

Note

## 기수역 요각류 위내용물 유전자 분석: 소화기관 내외부 유전자의 선택적 처리방법

채연지 · 오혜지 · 김용재<sup>1</sup> · 장광현\* · 조현빈<sup>2,\*</sup>

경희대학교 환경학 및 환경공학과, <sup>1</sup>대진대학교 생명과학과, <sup>2</sup>부산대학교 환경·에너지연구소

### Application of DNA Analysis for Identification of Prey Items on Zooplankton: Selective Treatment Method.

Yeon-Ji Chae (0000-0002-1185-7945), Hye-Ji Oh (0000-0003-2098-8485), Yong-Jae Kim<sup>1</sup> (0000-0003-3326-8372), Kwang-Hyeon Chang\* (0000-0002-7952-4047) and Hyunbin Jo<sup>2,\*</sup> (0000-0001-8064-7880) (Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea; <sup>1</sup>Department of Life Science, Daejin University, Pochon 11159, Republic of Korea; <sup>2</sup>Institute for Environment and Energy, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea)

**Abstract** Understanding the selective feeding behavior of zooplankton on phytoplankton is essential for evaluating the nutrient cycle and energy flow in the food web. Although many studies have been conducted regarding the feeding behaviors of zooplankton through gut content analyses, there are limitations in the visual identification of digested contents using a microscope. DNA techniques have been applied to overcome these limitations since they can detect and amplify small amounts of prey DNA remaining in the gut contents. We designed a method to extract prey DNA from the gut contents of the whole body of the copepod specimen and tested the resolution of DNA identification for the prey phytoplankton. The common brackish species, *Sinocalanus tenellus*, were collected from Saemangeum Reservoir in different sites and seasons, and gut content DNA was extracted using 2.5% bleach treatment for 2 min for removal of potential contamination sources existing in preserved specimens without dissolution of the body. The sequences of the extracted gut contents were confirmed using BLASTn suite based on the NCBI database. The phytoplankton species detected in the gut showed temporal and spatial differences. Although DNA analysis of small copepod gut contents has been suggested as an effective method to examine the dynamics of primary prey sources at the genus or species level, uncertainties such as misidentification and limitations in the detailed information of the composition still exist.

**Key words:** *Sinocalanus tenellus*, capillary sequencing, Saemangeum reservoir

## 서론

동물플랑크톤이 식물플랑크톤을 선택적으로 섭식하는 특성에 대한 이해는 수생태계 먹이사슬 내의 물질이동뿐만 아니라 남세균의 섭식을 통한 수질 개선 등 환경 관

Manuscript received 13 September 2021, revised 23 September 2021, revision accepted 24 September 2021

\* Corresponding author: Tel: +82-31-201-3392, E-mail: chang38@khu.ac.kr  
Tel: +82-51-510-3344, E-mail: prozeva@pusan.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

리 측면에서도 중요한 연구로 주목받고 있다(Knisely and Geller *et al.*, 1986; Sailley *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2020). 특히 요각류는 연안생태계에서 동물플랑크톤 군집에서 우점하여 생체량의 대부분을 차지하며(Rakhesh *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018), 어류의 주 먹이원이기 때문에 어족자원 유지 측면에서 중요한 역할을 수행한다(Chang *et al.*, 2014). 이와 같이 저차 생물의 에너지를 고차 생물로 전달하는 먹이망 내 요각류의 주요 역할 때문에 시공간 변화에 따른 요각류의 섭식 특성에 대한 정보는 수생태계의 구조 및 생산성을 파악하기 위해 중요하다(Uye, 2011). 최근 요각류의 섭식 특성을 보다 정확히 분석하기 위해 개체 해부 및 위내용물 추출 과정을 거쳐 유전자 분석 기법을 적용한 연구 결과가 보고되고 있다(Ho *et al.*, 2017; Hirai *et al.*, 2018; Yeh *et al.*, 2020). 그러나 해부를 통한 위내용물 추출 방법은 소형 요각류를 대상으로 적용하기에는 적절하지 않고, 유전자가 유실되거나 위 내용물이 아닌 개체 외부의 유전자로 인해 오염될 가능성이 존재한다. 본 논문에서는 이와 같은 문제를 해결하기 위해 요각류 개체를 해부하지 않고 외부의 불필요한 유전자를 제거하여 소화기관 속의 식물플랑크톤 유전자만 증폭·검출하는 방법을 시도하였다. 시공간 분포에 따른 섭식 특성 차이를 비교·분석하고자 동일 수역 내에서도 염분 구배가 뚜렷한 새만금을 연구 대상으로 선정하였다(Oda *et al.*, 2019). 호 내 식물플랑크톤 조성 및 기타 환경이 상이한 두 지점을 선정하여 모든 지점에서 지속적으로 출현하는 기수성 요각류인 *Sinocalanus tenellus*를 대상으로 위내용물의 유전자 분석을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 조사지점

2020년 2월, 5월, 8월 및 11월에 걸쳐 새만금호 내 염분농도가 낮은 담수 유입부(Site1; N35°49'17.03", E126°37'38.60")와 염분농도가 높은 해수 유입부(Site2; N35°45'23.82", E126°32'22.08")를 선정하여 먹이 환경 분석을 위한 원수와 기수역에서 우점하는 요각류 *S. tenellus* 채집을 실시하였다. *S. tenellus*의 크기(Prosomal length)는 대략 1.0 mm (Kimoto *et al.*, 1986)이며, 0.7~26.6 psu의 넓은 염분농도 범위에서 서식한다(Uye *et al.*, 2000). *S. tenellus*는 잡식성향을 가지며(Hada and Uye *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2018), 수계 내 동물플랑크톤 개체수 조절 및 식물플랑크톤의 시공간적 분포를 결정하는 데 중요한 역할을 수행한

다(Hada and Uye *et al.*, 1991).

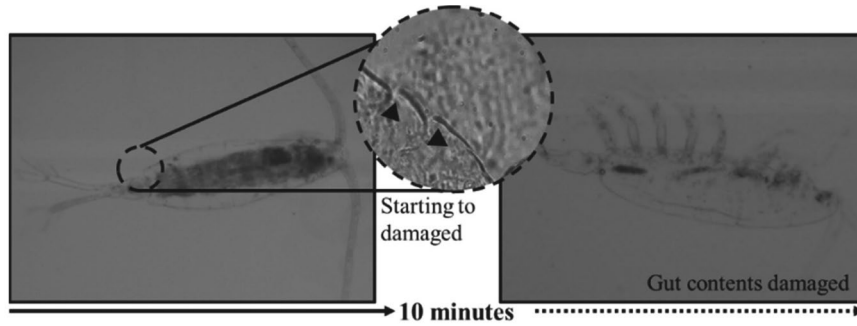
### 2. 플랑크톤 채집 및 동정

잠재적 먹이원이거나 할 수 있는 환경 중 식물플랑크톤 조성 분석을 위해 각 지점의 표층수 1 L를 polyethylene병에 채집하여 4~5%의 Lugol's solution 용액 처리 후 24시간 이상 정치했다. 상등액을 siphon으로 제거하고 농축시킨 뒤에 액침표본을 준비하여 광학현미경(Zeiss Axio imager A2, Germany)으로 ×600~1,000하에서 동정 및 분류했다. 부유성 구조류의 경우 KMnO<sub>4</sub>법(Hendey *et al.*, 1974)을 이용하여 시료를 세정하고 영구표본을 만들어 ×1000~2500하에서 동정하였다.

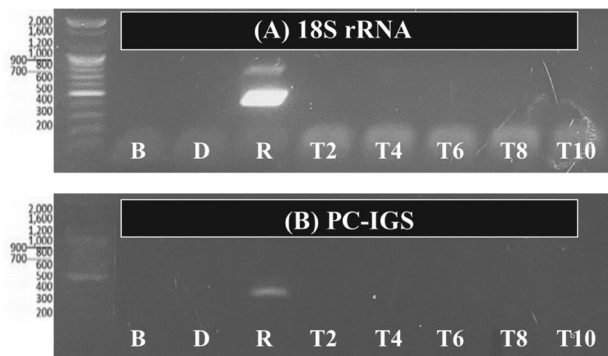
*Sinocalanus tenellus*를 채집하기 위해 각 지점의 수심을 측정된 뒤 바닥으로부터 수면까지 수직으로 네트(Kitahara zooplankton net; pore size 100 μm, diameter 0.3 m)를 약 1 m/s의 일정 속도로 표층까지 끌어올려 충분한 양이 채집될 때까지 반복하였다. 채집된 시료는 -20°C에서 냉동 보관하였으며, 해부현미경(Leica S8 APO, Germany)으로 동정한 뒤 교차 오염을 방지하기 위해 한 개체씩 유리 바이알에 70% 알코올로 고정하여 냉장 보관하였다.

### 3. 동물플랑크톤 위내용물의 선택적 처리

불필요한 DNA 제거에 시판용 표백제가 효과적인 것으로 보고되어(Greenstone *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2019; Chae *et al.*, 2021), 본 연구에서 요각류 개체 외부의 DNA를 제거하는데 시판용 표백제(차아염소산나트륨 5.4%)를 희석하여 사용하였다. 요각류 개체 내부의 위내용물에 영향을 미치지 않는 시간을 검토하기 위해 처리농도와 처리시간에 따른 제거효율을 확인하였다(Figs. 1, 2). 확인 결과에 따라 요각류 시료는 2.5%로 희석한 시판용 표백제(차아염소산나트륨 5.4%)에 2분간 처리하여 증류수로 2회 세척한 뒤 Bead Ruptor(Omni International, Kennesaw, GA)로 균질화 후 Dneasy Blood & Tissue kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 유전자를 추출하였다. 처리수 시료의 경우, 동일하게 최종 농도가 2.5%가 되도록 락스를 첨가한 뒤 2분간 방치 후 공극 크기가 0.45 μm인 GF/F(NC 45 ST, WhatmanTM) 여과지로 여과한 뒤 증류수로 2회 세척하고 Dneasy PowerWater kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 유전자를 추출하였다. 유전자 추출 과정은 제조사 권고에 따라 진행하였으나, 최종 유전자 농도를 높이기 위해 최종 부피를 50 μL로 줄여 추출하였다. 추출된 DNA는 -20°C 이하로 냉동 보관하였다.



**Fig. 1.** Microscopic observation to determine effective time for unnecessary DNA removal, but not allowing dissolution of gut contents from the specimen.



**Fig. 2.** Electrophoresis detection results (A) 18S rRNA for detecting Chlorophyceae using primer A (Table 1); (B) PC-IGS for detecting *Microcystis* using primer B (Table 1); B: blank; D: distilled water (negative control); R: raw water(control); T: treated water sample by 2.5% commercial bleach solution (2, 4, 6, 8, and 10 minutes); first lane of each gel: Ladder using 100 bp molecular marker.

#### 4. 동물플랑크톤 위내용물 DNA 분석

AccuPower Hot start PCR PreMix (Bioneer, Korea)에 각 샘플에서 추출된 유전자(1 µL)와 universal algal 23S rRNA를 타겟하는 프라이머 (Table 1-(C)), forward와 reverse 각각 1 µL를 첨가하여 최종 부피 20 µL로 Thermal cycler (Bio-rad, California, USA)에서 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 진행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% 아가로스 젤 (AccuPrep® PCR/Gel DNA Purification Kit (50 reactions) [K-3038])을 사용하여 분리하였고, 확인된 밴드는 Bioneer Co. (Daejeon, Korea)에서 capillary sequencing을 통해 양방향으로 염기서열을 분석하였다. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7)을 사용하여 시퀀스 정렬을 수행하였으며 BLASTn을 통해 유사도 (identity)가 높은 시퀀스를 식별하였다 (NCBI

Resource Coordinators, 2014). Collection (nr/nt) 데이터베이스에서 검색대상 생물종은 와편모조강 (Dinophyceae, taxid:2864), 규조강 (Bacillariophyceae, taxid:33849), 황갈조강 (Chrysophyceae, taxid:2825), 남조강 (Cyanophyceae, taxid:1117), 녹조강 (Chlorophyceae, taxid:3166), 유글레나조강 (Euglenophyceae, taxid:2704141), 은편모조강 (Cryptophyceae, taxid:3027)으로 설정하였다. Identity (%)가 97% 이상일 경우 해당 종으로 판단했으며, 97% 미만일 경우에는 Identity (%)를 기준으로 상위 5개의 종을 대상으로 Maximum Composite Likelihood (Neighbor-Joining Tree)를 이용하여 계통수 (Phylogenetic tree)에서 거리가 가장 가까운 종으로 선정하였다. 계통수에서 해당 시료가 같은 강, 목, 과 또는 속에 속하는 2개 이상의 종과 묶여 유사한 종으로 분류될 경우 해당 분류군으로 판단하였다. 위내용물에서 검출된 종들을 대상으로 계절 및 지점 간 공통종을 비교하기 위해 검출된 종을 하나의 OTUs (Operational Taxonomic Units)으로 가정하여 벤다이어그램으로 시각화하였다. DNA 추출 및 증폭 과정에서 오염을 최소화하기 위해 각 샘플은 분리 보관되었으며, 클린벤치에서 멸균 장갑 및 멸균된 기구를 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

각 계절별 두 지점에서 수질 항목을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 요각류의 잠재적 먹이원의 종류와 양을 나타내는 새만금호의 식물플랑크톤 군집을 분석하기 위해 현미경을 이용하여 두 지점에서 채수 및 농축 과정을 거친 시료의 계절별 종조성을 확인하였다 (Table 3, Fig. 4). 8월을 제외한 2월, 5월 및 11월에서 종수가 Site2보다 Site1에서 다양하게 나타났으며, 우점종은 계절별로 각각 다른 종으로 출현하였지만 두 지점에서는 동일한 종으로

**Table 1.** Primers used for confirming the DNA removal efficiency (A, B) and detecting *S. tenellus* food sources (C).

Target organism	Primer	Sequence(5'-3')	Base pair	Ref.
(A) Chlorophyceae (18S rRNA)	ChloroF	TGGCCTATCTTGTGGTCTGT	473	Moro <i>et al.</i> , 2009
	ChloroR	GAATCAACCTGACAAGGCAAC		
94°C, 3 min → 35 cycles [94°C, 1 min → 55°C, 1 min → 72°C, 1 min] → 72°C, 10 min				
(B) <i>Microcystis</i> (PC-IGS)	cpc57F	AACCTATGTAGCTTTAGGAGTACC	300	Kim <i>et al.</i> , 2010
	cpc356R	CTTAAGAAACGACCTTGAGAATC		
94°C, 5 min → 35cycles [94°C, 1 min → 60°C, 1 min → 72°C, 1 min] → 72°C, 5 min				
(C) Universal algal (23S rRNA)	p23SrV_f1	GGACAGAAAGACCCTATGAA	~400	Yang <i>et al.</i> , 2018
	p23SrV_r1	TCAGCCTGTTATCCCTAGAG		
94°C, 2 min → 35 cycles [94°C, 20s → 55°C, 30s → 72°C, 30s] → 72°C, 10 min				

**Table 2.** Water factors at two sites and seasons in Saemangeum reservoir.

Water quality	February		May		August		November	
	Site1	Site2	Site1	Site2	Site1	Site2	Site1	Site2
Water temperature	4.3	4.5	18.2	17.5	32.0	31.0	15.1	15.1
Salinity	14.0	14.9	18.8	22.8	0.2	0.7	11.7	18.1
pH	8.9	8.5	8.7	8.7	7.9	8.6	8.3	8.1
Dissolved oxygen	14.5	14.2	7.8	8.2	4.3	5.6	7.4	6.8
Chemical oxygen Demand	2.4	1.6	14.4	11.2	7.2	0.4	2.4	2.4
Chl- <i>a</i>	14.9	6.2	12.7	2.9	0.9	2.5	1.9	0.9
Total nitrogen	1.585	1.862	1.483	1.058	2.140	1.789	0.896	0.792
Total phosphorus	0.253	0.098	0.139	0.017	0.215	0.139	0.041	0.048

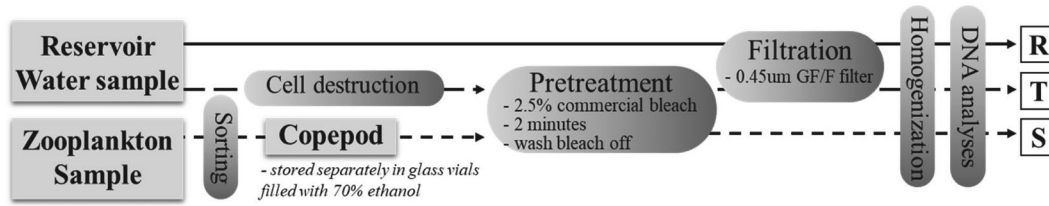
**Table 3.** Species numbers of phytoplankton and density (cells mL<sup>-1</sup>) (relative abundance %) of dominant species at two sites and seasons in Saemangeum reservoir.

	Site1			Site2		
	Species number	Dominant species	Cells mL <sup>-1</sup> (Abundance%)	Species number	Dominant species	Cells mL <sup>-1</sup> (Abundance%)
Feb	23	<i>Chaetoceros</i> sp.	879 (26.4)	20	<i>Chaetoceros</i> sp.	2321 (25.0)
May	17	<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	3062 (40.8)	9	<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	2432 (52.7)
Aug	23	<i>Coelastrum sphaericum</i>	272 (21.6)	30	<i>Planktothrix rubescens</i>	1896 (30.5)
Nov	18	<i>Skeletonema dohrnii</i>	10544 (78.0)	14	<i>Skeletonema dohrnii</i>	2715 (78.7)

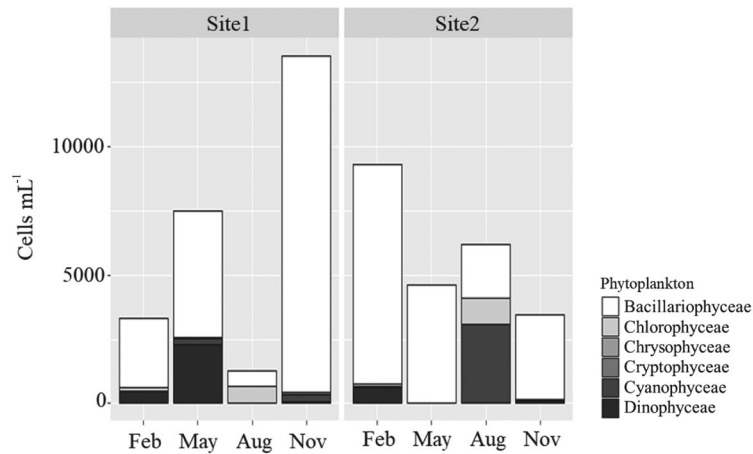
조사되었다. 해수에서 주로 출현하는 *Chaetoceros* sp.와 *Skeletonema dohrnii*는 각각 2월과 11월에 우점하는 것으로 분석되었고, 해수와 기수 모두에서 서식하는 *Cyclotella choctawhatcheeana*는 5월에 우점하였다. 강우가 많았던 8월에 지점 2에서 출현종수는 다른 조사 시기보다 더 많았으며, 담수종인 녹조강의 *Coelastrum sphaericum*과 남조

강의 *Planktothrix rubescens*가 우점하여 다른 계절에 비해 담수 성향이 강한 것으로 나타났다. 따라서 새만금 요각류 군집의 먹이환경은 상류 하천수 및 영양염의 호 내 유입에 의해 상이한 시공간 분포 경향을 가지는 것으로 판단된다 (Blenckner *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2014).

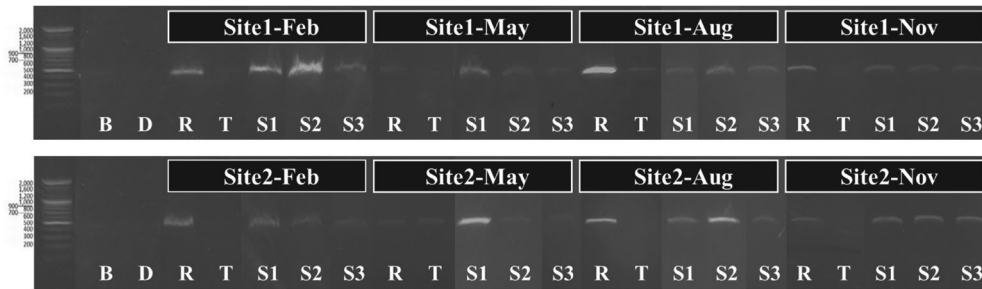
시료 내에서 검출하고자 하는 유전자를 선택적으로 증



**Fig. 3.** Experimental design. (R) Identification of phytoplankton species in raw water (food environment), (T) Test for removal of extracellular DNA (Validation of gut contents analysis), (S) Analyses of phytoplankton community in the gut contents of *S. tenellus* (food).



**Fig. 4.** Each Class density (cells mL<sup>-1</sup>) of phytoplankton at two sites in Seamangeum reservoir.



**Fig. 5.** Electrophoresis detection results, B: blank; D: distilled water (negative control); R: raw water (control); T: treated water sample by 2.5% commercial bleach solution for 2 minutes; first lane of each gel: Ladder using 100 bp molecular marker.

폭할 수 있는 프라이머를 첨가하여 PCR 및 전기영동을 진행한 뒤, 젤로부터 프라이머의 base pair 위치에서 밴드가 확인되면 시료 내 해당 유전자가 존재한다고 판단할 수 있다. 본 연구에서 적용한 전처리 방법의 유효성을 확인하기 위해 원수와 전처리를 진행한 처리수의 밴드를 비교한 결과, 일부 처리수를 제외하고는 원수에서 확인된 밴드가 처리수에서는 관찰되지 않아, 본 실험에서 시도한 전처리 방법을 통해 요각류 개체 외부의 불필요한 DNA를 제거하는데 효과가 있는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 밴드가 확인된

처리수는 요각류 위내용물 시료와 함께 식물플랑크톤 유전자의 증폭 여부를 확인하기 위해 추가적인 검증 과정이 필요하다고 판단하여 밴드를 포함한 젤을 추출하고 서열 분석을 실시하였다.

서열 분석 결과, 총 3개 시료의 계통수에서 검출된 서열과 identity를 기준으로 상위 종들이 동일한 강, 목 또는 속으로 묶이는 것으로 나타나 해당 분류군으로 판단하였다(Fig. 6). 원수와 처리수 및 요각류 위내용물에서 다양한 분류군(규조강, 녹조강, 남조강, 와편모조강, 은편모조강, 황

**Table 4.** The summary of detected dominant signal information based on the direct capillary sequencing.

Site	Month	Samples	Organisms (taxid)	Identity (%)	Query (%)
Site1	Feb	R	Order Oscillatoriales (KM458382.1)	90.91	13
		S1	<i>Ankistrodesmus</i> sp. (MF716577.1)	98.6	74
		S2	<i>Ankistrodesmus</i> sp. (MF716577.1)	97.65	62
		S3	Order Chaetopeltidales (KT713392.1)	95.45	22
	May	R	<i>Cyanobacterium endosymbiont</i> (AP018341.1)	86.84	23
		S1	<i>Dinophysis acuta</i> (KP826905.1)	83.33	65
		S2	Class Chlorophyceae	Fig 6-Phylogenetic tree (1)	
		S3	<i>Synechococcus</i> sp. (MK351651.1)	94.44	29
	Aug	R	<i>Scendesmus acunae</i> (MF716573.1)	83.45	14
		T	No match in BLASTn suite		
		S1	Order Chlamydomonadales (MF482963.1) or Order Tetrasporales (MF484668.1)	100	6
		S2	<i>Nitzschia palea</i> (AP018511.1) or <i>Trachelomonas</i> sp. (KT305205.1)	100	22
	Nov	S3	<i>Ankistrodesmus</i> sp. (MF716577.1)	97.18	73
		R	<i>Dinophysis acuta</i> (KP826905.1)	78.79	49
		S1	<i>Ankistrodesmus</i> sp. (MF716577.1)	97.16	73
		S2	<i>Synechococcus</i> sp. (CP0309373.1)	97.21	92
Site2	Feb	S3	Order Chlamydomonadales (MF485331.1)	87.96	17
		R	No match in BLASTn suite		
		S1	<i>Dinophysis acuta</i> (KP826905.1)	87.63	18
		S2	<i>Dinophysis fortii</i> (KP826909.1)	93.02	19
	May	S3	<i>Aphanothece clathrata</i> var. <i>rosea</i> (MW652744.1)	88.07	71
		R	<i>Synechococcus</i> sp. (CP039373.1)	97.16	39
		T	Genus <i>Dunaliella</i>	Fig 6-Phylogenetic tree (2)	
		S1	<i>Leptolyngbya</i> sp. (KM458323.1)	94.12	96
	Aug	S2	<i>Dinophysis acuta</i> (KP826905.1)	88.27	72
		S3	<i>Dinophysis acuta</i> (KP826905.1)	81.94	41
		R	<i>Synechococcus</i> sp. (CP039373.1)	98.85	65
		S1	Order Synechococcales	Fig 6-Phylogenetic tree (3)	
	Nov	S2	Order Chaetopeltidales (KT713392.1)	97.73	16
		S3	<i>Pandorina morum</i> (MH511706.1)	78.35	54
		R	<i>Halamphora</i> sp. (MZ469823.1)	100	20
		S1	Order Chaetopeltidales (KT713392.1)	97.22	6
Nov	S2	<i>Ankistrodesmus</i> sp. (MF716577.1)	83.82	6	
	S3	No match in BLASTn suite			

갈조강)에 속하는 식물플랑크톤이 검출되었으며, 새만금 호 내 시공간 차이에 따라 상이한 경향을 보였다. 현미경을 이용하여 동정한 식물플랑크톤 군집 조성의 경우 규조강이 우점한 반면, 동일한 원수의 서열 분석 결과에서는 주로 녹조강, 남조강 및 와편모조강이 우점하여 다소 상반된 경향을 나타냈다. 특히 현미경 분석 결과에서 보다 더

다양한 식물플랑크톤 종들이 관찰되었다. 이와 같은 차이는 현미경 분석과 유전자 분석에 사용되는 시료의 절대적인 양의 차이뿐만 아니라(현미경 분석-1 L, 유전자 분석-50 mL) 육안으로 세포를 정확하게 확인할 수 있는 온전한 세포와 환경 내 세포가 분해되어 존재하는 유전자 양의 차이에 기인한 것으로 판단된다. 또한 현미경 분석의 경우



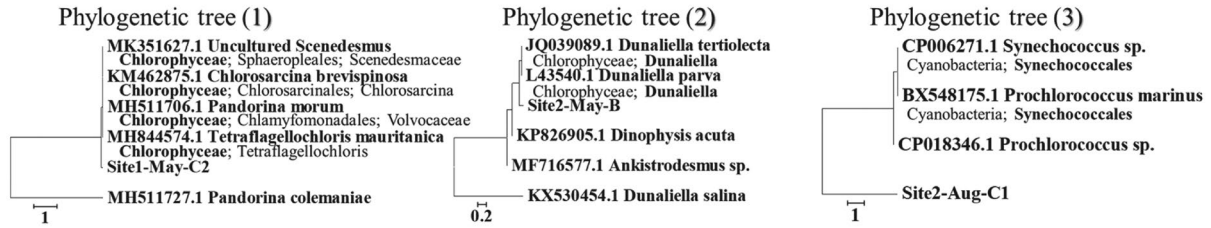


Fig. 6. Phylogenetic tree using MEGA (Neighbor-Joining Tree, Maximum Composite Likelihood) up to the top 5 species based on identity (%).

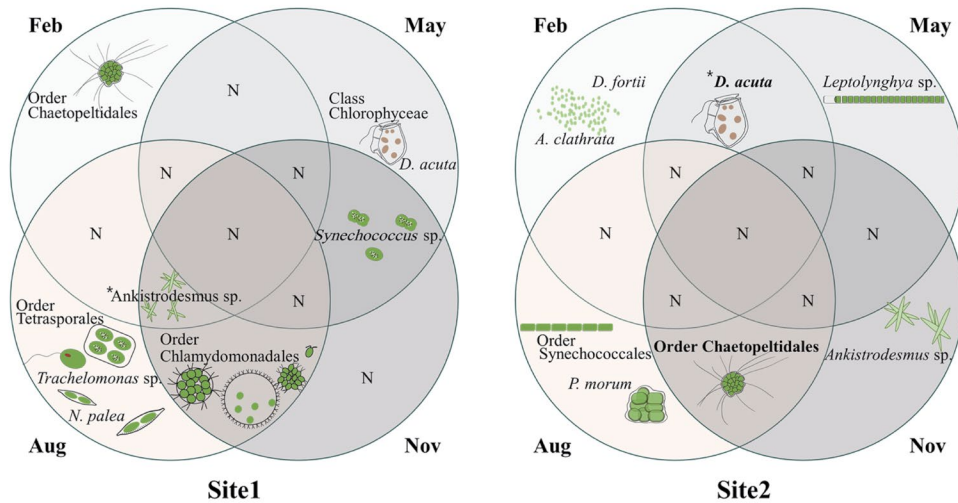


Fig. 7. Venn diagram of phytoplankton species detected from *S. tenellus*' gut contents among sites and season (\*: phytoplankton species detected twice in repeats within the same season; N: no overlap species).

육안으로 확인되는 종을 모두 동정하여 밀도 및 생체량을 환산할 수 있으나, 서열분석의 경우 한 시료로부터 하나의 염기서열을 얻고 이와 가장 유사한 대상종을 검출하는 방법이기 때문에 정량적인 비교를 하기에는 한계가 있다. 따라서 먹이환경을 나타내는 원수시료는 다량의 세포 및 유전자가 동시에 존재하기 때문에 유전자 분석과 함께 종 다양성 및 상대 풍부도 등을 비교할 수 있도록 현미경 분석이 병행될 필요성이 있다고 판단된다.

한편 위내용물에서 검출된 식물플랑크톤은 특정 계절 및 지점에서 공통적으로 검출되거나 반복구에서 동일한 종이 나타나는 경향을 보였다. 그러나 동일 지점 내 동일 계절의 원수와 요각류 위내용물에서 검출된 식물플랑크톤이 모두 일치하지 않는 것으로 보아, 환경 내 다량 존재하는 먹이원과 요각류가 주로 섭식한 먹이원과는 차이가 있는 것으로 확인되었다.

요각류의 주요 섭식 대상의 변화를 분석하기 위해 지점별 위내용물에서 검출된 식물플랑크톤 종들의 중첩 여부

를 벤다이어그램으로 시각화하였다(Fig. 7). 일부 종들(녹조강-Order Chlamydomonadales, Order Chaetopeltidales, *Ankistrodesmus* sp.; 남조강-Synechococcus sp.; 와편모조강-Dinophysis acuta)은 특정 계절 및 지점에서 공통적으로 검출되었으나, 4계절에서 모두 공통적으로 검출된 식물플랑크톤은 존재하지 않아 전체적으로 새만금호 내 시공간적 차이에 따라 *S. tenellus*의 주요 섭식 대상종은 상이한 경향을 보였다. 지점 1의 경우, 녹조강의 *Ankistrodesmus* sp. 및 Chlamydomonadale 목이 특정 계절에 공통적으로 검출되어 녹조강이 가장 빈번하게 섭식되는 분류군으로 분석되었다. 8월에는 규조강(*Nitzschia palea*), 녹조강(Order Chlamydomonadales, Order Tetrasporales, *Ankistrodesmus* sp.) 및 유글레나강(*Trachelomonas* sp.)을 포함한 상대적으로 다양한 식물플랑크톤이 검출되었다. 이는 현미경을 이용하여 채집한 현장 원수를 분석한 결과에서 8월의 식물플랑크톤 종수가 다른 계절에 비해 다양하게 나타난 경향과 일치하였다. 즉 섭식 가능한 먹이가 증

가할 경우 다양한 먹이원을 섭식하고 이에 따라 위 내용물에서 검출되는 식물플랑크톤의 종 수도 증가하는 것으로 나타났다. 지점 2의 경우 녹조강, 남조강 및 와편모조강이 검출되었으며 우점 식물플랑크톤 분류군은 계절에 따라 상이한 것으로 나타났다. 2월과 5월의 경우 남조강과 와편모조강이 우점한 반면, 8월과 11월에는 Chaetopeltidales 목이 공통적으로 검출되는 등 녹조강이 우점하였다.

본 연구와 같은 유전자를 이용한 생물종 검출 및 위내용물 분석 과정에서 시료 오염, 기술적 한계 등으로 인해 일반적으로 발생할 수 있는 오류들로는 위양성(false-positive) 및 위음성(false-negative)을 들 수 있다. 본 연구의 분석 과정에서도 이와 관련된 결과가 일부 유도되어, 향후 유사한 분석에서 보다 명확한 결과를 얻기 위해서는 주의가 요구되며 방법적인 측면에서도 개선의 필요성이 제시되었다. 먼저 밴드가 확인된 처리수 시료(지점 1-8월, 지점 2-5월)를 대상으로 한 서열분석 결과에서 지점 1의 8월 시료에서는 식물플랑크톤이 검출되지 않은 반면, 지점 2의 5월 시료에서는 *Dunaliella*가 검출되어 위양성으로 판단하였다. 해당 식물플랑크톤 종은 다른 지점 및 계절의 시료에서 전혀 검출되지 않았으며 현미경 분석에서도 관찰되지 않았다. 따라서 이와 같은 결과는 시료 간 교차오염 및 분석 과정 중의 오염보다는 사용 프라이머의 민감도 및 특이성 부족으로 인한 유전정보 해석의 한계로 판단된다.

한편, 지점 2의 2월 원수(R) 및 11월 요각류 위내용물 시료(S3)에서는 겔로부터 밴드가 확인되었으나 BLASTn 매칭에서 유사한 식물플랑크톤이 검출되지 않아 false-negative로 판단되었다. 본 연구에서는 Capillary Sequencing 분석을 통해 증폭된 유전자 중 신호가 강한 염기서열을 바탕으로 하나의 서열로 나타내고 BLASTn을 통해 가장 유사한 종을 확인하여 대상 종을 특정하였다(Gibbs *et al.*, 1989; NCBI Resource Coordinators, 2014). 이러한 분석 특성은 시료 내 다른 종들의 유전자가 동시에 증폭되는 이중 피크(double-peak)의 발생을 유도할 수 있고, 결과적으로 유전 서열의 불일치로 인해 해석이 어려워질 가능성이 존재한다(Hill *et al.*, 2014).

본 연구에서는 요각류 위내용물의 추출 방법을 확립하고 유전자 분석으로의 적용 가능성을 확인하는 것을 목적으로 하였다. 동물플랑크톤의 경우 개체의 해부와 장내 섭취된 식물플랑크톤 세포의 관찰이 불가능한 경우가 많으므로 본 연구에서는 이러한 한계점을 보완하기 위한 효과적인 방법을 고안하는 데 집중하였다. 따라서 유전자 증폭과 유전정보의 판독을 위한 서열분석 결과의 경우, 명확한 결과만 검출로 판단하여 해석한 반면 일부 모호한 결과들

은 향후 유사한 분석에서 개선되어야 할 점들로 정리하여 제시하였다. 본 연구에서 적용한 capillary sequencing 분석 방법은 추출 및 증폭한 유전자를 대상으로 분류군을 특정하여 이외의 분류군은 고려 대상에서 제외할 수 있다는 점과 비용적인 측면에서 부담이 적다는 장점이 있으나, 기술 및 방법적인 측면에서 보다 정확한 분석을 진행하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

최근 활발하게 적용되고 있는 차세대염기서열분석법(Next-generation sequencing)은 대량으로 유전체의 염기서열 정보를 얻을 수 있는 방법으로, 모든 세포의 DNA 염기서열의 총합으로 표현되는 capillary sequencing과 달리 각 세포에서 유래한 단일 가닥 DNA 염기서열이 각각 독립적으로 표현되기 때문에 검출 가능한 유전자를 모두 확인할 수 있다(Reis-Filho, 2009; Kircher *et al.*, 2010). 국내 외에서 어류, 대형무척추동물 등 비교적 대형 동물들을 대상으로 NGS를 적용하여 위내용물을 연구한 사례가 최근 보고되고 있으나(Leray *et al.*, 2013; Jo *et al.*, 2020; Kou *et al.*, 2020), 동물플랑크톤을 대상으로 한 연구 사례는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서 적용한 위내용물 분석에 특화된 외부 유전자 제거 전처리 방법은 농도와 처리시간 조절 등의 응용방법에 따라 다양한 동물플랑크톤 분류군에 적용이 가능할 것으로 사료된다. 처리된 위내용물에서 유전자를 추출할 경우에는 본 연구에서 사용한 capillary sequencing의 사전 분석을 통해 프라이머의 적합성을 확인한 뒤에 NGS를 함께 적용한다면 다양한 수생태계 및 생물군의 연구분야에서 종 다양성, 상대 풍부도 등 정성 및 정량적인 비교 등 보다 정확한 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대된다(Reis-Filho, 2009).

## 적 요

동물플랑크톤이 식물플랑크톤을 선택적으로 섭식하는 특성에 대한 이해는 수생태계 먹이사슬 내의 물질 이동에 중요하다. 하지만 해부를 통한 위내용물 추출 방법은 소형 요각류를 대상으로 적용하기에는 적절하지 않고, 유전자가 유실되거나 위내용물이 아닌 개체 외부의 유전자로 인해 오염될 가능성이 존재한다. 본 연구에서 호 내 식물플랑크톤 조성 및 기타 환경이 상이한 두 지점을 선정하여 모든 지점에서 지속적으로 출현하는 기수성 요각류인 *Sinocalanus tenellus*를 대상으로 위내용물의 유전자 분석을 수행하였다. 요각류 개체 외부의 DNA를 제거하는 데 2.5%로 희석한 시판용 표백제(차아염소산나트륨 5.4%)에 2분간 처리하여 증류수로 2회 세척한 뒤 유전자를 추출



하였다. 추출된 유전자는 23S rRNA를 증폭하여 서열분석을 실시하였다. Capillary sequencing 분석 결과, 원수와 처리수 및 요각류 위내용물에서 다양한 분류군(규조강, 녹조강, 남조강, 와편모조강, 은편모조강, 황갈조강)에 속하는 식물플랑크톤이 검출되었으며, 새만금호 내 시공간 차이에 따라 상이한 경향을 보였다. 현미경을 이용하여 동정한 식물플랑크톤 군집 조성의 경우 규조강이 우점한 반면, 동일한 원수의 유전자 분석(capillary sequencing) 결과에서는 주로 녹조강, 남조강 및 와편모조강이 우점하여 다소 상반된 경향을 나타냈다. 본 연구에서 적용한 위내용물 분석에 특화된 외부 유전자 제거 전처리 방법은 농도와 처리시간 조절 등의 응용방법에 따라 다양한 동물플랑크톤 분류군에 적용이 가능할 것으로 사료된다.

**저자정보** 채연지 (경희대학교 석사수료), 오혜지 (경희대학교 박사수료), 김용재 (대진대학교 교수), 장광현 (경희대학교 교수), 조현빈 (부산대학교 환경·에너지연구소 연구교수)

**저자기여도** 개념설정: 장광현, 조현빈, 조사 및 실험: 채연지, 오혜지, 장광현, 자료분석: 채연지, 오혜지, 조현빈, 김용재, 원고작성: 채연지

**이해관계** 본 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

**연구비** 이 논문은 2020년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2020R1C1C1009066).

## REFERENCES

- Blenckner, T., K. Pettersson and J. Padisak. 2002. Lake Plankton as Tracer to Discover Climate Signals. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie* **28**: 1324-1327.
- Chae, Y.-J., H.-J. Oh, K.-H. Chang, I.-S. Kwak and H. Jo. 2021. Application of Next-Generation Sequencing for the Determination of the Bacterial Community in the Gut Contents of Brackish Copepod Species (*Acartia hudsonica*, *Sinocalanus tenellus*, and *Pseudodiaptomus inopinus*). *Animals* **11**: 542.
- Chang, K.H., D. Hideyuki, N. Yuichiro, N. Gui-Sook and N. Shin-ichi. 2014. Feeding behavior of the copepod *Temora turbinata*: clearance rate and prey preference on the diatom and microbial food web components in coastal area. *Journal of Ecology and Environment* **37**: 225-229.
- Chen, M., D. Kim, H. Liu and C.K. Kang. 2018. Variability in copepod trophic levels and feeding selectivity based on stable isotope analysis in Gwangyang Bay of the southern coast of the Korean Peninsula. *Biogeosciences* **15**: 2055-2073.
- Gibbs, R.A., P.N. Nguyen, L.J. McBride, S.M. Koepf and C.T. Caskey. 1989. Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of in vitro amplified cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 1919-1923.
- Greenstone, M.H., D.C. Weber, T.A. Coudron, M.E. Payton and J.S. Hu. 2012. Removing external DNA contamination from arthropod predators destined for molecular gut-content analysis. *Molecular Ecology Resources* **12**: 464-469.
- Hada, A. and S. Uye. 1991. Cannibalistic feeding-behavior of the brackish-water copepod *Sinocalanus tenellus*. *Journal of Plankton Research* **13**: 155-166.
- Hendey, N.I. 1974. The permanganate method for cleaning using diatoms. *Nova Hedwigia. Beiheft* **64**: 305-323.
- Hill, J.T. 2014. Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. *Developmental Dynamics* **243**: 1632-1636.
- Hirai, J., Y. Hamamoto, D. Honda and K. Hidaka. 2018. Possible aplanochytrid (Labyrinthulea) prey detected using 18S metagenetic diet analysis in the key copepod species *Calanus sinicus* in the coastal waters of the subtropical western North Pacific. *Plankton and Benthos Research* **13**: 75-82.
- Ho, T.W., J. Hwang, M.K. Cheung, H.S. Kwan and C.K. Wong. 2017. DNA-based study of the diet of the marine calanoid copepod *Calanus sinicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **494**: 1-9.
- Jo, H., B. Choi, K. Park, W.-S. Kim and I.-S. Kwak. 2020. First Gut Content Analysis of 4th Instar Midge Larvae (Diptera: Chronomidae) in Large-Scale Weirs Using a DNA Meta-Barcoding Approach. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**: 2856.
- Kim, S.-G., S.-H. Joung, C.-Y. Ahn, S.-R. Ko and S.M. Boo. 2010. Annual variation of Microcystis genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* **74**: 93-102.
- Kimoto, K., S. Uye and T. Onbe. 1986. Growth characteristics of a brackish-water calanoid copepod *Smocalanus lenellus* in relation to temperature and salinity. *Bulletin of the Plankton Society of Japan* **33**: 43-57.
- Kircher, M. and J. Kelso. 2010. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. *Bioessays* **32**: 524-536.
- Kuo, J., C. Chen, C. Han, Y. Ju and K. Siong. 2020. Analyses of diet preference of larval orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) grown under inorganic fertilization method using next-generation sequencing. *Aquaculture* **735916**.
- Knisely, K. and W. Geller. 1986. Selective feeding of four zooplankton species on natural lake phytoplankton. *Oecolo-*

- gia **69**: 86-94.
- Lee, S.W., C. Park, D.B. Lee and J.K. Lee. 2014. Effect of freshwater discharge on plankton in Cheonsu bay, Korea during the rainy season. *The Sea Journal of the Korean Society of Oceanography* **19**: 41-52.
- Leray, M., J.Y. Yang, C.P. Meyer, S.C. Mills, N. Agudelo, V. Ranwez, J.T. Boehm and R.J. Machida. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* **10**: e34.
- Moro, C.V., O. Crouzet, S. Rasconi, A. Thouvenot, G. Coffe, I. Batisson and J. Bohatier. 2009. New design strategy for development of specific primer sets for PCR-based detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5729-5733.
- NCBI Resource Coordinators. 2014. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* **42**: D7-D17.
- Oda, Y., S. Nakano, J.M. Suh, H.J. Oh, M.Y. Jin, Y.J. Kim, K.H. Chang. 2018. Spatiotemporal variability in a copepod community associated with fluctuations in salinity and trophic state in an artificial brackish reservoir at Saemangeum, Korea. *PLoS ONE* **13**: 1-18.
- Oh, H.J., P.H. Krogh, H.G. Jeong, G.J. Joo, I.S. Kwak, S.J. Hwang, J.S. Gim, K.H. Chang and H. Jo. 2020. Pretreatment method for DNA barcoding to analyze gut contents of rotifers. *Applied Sciences* **10**: 1064.
- Rakesh, M., A.V. Raman, T. Ganesh, P. Chandramohan and F. Dehairs. 2013. Small copepods structuring meso-zooplankton community dynamics in a tropical estuary-coastal system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **126**: 7-22.
- Reis-Filho, J. 2009. Next-generation sequencing. *Breast Cancer Research* **11**: S12.
- Sailley, S.F., L. Polimene, A. Mitra, A. Atkinson and J.I. Allen. 2015. Impact of zooplankton food selectivity on plankton dynamics and nutrient cycling. *Journal of Plankton Research* **37**: 519-529.
- Uye, S., T. Shimazu, M. Yamamuro, Y. Ishitobi and H. Kamiya. 2000. Geographical and seasonal variations in mesozooplankton abundance and biomass in relation to environmental parameters in Lake Shinji-Ohashi River-Lake Na-kaumi brackish-water system, Japan. *Journal of Marine Systems* **26**: 193-207.
- Uye, S. 2011. Human forcing of the copepod-fish-jellyfish triangular trophic relationship. *Hydrobiologia*. **666**: 71-83.
- Yang, J., H. Jiang, W. Liu and B. Wang. 2018. Benthic algal community structures and their response to geographic distance and environmental variables in the Qinghai-Tibetan lakes with different salinity. *Frontiers in Microbiology* **9**: 578.
- Yeh, H.D., J.M. Questel, K.R. Maas and A. Bucklin. 2020. Metabarcoding analysis of regional variation in gut contents of the copepod *Calanus finmarchicus* in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **180**: 104738.