

한국 동해안에 서식하는 진주담치(*Mytilus edulis*)의 미토콘드리아 DNA 다형현상

김익수[†] · 민병윤 · 윤명희* · 김도훈**

경남대학교 공간환경 시스템 공학부

*경성대학교 자연과학부

**동아대학교 생명자원과학부

Mitochondrial DNA Polymorphism of the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Species Complex on the East Coast of Korea

Ik-Soo Kim[†], Byung-Yoon Min, Myung-Hee Yoon*, and Doh-Hoon Kim**

Division of Architectural, Civil and Environmental Engineering, Kyungnam University, Masan, 630-701, Korea

*Faculty of Natural Sciences, Kyungsung University, Pusan, 608-736, Korea

**Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea

Abstract

Mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism of the blue mussel (*Mytilus edulis*) species complex sampled from the east coast of Korea was studied using a partial sequence of COIII gene (336 bp). Samples obtained from three localities on the east coast of Korea revealed four haplotypes with two clearly differentiated mitochondrial clades (termed clades B and E), separated by 4.2% of minimum sequence divergence. This pattern indicates no difference between east and south coasts of Korea. According to population genetic theory on evolutionary characteristics of mtDNA, we concluded that mtDNA introgression from *M. edulis* to *M. galloprovincialis* might be a source for mtDNA polymorphism found in mussels on the east coast of Korea.

Key words – Mitochondrial DNA polymorphism, Blue mussel, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*

서 론

우리 나라에 서식하는 진주담치(*Mytilus edulis*)의 학명은 일본 연안에 서식하는 진주담치와의 산란시기와 번식생태의 유사성[18] 그리고 우리 나라 남해안, 동해안 및 일본 연안에 서식하는 진주담치와의 패각형태의 유사성으로

[17] 지중해산의 *M. galloprovincialis*로 보고되고 있는 실정이다. 이러한 가운데 Kim 등[5]은 우리 나라 남해안에 서식하는 진주담치의 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 분석하여 이들 집단의 계통지리학적 분포는 Avise 등 [1]의 category II 즉, 같은 지역에 비연속적이며 계통적으로 다른 두 가지 미토콘드리아 유전자형이 존재하는 유형에

[†] Corresponding author

해당한다고 보고한 바 있다. 이러한 유형을 가진 mtDNA 다형현상의 원인으로 외부 형태적으로는 지중해산의 *M. galloprovincialis*와 유사한 진주담치 집단에 복반구 종인 *M. edulis*의 mtDNA가 유전자이입되어, 우리 나라 남해안에 서식하는 진주담치 집단은 *M. galloprovincialis*와 *M. edulis*의 mtDNA를 동시에 보유하게 되었다고 설명하였다.

본 연구에서는 동해안에 서식하는 진주담치 mtDNA의 일부 염기서열을 분석하여, 남해안으로부터 얻은 결과와 비교함으로써 남해안 진주담치의 다형현상이 동해안에 서식하는 진주담치 집단에서도 관찰되는지 또는 동해안 특유의 유형이 발견되는지를 조사하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용된 진주담치는 1997년 10월과 11월에 동해안의 대진, 월포, 연암으로부터 채집되었으며(Fig. 1), 바닷물과 함께 경남대학교로 옮긴 후 외투조직 일부를 제거, 70% 알콜에 보관하고 나머지 부위는 냉동(-70 °C) 저장하였다.

미토콘드리아 DNA

알콜에 보관된 소량의 외투조직으로부터 total DNA를

추출하기 위하여 phenol-chloroform-isoamyl alcohol 대신 NaCl(5M)을 사용하여 DNA를 protein으로부터 분리하는 Medreno et al.[9]의 방법을 일부 변형하여 사용하였다.

본 연구를 위하여 mtDNA의 cytochrome c oxidase (CO) subunit III(이하 COIII) 유전자 336 염기쌍의 염기서열을 파악하였다. 이를 위하여 모계의 mtDNA만을 정확히 복제해 낼 수 있는 primer를 제작, 사용하였으며 이에 대한 자세한 정보는 Kim et al.[5]에 기술하였다. PCR 복제는 genomic DNA를 먼저 94°C에서 7분간 denaturation 후 35 cycle 동안 92°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 1분간 annealing, 그리고 72°C에서 2분간 extension을 반복하였다. 마지막 cycle에서 extension 과정은 총 9분간 실시하였다.

성공적인 DNA 복제를 확인하기 위하여 1.4% agarose gel에서 1X TBE buffer를 사용하여 약 1시간동안 전기영동을 실시하였다. 여분의 primer와 nucleotide를 제거하기 위하여 PCR Purification Kit(QIAGEN)를 사용하였다. DNA 염기서열분석은 ABI 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)의 long capillary를 사용하였으며(각 시료 당 약 3시간) 염기서열분석의 정확성을 기하기 위해 각 strand 당 두 번씩 실시하였다. 얻어진 각 개체당 네 개의 염기서열은 IBI MacVector(version 4.1.1)를 이용하여 정열, 각 시료의 최종 염기서열을 결정하였다.

PAUP과 networks를 이용한 계통분류학적 분석

각 개체의 염기서열은 새로운 염기서열이 얻어지는 데로 알파벳으로 표기하였으며(이하 haplotype) 아울러 다른 연구자에 의해 분석된 두 개의 *Mytilus edulis*의 동일 부위 염기서열[4,13]을 얻어 분석에 포함하였다. 이들 haplotype 간의 계통유전적 관련을 파악하기 위하여 PAUP (Phylogenetic Analysis using Parsimony) version 3.1[14]을 사용하였으며 이를 위하여 *M. trossulus*의 모체 mtDNA의 동일부위 염기서열[13]을 outgroup으로 사용하였으며 계통수는 heuristic search법으로 분석하였다. 얻어진 계통수의 신뢰도 측정을 위하여 bootstrapping법(1,000 iterations)을 사용하였다.

한 종내의 mtDNA haplotype을 parsimony법을 이용하여 분석할 경우 back mutation과 parallel mutation으로 인해 종종 계통수의 여러 분지에서 다분지를 나타냄으로

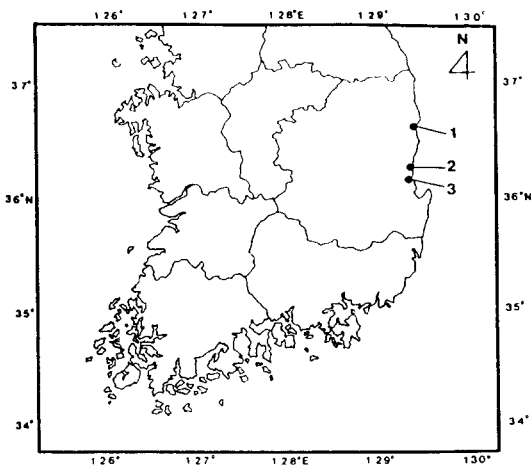


Fig. 1. Map showing the sampling sites on the east coast of Korea. Locality names are as follows: 1. Taejin, 2. Wolpo, 3. Yeonam.

비슷한 haplotype 간의(예를 들면 한 개의 염기차이) 정확한 유전적 관련이 파악되지 않는 수가 많다. 이러한 문제를 해결하고 모든 haplotype간의 유전적 거리를 파악하기 위하여 사용되는 parsimonious one-step median networks 를 사용하였다[2].

결론 및 고찰

COIII 유전자 염기서열 분석

우리 나라 동해안에 서식하는 진주담치 15개체로부터 얻은 COIII 유전자 중 336 염기쌍을 분석한 결과, 4개의 haplotype(A, B, C, L)을 얻었다(Table 1). 본 연구에서 확인된 4개의 haplotype을 포함하여 Kim 등[5]에서 확인된 총 15개의 haplotype은 GenBank에 등록하였다. Access number는 AF127464-AF127478이며 Korean Sequence Database (GenNuri) access number는 같은 순서로 KS101661-KS101675다. 인터넷상의 Blast Search를 통해 얻은 두 개의 blue mussel(*Mytilus edulis*) haplotype[4, 13]과 함께 정렬한 결과, 20개의 염기자리에서 치환이 발견되었으며 그

중 18개는 transition 치환이었으며 2개는 transversion 치환으로, 염기위치는 31번과 151번이었다(Fig. 2).

MtDNA 다형성

본 연구로부터 분석된 4개의 haplotype사이의 염기변이는 1개(0.3%) - 15개(4.5%)였으며 짝짓기 비교 결과, 최대 sequence divergence는 haplotype L과 A 그리고 L과 C와의 비교에서 나타났으며, haplotype L을 제외한 나머지 세 개의 haplotype 사이에는 한개 또는 두개(0.3-0.6%)의 적은 염기변이를 나타내었다(Table 2). 이들 사이의 유전적 관련을 unrooted median network으로 나타낸 결과(Fig. 3)

```

00000011111112222223
02344613345590233473
48149452541321314161
A (ME8)      CTTTTTATCGTCCACAC
B (ME13)     T.....
C (ME20)     T..C.....
L (ME44)     TCG.C.CGCT.C.TCTGT.T
U50216-EF   T...CC..CT.C...G.G.
M83760-EF   T...C...CTTCT...G.G.
    
```

Table 1. List of trapping localities, animal numbers, and mitochondrial COIII haplotypes.

Trapping Locality	Animal Number	COIII Haplotypes
1. Taejin, Kyung-sangbukdo(6)	ME56	B
	ME57	B
	ME58	B
	ME74	B
	ME75	A
	ME76	C
2. Wolpo, Kyung-sangbukdos(5)	ME68	B
	ME69	C
	ME70	L
	ME71	B
	ME72	B
	ME73	L
3. Yeonam, Kyung-sangbukdo(4)	ME64	C
	ME65	B
	ME66	L
	ME67	B

Fig. 2. Positions of variable sites among sequences of 336-bp of COIII gene obtained from the samples on the east coast of Korea and two homologous sequences of *M. edulis* (U50216-EF and M83760) obtained from Hoffmann et al.[4] and Stewart et al.[13].

Table 2. Pairwise distances among four haplotypes in *Mytilus edulis* species complex based on DNA sequences of a fragment of COIII gene and two homologous sequences of *M. edulis* obtained from Hoffmann et al.[4] and Stewart et al.[13]

	1	2	3	4	5	6
1A(ME8)	-	0.003	0.006	0.045	0.024	0.027
2B(ME13)	1	-	0.003	0.042	0.021	0.024
3C(ME20)	2	1	-	0.045	0.024	0.027
4L(ME44)	15	14	15	-	0.033	0.036
5U50216-EF	8	7	8	11	-	0.009
6M83760-EF	9	8	9	12	3	-

Numbers above the diagonal are mean distance values below the diagonal are absolute values.

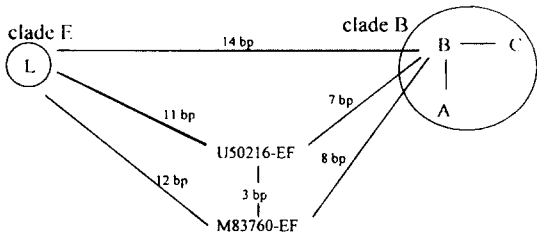


Fig. 3. Parsimonious one-step median networks analysis among four mitochondrial COIII haplotypes and two *M. edulis* sequences.

Each bar indicates one nucleotide difference from the neighboring haplotype. Haplotype L in clade E and haplotype B in clade B requires 14 mutational steps to connect to each other. A homologous sequence of *M. edulis*(U50126-EF) shows a minimum of seven and 11 mutational steps to connect to clade B and E, respectively.

동해안에는 크게 두 가지의 mtDNA 에 근거한 유전적 집단 즉, haplotype A, B, C로 구성된 그룹과 haplotype E만을 포함하는 그룹이 존재하고 있는 것으로 나타났으며, 이들은 Kim 등[5]에서 각각 clade B(haplotype A, B, C)와 E(haplotype L)에 해당되었다. 본 연구에서는 이들 두 clade 사이에는 최소한 14개의 염기변이(4.2%; haplotype L과 B)가 존재하는 것으로 나타났다. 진주담치 haplotype 상호간의 유전적 관련을 파악하기 위한 PAUP 분석 결과 (Fig. 4A), 역시 두개의 명백한 clade를 형성하였으며, clade B는 강력한 monophyletic group(100 bootstrap)을 형성하며 clade L과 분리되어 우리 나라 동해안에 서식하는 진주담치는 두 가지의 mtDNA에 근거한 유전적 집단이 서식하고 있음을 보여 주었다.

이러한 현상은 남해안으로부터 얻은 결과[5]와 일치하는 것으로써, 아직 확인되지 않은 서해안을 제외한, 동해안과 남해안은 Avise et al.[1]이 제시한 다섯 가지 mtDNA clone의 분포 유형중 category II 즉, 같은 지역에 비연속적이며 계통적으로 다른 clone이 공존하는 경우에 해당된다고 할 수 있다. MtDNA는 유전적 재조합을 하지 않고 모성유전을 하는 유전물질로 effective population size(N_e)는 nuclear DNA의 1/4에 해당한다고 알려져 있다[15]. 그러므로 특정 haplotype에 대한 genetic drift의 영향은 확률적으로 nuclear DNA allele에 비해 훨씬 크며 확률 통계적 사건에 의한 mtDNA 계통의 높은 소멸 가능성으로

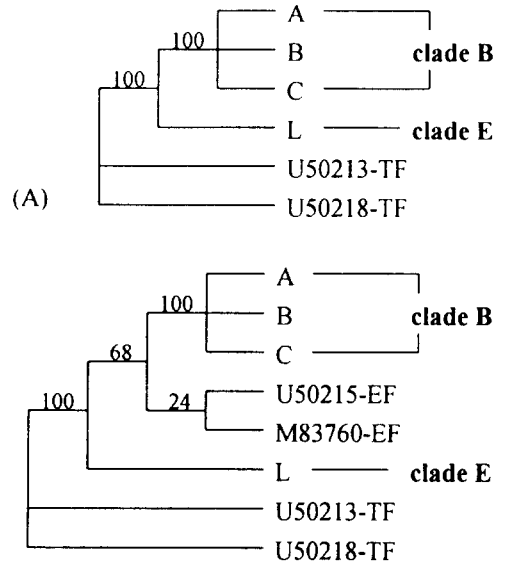


Fig. 4. PAUP analyses of mitochondrial COIII sequences. The topology in (A) represents the result of heuristic search for the haplotypes obtained from the east coast of Korea.

A single most parsimonious tree was obtained using two sequences of *M. trossulus* as outgroups. The numbers shown on branches are bootstrap values (1,000 replications). Tree length is 71, Consistency Index(CI) is 1.0, and Retention Index(RI) is 1.0. The topology in (B) represents the result of heuristic search for the two clades of haplotypes(clades B and E) and two homologous sequences of *M. edulis* obtained from Hoffmann et al.[4] and Stewart et al.[13]. The tree shown is a majority-rule consensus of three equally parsimonious trees. Except for including the two additional *M. edulis* sequences, other conditions for the analysis was the same as those in (A). Tree length is 76 steps, CI is 0.961 and RI is 0.955.

두 가지 이상의 아주 독특한 mtDNA 계통이 한 집단 내에서 아주 오랫동안 공존하기란 매우 어렵다고 알려져 있다[10]. 그러므로 Avise et al.[1]은 같은 지역에 계통적으로 아주 다른 clone이 공존하는 경우에 대하여, 한때 격리되었던 allopatric mtDNA clone이 장벽의 소멸로 최근 다시 만나는 secondary admixture zone에서나 생식적 격리 등의 본질적인 장벽이 있던 sympatric sibling species가 우연히 한 종의 분석에 포함되어 나타난 경우일 수 있다고 설명하였다. 그러나 이후의 data의 축적으로 이러한 발

견에 대한 해석은 현재 다양하게 이루어지고 있는 실정이며[6,11,16], Kim et al.[5]은 유전자이입에 의한 다형현상 가능성에 대해 고찰한 바 있다.

MtDNA 유전자이입

다른 연구자에 의해 연구된 두 개의 *M. edulis* 염기서열 [4,13] 상호간에는 3개(0.9%)의 염기변이를 나타냈으며, 이들은 본 연구에서 얻은 4개의 haplotype과의 비교시 7개(2.1%) - 12개(3.6%)의 염기변이를 나타내었다(Table 2). 이들은 다시 clade E의 haplotype L과의 비교시 11개(3.3%) - 12개(3.6%)의 염기변이를, 그리고 clade B의 haplotype A, B, C와의 비교시 7개(2.1%) - 9개(2.7%)의 염기변이를 보여 *M. edulis* 염기서열은 clade B(haplotype A, B, C)와 유전적으로 다소 가까운 것으로 나타났다(Fig. 3).

M. edulis 염기서열을 포함하여 PAUP 분석을 실시한 결과(Fig. 4B), 이들 염기서열을 제외시킨 채 분석한 경우 처럼(Fig. 4A), clade B와 E의 계통수는 두 가지의 clade가 그대로 유지되었다. 다만 새로이 첨가한 두개의 *M. edulis* 염기서열은 68%의 지지를 받으며 clade B와 비교적 강력한 monophyletic group을 형성하였으므로 clade B에 속한 haplotype은 미토콘드리아 DNA에 관한 한, 북반구 종인 *M. edulis*에 가깝다고 결론지었다. 그러나 이러한 결과는 현재 통용되고 있는 진주담치의 분류학적 위치[18, 17]에 대한 의문을 제기시킨다. 즉, 최근까지의 형태학적 연구에서 우리 나라에 서식하는 진주담치 종은 *M. galloprovincialis*로 보고되어 있으며 *M. edulis*의 존재 가능성은 거론되지 않았다[17]. 또한 세계적으로 분류학적인 혼란 속에 있는 *M. edulis*와 *M. galloprovincialis* 두 종의 공존 가능성에 대한 보고는 전무한 실정이다. 이처럼 *M. edulis*가 우리 나라 해안에 존재하지 않는다면 외국의 *M. edulis* 염기서열과 비교적 강력한 monophyletic group을 형성하는 clade B에 속하는 haplotype(Fig. 3 and 4B)을 가진 진주담치의 종명에 대해서 강한 의문이 남게된다.

외국의 경우 *Mytilus*에 속하는 종들 중에서 분류학적 어려움을 겪고있는 *M. edulis* species complex[8,11,12] 중 두 가지 종이 동소적으로 발생하는 곳에서는 미토콘드리아 DNA의 유전자이입이 발생한다고 보고된 바 있으며 이러한 유전자 이입은 *Mytilus* 속내의 다른 종에서 *M. galloprovincialis*로만 일어나고 있다고 보고된 바 있다. 그

예로, Edward et al.[3]은 England의 북동쪽에서 남서쪽에 걸쳐 서식하는 담치에 대한 allozyme과 mtDNA를 분석한 결과, South West England에 서식하는 *M. galloprovincialis* 집단은 *M. galloprovincialis*만의 allozyme의 allele을 보유하고 있었으나 mtDNA에 관한 한 *M. galloprovincialis*와 *M. edulis*의 두 가지 종의 유전물질을 보유하고 있다고 보고하였다. 이는 *M. edulis*만이 서식하는 South Wales에서 South West England로 유충이 일방적으로 이동함으로써 South West England에서 비대칭적 introgression이 발생하였기 때문이라고 설명하였다. 그러나 그 반대방향 즉, *M. galloprovincialis*에서 *M. edulis*로의 mtDNA의 유전자이입은 발견되지 않았다고 보고하였다. 결론적으로, 형태적 학으로는 *M. galloprovincialis*만 우리 나라에 서식하고 있다는 점과 mtDNA의 일방적인 유전자이입에 대한 연구결과를 종합적으로 고려할 때, 우리 나라에 서식하는 진주담치는 *M. edulis*인 진주담치의 mtDNA가 형태적으로 *M. galloprovincialis*인 진주담치에 유전자이입된 상태로 유입된 종이라 생각되며 그 결과, 우리 나라 동해안 진주담치에서도 남해안과 마찬가지로 *M. galloprovincialis*와 *M. edulis*의 mtDNA가 발견된 것으로 생각된다. 그러나 우리 나라에 서식하는 진주담치에 대한 분류학적 및 계통유전적 연구는 아직 광범위하게 이루어지고 있지 않은 실정이므로 많은 연구의 여지가 남아있다고 생각된다. 그러므로 앞으로의 연구에서는 우리 나라 서해안을 비롯한 다양한 서식처에서 채집된 담치를 이용, allozyme marker 등 다른 nuclear DNA marker와 패각형태를 이용한 분류학적 연구가 필수적이라 생각된다.

요 약

본 연구는 미토콘드리아 DNA중 COIII 유전자 일부(336 bp)의 염기서열을 이용, 우리 나라 동해안에 서식하는 진주담치의 미토콘드리아 DNA 다형현상을 파악하였다. 우리 나라 동해안 세 곳에서 채집한 진주담치로부터 네개의 haplotype을 얻었으며 이들은 유전적으로 격리된 두 가지 계통을 형성하며 최소 4.2%(14 염기쌍)의 유전적 거리를 나타내었다. 이러한 유형은 남해안에서도 발견된 바 있어 우리 나라 동해안은 남해안과 마찬가지로 두 가지의 유전적으로 격리된 mtDNA를 가진 진주담치 집단이

서식하는 것으로 밝혀졌다. 미토콘드리아 DNA의 진화 특성상, 한 지역 내에 두 가지의 독특한 계통이 오랜 시간 공존하기 어렵다는 점으로 미루어 동해안에 서식하는 진주담치의 미토콘드리아 DNA 다형성 유형은 *M. edulis*의 mtDNA가 *M. galloprovincialis*에 유전자이입됨으로써 생긴 결과라고 생각된다.

감사의 글

채집 및 시료관리에 많은 노력을 기울여 준 국제경영연 구원 (IMI)내 국제환경연구소 위성욱 연구원과 홍혜경 연구원에게 심심한 감사를 보냅니다. 지도를 만든 박선희 양에게 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 489-522.
2. Bandelt, H.-J., P. Forster, B. C. Sykes and M. B. Richards. 1995. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* **141**, 743-753.
3. Edward, C. A. and D. O. F. Skibinski. 1987. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales. *Mar. Biol.* **94**, 547-556.
4. Hoffman, R. J., J. L. Boore and W. M. Brown. 1992. A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* **131**, 397-412.
5. Kim, I., B. Y. Min, M. H. Yoon, M. S. Yoo and D. H. Kim. 1999. Unusual mitochondrial DNA polymorphism of the blue mussel (*Mytilus edulis*) species complex on the southern coast of Korea. *Korean J. Biol. Sci.* **3**, 79-87.
6. Kim, I., C. J. Phillips, J. A. Monjeau, E. C. Birney, K. Noack, D. E. Pumo, R. S. Sikes and J. A. Dole. 1998. Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Molecular Ecology* **7**, 667-678.
7. McDonald, J. H. and R. K. Koehn. 1988. The mussels

Mytilus galloprovincialis and *M. trossulus* on the Pacific coast of the North America. *Mar. Biol.* **99**, 111-118.

8. McDonald, J. H., R. Seed and R. K. Koehn. 1991. Allozyme and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern hemispheres. *Mar. Biol.* **111**, 323-335.
9. Medreno, J. F., E. Aasen and L. Sharrow. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Bio Techniques* **8**, 43.
10. Neigel, J. E. and J. C. Avise. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. pp 515-534, In Nevo, E. and S. Karlin(ed.), *Evolutionary Processes and Theory*, Academic Press Inc., New York.
11. Pumo, D. E., I. Kim, J. Remsen, C. J. Phillips and H. H. Genoways. 1996. Molecular systematics of the fruit bat, *Artibeus jamaicensis*: origin of an unusual island population. *J. Mamm.* **77**, 491-503.
12. Seed, R. 1992. Systematics, evolution, and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview. *Am. malac. Bull.* **9**, 123-137.
13. Stewart, D. T., E. R. Kenchington, R. K. Singh and E. Zouros. 1996. Degree of selective constraint as explanation of the different rates of evolution of gender-specific mitochondrial DNA lineages in the mussel *Mytilus*. *Genetics* **143**, 1349-1357.
14. Swofford, D. L. 1990. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 3.0. Illinois Natural History Survey, Champaign (on disk).
15. Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, K. M. Helm-Bychowski, R. J. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage and M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn Soc* **26**, 375-400.
16. Wilson, G. S. and T. H. Fleming. 1996. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **5**, 329-339.
17. Yoo, M. S. 1992. A taxonomical study of the shell morphology of blue mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis* Lamarck in Korea and Japan. *Bull. Korean Fish. Soc.* **25**, 165-170.
18. Yoo, M. S. and T. Kajihara. 1983. Reproductive biology of the marine mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*, in Japan. *Marine Foulding* **4**, 11-21.