

긴잎돌김 *Porphyra pseudolinearis*의 엽체형간 18S rDNA 염기서열 상동성

Long-Guo JIN · 김영대* · 김명숙 · 진형주 · 조지영 · 최재석 · 홍용기* · 김형근**
 부경대학교 생물공학과, *국립수산진흥원 등해수산연구소, **강릉대학교 수산자원개발학과

Sequence Similarity of Nuclear 18S rDNA from Morphologically Different Blades of the Seaweed *Porphyra pseudolinearis* (Rhodophyta)

Long-Guo JIN, Young-Dae KIM*, Myung-Sook KIM, Hyung-Joo JIN, Ji-Young CHO
 Jae-Suk CHOI, Yong-Ki HONG and Hyung Geun KIM**

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*East Sea Regional Fisheries Research Institute, Kangnung 210-860, Korea

**Department of Fisheries Resources Development, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Partial fragments of nuclear 18S rDNAs from morphologically wide and narrow thalli of the seaweed *Porphyra pseudolinearis* were amplified and sequenced to compare their DNA homology. Both sequences of 311 base pairs showed 100% identical each other. They showed 97.7% similarity with a wild strain collected at Sodol in Kangwondo, and 99.4% similarity with the GenBank accession number AB013185 of the Japanese *P. pseudolinearis*. Thus the morphological difference of wide and narrow blades might not be a classification criterion for the sub-species level of *P. pseudolinearis*.

Key words: 18S rDNA, *Porphyra pseudolinearis*, red alga, sequence comparison

서 론

홍조류에 속하는 김속 (*Porphyra*)은 전세계적으로는 80여 종이 알려져 왔으며 한국에서는 14종이 기록되어 있다 (Lee and Kang, 1986). Kurogi (1972)는 김속의 식별형질로서 엽체의 세포층 수, 세포당 엽록체 수, 거치상 돌기의 유무, 생식유형, 체형, 색채, 엽체의 두께, 정자낭반의 형태, 정자낭 및 과포자낭 분열형식, 무성포자의 형성 유무, 생육시기, 지리적 분포, 각포자체의 형태 및 생태적 특성 등을 언급하였다. 그러나 김속 식물은 체형이 단순하고 형태적인 변이가 심한 분류군이므로 전통적인 형태 해부학적 식별형질만을 가지고는 여전히 80여종이나 되는 김속 식물을 분류한다는 것은 불충분하였다.

최근의 분자생물학적 연구에서는 김속 식물들의 구별을 위하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 방법에 의한 동정 (Araki et al., 1992; Stiller and Waaland, 1993), Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) 방법에 의한 동정 (Dutcher and Kapraun, 1994; Shin et al., 1996), 혹은 18S rDNA 염기서열에 의한 분류 (Saunders and Druehl, 1992; Oliveira et al., 1995; Tan and Druehl, 1996; Yamazaki et al., 1996), Rubisco spacer 염기서열에 의한 분류 (Brodie et al., 1996; 1998) 등의 방법들이 쓰여지고 있다. 그 중 특히 세포 핵내에 존재하는 ribosomal RNA 지령의 유전자 (rDNA)는 직렬로 반복되어 있는 repeated transcription unit로서 진핵생물에서는 28S rDNA, 18S rDNA, 5.8S rDNA의 3개 전사영역을 포함하고 있다 (Williams et al., 1988). 이들 영역들 중에서 특히 18S rDNA gene은 염기서열이 많이 보존되어 있어서 종의 구별 등 분류학적 연구에 많이 쓰여지고 있다.

긴잎돌김 (*Porphyra pseudolinearis*)은 동해안 및 울릉도 일대에서 중간대 상부의 암반에 착생하고 있는 종으로 엽체 형태는 선형 또는 피침형을 하고 있다. 또한 본 종의 엽체는 간혹 체장이 40cm에 이를 정도로 큰 식물체들로 성장하기도 하지만 대체로 체장대 폭의 비율은 3~15배의 범위안에 포함되어 있는 특징을 갖고 있다 (Hwang, 1994).

본 연구에서는 강원도 안인 지역에서 채집한 긴잎돌김 (*Porphyra pseudolinearis*)의 원형질체 (protoplast) 세포배양중 발생한 서로 다른 형태 type 즉 엽체의 폭이 넓은 긴잎돌김과 상대적으로 엽체의 폭이 좁은 type이 서로 유전적 변이 즉 genotype의 차이에 의하여 발생되어진 것인지 혹은 형태적 단순 변이 즉 phenotype 차이에 의한 것인지의 여부를 확인하고자 18S rDNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 동시에 강원도 소돌 지역의 자연산 긴잎돌김의 18S rDNA 염기서열과 NCBI GenBank에 등재된 긴잎돌김의 유전자 염기서열과도 함께 비교해 보았다.

재료 및 방법

시료채집 및 전처리

형태변이가 생긴 긴잎돌김은 강원도 안인 지역에서 채집하여 원형질체를 만든 다음 PES배지에서 실내 조직배양을 하였으며, 비교 실험으로 사용된 긴잎돌김은 강원도 소돌에서 채집한 엽체를 실험실에 옮긴 직후 초음파 및 betadine 처리 등의 무균화처리 (Park et al., 1998)를 행한 다음 DNA를 추출하였다.

DNA 추출

긴잎돌김 조직으로부터 total DNA의 추출은 LiCl방법 (Hong et al., 1995)에 따라 추출하였다. 이때 시료는 0.1g을 약 0.2cm씩 자른후 15 ml plastic tube에 넣고 4ml의 추출용액 (0.8 M LiCl, 10

*Corresponding author: ykhong@pknu.ac.kr

mM EDTA, 0.6% Sarcosyl, 0.2% PVPP, 5% β -mercaptoethanol, pH 9.0)으로 55°C에서 10분간 열처리한 다음 4°C에서 1시간동안 진탕하였다. 그리고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액에 0.1배의 3 M sodium acetate (pH 5.4)와 2배의 ethanol을 넣어 -20°C에 1시간동안 놓아두어서 침전이 잘 이루어지게한 다음 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 마지막으로 70% ethanol로 세척한후 건조한 다음 300 μ l의 증류수에 녹였다.

DNA 정량

추출한 DNA는 Mini Fluorometer (Hoefer, Model TKO 100)로 정량하였으며, PCR의 주형으로 사용하기 위하여 최종농도를 3 ng/ μ l로 조정하였다.

PCR 증폭

PCR 증폭은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk)를 사용하여 수행하였다. 부분적인 18S rDNA 영역을 증폭하기 위하여 specific한 primer인 NS5 (AACTTAAAGGAATTGACGGAAG)와 NS6 (GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC)을 사용하였다 (White et al., 1990). PCR 반응액은 25 μ l당 1 μ l의 template DNA (3 ng/ μ l), 1 μ l의 각 primer (50 pmol/ μ l), 1 μ l의 2.5 mM dNTPs, 2 μ l의 25 mM MgCl₂, 2.5 μ l의 10×PCR buffer, 1 μ l의 12.5% Tween 20, 0.3 μ l의 Taq DNA polymerase (5 u/ μ l) (Promega)를 첨가하였다. PCR 반응조건은 초기반응을 94°C에서 5분간 시킨 다음, 94°C에서 1분간 DNA denaturation, 45°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 2분간 DNA extension의 cycle로 35회 반응시키고 나서, 마지막으로 72°C에서 10분간 PCR 생성물들을 충분히 extension시켰다.

Agarose gel 전기영동 및 DNA 회수

10 μ l의 PCR 생성물은 0.5 μ g/ml의 EtBr가 포함된 2% agarose gel 상에서 0.5×TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)로서 100 V 전압으로 30분간 전기영동하였다 (Sambrook et al., 1989). 전기영동을 한 다음 원하는 DNA band만을 agarose gel에서 오려내어 DNA extraction kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis)의 protocol에 따라 DNA를 회수하였다.

DNA ligation 및 형질전환

DNA ligation과 대장균 INVaF'에로의 형질전환은 Invitrogen사의 Topo TA cloning kit의 protocol에 따라 수행하였다.

Plasmid 추출 및 제한효소 처리

Plasmid 추출은 High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis)의 방법에 따라 추출하였다. Plasmid를 추출한 다음 원하는 PCR product가 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 Eco RI 제한효소로 분해하여 DNA 삽입을 확인하였다.

염기서열 분석

DNA 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377,

Perkin-Elmer Cetus, Norwalk)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 비교하였다. 부분적인 18S rDNA 염기서열은 Clustal W program을 이용하여 정렬시켰고, 정렬된 상은 GeneDoc program (Nicholas et al., 1997)을 사용하였다.

결 과

원형질체의 배양 엽체

강원도 안인 지역에서 채집한 긴잎돌김으로부터 원형질체를 분리하여 배양을 시작한지 10주가 지나고 나면 비록 한 개체에서 분리된 원형질체라 할지라도 배양 엽체의 폭은 크게 2 종류의 서로 다른 변이집단으로 구분되었다 (Fig. 1). 하나는 배양 엽체의 최대폭이 평균 0.51±0.13 cm (n=5)이고 체장 대 최대 엽체폭의 비율은 15.3을 갖는 개체들로서 상대적으로 넓은 엽체 형태를 하고 있었으며 (Fig. 1A), 또 다른 하나는 배양 엽체의 최대폭이 평균 0.10±0.01 cm (n=3)이고 체장 대 최대 엽체폭의 비율은 66.0을 갖는 개체들로 훨씬 더 가늘어 보이는 엽체 형태를 하고 있었다 (Fig. 1B). 이들 두 집단에서 나타나는 엽체 길이/최대 엽체폭의 비율은 4.3배 정도의 값 차이를 보였다. 그리고 강원도 안인 및 소돌 지역에서 채집한 자연산 긴잎돌김들은 대부분 넓은 엽체형들이 주종을 이루고 있으며 부분적으로 가느다란 엽체형들도 일부 분포되어 있었다.

18S rDNA의 증폭

엽형이 완전히 다른 이들 두 집단의 엽체들로부터 부분적인 18S rDNA 영역을 증폭하기 위하여 NS5 및 NS6 primer를 사용하여 PCR반응을 시킨 후 그 생성물을 TA cloning vector인 pCR 2.1에 삽입하여 대장균 INVaF'에로 형질전환시켰다. 이때 PCR product가 정확히 삽입된 plasmid인지의 여부를 확인하기 위하여, 형질전환된 각 집락으로부터 vector plasmid를 추출한 후, 제한효소 Eco RI으로 분해하여 비교하여 보았다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 18S rDNA의 부분적인 증폭이 이루어진 311 bp 크기의

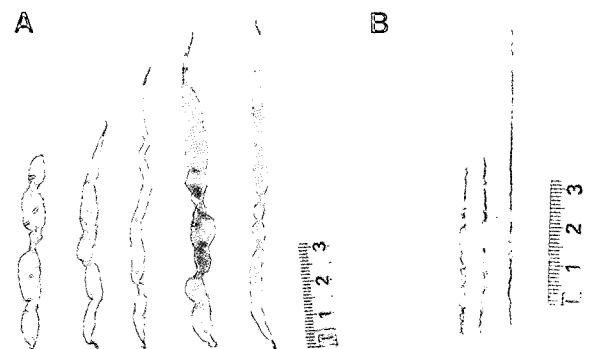


Fig. 1. The rhodophyte *Porphyra pseudolinearis* Ueda derived from protoplast culture. A, morphologically wide-type thalli. B, morphologically narrow-type thalli.

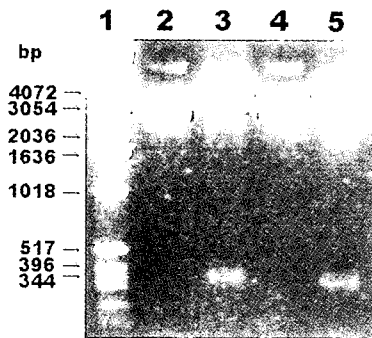


Fig. 2. Cloning of PCR product using TA cloning vector. The PCR product was ligated in the TA cloning vector of pCR 2.1 and transformed to *E. coli* INVaF⁺ host cell. The recombinant plasmid was digested with the restriction enzyme *Eco* RI. Lane 1 is the molecular size marker of 1 kb DNA ladder from Gibco/BRL. Lanes 2 and 4 are the recombinant plasmids that had been inserted with PCR products from morphologically wide-type and narrow-type of the protoplast-cultured *Porphyra pseudolinearis*. Lanes 3 and 5 are the *Eco* RI digested recombinant plasmids from wide-type and narrow-type.

유전자 마다가 삽입된 plasmid의 경우 *Eco* RI에 의하여 분명하게 절단되었다. 이 형질전환 집락으로 부터 약 3 ml의 균체를 배양하여 재조합된 plasmid를 plasmid isolation kit로서 plasmid를 정제하여 DNA염기서열 조사를 행하였다.

DNA 염기서열 비교

TA cloning vector에 삽입된 18S rDNA 부분의 구조를 알기 위하여, DNA sequencer에 의한 그 염기서열을 조사한 바 Fig. 3과 같이 긴잎돌김의 폭이 넓은 type과 엽체폭이 좁은 type 모두 311개의 염기로 구성되어 있는 것으로 나타났으며, G+C의 함량은 47.9% 정도 차지하였다. 이 18S rDNA sequence 부분을 Clustal W program을 이용하여 alignment시켜본 결과, 엽체폭이 넓은 type 및 엽체폭이 좁은 type은 이 염기서열에서 완전히 일치하였으며, 또한 다른 지역의 자연산 긴잎돌김으로서 강원도 소들의 wild type과 비교하여도 97.7%의 상동성을 보였다. 그리고 이 DNA 염기서열을 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 알려진 유전자들과 유사성 검색을 실시한 결과, GenBank accession number AB013185의 일본산 긴잎돌김 18S rDNA에 대하여 232와 233번째 염기사이에 thymine 염기의 결손변이가 1곳 존재

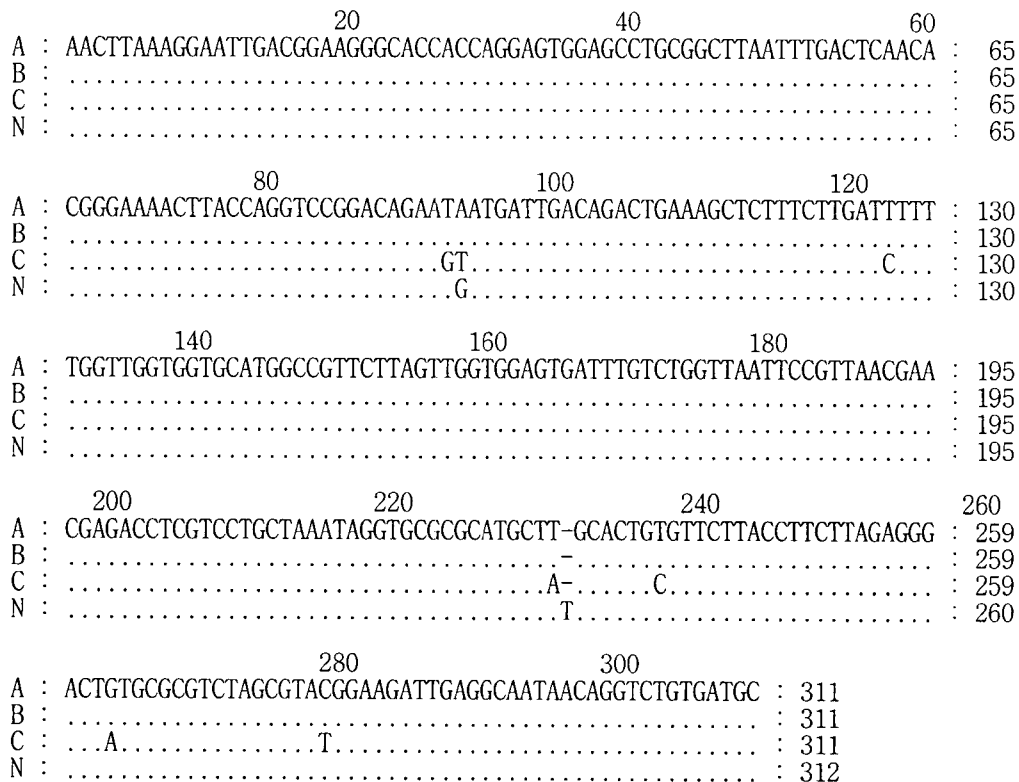


Fig. 3. Alignment of partial 18S rDNA sequence using a primer set of NS5 (AACTTAAAGGAATTGACGGAAG) and NS6 (GCAT-CACAGACCTGTTATTGCCTC). Letters A and B indicate wide-type and narrow-type derived from the protoplast-culture of *Porphyra pseudolinearis*, that was originally collected at Anin in Kangwondo. Letter C indicates a wild strain of the *P. pseudolinearis* collected at Sodol in Kangwondo. Letter N indicates the Japanese *P. pseudolinearis* from NCBI accession number AB013185. Numbers refer to nucleotide positions (1-312). Dots represent identity with the sequence of wide-type from the *P. pseudolinearis*. Dashes denote alignment gaps.

하는것 외에는 전체적으로 99.4%의 상동성을 보였다. 따라서 본 실험의 원형질체 분리 배양중 발생된 엽체폭이 넓은 type과 엽체폭이 좁은 type 간에는, 비록 18S rDNA의 한 부분만을 비교하였지만, 최소한 종간의 구별에 많이 이용되는 18S rDNA 부분의 어떤 유전적 변이에 의한 것보다는 단순한 형태적 변이 즉 phenotype 차이에 의한 것으로 여겨진다. 즉 긴잎돌김의 형태는 지금까지 분류의 가장 기본이 되어 왔으나, 형태변이에 의하여 엽체폭이 좁은 type의 엽체도 발생될 수 있으며, 이들도 최소한 18S rDNA 유전자의 염기서열에 있어서는 우점 집단을 이루는 넓은 엽체폭의 type과 같은 염기서열을 가지고 있음을 볼 수 있었다.

고 찰

긴잎돌김의 원형질체 분리 배양과정에서 나타난 두 형태변이형 사이의 18S rDNA 염기서열은 100% 일치하였으며, 다른 자연산 긴잎돌김 및 일본산 긴잎돌김과도 매우 높은 상동성을 보였다. 이 같이 높은 상동성 값은 전반적으로 18S rDNA 유전자 자체의 보존성이 매우 높기 때문이기도 하지만 또한 rDNA 영역중 일부분만 비교하였기 때문에 나타난 결과일 수도 있다. 세포 핵내에 존재하는 rDNA는 직렬로 반복되어 있는 repeated transcription unit로서 진핵생물에서는 영역별 단위로서 보존도가 매우 높은 18S rDNA (small subunit), 28S rDNA (large subunit)와 5.8S rDNA 등 3개의 전사영역과, 보다 가변 전사영역인 internal transcribed spacer (ITS), external transcribed spacer (ETS) 등과 또한 가장 polymorphic한 noncoding region인 intergenic spacer (IGS) 영역을 포함하고 있다 (Williams et al., 1988). 이러한 rDNA의 반복단위 copy수는 매 haploid genome 당 몇 백개 내지 몇 천개로 서로 다르다 (Long and Dawid, 1980). 이들 영역들 중에서 18S rDNA gene은 염기서열이 매우 높은 정도로 보존되어 있으므로 가장 널리 종의 구별이나 종 동정 등 분류학적 연구에 이용되어지고 있다 (Saunders and Druehl, 1992; Tan and Druehl, 1996). 그러나 보다 좁은 종내의 개체 변이나 아종의 구별 등에는 이보다 유전적 변이도가 높은 ITS1, ITS2 및 5.8S rDNA 영역을 포함한 ITS 염기서열 분석등이 이용되어져 오기도 하였다 (Saunders and Druehl, 1993; Kunimoto et al., 1999). 따라서 향후 이들에 대한 염기서열의 비교 분석도 필요하리라 여겨진다. 그러나 이들은 변이 정도가 심하여 경우에 따라서는 개체간의 변이가 높게 나타날 수 있으므로 개체간의 유전적 표식자의 필요성이 있을 경우에만 이에 대한 염기서열의 분석이 요구되기도 한다. 본 실험에서는 긴잎돌김의 우점 엽체 형태인 넓은 형 엽체의 18S rDNA 염기서열이 좁은 엽체폭의 type 및 다른 지역의 자연산 엽체와 일본산 긴잎돌김 (GenBank accession number AB013185)의 rDNA 염기서열들과도 높은 상동성을 보였으므로, 최소한 18S rDNA의 부분적 염기서열 비교에 따른 기준이지만, 긴잎돌김의 분류상 단순히 형태적으로 엽체폭이 넓은 엽체만을 한정하여 분류되어지지 않아도 될 것으로 사료된다. 그러나 여전히 18S rDNA의 전체 염기서열 혹은 다른 유전자들의 염기서열들을 비교할 필요성을 완전히 배제하지는 않고 있다.

사 사

이 논문은 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과 일부입니다.

참 고 문 헌

- 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.
- 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.
- Brodie, J., P.K. Hayes, G.L. Barker, L.M. Irvine and I. Bartsch. 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophycidae, Rhodophyta) in the northeast Atlantic based on the *rbcL-rbcS* intergenic spacer. *J. Phycol.*, 34, 1069~1074.
- 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.
- Hong, Y.K., S.D. Kim, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *J. Appl. Phycol.*, 7, 101~107.
- Hwang, M.S. 1994. A taxonomic study on the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) in Korea. Ph. D. dissertation, Seoul National University, Korea. pp. 277 (in Korean).
- Kunimoto, M., H. Kito, Y. Kaminishi, Y. Mizukami and N. Murase. 1999. Molecular divergence of the *ssu* rRNA gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 11, 211~216.
- Kurogi, M. 1972. Systematics of *Porphyra* in Japan. In *Contributions to the systematics of benthic marine algae of the North Pacific*. Abbott, I.A. and M. Kurogi ed. Jap. Soc. Phycol., Kobe. pp. 167~191.
- Lee, I.K. and J.W. Kang. 1986. A check list of marine algae in Korea. *Kor. J. Phycol.*, 1, 311~325.
- Long, E.O. and I.B. Dawid. 1980. Repeated sequences in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 727~764.
- Nicholas, K.B., H.B. Nicholas Jr. and D.W. Deerfield. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News*, 4, 14.
- Oliveira, M.C., J. Kurniawan, C.J. Bird, E.L. Rice, C.A. Murphy, R.K. Singh, R.R. Gutell and M.A. Ragan. 1995. A preliminary investigation of the order Bangiales (Bangiophycidae, Rhodophyta) based on sequences of nuclear small-subunit ribosomal RNA genes. *Phycol. Res.*, 43, 71~79.
- 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. Biotech.*, 6, 62~64.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 18~88.
- 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.
- Saunders, G.W. and L.D. Druehl. 1993. Nucleotide sequences of the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA genes from *Alaria marginata* and *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyta: Laminariales). *Mar. Biol.*, 115, 347~352.
- Shin, J.A., N. Morikawa, H. Akita and A. Miura. 1996. Polymerase chain reaction-based identification of varieties in *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Aomori Univ. & Aomori Jr. Coll.*, 18, 101~106.
- Stiller, J.W. and J.R. Waaland. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 29, 506~517.
- Tan, I.H. and L.D. Druehl. 1996. A ribosomal DNA phylogeny supports the close evolutionary relationships among the Sporochneales, Desmarestiales, and Laminariales (Phaeophyceae). *J. Phycol.*, 32, 112~118.
- 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 ed. Academic Press, Florida. pp. 315~322.
- 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.
- Yamazaki, S., Y. Kitade, T. Maruyama and N. Saga. 1996. Phylogenetic position of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on the 18S rDNA sequence. *J. Mar. Biotechnol.*, 4, 230~232.

2000년 9월 14일 접수
2000년 11월 4일 수리