



50 × 50 m<sup>2</sup>, 100 × 100 m<sup>2</sup>, 500 × 500 m<sup>2</sup>, 1,000 × 1,000 m<sup>2</sup>)을 설치하여 방형구내에서 임의로 20개체씩 채집하였고 이들 중 5~10 개체를 무작위적으로 선정하여 각각을 AFLP 분석 재료로 사용하였다.

### Genomic DNA 추출

채집된 재료는 각 개체 끝에서 50 mm씩을 절단하고 해부 현미경 하에서 이물질을 제거한 다음 70℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 각각의 시료로부터 genomic DNA는 DnaEasy™ Plant mini kit(QIAGEN Co. USA)를 이용하여 제시된 추출법에 따라 추출하였다. 채집된 시료로부터 AFLP 분석 확립을 위해 4종에 대하여 1 × 1 m<sup>2</sup> 방형구에서 채집된 각각 시료 5개씩을 선정하고 1차적으로 genomic DNA 추출한 다음(Fig. 1) 이들을 대상으로 본 분석에 사용될 선택 프라이머(selective primer) 선정에 이용하였다.

### AFLP 분석 체계 확립

본 연구에서는 AFLP 분석 결과에 대한 정확성과 재현성을 증진시킬 수 있는 AFLP™ Plant Mapping(Applied Biosystem Co. USA)을 이용하여 분석하였다.

#### 1. 제한 효소의 선택 및 검증

제한 효소는 EcoRI 및 MseI (New England BioLabs Inc. USA)으로 선정하고 칠면초, 갈대 그리고 갯잔디의 genomic DNA에 대한 선별도(selectivity)를 조사하였다. 두 효소 모두 높은 절단 효과를 나타내어 본 AFLP 분석 실험에 이용하였다(Fig. 2).

#### 2. 효소를 이용한 제한 절편화(Restriction) 및 부착 결합(Adaptor Ligation)의 통합 반응

제한 효소를 이용한 genomic DNA의 절편화와 각 효소에 대한 부착 결합 과정을 통합하여 실시함으로써 실험 공정을 단순화시켰다. 각각 1.0 ul의 EcoRI 및 MseI adaptor (Applied Biosystem Co. USA), 1.0 ul 10x T4 DNA ligase 그리고 1.0 ul의 효소 반응액(Enzyme Master Mix)을 혼합한 혼합액에 5.5 ul의 DDW에 녹인 0.5 ug의 genomic DNA를 첨가한 후 25℃의 항온 수조에서 12간 동안 방치하였다. 전 선택적 증폭(Pre-selective amplification)을 위해서 제한절편 된 후 부착 결합된(ligation) DNA는 TE<sub>0.1</sub>

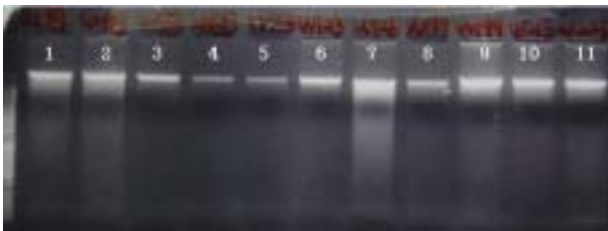


Fig. 1. Total genomic extraction from four plants *Suaeda japonica* (1~3), *Phragmites communis* (4~5), *Zoysia sinica* (6~9), *Suaeda maritima* (9~11).

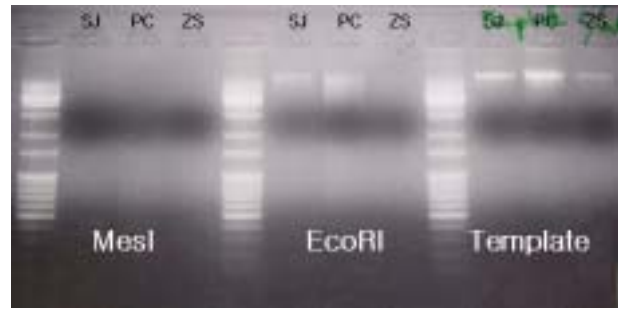


Fig. 2. The genomic DNA before restriction digesting (right), and after restriction digesting by MseI (left) and EcoRI (middle). SJ: *Suaeda japonica*, PC: *Phragmites communis*, ZS: *Zoysia sinica*.

Buffer를 이용하여 20배 희석하여 -25℃에 보관하였다.

#### 3. 전 선택적 증폭(Preselective Amplification)

20배 희석된 제한 절편 및 부착 결합된 DNA template (4.0 ul)와 각각 EcoRI와 MseI의 AFLP 전 선택적 프라이머(EcoRI pre-selective primer: with final base as A; MseI pre-selective primer: with final base as C (Applied Biosystem Co. USA)) 각각 0.5 ul과 15 ul의 AFLP core Mix™(Applied Biosystem Co. USA)을 혼합하여 GeneAmp PCR system 2400™(Applied Biosystem Co. USA)을 이용하여 72℃ 2분간 전가열(pre-heating)을 한 다음, 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 2분을 한 주기로 20회 반복하고 60℃에서 30분간 최종 확장(Final extension)을 실시하였다. 전 선택 증폭(Pre-selective amplified) DNA 절편은 약 1,000 bp에서 40 bp의 크기를 나타내었다(Fig. 3). 전 선택 증폭 DNA 절편은 TE<sub>0.1</sub> Buffer로 10배 희석하여 선택적 증폭(Selective amplification)에 사용되었다.

#### 4. 선택적 증폭(Selective Amplification)

희석된 전 선택적으로 증폭된 DNA 절편은 MseI와 EcoRI Dye 선택 프라이머를 사용하여 일차로 선택적 증폭(Selective



Fig. 3. Gel results after pre-selective amplification with EcoRI & MseI pre-selective primer restriction. Preselective amplification products create a visible smear in the 100~1,000 bp range. 1~4: *Suaeda japonica*, 5~8: *Phragmites communis*, 9~12: *Zoysia sinica*, 13~16: *Suaeda maritima*.

amplification)을 실시하였다. 선택적 증폭에 이용될 선택 프라이머는 각각의 조합에 대하여 선택도와 안정성을 조사하여 13개 프라이머 쌍을 선정하였다(Table 1). 선택적 증폭은 3.0 ul의 희석된 전 선택 증폭 DNA 절편과 각각 1.0 ul의 MseI 선택적 프라이머(Primer-CXX)와 EcoRI(Dye primer-AXX)<sup>TM</sup> 그리고 15.0 ul AFLP Core Mix<sup>TM</sup>(Applied Biosystem Co. USA)을 혼합한 혼합액을 만들어 GeneAmp PCR system 2400<sup>TM</sup>을 이용하여 94℃ 2분간 전가열한 다음, 첫 주기는 94℃ 30초, 66℃ 30초, 72℃ 2분으로 하고 매 주기마다 annealing temperature을 1℃ 낮추어 56℃까지 낮춘 다음 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 2분을 한 주기로 20회 반복하고 60℃에서 30분간 최종 증폭을 실시하였다.

5. AFLP 다양성 평가

선택적 증폭된 산물은 제시된 사용법 및 프로그램 운영 방법에 따라서 GeneScan-500 Size Standard<sup>TM</sup>(Applied Biosystem Co. USA)와 같이 ABI Prism 377 DNA Sequencer<sup>TM</sup>(Applied Biosystem Co. USA)을 이용하여 전기 영동을 실시하고, 그 결과를 GeneScan<sup>TM</sup>와 Genotyper<sup>TM</sup> 프로그램(Applied Biosystem Co. USA)을 이용하여 분석하였다. 분석 대상은 50 bp 이상 크기의 절편들을 대상으로 식물체들 간의 AFLP 다형 정도를 비교 분석하였다. 13개의 선택 프라이머 쌍을 통하여 얻은 기초 자료에 근거하여 다수의 유의한 유전적 다양성 정보를 갖는 증폭 DNA 절편을 증폭한 3개의 선택 프라이머 쌍을 선택하여 AFLP 정보를 얻었다. 식물의 종류에 따른 개체군의 유전적 변이를 AMOVA Prep (Miller 1998) 프로그램을 이용하여 분석 자료를 Two-level data set으로 변환한 후 WINAMOVA program 이용하여  $\Psi_{ST}$  값(Wright 1965)을 산출하여 개체군내의 유전적 변이를 평가하였다.  $\Psi_{ST}$  값은 각 종에 따른 3개의 선택적 프라이머 쌍에 의해 증폭된 모든 AFLP 결과를 통합하고, 모든 증폭 DNA 절편을 동일한 가중치를 두고 만든 distance matrix에 근거하여 산출하였다(Excoffier et al. 1992).

6. 복원 최소 면적 판정

조사 면적에 따른 유전적 변이 정도를 평가하고 면적의 증가에 따른 유전적 다양성 증가의 변화가 포화되는 면적을 복원 및 보존 최소 면적으로 판정하였다.

결과 및 논의

선택적으로 증폭된 절편 중 50 bp 이상 크기의 절편들을 대상으로 각 개체군간의 비교 분석한 결과, 13개의 선택 프라이머 쌍을 사용하여 4 종의 식물에서 총 585 절편을 얻었다(Table 2). 특히 칠면초, 갈대, 갯잔디, 그리고 해홍나물 등을 특징 지을 수 있는 절편들은 각각 116, 96, 72, 그리고 59개로 구분되었다(Fig. 4).

다수의 유전적 다양성 정보를 갖는 DNA 절편을 증폭한 3개의 선택 프라이머 쌍을 한 반응 쌍으로 선정하여 증폭한 결과, 칠면초(*S. japonica*)는 EcoRI\*AAG/MseI\*CAE, EcoRI\*ACT/MseI\*CTA, EcoRI\*AGC/MseI\*CAG의 프라이머 쌍에서 각각 36, 42, 37 절편들이 증폭되었으며, 갈대(*P. communis*)는 EcoRI\*AGG/MseI\*CTA, EcoRI\*ACT/MseI\*CAG, 그리고 EcoRI\*AGC/MseI\*CAA 반응에서 각각 40, 46, 41 개의 절편들이, 그리고 해홍나물(*S. maritima*)는 EcoRI\*AGG/MseI\*CTA, EcoRI\*ACA/MseI\*CTG, EcoRI\*AGC/MseI\*CAT 프라이머 쌍에서 25, 34, 33, 그리고 갯잔디(*Z. sinica*)는 EcoRI\*AGG/MseI\*CTA, EcoRI\*ACA/MseI\*CAG, EcoRI\*ACC/MseI\*CTA 프라이머 쌍에서 각각 35, 35, 28개 절편들이 증폭되었다(Table 3). 증폭된 절편을 지표로 하여 개체군내 유전적 다양성과 염생식물군락 보존 및 복원을 위한 최소 면적을 추정하는데 기초 자료로 이용하였다. 각 종에 따른 3개의 선택적 프라이머 쌍에 의해 증폭된 모든 AFLP 결과를 통합하고, 모든 절편들을 동일한 가중치를 두고 만든 distance matrix에 근거하여 산출한 개체군내의 유전적 다양성  $\Psi_{ST}$  값(값이 클수록 다양성은 낮음)은 갈대(*P. communis*)는 0.3856, 칠면초(*S. japonica*)는 0.1445, 해홍나물(*S. maritima*)은 0.1669 그리고 갯잔디(*Z. sinica*) 0.2422을 나타내어 칠면초가 0.1445로 가장 낮은 값을 나타내고 갈대가 0.3856로 가장 높은 값을 나타내었다

Table1. Selective primer combination tested in this AFLP analyses

	MseI Primers							
	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
AAC								
AAG		*						
ACA			*				*	
EcoRI Primers					*			
ACC								
ACG								
ACT		*	*		*		*	
AGC	*			*				
AGG		*			*	*		

\*: primer set used in this analysis.

Table 2. Number of AFLP fragments among the strains amplified by 13 selective primer sets

Primer combination	Total no. of fragments	No. of polymorphic fragments detected			
		SJ	PC	ZS	SM
E*AAG / M*CAC	47	15	5	5	5
E*ACA / M*CAG	43	12	4	12	5
E*ACA / M*CTG	43	14	8	9	8
E*ACC / M*CTA	29	2	6	5	2
E*ACT / M*CAC	56	11	5	3	3
E*ACT / M*CAG	66	4	12	5	3
E*ACT / M*CTA	30	16	7	3	3
E*ACT / M*CTG	18	8	5	4	4
E*AGC / M*CAA	43	9	12	4	3
E*AGC / M*CAC	35	9	9	3	3
E*AGG / M*CAC	65	5	5	2	2
E*AGG / M*CTA	72	13	11	12	9
E*AGG / M*CTC	38	8	7	5	5
Total	585	116	96	72	59

SJ: *Suaeda japonica*, PC: *Phragmites communis*, ZS: *Zoysia sinica*, SM: *Suaeda maritima*.

(Table 4). 주로 무성 번식을 하는 갯잔디와 갈대 개체군에서 유전적 변이가 낮고 칠면초와 해홍나물 개체군이 갯잔디와 갈대 개체군에 비교하여 변이가 높은 것으로 나타났다.

한편 개체군 보존 및 복원을 위한 최소 면적은 단위 면적의

Table 3. Selective primer combination used in this AFLP analyses

Species	Selective Primer set	No. of AFLP fragments	No. of Informative fragments
<i>Suaeda japonica</i> (n=65)	E*AAG / M*CAC	36	17
	E*ACT / M*CTA	42	26
	E*AGC / M*CAC	37	20
<i>Phragmites communis</i> (n=77)	E*AGG / M*CTA	40	20
	E*ACT / M*CAG	46	21
	E*AGC / M*CAA	41	19
<i>Zoysia sinica</i> (n=72)	E*AGG / M*CTA	35	17
	E*ACA / M*CAG	35	20
	E*ACC / M*CTA	28	15
<i>Suaeda maritima</i> (n=66)	E*AGG / M*CTA	25	12
	E*ACA / M*CTG	34	18
	E*AGC / M*CAC	33	16

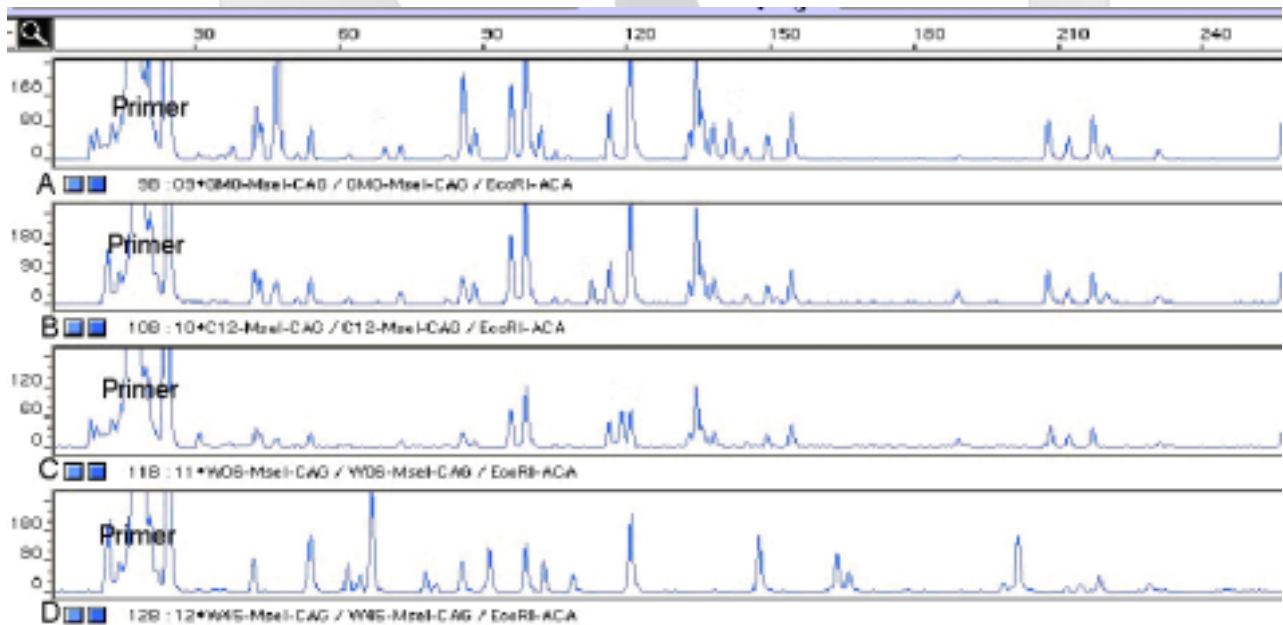


Fig. 4. A partial electropherogram of four sample run on ABI Prism 377 DNA sequencer and evaluated by GeneScan software™ (Fragment size is variable). The products amplified by EcoRI\*ACA- MseI\*CAG selective primer set. A: *Suaeda japonica*, B: *Phragmites communis*, C: *Zoysia sinica*, D: *Suaeda maritima*.

증가에 따른 유전적 다양성 지수( $\Psi_{ST}$ )의 변화 양상에 근거하여

Table 4. The genetic diversity of four populations in this study

Population	$\Psi_{ST}$
<i>Phragmites communis</i>	0.3856
<i>Suaeda japonica</i>	0.1445
<i>Suaeda maritima</i>	0.1669
<i>Zoysia sinica</i>	0.2422

\* $\Psi_{ST}$  값은 AMOVA를 이용하여 개체군의 유전적 변이를 나타낸 것이다. 이 값은 적을수록 유전적 다양성이 높은 것으로 간주된다.

지수의 변화 양상이 포화(Saturation)를 나타내는 면적을 최소 면적으로 판정하였다. 갈대(*P. communis*)는 대체로 모든 조사 단위 면적에서 대체로 높은  $\Psi_{ST}$  값을 나타내고 500 × 500 m<sup>2</sup>에서 0.3621 값으로 최소값을 보였다(Fig. 6). 칠면초(*S. japonica*)는 대체로 100 × 100 m<sup>2</sup>에서 0.1334, 해홍나물(*S. maritima*)은 비록 칠면초에 비하여 높은 값을 보이지만 역시 100 × 100 m<sup>2</sup>에서 0.1553을, 그리고 갯잔디(*Z. sinica*)는 갈대와 같이 대체로 높은 값을 나타내었고 1,000 × 1,000 m<sup>2</sup>에서 최저 0.2013값을 보였으나 100 × 100 m<sup>2</sup>에서 포화되는 양상을 보였다(Table 5).

갈대 자연 개체군의 경우, 대체로 낮은 유전적 다양성을 나타내고 있는데, 이는 이들이 주로 영양 번식을 통해 개체군을 유지하고 있기 때문일 것이다(Samils et al. 2001, Liston et al. 2003).

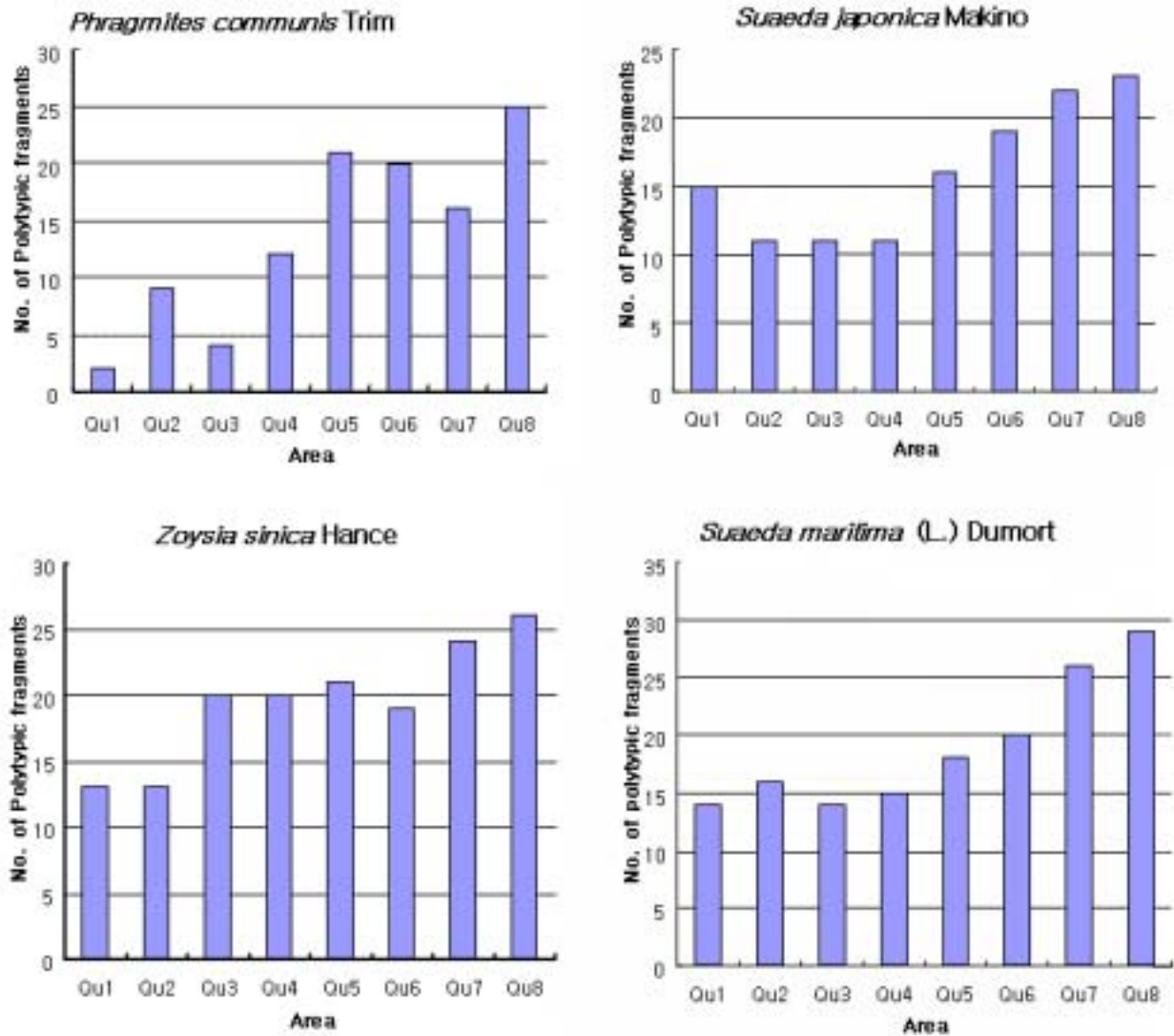


Fig. 5. The Number of polytypic AFLP fragments from sampled area. Qu1: 1 × 1 m<sup>2</sup>, Qu2: 5 × 5 m<sup>2</sup>, Qu3: 10 × 10 m<sup>2</sup>, Qu4: 50 × 50 m<sup>2</sup>, Qu5: 100 × 100 m<sup>2</sup>, Qu6: 250 × 250 m<sup>2</sup>, Qu7: 500 × 500 m<sup>2</sup>, Qu8: 1,000 × 1,000 m<sup>2</sup>.

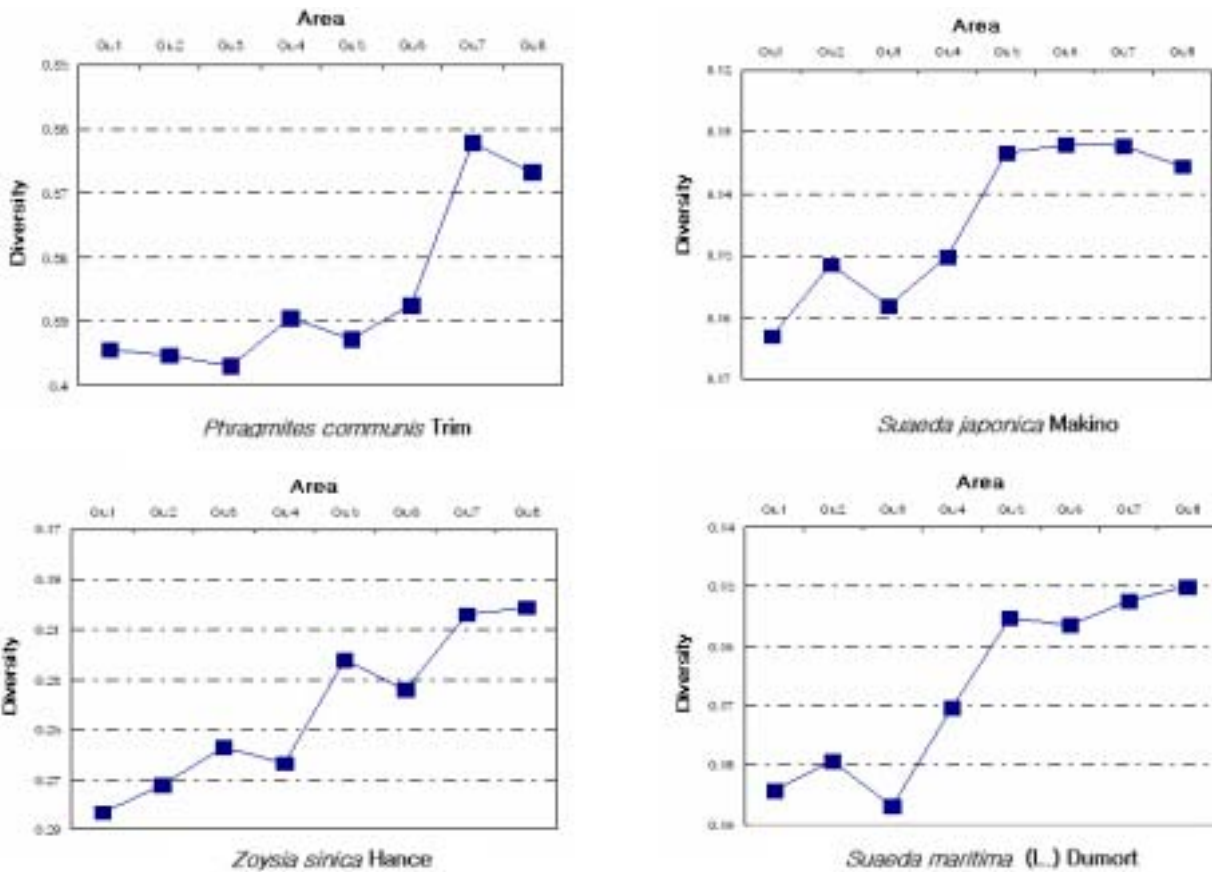


Fig. 6. Estimated  $\Psi_{ST}$  value based on AFLP fragments from sampled area. Qu1:  $1 \times 1 \text{ m}^2$ , Qu2:  $5 \times 5 \text{ m}^2$ , Qu3:  $10 \times 10 \text{ m}^2$ , Qu4:  $50 \times 50 \text{ m}^2$ , Qu5:  $100 \times 100 \text{ m}^2$ , Qu6:  $250 \times 250 \text{ m}^2$ , Qu7:  $500 \times 500 \text{ m}^2$ , Qu8:  $1,000 \times 1,000 \text{ m}^2$ .

Table 5. The estimated  $\Psi_{ST}$  value based on AFLP fragments from sampled area

	<i>P. communis</i>	<i>S. japonica</i>	<i>Z. sinica</i>	<i>S. maritima</i>
Qu1	0.3943	0.1631	0.2831	0.1843
Qu2	0.3953	0.1515	0.2721	0.1793
Qu3	0.3969	0.1581	0.2573	0.1869
Qu4	0.3894	0.1502	0.2635	0.1704
Qu5	0.3926	0.1334	0.2221	0.1553
Qu6	0.3874	0.1321	0.2343	0.1565
Qu7	0.3621	0.1323	0.2041	0.1524
Qu8	0.3667	0.1356	0.2013	0.1501

\* Qu1:  $1 \times 1 \text{ m}^2$ , Qu2:  $5 \times 5 \text{ m}^2$ , Qu3:  $10 \times 10 \text{ m}^2$ , Qu4:  $50 \times 50 \text{ m}^2$ , Qu5:  $100 \times 100 \text{ m}^2$ , Qu6:  $250 \times 250 \text{ m}^2$ , Qu7:  $500 \times 500 \text{ m}^2$ , Qu8:  $1,000 \times 1,000 \text{ m}^2$ .

한편 이들의 최소 복원 및 보존 면적은  $500 \times 500 \text{ m}^2$ 은 유지되어야 할 것으로 판단되고, 특히 개체군을 인위적으로 복원하기 위한 개체군은 유전적 안정성을 고려하여 다른 지역에 독립적

으로 형성된 자연 개체군들로부터 개체를 선별하여 조성함으로써 단일 모집단으로부터 유래될 수 있는 유전적 단순성을 극복하는 것이 바람직하다고 사료된다. 갯잔디 개체군은 대체로 갈대개체군과 비슷한 유전적 다양성을 보이고 있으며 전체적으로 낮은 다양성을 보이고 있다. 이는 조사 주변 갯잔디 개체군과 격리되어 형성되어 있고 이들 식물들이 주로 영양 번식을 통하여 번식하는 생식 전략을 갖고 있는 것과 상관 관계가 있을 것으로 판단된다. 이러한 결과는 Liston et al. (2003)은 포아풀과 식물 개체군에서 유전적 다양성은 영양 번식보다는 유성 생식에 의해서 유지된다는 결과와도 일치한다. 또한 이러한 특성은 식물 개체군의 보존 및 복원 전략에서 반드시 고려해야 할 것이다. 또한 칠면초와 해홍나물 개체군은 갈대와 갯잔디 개체군과 비교하여 대체로 높은 유전적 다양성을 가지고 있는데 이는 이들 식물이 주로 1년생이고 유성 생식을 통해서 개체군을 유지되는 것에서 기인한다고 판단된다.

적 요

서남해안에 자생하고 있는 염생 식물 4종, 갈대(*Phragmites*

*communis* Trin), 칠면초(*Suaeda japonica* Makino), 갯잔디(*Zoysia sinica* Hance), 그리고 해홍나물(*Suaeda maritima* (L.) Dumort)에 대하여 최소 복원 및 보존 면적의 크기를 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 기법을 이용한 유전적 다양성 정보에 근거하여 판정하였다. 각 종들의 조사 지역 개체군내에서 유전적 다양성 지수  $\Psi_{ST}$  값은 갈대(*P. communis*)는 0.3856, 칠면초(*S. japonica*)는 0.1445, 해홍나물(*S. maritima*)은 0.1669 그리고 갯잔디(*Z. sinica*) 0.2422을 나타내었다. 칠면초가 0.1445로 가장 낮은 값을 나타내었고 갈대가 0.3856로 가장 높은 값을 나타내었다. 즉, 본 조사 대상 군락 중에서 칠면초 개체군이 가장 높은 유전적 다양성을 나타내었고, 갈대 개체군이 가장 낮은 유전적 다양성을 나타내는 것으로 판단되었다. 한편, 각 개체군별 단위 면적당 유전적 다양성 지수에 근거한 최소 복원 및 보존 면적은 갈대(*P. communis*)는  $500 \times 500 \text{ m}^2$ , 칠면초(*S. japonica*), 해홍나물(*S. maritima*), 그리고 갯잔디(*Z. sinica*)들은 각각  $100 \times 100 \text{ m}^2$ 로 판정되었다.

## 사 사

본 연구는 환경부 Eco-technopia 21차세대핵심환경기술개발 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Choi H-G, Kim C. 2000. Conservational strategy of *Ranunculus kazuensis* in Korea. In pro. of Intl. Symp. On Ecotechnology in Environmental Protection and Fresh water lake management. Res Inst Natl Sci, Pai Chai Uni pp13-21.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Hedréon M, Fay MF, Chase MW. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylophiza* (Orchidaceae). *Am J Bot* 88: 1868-1880.
- Ihm B-S, Myung H-H, Park D-S, Lee J-Y, Lee J-S. 2004. Morphological and genetic variations in *Suaeda maritima* based on habitat. *J Plant Biol* 47: 221-229.
- Krauss SL. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* 9: 1241-1245.
- Lindstedt B-A, Heir E, Vardund T, Melby KK, Kapperud G. 2000. Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* strains by Amplified-Fragment Length Polymorphism Genotyping. *J Clinical Micro* 38: 3379-3387.
- Liston A, Wilson BL, Robinson WA, Doescher PS, Harris NR, Svejcarr T. 2003. The relative importance of sexual reproduction versus clonal spread in an aridland bunchgrass. *Oecologia* 137: 216-225.
- Miller MP. 1998. AMOVA-PREP ver. 1.01. North Arizona University, Flagstaff, AZ.
- Qamaruz-Zaman F, Fay MF, Parker JS, Chase MW. 1998. The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: a case study of *Orchis simia* (Orchidaceae). *Lindleyana* 13: 125-133.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regards to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Samils B, Stepien V, Lagercrantz U, Lascoux M, Gullberg U. 2001. Genetic diversity in relation to sexual and asexual reproduction in populations of *Melampsora larici-epitea*. *Eur J Plant Pathol* 107: 871-881.

(2006년 8월 7일 접수, 2006년 11월 30일 채택)