

두 종의 한국산 홍조 지누아리류(*Grateloupia filicina*, *Grateloupia divaricata*)의 생태 특성과 18S rDNA 염기서열 상동성 분석

김영대* · Long-Guo Jin¹ · 송홍인 · 홍정표 · 이주 · 전창영 · 김수경 · 김동삼 · 한형균 · 홍용기¹

국립수산물품질관리원동해수산물연구소, ¹부경대학교 생물공학과

Received March 23, 2006 / Accepted August 5, 2006

The Ecological Character and Sequence Similarity Analysis of 18S rDNA from the Two Species of *Grateloupia* (*Grateloupia*, *Rhodophyta*) in Korea. Young-Dae Kim*, Long-Guo Jin¹, Hong-In Song, Jung-Pyo Hong, Chu Lee, Chang-Young Jeon, Su-Kyoung Kim, Dong-Sam Kim, Hyoung-Kyun Han and Yong-Ki Hong¹, *Aquaculture Division, East Sea Regional Fisheries Research Institute, Kangneung 210-860, Korea*, ¹*Department of Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea* – The species of *Grateloupia filicina*, *Grateloupia divaricata* in East Sea were investigated taxonomically in order to clarify taxonomic position. The ecological character, external morphology, anatomy of vegetative structure. Blade length are 15~40 cm, erect from discoidal holdfast of 3~10 mm in diameter. Stipe 1~2.5 cm long, narrowly cylindrical below, compressed above *Grateloupia filicina*. Main axis are long and compressed, 3~7 mm broad in broadest part. Colors are scarlet to light red. Blade length are 10~25 cm, erect from discoidal holdfast of 3~8 mm in diameter *Grateloupia divaricata*. Stipe are single and simple 2~5 mm broad. Thallus composed of cortex and medulla in section; cortex composed of 9~10 layers of anticlinally arranged cortical cell, divided into outer, middle and inner parts. Partial fragments of nuclear 18S rDNAs from the two species of *Grateloupia* (*Rhodophyta*) were amplified using the PCR reaction and sequenced to compare their similarity. The partial sequences showed 98.9% similarity each other. *Grateloupia filicina* has 371 bp sizes and *Grateloupia divaricata* has 372 bp size. The G+C contents of *Grateloupia filicina* is 54.3% and *Grateloupia divaricata* is 53.64%.

Key words – 18S rDNA, *Grateloupia*, seaweed, sequence comparison.

서 론

지누아리는 강원도 지방을 중심으로 예로부터 귀중한 식량자원으로 이용되어져 왔으며 최근 식생활개선과 더불어 건강식품으로 수요가 지속적으로 증대되고 있다. 그러나 환경오염과 산업화에 따른 서식지 감소 및 과도한 채취로 자원량이 급속히 감소하고 있는 실정이다. 지누아리의 생식생물학적 연구를 비롯하여 인공종묘생산을 통하여 자원량 증강이 절실하다. 이러한 연구의 일환으로 우선, 이종에 대한 외형특성과 내부구조, 유전적 특성 구명이 시급한 실정이다. *Grateloupia* 과에 대한 연구로는 분류적 연구가 있으며 외국 의 경우 Ching[5]이 내부구조와 생식구조에 대한 연구가 있으며, 이외에 Okamura[13], Smith[17], Taylor[19], Dawson[6] 등이 있다. 최근의 분자생물학적 연구에서는 해조류 종들의 구별을 위하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 방법에 의한 동정[3,18], Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) 방법에 의한 동정[7], 혹은 18S rDNA 염기서열에 의한 분류[16], Rubisco spacer 염기서열에 의한 분류 [4] 등의 방법들이 쓰여 지고 있다. 그중 특히 세포 핵 내에 존

재하는 ribosomal RNA 지령의 유전자 (rDNA)는 직렬로 반복되어 있는 repeated transcription unit로서 진핵생물에서는 28S rDNA, 18S rDNA, 5.8S rDNA의 3개 전사영역을 포함하고 있다[21]. 이들 영역들 중에서 특히 18S rDNA 유전자 즉 SSU rDNA 유전자는 진화 속도가 매우 느리고 특정부분은 많은 생물체가 공통적으로 보존된 염기서열도 갖고 있으므로 종의 구별 등 분류학적 연구에도 많이 쓰여 지고 있다[8].

따라서 본 연구에서는 2종의 지누아리 속의 해조류, 참지누아리 (*Grateloupia filicina*) 와 빠지누아리 (*Grateloupia divaricata*)를 우선 대상으로 하여 외형 및 세포구조와 18S rDNA 유전자의 염기서열분석을 수행하여 한국산 해조류의 유전자 database 자료를 집적화하며 또한 이를 기준으로 하여 유전자 자원으로서의 보존활용, 개체 수준에서의 종 보존 및 품종확인 등의 기초 자료로서 제공되는 것을 목적으로 한다.

재료 및 방법

시료채취 및 전처리

본 연구에 사용된 참지누아리 (*Grateloupia filicina*), 빠지누아리 (*Grateloupia divaricata*) 는 강원도 강릉시 사근진 지역에서 업체들을 채집하였다. 부착생물의 오염을 제거하기 위하

*Corresponding author

Tel : +82-31-660-8545, Fax : +82-33-661-8514

E-mail : ydkim@nfrda.re.kr

여, 엽체는 초음파세척기로 1분씩 2번 처리한 후 1% Betadine 용액에 1분간 담그었다가 멸균해수로 세척을 3회 반복하였다. 엽체는 실온에서 4시간 동안 건조시킨 다음 실험에 사용될 때까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다[14].

세포특성

매월 참지누아리와 빠지누아리의 분류 및 세포특성을 규명하기 위하여 샘플하였다. 샘플은 4%의 포르말린에 고정 후 보관하였다. 20~50 μm 두께의 절편을 만들어 slide glass 위에 놓고 1% anilin blue 수용액으로 염색한 후, 1%의 NaOH 용액을 1-2방울로 유화시키고 증류수로 씻은 다음 다시 1%의 HCl을 1~2방울 가하여 고정 후 증류수 씻어서 gelatin-gumglycerin medium으로 mount 하였다.

DNA 추출

건조 보관된 엽체로부터 DNA의 추출은 LiCl방법[9]에 따라 추출하였다. 이때 시료는 0.1 g을 약 0.2 cm씩 자른 후 15 ml plastic tube에 넣고 4 ml의 추출용액 (0.8 M LiCl, 10 mM EDTA, 0.6% Sarcosyl, 0.2% PVPP, 5% β -mercaptoethanol, pH 9.0)으로 55°C 에서 10분간 열처리한 다음 4°C 에서 1시간 동안 진탕하였다. 그리고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액에 0.1배의 3M sodium acetate (pH 5.4)와 2배의 ethanol을 넣어 -20°C 에서 1시간 동안 놓아두면서 침전이 잘 이루어지게 한 다음 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 마지막으로 70% ethanol로 세척한 후 건조한 다음 300 μl 의 증류수에 녹였다.

DNA 정량

추출한 DNA는 Mini Fluorometer (Hoefer, Model TKO 100)로 정량하였으며, 유전자증폭반응 (PCR)의 주형으로 사용하기 위하여 TE buffer로 최종농도가 3 ng/ μl 되게 조정하였다.

PCR 증폭

PCR 증폭은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Co.)를 사용하여 수행하였다. 부분적인 18S rDNA 영역을 증폭하기 위하여 primer set NS7 (5'-GAGGCAATAACAGGTC TGTGATGC-3')과 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3')[20]들을 조합하여 사용하였다. PCR 반응액은 25 μl 당 1 μl 의 template DNA (3ng/ μl), 1 μl 의 각 primer (50 pmol/ μl), 1 μl 의 2.5 mM dNTPs, 2 μl 의 25 mM MgCl_2 , 2.5 μl 의 10 \times PCR buffer, 1 μl 의 12.5% Tween 20, 0.3 μl 의 Taq DNA polymerase (5 unit/ μl) (Promega)를 첨가하였다. PCR 반응조건은 초기반응을 94°C 에서 5분간 시킨 다음, 94°C 에서 1분간 DNA denaturation, 45°C 에서 1분간 primer annealing, 72°C 에서 2분간 DNA extension의 cycle로 35회 반응시키고 나서, 마지막으로 72°C 에서 10분간 PCR 생성물

들을 충분히 extension시켰다.

Agarose gel 전기영동 및 DNA 회수

10 μl 의 PCR 증폭 생성물은 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EtBr이 포함된 2% agarose gel 상에서 0.5 \times TAE buffer (10 mM Tris-acetate, 0.5 mM EDTA, pH 8.0)로서 100 V 전압으로 30분간 전기영동 하였다[15]. 전기영동을 한 다음, 원하는 DNA band만을 agarose gel에서 오려내어 DNA extraction kit (Roche Co.)로 DNA를 회수하였다.

DNA ligation 및 형질전환

DNA ligation과 형질전환은 Invitrogen사의 Topo TA cloning kit의 protocol에 따라 수행하였다.

Plasmid 추출 및 제한효소 처리

Plasmid는 High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Co.)를 사용하여 추출하였다. Plasmid를 추출한 다음, 원하는 PCR 생성물이 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 Eco R1 제한효소로 분해하였으며 이때 추출 plasmid 3 μl , 10 \times buffer 1 μl , Eco R I (5,000 unit/ μl) 1 μl , 증류수 5 μl 로 하여 37°C 에서 2시간 동안 반응시킨 다음 전기영동 하여 확인하였다.

DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search[1,2] 프로그램을 이용하여 비교하였다. 부분적인 18S rDNA의 염기서열은 ClustalX 1.81 program[10]을 이용하여 정렬시켰고, alignment view는 Genedoc program[12]을 사용하였다.

결 과

세포특성

Grateloupia filicina (Wulfen) C. Agardh

서식 수심은 조간대에서 수심 30 cm 이내이나 간혹 1 m에서 발견되기도 하며, 파도와 유속이 거의 없는 곳에서 많이 발견된다. 부지는 길고 꼬불꼬불하나 주축은 뚜렷이 편압되었고 엽체의 엽장은 15~40 cm이나 간혹 60 cm에 달하는 개체도 발견된다. 엽체의 색상으로 선홍색 내지 홍색이며 하부는 연골질이며 부드럽고 미끄럽다(Fig. 1). 엽체의 윗부분은 편엽되어 있으나 뿌리 부분은 등글고 폭은 1~2.5 mm이나 줄기의 넓은 부분은 3~9 mm다. 줄기의 내부구조의 관찰을 위해 조직절단하면 원형과 타원형이 혼재하고, 내부구조는 피층과 수층으로 구성된다. 피층은 세포열이 9~13층에 달하고 내피층과 외피층으로 나누어진다. 뿌리는 반상근으로 구성되어 있고 조직절단하면 반상근의 조직은 치밀하고

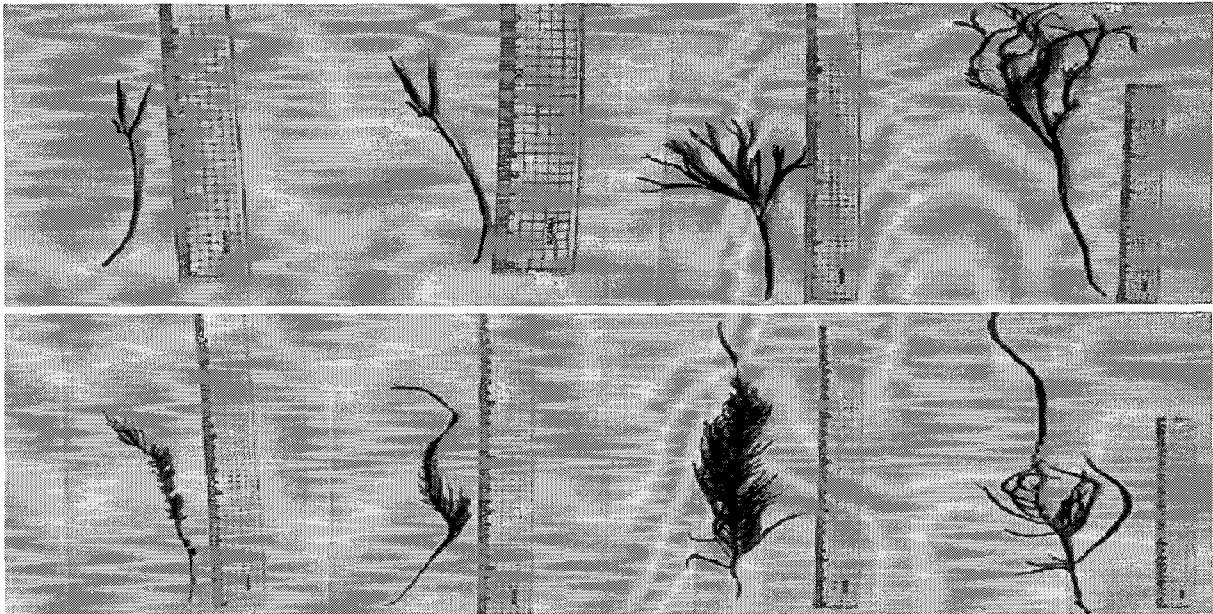


Fig. 1. The shape of *Grateloupia filicina*(left) and *G. divaricata*(right).

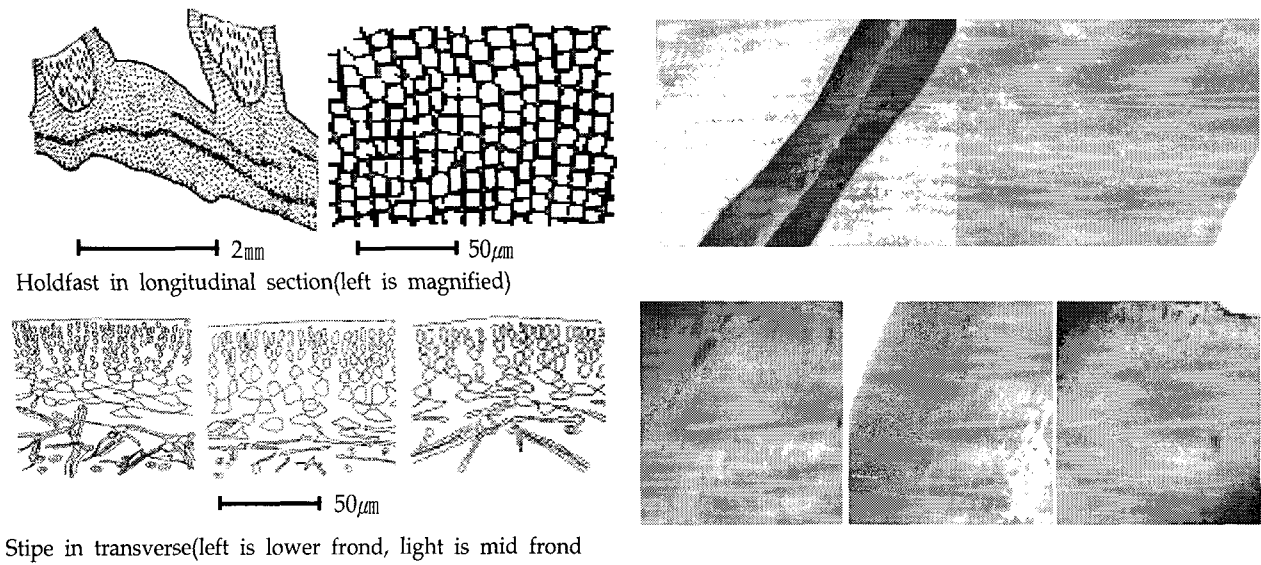


Fig. 2. Vegetative structure of *Grateloupia filicina*.

가장자리의 하부는 수평 세포열이 있고 상부는 수직 세포열로 이루어져 있다(Fig. 2)

***Grateloupia divaricata* Okamura**

서식 수심은 약 20~60 cm이며 참지누아리보다 저층에서 발견되고 파도가 있고 유속이 빠른곳에서 발견된다. 엽장은 주로 10~25 cm이나 간혹 50 cm 가되는 개체도 있고 줄기는 폭 2~5 mm인 둥근 형태이다. 엽체는 뿌리와 끝부분이 가늘고 엽체 중간 부분이 두텁다. 뿌리는 작은 반상근이고 종단면은 유조직성이다. 엽체의 내부는 성장도에 따라 구분되어져, 피층 세포수는 중간 부분 이하에서는 8~12층이나, 끝부

분에서는 6~9층이다(Fig. 3).

전기영동

엽형이 다른 지누아리 2종의 엽체들로부터 분리한 total DNA로부터 PCR 반응으로 증폭시켜 얻은 부분적인 18s rDNA의 크기는 모두 350bp의 동일한 형태를 나타내어, 이 2종의 지누아리는 18s rDNA 부분에 NS7 및 NS8의 같은 염기서열과 같은 크기의 rDNA 부위를 가지고 있음이 판명되어 엽형의 차이가 있지만 분자생물학적으로 종 분류의 기준이 되는 18s rDNA 부분은 최소한 유전적으로 유사성이 매우 높은 것으로 판명되었다.

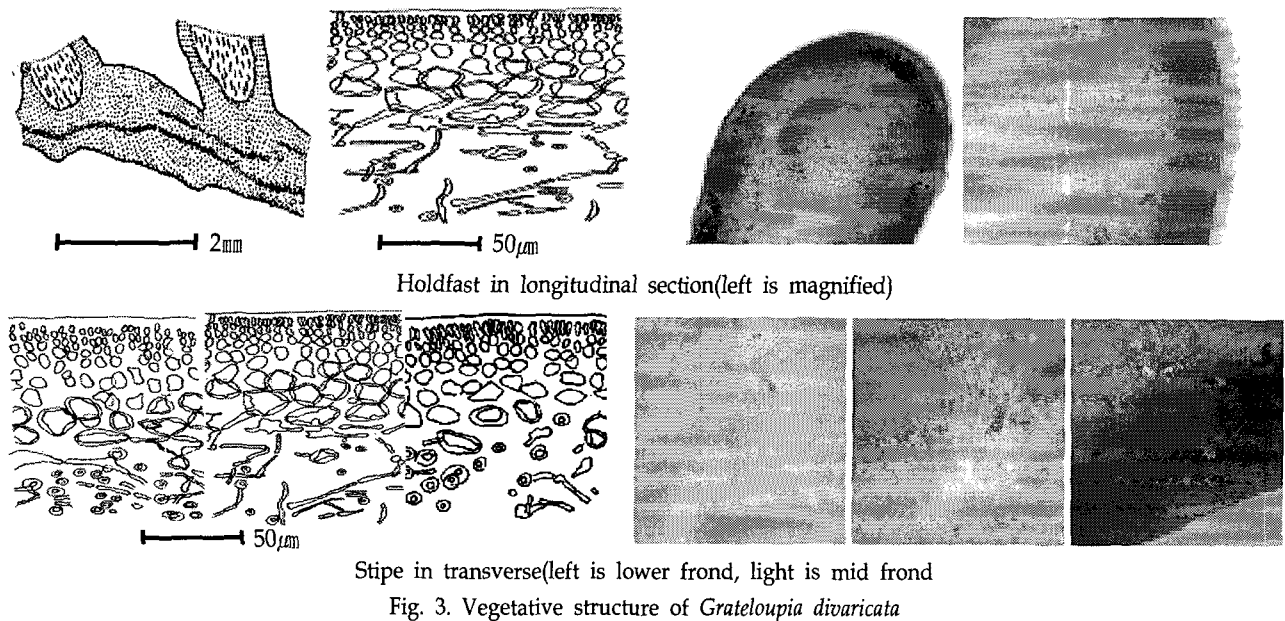


Fig. 3. Vegetative structure of *Grateloupia divaricata*

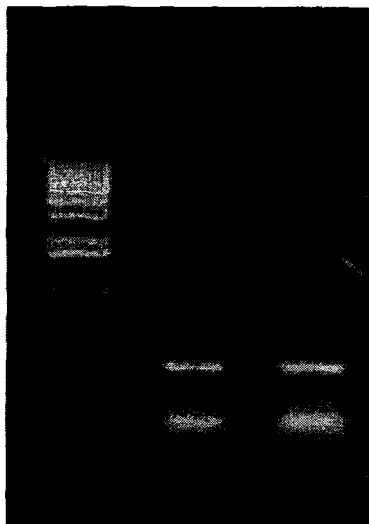


Fig. 4. Partial 18s rDNA of six species of *Grateloupia* amplified with the specific primer set of NS7 and NS8. Lane 1, DNA size marker of 1 kb ladder; Lane; Lane 2, *Grateloupia filicina* ; Lane 3, *Grateloupia divaricata*.

18S rDNA 증폭

PCR 반응 결과 primer NS7과 NS8을 사용하였을 때 약 370 bp 정도의 PCR 산물이 생성 되었다. PCR 생성물들을 TA cloning vector인 pCR2.1에 삽입하여 *E. coli* INVαF'에 형질전환 시켰다. 이때 PCR 생성물들이 정확히 삽입된 plasmid인지의 여부를 확인하기 위하여, 형질전환 된 각 집락으로부터 plasmid를 추출한 후 제한효소 *Eco* RI으로 분해하였다. 그 결과 상기 크기의 유전자 마다가 분명하게 절단되었다 (미발표자료). 이 형질전환 집락으로부터 3 ml의 균체

를 배양하여 재조합된 plasmid를 Plasmid Isolation Kit로서 분리하여 DNA 염기서열 조사를 행하였다.

18S rDNA 염기서열 비교

본 연구에서 사용된 지누아리 속에 대한 부분적인 18S rDNA 영역의 PCR 생성물을 대상으로 한 부분적인 염기서열은 NCBI의 BLAST program을 통하여 비교 분석하였고, 또한 ClustalX 1.81 program을 사용하여 정렬시켰다(Fig. 2). 한국산 두 종의 지누아리 속의 염기서열 분석 결과 primer NS7과 NS8을 사용하였을 때 참지누아리 (*Grateloupia filicina*)는 371bp 정도의 PCR 산물, 뺨지누아리 (*Grateloupia divaricata*)는 372bp 정도의 PCR product를 생성하였다. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 blast 검색을 한 결과 두 종 모두 *Grateloupia filicina*와 99%의 유사성을 가지고 있었다. 또한 두종의 부분적인 염기서열을 비교할 때 98.9%의 유사성을 가지고 있었으며, G+C 함량은 *G. filicina*가 54.3%이고, *G. divaricata*가 53.64%였다. 그리고 *G. filicina*와 *G. divaricata*를 서로 비교할 때 3곳의 insertion 변이, 1곳의 point deletion이 일어난 차이를 보였다(Fig. 2).

고 찰

참지누아리는 우리나라 전 해역에 분포하고 있고 서식 수심은 파도의 영향이 적은 곳에 서식하고 있고 뺨지누아리보다 위쪽에 서식하는 특성을 가진다. 이종은 6월경부터 끝녹음이 시작되어 초겨울에 개체가 나타난다. 선홍색으로 엽체가 부더럽고 줄기를 중심으로 좌우 대칭의 부지를 가지며 노성체가 되면 좌우대칭의 부지 일부가 떨어지기도 한다. 뺨

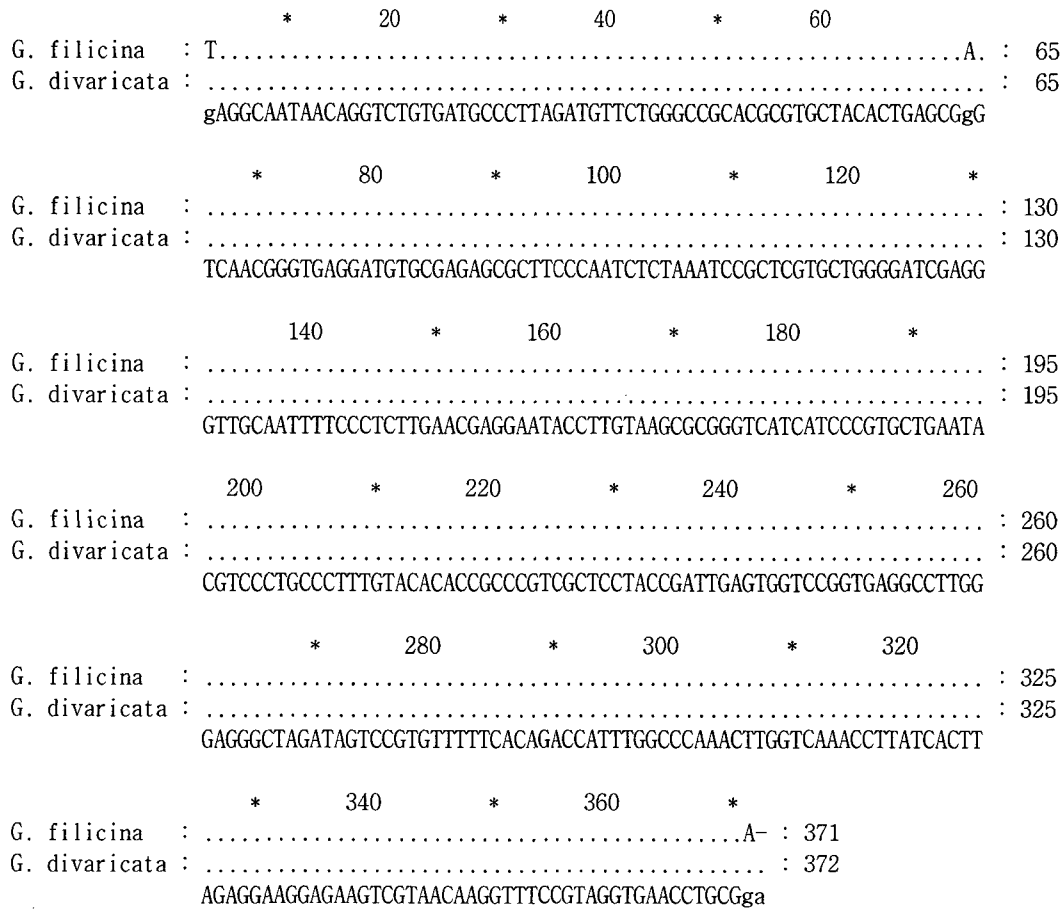


Fig. 5. Alignment of partial 18S rDNA sequences using a primer set NS7 (5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3')과 NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'). Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

지누아리는 주로 동해안에 분포하고 있고 서식 수심은 50 cm 이하 간혹 1 m까지 서식하는 개체가 발견된다. 노성체가 되면 줄기 부분에서도 부지가 생기고 엽체의 끝부분은 두갈래로 나누어진다.

지누아리속의 부분적인 염기서열 비교에서 *G. filicina*는 371 bp의 크기, *G. divaricata*는 372 bp의 크기를 가지고 있었으며, 3곳의 insertion변이와 1곳의 point deletion이 일어났다. NCBI blast검색에서 *Grateloupia filicina* 와 99%의 유사성을 가지고 있는 것은 NCBI에 등록된 *Grateloupia*속 이 단 *G. filicina* 만 있기 때문에 *G. divaricata*도 *G. filicina* 와 99%의 유사성을 가진 것으로 사료된다. *G. filicina*는 체형의 변화가 매우 심해서 다른 종처럼 보이는 수도 있다[11]. 그러나 본 연구를 통하여 *G. filicina*와 *G. divaricata*는 부분적인 염기서열 비교로도 구별이 가능함을 알 수 있다. 따라서 본 연구 결과는 앞으로 *G. filicina*와 *G. divaricata*의 구별에 유용한 유전 자원을 줄 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
2. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
3. Araki, S., T. Sakurai, T. Oohusa and N. Sato. 1992. Comparative restriction endonuclease analysis of rhodoplast DNA from different species of *Porphyra*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58** 477-480.
4. Brodie, J., P. K. Hayes, G. L. Barker and L. M. Irvine. 1996. Molecular and morphological characters distinguishing two *Porphyra* species (Rhodophyta, Bangiophycidae). *Eur. J. Phycol.* **31**, 303-308.
5. Ching, Y. M. 1970. Morphological studies of red algae of the family Cryptonemiaceae. Univ. California Publ. Bot. Vol. 58: vi+83 pp., 10 pls.
6. Dawson. E. Y. 1945a. Notes on Pacific coast marine algae.

- II. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.* **44(1)**, 22-27, 2 pls.
7. Dutcher, J. A. and D. F. Kapraun. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* **6**, 267-273.
 8. Hillis D. M. and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.* **66**, 411-453.
 9. Hong, Y. K., S. D. Kim, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995. DNA extraction conditions from *Poyphyra perforata* using LiCl. *J. Appl. Phycol.* **7**, 101-107.
 10. Jeannmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403-405.
 11. Kang, J. W., 1968. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea, vol.8 marine algae, p179, *Education republic of Korea*.
 12. Nicholas, K. B., H. B. Nicholas Jr and D. W. Deerfield. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News* **4**, 14.
 13. Okamura, K. 1933-1942. Icones of Japanese Algae VII. 2+3+116+41 pp. pls 301-345.
 14. Park, J. W., Y. C. Cho, B. H. Nam, H. J. Jin, C. H. Sohn and Y. K. Hong. 1998. RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis*. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 62-64.
 15. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 18.88.
 16. Saunders, G. W. and L. D. Druehl. 1992. Nucleotide sequences of the small-subunit ribosomal RNA genes from selected Laminariales (Phaeophyta): Implications for kelp evolution. *J. Phycol.* **28**, 544-549.
 17. Smith, G. M. 1944. *Marine algae of the Monterey Peninsula, Calif.* Stanford Univ. Press ix+622 pp., 98 pls.
 18. Stiller, J. W. and J. R. Waaland. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **29**, 506-517.
 19. Taylor, W. R. 1960. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coast of the Americas*, Univ. Michigan studies Sci. Ser. Vol. 21. 662 pp.
 20. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M., J. Gelfand, J. Sninsky, and T. White eds., Academic Press, Florida, 315-322.
 21. Williams, S. M., R. W. DeBry and J. Feder. 1988. A commentary on the use of ribosomal DNA in systematic studies. *Syst. Zool.* **37**, 60-62.