Korean J. Malacol. 25(3): 197-201, 2009

독도연안에 서식하는 전복의 유전학적 특성

박철지, 이정호, 노재구, 김현철, 민병화, 명정인

국립수산과학원 육종연구센터

Genetic characteristics of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* in Dokdo Island, Korea

Choul-Ji Park, Jeong-Ho Lee, Jae Koo Noh, Hyun Chul Kim, Byoung Hwa Min and Jeong-In Myeong

Genetics and Breeding Research Center, NFRDI, Gyeongsangnam-do 656-842, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the genetic characteristics of wild population of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* in Dokdo island. We used six polymorphic microsatellite marker to investigate the genetic diversity and population structure. The loci *Hdh1321* and *Hdh512* had the highest number of allele (34 and 22 respectively) and loci *Hdh145* and *Awb083* had the lowest (5 and 7 respectively). The mean number of allele per locus was 14.8. The average observed and expected heterozygosities were 0.664 and 0.824 respectively, and the average F_{IS} was 0.195. We compared the population genetic parameters of Dokdo population with previously published data of the same species. At the result, the parewise F_{ST} test showed significant difference between the Dokdo population and six populations (published data), suggesting that the genetic relationship of Dokdo population was separated from six populations.

Key words: Dokdo, abalone, genetic diversity, relationship

서 론

우리나라의 최동단에 위치하고 있는 독도는 대마난류의 영향을 받고 있으며 이 대마난류는 독도 근처에서 북한한류와 교차하게 되어, 이 해역은 동·식물 플랑크톤이 다양하여 상업적 가치가 높은 수산자원이 다량 분포하고 있는 지역이다 (해양수산부, 2000). 이 지역의 주요 어종으로는 오징어, 명태, 대구, 상어, 송어 등이 있으며, 해양무척추동물은 산호의 강장동물 1과 1종, 전복, 밤고동, 소라등의 연체동물 9과 19종, 바위게, 부채게 등 절지동물 11과 17종, 불가사리, 성게 등 극피동물 5과 5종 등 모두 26과 42종이 조사 보고된 바 있다 (김과 최, 1981). 이 지역은 독특한 인위적 교란이 일어나지 않은 외해역에 위치하고 있는 지정학적 영향으로 암반생물군집의 경우 대황 (*Eisemia bicyclis*), 감태 (*Ecklonia cava*) 등 대형 갈조류가 우점하는 안정된 생태계를 나타내고 있어 전복 및 소라와 같은 고부가가치의 수산자원생물이 서식하기 좋은 환경으로 알려져 있다 (Kang *et al*., 2001). 또한 이 지역에는 자연산뿐만 아니라 수산자원조성을 위하여 1993년부터 최근까지 전복 인공종묘를 대량방류하고 있다. 그러나 이러한 전복 인공종묘의 방류는 그 지역에 오랫동안 서식하고 있는 자연집단의 지역특성적인 유전적 구조에 큰 영향을 미칠 수 있다. 따라서 독도지역에 서식하는 전복의 자연집단 및 방류되어지는 인공종묘에 대한 유전적 다양성 및 집단구조 등의 분석은 이 지역의 수산자원조성 및 관리에 있어 매우 중요하다.

유전적 다양성 및 집단 구조 등을 조사하기 위해서는 분석에 적합한 유전 표식을 필요로 한다. 유전표식으로는 Isozyme을 비롯하여 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Microsatellite, SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 및 EST (Expressed Sequence Tags) 등이 개발되어져 있다. 이러한 다수의 유전표식 중 Microsatellite DNA는 높은 변이를 나타내는 유전표식으로서 유전자지도, 개체식별 및 친자확인, 집단유전학 등

Received Nov 2, 2009; Accepted Nov 30, 2009
Corresponding author: Choul Ji Park
Tel: +82 (55) 633-1272 e-mail: choulji@nfrdi.go.kr
1225-3480/24324

의 많은 연구에 유용하게 활용 되어 지고 있다.

Microsatellite DNA 유전표식은 전복류에 있어 *Haliotis discus hannai* (Li *et al*., 2002, Sekino *et al*., 2005, 2006; Hara and Sekino, 2005; Sekino and Hara, 2007; Sun *et al*., 2007), *H. kamtschatkana* (Miller *et al*., 2001), *H. rubra* (Huang and Hanna, 1998; Evans *et al*., 2000), *H. asinina* (Selvamani *et al*., 2000), *H. diversicolor* (Ren *et al*., 2008) 등과 같이 세계적 주요 양식 종을 대상으로 개발되어 많은 유전학적 연구에 유용하게 활용되어지고 있다.

본 연구는 Microsatellite DNA 유전표식을 이용하여 독도 지역에 서식하고 있는 자연산 전복집단의 유전적 다양성 및 집단 구조를 파악하여 이 지역의 자원관리 및 조성을 위한 기초자료를 제공하고자 한다. 또한 독도지역에 서식하고 있는 전복의 유전학적 특성을 규명하는 첫 연구 결과라는 점에서 큰 의의가 있다.

재료 및 방법

1. 분석 시료 및 Genomic DNA 추출

본 실험에 사용한 전복 시료는 2006년 6월 울릉도 어촌계 해녀들이 채취한 평균 각장 118.53mm의 자연산 전복 60마이다. gDNA는 전복 외투막의 조직 일부를 절제하여 킬레이팅 수지법 (chelating resin method; Walsh *et al*., 1991; Suenaga and Nakamura, 2005) 을 이용하여 추출하였다. PCR 증폭반응은 얻어진 DNA 시료, 10× 반응완충용액, 10 mM dNTP, *f-Taq* DNA polymerase (Solgent), 그리고 Table 1에 나타낸 6개의 Microsatellite 유전표식을 이용하여 수행하였다.

2. 유전자형 분석

PCR 의해 증폭된 Microsatellite DNA 단편은 size standard로 GeneScan 400HD ROX (ABI, USA), HiDi formamide와 혼합한 후 유전자형 분석기 (3100 genetic analyzer; ABI, USA) 를 통하여 분석을 하였으며 분석 후에 나타난 피크 정보를 GeneMapper v3.7 software를 이용하여 유전자형을 분석하였다.

3. 통계학적 분석

독도 집단의 유전적 다양성 분석을 위하여 대립유전자 빈도 (allele frequencies), 유전자좌당 대립유전자수 (allele number per locus), 관찰치 이형접합률 (observed heterozygosities, *Ho*), 기대치 이형접합률 (expected heterozygosities, *He*), 다형성정보지수 (Polymorphism Information Content, PIC) 는 Cervus 2.0 (Marshall *et al*., 1999) 프로그램을 이용하여 구하였으며, GENEPOP version 3.4 software (Raymond and Rousset 1995) 를 사용하여 Markov-chain method에 의한 Fisher's exact test를 하여 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 에 일치하는지의 유의성 검정을 하였다. 그리고 FSTAT version 2.9.3.2 software (Goudet, 1995) 를 이용하여 집단내의 근친도를 나타내는 F_{IS} (inbreeding coefficient) 값을 구한 후 유의성 검정을 하였다.

독도집단의 유전적 다양성의 정도는 동일한 방법으로 분석되어진 우리나라의 동·서·남해 6개 지역집단 (Jeong *et al*., 2008) 과 비교분석을 통하여 파악하였다. 이들 집단간의 유전적 차이를 나타내는 F_{ST} 값은 FSTAT software를 이용하여 구하였다. 또한 각 지역의 전복집단과의 유전적 유연관계를 조

Table 1. Primer sequences for microsatellite loci used in this study

Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat type	GenBank accession No.	Reference
Awb017	F:ACATGTCGTGATTGTTTCCCAC R:TCCTGACCACATACTGTTCACATTAG	$(CA)_{16}$	AB177912	Sekino *et al*., 2005
Awb083	F:GCTTAGAAGGGACATAACTCGCAATA R:AATAGACATTCTACAAGCGAGGAAA	$(ATC)_{8}$	AB177936	Sekino *et al*., 2005
Awb098	F:ACATGGAACTGCGAGTCCTAGAAGC R:TGATTATTTTCAGATCGCCGTCATA	$(AC)_{13}$	AB177939	Sekino *et al*., 2005
Hdh1321	F:TTCTGAGATGAGACGCACCAC R:TTGGCAGCAGGCGTCGTGT	$(CGCA)_4(CA)_{18}$	AB084076	Li *et al*., 2002
Hdh145	F:TAGTTGTTGAACCTTTCTGTTG R:TAGACAAACAGAAAACTTCACC	$(CA)_8(CATA)_3$	AB091480	Park *et al*., 2003
Hdh512	F:CCGAGATGTTTACAGAGAGA R:CACACTCGATTTCTCACTCA	$(GA)_{23}$	AB091482	Park *et al*., 2003

Table 2. Genetic variability of six microsatellite loci in Dokdo population

Locus	A	*Ho*	*He*	PIC	F_{IS}
Awb017	11	0.833	0.826	0.799	-0.009
Awb083	7	0.733	0.699	0.640	-0.050
Awb098	10	0.717	0.771	0.742	0.071
Hdh1321	34	0.950	0.966	0.956	0.017
Hdh145	5	0.267	0.749*	0.703	0.646**
Hdh512	22	0.483	0.931*	0.919	0.483**
Mean	14.8	0.664	0.824	0.793	0.195**

A, number of allele at each locus; *Ho*, observed heterozygosity; *He*, expected heterozygosity; PIC, Polymorphism Information Content; F_{IS}, inbreeding coefficient.
* Statistically significant deviation from Hardy Weinberg equilibrium (P <0.05).
** Significant level at P<0.05.

사하기 위하여 MSA (Microsatellite Analyser; Dieringer and Schlötterer, 2002)을 이용하여 Nei's chord distance (1983) 값을 구하였으며 이를 근거로 하여 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) 방법으로 계통수를 만들어 집단간의 유연관계를 나타내었다.

결과 및 고찰

1. 유전적 다양성

독도 지역에서 수집한 전복 60마리에 대한 유전적 다양성 분석의 결과를 Table 2 에 나타내었다. 각 유전자좌에 따른 대립유전자수 (A) 의 범위는 5-34개로 *Hdh145*에서 5개 *Hdh1321*에서 34개로 평균 대립유전자수는 14.8개였다. 관찰치 이형접합률 (*Ho*) 의 경우 *Hdh145*가 0.267로 가장 낮은 값을 나타낸 반면 *Hdh1321*은 0.950으로 가장 높은 값을 나타내어 평균 관찰치 이형접합률 (*Ho*) 은 0.644로 나타났다. 한편 기대치 이형접합률 (*He*) 의 경우에는 *Awb083*이 0.699로 가장 낮은 값을 나타내었으며 *Hdh1321*이 0.966으로 가장 높은 값을 나타내어 평균 기대치 이형접합률 (*He*) 은 0.824로 관찰치 이형접합률 (*Ho*) 보다 높게 나타났다. 이러한 값을 토대로 Markov-chain method에 의한 Fisher's exact test를 하여 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 에 일치하는지의 유의성 검정을 한 결과 *Hdh145* 및 *Hdh512*의 2개의 유전자좌에 있어 유의적으로 벗어난 결과를 나타내었다 (P < 0.05). 다형성정보지수 (PIC) 의 경우에는 *Awb083*이 0.640으로 가장 낮은 값을 나타낸 반면, *Hdh1321*은 0.956으로 가장 높은 값을 나타내어 평균 0.793으로 나타났다. 그리고 집단내의 근친도를 파악하기 위하여 근교계수 (F_{IS}) 를 분석한 결과 *Hdh145* 및 *Hdh512*의 2개의 유전자좌에 있어 유의적으로 높은 근친도를 나타내었으며 독도집단의 평균 근교계수 (F_{IS}) 에 있어서도 0.195로 유의적으로 높게 나타났다 (P < 0.05).

이러한 독도집단의 유전적 다양성의 정도를 파악하기위하여 Jeong *et al*. (2008) 의 동·서·남해 6개 지역집단에서 얻어진 유전적 다양성 결과와 비교하여 보았다. 그 결과 6개 지역집단의 대립유전자수는 평균 13.8-15.8개로 독도집단의 14.8개와 큰 차이는 나타나지 않았다. 그러나 평균 관찰치 이형접합체 (*Ho*) 의 경우 6개 지역집단에서는 0.605-0.656으로 나타난 반면 독도집단에서는 0.664로 6개의 지역집단보다 높은 값을 나타내었다. 또한 평균 기대치 이형접합률 (*He*) 에 있어서도 가장 높은 값을 나타낸 울산집단의 0.824와 같은 값을 나타내었다. 그리고 다양성정보지수 (PIC) 에 있어서도 독도집단의 0.793은 6개의 지역집단 중 가장 높게 나타난 울산집단 (0.798) 과 비슷한 값을 나타내었다. 또한 집단 내의 근친도를 나타내는 근교계수 (F_{IS}) 를 계산하여 비교해 본 결과, 6개 지역집단에서는 0.195-0.265로 평균 0.233의 높은 값을 나타낸 반면 독도집단은 이중 가장 낮게 나타난 완도집단의 0.195와 같은 값을 나타내었다.

이와 같이 독도집단과 우리나라의 동·서·남해의 6개의 지역집단의 유전적 다양성을 비교한 결과 독도집단은 6개의 지역집단 보다 높은 관찰치 (*Ho*) 및 기대치 (*He*) 이형접합률, 다양성정보지수 (PIC) 를 나타내었으며 근교계수 (F_{IS}) 의 비교에 있어서도 다른 지역집단보다 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과의 원인을 추정하여 보면 Jeong *et al*. (2008) 의 동·서·남해 6개 지역집단에 있어 방류전복의 혼획비율이 평균 67.4%로 높게 나타나 방류 되어진 전복에 의해 그 지역에 서식하고 있는 전복집단의 유전적 다양성을 축소 시켰기 때문이라 추정되어진다. 따라서 6개 지역집단의 유전적 다양성보다

Table 3. Comparison of F_{ST} and genetic distance among populations

	Dokdo	
	F_{ST}	Genetic distance
Uljin	0.0277*	0.10574
Ulsan	0.0189*	0.09259
Taean	0.0262*	0.10154
Daechon	0.0363*	0.11552
Yosu	0.0174*	0.09527
Wando	0.0206*	0.09998

*Significant level at $P<0.05$

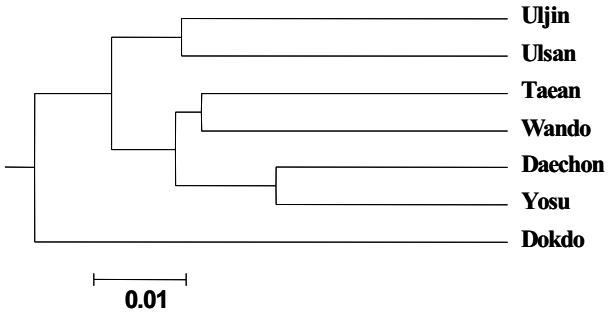

Fig. 1. UPGMA dendrogram of Dokdo populations based on Nei's chord distance.

높게 나타난 독도집단의 유전적 다양성을 유지하고 보존하기 위해서는 이 지역의 유전적 다양성 및 특성을 고려하여 인공종묘의 방류가 이루어져야 하며 방류를 한 이후에도 지속적인 유전학적 모니터링이 필요하다고 생각되어진다.

2. 유전적 차이

독도집단과 6개 지역집단간의 유전적 차이를 파악하기위하여 F_{ST} 값 및 Nei's chord distance (1983) 를 Table 3에 나타내었다. 그 결과 독도집단은 6개 지역집단 모두에 있어 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$). 그 중 서해의 대천집단이 0.0363으로 가장 큰 차이를 나타내었으며 남해의 여수집단이 0.0174로 가장 적은 차이를 나타내었다. 또한 이들 집단간의 유전적 거리를 비교하여보면 서해 대천집단이 0.11552로 가장 높은 값을 나타내었으며 동해 울산집단이 0.09259로 다른 지역집단보다 낮은 값을 나타내었다. 이러한 값을 토대로 UPGMA법을 이용하여 유전적 유연도로 나타내어보았다 (Fig. 1). 그 결과 독도집단은 동·서·남해 6개 지역집단과는 독립되어진 형태로 나타났다. 이러한 결과는 독도의 경우, 지리적으로 격리된 지역으로 유전적 변이 및 지역성을 나타내는 유전적 특정형질이 육지의 전복과는 차이를 나타내고 있기 때문이라 추정되어진다. 따라서 다른 지역과의 차이를 나타내는 독도지역의 전복을 유지 및 보존하기 위해서는 이 지역의 유전적 다양성을 고려한 체계화된 방류가 이루어져야 한다고 생각되어진다.

요 약

본 연구에서는 높은 변이를 나타내는 6개의 Microsatellite DNA 유전표식을 이용하여 독도지역에 서식하고 있는 자연산 전복집단의 유전적 다양성 및 집단구조를 파악하여 동·서·남해의 6개 지역집단과 비교 분석하였다. 그 결과 독도지역의 유전적 다양성은 6개 지역집단보다 높게 나타났으며 유전적 거리에 의한 유연관계 분석 결과에 있어서도 이들 집단과는 독립된 집단으로 나타났다. 이러한 결과는 6개 지역집단에 있어 방류전복의 높은 혼획비율에 의한 자연산 집단의 유전적 다양성이 축소되어진 결과라고 생각되어진다. 따라서 독도집단의 높은 유전적 다양성을 유지하고 보존하기 위해서는 이 지역의 유전적 다양성을 고려한 체계화된 전복종묘의 방류가 이루어져야 하며, 방류를 한 이후에도 지속적인 유전학적 모니터링이 필요하다고 생각되어진다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 (RP-2009-BT-028) 의 지원에 의해 연구 되었습니다.

REFERENCES

김훈수, 최병래, 1981. 울릉도 및 독도의 해양 무척추동물상. 한국자연보존협회 조사보고서. 19, 193-200.

해양수산부. 2000. 독도 생태계 등 기초조사 연구. 11-649.

Dieringer D., Schlötterer C. (2002) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analyser tool for large microsatellite data sets, *Molecular Ecology Note* **3**: 167-169.

Evans B., White R. W. G., Elliott N. G. (2000) Characterization of microsatellite loci in Austrailian blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach). *Molecular Ecology*, **9**: 1183-1184.

Goudet J. (2002) FSTAT version 2.9.3.2: a program to estimate and test gene diversity and fixation indices.

Hara M., Sekino M. (2005) Genetic difference between Ezo-awabi *Haliotis discus hannai* and Kuro-awabi *H. discus discu*s population: microsatellite-based population analysis in Japanese abalone. *Fisheries Science*, **71**: 754-766.

Hunang B., Hannna P. J. (1998) Identification of three polymorphic microsatellite loci in blacklip abalone, *Haliotis rubra* (Leach) and detection in other abalone species, *journal of Shellfish Res*, **17**: 795-799.

Jeong D. S., Park C. J., Jeon C. Y. (2008) Genetic variability and population structure of Pacific abalone microsatellite DNA markers, *Journal of the korean fisheries society*, **41**(6): 466-470.

Kang, R. S., Won K. S., Hong K. P., Kim J. M. (2001) Population studies on the Kelp *Ecklonia cava and Eisenia bicyclis* in Dokdo, korea, **16**(2): 209-215.

Li Q., Park C., Kijima A. (2002) Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, *Journal of Shellfish Research*, **21**: 811-815.

Marshall T. C., Slate J., Kruuk L., Pemberton J. M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**: 639-655.

Miller K. M., Laberee K., Kaukinen K. H., Li S., Withler R.E. (2001) Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Molecular Ecology Notes*, **1**: 315-317.

Nei M., Tajima, F., Tateno Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, **19**: 153-170

Park C. J., Li Q., Kobayashi T., Kijima A. (2003) Characterization novel microsatellite DNA marker in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, *Fish genetics and Breeding science*, **33**: 19-24.

Raymond M., Rousset F. (1995) GenePop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**: 248-249.

Ren P., Wang Z., Yao C., Liu Y., Ke C. (2008) Development of 11 polymorphic microsatellite loci in the small abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve), 8: 1390-1392.

Sekino M., Saido T., Fujita T., Kobayashi T., Takami H. (2005) Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas, *Aquaculture*, **243**: 33-47.

Sekino M., Kobayashi T., Hara M. (2006) Segregation and Linkage Analysis of 75 Novel Microsatellite DNA markers in Pair Crosses of Japanese Abalone (*Haliotis discus hannai*) Using the 5`-Tailed Primer Method. *Marine Biotechnology*, **8**: 453-466.

Sekino M., Hara M. (2007) Individual assignment tests proved genetic boundaries in a species complex of Pacific abalone (genus *Haliotis*). *Conservation Genetics*, **8**: 823-841.

Selvamani M. J. P., Degnan S. M., Paetkau D., Degnan B. M. (2000) Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reep population of the tropical abalone, *Haliotis asinina*. *Molecular Ecology*, **9**: 1184-1185.

Suenaga E., Nakamura H. (2005) Evolution of tree methods for effective extraction of DNA from human hair, *Journal of chromatography B*, **820**: 137-141.

Sun X. Q., Zhen M. G., Yang G. P. (2007) Development of 15 polymorphic genic microsatellite DNA markers of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 604-606.

Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Biotechniques*, **10**: 506-513.