

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “국내 학·연 극지연구진흥프로그램(PAP사업)”에 관한 연구“(극지 해양원생생물성 숙주-기생충 식별 DNA 바코드 개발 및 적용)” 과제의 최종보고서(보고서명: 극지 해양원생생물성 숙주-기생충 식별 DNA 바코드 개발 및 적용)로 제출합니다.



연구기관명 : 강릉원주대학교

연구책임자 : 정 재 호

참여연구원 : 문 지 혜

# 요 약 문

## I. 제 목

극지 해양원생생물성 숙주-기생충 식별 DNA 바코드 개발 및 적용

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 전 세계적으로 단편의 유전자 염기서열을 활용하여 표준화된 원생생물 종식별 시스템을 구축하려는 프로젝트가 진행 중에 있으며 생물에 따라 사용되는 유전자가 각기 차이가 있음(DNA 바코드)
- 국외 연구동향에 따르면, 원생생물의 경우 기존에 사용하던 핵 내 18S 유전자에서 28S 유전자로 바뀌는 추세에 있어 이에 발맞춰 극지 생물에 대해 신규 DNA 바코드 유전자를 개발 및 적용하고자함
- 정통 형태분류학을 기반으로 정확한 종식별이 이루어진 표본에 대해 18S, 28S 유전자 또는 미토콘드리아 유전자 등을 비교 분석하여, 적절한 DNA 바코드 유전자 부위를 선정 하고 PCR 프라이머 선정 및 PCR 조건의 최적화 조건에 대한 필요성이 대두됨
- 기존 종식별 마커의 한계를 극복하기 위한 신규 DNA 바코드를 개발의 필요성이 대두되며 그에 따라 해당 신규 마커를 해양원생생물성 숙주(유종섬모충류)-기생충(와편모조류)에 적용하여 그 효용성의 검증이 필요

## III. 연구개발의 내용 및 범위

- 극지 부유성 해양원생생물의 종식별 유전자 탐색(DNA 바코드): 기존 바코드 유전자에 대한 해상력 검증을 통해 새로운 바코드 유전자 선별 또는 기존 유전자 부위에 대한 고효율 프라이머 제작
- 극지연구소 인프라를 통해 기 확보된 아라온호 시료와 극지기반 표본채집을 통해 아래와 같은 신규 연구과제 창출
- DNA 바코드 적용: 원생생물성 숙주-기생충의 DNA 바코드(숙주-유종섬모충류, 기생충-와편모조류) 적용을 통해 미소 진핵생물의 유전자기반 종식별 원천 데이터 확보
- 형태기반 종식별 난제에 대한 해결법 모색: 과도한 형태변이를 갖는 유종섬모충류 *Parafavella*에 대한 사례연구 수행을 통해 바코드 해상력 검증 및 형태분류학 난제 해결 수행
- 전세계적으로 생산 중단된 프로타골 시약으로 인한 기존 종식별 표본제작법 개량 필요

## IV. 연구개발결과

- 신규 바코드 유전자 선정: 미토콘드리아 CO1(숙주), 18S V4 부위(기생충)
- 신규 바코드에 대한 최적화된 DNA 바코드 실험 프로토콜 구축

- DNA 바코드 적용을 통해 숙주(유종섬모충류) 활용 가이드라인 제시
- 프로타콜 합성 및 염색법 개발을 통해 형태기반 종식별 표본제작법 개량

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 원생생물 종식별에 적합한 신규 DNA 바코드로서의 유전자 가이드라인 활용
- 형태분류학자가 아닌 일반 연구진도 활용 가능한 표준화된 종식별 DNA 바코드 시스템 활용
- 극지 생태계의 기생충 감염에 의한 생태계 건강성 평가 및 이머징 병원체에 대한 기초 자료로서 활용 가능
- Parafavella* 사례연구를 기반으로 종식별 문제를 내포한 유종섬모충류의 계통분류학적 문제 해결 및 기타 유종섬모충류에 활용안 제시
- 전세계적 연구 선도권 확보 및 연구인력 양성을 통해 향후 관련 생물을 활용한 연구 연속성 기반 구축



# Summary

## I. Title

Development and application of protist DNA barcode for polar marine host-parasite identification

## II. Purpose

- To find genes for identification of polar planktonic marine protists (DNA barcode): verification of previous barcoding genes or design new high-sensitive primer set
- To create new research project from samples collected using Araon ice-breaking vessel and infrastructures of Korea Polar Research Institute (see belows)
- To apply a DNA barcode to polar protists: reference database construction using protist DNA barcode (host-loricate ciliates, parasite-dinoflagellates) to identify micro-/pico- eukaryotes
- To solve the problematic situation in morphology-based species identification: case study in loricate ciliates *Parafavella* having excessive morphological variation to evaluate barcode resolution and find solution of morphology-based taxonomical problem

## III. Contents

- DNA barcode is a global research trend to standardize species identification system using a single gene fragment which depends on target taxa
- Global research groups have been trying to find new barcoding gene to identify protists and thus we will keep up with the global trend and apply the barcode to polar protists
- We will evaluate and choose new barcoding gene (i.e., 18S, 28S, mitochondrial genes) and optimize experimental conditions using specimens identified based on traditional taxonomy
- We will analyze samples previously collected using the Araon vessel and construct reference database of marine protist (host-loricate ciliates, parasite-dinoflagellates) based on morphology and DNA barcode
- We will construct the reference database including microphotographs and DNA barcodes obtained from the same specimen identified morphologically
- We will conduct a case study for *Parafavella* species having excessive morphological variation to evaluate the new barcoding gene as a solution of their synonyms or homonyms and of true systematic relationships

- We will establish genetic database of parasitic dinoflagellates which have less than 3  $\mu\text{m}$  of a dinospore in size with insufficient morphological key features
- We will establish a database including a list of parasites, host specificity, occurrence period, occurrence frequency, density, and infection intensity

#### IV. Results

- Developments of DNA barcode for hosts (mt C01) and parasites (18S V4)
- Optimization of experimental conditions
- Application guideline of the DNA barcode
- Development of a protocol of protargol-synthesis/-impregnation

#### V. Expected contribution

- As a guideline, the new DNA barcode would support to identify protist species using barcoding gene sequences
- The standardized DNA barcode system would help non-taxonomists to identify microscopic protist without taxonomic training
- As a reference database, the DNA barcode with specimen morphology would provide the standard for accurate species identification
- The investigation of parasite infection would help to evaluate ecosystem health and to provide fundamental database to emerging parasites in the future
- The case study of *Parafavella* would provide a solution for systematically problematic group loricate ciliates
- The research field of DNA barcode for protist host-parasite species is undeveloped topic in marine ecosystem thus we could lead and produce research experts if the proposal is accepted

# Contents

## Chapter 1. Introduction

### 1.1 Research goals

### 1.2 Research importance

## Chapter 2. Status of domestic and foreign technology development

### 2.1 Status and limitations of domestic and foreign researches

### 2.2 Research trends and creativity

## Chapter 3. Contents and results of research-developments

### 3.1 Goals and results

## Chapter 4. Achievement of research-development goal and contribution to external

### 4.1 Achievement of research-development goal

### 4.2 Importance of results and contribution to external

## Chapter 5. Utilization of results

### 5.1 Utilization of results

### 5.2 Expected contributions

### 5.3 Research plan after this project

## Chapter 6. References

## Chapter 7. Proof data

# 목 차

## 제 1 장 서론

### 제 1 절 연구목표

### 제 2 절 연구과제의 중요성

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

### 제 2 절 관련 연구동향 및 독창성

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구목표 및 결과

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 목표달성도

### 제 2 절 연구개발결과의 우수성 및 대외기여도

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 활용방안

### 제 2 절 기대효과

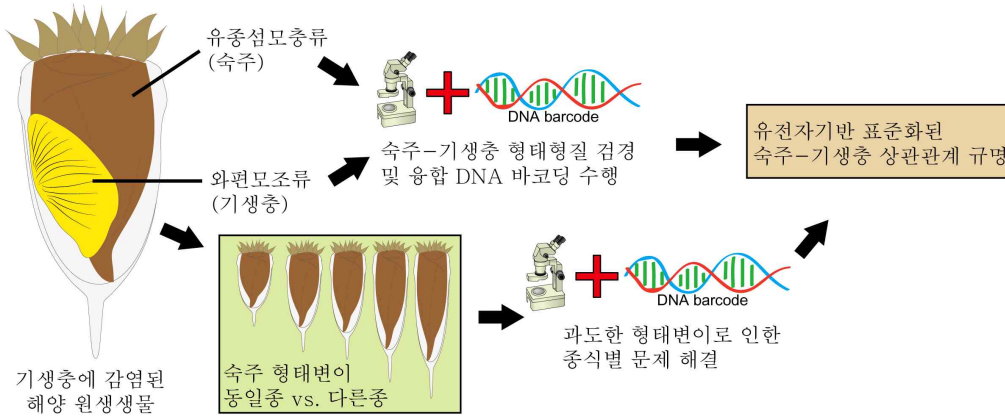
### 제 3 절 연구종료후 성과창출 계획

## 제 6 장 참고문헌

## 제 7 장 증빙자료

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구목표



원생생물성 DNA 바코드에 관한 연구내용 모식도.

### 1. 섬모충류(숙주)와 외편모조류(기생충)의 종식별 DNA 바코드 개발 및 실험조건 최적화

- 전 세계적으로 단편의 유전자 염기서열을 활용하여 표준화된 종식별 시스템을 구축하려는 프로젝트가 진행 중에 있으며 생물에 따라 사용되는 유전자가 각기 차이가 있음. 국외 연구동향에 따르면, 원생생물의 경우 핵 내 18S 유전자에서 28S 유전자로 바뀌는 추세에 있어 이에 발맞춰 국내에 서식하는 이들 생물에 대한 DNA 바코드 유전자를 확보하고자 함(Pawlowski et al., 2012; Stoeck et al., 2014).
- 정통 형태분류학을 기반으로 정확한 종식별이 이루어진 표본에 대해 18S, 28S 유전자 등을 비교 분석하여 적절한 DNA 바코드 유전자 부위를 선정하고 PCR 프라이머 선정 및 PCR 조건 최적화 진행.
- 숙주의 경우 기존 종식별 유전자의 낮은 해상력, 기생충의 경우 숙주의 게놈 DNA와 섞인 상태에서부터 정확한 종식별 결과를 제시해야하는 각각의 연구목표를 갖고 있음.

### 2. 신규 바코드 적용을 위한 표본 확보 및 표본 스크리닝

- 신규 개발된 바코드 적용을 위해 형태적으로 동정된 단일 표본 확보 필요.
- 아라온호 표본 스크리닝 수행을 통해 관련 표본 확보(극지연구소 양은진 박사님 시료 제공).
- 남극 세종기지와 북극 다산기지 현장 탐사 및 채집 수행을 통해 관련 표본 확보.

### 3. 기생충 종식별을 위한 기술 개발

- 기생충 표본 제작에 필수 화학물질(프로타골)의 생산 중단으로 인해 ‘종식별’을 위한 표본 제작 기술 개발.
- 2013년 미국과 중국에서 공동으로 발표한 프로타골 합성법 개량 및 적용(Pan et al., 2013).

### 4. 숙주 생물인 *Parafavella* 사례연구

- 종식별에 지속적인 문제가 제기되어 있지만 100년간 미해결된 상태(Davis, 1978)로 남아있는



*Parafavella*에 대해 신규 바코드 적용.

- 숙주 생물의 DNA 바코드를 적용한 사례 연구로서 본 연구과제를 통해 개발된 마커의 효용성을 검증.

## 제 2 절 연구과제의 중요성

1. 본 연구개발은 2개의 문단위(phylum) 생물을 통합하여 숙주-기생충 DNA 바코드 개발을 위한 내용임. 특히, 숙주생물은 자연계에서 높은 생물량을 차지하여 상위영양단계로의 물질 순환을 통해 건강한 생태계를 유지하는 가교 역할을 하지만 이들을 숙주로 삼는 기생충의 감염은 이러한 흐름을 끊는 악영향을 끼칠 수 있음. 하지만 원생생물이라는 특성이 이들 생물에 대한 생태모니터링에 걸림돌이 되어 왔음. 특히, 이들의 작은 크기, 연약한 세포, 형태기반 종식별의 높은 난이도 등이 대표적. 이러한 문제들을 해결하고 보다 표준화된 기생충 모니터링 시스템을 구축하고자 본 연구개발에 높은 의의가 있음으로 판단됨. 본 연구의 목표 및 필요성을 요약하면 아래와 같음.
2. 해당 생물분류군에 대한 국제적 연구의 미흡함과 관련 연구분야의 선도 연구진과(오스트리아 잘츠부르크 대학의 Wilhelm Foissner 교수, 오스트리아 생태공학상담소 Helmut Berger 박사, 미국 스미스소니언연구소의 Wayne D. Coats 박사)의 공동연구경험은 해당 과제 수행을 통해 극지인프라를 극대화하여 세계적 선도그룹으로 발돋움 할 수 있는 좋은 기회라고 판단됨. 또한, 이들 국외 선도연구진은 대부분 정년퇴임을 하였기 때문에 해당 연구분야에 대한 연구갭이 발생하여 시기적으로도 좋은 기회라고 판단됨.
3. 아라온호 시료에서 발견되는 일부 냉수성 숙주종의 경우, 동계 국내 해역에 일부 발견되기 때문에 본 과제와의 연관성을 무시할 수 없을 것으로 판단됨. 또한, 이들 숙주생물이 기생충에 감염되어 극지해역과 국내해역에 확산될 경우, 생태계에 미치는 영향에 대한 연구가 필요할 것으로 판단됨.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 연구동향 및 기존연구의 문제점

- 본 연구를 통해 DNA 바코드 개념을 극지에 서식하는 원생생물성 섬모충류(숙주)와 와편모조류(기생충)에 적용하여 정확한 종식별 체계를 확립함으로써 형태분류학자가 아닌 일반 연구진도 이들을 종식별 할 수 있도록 표준화된 시스템을 정착시키고자 함. 특히 숙주와 기생충을 동시에 적용할 수 있는 바코드를 개발하는데 그 의의가 있음.

- 숙주와 기생충을 포함한 이들 원생생물은 그 크기가 1 mm 이하로 매우 작고 특히 기생충은 0.01 mm 이하로 picoeukaryote에 속함(Combs & Bachvaroff, 2013). 이들 생물은 전세계적으로 미개척생물분류군으로 국내외 연구가 미진한 상황. 특히, 기생성 와편모조류의 경우 전세계적으로 연구가 미진한 분야로 향후 연구 성과는 해당 분야의 선도 입지를 다지는 중요한 역할을 할 것으로 판단됨.

- 숙주생물인 섬모충류는 치어와 같은 수산자원 생물의 중요 먹이원으로서 중요한 생태학적 징검다리 역할을 수행하지만 이들을 숙주로 삼는 기생충의 감염으로 인해 이들 숙주의 사멸은 생태계 건강성에 악영향을 미칠 것으로 판단됨(Combs, 1999). 하지만 현재 극지 해역에 기생충이 몇 종이 출현하며 언제 어떤 영향을 끼치는지에 대한 연구가 미비한 실정임.

- 정확한 숙주-기생충 상관관계 규명을 위해 숙주생물과 이들의 기생충에 대한 동시진행연구가 시급함. 숙주와 기생충에 대한 각각의 분리된 독립적 연구는 상관관계 규명에 오히려 혼란을 가중시킬 수 있음. 예를 들어, 숙주 또는 기생충 생물에 대한 오동정은 잘못된 숙주-기생충 상관관계를 초래하여 향후 기생충에 의한 생태계 교란에 대처하는데 있어 잘못된 진단 및 처방을 초래할 수 있음.

- 숙주생물과 이들의 기생충 다양성 규명과 생태계 영향을 모니터링하기 위해서는 DNA 바코드 시스템(Stoeck et al., 2014)과 같은 표준화된 종식별 체계가 시급함.

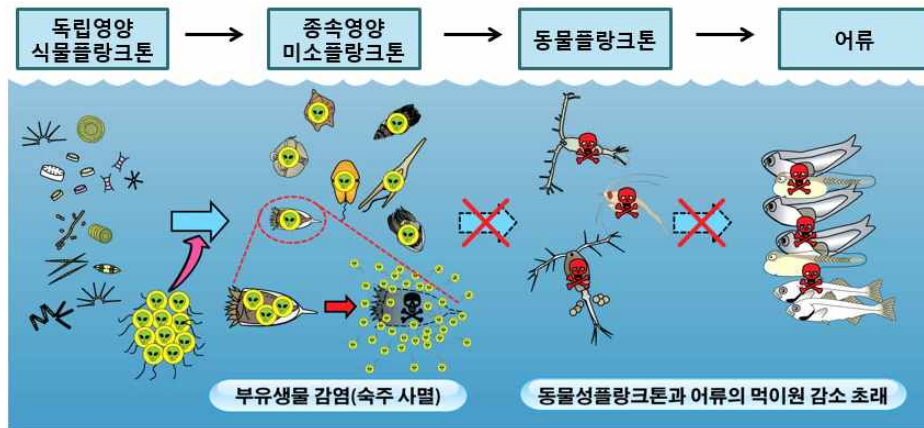
- 또한, 숙주생물인 유충섬모충류의 경우 종식별에 심각한 문제가 끊임없이 제기되고 있으나 이에 대한 해결책이 마땅치 않은 상황임. 국외 연구진들이 이를 바로잡고자 핵 내 28S 리보솜유전자를 사용하여 종식별 해상력을 향상시키려 하고 있으나 아직까지 그 문제가 해결되지 않은 상황(Santoferrara et al., 2013, 2016). 유충섬모충류는 일반 섬모충류와 달리 피갑의 형태에 의해 종동정이 되어 왔으나 형태형질의 심각한 종내 변이성이 발견되었음. 국·내외에서 현재 개발되어 사용 중인 바코드 유전자의 경우 이들의 문제를 해결하기에 그 해상력에서 한계를 보여주어 이에 대한 해결책 모색이 시급함.

- 정확한 종식별이 이루어지지 않은 결과물은 잘못된 숙주와 기생충과의 상관관계 및 이들을 기반으로 한 생태계 물질순환에 오류를 유발할 수 있음.

- 본 연구수행을 통해 형태기반 종식별이 어려운 원생생물에 대해 유전자기반 표준화된 종식별 시스템을 확립하고 이를 이용하여 현재 극지 부유성 해양생태계에 존재하는 문제를 해결하는데 적용하고자 함.

## 제 2 절 관련 연구동향 및 독창성(창의성)

- 생태계에서 원생생물성 섬모충류 숙주는 저차생산 단계의 생산자이며 동시에 미소생물을 섭식하는 소비자로서 치어를 포함한 다세포 동물 등의 중요 먹이원 역할을 함. 국내에서는 1980년대에 본격적으로 연구가 시작되었지만 전 세계적으로 약 8,000여종이 보고된 것에 반해 국내에는 약 200여종만이 보고됨(Jung et al., 2017). 또한, 극지의 경우, 남극과학기지 주변의 토양 시료를 예로 들면 이들 원생생물이 우점함에도 불구하고 그 연구가 미비한 실정임(Petz, 1997).



기생충 출현 및 감염에 의한 생태계 교란

- 섬모충류와 같은 원생생물은 단세포 진핵생물로서, 크기가 평균 200  $\mu\text{m}$ 로 작고 외부 충격에 약하여 이들에 대한 연구가 더디게 진행되었으며, 전 세계적으로 이들의 다양성이 12~38%만이 밝혀졌다고 추정되며 나머지 종들에 대해서는 미개척 분야로 남아있음(Foissner et al., 2008). 이로 인해 2012년 국립생물자원관에서는 섬모충류 생물을 국내 미개척 분류군으로 지정하여 연구인력양성사업을 수행한 바 있음.

- 섬모충류는 현재 만여종이 동물명명규약에 따라 기재되어 있지만 이들의 다양성은 4만여종에 달할 것으로 추정됨(Foissner et al., 2008). 미발굴 신종이 다수 존재하는 섬모충류의 경우, 오스트리아와 중국에서 그 연구가 활발히 진행되고 있으며 대부분 계통분류학적 연구가 그 주를 이루고 있음. 한 해 수십종의 신종이 학계에 보고되고 있으며, 이들 생물은 극지해양은 물론 세종기지와 장보고기지 주변 토양에서도 우점적으로 발견될 정도로 폭넓은 생태학적 지위를 갖고 있음(Petz, 1997).

- 최근 들어 이들 생물의 종식별 체계에 대한 문제점이 제기되어 이를 바로잡기 위하여 'DNA 바코드' 개념이 적용되어 정확한 종식별 체계를 세우고자 국외에서 연구가 진행 중. 기존 핵 내 18S 리보솜 유전자를 이용한 바코드 체계에서 28S 리보솜 유전자 체계로 변경 및 검증이 진행되고 있음(Stoeck et al., 2014).

- 이와 더불어 이들 섬모충류에 기생하는 기생성 와편모조류가 최근 국내 해양에서 다수 발견됨(Coats et al., 2014). 상대적으로 연구가 보다 진행된 미국의 경우 최대 86%의 숙주가 감염된 사례가 보고됨(Coats, 1999).

- 특히, 기생성 와편모조류 *Euduboscquella* 종이 주로 국내 해역의 부유성 섬모충류에 기생하는

것으로 확인되었지만, 해당 생물에 대한 연구선도 국가인 미국을 비롯하여 전 세계적으로 이들 기생충에 대한 연구는 미비한 실정임. 따라서 본 연구의 수행은 관련 분야의 세계적 주도권을 확보하는데 있어 그 중요성을 시사하며, 관련 분야의 선도연구진인 미국 스미스소니언연구소 Wanye D. Coats 박사와의 공동연구 수행 경험은 극지인프라를 극대화하는데 좋은 기회로 작용할 것으로 판단됨.

- *Euduboscquella*의 유주자는 그 크기가 약 3  $\mu\text{m}$ 로 해양생태학적으로 picoeukaryote로 분류되며, 근연종인 *Amoebophrya*는 적조생물을 숙주로 삼기 때문에 국내연구진을 통해 적조생물을 제어하기 위한 생물학적 방제 역할로 활용하고자 연구가 진행 중. 하지만 *Euduboscquella* 기생충에 대한 연구는 극히 제한적이므로 현재 극지 및 우리 해역에 어떤 기생충이 어떠한 생태학적 영향을 미치는지에 대한 조사가 시급함(Coats, 1999; Jung et al., 2016).



# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구목표 및 결과

### 1. 연구내용

가. 숙주생물(섬모충류)에 대한 신규 바코드 부위 선정 및 실험조건 확립

- 미토콘드리아 CO1 유전자로 구성된 신규 바코드 부위 확보(그림 1)
- 기존 바코드 부위(18S, 28S D1/2)의 종식별 한계 재검증(그림 2, 3, 증빙8; 중간진도 평가의견 반영)
- 극지 및 국내외표본을 활용하여 마커부위 검출에 대한 검증 완료(표 1, 2)
- 특히, 부유중에 대한 데이터 추가 확보(표 2; 중간진도 평가의견 반영)
- 숙주생물의 DNA 바코드 개발내용은 Mitochondrial DNA Part A 학술지에 올해 온라인으로 출판됨(증빙7)

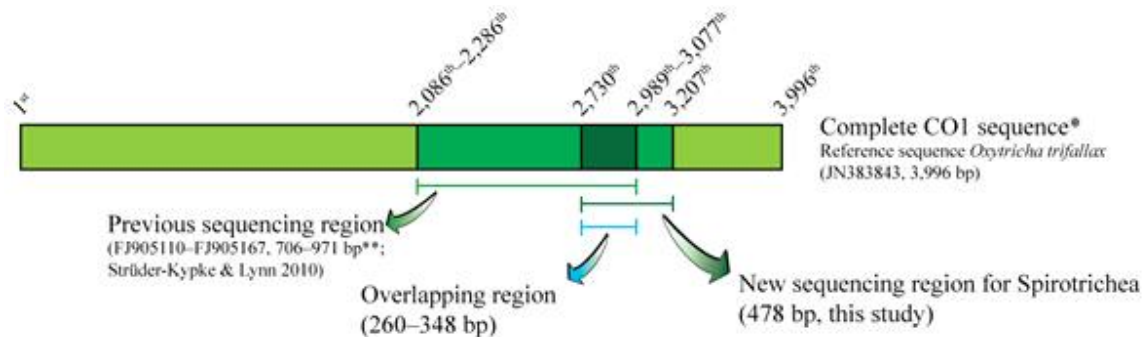


그림 1. 신규 종식별 바코드의 프라이머 결합 부위.

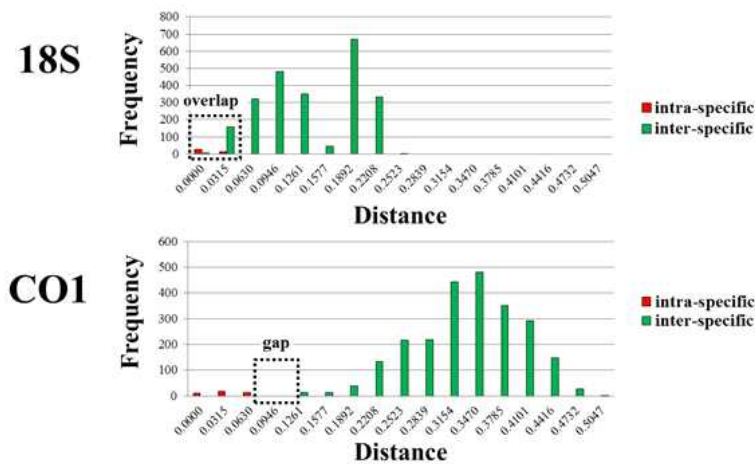


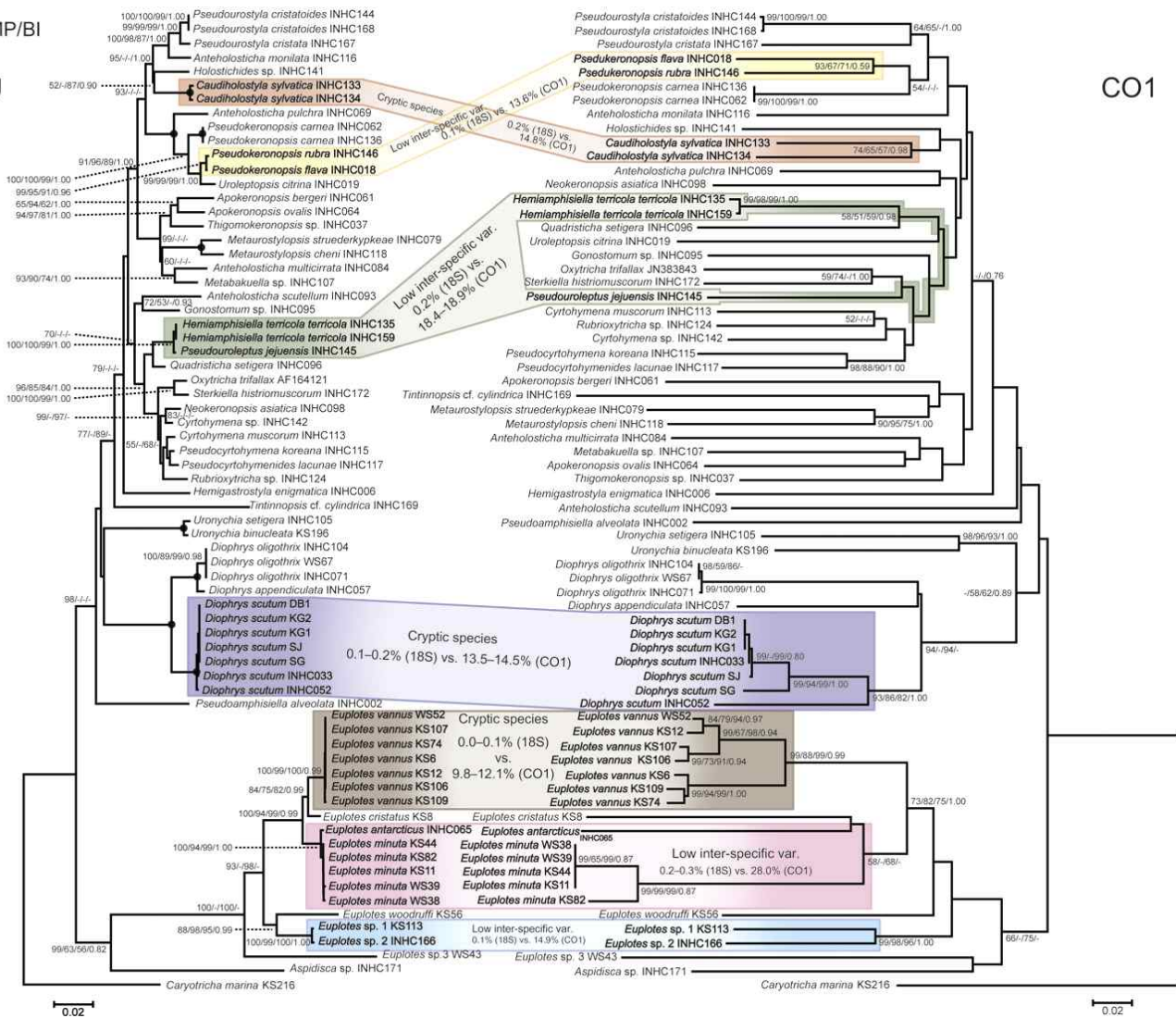
그림 2. 기존 종식별 바코드와 신규 바코드 간에 해상력 차이 비교. 유전적 차이에 따른 빈도수로 표현



NJ/ML/MP/BI

SSU

CO1



- 목표달성을 위한 연구수행 방법

구분	연구개발 목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용*
2016년도	바코드 유전자 선정	1. 데이터베이스 기반 생물정보 분석	유전자 염기서열 데이터에 기반하여 기존 바코드 부위 종식별 해상력 분석 및 신규 바코드 부위 탐색
		2. 유전체 실험 및 분석	신규 바코드 부위 탐색을 위해 미토콘드리아 유전체를 실험적으로 분석하여 후보 마커 부위를 선정함
	최적화된 DNA 바코드 실험 프로토콜 구축	3. 유전자 증폭 실험	선정된 바코드 부위에 대한 최적화된 PCR 조건 선별
	표본 스크리닝	4. 형태기반 표본 선별	표본 스크리닝을 통해 유전자 추출을 위한 표본에 대한 사진 확보 및 분리작업 수행
2017년도	DNA 바코드 적용(숙주) 및 활용 가이드라인 제시	1. 유충섬모충류(숙주)에 대해 바코드 적용	다산기지, 세종기지, 아라온호, 국내해역의 유충섬모충류에 적용하여 해당 결과를 통해 활용 가이드라인 제시
	기생충 종식별 기술 개발	2. 프로타콜 합성법 및 프레파라트 제작법 개발	생산중단된 프로타콜을 실험실 내에서 합성할 수 있도록 기술을 개발하고 이를 통해 프레파라트를 제작할 수 있는지 검증
	<i>Parafavella</i> (숙주) 사례연구 수행	3. 해당 속에 포함된 종에 바코드 적용 및 효용성 검증	북반구에서 출현하는 해당 종에 대해 다양한 지역(다신기지, 아라온호 시료, 동해)에서 시료를 채집하여 숙주종의 DNA 바코드 해상력 검증

J4-2_ Assembly 2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J4-1_ Assembly 9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J7-1_ Assembly	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J4-6_ Assembly	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J4-5_ Assembly 3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J4-4_ Assembly 2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J4-3_ Assembly 2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J1-2_ Assembly 6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J1-1_ Assembly 2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J1-3_ Assembly	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M22-2_ Assembly	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M22-6_ Assembly	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

J11-2_CiCO1_ Ass...	98.013%	91.109%	89.226%	89.226%	89.226%	89.226%	89.226%	89.226%	89.226%	89.226%
J11-3_CiCO1_ Ass...	98.013%	91.423%	89.540%	89.540%	89.540%	89.540%	89.540%	89.540%	89.540%	89.540%
J11-1_CiCO1_ Ass...	91.109%	91.423%	96.862%	96.862%	96.862%	96.862%	96.862%	96.862%	96.862%	96.862%
M15-5_CiCO1_ As...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
M15-2_CiCO1_ As...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J8-6_CiCO1_ Asse...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J5-4_CiCO1_ Asse...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J5-1_CiCO1_ Asse...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J5-2_CiCO1_ Asse...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
J5-3_CiCO1_ Asse...	89.226%	89.540%	96.862%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

그림 3. *Parafavella* 5종의 유전적 유사도. 18S-28S D1/D2 부위(위)와 신규 바코드 CO1 부위의 유사도(아래). *Parafavella* 5종은 기존의 바코드 부위로는 전혀 종식별이 불가능한 것으로 확인이 되었으며, 신규 바코드를 적용하면 3개의 그룹으로 나누어지는 것을 확인.

표 1. 신규 종식별 바코드가 확보된 종목록. 극지방(굵은 글씨)을 포함한 다양한 지역에서 표본을 확보함.

Isolate ID	Order	Family	Species	Habitat	Origin
INHC116	Urostylida	Urostylidae	<i>Anteholosticha monilata</i>	Brackish water	Songjiho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
INHC084	Urostylida	Urostylidae	<i>Anteholosticha multicirrata</i>	Marine	Busan, South Korea
INHC069	Urostylida	Urostylidae	<i>Anteholosticha pulchra</i>	Marine	Incheon, South Korea
<b>INHC093</b>	<b>Urostylida</b>	<b>Urostylidae</b>	<b><i>Anteholosticha scutellum</i></b>	<b>Marine</b>	<b>Svalbard, Arctic</b>
INHC061	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Apokeronopsis bergeri</i>	Marine	Incheon, South Korea
INHC064	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Apokeronopsis ovalis</i>	Marine	Baengnyeong-do Island, Incheon, South Korea
INHC171	Euplotida	Aspidiscidae	<i>Aspidisca</i> sp.	Marine	Incheon, South Korea
INHC133	Urostylida	Urostylidae	<i>Caudiholosticha sylvatica</i>	Soil	Soya-do Island, Incheon, South Korea
INHC134	Urostylida	Urostylidae	<i>Caudiholosticha sylvatica</i>	Soil	Sangunburi Crater, Jeju-do Island, South Korea
INHC113	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Cyrtohymena muscorum</i>	Fresh water	Jangdo Wetland, Jeollanam-do, South Korea
INHC115	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Pseudocyrtohymena koreana</i>	Brackish water	Incheon, South Korea
INHC117	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Cyrtohymena</i> sp. 2	Brackish water	Songjiho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
INHC142	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Cyrtohymena</i> sp. 3	Moss	Muui-do Island, Incheon, South Korea
<b>INHC057</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Uronychiidae</b>	<b><i>Diophrys appendiculata</i></b>	<b>Marine</b>	<b>Svalbard, Arctic</b>
<b>INHC071</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Uronychiidae</b>	<b><i>Diophrys oligothrix</i></b>	<b>Marine</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
<b>INHC104</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Uronychiidae</b>	<b><i>Diophrys oligothrix</i></b>	<b>Brackish water</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
<b>WS067</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Uronychiidae</b>	<b><i>Diophrys oligothrix</i></b>	<b>Marine</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
INHC033	Euplotida	Uronychiidae	<i>Diophrys scutum</i>	Marine	Gangwon-do, South Korea
<b>INHC052</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Uronychiidae</b>	<b><i>Diophrys scutum</i></b>	<b>Marine</b>	<b>Svalbard, Arctic</b>
DB1	Euplotida	Uronychiidae	<i>Diophrys scutum</i>	Marine	Haeundae Beach, Busan, South Korea
KG1	Euplotida	Uronychiidae	<i>Diophrys scutum</i>	Marine	Gangguhang Port, Gyeong-sangbuk-do, South Korea
KG2	Euplotida	Uronychiidae	<i>Diophrys scutum</i>	Marine	Gangguhang Port,



SG	Euplotida	Uronychiidae	<i>Diophrys scutum</i>	Marine	Gyeongsangbuk-do, South Korea
SJ	Euplotida	Uronychiidae	<i>Diophrys scutum</i>	Marine	Seogwipo-si, Jeju-do Island, South Korea
<b>INHC065</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Euplotidae</b>	<b><i>Euplotes antarcticus</i></b>	<b>Marine</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
KS008	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes cristatus</i>	Marine	Incheon, South Korea
KS011	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes minuta</i>	Marine	Seongsan-eup, Seogwipo-si, Jeju-do Island, South Korea
KS082	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes minuta</i>	Marine	Ganwoldo, Chungcheongnam-do, South Korea
KS044	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes minuta</i>	Marine	Busan, South Korea
WS038	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes minuta</i>	Marine	Laguna Beach, California, USA
WS039	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes minuta</i>	Marine	Laguna Beach, California, USA
KS113	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes</i> sp. 1	Brackish water	Incheon, South Korea
INHC166	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes</i> sp. 2	Brackish water	Songjiho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
WS043	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes</i> sp. 3	Marine	Newport beach, California, USA
KS006	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	Incheon, South Korea
KS012	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	Seongsan-eup, Seogwipo-si, Jeju-do Island, South Korea
KS074	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	Incheon, South Korea
KS106	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	Incheon, South Korea
KS107	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	Incheon, South Korea
KS109	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	Incheon, South Korea
WS052	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes vannus</i>	Marine	East River, New York, USA
KS056	Euplotida	Euplotidae	<i>Euplotes woodruffi</i>	Brackish water	Songjiho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
<b>INHC095</b>	<b>Sporadotrichida</b>	<b>Gonostomatidae</b>	<b><i>Gonostomum</i> sp.</b>	<b>Soil</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
INHC135	Stichotrichida	Amphisiellidae	<i>Hemiamphisiella terricola terricola</i>	Soil	Soya-do Island, Incheon, South Korea
INHC159	Stichotrichida	Amphisiellidae	<i>Hemiamphisiella terricola terricola</i>	Soil	Samjeong-ri, Jeollanam-do, South Korea
INHC006	Stichotrichida	Amphisiellidae	<i>Hemigastrostyla enigmatica</i>	Marine	Dongmak Beach, Gangwha-do Island, South Korea
INHC141	Urostylida	Urostylidae	<i>Holostichides</i> sp.	Soil	Songjiho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
KS216	Euplotida	Kiitrichidae	<i>Kiitricha marina</i>	Marine	Incheon, South Korea
<b>INHC107</b>	<b>Urostylida</b>	<b>Urostylidae</b>	<b><i>Metabakuella</i> sp.</b>	<b>Fresh water</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
INHC118	Urostylida	Urostylidae	<i>Metaurostylopsis cheni</i>	Marine	Mokpo, Jeollanam-do, South Korea
INHC079	Urostylida	Urostylidae	<i>Metaurostylopsis struederkypkeae</i>	Brackish water	Yeongnangho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
<b>INHC098</b>	<b>Sporadotrichida</b>	<b>Neokeronopsidae</b>	<b><i>Neokeronopsis asiatica</i></b>	<b>Fresh water</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
<b>INHC096</b>	<b>Sporadotrichida</b>	<b>Oxytrichidae</b>	<b><i>Oxytricha setigera</i></b>	<b>Soil</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>
INHC002	Urostylida	Pseudoamphisiellidae	<i>Pseudoamphisiella alveolata</i>	Marine	Incheon, South Korea
INHC062	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Pseudokeronopsis carnea</i>	Marine	Incheon, South Korea
INHC136	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Pseudokeronopsis carnea</i>	Marine	Gwangyang, Jeollanam-do, South Korea
INHC018	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Pseudokeronopsis flava</i>	Marine	Pohang-si, Gyeongsangnam-do, South Korea
INHC146	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Pseudokeronopsis rubra</i>	Marine	Hwajinpo, Gangwon-do, South Korea
INHC145	Stichotrichida	Kahliellidae	<i>Pseudouroleptus jejuensis</i>	Soil	Cheongsugotjawal, Jeju-do Island, South Korea

INHC167	Urostylida	Pseudourostylidae	<i>Pseudourostyla cristata</i>	Soil	Hanon Crater, Jeju-do Island, South Korea
INHC144	Urostylida	Pseudourostylidae	<i>Pseudourostyla cristatoides</i>	Brackish water	Hwajinpo, Gangwon-do, South Korea
INHC168	Urostylida	Pseudourostylidae	<i>Pseudourostyla cristatoides</i>	Brackish water	Songjiho Lagoon, Gangwon-do, South Korea
INHC124	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Rubrioxxytricha</i> sp.	Fresh water	Dorimcheon Stream, Seoul, South Korea
INHC172	Sporadotrichida	Oxytrichidae	<i>Sterkiella histriomuscorum</i>	Brackish water	Incheon, South Korea
INHC037	Urostylida	Pseudokeronopsidae	<i>Thigmokeronopsis</i> sp.	Marine	Gusan Beach, Gyeongsangbuk-do, South Korea
INHC169	Tintinnida	Codonellidae	<i>Tintinnopsis</i> cf. <i>cylindrica</i>	Marine	Incheon, South Korea
INHC019	Urostylida	Urostylidae	<i>Uroleptopsis citrina</i>	Marine	Pohang, South Korea
KS196	Euplotida	Uronychiidae	<i>Uronychia binucleata</i>	Marine	Incheon, South Korea
<b>INHC105</b>	<b>Euplotida</b>	<b>Uronychiidae</b>	<b><i>Uronychia setigera</i></b>	<b>Brackish water</b>	<b>King George Island, Antarctic</b>

#### 나. 숙주생물의 DNA 바코드 적용 및 *Parafavella* 사례 연구

- 남극 세종기지와 북극 다신기지 인근 해양시료 확보를 통해 12종의 유충섬모충류 확보(표 2, 그림 4)
- *Parafavella* 사례 연구를 통해 본 바코드의 효용성 검증, 그림 5와 6에서와 같이 다신기지 시료(2017), 아라온호 시료(2012, 2017), 동해 시료(2016)로부터 해당 종을 확보하여 Zoological Scripta 학술지에 논문 투고 준비 중



표 2. 유종섬모충류(숙주) 표본 목록.

Species	Isolate	Sampling data		Measurements		SSU rDNA - ITS regions - LSU rDNA (2,945 bp)	COI gene (478 bp)
		Date	Latitude/longitude	Lorica oral diameter	Length		
<i>P. jorgenseni</i>	Ara01	7/24/2012	N54°19'59.4"/E173°39'58.8" (Bering Sea)	43.1	96.7	J1-1	J11-1
<i>P. jorgenseni</i>	Ara02	7/24/2012	N54°19'59.4"/E173°39'58.8" (Bering Sea)	48.0	106.3	J1-2	J11-2
<i>P. jorgenseni</i>	Ara03	7/24/2012	N54°19'59.4"/E173°39'58.8" (Bering Sea)	46.2	105.7	J1-3	J11-3
<i>P. subrotundata</i>	Ara04	7/26/2012	N58°45'10.2"/W178°29'41.4" (Bering Sea)	60.6	250.8	J4-1	J5-1
<i>P. subrotundata</i>	Ara05	7/26/2012	N58°45'10.2"/W178°29'41.4" (Bering Sea)	62.6	163.2	J4-2	J5-2
<i>P. subrotundata</i>	Ara06	7/26/2012	N58°45'10.2"/W178°29'41.4" (Bering Sea)	63.4	186.8	J4-3	J5-3
<i>P. subrotundata</i>	Ara07	7/26/2012	N58°45'10.2"/W178°29'41.4" (Bering Sea)	57.4	202.8	J4-4	J5-4
<i>P. gigantea</i>	Ara08	7/27/2012	N62°30'35.4"/W173°59'54.0" (Bering Sea)	67.0	515.6	J7-1	J8-6
<i>P. gigantea</i>	Arc01	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	59.0	399.8	M33-1	M34-1
<i>P. gigantea</i>	Arc02	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	60.1	390.5	M33-2	M34-2
<i>P. gigantea</i>	Arc03	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	62.9	415.0	M33-3	M35-1
<i>P. gigantea</i>	Arc04	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	60.6	426.8	M33-4	M34-4
<i>P. gigantea</i>	Arc05	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	61.6	366.0	M33-5	M36-1
<i>P. gigantea</i>	Arc06	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	58.7	511.1	M37-6	M36-2
<i>P. gigantea</i>	Arc07	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	49.3	360.4	M33-6	M35-4
<i>P. gigantea</i>	Arc08	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	54.5	452.4	M33-8	M34-9
<i>P. gigantea</i>	Arc09	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	58.2	419.1	M33-9	M34-10
<i>P. gigantea</i>	Arc10	7/23/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	52.1	277.9	M33-10	M34-11
<i>P. greenlandica</i>	Arc11	7/14/2017	N78°55'40.9"/E11°56'11.8" (Greenland Sea)	34.8	86.4	M33-11	M42-2
<i>P. greenlandica</i>	Arc12	7/14/2017	N78°55'40.9"/E11°56'11.8" (Greenland Sea)	33.2	78.4	M33-12	M41-2
<i>P. gigantea</i>	Kor01	5/23/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	57.8	285.3	M22-2	M15-2
<i>P. gigantea</i>	Kor03	3/11/2016	N37°52'1.0"/E128°50'54.4" (East/Japan Sea)	60.9	378.9	G1-18	G3-5
<i>P. gigantea</i>	Kor04	3/3/2016	N38°9'18.1"/E128°36'34.1" (East/Japan Sea)	61.6	376.1	G1-13	G3-4
<i>P. gigantea</i>	Kor05	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	59.6	269.0	G2-2	G3-6
<i>P. gigantea</i>	Kor06	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	60.8	434.2	G1-3	G3-1
<i>P. gigantea</i>	Kor07	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	62.6	416.9	G1-5	G3-2
<i>P. gigantea</i>	Kor08	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	61.7	375.6	G2-4	G3-7
<i>P. gigantea</i>	Kor09	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	61.0	348.4	G1-7	G3-3
<i>P. gigantea</i>	Kor10	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	60.8	312.0	G2-6	G4-1
<i>P. gigantea</i>	Kor11	3/11/2016	N37°46'18.4"/E128°57'5.6" (East/Japan Sea)	59.7	295.5	G2-7	G3-9
<i>T. parvula</i>	KJH5-1	7/30/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	25.9	53.7		KJH9-1
<i>T. baltica</i>	KJH5-2	7/30/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	40.8	68.1	KJH8-2	KJH9-2
<i>A. norvegica</i>	KJH6-1	7/30/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	25.4	36.2	KJH8-3	KJH9-3
<i>L. bottnicus</i>	KJH6-2	7/30/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	38.0	215.1		KJH9-4
<i>T. parvula</i>	KJH11-1	7/16/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	21.5	53.2		
<i>T. acuminata</i>	KJH11-2	7/16/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	24.8	52.2		
<i>T. karajacensis</i>	KJH11-3	7/16/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	67.4	38.4		
<i>L. pellucidus</i>	KJH11-4	7/15/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	39.0	167.9		

<i>T. major</i>	KJH11-5	7/15/2017	N78°55'42.5"/E11°56'18.5" (Greenland Sea)	29.6	38.5		
<i>P. parumdentata</i>	KJH11-6	7/14/2017	N78°55'40.9"/E11°56'11.8" (Greenland Sea)	63.6	93.4		
<i>A. norvegica</i>	KJH11-7	7/20/2017	N78°55'40.9"/E11°56'11.8" (Greenland Sea)	25.5	44.2		
<i>T. beroidea</i>	KJH11-8	7/23/2017	N78°55'40.9"/E11°56'11.8" (Greenland Sea)	39.0	61.6		
<i>C. antarctica</i>	M49-1	1/12/2017	S62°12'58.4"/W58°47'57.2" (Antarctic Sea)	36.8	78.6		M58-1
<i>C. antarctica</i>	M49-2	1/12/2017	S62°12'58.4"/W58°47'57.2" (Antarctic Sea)	41.0	77.9	M52-5	M58-2
<i>Cymatocylys</i> sp.	M49-3	1/12/2017	S62°12'58.4"/W58°47'57.2" (Antarctic Sea)	91.0	143.1		M53-3
<i>Cymatocylys</i> sp.	M50-1	1/10/2017	S62°13'19.2"/W58°47'14.7" (Antarctic Sea)	94.6	130.5		M54-3



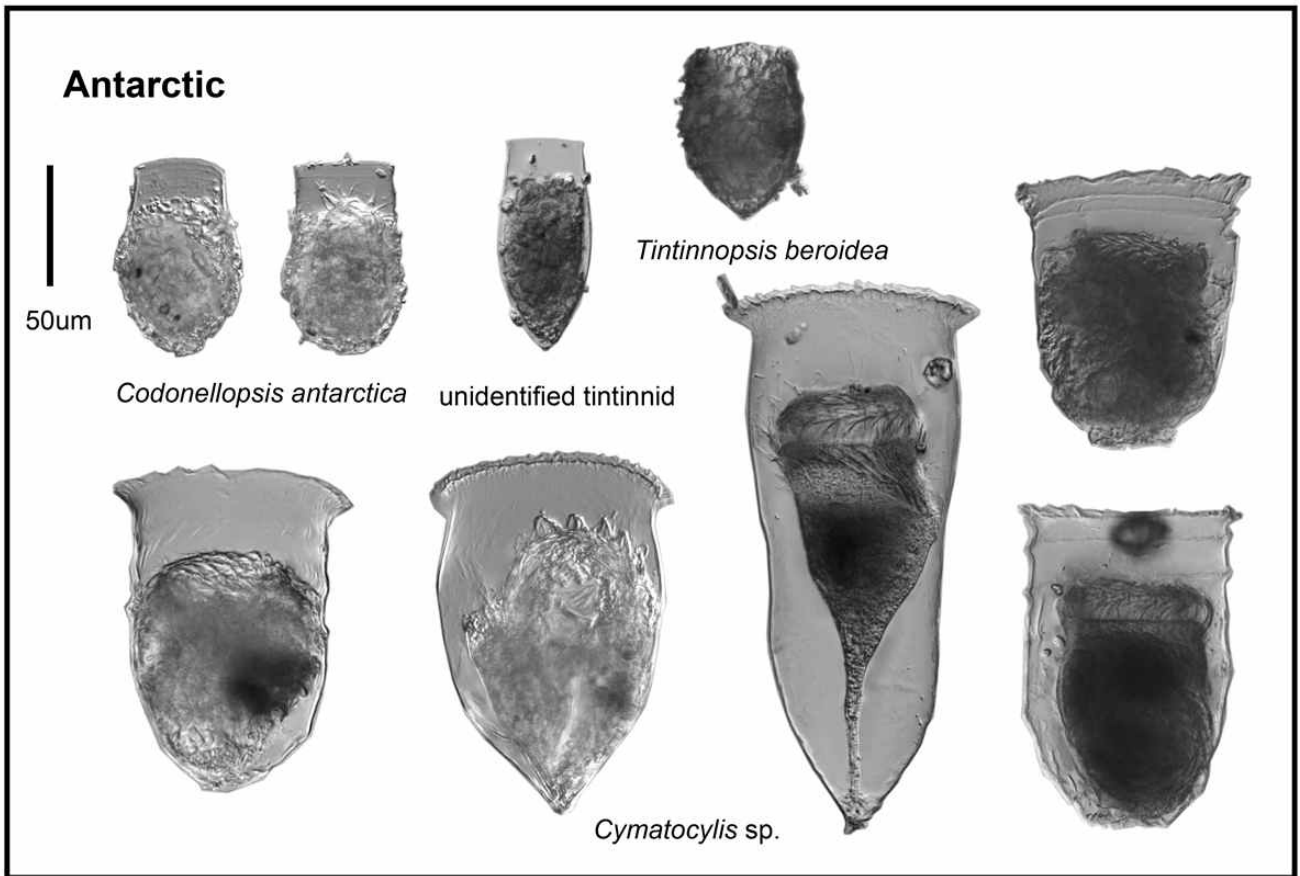
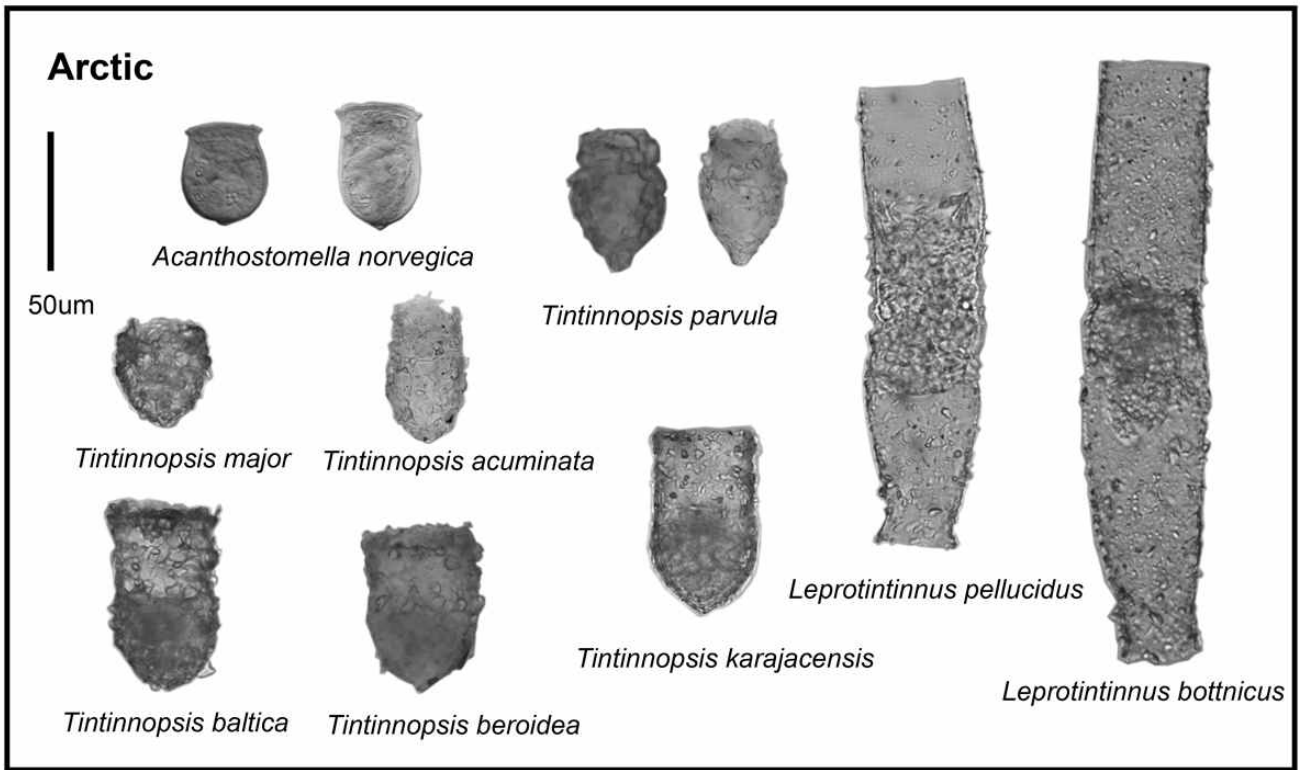


그림 4. 남극 세종기지와 북극 다산기지 연안에서 채집된 유충섬모충류 사진.



그림 5. *Parafavella* 시료 채집지. 다산기지 연안, 동해 연안과 아라온호로부터 시료 확보.

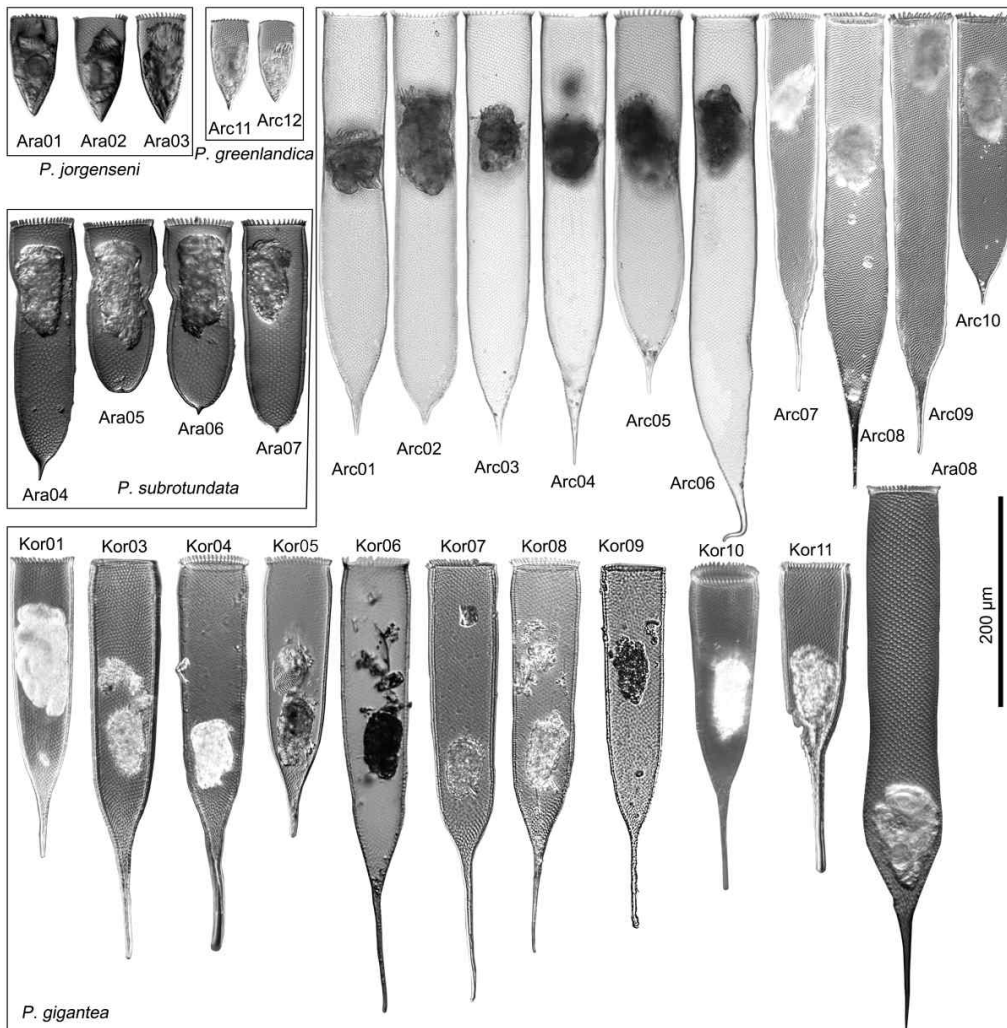
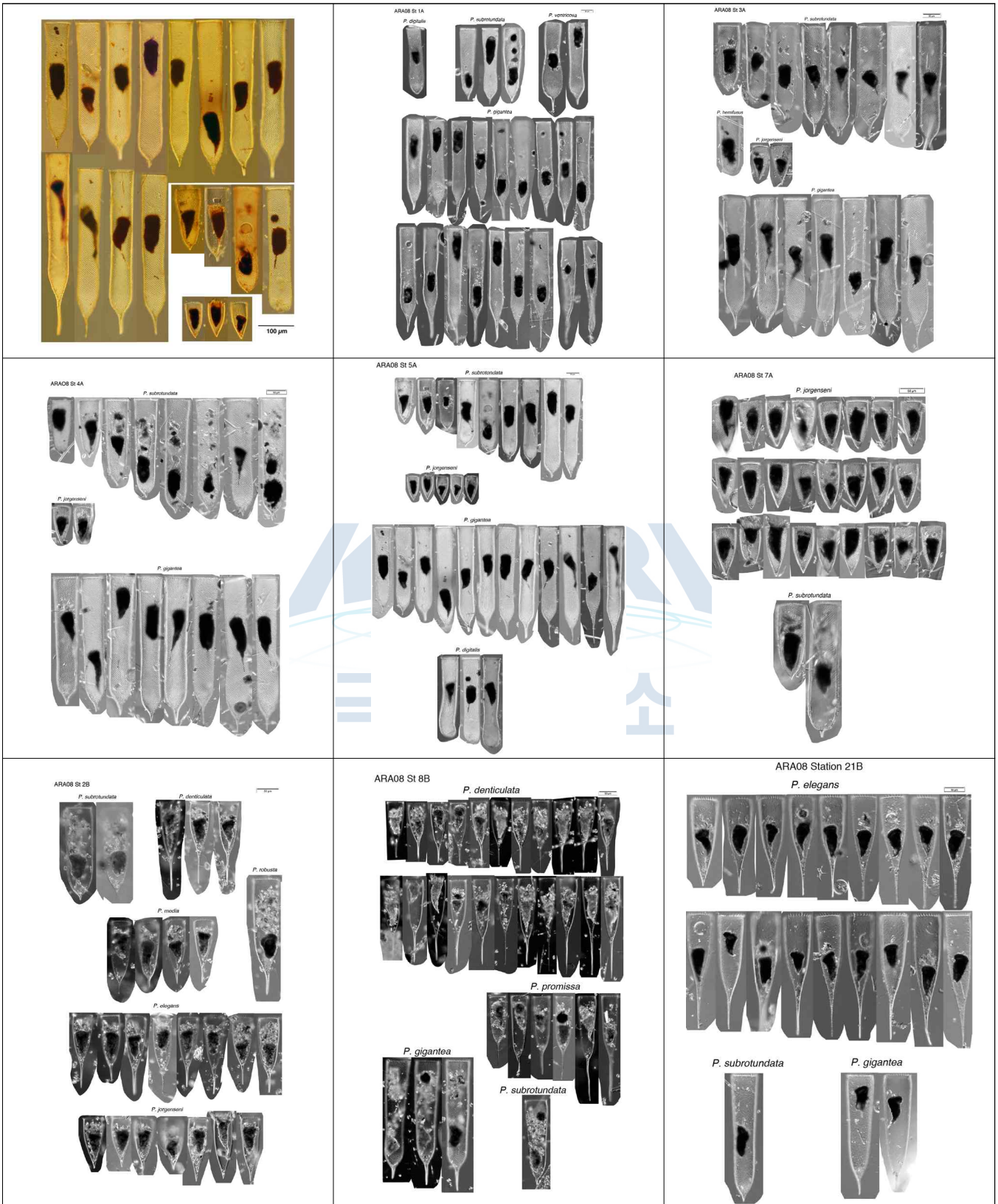


그림 6. *Parafavella* 표본 사진. 그림 5에서 채집된 표본.



2012년과 2017년에 아라온호를 통해 채집된 *Parafavella* 시료 사진.



다. 기생충(와편모조류)에 대한 신규 바코드 부위 선정 및 실험조건 확립

- 숙주 및 기타 다른 진핵생물이 혼합된 표본에서 기생충의 마커 유전자만 선별적으로 탐색 가능(그림 7, 8)
- 국내 표본을 활용하여 마커부의 검출에 대한 검증 완료
- 기생충 DNA 바코드 논문은 올해 Ocean Science Journal 학술지를 통해 출판됨(증빙6)

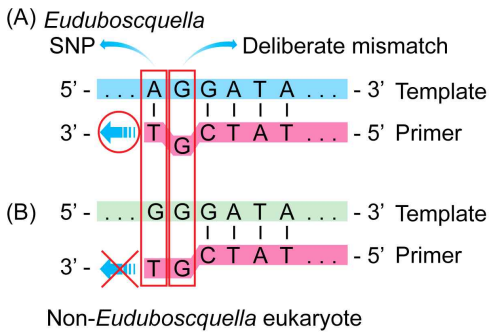


그림 7. 혼합된 gDNA에서 기생충만을 선택적 염기서열 분석할 수 있도록 디자인된 프라이머의 모식도.

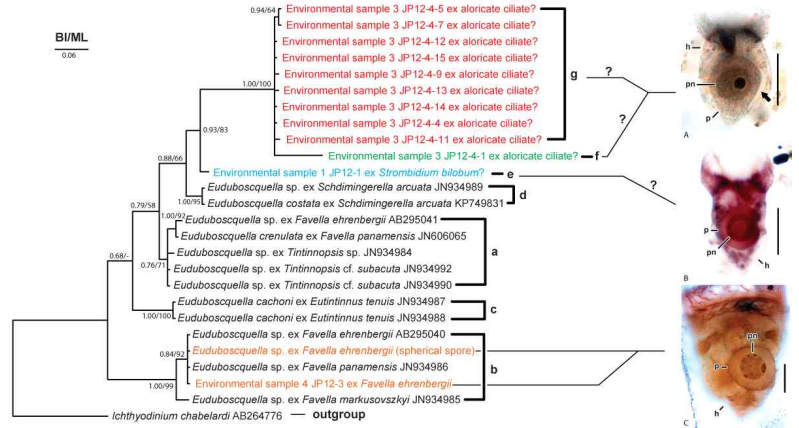


그림 8. 기생충 특이 프라이머를 적용 결과. 감염된 섬모충류(숙주)로부터 기생충 유전자를 확보하여 계통수 분석을 실시.

라. 기생충 종식별 기술 개발(프로타골 프레파라트 제작)

- 2013년 미국과 중국에서 보고한 프로타골 합성을 재현한 결과, 해당 방법은 재현성이 떨어지고 매번 다른 실험 결과가 나타남. 이에 따라 2013년에 보고된 기술을 개량하기로 목표를 변경(기 보고함).
- 기생충은 물론 숙주생물의 종식별을 위해서는 프로타골 프레파라트 제작이 필수적이기에 프로타골 합성법을 새로 제시하여 해당 결과를 Animal Cells and Systems 학술지에 보고함(증빙2).
- 2017년 우크라이나 연구진이 해당 프레파라트 제작을 위한 신규 연구방법을 제시하였으나 본 연구진이 재현한 결과, 재현성이 떨어짐.
- 본 연구팀이 개발한 프로타골 합성법 및 프레파라트 제작법은 우수한 염색 결과(그림 9)를 보여주었으나 장기 보관되어 있던 시료에 대해서는 효율성이 떨어져 이에 대한 보완책이 차후 필요할 것으로 보임. 또한 우크라이나 연구진과의 연구교류를 통해 이에 대한 공동 해결책 모색이 필요함.



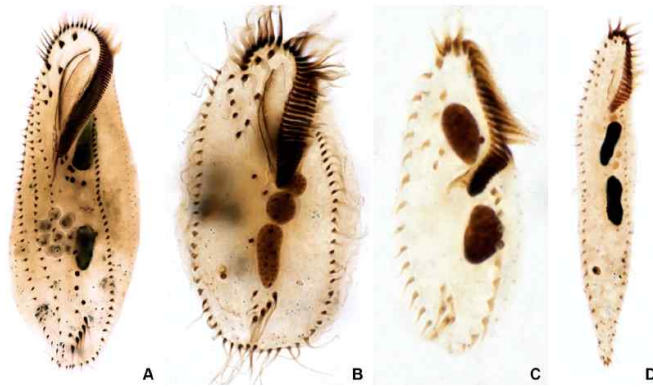


그림 9. 프로타콜 프레파라트의 염색된 표본 사진.

마. 형태분류 및 관련 실험에 대한 자문 요청 및 공동연구 수행(그림 10)

- 울산대학교 김지혜 연구교수, 이집트 Al Azhar 대학 Atef Omar 교수: 자유생활형 및 외부 기생형 섬모충류에 대한 실험방법 및 종동정 노하우에 대해 자문요청
- 프랑스 소르본 대학 John R. Dolan 교수: DNA 바코드를 적용한 유종섬모충류 *Parafavella* 논문을 공동 집필 중



그림 10. 연구진 사진. 왼쪽부터 정재호 교수(연구책임자), Atef Omar 교수(Al Azhar 대학), 문지혜(연구원), 김지혜 연구교수(울산대).

바. 바코드를 활용 가이드라인(증빙자료 8)

- 지면관계상 증빙자료 8에 해당 내용 기재

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 목표달성도

구 분	%	성취도 판단			특기사항 (우수성 또는 부진사유 등)
		부진	정상	우수	
2016년도 목표 달성도	100			✓	
2017년도 목표 달성도	100			✓	SCI(E) 논문 6편 출판으로 목표 초과달성
최종목표 대비 달성도	100			✓	

#### 1. 정성적 성과

##### - 2016년도 정성적 성과

연구개발목표	달성내용	달성도	증빙자료 설명/제출 (필요시)
○ 바코드 유전자 선정	기존 바코드 부위 종식별 해상력 분석 및 신규 바코드 부위 탐색	100 %	
○ 최적화된 DNA 바코드 실험 프로토콜 구축	선정된 바코드 부위에 대한 최적화된 PCR 조건 선별	100 %	
○ 표본 스크리닝	표본 스크리닝을 통해 유전자 추출을 위한 표본에 대한 사진 확보 및 분리작업 수행	100 %	

##### - 2017년도 정성적 성과

연구개발목표	달성내용	달성도	증빙자료 설명/제출 (필요시)
○ DNA 바코드 적용(숙주)	- 숙주 표본으로부터 사진 확보 및 바코드 유전자 확보	100 %	
○ 기생충 종식별을 위한 기술 개발	- 프로타콜 합성법 개량 - 세포 염색법 개량	100 %	
○ <i>Parafavella</i> 사례연구 수행	- 형태분류학적 오류 해결을 위한 사례연구로서 해당 바코드 부위에 대한 해상력 검증 및 다른 사례로 확장가능성 타진	100 %	
○ 바코드에 기반한 연구 활용 가이드라인 제시	- 표본 채집, 유전자 분석 및 세포염색 기법에 대한 프로토콜 제시	100 %	

2. 2개년 정량적 성과

- 2016년도 정량적 성과

구 분		목표(건)	달성 실적(건)	주저자 실적	달성도		증빙자료(제출)*	비고
국외 논문	SCI	1	1	주저자 1	100	%	증빙1	
	SCIE					%		
국내 논문	SCI					%		
	SCIE					%		
특 허 출 원								
기 타								

- 2017년도 정량적 성과

구 분		목표(건)	달성 실적(건)	주저자 실적	달성도		증빙자료(제출)*	비고
국외 논문	SCI	2	4	주저자 4	200	%	증빙3, 4, 5, 7	
	SCIE					%		
국내 논문	SCI					%		
	SCIE	0	2	주저자 2	200	%	증빙2, 6	기존 목표가 0이었기에 임의로 200%로 표기함
특 허 출 원								
기 타								

3. 인력양성 추진 내용

가. 연도별 목표대비 달성내역

- 2016년도 인력양성 추진실적

(명)

구 분	석사(석사과정)		박사(박사과정)		계	
	목표	달성	목표	달성	목표	달성
인 원	1	0*	0	0	1	0*

\*, 김지영 학생의 석사과정 중도 포기(개인적 사유)로 인해 목표달성 불가함. 관련 실험은 문지혜학생 ('17년 1학기 입학, 석사과정)이 이어받아 연구를 진행함. 해당 사항은 중간진도보고 때 기보고함.

- 2017년도 인력양성 추진실적

(명)

구 분	석사(석사과정)		박사(박사과정)		계	
	목표	달성	목표	달성	목표	달성
인 원	0	0	0	0	0	0

나. 달성 및 활용실적

과제 참여연구원				주요 활용실적
소속	이름	전공	학위	
강릉원주대 생물학과	문지혜	원생동물 계통분류학	석사과정	-17년 1~2월 남극세종기지 주변의 해양 원생동물을 채집함 -17년 7~8월 북극다산기지 주변의 해양 원생동물을 채집함 -양극지 기지에서 채집한 시료와 아라온호 시료 분석에 참여함 -대조군으로 사용될 국내 표본의 채집 및 분석에 참여함 -19년 2월 졸업 예정(석사학위 취득)



## 제 2 절 연구개발결과의 우수성 및 대외기여도

- 숙주생물의 근연종간에 높은 종식별 해상력을 가진 신규 바코드 부위 확보 및 실험조건 확립
  - 기존 원생동물에는 적용하지 못했던 '미토콘드리아 CO1 유전자'로 구성된 신규 바코드 부위 확보
  - 기본 바코드 부위의 종식별 한계가 극지생물에서 재차 확인됨에 따라 신규 바코드의 중요성이 더욱 강조됨
  - 해당 연구결과는 Mitochondrial DNA Part A 학술지에 온라인으로 출판됨
- 기생충(와편모조류)에 대한 신규 바코드 부위 선정 및 실험조건 확립
  - 숙주생물의 gDNA가 혼합된 조건하에서도 기생충 종만을 선별적으로 종식별 가능케 함
  - 국내 대조군 표본에서 이를 검증하였으며, 해당 연구결과는 Ocean Science Journal 학술지를 통해 발표함
- 숙주와 기생충 종식별 기술 개발
  - 생산중단된 프로타콜 시약을 실험실 내에서 합성할 수 있는 방법을 제시
  - 기존 보고된 합성법들이 재현성이 떨어져 이를 개량한 방법을 제시하였으며, 숙주와 기생충 연구에 필수적인 화학물질이므로 관련 학계에 의미 있는 논문으로 판단됨
  - 해당 연구결과는 Animal Cells and Systems 학술지를 통해 발표함
- *Parafavella* spp. 사례연구 수행
  - 다산기지, 아라온호 시료, 동해 시료에서 확보한 숙주생물(*Parafavella* spp.)에 대해 신규 바코드 마커를 적용함
  - 그 결과, 기존 종식별 DNA 마커의 한계를 확인함과 동시에 신규 개발한 마커의 해상력을 검증함
  - 프랑스 소르본 대학의 Dolan 교수와 공동연구를 수행 중에 있으며 해당 연구결과는 Zoological Scripta 학술지에 투고할 예정
  - 본 사례연구의 중요성은 기존의 분류체계가 경우에 따라 상당부분 오류를 내포하고 있고 이를 해결하기 위해서는 본 연구과제를 통해 개발된 신규 마커의 활용이 필수적임을 나타냄
  - 북극해에는 1885년부터 현재까지 89종의 유종섬모충류가 보고되었지만 해당 결과에 대한 재검증이 요구되며, 검증과정에서 신규 마커의 활용이 필수

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 활용방안

#### 1. 극지 원생동물에 대한 고해상도 종식별 기법 제시

- 형태분류학자가 아닌 일반 연구진도 활용 가능한 표준화된 종식별 DNA 바코드 시스템 제시:
  - 학부생 수준에서 재현실험 가능하고, 형태분류학적 모호한 표현이 아닌 DNA 염기서열('A' 'T' 'G' 'C')에 기반한 명확한 종식별 기준점을 제공하여 언제든지 종식별 및 근연종과의 비교를 가능케 함
- 원생생물 종식별에 적합한 신규 DNA 바코드로서의 유전자 활용 가이드라인 제시:
  - 각 유전자별 종식별 해상력 결과를 제공함으로써, 타 연구 진행에 있어 적합한 유전자 선택 시 기준으로 활용 가능
- 표본의 형태 데이터와 DNA 바코드를 통합한 정밀한 종식별 원천 DB 제시를 통해 향후 종식별에 대한 기준점 제시(논문)

#### 2. 고해상도 종식별에 기반을 둔 생태학적(정량적) 활용

- 생태계 변화에 의한 극지 원생동물 종조성 변화 모니터링 기법으로 활용:
  - 고해상도의 종식별 마커를 통해 표준화된 모니터링 기법 기반 제공. 이를 통해 생태계 변화에 의한 종조성 변화 및 외래종 유입에 대한 감시 기법으로 활용
  - 환경지표종을 활용하여 극지 생태계 모니터링
- 극지 생태계의 기생충 감염에 의한 생태계 건강성 평가 및 이머징 병원체에 대한 기초 자료 확보:
  - 기생충 감염에 의한 생태계 영향 모니터링
  - 해당 기생충은 거의 모든 해역에서 발견되는 것으로 판단되지만, 전세계적으로 미개척 분류군으로서 연구의 진척이 미진한 상황. 이에 따라 국제공동연구진과의 협력을 통해 극지환경에 출현하는 기생충의 정확한 종식별과 숙주와의 상관성 규명은 관련 연구의 질적 향상을 도모할 수 있음

#### 3. 극지 원생동물에 대한 학술적 접근 확장

- 본 과제를 통해 형태적으로 논란이 있는 종들의 종식별 문제를 해결함으로써, 종수준에 기반한 계통분류학적·생태학적·진화학적 연구의 기반을 견고히 할 수 있을 것으로 판단됨
- *Parafavella* 사례연구를 기반으로 종식별 문제를 내포한 유종섬모충류의 계통분류학적 문제 해결:
  - 사례연구를 통해 유종섬모충류에 다분히 존재하는 종식별 문제에 대해 해결책을 강구함으로써, 타 유종섬모충류의 문제도 해결할 수 있을 것으로 판단됨
  - 사례연구를 모델 삼아 계통분류학적으로 문제가 있는 유종섬모충류에 적용하고자 함
- 전세계적 연구 선도권 확보를 통해 향후 관련 생물을 활용한 연구 연속성 기반 구축:
  - 특히, 본 연구과제에서 중점을 두는 기생충 연구는 전세계적으로 미개척 분류군에 속하지만, 생태적으로 숙주생물에 대한 높은 감염력 및 이에 따른 과급효과로 인해 해양생태계 먹이그물망 내 교란을 유발함. 해당 연구과제가 도출할 표준화된 종식별 체계는 앞으로 관련 연구를 수행하는데 있어 최소 종식별에 한해서 신뢰도를 뒷받침할 수 있을 것으로 판단됨

## 제 2 절 기대효과

### 1. 방대한 극지인프라를 활용하여 효율적인 신규 연구과제 창출

- 원생생물은 극지와 같은 극한환경에서도 우점 할 정도로 폭넓은 생태적 지위를 갖고 있지만 그 연구가 미비함, 게다가 본 연구를 통해 기존에 알려진 종식별 결과에 많은 문제가 내포되었음을 확인함
- 현재까지 알려진 유종섬모충류에 대한 전면 재검토가 필요한 상황, 즉 본 과제의 연구결과를 활용하여 기존 생태/분류 연구결과에 대한 오류 수정이 필요함, 예를 들어 북극과 동해에 동일한 유종섬모충 *P. gigantea*가 출현하지만 유전자 분석 결과 이들은 전혀 다른 종이 확인됨
- 본 연구과제에서 개발된 숙주생물의 DNA 바코드는 유종섬모충류에 대해서 전세계적으로 적용된 바 없기에 해당 연구는 국제적으로 주도적으로 연구 아이টে를 제공
- 이들 생물에 관한 연구수행에 있어 추가 장비 및 추가 인프라 구축이 불필요하여 기존 체계 하에서 효율적인 연구수행이 가능하며 따라서 추가 인프라 없이 국제적으로 주도 가능한 연구 가능
- 특히, 유종섬모충류의 경우 기존 아라온호 매 항차에서 채집하여 보관하고 있는 표본을 활용할 수 있기에 보다 연구의 확장이 용이함
- 본 과제에서는 부유성 원생생물에 초점을 맞추었지만 해당 바코드는 저서성 원생생물에게도 적용 가능하기에 극지연구소 기지 기반 육상 생물에 적용가능

### 2. 신규 연구인력 양성

- 원생생물은 극지에서조차 흔하게 관찰 가능하지만 그 크기가 작고 다루기 까다로워 그간 연구가 미비하였으며 또한, 관련 연구인력이 적은 실정
- 본 연구과제의 2년간 수행을 통해 석사급 연구인력을 양성(2019년 2월 학위수여, 문지혜)
- 또한, 양성된 연구인력으로 하여금 본 신규 연구과제에 대해 일회성이 아닌 지속적인 수행을 가능케 하고 극지 인프라를 효율적으로 활용 가능할 것으로 판단됨

## 제 3 절 연구종료후 성과창출 계획

구분	주요내용	의의(시사점)	비고
논문	1년 이내 SCI급 논문 1편 생산	전세계 최초로 유종섬모충류에 바코드를 적용한 연구 사례 발표	해당 PAP 사업의 사사 기재
지적재산권			
인력양성	극지원생물분야 전문가 양성(문지혜 학생: 2019년 2월 석사학위 취득 예정)	현재 극지연에 없는 연구인력임. 향후 분자생태학분야로의 전문인력으로서의 인력양성 예상	
기타			



## 제 6 장 참고문헌

- Coats, D.W., 1999. Parasitic life styles of marine dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 402–409.
- Coats, D.W., Bachvaroff, T.R., 2013. Parasites of tintinnids, in: Dolan, J.R., Montagnes, D.J.S., Agatha, S., Coats, D.W., Stoecker, D.K. (Eds.), *The biology and ecology of tintinnid ciliates. Models for marine plankton.* John Wiley, Chichester, pp. 145–170.
- Coats, D.W., Kim, Y.O., Choi, J.M., Lee, E.S., 2014. Observations on dinoflagellate parasites of aloricate ciliates in Korean coastal waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 72, 89–97.
- Davis, C.C., 1978. Variations of the lorica in the genus *Parafavella* (Protozoa: Tintinnida) in northern Norway waters. *Canadian Journal of Zoology* 56, 1822–1827.
- Foissner, W., Chao, A., Katz, L.A., 2008. Diversity and geographic distribution of ciliates (Protista: Ciliophora). *Biodivers. Conserv.* 17, 345–363.
- Jung, J.-H., Choi, J.M., Coats, D.W., Kim, Y.-O., 2016. *Euduboscquella costata* n. sp. (Dinoflagellata, Syndineia), an intracellular parasite of the ciliate *Schmidingerella arcuata*: Morphology, molecular phylogeny, life cycle, prevalence, and infection intensity. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63, 3–15.
- Jung, J.-H., Park, M.-H., Kim, S.Y., Choi, J.M., Min, G.-S., Kim, Y.-O., 2017. Checklist of Korean ciliates (Protozoa: Ciliophora). *J. Species Res.* 6, 241–257.
- Pan, X., Bourland, W.A., Song, W., 2013. Protargol synthesis: An in-house protocol. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 609–614.
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S.S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A.M., Gile, G.H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P.J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Luke, J., Mann, D.G., Mitchell, E.A.D., Nitsche, F., Romeralo, M., Saunders, G.W., Simpson, A.G.B., Smirnov, A.V., Spouge, J.L., Stern, R.F., Stoeck, T., Zimmermann, J., Schindler, D., de Vargas, C., 2012. CBOL protist working group: Barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *Plos Biol.* 10, e1001419.
- Petz, W., 1997. Ecology of the active soil microfauna (Protozoa, Metazoa) of Wilkes Land, East Antarctica. *Polar Biol.* 18, 33–44.
- Santoferrara, L.F., McManus, G.B., Alder, V.A., 2013. Utility of genetic markers and morphology for species discrimination within the order Tintinnida (Ciliophora, Spirotrichea). *Protist* 164, 24–36.
- Santoferrara, L.F., Grattepanche, J.-D., Katz, L.A., McManus, G.B., 2016. Patterns and processes in microbial biogeography: do molecules and morphologies give the same answers? *ISME J* 10, 1779–1790.
- Stoeck, T., Przybos, E., Dunthorn, M., 2014. The D1-D2 region of the large subunit ribosomal DNA as barcode for ciliates. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 458–468.



# 제 7 장 증빙자료

## 증빙1



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Protistology 59 (2017) 114–123

European Journal of  
PROTISTOLOGY

[www.elsevier.com/locate/ejop](http://www.elsevier.com/locate/ejop)

## Morphology, morphogenesis, and molecular phylogeny of *Pleurotricha oligocirrata* nov. spec. (Ciliophora: Spirotrichea: Stylonychinae)

Mi-Hyun Park<sup>a,1</sup>, Ji Hye Moon<sup>b,1</sup>, Ki Nam Kim<sup>b</sup>, Jae-Ho Jung<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon, South Korea

<sup>b</sup>Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea

Received 5 January 2017; received in revised form 7 April 2017; accepted 8 April 2017  
Available online 17 April 2017

### Abstract

*Pleurotricha oligocirrata* nov. spec. was discovered in samples collected from a freshwater wetland in Korea and is described here based on its morphology, morphogenesis, and the nucleotide sequence of its nuclear small subunit ribosomal rRNA (SSU rRNA) gene. In its genus, *P. oligocirrata* is the only species that possesses one right marginal cirral row. The morphology of *P. oligocirrata* is as follows: body size 98–148 × 47–72 μm in protargol preparations, colourless and rigid body; contractile vacuole anterior of mid-body near left margin; cortical granules lacking; two macronuclear nodules with two micronuclei; undulating membranes in *Oxytricha* pattern; 50–62 adoral membranelles, 23–27 frontal-ventral-transverse cirri, one left and one right marginal cirral row; six or seven dorsal kineties, including dorsomarginal rows, with three caudal cirri. The genetic distances between *P. oligocirrata* and its congeners *P. curdsi* and *P. lanceolata* were 0.257%–0.386% (4–6 nt difference) and 0.064% (1 nt difference), respectively.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Ciliate; Korea; New species; SSU rRNA gene

### Introduction

The genus *Pleurotricha* Stein, 1859 belongs to the Stylonychinae Berger and Foissner, 1997 and comprises three species: *P. curdsi* (Shi et al., 2002) Gupta et al., 2003; *P. grandis* Stein, 1859; and *P. lanceolata* (Ehrenberg, 1835) Stein, 1859 (type species) (Berger 1999; Gupta et al. 2003; Lu et al. 2015). According to Berger (1999), *Pleurotricha* species lack caudal cirri; however, Gupta et al. (2003) and Berger (personal communication in Gupta et al. 2003) have

subsequently noted the occurrence of caudal cirri in *P. curdsi* and *P. lanceolata*, respectively.

Within the genus *Pleurotricha*, *P. curdsi* has been well characterized, based on modern techniques (i.e., silver staining, morphogenesis, DNA sequencing; Gupta et al. 2003; Lu et al. 2015; Xu et al. 2015), and rDNA sequences of *P. lanceolata* are also available in GenBank. In addition, the genus has also been reported as monophyletic (Lu et al. 2015; Xu et al. 2015).

During an investigation of ciliate diversity in Korea, we discovered a new species in *Pleurotricha*. It was identified based on live observations, protargol preparations, and scanning electron microscopy. In addition, the rDNA sequence of

\*Corresponding author.

E-mail address: [jhjung@gwnu.ac.kr](mailto:jhjung@gwnu.ac.kr) (J.-H. Jung).

<sup>1</sup>These authors equally contributed to this work.



ral rows, and number of FVT cirri (17–21 vs. 23–27; Berger 1999; Gupta et al. 2003).

As depicted by the phylogenetic tree (Fig. 6), the genetic distance between *Pleurotricha* species precludes discrimination based on SSU rDNA, even though the species can be easily distinguished by conspicuous diagnostic characters, such as the number of right marginal cirral rows in *P. oligocirrata*. Therefore, genetic markers that provide higher resolution are necessary for applications that do not involve morphological analysis (e.g., high-throughput sequencing).

### Improved diagnosis of *Pleurotricha* Stein, 1859

Stylonychinae with undulating membranes in *Oxytricha* pattern. Usually six cirral anlagen developed during morphogenesis; 18 or more FVT cirri. One or more right and one or more left marginal cirral rows. Dorsal kinety 3 fragmented; caudal cirri present. Dorsomarginal kineties present.

### Acknowledgements

This work was supported by the Korea Polar Research Institute (KOPRI, grant no. PD16010); and the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (grant no. NIBR201601201).

### References

- Berger, H., 1999. Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). Monogr. Biol. 78, i–xii, 1–1080.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772.
- Foissner, W., 2014. An update of ‘basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa’. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 271–292.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59, 307–321.
- Gupta, R., Kamra, K., Arora, S., Sapra, G.R., 2003. *Pleurotricha curdsi* (Shi, Warren and Song 2002) nov. comb. (Ciliophora: Hypotrichida): morphology and ontogenesis of an Indian population; redefinition of the genus. Eur. J. Protistol. 39, 275–285.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95–98.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends Biochem. Sci. 23, 403–405.
- Jung, J.-H., Park, K.-M., Min, G.-S., 2012. Morphology, morphogenesis, and molecular phylogeny of a new brackish water ciliate, *Pseudourostylo cristatooides* n. sp., from Songjiho lagoon on the coast of East Sea, South Korea. Zootaxa 3334, 42–54.
- Jung, J.-H., Park, K.-M., Min, G.-S., 2014. Morphology and molecular phylogeny of *Pseudouroleptus jejuensis* nov. spec., a new soil ciliate (Ciliophora, Spirotrichea) from South Korea. Acta Protozool. 53, 195–206.
- Lu, X., Shao, C., Yu, Y., Warren, A., Huang, J., 2015. Reconsideration of the ‘well-known’ hypotrichous ciliate *Pleurotricha curdsi* (Shi et al., 2002) Gupta et al., 2003 (Ciliophora, Sporadotrichida), with notes on its morphology, morphogenesis and molecular phylogeny. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 3216–3225.
- Lynn, D.H., 2008. The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature. Springer, New York.
- Lynn, D.H., Strüder-Kypke, M.C., 2006. Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rRNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene sequences. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 385–387.
- Pan, X., Bourland, W.A., Song, W., 2013. Protargol synthesis: an in-house protocol. J. Eukaryot. Microbiol. 60, 609–614.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 61, 539–542.
- Shi, X., Warren, A., Song, W., 2002. Studies on the morphology and morphogenesis of *Allotricha curdsi* sp. n. (Ciliophora: Hypotrichida). Acta Protozool. 41, 397–405.
- Sonnenberg, R., Nolte, A.W., Tautz, D., 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. Front. Zool. 4, 6.
- Stoeck, T., Przybos, E., Dunthorn, M., 2014. The D1-D2 region of the large subunit ribosomal DNA as barcode for ciliates. Mol. Ecol. Resour. 14, 458–468.
- Strüder-Kypke, M.C., Lynn, D.H., 2010. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. Syst. Biodivers. 8, 131–148.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731–2739.
- Xu, Y., Li, L., Fan, X., Pan, H., Gu, F., Al-Farraj, S.A., 2015. Systematic analyses of the genus *Architricha* and *Pleurotricha curdsi* (Ciliophora Oxytrichidae), with redescription of their morphology. Acta Protozool. 54, 183–193.
- Yi, Z., Chen, Z., Warren, A., Roberts, D., Al-Rasheid, K., Miao, M., Gao, S., Shao, C., Song, W., 2008. Molecular phylogeny of *Pseudokeronopsis* (Protozoa Ciliophora, Urostylella), with reconsideration of three closely related species at inter- and intra-specific levels inferred from the small subunit ribosomal RNA gene and the ITS1-5.8 S-ITS2 region sequences. J. Zool. 275, 268–275.



## Cytological staining of protozoa: a case study on the impregnation of hypotrichs (Ciliophora: spirotrichea) using laboratory-synthesized protargol

Ji Hye Kim <sup>a</sup> and Jae-Ho Jung <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Natural Science Research Institute, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea; <sup>b</sup>Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea

### ABSTRACT

Protargol (silver proteinate) impregnation is a common method used to identify and characterize ciliated protozoa. Unfortunately, chemical companies have stopped producing the ‘strong’ protargol powder used in this method. Based on an in-house protocol for its synthesis published in 2013, more than 10 batches of protargol powder were produced and subsequently applied in taxonomic studies. During these studies, the protocol for protargol powder synthesis was slightly modified and employed a peptone not originally listed in the 2013 protocol. This modification improved the results of the impregnation protocol. Protargol preparations of hypotrichs were optimized by adjusting the pH during staining rather than during the synthesis. The pH was adjusted to 7.5–7.6, and an acetone developer was used. While the conditions used in this study are not completely comparable to those using the commercially produced protargol, access to this information could help researchers investigate the diversity of ciliates, particularly hypotrichs.

### ARTICLE HISTORY

Received 9 July 2017  
Revised 1 September 2017  
Accepted 3 September 2017

### KEYWORDS

Infraclature; species identification; silver proteinate; silver staining



### Introduction

Taxonomical and ecological studies on ciliated protozoa have been performed using a number of methods, including live observation, silver carbonate impregnation, scanning electron microscopy, and supravital staining, protargol, and dry and wet silver nitrate impregnation. These techniques have been modified and improved in several studies (Chatton and Lwoff 1930, 1936; Tuffrau 1964, 1967; Wilbert 1975, 1976; Fernandez-Galiano 1976; Foissner 1976, 1991, 2014; Dieckmann 1995; Silva-Neto 2000; Ma et al. 2003; Vdacny and Foissner 2012). Among these methods, protargol impregnation is a key approach used to identify and describe ciliate species (Corliss 1979; Lynn 2008; Foissner 2014). Unfortunately, ‘strong’ silver proteinate, which is an effective staining tool, is no longer commercially available (Pan et al. 2013). Therefore, ciliate taxonomists and ecologists may have to synthesize the protargol themselves (Pan et al. 2013).

Pan et al. (2013) published a protocol for synthesizing protargol that could be subsequently used to study ciliate diversity. To the best of our knowledge, this is the most recent publication aiding optimization and standardization of this technique. Based on this protocol, our group synthesized protargol more than 10 times. In

their protocol, Pan et al. (2013) assessed five peptones for protargol synthesis; however, we were unable to locate an official supplier for some of these in Korea. Of the available peptones, three were tested: oxid tryptone (Fisher Scientific), peptone (Beijing Aoboxing), and peptone from gelatin (Sigma-Aldrich). However, use of protargol synthesized with these peptones resulted in insufficient impregnation of ciliatures and the nuclear apparatus, compared with the commercial protargol, when an ordinary developer was used in the process of ‘Procedure A’ (Foissner 2014). Importantly, estimation of stained specimen quality is subjective and is somewhat user-dependent and depends on the taxon being studied. While we have previously described characterizing hypotrichs using laboratory-synthesized protargol (Jung et al. 2015, 2016; Kim and Jung 2016; Park et al. 2017a, 2017b), we have continued to optimize this process. As mentioned by Pan et al. (2013), an optimal peptone for protargol synthesis is still awaiting our discovery. To determine the optimal conditions for studying hypotrichs, the protocol used to synthesize protargol was modified slightly and tested with another peptone not listed by Pan et al. (2013).

In this article, we briefly report modifications to optimize preparations of hypotrichous ciliates. *Pleurotricha*

**CONTACT** Jae-Ho Jung  [jhjung@gwnu.ac.kr](mailto:jhjung@gwnu.ac.kr)  Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/19768354.2017.1376707>.

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group  
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



find more optimal laboratory-synthesized protargol and an optimal condition for the Quantitative Protargol Staining (QPS; Montagnes and Lynn 1987). In particular, no tests for the QPS using the laboratory-synthesized protargol have yet been attempted.

## Conclusion

This study was performed to optimize the preparation of high-quality hypotrich specimens using laboratory-synthesized protargol. Based on our case study, protargol synthesis was modified as follows: (1) protargol powder was created without adjusting the pH during synthesis, (2) the pH of the protargol solution was adjusted to a pH of 7.5–7.6 during staining, (3) the acetone developer was more effective, and (4) a previously untried peptone derived from peas was used successfully for protargol synthesis. While the conditions used in this study to synthesize protargol are not completely comparable to commercial protargol, this information could help taxonomists/ecologists investigate the diversity of ciliates, particularly in hypotrichs. In addition, we recommend testing the pH levels to find the optimal condition for each batch of the laboratory-synthesized protargol.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Funding

This work was supported by grants from the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korea government (MSIP; Ministry of Science, ICT & Future Planning) (No. NRF-2017R1C1B5017183), the Korea Institute of Ocean Science & Technology (KIOST, grant no. PE99513) and the Korea Polar Research Institute (KOPRI, grant no. PE17900).

## ORCID

Jae-Ho Jung  <http://orcid.org/0000-0001-5497-8678>

Ji Hye Kim  <http://orcid.org/0000-0002-1603-5297>

## References

- Berger H. 1999. Monograph of the Oxytrichidae (Ciliophora, Hypotrichia). Monogr Biol. 78(i–xii):1–1080.
- Chatton E, Lwoff A. 1930. Imprégnation, par diffusion argentine, de l'infuciliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans desiccation. C R Soc Biol. 104:834–836.
- Chatton E, Lwoff A. 1936. Techniques pour l'étude des protozoaires, spécialement de leurs structures superficielles (cinétome et argyrome). B Soc Fr Microsc. 5:25–39.
- Corliss JO. 1979. The ciliated protozoa: characterization, classification and guide to the literature, 2nd ed. New York (NY): Pergamon Press.
- Davenport HA, Porter RW, Myhre BA. 1952. Preparation and test in G of silver-protein compounds. Stain Technol. 27:243–248.
- Dieckmann J. 1995. An improved protargol impregnation for ciliates yielding reproducible results. Eur J Protistol. 31:372–382.
- Fernández-Galiano D. 1976. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. Trans Amer Micros Soc. 95:557–560.
- Foissner W. 1976. Erfahrungen mit einer trockenen Silberimprägnationsmethode zur Darstellung argyrophiler Strukturen bei Protisten. Verh Zool Bot Ges. 155:68–79.
- Foissner W. 1991. Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. Europ J Protistol. 27:313–330.
- Foissner W. 2014. An update of 'basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. Int J Syst Evol Microbiol. 64:271–292.
- Jung J-H, Park K-M, Kim S. 2016. Morphology and molecular phylogeny of the soil ciliate *Anteholosticha rectangula* nov. spec. from King George Island, Maritime Antarctica. Acta Protozool. 55:89–99.
- Jung J-H, Park K-M, Min G-S, Berger H, Kim S. 2015. Morphology and molecular phylogeny of an Antarctic population of *Paraholosticha muscicola* (Kahl, 1932) Wenzel, 1953 (Ciliophora, Hypotricha). Polar Sci. 9(Special Issue: The Asian Forum for Polar Sciences (AFOPS)):374–381.
- Kim J-Y, Jung J-H. 2016. Taxonomic survey on ciliate diversity in eastern area of Kangwon-province, Korea: brief records of fifteen species unrecorded from Korea. J Species Res. 5:333–342.
- Kumar S, Foissner W. 2015. Biogeographic specializations of two large hypotrich ciliates: *Australocirrus shii* and *A. australis* and proposed synonymy of *Australocirrus* and *Cyrtohymenides*. Eur J Protistol. 51:210–228.
- Lynn D. 2008. The ciliated protozoa: characterization, classification and guide to the literature, 3rd ed. Guelph (ON): Springer.
- Ma H, Choi JK, Song W. 2003. An improved silver carbonate impregnation for marine ciliated protozoa. Acta Protozool. 42:161–164.
- Montagnes DJS, Lynn DH. 1987. A quantitative protargol stain (QPS) for ciliates: method description and test of its quantitative nature. Marine Microbial Food Webs. 2:83–93.
- Pan X, Bourland W, Song W. 2013. Protargol synthesis: an in-house protocol. J Eukaryot Microbiol. 60:609–614.
- Park M-H, Moon JH, Kim KN, Jung J-H. 2017a. Morphology, morphogenesis, and molecular phylogeny of *Pleurotricha oligocirrata* nov. spec. (Ciliophora: Spirotrichea: Stylonychinae). Eur J Protistol. 59:114–123.
- Park K-M, Jung J-H, Min G-S, Kim S. 2017b. *Pseudonotohymena antarctica* n. g., n. sp. (Ciliophora, Hypotricha), a new species from Antarctic soil. J Eukaryot Microbiol. (in press).
- Silva-Neto ID. 2000. Improvement of silver impregnation technique (protargol) to obtain morphological features of protists ciliates, flagellates and opalinated. Rev Bras Biol. 60:451–459.
- Tuffrau M. 1964. Quelques variant techniques de l'imprégnation de ciliés par le protéinate d'argent. Archs Zool Exp Gén. 104:186–190.

증빙3



## Morphology and Molecular Phylogeny of *Pseudocyrtohymenides lacunae* nov. gen., nov. spec. (Ciliophora: Oxytrichidae) from South Korea

Jae-Ho JUNG<sup>1,2,\*</sup>, Kyung-Min PARK<sup>1,3,\*</sup>, and Gi-Sik MIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon, South Korea; <sup>2</sup>Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea; <sup>3</sup>Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, South Korea

\* These authors equally contributed to this work.

**Abstract.** We collected an 18-cirri oxytrichid ciliate from the brackish lagoon Songjiho, South Korea, in March 2012. Based on analyses of morphological and molecular attributes, we conclude that it is new genus and species. *Pseudocyrtohymenides lacunae* nov. gen., nov. spec. has similar morphological attributes to the genus *Pseudocyrtohymena*, however, the former species lacks caudal cirri. The sequence similarity of the nuclear small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene was 99.4% (10 nt difference) between *Pseudocyrtohymenides lacunae* and *Pseudocyrtohymena koreana* (type species).

**Key words:** New genus, new species, Korea, SSU rRNA gene, protargol impregnation, Sporadotrichida

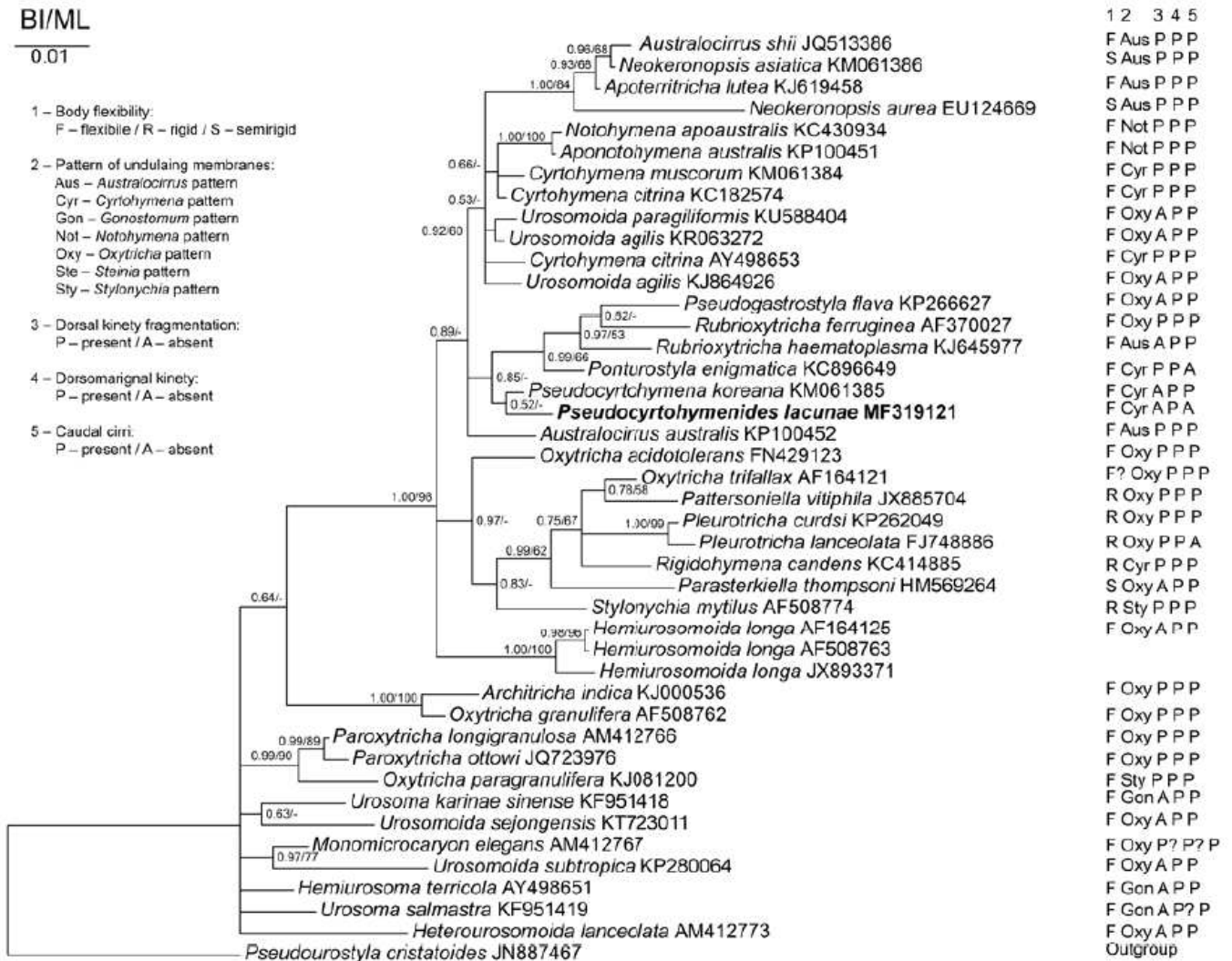
### INTRODUCTION

Oxytrichids with 18 frontal-ventral-transverse (FVT) cirri are a diverse group of ciliates (Berger 1999). The type genus *Oxytricha* Bory de Saint-Vincent in Lamouroux *et al.*, 1824 has the following morphological diagnosis: usually 18 FVT cirri; one left and one right marginal cirral row; dorsal kinety 3 fragmented (*Oxytricha* pattern) or non-fragmented (*Urosomoida* pattern); caudal cirri present; and undulating membranes in *Oxytricha* pattern (Berger 1999). Although

they have limited variation in traits such as 18 FVT cirri, new taxa are constantly being discovered, even at the genus level (Kumar *et al.* 2015, Foissner 2016, Jung *et al.* 2016a). In the Oxytrichidae Ehrenberg, 1838, it is generally found that combinations of morphological attributes (see above) define new genera, rather than single characteristics (e.g., *Aponotohymena* Foissner, 2016, *Architricha* Gupta *et al.*, 2006, *Monomicrocaryon* Foissner, 2016, *Pseudocyrtohymena* Jung *et al.*, 2015, *Quadrasticha* Foissner, 2016).

Of the recently established genera in Oxytrichidae, our new species has similar morphological attributes to the genus *Pseudocyrtohymena* that consists of the sole species *P. koreana* (monotypy) and mainly differs from the genus *Oxytricha* by its undulating membranes (*Cyrtohymena* pattern vs. *Oxytricha* pattern) (Jung *et*

*Address for correspondence:* Gi-Sik Min, Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, South Korea; Tel: +82-32-860-7692; Fax: +82-32-874-6737; Cell Phone: +82-10-6219-0752; Email: mingisik@inha.ac.kr



**Fig. 3.** Phylogenetic tree of SSU rRNA gene sequences, showing the position of *Pseudocyrtohymenides lacunae* nov. spec. on the basis of Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). Bootstrap values of ML and posterior probabilities of BI were denoted on each interior branch. If the values of the bootstrap and the posterior probability were less than 50% and 0.50, respectively, they were excluded. The scale bar represents one nucleotide substitution per 100 nt.

*Ponturostyla enigmatica* (Fig. 3). These groups all have the reduced number of caudal cirri in common; *Pseudocyrtohymena* has 1–3 caudal cirri and *Pseudocyrtohymenides* lacks the caudal cirri (1 in *P. flava*; 0 or 1 in *R. haematoplasma*; 1 or 2 in *R. ferruginea*; 0 in *P. enigmatica*) (Berger 1999, Song 2001, Fan *et al.* 2015). Based on the phylogenetic tree (Fig. 3; see the terms on the upper left), morphological attributes such as ‘2-undulation membranes’ or ‘3-dorsal kinety fragmentation’ did not exclusively separate these genera. This was expected, as with other oxytrichids, the genus *Pseudocyrtohymenides* is defined as a combination of characteristics not individual ones.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR 2013-02-001); the Korea Polar Research Institute (KOPRI, PE 17900); and the National Research Foundation of Korea (NFK) funded by the Korea government (MSIP; Ministry of Science, ICT & Future Planning) (No. NRF – 2017 R1C1B5017183).

**REFERENCES**

Alfaro M. E., Zoller S., Lutzoni F. (2003) Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Mol. Biol. Evol.* 20: 255–266



## Taxonomical reinvestigation of the colepid species *Pinacocoleps pulcher* (Spiegel, 1926) Foissner *et al.*, 2008 (Ciliophora: Prorodontida: Colepidae)

Ji Hye MOON<sup>1,\*</sup>, Ji Hye KIM<sup>2,\*</sup>, Jae-Ho JUNG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea; <sup>2</sup>Natural Science Research Institute, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea

\* Both authors contributed equally to this study.

**Abstract.** Brackish water populations of *Pinacocoleps pulcher* were collected from a lagoon in Korea. This species has never been described using silver impregnation and nuclear small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene. In the present study, we investigated the morphological and molecular attributes of *P. pulcher* using standard methods. The morphology was studied based on observations of live materials, silver-impregnated preparations, and scanning electron microscopy. The morphological characteristics are as follows: body size 80–90 × 40–50 μm *in vivo*, shape broadly ellipsoidal, body cross-section ellipsoidal, about seven anterior spines and about seven posterior spines, approximately 21 somatic ciliary rows, one macronucleus and one micronucleus, and a single caudal cilium. The SSU rRNA gene tree supports a sister relationship of *P. pulcher* to the genus *Apocoleps*, not *P. tessellatus*.

**Keywords:** ciliate, redescription, taxonomy, SSU rDNA sequences, brackish water, Korea.

### INTRODUCTION

*Pinacocoleps* Diesing, 1865 had long been forgotten until Foissner *et al.* (2008) resurrected it. Diesing (1865) defined *Pinacocoleps* as a genus with longitudinal and transversal grooves on the plates. Foissner *et al.* (2008) refined *Pinacocoleps* with six tiers and *incurvus*-type (currently *Pinacocoleps*-type) plates. Foissner *et al.* (2008) and Chen *et al.* (2010) assigned seven species to *Pinacocoleps* (Lu *et al.* 2013). Of these, only two species were described morphologically using stand-

ard methods (*P. similis* and *P. tessellatus*), and only one SSU rRNA gene sequence of *P. tessellatus* is available (Chen *et al.* 2010; Lu *et al.* 2013). Therefore, this study provides the redescription of *P. pulcher* and the SSU rRNA gene tree of Colepidae Ehrenberg, 1838 including the newly sequenced SSU rRNA gene sequences of *P. pulcher*.

### MATERIALS AND METHODS

#### Sample collection and identification

*Pinacocoleps pulcher* was collected from Songjiho lagoon in Goseong, Korea in June 2016 (salinity 15‰, 38°20'09.21" N, 128°30'57.62" E) and September 2017 (salinity 9.6‰, 38°20'09.40" N,

Address for correspondence: Jae-Ho Jung, Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea; Fax: +82-33-640-2867; E-mail: jhjung@gwnu.ac.kr



**Acknowledgements.** This work was supported by grants from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR201601201); the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korea government (MSIP; Ministry of Science, ICT & Future Planning) (No. NRF-2017R1C1B5017183); and the Korea Polar Research Institute (KOPRI, grant no. PE17900).

## REFERENCES

- Bock K. J. (1952) Über einige holo- und spirotriche Ciliaten aus den marinen Sandgebieten der Kieler Bucht. *Zool. Anz.* **149**: 107–115
- Borror A. C. (1963) Morphology and ecology of the benthic ciliated protozoa of Alligator Harbor, Florida. *Arch. Protistenk. Bd.* **106**: 465–534
- Chen X., Warren A., Song W. (2009) Taxonomic studies on a new marine ciliate, *Apocoleps magnus* gen. nov., spec. nov. (Ciliophora, Colepidae), isolated from Qingdao, China. *J. Ocean Univ. China* **8**: 317–321
- Chen X., Wang Y., Long H., Al-Rasheid, K. A. S., Warren A., Song W. (2010) Morphological studies on two marine colepid ciliates from Qingdao, China, *Nolandia orientalis* spec. nov. and *Pinacocoleps similis* (Kahl, 1933) comb. nov. (Ciliophora, Colepidae). *Eur. J. Protistol.* **46**: 254–262
- Chen X., Shazib S. U. A., Kim J. H., Jang S. W., Shin M. K. (2016). Morphological description and molecular phylogeny of two species of *Levicoleps* (Ciliophora, Prostomatida), *L. taehwae* nov. spec. and *L. biwae jejuensis* nov. subspec., collected in Korea. *J. Eukaryot. Microbiol.* **63**: 471–480
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. (2012) jModel Test2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **9**: 772
- Diesing K. M. (1865) Revision der Prothelminthen. Abtheilung: Amastigen. I. Amastigen ohne Peristom. *Sber. Akad. Wiss. Wien.* **52**: 505–579
- Foissner W. (2014) An update of ‘basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliate protozoa’. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 271–292
- Foissner W., Kusuoka Y., Shimano S. (2008) Morphology and gene sequence of *Levicoleps biwae* n. gen., n. sp. (Ciliophora, Prostomatida), a proposed endemic from the ancient Lake Biwa, Japan. *J. Eukaryot. Microbiol.* **55**: 185–200
- Hartwig E. (1973) Die Ciliaten des Gezeiten-Sandstrandes der Nordseeinsel Sylt. I. Systematik. *Abh. math-naturw. Kl. Akad. Wiss. Mainz. Mikrofauna Meer.* **18**: 1–69
- Kahl A. (1930) Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere order Ciliata (Infusoria) 1. Allgemeiner Teil und Prostomata. *Tierwelt Dtl.* **18**: 1–180
- Kahl A. (1933) Ciliata Libera et Ectocommensalia. *Tierwelt Nord- und Ostsee* **23** (Teil II, c<sub>3</sub>): 29–146
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**: 1647–1649.
- Lu B., Huang J., Chen X. (2013) The morphology and SSU rRNA gene sequence analysis of a poorly-known brackish water ciliate, *Pinacocoleps tessellatus* (Kahl, 1930) (Ciliophora, Colepidae) from Hangzhou Bay, China. *Zootaxa* **3637**: 123–130
- Lu B., Ma M., Gao F., Shi Y., Chen X. (2016) Morphology and molecular phylogeny of two colepid species from China, *Coleps amphacanthus* Ehrenberg, 1833 and *Levicoleps biwae jejuensis* Chen *et al.*, 2016 (Ciliophora, Prostomatida). *Zoological Research* **37**: 176–185
- Lynn D. H. (2008) The ciliated Protozoa: characterization, classification, and guide to the literature, 3rd edn. Springer, Dordrecht
- Nguyen L., Schmidt H. A., Haeseler A., Minh B. Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**: 268–274
- Noland L. E. (1937) Observations on marine ciliates of the Gulf Coast of Florida. *Trans. Am. Micros. Soc.* **56**: 160–171
- Pan X., Bourland W. A., Song W. (2013) Protargol Synthesis: An In-house Protocol. *J. Eukaryot. Microbiol.* **60**: 609–614
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A., Huelsenbeck J. P. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**: 539–542
- Spiegel A. (1926) Einige neue marine Ciliaten. *Arch. Protistenkd.* **55**: 184–190
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731–2739

Received on 15<sup>th</sup> June, 2017; revised on 26<sup>th</sup> September, 2017; accepted on 26<sup>th</sup> September, 2017





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Protistology 62 (2018) 69–78

European Journal of  
PROTISTOLOGY[www.elsevier.com/locate/ejop](http://www.elsevier.com/locate/ejop)

## Morphology and molecular phylogeny of *Holostichides terrae* nov. spec. (Ciliophora: Spirotrichea) with discussion on the possible non-monophyly of *Holostichides*

Jae-Ho Jung<sup>a,\*</sup>, Joung Cho<sup>b</sup>, Yoon Hye Jang<sup>b</sup>, Dong Yuen Gil<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea

<sup>b</sup>Institute of Science-Gifted Education, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, South Korea

Received 28 August 2017; received in revised form 21 November 2017; accepted 21 November 2017  
Available online 28 November 2017

### Abstract

In a study to investigate ciliate diversity, we discovered a new soil ciliate. *Holostichides terrae* nov. spec. was examined and identified based on observations of living cells and stained specimens. In addition, the nuclear SSU rRNA gene along with morphology was analyzed to infer its phylogenetic position. The new species closely resembles *H. dumonti*, but can be distinguished by the morphology of the pharynx (with rod-shaped structure vs. lacking) and the number of frontoterminal cirri (invariably two vs. usually more than two). Molecular analyses indicate that the genus *Holostichides* is not monophyletic, and *H. terrae* is closely related with the genera *Birojimia* and *Hemicyclostyla*, both of which have a pharynx with rod-shaped structures, as also seen in *H. terrae*.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Korea; New species; SSU rRNA gene; Terrestrial ciliate

### Introduction

The genus *Holostichides* Foissner, 1987 occurs in terrestrial or semi-terrestrial habitats and comprises four species, including a recent one (Berger 2006; Kim et al. 2017): *H. chardezi* Foissner, 1987 (type species); *H. dumonti* Foissner, 2000; *H. heterotypicus* Kim et al., 2017; and *H. typicus* (Song and Wilbert, 1988) Eigner, 1994. Based on the midventral complex comprising midventral pairs and midventral row(s) as an autapomorphy, Berger (2006) assigned the genus to the Bakuellidae Jankowski, 1979.

Recently, Kim et al. (2017) described *H. heterotypicus* and provided its SSU rDNA sequence, which is the only genetic data available from GenBank for this genus. Their gene tree indicated *H. heterotypicus* is not a member of Bakuellidae, but rather clusters with *Extraholosticha sylvatica*. In addition, they emphasized that presence of caudal cirri in combination with absence of transverse cirri might be distinct features of bakuellids.

During the examination of ciliate diversity in South Korea, we isolated a *Holostichides* morphotype from a moss sample on a mountain, which was identified as a new species based on morphological and molecular attributes. Herein, we report its morphology along with SSU rRNA gene tree and discuss its phylogenetic position with focus on the non-monophyly of this genus.

\*Corresponding author.

E-mail address: [jhjung@gwnu.ac.kr](mailto:jhjung@gwnu.ac.kr) (J.-H. Jung).



of Pseudourostylidae and Pseudokeronopsidae) rather than Bakuellidae. Kim et al. (2017) reported this discrepancy based on the SSU rRNA gene tree of *H. heterotypicus* and emphasized the importance of transverse cirri (absent vs. present) and caudal cirri (present vs. absent) as a feature distinct from Bakuellidae. Unfortunately, the genetic data for *Paragastrostyla* and *Australothrix*, which have caudal cirri but lack transverse cirri, such as *Holostichides*, are not available.

Pseudourostylidae comprises the following three genera: *Pseudourostyla*, *Hemicycliostyla*, and *Trichototaxis* (Berger 2006). Recent studies support that the genus *Hemicycliostyla* is distinct from *Pseudourostyla*, type genus of Pseudourostylidae, and has a sister relationship with *Birojimia* (Chen et al. 2014; Kim et al. 2016, 2017; Paiva et al. 2012). If the pharynx with rod-shaped structures can be considered as an autapomorphy, a new family could be established for *Birojimia*, *Hemicycliostyla*, and *Holostichides terrae*. In addition, further studies are necessary to show whether or not the pharynx is an autapomorphy for the following species as well: All species in *Birojimia* — *B. terricola* Berger and Foissner, 1989, *B. litoralis* Foissner, 2016, *B. soyaensis* Kim et al., 2016; *Pseudobirojimia muscorum* (Kahl, 1932) Foissner, 2016; *Australothrix alwiniae* Blatterer and Foissner, 1988, *Australothrix venezuelensis* Foissner and Heber in Foissner, 2016; *Pseudourostyla dimorpha* Foissner, 2016; of the species in *Hemicycliostyla*, only *H. sphagni* has the pharynx because the other congeners were insufficiently described without protargol impregnation (Berger 2006; Paiva et al. 2012); *Acuholosticha notabilis* (Foissner, 1982) Li et al., 2017, *Acuholosticha silvicola* (Foissner 2016) Li et al., 2017, *Acuholosticha halophila* (Foissner, 2016) Li et al., 2017 have the pharynx, but the other congeners have the ordinary structure, as briefly discussed by Li et al. (2017) the pharynx might be a key to separation of *Acuholosticha* Li et al., 2017 at the genus level; Australian population of *Anteholosticha bergeri* sensu Blatterer and Foissner (1988).

## Acknowledgements

We are very grateful to Dr. H. Berger for kind advice and raw data for *H. dumonti*. This work was supported by grants from the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Korea government (MSIP; Ministry of Science, ICT & Future Planning) (No. NRF-2017R1C1B5017183), the Institute of Science-Gifted Education, Gangneung-Wonju National University; and the Korea Polar Research Institute(KOPRI, grant no. PE17900).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.11.003>.

## References

- Berger, H., 2006. Monograph of the Urostyleoidea (Ciliophora, Hypotricha). Monogr. Biol. 85, i–xv, 1–1303.
- Blatterer, H., Foissner, W., 1988. Beitrag zur terricolen Ciliatenfauna (Protozoa: Ciliophora) Australiens. Stapfia 17, 1–84.
- Chen, X., Miao, M., Ma, H., Al-Rasheid, K.A.S., Xu, K., Lin, X., 2014. Morphology, ontogeny, and phylogeny of two brackish urostyleid ciliates (Protist, Ciliophora, Hypotricha). J. Eukaryot. Microbiol. 61, 594–610.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModel-Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792–1797.
- Foissner, W., 1987. Neue und wenig bekannte hypotriche und colpodide Ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus Böden und Moosen. Zool. Beitr. (N. F.) 31, 187–282.
- Foissner, W., 2000. A compilation of soil and moss ciliates (Protozoa Ciliophora) from Germany, with new records and descriptions of new and insufficiently known species. Eur. J. Protistol. 36, 253–283.
- Foissner, W., 2014. An update of ‘basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa’. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 271–292.
- Foissner, W., Al-Rasheid, K., 2006. A unified organization of the stichotrichine oral apparatus, including a description of the buccal seal (Ciliophora: Spirotrichea). Acta Protozool. 45, 1–16.
- Foissner, W., Agatha, S., Berger, H., 2002. Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha region and the Namib desert. Part I: text and line drawings. Denisia 5, 1–1063.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A., 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28, 1647–1649.
- Kim, J.H., Jung, J.-H., 2017. Cytological staining of protozoa: a case study on the impregnation of hypotrichs (Ciliophora: Spirotrichea) using laboratory-synthesized protargol. Anim. Cells Syst. 21, 412–418, <http://dx.doi.org/10.1080/19768354.2017.1376707>.
- Kim, K.-S., Jung, J.-H., Min, G.-S., 2016. A new soil ciliate, *Birojimia soyaensis* nov. spec. (Ciliophora: Urostyleoidea) from South Korea. Acta Protozool. 55, 135–144.
- Kim, K.-S., Jung, J.-H., Min, G.-S., 2017. Morphology and molecular phylogeny of two new ciliates, *Holostichides heterotypicus* n. sp. and *Holosticha muuiensis* n. sp. (Ciliophora: Urostyleoidea). J. Eukaryot. Microbiol. 64, 873–884.
- Li, F., Lyu, Z., Li, Y., Fan, X., Al-Farraj, S.A., Shao, C., Berger, H., 2017. Morphology, morphogenesis, and molecular phylogeny of *Uroleptus* (*Caudiholosticha*) *stueberii* (Foissner, 1987) comb. nov. (Ciliophora, Hypotricha), and reclassification of the remaining *Caudiholosticha* species. Eur. J. Protistol. 59, 82–98.
- Lynn, D.H., 2008. The Ciliated protozoa: Characterization, classification, and guide to the literature. Springer, New York.
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for esti-



Article

## Genus-specific PCR Primers Targeting Intracellular Parasite *Euduboscquella* (Dinoflagellata: Syndinea)

Jae-Ho Jung<sup>1,2</sup>, Jung Min Choi<sup>1</sup>, and Young-Ok Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>South Sea Environment Research Center, South Sea Research Institute, KIOST, Geoje 53201, Korea

<sup>2</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea

Received 8 February 2017; Revised 9 July 2017; Accepted 30 September 2017  
 © KSO, KIOST and Springer 2017

**Abstract** – We designed a genus-specific primer pair targeting the intracellular parasite *Euduboscquella*. To increase target specificity and inhibit untargeted PCR, two nucleotides were added at the 3' end of the reverse primer, one being a complementary nucleotide to the *Euduboscquella*-specific SNP (single-nucleotide polymorphism) and the other a deliberately mismatched nucleotide. Target specificity of the primer set was verified experimentally using PCR of two *Euduboscquella* species (positive controls) and 15 related species (negative controls composed of ciliates, diatoms and dinoflagellates), and analytical comparison with SILVA SSU rRNA gene database (release 119) in silico. In addition, we applied the *Euduboscquella*-specific primer set to four environmental samples previously determined by cytological staining to be either positive or negative for *Euduboscquella*. As expected, only positive controls and environmental samples known to contain *Euduboscquella* were successfully amplified by the primer set. An inferred SSU rRNA gene phylogeny placed environmental samples containing aloricate ciliates infected by *Euduboscquella* in a cluster discrete from *Euduboscquella* groups a–d previously reported from loricate, tintinnid ciliates.

**Keywords** – marine parasite, syndinean dinoflagellate, SNP, target-specific PCR primer, ciliates

### 1. Introduction

*Euduboscquella* members grow in the intracellular space of hosts until reaching maturity, after which they emerge from the hosts and undergo consecutive divisions (= sporogenesis). The occurrences of *Euduboscquella* species in ciliate and dinoflagellate hosts have been reported from coastal waters of all continents other than Antarctica and Australia (Akselman and Santinelli 1989; Cachon 1964; Campbell 1927; Chatton

1952; Coats and Bachvaroff 2013; Harada et al. 2007; Jung et al. 2016). Of the nine species of *Euduboscquella*, seven infect ciliate hosts, with six reported from the hosts of loricate ciliates (*Coxiella*, *Eutintinnus*, *Favella*, *Schmidingerella*, and *Tintinnopsis*) and one, *Euduboscquella caryophaga*, from aloricate ciliates (*Prorodon* and *Strombidium*) (Coats and Bachvaroff 2013; Jung et al. 2016) and with two reported from the hosts of dinoflagellates (*Leptodiscus* and *Noctiluca*).

Of the parasites infecting ciliates, *Euduboscquella caryophaga* is difficult to study in vivo, resulting in observations of parasite development being limited to intracellular stages, with extracellular sporogenesis being assumed (Cachon 1964). Accordingly, *Euduboscquella* species infecting non-loricate ciliates are poorly known, with only a single account (Coats et al. 2014) being published since the original description of *E. caryophaga* (Cachon 1964).

Identification of *Euduboscquella* species is very time-consuming, as it requires knowledge of the parasite's full developing process. With regard to the sporogenesis, no one has observed the process in *E. caryophaga*, even Cachon (1964) who was the first to publish on it. Although *E. caryophaga* is the sole species infecting aloricate ciliates in its genus, Coats et al. (2014) suggested a high diversity of *Euduboscquella* species from these hosts. Furthermore, the spores of *Euduboscquella* spp. and other syndinean dinoflagellates are small, 2–20 μm in length, and have few diagnostic morphological characters for distinguishing congeners. Early infection stages also have few distinguishing morphological characters, making it difficult to distinguish between infections caused by *Euduboscquella* spp. and *Amoebophrya* spp., other genus of syndinean dinoflagellate. In addition, confusion

\*Corresponding author. E-mail: yokim@kiost.ac.kr



to have an unidentified aloricate ciliate infected by *Euduboscquella* sp. yielded two different SSU rRNA gene sequences (groups f and g). That result raises the possibility that the unidentified aloricate ciliate may have been infected by two species of *Euduboscquella*, as has been shown to occur in some tintinnids (Bachvaroff 2012). Alternatively, either or both of the SSU rRNA gene sequences may have come from protists (e.g., ciliates or dinoflagellates) other than the unidentified aloricate ciliate.

The gene sequences presumably obtained from aloricate ciliates increase our superficial knowledge about the parasite and support the notion of their diversity as shown by Coats et al. (2014). The genus-specific marker combined with cytological staining could help us understand the diversity and ecological attributes of the parasite.

## 5. Conclusion

Identification of *Euduboscquella* species is a time-consuming process requiring knowledge of the entire developmental process of the parasite. Furthermore, spores of *Euduboscquella* species are very small and have not, as yet, been shown to exhibit diagnostic morphological features. The development of a *Euduboscquella*-specific primer provides a useful tool for quick detection and assessment of *Euduboscquella* diversity using PCR of environmental gDNA. Use of the primers in conjunction with PCR of gDNA from individual host specimens isolated from samples and the V4 region of SSU rRNA gene may provide a foundation for distinguishing parasite species and evaluating host specificity.

## Acknowledgments





We would like to express our appreciation to D. Wayne Coats for improving the manuscript. This research was supported by the Basic Core Technology Development Program for the Oceans and the Polar Regions of the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2016M1A5A1027456), and by the Korea Polar Research Institute (KOPRI, PE17900).

## References

- Akselman R, Santinelli N (1989) Observaciones sobre dinoflagelados parasitos en el litoral Atlantico sudoccidental. *Physis B Aires Sec A* 47:43–44
- Bachvaroff TR, Kim S, Guillou L, Delwiche CF, Coats DW (2012) Molecular diversity of the syndinean genus *Euduboscquella* based on single-cell PCR analysis. *Appl Environ Microb* 78:334–345
- Bui M, Liu Z (2009) Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping. *Plant Methods* 5:1
- Cachon J (1964) Contribution à l'étude des péridiniens parasites. *Cytologie, cycles évolutifs. Ann Sci Nat Zool* 6:1–158
- Campbell AS (1927) Studies on the marine ciliate *Favella* (Jørgensen), with special regard to the neuromotor apparatus and its rôle in the formation of the lorica. *Univ Calif Publ Zool* 29:429–452
- Chatton É (1952) Classe des dinoflagellés ou péridiniens. In: Grassé P-P (ed) *Traité de zoologie*. Masson & Cie, Paris, pp 309–390
- Coats DW, Bachvaroff TR (2013) Parasites of tintinnids. In: Dolan JR, Montagnes DJS, Agatha S, Coats DW, Stoecker DK (eds) *The biology and ecology of tintinnid ciliates: models for marine plankton*. John Wiley, Chichester, pp 145–170
- Coats DW, Kim YO, Choi JM, Lee ES (2014) Observations on dinoflagellate parasites of aloricate ciliates in Korean coastal waters. *Aquat Microb Ecol* 72:89–97
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9:772
- Dunthorn M, Klier J, Bunge J, Stoeck T (2012) Comparing the hyper-variable V4 and V9 regions of the small subunit rDNA for assessment of ciliate environmental diversity. *J Eukaryot Microbiol* 59:185–187
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41:95–98
- Harada A, Ohtsuka S, Horiguchi T (2007) Species of the parasitic genus *Duboscquella* are members of the enigmatic marine alveolate group I. *Protist* 158:337–347
- Jung J-H, Choi JM, Coats DW, Kim Y-O (2016) *Euduboscquella costata* n. sp. (Dinoflagellata, Syndinea), an intracellular parasite of the ciliate *Schmidingerella arcuata*: morphology, molecular phylogeny, life cycle, prevalence, and infection intensity. *J Eukaryot Microbiol* 63:3–15
- Jung J-H, Kim S, Ryu S, Kim M-S, Baek Y-S, Kim S-J, Choi J-K, Park J-K, Min G-S (2012) Development of single-nucleotide polymorphism (SNP)-based phylum-specific PCR amplification technique: Application to the community analysis using ciliates as a reference organism. *Mol Cells* 34:383–391
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T,



## Utility of mitochondrial *CO1* sequences for species discrimination of Spirotrichea ciliates (Protozoa, Ciliophora)

Mi-Hyun Park<sup>a,\*</sup> , Jae-Ho Jung<sup>b,\*</sup> , Euna Jo<sup>a</sup>, Kyung-Min Park<sup>a,c</sup>, Ye-Seul Baek<sup>a</sup>, Se-Joo Kim<sup>d</sup>  and Gi-Sik Min<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon, The Republic of Korea; <sup>b</sup>Department of Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, The Republic of Korea; <sup>c</sup>Korea Polar Research Institute, Incheon, The Republic of Korea; <sup>d</sup>KRIBB, Daejeon, The Republic of Korea

### ABSTRACT

Ciliates are a diverse species group of the Protozoa, and nuclear and mitochondrial genes have been utilized to discover new species and discriminate closely related species. The mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*CO1*) gene has been used to discriminate metazoan species and has also been applied for some groups in the phylum Ciliophora. However, it is difficult to produce a universal primer as a standard barcode, because unlike metazoans, mitochondrial DNA sequences of ciliates are long and highly variable. Therefore, to design the new primer set, we sequenced the mitochondrial genomes of two pseudokeronopsids in the class Spirotrichea using next-generation sequencing technology (HiSeq™ 2000). Based on putative *CO1* gene fragments of the pseudokeronopsids, we designed the new primer set and successfully sequenced the *CO1* of 69 populations representing 47 species (five orders, 14 families, and 27 genera). We found that *CO1* showed higher resolution for separating congeneric species than did nuclear SSU rRNA gene sequences, and we identified some putative cryptic species.

### ARTICLE HISTORY

Received 18 August 2017  
 Accepted 3 April 2018

### KEYWORDS

Ciliophora; *CO1*; cryptic species; molecular species identification; SSU



### Introduction

Ciliates are found in a wide variety of habitats; recent studies related to taxonomy and molecular phylogeny support their huge diversity, and species richness is considered to include greater than tens of thousands (Foissner et al. 2008). To identify these diverse ciliate species, an accurate species identification method is required. Ciliates are usually identified based on data obtained from living cells, stained specimens, and nuclear small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) gene sequences. However, identifying ciliate species using morphological attributes is restricted to a few taxonomic specialists. Due to the huge diversity and sometimes low resolution of SSU for discriminating congeneric species, a new genetic marker is in demand. For example, some taxa show greater than 99.0% in SSU similarity between congeners (e.g. *Pseudokeronopsis*, *Pseudouroleptus*, and *Pseudourostyla*; Yi et al. 2008; Jung et al. 2012, 2014). In addition, Lynn and Strüder-Kypke (2006) reported that some species of *Tetrahymena* have identical SSU sequences between congeners. A similar problem has also been reported for other unicellular eukaryotes, such as dinoflagellates (Logares et al. 2007). The mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*CO1*) gene has also been applied to Ciliophora, which showed high resolution for closely related species and identified cryptic species among some morpho-species (Strüder-Kypke and Lynn 2010).


*CO1* is a standardized gene marker used to identify diverse eukaryotic species, particularly among metazoans, because

this gene has a distinct 'barcode gap' between maximum intra-specific and minimum inter-specific divergences (Blaxter 2003; Lefebure et al. 2006). In ciliates, Barth et al. (2006) were the first to use a *CO1* of the genus *Paramecium*. To date, more than 10 barcoding studies have been published, and their results have proven the suitability of the *CO1* as a marker to identify ciliate species (Barth et al. 2006; Lynn and Strüder-Kypke 2006; Chantangsi and Lynn 2008; Gentekaki and Lynn 2009; Jung et al. 2011; Kher et al. 2011; Tarcz et al. 2012, 2013, 2014; Zhao et al. 2013; Song et al. 2014; Zhao et al. 2016). However, the lack of universal primer sets covering all ciliate groups has restricted the uncovering of ciliate diversity and the presence of heteroplasmy reported by Zhao et al. (2013) has led to difficulty interpreting the results. Furthermore, some ciliates inhabit anoxic ecosystems, which means there is a lack of functional mitochondria (e.g. *CO1*). Due to these problems, *CO1* is considered an inappropriate barcoding region according to the Consortium for the Barcode of Life's criteria (Stoeck et al. 2014). Nevertheless, *CO1* provides valuable resolution for identifying populations, species, and cryptic species with an intact *CO1* because it exhibits greater nucleotide variation than the nuclear ribosomal genes (e.g. SSU and LSU; Zhao et al. 2016). Therefore, Gao et al. (2017) suggested that the *CO1* barcode can be partially applied to the specific taxa of ciliates.

The class Spirotrichea is a species-rich group of the phylum Ciliophora, with a wide distribution in freshwater,

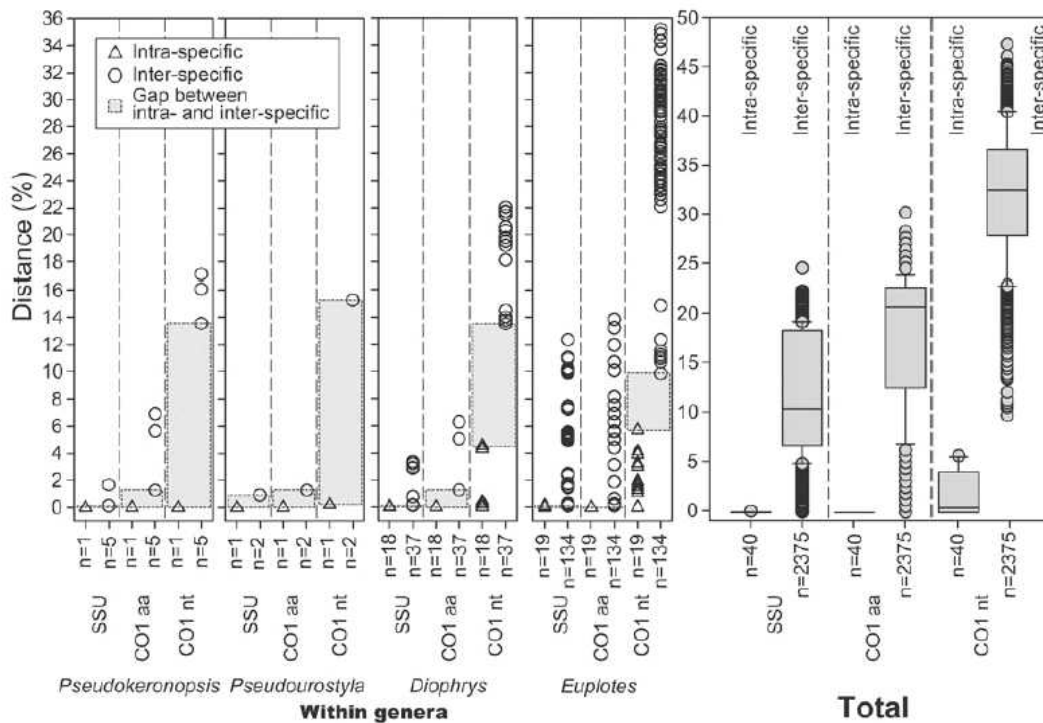
CONTACT Gi-Sik Min  mingisik@inha.ac.kr  Biological Sciences, Inha University, 253 Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 22212, Republic of Korea

\*These authors contributed equally to this work.

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group





**Figure 4.** Sequence distances in SSU and CO1 genes. Four genera including *Diophrys*, *Euplotes*, *Pseudokeronopsis*, and *Pseudourostyla* (excluding *Caudiholosticha* because it contains only one species) were analysed for intra- and inter-specific divergence within each genus (left). The box plot (right) shows whole pairwise values for the 70 populations.

**Table 2.** Characteristic substitutions in CO1 of eight species.

Species	dN/dS	No. of sequences/populations
<i>Caudiholosticha sylvatica</i>	2/55	2
<i>Diophrys oligothrix</i>	0/2	3
<i>Diophrys scutum</i> <sup>a</sup>	0/113 (12/442)	6 (7)
<i>Euplotes vannus</i>	0/642	7
<i>Euplotes minuta</i>	0/100	5
<i>Hemiamphisiella terricola terricola</i>	0/3	2
<i>Pseudokeronopsis camea</i>	0/0	2
<i>Pseudourostyla cristatoides</i>	0/1	2

dN: the number of nonsynonymous substitutions; dS: the number of synonymous substitutions.

<sup>a</sup>Substitutions including population INHC052 (likely a cryptic species) are represented in parenthesis.

### Nucleotide substitutions in the CO1 gene within a single species

We calculated intra-specific nucleotide substitutions of eight species including three putative cryptic species/populations (i.e. *C. sylvatica*, *D. scutum*, and *E. vannus*; Table 2). Of the three species, we assumed the cryptic species *C. sylvatica* and *D. scutum* showed greater intra-specific divergences than other species, and nonsynonymous substitutions were detected. *Caudiholosticha sylvatica* showed an intra-specific divergence of 14.8% in CO1. Of the seven populations of *D. scutum*, the population INHC052 showed higher intra-specific divergences of 13.5–14.5% compared to the other populations. On the other hand, although we believe *E. vannus* might include a sibling species, populations of *E. vannus*, including the putative cryptic species, only showed synonymous substitutions in CO1 (642 synonymous substitutions among seven populations, Table 2). Different results than expected in the population of *E. vannus*

can be considered in the exploratory stage of CO1 barcoding and the use of a limited population (Gao et al. 2017). Nevertheless, the usefulness of CO1 in the discovery of cryptic species is clear.

### Conclusions

We designed a new primer set targeting spirotrichean ciliates, which is a species-rich group of Ciliophora (Protozoa). The CO1 sequences of the 69 ciliate populations (47 species) were successfully sequenced and three putative cryptic species, which are hardly detectable in morphological and SSU analyses, were identified. Among the 47 species, the CO1 sequences of the cosmopolitan or common genera (i.e. *Anteholosticha*, *Aspidisca*, *Diophrys*, *Euplotes*, *Pseudokeronopsis*, and *Tintinnopsis*) were successfully sequenced and we expect that CO1 will aid the characterization of biogeographical distribution patterns and the identification of cryptic species.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### Funding

This work was supported by Mid-Career Researcher Program through NRF grant funded by the MEST [grant number 2016R1A2B4014520] and the Korea Polar Research Institute (KOPRI)[grant number PE17900].

### ORCID

Mi-Hyun Park  <http://orcid.org/0000-0002-2844-3546>  
Jae-Ho Jung  <http://orcid.org/0000-0001-5497-8678>



## 증빙8

### ○ 바코드를 활용 가이드라인

#### - 표본채집

· 정성시료 채집(유전자 분석용): 유전자 분석용 표본의 경우 에탄올 70% 농도(최종)를 유지할 수 있도록 첨가하며, 표본의 개체수를 다량 확보할 수 있도록 플랑크톤 네트를 사용하길 권함. 아세트산이 비침가된 Lugol 시약의 경우도 DNA를 추출하여 유전자 분석에 활용될 수 있지만 장기보관이 필요한 경우에는 에탄올 고정을 권함. 단기간에 분석이 진행될 수 있다면 Lugol의 사용이 더 효율적일 수 있음. Lugol의 경우 시료 고정에 필요한 시약이 적을뿐더러 세포를 갈색으로 물들이므로 표본의 검경이 수월하며 이에 반해 에탄올 시료는 에탄올 자체의 특성으로 소금기가 결정화되어 표본의 검경을 방해하며, 검경 시 증발에 따른 표본의 이동을 야기하기도 함. 시료와 혼합된 최종 농도를 고려하였을 때 Lugol 용액은 1~2%, Bouin 용액은 10% 이상 유지할 것.

· 시약 조성: Lugol - iodine (2) : potassium iodide (3); Bouin 용액 - saturated picric acid (15) : formalin (5) : glacial acetic acid (1); 농축 Bouin 용액 - picric acid crystal을 formalin 용액에 포화시킨 용액에 acetic acid 1/10 첨가

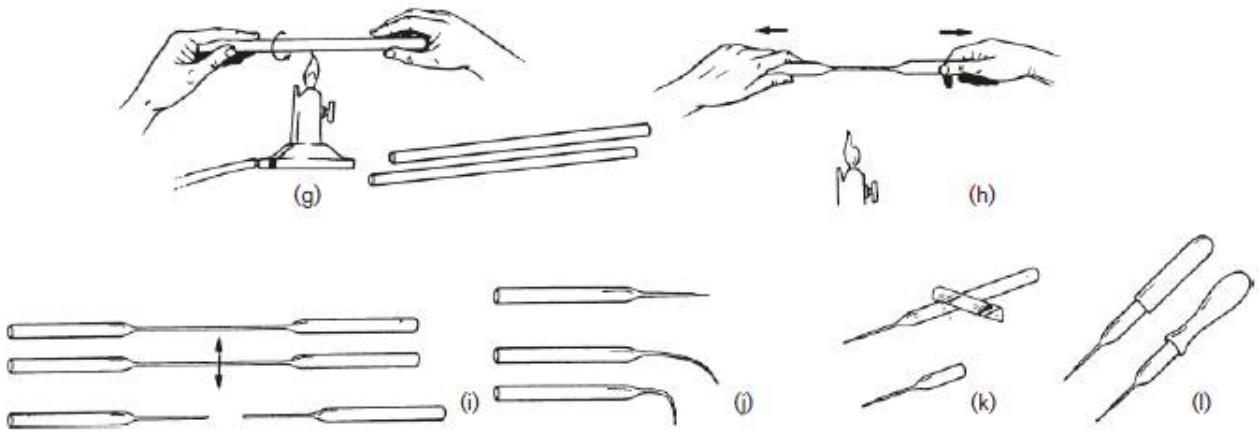
· 정성시료 채집(형태 관찰용): 섬모충류와 기생성 외편모조류 종식별을 위해서는 프로타골을 이용한 형태 관찰이 필수적이기 때문에 해당 목적을 위해서는 Bouin 시약을 통해 시료의 고정이 필요. 해당 표본은 차후 quantitative protargol staining (QPS) 염색을 통해 슬라이드 프레파라트 제작 가능.

· 정량시료: 군집구조 등의 연구목적을 위해 종별 개체수 정량 데이터가 필요한 경우, Lugol 시약을 이용하여 4리터 이상의 해수를 고정하길 권함. 4리터 이상의 해수를 채수하여 플랑크톤 네트 등이 부착된 체를 이용하여 원생생물을 걸러내고 이를 Lugol 시약을 고정하면 시료의 부피를 축소시킬 수 있음. 숙주생물인 섬모충류의 경우 수환경 내에 밀도가 굉장히 적어 1리터만으로는 이를 감지 못 할 수 있기 때문에 4리터 이상을 권함.

· 주의사항: 원생생물 표본 확보를 위해 일반적으로 20  $\mu\text{m}$  플랑크톤 네트를 사용하지만 세포막이 약한 종의 경우에는 네트와의 마찰만으로도 세포가 터질 수 있음. 따라서 채집하고자하는 종에 따라 방법을 달리 해야하며 해당 플랑크톤 네트를 사용할 경우 유중섬모충류는 일반적으로 문제없이 채집이 가능함. 하지만 소모류와 같이 유중섬모충류와 같은 섬모충문에 포함되지만 피갑이 없기 때문에 플랑크톤 네트로 채집이 불가함. 따라서 해당 방법으로 채집된 표본에 대해서는 정량분석 또한 불가함을 주의할 것.

#### - 사진 자료 확보

· 숙주생물인 섬모충류의 경우 그 크기가 일반적으로 50~200  $\mu\text{m}$ 이기 때문에 작업의 효율성을 고려한다면 도립현미경 내에서 시료의 검경을 권함. 정립현미경의 경우, 시료를 관찰하기 위해 커버글라스를 사용해야 하는 불편함이 있으며, 표본의 사진 촬영 후 이를 회수하는데 있어 커버글라스 제거 과정에서 표본을 소실할 수 있음. 도립현미경이 없는 경우, 슬라이드를 뒤집어 정립현미경에서 검경 가능하나 표본이 움직일 수 있기 때문에 권하지 않음. 섬모충류와 기생성 외편모조류 검경을 위해서는 차등간섭대비현미경(differential interference contrast)을 사용하여 세포 외부의 입체적인 관찰이 중요하며, 경우에 따라 주사전자현미경을 활용하여 세포 미세 구조의 검경이 필요할 수 있음.



미소표본을 분리하여 검경하거나 유전자 추출 시 사용되는 미세소관 제작법(Foissner 2014에서 발췌)

- 단일 개체로부터 서로 다른 z 축의 사진을 촬영하여 Helicon 프로그램 등을 이용하여 사진을 합친다면 단일 사진에 다양한 형태적 특징을 포함할 수 있음. 사진을 촬영하는 과정에서 표본이 움직이게 되면 최종 결과물의 질이 저하되므로 되도록 표본이 움직이지 않는 상황에서 다수의 사진을 촬영할 것.

- 주사전자현미경 촬영: Foissner (2014) 논문을 참고하여 본 연구과제에 적용해본 결과, 챔버를 이용하여 유충섬모충류 및 기타 섬모충류의 임계점 건조 시(critical point dry) 시료의 소실이 많음. 이를 해결하고자 poly L-lysine을 사용하여 세포를 커버슬립에 부착하면 적은 수의 표본만으로도 전자현미경 촬영이 가능함. 유충섬모충류의 경우, 피압에 의해 poly-L lysine 부착이 저해되므로 Hexamethyldisilazane 시약을 활용하여 임계점 건조를 대체함. 만약 피압만을 관찰하고자 한다면 임계점 건조나 Hexamethyldisilazane 시약 처리 없이 공기중에 건조만으로도 관찰 가능.

- 프로타골 합성

- 2013년 미국과 중국이 공동으로 제시한 합성법을 개량함. 해당 합성법은 Animal Cells and Systems 학술지에 2017년 출판되었으며, 주요 개량 내용은 기존에 사용하지 않았던 새로운 펩톤(시그마 플루카, 제품번호 96174)을 사용하였고 pH 보정 과정을 합성 완료 후 프레파라트 제작 과정으로 이동. 나머지 과정은 2013년 합성법과 동일함. 합성된 프로타골은 기존 회사에서 판매하던 시약과 달리 공기 중의 수분흡수가 빠르므로 실리카겔 등을 이용하여 수분의 제거가 필요하며, 합성 후 1년 이내에 사용을 권함. 따라서 합성 과정 중에 공기 중의 습기가 많은 날은 피하는 것이 바람직함. 2013년 논문에서는 pH 8~9를 권하였지만 본 연구과제에서 실험한 결과 pH 8이하의 경우 염색 결과가 더 좋게 나타났으며, 합성된 프로타골에 따라 약간씩 최적의 pH 조건에 변동이 있었음. 따라서 매 합성한 프로타골에 대해 최적의 pH 조건을 찾아 사용할 것을 권함.

- DNA 추출

- 원생생물이라 할지라도 하나의 세포에서 충분히 DNA를 추출하여 유전자 분석이 가능하기에 도립현미경 등을 이용하여 하나의 세포를 분리하여 세척 후 DNA 추출을 권함. 여러 세포를 혼합하여 DNA를 추출할 경우 DNA가 섞이게 되므로 오동정된 다른 종이 섞일 가능성을 배제할 수 있으며 개체에 따라 유전적 차이가 있는 경우 혼합된 DNA에서는 이를 식별할 수 있는 방법이 없으므로 권하지 않음. 따라서 현미경을 통해 사진 자료를 획득한 표본에서 DNA를 추출하여 차후 분석에 활용을 권함. 표본의 크기에 적합한 미세소관을 조형하여 사용한다면 표본의 소실과 불필요하게 과도한 용액의 이동을 방지할 수 있음. 에탄올에

고정된 세포는 농축기 등을 이용하여 충분히 증발을 시킨 후 DNA를 추출하여야 하며, Lugol 용액에 고정된 세포는 충분히 증류수 등을 통해 해당 용액을 제거해야 함. 여기서는 권하지 않지만 아세트산이 포함된 Lugol 용액을 사용하여 세포를 고정하였다면 특정 약품을 첨가함으로써 DNA 추출이 일부 가능해짐. 본 연구과제에서는 RED-Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma 사) 제품을 사용하여 DNA를 추출하였으며, 제품설명서에 기재된 1회 사용액의 1/10 사용만으로 하나의 세포로부터 충분한 DNA 추출이 가능함.

#### - 유전자 증폭

- 핵 내 리보솜 유전자: New Euk A 프라이머와 LSU rev 2 프라이머를 이용하면 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S D1-D2 부위를 순차적으로 얻을 수 있음. 해당 프라이머를 통해 유전자 증폭이 안 될 경우, 리버스 프라이머의 교체를 권함. Sonnenberg 등(2007)의 논문을 참고하면 다른 프라이머의 정보가 활용 가능. 여기에서 언급한 프라이머는 진핵생물에 공통적으로 사용가능하기에 먹이생물로부터 추출된 DNA가 유전자 증폭과정에서 나타날 수 있음. 따라서 해당 경우에는 클로닝 등으로 혼합된 DNA를 분리할 수 있으나 유전자 증폭 효소의 에러나 세포 내 유전자의 이질성 등을 고려해야 함.
- 미토콘드리아 내 CO1 유전자: CiCO1 Fv2 + CiCO1 Rv2 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 시 478 bp를 얻을 수 있음. 해당 유전자는 다음과 같은 특성이 있으므로 분석 시 이를 반드시 고려해야 함: 세포 내 유전적 다양성 존재, 위유전자 존재, 모계유전으로 인한 잡종 형성 시 부계정보 누락 등.

#### - 유전자 분석

- 종의 계통분석: 종수준 또는 그보다 상위수준의 계통유연관계를 규명하기 위한 목적으로 다음과 같은 프로그램이 필요함: BioEdit (또는 Geneious), jModeltest, IQ-Tree, MrBayes, MEGA. BioEdit 또는 Geneious 프로그램을 사용하여 염기서열을 정렬하거나 편집 또는 contig 생성에 활용, MEGA 등의 프로그램을 사용하여 염기서열 데이터 포맷 변경 또는 간략한 계통수 추론에 활용, 최근 개발된 IQ-Tree를 활용하면 방대한 염기서열 데이터로부터 단시간 내에 maximum likelihood 계통수 추론 가능. 이와 관련된 염기치환 모델 선택에는 jModeltest 사용. 해당 분석에는 보존적인 리보솜 유전자를 사용을 권하나 근연종간에 유전자 염기서열이 100% 일치하는 경우도 존재하므로 종식별을 목적으로는 그 해상력이 낮음. 기존 논문에서 ITS 등의 유전자로부터 2차구조를 이용한 종식별 활용 사례가 있으나 경우에 따라 잘못된 2차구조 추정은 종식별 문제의 잠재적인 오류를 내포하므로 권하지 않음. 또한, 본 연구과제의 분석결과 근연종의 경우에는 해당 유전자의 염기서열이 100% 일치하는 경우도 있기 때문에 종식별 해상력에 대한 근본적인 문제를 내포하고 있음.
- 종 내 집단유전학적 분석: 특정 종의 군집구조 특성을 규명하기 위한 분석으로 집단유전학적 분석법이 필요함. 본 과제에서는 popart 프로그램을 사용함. 최근 개발된 popart 프로그램의 경우 다른 프로그램들과 달리 사용자의 편의성을 좀 더 고려되었고 해당 haplotype의 채집지를 지도에 표기할 수 있는 기능을 담고 있어 유용함. 종간/종내 유전적 변이가 큰 미토콘드리아 CO1 유전자가 집단유전학적 분석에 적합함. 하지만 해당 유전자는 변이성이 높으므로 리보솜 유전자와 달리 계통을 규명하는데 있어서는 그 해상력이 떨어짐. CO1 위유전자의 경우, 아미노산 서열로 번역하였을 때 종결코돈이 나타나지 않는다면 위유전자로서의 가능성은 낮으나 최근에 발생한 중복 또는 유전자 이동에 의해 발생한 위유전자의 경우는 실제로는 번역으로만 구별되지 않음을 주의할 것. 이러한 경우가 추정되는 상황에서는 CO1 주변의 유전자 등이 정상적인 유전자 배열을 갖고 있는지 고려하여 확인하는 방법이 있음.

## PCR: Ciliates

No.	Sample	Primer
1	JHJ-28-1 <i>Holostichides dumonti</i>	New Euk A / LSU rev 4
2	JHJ-28-2 <i>Holostichides dumonti</i>	New Euk A / LSU rev 4
3	JHJ-28-3 <i>Holostichides dumonti</i>	New Euk A / LSU rev 4
4	JHJ-28-4 <i>Holostichides dumonti</i>	New Euk A / LSU rev 4
5	DW	New Euk A / LSU rev 4

## Takara EX Taq

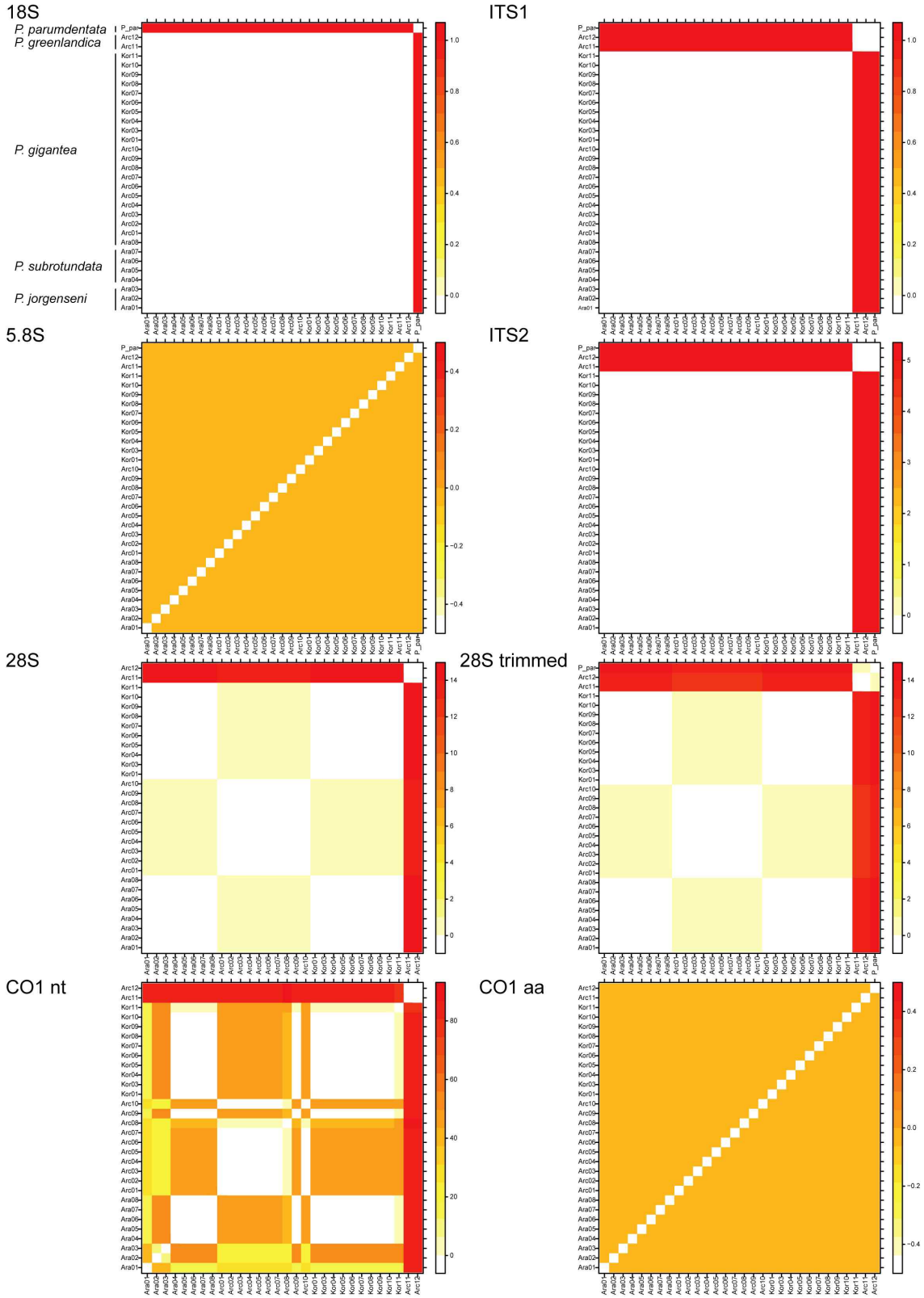
10X PCR bf	17.5				
dNTP	14				
Taq	1	94°C	1'	30"	
DNA	5	98°C		10"	
Primer (20 pmol/ul)	2.5 + 2.5	58.5°C		30"	} X 40
DW	132.5	72°C	3'		
<b>Total (each 35 µl)</b>	<b>175</b>	72°C	7'		
		4°C	∞		

핵 내 리보솜 유전자 증폭을 위한 실험 조건.

No.	Sample	primer
1	M-49-1 (EtOh fixed cell): 2017.01.12 마리안소만	CiCO1_Fv2/ CiCO1_Rv2
2	M-49-2 (EtOh fixed cell): 2017.01.12 마리안소만	CiCO1_Fv2/ CiCO1_Rv2
3	DW	CiCO1_Fv2/ CiCO1_Rv2

10X PCR bf	10.5	94°C	1'	30"
dNTP	8.4	98°C		10"
Taq	0.6	53°C		30"
DNA	3	72°C	1'	
Primer(20 pmol/ul)	1.5+1.5	72°C	7'	
DW	79.5	4°C		
<b>Total (each 35ul)</b>	<b>105</b>			<b>40 cycle</b>

미토콘드리아 CO1 유전자 증폭 실험 조건.



기존 바코드 유전자와 본 과제에서 신규 개발한 CO1 바코드간의 해상력 차이. 대상 생물로 *Parafavella*를 분석함.



주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 PAP사업 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 PAP 사업으로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.