

# Mitochondrial CO I 유전자와 ITS 유전자를 이용한 다슬기과 4종의 계통학적 연구

김우진, 방인철<sup>1</sup>

국립수산과학원 생명공학연구단, <sup>1</sup>순천향대학교 생명과학부

## 1. 서론

우리나라에 서식하는 다슬기는 형태학적 변이가 심하여 외관상으로 종을 구분하기가 매우 어려운 경우가 많다. 국내에 서식하고 있는 다슬기는 형태학적 특징과 동위효소 분석을 통해 종간 분류 및 유전적 유연관계를 조사한 바 있다 (Jung et al., 1999). 국내의 다슬기과 (Pleuroceridae) 담수 복족류는 v. Marten (1905)에 의하여 모두 *Melania*속의 15종 3아종으로 발표되었다. 그 이후 *Melania*속을 *Semisulcospira*속으로 변경하고 이를 *Semisulcospira*속 6종 및 3아종으로 정리하였다. 그 후 Kwon and Habe (1979) 및 Kwon (1990)은 국내 다슬기과를 *Semisulcospira*와 *Koreanomelania*의 2개 속으로 구분하였다. 그러나 Burch (1987)는 *M. globus*종을 새로운 *Koreoleptoxis* 속에 신아종 (*Koreoleptoxis globus ovalis*)으로 발표하여 한국산 다슬기 과를 *Semisulcospira*, *Koreanomelania*, *Koreoleptoxis*의 3개 속으로 구분하였다. 본 연구에서는 꽃채다슬기 (*S. gottschei*), 주름다슬기 (*S. forticosta*), 염주알다슬기 (*Koreanomelania nodifila*), 띠구슬다슬기 (*Koreoleptoxis globus ovalis*) 4종을 대상으로 mitochondrial cytochrome oxidase (CO I) 유전자와 internal transcribed spacer (ITS) 유전자의 염기서열 분석을 통하여 이들의 분류학적 유연관계를 조사하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가) 다슬기 DNA 시료

실험재료인 꽃채다슬기와 주름다슬기는 강원도 정선에서, 염주알다슬기와 띠구슬다슬기는 강원도 평창에서 채집하였다. 채집된 개체는 genomic DNA를 분리하기 위하여 실험실까지 살아있는 상태로 운반하였으며, genomic DNA는 Asahida et al. (1996)의 방법에 따라 TNE-urea buffer (8 M urea : 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 : 125 mM NaCl : 10 mM EDTA : 1% SDS)를 사용하여 근육조직에서 분리하였다.

### 나) CO I 유전자 및 ITS 유전자 증폭, 분리 및 염기서열 결정

분리된 DNA를 주형으로 CO I 유전자와 ITS 유전자를 증폭하였다. CO I 유전자를 증폭하기 위하여 HCO (5'-aaacttcagggtgaccaaataca-3')와 LCO (5'-ggcaacaatacataaagatattgg'3') primer set를 사용하였다. PCR 조건은 처음 95°C에서 2분간 DNA를 변성하고 그 다음 95°C에서 1분간 denaturation, 54°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분30초간 elongation하여 이를 35회 반복한 후, DNA 합성을 72°C에서 7분간 하였다. ITS 유전자를 증폭하기 위한 primer은 18S와 28S rDNA의 conserved region에서 각각 유래된 ITS5F (5'-ggaagtaaaagtcgtaacaagg-3)와 ITS4R (5'-tctcctcgctta-ttgatattgc-3)를 사용하였다. PCR 조건은 처음 95°C에서 5분간 DNA를 변성하고 그 다음 94°C에서 1분간 denaturation, 52°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation하여 이를 35회 반복한 후, DNA 합성을 72°C에

서 8분간하였다. 각 primer에서 증폭된 PCR 산물들은 QIAGEN gel extraction kit를 사용하여 분리하였으며, 분리된 DNA를 pGEM-TE vector에 cloning한 후 plasmid를 분리하여 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열분석은 자동염기서열분석기 (ABI 310)를 사용하였다.

#### 다) Data 분석

각 시료의 염기서열 비교는 multiple alignment program Clustal W (Thompson et al., 1994)을 사용하였다. Pairwise distance는 Kimura-2 parameter method를 이용하여 계산하였고, 계통유연관계는 MEGA program을 이용하여 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)로 분석하였으며, trees의 internal branches strength는 bootstrap analysis에 의해 1,000 bootstrap 반복에서 통계적으로 테스트되었다 (Felsenstein, 1985).

### 3. 결과 및 요약

꽃체다슬기 (*S. gottschei*), 주름다슬기 (*S. forticosta*), 염주알다슬기 (*K. nodifila*), 띠구슬다슬기 (*K. globus ovalis*)를 대상으로 특정 primer set (HCO와 LCO)를 이용하여 710 bp CO I 유전자를 증폭하였다. 증폭된 산물을 gel에서 분리하여 vector에 cloning한 후 염기서열을 결정하였다. 꽃체다슬기의 염기서열을 주름다슬기, 띠구슬다슬기, 염주알다슬기의 염기서열과 비교한 결과 각각 96.1, 89.4, 89.6%의 유사성을 보였으며, 주름다슬기와 염주알다슬기는 89.6%, 주름다슬기와 띠구슬다슬기는 88.4%, 염주알다슬기와 띠구슬다슬기는 91.2%의 유사성을 보였다. *Semisulcospira*속에 속하는 꽃체다슬기와 주름다슬기간에는 96.1%, *Semisulcospira*속과 *Koreanomelania*속간은 89.6%, *Semisulcospira*속과 *Koreoleptoxis*속간은 89.4%, *Koreanomelania*속과 *Koreoleptoxis*속간은 88.4%을 보여 종간의 유사성이 속간보다 높게 나타났다. 또한 이들 종의 속간에서 CO I 유전자의 유사성 비교 결과는 Kwon and Habe (1979), Kwon (1990)에 의해 우리나라 다슬기류를 *Semisulcospira*와 *Koreanomelania*의 2개 속으로 구분했던 연구와 Burch (1987)에 의해 *Semisulcospira*, *Koreanomelania*, *Koreoleptoxis*의 3개 속으로 구분했던 연구들을 뒷받침해 주었다. 이들 염기서열을 토대로 Kimura 2-parameter (1980) 방법으로 pairwise distance를 조사한 결과, 꽃체다슬기와 주름다슬기의 종간 distance는 0.041, *Semisulcospira*속과 *Koreanomelania*속간의 distance는 0.116, *Semisulcospira*속과 *Koreoleptoxis*속간의 distance는 0.127-0.129, *Koreanomelania*속과 *Koreoleptoxis*속간의 distance는 0.088로 나타나 염주알다슬기와 띠구슬다슬기는 속간 차이를 볼 수 있었다. Genetic distance를 토대로 neighbor-joining 방법으로 dendrogram을 작성한 결과, 꽃체다슬기, 주름다슬기, 띠구슬다슬기를 포함한 그룹과 염주알다슬기 그룹으로 구분되어졌으며, 또한 띠구슬다슬기는 *Semisulcospira*속과 가까운 특징을 보였다.

그리고 형태학적으로 유사하나 분류가 어려운 종의 구분, 유전학적 및 진화학적 분석에 유용한 marker로 이용되고 있는 ITS 유전자를 이용하여 이들 종들에 분류학적 유연관계를 조사하고자 특정 primer set (ITS5F와 ITS4R)를 이용하여 1100 bp ITS 유전자를 증폭하였다. 증폭된 1100 bp 중에서 5.8S rDNA를 제외한 부분의 염기서열을 결정한 결과, 각 종의 염기서열 크기는 종마다 차이가 있었다. 꽃체다슬기는 746 bp, 주름다슬기는 759 bp, 띠구슬다슬기는 710 bp, 염주알다슬기는 735 bp 였다. 이들 염기서열을 꽃체다슬기 염기서열을 기준으로 비교한 결과, 주름다슬기, 띠구슬다슬기, 염주알다슬기와 각각 93.7, 90.4, 90.2%의

유사성을 보였으며, 주름다슬기와 염주알다슬기는 88.6%, 주름다슬기와 띠구슬다슬기는 87.3%, 염주알다슬기와 띠구슬다슬기는 92.7%의 유사성을 보였다. *Semisulcospira*속에 속하는 꽃체다슬기와 주름다슬기간은 93.7%의 유사성을 보였으며, *Semisulcospira*속과 *Koreanomelania*속간은 88.6-90.2%로 *Semisulcospira*속과 *Koreoleptoxis*속간의 87.3-90.4%를 보이는 값과 비슷하였으며, *Koreanomelania*속과 *Koreoleptoxis*속간은 92.7%을 보여 종간의 수치보다는 낮고 속간의 수치보다도 높게 나타났다. 또한 이들 염기서열을 토대로 Kimura 2-parameter (1980) 방법으로 pairwise distance를 조사한 결과, 꽃체다슬기와 주름다슬기의 종간 distance는 0.029로 나타났으며, *Semisulcospira*속과 *Koreanomelania*속간의 distance는 0.033-0.043으로 *Semisulcospira*속과 *Koreoleptoxis*속간의 0.035-0.047 수치와 유사한 반면, *Koreanomelania*속과 *Koreoleptoxis*속간의 distance는 0.02로 꽃체다슬기와 주름다슬기의 종간 수치보다 약간 적게 나타났다. 그리고 CO I 유전자에 의한 distance 수치는 ITS 유전자에 의한 수치보다 약간 높게 나타나는 특징을 보였다. Genetic distance를 토대로 neighbor-joining 방법으로 dendrogram을 작성한 결과는 CO I 유전자에서 나타난 유연관계와 동일하였다. 따라서 이런 결과를 토대로 우리나라에 서식하고 있는 다슬기과는 *Semisulcospira*, *Koreanomelania*, *Koreoleptoxis*의 3개 속으로 구분하는 것이 타당할 것으로 본다. 그리고 CO I 유전자와 ITS 유전자는 다슬기의 종간 및 속간 유전적 분화 차이를 알 수 있는 유용한 marker로 여겨진다.

#### 4. 참고문헌

- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K. and Nakayama, I. (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sci.*, 62: 727-730.
- Burch, J.B., Chung, P.R. and Jung, Y. (1987) A guide the freshwater snails of korea. *Walkerana*, 2: 195-232.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Kimmura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Kwon, O.K. (1990) Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. Vol. 32. Mollusca (I). Ministry of Education. Seoul Korea.
- Kwon, O.K. and Habe, T. (1979) A list of non-marine mollusks in Korea. *Kor. J. Limn.*, 12: 24-31.
- Jung, Y., Park, G.M., Park, J., Kim, J.J., Min, D.Y. and Chung, P.R. (1999) Allozyme variability in three species of genus *Semisulcospira* (Prosobranchia: Pleuroceridae). *Korean J. Malacol.*, 15: 13-20.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.*, 24: 189-204.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Tes.*, 22: 4673-4680.
- von Martens, E. (1905) Koreanische Süßwasser-Mollusken. *Zoologischen Jahrbüchern*, suppl. 8, pp. 23-70, pls.1-3.