

# 해중림 모니터링 및 조성사업연구

-인천관내 해중림 모니터링 및 SSR 마커를 이용한 잘피의 유전 다양성 연구-

구자근

## I. 서론

잘피는 해조류와 달리 뿌리를 가지며 꽃이 피고 열매를 맺는 대표적인 바다식물인 해초로 거머리말이라 하며 진질(전남), 질피(경남) 라고도 불린다. 겨울에 자라기 시작하여 4-6월에 꽃을 피우고 열매를 맺는 다년생 해산 현화식물(꽃이 피는 식물)로 키는 180~220cm, 옆신(잎) 넓이는 1cm 내외이다. 줄기에는 당분이 많아 과거에는 식용으로 이용되기도 하고 식물체 자체는 염분이 없어 퇴비로도 이용되었으며 듀공 등 해산 포유류나 새의 먹이가 되기도 하며, 우리나라 서해안의 백령도에서 태안반도, 변산반도, 남해안의 완도, 광양만 남해도, 진해만, 부산 가덕도, 제주도, 동해안의 경북 울주군에 이르기까지 우리나라 전해역의 니질 또는 사니질로 조성된 얕은 내만의 파도가 심하지 않은 곳에서 큰 무리를 이루어 서식한다. 인천관내에서는 옹진군 덕적면 자월리 작은풀안해수욕장 앞 지선에 군락을 이루어 분포하며 영흥면에서도 군락을 이루는 것으로 알려져 있다. 따라서 생태계 기반 연구를 위한 해중림 조성 사업 중 인천관내의 잘피 군락지에 대한 실태조사가 필요하지만 군락의 상태 등 잘피 군락지에 대한 정보는 거의 전무하고 이에 대한 연구는 진행되고 있지 않은 실정이다. 이에 따라 관내 잘피 군락지의 모니터링을 통하여 자원보존과 지속적인 해양생산력을 유지하기 위한 기반연구로서 인천관내 해중림 모니터링 연구를 실시하였다.

SSR(Simple Sequence Repeats)은 유전체 전반에 널리 분포하는 2~6개의 단순히 반복되는 염기서열을 대상으로 DNA 변이를 분석할 수 있는 방법으로, 계통분류 등을 연구할 수 있는 유전기법이다. 이러한 유전적 기법은 반복염기서열의 클론 확보, 염기서열 분석 및 프라이머 제작 등에 많은 소요비용이 들며 제작이 어렵기는 하지만 한번 만들어 놓은 마커는 간편하게 사용이 가능한 장점이 있다.

잘피는 해양 현화식물로 해양생태계의 기반이 되며 해중림을 조성하는 해양보호종이다. 현재 해양환경 변화와 간척 등의 연안의 물리적인 변화에 따라 육지에서 가까운 연안에서는 없어지고 있는 실정이다. 이러한 잘피 군락지의 변화에 따라 지역간의 계통분류를 실시하여 유전적 다양성을 조사하는 것이 본 연구의 목적이다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 해중림 모니터링

인천 관내 잘피의 군락지는 2005년부터 실시된 잘피 연구를 위하여 파악된 인천광역시 옹진군 영흥면 내리 어촌계 앞 지선, 자월면 작은풀안해수욕장앞 지선, 백령면 옹기포 주변의 총 3개 지점을 대상으로 조사하였다(그림 1). 조사 항목은 군락위치 파악 및 잘피 개체의 특성으로 정하였다. 군락의 위치는 항공 사진으로 파악 후 직접 현장을 방문하여 조사하였으며, 잘피 개체의 특성은 전장 등 생물특성학적 조사를 실시하였다. 또한 조사된 잘피의 샘플을 수거하여 유전학적 분석을 통한 계통분류를 연구하기 위하여 각 지역에서 시료로 20개체 이상을 확보하여 사용하였다.

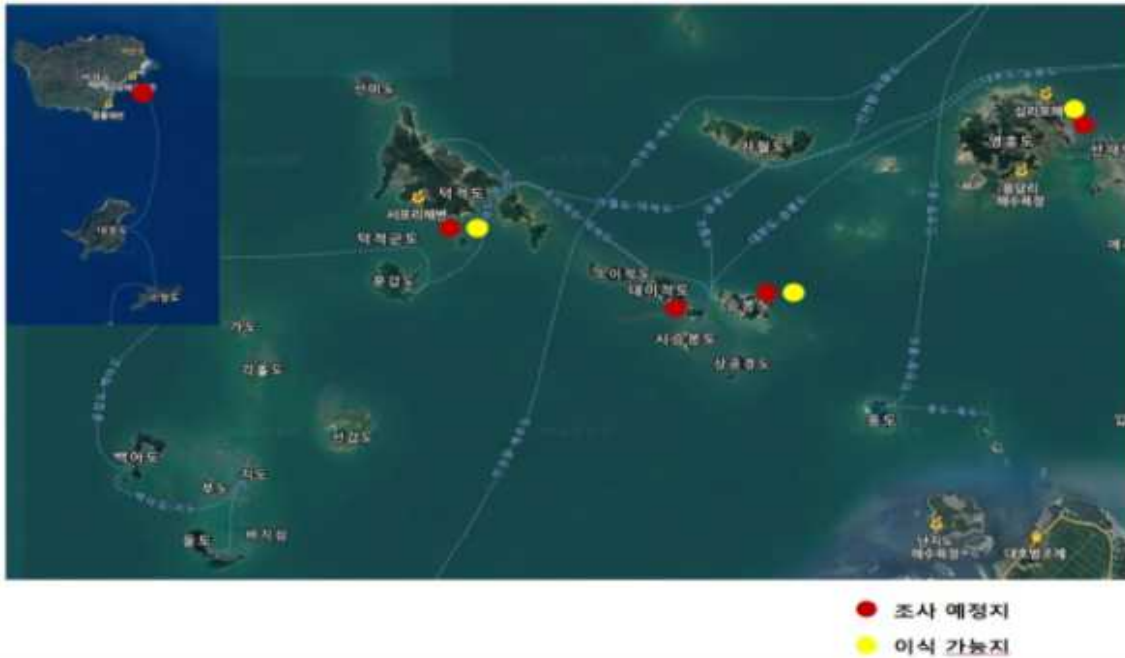


그림 1. 인천관내 해중림 모니터링 위치도

### 2. 실험재료 및 genomic DNA 추출

본 실험에 사용된 3개 지역 내 60점(각 지역 당 20점)의 잘피 조직 시료를 사용하였다. 잘피 잎 조직으로부터 genomic DNA(이하 gDNA)의 분리는 Biomedic<sup>®</sup> Plant gDNA Extraction Kit(Biomedic Co., Ltd., Korea)를 사용하였고 제조회사의 지침에 따라 수행하였다. 추출한 gDNA의 정량 및 정성 분석은 DeNovix DS-11+ Spectrophotometer(DeNovix, Wilmington, DE, USA)로 수행하였다. 추출한 gDNA는 2% (w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 통하여 확인하였다.

### 3. SSR 마커 정보

잘피의 유전 다양성 분석을 위해 기존에 보고된 SSR 마커 정보 중에서 7개를 선별하여 사용하였으며(Reusch et al., 1999, Mol. Ecol. 8:317-321; Reusch, 2000, Mol. Ecol. 9:371-373), 정방향 프라이머의 5' 말단은 형광염료인 6-FAM (Applied Biosystems) 으로 표지하여 사용하였다(표 1).

표 1. 잘피의 유전분석을 위한 SSR 마커 정보

NO	Marker Name	Primer Sequence (5' → 3')	Repeat motif	Size (bp)	Ta (°C)
1	GA17H1F	FAM-TCT TTA CCA ACC GAT CTC C	(TC)27	139	60
	GA17H1R	AAA CAC AAG CAA AAC AGT TAG T			
2	GA35E2F	FAM-CTT TCC CTC TTG GGC TTT TA	(TC)15	120	60
	GA35E2R	AAG AGG CTT TAA TTC AAA CAC A			
3	CT-3F	FAM-TGA AGA AAT CCC AGA AAT CCC	(CT)17	118	60
	CT-3R	AGA CCC GTA AAG ATA CCA CCG			
4	GA-1F	FAM-TAG TGG TGG TTG TTG GAG TGC	(GA)12	120	60
	GA-1R	GCC TCT TCC TTC AGA CTT CCC			
5	GA-2F	FAM-GGC AGC GAT CTA ATA ACA ATT AAG G	(GA)12	171	60
	GA-2R	ACG TCA CAT CTT TTC ACG ACC			
6	GA-3F	FAM-CGA CGA TAA TCC ATT GTT GC	(GA)13	112	60
	GA-3R	GCT TTT CAT TTA TCC AAT AGT TTG C			
7	GA-4F	FAM-GCG TGG ATT CTG GTT TTC G	(GA)5	137	60
	GA-4R	GCA TAT CCT CTT CTT TTG CCC			
8	GA-5F	FAM-ACC ATT TCC CGT CGT TAT C	(GA)13	150	55
	GA-5R	TTT GGT GCT AAT GAG TTG GG			
9	GA-6F	FAM-AGA AAC CCT AAT GTG ATG AAA TG	(GA)11	170	60
	GA-6R	TGT TGG TTA ATT CTC TTC TAA TCT T			

### 4. 증폭 DNA 단편 분석

증폭 DNA의 단편 분석을 통한 유전형 분석을 수행하였다. PCR 반응은 50 ng 게놈 DNA, 5 $\mu$ l의 2x HS<sup>TM</sup>TaqDNA중합효소 혼합액(DongSheng Biotech., Guangzhou, China), 각 0.3 $\mu$ l의 정방향과 역방향 프라이머(각 10 $\mu$  M)를 포함하는 10 $\mu$ l의 반응부피에 ABI 2720 Thermalcyder (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 정방향 프라이머의 5' 말단은 형광염료인 6-FAM(Applied Biosystems)으로 표지하여 증폭산물이 형광 표지가 이루어지도록 하였다. PCR 증폭을 위한 조건은 다음과 같다 : 초기 열변성(1회)-95°C 5분; DNA 증폭(총 35회 반복)-95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초; 최종 신장 반응(1회)-72°C 30분. PCR 증폭산물은 증폭여부를 확인하기 위하여 2% (w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 하

였다. PCR 증폭 후, 0.2 $\mu$ l의 PCR 증폭산물을 9.8 $\mu$ l의 Hi-Di formamide 및 0.2 $\mu$ l의 GeneScan<sup>TM</sup>500LIZ 사이즈스탠다드(Applied Biosystems)와 혼합하였다. 혼합물은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 방치하였다. 증폭된 DNA 절편은 50mm 모세관이 장착된 ABI 3730 DNA Analyzer(Applied Biosystems) 상에서 모세관 전기영동을 통해 DNA 절편들을 분리하였다. 대립유전자의 크기는 GeneMapper 소프트웨어(버전 4.0; Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다.

## 5. 유전 다양성 분석

주요 대립유전자 빈도(MAF), 대립유전자 수(NA), 유전적 다양성(GD), 다형성 정보 함유량(PIC) 등을 포함한 유전적 매개변수는 PowerMarker 소프트웨어(버전 3.25; Liu and Muse, 2005, *Bioinformatics*, 21:2128-2129)를 이용하여 공유하는 대립유전자 빈도를 계산함으로써 측정하였다. UPGMA 계통수는 MEGA 소프트웨어(버전 5.0)를 사용하여 작성하였다.

표 2. 잘피 샘플에서 정제된 게놈 DNAs 측정 값

지역	시료명	농도(ng/ul)	지역	시료명	농도(ng/ul)
백령도 (BR)	BR01	41.49	영흥 (YH)	YH11	7.81
	BR02	18.92		YH12	3.55
	BR03	6.38		YH13	30.24
	BR04	7.65		YH14	18.17
	BR05	45.56		YH15	11.92
	BR06	6.17		YH16	4.52
	BR07	21.48		YH17	21.22
	BR08	11.93		YH18	5.47
	BR09	24.92		YH19	212.04
	BR10	36.50		YH20	6.38
	BR11	84.33	대이작 도 (DE)	DE01	51.46
	BR12	38.38		DE02	240.00
	BR13	13.02		DE03	296.43
	BR14	73.23		DE04	1467.70
	BR15	72.63		DE05	169.49
	BR16	14.57		DE06	201.43
	BR17	32.36		DE07	203.47
	BR18	8.94		DE08	128.56
	BR19	5.47		DE09	246.24
	BR20	101.59		DE10	101.59
영흥 (YH)	YH01	21.88	DE11	105.32	
	YH02	23.18	DE12	121.06	
	YH03	4.72	DE13	221.15	
	YH04	16.01	DE14	142.93	
	YH05	3.46	DE15	212.04	
	YH06	4.58	DE16	97.69	
	YH07	6.70	DE17	66.04	
	YH08	4.96	DE18	266.96	
	YH09	8.94	DE19	73.95	
	YH10	2.24	DE20	42.26	

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 해중림 모니터링

인천관내 해중림을 모니터링한 결과는 그림 2 ~ 그림 4에 잘 나타나 있다. 인천광역시 영흥면 내리 어촌계 앞 지선 잘피 군락지 조사에서는 요각류와 어류의 난 부착 등이 확인 되었으며, 체장의 경우 1m 이하로 백령도 보다 키가 작은 개체로 확인되었다. 또한 계절별 개체수의 편차가 심하며, 연간 개체수의 차이가 많이 있었다. 면적 및 분포에 있어서 간조 시 80~90% 육상으로 노출 되는 특징이 있다.

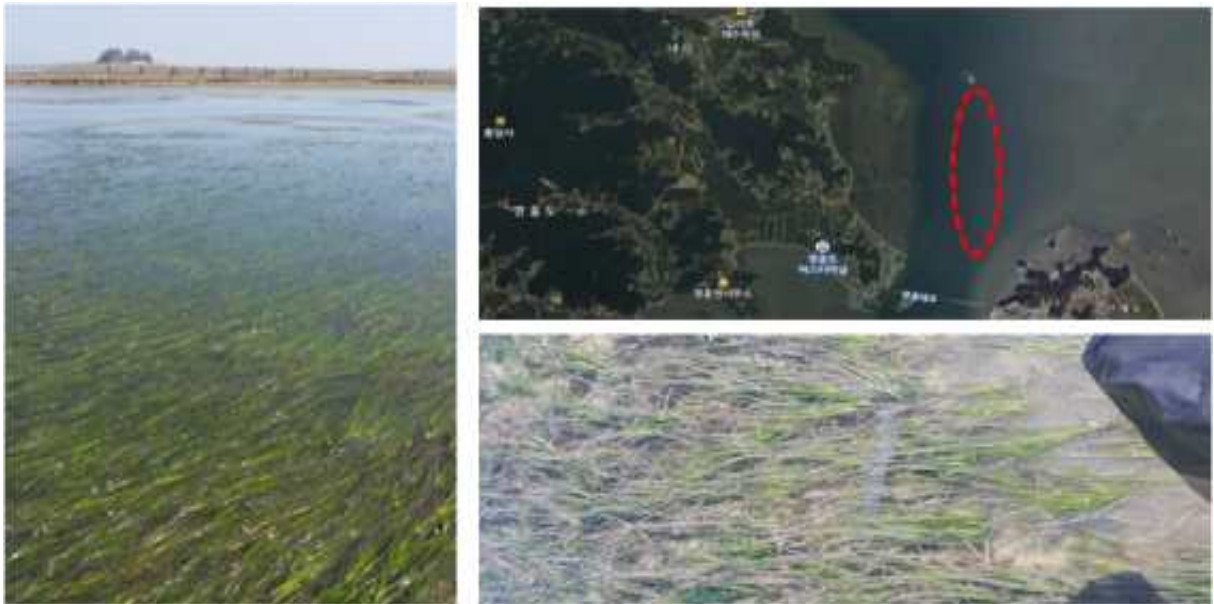


그림 2. 인천광역시 영흥면 내리 어촌계 앞 지선 잘피 군락지 조사

덕적면 자월리 작은풀안해수욕장 앞 지선 잘피 군락지 조사에서는 개체의 서식 밀도가 15~20m<sup>2</sup>으로 비교적 적은 서식밀도로 조사 되었고 면적 및 분포도 대부분 간조 시 전체면적의 5~10%만 노출 되어 영흥면과는 큰 차이를 보였다. 개체의 특성은 대부분 체장 30cm 이하로 인천의 잘피 군락지 중 가장 키가 작은 개체 특성을 가지고 있는 것으로 조사 되었다.

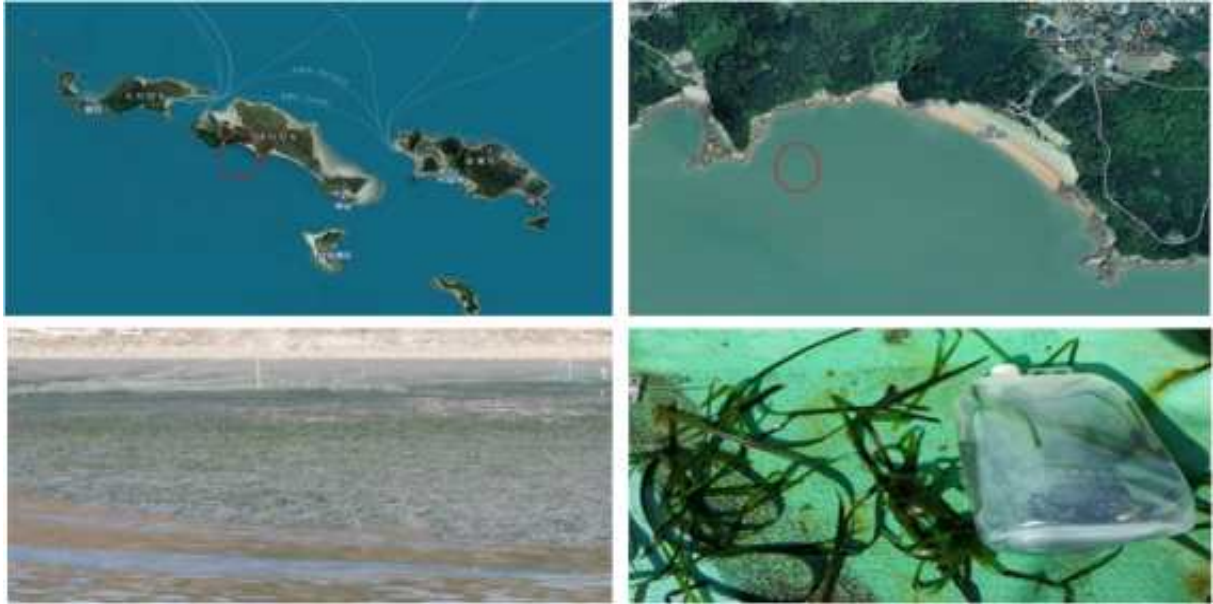


그림 3. 인천광역시 덕적면 자월리 작은풀안해수욕장 앞 지선 잘피 군락지 조사

백령면의 잘피 군락지는 두무진과 용기포항 인근에서 조사되었는데 가장 특징적인 사항은 개체의 체장이 1.6~2m로 인천관내에서 가장 큰 개체로 확인 되었다. 면적 추정은 군사보호지역 특성으로 항공사진 뿐 아니라 접근이 불가해서 추정할 수 없었지만 노출이 없는 수심 10m 지점에 군락지 모두가 분포하는 것으로 추정된다.



그림 4. 인천광역시 백령면 용기포항 인근 잘피 군락지 조사

## 2. 잘피 잎 조직으로부터 gDNA의 분리

3개 지역 60점의 잘피 시료로부터 gDNA를 추출하여 정량한 후(Table 2), 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하였다(그림 5).

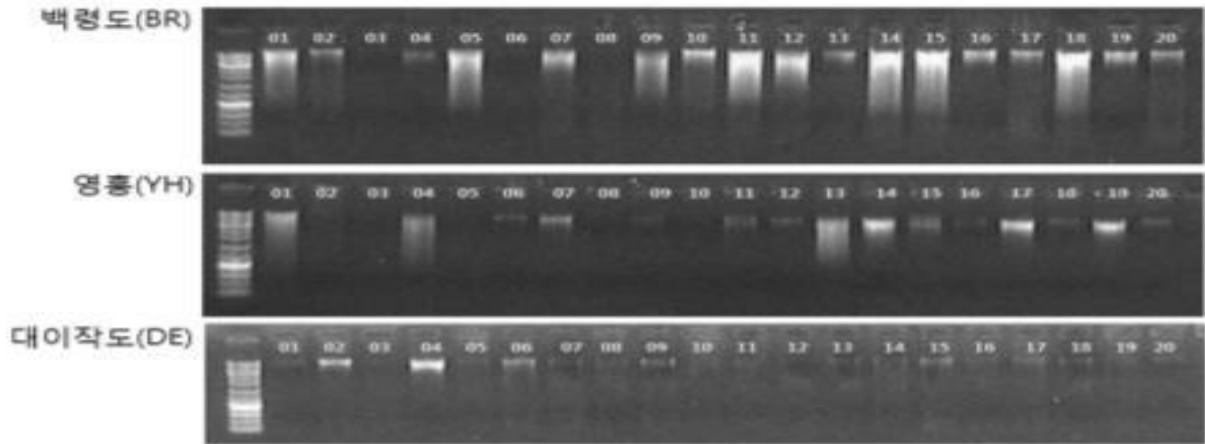


그림 5. 잘피의 잎에서 분리한 게놈 DNAs의 전기영동 실험결과

## 3. 잘피의 유전 다양성 분석

9개 유전자좌위를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 3개 지역 55개 시료(증폭이 불량한 5개 시료 제외)에 적용하여 유전 다양성 분석을 수행하였다. 55개 시료에 대한 절편 분석(fragment analysis)을 수행한 결과, 2개의 마커(GA5, GA6)는 대부분의 시료에서 증폭되지 않았다. 따라서 본 분석에서는 7개 마커에 대해서만 분석을 수행하였으며, 분석에 사용된 7개 유전자좌위의 특징을 요약하여 Table 3에 정리하였다. 분석 결과, 2개의 마커(GA1, GA3)는 본 분석에 사용된 집단에서 유전 다양성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이들 2개의 마커를 제외하여 분석한 결과, 최소 7개(GA2 마커)에서 최대 12개(GA17H1 마커)에 이르기까지 전체적으로 50개 대립 유전자가 관찰되었으며, SSR 좌위당 평균 대립 유전자수는 7.14개였다. 주요 대립 유전자 빈도(Major Allele Frequency)는 0.33(GA2 마커)에서 0.60(GA35E2 마커)에 이르기까지 다양하였으며, 평균값은 0.61이었다. 이형접합도 관찰치(Heterozygosity)는 0.13(GA17H1 마커)에서 0.92(GA2 마커)의 범위를 보였고, 평균값은 0.38이었다. 이형접합도 기대치(Gene Diversity)는 0.62(GA35E2 마커)에서 0.73(GA4 마커)의 범위를 보였고, 평균값은 0.51이었다.

표 3. 각기 다른 지역의 잘피 샘플을 기반으로 한 7개의 SSR 분석결과

Marker	Major Allele Frequency	Genotype No	Sample Size	No. of obs.	Allele No	Availability	Gene Diversity <sup>b</sup>	Hetc
CT3	0.43	11.00	55.00	44.00	9.00	0.80	0.72	0.45
GA1	0.98	2.00	55.00	46.00	2.00	0.84	0.04	0.00
GA2	0.33	11.00	55.00	51.00	7.00	0.93	0.73	0.92
GA35E <sub>2</sub>	0.60	10.00	55.00	39.00	11.00	0.71	0.62	0.36
GA3	1.00	1.00	55.00	53.00	1.00	0.96	0.00	0.00
GA4	0.43	10.00	55.00	55.00	8.00	1.00	0.73	0.82
GA17H <sub>1</sub>	0.52	11.00	55.00	24.00	12.00	0.44	0.71	0.13
Mean	0.61	8.00	55.00	44.57	7.14	0.81	0.51	0.38

<sup>a</sup>Availability is defined as  $1 - \text{Obs}/n$ , where **Obs** is the number of observations and *n* is the number of individuals sampled.

<sup>b</sup>Gene diversity, often referred to as expected heterozygosity, is defined as the probability that two randomly chosen alleles from the population are different.

<sup>c</sup>Heterozygosity is simple the proportion of heterozygous individuals in the population.

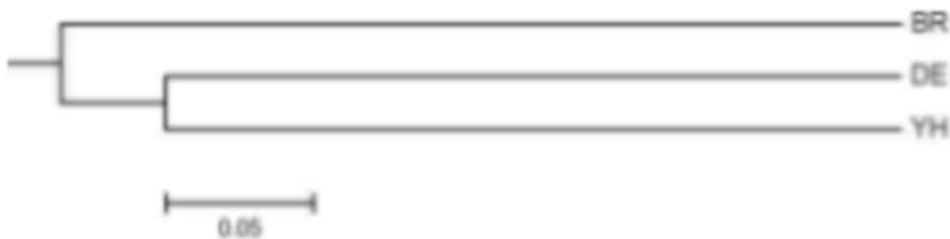


그림 6. 3개 지역의 그룹간의 유전학적 모식도(UPGMA tree). BR, 백령도 ; DE, 대이작도 ; YH, 영흥도.

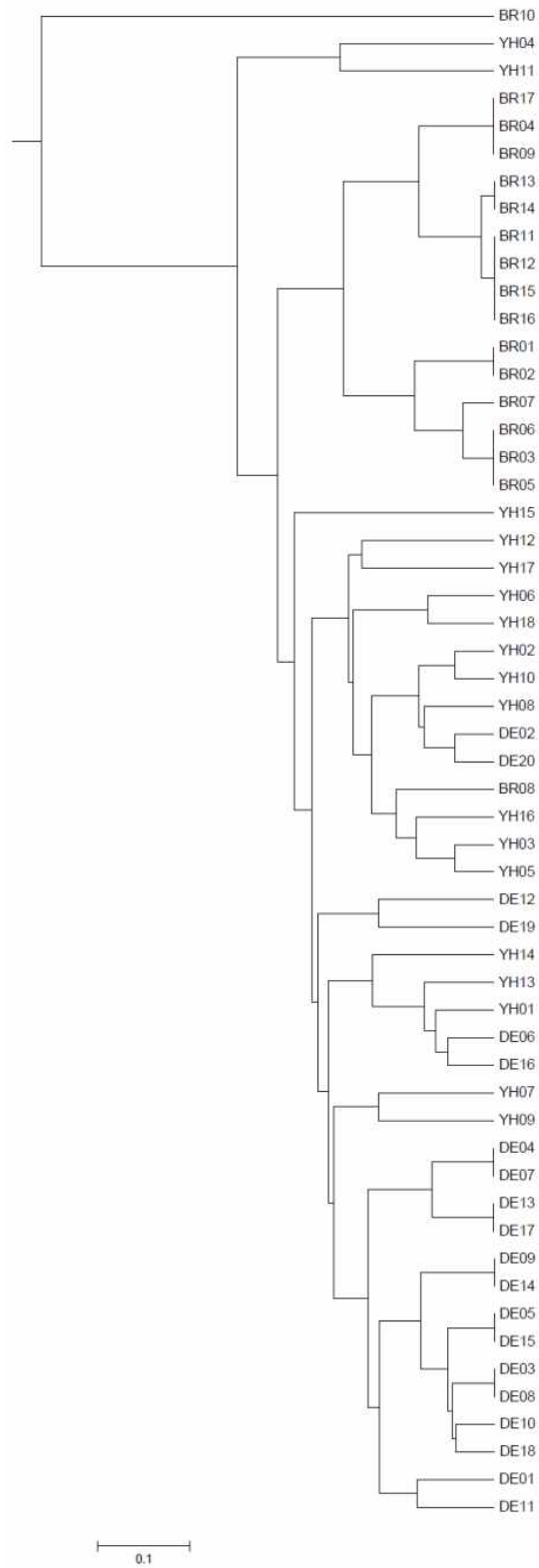


그림 7. 55개의 샘플 분석을 통한 유전학적 모식도(UPGMA tree). BR, 백령도; DE, 대이작도; YH, 영흥도.

## IV. 고찰

본 연구는 7개 다형성 SSR 마커에서 유래한 전체 50개 대립 유전자를 이용하여 3개 지역, 55개 잡피 시료의 유전적 다양성과 유연관계를 평가하였다. 유전자원간의 유전적 유사도 매트릭스를 토대로 UPGMA 계통수를 작성하였다(그림 6). 계통수 분석 결과, 백령 시료의 경우 2개의 시료(BR10, BR08)를 제외하고, 하나의 그룹에 속하는 것을 볼 수 있었다. 반면, 영흥 시료와 대이작도 시료는 서로 혼재되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 현상은 바다 환경 조건에서 지리적으로 가까운 곳에 위치하는 영흥도와 대이작도의 잡피 군집간에 수배우체의 자유로운 이동에 의한 유전적 혼입이 이루어진 결과로 판단된다. 백령도, 영흥도, 대이작도의 3개 군집별 유전적 유연관계를 분석한 결과, 영흥도와 대이작도 군집이 백령도 군집에 비해 유전적으로 가까운 결과를 보였다(그림 6). 이러한 결과는 상기 두 군집(영흥도, 대이작도)의 개체들 간 유전적 혼입 결과와 일치하는 것으로 판단된다.