

유전적 형질에 의한 북태평양 연어 (*Oncorhynchus keta*)의 계군 구분

정웅식 · 이윤호* · 김수암¹ · 진덕희² · 성기백³
한국해양연구원, ¹부경대학교, ²강릉대학교, ³국립수산과학원

Genetic Identification of the North Pacific Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Stocks

Woongsic JUNG, Youn-Ho LEE*, Suam KIM¹, Deuk-Hee JIN² and Ki Baek SEONG³
Polar Sciences Laboratory, Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 426-744, Korea
¹Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
²Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Gangnung 210-702, Korea
³Yang Yang Inland Fisheries Research Institute, NFRDI, Yang Yang 215-821, Korea

The chum salmon (*Oncorhynchus keta*) is an anadromous fish distributed all around the North Pacific. Artificial production and release of the juveniles are being made by Korea, Japan, Russia, Canada and the United States. It is important to set up some criteria identifying each stock in order to clarify each nation's right of harvest for the chum salmon resource. As an attempt to build such criteria, we analyzed sequences of a microsatellite DNA Ogo5 and the COIII-ND3-ND4L region of the mitochondrial DNA from chum salmon of Korea, Japan, and the United States. Ogo5 has 4 different alleles: allele A, B-1, B-2, and B-3. Allele B-3 is found only in 3 individuals out of 12 Korea salmon. The Japan salmon have the other 3 alleles and the America salmon have only 2 alleles, A and B-1. Heterozygosity index (Ho/He) distinguishes the Korea (1.61) and Japan salmon (1.63) from the America ones (1.09). Seventeen different haplotypes are found in the COIII-ND3-ND4L region from 60 individuals, 20 from each stock. The gene genealogy of the haplotypes revealed by TCS program shows that the Korea and Japan salmon are genetically closely linked, but that they are clearly distinguished from the America ones. Ten and eleven individuals of the Korea and Japan salmon have an identical haplotype. Nine individuals of the Korea salmon (45%), however, are separable from the Japan salmon by their own specific nucleotides. This result presents usefulness of the COIII-ND3-ND4L region as a genetic marker for identification of the chum salmon stocks.

Key words: *Oncorhynchus keta*, Salmon stock, ND3, Microsatellite DNA

서론

한국 동해안의 가장 대표적인 연어과 어류가 연어 (*Oncorhynchus keta*)이다. 연어는 북태평양과 베링해, 오호츠크해 및 이들 바다로 유입되는 하천에 널리 분포한다 (Myoung and Park, 1992). 한국을 비롯한 북태평양 연안국들 (미국, 일본, 러시아, 캐나다 등)은 연어자원을 증대시키기 위해 연어 치어를 인공적으로 생산하여 하천에 방류한다. 각 나라에서 방류된 연어 집단은 일생 동안 일정한 경로를 따라 북태평양과 주변 해역을 회유한다. 그런데, 회유경로가 집단 간에 서로 겹치며 인접국의 배타적 경제수역을 지나게 되는 경우가 많다. 미국, 캐나다, 일본, 러시아는 1993년 북태평양 소하성 어류위원회 (NPAFC)를 설립하여 연어자원에 대한 국가 간 이해가 상충될 경우에 대비하고 있으며, 연어자원의 효율적 관리와 합리적인 이용방안을 마련해 오고 있다.

연어 계군에 대한 분석과 이를 구분할 수 있는 표지가 연어

치어를 생산, 방류하는 북태평양 각국의 권리를 보장하고, 연어 자원을 효율적으로 관리하는데 필요하다고 생각되어 이에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 최근 연어과 어류의 계군을 분석하는데 유전자를 이용하는 다양한 방법들이 시도되고 있다. 처음에는 효소단백질의 대립형질을 이용하는 동위 효소 분석법이 적용되었고 (O'Connell et al., 1996), 마이크로새틀라이트 DNA의 염기배열이 계군 분석에 유용한 표지임이 알려지면서 (Wright and Bentzen, 1994; Jarne and Lagoda, 1996) 이를 이용하는 방법들이 대서양 연어 (McConnell et al., 1995), sockeye 연어 (Nelson et al., 1998), 송어 (Beacham et al., 2000) 등을 대상으로 시도되었다. 한편, 미토콘드리아 유전자는 염기배열의 변화가 핵 내 유전자보다 약 10배나 빠르고 (Brown et al., 1979) 모든 진핵생물에 상동유전자가 존재하는 장점이 있어 종과 계군을 구분하고 그들간의 상관관계를 분석하는데 좋은 지시자가 되는 것으로 알려져 있다 (Avisé, 1994). 미토콘드리아 유전자는 연어과 어류의 중간 상관관계를 밝히는데 이용되어 왔으며 (Domanico and Phillips, 1995; Kitano et al.,

*Corresponding author: ylee@kordi.re.kr

1997; Domanico et al., 1997), sockeye 연어의 계군을 밝히는 데도 이용되었다 (Allendorf and Seeb, 2000). Sunnucks (2000)는 미토콘드리아 유전자의 하나인 ND3가 변이 속도가 빨라 종간의 상관관계 분석 뿐만 아니라 계군 분석과 생물지리학적 연구에 적합한 지시자임을 제시하였다. 우리나라에서는 한국산 연어의 유전적 표지를 개발하기 위한 생화학적 연구 (Hong et al., 1994), 집단유전학에 대한 연구 (Seong, 1999), 미토콘드리아 리보솜 RNA를 이용한 언어과의 계통진화에 대한 연구 (Lee et al., 2000) 등이 수행되었다. 그러나, 아직 우리나라 연어를 북태평양 주변국의 연어와 구분할 수 있는 유전적 표지가 확립되지 않았으며 집단 간의 유전적 관계 역시 명확히 설정되지 않았다.

본 연구는 한국, 일본, 미국에서 방류되는 연어집단의 유전적 차이 유무를 밝히고, 이를 구분하는 표지를 확립할 목적으로 수행되었다. 이를 위하여 연어와 진화적으로 가까운 곱사연어 (Domanico and Phillips, 1995)에서 알려진 마이크로새틀라이트 DNA Ogo5 (Olsen et al., 1998)와 미토콘드리아 유전자 중 변화율이 특히 높은 것으로 알려진 ND3 (Jacobs et al., 1988; Sunnucks, 2000)와 그 주변 지역 COIII와 ND4L 말단의 염기배열을 분석하여 한국, 일본, 미국의 연어 시료간 서로 비교하였다.

재료 및 방법

시료 채집

한국 연어는 동해안에 위치한 양양의 남대천에서, 일본 연어는 홋카이도 서쪽 연안에 위치한 Mashike의 Shokanbetsu 강에서, 미국 연어는 북태평양 동안에 위치한 워싱턴주 소재 Quilcene에서 채집하였다. 이들 지역은 각 나라에서 연어의 회유량이 비교적 많은 대표적인 연어 산지이다. 연어의 유전자 분석에 간 (liver) 조직을 이용하였다. 간 조직은 채취 후 100% 에탄올에 고정하거나 냉동 보관하여 실험실로 운반하였다.

계놈 DNA의 분리와 대상 유전자의 증폭

연어의 계놈 DNA를 분리하기 위해 Blood and Cell culture DNA Midi Kit (Qiagen, Germany)를 사용하였다. 냉동된 간 시료는 바로 DNA 분리에 사용하였고, 에탄올에 고정된 시료는 사용 전 3차 증류수로 여러 차례 씻은 후 사용하였다. 시료에서 약 70 mg을 떼어내 DNA 분리 kit가 제시하는 방법에 따라 실험을 진행시켜 계놈 DNA를 분리하였다. 분리된 계놈 DNA는 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하여 추출된 상태를 확인하였으며, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 그 농도를 결정하였다.

추출된 계놈 DNA를 사용하여 마이크로새틀라이트 DNA Ogo5를 중합효소연쇄반응 (PCR)으로 선택적으로 증폭하였다. Ogo5 증폭에 사용된 프라이머는 Olsen et al. (1998)이 곱사연어에서 밝힌 것을 그대로 사용하였다 (Ogo5F:GGTTTGAC-ATTTAAGGCGGA, Ogo5R:GGGTGTTCAAGCTCACTGCT).

COIII-ND3-ND4L 유전자 증폭에는 이 유전자의 양쪽에 위치한 COIII과 ND4L 유전자 말단의 염기배열에 맞는 프라이머 (Domanico and Phillips, 1995; COIII:TTACAATCGCTGACGCGC, ND4L:GGTGC GGTTGAAACGCGAGTC)를 이용하였다.

PCR 반응용액은 5 μ L 10xPCR buffer (Qiagen), 2.5 μ L 10 mM each dNTPs, 2.5 μ L 10 pmole 프라이머 (앞쪽과 뒤쪽), 0.5-1.0 μ g DNA, 2.5 unit Hotstar Taq polymerase (Qiagen)를 혼합하여 전체 50 μ L을 만들었다. PCR 반응과정과 시간, 온도 조건은 다음과 같다: 초기 활성화 (95°C, 15분); 35회 반복 과정의 denaturation (95°C, 1분), annealing (50°C, 1분), extension (72°C, 1분); 최후 반응 (72°C, 10분); 보관 (4°C). PCR 반응기로서 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) 또는 TGradient Thermocycler (Whatman, Biometra)를 사용하였다. PCR이 끝난 후 반응용액 8 μ L를 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하여 증폭된 DNA의 크기를 확인하였다.

염기배열 결정과 분석

PCR로 증폭된 DNA는 대립유전자가 2개 이상인 Ogo5의 경우 TOPO TA cloning kit (Invitrogen)를 사용하여 클로닝하였고, 대립유전자가 1개인 COIII-ND3-ND4L의 경우 PCR 산물을 정제하여 바로 염기배열을 결정하였다. 클로닝 과정은 제품에서 제시한 실험과정을 따라 진행하였으며, PCR 산물을 pCRII-TOPO vector에 연결하고 *E. coli* 내로 이전시켰다. PCR 산물이 들어가 흰색이나 옅은 청색으로 자라는 콜로니를 선택하여 M13F (TGTAACGACGCGCCAGT)와 M13R (CAGG-AAACAGCTATGACCATG) 프라이머를 사용하여 삽입된 DNA를 PCR로 증폭하였다. PCR이 끝난 후 반응용액 8 μ L를 0.8% 아가로스 젤에 전기영동하여 예상하는 크기의 DNA가 증폭되었는지를 판단하였다. 예상하는 크기로 증폭된 DNA는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 이용하여 정제하고, Dye-terminator와 T7 (TAATACGACTCACTATA GGG) 혹은 Sp6 (ATTTAGGTCACACTATAG) 프라이머를 사용하여 염기배열 결정 PCR 반응을 진행시켰다. COIII-ND3-ND4L의 PCR 반응은 처음 이 유전자를 증폭하기 위해 사용하였던 COIII와 ND4L 프라이머를 사용하여 실시하였다. 이후 PCR 반응산물인 DNA를 알콜침전법으로 정제하고, Automated DNA sequencer 377 (Applied Biosystems)로 전기영동하여 염기배열을 결정하였다. 결정된 염기배열은 MacVector 프로그램 내의 Clustal W (version 6.5.3, Oxford Molecular)를 사용하여 개체간 서로 비교하였다. 염기배열의 차이에 근거하여 개체간, 집단간의 유전적 관계를 TCS 프로그램 (ver. 1.13; Clement et al., 2000)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

한국, 일본, 미국 연어의 마이크로새틀라이트 DNA Ogo5 염기배열과 대립유전자 빈도

연어의 간 조직에서 추출된 계놈 DNA를 이용하여 마이크로새틀라이트 DNA를 PCR 반응으로 증폭한 결과, Ogo5 프라

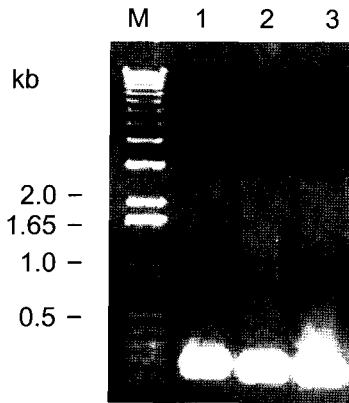


Fig. 1. An electrophoresis picture of the Ogo5 PCR products from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) (M, size marker; 1, 2, 3, three different individuals)

이머에 의해 약 200 bp의 DNA가 증폭되었다 (Fig. 1). Ogo5는 한국 연어 12개체, 일본 연어 8개체, 미국 연어 10개체에서 모두 4개의 대립유전자 염기배열이 나타났다: allele A, 183 bp; allele B-1, 180 bp; allele B-2, 182 bp; allele B-3, 183 bp (Fig. 2). 각 대립유전자는 GT 반복구조의 수와 주변 염기서열이 서로 달랐다. 한국과 일본연어는 주로 allele A와 allele B-1의 이형접합체 (heterozygote)이었으며, 미국연어는 allele A와 allele B-1의 이형접합체 외에 allele A의 동형접합체 (homozygote)가 많았다 (Table 1). 한국 연어 세 개체는 allele B-3 대립유전자를 갖는 것으로 나타나 일본 연어와 구분되는 특징을 보였다.

Ogo5의 대립유전자 빈도에 따른 이형접합도 지수 (heterozygosity index, Ho/He ratio; Ho, observed; He, expected heterozygosity)는 한국과 일본 연어의 경우 각각 1.61과 1.63으로 유사하였으나, 미국 연어의 경우 1.09로 나타났다 (Table 2). 이것은 미국 연어 집단이 Hardy-Weinberg 평형에 있으나 한국

과 일본 연어 집단은 이 평형에서 다소 벗어나 이형접합체 개체가 많음을 시사한다. 한국과 일본 연어 집단에서 높은 이형접합도 지수가 보이는 것은 두 나라에서 상대적으로 높은 비중을 차지하는 인공종묘생산의 영향일 것으로 생각된다. 인공종묘생산은 그 과정의 특성상 자손을 번식시키는 성체의 수가 적어 유효 집단의 크기 (effective population size)를 작게 한다. 이에 따라, 연어집단은 유전적 병목현상 (bottleneck event)을 겪게 된다. 병목현상을 겪는 집단에서는 대립유전자 다양성의 감소가 이형접합도의 감소보다 빠르게 일어나게 되어 (Nei et al., 1975), 다시 평형에 이르기 전까지 기대 이형접합도가 관찰 이형접합도보다 낮게 되는 이형접합도 지수의 상승이 나타난다 (Cornuet and Luikart, 1996). 한국과 일본의 인공종묘생산은 매년 계속되므로 두 나라 연어집단은 지속적인 병목현상을 겪고 있다고 볼 수 있다. 미국 연어의 경우 인공생산보다 자연생산이 집단 크기에 기여하는 바가 더 클 것으로 추정된다.

한편, 한국과 일본 연어에서 공통적으로 allele A와 allele B-1의 이형접합체가 높은 비율로 나타난 것은 두 연어집단의 유전적 상관관계가 밀접함을 시사한다. Taylor et al. (1994)은 minisatellite DNA를 이용하여 북태평양 연어를 일본 계군, 러시아·유콘강 계군, 남동 알래스카·캐나다 British Columbia 계군으로 구분하였다. Utter et al. (1980)은 동위효소의 변이에 근거하여 연어를 아시아 계군 (일본, 러시아), 알래스카 계군, 북미 계군으로 구분하였다. 본 연구 결과는 한국 연어가 지리적으로 가까운 일본 연어와 함께 아시아 계군에 속할 가능성을 제시해 준다.

연어의 COIII-ND3-ND4L 염기배열과 계군 분석

한국 연어 20개체, 일본 연어 20개체, 미국 연어 20개체에서 미토콘드리아 COIII-ND3-ND4L 유전자의 염기배열을 분석하였다. Domanico and Phillips (1995)가 이용한 COIII와 ND4L 프라이머를 사용하여 PCR을 진행시켜 약 780 bp 크기의 DNA



Fig. 2. Sequences of the four different alleles of the microsatellite DNA Ogo5 from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*).

Table 1. The genotype of each chum salmon (*Oncorhynchus keta*) individual for the microsatellite DNA Ogo5

Sample	Allele			
	Allele A (183 bp)	Allele B-1 (180 bp)	Allele B-2 (182 bp)	Allele B-3 (183 bp)
Korea	01	○		○
	02	○		○
	03	○	○	
	04	○	○	
	05	○	○	
	06	○		○
	07	○	○	
	08	○	○	
	09	○	○	
	10	○	○	
	11	○	○	
	12	○		○
Japan	01	○	○	
	02	○	○	
	03	○	○	
	04	○	○	
	05	○○		
	06	○	○	
	07	○	○	
	08	○		○
USA	01	○	○	
	02	○	○	
	03	○○		
	04	○○		
	05	○○		
	06		○○	
	07	○○		
	08	○	○	
	09	○	○	
	10	○	○	

Table 2. Allele frequency of the microsatellite DNA Ogo5 in each population of the chum salmon (*Oncorhynchus keta*). (KS, Korea chum salmon; JS, Japan chum salmon; AS, American chum salmon)

Alleles	Allele frequency in each population		
	KS	JS	AS
Allele A	0.50	0.56	0.65
Allele B-1	0.33	0.38	0.35
Allele B-2	0.04	0.06	0.00
Allele B-3	0.13	0.00	0.00
Ho	1.00	0.88	0.50
He	0.62	0.54	0.46
Ho/He ratio	1.61	1.63	1.09

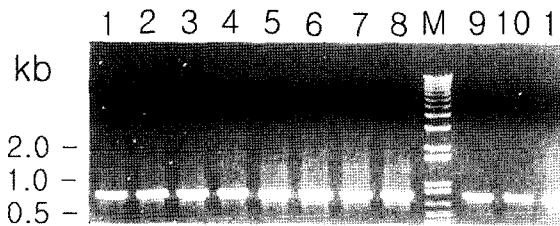


Fig. 3. An electrophoresis picture of the COIII-ND3-ND4L PCR products from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) (M, size marker)

단편을 선택적으로 증폭하였다 (Fig. 3). 이 PCR 산물을 정제하고 바로 염기배열을 결정하여 프라이머를 제외한 744 bp의 염기배열을 모든 개체에서 확인하였다 (Fig. 4). 첫 번째 염기에서 273번째까지는 COIII 유전자의 3'쪽 말단이고, 274-624 염기배열은 ND3 유전자이며, 625-744 염기배열은 ND4L 유전자의 5'쪽 단편이다.

COIII-ND3-ND4L 염기배열은 분석한 연어 60개체에서 전체 염기가 삽입이나 결실이 없이 잘 보존되었다. 단일염기 다형성 (SNP, single nucleotide polymorphism)은 모두 20개의 위치에서 발견되었으며, SNP에 의해 서로 다른 염기배열을 갖는 haplotype이 17 종류가 구분되었다. 단일염기 다형성이 발견된 20개의 위치 중 13개가 한 개체에서만 발견되는 개체 특이적 변이 (singleton)였고, 7개는 두 개체 이상에서 공통적으로 발견되는 집단 특이적 염기변이였다 (Fig. 5). 한국 연어는 246번째 염기가 두 개체에서 아데닌 (A)이었고, 307번째 염기가 다섯 개체에서 시토신 (C)이었다. 일본 연어는 393번째 염기가 세 개체에서 구아닌 (G)이었다. 한국과 일본 연어에 비해 특징적인 염기가 미국 연어에서 일관되게 관찰되었다. 미국 연어는 57번째, 534번째, 591번째 염기가 조사한 20 개체 모두에서 시토신 (C), 구아닌 (G), 구아닌 (G)이었으나 한국과 일본 연어는 이 세 위치에서 각각 3-6개체만 미국 연어와 동일한 염기를 갖고 나머지 개체는 티민 (T), 아데닌 (A), 아데닌 (A)을 갖고 있었다. 특히, 미국 연어는 20 개체 중 17 개체가 303번째 염기로 티민 (T; 나머지 세 개체는 시토신, C)을 갖고 있어 조사한 모든 개체가 시토신 (C)을 갖고 있는 한국과 일본 연어와 분명히 구분되었다. 이와 같은 COIII-ND3-ND4L의 단일염기 다형성 패턴은 한국과 일본 연어가 유전적으로 가까운 집단이며, 미국 연어는 상대적으로 먼 유전적 집단을 시사한다. Choi (2002)와 Choi et al. (2003)은 한국, 일본, 미국 연어 3-4개체의 COIII-ND3-ND4L을 분석하여 McKay et al. (1996)이 밝힌 염기배열과 차이가 있는 단일염기 다형성을 보고한 바 있다.

연어의 COIII-ND3-ND4L 염기배열을 이용하여 TCS 분석 (Clement et al., 2000)을 실시한 결과 한국 연어는 유전적 형질이 일본 연어와 유사하며, 이들은 미국 연어와 뚜렷이 구분되었다 (Fig. 6). 즉, 한국, 일본, 미국의 연어가 COIII-ND3-ND4L 유전 형질에 따라 한국과 일본 계군, 미국 계군으로 구분됨을 보여준다. 한국과 일본 연어는 50% 이상 (한국 연어 10개체, 일본 연어 11개체)이 동일한 염기배열을 갖고며 같은 haplotype에 속하였다. 반면, 한국과 일본, 미국 연어에서 동일한 염기배열을 갖는 개체는 각각 1개체, 3개체, 3개체에 불과하였다 (전체의 5-15%). 한국과 일본 연어 사이에 유전적 유사성이 높은 것은 1) 두 계군이 분리된 시기가 지금부터 그다지 오래되지 않아 변이가 축적될 시간이 충분치 않았을 가능성, 2) 두 나라 연어 사이에 지금도 지속적인 개체의 이동 (migration)이 일어나고 있을 가능성, 3) 1985-1986년에 일본으로부터 100만 마리 이상의 인공종묘 (발아란)를 도입하여 양

(A)
 TCCACTTTCTTTGTCGCCACAGGATTCCACGGCCTACACGTAATCATCGGCTCTACTTTTCTGGCTGTTT
 GCCTTCTACGACAAATTC AATACCATTTCACATCTGAACATCATTTTGGCTTTGAAGCCGCTGCTTGATA
 TTGACACTTTGTAGACGTTGTGTGACTCTTCTATACGTTTCTATTTACTGATGAGGCTCATAATCTTTT
 TAGTATTAATTAGTATAAGTGACTTCCAATCACCCGGTCTTGGTTAAAATCCAAGGAAAGATAATGAACT
 TAATTACAACAATCATTACTATCACCATCACATTGTCCGCAGTACTAGCCACTATCTCTTTCTGATTACC
 ACAAATCTCCCCGACGCAGAAAAGTTGTCTCCCTATGAGTGCGGATTTGACCCACTAGGGTCCGCCCGC
 CTCCCCCTTCTTTACGCTTCTTTTTAATTGCCRTCTCTTTCTCCTATTTGATCTAGAAAATTGCCCTCC
 TTCTCCCCTTACCTTGGGGGGATCAACTCAGTACCCCAACCCTAACACTTATTTGATCCACTGCCGTACT
 CGCCCTCCTTACTCTTGGCTTAATTTATGARTGAACCCAAGGAGGCTTGGAAATGAGCCGAATAGGCAGTT
 AGTCCAAAACAAGACCCTTGATTTCCGGCTCAAAGACCATGGTTTAAGTCCATGACCGCCTTATGACACC
 AGTACACTTCAGCTTTACCTCAGCCTTTATTCTAGGGCTTATAG

(B)
 TCCACTTTCTTTGTCGCCACAGGATTCCACGGCCTACACGTAATCATCGGCTCTACTTTTCTGGCTGTTT
 GCCTTCTACGACAAATTC AATACCATTTCACATCTGAACATCATTTTGGCTTTGAAGCCGCTGCTTGATA
 TTGACACTTTGTAGACGTTGTGTGACTCTTCTATACGTTTCTATTTACTGATGAGGCTCATAATCTTTT
 TAGTATTAATTAGTATAAGTGACTTCCAATCACCCGGTCTTGGTTAAAATCCAAGGAAAGATAATGAACT
 TAATTACAACAATCATTACTATYACCATCACATTGTCCGCAGTACTAGCCACTATCTCTTTCTGATTACC
 ACAAATCTCCCCGACGCAGAAAAGTTGTCTCCCTATGAGTGCGGATTTGACCCACTAGGGTCCGCCCGC
 CTCCCCCTTCTTTACGCTTCTTTTTAATTGCCATCCTCTTTCTCCTATTTGATCTAGAAAATTGCCCTCC
 TTCTCCCCTTACCTTGGGGGGATCAACTCAGTACCCCAACCCTGACACTTATTTGATCCACTGCCGTACT
 CGCCCTCCTTACTCTTGGCTTAATTTATGAGTGAACCCAAGGAGGCTTGGAAATGAGCCGAATAGGCAGTT
 AGTCCAAAACAAGACCCTTGATTTCCGGCTCAAAGACCATGGTTTAAGTCCATGACCGCCTTATGACACC
 AGTACACTTCAGCTTTACCTCAGCCTTTATTCTAGGGCTTATAG

Fig. 4. The typical COIII-ND3-ND4L DNA sequences of the Korea and Japan chum salmon (*Oncorhynchus keta*) (A) and of the America chum salmon (B)

	57	246	303	307	393	534	591
KS01	TACTTTT	CCCGGTC	TATCACC	TCA	GTGCGGA	CCTAACA	TGAATGA
KS02							
(KS05, KS09-KS11, KS13, KS14, KS16-KS19, same as KS02)							
KS03	..C..	C..	..	G..	..
KS04	..C..	C..	..	G..	..
KS06A..
KS07	..C..	C..	..	G..	..
KS08	..C..	C..	..	G..	..
KS12	..C..	C..	..	G..	..
KS15A..
KS20	..C..	G..	..
JS01	..C..G..	..G..	..
JS02							
(JS06, JS08-JS18 same as JS02)							
JS03G..	..G..	..G..
JS04G..
JS05	..C..G..	..
JS07	..C..G..	..G..
JS19	..C..G..	..G..
JS20	..C..G..	..G..
AS01	..C..T..G..	..G..
AS02	..C..T..G..	..G..
AS03	..C..T..G..	..G..
AS04	..C..T..G..	..G..
AS05	..C..T..G..	..G..
AS06	..C..T..G..	..G..
AS07	..C..T..G..	..G..
AS08	..C..T..G..	..G..
AS09	..C..T..G..	..G..
AS10	..C..T..G..	..G..
AS11	..C..T..G..	..G..
AS12	..C..T..G..	..G..
AS13	..C..T..G..	..G..
AS14	..C..T..G..	..G..
AS15	..C..T..G..	..G..
AS16	..C..T..G..	..G..
AS17	..C..T..G..	..G..
AS18	..C..T..G..	..G..
AS19	..C..T..G..	..G..
AS20	..C..T..G..	..G..

Fig. 5. The population-discriminative single nucleotide polymorphisms of the COIII-ND3-ND4L region among the Korea (KS), Japan (JS) and America (AS) chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Dots denote the identical nucleotide with the first sequence.

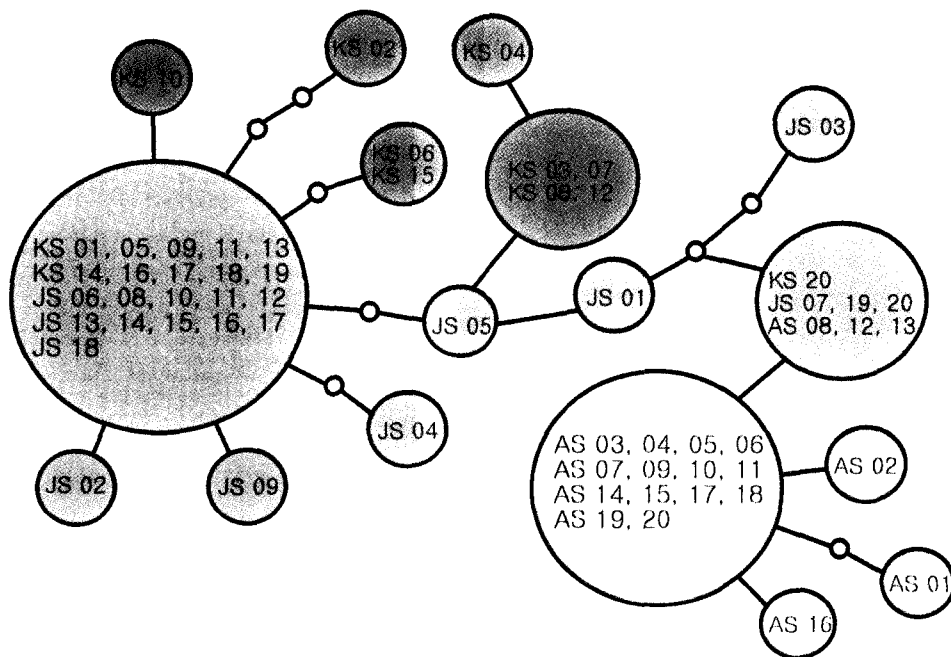


Fig. 6. A diagram of COIII-ND3-ND4L gene genealogy among the Korea (KS), Japan (JS) and America (JS) chum salmon (*Oncorhynchus keta*) revealed by the computer program TCS (ver. 1.13; Clement et al., 2000). The line between circles indicates one nucleotide difference. (orange, KS population; green, JS; yellow, AS; Blue, KS and JS; pink, KS, JS and AS)

양 남대천에 방류함으로써 인위적인 유전자 교환이 일어났을 가능성 등으로 설명될 수 있다. 한편, 한국과 일본, 미국 연어의 5-15%가 동일한 haplotype을 갖는 것은 두 계군 사이의 유전자 교환이 매우 적음을 시사한다. COIII-ND3-ND4L 염기배열에서 보여지는 연어의 유전적 계군 구분은 마이크로새틀라이트 DNA Ogo5의 이형접합도 지수가 한국과 일본 연어가 서로 유사하고 (약 1.6), 미국 연어가 크게 다른 (약 1.1) 결과 (Table 2)와 부합된다. COIII-ND3-ND4L에 의한 연어 계군 구분은 minisatellite DNA에 근거한 Taylor et al. (1994)의 구분 (일본 계군, 러시아·유콘강 계군, 남동 알래스카·캐나다 British Columbia 계군)과 동위효소를 이용한 Utter et al. (1980)의 구분 (아시아(일본·러시아)계군, 알래스카계군, 북미 (BC and Puget Sound)계군)과도 부합되는 결과이다.

한국 연어는 대다수가 일본 연어와 하나의 유전적 계군을 이루지만 약 45%는 유전적으로 독특한 특징을 갖는다. 한국 연어 20개체 중 5개체는 한국/일본 계군과 미국 계군의 중간적인 특징을 갖고 있으나, COIII-ND3-ND4L 염기배열에서 307 번째 염기로 시토신 (다른 개체들은 아데닌)을 가짐으로써 일본과 미국 연어와도 구분된다. 그 외 한국 연어 2개체는 246번째 염기로 아데닌을 갖고 있어 다른 연어들과 구분되며, 또 다른 2개체는 개체 특이적인 변이 (singleton)를 갖고 있어 구분된다. 이는 한국 연어 집단이 유전적으로 비교적 다양하게 구성되어 있으며, 그 45%는 일본 연어와 구분되는 독특한 계통에서 유래한 집단일 가능성을 시사한다.

일본 연어 20개체의 구성은 한국 연어와 동일한 염기배열을 갖는 11 개체 (55%), 이와 유사하나 개체 특이적 변이를 갖는 세 개체, 미국 연어 일부와 동일한 염기배열을 갖는 세 개체 (15%), 이와 비슷하나 개체 특이적 변이를 갖는 3개체로 이루어져 있다 (모두 8 종류의 haplotype). 일본 연어의 유전적 구성 역시 비교적 다양하게 나타났다. 미국 연어 20개체는 5 종류의 haplotype으로 구성되었다. 20개체 중 14개체가 단 하나의 haplotype에 속하며, 또 다른 3개체는 앞의 haplotype에서 한 개의 염기가 치환된 염기배열을 갖는다. 나머지 세 개체 역시 주요 haplotype에서 한 두 개의 개체 특이적 변이 (singleton)만을 갖는 독립된 염기배열을 보인다. 본 연구에서 분석된 결과로만 볼 때, 미국 연어는 유전적 구성이 비교적 단순하다고 볼 수 있다.

한국, 일본, 미국 연어가 미토콘드리아 유전자 COIII-ND3-ND4L의 염기배열에 따라 한국/일본 계군과 미국 계군으로 크게 나뉘는 것은 북태평양 소하성 어류의 기원에 대한 McPhail and Lindsey (1970, 1986) 가설을 지지한다. 이들은 현생 북태평양 소하성 어류 집단이 지금부터 약 18,000년 전 Wisconsin 빙하기에 북태평양 생물의 피한지 (refugia)였던 북쪽의 베링해 (Beringia), 서쪽의 오호츠크해, 동쪽의 Cascadia에서 각각 기원하였다고 주장한다. 본 연구에서 밝혀진 연어의 계군 구조를 이 가설에 대비해 보면, 한국과 일본 연어는 오호츠크해 피한지 연어의 후손이며 미국 연어는 Cascadia 피한지 연어의 후손으로 추론할 수 있다. 본 연구에서 COIII-

ND3-ND4L의 염기배열은 연어 집단 간의 유전적 상관관계를 보여줄 뿐만 아니라, 각 계군과 haplotype을 구분할 수 있는 명백한 기준 (독특한 DNA 염기배열 형질)을 제시하는 좋은 유전자 마커 (genetic marker)임이 드러났다. 비록, 한국 연어가 일본 연어와 유전적으로 유사하고 같은 계군에 속한다고 하더라도 조사된 약 45% 개체가 독특한 COIII-ND3-ND4L 염기배열을 갖고 있으므로, 이 유전자는 한국의 독특한 개체군을 일본 연어와 구분할 수 있는 표지로서 매우 유용하다.

사 사

이 연구는 해양수산부 수산특정연구개발사업 (19990011)과 과학기술부 국가지정연구실사업 (2000-N-NL-01-C16)의 연구비 지원을 받아 수행되었다. 연어 시료 채집에 도움을 준 국립수산물품질관리원 양양내수면연구소, 일본 홋카이도 어류부화장, 미국 알래스카 수산과학연구소 직원 여러분께 감사 드린다.

참 고 문 헌

- Allendorf, F.W. and L.W. Seeb. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. *Evolution*, 54, 640-651.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York.
- Beacham, T.D., S. Pollard and K.D. Le. 2000. Microsatellite DNA population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Nass and Skeena rivers in northern British Columbia. *Mar. Biotechnol.*, 2, 587-600.
- Brown, W.M., M. George, Jr. and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1967-1971.
- Choi, Y.S. 2002. Cloning and nucleotide sequence of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA for population analysis of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Master's thesis, Gangneung Univ. (in Korean)
- Choi, Y.S., Y.H. Lee and D.H. Jin. 2003. Cloning and DNA sequences analysis of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 from Korean chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *J. Kor. Fish. Soc.* (in press).
- Clement, M., D. Posada and C.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9, 1657-1660.
- Cornuet, J.M. and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001-2014.
- Domanico, M.J. and R.B. Phillips. 1995. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (Genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 4, 366-371.
- Domanico, M.J., R.B. Phillips and T.H. Oakley. 1997. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (genus *Oncorhynchus*) using nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54, 1865-1872.
- Hong K.P., J.G. Myoung, J.K. Son and C.W. Park. 1994. A biochemical study for the development of genetic marker on salmonids in Korea. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 27, 83-88.
- Jacobs, H.T., D.J. Elliott, V.B. Math and A. Farquharson. 1988. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 202, 185-217.
- Jarne, P. and J.L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE.*, 11, 424-429.
- Jung, W.S., Y.H. Lee, H.C. Shin, K.B. Seong and S.A. Kim. 2001. Species identification of the chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and pink salmon (*O. gorbuscha*) by use of genetic markers. *J. Kor. Soc. Fish. Res.*, 4, 30-41. (in Korean)
- Kitano, T., N. Matsuoka and N. Saitou. 1997. Phylogenetic relationship of the genus *Oncorhynchus* species inferred from nuclear and mitochondrial markers. *Genes Genetic Syst.*, 72, 25-34.
- Lee, H.J., J.Y. Park, J.H. Lee, K.S. Min, I.G. Jeon, M.A. Yoo and W.H. Lee. 2000. Phylogeny of the subfamily Salmonidae distributed in Korea based upon nucleotide sequences of mitochondrial ribosomal RNA genes. *J. Kor. Fish. Soc.*, 33, 103-109.
- McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen and J. Wright. 1995. Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 137, 19-30.
- McKay, S.J., R.H. Devlin and M.J. Smith. 1996. Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 1165-1176.
- McPhail, J.D. and C.C. Lindsey. 1970. Freshwater fishes of northwestern Canada and Alaska. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, 173, 381.
- McPhail, J.D. and C.C. Lindsey. 1986. Zoogeography of the freshwater fishes of Cascadia (the Columbia

- system and rivers north to the Stikine). In: Zoogeography of North American Freshwater Fishes, Hocutt, C.H. and E.O. Wiley, ed. Wiley and Sons, New York, N.Y., pp. 615-637.
- Myoung, J.G. and C.W. Park. 1992. Morphological and taxonomic studies of *Oncorhynchus* sp. in Korea. Korea Ocean Research and Development Institute. BSPE 00254-420-3. (in Korean)
- Nei, M., T. Maruyama and R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1-10.
- Nelson, R.J., T.D. Beacham and M.P. Small. 1998. Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7, 312-319.
- O'Connell, M., D.O.F. Skibinski and J.A. Beardmore. 1996. Allozyme and mtDNA divergence between Atlantic salmon populations in North Wales. *J. Fish Biol.*, 48, 1023-1026.
- Olsen, J.B., P. Bentzen and J.E. Seeb. 1998. Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Mol. Ecol.*, 7, 1083-1090.
- Seong, K.B. 1999. Biological characteristics and population genetics of salmonid species from Korea. Ph. D. Thesis, Pukyong Nat'l Univ., pp. 125. (in Korean)
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *TREE.*, 15, 199-203.
- Taylor, E.B., T.D. Beacham and M. Kaeriyama. 1994. Population structure and identification of north Pacific ocean chum salmon (*Oncorhynchus keta*) revealed by an analysis of minisatellite DNA variation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51, 1430-1442.
- Utter, F.M., S.G. Campton, G. Miller, J. Seeb and L. Wishard. 1980. Population structure of indigenous salmonid species of the Pacific Northwest. In: Salmonid ecosystems of the North Pacific, McNeil, W.J. and D.C. Himsforth, ed. Oregon State Univ. Press, pp. 285-304.
- Wright, J.M. and P. Bentzen. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Fish Biol. Fish.*, 4, 384-388.

2003년 5월 17일 접수

2003년 11월 29일 수리