 분석 기법 개발                 |                              |                      | 서식지 별 출<br>현 종 목록        |
|               |                           | NGS 기반 광역적 미세조류 다양성 분포 특성 파악 |                              |                      |                          |
|               | •시공간적 분<br>포 분석           | 한반도 주변해 난류 영향<br>수역 다양성 비교   | 난류기원 와편모류 분포<br>과정 분석        | 난류기원 규조류 분포<br>과정 분석 | 아열대화 지표<br>종 선정          |
|               | •규조류 분<br>자 마커 검토<br>및 개발 | 분자 마커 개발 (배양체<br>확립 및 시퀀싱)   | NGS 적용성 평가                   | 규조류 증목록 작성           | 규조류 다양성<br>목록 및 분석<br>기술 |
| 기능유형<br>별 다양성 | •기능 유전자<br>(Nif, DMS)     | 질소고정자 다양성 분석                 |                              |                      | 기능 그룹별<br>다양성 목록         |
|               |                           |                              | Haptophyta 분자 마커<br>탐색       | Haptophyta 다양성 분석    |                          |
|               |                           |                              | 준계 증식 Cryptophyta<br>분자마커 개발 | Cryptophyta 다양성 분석   |                          |

그림 11. 연구개발 3개년도 총괄 로드맵

## 2절 연구방법

### 1. 미세조류 다양성 연구

#### 1.1 NGS 적용한 우리나라 주변해 미세조류 다양성 연구

##### 1.1.1 미세조류 다양성 분석 시료 현황

미세조류의 다양성은 이전과 연구기간 동안 다른 연구 등을 통해 확보된 DNA 시료를 이용하여 분석 되었다. 이들 시료를 이용함으로써 황해, 남해, 동중국해 및 동해를 포함한 우리나라 주변해에서 미세조류의 다양성의 시·공간적 분포 특성을 파악할 수 있었다. 2003년부터 2017년까지 15년 동안 수행된 조사 중 정제된 DNA가 가용한 719개 정점의 3000여개 시료에 대해 분자생태학적 방법을 이용하여 미세조류의 다양성을 분석하였으며 (그림 12). 연도, 월 및 해역별 시료의 수는 표에 나타내었다.

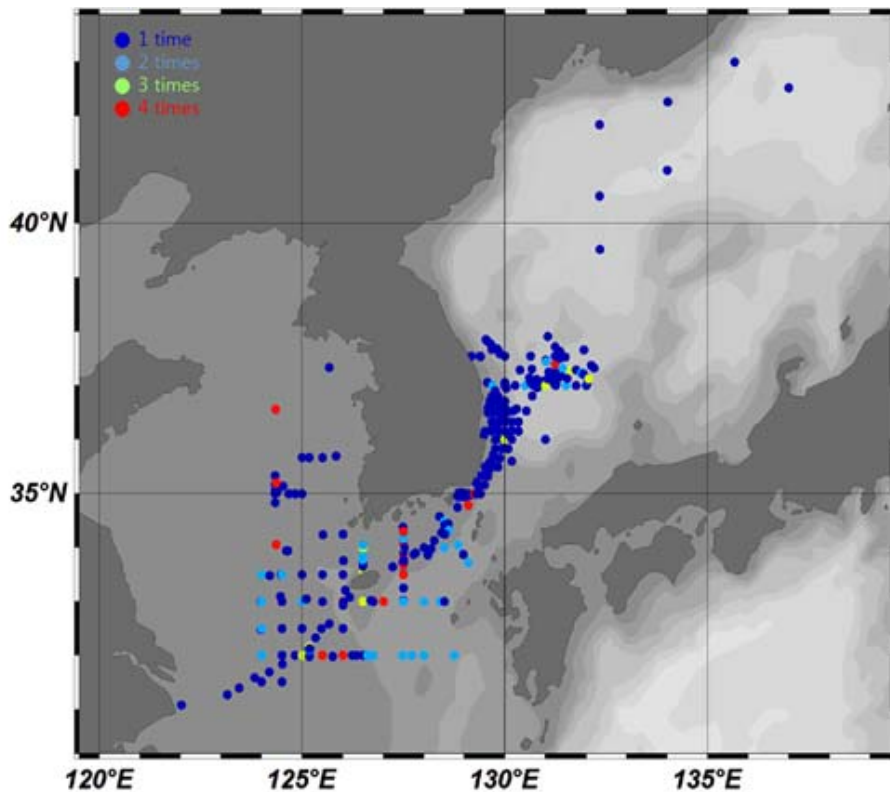


그림 12. 본 연구에 사용한 시료의 채집지점

### 1.1.2 NGS를 이용한 미세조류 분석기술 확대

#### □ DNA 추출 및 정제

유전자 분석을 위해 아래의 방법으로 DNA를 농축 및 정제하였다. 해수 시료를 현장에서 멸균된 0.2  $\mu\text{m}$  막여과지 (Supor filter, Gelman)에 여과하였으며, 여과지는 멸균된 2 ml 플라스틱 용기에 넣어진 후, 1 ml의 STE 완충용액을 넣어 냉동보관 (-70°C)하였다. 유전자 분석을 위한 DNA 추출은 Somerville et al. (1989)의 방법에 따라 수행되었다. 시료에 2 ml의 SET 완충용액을 넣고, lysozyme, proteinase K와 10% SDS 용액을 첨가하여 세포를 용해시켰다. 여기에 phenol-chloroform- isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 넣어 단백질을 제거하였으며, 다시 chloroform-isoamylalcohol 용액을 넣어 추가 정제하였다. DNA는 에탄올 침전을 통해 농축되었다. 2010년 이후의 시료에 대해서는 cell lysis 이후에 DNeasy genomic DNA purification kit (Qiagen)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

#### □ 초미소남세균의 다양성

Cyanobacteria의 다양성은 16S-23S rRNA 사이의 internal transcribed spacer (ITS) 염기서열 분석을 통해 수행되었다. ITS 염기서열은 GS-FLX Titanium이나 MiSeq 플랫폼을 이용하여 분석하였다. PCR 증폭에는 cyanobacteria에 특이적인 forward와 reverse 시퀀스 (Choi et al. 2013)에 각각의 플랫폼에서 분석하기 위한 어댑터 시퀀스를 붙여 제작된 프라이머를 이용하였다. pyrosequencing 방법은 Choi et al. (2013)제시된 방법을 따랐으며, MiSeq 분석은 아래의 과정에 따라 진행되었다. 남세균의 16S-23S ITS 유전자 부위에 특이적인 forward primer와 reverse primer 서열에 (Choi et al. 2013), 두 번째 PCR을 위한 Linker 서열을 붙인 확장프라이머를 이용하여 DNA의 ITS 부분(약 150-200 bps)을 PCR로 증폭하였다 (Illumina 2013). 증폭된 PCR 산물은 Ampure XT beads를 이용하여 정제되었다. 이어서, index와 시퀀싱 염기서열이 결합된 16개의 P5-primer와 24개의 P7-프라이머를 시료간에 중복되지 않게 조합하여, 두 번째 PCR을 수행하였다. Ampure XT beads를 이용하여 정제한 두 번째 PCR 산물은 nanodrop을 이용하여 정량하였으며, 동일한 양의 PCR 산물을 혼합하여 MiSeq 분석을 위한 시료를 준비하였다. MiSeq 분석은 천랩 (서울)에서 수행하였다. 얻어진 DNA 염기서열은 각 시료에 해당되는 Index의 염기서열에 따라 분류되었으며, Mothur 프로그램과 (Schloss et al. 2009), 기존에 알려진 *Synechococcus*와 *Prochlorococcus* 염기서열을 포함한 데이터베이스 (Choi et al. 2013)를 이용하여 분석되었다.

□ 광합성초미소진핵생물의 다양성

광합성진핵생물의 다양성도 광합성 남세균의 다양성 분석과 유사하게 MiSeq을 이용하여 분석되었으며, 대부분 유사한 과정으로 분석되었다. 그러나, 색소체의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머인 PLA449 (Fuller et al. 2006)와 universal 프라이머인 907R (Lane et al. 1985)을 이용하였으며, 얻어진 염기서열의 계통분석을 위한 데이터베이스는 PhytoREF (Decelle et al. 2015)를 이용하였다.

1.2. 우리나라 주변해 서식지별 미세조류 DB 구축

NGS에 의해 생산되는 대량의 다양성 정보 및 생태 환경 자료의 수집 및 접근을 위한 데이터베이스를 구축하였다. 이를 통해 수천 개에 이르는 다양성 정보를 효율적으로 관리하며, 관련된 생태환경 자료 등의 통합적 공유를 용이하게 하고자 하였다. 데이터베이스의 설계 및 제작은 외부 업체 (주식회사 엔지이엔)에서 담당하였으며, 리눅스 기반 서버로 웹을 통해 업로드, 검색 및 다운로드가 가능하게 제작하였다.

1.3. 규조류 분자마커 검토 및 개발

1.3.1. 배양체 확보 및 신규 분자마커 테스트

본 연구는 충청남도 태안반도에 위치한 근소만 (36°44'12.06"N 126°10'47.52"E)에서 주로 수행되었으며, 일부 시료는 을왕리 (37°26'43.67"N 126°22'18.07"E)와 시화 갯벌 (37°18'46.73"N 126°36'32.64"E)에서 획득하였다 (그림 13).

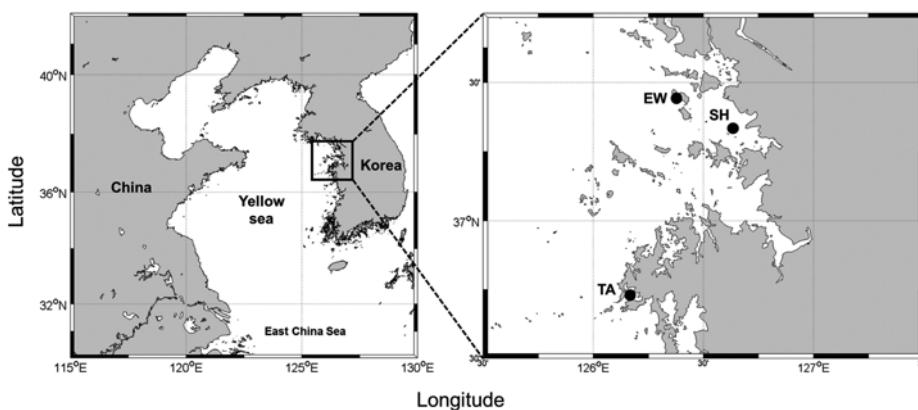


그림 13. 본 연구 조사지점. EW 을왕리 갯벌, SH 시화갯벌, 및 TA 태안 갯벌 위치

### 1.3.2. 배양주 확보, 분리 및 배양

미세 규조류를 포함하고 있는 개벌의 상층부를 긁어서 50 ml 튜브에 넣고 살아있는 상태로 실험실로 운반하였으며, 독립현미경과 Pasteur's pipette을 이용하여 단일 배양주로 분리하였다. 균주의 배양은 f/2 배지를 이용하였으며, 2-3주 간격으로 계대 배양하였다. 배양 시 L:D 주기는 12h:12h로, 조도는 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 으로 하였으며, 배양 온도는 15°C으로 하였다.

### 1.3.3. 배양주 동정

배양주가 충분히 자라면 일부를 덜어 산처리법 (modified Hendey 1974)으로 하여 세정하였으며, 광학현미경을 이용하여 1000배 배율에서 관찰 및 동정하였다. 주사전자현미경 분석을 위해 균주의 일부를 덜어 루골용액으로 고정하고 망목 1-2  $\mu\text{m}$ 의 PC membrane 여과지를 이용하여 여과하였다. 탈수는 에탄올을 이용하였으며, 마지막에 tetramethylsilane을 처리하여 건조하였다. 탈수 과정이 완료된 여과지를 stub에 붙이고 백금으로 코팅하여 주사전자현미경으로 관찰하였다. 규조류의 동정에는 Krammer & Lange-Bertalot (1986), Krammer & Lange-Bertalot (1988), Krammer & Lange-Bertalot (2000), Lobban (1984), Massé *et al.* (2001), Patrick & Reimer (1975), Poulin *et al.* (2013), Witkowski *et al.* (2000), Witkowski *et al.* (2004) 등을 참고하였다.

### 1.3.4. DNA 추출 및 PCR

DNA 추출을 위해, 충분히 자란 배양주의 일부를 덜어 micro 튜브에 넣고 13,000 rpm으로 1분간 원심 분리하여 배양주를 모았다. 모아진 배양주는 DNA extraction kit를 이용하였으며, kit의 매뉴얼에 따라 실시하였다. 추출한 DNA는 -80°C에서 보관하였다. 추출한 DNA를 주형으로 하여 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 18s rRNA gene 증폭을 위한 primer는 diatom9F (Lynch *et al.* 1997)와 EukB-R (Medlin *et al.* 1988)을 이용하였으며, *rbcL* gene 증폭을 위한 primer는 DPrbcL1과 DPrbcL7 (Daugbjerg and Andersen 1997)을 이용하였다. PCR 반응을 위해 1  $\mu\text{l}$ 의 DNA에 3  $\mu\text{l}$  10x ExTaq buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  free), 2.4  $\mu\text{l}$  dNTP, 0.5  $\mu\text{l}$  primer (forward와 reverse 각각), 0.2  $\mu\text{l}$  Taq polymerase (Takara, ExTaq), 22.4  $\mu\text{l}$  증류수를 첨가하여 최종 부피를 30  $\mu\text{l}$ 로 하였다. PCR 반응 조건은 18s rRNA gene의 경우 94°C에서 4분 동안 initial denaturation 시키고, 94°C에서 45초 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분 30초 동안 extension의 cycle을 34회 반복하였다. *rbcL* gene은 94°C에서 3분 동안 initial denaturation 시키고, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 cycle을 35회 반복하였다. 최종적인 PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하고 loading dye로 염색하여 확인 하였다.

### 1.3.5. DNA 정제 및 염기서열 분석

PCR 산물을 이용하여 염기서열을 분석하기 위하여 DNA 정제를 수행하였다. DNA 정제는 Accuprep PCR purification kit (Bioneer, Daejeon South Korea)를 이용하여 kit의 protocol에 따라 진행하였다. 정제된 DNA는 마크로젠에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열은 Vector NTI Advance 11 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 assemble 하였으며, ARB program package를 이용하여 정렬하였고, 최종 수작업을 통해 완성하였다. 정렬시에는 GenBank에 등록되어 있는 염기서열을 받아 함께 진행하였다. 정렬된 염기서열을 근거로 phylogenetic tree를 작성하여 유연관계를 분석하였다.

### 1.3.6. 저서성 구조류 다양성 연구를 위한 NGS 적용성 평가

#### □ 조사정점

본 연구의 조사 지역은 충남 태안반도에 위치한 근소만으로 상부조건대부터 하부까지 총 10개의 정점을 선정하여 시료를 채취하였다 (그림 14). 근소만은 반폐쇄성 만으로 면적은 87 km<sup>2</sup>이며, 만으로 유입되는 강은 없어 담수 유입에 대한 영향이 적다. 만조 시 수심은 지역에 따라 2-4m이며, 간조 시 갯벌의 90% 이상이 노출된다.

#### □ 퇴적물샘플 수집

퇴적물 시료는 2011년 10월과 2012년 1월 투명 아크릴 코어 (내경 2 cm, 길이 15 cm)를 사용하여 수집하였다. 저서 구조류는 퇴적물의 표면에 불규칙적인 매트를 형성하는 경향이 있으므로 각 정점에서 5개의 샘플을 수집하고 즉시 아이스박스에 넣고 냉동상태로 실험실로 운반하였다. 각 정점에서 채취한 5개의 코어 시료의 상부 1 cm를 각각 잘라내어 하나의 튜브에 모아 완전히 혼합하였으며, 이를 샘플링하여 DNA 추출을 위한 시료를 확보하였고 실험 시까지 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하였다.

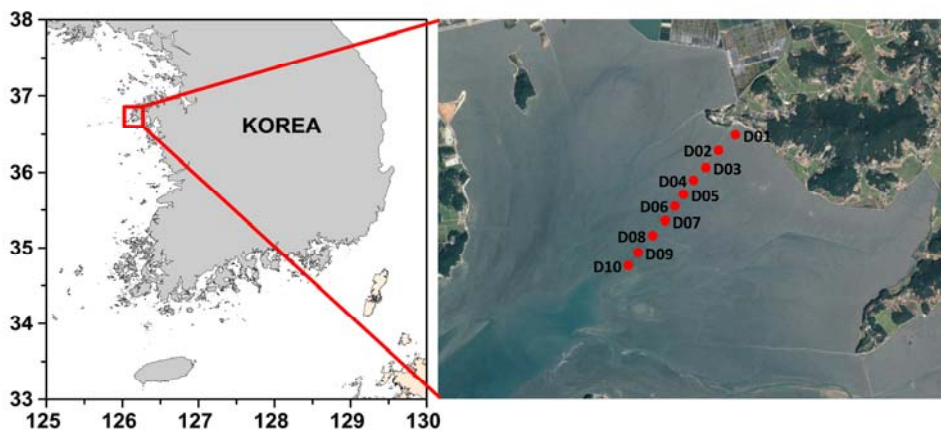


그림 14. 저서돌말류 NGS 분석에 사용한 태안 근소만 시료 채집지 (D01-D10)

## □ 프라이머 제작

*rbcL* 유전자를 대상으로하는 저서성 규조류 특이적 프라이머의 제작을 위해 Geneious Pro v.5.3.6 소프트웨어 (<http://www.geneious.com>) 내 Primer3 (Untergasser et al. 2012) 을 사용하였다. 프라이머는 GenBank에 등록된 1,240개 규조류의 *rbcL* DB를 참조하여 설계하였다. 아미노산 서열의 정렬 후, amplicon size, specificity 및 degeneracy을 고려하여 프라이머 쌍을 설계 하였다. 배양 균주 및 자연 퇴적물 시료를 이용한 온도 구배 PCR을 통해 적절한 annealing 온도를 결정하였다. 특이성을 평가하기 위해 자연 샘플의 PCR 산물을 정제하고 T-Blunt PCR Cloning Kit (SolGent)를 사용하여 클로닝 하였고, Macrogen에 의뢰하여 시퀀싱 하였다.

## □ NGS 라이브러리 준비

20개의 침전물 샘플로부터 얻은 DNA는 PowerSoil DNA isolation kit (MO BIO Laboratories Inc.)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 1차 PCR은 새로이 제작된 *rbcL* 유전자에 대한 저서성 규조류 특이적 프라이머 쌍을 사용하여 수행되었다. PCR 조건은 다음과 같다: 94°C에서 5분간 initial denaturation; amplification (95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 45초) 25회 반복; 72°C에서 10분간 최종 extension. 1차 PCR 산물의 정제와 2차 PCR의 수행은 MiSeq 매뉴얼 Illumina (2013)과 Choi et al. (2016)에 따라 수행되었다. 최종 정제 된 PCR 샘플을 NanoDrop ND-1000 분광광도계 (NanoDrop Technologies)를 사용하여 정량하였으며, 각각의 PCR 산물을 동일한 양으로 모으고 Chun Lab의 Illumina MiSeq 2 x 300 PE 플랫폼을 사용하여 혼합 된 샘플을 시퀀싱하였다.

## □ MiSeq 데이터 분석

GenBank에서 획득한 2,240개의 *rbcL* 유전자 염기서열을 이용하여 reference database를 구축하였다. *rbcL* 유전자의 alignment는 ARB 패키지 (Ludwig et al, 2004)를 사용하여 수행되었으며, 이 과정에서 아미노산 서열로 변환하여 부정확 한 서열과 코돈을 가진 서열은 제외되었다. MiSeq을 통해 획득한 read들은 Mothur 패키지 v.1.33.3 (Schloss et. al. 2009, <http://www.mothur.org/>)을 이용하여 처리하였다. fastq 파일들은 먼저 ‘contig.seqs’ 명령을 사용하여 contig에 어셈블한 후 ‘screen.seqs (minlength=400, maxlength=525, maxambig=0, Maxhomop=8)’ 명령을 사용하여 품질이 좋지 않은 시퀀스를 제거하였다. 그 후 Jemboss 프로그램 v.1.5 (Carver and Bleasby 2003, <http://emboss.sourceforge.net/emboss/>)를 사용하여 모든 서열을 아미노산 서열로 변환하여 부정확한 코돈을 선별 하였으며, 이러한 read들은 Mothur 패키지의 ‘remove.seqs’ 명령을 이용하여 제거하였다. 다음으로, ‘unique.seqs’ 명령을 이용하여 단일 대표 시퀀스를 선택하였으며, ‘align.seqs’

명령을 통해 reference database을 기준으로 정렬하였다. ‘pre.cluster (diffs=4)’ 및 ‘chimera.uchime (dereplicate=t)’ 명령을 사용하여 PCR artifacts 및 chimera를 제거하였다. 남은 read들은 ‘classify.seqs (method=knn, numwanted=1)’ 명령을 이용하여 각 read들의 분류계급을 지정하였으며, ‘sub.sample (size=9,236)’ 명령에 의해 임의로 서브 샘플링하였다. ‘dist.seqs (cutoff=0.20)’ 명령을 사용하여 OTU (Operational Taxonomic Unit) distance matrix를 생성했으며, ‘cluster (with cutoffs ranging from 0.01 to 0.06)’ 명령을 사용하여 distance matrix를 기준으로 OTU를 클러스터링하였다. 각 OTU shard 파일은 ‘make.shared (labels=cutoffs ranging from 0.01 to 0.06)’ 명령을 사용하여 cutoff 기준에 따라 각각 생성하였으며, 각 분류 계급 수준에서 OTU 및 종의 수를 추정하는 데 사용하였다. 마지막으로, representative OTU 시퀀스는 ‘get.oturep (method=abundance)’ 명령을 사용하여 생성되었습니다. 다양성지수는 ‘summary.single (calc=nseqs-coverage-sobs-ace-chao-shannon-simpson, subsample=9,236)’ 명령을 사용하여 계산되었다.

#### □ 계통 분석

OTU에 대해 지정된 분류 계급은 계통 분석을 수행하여 확인하였다. 주요 OTU를 대표하는 시퀀스들에 대한 ML (maximum-likelihood) 계통수는 Randomized Axelerated Maximum Likelihood v.8.2.1 소프트웨어 (RAxML, Stamatakis 2014)를 사용하여 제작되었다. Ochrophyta에 속하는 두 종 (*Triparma pacifica*와 *Triparma mediterranea*)을 outgroup으로 활용하였다. Interactive Tree of Life (Letunic and Bork 2007, <http://itol.embl.de>)를 사용하여 ML 계통수가 포함된 heatmap을 작성하여 각 OTU의 상대 빈도를 표시하였다.

### 1.4 연안 및 주변해 미세조류 분포 분석

본 연구에서 열대성 와편모조류 지표종을 선정하기 위해 쿠로시오 해역과 열대 해역 및 동중국해 해역, 동해 해역에서 현장조사를 통해 얻은 시료 100개를 분석하였다. 시료는 phytoplankton net (망목 20  $\mu\text{m}$ )를 사용하여 아표층 엽록소 최대 (SCM)층부터 표층까지 수직으로 채집하였다. 채집된 식물플랑크톤은 현장에서 Lugol's iodine solution으로 고정한 후 실험실로 옮겨져 도립현미경 (Nikon Eclipse Ti-U)을 통해 분석되었다. 대형 열대성 와편모조류의 종 다양성을 보기 위해 40배율에서 동정하였으며 소형 열대성 와편모조류 종을 동정하기 위해 200배율로 동정하였다. 열대성 지시종 선정을 위해 와편모조류 중 비교적 크기가 크고 광학현미경 상에서 형태적으로 분류가 편리한 종들을 위주로 선정하였다. 선정된 *Amphisolenia*속 9종, *Ceratocorys*속 2종, *Citharistes*속 2종, *Dinophysis*속 7종, *Ceratium*속 50종, *Ornithocercus*속 9종, *Oxytoxum*속 8종, *Phalacroma*속 3종, *Podolampas*속 4종, *Pyrocystis*속 1종, *Triposolenia*속 1종 총



11개의 속에 속한 98종으로 이루어진 리스트를 기반으로 각 정점에서 출현유무를 확인하였다. 98종중 52종을 차지하는 *Ceratium*속에 속하는 종 중 형태 변화가 심해 아종이 다수 존재하는 일부 종들은 아종을 구분하지 않고 종 수준에서 동정하였다. 각 종이 출현한 정점의 표층 최저 수온과 표층 최저 염분을 바탕으로 PASW statistic 18의 계층적 군집분석 방법 중 중심점 군집화 방법을 활용하여 5개의 그룹으로 군집을 나누었다. 독도 인근 해역에 미치는 난류의 영향을 알아보기 위해 2013년 4, 8월 A정점과 16번 정점 및 2006년 11월, 2007 12월 24번 정점에서 위 리스트를 기반으로 와편모조류의 출현유무를 확인하였다.

## 2. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 연구

### 2.1. *nifH* 유전자 분석을 통한 우리나라 주변해 질소고정자 분포 비교

질소고정은 빈영양해역에서 질소공급의 50% 이상을 차지하는 매우 중요한 생지화학적 과정이다. 우리나라는 제주도 동쪽으로 빈영양성인 쿠로시오 분지류의 영향을 받으며, 그 분지류는 대한해협 통해 동해에까지 영향을 미친다. 또한 하계에는 성층의 강화로 표층으로의 영양염 공급이 제한되어 빈영양 특성을 나타내기도 한다.

이러한 생태적 중요성에도 불구하고, 현재까지 우리나라 주변해에서 질소고정에 대한 연구는 거의 수행되지 못하였다. 본 연구에서는 우리나라 주변해에서 잠재적인 질소고정자를 파악하기 위해 NGS 방법을 적용하여 질소고정자 다양성을 파악하였다. 질소고정 생물의 다양성은 질소 고정과 관련된 nitrogenase 유전자의 하나인 *nifH* 유전자의 염기서열 분석을 통해 이루어졌다. 유전자 분석을 위한 DNA 추출은 앞의 초미소남세균 다양성 분석과 동일한 방법으로 진행되었다. NGS 분석은 MiSeq 플랫폼을 이용하였다. *nifH* 유전자의 증폭은 nested PCR (Omoregie et al. 2004) 방법으로 수행되었으며, 두 번째 PCR의 forward primer (*nifH1*)에 MiSeq 어댑터 시퀀스를 추가한 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 이후의 방법은 초미소남세균 다양성에서 분석된 방법과 유사하게 수행되었다. 최종적으로 약 500bps의 PCR 산물을 얻었으며, 증폭된 PCR 산물을 nanodrop을 이용하여 정량하였다. 시퀀싱은 천랩 (주)에서 수행되었다. 얻어진 DNA 염기서열은 각 시료에 해당되는 barcode 염기서열에 따라 분류되었다. Primer 염기서열 제거 및 alignment는 Mothur 프로그램 (Schloss et al., 2009)을 이용하여 수행되었으며, 얻어진 염기서열의 분류학적 그룹의 결정은 Mothur 프로그램을 이용하였다. 이때 *nifH* 유전자의 database는 '*nifH* database; <http://www.es.ucsc.edu/~wwwzehr/research/database/>'를 이용하였다.

## 2.2. 춘계증식 은편모조류 (Cryptophyta) 다양성 분석을 위한 분자마커 개발

### □ 배양주 확보 및 유지

은편모조류 배양주는 미세조류배양 전문기관에서 분양받았다. 미국 National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA), 영국 Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) 및 한국해양과학기술원 해양시료도서관 (KIOST-LIMS)이다. 각 배양주는 f/2 배지 (Guillard and Ryther 1962), 20°C, L:D주기 12h:12h, 조도 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 유지하였다.

### □ DNA 추출, PCR 및 염기서열 분석

Total DNA 추출을 위해 각배양주의 세포크기를 고려하여 2-5  $\mu\text{l}$  membrane filter를 이용하였다. 여과지에 모은 세포는 멸균 f/2 배양액을 이용하여 2-3회 씻어내어 박테리아 오염을 최소화 하였다. 각 배양주의 0.1-0.2 g의 세포를 수집하여 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 또는 LaboPass Tissue Mini Kit (Cosmo Genetech, Seoul, Korea)의 매뉴얼에 따라 total DNA 추출을 수행하였다. 추출한 DNA는 -80°C에서 보관하였다. 추출한 DNA를 주형으로 하여 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR PreMix Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하였다. PCR 반응 조건은 initial denaturation 94°C에서 3분, main cycle 30회 (denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 1분, extension 72°C 2분) 반복, final extension 72°C 10분이다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인 하였다. PCR 산물 정제는 Accuprep PCR purification kit (Bioneer, Daejeon South Korea)를 이용하였다. 정제된 DNA는 마크로젠에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 각 정방향 및 역방향 염기서열 분석결과 (abi files)는 Geneious Pro V.7을 이용하여 확인하였다. 정렬시에는 GenBank에 등록되어 있는 염기서열을 받아 함께 진행하였다. GenBank DB에서 받은 은편모조류 색소체 유전체 자료는 8개는 NC\_000926 *Guillardia theta* (Douglas and Penny 1999), KY856939 *Cryptomonas curvata*, KY856941 *Chroomonas placoidea*, KY860574 *Chroomonas mesostigmatica*, KY856940 *Storeatula* sp. (Kim et al. 2017), NC\_009573 *Rhodomonas salina* (Khan et al. 2007), NC\_013703 *Cryptomonas paramecium* (Donaher et al. 2009), NC\_027589 *Teleaulax amphioxeia* (Kim et al. 2015)이다. 각 유전자 DNA 서열은 Geneious Pro plug clustal의 translation alignment 알고리즘을 이용하여 정렬하였다. 춘계 은편모조류 4종 (NC\_007288 *Emiliania huxleyi*, NC\_007288 *Pavlova lutheri*, NC\_016703 *Phaeocystis antarctica*, NC\_021637 *Phaeocystis globosa*)의 자료를 이용하였다.

각 유전자의 P-distances는 PAUP\* V.4.10b (Swofford 2002)를 이용하였으며, Synonymous substitution rate (Ks) and Non-synonymous substitution rate (Ka)는 DnaSP V.6.10.01

(Librado and Rozas 2009)을 이용하였다. 각 유전자 최적의 계통수는 maximum likelihood 방법을 적용한 RAxML V.8.26. (Stramatakis 2014)을 이용하여 추정하였다. 각 monophyletic node의 지지도는 ML criterion하에서 bootstrap method (1,000번)을 이용하여 계산하였다.

### 2.3. 착편모조류 (Haptophyta) 분자마커 탐색 및 인근해 다양성 분석

#### □ 배양주 확보 및 유지

착편모조류 24개 배양주는 미세조류배양 전문기관인 한국해양과학기술원 해양시료 도서관 (KIOST-LIMS)에서 분양받았다. 각 배양주는 f/2 배지 (Guillard and Ryther 1962), 20°C, L:D주기 12h:12h, 조도 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 유지하였다.

#### □ DNA 추출 및 염기서열 분석

Total DNA 추출을 위해 각배양주의 세포크기를 고려하여 2-5  $\mu\text{l}$  membrane filter를 이용하였다. 여과지에 모은 세포는 멸균 f/2 배양액을 이용하여 2-3회 씻어내어 박테리아 오염을 최소화 하였다. 각 배양주의 0.1-0.2 g의 세포를 수집하여 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 또는 LaboPass Tissue Mini Kit (Cosmo Genetech, Seoul, Korea)의 매뉴얼에 따라 total DNA 추출을 수행하였으며 -80°C에서 보관하였다. 각 배양주 total DNA는 Illumina HiSeq 2500 플랫폼 (100bp paired-end 500bp insertion; DNA Link)을 이용하여 분석하였다. 전체 paired-read의 어셈블리에는 CLC Genomics Workbench V.6 (QIAGEN, Hilden, Germany)의 CLC de novo assembler를 이용하였다. GenBank에서 가용한 착편모조류 세포소기관 유전체 (mtDNA 미토콘드리아 유전체, ptDNA 색소체 유전체)는 다음과 같다. 4종의 mtDNA는 JN022704 *Emiliana huxleyi*, NC\_005332 *Emiliana huxleyi*, KJ201908 *chrysochromulina* sp. CCMP 291 및 AB930144 *Chrysochromulina* sp. NIES 1333이며, 5종의 ptDNA는 NC\_020371 *Pavlova lutheri*, NC007288 *Emiliana huxleyi*, KJ201907 *Chrysochromulina* sp. CCMP291, NC\_016703 *Phaeocystis antarctica*, NC\_021637 *Phaeocystis globosa*이다. 각 세포소기관 유전체 CDS 중 대표적인 유전자 31개를 선정하였다 (mtDNA: *cob*, *cox2*, *cox3*, *nad1*, *nad5*, ptDNA: *atpA*, *cbbX*, *ccs1*, *clpC*, *minD*, *petB*, *petD*, *psaA*, *psaB*, *psaD*, *psbA*, *psbB*, *psbV*, *rbcL*, *rbcS*, *rpl2*, *rpl3*, *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *proC2*, *rps2*, *rps3*, *secY*, *tufA*). 31개 CDS 염기서열은 *Emiliana huxleyi*의 아미노산서열을 이용한 BLASTp를 통하여 확보하였다.

각 유전자의 *P*-distances는 PAUP\* V.4.10b (Swofford 2002)를 이용하였으며, Synonymous substitution rate (*Ks*) and Non-synonymous substitution rate (*Ka*)는 DnaSP V.6.10.01 (Librado and Rozas 2009)을 이용하였다. 각 유전자 최적의 계통수는 maximum likelihood 방법을 적용한 RAxML V.8.26. (Stramatakis 2014)을 이용하여 추정하였다. 각 monophyletic node의 지지도는 ML criterion하에서 bootstrap method (1,000번)을 이용하여 계산하였다.

### 3절 연구결과

#### 1. 미세조류 다양성 연구

##### 1.1. NGS 적용한 우리나라 주변해 미세조류 다양성 연구

###### 1.1.1. 초미소남세균 다양성의 시·공간적 분포

우리나라 주변해에 우점하여 나타나는 *Synechococcus*는 clades I, IV 및 II에 속하였다. clades I 과 IV는 연안의 냉수역과 아한대 해역에서 우점하는 냉수성 clades로 잘 알려져 있는데, 이들은 겨울과 봄에 우리나라 주변해에서 높은 비율로 출현하였다 (그림 15-16). 난수성으로 알려진 clade II는 봄을 제외하면 모든 계절의 표층에서 높게 나타나 우리나라 주변해에서 가장 우점하는 *Synechococcus*의 clade였다. 수온이 낮은 겨울철에도 난수성인 clade II가 우리나라 주변해에서 우점하였는데, 이는 *Synechococcus*의 개체수가 매우 낮은 겨울철에 쿠로시오 분지류를 통해 유입된 clade II의 *Synechococcus*가 상대적으로 높은 비율을 차지하였기 때문으로 여겨진다. 한편, 하계에 20m 수심에서는 냉수성인 clade I이 clade II와 유사하거나 높은 비율로 나타나 표층과 뚜렷이 구별되는 군집조성을 보였는데, 성층의 영향으로 20 m 수심의 수온이 하계에도 낮게 유지되었기 때문으로 여겨진다.

한편, 빈영양성으로 쿠로시오 난류를 통해 유입되는 *Prochlorococcus*는 HLII 생태형 (ecotype)이 다른 생태형에 비해 절대적으로 우점하였다. 그러나, 전체 초미소남세균의 30% 이하로만 분포하여 *Prochlorococcus*의 기여도는 대부분의 시기에 높지 않았다 (그림 15-16). 다만, 여름과 가을철에 동중국해를 중심으로 주변해서 유의하게 출현하여 이 시기에 쿠로시오 분지류의 유입을 시사하였다.

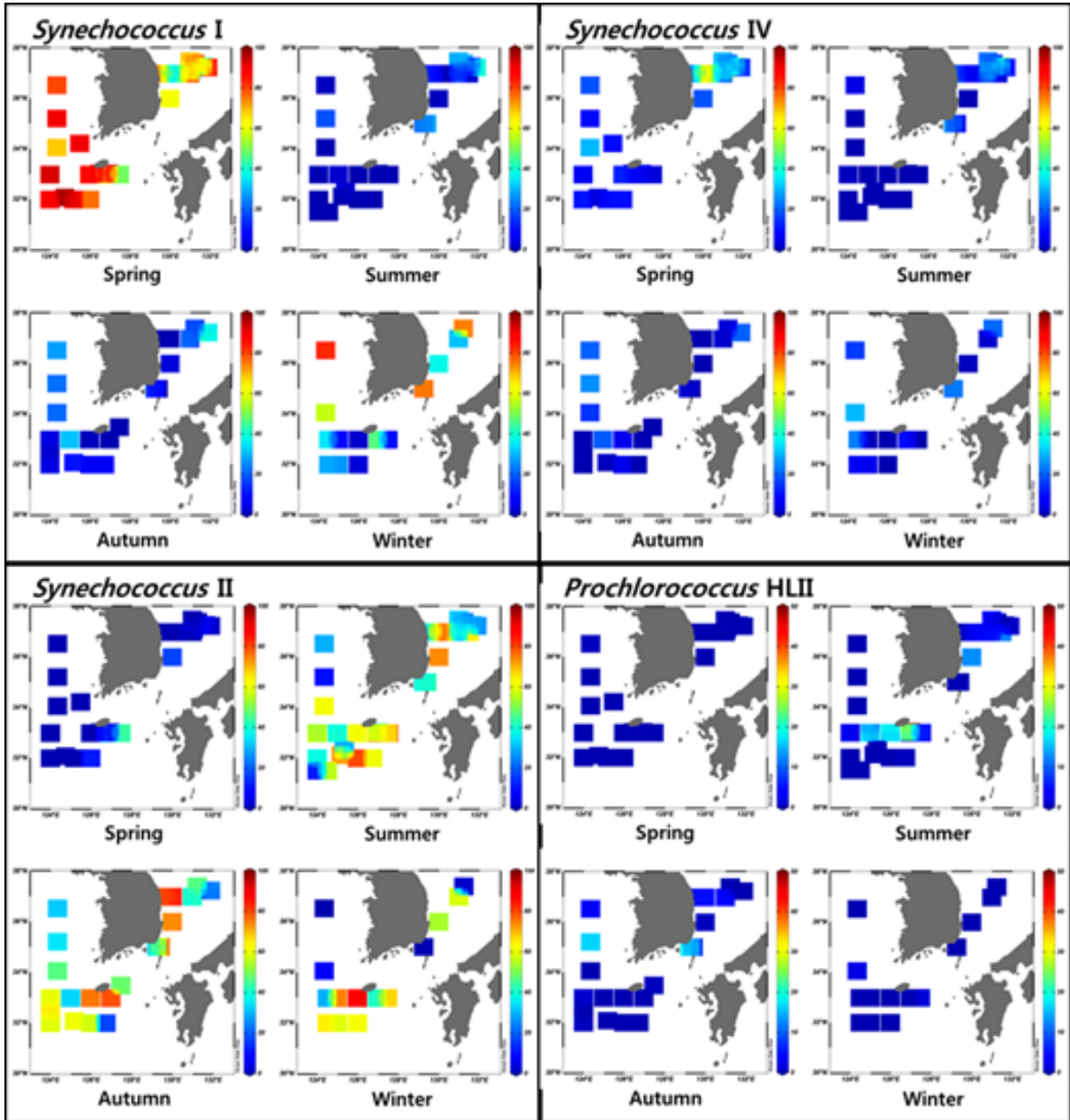


그림 15. 우리나라 주변해 표층수에 우점하는 picocyanobacteria 분포도

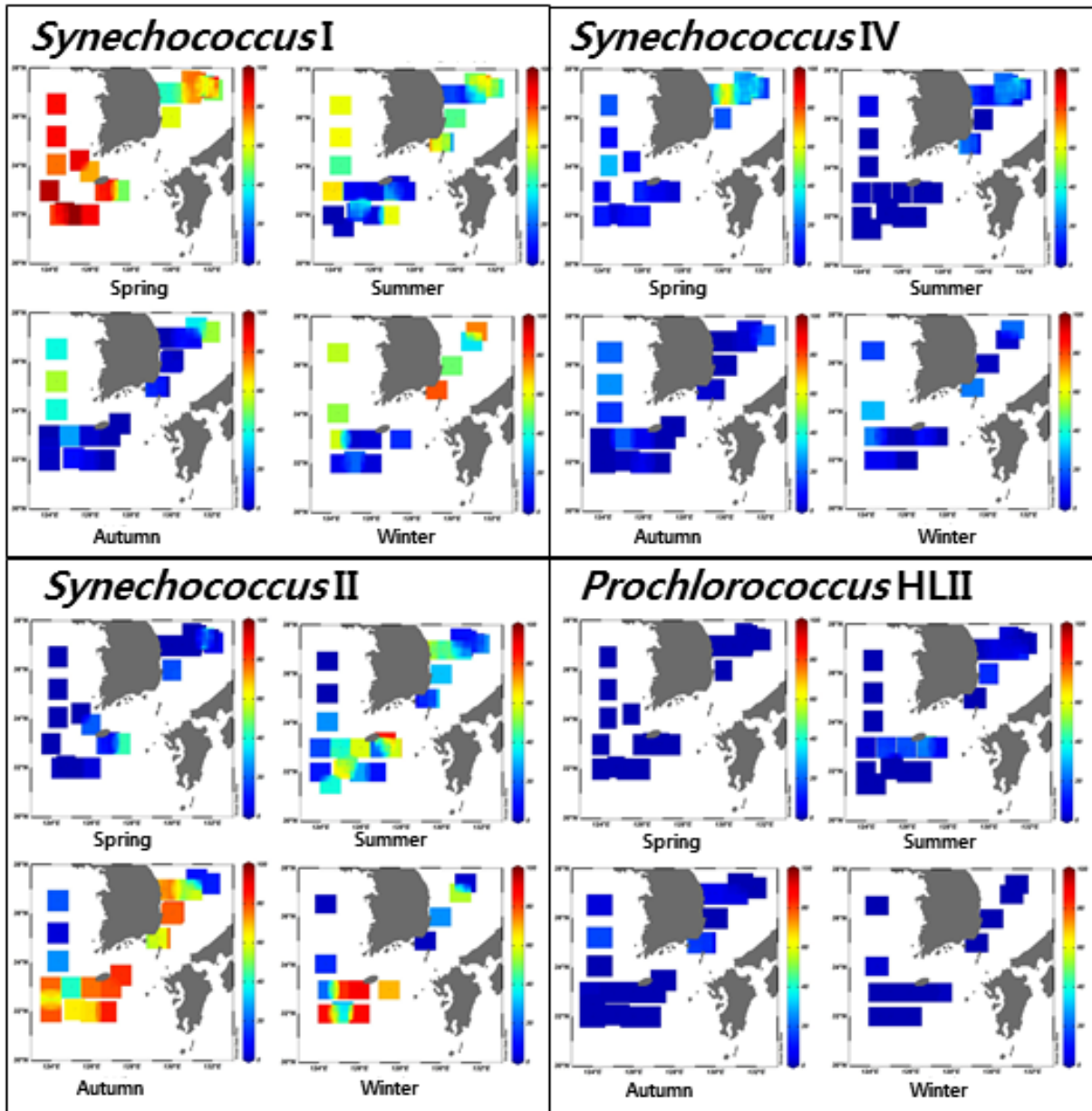


그림 16. 우리나라 주변해 수심 20 m에 우점하는 picocyanobacteria 분포도

### 1.1.2. 광합성초미소진핵생물 다양성의 시·공간적 분포

우리나라 주변해의 광합성 초미소진핵생물의 다양성은 시·공간적으로 큰 변이를 나타내었다 (그림 17-18). 봄에는 표층에서 녹조류인 Mamiellophyceae가 80% 이상까지 가장 우점하는 초미소식물플랑크톤으로 나타났으며, 규조류는 동중국해와 동해의 표층과 20 m 수심에서 약 50% 내외의 높은 비율로 출현하였다. Prymnesiophyceae도 서해와 독도 주변해에서 약 40~50%의 비율로 나타났는데, 해역별로 뚜렷한 차이를 보였다. 그러나 이러한 차이는 봄철에 식물플랑크톤 군집이 봄철 대변성을 전후하여 큰 변동성을 나타낸 점에 비취볼 때 해역별 군집 특성이라기 보다 조사 시기의 차이 때문일 가능성이 있다.

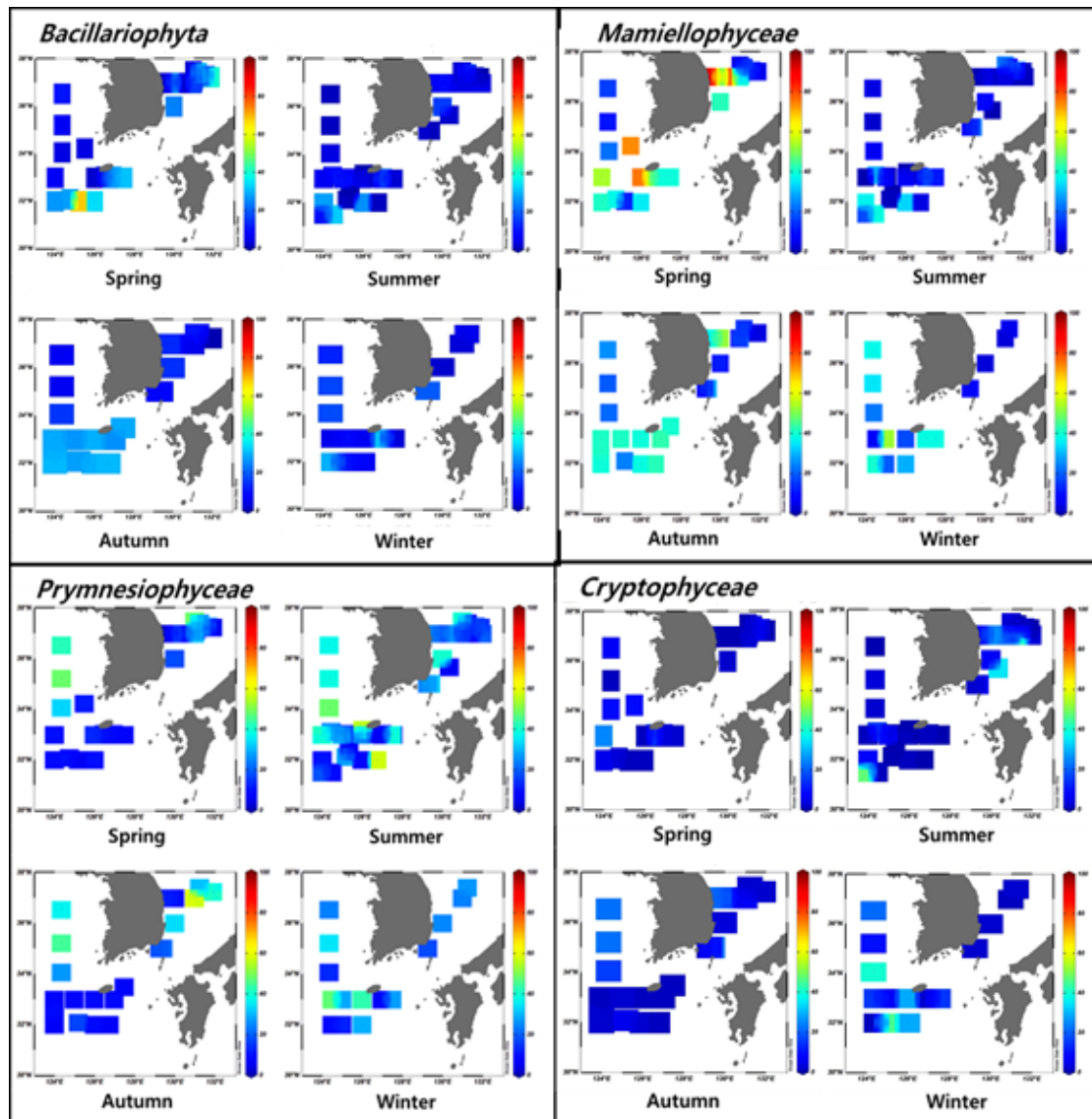


그림 17. 우리나라 주변해 표층수에 우점하는 광합성 초미소조류 분포도

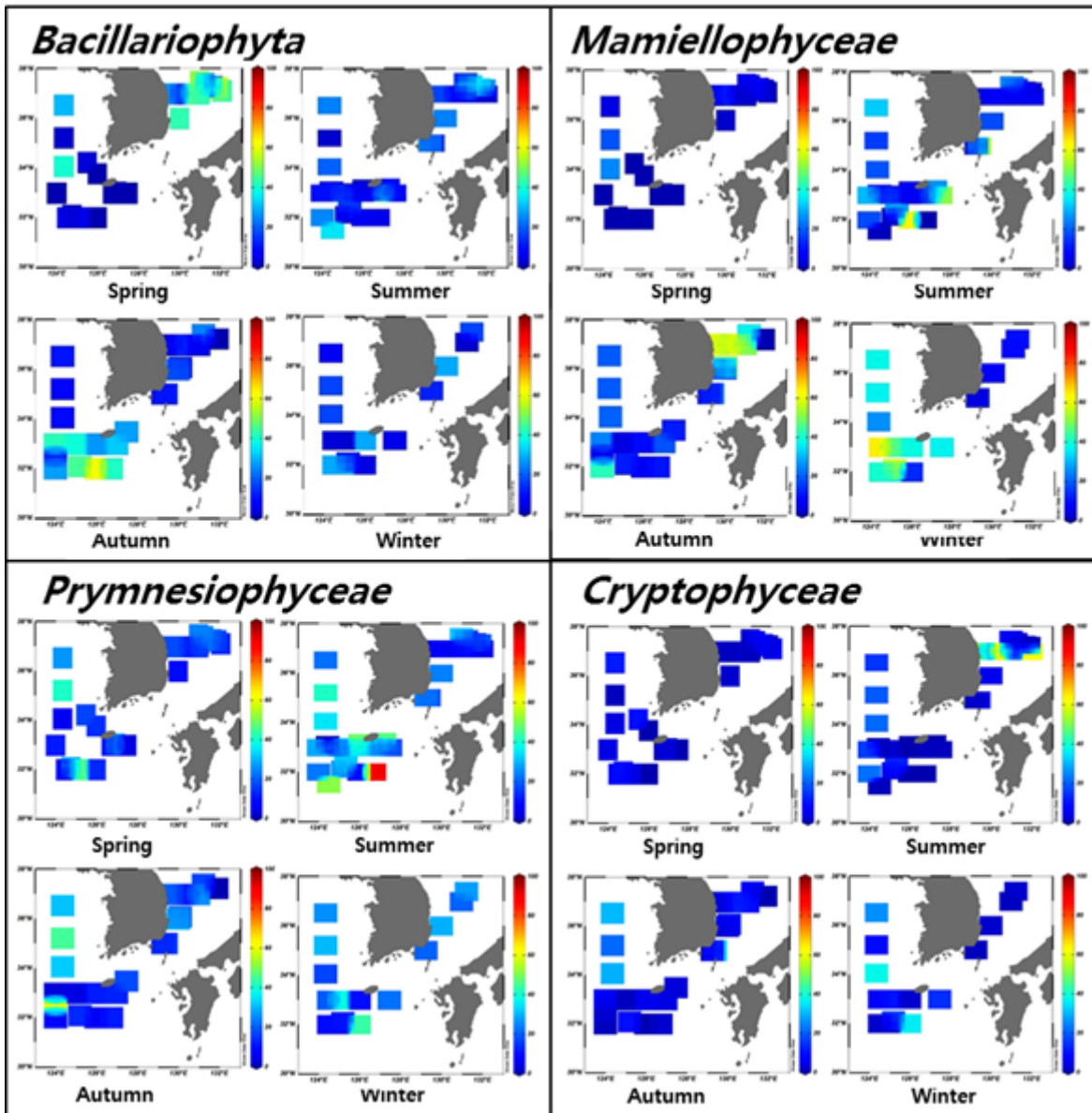


그림 18. 우리나라 주변해 수심 20 m에 우점하는 광합성 초미소조류 분포도

여름철에는 표층과 20 m 모두에서 Prymnesiophyceae가 가장 우점하게 나타났으며, 20 m 수심에서는 녹조류도 40% 정도까지 나타나 하계 유광대 저층에서 여전히 높은 비율로 존재하는 것으로 파악되었다. 가을철에는 녹조류와 Prymnesiophyceae가 40% 내외의 높은 비율을 보였으며, 동중국해에서는 규조류도 높게 나타났다. 겨울철에는 녹조류가 가장 높은 비율로 나타났으며, 그 밖에 Prymnesiophyceae, Cryptophyceae와 규조류도 고루 높은 분포를 나타내었다.



## 1.2. 미세조류 데이터베이스

### 1.2.1. 입력 변수

본 연구와 이전 연구에서 확보된 다양성 정보와 물리·화학적 환경 자료 및 생물학적 자료를 포함하는 데이터베이스를 구축하였다. 입력 자료는 표 x에 제시한 바와 같이 조사 시기 등의 메타데이터, CTD 자료, 영양염을 포함한 화학 자료, 식물플랑크톤 및 세균 생물량, 광합성량 등 다양한 종류의 환경 자료를 포함하고 있으며, 다양한 크기 구배 (total, 3 um 이상, 3 um 이하)의 미세조류와 세균 다양성 정보를 함께 입력할 수 있게 구성하였다. 다만, 다양성 데이터베이스는 현재 한국해양과학기술원내에서만 이용 가능하다.

표 1. DB 입력변수

| Data            | Variables  |
|-----------------|--|
| Meta-data       | Region, Project, Cruise ID, Date, Location, Depth  |
| Physical data   | CTD  |
| Chemical data   | Nutrients (Nitrite, Nitrate, Ammonia, Silicate, Phosphate),<br>N/P ratio, DOC, DON, SS   |
| Biological data | Chl a (total, > 20um, 10~20um, pico-fraction)<br>Primary production<br>Pigment concentrations (HPLC)<br>Picophytoplankton abundance (Flow cytometry/ FlowCAM)<br>Prokaryotic abundance and production<br>Photosynthetic parameters (FRRF/in situ Fire) |
| Diversity data  | 초미소남세균 다양성<br>원핵생물 다양성<br>광합성 초미소진핵생물 다양성<br>질소고정세균 다양성  |

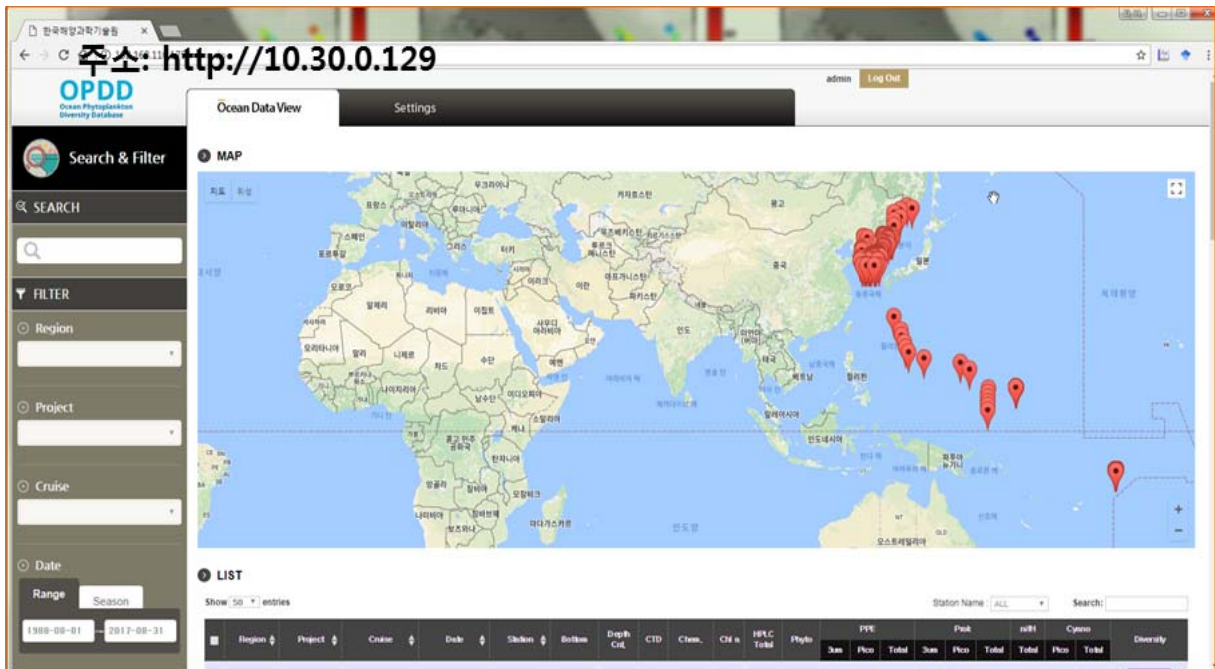


그림 19. 본 연구를 통해 구축한 웹 DB

### 1.2.2. 웹 인터페이스

웹데이터베이스의 첫 화면에는 검색을 위한 단과 검색된 자료의 위치를 보여주는 지도가 나타난다. 지도단의 settings를 클릭하여 선택하면, 자료를 입력하기 위한 창이 나타나며, 해당되는 자료의 입력폼을 다운로드할 수 있는 링크가 있다.

### 1.2.3. 데이터베이스 크기

현재까지 총 592 정점, 4,078 시료에 대한 자료 입력이 완료되었다. 각 해역별, 시기별 자료의 수는 표 2와 같다.

### 1.2.4. 데이터베이스 자료 가시화

입력 자료 중 각 정점의 CTD 자료는 바로 그래프로 볼 수 있게 제작되어 있으며, 다양성 자료도 다양한 분류학적 체계를 선택하여 각 정점의 자료를 그래프로 볼 수 있게 하였다 (그림 20).

표 2. DB에 포함된 정점 및 시료 수

| Area                        | Season | No. of stations | No. of samples | Total samples |
|-----------------------------|--------|-----------------|----------------|---------------|
| East Sea                    | Spring | 78              | 355            | 811           |
|                             | Summer | 71              | 255            |               |
|                             | Autumn | 25              | 50             |               |
|                             | Winter | 26              | 151            |               |
| East China<br>Sea/South Sea | Spring | 115             | 1168           | 2504          |
|                             | Summer | 71              | 676            |               |
|                             | Autumn | 60              | 415            |               |
|                             | Winter | 35              | 245            |               |
| Yellow Sea                  | Spring | 10              | 95             | 253           |
|                             | Summer | 6               | 47             |               |
|                             | Autumn | 5               | 10             |               |
|                             | Winter | 10              | 101            |               |
| Warm pool                   | Spring | 80              | 510            | 510           |

### 1.2.5. 자료의 다운로드

입력된 자료는 기본적으로 환경변수를 포함한 각 계통 수준에서의 다양성 정보를 함께 엑셀 파일로 다운로드할 수 있게 하여, 환경 변수와의 비교 분석을 수월하게 할 수 있게 하였다 (그림 21). 또한 CTD 자료도 따로 다운로드 받을 수 있게 출력 모듈을 디자인하였다.

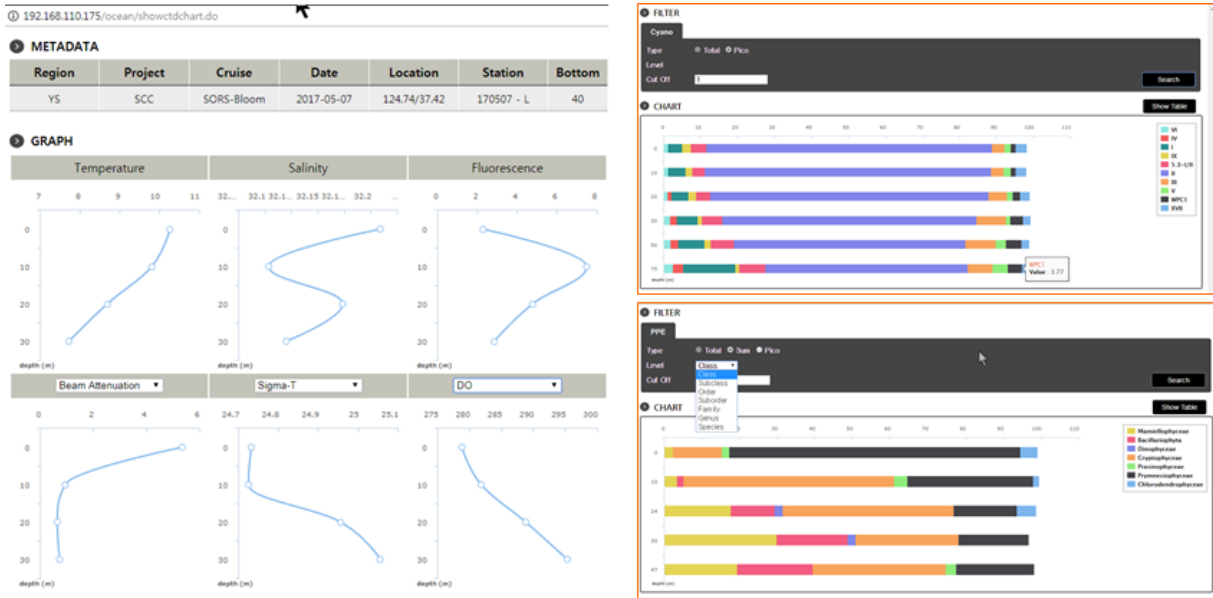


그림 20. DB에서 선택한 정점에서의 CTD 프로파일과 조류다양성 정보 화면

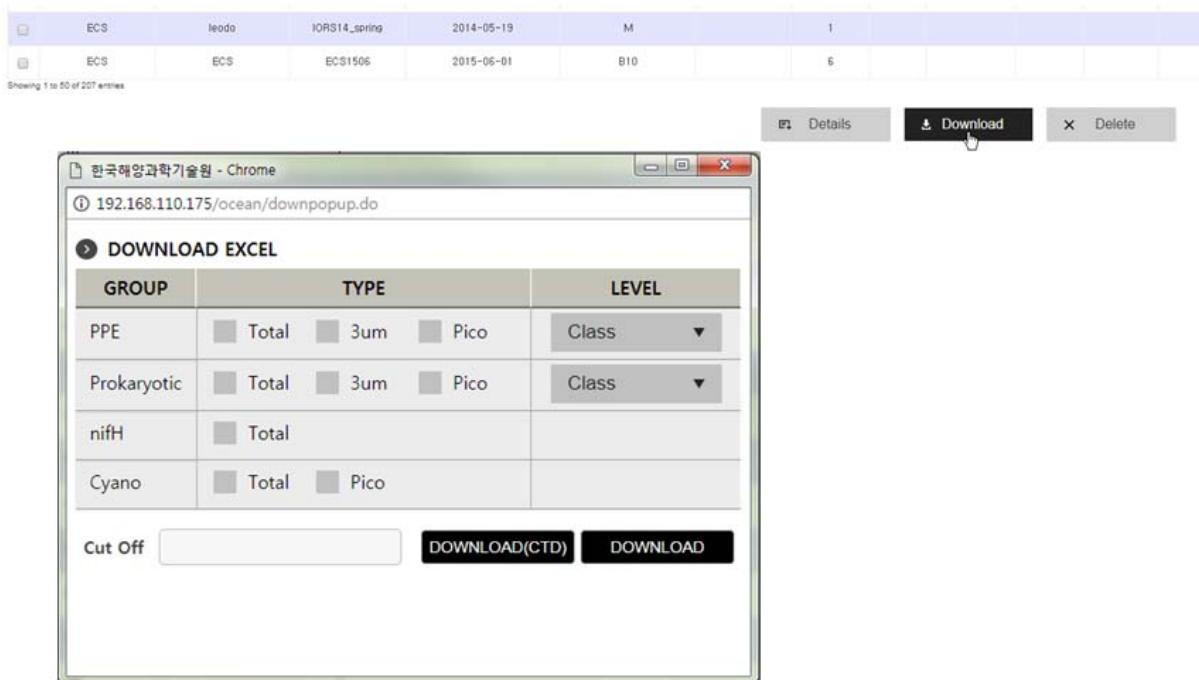


그림 21. DB에서의 자료다운로드 화면

### 1.3. 규조류 분자마커 검토 및 개발

#### 1.3.1. 배양체 확보 및 신규 분자마커 테스트

##### □ 갯벌 저서 미세 규조류의 형태적 분류 및 다양성

근소만에서 획득한 64개의 균주를 현미경으로 관찰 및 동정한 결과 3목 6과 13속 52 종으로 판명되었다 (그림 22, 표 3). 모든 종들은 유상규조류 (pennate diatom)로 나타났으며, 18개 균주는 동정이 불가능하여 속 수준까지 동정하고 번호를 주어 식별하였다 (그림 23). 이들의 자세한 목록 및 형태학적 정보들은 표 3에 나타내었다. 이들 중 Bacillariaceae에 속하는 종들이 22종으로 가장 많았으며, 그 다음은 Naviculaceae (20종), Entomoneidaceae (4종) 순이었다. 속 수준에서는 *Navicula* 속에 속하는 종들이 17종으로 가장 많았으며, 그 다음은 *Nitzschia* 속 (16종), *Entomoneis* 속 (4종) 순이었다.

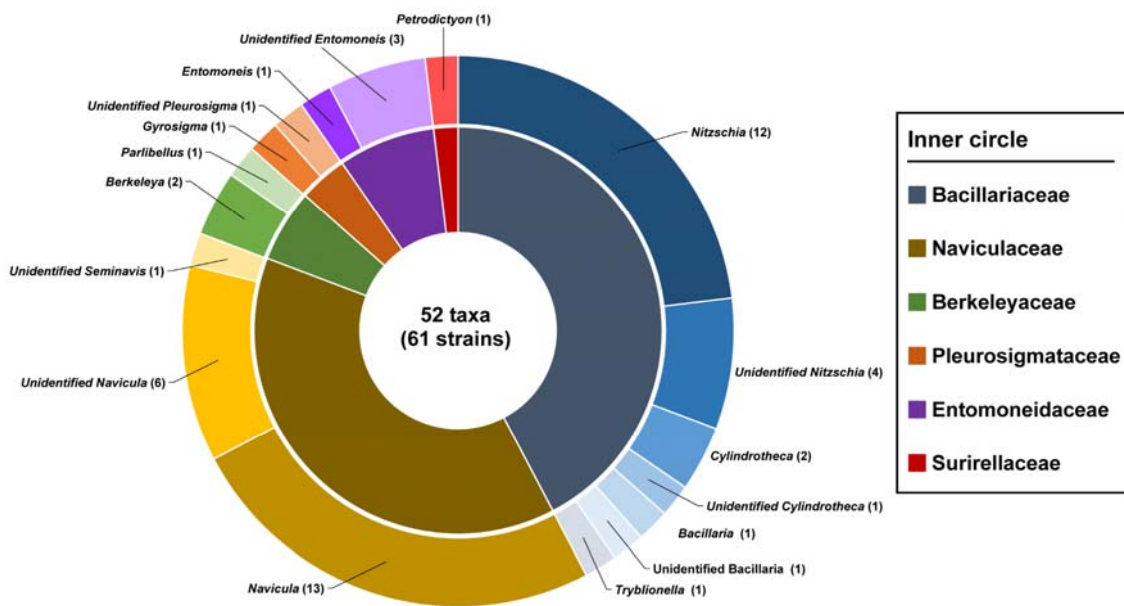


그림 22. 본 연구를 통해 확보한 돌말류 배양주의 형태기반 분류정보

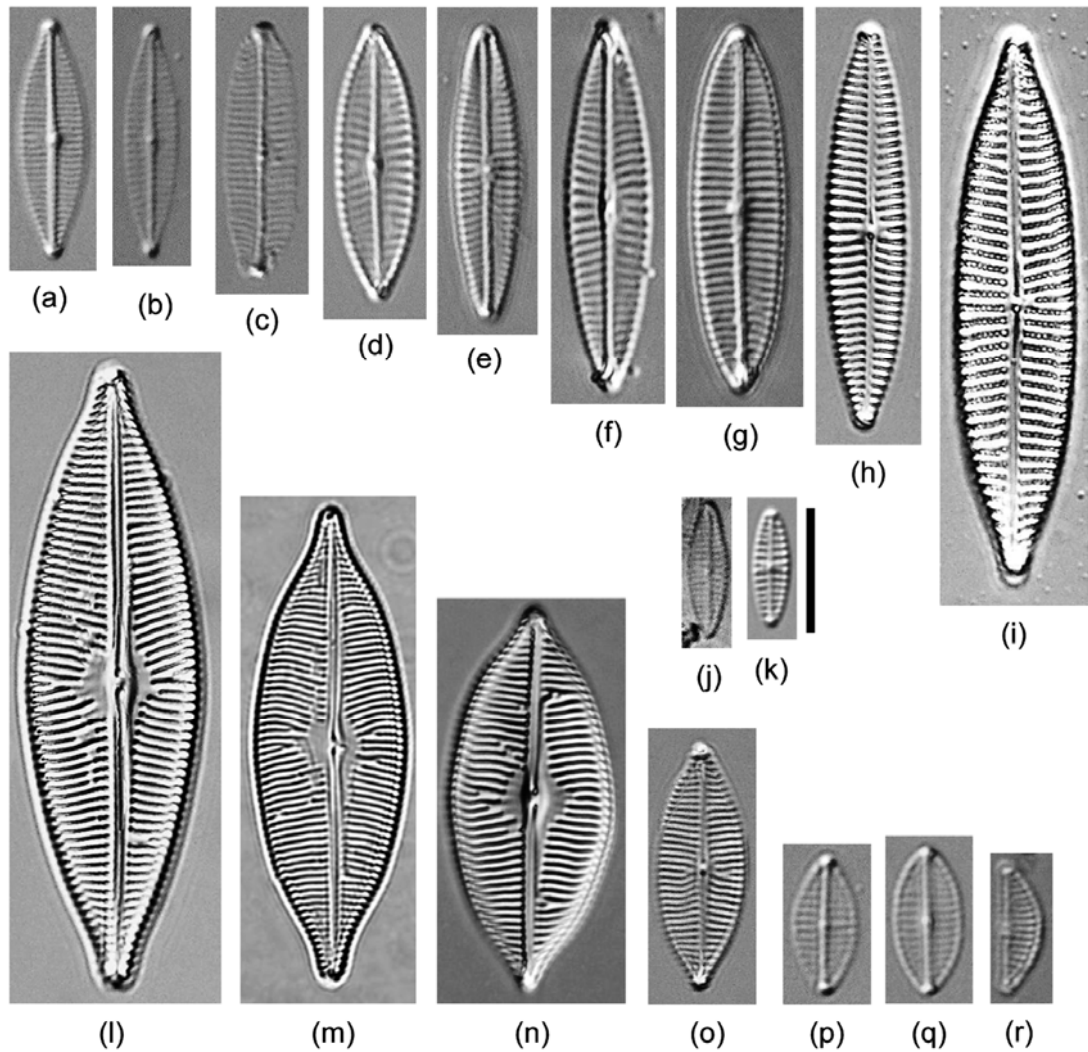


그림 23. *Navicula*속 및 *Seminavis*속 저서 돌말류 광학현미경 사진. (a) *Navicula gregaria* TA289. (b) *N. agatkae* TA291. (c) *N. incertata* TA414. (d) *Navicula* sp.1 TA298. (e) *Navicula* sp.5 TU3. (f) *Navicula* sp.3 EW220. (g) *N. ramosissima* TA316. (h) *N. flagellifera* TA105. (i) *Navicula* sp.2 TA64. (j) *N. salinicola* TA204. (k) *N. perminuta* TA441. (l) *N. trivialis* TA83. (m) *N. salinarum* TA402. (n) *N. cf. salinarum* TA407. (o) *N. salinarum* var. *minima* TA416. (p) *Navicula* sp.4 TA323. (q) *Navicula* sp.6 TA446. (r) *Seminavis* sp.1 TA305. Scale bar = 10  $\mu$ m.

표 3. 저서돌말류 형태 및 분류정보. 각 종명은 GenBank BLASTn 결과를 표시함

| Species name   | Strain no.    | Morphometrics       |                     |                 |                       |                       |  | BLASTn       |  |              |
|--|---------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|--|--------------|--|--------------|
|  |               | L <sup>1</sup> (um) | W <sup>2</sup> (um) | Striae in 10 um | L <sup>6</sup> /10 um | F <sup>7</sup> /10 um | 18S rDNA Species name  | Ident (%)    | rbcl gene Species name                               | Ident (%)    |
| <b>Bacillariales Hendey</b>                                      |               |                     |                     |                 |                       |                       |  |              |  |              |
| <b>Bacillariaceae Ehrenberg</b>                                  |               |                     |                     |                 |                       |                       |  |              |  |              |
| <i>Bacillaria paxillifer</i> (O.F. Müller) T. Marsson            | EW234         | 55.7                | 6.5                 | 23              | 20                    | 7                     | <i>Bacillaria paxillifer</i>   | 99.9         | <i>Bacillaria paxillifer</i>                         | 94.3         |
| Unidentified <i>Bacillaria</i> sp.1                              | SH349         | 115.7               | 10.0                | 20              | 24                    | 10                    | <i>Bacillaria</i> cf. <i>paxillifer</i>  | 98.5         | <i>Nitzschia lorenziana</i> Grunow                   | 94.3         |
| <i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & J.C. Lewin | TA256         | 159.4               | 3.8                 |                 |                       | 15                    | <i>Cylindrotheca closterium</i>  | 99.6         | <i>Cylindrotheca</i> sp.                             | 95.6         |
| <i>Cylindrotheca gracilis</i> (Brébisson ex Kützing) Grunow      | TA46          | 156.3               | 4.0                 |                 |                       | 20                    | <i>Cylindrotheca closterium</i>  | 98.7         | <i>Cylindrotheca closterium</i>                      | 95.1         |
| Unidentified <i>Cylindrotheca</i> sp.1                           | TA198         | 45.6                | 2.8                 |                 |                       | 20                    | <i>Cylindrotheca fusiformis</i> Reimann & J.C. Lewin                           | 98.7         | <i>Cylindrotheca</i> sp.                             | 95.0         |
| <i>Nitzschia aequorea</i> Hustedt                                | Dilu38        | 7.4                 | 3.3                 | 55              |                       | 22                    | <i>Nitzschia communis</i> Rabenhorst   | 99.6         | <i>Nitzschia capitellata</i> Hustedt                 | 95.1         |
| <i>Nitzschia bergii</i> A. Cleve                                 | TA139         | 25.7                | 5.3                 | 40              | 22                    | 16                    | <i>Nitzschia bizertensis</i> B. Smida, N. Lundholm, A.S. Hlaili & H.H. Mabrouk | 99.6         | <i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W. Smith            | 95.3         |
| <i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Rabenhorst                  | TA44<br>TA192 | 37.8<br>41.4        | 5.8<br>6.1          | 48              |                       | 6                     | <i>Nitzschia epithemoides</i> Grunow   | 97.6<br>97.0 | <i>Nitzschia sigmaidea</i> (Nitzsch) W. Smith        | 95.6<br>96.5 |
| <i>Nitzschia dubia</i> W. Smith                                  | TA37          | 55.2                | 12.0                | 23              |                       | 10                    | <i>Nitzschia dubiformis</i> Hustedt  | 99.8         | <i>Psammodictyon constrictum</i> (Gregory) D.G. Mann | 94.6         |
| <i>Nitzschia dubiformis</i> Hustedt                              | SH366         | 48.3                | 5.0                 | 38              |                       | 16                    | <i>Nitzschia dubiformis</i>  | 98.7         | <i>Nitzschia dubiformis</i>                          | 93.4         |
| <i>Nitzschia liebetruthii</i> Rabenhorst                         | TA353         | 21.1                | 2.7                 | 21              |                       | 11                    | <i>Nitzschia ovalis</i> H.J. Arnot   | 96.7         | <i>Bacillaria paxillifer</i>                         | 94.5         |

| Species name  | Morphometrics  |                     |                     |                 |                       |                       |  | BLASTn       |  |              |                       |           |
|---|----------------|---------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|--|--------------|--|--------------|-----------------------|-----------|
|   | Strain no.     | L <sup>1</sup> (um) | W <sup>2</sup> (um) | Striae in 10 um | L <sup>6</sup> /10 um | F <sup>7</sup> /10 um | 18S rDNA Species name                            | Ident (%)    | Species name                                   | Ident (%)    | rbL gene Species name | Ident (%) |
| <i>Nitzschia ligowskii</i> Witkowski, Lange-Bertalot, Kociolek & Brzezinska | TA426          | 22.0                | 7.6                 | 26              | 11                    | 11                    | <i>Nitzschia apiculata</i> (Gregory) Grunow      | 98.9         | <i>Tryblionella apiculata</i>                  | 95.3         |                       |           |
| <i>Nitzschia paleaeformis</i> Hustedt                                       | TA394          | 50.0                | 4.5                 | 36              | 9                     | 9                     | <i>Nitzschia</i> sp.                             | 98.8         | <i>Tryblionella apiculata</i>                  | 94.1         |                       |           |
| <i>Nitzschia</i> cf. <i>paleacea</i>  | TA406          | 19.1                | 5.0                 | 48              | 8                     | 8                     | <i>Bacillaria</i> cf. <i>paxillifer</i>          | 98.9         | <i>Tryblionella apiculata</i>                  | 94.1         |                       |           |
| <i>Nitzschia pellucida</i> Grunow   | EW229          | 73.7                | 7.5                 | 33              | 14                    | 14                    | <i>Nitzschia dubiformis</i>                      | 99.2         | <i>Psammodictyon constrictum</i>               | 92.9         |                       |           |
| <i>Nitzschia pusilla</i> Grunow   | TA-45<br>TA420 | 20.0<br>45.5        | 4.4<br>4.9          | 51<br>53        | 18<br>20              | 18<br>20              | <i>Nitzschia thermalis</i> (Ehrenberg) Auerswald | 99.3<br>99.3 | <i>Nitzschia capitellata</i>                   | 95.3<br>95.6 |                       |           |
| <i>Nitzschia sigma</i> (Kützing) W. Smith                                   | TA341<br>TA377 | 277.1<br>303.3      | 8.2<br>8.4          | 28<br>30        | 6                     | 6                     | <i>Nitzschia bizertensis</i>                     | 96.0<br>96.1 | <i>Nitzschia capitellata</i>                   | 94.8<br>94.9 |                       |           |
| <i>Nitzschia sigmaformis</i> Hustedt  | TA311          | 84.8                | 5.2                 | 27              | 10                    | 10                    | <i>Nitzschia palea</i>                           | 97.5         | <i>Nitzschia filiformis</i> (W. Smith) Hustedt | 91.2         |                       |           |
| Unidentified <i>Nitzschia</i> sp.1  | Dilu16         | 11.3                | 3.7                 | 52              | 18                    | 18                    | <i>Nitzschia thermalis</i>                       | 99.2         | <i>Nitzschia capitellata</i>                   | 95.2         |                       |           |
| Unidentified <i>Nitzschia</i> sp.2  | TA61           | 9.8                 | 3.0                 | 56              | 20                    | 20                    | <i>Nitzschia thermalis</i>                       | 99.5         | <i>Nitzschia capitellata</i>                   | 95.0         |                       |           |
| Unidentified <i>Nitzschia</i> sp.4  | TA409          | 26.9                | 7.8                 | 40              | 12                    | 12                    | <i>Nitzschia dubiiformis</i>                     | 99.7         | <i>Psammodictyon constrictum</i>               | 94.3         |                       |           |
| <i>Tryblionella apiculata</i> Gregory                                       | TA-85          | 30.8                | 6.7                 | 16              |                       |                       | <i>Nitzschia apiculata</i>                       | 99.6         | <i>Tryblionella apiculata</i>                  | 96.5         |                       |           |
| <b>Naviculales Bessey</b>   |                |                     |                     |                 |                       |                       |  |              |  |              |                       |           |
| <b>Berkeleyaceae D.G.Mann</b>   |                |                     |                     |                 |                       |                       |  |              |  |              |                       |           |
| <i>Berkeleya fennica</i> Juhlin-Dannfelt                                    | TA424          | 11.7                | 3.9                 | 36 <sup>o</sup> |                       |                       | <i>Berkeleya rutilans</i>                        | 99.4         | <i>Berkeleya rutilans</i>                      | 94.7         |                       |           |



| Species name   | Morphometrics  |                     |                     |                 |                |                   |                    | BLASTh             |   |              |  |              |           |
|--|----------------|---------------------|---------------------|-----------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|---|--------------|--|--------------|-----------|
|  | Strain no.     | L <sup>1</sup> (um) | W <sup>2</sup> (um) | T <sup>3</sup>  | L <sup>4</sup> | O <sup>5</sup> um | L <sup>6</sup> /10 | F <sup>7</sup> /10 | 18S rDNA  | Ident (%)    | Species name                                   | Ident (%)    | rbcl gene |
| <i>Berkeleya rutilans</i> (Trentepohl ex Roth) Grunow    | TA440          | 15.9                | 4.1                 | 28 <sup>9</sup> |                |                   |                    |                    | <i>Berkeleya rutilans</i>                                       | 99.8         | <i>Berkeleya rutilans</i>                      | 99.5         |           |
| <i>Paribellus delognei</i> (Van Heurck) E.J. Cox         | TA387          | 36.7                | 12.7                | 19              |                |                   |                    |                    | <i>Prestauroneis integra</i> (W. Smith) K. Bruder               | 98.92        | <i>Craticula cuspidata</i> (Kützing) D.G. Mann | 94.2         |           |
| <b>Naviculaceae Kützing</b>                              |                |                     |                     |                 |                |                   |                    |                    |   |              |  |              |           |
| <i>Haslea nipkowitzii</i> (Meister) M. Poulin & G. Massé | SH381          | 130.5               | 17.8                | 26              | 28             |                   |                    |                    | <i>Haslea nipkowitzii</i>                                       | 99.7         | <i>Haslea</i> sp.                              | 95.9         |           |
| <i>Haslea pseudostrearia</i> Massé, Rincé & E.J. Cox     | TA280          | 48.4                | 6.0                 | 41              | 35             |                   |                    |                    | <i>Haslea pseudostrearia</i>                                    | 100.0        | <i>Haslea pseudostrearia</i>                   | 96.7         |           |
| <i>Navicula agatkae</i> Witkowski                        | TA291          | 18.7                | 4.7                 | 18              | 15             |                   |                    |                    | <i>Navicula gregaria</i>  | 99.5         | <i>Navicula</i> sp. S0020                      | 96.0         |           |
| <i>Navicula flagellifera</i> Hustedt                     | TA105          | 33.6                | 6.4                 | 14              | 40             |                   |                    |                    | <i>Navicula</i> sp.   | 99.9         | <i>Navicula</i> sp. S0020                      | 99.2         |           |
| <i>Navicula gregaria</i> Donkin                          | TA289          | 25.5                | 5.2                 | 18              | 29             |                   |                    |                    | <i>Navicula gregaria</i>  | 99.9         | <i>Seminavis</i> cf. <i>robusta</i>            | 95.4         |           |
| <i>Navicula incertata</i> Lange-Bertalot                 | TA414          | 19.2                | 3.5                 | 16              | 48             |                   |                    |                    | <i>Navicula tripunctata</i> (O.F. Müller) Bory de Saint-Vincent | 99.6         | <i>Navicula</i> sp. S0020                      | 95.6         |           |
| <i>Navicula perminuta</i> Grunow                         | TA413<br>TA441 | 4.3<br>5.6          | 2.0<br>2.0          | 26              | 40             |                   |                    |                    | <i>Navicula perminuta</i>                                       | 100.0        | <i>Seminavis</i> cf. <i>robusta</i>            | 94.0<br>93.9 |           |
| <i>Navicula ramosissima</i> (C. Agardh) Cleve            | TA316<br>TA439 | 25.1<br>30.8        | 5.7<br>6.9          | 12<br>15        | 38<br>40       |                   |                    |                    | <i>Navicula arenaria</i>  | 99.8<br>99.5 | <i>Navicula ramosissima</i>                    | 97.7<br>97.3 |           |
| <i>Navicula salinarum</i> Grunow                         | TA402          | 37.0                | 11.7                | 15              | 33             |                   |                    |                    | <i>Navicula phyllepta</i> Kützing                               | 99.5         | <i>Navicula cryptocephala</i> Kützing          | 96.0         |           |
| <i>Navicula salinarum</i> var. <i>minima</i> R. Kolbe    | TA416          | 20.3                | 6.9                 | 18              | 42             |                   |                    |                    | <i>Navicula phyllepta</i>                                       | 99.6         | <i>Navicula cryptocephala</i>                  | 95.4         |           |
| <i>Navicula</i> cf. <i>salinarum</i>                     | TA407          | 36.3                | 13.8                | 14              | 31             |                   |                    |                    | <i>Navicula phyllepta</i>                                       | 99.5         | <i>Navicula cryptocephala</i>                  | 95.6         |           |

| Species name  | Morphometrics  |                     |                     |                  |                |                |    |                    |                    |                 | BLASTn   |              |   |              |
|---|----------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------|----------------|----|--------------------|--------------------|-----------------|--|--------------|---|--------------|
|   | Strain no.     | L <sup>1</sup> (um) | W <sup>2</sup> (um) | T <sup>3</sup>   | L <sup>4</sup> | O <sup>5</sup> | um | L <sup>6</sup> /10 | F <sup>7</sup> /10 | Striae in 10 um | 18S rDNA Species name                            | Ident (%)    | rbcl gene Species name                      | Ident (%)    |
| <i>Navicula salinicola</i> Hustedt                    | TA204          | 12.3                | 3.5                 | 20               | 40             |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula lanceolata</i> (C. Agardh) Kützing   | 99.5         | <i>Navicula</i> sp. S0020                   | 95.8         |
| <i>Navicula trivialis</i> Lange-Bertalot              | TA83           | 49.0                | 12.5                | 14               | 30             |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula phyllepta</i>                        | 99.5         | <i>Navicula cryptocephala</i>               | 95.2         |
| Unidentified <i>Navicula</i> sp.1                     | TA298          | 24.0                | 6.3                 | 12               |                |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula ramosissima</i>                      | 99.6         | <i>Navicula</i> sp. S0020                   | 95.5         |
| Unidentified <i>Navicula</i> sp.2                     | TA64           | 36.8                | 10.4                | 9                |                |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula veneta</i> Kützing                   | 98.6         | <i>Navicula</i> sp. S0020                   | 95.7         |
| Unidentified <i>Navicula</i> sp.3                     | EW220          | 29.5                | 7.1                 | 12               | 20             |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula lanceolata</i>                       | 99.6         | <i>Navicula</i> sp. S0020                   | 95.6         |
| Unidentified <i>Navicula</i> sp.4                     | TA323          | 11.6                | 5.0                 | 18               | 36             |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula</i> sp.                              | 99.6         | <i>Navicula ramosissima</i>                 | 96.9         |
| Unidentified <i>Navicula</i> sp.5                     | TU3            | 10.6                | 5.0                 | 16               | 39             |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula</i> sp.                              | 99.9         | <i>Navicula</i> sp. S0020                   | 99.6         |
| Unidentified <i>Navicula</i> sp.6                     | TA308<br>TA446 | 11.8                | 5.6                 | 20               | 45<br>46       |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula arenaria</i><br>Donkin               | 99.7<br>99.5 | <i>Navicula</i> sp. S0020                   | 95.7<br>95.6 |
| Unidentified <i>Seminavis</i> sp.                     | TA305          | 15.9                | 6.4                 | 18               | 45             |                |    |                    |                    |                 | <i>Navicula phyllepta</i>                        | 98.9         | <i>Seminavis</i> cf. <i>robusta</i>         | 95.6         |
| <b>Pleurosigmataceae Mereschowsky</b>                 |                |                     |                     |                  |                |                |    |                    |                    |                 |  |              |   |              |
| <i>Gyrosigma limosum</i> Sterrenburg & Underwood      | TA152          | 61.6                | 10.7                | 22               | 262            |                |    |                    |                    |                 | <i>Gyrosigma acuminatum</i> (Kützing) Rabenhorst | 99.7         | <i>Gyrosigma acuminatum</i>                 | 96.9         |
|   | TA400          | 96.2                | 11.2                | 24               | 8              |                |    |                    |                    |                 | <i>Pleurosigma intermedium</i> W. Smith          | 98.7         | <i>Gyrosigma acuminatum</i>                 | 93.9         |
| Unidentified <i>Pleurosigma</i> sp.                   | TA34           | 91.4                | 20.0                | 24               | 20             |                |    |                    |                    |                 |  |              |   |              |
| <b>Surirellales D.G.Mann</b>                          |                |                     |                     |                  |                |                |    |                    |                    |                 |  |              |   |              |
| <b>Entomoneidaceae Reimer in Patrick &amp; Reimer</b> |                |                     |                     |                  |                |                |    |                    |                    |                 |  |              |   |              |
| <i>Entomoneis paludosa</i>                            | TA208          | 41.4                | 35.9 <sup>8</sup>   | 22               |                |                |    |                    |                    |                 | <i>Entomoneis</i> cf. <i>alata</i>               | 86.5         | <i>Surirella</i> sp.                        | 96.9         |
|   | TA263          | 68.4                |                     | 23               |                |                |    |                    |                    |                 |  | 86.5         | <i>Haslea crucigera</i> (W. Smith) Simonsen | 96.7         |
| Unidentified <i>Entomoneis</i> sp.1                   | TA410          | 30.2                | 15.7 <sup>8</sup>   | 25 <sup>10</sup> |                |                |    |                    |                    |                 | <i>Entomoneis ornate</i> (Bailey) Reimer         | 95.6         | <i>Haslea crucigera</i>                     | 96.7         |

| Species name                                       | Morphometrics |                     |                     |                  |                |                   |                    | BLASTh             |  |           |                         |           |           |
|--|---------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|--|-----------|-------------------------|-----------|-----------|
|  | Strain no.    | L <sup>1</sup> (um) | W <sup>2</sup> (um) | T <sup>3</sup>   | L <sup>4</sup> | O <sup>5</sup> um | L <sup>6</sup> /10 | F <sup>7</sup> /10 | 18S rDNA                                       | Ident (%) | Species name            | rbcl gene | Ident (%) |
| Unidentified <i>Entomoneis</i> sp.2                | TA350         | 50.3                | 29.9 <sup>8</sup>   | 15 <sup>10</sup> |                |                   |                    |                    | <i>Entomoneis</i> cf. <i>alata</i>             | 98.7      | <i>Haslea crucigera</i> |           | 97.7      |
|  | SH373         | 62.8                | 35.2 <sup>8</sup>   | 16 <sup>10</sup> |                |                   |                    |                    | <i>Entomoneis</i> sp.                          | 98.8      |                         |           | 97.7      |
| Unidentified <i>Entomoneis</i> sp.3                | EW239         | 53.2                | 41.0 <sup>8</sup>   | 16 <sup>10</sup> |                |                   |                    |                    | <i>Amphiprora alata</i><br>(Ehrenberg) Kützing | 94.6      | <i>Amphiprora alata</i> |           | 96.5      |
| <b>Surirellaceae Kützing</b>                       |               |                     |                     |                  |                |                   |                    |                    |  |           |                         |           |           |
| <i>Petrodictyon gemma</i> (Ehrenberg)<br>D.G. Mann | TA201         | 55.8                | 25.8                |                  |                |                   |                    |                    | <i>Cylindrotheca closterium</i>                | 83.8      | <i>Surirella</i> sp.    |           | 96.9      |

<sup>1</sup>L, length; <sup>2</sup>W, width; <sup>3</sup>T, transverse; <sup>4</sup>L, longitudinal; <sup>5</sup>O, oblique; <sup>6</sup>L, lineolae; <sup>7</sup>F, fibulae; <sup>8</sup>In girdle view; <sup>9</sup>In the middle of frustule; <sup>10</sup>Striae composed of doubly-punctate striae

저서 미세 규조류는 생활 형태에 따라 운동성을 가진 epipellic diatom과 기질에 부착하여 생활하는 epipsammic diatom으로 나눌 수 있는데 epipellic diatom은 주로 니질성 퇴적물에서 자유롭게 생활하기 때문에 운동성 기관인 raphe를 양쪽 각에 모두 가지고 있는 biraphid diatom이 대부분이고, 주로 epipsammic diatom은 모래에 부착하여 생활하기 때문에 monoraphid 이거나 araphid diatom이 주로 나타난다 (Round, 1971). 따라서 biraphid diatom에 속하는 *Nitzschia* 속과 *Navicula* 속의 종들이 다양하게 출현하는 것으로 미루어 볼 때, 본 연구 지역에서는 니질성 퇴적물의 비율이 높을 것으로 추측할 수 있다.

#### □ 근소만 저서 미세 규조류의 염기서열 분석

근소만에서 분리한 61개 균주의 18s rDNA와 *rbcL* gene에 대한 sequencing을 실시하였고, 각각 약 1,600bp와 1,550bp 길이의 sequence를 성공적으로 획득하였다. BLASTn 검색 결과 대부분의 균주들은 형태 동정과 다른 것으로 나타났다. 18S의 경우, 총 9개의 균주만 98.7% 이상의 유사도를 가지고 형태 동정과 일치하였다. *rbcL*의 경우에는 오직 6개의 균주만이 형태 동정과 일치하였으며, 그들의 유사도 범위는 94.3-99.5%로 나타났다. Kermarrec et al. (2014)은 *rbcL* 마커 이용시 종의 분류 기준을 유사도 99%로 제시하였는데 본 연구 결과 분류군 마다 차이가 있을 수 있을 것으로 생각되며, 보다 면밀한 검토가 필요할 것으로 생각된다. 대부분의 종들에서 형태 분류와 불일치가 확인되었으며, 99%의 높은 유사성을 가지는 종들도 형태적으로 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 예를 들어 18s rDNA에서 BLASTn 결과, *Nitzschia dubia* TA37, *N. dubiiformis* SH366, *N. pellucida* EW229, *Nitzschia* sp.4 TA409는 모두 *N. dubiiformis* AB430616과 높은 유사성을 보였지만 형태적으로는 모두 다른 종으로 나타났다 (그림 24).

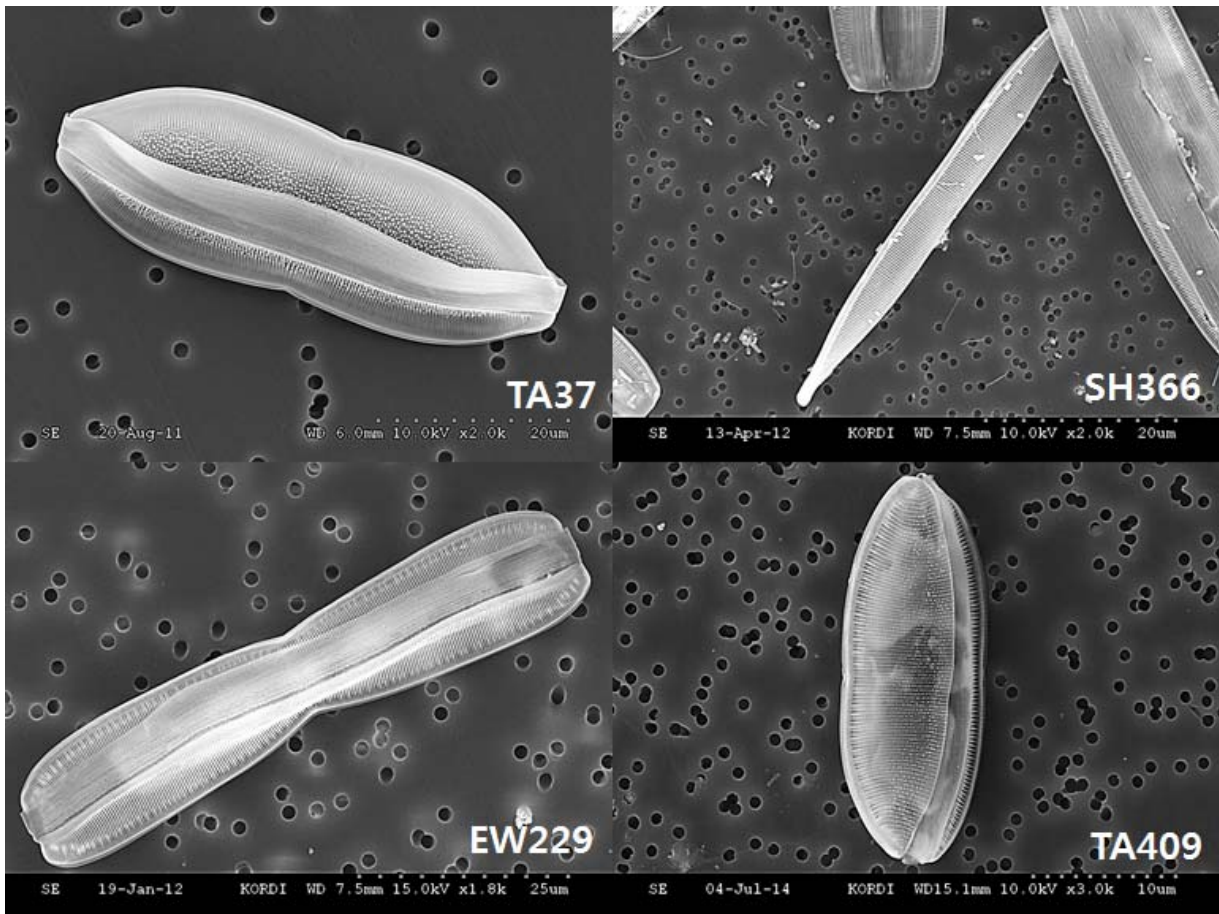


그림 24. 저서돌말류 SEM 이미지. *Nitzschia dubia* TA37, *N. dubiiformis* SH366, *N. pellucida* EW229, *Nitzschia* sp.4 TA409

본 연구를 통해 확보한 시퀀스들을 이용하여 계통수를 작성하였다 (그림 25-27). 대체로 근연관계에 있는 종들 끼리 잘 묶이는 것으로 나타났으나, 18S에 비해 *rbcL* 을 마커로 이용하였을 때 보다 분해능이 높은 것으로 보인다. 예를 들어 18S의 경우 Surirellaceae에 속하는 *Petrodictyon gemma* TA201가 같은 과에 속하는 *Surirella* 속의 종이 아닌 Entomoneidaceae에 속하는 *Entomoneis* 속의 종들과 묶이는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 18S에서는 *Petrodictyon gemma*와 *Entomoneis paludosa* 사이에서 long branch artefact가 발생하는 것으로 나타났다.

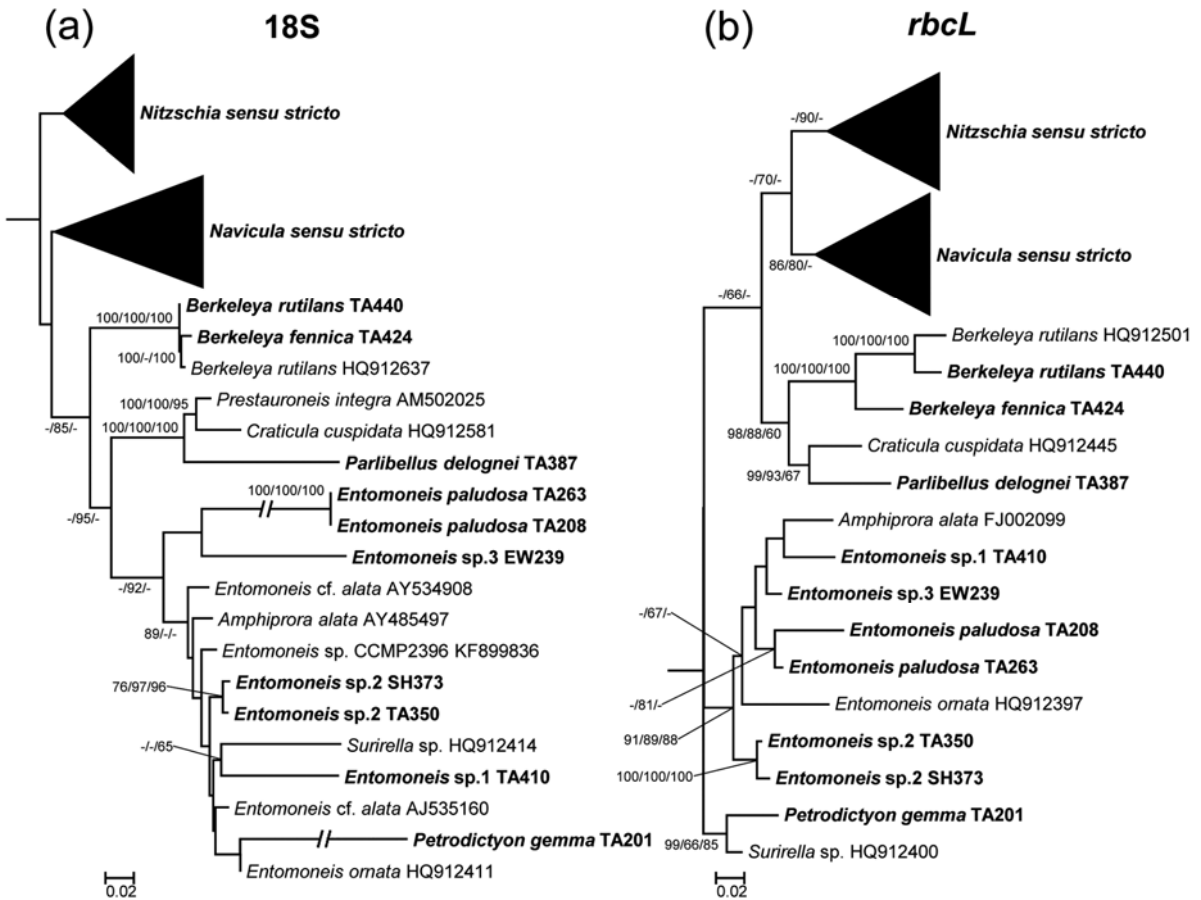


그림 25. 저서 돌말류 61개 배양주 ML 계통수. (a) 18S rRNA 및 (b) *rbcL* 계통수를 각각 표기하였다. 각 node의 단계통성 지지도는 Neighbor-joining (NJ), Maximum likelihood (ML) 및 Maximum parsimony (MP) bootstraps을 순서대로 표기하였다

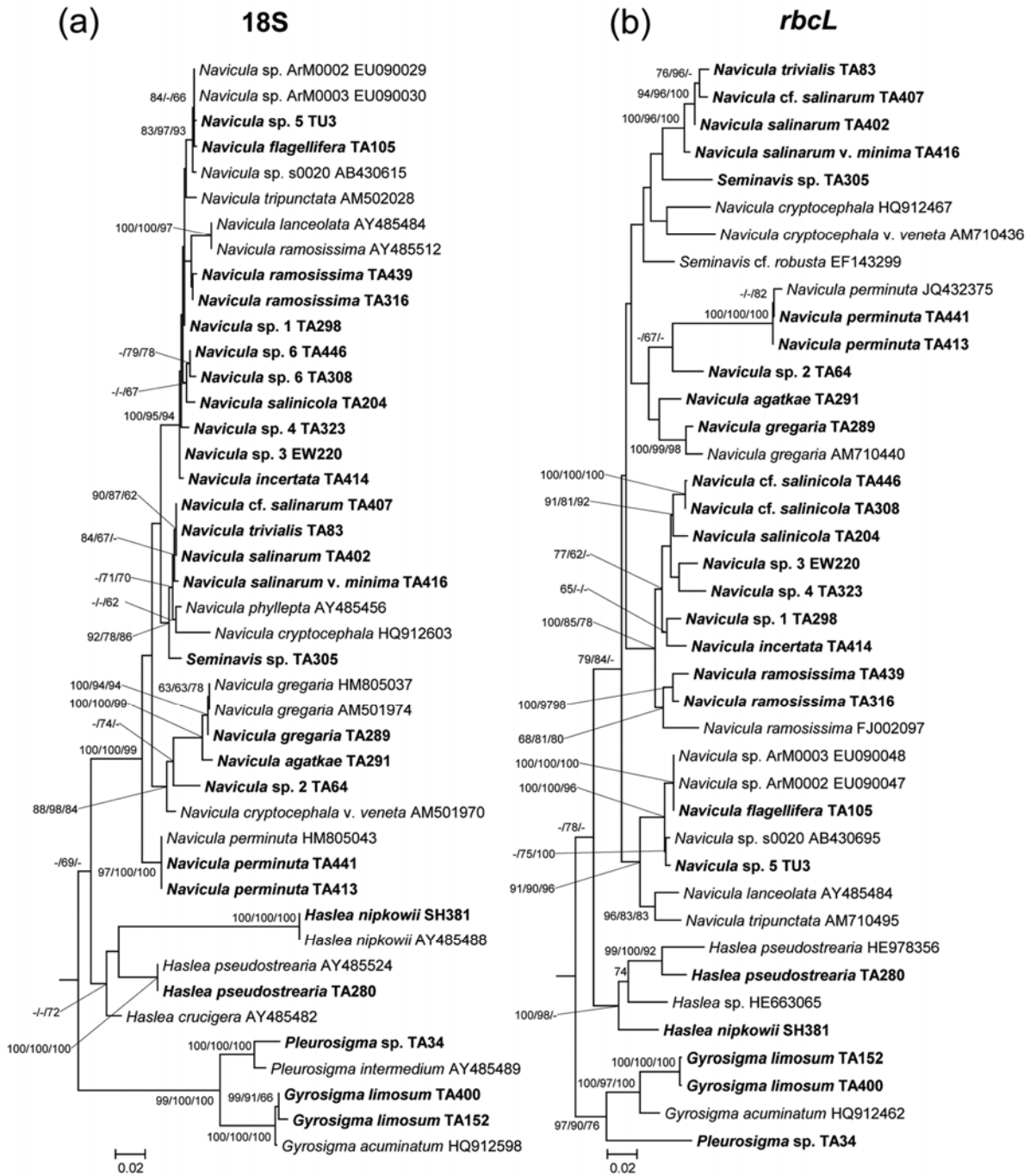


그림 26. *Navicula sensu stricto*의 18s rRNA (a) 및 *rbcL* (b) 계통수. 각 node의 단계통성 지지도는 Neighbor-joining (NJ), Maximum likelihood (ML) 및 Maximum parsimony (MP) bootstraps을 순서대로 표기하였다

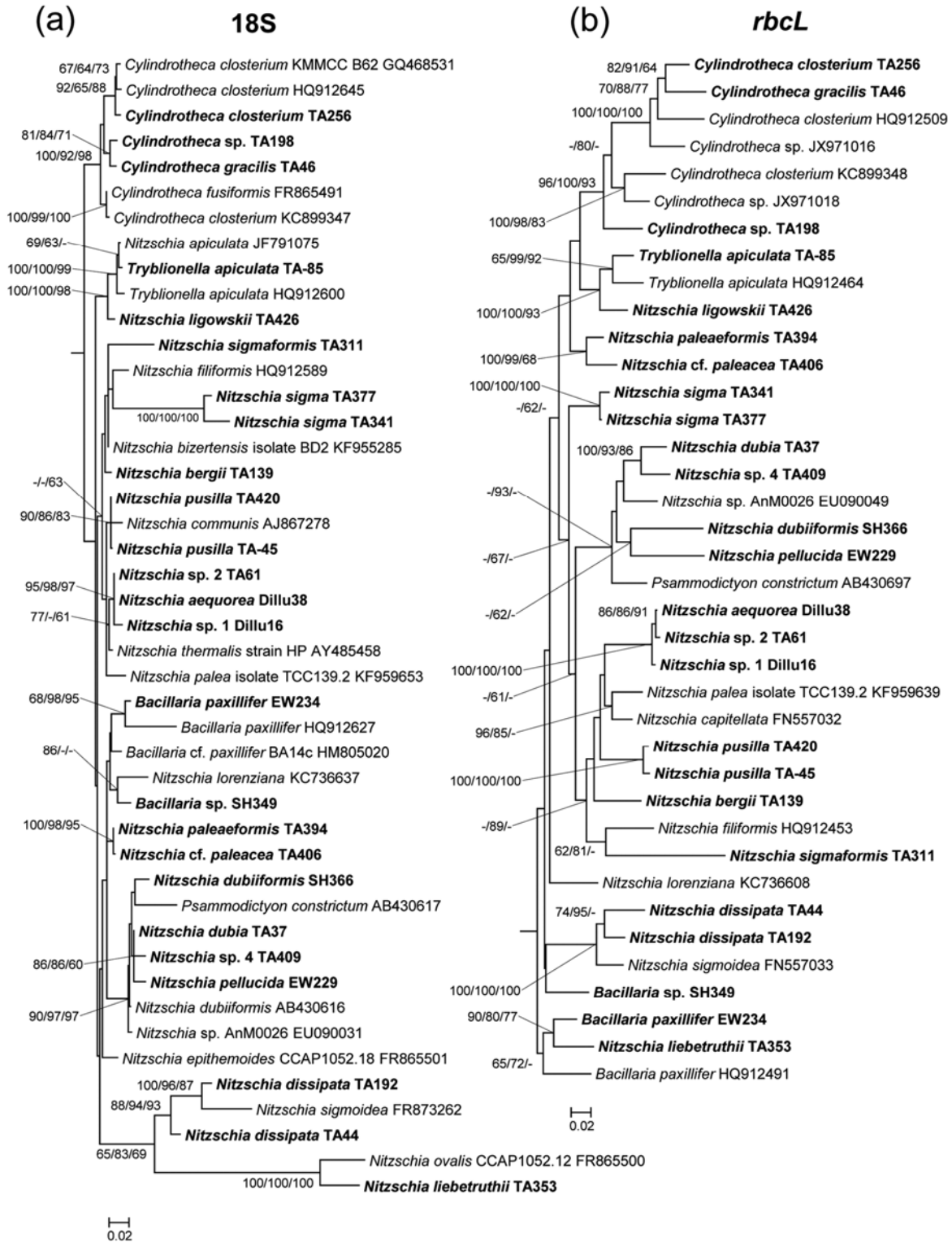


그림 27. *Nitzschia sensu stricto*의 18s rRNA (a) 및 *rbcL* (b) 계통수. 각 node의 단계통성 지지도는 NJ, ML 및 MP bootstraps을 순서대로 표기하였다



본 연구에서 얻은 sequence를 이용해서 18S rDNA와 *rbcL* gene의 divergence level을 분석하였다 (표 4). 18S에서 long branch artefact가 나타났음에도 불구하고 *Entomoneis* 제외한 모든 속들에서 *rbcL*은 18S rDNA에 비해 두 배 이상 높은 sequence간 거리를 보였다. 특히 가장 많은 종이 포함된 *Navicula*와 *Nitzschia*에서는 *rbcL* gene에서 2배 이상 높은 수치를 보였다. 이는 갯벌에서 주로 이 두 속이 우점하여 출현함을 감안할 때 *rbcL*이 마커유전자로써 더 나은 분해능을 보일 수 있음을 암시한다. 규조류 생태연구에 있어 분자생물학적 접근법의 핵심은 가능한 많은 DNA 라이브러리를 확보하여 육안동정기술을 객관화하고 동정속도를 빠르게 하는 것이다. 따라서 분자 마커의 해상력뿐만 아니라 양질의 데이터베이스 구축이 중요하다. 18S의 경우 오랫동안 연구에 이용되어 가장 큰 데이터베이스 (4,800여개 / 881종)가 구축되어 있지만 그 중에서도 저서 규조류의 정보는 매우 적다. 더불어 규조류 다양성 연구에는 낮은 해상력으로 인해 부적합해 보인다 (Beszteri et al. 2001). 그 다음으로 큰 데이터베이스를 가지고 있는 마커는 *rbcL*로, 3,099개의 시퀀스가 등록되어 있으며, 그 외 분자 마커의 데이터베이스는 아직 매우 미비하다 (An et al. 2017). 더불어 *rbcL*은 alignment가 간단하고, PCR 효율이 높으며, 박테리아 또는 곰팡이 등에 의한 오염가능성도 적다는 장점이 있다 (MacGillivray and Kaczmarek 2011). 따라서 저서 규조류의 다양성 분석을 위한 마커유전자로서 *rbcL*은 높은 잠재력을 가지고 있을 것으로 판단되며, 양질의 데이터베이스 구축을 위한 지속적인 연구가 요구된다.

표 4. 각 속별 18s RNA 및 *rbcL* 유전자의 Jukes and Cantor model을 이용한 genetic distance

| Order         | Genus                | No. of strains | Genetic distance |             |
|---------------|----------------------|----------------|------------------|-------------|
|               |                      |                | 18S rDNA         | <i>rbcL</i> |
| Naviculales   | <i>Navicula</i>      | 21             | 0.015            | 0.050       |
|               | <i>Haslea</i>        | 2              | 0.037            | 0.047       |
|               | <i>Berkeleya</i>     | 2              | 0.003            | 0.049       |
|               | <i>Gyrosigma</i>     | 2              | 0.003            | 0.021       |
| Bacillariales | <i>Bacillaria</i>    | 2              | 0.022            | 0.056       |
|               | <i>Nitzschia</i>     | 20             | 0.036            | 0.078       |
|               | <i>Cylindrotheca</i> | 3              | 0.010            | 0.065       |
| Surirellales  | <i>Entomoneis</i>    | 6              | 0.074            | 0.048       |
| Average       |                      |                | 0.060            | 0.089       |

### 1.3.2. NGS 적용성 평가

#### □ 프라이머 제작 및 특이성 평가

지금까지 규조류의 계통 발생 분석에는 핵, 미토콘드리아 및 엽록체 유전자 내의 다양한 DNA 영역이 사용되었다 (Moniz and Kaczmariska 2009). 이전의 연구는 주로 리보솜 RNA (즉, 18S rDNA 및 28S rDNA)에 초점을 두었다. 특히, 18S rDNA가 광범위하게 사용되었고 상대적으로 가장 많은 서열을 포함하는 데이터베이스가 구축되었다 (Beszteri et al., Jones et al., 2005). 그러나 18S rDNA는 규조류 종에 대해 해상력이 떨어지는 것으로 보고되었다 (Theriot et al. 2009, Mann et al., 2010, Kermarrec et al. 2013, An et al., 2017). 따라서 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (*rbcL*), cytochrome c oxidase subunit I (*coxI*), internal transcribed spacer (ITS), photosystem II protein D1 (*psbA*), ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (*rbcS*) 등 18S rRNA보다 우수한 분해능을 제공하는 대체 유전자 마커들이 제안되었다 (Ehara et al., Amato et al., 2007, Evans et al 2007, Roer 2008, Moniz and Kaczmariska 2009, Trobajo et al., 2010, Delaney et al. 2011, Zimmermann et al. 2011, Kermarrec et al., 2013, An et al, 2017). 그러나 NGS 분석에서 가장 중요한 것은 좋은 데이터베이스를 구축하는 것으로 이용 가능한 서열의 수, 정렬의 용이성, 균류 또는 박테리아에 의한 오염 위험성을 고려하여 MiSeq 분석을 위한 분자 마커로서 *rbcL* 유전자를 선택했다 (Evans et al. 2007, MacGillivray and Kaczmariska 2011).

본 연구에서는 GenBank에서 획득한 *rbcL* 데이터베이스를 참조하여 저서성 규조류 특이적이며, 크기가 약 450bp 정도인 새로운 프라이머 제작하였다 (forward: DrbcL265\_F, 5'-TAY CGY GTA GAT CCA GTT CCA-3 / reverse: DrbcL695\_R, 5'-GCA CGR TTR ATA SCT TCC AT-3'). In silico 분석은 본 연구에서 제작된 프라이머가 갯벌에 일반적으로 분포하는 저서 규조류들을 포함한 대부분의 우상규조류와 잘 일치함을 보였다 (표 5). 하나의 불일치를 허용하면 거의 대부분의 우상규조류와 일부 중심규조류까지 커버되는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 제작된 프라이머는 저서성 규조류 다양성 연구에 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 프라이머는 주로 부유생활을 하는 중심 규조류의 서열과 잘 일치하지 않아 플랑크톤의 규조류 다양성에 대한 연구에서는 주의가 필요할 것으로 보인다.

표 5. 본 연구에서 새로 디자인한 *rbcL* 프라이머의 돌발류 분류군별 적합성

|  | No. of sequences |         | No mismatch (%) |         | One mismatch (%) |         | Two mismatches (%) |         |
|--|------------------|---------|-----------------|---------|------------------|---------|--------------------|---------|
|  | Forward          | Reverse | Forward         | Reverse | Forward          | Reverse | Forward            | Reverse |
| Class Bacillariophyceae Haeckel, 1878                                    |                  |         |                 |         |                  |         |                    |         |
| Order Naviculales Bessey, 1907   | 660              | 90      | 92              | 100     | 99               | 100     | 100                | 100     |
| Order Bacillariales Hendey, 1937   | 366              | 93      | 91              | 99      | 99               | 99      | 100                | 100     |
| Order Surirellales D.G. Mann, 1990                                       | 214              | 96      | 97              | 100     | 100              | 100     | 100                | 100     |
| Order Cymbellales D.G. Mann, 1990  | 177              | 82      | 96              | 100     | 99               | 100     | 100                | 100     |
| Order Cocconeoidales Cocconeoidales E.J. Cox, 2015                       | 72               | 88      | 89              | 99      | 100              | 100     | 100                | 100     |
| Order Thalassiosiphysales D.G. Mann, 1990                                | 58               | 74      | 95              | 97      | 100              | 98      | 100                | 100     |
| Order Eunotiales P.C. Silva, 1962  | 48               | 0       | 2               | 94      | 90               | 100     | 100                | 100     |
| Order Rhopalodiales D.G. Mann, 1990                                      | 22               | 41      | 82              | 91      | 100              | 100     | 100                | 100     |
| Order Achnanthes P.C. Silva, 1962  | 10               | 20      | 50              | 80      | 70               | 100     | 100                | 100     |
| Order Fragiliales P.C. Silva, 1962                                       | 46               | 33      | 100             | 89      | 100              | 98      | 100                | 100     |
| Order Licmophorales Round, 1990  | 40               | 63      | 88              | 90      | 98               | 100     | 100                | 100     |
| Order Plagiogrammales E.J.Cox, 2015                                      | 25               | 80      | 96              | 100     | 100              | 100     | 100                | 100     |
| Order Rhabdonematales Round & R.M. Crawford, 1990                        | 11               | 36      | 55              | 64      | 82               | 73      | 100                | 100     |
| Order Rhaphoneidales Round, 1990   | 10               | 40      | 100             | 40      | 100              | 100     | 100                | 100     |
| Other Bacillariophyceae  | 35               | 49      | 57              | 69      | 86               | 83      | 100                | 100     |
| Class Coscinodiscophyceae Round & R.M. Crawford, 1990                    |                  |         |                 |         |                  |         |                    |         |
| Order Rhizosoleniales P.C. Silva, 1962                                   | 44               | 34      | 93              | 61      | 95               | 100     | 95                 | 95      |
| Order Coscinodisciales Round & R.M. Crawford, 1990                       | 36               | 17      | 72              | 83      | 97               | 100     | 100                | 100     |
| Order Melosirales R.M. Crawford, 1990                                    | 21               | 57      | 71              | 86      | 95               | 100     | 100                | 100     |
| Other Coscinodiscophyceae  | 28               | 29      | 86              | 54      | 96               | 64      | 100                | 100     |
| Class Mediophyceae (Jousé & Proshkina-Lavrenko) Medlin & Kaczmarek, 2004 |                  |         |                 |         |                  |         |                    |         |
| Order Thalassiosirales Glezer & Makarova, 1986                           | 155              | 1       | 15              | 13      | 15               | 96      | 98                 | 98      |
| Order Eupodiscales V.A. Nikolaev & D.M. Harwood, 2000                    | 45               | 2       | 82              | 2       | 82               | 20      | 100                | 100     |
| Order Cymatosirales Round & R.M. Crawford, 1990                          | 34               | 68      | 91              | 88      | 100              | 100     | 100                | 100     |
| Order Biddulphiiales Krieger, 1954                                       | 30               | 30      | 80              | 53      | 90               | 93      | 97                 | 97      |
| Order Chaetocerotales Round & Crawford, 1990                             | 17               | 24      | 82              | 53      | 88               | 82      | 100                | 100     |
| Other Mediophyceae   | 29               | 21      | 72              | 45      | 83               | 90      | 100                | 100     |

표 6. 새로 디자인한 프라이머를 이용하여 구축한 저서돌말류 클론라이브러리의 BLASTn 결과

|         | Closest relative                                  | Acc. no.     | E-value | Gaps (%)   | Identity (%)  |
|---------|---|--------------|---------|------------|---------------|
| Col. 1  | <i>Nitzschia incurvata</i> var. <i>lorenziana</i> | KC736608     | 1e-161  | 0/380 (0%) | 358/380 (94%) |
| Col. 2  | <i>Navicula</i> sp.                               | KY320308     | 5e-155  | 0/308 (0%) | 306/308 (99%) |
| Col. 3  | <i>Navicula salinarum</i>                         | KY320303     | 1e-146  | 0/320 (0%) | 309/320 (97%) |
| Col. 4  | <i>Halamphora coffeaeformis</i>                   | KX120546     | 3e-142  | 0/312 (0%) | 301/312 (96%) |
| Col. 5  | <i>Halamphora montana</i>                         | KC736590     | 2e-174  | 0/367 (0%) | 357/367 (97%) |
| Col. 6  | <i>Halamphora montana</i>                         | KC736590     | 1e-175  | 0/372 (0%) | 361/372 (97%) |
| Col. 7  | <i>Nitzschia incurvata</i> var. <i>lorenziana</i> | KC736608     | 1e-146  | 0/380 (0%) | 349/380 (92%) |
| Col. 8  | <i>Thalassiosira pseudonana</i>                   | XM_002297482 | 6e-174  | 0/381 (0%) | 366/381 (96%) |
| Col. 9  | <i>Halamphora montana</i>                         | KC736590     | 6e-174  | 0/372 (0%) | 360/372 (97%) |
| Col. 10 | <i>Psammoneis obaidii</i>                         | KR059024     | 1e-180  | 2/433 (0%) | 405/433 (94%) |
| Col. 11 | <i>Entomoneis</i> sp.                             | KX120570     | 0       | 0/433 (0%) | 422/433 (97%) |
| Col. 12 | <i>Pseudostaurosira brevistriata</i>              | KU851889     | 0       | 0/432 (0%) | 421/432 (97%) |
| Col. 13 | <i>Dimeregramma</i> sp.                           | KR048209     | 0       | 0/433 (0%) | 414/433 (96%) |
| Col. 14 | <i>Navicula gregaria</i>                          | KY320297     | 0       | 0/433 (0%) | 424/433 (98%) |
| Col. 15 | <i>Navicula salinarum</i> f. <i>minima</i>        | KY320304     | 0       | 0/433 (0%) | 429/433 (99%) |
| Col. 16 | <i>Cocconeis</i> cf. <i>mascarenica</i>           | KT943679     | 0       | 0/432 (0%) | 420/432 (97%) |
| Col. 17 | <i>Pseudostaurosira brevistriata</i>              | KU851889     | 0       | 0/432 (0%) | 417/432 (97%) |

자연 시료를 이용한 PCR-cloning / sequencing을 통해 프라이머가 저서 규조류에 특이성을 가진다는 것을 확인하였다. 자연 시료로부터 추출된 17개의 모든 클론은 blastn 검색 결과 모두 규조 *rbcL* 서열로 판명되었으며, 가장 가까운 규조 sequence와 비교하여 92-99%의 유사도를 보였다 (표 6).

#### □ OTU 할당 및 read 분류

규조토 구성과 다양성을 이해하려고 할 때 OTU를 분리하는 기준이 중요한데, 일반적으로 원핵생물의 경우 16S rRNA의 98.7% 유사도 수준을 OTU를 종 수준을 정의하는 기준으로 정하고 있다 (Yarza 2014). 그러나, 규조류의 경우 종 또는 속 수준 분류 기준이 명확하지 않다. Nanjappa et al. (2014)는 SSU rDNA의 V4 및 V9 영역의 파이로 시퀀싱을 사용하여 97% 유사도 수준으로 OTU를 클러스터링하여 규조 다양성 및 분포를 분석했다. Zimmermann et al. (2015)는 18S V4를 분자마커로 하여 OTU를 98% 유사도를 기준으로 분류하여 파이로시퀀싱을 진행하였으며, 형태 분류를 기

반으로한 결과와 비교하였다. *rbcL*의 경우, Hamsher et al. (2011)은 Sellaphora 속의 종간 변식 다양성이 0.14-0.73%로 매우 낮다고 보고하였으며, Kermarrec et al. (2014)는 99%와 98%의 유사도를 종과 속을 나누는 기준으로 제안하였다. 본 연구에서, 우리는 *rbcL* 서열의 상이한 유사도 (94-99%)에서 OTU 및 종의 수를 추정하였다 (그림 28). 유사도가 증가함에 따라 OTU 수가 기하급수적으로 증가하였다. 그러나 종의 수는 98% 수준에서 포화되는 경향을 보여 종 수준 분류를 위한 유사도는 보수적으로 판단하여 98%를 문턱 값으로 사용할 수 있을 것으로 판단하였으며, 본 연구에서 다양성 분석을 위해 98% *rbcL* 염기서열 유사도를 사용했다.

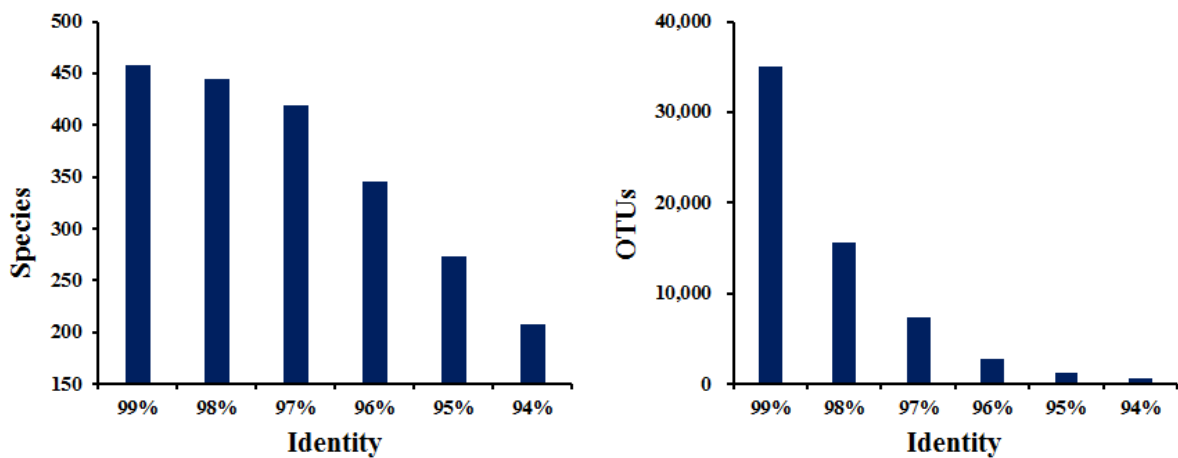


그림 28. *rbcL* 유전자 염기서열의 유사도를 기준으로 한 저서들말류 종 수 (왼쪽) 및 OTUs 수 (오른쪽) 추정치

Mothur 프로그램은 분류를 분류하고 분류 계급을 할당하는 두 가지 방법을 제공한다. 하나는 본 연구에서 사용된 *k*-Nearest Neighbor (*k*-NN) 알고리즘이고 다른 하나는 Wang 알고리즘이다. 후자는 Bayesian method라 불리는 통계적 접근법을 사용한 매우 신뢰성이 있는 방식으로 군집을 분석하는 RDP classifier (Wang et al. 2007)에 의해 구현된다. 그러나 Wang 알고리즘을 사용할 때, 절반 이상의 read들이 속 수준에서도 분류되지 않았으며, 이는 저서 규조류의 유전적 다양성에 대한 정보가 아직 많이 부족하기 때문으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 *k*-NN 알고리즘을 사용하여 데이터베이스 내 가장 가까운 관계에 있는 시퀀스를 참조하여 각 read들을 분류하였고, ML 계통수를 제작하여 주요 OTU의 분류를 확인했다 (Jiang et al. 2012). 계통수 기반 접근법과 *k*-NN 알고리즘에서 부여된 분류계급간의 약간의 불일치가 발견되었으며, 이들은 계통 분석을 참고하여 *k*-NN 알고리즘으로 부여된 주요 OTUs의 분류 계급을 수정하였다.

### □ 추계와 동계 갯벌 저서성 규조류의 다양성

MiSeq 플랫폼을 이용한 저서 규조류의 다양성 분석의 유용성을 검토하기 위해 새롭게 디자인 된 프라이머를 사용하여 20개의 샘플 분석하여 평균 길이가 431bp인 972,664개의 raw read를 얻었다 (표 7). 문제가 있는 read 및 chimera 제거 후, 남은 read는 총 384,646개로 각 샘플에서 얻은 read 수는 9,246에서 38,793개의 범위를 보였다. 따라서 각 샘플의 read 수를 normalize하기 위해 각 시료에서 9,246개의 read를 서브 샘플링했다. OTU는 98%의 유사도를 기준으로 클러스터링 되었으며, 이 중 1% 이상의 상대 빈도를 보인 OTU는 103개로 나타났다. OTU의 수는 10월에 비해 1월에 크게는 4배까지 차이가 났다. 각 OTU들의 대표시퀀스를 이용하여 작성된 계통수 및 heatmap은 그림 29에 나타내었다.

MiSeq 기법을 통해 획득한 저서성 규조류 다양성 지수들을 표 8에 나타내었다. Shannon 다양성 지수는 4.7-6.1로 나타났는데, 강화도 갯벌 (1.0-2.0)과 조사 지역 인근에 위치한 태안 진산리 (3.32)에서 실시 된 연구 결과에 매우 비해 높았다 (Choi 2002, Yoo 2004, Park et al., 2013). 특히 부유 지수 (ACE와 Chao1)는 10월보다 1월에 10-20배까지 차이를 보여 계절적 변화가 컸다. 풍부도와 다양성 지수의 공간적 변화는 시간적 변화에 비해 상대적으로 작았다. Good's coverage는 0.7-0.98의 범위를 보여 이는 저서성 규조류 다양성 분석을 위한 MiSeq 기법을 활용이 적절하다는 것을 보여준다.

### □ 저서 규조의 시·공간적 변화

본 연구에서 얻은 OTU는 아직 분류계급이 정립되지 않은 *Schizostauron* 속을 제외하고 3강, 30목, 57과, 140속 및 445 분류군으로 분류되었다. 높은 상대 빈도를 보인 10개의 속은 전체의 60% 이상을 구성하고, 시·공간적으로 다른 변이를 보였다 (그림 30). *Nitzschia*, *Navicula*, *Amphora*, *Berkeleya*, *Planothidium*, *Sellaphora*, *Surirella*이 주요 분류군으로 나타났다. 2011년 10월 *Navicula*와 *Amphora*가 대부분의 정점에서 우점하였지만 *Nitzschia*는 주로 하부조간대에서 높은 풍도를 보였다. 이와 반대로, *Amphora*, *Planothidium*과 *Sellaphora*는 육지와 가까운 정점들에서 증가하는 경향을 보였다. 2012년 1월에는 *Nitzschia*와 *Navicula*가 우점하는 것으로 나타났으며, 1월 *Berkeleya*의 상대 빈도가 상부조간대에서 크게 증가하는 것으로 나타났다.

표 7. MiSeq 분석을 통해 얻은 각 샘플별 read 수와 pre-processing에 따른 read 수

| Date                  | Stations | Raw reads      | Number of remained reads                  |                           |                    |
|-----------------------|----------|----------------|---|---------------------------|--------------------|
|                       |          |                | Removal of short/long and ambiguous reads | Removal of nonsense codon | Removal of chimera |
| 2011-10-31            | D01      | 49,541         | 26,124                                    | 25,342                    | 24,343             |
|                       | D02      | 82,624         | 40,939                                    | 40,135                    | 38,793             |
|                       | D03      | 47,405         | 19,287                                    | 18,814                    | 18,384             |
|                       | D04      | 43,559         | 19,765                                    | 19,113                    | 18,454             |
|                       | D05      | 45,964         | 21,687                                    | 20,941                    | 20,082             |
|                       | D06      | 63,068         | 29,990                                    | 28,887                    | 28,168             |
|                       | D07      | 57,578         | 27,254                                    | 26,592                    | 26,011             |
|                       | D08      | 72,615         | 28,689                                    | 27,527                    | 27,194             |
|                       | D09      | 60,044         | 24,233                                    | 23,391                    | 22,988             |
|                       | D10      | 72,930         | 34,789                                    | 33,600                    | 33,207             |
| 2012-01-27            | D01      | 33,160         | 14,743                                    | 14,405                    | 10,677             |
|                       | D02      | 30,708         | 12,931                                    | 12,655                    | 9,246              |
|                       | D03      | 38,035         | 17,821                                    | 17,470                    | 12,304             |
|                       | D04      | 37,239         | 18,633                                    | 18,212                    | 12,548             |
|                       | D05      | 32,185         | 14,638                                    | 14,309                    | 10,149             |
|                       | D06      | 43,315         | 21,822                                    | 21,351                    | 15,114             |
|                       | D07      | 34,675         | 17,685                                    | 17,341                    | 12,128             |
|                       | D08      | 39,728         | 18,305                                    | 17,861                    | 12,392             |
|                       | D09      | 32,488         | 14,853                                    | 14,527                    | 10,326             |
|                       | D10      | 55,803         | 26,981                                    | 26,406                    | 22,138             |
| <b>Remained reads</b> |          | <b>972,664</b> | <b>451,169</b>                            | <b>438,879</b>            | <b>384,646</b>     |
| %                     |          | 100.0          | 46.4                                      | 45.1                      | 39.5               |

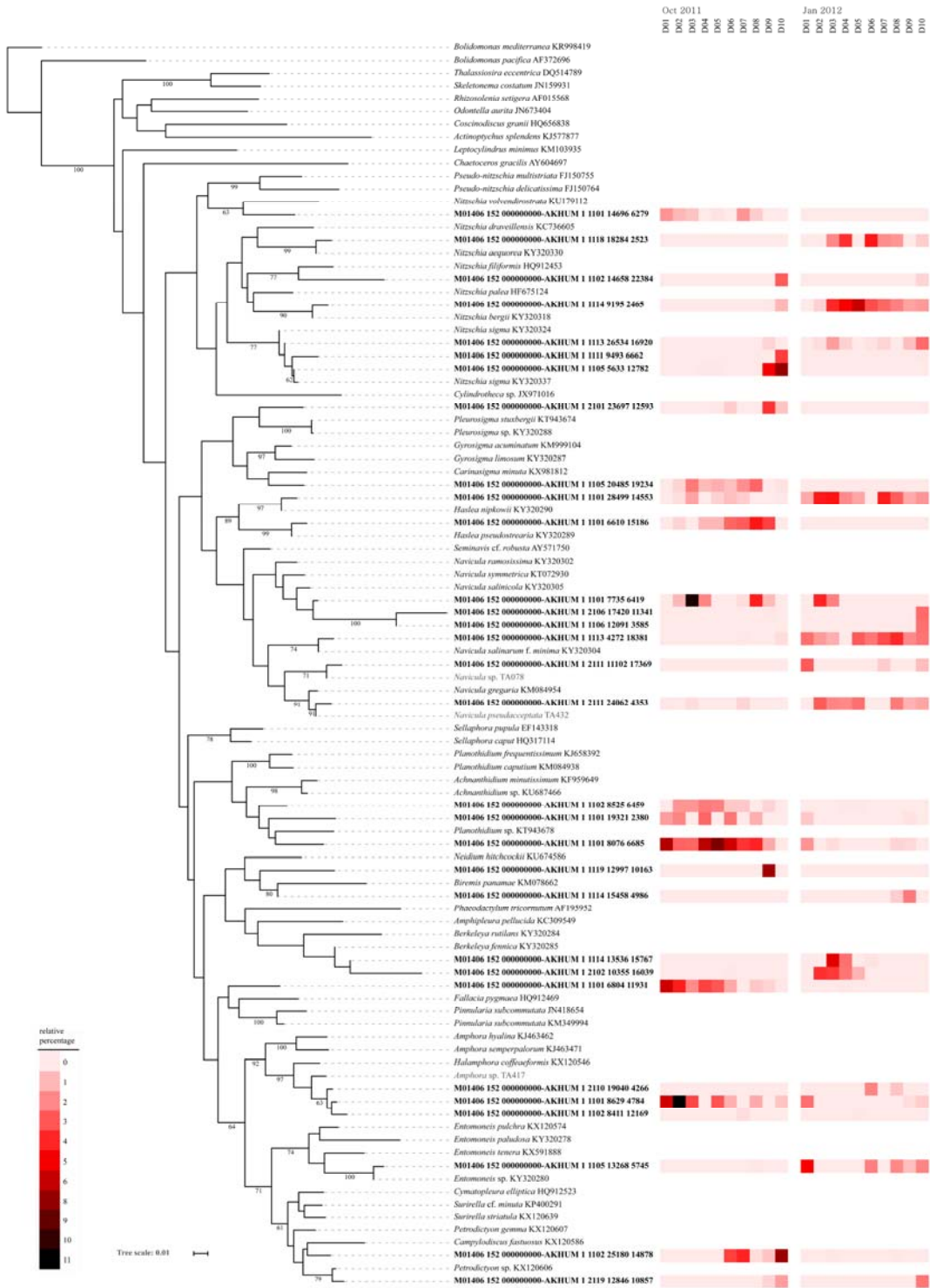


그림 29. 10개 지점 (D01-D10)에서 발견한 돌말류 genotypes간 Maximum likelihood 계통수 및 지점별 출현율. Heatmap은 각 지점의 주요 genotypes (>3%)을 상대적으로 표시한다.



표 8. 각 지점별 operational taxonomic units (OTUs), abundance-based coverage estimators, (ACEs), Chao 1 richness values 및 Shannon and inverse Simpson 다양성 지수

| Date      | Station | OTUs  | Coverage | ACE    | Chao 1 | Shannon | Simpson |
|-----------|---------|-------|----------|--------|--------|---------|---------|
| Oct. 2011 | D01     | 582   | 0.974    | 1,163  | 1,019  | 4.678   | 0.026   |
|           | D02     | 546   | 0.978    | 955    | 948    | 4.717   | 0.028   |
|           | D03     | 550   | 0.981    | 744    | 823    | 4.774   | 0.026   |
|           | D04     | 674   | 0.967    | 1,579  | 1,365  | 4.874   | 0.020   |
|           | D05     | 623   | 0.975    | 1,083  | 1,042  | 4.903   | 0.021   |
|           | D06     | 594   | 0.975    | 1,170  | 1,265  | 4.998   | 0.017   |
|           | D07     | 638   | 0.975    | 1,117  | 969    | 5.097   | 0.014   |
|           | D08     | 509   | 0.979    | 1,060  | 1,017  | 4.872   | 0.017   |
|           | D09     | 521   | 0.978    | 991    | 984    | 4.747   | 0.022   |
|           | D10     | 392   | 0.985    | 827    | 769    | 4.591   | 0.026   |
| Jan. 2012 | D01     | 1,857 | 0.849    | 17,841 | 7,769  | 5.600   | 0.015   |
|           | D02     | 2,720 | 0.770    | 26,548 | 11,317 | 6.038   | 0.015   |
|           | D03     | 2,428 | 0.794    | 22,960 | 10,220 | 5.711   | 0.018   |
|           | D04     | 2,602 | 0.776    | 29,298 | 12,119 | 5.970   | 0.013   |
|           | D05     | 2,138 | 0.819    | 23,639 | 9,141  | 5.580   | 0.018   |
|           | D06     | 2,206 | 0.817    | 21,646 | 10,076 | 5.769   | 0.014   |
|           | D07     | 2,237 | 0.813    | 24,813 | 11,139 | 5.841   | 0.013   |
|           | D08     | 2,307 | 0.806    | 24,585 | 9,821  | 5.843   | 0.012   |
|           | D09     | 2,523 | 0.784    | 27,501 | 11,276 | 6.143   | 0.008   |
|           | D10     | 962   | 0.945    | 2,742  | 1,953  | 5.185   | 0.013   |

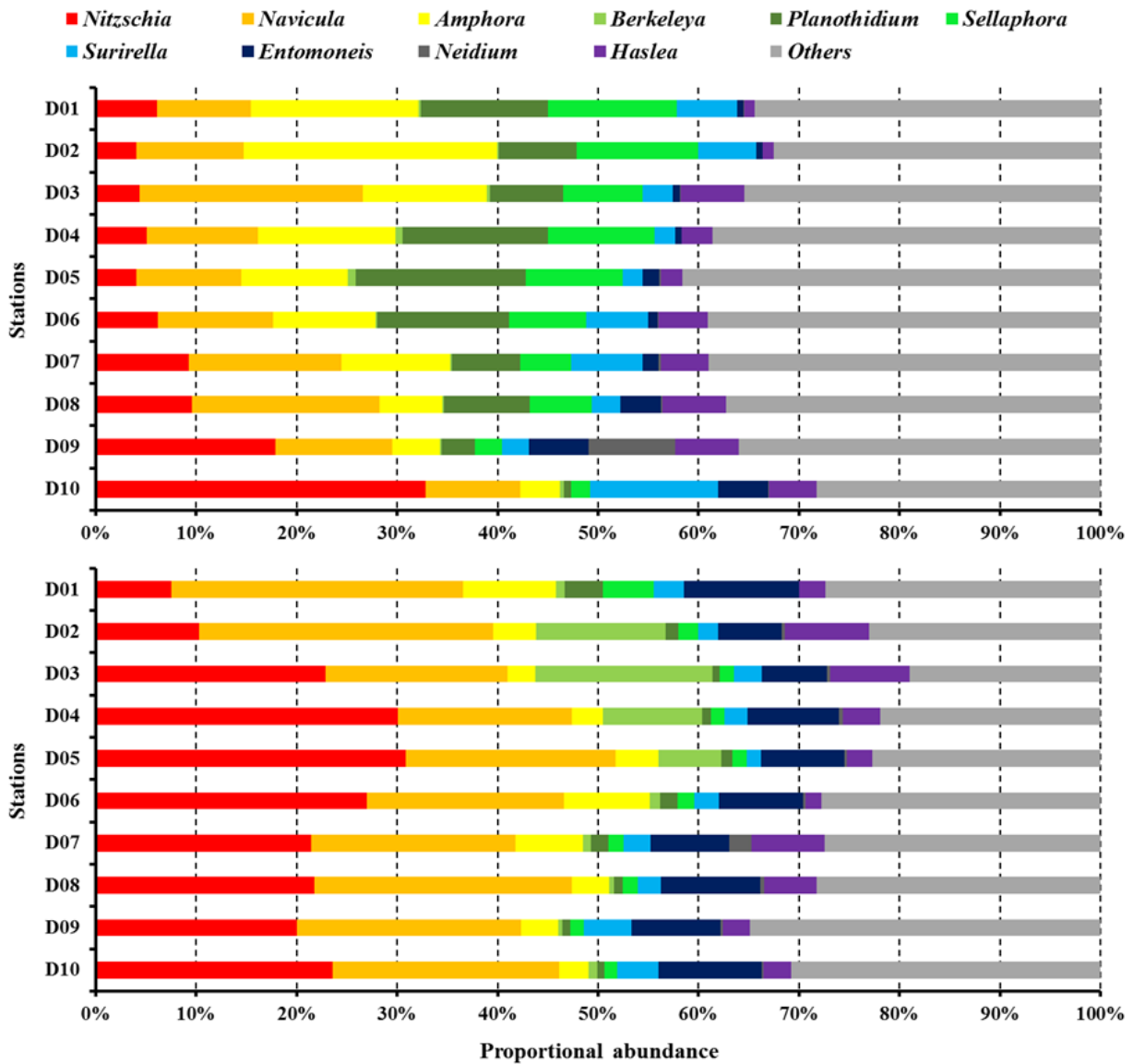


그림 30. 태안 근소만 저서돌말류 10개 주요 속의 2011년 10월과 2012년 1월 출현빈도

근소만의 갯벌의 주요 저서 생물로 나타난 *Navicula*, *Nitzschia* 및 *Amphora*는 세포의 양면에 raphe를 가지고 있으며 raphe에서 분비된 세포외 분비물질을 이용한 운동 능력을 가지고 있기 때문에 퇴적물이 지속적으로 축적되고 극심한 환경 변화가 주기적으로 발생하는 해안 환경에서 성장이 가능하다. 따라서 *Amphora*, *Navicula*, *Nitzschia*는 전 세계 갯벌에 널리 분포하는 주요 분류군으로 알려져 있다 (Round 1971, Dijkema and Wolff 1983, Underwood 1994).

### □ 저서성 규조류 연구를 위한 NGS의 적용 가능성과 한계

저서성 규조류를 연구하기 위한 분자 기법의 응용은 분명한 장점을 가지고 있고 본 연구 결과를 토대로 충분한 가능성을 보여줬지만 아직까지는 몇 가지 한계점이 있다. NGS기법을 활용함에 있어 기존 양질의 데이터베이스 확충은 매우 중요하다 (Kermarrec et al., 2013). 현재까지 구축된 데이터베이스 내에서 *rbcL* 유전자 서열의 수가 다른 단백질을 코딩하는 유전자 (리보솜 단백질 제외)의 수보다 상대적으로 많았지만, 많은 read들은 데이터베이스와 매우 낮은 유사도를 보였다 (그림 31). 현재 추정되고 있는 규조류 종 수가 30,000-100,000종 임을 감안할 때 (Mann and Vanormelingen 2013), 본 연구에서 사용된 2,200여개의 염기서열을 포함하는 데이터베이스는 계통분석 관점에서 볼 때 매우 불충분하다. 따라서 데이터베이스를 확장하고 개선하기 위한 지속적인 노력이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

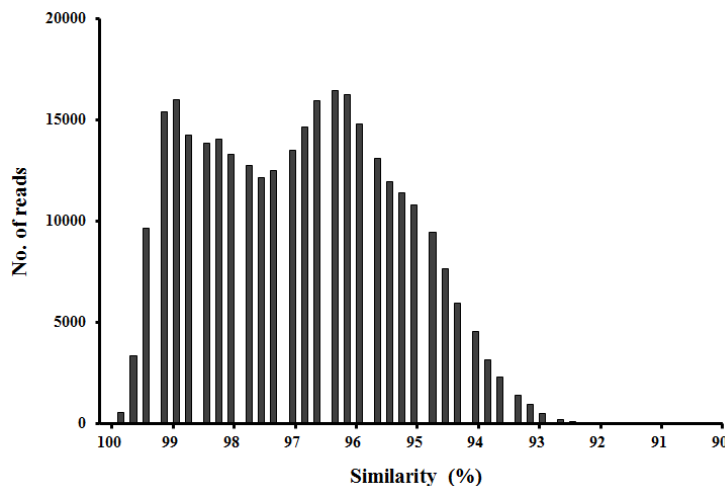


그림 31. MiSeq read의 reference DB에 대한 유사도 분포

#### 1.4. 난류성 와편모조류 지표종 선정

독도 수역에 분포하는 와편모조류의 분포과정을 파악하고자 북서태평양의 시료를 이용 계층적 군집 분석 결과 11속 98종은 각 그룹의 특징에 따라 5개의 군집으로 나뉘었다 (그림 32). 첫 번째 그룹은 고온고염의 조건을 요구하는 호염 열대성 종들로 이루어져 있으며,  $25.3 \pm 2.7^\circ\text{C}$ 의 최저 수온 범위와  $34.4 \pm 0.3$  PSU의 최저 염분 범위를 나타냈다. *Ceratium limulus*, *Neoceratium eucarctatum*, *Ornithocercus heteroporoides*, *Oxytoxum elegans* 등 34종이 포함되었으며, 수온과 염도의 저하에 가장 민감하게 반응하는 그룹으로 나타났다. 독도 인근 해역에서 출현 양상을 살펴보면 11월에 *Ceratium incisum*, *Podolampas elegans*이 출현한 반면, 12월에는 *Podolampas elegans*만

출현하였다 (그림 33). 하지만 출현 종과 출현 빈도가 매우 낮게 나타나 독도 인근해역에서 첫 번째 그룹은 열대성 지시종의 출현은 매우 드물것으로 판단된다. 두 번째 그룹은 염분 저하에는 민감하게 반응하지만 수온 저하에는 상대적으로 내성이 강한 열대성 종들로 이루어져 있으며, *Ceratium concilians*, *Ceratium declinatum*, *Ceratium symmetricum*, *Ornithocercus heteroporus* 등 20종이 포함된다.

조사 결과 두 번째 그룹은 독도 인근 해역에서 첫 번째 그룹과 비슷한 경향을 보였는데, 11월에 *Ceratium declinatum*, *Ceratium biceps*이 출현하였으나 12월에는 *Ceratium declinatum*만 출현하였다. 첫 번째 그룹과 마찬가지로 독도 인근해역에서 열대성 지시종으로는 서정이 가능하나 출현 빈도가 낮은 단점이 있다. 세 번째 그룹은 수온 저하와 염도 저하에 내성을 가진 종들로  $18.8\pm 3^{\circ}\text{C}$ 의 최저 수온범위와  $32.8\pm 0.3$  PSU의 최저 염분 범위를 나타낸 그룹으로 *Amphisolenia bidentata*, *Ceratium contortum*, *Ceratium hexacanthum*, *Ornithocercus magnificus* 등 24종이 속하였다 (그림 33).

세 번째 그룹은 독도 인근 해역에서 8~12월까지 출현하였는데, 출현 양상을 살펴보면 8월 1속 1종으로 최저치를 나타냈고 10~12월 6속 13종으로 최대치를 나타낸 후 감소하는 경향을 보였다. 주요 출현 종으로는 *Ceratium contortum*, *Ornithocercus magnificus*, *Podolampas palmipes* 등이 있으며 첫 번째 그룹과 두 번째 그룹에 비해 출현 종수와 빈도가 높아 열대성 지시종으로 활용성이 높을 것으로 판단된다.

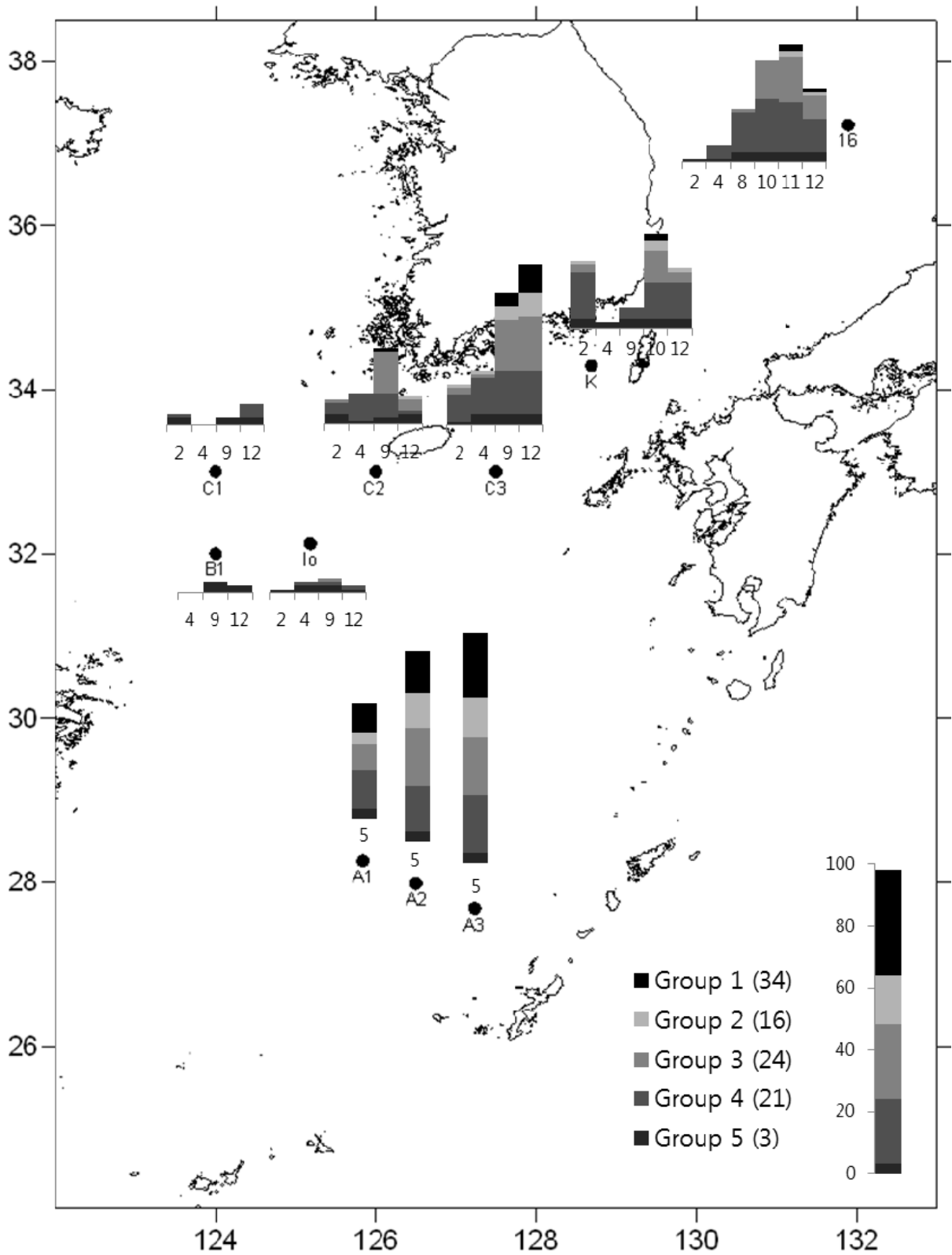


그림 32. 그룹별 와편모조류 출현종수의 북서태평양 분포도

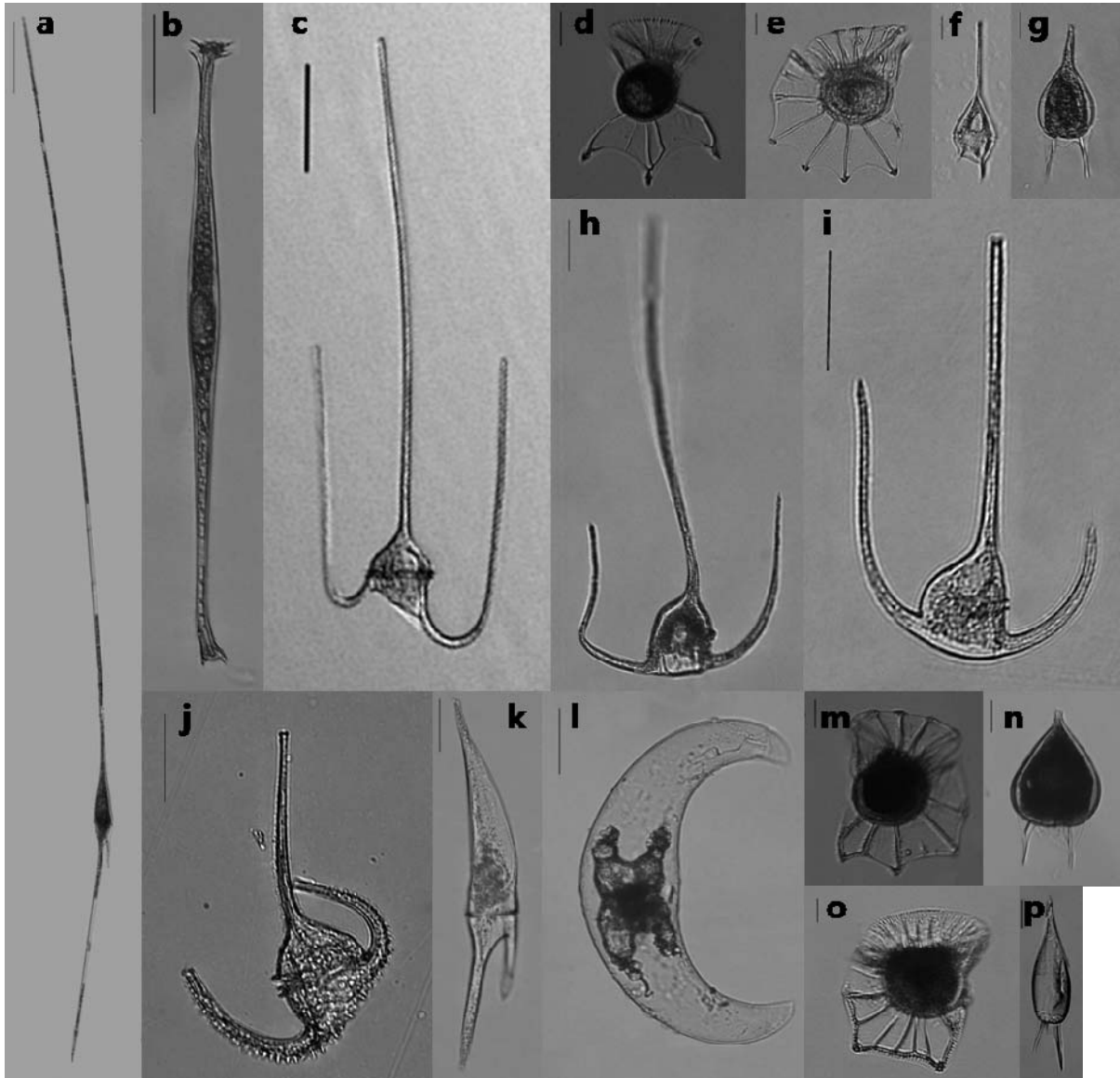


그림 33. 독도수역에 출현하는 난류성 외편모조류. a. *Ceratium biceps*, b. *Amphisolenia bidentata*, c. *Ceratium deflexum*, d. *Ornithocercus magnificus*, e. *Ornithocercus steinii*, f. *Ceratium teres*, g. *Podolampas elegans*, h. *Ceratium contortum*, i. *Ceratium declinatum*, j. *Ceratium ranipes*, k. *Ceratium incisum*, l. *Pyrocystis lunula*, m. *Ornithocercus thumii*, n. *Podolampas bipes*, o. *Ornithocercus quadratus*, p. *Podolampas palmipes*  
(Scale bar: a,b,c = 100  $\mu\text{m}$ , d,e,f,g,h,n,o,p = 20  $\mu\text{m}$  i,j,k,l,m = 50  $\mu\text{m}$ )

네 번째 그룹은 환경변화에 내성이 강하여 저온 ( $10.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$ )과 저염수 ( $32.5 \pm 0.4$  PSU)해역까지 널리 분포하는 종들로 *Dinophysis caudata*, *Ceratium arietinum*, *C. gibberum*, *C. horridum*, *C. macroceros*, *C. massiliense*, *C. vultur* 등 22종이 포함되었다. 실제 *Ceratium arietinum*와 *Ceratium gibberum*는 열대성 종이지만  $10 \sim 25^\circ\text{C}$  사이의 수

온에서 출현하여 수온 내성이 매우 큰 것으로 알려져 있으며 (Dodge and Marshall, 1994), *Ceratium candelabrum*, *Ceratium horridum*, *Ceratium massiliense* 등은 종내 형태적 변이가 크게 나타나 아종 수준에서 널리 분포한다고 알려져 있다 (Tunin-Ley, 2007). 독도 인근 해역에서 출현 양상을 살펴보면 세 번째 그룹과 유사한 경향을 보였는데 2월을 제외한 전 조사 시기에 걸쳐 출현하였으며, 4월 4속 4종으로 최저치를 나타낸 후 10~11월 4속 16종으로 최대치를 나타낸 후 감소하는 추세를 보였다. 다섯 번째 그룹은 조사된 98종의 와편모조류 중 환경변화에 가장 내성이 강한 종들로 전세계 보편종에 속하는 *Ceratium furca*, *C. fusus*, *C. tripos*이 속해 있으며 2~30℃의 넓은 수온 범위에서 다양한 해역에서 출현하는 것으로 알려져 있다 (Matrai 1986). 독도 인근 해역에서 조사된 전 시기에 걸쳐 출현하였으며, 98종 중 가장 높은 빈도수를 나타냈다. 계절적으로는 2~4월에 *Ceratium fusus*를 제외한 두 종은 출현하지 않았다.

독도 인근 해역에서 조사된 시기 중 10~12월에 첫 번째 그룹을 비롯한 두 번째 그룹과 세 번째 그룹의 출현이 증가하는 현상은 동해에 고온고염의 해수를 전달하는 대마 난류가 1월에 가장 약해지고 10월에 가장 강해지는 특성으로 인한 것으로 여겨진다 (Takikawa et al.; 2005). 또한 동해의 계절적인 환경변화에 의해 나타나는 물리적 특성도 난류성 와편모조류의 분포 확장에 영향을 준 것으로 판단된다. 이러한 결과를 종합적으로 고려해 봤을 때 물리·화학적 환경요소는 해류의 이동에 따라 그 특성이 사라져 관측 시 드러나지 않지만, 해류를 따라 이동하는 지시종의 경우 생존 적응력을 통해 잔존함으로써 생물지리학적 분포를 통해 난류의 유입 여부와 영향력을 확인할 수 있음을 알 수 있다.

현재 진행되는 기후변화로 인해 다양한 환경변화가 예측되고 있으나 지표종을 이용한 환경변화 연구는 축적된 자료의 부족으로 적용 범위에 한계가 있는 실정이다. 우리는 와편모조류의 분포자료와 문헌자료를 이용 고온고염종을 선정하였으며 동중국해 및 동해에서 출현한 종들의 생태적 특성을 파악하였다. 이들 종을 이용한 기후변화연구는 다음과 같은 분야에 적용시킬 수 있을 것으로 판단된다.

- i) **한반도 주변해의 식물플랑크톤 다양성변화 원인 규명:** 한반도 주변해는 난류의 유입에 의해 식물플랑크톤의 다양성이 증가하나, 쿠로시오 분지류에 의한 다양성 변화 연구가 부족한 상황이다. 따라서 한반도 주변해에서 고온고염성 지표종의 분포 변화는 기후변화에 따른 쿠로시오 분지류의 생태계 영향을 판단하는데 중요한 자료로 이용될 수 있다.
- ii) **쿠로시오 분지류의 세력변화에 의한 생태계 영향:** 쿠로시오에서 분지한 대마난류의 동해유입이 증가하면 고온고염종의 출현도 변화할 것으로 예상된다. 고온

고염성 지표종에 대한 기초자료는 대한해협을 난류수송량 변화가 동해 생태계가 미치는 영향을 가늠하는데 유용하게 이용될 수 있다.

- iii) **장강저염수의 세력변화에 의한 생태계 영향:** 하계 장강저염수의 확장이 고온고염종의 분포를 제한하는 결과를 나타냈다. 따라서 수온이 높은 하계에 장강저염수는 쿠로시오 분지류로부터 이동되는 고염고온성 지표종이 한반도 주변해로 확산되는데 큰 제한요인이 될 수 있다. 기후변화에 의한 강우량의 증감이나 성층 강화는 장강저염수의 동태를 결정하며, 이에 따라 난수성 와편모조류의 다양성이 영향을 받을 것으로 사료된다.
- iv) **고해양 환경 해석:** 고온고염의 난수성 지표종은 고해양 환경의 중요한 지시자로 이용된다. 이들 지표종의 대양으로부터 한반도 주변해의 분포와 이동과정 및 생태적 특성자료는 동해의 고해양 환경 복원 연구의 정밀도를 높이는 기초자료로 활용이 가능하다.

이상과 같이 와편모조류 지표종은 기후변화와 연결된 다양한 생태계 현상을 연구하는데 적용이 가능하다. 본 조사에서 얻어진 결과를 기반으로 자료를 더욱 축적하고 보완해 나가는 노력이 필요할 것으로 보이며, 이를 통해 동중국해 및 한국 남해의 변화 양상에 대해 안정적인 모니터링이 가능 할 것으로 보인다.

## 2. 기능 유형별 식물플랑크톤 (PFTs) 다양성 연구

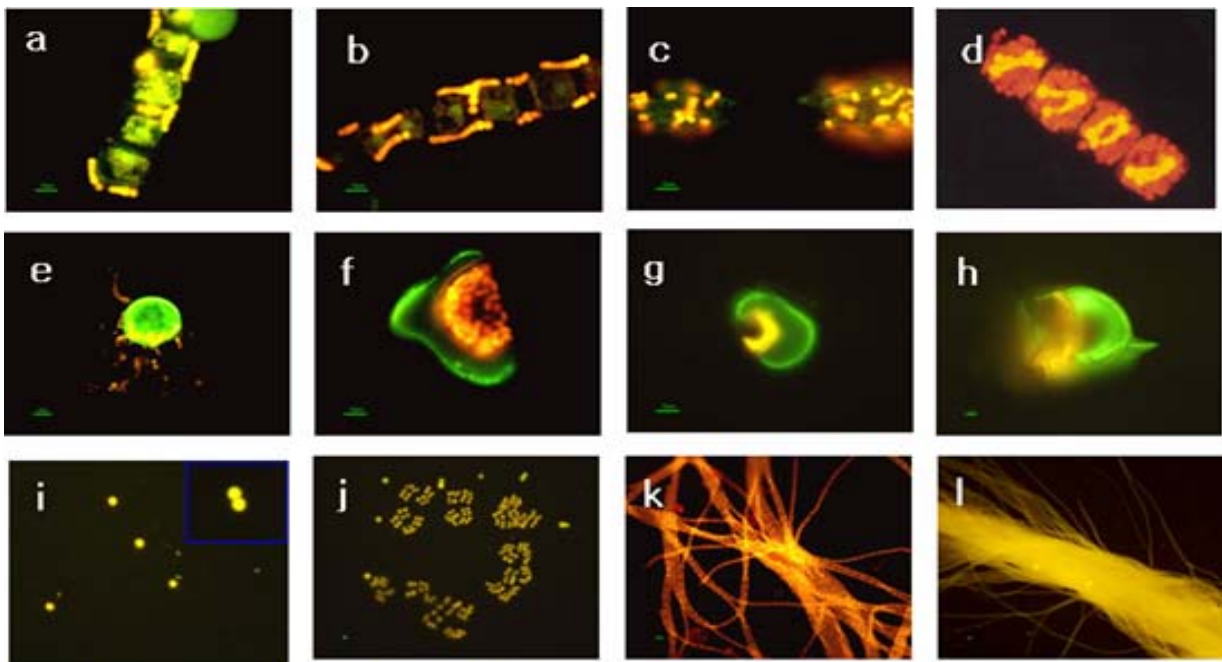
### 2.1. 한반도 주변해의 질소고정세균 분포

질소고정자는 빈영양 대양에서 중요한 질소 공급원으로서 역할을 하며, 대부분 질소고정 남세균이 질소고정의 대부분을 담당하는 것으로 여겨진다. 또한, 일부 질소고정 남세균은 규조류와 와편모류의 내외부 공생 관계를 나타내기도 한다 (그림 34).

우리나라 주변해에 출현하는 질소고정자의 다양성은 해역에 따라 차이를 나타내었다 (그림 35). 동중국해의 쿠로시오 분지류 영향해역에서는 Prymnesiophytes에 공생하는 UcnA 그룹, 사상체 질소고정자인 *Trichodesmium* 등의 남세균 계통이 50% 이상을 차지하였으나, 동중국해 해역에서는 이들의 비율이 약 25% 이하로 감소한 반면, *deltaproteobacteria* 등 다양한 종속영양성 세균이 크게 우점하였다. 서해에서는 질소고정 남세균은 거의 나타나지 않은 반면, 동해에서는 UcnA와 *Trichodesmium*이 다시 50% 이상으로 나타나 대조적인 특성을 나타냈다. 이러한 지역적 분포 특성의 차



이로부터 우리나라 주변해의 질소고정자의 분포가 쿠로시오 분지류에 의한 이류에 큰 영향을 받음을 알 수 있었다. 또한 정량적 자료는 없지만, 우리나라 주변에서 난수성 질소고정세균의 성장이 활발하지 않을 가능성을 고려하면, 우리나라 주변해에 종속영양성 질소고정자가 많이 분포하지 않을 가능성을 시사한다. 그러나, 시기에 따라 나타날 수 있는 빈영양 상태에서는 질소 공급자로서 이들의 역할이 중요할 것으로 여겨진다.



#### **Diatom-cyanobacteria symbiosis**

*Bacteriastrium* sp. - *Calothrix rhizosoleniae*  
*Chaetoceros* sp. - *Calothrix rhizosoleniae*  
*Hemiaulus membranaceus* - *Richelia intracellularis*  
*Hemiaulus hauckii* - *Richelia intracellularis*  
*Rhizosolenia* spp. - *Richelia intracellularis*  
*Climacodinium flauensfeldianum* - *Cyanothece* like sp.  
*Dactyliosolen* sp. - rod type cyanobacteria

#### **Dinoflagellate-cyanobacteria symbiosis**

*Ornithocercus* spp. - rod type  
*Histoneis* sp. - rod type  
*Citharistes* - rod & coccoid type

#### **Filamentous non-heterocystous cyanobacteria**

*Trichodesmium* spp.  
*Katagnyneme* sp.

#### **Cocoid cyanobacteria**

*Crocospaera* sp.

그림 34. 질소고정 남세균의 형광현미경 사진. (a-d: 규조류와 공생하는 남세균, e-h: 와편모류에 공생하는 남세균, i-j: 구형 남세균, k-l: 사상형 남세균)

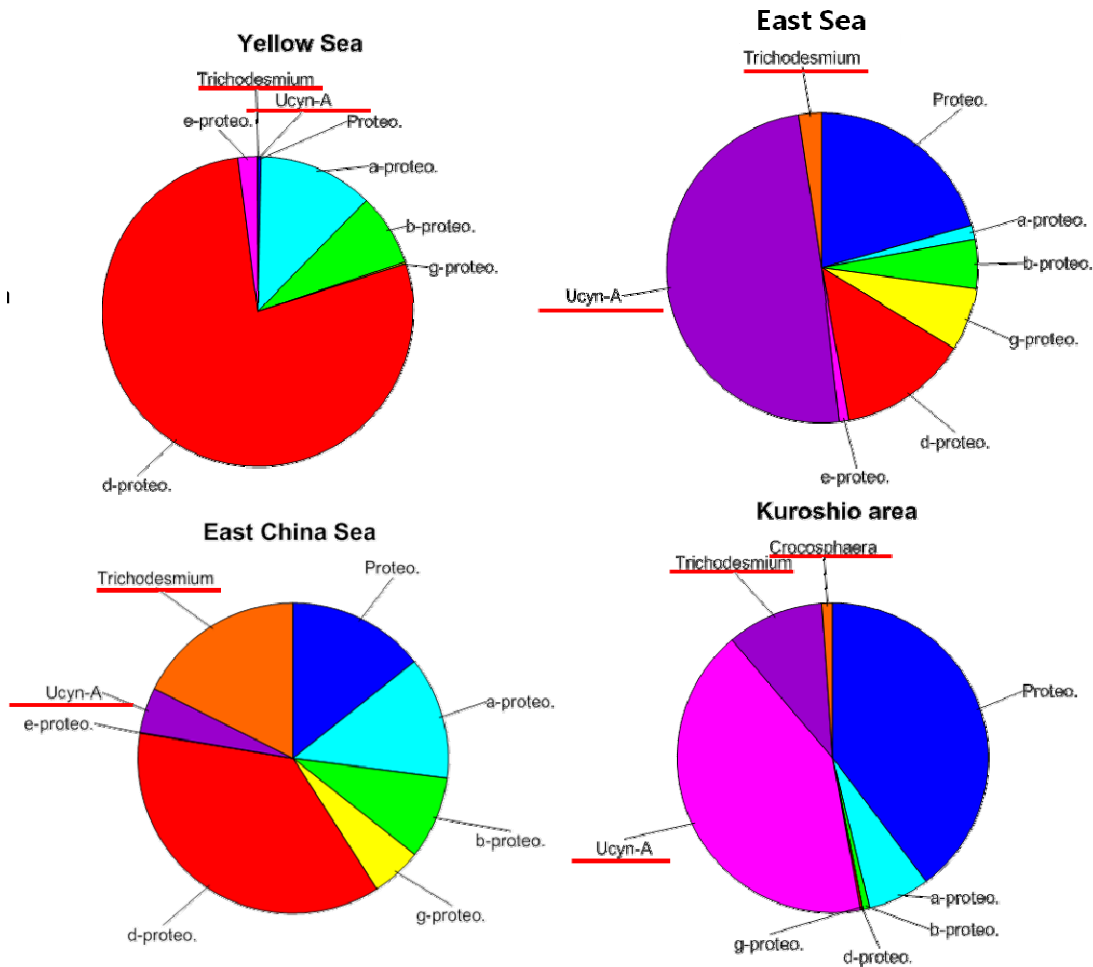


그림 35. 우리나라 주변해의 해역별 질소고정자 다양성을 보여주는 그래프. 각 해역에서 측정된 사계절 자료의 평균을 나타낸 것임

## 2.2. 춘계중식 은편모조류 (Cryptophyta) 다양성 분석을 위한 분자마커 개발

은편모조류는 연안생태계 주요 일차생산자 중 한 그룹으로, 지중해 은편모조류 봄철 대발생은 이후 *Dinophysis*류 와편모조 대발생과 연관이 있음이 최근 알려져 있다 (Adolf et al. 2008, Laza-Martinez 2012). 은편모조류는 일반적으로 2개 편모를 가지며 (그림 36), 진핵생물 중 제2차공생의 결과인 핵양체 (Nucleomorph)를 가지는 유일한 단세포성 미세조류 그룹이다. 해양에는 *Rhodomonas*속 및 *Teleaulax*속 등 다양한 그룹이 알려져 있다. 은편모조류는 5개 또는 11개 clades가 알려져 있으나 (Hoef-Emden 2008, Choi et al. 2013) 우리나라 연안 및 인근해 은편모조류의 다양성에 대한 연구는 매우 미비한 실정이다. 우리나라 서해 및 남해 연안 등 인근해에는 은편모조류 (Cryptophytes)가 빈번히 출현 (그림 37)하며, 지역에 따라 봄철 대발생 하기도 한다.

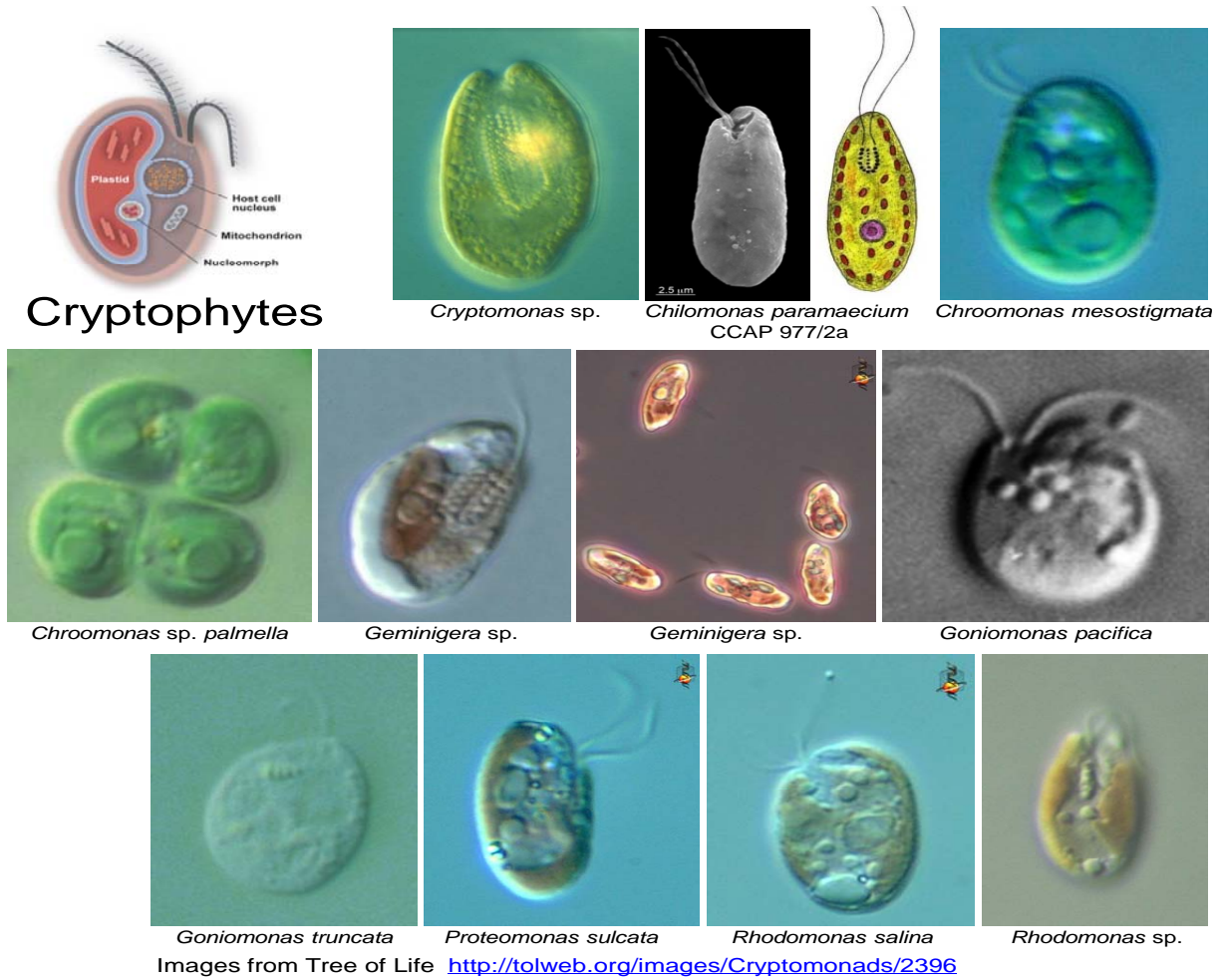


그림 36. 전형적인 은편모조류 (Cryptophytes)의 모식도와 다양한 은편모조류



그림 37. 우리나라 남해 및 서해에 출현하는 은편모조류 예시 이미지

표 9. 본 연구에 사용한 40개 은편모조류 배양주 리스트

| #   | Strain ID   | Identity                             | #   | Strain ID  | Identity                                       |
|-----|-------------|--------------------------------------|-----|------------|--|
| 01. | CCAP 977/2A | <i>Chilomonas paramecium</i>         | 20. | KMMCC 0010 | <i>Chroomonas</i> sp.                          |
| 02. | CCAP 978/27 | <i>Rhodomonas salina</i>             | 21. | KMMCC 0011 | <i>Cryptomonas ovata</i> var. <i>palustris</i> |
| 03. | CCAP 978/6A | <i>Rhinomonas atrorosea</i>          | 22. | KMMCC 0242 | <i>Spumella</i> sp.                            |
| 04. | CCAP 978/8  | <i>Chroomonas placoidea</i>          | 23. | KMMCC 0556 | <i>Chroomonas salina</i>                       |
| 05. | CCAP 978/52 | <i>Cryptomonas curvata</i>           | 24. | KMMCC 0574 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
| 06. | CCMP 1168   | <i>Chroomonas mesostigmatica</i> cf. | 25. | KMMCC 0586 | <i>Hillea</i> sp.                              |
| 07. | CCMP 1178   | <i>Rhodomonas abbreviata</i> cf.     | 26. | KMMCC 0591 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
| 08. | CCMP 1181   | <i>Hemiselmis cryptochromatica</i>   | 27. | KMMCC 1071 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
| 09. | CCMP 2293   | Unidentified cryptophyceae           | 28. | KMMCC 1080 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
| 10. | CCMP 2564   | <i>Geminigera cryophila</i>          | 29. | KMMCC 1134 | <i>Hillea</i> sp.                              |
| 11. | CCMP 2712   | <i>Guillardia theta</i>              | 30. | KMMCC 1303 | <i>Cryptomonas</i> sp.                         |
| 12. | CCMP 325    | <i>Hanusia phi</i>                   | 31. | KMMCC 1485 | <i>Cryptomonas erosa</i>                       |
| 13. | CCMP 326    | <i>Proteomonas</i> sp.               | 32. | KMMCC 1493 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
| 14. | CCMP 443    | <i>Hemiselmis tepida</i>             | 33. | KMMCC 1499 | <i>Cryptomonas</i> sp.                         |
| 15. | CCMP 644    | <i>Hemiselmis andersenii</i>         | 34. | KMMCC 1620 | <i>Hillea fusiformis</i>                       |
| 16. | CCMP 705    | <i>Proteomonas sulcata</i>           | 35. | KMMCC 1679 | <i>Cryptomonas erosa</i>                       |
| 17. | CCMP 739    | <i>Rhodomonas lens</i>               | 36. | KMMCC 1908 | <i>Cryptomonas erosa</i>                       |
| 18. | CCMP 740    | <i>Rhodomonas</i> sp.                | 37. | KMMCC 2070 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
| 19. | CCMP 760    | <i>Rhodomonas</i> sp.                | 38. | KMMCC 2071 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
|     |             |                                      | 39. | KMMCC 2072 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |
|     |             |                                      | 40. | KMMCC 2073 | <i>Rhodomonas</i> sp.                          |

본 연구에서는 기존 배양주를 중심으로 우리나라 은편모조류 기초자료를 확보하고 인근해 춘계대증식 그룹목록을 파악하고자하였다. 이를 위해 GenBank DB로부터 가용한 은편모조류 DNA 자료를 확보하였다. GenBank에서는 nuclear 18S rRNA, plastid *rbcl*, *psbA* 등 다수 유전자 정보를 확보하였으며, 특히 8개 ptDNA genome data를 확보하여 비교분석에 이용하였다. 기존의 GenBank 자료와 배양주로부터 분석한 색소체 유전자 (16S, *psbA*) 정보를 비교하여 각 배양주 별 clade 및 변위부위 정보 확정하였다. *psbA* 자료는 GenBank로부터 받을 수 있는 자료가 제한적이거나 clade 확인이 용이하고 clades간 계통관계 일관성을 가지며 낮은 변이를 보인다 (그림 38).

Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA, CCMP 배양주), KIOST-해양시료도서관 (KMMCC 배양주)으로부터 확보한 은편모조류 40개 배양주 (표 9)의 염기서열 분석도 시행하였다. 새로 분석한 인근해 시료의 16S 자료는 직관적인 비교로 clade 확인이 가능하였으나, clades 간 계통관계 및 clade 내 변이가 낮아 다수의 샘플에 대한 유용성 확인이 어려운 상황이다 (그림 39-40).



그림 38. 은편모조류 색소체 *psbA* DB. GenBank 자료 (검정)와 40개 배양주로부터 분석한 정보 (녹색)를 통합하여 계통수 구축. 이후 각 clade별 정보좌위를 alignment에서 찾아내 표시함

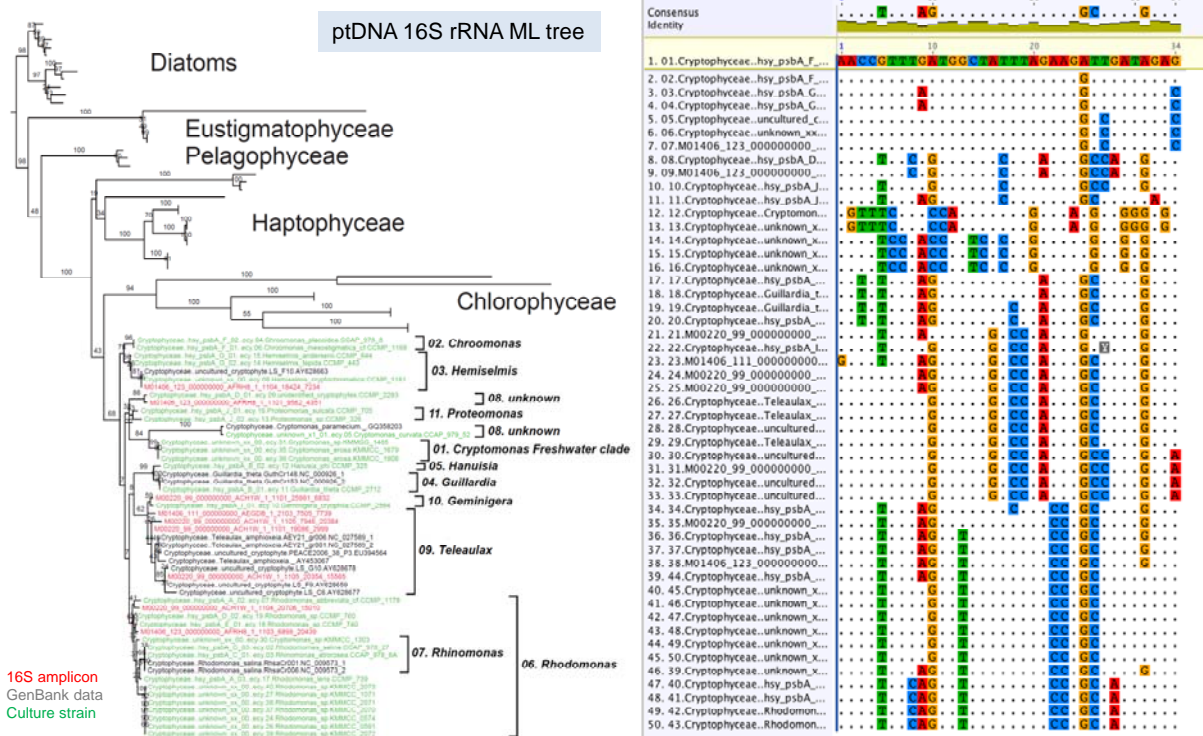


그림 39. 은편모조류 색소체 16S DB. GenBank 자료 (검정), 40개 배양주로부터 분석한 정보 (녹색) 및 연안샘플 NGS-amplicon 자료를 통합하여 계통수 구축. 이후 각 clade별 정보좌위를 alignment에서 찾아내 표시함

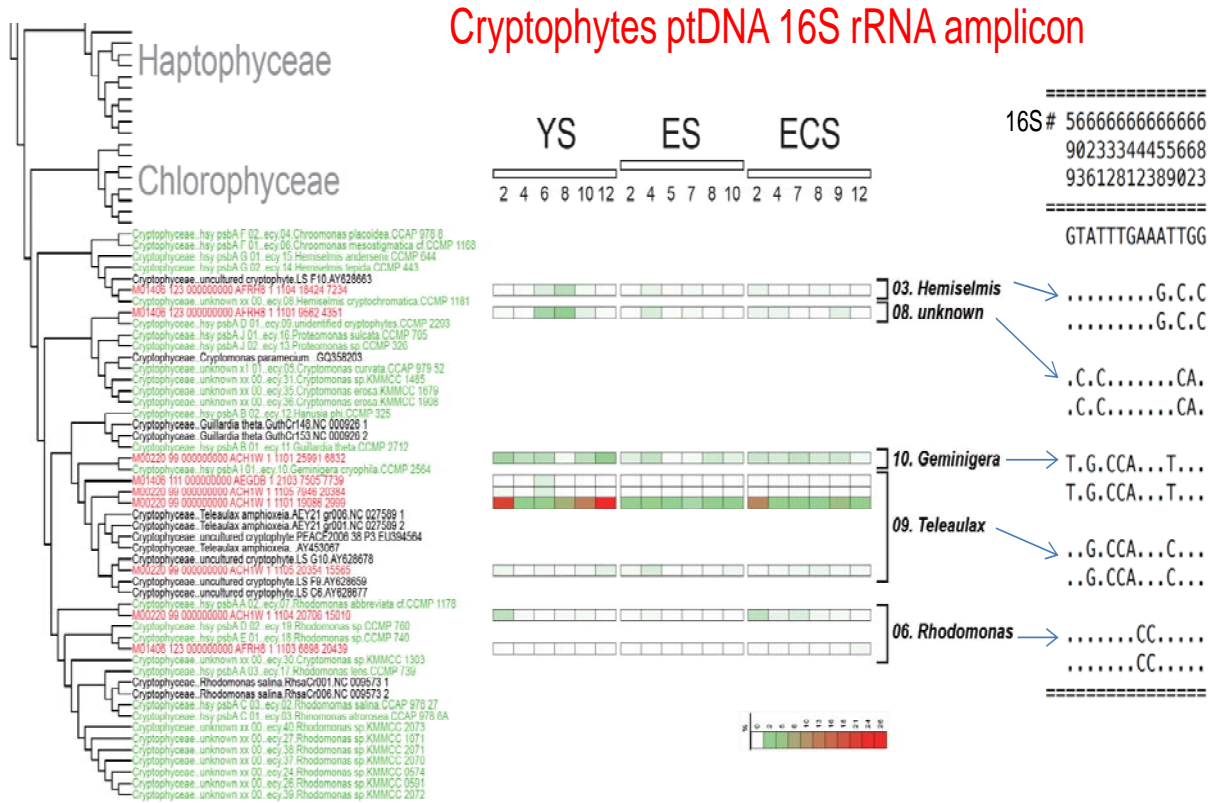


그림 40. 우리나라 연안 및 인근해 분포하는 은편모조류 clades를 plastid 16S 자료를 이용하여 판별함

GenBank Organelles Genome DB에서 가용한 은편모 색소체 유전체 자료 8개는 KY860574 *Chroomonas mesostigmatica*, KY856941 *Chroomonas placoidea* CCAP 978/8, KY856939 *Chroomonas placoidea* CNUKR FBCC300012D, NC\_013703 *Cryptomonas paramecium*, NC\_000926 *Guillardia theta*, NC\_009573 *Rhodomonas salina*, KY856940 *Storeatula* sp. NC\_027589 *Teleaulax amplioxeia*이다. 이 ptDNA로부터 134개 CDS 정보를 확보하였으며, 각 유전자별 염기서열을 비교하여 20 CDS (그림 41)와 핵 18S rRNA 유전자 정보를 확보하였다.

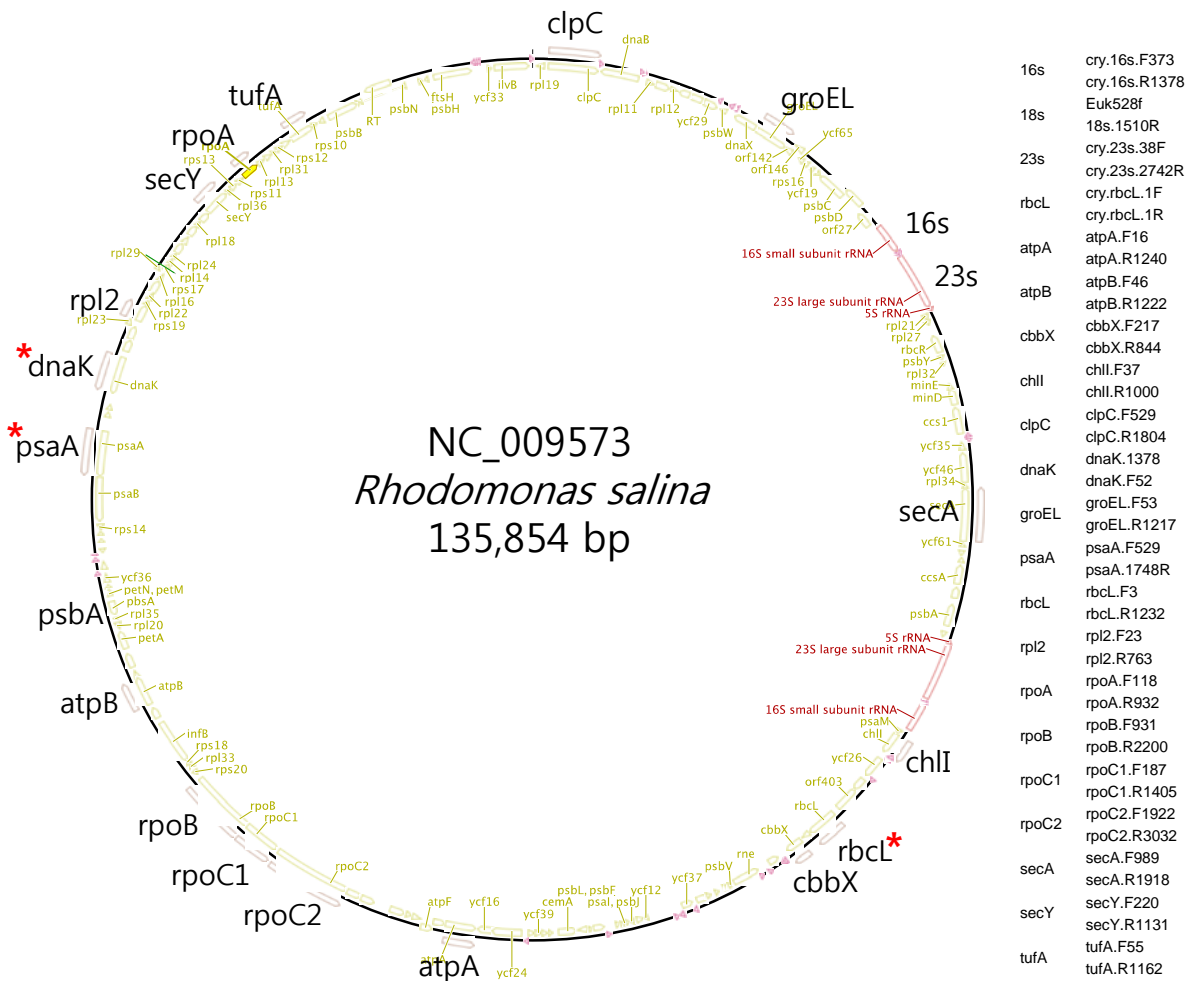


그림 41. 대표적인 은편모조류인 *Rhodomonas salina* 색소체 유전체 지도와 선택한 20개 유전자. 핵 18S rRNA를 포함하면 총 21개 유전자의 분석을 시도함

20개 CDS를 대상으로한 PCR-Sanger Sequencing은 27개 배양주 14개 유전자에서 성공하였다. 각 유전자 염기서열의 박테리아 오염가능성은 BLAST 및 amino acid 서열을 고려한 multiple sequence alignment로 확인 하였다. 각 유전자의 자료분석을 위한 외부군으로 착편모조류 (Haptophytes)의 유전자 염기서열을 추가하였다 (그림 42).

연구결과 확보한 은편모조류 배양주의 14개 유전자 no. taxa, alignment length, base frequency, variability 정보는 표 10에 요약하였다. rRNA 유전자의 alignment는 2차 구조를 고려하여 Indel을 부여하였으며, 그 결과 최대 2,629bp (23S rRNA)의 크기를 보였다. 색소체 유전자 alignment는 최대 1,272bp (*rbcL*)에서 최소 852bp (*chlI*)의 크기를 보였다.

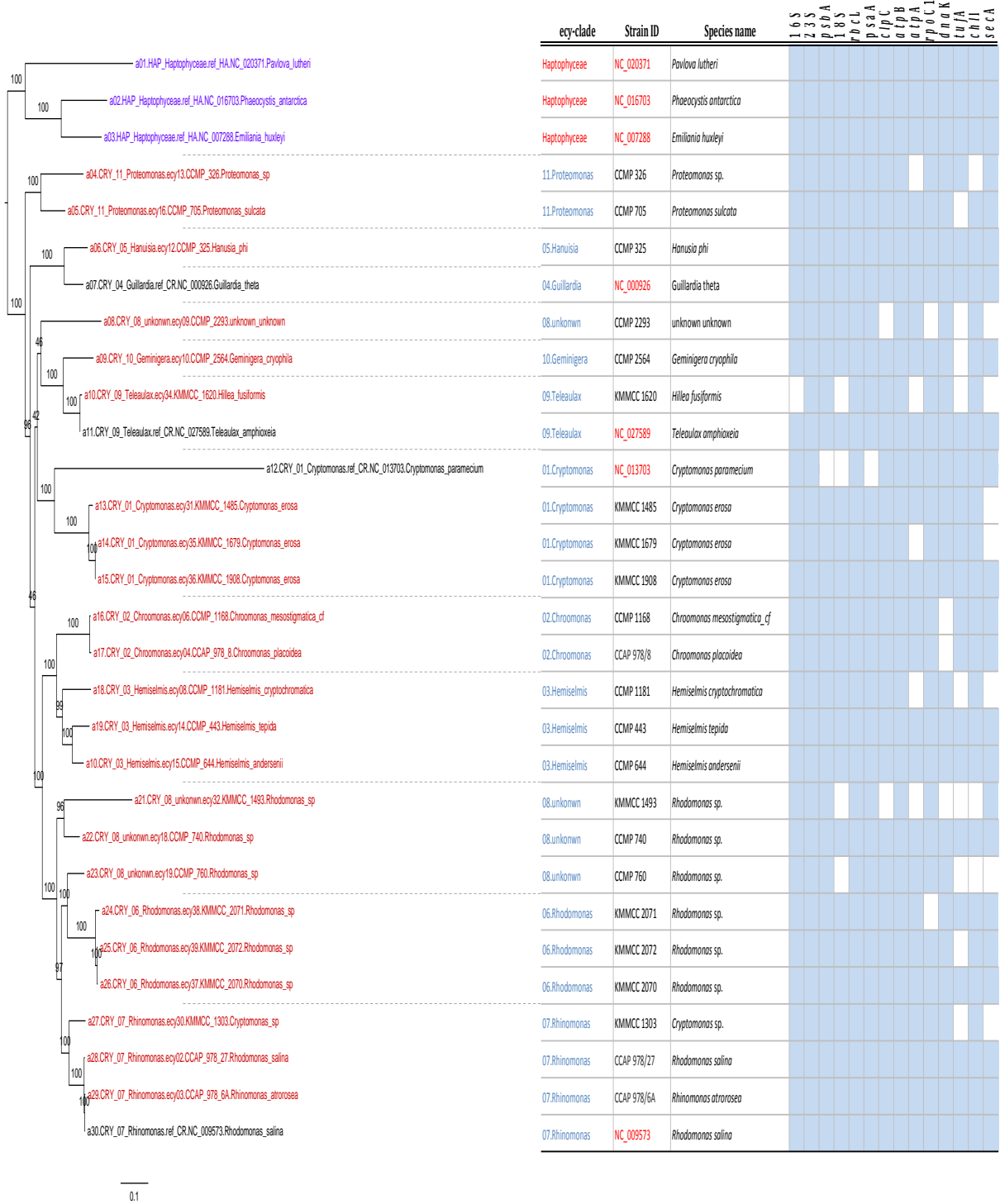


그림 42. Sanger sequencing이 성공한 은편모 배양주의 계통수 및 시퀀스 유무



표 10. 은편모조류 14개 유전자의 염기서열 특성 비교

| gene                               | 16S      | 23S       | psbA     | 18S      | rbcl     | psaA     | clpC     | atpB     | atpA     | rpoC1    | dnaK     | tufA     | chlI     | secA     |
|------------------------------------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Number of Sequences</b>         |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Total no. sequence                 | 29       | 30        | 29       | 26       | 30       | 29       | 28       | 30       | 25       | 28       | 27       | 21       | 27       | 23       |
| No. outgroup                       | 3        | 3         | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        | 3        |
| No. ingroup                        | 26       | 27        | 26       | 23       | 27       | 26       | 25       | 27       | 22       | 25       | 24       | 18       | 24       | 20       |
| <b>Alignment length (bp or aa)</b> |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Total                              | 832      | 2629      | 948      | 896      | 1272     | 1071     | 1113     | 1041     | 1110     | 1119     | 1194     | 1014     | 852      | 888      |
| 1st codon position                 |          |           | 316      |          | 424      | 357      | 371      | 347      | 370      | 373      | 398      | 338      | 284      | 296      |
| 2nd codon position                 |          |           | 316      |          | 424      | 357      | 371      | 347      | 370      | 373      | 398      | 338      | 284      | 296      |
| 3rd codon position                 |          |           | 316      |          | 424      | 357      | 371      | 347      | 370      | 373      | 398      | 338      | 284      | 296      |
| <b>Base frequency (%)</b>          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| A                                  | 0.279    | 0.292     | 0.228    | 0.262    | 0.271    | 0.287    | 0.357    | 0.314    | 0.314    | 0.349    | 0.359    | 0.324    | 0.35     | 0.362    |
| C                                  | 0.21     | 0.202     | 0.227    | 0.199    | 0.188    | 0.19     | 0.156    | 0.177    | 0.173    | 0.158    | 0.153    | 0.174    | 0.15     | 0.166    |
| G                                  | 0.286    | 0.289     | 0.205    | 0.272    | 0.231    | 0.194    | 0.234    | 0.215    | 0.224    | 0.206    | 0.213    | 0.233    | 0.226    | 0.196    |
| T                                  | 0.225    | 0.218     | 0.339    | 0.266    | 0.31     | 0.33     | 0.253    | 0.294    | 0.29     | 0.287    | 0.275    | 0.269    | 0.274    | 0.276    |
| GC content                         | 0.496    | 0.49      | 0.433    | 0.471    | 0.419    | 0.383    | 0.39     | 0.392    | 0.396    | 0.364    | 0.366    | 0.407    | 0.376    | 0.362    |
| <b>Variability</b>                 |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Length (bp)                        | 832      | 2629      | 948      | 896      | 1272     | 1071     | 1113     | 1041     | 1110     | 1119     | 1194     | 1014     | 852      | 888      |
| Constant site, %                   | 518 62.3 | 1802 68.5 | 643 67.8 | 655 73.1 | 702 55.2 | 562 52.5 | 518 46.5 | 467 44.9 | 212 19.1 | 357 31.9 | 543 45.5 | 427 42.1 | 288 33.8 | 160 18.0 |
| Parsimony uninformative, %         | 148 17.8 | 273 10.4  | 48 5.1   | 38 4.2   | 107 8.4  | 64 6.0   | 106 9.5  | 102 9.8  | 397 35.8 | 178 15.9 | 55 4.6   | 72 7.1   | 113 13.3 | 125 14.1 |
| Parsimony informative site, %      | 166 20.0 | 554 21.1  | 257 27.1 | 203 22.7 | 570 36.4 | 509 47.5 | 489 43.9 | 472 45.3 | 501 45.1 | 584 52.2 | 651 54.5 | 515 50.8 | 451 52.9 | 603 67.9 |
| Total variable site, %             | 314 37.7 | 827 31.5  | 305 32.2 | 241 26.9 | 570 44.8 | 509 47.5 | 595 53.5 | 574 55.1 | 898 80.9 | 762 68.1 | 651 54.5 | 587 57.9 | 564 66.2 | 728 82.0 |
| <b>Distance</b>                    |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| slope b [P=+bx2P]                  | 0.797    | 0.861     | 0.862    | 0.875    | 0.819    | 0.781    | 0.745    | 0.693    | 0.263    | 0.619    | 0.755    | 0.648    | 0.612    | 0.433    |
| R square                           | 0.996    | 0.998     | 0.998    | 0.999    | 0.996    | 0.993    | 0.990    | 0.986    | 0.946    | 0.983    | 0.991    | 0.984    | 0.966    | 0.923    |
| <b>1st codon position</b>          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Length                             |          |           | 316      |          | 424      | 357      | 371      | 347      | 370      | 373      | 398      | 338      | 284      | 296      |
| Constant site                      |          |           | 248 78.5 |          | 295 69.6 | 229 64.1 | 215 58.0 | 197 56.8 | 84 22.7  | 121 32.4 | 223 56.0 | 177 52.4 | 111 39.1 | 59 19.9  |
| Parsimony uninformative            |          |           | 9 2.8    |          | 24 5.7   | 32 9.0   | 51 13.7  | 47 13.5  | 169 45.7 | 29 7.3   | 31 9.2   | 54 19.0  | 49 16.6  |          |
| Parsimony inf site                 |          |           | 59 18.7  |          | 105 24.8 | 96 26.9  | 105 28.3 | 103 29.7 | 117 31.6 | 175 46.9 | 146 36.7 | 130 38.5 | 119 41.9 | 188 63.5 |
| Variable site                      |          |           | 68 21.5  |          | 129 30.4 | 128 35.9 | 156 42.0 | 150 43.2 | 286 77.3 | 252 67.6 | 175 44.0 | 161 47.6 | 173 60.9 | 237 80.1 |
| Base Frequency: A                  |          |           | 0.2365   |          | 0.2508   | 0.2779   | 0.2969   | 0.2883   | 0.2971   | 0.2856   | 0.2785   | 0.2947   | 0.3321   |          |
| C                                  |          |           | 0.1709   |          | 0.1757   | 0.2015   | 0.1499   | 0.1665   | 0.1467   | 0.1997   | 0.1432   | 0.1636   | 0.1572   |          |
| G                                  |          |           | 0.3305   |          | 0.3867   | 0.2953   | 0.4254   | 0.3820   | 0.4135   | 0.3213   | 0.4016   | 0.4208   | 0.3995   |          |
| T                                  |          |           | 0.2621   |          | 0.1868   | 0.2254   | 0.1278   | 0.1633   | 0.1566   | 0.1819   | 0.1696   | 0.1371   | 0.1486   |          |
| GC content                         |          |           | 0.5014   |          | 0.5624   | 0.4968   | 0.5752   | 0.5485   | 0.5601   | 0.5210   | 0.5448   | 0.5844   | 0.5567   |          |
| b                                  |          |           | 0.8827   |          | 0.8720   | 0.8274   | 0.8119   | 0.7533   | 1.5170   | 0.6613   | 0.7997   | 0.7481   | 0.6236   |          |
| R-squared                          |          |           | 0.9922   |          | 0.9983   | 0.9979   | 0.9972   | 0.9924   | 0.9594   | 0.9902   | 0.9995   | 0.9961   | 0.9742   |          |
| <b>2nd codon position</b>          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Length                             |          |           | 316      |          | 424      | 357      | 371      | 347      | 370      | 373      | 398      | 338      | 284      | 296      |
| Constant site                      |          |           | 288 91.1 |          | 360 84.9 | 310 86.8 | 296 79.8 | 258 74.4 | 121 32.7 | 218 58.4 | 315 79.1 | 229 67.8 | 171 60.2 | 86 29.1  |
| Parsimony uninformative            |          |           | 4 1.3    |          | 21 5.0   | 22 6.2   | 42 11.3  | 43 12.4  | 211 57.0 | 91 24.4  | 18 4.5   | 34 10.1  | 54 19.0  | 72 24.3  |
| Parsimony inf site                 |          |           | 24 7.6   |          | 43 10.1  | 25 7.0   | 33 8.9   | 46 13.3  | 3 0.8    | 64 17.2  | 65 16.3  | 75 22.2  | 59 20.8  | 138 46.6 |
| Variable site                      |          |           | 28 8.9   |          | 64 15.1  | 47 13.2  | 75 20.2  | 89 25.6  | 214 57.8 | 155 41.6 | 83 20.9  | 109 32.2 | 113 39.8 | 210 70.9 |
| Base Frequency: A                  |          |           | 0.2173   |          | 0.2959   | 0.2572   | 0.3278   | 0.2736   | 0.2622   | 0.3261   | 0.3352   | 0.3135   | 0.3373   |          |
| C                                  |          |           | 0.2378   |          | 0.2097   | 0.2281   | 0.2266   | 0.2597   | 0.2539   | 0.1616   | 0.2305   | 0.2296   | 0.1991   |          |
| G                                  |          |           | 0.2003   |          | 0.1964   | 0.1695   | 0.1578   | 0.1540   | 0.1772   | 0.1688   | 0.1379   | 0.1598   | 0.1645   |          |
| T                                  |          |           | 0.3446   |          | 0.2980   | 0.3452   | 0.2878   | 0.3128   | 0.3068   | 0.3435   | 0.2965   | 0.2971   | 0.2991   |          |
| GC content                         |          |           | 0.4381   |          | 0.4061   | 0.3976   | 0.3844   | 0.4136   | 0.4310   | 0.3304   | 0.3684   | 0.3893   | 0.3636   |          |
| b                                  |          |           | 0.9524   |          | 0.9410   | 0.9532   | 0.9312   | 0.8810   | 0.3311   | 0.8489   | 0.9143   | 0.8512   | 0.8018   |          |
| R-squared                          |          |           | 0.9999   |          | 0.9997   | 0.9999   | 0.9997   | 0.9986   | 0.9934   | 0.9975   | 0.9993   | 0.9990   | 0.9944   |          |
| <b>3rd codon position</b>          |          |           |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Length                             |          |           | 316      |          | 424      | 357      | 371      | 347      | 370      | 373      | 398      | 338      | 284      | 296      |
| Constant site                      |          |           | 107 33.9 |          | 47 11.1  | 23 6.4   | 7 1.9    | 12 3.5   | 7 1.9    | 18 4.8   | 5 1.3    | 21 6.2   | 6 2.1    | 15 5.1   |
| Parsimony uninformative            |          |           | 35 11.1  |          | 62 14.6  | 10 2.8   | 13 3.5   | 12 3.5   | 17 4.6   | 10 2.7   | 8 2.0    | 7 2.1    | 5 1.8    | 4 1.4    |
| Parsimony inf site                 |          |           | 174 55.1 |          | 315 74.3 | 324 90.8 | 351 94.6 | 323 93.1 | 346 93.5 | 345 92.5 | 385 96.7 | 310 91.7 | 273 96.1 | 277 93.6 |
| Variable site                      |          |           | 209 66.1 |          | 377 88.9 | 334 93.6 | 364 98.1 | 335 96.5 | 363 98.1 | 355 95.2 | 393 98.7 | 317 93.8 | 278 97.9 | 281 94.9 |
| Base Frequency: A                  |          |           | 0.2316   |          | 0.2653   | 0.3263   | 0.4461   | 0.3809   | 0.3955   | 0.4240   | 0.4577   | 0.3805   | 0.4167   |          |
| C                                  |          |           | 0.2731   |          | 0.1771   | 0.1391   | 0.0923   | 0.1047   | 0.1173   | 0.1137   | 0.0851   | 0.1280   | 0.0950   |          |
| G                                  |          |           | 0.0853   |          | 0.1113   | 0.1165   | 0.1187   | 0.1081   | 0.0804   | 0.1274   | 0.0992   | 0.1189   | 0.1142   |          |
| T                                  |          |           | 0.4101   |          | 0.4463   | 0.4181   | 0.3429   | 0.4063   | 0.4069   | 0.3349   | 0.3580   | 0.3726   | 0.3742   |          |
| GC content                         |          |           | 0.3584   |          | 0.2884   | 0.2556   | 0.2110   | 0.2128   | 0.1976   | 0.2411   | 0.1843   | 0.2469   | 0.2092   |          |
| b                                  |          |           | 0.7407   |          | 0.5559   | 0.5005   | 0.4355   | 0.3632   | 0.0835   | 0.3262   | 0.4455   | 0.0855   | 0.2905   |          |
| R-squared                          |          |           | 0.9918   |          | 0.9521   | 0.9343   | 0.8855   | 0.8684   | 0.4849   | 0.8347   | 0.9008   | 0.4408   | 0.7233   |          |

은편모조류 11개 ptDNA CDS (*atpA*, *atpB*, *chlI*, *clpC*, *dnaK*, *psaA*, *psbA*, *rbcL*, *rpoC1*, *secA* 및 *tufA*)는 rRNA (18S, 16S, 23S) 보다 낮은 GC-content를 보였다 (최대: *rbcL* 0.419, 최소: *secA* 0.362). Alignment 중 분류군간 변이가 없는 보존부위 비율은 rRNA가 대체적으로 높았으며 CDS는 대체적으로 낮았다. 예를 들어 *secA*는 18% (160/888 bp)만이 보존부위비율로 최소값이며, 18S rRNA는 73.1% (655/896 bp)로 가장 높은 보존부위비율을 보였다. 변이부위는 CDS (최소 *psbA* 32.2%, 최대 *dnaK* 54.5%)가 rRNA 보다 대체적으로 높았다. rRNA 변이부위는 16S 37.7%, 23S 31.5%, 18S 26.9%이며, CDS에서는 최소 32.2% (*psbA*)에서 최대 82% (*secA*) 범위를 보였다 (표 10).

각 분류군간 pair-wise *P*-distance의 분포 비교를 통해 은편모조류 clade간 적정 수준의 변이를 가지는 유전자를 선택하고자 하였다. Haptophytes를 제외한 은편모조류만의 *P*-distance (proportional distance) 평균값을 기준으로, 최소변이 유전자는 16S rRNA (평균 3.61%)이며, 최대변이 유전자는 *secA* (평균 30.03%)이다 (그림 43).

Un-corrected distance (*P*-distance; Y)와 K2P model을 적용한 corrected distance (X)간 상관관계를 비교한 saturation tests 결과 (표 10), slop b value는 16S 0.797 ( $R^2 = 0.996$ ), 23S 0.861 ( $R^2 = 0.998$ ), *psbA* 0.862 ( $R^2 = 0.999$ ), 18S 0.875 ( $R^2 = 0.999$ ), *rbcL* 0.819 ( $R^2 = 0.996$ ), *psaA* 0.781 ( $R^2 = 0.993$ ), *clpC* 0.745 ( $R^2 = 0.990$ ), *atpB* 0.693 ( $R^2 = 0.986$ ), *dnaK* 0.755 ( $R^2 = 0.991$ ), *chlI* 0.612 ( $R^2 = 0.966$ ), 및 *tufA* 0.648 ( $R^2 = 0.984$ )이다. Saturation sign을 보인 유전자는 *atpA* ( $b = 263$ ,  $R^2 = 0.946$ ) 및 *secA* ( $b = 0.433$ ,  $R^2 = 0.923$ )이다.

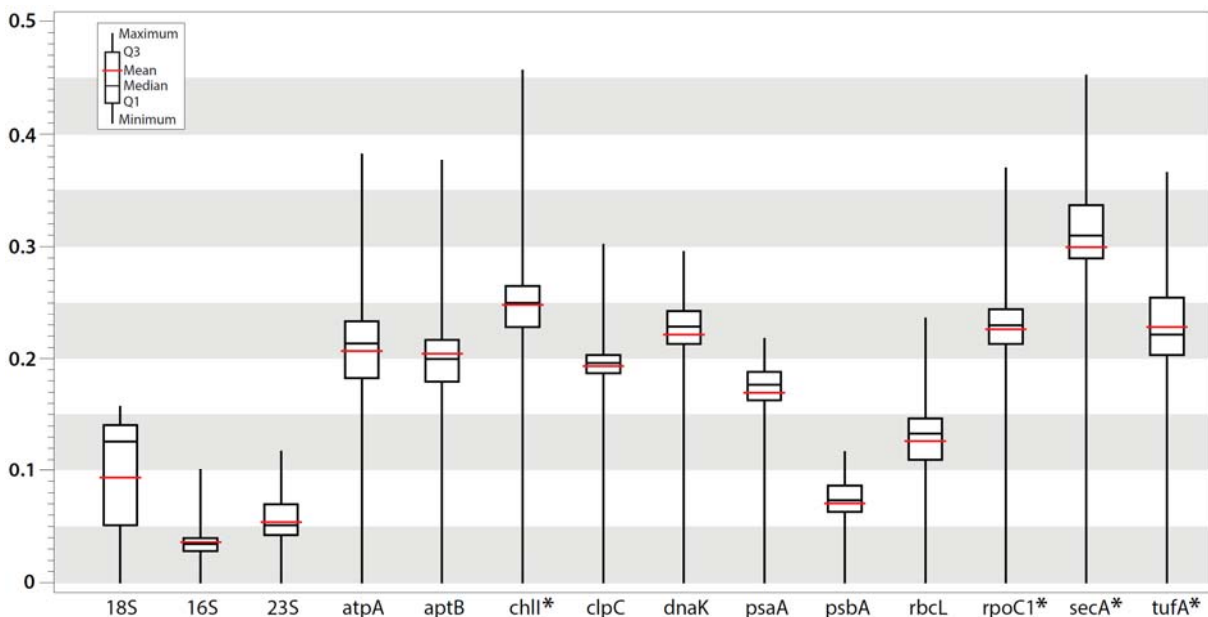


그림 43. 은편모조류 14개 유전자의 *P*-distance 분포

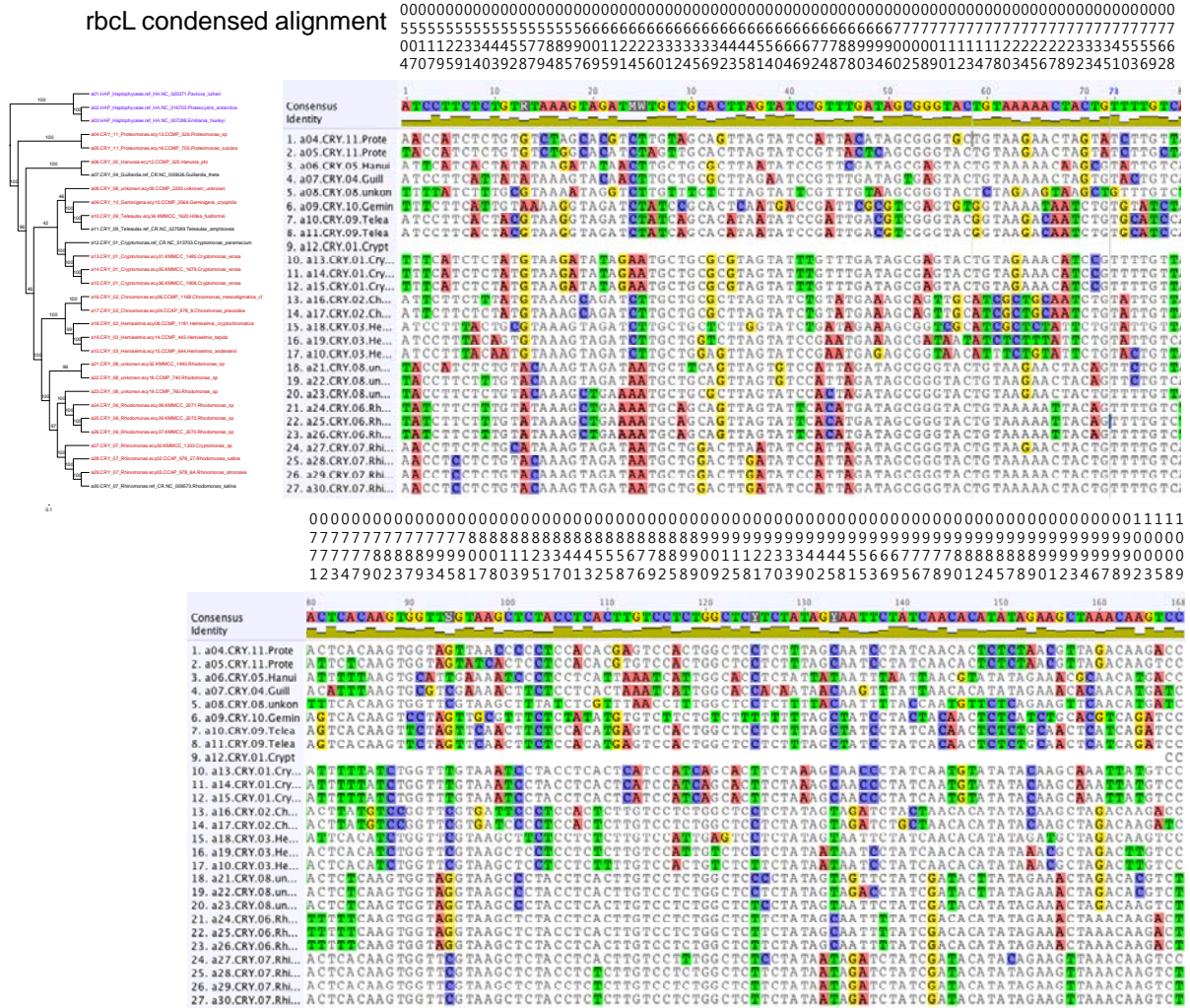


그림 44. 은편모조류 11개 clades의 *rbcL* alignment의 변이좌위만 나타낸 condensed alignment. 총 570개 변위좌위 중 NGS-amplicon 분석에 최적인 부위 (#504-#1009)만을 수집함

은편모조류에서 alignment indel (gap), saturation test를 고려했을 때 적절한 변이율을 가지는 유전자 3개를 선정한 결과는 *rbcL* (*P*-distance 평균 12.73%), *psaA* (평균 16.98%), *dnaK* (평균 22.13%) 이다. 은편모조류 *rbcL* 유전자의 변이좌위만을 나타낸 condensed alignment 비교를 통하여 은편모 11개 clades 전체의 동정에 적절한 amplicon 부위를 선정 (그림 44) 하였으며, 우리나라 인근해 시료의 시험분석에 이용하였다.

은편모조류 특이 *rbcL*-amplicon 자료를 이용한 우리나라 주변해 은편모조류 계통수 구축결과 동해, 서해 및 남해에서 7개 clades (CRY03 *Hemiselmus* clade, CRY06 *Rhodomonas* clade, CRY07 *Rhinomonas* clade, CRY08 Unknown clade, CRY09 *Teleaulax* clade, CRY11 *Proteomonas* clade, Unknown clade 2)가 확인되었다 (그림 45). 은편모조류

*rbcL* 계통수는 clades가 유연관계를 보여주었다. 은편모조류 전체 clades는 공통조상을 가지는 단계통성이다. 근연관계에 있는 clades는 CRY06-CRY07, CRY02-CRY03, CRY09- Unknown2-CRY11 등 이다. CRY09 clade는 CRY09a와 CRY09b로 구분되며, CRY09b clade는 CRY10 clade와 근연관계를 보였다.

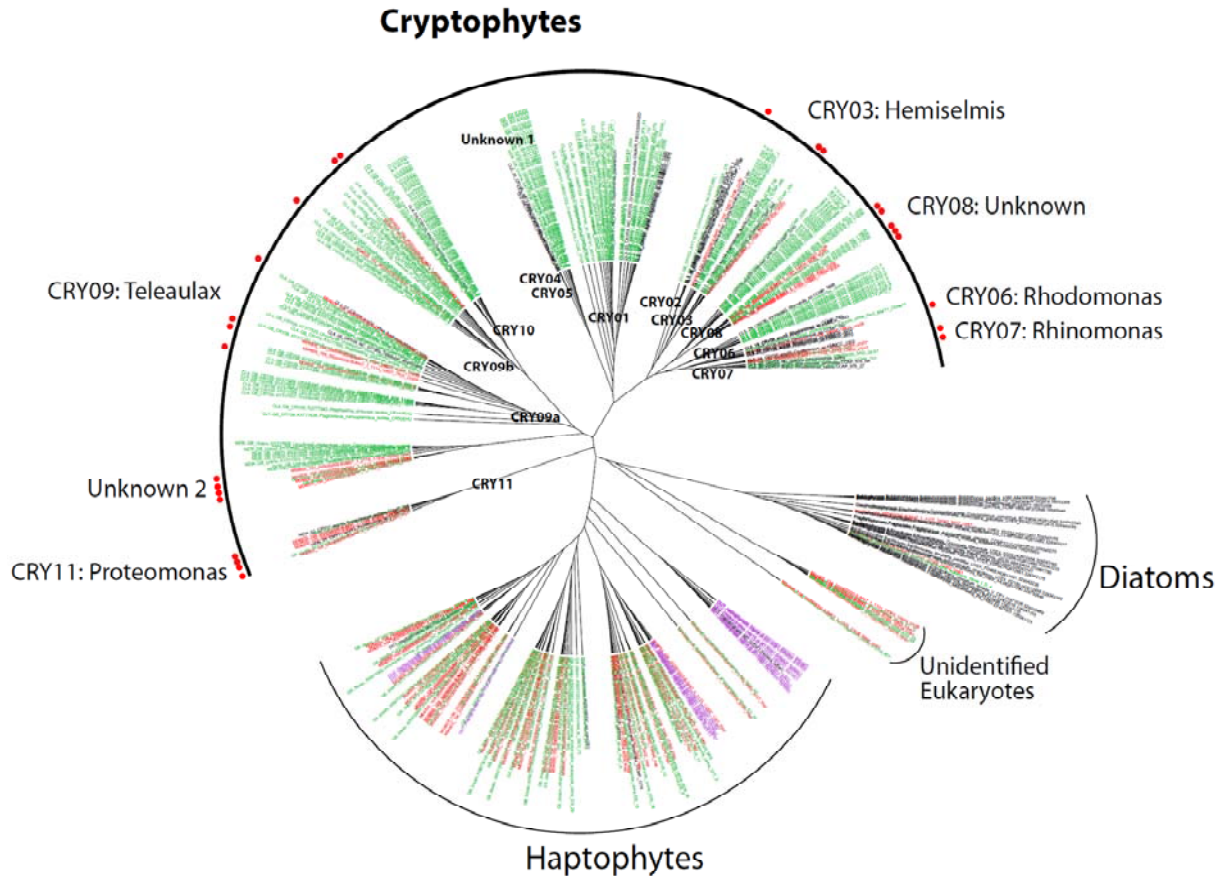


그림 45. *rbcL*-amplicon에 기반한 우리나라 동해, 서해 및 남해에 출현하는 은편모조류 7개 clades

동해, 서해, 남해 해역별 출현하는 은편모조류 clade를 확인한 결과 (그림 46), Cry09 clade가 모든 시기 및 해역에서 우점하였다. 이를 근거로 우리나라 인근해 춘계대증식 후보 은편모조류를 추정하였다.



그림 46. 우리나라 동해, 서해 및 남해 시기별 출현하는 은편모조류 7개 clades

#### □ 우리나라 인근해 은편모조류 clades 목록 춘계 대중식 후보 그룹

- CRY03 Hemiselmsis clade: *Hemiselmsis andersenii*
- CRY06 Rhodomonas clade: *Rhodomonas* sp.
- CRY07 Rhinomonas clade: *Rhinomonas abbreviata*
- CRY08 Unknown clade
- CRY09 Teleaulax clade: *Teleaulax amphioxeia*, *Hellea fusiformis*
- CRY11 Proteomonas clade: *Proteomonas* sp.
- Unknown clade 2

### 2.3 착편모조류 (Haptophyta) 분자마커 탐색 및 인근해 다양성 분석

착편모조류는 대양생태계 주요 일차생산자 중 하나인 진핵생물군으로, 최근 Choi et al. (2016)은 북서태평양 열대-한대 해역의 미소조류 연구를 통해 착편모조류가 우점함을 확인하였다 (그림 47). 이 결과에서, 빈영양성 대양 표층수 일차생산자 90%가 착편모류 Prymnesiophyceae 이며, Phaeocystaceae 일부 clade의 경우 최대 47% 차지하며, 동중국해 연안수 영향을 받는 해역과 쿠로시오 영향 해역 간 식물플랑크톤 군집 차이가 존재함을 밝혔다. 그러나 pt 16S rRNA amplicon 자료를 이용한 착편모조류 다양성 파악은 제한적이었다. Public DB에 가용한 착편모조류 자료는 *Braarudosphaera*,

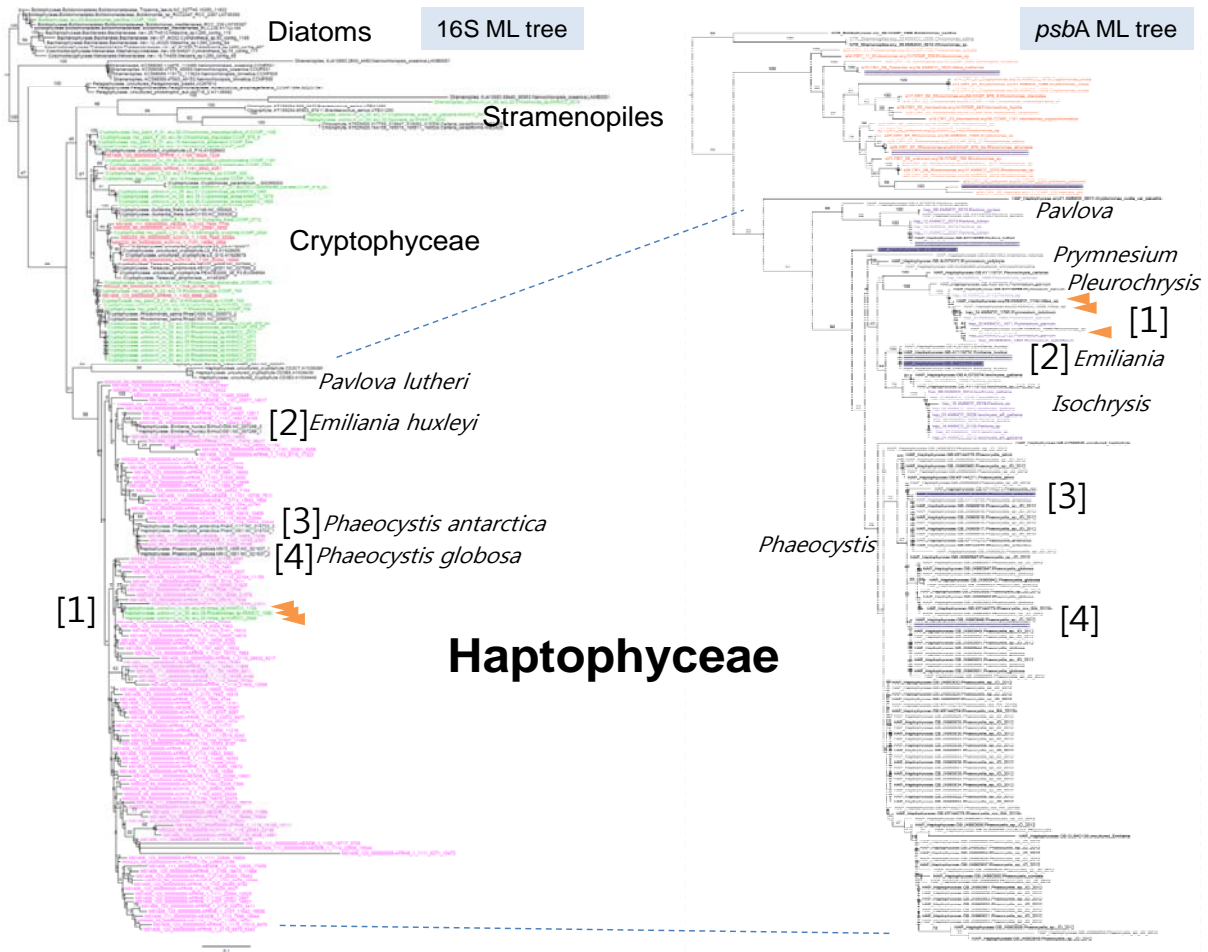


그림 47. 착편모조류 16S rRNA 및 psbA 계통수

*Chrysochromulina*, *Emiliana*, *Isochrysis*, *Phaseocystis*, *Syracocysphaera*속 대표종 수준으로 야외 시료 분석 자료가 거의 없어 다양성 및 계통 파악 불가하며, CCAP, CCMP 등 국제 공인 배양기관의 가용 착편모 배양주가 매우 제한적이기 때문이다. 또한 일부 발표된 자료에서도 북서태평양 착편모조류 amplicon 중 다수는 unidentified OTU 이다.

본 연구는 KIOST-해양시료도서관이 보유한 착편모조류 24개 배양주 (표 11)를 이용하여 우리나라 및 근연해 착편모조류 다양성 및 생태계 모니터링을 위한 기초자료 확보를 위해 수행하였다. GenBank Organelles Genome DB로부터 착편모조류 7종의 세포소기관 유전체 정보를 확보하였다. 미토콘드리아 유전체 (mtDNA, 4건)는 JN022704 *Emiliana huxleyi* (ref\_02), NC\_005332 *Emiliana huxleyi* (ref\_03), KJ201908 *Chrysochromulina* sp (ref\_04). CCMP 291, AB930144 *Chrysochromulina* sp. NIES 1333 (ref\_05)이며, 색소체 유전체 (ptDNA, 5건)는 NC\_020371 *Pavlova lutheri* (ref\_01), NC\_007288 *Emiliana huxleyi* (ref\_02), KJ201907 *Chrysochromulina* sp. CCMP 291 (ref\_04), NC\_016703 *Phaeocystis antarctica* (ref\_06), NC\_021637 *Phaeocystis globosa*



YP\_277314), *rpl2* (50S ribosomal protein L2; YP\_277404), *rpl3* (50S ribosomal protein L3; YP\_277417), *rpoA* (RNA polymerase alpha subunit; YP\_277420), *rpoB* (RNA polymerase beta subunit; YP\_277360), *rpoC1* (RNA polymerase beta' subunit; YP\_277361), *rpoC2* (RNA polymerase beta" subunit; YP\_277362), *rps2* (30S ribosomal protein S2; YP\_277364), *rps3* (30S ribosomal protein S3; YP\_277408), *secY* (preprotein translocase subunit SecY; YP\_277416), 및 *tufA* (elongation factor Tu; YP\_277425)를 선정하였다 (표 11). ref\_02 *Emiliana huxleyi* 31 CDS AA를 BLASTx query에 이용하였다.

착편모조류 KMMCC 배양주 24개의 total DNA를 추출하였으며, 이 중 20개 샘플의 assembly 결과 중 BLAST를 통해 mt CDS 5개와 pt CDS 26개의 염기서열 확보하였다 (표 11). 각 유전자의 multiple sequence alignment 수행 후 identical site, pairwise % identity 및 GC content를 표 12에 요약하였다. 각 유전자 alignment 크기는 최소 447 bp (*psaD*) - 최대 3,973 bp (*rpoC2*)이며, identical site는 최소 20.2% (*rpoC2*) - 최대 78.6% (*psbA*), GC content는 최소 30.6% (*ccs1*) - 최대 44.8% (*psbA*) 이다 (그림 48).

표 12. 착편모조류 분자마커 탐색에 사용한 mt 및 pt CDS 정보

| #    | Gene         | No. Taxa | Alignment Length | Identical site |      | Pairwise % identity | GC Content |
|------|--------------|----------|------------------|----------------|------|---------------------|------------|
|      |              |          |                  | bp             | %    |                     |            |
| mt01 | <i>cob</i>   | 22       | 1,148            | 482            | 42.1 | 73.4                | 34.4       |
| mt02 | <i>cox2</i>  | 23       | 780              | 299            | 38.3 | 71.0                | 34.8       |
| mt03 | <i>cox3</i>  | 23       | 891              | 304            | 37.4 | 71.3                | 36.2       |
| mt04 | <i>nad1</i>  | 23       | 1,035            | 362            | 35.0 | 67.6                | 33.8       |
| mt05 | <i>nad5</i>  | 23       | 2,061            | 617            | 30.0 | 65.3                | 33.1       |
| pt01 | <i>atpA</i>  | 24       | 1,056            | 763            | 50.7 | 77.6                | 40.5       |
| pt02 | <i>cbbX</i>  | 23       | 876              | 426            | 48.8 | 75.7                | 37.3       |
| pt03 | <i>ccs1</i>  | 24       | 1,356            | 229            | 22.4 | 60.9                | 30.6       |
| pt04 | <i>ccsA</i>  | 24       | 990              | 319            | 32.5 | 66.2                | 34.2       |
| pt05 | <i>clpC</i>  | 24       | 2,550            | 1,165          | 46.5 | 75.9                | 38.3       |
| pt06 | <i>minD</i>  | 24       | 840              | 241            | 28.7 | 65.9                | 35.5       |
| pt07 | <i>petB</i>  | 24       | 648              | 376            | 58.0 | 79.9                | 38.9       |
| pt08 | <i>petD</i>  | 24       | 483              | 270            | 55.9 | 79.5                | 37.7       |
| pt09 | <i>psaA</i>  | 24       | 2,259            | 1,292          | 57.2 | 80.9                | 40.1       |
| pt10 | <i>psaB</i>  | 24       | 2,205            | 1,248          | 56.6 | 80.7                | 40.6       |
| pt11 | <i>psaD</i>  | 24       | 447              | 185            | 43.1 | 76.4                | 36.3       |
| pt12 | <i>psbA</i>  | 24       | 1,083            | 851            | 78.6 | 92.3                | 44.8       |
| pt13 | <i>psbB</i>  | 24       | 1,530            | 939            | 61.4 | 83.4                | 42.6       |
| pt14 | <i>psbV</i>  | 24       | 495              | 221            | 44.6 | 73.6                | 37.7       |
| pt15 | <i>rbcl</i>  | 24       | 1,467            | 952            | 64.9 | 86.3                | 43.3       |
| pt16 | <i>rbcS</i>  | 24       | 420              | 216            | 51.4 | 79.7                | 41.7       |
| pt17 | <i>rpl2</i>  | 24       | 849              | 304            | 35.8 | 69.8                | 40.4       |
| pt18 | <i>rpl3</i>  | 24       | 630              | 174            | 27.9 | 66.2                | 35.7       |
| pt19 | <i>rpoA</i>  | 24       | 999              | 227            | 23.5 | 61.8                | 33.5       |
| pt20 | <i>rpoB</i>  | 24       | 3,369            | 1,172          | 34.8 | 69.3                | 36.4       |
| pt21 | <i>rpoC1</i> | 24       | 1,863            | 734            | 39.5 | 70.6                | 36.5       |
| pt22 | <i>rpoC2</i> | 24       | 3,973            | 800            | 20.2 | 58.0                | 33.9       |
| pt23 | <i>rps2</i>  | 24       | 702              | 245            | 35.5 | 69.3                | 37.4       |
| pt24 | <i>rps3</i>  | 24       | 684              | 202            | 30.7 | 66.2                | 36.2       |
| pt25 | <i>secY</i>  | 24       | 1,296            | 262            | 20.3 | 58.7                | 32.1       |
| pt26 | <i>tufA</i>  | 24       | 1,233            | 648            | 52.6 | 78.3                | 40.5       |



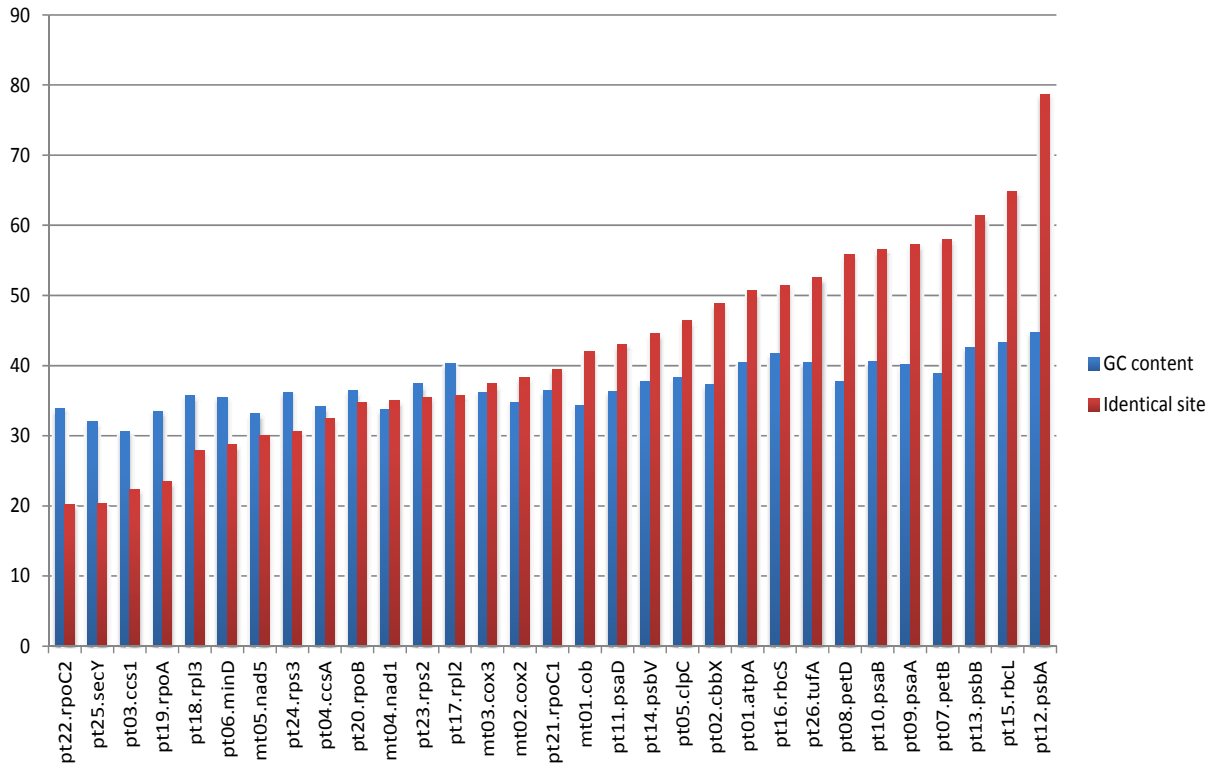


그림 48. 착편모조류 mt 및 pt 31개 CDS의 GC content (%) 및 multiple sequence alignment 중 identical site (%) 비교

전체 31개 유전자간 비교에서 GC content (%)와 identical site (%)가 유의한 차이를 보인다 (그림 48). 둘 간의 상관관계분석에서 양의 상관계수 ( $b = 3.65$ )를 보였다 ( $R^2 = 0.7765$ ) (그림 49). psbA는 31개 유전자 중 가장 변이가 적은 (pairwise % identity = 92.3, 표 12)이다. 따라서 *rbcL* 유전자를 착편모조류 분자마커로 선택하여 시험분석 수행하였다. *rbcL* amplicon 자료와 통합하여 계통수를 구축하였으며 각 clade 구분하였다 (그림 50). 계통분석 결과, 우리나라 인근해 착편모조류는 6개의 알려진 clades와 최소 9개 unidentified clades로 구성됨을 발견하였다.

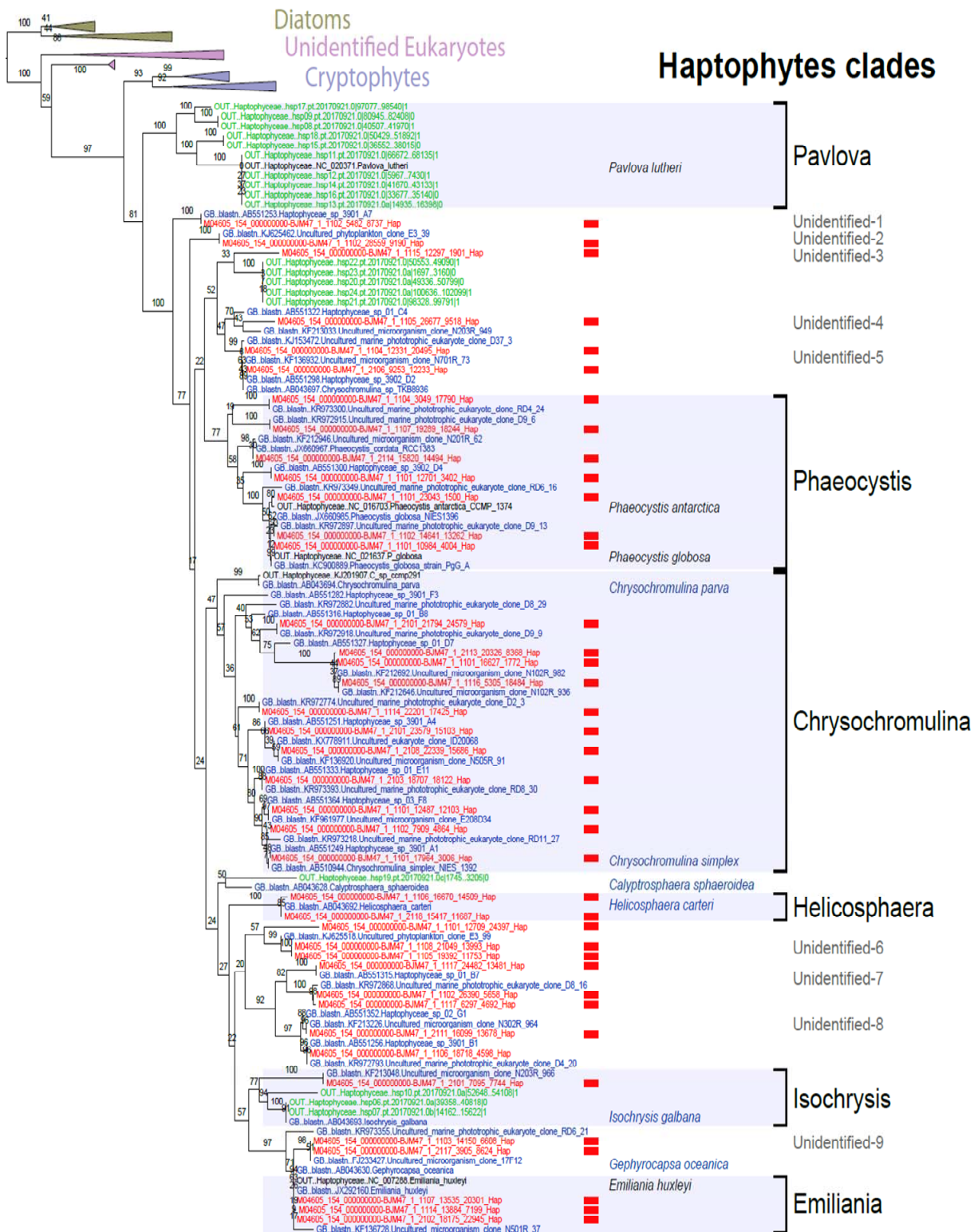


그림 50. Reference *rbcL* 및 amplicon *rbcL* 자료를 통합 분석한 우리나라 인근해  
 착편모조류 Maximum likelihood 계통수.

ML bootstrap value (n=1000)는 각 node에 표시함

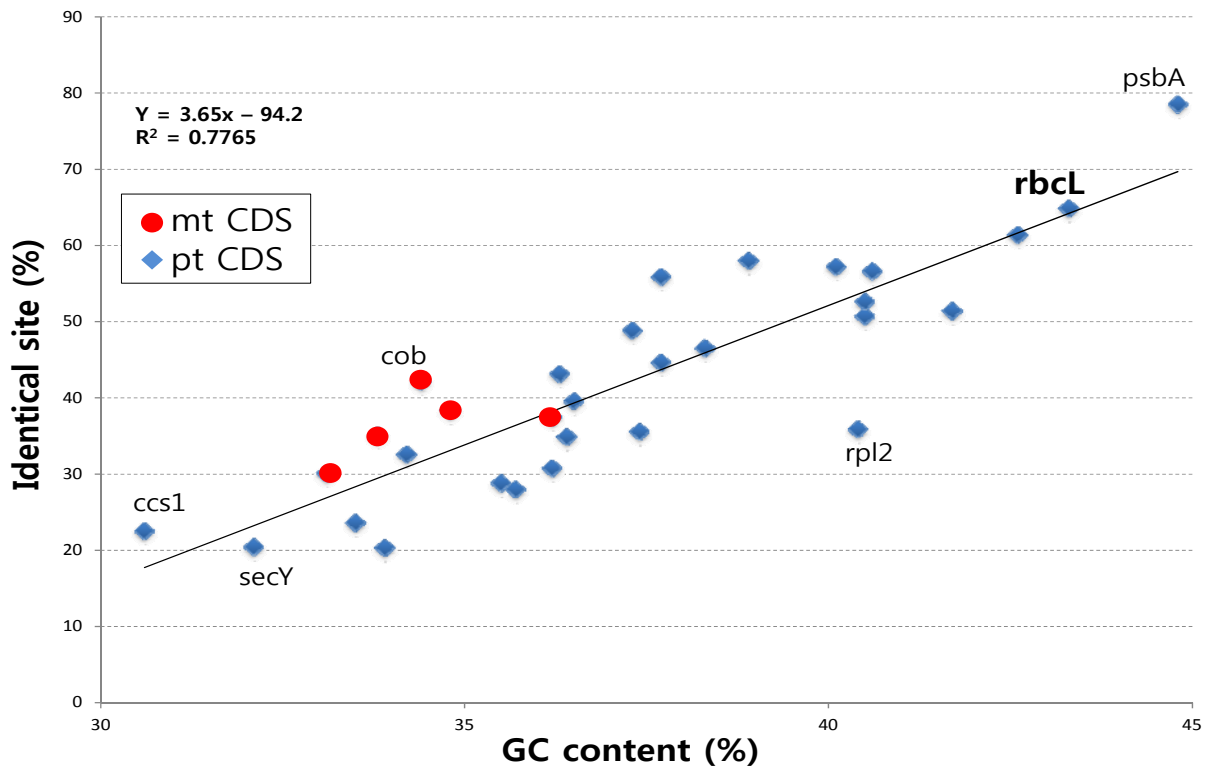
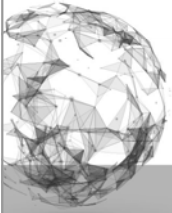


그림 49. 착편모조류 31 CDS Identical site와 GC content 간의 상관관계

□ 우리나라 인근해 착편모조류 6개의 clades 및 9개 unidentified clades

- Chrysochromulina clade: *Chrysochromulina parva*, *Chrysochromulina simplex*
- Emiliania clade: *Emiliania huxleyi*
- Helicosphaera clade: *Helicosphaera carteri*
- Isochrysis clade: *Isochrysis galbana*
- Pavlova clade: *Pavlova lutheri*
- Phaeocystis clade: *Phaeocystis antarctica*, *Phaeocystis globosa*
- Unidentified-1 clade
- Unidentified-2 clade
- Unidentified-3 clade
- Unidentified-4 clade
- Unidentified-5 clade
- Unidentified-6 clade
- Unidentified-7 clade
- Unidentified-8 clade
- Unidentified-9 clade





## 제4장

# 연구결과 대외기여 및 활용계획



## 제4장 연구결과 대외기여 및 활용계획

### 1절 연구결과 대외기여

- 해양 환경의 변화에 따른 해양 생태계의 변동을 예측하고 대응 체계를 수립하기 위해서는 다양성에 기반한 기초 자료의 확보가 반드시 선행될 필요가 있음
- 해양 일차생산자 다양성 연구는 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 초기 단계에 있으며, 다양한 기능 그룹에 대한 연구도 또한 초기 수준임
- 따라서 본연구팀의 선행 연구 결과와 경험을 활용한 지속적인 연구를 통해 선진 해양생태 연구 그룹과 경쟁이 가능할 것임
- 본 연구는 microscopy, flow cytometry, FlowCAM, HPLC, NGS 등 여러 분석 기법을 활용하여 한반도 주변해의 서식지별 미세조류 다양성 분석과 출현 종 목록 작성을 주요 목표로 설정함
- 특히 해양 환경변화의 계절성과 해류의 영향에 따른 다양성의 변화를 기초로 아열대화 지표종의 선정과 분포과정을 파악하고자 하며, 해양 물질순환에 기여하는 미세조류의 역할을 파악하기 위해서 PFTs 다양성 분석 기술 개발을 수행함
- 이러한 주제의 연구를 통해 얻어진 자료는 해양생태계의 현황을 파악하는데 활용되며, 미래에 나타날 해양생태계 변화를 이해하고 대응할 수 있는 기반을 제공할 것으로 사료됨

#### 1.1. 1차년도 성과 및 파급효과

- 우리나라 주변해 일차생산자 다양성을 이해하고 생태적 구조 및 변동성 파악을 위한 연구를 수행함
- 북서태평양 초미소 광합성 진핵생물의 다양성과 지역적 군집구조를 이해하는데 NGS 기술을 도입함
- 시·공간적으로 광범위한 해상력의 미세생물 다양성 연구를 위해서는 기존의 분자생물학적 기법에 부가적으로 대량 시료 분석이 가능한 최신 NGS 기법과의 융합이 필요함

- 특히 초미소 (세포크기 3 um 이하) 식물플랑크톤과 같은 현미경으로도 동정이 어려운 그룹은 분자생태학적 분석기법의 적용이 필요함
- 다양한 서식처에서 계절적인 시료를 획득하기 위해서는 많은 시간과 재원이 요구되며, 시료의 확보 방법에 대한 충분한 검토가 필요함

## 1.2. 2차년도 성과 및 파급효과

- 해양 환경의 변화에 따른 해양 생태계의 변동을 예측하고 대응 체계를 수립하기 위해서는 다양성에 기반한 기초 자료의 확보가 반드시 선행될 필요가 있음에도 불구하고, 우리나라 주변해의 미세조류 다양성 연구는 거의 없는 실정임
- 특히, 우리나라 연안에 잘 발달된 갯벌에 우점하는 일차생산자 (규조류, Diatoms)의 다양성 연구와 같은 특정 그룹의 연구를 위해서는 연구대상 특이적인 분자마커의 개발이 반드시 병행되어야 함
- 최근 식물플랑크톤 다양성 연구에는 최신 NGS 기술이 적용하고 있으며 이를 통해 저비용 고효율 분석이 확대될 것으로 기대됨
- 다양한 저서 규조류의 미토콘드리아 유전체 분석을 완료하거나 분석 중에 있으며, 이들 자료를 이용하여 규조류의 다양성 분석을 위한 분자마커 개발을 위한 기반을 구축함
- 이러한 연구 방식은 다른 주요 기능 그룹의 분자마커 개발에 적용될 수 있을 것으로 기대됨

## 1.3. 3차년도 성과 및 파급효과

- 우리나라 주변해 해양 일차생산자 다양성 DB 구축
- 우리나라 주변해 주요 일차생산자의 대표적인 배양주를 이용하여 다유전자 비교분석을 수행하여 각 그룹별 생태구조 연구를 위한 분자마커 후보를 제안함
- Cryptophytes 및 Haptophytes의 새로운 분자마커 유용성 검증을 위해 야외시료 분석을 시도함
- 해양 환경의 변화에 따른 해양 생태계의 변동을 예측하고 대응 체계를 수립하기 위해서는 생물다양성 기반의 기초 자료 확보가 반드시 선행되어야 함

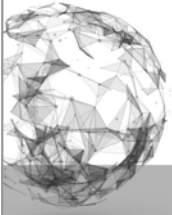


## 2절 활용계획

- 주요 기능 미세조류 그룹의 다양성 분석 기법을 개발함으로써, 관련 분야의 다양성 연구의 질적 발전과 연구 활성화에 기여함
- 담보 상태였던 우리나라 주변해의 미세생물 다양성 정보에 대한 체계적인 자료의 확보가 가능
- 해양 산성화 등 변화하는 해양 환경에서 미세생물 군집의 기능적 변동을 평가하고 예측하기 위한 기반 자료를 제공함으로써, 해양 생태계의 보존과 지속가능한 개발을 위한 과학적 근거를 제시함
- 지구 온난화에 의한 우리나라 주변해 아열대화 여부의 논쟁에 대한 체계적이고 과학적인 판단을 위한 근거 자료를 제공
- 주요 미세조류 그룹의 생물지리적 분포, 환경적 요인과의 연관성 및 계절적 천이 특성을 파악함으로써 주변해의 기초생태계 이해 증진
- 우리나라 주변해의 일차생산자의 다양성 정보는 시·공간적으로 우점하는 그룹에 대한 사전 지식을 제공함으로써, 추후 배양을 통한 환경 반응 분석 및 평가를 위한 사전 정보로 활용될 수 있음
- 다양한 주변해의 다양성 정보는 기초생태계의 변동을 모니터링하기 위한 기반 자료로 활용될 수 있음
- 주요 그룹의 생리적, 유전적 특성의 연구와 본 연구 결과를 결합하여 활용함으로써, 생태계 모델의 정확도 향상에 기여할 수 있을 것임
- 중요한 기능 그룹의 분포에 대한 정보는 주변해의 생지화학적 과정을 파악하고 생태계의 먹이망과 기능 연구에 활용될 수 있음
- 미세조류 군집 및 기능 그룹의 다양성 연구 기법은 메조코즘 연구와 같은 환경 변화에 다른 군집 수준의 반응을 연구하기 위한 방법론 개발에 활용될 수 있음



해양 서식처별 일차생산자 다양성의  
계절적 특성 연구



## 참고 문헌



## 참고문헌

- Adolf JE, Bachvaroff T, Place AR (2008) Can cryptophyte abundance trigger toxic *Karlodinium veneficum* blooms in eutrophic estuaries?. *Harmful Algae*, 8(1):119-128.
- Amato A, Kooistra W-H, Ghiron JH, Mann D-G, Proschold T, Montresor M (2007) Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist* 158:193-207.
- An S-M, Choi D-H, Lee J-H, Lee H, Noh J-H (2017) Identification of benthic diatoms isolated from the eastern tidal flats of the Yellow Sea: Comparison between morphological and molecular approaches. *PLoS one* 12 (6):e0179422.
- Beszteri B, Ács É, Makk J, Kovács G, Márialigeti K, Kiss KT (2001) Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 1581-1586.
- Carver T, Bleasby A (2003) The design of Jemboss: a graphical user interface to EMBOSS. *Bioinformatics* 19:1837-1843.
- Choi DH, Noh JH, An SM, Choi YR, Lee H, Ra K, Kim D, Rho T, Lee SH, Kim KT, Chang KI, Lee JH (2016) Spatial distribution of cold-adapted *Synechococcus* during spring in seas adjacent to Korea. *Algae* 31:231-241.
- Choi DH, Noh JH, Lee JH (2014) Application of pyrosequencing method for investigating the diversity of *Synechococcus* subcluster 5.1 in open ocean. *Microbes Environ* 29(1):17-22.
- Choi DH, Noh JH, Shim J (2013) Seasonal changes in picocyanobacterial diversity as revealed by pyrosequencing in temperate waters of the East China Sea and the East Sea. *Aquat Microb Ecol* 71(1):75-90.
- Choi HC (2002) A study on the microphytobenthos on an intertidal mud flat of Ganghwa is. in Korea. MS. Thesis, Inha University, Incheon, Korea, 67 pp.
- Daugbjerg N, Andersen RA (1997) A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analyses of chloroplast-encoded *rbcL* sequence data. *J Phycol* 33:1031-1041.
- Decelle J, Romac S, Stern RF, Bendif EM, Zingone A, Audic S, ... Gourvil P (2015) Phyto REF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Mol Ecol Resour* 15(6):1435-1445.

- Delaney JA, Ulrich R-M, Paul JH (2011) Detection of the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* using the RuBisCO small subunit (*rbcS*) gene in two real-time RNA amplification formats. *Harmful algae* 11:54-64.
- Dijkema KS, Wolff WJ (1983) Flora and vegetation of the Wadden Sea islands and coastal areas. August Aime Balkema, Rotterdam, 413 p.
- Dodge JD, Marshall HG (1994) Biogeographical analysis of the armoured planktonic dinoflagellate *Ceratium* in the North Atlantic and adjacent seas. *J Phycol* 30:905-922
- Donaher N, Tanifuji G, Onodera NT, Malfatti SA, Chain PSG, Hara Y, Archibald JM (2009) The complete plastid genome sequence of the secondarily nonphotosynthetic alga *Cryptomonas paramecium*: reduction, compaction, and accelerated evolutionary rate. *Genome Biol Evol* 1:439-448.
- Douglas SE, Penny, SL (1999) The plastid genome of the Cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol* 48:236-244.
- Ehara M, Inagaki Y, Watanabe KI, Ohama T (2000) Phylogenetic analysis of diatom *cox1* genes and implications of a fluctuating GC content on mitochondrial genetic code evolution. *Curr Genet* 37:29-33.
- Evans KM, Wortley AH, Mann DG (2007) An assessment of potential diatom “barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S, and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158:349-364.
- Fuller NJ, Tarran GA, Cummings DG, Woodward EMS, Orcutt KM, Yallop M, ... Scanlan DJ (2006) Molecular analysis of photosynthetic picoeukaryote community structure along an Arabian Sea transect. *Limnol Oceanogr* 51(6):2502-2514.
- Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8:229-239.
- Hamsher SE, Evans KM, Mann DG, Pouličková A, Saunders GW (2011) Barcoding diatoms: exploring alternatives to *COI-5P*. *Protist* 162:405-422.
- Hendey NI (1974) The permanganate method for cleaning freshly gathered diatoms. *Microscopy* 32:423-426.
- Hoef-Emden K (2008) Molecular phylogeny of phycocyanin-containing cryptophytes: evolution of biliproteins and geographical distribution. *J Phycol* 44(4):985-993.
- Illumina (2013) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Available from: [http://support.illumina.com/downloads/16s\\_metagenomic\\_sequencing\\_library\\_preparation.html](http://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html). Accessed 20 Sep 2017.

- Jiang S, Pang G, Wu M, Kuang L (2012) An improved *K*-nearest-neighbor algorithm for text categorization. *Expert Syst Appl* 39:1503-1509.
- Jones HM, Simpson GE, Stickle AJ, Mann DG (2005) Life history and systematics of *Petronis* (Bacillariophyta), with special reference to British waters. *Eur J Phycol* 40:61-87.
- Kermarrec L, Franc A, Rimet F, Chaumeil P, Humbert JF, Bouchez A (2013) Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. *Mol Ecol Resour* 13:607-619.
- Kermarrec L, Franc A, Rimet F, Chaumeil P, Frigerio JM, Humbert JF, Bouchez A (2014) A next-generation sequencing approach to river biomonitoring using benthic diatoms. *Freshw Sci* 33:349-363.
- Khan H, Parks N, Kozera, C, Curtis, BA, Parsons, BJ, Bowman S, Archibald JM (2007) Plastid genome sequence of the Cryptophyte alga *Rhodomonas salina* CCMP1319: lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. *Mol Biol Evol* 24:1832-1842.
- Kim JI, Moore CE, Archibald JM, Bhattacharya D, Yi G, Yoon HS, Shin W (2017) Evolutionary dynamics of Cryptophytes plastid genomes. *Genome Biol Evol* 9:1859-1872.
- Kim JI, Yoon HS, Yi G, Kim HS, Yih W, Shin W (2015) The plastid genome of the cryptomonad *Teleaulax amphioxeia*. *PLoS One* 10:e0129284.
- Kirkham AR, Jardillier LE, Holland R, Zubkov MV, Scanlan DJ (2011) Analysis of phototrophic picoeukaryote community structure along an extended Ellett Line transect in the northern North Atlantic reveals a dominance of novel prymnesiophyte and prasinophyte phylotypes. *Deep Sea Res I* 58:733-744.
- Kirkham AR, Lepere C, Jardillier LE, Not F, Bouman H, Mead A, Scanlan DJ (2013) A global perspective on marine photosynthetic picoeukaryote community structure. *ISME J* 7(5):922.
- Koizumi I (1989) Holocene pulses of diatom growths in the Warm Tsushima Current in the Japan Sea. *Diatom Res* 4(1):55-68
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1986) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. Bacillariophyceae. Naviculaceae, Vol 1. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Krammer K, Lange-Bertalot H (1988) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. Bacillariophyceae. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, Vol 2. Gustav Fischer Verlag Stuttgart

- Krammer K, Lange-Bertalot H (2000) Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2. Bacillariophyceae. English and French translation of the keys, Vol 5. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Natl Acad Sci U S A 82(20):6955-6959.
- Laza-Martinez A (2012) *Urgorri complanatus* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae), a red-tide-forming species in brackish waters. J Phycol 48(2):423-435.
- Letunic I, Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics 23:127-128.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25:1451-1452.
- Lobban CS (1984) Marine tube-dwelling diatoms of eastern Canada: descriptions, checklist, and illustrated key. Can J Bot 62:778-794.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, ... Schleifer KH. (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucleic acids res 32:1363-1371.
- Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welsh PL, León PE, King MC (1997) Nonsyndromic Deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. Science 278:1315-1318.
- MacGillivray ML, Kaczmarek I (2011) Survey of the efficacy of a short fragment of the *rbcL* gene as a supplemental DNA barcode for diatoms. J Eukaryot Microbiol 58:529-536.
- Mann DG, Vanormelingen P (2013) An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. J Eukaryot Microbiol 60:414-420.
- Mann DG, Sato S, Trobajo R, Vanormelingen P, Souffreau C (2010) DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. Algologie 31:557-577.
- Marinov I, Gnanadesikan A, Toggweiler JR, Sarmiento JL (2006) The southern ocean biogeochemical divide. Nature 441(7096):964.
- Masse G, Rince Y, Cox E, Allard G, Belt ST, Rowland SJ (2001) *Haslea salstonica* sp. nov. and *Haslea pseudostrearia* sp. nov. (Bacillariophyta), two new epibenthic diatoms from the Kingsbridge estuary, United Kingdom. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris, Sciences de la Vie 324:617-626.



- Matrai PA (1986) The distribution of the dinoflagellate *Ceratium* in relation to environmental factors along 28 N in the eastern North Pacific. *J Plankton Res* 8 (1):105-118
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin M-L (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71:491-499.
- Moniz MBJ, Kaczmarska I (2010) Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Protist* 161:7-34.
- Nanjappa D, Audic S, Romac S, Kooistra WH, Zingone A (2014) Assessment of species diversity and distribution of an ancient diatom lineage using a DNA metabarcoding approach. *PLoS One* 9:e103810.
- Omorgie EO, Crumbliss LL, Bebout BM, Zehr JP (2004) Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus* chthonoplastes cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Appl Environ Microbiol* 70(4):2119-2128.
- Park SK, Kim BY, Choi HG, Oh JS, Chung SO, An KH, Park KJ (2013) Seasonal Variation in Species Composition and Biomass of Microphytobenthos at Jinsanri, Taean, Korea. *Kor J Fish Aquat Sci* 46:176-185.
- Patrick R, Reimer CW (1975) The diatoms of the United States, exclusive of Alaska and Hawaii - Entomoneidaceae, Cymbellaceae, Gomphonemaceae, Epithemaceae. Vol. II, Part I. Monographs of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Number 13. 213 p.
- Poulin M, Masse G, Belt ST, Delavault P, Rousseau F, Robert JM, Rowland SJ (2004) Morphological, biochemical and molecular evidence for the transfer of *Gyrosigma nipkowii* Meister to the genus *Haslea* (Bacillariophyta). *Eur J Phycol* 39:181-195.
- Raven JA, Falkowski PG (1999) Oceanic sinks for atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ* 22(6):741-755.
- Roer R-D (2008) A genetic marker for coastal diatoms based on *psbA*. MS. Thesis, University of North Carolina, Wilmington, USA, 64 p.
- Round FE (1971) Benthic marine diatoms. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 9:83-139.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing Mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537-7541.

- Somerville CC, Knight IT, Straube WL, Colwell RR (1989) Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl Environ microbiol* 55(3):548-554.
- Stamatakis A (2014) RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312-1313.
- Swofford DL (2002) PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Takahashi T, Sutherland SC, Sweeney C, Poisson A, Metzl N, Tilbrook B, ... Olafsson J (2002) Global sea-air CO<sub>2</sub> flux based on climatological surface ocean pCO<sub>2</sub>, and seasonal biological and temperature effects. *Deep Sea Res Pt II: Top Stud Oceanogr* 49(9-10):1601-1622.
- Takikawa T, Yoon JH (2005) Volume transport through the Tsushima Straits estimated from sea level difference. *J Oceanogr* 61:699708.
- Theriot EC, Cannone JJ, Gutell RR, Alverson AJ (2009) The limits of nuclear-encoded SSU rDNA for resolving the diatom phylogeny. *Eur J Phycol* 44:277-290.
- Trobajo R, Mann D-G, Clavero E, Evans KM, Vanormelingen P, Mcgregor RC (2010) The use of partial *cox1*, *rbcL* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae). *Eur J Phycol* 45:413-425.
- Tunin-Ley A, Labat JP, Gasparini S, Mousseau L, Lemée R (2007) Annual cycle and diversity of species and infraspecific taxa of *Ceratium* (Dinophyceae) in the Ligurian Sea, northwest Mediterranean. *J Phycol* 43(6):1149-1163.
- Underwood GJC (1994) Seasonal and spatial variation in epipelagic diatom assemblages in the Severn estuary. *Diatom Res* 9:451-472.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microb* 73:5261-5267.
- Witkowski A, Lange-Bertalot H, Metzeltin D (2000) Diatom flora of marine coasts. I. *Iconographia Diatomologica*. Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Witkowski A, Lange-Bertalot H, Kociolek JP, Ruppel M, Wawrzyniak-Wydrowska B, Bak M, Brzezynska A (2004) Four new species of *Nitzschia* sect. *Tryblionella* (Bacillariophyceae) resembling *N. parvula*. *Phycologia* 43:579-595.

- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rossello-Mora R (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* 12:635-645.
- Yoo MH (2004) Seasonal distribution of microphytobenthos and primary production on an intertidal mud flat in Janghwa, Ganghwa Island of Korea. MS. Thesis, Inha University, Incheon, Korea, 96 p.
- Zimmermann J, Glockner G, Jahn R, Enke N, Gemeinholzer B (2015) Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. *Mol Ecol Resour* 15:526-542.

