

한국산 방사무늬김 (*Porphyra yezoensis*)의 핵 18S rDNA 염기서열 분석

Long-Guo JIN · 김명숙 · 최재석 · 조지영 · 진형주 · 홍용기⁺
부경대학교 생물공학과

Sequence Analysis of Nuclear 18S rDNA from the Seaweed *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) in Korea

Long-Guo JIN, Myung-Sook KIM, Jae-Suk CHOI, Ji-Young CHO
Hyung-Joo JIN and Yong-Ki HONG⁺
Department of Biotechnology, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

Nuclear 18S ribosomal RNA gene (18S rDNA) from the aquaculturable seaweed *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) was amplified using the polymerase chain reaction and its sequence was analysed. Complete 18S rDNA has an 1823 bp exon and a 514 bp intron. The G+C contents of exon and intron were 48.6% and 55.4%, respectively. The exon sequence showed 99.5% homology to the GenBank accession number AB013177 of the Japanese *P. yezoensis*. The intron region that was inserted upstream between 568 and 1083 showed 93.4% homology to the AB013177.

Key words: 18S rDNA, Exon, Intron, *Porphyra yezoensis*, Seaweed, Sequence analysis

서 론

양식 해조류 중 홍조류에 속하는 김속 (*Porphyra*)은 산업적으로 가장 높은 가치를 가지고 있는 종으로서 우리나라의 남해안과 서해안을 비롯한 일본, 중국 등지에서도 양식방법으로 대량 생산되고 있다. 한국에서는 양식종으로 방사무늬김 (*Porphyra yezoensis*) 및 참김 (*P. tenera*)이 주종을 이루고 있다 (Kang, 1970). 김의 2000년도 양식 생산고는 1천억원 정도로 해조류 전체 생산고의 72% 및 양식 전체 생산고의 15%로서 단위 생물종 당 가장 경제성이 높은 종이다 (해양수산부, 2001). 김속은 홍조식물문의 원시 홍조강, 김파래과에 속하는 분류군으로 현재까지 100여종 이상이 알려졌으며, 열대에서 한대에 이르기까지 전세계의 해안에 널리 분포한다. 그 중 한국에서 기록된 종은 14종으로 보고되었다 (Lee and Kang, 1986; Hwang and Lee, 2001). 김의 종분류는 엽체의 세포층수, 세포당 엽록체수, 거치상돌기의 유무, 생식유형, 체형, 엽체의 두께, 정자낭반의 형태, 정자낭 및 과포자낭 분열형식, 무성포자의 형성유무, 생육시기, 지리적 분포, 각포자체의 형태 및 생태적 특성 등을 종합하여 분류한다 (Kurogi, 1972). 이같은 전통적인 분류 특징으로는 100여종이나 되는 김들을 형태적으로 분류한다는 것은 매우 힘들다.

최근의 분자생물학적 연구에서는 김 종들의 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), isozyme에 의한 종의

구별 (Lindstron and Cole, 1992; Hwang et al., 1998), 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 유전자 즉 SSU rDNA 유전자는 진화 속도가 매우 느리고 특정부분은 많은 생물체가 공통적으로 보존된 염기서열도 갖고 있으므로 종의 구별 등 분류학적 연구에도 많이 쓰여지고 있다 (Hillis and Dixon, 1991).

따라서 본 연구에서는 한국산으로 양식가능한 대표적인 김 품종을 우선 대상으로 하여 18S rDNA 유전자의 염기서열분석을 수행하여 한국산 해조류의 유전자 database 자료를 집적화하며 또한 이를 기준으로 하여 외국 종과의 유전자원을 비교 분석함으로써 유전자원으로서의 보존활용, 종묘 및 개체 수준에서의 종 보존 및 품종확인 등의 기초자료로서 제공되는 것을 목적으로 한다.

재료 및 방법

시료채취 및 전처리

본 연구에 사용된 방사무늬김 (*Porphyra yezoensis* Ueda)은 우리나라 자연산의 품종을 대상으로 하기 위하여 김 양식이 전혀 시행된 적이 없으며 지리적으로도 김 양식장들과 많이 격리되어 있는 경상북도 포항시 대보리 해안 암반 지역에서 전형적인 방사무늬김 형태의 엽체들을 채집하였다. 부착생물의 오염을 제거하기

⁺ Corresponding author: ykhong@pknu.ac.kr

위하여, 염체는 초음파세척기로 1분씩 2번 처리한 후 1% Betadine 용액에 1분간 담그었다가 멸균해수로 세척을 3회 반복하였다. 염체는 실온에서 4시간 동안 건조시킨 다음 실험에 사용될 때까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다 (Park et al., 1998).

DNA 추출

건조 보관된 김 염체로부터 DNA의 추출은 LiCl방법 (Hong et al., 1995)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 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액에 0.1배의 3 M sodium acetate (pH 5.4)와 2배의 ethanol을 넣어 -20°C 에서 1시간 동안 놓아두면서 침전이 잘 이루어지게 한 다음 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 마지막으로 70% ethanol로 세척한 후 건조한 다음 300 μL 의 증류수에 녹였다.

DNA 정량

추출한 DNA는 Mini Fluorometer (Hofer, 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. 전체 18S rDNA 영역을 증폭하기 위하여 적합한 primer set들을 조합하여 사용하였다 (Table 1). 그 중 일부는 Kunimoto et al. (1999)의 염기서열들을 바탕으로 하여 18S rDNA의 intron 부분을 증폭시키기 위하여 알려진 exon 부분에서 비교적 보존적인 것으로 여겨지는 염기서열들을 선택하여 본 연구의 primer로 사용하였다. PCR 반응액은 25 μL 당 1 μL 의 template DNA (3 ng/ 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 u/ 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 생성물들을 충분히 extension시켰다.

Agarose gel 전기영동 및 DNA 회수

10 μL 의 PCR 증폭 생성물은 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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 전기영동하였다 (Sambrook et al., 1989). 전기영동을 한 다음, 원하는 DNA band만을 agarose gel에서 오려내어 DNA extraction kit (Boehringer Mannheim 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 (Boehringer Mannheim Co.)를 사용하여 추출하였다. Plasmid를 추출한 다음, 원하는 PCR 생성물이 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 *Eco*

Table 1. Primer list for amplification of 18S rDNA sequence used in this work

Primer	Sequence	Reference
5'SSU	5'-CAACCTGGTTGATCTGCCAG-3'	Stiller and Waaland, 1993
NS2'	5'-CACCAGACTTGCCCTCCAATG-3'	In this study
F397	5'-CTGAGAAACGGCTACCACAT-3'	Kunimoto et al., 1999
R1132	5'-GTCCGACTACGAGCGTTTTAACTG-3'	Kunimoto et al., 1999
NS3'	5'-CATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'	In this study
NS3a	5'-CGCGTAATTCAGCTCCAATAGCA-3'	In this study
NS4	5'-CTTCCGTCAATTCCTTAAAG-3'	White et al., 1990
NS5	5'-AACTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	White et al., 1990
NS6	5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'	White et al., 1990
NS7	5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'	White et al., 1990
3'SSU	5'-TGATCTTCTGGCAGGTTACCTAC-3'	Stiller and Waaland, 1993

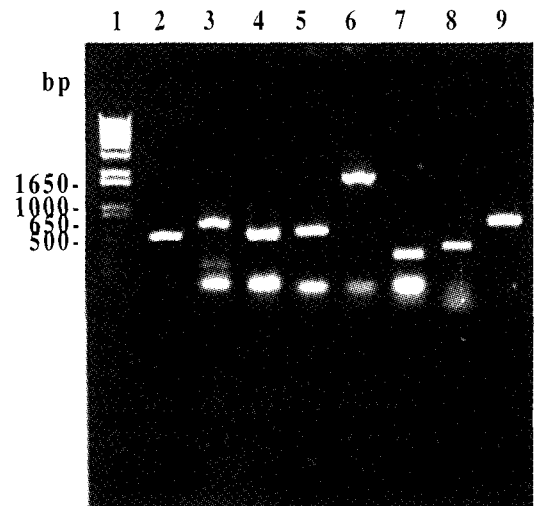


Fig. 1. Partial fragments of 18S rDNA amplified with primer sets: Lane 1, DNA size marker of 1 kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, PCR product with a primer set 5'SSU-NS2'. Lane 3, PCR product with a primer set F397-R1132. Lane 4, PCR product with a primer set NS3'-R1132. Lane 5, PCR product with a primer set NS3a-NS4. Lane 6, PCR product with a primer set 5'SSU-NS4. Lane 7, PCR product with a primer set NS5-NS6. Lane 8, PCR product with a primer set NS7-SSU. Lane 9, PCR product with a primer set NS5-3'SSU.

RI 제한효소로 분해하였으며 이때 추출 plasmid 3 μ L, 10 \times buffer 1 μ L, Eco RI (5,000 unit/ μ L) 1 μ L, 증류수 5 μ L로 하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 전기영동하여 확인하였다.

DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search (Altschul et al., 1990; 1997) 프로그램을 이용하여 비교하였다. Intron 영역은 알려진 홍조류들의 18S rDNA 염기서열을 비교하여 추정적으로 동정하였다 (Hendriks et al., 1991). 전체 18S rDNA의 exon 및 intron 염기서열은 기존의 NCBI에 등록된 *P. yezoensis* (AB013177) 품종을 대상으로 ClustalX 1.81 program

(Jeannmougin et al., 1998)을 이용하여 정렬시켰고, alignment view는 Genedoc program (Nicholas et al., 1997)을 사용하였다. 그리고 phylogenetic tree는 NCBI에 등록된 일부 김 종들과 함께 Treecon program (Van de Peer and De Wachter, 1994)을 이용하여 그렸다.

결 과

형태적 분석

본 식물체는 채집 해안 조간대 중부에 생육하고 있었고 그 체장은 7~10 cm이었다. 식물체의 형태는 주로 타원형이며 엽체의 가장자리에 파상무늬가 있고 거치상 돌기는 없다. 영양세포는 주

Sample	: CAACCTGGTTGATCCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGCTCAAAGACTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACACTTTTATACTCGTGAAACTGCGAATGCC	: 100
AB013177	:	: 100
Sample	: TCATTAACACAGTTATAGTTCCTTTGGGAACAACACTACTTGGATAACCGTAGTAATCTAGAGCTAATACATGCCTCAACGCCCGACTCACGAAGGGTG	: 200
AB013177	:	: 200
Sample	: GTATTTATTGGATAAAAAACCATCGTGTCTgTCCAGAGCGCTTTAAGATGATTCACAATAACTTGTGGATCGCATGGCTCGTGTGGCGACTCCTCA	: 300
AB013177	:c.....g.....	: 298
Sample	: TTCAAATTTCTGCCCTAcCAACTTTCGATGGTAGATATTGGTCTACCATGGTGTGACGGGTGACGGGAATTAGGGTTCGATTCGGAGAGGGAGCCT	: 400
AB013177	:t.....	: 398
Sample	: GAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGCCGCAAAATTACCAATCCGACTCGGGGAGGTAGTGACAAAAATAACAAATAGGGGCCCTTTG	: 500
AB013177	:	: 498
Sample	: GGTCTCTAATTGGAATGAGAACAATTTAAATCCCTTATCGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGTAATTCAGCTCCAATAGC	: 600
AB013177	:	: 598
Sample	: GgTATATTAAAGTTGTTGAGTAAACGCTCGTAGTCGGACCTCGGAGCGCCCCACGGCCGGCTTTTGCCTTGTGCCAGTGGGAGTTTGTCTCCT	: 700
AB013177	:	: 697
Sample	: TTTGTCCGGACCGGTGTGTCAGGGCCTTACTGTCTCTGCGGTTTACCTGCGGGCCGACCGTTTACTGTGAAGAAAGTAAAGTGTCAAAGCAGGCCA	: 799
AB013177	:	: 796
Sample	: ATGCCITGAATATGTGACATGGAATAAGAAATAGGACTTGGGCTCTATTTTGTGGTTTCCAGTGACCAAGTAATGATTAATAGGACGGTTGGGGCC	: 899
AB013177	:	: 896
Sample	: ATTCTGATTTCATGTCAGAGGTGAAATCTTGGATTGATGGAAGACGTACAACCTGCGAAAGCATCTGCCATGGATGTTTTCATTGATCAAGAACGAAAG	: 999
AB013177	:	: 996
Sample	: TTAGGGATCGAAGACGATCAGATACCCTCGTAGTCTTAAACCATAAACGATGCCGACTGGGGATTGGCGGGGCACTTTATATGACTCTGTGAGCACCC	: 1099
AB013177	:	: 1096
Sample	: TGAGGAAACCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCCAGGAGTGGAGCCTGCCG	: 1199
AB013177	:	: 1196
Sample	: CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTACCAGTCCGGACAGAGAAGATGATGACAGACTGAAAGCTCTTTCTTGATTTTTTGGTGGTGGTGCATGCC	: 1299
AB013177	:	: 1296
Sample	: CGTCTTAGTTGGTGGAGTATTGTCTGGTTAATCCGTTAACGAACGAGACCTCGTCTGCTAAATAGGTGCGCGCATGCCAGCACTGCGTCTTACC	: 1399
AB013177	:	: 1396
Sample	: TTCCTAGAGGACTATCGCGCTTAGCGTATGGAAGATTGAGGCAATAACAGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTaGGGCCGACGGCGCTACACTGA	: 1499
AB013177	:	: 1495
Sample	: TGCATTCAACGAGTTTCACTTGATAGTCTGGGTCGGAAGGCTCGGTAATCTTTTGAAGTGATCGTCTGGGATAGATCATTGCAATTAaTGATCT	: 1599
AB013177	:	: 1595
Sample	: TCAACGAGGAATTCCTGTAGCGCAGGTCAACAGCTCGCCGAATACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCTCTACCGATTGAATGGTCC	: 1699
AB013177	:	: 1695
Sample	: GATGAAATGTCGGATCGCGCTAGTGTGATGGACTCGTCCAGAGCGGTAGCGGTGAGAAGCTCATTAATCTTATCATT-AGAGGAAGGAGAAGTCGTA	: 1798
AB013177	:	: 1795
Sample	: ACAAGTTTCCGCTAGGTGAACCTGC	: 1823
AB013177	:	: 1820

Fig. 2. Alignment of 18S rDNA exon sequences from the *P. yezoensis*. The sample was collected at rocky shore in Daeho, Pohang, Korea. The AB013177 indicates the *P. yezoensis* in GenBank (NCBI accession number AB013177). Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

```

Sample : AACGTATGCATAAAGCCCTCCGTAATAAAAAAAAAACAGCGCCgGATGTCTCTCTGGAAGCACACCATGCATGGGGTTtGTTCCCTCTCTGCATGGCCG : 100
AB013177 : .....c.....a.....c.....c.....c..... : 100

Sample : TGTGAAAgAGGCGAGTAGGCAAACGATGGAAACCCGGCTTGGAAATAGTAACCAGCCACAGAGCCCCCATCATACACTTCTAAATGGCCGGGAGTGCCC : 200
AB013177 : .....a..... : 200

Sample : GCGAGGCCTTACTACCCGGTCCGCGGAGGTGAGAGCGACAATCGtTCAGGACGCGAGTGTACGTAGTGGTACgTGGATGGTAAAAACGTCAAG : 300
AB013177 : .....c.....a..... : 300

Sample : GATAGGGTTGATCCCGCAGGGAACCGCGAGtGCCgcCaTGgt-----CgGTgGGCAAAGGCGAACCTTCAGAGACTcTAATGGAGTGGGCGCAAGCT : 391
AB013177 : .....c...aa.c..ccttgggcaa.a.t.....a..... : 400

Sample : TAAGGGAGAGTCCAATCCACTGGGAAACCAGGTCCACAGCAGTAACGGGGTGTGCTCGCCCCAGaAGGACTGTGGAAGGCAaaccCCACAAAAGGGTG : 491
AB013177 : ..... : 496

Sample : TGTGTTtgtcCGGGTAGCAATGG : 514
AB013177 : .....-gt..... : 517

```

Fig. 3. Alignment of 18S rDNA intron sequences from the *P. yezoensis*. The sample and the AB013177 are described in Fig. 2. Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

로 불규칙하게 배열하고 표면에서 모나지 않은 사각형이다. 식물체의 암수 생식기관은 자용동주이며 정자낭반은 엽체 가장자리에서 먼저 나타났고 점차 내부로 쐐기꼴 무늬로 발달하였다. 과포자낭은 엽체 상부에 퍼져 있었다. 따라서 이같은 기본 형태적인 특징으로 보아 본 식물체는 방사무늬김으로 우선 분류하였다.

18S rDNA 증폭

방사무늬김의 18S rDNA 전체 염기서열을 증폭하고자 8조합의 primer들을 사용하여 각각을 PCR 반응시켰다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 primer 5'SSU-NS2'들을 사용한 경우 568 bp 크기의 생성물이 증폭되었다. 그리고 primer F397-R1132들을 사용한 경우 758 bp 크기의 생성물, NS3'-R1132들을 사용한 경우 609 bp 크기의 생성물, NS3a-NS4들을 사용한 경우 597 bp 크기의 생성물, 5'SSU-NS4들을 사용한 경우 1,687 bp 크기의 생성물, NS5-NS6들을 사용한 경우 311 bp 크기의 생성물, NS7-3'SSU들을 사용한 경우 385 bp 크기의 생성물, NS5-3'SSU들을 사용한 경우 672 bp 크기의 생성물들이 각각 증폭되었다. 이들 8가지 PCR 생성물들을 TA cloning vector인 pCR2.1에 삽입하여 *Escherichia coli* INVaF'에 형질전환시켰다. 이때 PCR 생성물들이 정확히 삽입된 plasmid인지의 여부를 확인하기 위하여, 형질전환된 각 집락으로부터 plasmid를 추출한 후 제한효소 *EcoRI*으로 분해하였다. 그 결과 상기 크기의 유전자 마다가 분명하게 절단되었다 (미발표자료). 이 형질전환 집락으로부터 3 mL의 균체를 배양하여 제조된 plasmid를 Plasmid Isolation Kit로서 분리하여 DNA 염기서열 조사를 행하였다.

18S rDNA 염기서열 비교

본 연구에서 사용된 방사무늬김에 대한 18S rDNA 영역의 PCR 생성물 (Fig. 1)을 대상으로 한 전체 염기서열은 NCBI의 BLAST program을 통하여 비교 분석하였다. 또한 intron 영역을 알려진 홍조류들의 염기서열과 비교하여 동정한 후 각각의 exon 및 intron 염기서열은 ClustalX 1.81 program을 사용하여 정렬시켰다. 그 결과 Fig. 2와 같이 본 방사무늬김은 일본산 방사무늬김 (NCBI accession number: AB013177)과 전체 18S rDNA의 exon 영역에서 염기 9개의 차이를 가지고 있었으며 homology가 99.5%에 도

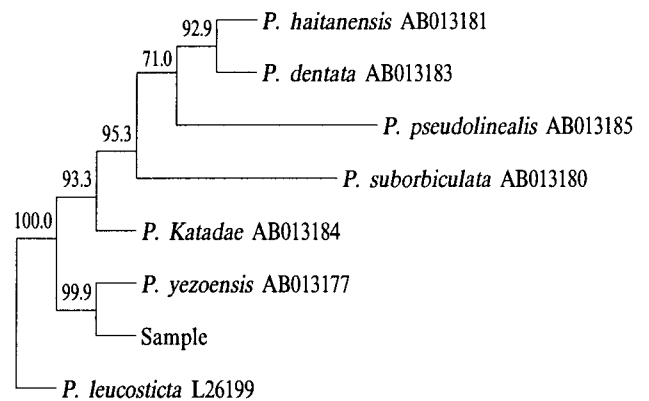


Fig. 4. Phylogenetic tree of the *Porphyra* species based on the neighbor-joining method with values for each internal branch, determined by bootstrap analysis with 1000 replications. The values indicate percentages along the branch.

달하였다. 이들 exon 영역의 G+C 함량은 모두 48.6%로 동일하였다. 그리고 exon염기서열의 232번째 thymine, 233번째 guanine, 602번째 guanine, 1476번째 adenine 염기가 삽입된 frameshift 변이가 있으며, 1779번째 thymine 염기가 결손변이되어 전체 염기 크기는 1823개로서 일본산이 1820개인데 반하여 3개의 염기가 많다. 그리고 한 염기의 변환 중 transition 변이 즉 같은 종류의 purine 혹은 pyrimidine으로 변이 (A↔G, T↔C)된 곳은 3곳이며, transversion 변이 즉 purine염기 종류가 pyrimidine으로 서로 변이 (A,G↔T,C)된 곳은 1곳이 존재한다. 또한 일본산 방사무늬김과 비교할 때 본 연구에서 사용한 한국산은 단지 upstream 568과 1083 염기 사이 즉 5'GTCTGGTG-CCAGCAGCC3' 사이에 5' AAC로 시작하여 AATGG3'로 끝나는 514 bp의 intron을 가지고 있다. 같은 경우에 일본산은 517 bp의 intron을 가지고 있었으며 intron의 homology는 93.4%에 달하였다 (Fig. 3). Intron염기의 458, 475, 476, 477, 498, 499번째에 A, A, C, C, T, G 염기가 각각 삽입된 frameshift 변이가 있으며, 342~350번 사이에 9개의 염기가 결손변이되어 있으므로 일본산보다 3개의 염기가 적다. 그리고 한 염기의 변환 중 transition 변이는 13곳, transversion 변이는

6곳이 존재한다. Treecon program으로 작성한 phylogenetic tree (Fig. 4) 상에서도 본 방사무늬김은 다른 김종들과는 거리가 멀며 일본산 방사무늬김과는 동일 그룹에 속하는 것으로 나타났으며 bootstrap analysis를 1000번 반복하였을 때도 99.9%의 가능성으로 동일하게 나타났다.

고 찰

한국산 방사무늬김의 염기서열 분석 결과 18S rDNA의 exon 영역의 크기는 1,823 bp로서 일본산보다 3개의 염기가 많은 반면 intron의 염기수는 514개로서 3개의 염기가 적으므로 전체 2,337개의 염기 크기는 동일하다. Exon은 일본산과 염기 9개의 차이를 제외하고는 완전히 일치하는 99.5%의 높은 상동성을 나타내었으나 intron은 결손변이 및 단일 염기 변이가 많이 일어나 있다. 또한 다른 일본산 방사무늬김 (NCBI accession number: AB013178)은 downstream 부분에도 508 bp의 intron을 가지고 있다. Kunimoto 등 (1999)에 의하면 방사무늬김의 경우에 upstream에 위치한 intron의 염기서열은 개체마다 모두 같으며 downstream의 intron에서는 많은 차이를 나타낸다고 하였다. 그러나 본 연구의 방사무늬김은 일본산 AB013177과 같이 upstream의 intron만 가지는 type에 속하는 것으로 보이나 반면에 이 intron의 염기서열에서는 서로 같지 않은 것으로 나타났다. Upstream에 위치한 intron은 exon 염기 splicing site의 염기서열 5'CTGGTG-CCAGCA3' 사이에는 위치하나, 이들 intron의 보존적 핵심부위 특징들인 P, Q, R, S의 공통부위는 비슷하지 않다 (Van Oppen et al., 1993). 따라서 이 upstream intron에 대해서는 아직 어떠한 유형이라고 분류하기는 명확하지 않다. 같은 종이라 할지라도 지역에 따라 흔히 intron의 개수나 염기서열이 다른 것을 종종 발견할 수가 있으므로 (Kunimoto et al., 1999; Jin et al., 2001) intron의 비교로는 김 종들을 비교 분류하는 것은 불충분하다. 그러나 이러한 intron의 차이는 cultivar line을 추적하는데는 유용하게 쓰일 수 있을 것 같다. 또한 NCBI에 등록된 김 중에서 우리나라에 서식하는 김과 동일 종명을 가지는 김들을 선택하여 Treecon program을 이용한 phylogenetic tree를 그린 결과 본 방사무늬김은 일본산 방사무늬김 (AB013177)과 exon 영역에서 동일 그룹에 속하는 것으로서 bootstrap 분석에서도 1,000번 반복하였을 때 99.9%의 가능성을 나타내었다. 따라서 한국산과 일본산의 방사무늬김은 형태적으로나 유전적으로 매우 유사하였으며 이들의 구별에는 18S rDNA의 exon 영역 염기서열의 일부 차이 즉 삽입변이 4곳, 결손변이 1곳, transition 3곳, transversion 1곳 등의 염기 차이를 확인함으로써 가능하다. 이러한 18S rDNA 염기서열들은 앞으로 한국산 김의 유전자은행을 확립하여 유전자원으로서의 보존활용, 종묘 및 개체 수준에서의 종보존 체계를 확립하는 데에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연

구결과 일부입니다. 김명숙은 부경대학교 해양식량자원개발 특성화사업단 박사후 전임연구원입니다.

참 고 문 헌

- 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.
- 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. *Nuc. Acids Res.*, 25, 3389~3402.
- 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.
- Hendriks, L., R. De Baere, Y. Van De Peer, J. Neefs, A. Goris and R. Dewatcher. 1991. The evolutionary position of the rhodophyte *Porphyra umbilicalis* and the basidiomycete *Leucosporidium scottii* among other eukaryotes as deduced from complete sequences of small ribosomal subunit RNA. *J. Mol. Evol.*, 32, 167~177.
- Hillis, D.M. and M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.*, 66, 411~453.
- 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.
- Hwang, M.S., M.H. Han and I.K. Lee. 1998. Allozyme variation and species relationships in the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, 13, 447~459.
- Hwang, M.S. and I.K. Lee. 2001. Taxonomy of the Genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, 16, 233~273.
- Jeanmougin, 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.
- Jin, L.G., M.S. Kim, Y.D. Kim, H.G. Kim and Y.K. Hong. 2001. Sequence Analysis of Nuclear 18S rDNA from *Porphyra pseudolinearis* (Rhodophyta) in Korea. *Algae*, 16, 277~282.
- Kang, J.W. 1970. Species of cultivated *Porphyra* in Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 3, 77~92.
- 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 Kurogi, M. eds. Jap. Soc. Phycol., Kobe, 167~191.
- Lee, I.K. and J.W. Kang. 1986. A check list of marine algae in Korea. Kor. J. Phycol., 1, 311~325.
- Lindstrom, S.C. and K.M. Cole. 1992. Relationships between some North Atlantic and North Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta): Evidence from isozymes, morphology, and chromosomes. Can. J. Bot., 70, 2066~2075.
- 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 (Bangiothycidae, 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. Biotechnol., 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, 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.
- 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.
- Van de Peer, Y. and R. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. App. Biosci., 10, 569~570.
- Van Oppen, M.J., J.L. Olsen and W.T. Stam. 1993. Evidence for independent acquisition of group I introns in green algae. Mol. Biol. Evol., 10, 1317~1326.
- 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.
- 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.
- 해양수산부. 2001. 해양수산 통계 연보. 크리홍보(주), 서울, 1439.

2002년 9월 11일 접수

2002년 11월 16일 수리