ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
*Journal of Life Science* 2016 Vol. 26. No. 11. 1237~1244 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.11.1237

# Genetic Diversity and Relationship of the Walleye Pollock, *Theragra chalcogramma* Based on Microsatellite Analysis

Chun Mae Dong[1], Jung-Ha Kang[1], Soon-Gyu Byun[2], Kie-Young Park[3], Jung Youn Park[1], Hee Jeong Kong[1], Cheul Min An[1], Gun-Do Kim[4] and Eun-Mi Kim[1]*

[1]*Biotechnology research division, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Busan 46083, Korea*
[2]*Aquaculture Industry Division, East Sea Fisheries Research Institute NIFS, Gangneung 25435, Korea*
[3]*Department of Marine Biology, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea*
[4]*Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Korea*

Received September 29, 2016 / Revised October 17, 2016 / Accepted October 22, 2016

A comprehensive analysis of the genetic diversity and relationship of the cold-water fishery walleye pollock (*Theragra chalcogramma*), the most abundant economically important fishery resource in the East sea of Korea, has not been carried out, despite its importance in Korea. The present study assessed the genetic diversity and relationship between five walleye pollock populations (Korean population, Russian population, USA population, and Japanese populations) of *T. chalcogramma* using eight microsatellite DNA (msDNA) markers to provide the scientific data for the preservation and management of the Pollock fishery resource. The results of the analysis of 186 individuals of the Pollock revealed a range of 7.13 - 10.63 numbers of alleles (mean number of alleles=9.05). The means of observed heterozygosity ($H_O$), expected heterozygosity ($H_E$) were 0.732 and 0.698, respectively. The results of genetic distance, Pairwise $F_{ST}$, UPGMA (UPGMA: un-weighted pair-group method with an arithmetical average) (the phylogenetic tree), PCA (PCA: Principal Coordinate analysis) analysis pointed to significant differences between the Korean population, Russian population, USA population, and Japanese populations, although small ($p$<0.05). These results shed light on the genetic diversity and relationships of *T. chalcogramma* and can be utilized for research on the evaluation and conservation of Korean *T. chalcogramma* as genetic resources.

**Key words** : Genetic diversity, microsatellite, relationship, *Theragra chalcogramma*

## 서 론

명태(*Theragra chalcogramma*)는 대구목(Gadiformes) 대구과(Gadidae)에 속하는 어종으로 우리나라 동해, 일본 북해도, 북쪽의 오호츠크해와 베링해를 거쳐 미국 알래스카만과 북태평양의 전 연안에 널리 분포하는 냉수성 어종이다[10]. 냉수성 어류인 명태는 수온 1-10℃, 수심은 해역마다 다르며 약 200-1,200 m까지 서식한다[26]. 명태의 치어가 2-3년 성장한 후 겨울이 되면 연안으로 이동하여 산란을 하며[14, 33], 동해의 북쪽과 러시아의 타르타 해협 부근과 프리모리에 지역의 피터대제만, 일본의 홋카이도 연안 해역, 그리고 원산만이 주요 산란장으로 알려져 있다[17].

명태는 우리나라에서 경제적으로 중요한 어종이지만 1971년 이후, 어획량은 급격히 증가하여 1981년에 약17만톤이 어획되었지만 2007년부터 현재까지 약2톤 내외로 어획량이 급격히 감소되었다[27]. 이처럼 우리나라에서 명태의 어획량이 급격히 감소한 이유는 1980-1990년대 명태의 과도한 남획과 기후 변화에 따른 해양환경 변화가 주된 원인으로 추정되고 있다[18, 38].

현재까지 명태에 관한 연구로는 북태평양에 서식하는 명태 집단의 생물학적, 자원학적, 유전학적 분석에 관한 다수의 연구가 있으나[5, 12, 29], 우리나라 연안에 서식하는 명태에 관한 연구로는 산란과 성숙, 연령과 성장에 관한 연구[1, 2], 시 계열 분석을 이용한 한국 명태어업의 어획량 예측: AIC [32] 및 1970-1990년대 동해에서 어획된 명태의 체장에 따른 체급별 어획 마릿수 추정[14] 등 몇몇의 생태 및 자원생물학적 연구에 불과하며, 아직 국내에서 명태의 유전적 다양성 및 유연관계 분석에 대한 연구는 이루어지지 않고 있으며, 유전학적 분석에 관한 연구도 미비한 상태이다. 또한, 유전자원으로서 국내의 명태자원을 보다 효율적으로 관리하기 위해서는 체계적인 수집, 관리, 평가 및 보존이 필요하고, 이를 위한 분자 유전학적 분석기법을 활용한 유전적 특성 구명이 필수적이다. 따라서, 국내 명태자원의 회복 및 보존과 합리적 이용을 위해 체계

***Corresponding author**
Tel : +82-51-720-2467, Fax : +82-51-720-2456
E-mail : ocean0629@korea.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

적이고 지속적인 자원관리 계획의 수립이 요구되며, 이러한 자원관리를 위해 명태 집단에 대한 유전학적 분석을 통한 분자계통학적 연구와 유전적 다양성에 관련된 연구가 필요한 실정이다.

분자 마커는 환경의 영향을 받지 않고 DNA 수준에서 종간 비교가 가능하여 형태적 특성과 유전적 변이와의 관계를 예측할 수 있는 효율적인 수단으로 사용되고 있다[42]. 그 중에서 microsatellite DNA (msDNA) 마커는 종의 유전적 특성을 본질적으로 반영할 뿐만 아니라, 진핵 생물의 유전체 전반에 걸쳐 존재한다[23, 24]. 또한, 개체 간 다형성이 높고 반복 실험 시에도 재현성이 높으며 공유성(co-dominant)을 나타내고 Hardy-Weinberg 평형 가설에 기반하여, 멸종위기 종을 대상으로 유전 다양성 유지를 위한 포획 사육(captive breeding) 프로그램을 위한 개발[25] 및 연어과 어류[3, 19], 넙치[37], 참돔[35], 전복[8, 21], 굴[4, 22], 도루묵[15] 등 여러 수산자원의 유전적 다양성 분석 및 계군 분석 등의 연구에 널리 활용되고 있다[13, 41].

본 연구에서는 기존에 개발되어 있는 명태 및 대구의 특이적 msDNA마커 중 명태에 적용 가능한 msDNA 마커 8개를 선별하여 우리나라 동해, 러시아, 미국 및 일본 지역의 5집단을 대상으로 분석을 수행하였으며, 본 연구를 통해 명태 집단의 유전적 다양성 및 집단 간 유연 관계를 파악하여 우리나라 명태자원의 보존 및 관리를 위한 유전학적 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 시료 확보

본 연구에 사용한 명태 시료는 총 186개체로, 강원원주대학교로부터 우리나라 동해(2013년, n=22) 집단, 러시아(2014년, n=30) 집단 및 일본(2014년, n=30) 집단의 genomic DNA을 확보하였으며, 추가적으로, 국립수산과학원 수산생명자원 수장고 시설에 보관되어 있는 일본(2006년, n=59) 집단과 미국(2006년, n=45) 집단의 명태 지느러미 일부를 분석에 사용하였다(Table 1).

### DNA 추출

시료의 DNA 추출은 DNeasy® Blood & tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)와 함께 자동화 DNA 추출 장비(MagExtractor MFX-6100, Toyobo, Japan)를 사용하여 genomic DNA를 순수분리·정제하였다. DNeasy® Blood & tissue Kit는 모든 시료를 20-30 mg씩 멸균된 E-tube로 옮겨 ATL Buffer 180 µl와 Proteinase K (PK) 20 µl를 첨가 후, 혼합하여 55℃에서 10분 동안 반응시켰다. 그리고 ATL Buffer 200 µl 첨가 후, 혼합하여 DNeasy MiNi spin column에 옮겨 8,000 rpm으로 1분간 원심 분리하였다. Column tube 교체 후, AW1 Buffer 500 µl 첨가하여 8,000 rpm으로 1분간 원심 분리하였다. 또 다시 Column tube 교체 후, AW2 Buffer 500 µl 첨가하여 14,000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다. Ethanol 제거한 다음 100 µl의 멸균수로 녹여 genomic DNA을 순수 분리하였다. 분리된 genomic DNA는 1.5% agarose gel을 사용하여 전기영동을 통해 DNA 밴드를 확인한 후, Nano-drop (Thermo fisher scientific, Waltham, USA)을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 순수 분리된 genomic DNA는 사용 전 까지 -20℃에서 보관하였다.

### Microsatellite (msDNA) 마커 분석

본 연구에 사용한 msDNA 마커는 기존에 보고된 것으로, 명태에서 개발한 Tch10, Tch13, Tch18 [30] 3개 msDNA 마커와 대구에서 개발한 Gmo-G5 [43], Gmo-C18, Gmo-C83 [40], Gma106 [6], KGM26 [16] 5개 msDNA 마커의 정보를 사용하여 프라이머를 제작하고, 각 프라이머 쌍의 forward 프라이머에 6-FAM 및 HEX 형광 물질을 표지 하여 사용하였다(Table 2).

PCR 조성은 10×Taq PCR buffer 1 µl, dNTP mixture (10 mM) 0.2 µl, Hs Taq DNA polymerase (2.5 U/µl; TNT Research, Seoul, Korea) 0.1 µl, forward와 reverse 프라이머 각각 0.4 µl(10 mM), template DNA 1 µl를 넣고, 총 10 µl까지 멸균된 증류수를 넣은 후 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, DNA Engine Tetrad PCT-2450G, 4-Bay)를 사용하여 수행하였다.

PCR 조건은 95℃에서 11분간 DNA를 사전변성(Preincubation)하고 그 다음 94℃에서 1분간 변성(denaturation)하였다. 54℃에서 1분간 프라이머 합성(annealing), 72℃에서 1분간 DNA 합성(extension)하여 총 34회 반복한 후, 최종 DNA 합성(full extension)을 72℃에서 5분간 실시하였다.

PCR 후 1.5% agarose gel 상에서 전기영동으로 증폭된 DNA 밴드의 유무를 확인하였다. PCR 산물은 Hi-Di Forma-

Table 1. Collections of *T. chalcogrammus* samples for the present study

| Location | Sample site | Year | Sample size |
|---|---|---|---|
| Eastern coast of Korea (KOR13) | Gangneung-Wonju National University | 2013 | 22 |
| Russia (RUA14) | Gangneung-Wonju National University | 2014 | 30 |
| America (USA06) | National Institute of Fisheries Science | 2006 | 45 |
| Japan (JPN06) | National Institute of Fisheries Science | 2006 | 59 |
| Japan (JPN14) | Gangneung-Wonju National University | 2014 | 30 |

Table 2. Primer sequences and information about microsatellite markers from *T. chalcogrammus*

| Locus | Forward (5′-3′) | Reverse (5′-3′) | Fluorescent label | Size (bp) | Tm |
|---|---|---|---|---|---|
| Tch10 | GTCTCTATGTCTGTCTTTCTATTTG | ACGAAACCCAACCCTGATT | HEX | 139-179 | 54 |
| Tch13 | TTTCCGATGAGGTCATGG | AATCCACTGGTGCAGACC | 6-FAM | 74-86 | 54 |
| KGM26 | TCCTTCAACAACTTGCTCTAT | GAACTGAATAAATGCCAGGTA | HEX | 190-224 | 54 |
| Tch18 | GGAGATGGTGCTAACTGG | AACGCACATGCACATACG | 6-FAM | 67-97 | 54 |
| Gmo-G5 | GTCTCTTGCCCTACGTTTGTTCG | GTTTCTTTTCTGGTTGTGGTGTGCCCTGAC | 6-FAM | 188-202 | 54 |
| Gmo-C18 | AAGCATGCGTTTGTGTTATTAC | ATCTGTTCTCGCTTTCCTTCATT | HEX | 146-188 | 54 |
| Gmo-C83 | CGGTGCGTTGGATTTCAT | GTTTCTTAACTGCTCTCCTGATTTTGTTTT | 6-FAM | 105-135 | 54 |
| Gma106 | TCACCATCACCTAGCAACCA | GCGGAGATGGAGGATTACTG | HEX | 179-225 | 54 |

mide와 size standard, GeneScan 400HD ROX (Applied Biosystems, USA)를 혼합하여 95℃에서 2분간 변성한 후, ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 데이터의 통계 분석

자동화 염기서열 분석 장치를 사용하여 각 msDNA 마커별 대립유전자들의 크기를 GeneMapper 프로그램(version 4.0 Applied Biosystems, USA)을 통해 산출하였다. 유전적 다양성 분석을 위해 FSTAT version 2.9.3 [11]를 이용하여 대립유전자수(number of alleles, $N_A$), 대립유전자 크기(product size range, S)를 구하였으며, Arlequin version 3.1 software [9]를 사용하여 기대치 이형 접합률(expected heterozygosity, $H_E$), 관찰치 이형 접합률(observed heterozygosity, $H_O$) 및 Markov-chain 방법에 기인한 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 이탈에 대한 분석을 수행하였다. 집단 내 근친교배계수(inbreeding coefficients, $F_{IS}$) [44]의 분석은 GENEPOP version 4.0 computer package [36]를 사용하여 1,000회 반복을 통해 유의성을 측정하였다.

집단 간 유전학적 유연관계 분석을 위해서 FSTAT version 2.9.3 program [11]을 사용하여 집단 간 유전적 분화 정도, Pairwise $F_{ST}$ [44] 수치를 측정하여 비교하였으며, Arlequin version 3.1 software [9]를 사용하여 통계적으로 집단 내 또는 집단 간 유전적 변이 정도를 통한 집단 간 유전적 분화 정도를 예측하기 위한 AMOVA (analysis of molecular variance) 분석을 수행하였다. 또한, 유전적 변이 분포를 통해 집단 간의 기하학적 관계를 보여주는 Principal Coordinate analysis (PCA) 분석은 GeneAlEx 6.4 program [34]을 사용하였으며, 유전적 거리에 기반한 계통학적 유연관계 분석에는 Populations 1.2.32 [20]를 이용하여 Nei [25]의 방법에 의한 Ds 유전적 거리를 통해 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical average) [39]방법으로 계통수를 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### msDNA 마커 및 명태 집단의 유전적 다양성 분석

우리나라 동해, 러시아, 미국 및 일본 지역의 명태 5집단에 대해 msDNA 마커 8개를 사용하여 유전자형을 분석하였다 (Table 2). 본 연구에 사용된 8개의 msDNA 마커는, 명태에서 개발한 Tch10, Tch13, Tch18 [30] 과 대구에서 개발한 Gmo-G5 [43], Gmo-C18, Gmo-C83 [40], Gma106 [6], KGM26 [16] 의 msDNA 마커 정보를 사용하였다. 대구 역시 명태와 같은 대구목 대구과에 속하는 어종으로, 대구에서 개발된 5개의 msDNA 마커 모두 명태 집단에서도 성공적으로 증폭하고 다형성을 나타내어, 종-교차적으로 명태의 유전적 다양성 및 구조 분석 연구에도 유용하게 사용이 가능함을 확인할 수 있었다.

8개 msDNA 마커의 분석 결과, 모든 집단에서 전반적으로 높은 다양성 지수가 확인되었으나, 각 유전자 좌 별 집단 간 유전적 다양성 정도는 다르게 나타났다(Table 3). 각 msDNA 마커에서 산출된 대립유전자수(number of alleles, $N_A$), 집단의 크기를 보정한 유전자좌당 대립유전자수($A_R$), 기대치 이형접합율(expected heterozygosity, $H_E$), 관찰치 이형 접합율(observed heterozygosity, $H_O$), Hardy-Weinberg equilibrium 통계치 및 근친교배계수(inbreeding coefficient, $F_{IS}$)는 표 3에 나타나있다.

명태 집단 분석에서 전체 103개의 다른 대립유전자가 관찰되었으며, 유전자 좌 당 평균 대립유전자의 수는 9.05개였다. Gmo-G5에서 3.6개로 가장 적게 나타났으며, Gmo-C18에서 15.2개로 가장 많이 나타났다. 전체 $N_A$는 2-18개였으며, 평균 $N_A$값은 일본(JPN06)에서 10.63개로 가장 많았고, 우리나라 동해(KOR13) 집단에서 7.13개로 가장 낮은 값을 나타내었다. 전체 $A_R$값은 1.700-14.769개 였으며, 평균 $A_R$값은 7.891로, 일본(JPN06)에서 8.37개로 가장 높았고, 우리나라 동해(KOR13) 집단에서 7.10개로 가장 낮았다. 각 집단 별 $H_E$값은 유전적 평형상태에 있는 집단으로 가정하였을 때 예상되는 이형 접합도를, $H_O$값은 실제로 관측된 이형접합을 하고 있는 개체들의 이형 접합도를 나타내는 것으로, 평균 $H_O$과 $H_E$은 각각 0.689 (USA06)-0.808(RUA14)과 0.662(JPN14)-0.735(RUA14)로 관찰

Table 3. Genetic variability at 8 microsatellite markers in 5 populations of *T. chalcogrammus*

| Populations (n) | Microsatellite markers | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tch10 | Tch13 | KGM26 | Tch18 | Gmo-G5 | Gmo-C18 | Gmo-C83 | Gma106 | Mean |
| KOR13 (22) | | | | | | | | | |
| $N_A$ | 6 | 5 | 4 | 11 | 3 | 12 | 7 | 9 | 7.13 |
| $A_R$ | 5.999 | 4.998 | 4.000 | 11.000 | 2.953 | 12.000 | 6.908 | 8.909 | 7.10 |
| He | 0.725 | 0.737 | 0.689 | 0.807 | 0.132 | 0.915 | 0.785 | 0.855 | 0.706 |
| Ho | 0.545 | 0.727 | 0.952 | 0.952 | 0.136 | 0.905 | 0.909 | 0.955 | 0.760 |
| P | 0.019* | 0.716 | 0.034* | 0.497 | 1.000 | 0.023* | 0.055 | 0.016* | |
| Fis | 0.252 | 0.013 | -0.396 | -0.185 | -0.033 | 0.012 | -0.162 | -0.119 | -0.077 |
| RUA14 (30) | | | | | | | | | |
| $N_A$ | 8 | 5 | 4 | 14 | 4 | 16 | 7 | 13 | 8.88 |
| $A_R$ | 7.897 | 4.676 | 3.992 | 12.225 | 3.827 | 14.657 | 6.583 | 11.154 | 8.13 |
| He | 0.792 | 0.679 | 0.631 | 0.822 | 0.408 | 0.928 | 0.771 | 0.850 | 0.735 |
| Ho | 0.800 | 0.800 | 0.967 | 0.700 | 0.433 | 0.933 | 0.833 | 1.000 | 0.808 |
| P | 0.693 | 0.232 | 0.000* | 0.081 | 0.146 | 0.037* | 0.725 | 0.000* | |
| Fis | -0.011 | -0.182 | -0.546 | 0.151 | -0.062 | -0.006 | -0.083 | -0.180 | -0.115 |
| USA06 (45) | | | | | | | | | |
| $N_A$ | 10 | 6 | 5 | 13 | 6 | 15 | 8 | 16 | 9.88 |
| $A_R$ | 9.093 | 4.786 | 4.461 | 10.611 | 3.971 | 12.747 | 6.502 | 12.68 | 8.11 |
| He | 0.803 | 0.666 | 0.675 | 0.774 | 0.170 | 0.892 | 0.694 | 0.885 | 0.695 |
| Ho | 0.533 | 0.667 | 0.978 | 0.689 | 0.156 | 0.822 | 0.733 | 0.933 | 0.689 |
| P | 0.000* | 0.213 | 0.000* | 0.106 | 0.061 | 0.152 | 0.212 | 0.000* | |
| Fis | 0.338 | -0.017 | -0.455 | 0.111 | 0.085 | 0.079 | -0.058 | -0.056 | 0.003 |
| JPN06 (59) | | | | | | | | | |
| $N_A$ | 10 | 9 | 4 | 16 | 3 | 18 | 8 | 17 | 10.63 |
| $A_R$ | 8.098 | 5.960 | 3.998 | 13.133 | 1.957 | 14.769 | 7.016 | 12.000 | 8.37 |
| He | 0.686 | 0.703 | 0.676 | 0.872 | 0.051 | 0.929 | 0.793 | 0.831 | 0.693 |
| Ho | 0.574 | 0.741 | 0.981 | 0.833 | 0.052 | 0.932 | 0.800 | 0.797 | 0.714 |
| P | 0.127 | 0.733 | 0.000* | 0.393 | 1.000 | 0.063 | 0.287 | 0.160 | |
| Fis | 0.164 | -0.054 | -0.457 | 0.044 | -0.012 | -0.003 | 0.017 | 0.041 | -0.033 |
| JPN14 (30) | | | | | | | | | |
| $N_A$ | 8 | 8 | 4 | 14 | 2 | 15 | 8 | 11 | 8.75 |
| $A_R$ | 7.295 | 6.500 | 4.000 | 12.272 | 1.700 | 13.975 | 7.013 | 9.327 | 7.76 |
| He | 0.639 | 0.673 | 0.619 | 0.867 | 0.033 | 0.931 | 0.745 | 0.788 | 0.662 |
| Ho | 0.517 | 0.767 | 0.800 | 0.900 | 0.033 | 0.967 | 0.767 | 0.767 | 0.690 |
| P | 0.107 | 0.094 | 0.190 | 0.745 | 1.000 | 0.543 | 0.183 | 0.080 | |
| Fis | 0.193 | -0.141 | -0.300 | -0.038 | 0.000 | -0.040 | -0.030 | 0.028 | 0.041 |
| All populations Mean | | | | | | | | | |
| $N_A$ | 8.40 | 6.60 | 4.20 | 13.60 | 3.60 | 15.20 | 7.60 | 13.20 | 9.05 |
| $A_R$ | 7.676 | 5.384 | 4.090 | 11.848 | 2.882 | 13.630 | 6.804 | 10.814 | 7.891 |
| He | 0.729 | 0.692 | 0.658 | 0.828 | 0.159 | 0.919 | 0.758 | 0.842 | 0.698 |
| Ho | 0.594 | 0.740 | 0.936 | 0.815 | 0.162 | 0.912 | 0.808 | 0.890 | 0.732 |

$N_A$=number of alleles per locus; $A_R$=allelic richness; $H_E$=expected heterozygosity; $H_O$=observed heterozygosity; $F_{IS}$=inbreeding coefficient.

*Not in conformity with Hardy-Weinberg equilibrium ($p$<0.005, Bonferroni-corrected value).

되었으며, 전체 평균 $H_O$와 $H_E$은 각각 0.732와 0.698로 나타났다. 명태 집단 분석에 대한 국외의 연구 결과로, O'Reilly et al. (2004)의 분석에서는 14개의 명태 msDNA 마커를 사용하여 10개의 명태 집단에서 919개체를 분석한 결과, 전체 $N_A$는 6-13개로 평균 20.9개로 나타났으며, $H_E$값은 0.68-0.96이고 평균 0.85의 수치를 나타냈다[31]. 이러한 결과는 본 연구 결과와 비교하여 다소 높은 대립유전자 수를 가지는 것으로 나타났으나, 이는 대립유전자의 개수가 집단 크기에 영향을 받아 나타나는 현상으로 사료되며, 본 연구 결과의 수치와 크게 차이가 나지 않는 점으로 보아 본 분석에 사용된 8개 msDNA 마커 모두가 명태 5집단에서 다형성이 높은 마커임을 시사하였다. 또한, 모든 집단에서 평균 $H_O$와 $H_E$값이 크게 차이가 나지 않으며, 해산어의 평균 $H_E$값인 0.79[7]와 유사한 수치를 나타내어, 본 연구에 사용된 명태 5집단의 유전적 다양성은 비교적

잘 유지되고 있는 것으로 예측되었다. 또한, 본 분석에서 우리나라 동해(KOR13) 명태 집단이 평균 $N_A$, $A_R$, $H_O$ 및 $H_E$에서 낮은 수치를 나타낸 것은 국내 명태 자원의 부족으로 인해 유전학적 특성 평가를 위한 국내 명태 집단의 시료 확보가 어려워 나머지 집단의 개체 수(30-59개체) 보다 확연히 적은 22개체 만을 분석에 사용했기 때문이라 사료된다.

이형 접합율 결핍으로 인한 Hardy-Weinberg 평형의 이탈은 40개의 유전자 좌에 대해서 6개가 관찰되었으며($p$<0.00625, Bonferroni correction), 사용된 8개의 msDNA 마커 중 4개의 유전자 좌(Tch13, Tch18, Gmo-G5, Gmo-C83)에서는 HWE 이탈이 관찰되지 않았다. 전체 $F_{IS}$는 -0.115-0.041로 나타났으며 $F_{IS}$의 평균값은 -0.0362의 낮은 수치를 나타내어, 낮은 수준의 근친교배 정도를 의미하였다.

### 유전적 유연관계 분석

집단 간 유전적 차이 정도를 나타내는 Pairwise $F_{ST}$값과 유전적 거리를 측정한 결과는 Table 4에 나타내었다. 전체 Pairwise $F_{ST}$값은 0.007-0.028로 나타났고, 우리나라 동해(KOR13) 집단과 일본(JPN06, JPN14) 집단 간에 유의한 차이가 나타났으며, 러시아(RUA14) 집단과 일본(JPN06) 집단 및 미국(USA06) 집단과 일본(JPN06, JPN14) 집단 간에서도 유의한 차이가 관찰되었다($p$<0.05). 따라서, 우리나라 동해, 러시아, 미국과 일본 명태 집단 간의 유전적 분화 정도에서 러시아(RUA14) 집단과 일본(JPN14) 집단 간 $F_{ST}$ 값을 제외하고는 모두 유의적인 차이를 나타내어, 비록 적은 유전적 분화 정도 수치이지만 유의적 차이가 나타난다는 것을 확인하였다(Table 4).

집단 간 유전적 거리는 Nei 방법에 의해 측정하였으며, 일본 집단 간 0.041로 가장 낮은 값을, 미국과 일본(JPN14) 집단 간 0.090로 가장 높은 값을 나타내었다. 유전적 거리 분석에서도 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단 간에는 평균 0.061, 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단과 일본 집단 간에는 0.079, 일본 집단 간에는 0.041의 수치를 보여, 집단 간 $F_{ST}$ 값 분석결과와 마찬가지로 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단과 일본 집단으로 구분되는 양상을 나타내었다(Table 4).

본 연구에 사용된 명태 5집단의 유전적 유연관계를 확인하기 위해 집단 간 Nei의 유전적 거리에 기반한 UPGMA 군집분석 결과에서는 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단이 하나의 cluster로 형성되며, 일본 명태 2집단(JPN06, JNP14)이 다른 하나의 cluster로 분리되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 주성분 분석에서는 상위 3개의 주성분이 전체 변이의 86.46% (제1주성분=42.84%, 제2주성분=22.65%, 제3주성분=20.98%)를 차지하였으며, 제1주성분과 제2주성분에 의한 분포도는 UPGMA에서의 결과와 동일하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 Oh et al. (2004)이 우리나라 동해에 존재하는 명태 집단과 일본에 서식하는 명태 집단이 서로 분리된다는 결과를 보고한 것과 유사하여, 본 연구의 분석 결과를 뒷받침해 주는 것이라 사료된다[28].

Table 4. Pairwise $F_{ST}$ (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) between 5 sample sites of *T. chalcogrammus* based on msDNA markers

| | KOR13 | RUA14 | USA06 | JPN06 | JPN14 |
|---|---|---|---|---|---|
| KOR13 | 0.000 | 0.007 | 0.011 | 0.014* | 0.018* |
| RUA14 | 0.063 | 0.000 | 0.011 | 0.021* | 0.025 |
| USA06 | 0.064 | 0.057 | 0.000 | 0.021* | 0.028* |
| JPN06 | 0.068 | 0.080 | 0.071 | 0.000 | 0.008 |
| JPN14 | 0.079 | 0.088 | 0.090 | 0.041 | 0.000 |

Symbol "*" indicates significant support for $F_{ST}$ values ($p$<0.05).

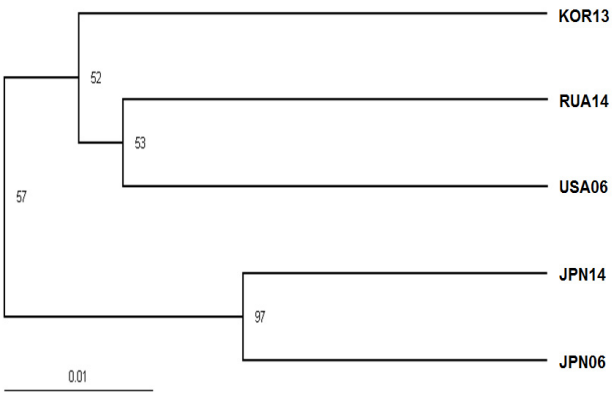


Fig. 1. Dendrogram based on Nei's genentic distance by UPGMA method for 5 populations of *T. chalco1925610grammus.*

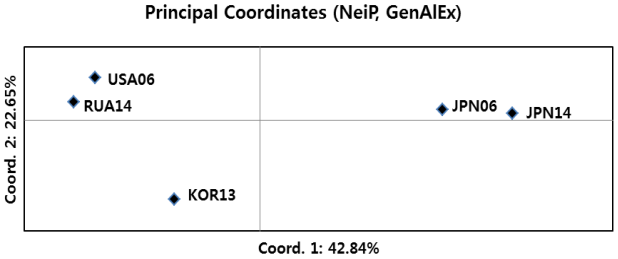


Fig. 2. Biplot of principal coordinates analysis based on the Nei's genetic distance for 5 populations of *T. chalcogrammus.*

집단 간의 유전적 차이를 보기 위해 유전적 거리, pairwise $F_{ST}$값, UPGMA 및 PCA 분석결과에 근거하여, 전체 5개의 명태 집단을 하나의 그룹으로, 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단과 일본 집단을 분리하여 2그룹으로 나누어 AMOVA test를 실시 하였다(Table 5). 전체 유전변이는 1.53%, 각 지역 집단 내 개체간 유전변이는 98.47%로 나타났으며($F_{ST}$=0.01529, $p$=0.0000), 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단과 일본 집단의 2그룹으로 나누어 분석한 결과, 2그룹 간 유전적 변이는 1.06%, 2그룹 내 각 집단 간 유전변이는 0.84%, 각 집단 내 개체 간 유전변이는 98.10%로 나타났다. 비록 명태 5집단을 우리나라 동해-러시아-미국과 일본 그룹으로 분리하여 분석하였을 때

Table 5. AMOVA for 5 populations of *T. chalcogrammus* based on msDNA markers

| Analysis | Source of variation | *d.f.* | Fixation indices | Percentage of variation |
|---|---|---|---|---|
| No grouping | Among populations | 4 | $F_{ST}$ : 0.01529 ($P$=0.0000) | 1.53 |
| | Within populations | 367 | | 98.47 |
| Regional grouping | Among groups | 1 | $F_{CT}$ :0.01063 ($P$=0.1053) | 1.06 |
| (KOR, RUA, USA vs. Japan) | Among populations within groups | 3 | $F_{SC}$ :0.00847 ($P$=0.0000) | 0.84 |
| | Within populations | 367 | $F_{ST}$ :0.01901 ($P$=0.0000) | 98.10 |

Significant was tested by nonparametric permutation tests (10100 permutations).

변이율(1.06%) 보다 한 그룹으로 가정하여 분석하였을 때 변이율(1.53%)이 0.47% 증가하여 하나의 그룹으로 가정하여 분석한 것이 집단 간 유전적 차이가 비교적 뚜렷한 것으로 관찰되었다. 그러나, 우리나라 동해-러시아-미국과 일본 그룹으로 나누어 분석하였을 때 각 그룹 내 집단 간 변이율은 0.84%로 감소하여, 집단 간 유전적 차이가 유의하게 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 분석 결과는 우리나라 동해-러시아-미국 집단과 일본 집단으로 분리하여 분석 시, 그룹 간 유전적 차이가 더 클 것으로 예측되며, 이는 본 연구에서 분석된 유전적 거리, pairwise $F_{ST}$ 값, UPGMA와 PCA 분석 결과와 동일한 결과를 나타내었다.

본 연구에서는 명태 및 대구 msDNA마커 8개를 이용하여 우리나라 동해, 러시아, 미국 및 일본 지역의 명태 5집단에 대한 유전적 다양성 및 집단 간 유연관계를 살펴보고자 하였다. 본 연구의 분석결과, 연구에 사용된 모든 명태 집단이 비교적 유전적 다양성이 잘 유지되고 있음이 확인되었으며, 유전적 분화 정도 및 유연관계 분석에서는 우리나라 동해, 러시아, 미국 집단과 일본 집단이 낮은 수치이지만 유의한 유전적 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 비록, 본 연구에 사용된 명태 집단 시료의 개체수가 적고, 명태 시료 수집의 지역적 한계가 있었으나, 본 연구의 결과는 우리나라 동해의 유용한 수산자원인 명태의 보존 및 유전적 특성을 규명하기 위한 구체적인 과학적 근거 및 우리나라 생물주권 확보를 위한 기초자료로도 활용 가능 할 것이라 생각된다. 향후, 명태 자원의 지속 가능한 관리와 보존을 위해서는 더욱 명확한 명태 집단의 유전적 다양성 및 유연관계를 보다 면밀하게 파악하여야 할 것이며, 이를 위해 우리나라를 중심으로 한 주변국 및 주요 서식지에 대한 충분한 명태 시료 확보가 필수적이며, 지속적인 유전학적 분석이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2016년 국립수산과학원 수산과학연구사업 수산유전자원의 탐색 및 활용(R2016037)과 해양수산부의 R&D 연구사업 "통합형 수산물 감식 정보센터 구축을 위한 실용기술 개발"의 지원으로 수행된 연구입니다.

## References

1. Bark, B. H., Hue, J. B. and Kim, H. K. 1978. Age and growth of Alaska pollack, *Theragra Chalcogramma*, in the Eastern Sea of Korea. Bulletin of National Fisheries Research and Development Institute. **20**, 33-42.
2. Bark, B. H., Hue, J. B. and Kim, H. K. 1978. Spawning and Maturity of Alaska Pollack, *Theragra chalcogramma* (PALLAS), in the Eastern Sea of Korea. Bulletin of National Fisheries Research and Development Institute. **22**, 33-38.
3. Beacham, T. D., Lapointe, M., Candy, J. R., Miller, K. M. and Withler, R. E. 2004. DNA in action: rapid application of DNA variation to sockeye salmon fisheries management. *Conserv. Gen.* **5**, 411-416.
4. Boudry, P., Collet, B., Cornette, F., Hervouet, V. and Bonhomme, F. 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas, Thunberg*) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* **204**, 283-296.
5. Canino, M. F., O'Reilly, P. T., Hauser, L. and Paul, B. 2005. Genetic differentiation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) in response to selection at the pantophysin (*Pan*I) locus. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **62**, 2519-2529.
6. Canino, M. F., Spies, I. S. and Hauser, L. 2005. Development and characterization of novel di- and tetranucleotide microsatellites markers in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*). *Mol. Ecol. Notes* **5**, 908-910.
7. DeWoody, J. A. and Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish. Biol.* **56**, 461-473.
8. Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P. and Elliott, N. G. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* **233**, 109-127.
9. Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* **1**, 47-50.
10. FishBase. 2015. Database for walleye Pollock. Retrieved from http;//www.FishBase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=318&AT=walleye+Pollock.
11. Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* **86**, 485-486.
12. Grant, W. S., Spies, I. B. and Canino, M. F. 2006. Biogeographic evidence for selection on mitochondrial DNA

in North Pacific walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *J. Hered.* **97**, 571-580.
13. Jarne, P. and Lagoda, P. J. G. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 424-429.
14. Kang, S. K., Park, J. H. and Kim, S. A. 2013. Size-class Estimation of Number of Walleye Pollock *Theragra chalcogrammal* Caught in the Southwestern East Sea during the 1970s-1990s. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 445-453.
15. Kim, E. M., Kang, H. S., Kang, J. H., Kim, D. G., An, C. M., Lee, H. W. and Park, J. Y. 2015. Genetic relationship of the randfish, *Arctoscopus japonicas* inhabit in five different areas of Korea and Japan based on mitochondrial DNA and microsatellite analyses. *J. Life Sci.* **25**, 1204-1213.
16. Kim, M. J., An, H. S. and Choi, K. H. 2010. Genetic characteristics of Pacific cod populations in Korea based on microsatellite markers. *Fish. Sci.* **76**, 595-603.
17. Kim, S. and Kang, S. 1998. The status and research direction for fishery resources in the East Sea/Sea of Japan. *J. Kor. Soc. Fish. Res.* **1**, 44-58.
18. Kim, S., Zhang, C. I., Kim, J. Y., Oh, J. H., Kang, S. and Lee, J. B. 2007. Climate variability and its effects on major fisheries in Korea. *Ocean. Sci. J.* **42**, 179-192.
19. Koljonen, M. L., Tähtinen, J., Säisä, M. and Koskiniemi, J. 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture* **212**, 6992.
20. Langella, O. 2002. POPULATIONS 1.2.29. Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees), http: //bioinformatics.org/~tryphon/populations.
21. Li, Q., Park, C., Endo, T. and Kijima, A. 2004. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture* **235**, 207-222.
22. Li, Q., Yu, H. and Yu, R. 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* **259**, 95-102.
23. Liu, Z. 2011. Genomic variations and marker technologies for genome-based selection. In: Liu, Z. (ed.), Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture. WileyBlackwell, Oxford, U. K.
24. Liu, Z. J. and Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**, 1-37.
25. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**, 283-292.
26. NFRDI. 2010. Ecology and fishing ground of fisheries resources in Korean waters. National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Korea. 405.
27. NFRDI. 2010. Korean Coastal and Offshore Fishery Census. 283-286.
28. Oh, T. G., Sakuramoto, K. and Lee, S. G. 2004. The Relationship between spawning area water temperature and catch fluctuation of walleye Pollock in the East Sea/Sea of Japan. *J. Kor. Soc. Fish. Res.* **6**, 1-13.
29. Olsen, J. B., Merkouris, S. E. and Seeb, J. E. 2002. An examination of spatial and temporal genetic variation in walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) using allozyme, mitochondrial DNA, and microsatellite data. *Fish. Bull.* **100**, 752-764.
30. O'reilly, P. T., Canino, M. F., Bailey, K. M. and Bentzen, P. 2000. Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye Pollock and other gadoids. *J. Fish Biol.* **56,** 1074-1086.
31. O'Reilly, P. T., Canino, M. F., Bailey, K. M. and Bentzen, P. 2004. Inverse relationship between FST and microsatellite polymorphism in the marine fish, walleye Pollock (Theragra chalcogramma): implications for resolving weak population structure. *Mol. Ecol.* **13**, 1799-1814.
32. Park, H. H. and Yoon, G. D. 1996. Prediction of walleye Pollock, *Theragra chalcogramma,* landings in Korea by time series analysis : AIC. *Bull. Kor. Soc. Fish. Tech.* **32**, 235-240.
33. Park, S. K. and OK, Y. S. 1986. Bio-economic research in fishery resouree management; walleye Pollock. *Nongchongyungje* **9**, 59-68.
34. Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* **6**, 288-295.
35. Perez-Enriquez, R., Takagi, M. and Taniguchi, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **173**, 413-423.
36. Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* **8**, 103-106.
37. Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M. and Yamashita, Y. 2003. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys oliaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture* **221**, 255-263.
38. Seo, H., Kim, S., Seong, K. and Kang, S. 2006. Variability in scale growth rates of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in relation to climate changes in the late 1980s. *Prog. Oceanogr.* **68**, 205-216.
39. Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
40. Stenvik, J., Wesmajervi, M. S., Fjalestad, K. T., Damsgard, B. and Delghandi, M. 2006. Development of 25 gene-associated microsatellite markers of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). *Mol. Ecol. Notes* **6**, 1105-1107.
41. Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* **17**, 6463-6471.
42. Van Dijk, H. and Van Delden, W. 1981. Genetic variability in *Plantago* species in relation to their ecology. 1. Genetic analysis of the allozyme variation in *P. major* subspecies. *Theor. Appl. Genet.* **60**, 285-290.
43. Wesmajervi, M. S., Tafese, T., Stenvik, J., Fjalestad, K. T., Damsgard, B and Delghandi, M. 2007. Eight new micro-

satellite markers in Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) Derived from an enriched genomic library. *Mol. Ecol. Notes* **7**, 138-140.

44. Weir, B. S. and Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-sta tistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.

## 초록 : Microsatellite marker 분석을 이용한 명태(*Theragra chalcogramma*) 5 집단의 유전적 다양성 및 유연관계 분석

동춘매[1] · 강정하[1] · 변순규[2] · 박기영[3] · 박중연[1] · 공희정[1] · 안철민[1] · 김군도[4] · 김은미[1]*

([1]국립수산과학원 생명공학과, [2]국립수산과학원 동해수산연구소 양식산업과, [3]강릉원주대학교 해양자원육성학과, [4]부경대학교 미생물학과)

한류성 어종인 명태는 우리나라 동해를 비롯한 일본, 러시아 북부의 오호츠크해, 베링해, 알래스카 등지에 서식하는 중요한 수산자원으로, 우리나라에서는 그 어획량이 매년 감소하고 있어, 그 자원량의 회복과 보존 및 관리가 필요한 대표적 어종이다. 그러나, 이러한 중요성에도 불구하고 국내에서 명태의 유전학적 집단 분석에 관한 연구는 많이 수행되지 않은 실정이다. 본 연구에서는 우리나라 동해, 러시아, 미국 명태 집단 및 일본 명태 집단과의 유전적 다양성과 유연관계를 분석하여 명태자원의 보존과 관리를 위한 과학적 자료를 제공하기 위해 유전적 다양성 및 계군 분석에 널리 사용되고 있는 microsatellite marker (msDNA) 8개를 사용하여 명태 집단의 유전자형을 분석하였다. 우리나라 동해, 러시아, 미국 및 일본 집단에서 채집된 총 186개체를 분석한 결과, 대립유전자수는 최소 7.13개에서 최대 10.63개로 나타났고, 평균 대립유전자의 수는 9.05개로 나타났다. 기대치와 관찰치 이형 접합율은 각각 0.698과 0.732로 조사되어, 현재 확보된 명태 집단의 유전적 다양성은 비교적 잘 유지되고 있는 것으로 나타났다. 유전학적 유연관계 분석을 위한 유전적 거리, Pairwise $F_{ST}$값, UPGMA와 주성분분석, AMOVA test 분석 결과, 우리나라 동해, 러시아, 미국의 명태 집단 간 유전적 차이는 거의 없었으나 일본 명태 집단과는 낮은 수치이지만 유의한 유전적 차이가 있음을 확인하였다($p$<0.05). 본 연구에서 확인된 유전학적 분석을 통한 명태 집단의 유전적 특성 및 주변국 집단과의 유연관계 분석결과는 우리나라 동해의 중요한 수산유전자원으로서의 명태에 대한 중요한 과학적인 근거자료가 될 것이며, 앞으로 명태 자원의 보존, 평가 및 이용에 활용 가능한 정보를 제공할 것이다.