

Original article

## 섬진강-광양만 하구 기수 재첩 (*Corbicula japonica*)의 분자 계통유전학적 분석

김지훈<sup>1</sup> · 김원석<sup>1</sup> · 박기연<sup>2</sup> · 곽인실<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 해양융합과학과, <sup>2</sup>전남대학교 수산과학연구소

**Molecular Phylogenetic Analysis of the Brackish Water Clam (*Corbicula japonica*) from Seomjin River to Gwangyang Bay, South Korea.** Ji-Hoon Kim<sup>1</sup> (0000-0002-1157-9308), Won-Seok Kim<sup>1</sup> (0000-0003-3368-3891), Kiyun Park<sup>2</sup> (0000-0003-2965-6970) and In-Sil Kwak<sup>1,2,\*</sup> (0000-0002-1010-3965) (<sup>1</sup>Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; <sup>2</sup>Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

**Abstract** An estuary is a water ecosystem with a high abundance of the species diversity, due to a variety of complex physicochemical factors of the area where freshwater and ocean mixed. The identification of *Corbicula* species in the estuary environments is difficult because of various morphological characteristics. In this study, we provide taxonomic information on *Corbicula* species with taxonomic difficulties using morphological and genetic analysis. This study was conducted on clams from the Seomjin River-Gwangyang Bay, one of the major production area of marsh clam in Korea. As a result, we characterized Cytochrome C Oxidase subunit I (COI) sequences of the *Corbicula*. The 636 bp nucleotide sequences of COI have 98% homology among *Corbicula* species collected from 2 sites of Seomjin River-Gwangyang Bay. The phylogenetic analysis with 17 species of *Corbicula* indicated that most of the species collected from Seomjin River-Gwangyang Bay were brackish water clam (*Corbicula japonica*), and only one Asian clam (*Corbicula fluminea*). The evolutionary distance between *C. japonica* and *C. fluminea* was less than 0.003. Therefore, it was confirmed that *C. japonica* is phylogenetically closely related to *C. fluminea*. In 9 species of Cyrenidae, phylogenetic tree was classified into three lineages. These results will be used as an important data for an identification of clam species by providing genetic information for *Corbicula* species with a morphological diversity.

**Key words:** *Corbicula japonica*, cytochrome c oxidase subunit I (COI), phylogenetic analysis, Seomjin River, estuary

### 서론

자연형 하구는 담수와 해수가 혼합되어 이화학적 특성

이 복합적으로 나타나는 장소로 서식하는 생물 종의 다양성이 높은 생태계이다. 우리나라 주요 하구는 5대강의 한강, 낙동강, 영산강, 금강, 섬진강 등이 존재하며, 그중 섬진강은 열린 하구로 높은 자연상태를 보존하고 있는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2012). 하구는 생태계 내 다양한 어류의 산란장소로 은신처, 서식지로 이용되고 더불어 새

Manuscript received 5 July 2022, revised 5 September 2022,  
revision accepted 5 September 2022

\* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149  
E-mail: inkwak@hotmail.com / iskwak@chonnam.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

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, provide the original work is properly cited.

를 비롯한 다양한 야생동물들의 서식처로 알려져 있다. 또한 하구 내 습지식물과 갯벌은 생태계 정화 및 탄소순환에 많은 기여를 하는 것으로 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2005). 그러나 하구의 하류 지역은 산단을 비롯한 도심을 거치며 육상 기원의 유입 오염물질들은 하구 생태계를 교란시켜 지속적인 생물 종 다양성 감소를 유발하는 것으로 알려져 있다(Rodgers *et al.*, 2020). 특히, 광양만은 수출입이 늘어나면서 원유 및 유류관련 제품을 수송하는 대형 선박들의 입, 출항이 잦아졌고, 씨프린스 호 충돌로 유류오염 사고로 오랜 기간 동안 연안생태계 회복을 위한 시간을 거치기도 하였다(Yoo, 2007).

재첩은 연체동물문 백합목 재첩과에 속하고 우리나라 전역에 서식하는 것으로 알려져 있다. 재첩은 섭식기능군이 여과 섭식자로 분류되며, 생태계 내 물질순환 및 동·식물플랑크톤 군집분포에 영향을 준다. 재첩에 대한 연구는 염분과 암모니아, 아질산이 재첩에 미치는 독성 영향평가 연구(Lee *et al.*, 2016), 재첩의 정자형성 과정과 정자 미세구조(Lee *et al.*, 2004) 등 다양한 결과가 보고되었다. 섬진강은 우리나라 재첩 생산량의 약 30%를 차지하고 있으며, 지역 내 어업에서 재첩은 많은 경제적 비중을 차지하여 수산업적 가치가 높다. 하지만 1990년대 후반 이후로 재첩의 생산량이 점차 감소하는 경향을 나타내어 재첩 보존의 중요성이 높아지고 있다(Lee *et al.*, 2012). 본 연구지역 내에서 재첩은 주로 *C. japonica*가 채집되어지나, 그중 일부는 *Corbicula fluminea*가 채집되어 중간 동정에 어려움이 있다. 종간의 형태적 분류는 외부형태의 유사성과 종내 환경에 따른 패각 무늬의 다양성으로 동정에 오류가 자주 발생하여 어려움을 겪고 있는 실정이다.

DNA 바코딩 연구는 형태적으로 분류가 어려운 생물 종에 대한 유전적 정보를 이용하여 종간 분류에 대한 객관적인 자료로 활용할 수 있다. DNA 바코딩은 대상 생물의 DNA를 이용하여 종 동정뿐 아니라 생물의 유전적 기원 및 근연종 간의 차이성에 대한 정보를 알 수 있게 도와준다(Kocher *et al.*, 1993). 미토콘드리아 DNA는 모계유전 특성을 지니고 있기 때문에 유전적 다양성과 계통지리적 연구, 개체군 분류 등과 같은 정보를 제공하기에 DNA 바코딩 연구에서 주로 적용된다. DNA 바코딩에 대한 기존 연구로는 담수에 서식하는 어류인 누치(*Hemibarbus labeo*)의 미토콘드리아 DNA Cytochrome c oxidase subunit (COI) 시퀀스를 이용한 계통진화적 연구(Park *et al.*, 2019), 타이완 해협의 어류 종 동정(Bingpeng *et al.*, 2018), 맹그로브 Sundarbans 숲에 서식하는 기수 및 해수 어류와 조개류의 개체군 파악을 위한 DNA 바코딩 연구(Habib *et al.*, 2021)가 보고되었다. 본 연구에서는 DNA 바코딩을 이용하여 형태학적 분류에 어려움이 있는 재첩의 종 동정에 대한 유전자 정보를 파악하고자 한다. 이를 위해 섬진강 하구 내 서식하는 재첩을 대상으로 COI을 이용하여 재첩 종간 계통학적 정보와 종 분류에 대한 정보를 알아보하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 생물 채집 정보

본 연구에서 분석된 기수재첩(*C. japonica*)은 2021년 9월 섬진강 일대에서 형망을 이용하여 채집하였다. 섬진

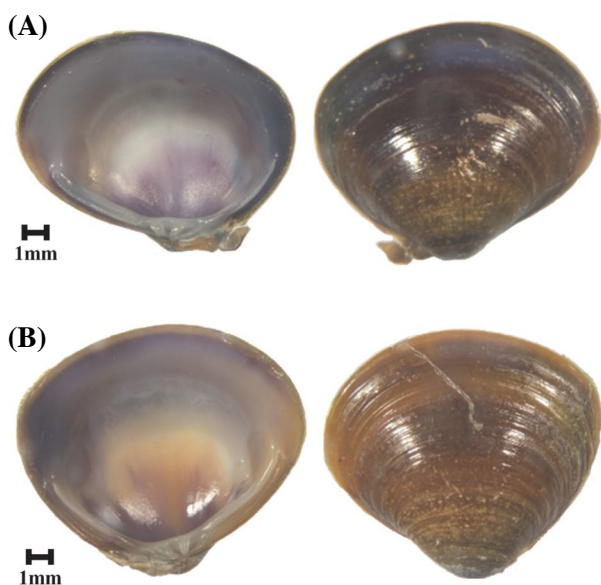


Fig. 1. Map of sampling sites in Korea.

강 지점은 A site (N 35°06'01.4", E 127°42'01.3"), B site (N 34°58'38.5", E 127°45'50.9")로 총 2지점에서 진행하였다 (Fig. 1). 현장에서 채집한 총 19마리의 채집은 즉시 실험실로 이동하여 각장 (Shell length, SL), 각고 (Shell height, SH), 무게 (Body weight, BW)를 측정하고, 조직을 해부하여  $-80^{\circ}\text{C}$  Deep freezer (Thermo Fisher Scientific)에 보관하였다 (Fig. 2) (Table 1).

## 2. 기수채집 Genomic DNA 추출

채집의 total genomic DNA 추출은 AccuPrep genomic



**Fig. 2.** External morphology of *Corbicula japonica* used in this study. (A): collected on A site, (B): collected on B site.

DNA extraction kit (Bioneer)를 이용하여 제공되는 Protocol에 따라 진행하였다. 실험 방법은 EP Tube에 TL Buffer 200  $\mu\text{L}$ 를 넣고 연체부를 homogenize하여 균질하게 하고, Proteinase K 20  $\mu\text{L}$ 와 RNase A 10  $\mu\text{L}$ 를 넣어 단백질과 RNA를 제거하였다. 이후  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 약 1시간 Lysis 과정을 거친 뒤, GB Buffer와 Ethanol을 넣고 원심분리를 하여 상등액을 취하였다. WA1, WA2 Buffer를 통해 washing 과정을 거친 후 EA Buffer로 Genomic DNA를 elution하여 샘플 사용 시까지  $-80^{\circ}\text{C}$  Deep freezer (Thermo Fisher Scientific)에 보관하였다. 추출한 DNA의 순도와 정량은 1.0% Agarose gel (w/v)과 Microplate reader (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific)를 통해 확인하였다.

## 3. 미토콘드리아 DNA의 COI 유전자 PCR 증폭과 염기서열 분석

채집의 미토콘드리아 DNA에서 COI 유전자 증폭을 위해 Bioneer의 Taq DNA polymerase를 사용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하였다. 증폭에 이용된 Primer는 Forward: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'와 Reverse: 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'이다 (Ward *et al.*, 2005). 30  $\mu\text{L}$  PCR mixture에는 20  $\mu\text{L}$  멸균된 ultrapure water, 3.0  $\mu\text{L}$  10 $\times$  PCR buffer, 1  $\mu\text{L}$  forward, reverse primer (20 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  each), 0.5  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase (2.5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), Bioneer, Korea), 그리고 genomic DNA template (25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) 등이 포함된다. PCR cycle 조건은  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 초기 변성 후  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 40초 변성,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 40초 primer 결합,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 합성 과정을 40회 반복하여 증폭하였으며, 반복 완료 후 최종 합성은  $72^{\circ}\text{C}$

**Table 1.** List of *Corbicula* species collected from Seomjin River-Gwangyang Bay.

ID	Coordinates	SL (cm)	SH (cm)	W (g)
A-1	A site (N 35.10, E 127.70)	1.3	1.1	0.62
A-2	A site (N 35.10, E 127.70)	1.4	1.1	0.71
A-3	A site (N 35.10, E 127.70)	1.3	1.0	0.57
A-4	A site (N 35.10, E 127.70)	1.2	1.1	0.58
A-5	A site (N 35.10, E 127.70)	1.4	1.2	1.10
A-6	A site (N 35.10, E 127.70)	1.5	1.2	0.77
B-1	B site (N 34.98, E 127.76)	1.0	0.8	0.28
B-2	B site (N 34.98, E 127.76)	1.0	0.9	0.41
B-3	B site (N 34.98, E 127.76)	1.0	0.8	0.35
B-4	B site (N 34.98, E 127.76)	1.2	1.0	0.52
B-5	B site (N 34.98, E 127.76)	1.2	1.1	0.68
Ave (SD)		1.2 (0.17)	1.0 (0.14)	0.6 (0.21)



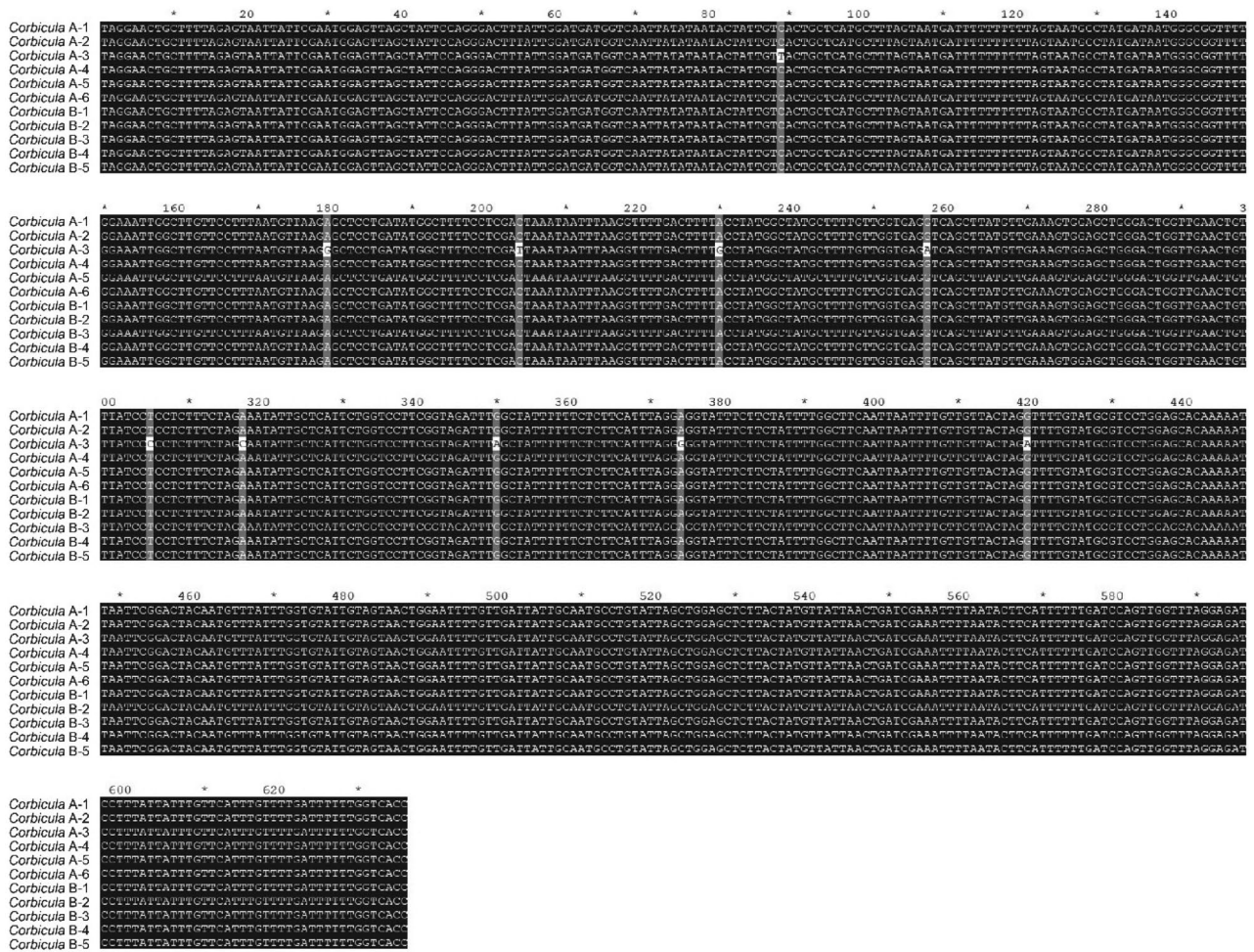


Fig. 3. Multiple alignment of COI sequences in *Corbicula* of Seomjin River-Gwangyang Bay.

에서 10분간 이루어졌다. PCR 결과는 1.5% Agarose gel 을 이용한 전기 영동을 통해 시각적으로 확인하였다. 또한 PCR 증폭된 결과물(PCR amplification products)은 DNA Gel Extraction Kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용해 PCR product를 정제하고 (purified), ABI3730x1 DNA Analyzer 플랫폼 (Macrogen, Korea)으로 Sequencing하여 염기서열 을 결정하였다.

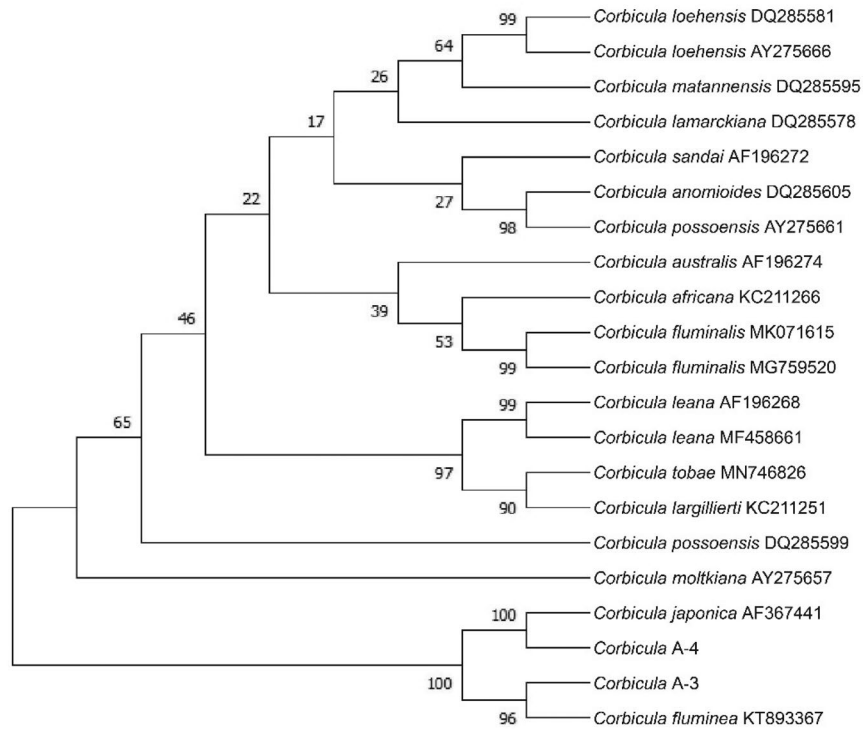
4. DNA 데이터 분석

섬진강에서 채집된 재첩의 COI 유전자 시퀀스는 NCBI GenBank 데이터베이스에 있는 재첩속, 재첩과에 속하는 종들의 상동 서열 (homologous sequences)을 비교하였다. 다중배열 분석은 Clustal W와 Gene Doc Program (version 2.6.001)을 이용하여 수행하였다. 계통유전학적 분석 (phylogenetic analysis)은 Mega X software (version 10.04)을 이

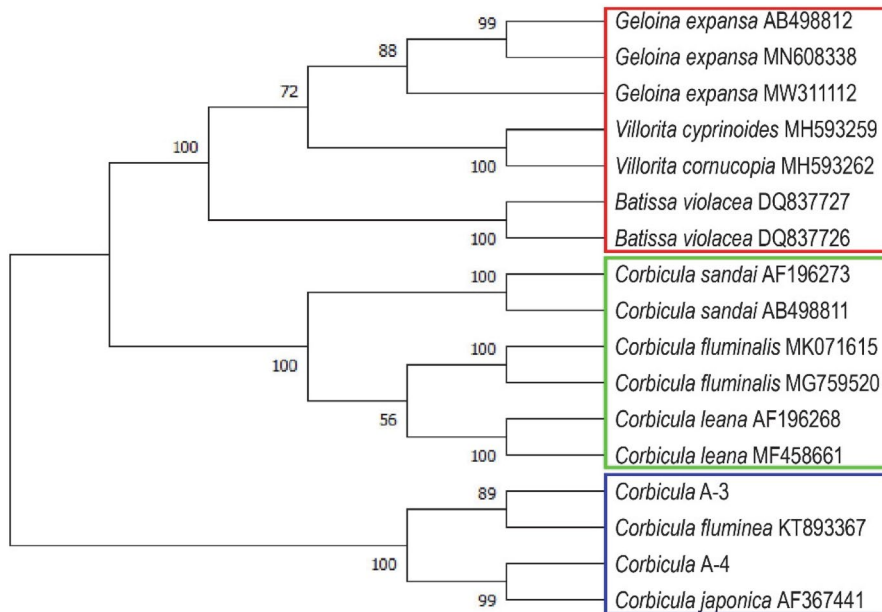
용하여 1000 bootstrap으로 neighbor-joining trees로 분석하였다. 또한, 쌍의 진화적 거리 (pairwise genetic distances)는 Mega X software (version 10.2.6)의 Maximum Composite Likelihood method를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 섬진강 하구 서식 재첩류를 이용하여 형태적 특징과 DNA 바코딩을 기반으로 유전적 차이를 분석하여 비교하였다. 기수재첩 (*C. japonica*)은 주로 섬진강 일대에 서식하고 황색 바탕에 흑갈색 무늬가 있으며 패각 내면은 자색을 띠지만, 패각의 색깔과 무늬가 일정하지 않다. 아시아재첩 (*C. fluminea*)은 동아시아 및 북미, 유럽 전역에 서식하며 외부 형태는 환경 변화에 영향을 받고 패각 내부의 색상은 유전적 영향을 받아 매우 다양한 형태로 존재



**Fig. 4.** Phylogenetic tree of the COI sequences in 17 species of *Corbicula* constructed by neighbor-joining analysis(bootstrap value 1000). The numbers at the nodes are the percentage bootstrap values.



**Fig. 5.** Phylogenetic tree of the COI sequences in 8 species of Cyrenidae constructed by neighbor-joining analysis (bootstrap value 1000). The numbers at the nodes are the percentage bootstrap values. The red line indicates one group of the Corbiculidae: *Geloina expansa*, *Villorita cyprinoides*, *Villorita cornucopia*, *Batissa violacea*, the green line indicates another group of the *Corbicula*: *Corbicula sandai*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula leana*, and the blue line indicates other group of *Corbicula fluminea*, *Corbicula japonica* and Seomjin River *Corbicula*.

**Table 2.** List of Cyrenidae for phylogenetic analysis in NCBI.

Scientific name	Accession No.	Region	Country
<i>Corbicula japonica</i>	KC211258	Kano River	Japonica
	AF367441		South Korea
<i>Corbicula fluminea</i>	KM659015	Hongze Lake	China
	KT893367	Yangtze River	China
	MW008738		
<i>Corbicula fluminalis</i>	MK071615	Kura River	Azerbaijan
	MG759520	Yuras River	Russia
<i>Corbicula possoensis</i>	AY275661	Poso River	Indonesia
	DQ285599		
<i>Corbicula loehnesis</i>	DQ285581	Poso River	Indonesia
	AY275666		
<i>Corbicula sandai</i>	AF196273	Biwa Lake	Japan
	AB498811	Biwa Lake	Japan
<i>Corbicula leana</i>	AF196268	Toyo River	Japan
	MF458661	Durance River	France
<i>Corbicula tobae</i>	MN746826	Toba Lake	Indonesia
<i>Corbicula largillierti</i>	KC211251	Mujiang River	China
<i>Corbicula australis</i>	AF196274	Menangle	Australia
<i>Corbicula africana</i>	KC211266	Mooi River	South Africa
<i>Corbicula anomioides</i>	DQ285605	Sulawesi	Indonesia
<i>Corbicula lamarckiana</i>	DQ285578	Sulawesi	Indonesia
<i>Corbicula matannensis</i>	DQ285595	Sulawesi	Indonesia
<i>Corbicula subplanata</i>	DQ285603	Sulawesi	Indonesia
<i>Corbicula linduensis</i>	DQ285579	Sulawesi	Indonesia
<i>Corbicula moltkiana</i>	AY275657		
<i>Batissa violacea</i>	DQ837727	Sulawesi	Indonesia
	DQ837726	Sulawesi	Indonesia
<i>Geloina expansa</i>	AB498812	Iriomote Island	Japan
	MW311112		
	MN608338	Hainan Island	China
<i>Villorita cyprinoides</i>	MH593259	Cochin	India
<i>Villorita cornucopia</i>	MH593262	Cochin	India

하기 때문에 형태적 특징만으로 분류가 어렵다(Hsu *et al.*, 2020). 재첩 형태 연구에서 기존에 보고된 것처럼, 기수재첩 (*C. japonica*)은 서식지에 따라 개체 표면은 흑갈색에 가깝게 나타나며 패각 내면은 보라색에 가깝게 나타난다 (Fig. 2). 반면, *C. fluminea*는 표면이 광택이 있는 황색 및 황갈색에 가까우며 각정이 거의 중앙에 위치해 있다. 또한, 패각 내면의 측치 부분은 보라색에 가까우며 중앙 부분은 흰색에 가까운게 형태학적 분류 특징으로 제시되고 있다. 이와 같은 형태학적 연구 외에도 재첩의 유전적 및 형태학적 다양성 (Sousa *et al.*, 2007; Voroshilova *et al.*, 2021), 오염물질에 대한 재첩의 생태독성학적 반응 (Guo and Feng,

2018) 등 분자적 및 생물학적 특징을 이용한 생태독성학적 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 재첩의 미토콘드리아 DNA 내 COI 유전자를 이용하여 염기서열을 분석한 결과, 섬진강 하구 내의 두 지점에서 채집된 재첩의 염기서열은 약 98% 상동성을 보였다 (Fig. 3). 본 연구에서 사용된 재첩의 COI 시퀀스를 NCBI (National Center for Bio technology Information) GenBank에 등록된 재첩 속 17종 (*Corbicula leana*, *Corbicula tobae*, *Corbicula largillierti*, *Corbicula australis*, *Corbicula africana*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula anomioides*, *Corbicula possoensis*, *Corbicula lamarckiana*, *Corbicula matannensis*, *Corbicula loe-*

Table 3. Pairwise distance matrix from the nucleotide substitution of *Corbicula* COI sequences of Kimura 2-parameter distance model in Mega X software.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
1	-																																							
2	0.012	-																																						
3	0.022	0.025	-																																					
4	0.010	0.004	0.028	-																																				
5	0.019	0.009	0.030	0.010	-																																			
6	0.015	0.003	0.025	0.006	0.007	-																																		
7	0.012	0.009	0.025	0.007	0.012	0.009	-																																	
8	0.013	0.013	0.024	0.016	0.016	0.010	0.016	-																																
9	0.010	0.018	0.022	0.016	0.016	0.018	0.015	0.016	-																															
10	0.015	0.018	0.028	0.015	0.018	0.015	0.013	0.006	0.016	-																														
11	0.016	0.013	0.027	0.015	0.009	0.013	0.009	0.015	0.009	0.013	-																													
12	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-																												
13	0.002	0.002	0.015	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	-																											
14	0.017	0.017	0.000	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.015	-																										
15	0.020	0.020	0.003	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.019	0.003	-																									
16	0.017	0.017	0.003	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.016	0.003	0.007	-																								
17	0.100	0.101	0.093	0.100	0.101	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.101	0.099	0.093	0.095	0.097	-																							
18	0.115	0.107	0.099	0.111	0.103	0.105	0.113	0.105	0.111	0.107	0.100	0.098	0.091	0.093	0.093	0.002	-																							
19	0.097	0.097	0.089	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.095	0.089	0.091	0.093	0.034	-																						
20	0.119	0.121	0.111	0.121	0.121	0.121	0.121	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.097	0.095	0.089	0.091	0.093	0.034	0.000	-																				
21	0.116	0.110	0.102	0.113	0.106	0.108	0.115	0.108	0.108	0.113	0.110	0.102	0.099	0.093	0.095	0.097	0.025	0.023	0.027	-																				
22	0.116	0.110	0.102	0.113	0.106	0.108	0.115	0.108	0.108	0.113	0.109	0.102	0.099	0.093	0.095	0.097	0.025	0.023	0.027	0.000	-																			
23	0.117	0.110	0.102	0.114	0.106	0.108	0.115	0.108	0.108	0.113	0.110	0.104	0.101	0.095	0.097	0.027	0.023	0.028	0.014	0.014	-																			
24	0.116	0.109	0.102	0.113	0.106	0.107	0.114	0.108	0.107	0.113	0.109	0.099	0.097	0.091	0.093	0.039	0.038	0.012	0.016	0.023	0.023	-																		
25	0.105	0.105	0.097	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	0.106	0.103	0.097	0.099	0.101	0.022	0.024	0.028	0.028	0.023	0.028	0.034	-																
26	0.097	0.097	0.089	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.098	0.095	0.089	0.091	0.093	0.018	0.021	0.028	0.028	0.020	0.020	0.022	0.030	0.020	-														
27	0.097	0.097	0.095	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.099	0.095	0.097	0.099	0.034	0.036	0.041	0.041	0.035	0.035	0.037	0.046	0.032	0.035	-													
28	0.111	0.111	0.103	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.112	0.109	0.103	0.105	0.107	0.028	0.030	0.035	0.035	0.030	0.030	0.035	0.041	0.010	0.030	0.039	-												
29	0.111	0.109	0.103	0.111	0.109	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.111	0.110	0.107	0.101	0.103	0.105	0.027	0.030	0.034	0.034	0.028	0.028	0.034	0.039	0.025	0.025	0.041	0.035	-											
30	0.103	0.103	0.095	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.103	0.104	0.101	0.095	0.097	0.099	0.022	0.024	0.025	0.025	0.023	0.023	0.028	0.030	0.020	0.023	0.035	0.030	0.018	-										
31	0.100	0.100	0.096	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.102	0.099	0.097	0.099	0.101	0.020	0.023	0.023	0.023	0.022	0.022	0.027	0.029	0.018	0.022	0.034	0.029	0.017	0.002	-									
32	0.099	0.099	0.091	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.100	0.097	0.091	0.093	0.093	0.020	0.021	0.030	0.030	0.022	0.022	0.023	0.032	0.022	0.002	0.037	0.032	0.027	0.025	0.024	-								
33	0.099	0.099	0.095	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.099	0.100	0.097	0.095	0.097	0.099	0.018	0.021	0.028	0.028	0.020	0.020	0.022	0.030	0.023	0.020	0.032	0.030	0.025	0.013	0.012	0.022	-							
34	0.093	0.093	0.089	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.093	0.094	0.091	0.089	0.091	0.091	0.039	0.038	0.044	0.044	0.039	0.039	0.041	0.048	0.046	0.035	0.044	0.057	0.044	0.039	0.037	0.037	-								
35	0.113	0.113	0.105	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.113	0.114	0.111	0.105	0.107	0.110	0.030	0.032	0.037	0.037	0.025	0.025	0.027	0.037	0.035	0.028	0.044	0.039	0.041	0.035	0.034	0.030	0.025	0.051	-						
36	0.114	0.107	0.099	0.111	0.103	0.105	0.112	0.105	0.105	0.111	0.107	0.100	0.098	0.092	0.094	0.096	0.041	0.034	0.017	0.017	0.030	0.030	0.036	0.015	0.039	0.032	0.052	0.044	0.044	0.035	0.034	0.032	0.035	0.052	0.044	-				

1. *Corbicula* A-1; 2. *Corbicula* A-2; 3. *Corbicula* A-3; 4. *Corbicula* A-4; 5. *Corbicula* A-5; 6. *Corbicula* A-6; 7. *Corbicula* A-7; 8. *Corbicula* B-1; 9. *Corbicula* B-2; 10. *Corbicula* B-3; 11. *Corbicula* B-4; 12. *Corbicula* B-5; 13. *Corbicula* japonica; *Corbicula* japonica; 14-16. *Corbicula fluminea*; 17, 18. *Corbicula sandai*; 19, 20. *Corbicula leanai*; 21, 22. *Corbicula fluminatis*; 23. *Corbicula africana*; 24. *Corbicula tobac*; 25. *Corbicula anomoides*; 26. *Corbicula subplanata*; 27, 28. *Corbicula possoensis*; 29. *Corbicula matanensis*; 30, 31. *Corbicula loehensis*; 32. *Corbicula imdiensis*; 33. *Corbicula tamarekiana*; 34. *Corbicula malkiana*; 35. *Corbicula australis*; 36. *Corbicula largillerti*



*hensis*, *Corbicula sandai*, *Corbicula subplanata*, *Corbicula linduensis*, *Corbicula moltkiana*, *C. fluminea*, *C. japonica*) 과 계통유전학적으로 비교 분석하였다(Fig. 4). 섬진강 재첩들은 대부분 *C. japonica*로 확인되었고, 그중 한 개체가 *C. fluminea*로 확인되었다. *C. fluminea*으로 추정되는 재첩의 계통유전학적 차이를 파악하고자 재첩 내 9종의 COI 시퀀스를 이용하여 계통수 분석을 진행하였다. Phylogenetic tree 분석은 크게 3개의 계통으로 분류되었다. 재첩과인 *Geloina expansa*, *Villorita cyprinoides*, *Villorita cornucopia*, *Batissa violacea*가 1개의 그룹으로 형성되고, 재첩 속인 *C. sandai*, *C. fluminalis*와 *C. leana*가 다른 그룹으로, *C. japonica*, *C. fluminea*와 섬진강 재첩이 하나의 그룹으로 형성되었다(Fig. 5). 또한 Kimura 2-parameter distance model을 통해 Pairwise distance를 분석한 결과, 본 연구에 채집된 *C. japonica*와 *C. fluminea*의 진화적 거리는 0.003 이하로 나타났다. 그 외에 *C. leana*와 0.089, *C. fluminalis*와 0.096, *B. violacea*와 0.193, *G. expansa*와 0.190, *V. cyprinoides*와 0.194로 확인되었다(Table 3). 이와 같은 결과를 바탕으로, 섬진강 하구에서 채집된 *C. japonica*와 *C. fluminea*은 계통유전학적으로 재첩과 내 *C. japonica*와 두 재첩 종의 형태적, 유전적 유사함은 재첩 분류를 어렵게 한다. 따라서, DNA 바코딩 기술은 형태적으로 분류에 어려움이 있는 생물의 종 동정을 위한 객관적 도구로 이용할 수 있다.

본 연구에서는 섬진강 내 재첩을 대상으로 염기서열 비교와 함께 형태적 분류를 통해 *C. fluminea*와 *C. japonica*으로 분류되었다. 형태적 종 동정에 대한 제한점이 존재하는 종을 대상으로 DNA 바코딩 기술은 종 동정에 대한 객관적인 유전학적 근거를 제시할 수 있다(Park *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2020). 또한, 이를 통해 종 간 진화계통학적 관계성에 대한 정보를 알 수 있다. 기존 연구에서는 미토콘드리아 DNA를 이용하여 아시아 내 분포하는 다양한 재첩에 대한 계통유전학적 관계성에 대해 보고하였다(Park *et al.*, 2003). DNA 메타바코딩을 활용하여 해양 저서환경에 환형동물, 절지동물이 우점하는 등 생물다양성을 파악하는 연구가 보고되었다(Leray *et al.*, 2014). 재첩의 미토콘드리아 DNA 내 COI 시퀀스를 이용한 계통유전학적 분석은 잘 알려지지 않은 분류군과 형태학적 분석만으로는 식별하기 힘든 종에 대한 유전적 정보를 제공한다(Song *et al.*, 2015). 생물의 유충이나 같은 속 내 형태적 유사성이 높은 복족류의 종 동정을 위해 형태분류 방법과 COI 시퀀스를 활용하여 높은 정확도의 동정 연구가 진행되기도 하였다(Ran *et al.*, 2020). 또한, COI을 이용한 이매패류 분류 연구는 분류학적 동정 키워드가 정리되어 있지 않아 분류에 어

려움이 있는 종에 대한 DNA 바코딩 분석은 형태학적 분류 키와 함께 생물 분류학적으로 유용한 정보를 제공한다.

## 적 요

재첩은 하구생태계에 서식하는 종으로, 우리나라에는 섬진강 하구에서 가장 많이 분포하는 것으로 알려져 있다. 섬진강 하구에 서식하는 재첩은 담수와 해수생태계의 변화를 잘 반영하는 종이다. 재첩은 외부형태만으로는 종 동정이 어려운 분류군에 속한다. 본 연구에서는 섬진강 서식 재첩의 종 동정을 위해 형태적 관찰뿐만 아니라 미토콘드리아 DNA의 COI 유전자 기반 DNA 바코딩을 통해 분석하였다. 그 결과 재첩 간 다른 두 종을 확인하였으며, COI 염기서열의 다중배열 분석결과 약 98%의 높은 상동성을 보였다. 재첩과 내 다양한 종들과 계통수 분석으로 계통유전학적 위치를 확인한 결과, 본 연구에서 사용한 재첩은 *C. japonica*, *C. fluminea*와 하나의 계통군으로 묶여졌고 진화적 거리는 0.003 이하로 나타났다. 또한 재첩속인 *C. leana*와 0.089, *C. fluminalis*와 0.096으로, 재첩과 내 3종과는 약 0.2로 *C. japonica*에 비해 상대적으로 진화적 거리가 먼 것으로 나타났다. 계통유전학적 분석을 통해 본 연구에서 사용한 재첩은 *C. japonica*이고, 그중 한 개체가 *C. fluminea*인 것으로 확인되었다. 이러한 연구 결과는 DNA 바코딩을 이용한 섬진강 하류 지역에 서식하는 재첩의 COI 시퀀스를 통해 계통유전학적 정보를 제공하여 형태학적 분석에 어려움이 있는 종에 대한 중요한 자료로 활용될 것이다.

**저자정보** 김지훈(전남대학교 해양융합과학과 석사과정), 김원석(전남대학교 해양융합과학과 박사과정), 박기연(전남대학교 수산과학연구소 학술연구교수), 광인실(전남대학교 해양융합과학과 교수)

**저자기여도** 개념설정: 광인실, 방법론: 광인실 & 박기연, 분석: 김지훈 & 김원석, 자료제공: 광인실 & 박기연, 자료관리: 김지훈 & 김원석, 원고 초안작성: 김지훈 & 김원석, 원고 교정: 광인실, 박기연, 김지훈, 원고 편집 및 검토: 광인실, 박기연, 김원석, 김지훈, 과제관리: 광인실, 연구비 수주: 광인실, 모든 저자는 논문의 결과에 동의하였고, 출판될 최종본을 검토하고 동의하였습니다.

**이해관계** 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

**연구비** 이 논문은 한국연구재단 중점연구사업의 지원(NRF-2018-R1A6A1A-03024314)과 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원(2021003050001)을 받아 수행된 연구임.



## REFERENCES

- Bingpeng, X., L. Heshan, Z. Zhilian, W. Chunguang, W. Yanguo and W. Jianjun. 2018. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PloS One* **13**(6): e0198109.
- Guo, X. and C. Feng. 2018. Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. *Science of the Total Environment* **631**: 56-70.
- Habib, K.A., A.K. Neogi, M. Rahman, J. Oh, Y.H. LEE and C.G. Kim. 2021. DNA barcoding of brackish and marine water fishes and shellfishes of Sundarbans, the world's largest mangrove ecosystem. *PloS One* **13**(6): e0255110.
- Hsu, T.H., A. Komaru and J.C. Rahman. 2020. Genetic diversity and clonality of the Asian clam *Corbicula fluminea* are reflected by inner shell color pattern. *Aquatic Invasions* **15**(4): 633-645.
- Kim, C.H., E.J. Kang, H. Yang, K.S. Kim and W.S. Choi. 2012. Characteristics of Fish Fauna Collected from Near Estuary of Seomjin River and Population Ecology. *Korean Journal of Environmental Biology* **30**(4): 319-327.
- Kim, G., C. Lee, H. Yoon and G. Joo. 2005. Changes of Distribution of Vascular Hydrophytes in the Nakdong River Estuary and Growth Dynamics of *Schenoplectus triqueter*, Waterfowl Food Plant. *Journal of Ecology and Environment* **28**(5): 335-345.
- Kocher, T.D., J.A. Conroy, K.R. McKaye and J.R. Stauffer. 1993. Similar morphologies of cichlid fish in Lakes Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**(6): 158-165.
- Lee, J.B., Y.J. Sin, J.H. Lee, Y.M. Choi, D.W. Lee and H.K. Cha. 2012. Estimation of potential fishery yield for *Corbicula japonica* in the Seomjin River, Korea. *The Korean Journal of Malacology* **28**(2): 91-99.
- Lee, J.Y., W.K. Kim, C.S. Lee and Y.J. Chang. 2004. Spermatogenesis and sperm ultrastructure of the marsh clam (*Corbicula japonica*) (Bivalvia: Veneridae). *The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science* **37**(4): 281-286.
- Lee, Y.S., H.S. Choi, W.H. Kim and C.J. Cheong. 2016. Evaluation of acute toxicity of salinity, ammonia, and nitrite to *Corbicula*. *Journal of Korean Society of Environmental Technology* **17**(6): 542-547.
- Leray, M. and N. Knowlton. 2014. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**(7): 2076-2081.
- Park, J.K. and W. Kim. 2003. Two *Corbicula* (Corbiculidae: Bivalvia) mitochondrial lineages are widely distributed in Asian freshwater environment. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**(3): 529-539.
- Park, J.W., K. Park and I.S. Kwak. 2020. Phylogenetic Analysis Using Cytochrome c Oxidase Subunit I of Silver Croaker (*Pennahia argentata*) Mitochondria DNA. *Korea Journal of Ecology and Environment* **53**(3): 265-274.
- Park, K., W.O. Lee and I.S. Kwak. 2019. Molecular Phylogenetic Study of the Barbel Steed (*Hemibarbus labeo*) in Seomjin River of Korea. *Korean Journal of Ecology and Environment* **52**(3): 221-230.
- Ran, K., Q. Li, L. Qi, W. Li and L. Kong. 2020. DNA barcoding for identification of marine gastropod species from Hainan island, China. *Fisheries Research* **225**: 105504.
- Rodgers, K., I. McLellan, T. Peshkur, R. Williams, R. Tonner, C.W. Knapp, F.L. Henriquez and A.S. Hursthouse. 2020. The legacy of industrial pollution in estuarine sediments: spatial and temporal variability implications for ecosystem stress. *Environmental Geochemistry and Health* **42**(4): 1057-1068.
- Song, Y.S., T. Ban and J. Kim. 2015. Molecular Phylogeny and Taxonomic Review of the Family Liparidae (Scorpaenoidei) from Korea. *Korean Journal of Ichthyology* **27**(3): 165-182.
- Sousa, R., R. Freire, M. Rufino, J. Méndez, M. Gaspar, C. Antunes and L. Guilhermino. 2007. DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. *PloS One* **13**(6): e0198109.
- Voroshilova, I.S., E.G. Pryanichnikova, A.A. Prokin, R.Z. Sabitova, D.P. Karabanov, D.D. Pavlov and E.M. Kurina. 2021. Morphological and genetic traits of the first invasive population of the Asiatic Clam *Corbicula fluminea* (OF Müller, 1774) naturalized in the Volga River basin. *Russian Journal of Biological Invasions* **12**(1): 36-43.
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last and P.D. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **B360**: 1847-1857.
- Yoo, S. 2007. Measurement of the Environmental Value of the Seomjin-River Estuary. *Journal of Environmental Policy* **6**(2): 1-25.