Vol. 31(4):319-326
DOI: 10.4217/OPR.2009.31.4.319

Ocean and Polar Research

December 2009

Article

마이크로세틀라이트 마커 분석을 이용한 남서태평양 일대에 서식하는 남방톱날꽃게(*Scylla serrata*)의 유전적 다양성

장요순[1*] · 이순길[1] · 노충환[2] · 오승용[1]

[1]한국해양연구원 해양생물자원연구부
(425-600) 경기도 안산시 안산우체국 사서함 29
[2]한국해양연구원 동해연구소
(767-813) 경상북도 울진군 죽변면 후정리 695-1

Genetic Diversity of the Mud Crab *Scylla serrata* in Micronesia based on Microsatellite Marker Analysis

Yo-Soon Jang[1*], Soon Kil Yi[1], Choong Hwan Noh[2], and Sung-Yong Oh[1]

[1]Marine Living Resources Research Department, KORDI
Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea
[2]East Sea Research Institute, KORDI
Uljin 767-813, Korea

Abstract : Analysis of four microsatellite markers from Mud Crab *Scylla serrata* revealed that there is high level of genetic diversity within this species. Genetic diversity of *S. serrata* was calculated using allele diversity, observed heterozygosity, expected heterozygosity (Het-exp), polymorphic information content, gene differentiation and Nei's D_A distance. Mean polymorphic information content value was 0.797, which reflected high level of polymorphism across the loci of *S. serrata*. The Palau population has the highest genetic diversity (Het-exp=0.871), while the Kosrae population has the lowest genetic diversity (Het-exp=0.806). However, the geographical genetic distance among *S. serrata* populations from Yab, Chuuk, Pohnpei, Kosrae, and Palau were low (0.2009~0.3350). These results suggest that despite their wide distribution, *S. serrata* are no different in geographical genetic diversity within the five sampled locations.

Key words : Mud crab, *Scylla serrata*, genetic diversity, microsatellite, Micronesia

1. 서 론

남방톱날꽃게(*Scylla serrata*)는 아프리카 동부해안에서 남중국해까지, 호주 중남부 연안에서 일본 큐슈 남부연안까지 대부분의 망그로브군총에 널리 분포하는 대형 십각류이다(Hill 1975; Yi et al. 2009). 일반적으로 망그로브군총에 서식한다 하여 망그로브크랩(mangrove crab) 또는 뻘에 구멍을 뚫고 은신한다 하여 머드크랩(mud crab)으로 불리기도 하는(Brown 1993) 이 종은 열대 태평양 도서국 주민들에게 매우 중요한 수산자원의 하나이고, 오스트레일리아에서는 최근 "icon species"로 주목받고 있다(FRDC 2005). 연간 150,000톤 내외이며(FAO 2008), 최근 과도한 어획으로 많은 해역에서 자원감소 현상이 뚜렷해지고 있다.

남방톱날꽃게 종을 유전적으로 구분하기 위하여 Keenan (1999)은 미토콘드리아 DNA의 COI(Cytochrome c oxidase

*Corresponding author. E-mail : jangys@kordi.re.kr

I) 유전자와 16S 리보솜 RNA 유전자에 존재하는 염기변이를 분석하였다. *Scylla* 속의 4종(*S. serrata, S. oceanica, S. tranquebarica, S. paramamosain*)간 및 종(species) 내에는 16S 리보솜 RNA 유전자 보다 COI 유전자에서 염기변이가 더 많고, 종간변이가 종 내 변이에 비해 10배 이상 많이 존재한다고 보고하였다. Gopurenko and Hughes (2002)는 미토콘드리아 DNA의 COI 유전자 haplotype을 이용하여 오스트레일리아의 서부, 북부 및 동부지역에서 채집한 남방톱날꽃게 집단의 서식지별 유전적 구조를 조사한 결과로부터 *S. serrata* 오스트레일리아 집단은 오스트레일리아 북부 서식 집단에서 분열되어 진화한 것으로 판단하였다. Zhongbao et al.(2004)는 중국 남서부에 서식하는 남방톱날꽃게 6개 집단의 유전적 다양성을 allozyme 전기영동법으로 분석하여 이들 6개 지역집단의 유전적 구조가 매우 유사하다고 보고하였다. Klinbunga et al. (2000)은 태국 동부지역 2곳에서 채집한 남방톱날꽃게 3종(*S. serrata, S. oceanica, S. tranquebarica*)의 유전적 다양성을 RAPD 분석법으로 3종간 유전적 차이가 큰 것을 확인하였고, 각 종내의 집단간에는 유전적 차이가 매우 적은 것으로 보고하였다.

마이크로세틀라이트는 많은 정보를 제공하는 유전자마커로 집단유전학, 연관관계 분석, 친자확인 등에 이용되고 있으며, 생물체 집단의 유전적 배경 및 유전적 관련성 연구에 사용하기 적합하기 때문에, 다양한 생물을 대상으로 높은 다형성을 갖는 마이크로세트라이트 마커를 확보하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 게의 마이크로세틀라이트 마커는 투구게(Ortí et al. 1997), 대게(Urbani et al. 1998), Chinese mitten crab(Hänfling and Weetman 2003), Dungeness crab(Jensen and Bentzen 2004), European green crab(Tepolt et al. 2007) 등에서 확보하여 각각의 좌위에 대한 특성이 보고되었다. 남방톱날꽃게의 마이크로세틀라이트 좌위는 Gopurenko et al.(2002)이 오스트레일리아 서식 집단을 대상으로 분리하여 각각의 좌위에 대한 특성을 보고하였다.

남방톱날꽃게는 우리나라에서 양식이 가능하며, 남방톱날꽃게 양식산업이 필요함을 보고한 바 있다(Yi et al. 2009). 본 연구에서는 남방톱날꽃게의 유전특성을 파악하기 위하여 유전적 다양성을 남서태평양 일대에서 서식하는 집단을 대상으로 마이크로세틀라이트 마커를 이용하여 분석하였다.

2. 재료 및 방법

실험재료와 Genomic DNA 분리 정제

남서태평양 일대에서 서식하는 남방톱날꽃게를 채집하여 유전특성을 분석하였다. 마이크로네시아의 얍(13개체), 축(18개체), 폰페이(20개체), 코스레(17개체)를 비롯하여 팔라우(10개체) 등 5개 지역에서 78개체의 남방톱날꽃게를 채집하였다(Fig. 1). 채집한 시료는 에탄올을 이용하여 고정하고 −20°C에 보관하였다. 남방톱날꽃게의 genomic DNA는 다리 근육조직(leg muscle)에서 Blin and Stafford(1976)의 방법을 다소 변형하여 추출하였다. 남방톱날꽃게 다리근육 조직시료의 수분을 제거한 후, lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 5 M Urea, 0.1 mg/m*l* proteinase K]를 첨가하여 용해시키고, *Accupre*® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Co., Korea)의 Binding buffer와 isopropanol을 사용하여 genomic DNA를 회수하였다. 분

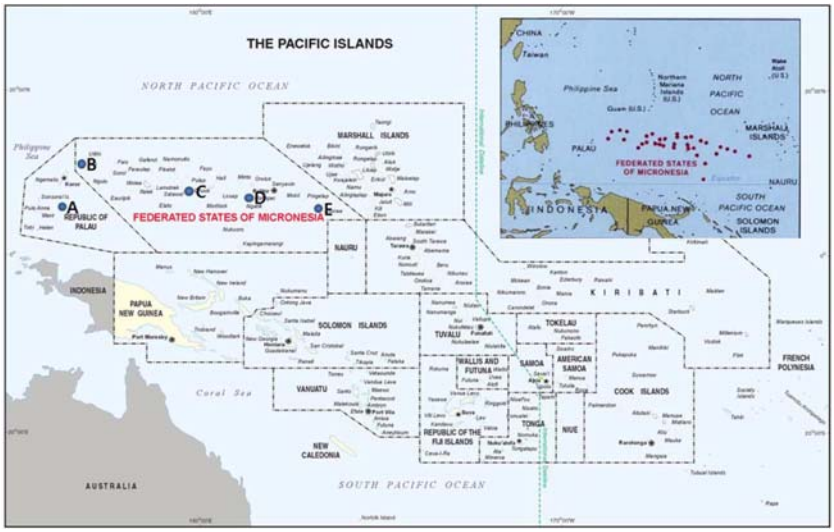

Fig. 1. Sample collection sites of five mud crab populations used in the study. A, Palau; B, Yab; C, Chuuk; D, Pohnpei; E, Kosrae.

리한 genomic DNA는 Binding column을 이용하여 정제하였고, 멸균수에 녹여 전기영동으로 확인하였다. NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)를 이용하여 정확한 농도를 측정한 후, 실험에 사용하기 적당한 농도(5 ng/μl)로 희석하였다.

마이크로세틀라이트 마커 분석

남서태평양 일대에 서식하는 남방톱날꽃게의 유전적 다양성 분석을 위해 Gopurenko et al.(2002)이 발표한 5개의 마이크로세틀라이트 좌위 중에서 4개의 정보를 사용하여 primer를 제작하였다. 분석에 이용한 각 마이크로세틀라이트 마커의 정보와 실험조건은 Table 1과 같다. PCR 산물의 증폭반응은 전체량을 20 μl로 하였으며, genomic DNA 50 ng, 형광 primer 5 pmol, Hotstart rTaq (TaKaRa Co., Japan) 1U을 사용하여 94°C에서 2분간 변성시켜, 94°C에서 10초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초 동안 30회 반응시킨 후, 마지막 신장반응은 72°C에서 30분간 실시하여 종료하였다(PTC-200, MJ Research, USA). PCR 반응조건은 형광염색된 마이크로세틀라이트의 색상과 대립유전자의 크기별 분포를 고려하여 결정하였으며, 3개의 마커는 multiplex PCR을 수행하였고, 1개는 단일 marker로 PCR을 수행하였다. PCR 증폭산물은 3% 아가로스 젤에 전기영동하여 증폭여부를 확인하였으며, 농도를 대략적으로 비교하고 유전자형 결정에 사용하였다.

PCR 증폭산물을 deionized formamide, loading buffer 및 Genescan 350-TAMRA internal size standard와 잘 혼합하여, 5% polyacrylamide denaturing gel에 loading 하였고, ABI PRISM 377 DNA sequencer(Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다.

유전적 다양성 분석

남방톱날꽃게 각 개체에 대한 마이크로세틀라이트의 PCR 산물을 Genescan analysis 프로그램을 이용하여 각 PCR 단편들의 크기를 3차원 최소자승법으로 분석하였다. Genotyper analysis 프로그램을 이용하여 마이크로세틀라이트 마커별 대립유전자들의 정확한 크기를 결정하였으며, 대립유전자의 빈도를 계산하고, 좌위당 대립유전자의 평균수(allelic diversity)를 구하였다.

마이크로세틀라이트 마커를 분석하여 확보한 남방톱날꽃게 지역집단별 및 개체별로 대립유전자들을 정리한 후, Microsatellite Toolkit(Park 2000) 프로그램으로 관측이형질성(observed heterozygosity), 대립유전자 빈도(allele frequency) 각 좌위(locus)의 대립유전자 수 및 지역집단별 대립유전자의 수를 각각 계산하였다. 마이크로세틀라이트 마커별 동형접합도(homozygosity; Ho), 이형접합도(heterozygosity; hi), 분석된 모든 마이크로세틀라이트 마커의 평균이형질성(H)을 계산하였다. 또한 각 마이크로세틀라이트 좌위에 대한 남방톱날꽃게 집단의 유전적 다양성을 조사하기 위하여, 아래와 같은 공식으로 Hardy-Weinberg 법칙을 통해 기대되는 이형질성(expected heterozygosity) 및 유전자 좌위의 다형성 정보량(polymorphism information content: PIC)을 구하였다.

집단간 유연관계를 분석하기 위한 D_A genetic distance 추정은 Nei et al.(1983)의 방법을 사용하는 집단유전학 분석프로그램인 DISPAN(Ota 1993) package를 이용하였다. 유연관계지도는 1,000회 반복을 통한 bootstrap value를 제공하는 DISPAN을 이용하여 Neighbor-Joining(NJ) 방법과 UPGMA(Unweigted Pair-Group Method with Arithmetic average) 방법을 이용하여 작성하였다. 전체집단의 개체별 유전적 거리 추정치를 근거로 하여 모든 개체간 Neighbor-Joining phylogenetic dendogram 작성은 simple allele-sharing 측정 수준을 통한 개체별 대립유전자 빈도를 근거로 Phylip ver.3.65를 이용하였다.

3. 결 과

남방톱날꽃게의 유전적 다양성

남서태평양일대에 서식하는 남방톱날꽃게 5개 지역 집

Table 1. Primer sequences and PCR amplification condition for microsatellite markers (Gopurenko et al. 2002)

Locus	Primer sequence (5'- 3')	Repeat motif	Annealing temp. (°C)	GenBank Accession no.
Ss101	FW: FAM-ATTCAACACGCGCGCGTACGC RV: GCAGTTTACCATATGCTTGGG	$(AG)_{36}$	55	AF508135
Ss103	FW: HEX-TTATATAAGAAATAATGTCC RV: GTTCCTGCTATGTAATCCCG	$(GA)_{36}$	45	AF508134
Ss403	FW:HEX-GACAAAGGAGCACTCAGCCAC RV: GAAGGATTCACTTGTCCACGC	$(CT)_{24}$	55	AF508132
Ss513	FW: GGCCGGGTGAGGGATGAGCC RV: TAMRA-CGTTTCCGCAACCAACAGATG	$(CT)_{14}$	55	AF508131

단 78개체를 Table 1과 같은 실험조건으로 4개의 마이크로세틀라이트 마커를 분석한 결과, 55°C 및 45°C에서 잘 반응하였고, PCR 단편이 완전한 형태로 증폭되었으며, 각 마커에 따른 단편들의 크기에 따라 대립유전자를 정확하게 결정할 수 있었다. 4개의 마커에서 73개의 대립유전자가 검출되었고, 분석한 모든 지역 집단에서 매우 다형적이었다(Table 2). 각 유전자 좌위에 있어서 대립유전자의 수는 5~24개의 범위였으며, 분석한 전체 개체들의 유전적 다양성을 나타내는 유전자 좌위별 이형질성(Ht)은 0.608~0.939, 지역집단간 유전자 변이도(Gst)는 0.022~0.053로 평균 0.038의 지역 집단간 유전자 변이도를 나타냈다.

Table 2. Characterization of the 4 microsatellite markers analysed in 5 mud crab populations (Chuuk, Kosrae, Palau, Yab, Pohnpei)

Locus	Size range (bp)	No. of alleles	Ht*	Hs†	Gst‡
Ss101	143-205	24	0.939	0.889	0.053
Ss103	96-166	24	0.931	0.903	0.030
Ss403	122-174	20	0.930	0.892	0.041
Ss513	146-156	5	0.608	0.595	0.022
All loci		73	0.852	0.820	0.038

Ht* : Expected total heterozygosity
Hs†: Expected within-population heterozygosity
Gst‡: Coefficient of gene differentiation

밀접하게 연관된 집단을 비교할 때, 특정 집단 내에서 독특한 양상을 보이는 대립유전자의 존재는 각 집단의 유전적구별의 척도로 이용할 수 있으므로, 이를 비교하기 위하여 각 마이크로세틀라이트 마커에 대한 남방톱날꽃게 지역 집단의 대립인자 빈도 분포를 조사하였다(Table 3). 남방톱날꽃게 각 지역 집단은 4개의 마이크로세틀라이트 마커에 대하여 4개에서 19개까지 다양한 수의 대립유전자 분포를 나타냈으며, 특정 지역 집단에서 높은 빈도를 가진 마커도 확인하였다. Ss101 마커는 5개 지역 집단에서 24개의 대립유전자를 가지고 있었으며, 12~19개의 대립유전자 분포를 나타내었다. 또한 특정 대립유전자 빈도에 편중됨은 없었으나, 코스레 지역 집단에서는 특정 대립유전자(181 bp)의 빈도만 0.3529를 나타내기도 하였

Table 3. Allele frequencies of 4 microsatellite markers in 5 mud crab populations

Locus	Populations					Locus	Populations				
Ss101	**Chuuk**	**Kosrae**	**Yab**	**Palau**	**Pohnpei**	**Ss103**	**Chuuk**	**Kosrae**	**Yab**	**Palau**	**Pohnpei**
143	0.0313	0.0294	0.0769	-	0.0250	96	-	-	0.0417	-	-
147	0.0313	-	-	0.0500	0.0250	108	-	-	-	0.0500	-
149	0.0938	0.0294	-	-	0.0750	110	-	-	0.0417	-	-
151	0.0313	-	0.0769	-	-	112	-	0.0625	0.0833	-	0.0526
159	0.0313	0.0294	0.0769	-	0.1000	114	0.0625	-	0.1667	0.2000	0.0526
161	0.1250	0.0588	0.0385	-	0.1750	116	-	0.0625	-	-	0.0263
163	0.0313	-	0.0385	-	0.0750	118	0.1563	0.0938	0.0417	0.1000	0.0789
165	0.0313	0.0882	0.0769	-	0.0750	120	0.0313	0.0313	-	-	0.0263
167	0.0313	0.0882	-	0.0500	-	122	0.0938	0.1563	0.0417	0.0500	0.1579
169	0.0625	-	0.0769	0.100	0.1500	124	0.0313	-	0.0833	0.0500	0.0263
171	0.0625	0.0882	0.0769	0.100	-	126	0.0625	-	0.0417	0.1000	-
173	0.0313	-	0.0385	0.100	0.0250	128	0.0938	0.0625	0.0417	0.0500	0.0789
175	0.0938	-	0.0385	0.0500	-	130	0.1563	0.0625	-	-	0.0789
177	0.0313	0.0882	0.1538	-	-	132	-	0.1250	0.1250	0.0500	0.0526
179	0.0313	0.0588	-	0.2500	0.1500	134	0.1563	0.0625	0.1250	0.0500	0.1316
181	0.0938	0.3529	0.0769	0.0500	0.0250	136	0.0313	0.1250	0.0417	0.0500	0.1053
183	-	0.0294	-	0.0500	0.0250	138	-	-	-	-	0.0789
185	-	-	0.1154	0.0500	-	140	0.0625	0.0938	0.0833	0.1000	-
187	0.0313	-	-	0.0500	0.0500	142	0.0313	0.0625	-	0.0500	0.0263
189	-	-	-	0.1000	-	144	0.0313	-	-	-	-
191	0.0313	-	-	-	-	146	-	-	0.0417	-	-
195	-	0.0294	-	-	-	150	-	-	-	0.0500	-
199	0.0313	-	-	-	-	164	-	-	-	0.0500	-
205	-	0.0294	0.0385	-	0.0250	166	-	-	-	-	0.0263
n=24	***19***	***13***	***14***	***12***	***14***	***n=24***	***13***	***12***	***14***	***14***	***15***

Table 3. Continued

Locus	Populations					Locus	Populations				
Ss403	**Chuuk**	**Kosrae**	**Yab**	**Palau**	**Pohnpei**	**Ss513**	**Chuuk**	**Kosrae**	**Yab**	**Palau**	**Pohnpei**
122	0.0313	-	-	-		146	0.5000	0.6471	0.5769	0.4000	0.5250
132	0.1563	-	0.0769	0.1000	0.0250	148	0.3438	0.2647	0.2308	0.4000	0.3000
134	0.0313	0.0294	0.0385	0.1000	0.0500	150	0.0938	0.0882	0.1154	0.1500	0.1750
136	-	0.0294	0.0769	-	0.0500	152	0.0625	-	-	0.0500	-
140	-	0.0294	-	0.0500	0.0500	156	-	-	0.0769	-	-
142	0.1563	0.1176	-	-	0.0750						
144	-	-	0.1538	-	0.1500						
146	0.0625	0.1765	0.0385	0.0500	0.1000						
148	0.0625	0.0882	-	-	0.1000						
150	0.0625	-	-	-	-						
152	0.0625	0.0588	0.0385	0.1000	-						
158	0.0625	0.1176	-	-	0.0750						
160	-	-	0.0385	-	-						
162	-	0.0294	0.0385	-	-						
164	0.0938	0.0588	0.0385	0.1500	0.1000						
166	0.0938	0.0294	0.1154	-	0.1000						
168	0.0313	0.1765	0.2308	0.1500	0.0500						
170	0.0938	0.0294	0.0385	0.2000	0.0500						
172	-	-	0.0385	-	0.0250						
174	-	0.0294	0.0385	0.1000	-						
n=20	***13***	***14***	***14***	***9***	***14***	***n=5***	***4***	***3***	***4***	***4***	***3***

다. 마이크로세틀라이트 마커 Ss103과 Ss403은 대립유전자가 각각 24개와 20개가 존재했으며, 5개 지역 집단에서 각각 12~15개와 9~14개의 대립유전자 분포를 나타냈다. 특정집단에서 독특한 양상을 나타내는 대립유전자는 존재하지 않았으며, 대체로 낮은 빈도로 고루 분포하였다. 5개의 대립유전자를 확인한 Ss513 marker는 대립유전자의 빈도 분포가 유사했고, 대립유전자 146 bp와 148 bp의 빈도 합이 약 0.8을 나타내고 있었다. 4개의 마이크로세틀라이트 마커를 이용하여 5개 지역 남방톱날꽃게 집단을 분석한 결과에서 각 지역 집단에서 빈도가 높은 특정 대립유전자가 존재했으나 그 값은 크지 않았고, 또한 전반적으로 지역 집단간 공유하고 있는 대립유전자 수가 현저히 많았기 때문에 이들을 지역 집단 특이적인 대립유전자로 판단할 수 없었다.

남서태평양 일대에 서식하는 남방톱날꽃게집단의 유전적 다양성을 조사하기 위해 대립유전자의 수, 이형질성(heterozygosity) 및 다형성정보량을 계산하였으며, 이를 평균한 결과는 Table 4와 같다. 유전적 다양성의 척도가 되는 기대된 이형질성(Het-exp) 값은 5개 지역 집단에서 0.806~0.871 범위로 평균 0.850이었으며, 유전적 다양성이 높았다. 팔라우 지역 집단이 다른 지역 집단에 비해 다소 높은 값을 나타냈지만, 각 집단간 다양성 정도의 차이는 극히 적었다. 분자 마커의 유용성을 알 수 있는 다형성 정보량은 0.758~0.813로 컸으며, 본 연구에서 사용한 4개의 마이크로세틀라이트 마커가 집단내 다형성을 검출할 수 있는 유용한 마커임을 의미한다. 각 마커에 따른 대립유전자의 분포가 5개 지역 집단에서 유사하였으며, 각 집단 내 동질성은 낮은 편이었다.

Table 4. Sample size, allele diversity, expected and observed heterozygosity and PIC obtained from 4 microsatellite markers for 5 mud crab populations

Population	Sample size	Het-obs	Het-exp	Allelic diversity	PIC
Chuuk	18	0.719	0.863	12.3	0.813
Kosrae	17	0.764	0.806	10.5	0.758
Yap	13	0.728	0.859	11.5	0.807
Palau	10	0.875	0.871	9.8	0.803
Pohnpei	20	0.709	0.851	11.5	0.806

남방톱날꽃게 집단의 유전적 유연관계

남서태평양 일대의 5개 지역에서 채집한 남방톱날꽃게 집단의 유전적 유연관계를 조사하기 위하여, Nei(1972, 1978)의 공식을 이용하여 유전적 거리를 구하였다(Table

Table 5. Matrix of D_A genetic distances observed among the mud crab populations

	Chuuk	Kosrae	Yap	Palau	Pohnpei
Chuuk	-				
Kosrae	0.2171	-			
Yap	0.2948	0.2896	-		
Palau	0.2603	0.3349	0.3087	-	
Pohnpei	0.2009	0.2070	0.2736	0.3350	-

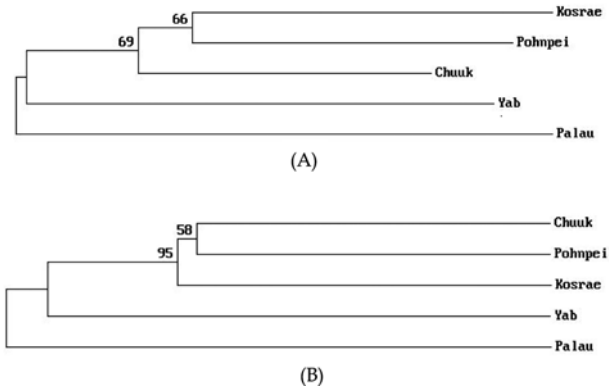

Fig. 2. Neighbor-joining tree (A) and UPGMA tree (B) constructed using D_A genetic distance matrix, showing the genetic relationships among the mud crab populations. Numbers indicate the bootstrap values in percentage (1000).

5). 유전적거리인 D_A distance 값은 0.2009~0.3350로 다양하게 계산되었고, 팔라우 지역집단과 폰페이 지역 집단 사이에서 0.3350으로 5개 지역 집단 중 이 두 집단이 서로 가장 먼 유연관계를 갖고 있었으며, 팔라우 지역 집단이 다른 4개 지역 집단과 비교적 먼 유연관계를 나타내었다.

각 지역 집단의 유연관계를 명확히 이해하기 위해서 D_A genetic distance의 matrix를 근거로한 Nei의 유전적 거리를 DISPAN program(Ota 1993)을 이용하여 Neighbor-joining tree 및 UPGMA tree를 작성한 후, 지역 집단간 유연관계 지도를 Fig. 2에 나타내었다. 각 cluster에 나타낸 수치는 1000회 반복하여 얻은 bootstrap value를 percentage로 나타낸 것이다. 두 방법에 의한 유연관계 지도에서 코스레, 폰페이와 축 지역집단이 비교적 가까운 유연관계를 갖고 있는 반면에 팔라우 지역집단은 나머지 지역집단과 다소 먼 유연관계를 형성하였다.

4. 고 찰

DNA marker 기술의 발전으로 생물의 유전학적 연구 방법이 바뀌었으며, allozyme, mtDNA, RFLP, RAPD, AFLP, 마이크로세틀라이트, SNP, EST와 같은 많은 genetic marker가 개발되었고, 이들을 활용하기 위한 연구가 활발하다. 이들 분자마커의 원리는 DNA 수준에서 생긴 유전적 변이가 오랜 기간 진화과정에서 축적되고, 다음 세대로 이어져 생물의 종 다양성을 결정하는데 기여한 유전적 변이를 찾는 것이다. 이런 유전적 변이를 DNA 마커 기술을 이용하여 탐색하고 확보한다. 여러 가지 DNA 마커 중 AFLP, SNP, 마이크로세틀라이트가 높은 다형성을 갖고 있기 때문에 활용성이 높다(Liu and Cordes 2004). 특히 마이크로세틀라이트는 적은 양의 DNA로도 충분히 분석할 수 있는 장점이 있고, 대립유전자의 수가 월등이 많아 다른 마커보다 효율적이다(Olufowote et al. 1997). 생물의 유전적 다양성 분석은 육종적 개량의 근간이 되고, 유전자원 평가에 매우 중요하며, 유용유전자를 탐색하고 이를 이용하여 우량한 개체나 집단 선발이 가능하다. 또한 특정 생물집단의 유전적 다양성 확보도 가능하다.

남서태평양 일대에 서식하는 남방톱날꽃게 5개 지역 집단의 유전적 다양성을 Gopurenko et al.(2002)이 발표한 마이크로세틀라이트 좌위를 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 사용한 4개의 마이크로세틀라이트 마커는 남방톱날꽃게 5개 지역 집단의 유전적 다양성과 이들 지역 집단간 유전적 유연관계 분석에 이용이 적합했으며, 특정 지역집단에만 특이적으로 높은 빈도를 나타내는 대립유전자는 발견되지 않았다. 또한 이들 마커의 분석결과로 확인한 대립유전자의 크기와 종류는, *Scylla* 속의 다른 종에서 확인되는 대립유전자와 다르기 때문에 형태구분이 모호한 *Scylla* 속의 종 분류에도 활용이 가능하였다.

유전적 다양성의 척도가 되는 기대된 이형질성 값을 살펴보면, 5개 지역 집단 모두 0.80 이상의 값을 나타내어 이들 지역 집단은 유전적 다양성이 높은 집단임을 알 수 있었다. 마커의 유용성 정보를 제공하는 다형성정보량은 5개 지역 집단 평균이 0.7974로 컸다. 다형성정보량은 검출 가능한 대립유전자 수와 그 대립유전자 빈도의 분포에 의해 결정되고, 모든 대립유전자 빈도의 평방합에서 1을 뺀 값으로 계산한다. 대립유전자의 빈도가 크면 클수록 다형성정보량은 커지기 때문에 이 값을 비교하여 다양한 분해능력을 가진 마커 선발에 활용한다(Botstein et al. 1980).

Gopurenko et al.(2002)은 *S. serrata*의 genome에서 2염기 또는 3염기 반복서열을 무작위로 스크리닝하는 방법으로 5개의 마이크로세틀라이트 좌위를 확보하여 이들 좌위의 특성을 조사하였으며, *S. serrata* 오스트레일리아 집단 36개체를 분석하여 각 좌위에 대한 이형접합도를 제시하였다. Ss101 좌위를 분석한 결과, 대립유전자는 크기가 141 bp-201 bp 범위에서 26개가 존재하고, 기대된 이형질

성 값은 0.963이었다고 보고하였다. 본 연구에서 5개 지역 집단을 Ss101 좌위를 이용하여 얻은 143 bp-205 bp 범위에서 24개의 대립유전자가 검출되고 기대된 이형질성 값이 0.939로 계산된 연구결과는 Gopurenko et al. (2002)이 보고한 결과와 유사하였다. Ss103 좌위, Ss403 좌위 및 Ss513 좌위 분석 결과 역시 대립유전자의 크기 범위와 빈도, 각각의 마커별 기대된 이형질성 값 등이 이미 보고된 결과와 비슷한 양상을 나타내고 있었다. 이와 같은 결과로 *S. serrata*가 높은 다형성을 유지하고 있고, 대체로 넓게 분포하여 서식하며, 서식지역에 따른 유전적 차이는 적을 것으로 판단하였다.

게(crab) 집단의 유전적 특성을 조사하기 위하여 마이크로세틀라이트 좌위를 탐색하고 특성을 분석하는 연구가 진행되고 있다. Ortí et al.(1997)은 투구게(horseshoe crab, *Limulus polyphemus)* 집단에서 CA가 반복되는 마이크로세틀라이트를 분석하여 대립유전자간의 유연관계를 추정하였다. Urbani et al.(1998)은 대게(snow crab, *Chionoecetes opilio*)의 genomic library를 구축하여 6개의 마이크로세틀라이트 마커를 확보하였고, 각각의 마커를 분석하여 4~22개의 대립유전자를 확인했다. 7종의 게를 분석하여 확보한 이들 마커를 사용하여 비교한 결과로 *C. opilio*에서 대체로 높은 변이가 존재하고, 6개의 좌위 중 5개가 게의 유전특성 분석에 이용 가능한 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 남방톱날꽃게 집단의 유전적 다양성 분석에 활용 가능한 마커를 확보하기 위하여 Urbani et al.(1998)이 발표한 마커의 정보를 이용하여 분석을 시도했으나, 대립유전자 단편이 정확하게 증폭되지 않아 *S. serrata* 집단의 유전적 다양성 분석에 적용할 수 없었고, 이들 마커는 남방톱날꽃게 집단 분석에는 적합하지 않은 것으로 판단하였다. 북미 태평양 연안의 식용 게인 Dungeness crab(*Cancer magister*) 집단에서 6개의 마이크로세틀라이트 마커를 확보하여 *Cancer* 속의 10종을 분석한 결과를 보고하였으나(Jensen and Bentzen 2004), 이들 마커 또한 남방톱날꽃게 집단 분석에는 적용이 불가능하였다. 이와 같은 결과는 마이크로세틀라이트 마커는 같은 속(genus) 대상생물의 유전적 특성 분석에 이용이 가능하며, 다양한 대립유전자의 크기와 빈도를 활용하면 같은 genus에 속하며 유사한 형태형질을 갖는 종(species)을 정확하게 구분할 수 있음을 의미한다.

마이크로세틀라이트 마커를 분석하여 얻은 대립유전자형의 빈도로부터 구한 Nei의 유전적 거리와 유전적 분화정도(Gst)로 각 지역 집단의 유사도를 조사한 결과, 본 연구에서 사용한 마커가 높은 다형성정보량을 나타낸 것에 기인하여, 비교적 적은 수의 시료 수와 마커를 적용했음에도 불구하고, 지역 집단간 유전적 다양성 정도를 정확하게 계산할 수 있었다. 서식 지역집단간 유전적거리로 분석한 유연관계는 서식지의 지리적인 위치에 따라, 비교적 가까운 거리에 서식하는 코스레, 폰페이, 축으로 이루어진 한 개의 그룹과 또 다른 한 개의 지리적 그룹(얍과 팔라우 지역집단)을 이루고 있는 것을 확인했다. 향후 연구에서는 채집지역을 다양하게 하여 분석 시료의 수를 증가시키고, 높은 다형성정보량을 갖는 마커로 추가 분석하면, *S. serrata*의 유전자 흐름에 관한 내용을 포함하여 유전적 구조를 명확히 해석할 수 있다. 또 서식 환경에 따른 유전적 특성을 비롯하여 남방톱날꽃게의 종간 구별 및 종 특이성도 구명할 수 있을 것이다.

5. 결 론

마이크로네시아의 얍, 축, 폰페이, 코스레, 팔라우 지역에서 서식하는 남방톱날꽃게 집단의 유전적 구성을 이해하고 유전적 다양성을 조사하기 위하여 4개의 마이크로세틀라이트 마커를 분석하였다. 좌위당 대립유전자의 수, 관찰된 이형질성, 기대된 이형질성, 다형성정보량, 집단간 유전자 변이도 및 집단간 유전적거리를 계산하였다. 본 연구에서 사용한 4개의 마이크로세틀라이트 마커는 평균 다형성정보량 값이 0.797로 마커의 다형성이 높아 남방톱날꽃게 집단의 유전적 다양성 분석에 유용하였다. 특정 지역 집단에서 특이적으로 나타나는 대립유전자는 없었으며, 대립유전자의 분포와 빈도가 5개 지역 집단에서 서로 유사하였다. 유전적 다양성 정도의 척도가 되는 기대된 이형질성 값은 5개 지역집단에서 0.806~0.871로 계산되어 남서태평양 일대에 서식하는 남방톱날꽃게 집단이 유전적으로 다양성이 높음을 알 수 있었다. *S. serrata* 팔라우 지역집단의 기대된 이형질성 값이 다른 지역집단에 비해 다소 높았으나, 나머지 4개의 지역 집단과 유전적 다양성 차이는 극히 적었다. 5개 지역집단간 유전적 거리(D_A distance)는 0.2009~0.3350이었으며, 팔라우 지역 집단이 다른 지역 집단과 비교적 먼 유연관계를 나타냈고, 코스레, 폰페이와 축 지역집단이 한 개의 그룹을 형성하였고, 얍 지역집단과 팔라우 지역집단이 다소 먼 유연관계를 형성하였다. 이상의 결과에서 남서태평양 일대에 서식하는 남방톱날꽃게 집단은 유전적으로 높은 다양성을 갖고 있으며, 서식지역에 따른 유전적 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

사 사

이 연구는 해양수산부의 연구사업 “남서태평양 해양생물자원 개발 연구”의 지원을 받아 수행되었다.

참고문헌

Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res **3**(9):2303-2308

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet **32**(3):314-331

Brown IW (1993) Mangrove crabs. In: Wright A, Hill L (eds), Nearshore marine resources of the South Pacific: Information for fisheries development and management, forum fisheries agency, Honiara, Solomon Islands, pp 609-642

FAO (2008) Species fact sheet. *Scylla serrata* (null, 2001). FAO Species identification and data program. Text and table on the internet. http://www.fao.org/fishery/species/2637. Accessed 5 Mar 2009

FRDC (2005) Methods for monitoring the abundance and habitat of the northern australian mud crab *Scylla serrata*. Fisheries Research & Development Council (FRDC) Project 2000/142 Final Repoprt pp 5-8

Gopurenko D, Hughes JM (2002) Regional patterns of genetic structure among Australian populations of the mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea : Decapoda): Evidence from mitochondrial DNA. Mar. Freshw. Res **53**(5):849-857

Gopurenko D, Hughes JM, Jing M (2002) Identification of polymorphic microsatellite loci in the mud crab *Scylla serrata* (Brachyura: Portunidae). Mol Ecol Notes **2**(4) 481-483

Hänfling B, Weetman D (2003) Characterization of microsatellite loci for the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Mol Ecol Notes **3**(1):15-17

Hill BJ (1975) Abundance, breeding and growth of the crab *Scylla serrata* in two South African estuaries. Mar Biol **32**(2):119-126

Jensen PC, Bentzen P (2004) Isolation and inheritance of microsatellite loci in the Dungeness crab (Brachyura: Cancridae: *Cancer magister*). Genome **47**(2):325-331

Keenan CP (1999) The fourth species of Scylla. In: Keenan CP, Blackshaw A (eds) Mud crab aquaculture and biology ACIAR proceedings, vol 78, pp 48-58

Klinbunga S, Boonyapakdee A, Pratoomchat (2000) Genetic diversity and species-biagnostic markers of mud crab (Genus *Scylla*) in eastern Thailand determined by RAPD analysis. Mar Biotechnol **2**(2):180-187

Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture **238**(1):1-37

Nei M (1972) Genetic distance between population. Am. Nat. **106**(949):283-292.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics **89**(3):583-590

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenic trees from molecular data. J Mol Evol **19**(2):153-170

Olufowote JO, Xu Y, Chen X, Goto M, McCouch SR, Park WD, Beachell HM, Dilday RH (1997) Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (Oryza sativa L.) using microsatellite and RFLP markers. Genome **40**(3):370-378

Ortí G, Pearse DE, Avise JC (1997) Phylogenetic assessment of length variation at a microsatellite locus. Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20):10745-10749

Ota T (1993) DISPAN. Pensylvania State University, PA. USA.

Park S (2000) Microsatellite Toolkit for MS Excel 97 or 2000 (personel communication).

Tepolt CK, Bagley MJ, Geller JB, Blum MJ (2006) Characterization of microsatellite loci in the European green crab (*Carcinus maenas*). Mol Ecol Notes **6**(2):343-345

Urbani N, Sévigny JM, Sainte-Marie B, Zadworny D, Kuhnlein U (1998) Identification of microsatellite markers in the snow crab Chionoecetes opilio. Mol Ecol **7**(3): 357-358

Yi SK, Lee SK, Lee JM (2009). Preliminary study of seed production of the micronesian mud crab *Scylla serrata*(Crustacea: Portunidae) in Korea. Ocean and Polar Res **31**(3):257-264

Zhongbao LI, Shaojing LI, Guizhong W (2004) Genetic diversity and differentiation of mud crab Scylla serrata populations from southeastern China. Acta Oceanol Sin **23**(2):309-316

Received Oct. 20, 2009
Revised Dec. 7, 2009
Accepted Dec. 8, 2009