

한국 및 일본산 참굴(*Crassostrea gigas* Thunberg)과  
한국산 바위굴(*C. nippona* Seki)의 미토콘드리아 DNA 변이

박 미 선 · 김 상 해\*

(국립수산진흥원 증식부 양식과, \*인제대학교 자연과학대학 생물학과)

적 요

한국 두 지역의 참굴(*Crassostrea gigas* Thunberg)과 일본산 참굴, 그리고 한국산 바위굴(*Crassostrea nippona* Seki)의 유전적 근연관계를 조사하기 위하여 미토콘드리아 DNA 절편분석을 하였다.

참굴의 전체 미토콘드리아 DNA 크기는 세 지역 모두 약 18 kb로서 동일하였으나 한국 동해산 바위굴의 경우는 약 22 kb 정도의 크기를 나타내었다. 여섯개 염기쌍을 인식하는 8종류의 제한효소를 사용하여 분석한 결과 세 지역 참굴의 mtDNA에서 BamHI과 BglI 그리고 XhoI 절단시 동일한 DNA 절편이 나타나는 특징이 있었다. 종내 지역간 염기서열 치환율 (p)은 남해안과 서해안산 참굴에서 2%로 가장 가까운 근연관계를 보였으며 이들과 일본산 참굴 사이에는 5%의 p값을 보였다. 참굴과 바위굴, 두 종간에는 약 42%의 염기서열 치환율을 갖는 근연관계를 나타내었다.

Key words: *Crassostrea*, mtDNA, nucleotide sequence divergence.

서 론

굴은 연체동물의 斧足綱(Pelecypoda), 翼形亞綱(Pterimorphia), 翼殼目(Pterioidea) 및 굴上科(Ostreacea)에 속하는 貝類로 현재 2科 8屬으로 분류되고 있으며(Torigoe, 1981), 그 종류만도 100種 이상인 것으로 밝혀져 있다(今井, 1976). 그러나 종의 분류에 관해서는 아직도 많은 이견이 있어 그 분류체계가 명확히 확립되어 있지 않다. 현재까지 우리 나라에 서식 분포하는 것으로 알려진 굴類는 8종에 불과하며, 이 중 산업상 가장 중요한 종은 참굴, *Crassostrea gigas*로 한국에는 주로 동, 서, 남해안 전 연안에 걸쳐 분포하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 최근 동해안의 참굴 서식지로 알려진 경북 영일군 장기면 신창리 현지어장(류 등, 1973)에 서식하

고 있는 굴은 殼形質 및 외부 형태학적으로 바위굴, *Crassostrea nippona*인 것으로 밝혀졌다 (박 등, 1995).

본 연구는 한국 서, 남해안산 및 일본 히로시마산 참굴, 그리고 한국 동해안산 바위굴을 대상으로 종내 및 종간의 유전적 변이를 조사하기 위하여 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 절편분석을 실시하였다. 최근에 활발히 연구되고 있는 mtDNA 절편분석은 mtDNA가 세포내 핵 DNA에 비하여 빠른 진화속도를 보이고(Brown *et al.*, 1979) 모계유전을 하며 비암호서열 부위가 거의 없고, DNA 재조합 현상이 거의 없는 특징을 가지고 있어 종내 및 종간의 유전적 유연관계를 밝히는데 많이 이용되고 있다(Avise and Lansman, 1983; Brown, 1983; Rand and Harrison, 1989; McLean *et al.*, 1983; Skibinski, 1985; Sounder *et al.*, 1986). 따라서 본 연구는 mtDNA 절편분석을 통하여 산지별 참굴의 유전적 변이를 규명함과 동시에 참굴과 바위굴의 종간 유전적 유연관계를 밝혀 그 분류학적 위치를 재확인하는데 기초를 마련하기 위하여 수행되었다.

### 재료 및 방법

#### 시료 및 효소

미토콘드리아 DNA 분석을 위한 굴 시료는 1994년 6-9월 굴의 산란기에 현지어장에서부터 매월 1회 채취, 사용하였다(그림 1). 한국 서해안산 참굴은 충남 보령군 천북면 장은리의 자연산 굴을, 남해안산 참굴은 경남 남해군 설천면 노랑리 월곡 현지어장에서 1993년 6월 채묘한 前期産 굴을 同年 8월 경남 통영군 한산면 봉암리에 위치한 延繩垂下式 굴 양식어장에 垂下, 양성 중인 것을, 일본산 참굴은 1994년 4월 히로시마로부터 수입한 稚貝를 남해안산 참굴의 양식지와

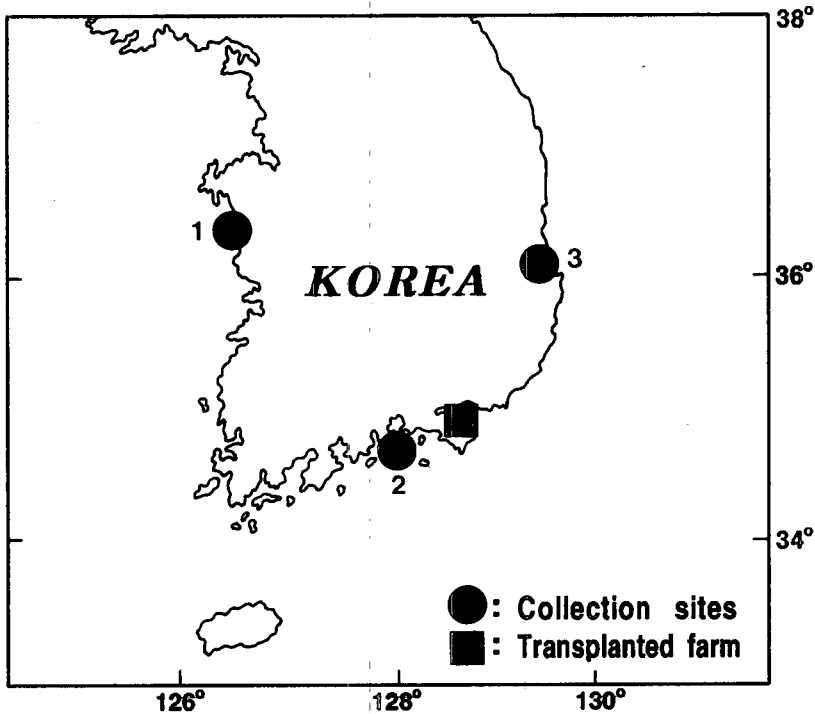


Fig. 1. Collection sites of oysters in west (1), south (2) and east (3) coasts and transplanted farm in Korea.

동일한 굴양식어장에 이식, 양성 중인 굴을 사용하였다. 한국 동해안산 바위굴은 경북 영일군 영일읍 장기면 신창리 현지어장의 굴을 채취하여 사용하였다. 제한효소는 제철화학사(POSKO Chem.)와 Boehringer Mannheim(BM)사 제품을 사용하였다. 기타 화학물질은 Sigma사 제품을 사용하였다.

#### 미토콘드리아 DNA 추출

굴 난소 또는 소화관 조직 10 g을 10배의 TEK 완충용액(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1.5% KCl, pH 7.5)에 넣어 마쇄기로 한, 두번 회전시킴으로서 균일하게 마쇄시켰다. 마쇄액을 15 ml 원심분리관에 옮긴 후 pasteur pipette을 사용하여 동량의 15% sucrose-TEK 용액을 마쇄액을 통과하여 밑으로부터 천천히 첨가하였다. 용액을 4°C, 4000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 새 원심분리관으로 옮긴 후 10000 × g에서 20분간 다시 원심분리시켰다. 침전물을 30 ml의 EST 용액(100mM EDTA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0)으로 희석한 후 상기와 같이 원심분리하여 미토콘드리아 분획을 취하였다.

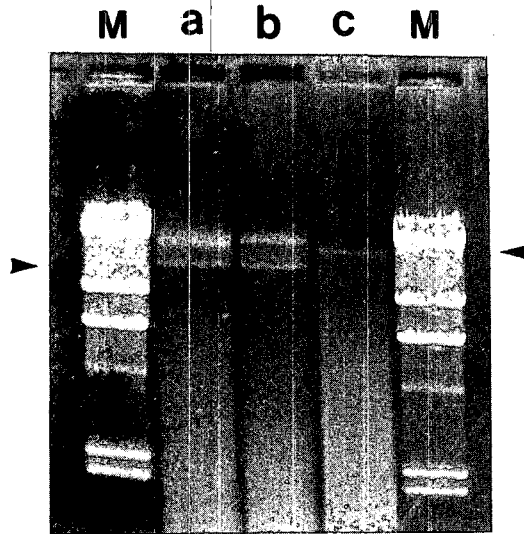
미토콘드리아 DNA 추출은 Birnboim과 Doly(1979) 방법을 개량한 Palva와 Palva(1985)의 방법을 사용하였다. 미토콘드리아가 포함된 침전물을 조직 g당 200  $\mu$ l의 용액 I(50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 넣어 용해하고 400  $\mu$ l의 용액 II(0.2 M NaOH, 1% SDS)를 첨가하여 미토콘드리아 막을 제거하였다. 300  $\mu$ l의 용액 III(3 M potassium acetate)를 첨가한 뒤 잘 혼합하여 12000 × g에서 30분간 원심분리시켰다. 상층액에 동량의 페놀을 첨가하여 혼합한 후 5000 × g에서 10분간 원심분리하고 상층액에 두배의 에탄올을 첨가하여 12000 × g에서 15분간 원심분리하여 mtDNA를 침전시켰다. 침전된 mtDNA를 20  $\mu$ l의 TE 용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)으로 용해시킨 후 제한효소 처리에 사용하였다.

#### mtDNA 제한효소 처리와 절편분석

미토콘드리아 DNA 절단에는 유전적 변이를 분석하는데 유용한 여섯개 염기쌍을 인식하는 제한효소들을 사용하였으며 공통적으로 8종류의 제한효소(BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, XhoI, 그리고 XbaI)를 선택하였다. 한 제한효소반응에 사용한 mtDNA 양은 최소 500 ng 이상을 취하였다. 반응은 각 효소의 최적 반응온도에서 각 효소 공급사의 지침에 따라 16시간 동안 수행하였으며(Maniatis *et al.*, 1982) 반응종결 후 0.8-1.0% agarose 겔 전기영동을 통하여 mtDNA 절편을 확인하였다. Upholt(1977)의 공식을 이용하여 각 집단의 mtDNA 절편의 이동도에 따라 비교되는 집단의 공통절편수의 비율(F값)을 얻고 F값에 의하여 상대적인 각 염기치환율을 표시하는 염기서열 분화정도(p값)를 결정하였다. 염기분화값에 따른 염기분화 정도는 UPGMA 방법에 의해서 그 거리를 측정하였다(Sneath and Sokal, 1973).

## 결 과

한국 두 지역(남해안, 서해안)과 일본산(히로시마) 참굴(*Crassostrea gigas*) 그리고 한국 동해안산 바위굴(*Crassostrea nippona*)의 유전적 변이도를 조사하기 위하여 mtDNA 절편분석을 수행하였다. 한국과 일본산 참굴의 mtDNA 크기는 제한효소 절단 결과 대략 18 kb 정도로 거의 동일하게 나타났으며 한국산 바위굴의 mtDNA 크기는 약 22 kb 정도였다(그림 2). 제한효소 BamHI이나 BglII로 절단하였을 때 네 지역의 mtDNA는 모두 하나의 절편으로 선형화되



**Fig. 2.** Electrophoretic patterns of undigested mtDNA from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *C. nippona*. Lane a: mtDNA from Korea West Sea, b: South Sea, c: East Sea, M: size marker DNA ( $\lambda$  DNA/HindIII). Arrows indicate the supercoiled form of mtDNAs.

어 이들 제한효소에 대한 인식부위가 하나씩 존재함을 알 수 있었다. 그러나 다른 제한효소들에 대한 DNA절편 형태는 네 지역 굴에서 서로 조금씩 다르게 나타났다. 세 지역 참굴의 mtDNA를 BamHI, BglI 그리고 XhoI로 절단하였을 때 나타난 DNA절편들의 크기는 동일하였다. 한국 두 지역의 참굴 mtDNA는 BamHI, BglI, HindIII, PstI, 그리고 XhoI 절단에서 동일한 DNA 절편을 보여주었다. 한국산 바위굴의 mtDNA 절편형태는 참굴과 비교하였을 때 몇몇 제한효소 절단에서 소수 절편들의 공통성이 나타났으나 거의 대부분은 서로 다른 형태를 보였다. 각 지역 굴의 mtDNA에 대한 사용한 제한효소들에 의한 총절편수와 비교지역간에 공통절편수를 조사해 본 결과(표 1) 한국 남해안산 참굴 mtDNA에서는 15개, 서해안산은 16개, 일본산은 8개, 그리고 한국 동해안산 바위굴에서는 11개의 총절편수를 보였다. 각 지역간 공통절편수는 한국 남해안과 서해안산에서 11개로 가장 높은 공통절편수를 보였고, 다음이 남해안과 일본산에서 6개, 그리고 서해안과 일본산에서 4개로 나타났다. 세 지역의 참굴들과 바위굴과의 공통절편수는 참굴들간에 비해서 상대적으로 작은 값을 보였다. 특히 일본산 참굴과 한국산 바위굴간에는 공통절편수가 하나도 없었다. 표 1의 공통절편수를 이용하여 그 비율(F값)과 염기치환율(p값)을 구하였다(표 2). 참굴의 경우 한국 남해안과 서해안산에서 F값은 0.71로 가장 높았으며  $p = 0.02$ 였다. 남해안산과 일본산 참굴 사이에는  $F = 0.52$ 와  $p = 0.04$ 였으며 서해안산과 일본산 참굴 사이는  $F = 0.33$ 과  $p = 0.07$ 의 값을 나타내었다. 한국산 바위굴과 세 지역의 참굴들과의 비교에서는 F값은 0.00에서 0.15 사이였으며 p값은 0.12에서 1.00 사이의 값을 보였다. 각 굴 집단에서 mtDNA 염기치환율을 토대로 종내 또는 종간 근연관계를 분석하였을 때(그림 3) 한국 남해안과 서해안산 참굴간에 2%의 가장 가까운 근연관계를 보였고 이들 지역과 일본산 참굴간에는 5%의 염기치환율을 갖는 근연성을 보였다. 세 지역 참굴과 바위굴 사이의 근연성은 42%의 높은 염기치환율을 나타내었다.

**Table 1.** Comparative analysis of mtDNA fragments among oysters from four localities.

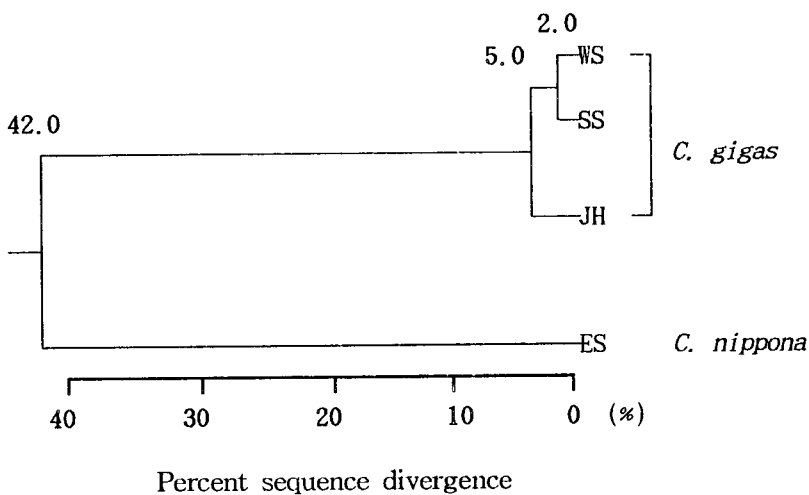
Species	Localities	Restriction enzymes								total
		EcoRI	BamHI	HindIII	XhoI	PstI	BglI	KpnI	XbaI	
<i>Crassostrea gigas</i>	WS/SS	1	1	4	2	2	1	0	0	11
	WS/JH	0	1	0	2	0	1	0	0	4
	SS/JH	0	1	0	2	0	1	2	0	6
<i>C. gigas/C. nippona</i>	WS/ES	1	0	1	0	0	0	0	0	2
	SS/ES	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	H/ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: WS; Korea West Sea, SS; South Sea, ES; East Sea, JH; Japan Hiroshima

**Table 2.** Genetic divergence of mtDNA among *Crassostrea gigas* and *C. nippona* populations.

Species	Localities	Localities			
		SS	WS	JH	ES
<i>Crassostrea gigas</i>	SS	—	0.71	0.52	0.08
	WS	0.02	—	0.33	0.15
	JH	0.04	0.07	—	0.00
<i>C. nippona</i>	ES	0.16	0.12	1.00	—

The above diagonal are total proportion of shared restriction fragments (F), the below diagonal are nucleotide sequence divergence (p).

**Fig. 3.** Dendrogram produced from UPGMA clustering of mtDNA nucleotide sequence divergence among populations of oysters, *Crassostrea gigas* and *C. nippona*.

## 고찰

본 연구에서는 한국에 서식하는 참굴(*Crassostrea gigas*)의 유전적 변이와 계통관계를 조사하기 위하여 한국 두 지역의 참굴과 일본산 참굴 그리고 한국산 바위굴(*Crassostrea nippona*)을 대상으로 미토콘드리아 DNA 절편분석을 수행하였다. 미토콘드리아 DNA 크기분석에서 세 지역 참굴에서 다 약 18 kb의 크기를 가졌으나 바위굴의 경우는 약 22 kb 정도로서 참굴에 비해 큰 크기를 가졌다. 이는 바위굴의 mtDNA에 DNA 절편 첨가가 생긴 것으로 추정된다. 여덟 종류의 제한효소를 사용하여 얻은 각 지역의 mtDNA 절편 양상은 각 지역간의 mtDNA에서 생긴 염기치환율을 알 수 있게 해주며 집단간 유전적 변이와 분화, 그리고 서로간 근연관계를 분석할 수 있게 한다. F값을 토대로 한국 남해안산과 서해안산 참굴의 평균 염기치환율은  $p = 0.02$ 로 나타났다. 이 값은 몇몇 무척추동물과 어류, 그리고 더 고등한 척추동물 종들의 집단간 평균 염기치환율(Avise and Lansman, 1983; Hale and Singh, 1986; McLean *et al.*, 1983; Zwanenburg *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1993; Lee and Park, 1992; Graves *et al.*, 1984; Latorre *et al.*, 1986; Sounder *et al.*, 1986)에 비하면 다소 높은 값에 해당하는데 이는 mtDNA의 유전적 변이가 원시적인 생물일수록 더 빠른 속도로 일어남(Kessler and Avise, 1985)에 기인할 것으로 추측된다.

각 지역간의 염기치환율을 토대로 유전적 근연관계를 조사하였을 때 서해안과 남해안산 참굴에서 2%의 염기치환율을 보여 가장 높은 근연성을 나타내었으며 이들 지역과 일본산 참굴간에는 5%의 염기치환율을 가지는 근연성을 보였다. 일반적으로 종내 유전적 변이에서 공통절편을 기준으로 하였을 때 mtDNA 염기서열 분화는 백만년당 2% 정도인 것으로 추정하며 타 분류군에서도 적용되기도 한다(Shields and Wilson, 1987). 이 가정에 의했을 때 한국 서해안과 남해안산 참굴은 약 100만년 전에 그리고 한국산과 일본산은 약 250만년 전에 분화된 것으로 추정할 수 있다. 참굴과 바위굴, 두 종간의 근연도에서는 본 연구에 사용한 제한효소들에 의한 공통절편 수가 두 종간에 매우 적었으며 특히 일본산 참굴과 바위굴 사이에는 공통절편이 하나도 없었던 결과에 의해 평균 염기서열 치환율이 42%를 나타내었다.

앞으로의 연구에서 한국산 참굴의 정확한 분류와 유전적 특성을 확립시키기 위하여 지역을 더 세분화하여 조사할 필요성이 있다.

## 참고문헌

- Avise, J.C. and R.A. Lansman, 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals, In: Evolution of Genes and Proteins (M. Nei and R. Koehn eds.), pp. 147-164. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Birnboim, H.C. and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., **7**: 1513-1523.
- Brown, W.M., M. George, Jr. and A.C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**: 1976-1981.
- Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA, In: Evolution of Genes and Proteins (M. Nei and R. Koehn eds.), pp. 62-68. Sinauer Associates, Sunderland MA.

- Graves, J.E., S.D. Ferris and A.E. Dizon, 1984. Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Marine Biology*, **79**: 315-319.
- Hale, L.R. and R.S. Singh, 1986. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8813-8817.
- Kessler, L.G. and J.C. Avise, 1985. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. *Molec. Biol. Evol.*, **2**: 109-125.
- Koh, H.S., S.K. Yoo, S.B. Kim and B.S. Yoo, 1993. Variation of mtDNA in striped field mice, *Apodemus agrarius coreae* Thomas, from the Korean peninsula. *Kor. J. Syst. Zool.*, **9**: 171-179.
- Latorre, A., A. Maya and F.J. Ayala, 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 8649-8653.
- Lee, H.Y. and C.S. Park, 1992. Genetic studies on Korean Anurans: Length and restriction site variation in the mitochondrial DNA of tree frogs, *Hyla japonica* and *H. suweonensis*. *Korean J. Zool.*, **35**: 219-225.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- McLean, M., C.K. Okubo and M.L. Tracey, 1983. Mitochondrial DNA heterogeneity in *Panulirus argus*. *Experientia*, **39**: 536-538.
- Palva, T.K. and E.T. Palva, 1985. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. *FEBS*, **192**: 267-270.
- Rand, D.M. and R.G. Harrison, 1989. Ecological genetics of a mosaic hybrid zone: mitochondrial, nuclear, and reproductive differentiation of crickets by soil type. *Evolution*, **43**: 432-449.
- Shields, G.F. and A.C. Wilson, 1987. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J. Mol. Evol.*, **24**: 212-217.
- Skibinski, D.O.F., 1985. Mitochondrial DNA variation in *Mytilus edulis* L. and the Padstow Mussel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **92**: 251-258.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco, CA.
- Sounders, N.C., L.G. Kessler and J.C. Avise, 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, **112**: 613-627.
- Torigoe, K., 1981. Oyster in Japan. *Jour. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 1 (Zoology)*, **29(2)**: 292-419.
- Upholt, W.B., 1977. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. *Nucl. Acids Res.*, **4**: 1257-1265.
- Zwanenburg, K.C.T., P. Bentzen and J.M. Wright, 1992. Mitochondrial DNA differentiation in western north Atlantic populations of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**: 2527-2537.
- 今井丈夫, 1976. 浅海完全養殖, 浅海養殖の進歩. 恒星社厚生閣, 東京, 87-94.
- 류성규, 유명숙, 1973. 굴의 양식에 관한 생물학적 연구(II): 참굴의 산지별 특성. *한수지*, **6**: 65-75.
- 박미선, 유호영, 박두원, 지영주, 임현정, 1995. 양식굴의 품종개량에 관한 연구. *수진사업보고(인쇄중)*.

RECEIVED: 12 May 1995

ACCEPTED: 7 June 1995

## Mitochondrial DNA Variation in Oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg and *C. nippona* Seki) Populations from Korea and Japan

Mi Seon Park and Sang Hae Kim\*

(Division of Aquaculture, Department of Aquaculture, National Fisheries Research & Development Agency, Pusan 626-900; \*Department of Biology, Inje University, Kimhae 621-749, Korea)

### ABSTRACT

The nucleotide sequence variation of mitochondrial DNA were investigated by eight restriction endonucleases from two oyster species, *Crassostrea gigas* collected from two localities of South Korea and one locality of Japan and *C. nippona* collected from one locality of South Korea. The total mtDNA size in the oyster, *C. gigas*, from the three localities was approximately 18 kb and that in *C. nippona* was 22 kb. The restriction fragment patterns of mtDNA in *C. gigas* from the three localities by BamHI, BglI, and XhoI digestions were identical to one another. The degree of mtDNA sequence divergence of *C. gigas* between the two localities in Korea was 2% and that between Korean and Japanese *C. gigas* was 5%. The amount of sequence divergence between the two species of oysters was 42%.