



Isozyme 및 AFLP분석에 의한 전복류 4종간의 유전적 차이 및 유연관계

박철지*, 木島明博¹

국립수산과학원 패류육종연구센터, ¹東北大學 農學部

Genetic Divergence and Relationship Among Four Abalone Species by Isozyme and AFLP analyses

Choul-ji Park* and Akihiro Kijima¹

¹Shellfish Genetic and Breeding Research Center, NFRDI, Ongpori Hallimeup, Bukjejugun Jejudo 695-835, Korea
¹Education and Research Center of Marine Bio-resources, Tohoku University, Onagawa, Oshika, Miyagi 986-2242, Japan

Isozyme and AFLP analyses were examined to estimate the utilities of them as a genetic marker. The utilities were evaluated by genetic divergence and relationships among the four distinct abalone species; *Haliotis discus hawaii* collected from northeast coast of Japan and Yellow-Sea coast of China, *H. rufescens* collected from west coast of USA, *H. rubra* collected from southeast coast of Australia and *H. midae* collected from Cape Town of South Africa. Isozyme and AFLP analyses showed a clear genetic divergence between every pair of species. Genetic relationships among the four species estimated by isozyme and AFLP analyses reflected to geographical distribution and morphological characteristics. In conclusion, Isozyme and AFLP analyses are suitable genetic markers for estimates of genetic divergence and relationship among abalone species.

Keywords: Abalone, Isozyme, AFLP, Genetic Divergence, Genetic Relationship

서 론

전복류는 전 세계의 열대지역을 비롯하여 온대 및 아열대의 연안에서 서식하는 종으로 약 100여종이 알려져 있으며 예로부터 식용 및 약용으로 이용되어 수산자원에 있어 중요한 종으로 알려져 있다(Lindberg, 1992). 전복류는 종묘생산 및 사육관리 기술이 발전하여 대량생산이 가능하게 되었으며 최근에는 생산 효율이 높은 우량품종개발을 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 우량품종개발을 위해서는 우선 전복류의 육종소재 탐색이 무엇보다 중요하며 동종(同種)에 대한 지역집단의 유전적 차이 및 근연(近緣) 종간의 유연관계를 명확히 파악 할 필요성이 있다.

종간의 명확한 구분 및 유연관계 분석이나 집단간의 유전적 다양성에 의한 유전적 차이 등을 조사하기 위해서는 유전표식을 필요로 한다. 유전표식으로 Isozyme을 비롯하여 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Microsatellite, SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 및 EST (Expressed sequence tags)등이 개발되

어져 있으며 이러한 유전표식은 다양한 분석을 통해 그 응용의 폭이 매우 광범위하게 활용되고 있다. 그러나 분석 대상 종에 따라 각 유전표식이 나타내는 유전적 변이성의 정도 및 응용성은 차이를 나타내고 있기 때문에 분석목적에 따라 적합한 유전표식을 사용할 필요가 있다(Taniguchi and Takagi, 1997).

종간의 유전적 분석에 있어 각 유전표식의 특징 및 유용성을 파악하기 위해서는 형태학적 차이가 명확하며 지리적 분포 영역이 중복되지 않는 종을 대상으로 하여야 한다. 또한 각 유전표식에 따른 유전적 변이성의 차이를 파악하기 위해서는 동일한 개체를 사용하여 분석하여야 한다.

동종(同種) 및 근연종(近緣種)에 대한 유전적 차이 및 유전적 분화정도를 분석하는 유전표식으로는 Isozyme이 있으며, 이것은 환경에 영향을 받지 않는 중립적인 변이를 나타냄으로 많은 생물집단의 유전적 변이성 및 유전적 분화정도 평가를 위한 유전표식으로 이용되어지고 있다. Isozyme 분석은 종내(種內)는 유전자 빈도의 차이, 종간(種間)은 대립유전자 위치의 차이를 이용하여 분석하는 방법으로 그것을 정량하는 척도로 Nei's의 유전적 거리(D)를 사용하고 있다(Nei, 1972).

한편, DNA를 이용한 유전표식에 있어 AFLP분석은 PCR-base DNA 다형성 분석법으로서 적용이 쉽고, 결과가 안정적이

*Corresponding author: chouljikr@yahoo.co.kr

며 다양한 유전자좌를 포함하는 다수의 유전표식을 개발할 수 있는 장점으로부터(Vos et al., 1995) 다양한 작물의 속 및 종간의 유전적 변이 및 유연관계 분석에 많이 이용되어지고 있다(Barrete and Kidwell, 1998; Garcia-Mas et al., 2000). AFLP분석에 의한 유전적 변이성의 정도를 정량하는 척도로는 Sneath and Sokal (1973)의 유전적 유사도(Similarity) 또는 Gilbert (1990)의 유전적 비유사도(Dissimilarity)를 사용하고 있다. AFLP 분석은 식물 계통의 다양 분석을 위해 처음으로 개발되어져 많은 식물의 유전적 변이성을 밝혀 왔으며, 수산생물에 있어서도 어류집단의 유전적 분석에 이용되어지고 있다(Takagi et al., 1998; Miceket et al., 2003; Yue et al., 2004). 그러나 패류 및 전복류에 있어 AFLP분석에 의한 종간의 유전적 분석의 예는 찾아보기 어렵다.

본 연구에서는 종으로 명확히 구분되는 북반구 2종(*Haliotis discus hannai* and *H. rufescens*)과 남반구 2종(*H. rubra* and *H. midae*)을 대상으로 Isozyme 과 AFLP분석에 의한 유전적 차이 및 유연관계를 명확히 파악함과 동시에 각 유전표식의 특징 및 그 유용성을 파악하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 이용한 전복류는 Table 1에 나타낸 5지역의 4종으로 북반구 2종과 남반구 2종이다. 북반구 종으로는 종간분석의 대조구 집단으로 다른 2지역(일본 女川만과 중국 青島연안)에서 채집한 자연산 *H. discus hannai*와 미국 캘리포니아의 자연산을 칠레로 옮겨 양식한(기원은 자연산) *H. rufescens*이다. 남반구 종으로는 호주 남부의 타스마니아 섬 연안에서 채집한 자연산 *H. rubra*와 남아메리카의 케이프타운 연안에서 채집한 자연산 *H. midae*이다. 이 실험재료는 석용으로 수입업자를 통해 수입하여 분석용 시료로 사용하였다.

Isozyme 분석

Isozyme검출용의 시료는 각 개체의 족부근육 부분을 소독한 베스와 가위로 약 0.5 g을 잘라내어 1.5 ml 마이크로튜브에 넣고 잘게 자른 후 30 μ l의 탈 이온수를 넣어 실험에 사용하기 전 까지 -30°C에 냉동 보관하였다. Isozyme 검출은 동결한 시료를 해동하여 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 조효소액으로 이용하여 수평식 전분 겔 전기영동 법에

따라 Isozyme을 분리 하였으며 효소 화학적 염색법에 의하여 밴드를 검출하였다(Fujio, 1984).

분석에 사용한 12효소는 aspartate aminotransferase (AAT; E.C. 2.6.1.1), creatine kinase (CK; E.C. 2.7.3.2), glucose-phosphate isomerase (GPI; E.C. 5.3.1.9), isocitrate dehydrogenase (IDH; E.C. 1.1.1.1.42), lactate dehydrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27), laucine aminopeptidase (LAP; E.C. 3.4.11.1), malate dehydrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.3.7), malic enzyme (ME; E.C. 1.1.1.40), mannosephosphate isomerase (MPI; E.C. 5.3.1.8), phosphoglucomutase (PGM; E.C. 2.7.5.1), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD; E.C. 1.1.1.44), superoxide dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1)이다. 겔 작성 및 전기영동에 사용한 buffer는 T-C buffer (0.135 M Tris-0.043 M Citric acid, pH 7.0)와 C-APM buffer (0.1 M Citric acid -2.4% Aminopropylmorpholine pH 6.0)의 2종류이며, 12효소 중 6PGD는 C-APM buffer를 이용하였으며 그 밖의 효소는 T-C buffer를 이용하였다.

전복류 4종의 대립유전자 추정은 겔에 나타난 밴드의 위치와 변이 패턴으로 판정하였다. 즉 원점으로부터 같은 거리를 이동한 Isozyme 밴드는 동일 유전자에 의해 지배 받는 유전자로 추정하였으며 대립유전자의 표시는 가장 멀리 이동한 밴드부터 A, B, C... 순으로 하였다.

전복류 4종간의 유전적 차이의 정도는 각 개체의 유전자형으로부터 얻어진 대립유전자의 빈도를 계산하여 Nei (1972)의 유전적 거리로 나타냈으며 유연관계 분석은 유전적 거리로부터 Sokal and Sneath (1963)의 수량분류학적 방법의 하나인 UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)을 이용하여 유전적 유연도(dendrogram)로 나타내어 분석하였다.

AFLP 분석

전복류의 DNA는 각 개체로부터 립프액을 뽑아 Sepa Gene KIT (三共純薬)를 이용하여 추출하였다. AFLP분석은 AFLPTM Analysis Systeme I Kit (GIBCO-BRL, USA)를 이용하였으며 사용한 Primer는 Kit에 포함되어져 있는 AFLP Starter Primer Kit의 64개 조합 중 무작위로 16개의 조합(E-AAC/M-CAA, E-AAC/M-CAC, E-AAC/M-CAG, E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CTA, E-AAC/M-CTC, E-AAC/M-CTG, E-AAC/M-CTT, E-ACC/M-CAA, E-ACC/M-CAC, E-ACC/M-CAG, E-ACC/M-CAT, E-ACC/M-CTA, E-ACC/M-CTC, E-ACC/M-CTG, E-ACC/M-CTT)을 선택하여 이용하였다. AFLP분석은 EcoRI/MseI 제한

Table 1. Collection localities and sample sizes of *Haliotis* spp.

Hemisphere	Species	Locality	No. of individuals used analyses
Northern	<i>H. discus hannai</i>	Miyagi Japan	5
	<i>H. discus hannai</i>	Qingdao China	5
	<i>H. rufescens</i>	California America	5
Southern	<i>H. rubra</i>	South Australia	5
	<i>H. midae</i>	South Africa	5

효소 처리(37°C 3시간)에 이어 *EcoRI/MseI* adapter를 부착한 후 선발 PCR반응을 진행하였다. 1차 선발 PCR반응은 총 20 cycles로 94°C 30초, 56°C 1분, 72°C 1분간 실시하였다. 2차 선발 PCR 증폭반응은 TE buffer (pH 8.5)에 40배로 희석된 1차 PCR 산물 5 μl 을 사용하였으며 PCR 조건은 touch down PCR 10 cycles; 94°C 60초, $65^{\circ}\text{C} \rightarrow 56^{\circ}\text{C}$ ($= -1^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$) 60초, 72°C 90초, normal PCR 23 cycles; 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 60초, final extension을 72°C 5분간 실시하였다. 증폭된 DNA는 SHIMADZU사의 DSQ-2000L DNA SEQUENCER를 이용하여 1000V, 3시간 전기영동을 하여 확인하였다.

전복류 4종간의 유전적 차이는 2개체 간에 검출된 총 증폭 단편 중 공유하지 않는 증폭단편의 비율로 나타내는 비유사도 지수(Dissimilarity index=D)를 이용하였다(Gilbert et al., 1990). 비유사도는 다음 식에 의하여 구하였다. 비유사도(D)= $N_{ab}/(N_a+N_b)$, N_{ab} =개체 a와 개체 b의 공유하지 않는 단편 수, N_a+N_b =개체 a와 개체 b에 나타난 총 단편 수의 합.

유전적 비유사도의 계산치리는 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 수치화하여 신출하였으며, 유전적 유연관계는 이 값을 근거로 UPGMA법을 이용하여 유전적 유연도로 나타내어 분석하였다.

결 과

Isozyme 분석

조사한 12호소 중 전복류 4종간의 비교가 용이하며 선명하고 안정적인 효소 활성을 나타낸 것은 GPI, IDH, LDH, MDH, 6PGD, PGM, SOD의 7호소로 *GPI**, *IDH-1**, *IDH-2**, *LDH-1**, *LDH-2**, *MDH-1**, *MDH-2**, 6PGD*, PGM-1* 및 SOD* 10유전자좌가 추정되었다(Fig. 1). 그 밖의 5호소 AAT, CK, LAP, ME, MPI는 효소활성이 약하거나 활성이 나타나지 않는 개체가 검출되어 종간 분석에는 부적합하여 분석 대상에서 제외시켰다.

*GPI*는 1개의 유전자좌 *GPI**가 추정되었으며, 일본산 *H. discus hannai*는 유전자형 CC형과 BC형, 중국산은 CC형과 CE형, *H. rufescens*는 CC형과 AC형이 추정되었다. 한편, *H. rubra*는 DF형과 FF형, *H. midae*는 DD형과 EE형이 각각 추정되었다.

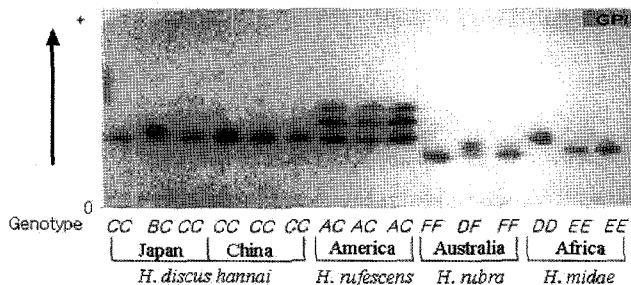


Fig. 1. An example of band patterns of the *GPI* electrophoretic for the four abalone species.

*IDH*는 2개의 유전자좌 *IDH-1**과 *IDH-2**가 추정되었으며, 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*는 2개 유전자좌 모두 유전자형 BB형, *H. rufescens*의 *IDH-1**은 CC형과 BC형, *IDH-2**는 BB형만이 각각 추정되었다. 한편, *H. rubra*의 *IDH-1**은 AC형, CC형, BB형이 추정되었으며, *IDH-2**는 AA형만이 추정되었다. *H. midae*에 있어서는 2개의 유전자좌 모두 CC형만이 추정되었다.

*LDH*는 2개의 유전자좌 *LDH-1**과 *LDH-2**가 추정되었으며, 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*와 *H. rufescens*는 2개의 유전자좌 모두 유전자형 BB형만이 추정되었으며, *H. rubra*는 CC형, *H. midae*는 AA형만이 각각 추정되었다.

*MDH*는 2개의 유전자좌 *MDH-1**과 *MDH-2**가 추정되었으며, 일본산 *H. discus hannai*의 *MDH-1**은 AB형과 BB형, 중국산은 BB형만이, *MDH-2**는 일본산 및 중국산 모두 유전자형 AA형만이 추정되었다. 한편, *H. rufescens*는 *MDH-1**과 *MDH-2**의 유전자좌 모두 CC형만이 추정되었으며, *H. rubra*는 DD형과 BB형, *H. midae*는 *MDH-1**에서 CC형, *MDH-2**는 DD형만이 추정되었다.

6PGD는 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*에서 AA형, AC형, CC형이 추정되었으며 *H. rufescens*는 CC형만이 추정되었다. *H. rubra*는 *H. discus hannai*와 같은 위치의 CC형만이, *H. midae*는 BB형과 BC형이 각각 추정되었다.

PGM는 2개의 유전자좌 *PGM-1**과 *PGM-2**가 추정되었으나 *PGM-2**는 효소활성이 약하거나 활성을 나타내지 않는 개체가 존재하여 분석에서 제외하였다. *PGM-1**는 일본산 *H. discus hannai*에서 AB형, AC형, BC형, CE형이 추정되었으며, 중국산에서는 AA형, AB형, BC형, CC형이 추정되었다. *H. rufescens*는 *H. discus hannai*와 같은 CC형을 나타내는 개체와 *H. discus hannai*에는 나타나지 않은 CD형과 DD형이 추정되었다. *H. rubra*는 EF형과 FF형, *H. midae*는 FF형, GG형, GH형이 추정되었다.

SOD는 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*에 유전자형 AA형이 추정되었으며 *H. rufescens*는 BB형, *H. rubra*는 CC형, *H. midae*는 DD형만이 각각 추정되었다.

위의 결과에서 추정된 각 유전자좌의 대립유전자 빈도를 Table 2에 나타내었으며, 4종의 전복류의 유전적 차이의 정도를 알기 위하여 유전자 빈도를 기초로 Nei's의 유전적 거리와 공통의 대립유전자를 가지지 않는 완전 분기 유전자좌(complete divergent locus)의 수를 Table 3에 나타내었다.

그 결과 같은 종인 일본산과 중국산의 *H. discus hannai*간에는 분기 유전자좌는 없었으며, 유전적 거리는 0.015로 나타났다. 그리고 같은 북반구에 서식하고 있는 *H. rufescens*간에는 4개의 유전자좌가 분기하여 유전적 거리는 일본산과 중국산 각각 0.734와 0.736으로 나타났다. 또한 *H. discus hannai*와 남반구에 서식하는 *H. rubra*간에는 분기 유전자좌수 7개와 8개로 유전적 거리 2.853과 2.414, *H. midae*간에는 9개와 8개의 분기

Table 2. Allele frequencies at the 10 isozyme loci in four abalone species

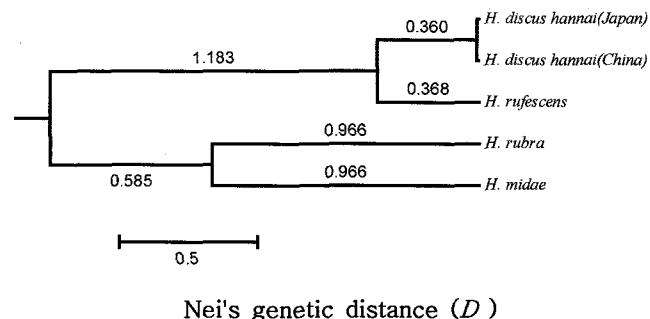
Locus	Allele	<i>H. discus hannai</i> Japan	<i>H. discus hannai</i> China	<i>H. rufescens</i> America	<i>H. rubra</i> Australia	<i>H. midae</i> Africa
<i>GPI*</i>	*A	-	-	0.40	-	-
	*B	0.10	-	-	-	-
	*C	0.90	0.90	0.60	-	-
	*D	-	-	-	0.10	0.30
	*E	-	0.10	-	-	0.70
	*F	-	-	-	0.90	-
<i>IDH-1*</i>	*A	-	-	-	0.10	-
	*B	1.00	1.00	0.40	0.20	-
	*C	-	-	0.60	0.70	1.00
<i>IDH-2*</i>	*A	-	-	-	1.00	-
	*B	1.00	1.00	1.00	-	-
	*C	-	-	-	-	1.00
<i>LDH-1*</i>	*A	-	-	-	-	1.00
	*B	1.00	1.00	1.00	-	-
	*C	-	-	-	1.00	-
<i>LDH-2*</i>	*A	-	-	-	-	1.00
	*B	1.00	1.00	1.00	-	-
	*C	-	-	-	1.00	-
<i>MDH-1*</i>	*A	0.10	-	-	-	-
	*B	0.90	1.00	-	-	-
	*C	-	-	1.00	-	1.00
	*D	-	-	-	1.00	-
<i>MDH-2*</i>	*A	1.00	1.00	-	-	-
	*B	-	-	-	1.00	-
	*C	-	-	1.00	-	-
	*D	-	-	-	-	1.00
<i>6PGD*</i>	*A	0.70	0.40	-	-	-
	*B	-	-	-	-	0.80
	*C	0.30	0.60	1.00	1.00	0.20
<i>PGM-1*</i>	*A	0.20	0.30	-	-	-
	*B	0.30	0.20	-	-	-
	*C	0.40	0.50	0.40	-	-
	*D	-	-	0.60	-	-
	*E	0.10	-	-	0.10	-
	*F	-	-	-	0.90	0.40
	*G	-	-	-	-	0.40
	*H	-	-	-	-	0.20
<i>SOD*</i>	*A	1.00	1.00	-	-	-
	*B	-	-	1.00	-	-
	*C	-	-	-	1.00	-
	*D	-	-	-	-	1.00

유전자좌가 나타나 유전적 거리 4.962와 3.821로 가장 높은 수치를 나타내었다. 한편, 남반구의 *H. rubra*와 *H. midae*간에는 10개 유전자좌 중 6개의 유전자좌가 분기하여 유전적 거리 1.931로 비교적 낮은 수치를 나타내었으며 *H. rubra*와 *H. rufescens*간에는 9개의 분기 유전자좌로 유전적 거리 2.875, *H. midae*와 *H. rufescens*간에는 8개의 유전자좌가 분기하여 유전적 거리 1.681을 나타내었다.

전복류 4종간의 유전적 유연관계를 알아보기 위해서 유전적 거리로 작성한 유연도를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 *H. discus hannai*의 일본산과 중국산이 가장 가까운 근연관계를 나타내었으며 다음으로 *H. discus hannai*와 같은 북반구에 서식하는 *H. rufescens*간이 근연관계를 나타내었다. 다음으로는 남반구에 서식하고 있는 *H. rubra*와 *H. midae*가 가까운 근연관계를 나타내었으며 이것은 북반구 종과는 독립된 그룹을 형성하였다.

Table 3. Nei's genetic distance (below diagonal) and number of complete divergent locus (above diagonal) of four abalone species

	<i>H. discus hannai</i> Japan	<i>H. discus hannai</i> China	<i>H. rufescens</i> America	<i>H. rubra</i> Australia	<i>H. midae</i> Africa
<i>H. discus hannai</i>	-	0	4	7	9
<i>H. discus hannai</i>	0.015	-	4	8	8
<i>H. rufescens</i>	0.734	0.736	-	9	8
<i>H. rubra</i>	2.853	2.414	2.875	-	6
<i>H. midae</i>	4.962	3.821	1.681	1.931	-

**Fig. 2.** Genetic relationship among four abalone species based on Nei's genetic distance calculated from allele frequencies at 10 isozyme loci.

AFLP 분석

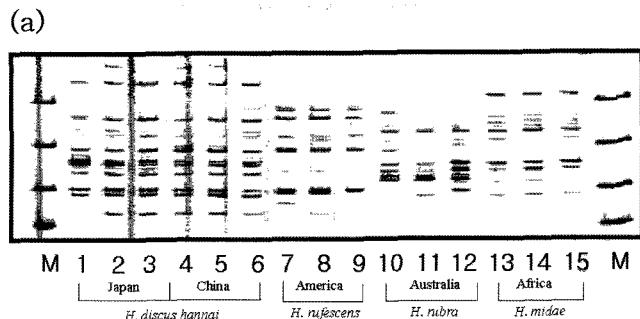
전복류의 종간분석에 적합한 primer를 선별하기 위하여 AFLP Starter Primer Kit의 64개 조합 중 16개의 조합을 선택하여 Primer 선별실험을 한 결과 E-AAC/M-CAA, E-ACC/M-CTG, E-ACC/M-CTT의 3개 primer조합에서 있어 개체간의 비교가 용이하며 선명하고 안정적인 증폭단편이 검출되었다(Fig. 3). 그러나 나머지 13개 Primer 조합에서는 single band로 monomorphism을 나타내거나 뱀드의 선명도가 낮고 전복류 4종에 있어 증폭을 나타내지 않는 개체가 검출되어 종간분석에는 적합하지 않아 분석대상에서 제외하였다.

3개의 primer 조합에 의한 증폭단편은 모두 100 bp-500 bp 사이에서 검출 되었다.

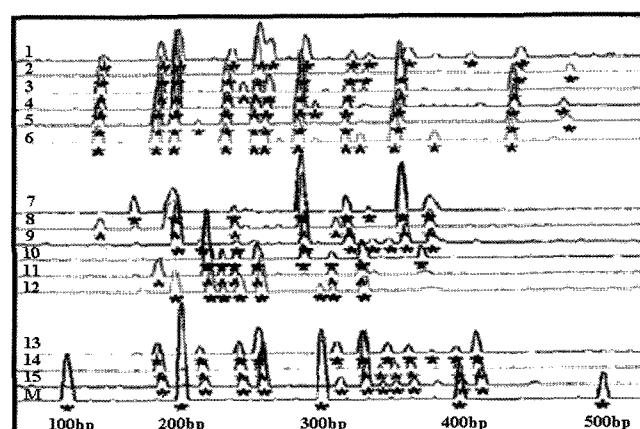
Primer E-AAC/M-CAA의 조합에 있어 검출된 증폭단편수는 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*가 각각 14개와 11개, *H. rufescens* 14개, *H. rubra* 6개, *H. midae* 11개이며 전복류 4종에 있어 검출된 전체 증폭단편 수는 25개였다. 이중에서 종 특이성을 가지는 증폭단편 수는 11개로 *H. discus hannai* 3개, *H. rufescens* 4개, *H. rubra*와 *H. midae* 각각 2개씩 검출되었다.

Primer E-ACC/M-CTG의 조합에 있어 검출된 증폭단편수는 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*가 16개와 14개, *H. rufescens* 12개, *H. rubra* 16개, *H. midae* 13개이며 전복류 4종에 있어 총 증폭단편 수는 33개가 검출되었다. 이중에서 종 특이성을 가지는 증폭단편은 *H. discus hannai* 5개, *H. rufescens* 3개, *H. rubra* 4개, *H. midae* 2개가 각각 검출되었다.

Primer E-ACC/M-CTT의 조합에 있어 검출된 증폭단편수는 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*가 14개와 15개, *H. rufescens* 14개, *H. rubra* 11개, *H. midae* 13개이며 전복류 4종에 있어



(b)

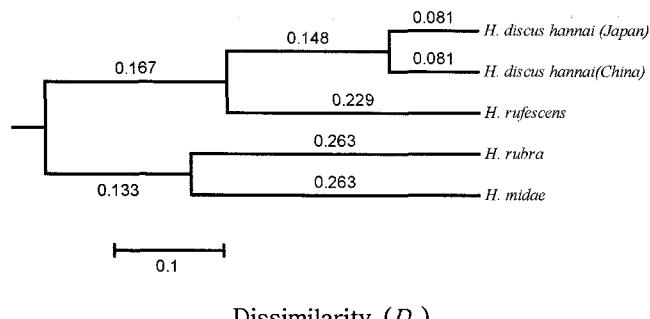
**Fig. 3.** An example of AFLP band patterns for the four abalone species produced from E-ACC/M-CTT primer pair. (a) Image of electrophoretic pattern by the AFLP analysis. (b) Fragment scoring by computer analysis of DSQ-2000L DNA SEQUENCER. Lanes M contain the molecular size standard.

총 증폭단편 수는 29개가 검출되었다. 이중에서 종 특이성을 가지는 증폭단편은 *H. discus hannai* 5개, *H. rufescens* 4개, *H. midae* 1개가 검출되었다.

전복류 종간의 유전적 차이를 알아보기 위하여 3개의 primer 조합에 의한 종간의 비공유 단편수와 평균 비유사도를 구하여 Table 4에 나타내었다. 그 결과 북반구의 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*와 *H. rufescens*간의 비공유단편수는 38개와 34개로 평균 비유사도 0.476과 0.441로 가장 낮은 수치를 나타내었으며, 다음으로 남반구의 *H. rubra*와 *H. midae*가 비공유단편수 26개로 평균 비유사도 0.526을 나타내었다. 일본산 및 중국산 *H. discus hannai*와 남반구 *H. rubra*간에는 비공유단편수 53개와 50개로 각각 0.773과 0.763를 나타내었으며, *H. midae*간에

Table 4. Values of dissimilarity (below diagonal) and number of not sharing fragment (above diagonal) of four abalone species

	<i>H. discus hannai</i> Japan	<i>H. discus hannai</i> China	<i>H. rufescens</i> America	<i>H. rubra</i> Australia	<i>H. midae</i> Africa
<i>H. discus hannai</i>	-	13	38	53	53
<i>H. discus hannai</i>	0.162	-	34	50	55
<i>H. rufescens</i>	0.476	0.441	-	57	57
<i>H. rubra</i>	0.773	0.763	0.864	-	26
<i>H. midae</i>	0.725	0.760	0.864	0.526	-

**Fig. 4.** Genetic relationship among four abalone species based on dissimilarity indices through three AFLP primer combinations.

는 53개와 55개로 0.725와 0.760의 평균 비유사도를 나타내었다. 마지막으로 *H. rufescens*와 남반구 *H. rubra*와 *H. midae*간에는 양쪽 모두 57개의 비공유 단편으로 0.864의 가장 높은 평균 비유사도를 나타내었다.

전복류의 종간의 유전적 유연관계를 알아보기 위하여 평균 비유사도 수치를 이용하여 비가중산술방식(UPGMA)에 의한 유전적 유연도를 작성하였다(Fig. 4). 그 결과 같은 종인 일본산 및 중국산의 *H. discus hannai*가 가장 가깝게 나타났으며, 다음으로 같은 북반구에 서식하는 *H. rufescens*가 가까운 근연관계를 나타내었다. 그 다음으로 남반구에 서식하는 *H. rubra*와 *H. midae*가 근연관계로 독립된 그룹을 형성하였다.

고 찰

종(種)은 생물분류의 기본 단위로서 종의 차이는 형태적으로 불연속하며, 상호간에 생식적으로 격리되어 지리적 분포권이 다른 군(群)을 의미한다. 또한, 유전적으로 보면 종은 생식적으로 격리되어진 변식 집단군으로 정의되어져 있다. 이러한 정의로부터 종이란 상호간에 생식 격리되어져 각각의 종에는 다른 종과는 불연속적으로 다른 유전적 조성을 보유하고 있는 유전적으로 독립된 군 또는 집단이라 생각되어진다. 또한, 유연관계라는 것은 생물의 분류군이 계통발생상 어느 정도 근연(近緣)인가를 나타내는 관계를 말한다.

전복류의 종 분화는 형태적 및 생물지리학적 관점으로부터 보면 열대지역에 있어 한정된 범위에서의 적응방산과 온대지역의 광범위한 적응방산에 의하여 나타난다(Lindberg, 1992). 이러한 이론을 적용하여 생각하여 보면 본 연구에서 조사한 전복

류는 온대지역에서 서식하여 광범위한 적응방산을 한 종으로 지리적으로 가까운 종이 근연관계로 나타나며, 북반구 종과 남반구 종이 구분 되어질 것이다. 따라서 형태학적 및 지리학적 분포로부터 4종간의 유연관계는 북반구 2종이 하나의 그룹을 형성하고 남반구 2종이 또 다른 하나의 독립된 그룹을 형성하여 그 그룹들이 연결되어지는 유연관계가 추정된다.

Isozyme 유전표식의 특징

Isozyme 분석은 DNA를 이용한 다른 유전표식보다 다소 낮은 변이성을 나타내지만 집단분석 및 종간의 분석에 많이 사용되어지고 있다. Isozyme란 효소의 다분자형(아미노산배열의 차이)을 분리한 유전자의 차이를 파악하는 방법으로 효소를 지배하는 구조유전자의 영역을 말한다. 또한 Isozyme 분석의 경우, 이론 집단 유전학적 연구에 의하여 유전적분화의 정도를 Nei (1972)의 유전적 거리에 의하여 나타낼 수 있으며 유전적분화의 정도를 진화년도와의 관계로 추정할 수 있는 특징을 가지고 있다. Nei (1975)은 많은 동물분류군의 유전적 거리를 조사하여, 종간에는 1.0, 아종간 0.1, 지방품종 0.01의 레벨을 나타내고 있다고 보고하고 있으며, Ayala (1982)는 종으로 인식할 수 있는 집단간의 유전적 거리는 0.2 이상으로 보고 하고 있다. 또한 Oniwa and Kijima (1989)는 해산류를 분석하여 종간의 유전적 거리의 평균은 0.8이라고 보고하고 있다.

이러한 유전적 거리는 일반적으로 많은 유전자좌에 의하여 구하지 않으면 유전적 분화의 정도를 정확히 파악하기가 어렵다. Park and Kijima (1991)는 종간의 유전적 거리는 분기 유전자좌의 수에 의존하여 변화하기 때문에 5개체 정도의 작은 샘플수로도 10 유전자좌 정도를 표식으로 이용하였을 경우 큰 차이는 나타나지 않는다는 것을 실험적으로 나타내고 있다. 본 연구에서 얻어진 전복류의 유전적 거리는 10 유전자좌를 이용하였으며 얻어진 종간의 유전적 거리는 의미를 가지는 수치라고 생각 된다. Brown (1993)는 12유전자좌를 이용하여 분석한 결과 *H. discus hannai*와 *H. rufescens*간에는 4개의 유전자좌가 분기를 나타내어 유전적 거리 0.634, *H. rubra*와 *H. midae*간에는 8개의 유전자좌가 분기를 나타내어 유전적 거리 1.265로 보고하고 있다. 이 결과와 본 연구 결과를 비교하여 보면 *H. discus hannai*와 *H. rufescens*간에는 4개 유전자좌의 분기를 나타내어 유전적 거리 0.734, *H. rubra*와 *H. midae*간에는 6개 유전자좌가 분기를 나타내어 유전적 거리 1.931로 유사한 유전적 거리를 나타내고 있다. 또한 유연관계 분석결과에 있어서는 북반구

2종과 남반구 2종이 명확히 구분되어 형태학적 및 지리학적 분포로부터 추정되어지는 4종간의 유연관계와 일치하였다. 따라서 Isozyme 분석은 전복류의 종간분석에 있어 5개체의 적은 개체수를 이용하여도 종간의 유전적 차이 및 유연관계 분석에 있어서 유용한 유전표식임을 시사하였다.

AFLP 유전표식의 특징

AFLP분석은 게놈 DNA를 제한효소로 절단하여 단편의 양쪽에 Primer와 상보적인 adapter배열을 접합하여 임의의 염기배열을 추가한 Primer를 이용하여 DNA를 증폭시켜 그 증폭단편의 길이의 다형을 검출하는 방법이다(Lin and Kuo, 1995). 이 방법은 식물의 게놈의 다형분석을 위하여 개발되어졌으며 RFLP 분석의 신뢰성 및 PCR의 간편성을 조합한 기술이라 생각된다. 그러나 AFLP 분석은 검출된 증폭단편의 유전지배를 직접 추정할 수 없기 때문에 Isozyme분석과 같이 대립유전자 빈도를 통하여 유전적 변이성 및 유전적 거리를 구하기는 어렵다. 따라서 개체 간에 검출된 밴드의 Dissimilarity(Gilbert et al., 1990)를 이용하여 종간 및 집단간의 유전적 차이를 정량하는 방법을 이용하고 있다.

AFLP분석에 대한 전복류 종간의 유전적 차이는 Isozyme의 완전 분기 유전자좌수에 상응하는 비공유 증폭단편수와 종 특유의 증폭밴드에 의하여 결정되어진다. 본 연구 결과의 전복류 4종간 비공유 증폭단편수는 Primer E-AAC/M-CAA조합에서 최소 9개에서 최대 15개로 평균 12.8개의 비공유 증폭단편이 검출되었으며 Primer E-ACC/M-CTG 조합에서는 평균 18.8개, Primer E-ACC/M-CTT 조합에서는 평균 15.6개가 검출되어 3개의 Primer를 이용하였을 경우 평균 47.2개로 증폭단편 전체(87개)의 50%이상의 증폭단편이 종간의 유전적 차이를 나타내고 있다. 또한 종 특유의 증폭단편 검출 비율은 Primer E-AAC/M-CAA에서는 44.0%, Primer E-ACC/M-CTG에서는 42.4%, Primer E-ACC/M-CTT에서는 34.5%를 나타내어 평균 40.3%로 전체(87개)의 40% (34.8개)의 증폭단편이 종 특이성을 나타내고 있었다.

이러한 결과는 AFLP 분석은 전복류 종식별에 있어 유용한 유전표식임을 시사하고 있다. 또한 종간의 유연관계 분석에 있어서도 북반구 2종과 남반구 2종으로 명확히 구분되어 형태학적 및 지리학적 분포로부터 추정되어지는 4종간의 유연관계와 일치하였으며 그 분화 정도의 크기는 Isozyme 분석의 결과와도 유사하였다. 따라서 AFLP 분석은 전복류 종간의 유전적 차이 및 유연관계 분석에 있어서 유용한 유전표식임을 시사하였다.

요 약

Isozyme과 AFLP분석에 있어 종간의 유전적 차이 및 유연관계를 분석에 따른 각 유전표식의 특징 및 유용성을 파악하기 위하여 종으로 명확히 구분되는 북반구 2종(*H. discus hannai*

와 *H. rufescens*)과 남반구 2종(*H. rubra*와 *H. midae*)을 대상으로 분석한 결과 Isozyme 및 AFLP분석은 전복류의 종간분석에 있어 유전적 차이 및 유연관계 분석에 유용한 유전표식임을 시사하였다.

참고문헌

- Ayala, F. J., 1982. Population and Evolutionary Genetics: A Primer, pp. 190–197.
- Barrett, B. A. and K. K. Kidwell, 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop Sci., 38, 1261–1271.
- Brown, L. D., 1993. Biochemical Genetics and Species Relationships within the Genus *Haliothis* (Gastropoda: Haliotidae). J. Moll. Stud., 59, 429–443.
- Fujio, Y., 1984. Study on genetic characteristics of fish and shellfishes in isozyme analysis. Nosuisho Tokubetsu Shiken, pp. 15–25.
- Garcia-Mas, J., M. Oliver, H. Gomez-Paniagua and M. C. de Vicente, 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. Theor. Appl. Genet., 101, 860–864.
- Gilbert, D. A., N. Lehman, S. J. O'Brien and R. K. Wayne, 1990. Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. Nature, 344, 764–767.
- Lin, J. J. and J. Kuo, 1995. AFLPTM: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. Focus, 17, 66–70.
- Lindberg, D. R., 1992. Evolution distribution and systematics of Haliotidae. (in) Abalon of the World: Biology, Fisheries and Culture (ed.), S. A. Shepherd, M. Tenger & S. Guzman, Blackwells, London, pp. 3–18.
- Mickeet, K., C. Morton, J. Feng, P. Li, M. Simmons, D. Cao, R. A. Dunham and Z. Liu, 2003. Assessing genetic diversity of domestic population of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. Aquaculture, 228, 91–105.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between population. Amer. Natur., 106, 283–292.
- Nei, M., 1975. Molecular population genetic and evolution North-Holland, Amsterdam and New York, 288 pp.
- Oniwa, K. and A. Kijima, 1989. Genetic distance between species in marine bivalves. Fish Genet. Breed. Sci., 14, 27–32.
- Park, J. Y. and A. Kijima, 1991. Estimation of Interspecific Gene Differences among *Pleuronectid* species with a Minimum Number of Isozyme Loci. Tohoku J. Agr. Res., 42, 34–53.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal, 1973. The principles and practice of numerical classification. Numerical taxonomy, pp. 1–15.
- Sokal, R. R. and P. H. A. Sneath, 1963. Principles of numerical taxonomy. 1st ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA, 312 pp.
- Takagi, M., G. Sogabe and N. Taniguchi, 1998. Genetic Variability and Divergence of Ayu *Plecoglossus altivelis* Using AFLP Fingerprinting. Fish Genet. Breed. Sci., 26, 55–61.
- Taniguchi, N. and K. Takagi, 1997. DNA Polymorphisms and Diversity analysis of Fish population. (in) DNA of Fish, pp.

- 117-137.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van der Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kupier and M. Zabeau, 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23, 4407-4414.
- Yue, G H., Y. Li, L. C. Lim and L. Orban, 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. Aquaculture, 237, 89-102.

원고접수 : 2005년 6월 15일
수정본 수리 : 2005년 10월 7일