



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

PCR-RFLP 분석법을 이용한 한국 해
연안에 서식하는 전복류의 진화적
유연관계 분석

2017년 2월

부경대학교 산업대학원

미생물학과

강 성 철

이학석사 학위논문

PCR-RFLP 분석법을 이용한 한국 해
연안에 서식하는 전복류의 진화적
유연관계 분석

지도교수 김 군 도

이 論文을 강성철 碩士學位論文으로 提出함

2017년 2월

부경대학교 산업대학원

미생물학과

강 성 철

강성철의 이학석사 학위논문을 인준함



2017 년 2 월 일

주 심 이학박사 김 영 태 (인)

위 원 이학박사 전 용 재 (인)

위 원 이학박사 김 군 도 (인)

목 차

List of Table.....	i
List of Figures.....	ii
영문초록.....	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1.1. 전복 공시 시료	5
1.2. Genomic DNA 분리	5
1.3. 전복 COI 염기서열 분석	7
1.4. PCR-RFLP 분석	7
III. 결과	9
1.1. 표준시료의 확보 및 형태학적 분류	9
1.2. 전복 COI 염기서열 분석	9
1.3. 전복 Calmodulin intron DNA를 이용한 PCR-RFLP 분석	19
IV. 고찰	27
V. 요약	29
VI. 감사의 글	30
VII. 참고문헌	31

List of Table

Table 1. 본 연구에 사용된 전복의 샘플링 지역 및 기관	6
Table 2. 본 연구에 사용된 primer 목록 및 염기서열	8
Table 3. 본 연구에 사용된 전복류의 형태학적 특징	10
Table 4. 국내 전복 4종에 대한 PCR-RFLP 분석을 통한 종 판별	23



List of Figures

Figure. 1. 한국 해 연안에 서식하고 있는 중·대형 종의 전복류	2
Figure. 2. 전복 sample의 COI 분석을 위한 PCR 수행 결과	11
Figure. 3. 한국 해 연안에 서식하는 전복 4종에 대한 COI 유전자의 유사성 분석 결과	12
Figure. 4. MEGA6 프로그램을 이용한 mitochondria COI 유전자를 이용한 전복 4종의 진화적 유연관계	13
Figure. 5. 본 연구자에 의해 밝혀진 COI 유전자와 An 등이 밝히 전복 COI 유전자의 비교를 통한 COI 유전자의 유사성 관계 분석	15
Figure. 6. 공시시료와 자연산 전복의 COI 염기서열 분석	16
Figure. 7. 본 연구에 사용된 전복과 NCBI 등록된 전복 COI 염기서열을 이용한 계통수 분석	18
Figure. 8. 공시시료를 이용한 CaM intron DNA의 PCR 결과	20
Figure. 9. 공시시료 전복 4종에 대한 second PCR결과 증폭된 PCR product의 염기서열 분석 결과	21
Figure. 10. 공시시료 4종에 대한 각각의 제한효소 처리 결과	22
Figure. 11. 여서도 지역에서 채집한 자연산 전복의 종 판별 결과	25
Figure. 11. Calmodulin intron III DNA 염기서열 바탕의 계통수분석	26

Phylogenetic Study of Genus *Haliotis* in Korea by PCR-RFLP analysis

Department of Microbiology Kang Sung Chul

Directed by Professor Kim Gun-Do

Abalones are gastropod mollusks belonging to the genus *Haliotis*. Pacific abalones are regarded as a very important marine gastropod mollusk in Korea, Japan, China, and also in food industries around the world. In Korea, 6 species of abalone have been reported to occur along the coasts: *Haliotis discus hannai*, *Haliotis discus discus*, *Haliotis madaka*, *Haliotis gigantea*, *Haliotis diversicolor supertexta*, and *Haliotis diversicolor diversicolor*. This study was performed to discriminate the genetic variances by the partial sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) genes and PCR-RFLP analysis against four species of Pacific abalone (*H. discus hannai*, *H. discus*, *H. madaka*, *H. gigantea*). COI gene is reasonably well conserved and has been sequenced in various invertebrate taxa. The PCR-RFLP analysis technique is a relatively simple and low cost method that allows differentiation of taxa without the need to know their genome. In this study, we investigated the genetic diversity, phylogenetic relationships within each species. The COI and PCR-RFLP analysis were able to distinguish between *H. gigantea* and the other three species. However, these analysis methods were inadequate to distinguish between *H. discus* and *H. madaka*. These results are believed to be able to provide a basis data for future hybrid breeding research by defining the genetically closely related four species of abalone, which is to develop new hybrid abalone for export using hybrid breeding.

I. 서론

전복은 전복과(*Haliotidae*), 전복속(*Haliotis*)에 속하며, 전 세계의 온대, 열대, 아열대 지역 연안에서 서식하는 종으로 현재까지 100 여종 이상이 존재하는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 전복 중에서 한국, 일본, 및 중국에 서식하고 있는 전복은 6개종으로 구분되며, 한류성인 북방전복(*Haliotis discus hannai*)과 난류성인 둥근전복(*Haliotis discus discus*), 왕전복(*Haliotis madaka*), 말전복(*Haliotis gigantea*), 오분자기(*Haliotis diversicolor diversicolor*), 마대오분자기(*Haliotis diversicolor supertexta*) 등이 있다[2].

전복에 대한 연구는 1960년대 전복 양식이 시도되면서 많은 연구가 광범위하게 진행되고 있으며, 현재는 분자유전학적 연구방법을 이용하여 우수 형질을 가지는 전복을 선발 육종하기 위한 방법들을 제시하고 있다. 우리나라의 경우 중·대형 종이라 할 수 있는 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복(Figure 1)을 대상으로 교잡육종을 위한 다양한 연구가 시도되고 있으나, 지금까지도 이들 종에 대한 명확한 종 판별이 힘들어 교잡육종에 앞서 명확한 종 분류 기준을 제시하는 것이 우선이라 할 수 있다.

현재까지 우리나라 근해에 서식하는 전복과의 종 분류를 위한 방법으로는 전통적인 방법인 형태학적 분류가 대부분을 차지하고 있다. 그러나 형태학적 차이를 기준으로 분류하는 경우, 형태적 차이는 유전적 요인 이외에 환경적 요인에 의해서도 결정되기 때문에 기존의 형태학적 분류 방법으로는 우리나라 연근해에 서식하는 전복과의 종 분류가 힘들며, 이를 극복하기 위해서는 진화적 유연관계를 분석하여 명확한 종을 분류할 수 있는 연구 방법이 요구되고 있다[3].

이러한 이유로 분자생물학적 기법이 적용된 국내 서식 전복과의 진화적 유연관계를 밝히기 위한 연구가 다각도로 진행되고 있다. 선행 연구된 연구 논문들을 살펴보면 종 구분을 위한 방법으로 mtDNA (mitochondrial DNA)의 16S rRNA 유전자, COI (Cytochrome c oxidase subunit 1) 유전자, ITS (internal transcribed spacer sequence)의 염기서열을 비교 분석하는 방법과 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA),



Figure 1. 한국 해 연안에 서식하고 있는 중·대형 종의 전복류[4]. (A) *Haliotis discus hannai*, (B) *Haliotis discus discus*, (C) *Haliotis gigantea*, (D) *Haliotis madaka*.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), EST (Expressed Sequence Tags), MS (Microsatellite Marker) 분석 등의 방법들이 제시되었다[5-7].

다양한 분자생물학적 실험 방법들 중에서 미토콘드리아 DNA의 염기 서열을 분석하는 연구기법(16s rRNA, COI 유전자 서열 비교 분석)은 종을 구분하기 위한 방법으로 유용하게 이용되는 방법이다. 미토콘드리아는 DNA repair system이 결여되어 있고, 반수체 상태로 유지되기 때문에 변이율이 높다[8]. 이러한 특성 때문에 미토콘드리아 DNA는 종을 구분하기 위한 maker로 이용되고 있으며, 그 중 대표적인 유전자가 COI 유전자이다. COI 유전자의 염기 서열을 분석하여 종 내와 종 간 유전적인 유연관계를 분석하면 동종의 경우 전체 염기 서열 중 1~2% 이내의 차이를 보이며, 이종간의 경우 2% 이상의 차이가 나타난다[8]. 그러나 미토콘드리아 DNA를 이용한 종 분류를 위한 maker의 경우 하나의 유전자만 이용하기 때문에 낮은 다양성을 가진다는 한계가 있다[9]. 따라서 하나의 유전자가 아닌 genomic DNA를 이용한 유전자 maker가 종내 집단 및 종간 유전적 차이를 알아보는 데 유용하게 활용될 수 있다. Genomic DNA를 이용한 진화적 유연관계 분석법 중 RAPD, RFLP, AFLP 방법의 경우 중합효소 연쇄반응(PCR)법과 제한효소를 사용하여 불특정 유전자를 증폭한 후 제한효소로 처리하여 증폭된 유전자의 아가로오즈 전기영동에 의한 DNA pattern를 비교하는 방법으로, 이들 방법의 경우 불특정 유전자를 증폭하기 때문에 재현성이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이들 방법에 대한 장·단점을 극복하기 위해서 현재는 두 가지 이상의 방법을 병행하여 연구를 진행하는 경우가 많다. 이 중에서 본 연구에서 사용된 PCR-RFLP 분석법은 종 특이 유전자(예: Calmodulin gene) primer를 이용하여 PCR을 한 후, 제한효소 처리하여 그 단편들의 다양성을 분석하여 종간의 유전적인 차이를 분석하는 방법이다[10-12]. 이러한 방법은 적은 양의 DNA만으로도 분석이 가능하고, 실험 방법도 간단하여 종간의 유전학적인 구분에 자주 활용되는 방법이다. PCR-RFLP 분석법의 경우 어류 종 내 및 종간의 진화적 유연관계를 분석하기 위해 사용되고 있을 뿐만 아니라[12], 곤충과 식물 등의 다양한 생물 종들 사이에서 유사 종간의 유전적 유연관계를 연구하기 위해서 많이 활용되고 있다[6,7].

본 연구에서는 우리나라 연근해에 서식하고 있는 전복의 종간 구분을 위해 COI 유전자의 염기서열 분석과 현재까지 진행된 바 없는 전복 Calmodulin DNA의 intron 부위를 이용하여 한국 연안에 서식하는 중·대형 전복류인 북방전복, 등근전복, 왕전복, 말전복을 대상으로 종 분류를 위한 실험방법을 제시하는 것을 목적으로 한다. 본 연구의 결과는 전복류의 유전학적 유연관계를 명확히 함으로써 전복 양식 산업에 있어 우수 형질을 가지는 전복의 선별과 선발 육종을 위한 중요한 기초 데이터를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.



II. 재료 및 방법

전복 공시 시료

한국 연안에 서식하는 전복류 중 본 연구에 사용된 전복류는 대형 종이라 할 수 있는 북방전복(*H. discus hannai*), 둥근전복(*H. discus discus*), 왕전복(*H. madaka*), 말전복(*H. gigantea*)을 사용하며(Figure 1), 이들의 샘플링은 다음과 같다. 북방전복의 경우 국립수산물과학연구원 전략양식연구소 육종연구센터에서 샘플을 수집하며, 둥근전복, 왕전복, 말전복은 전라남도 해양수산과학원 전복연구센터에서 수집한 전복을 실험에 사용한다. 또한 자연산 전복을 여서도 지역에서 채집하여 실험에 사용하였다. 본 연구에 사용된 전복은 각 종별로 10개체씩을 이용하여 실험에 사용하며, Table 1에 요약 정리하였다. 수집한 전복은 부패 및 변질을 최소화하기 위해 살아있는 전복에서 근육 조직을 채취하여 -80℃에 보관하며, DNA 분리는 보관한 전복 샘플을 실험 직전에 녹여서 사용한다.

Genomic DNA 분리

Genomic DNA 분리는 Asahida 등[13]의 논문을 참고로 하여 분리한다. Genomic DNA를 분리하기 위해 전복 근육 조직 20 mg을 TNES-Urea buffer (8 M UREA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS)에 넣고 균질화 시킨 후 0.8 mg의 proteinase K와 RNase I을 넣고 60℃에서 1시간 동안 반응시킨다. Phenol:chloroform (1:1)을 반응액과 같은 부피로 넣고 vortex한 후 16,000 g, 4℃에서 5분간 원심분리 한다. 원심분리된 상층액을 다시 같은 부피의 Phenol:chloroform (1:1)과 반응시킨 후 다시 16,000 g, 4℃에서 5분간 원심분리 한다. 원심분리한 상층액을 새 튜브로 옮겨 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 다시 16,000 g, 4℃에서 5분간 원심분리 한다. 원심분리 후 침전된 DNA pellet을 75% ethanol로 씻어준 후 다시 원심분리 한다. Ethanol을 모두 제거하고 건조시킨 후 TE buffer 30 ml에 DNA를 녹이고, 이를 5배 희석하여 사용한다.

Table 1. 본 연구에 사용된 전복의 샘플링 지역 및 기관

Name	Collection regions or institute	Specific name
Y2-Y8	도서 지역 채집 (자연산)	?
Hdh	국립수산물과학원 생명공학연구소 육종연구센터(NFRDI)	<i>Haliotis discus hannai</i>
Hdd	전라남도 해양수산과학원 전복연구센터	<i>Haliotis discus discus</i>
Hm	전라남도 해양수산과학원 전복연구센터	<i>Haliotis madaka</i>
Hg	전라남도 해양수산과학원 전복연구센터	<i>Haliotis gigantea</i>

전복 COI 염기 서열 분석

전복의 COI 염기 서열을 분석하기 위해 Metz 등[8]의 논문에서 나온 전복 COI의 특이적인 primer를 디자인하여 사용하며, 이에 대한 염기서열은 Table 2에 정리하였다. PCR 반응은 2 μ l의 gDNA와 primer (10 pM) F1 1 μ l와 R1 1 μ l, 5 $\times$ HiQ-PCR Mix (Genotech™) 4 μ l, distilled water 12 μ l를 섞은 후 반응시켰다. PCR 반응 온도는 94℃에서 3분간 pre-denaturation 시킨 후, 30 cycle로 94℃ 30초, 52℃ 30초, 72℃ 40초 조건으로 반응시키고, final extension은 72℃에서 5분간 진행한다. 5 μ l의 PCR product를 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 확인한다. 남은 17 μ l의 PCR product는 PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 정제한 후 COSMO genotech (Busan, Korea)에 의뢰하여 염기 서열을 분석한다. 분석한 염기 서열은 서열 간의 유사성을 ClustalX 및 Genedoc을 이용하여 alignment하여 확인하며, 계통수 분석은 MEGA6 (molecular evolutionary genetics analysis)를 이용한 neighbor-joining method로 분석한다.

PCR-RFLP 분석

추출된 전복 genomic DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다. First PCR은 Initial denaturation으로 94℃에서 5분, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 1분 30초로 30 cycle하며, 최종 extension으로 72℃에서 5분간 반응시켰다. Second PCR은 Initial denaturation으로 94℃에서 5분 방치 후, 94℃ 30초, 65℃ 30초, 72℃ 1분 30초로 30 cycle하며, 최종 extension으로 72℃에서 5분간 반응시켰다. 본 PCR에 사용된 Primer 서열은 Table 2에 정리하였다. PCR 반응이 끝나면 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시 한 후 목적하는 PCR 밴드를 Elution하여 (또는 목적하는 band가 single band인 경우 PCR purification 후) 제한효소 처리에 사용한다. 제한효소 처리 방법은 다음과 같다. Buffer 1 μ l, 제한효소 1 μ l, 정제된 DNA 5 μ l, 3차 멸균증류수 3 μ l를 혼합한 후, 37℃에서 3시간 반응한다. 제한효소 처리 후, 그 산물을 1% agarose gel에 전기영동 하여 EtBr로 염색한 후, band pattern을 분석한다.

Table 2. 본 연구에 사용된 Primer 목록 및 염기서열

Name	Sequence (5' → 3')	비고
COI-F	GAT CCG GCT TAG TCG GAA CTG C	COI
COI-R	GAT GTG TTG AAA TTA CGG TCG GT	
CAD-F	CAA GAC ATG ATC AAC GAA GT	Frist PCR
CAD-R	TTC ATC TTT CTG GCC ATC AT	
IT3-F	TCA ACG AAG TAG ATG CTG ATG GTG AGT GC	Second PCR
IT3-R	GTT GAC GAT ATG TTG TTG CCA GCG GTT TCG A	

Ⅲ. 결과

표준 시료의 확보 및 형태학적 분류

한국 해 연안에 서식하는 전복과 패류에 대한 기록은 Nomura & Hatai (1928)가 *Haliotis discus* [14]를 기록한 이후 2004년까지 모두 2속 2종 및 4아종이 기록되었다. 본 연구에 사용된 북방전복, 등근전복, 왕전복, 말전복의 최초 보고된 내용을 살펴보면 1791년 Grnelin [15]이 말전복을 처음 보고한 이후로 등근전복 [16], 북방전복[17], 왕전복[18] 순으로 보고되었으며, 말전복에서 왕전복, 등근전복에서 북방전복을 분리하였다.

우리나라 연근해에 서식하는 전복류인 북방전복, 등근전복, 왕전복, 말전복의 표준 공시 시료 샘플 수집은 앞서 재료 및 방법에 나타냈었으며, 수집된 샘플들은 Won 등[19]이 발표한 논문을 참고 하여 형태학적 특징을 기준으로 분류하였으며, 이에 대한 결과는 Table 3에 나타내었다. 수집된 전복은 형태학적 특징에 부합하는 전복만을 선별하여 유전학적 계통 분류를 위한 실험에 사용하였다.

전복 COI 염기서열 분석

우리나라 연근해에 서식하는 전복류인 북방전복, 등근전복, 왕전복, 말전복의 COI 분석을 위해 PCR을 수행하였으며, 그 결과 약 580 bp 정도의 PCR band를 얻었을 수 있었다(Figure 2). COI 유전자의 염기서열을 비교한 결과 각각 전복의 유연관계는 97% 이상의 유사성을 나타냈고, 북방전복과 등근전복, 왕전복은 98% 이상의 유사성이 있으며, 말전복의 경우 97% 정도의 유사성이 있는 것으로 밝혀졌다. 각 전복의 COI 부분 염기서열 중 북방전복을 중심으로 다른 3종의 염기서열을 비교한 결과 20개의 단일 뉴클레오티드 차이가 관찰되었으며, 그 중 말전복과 다른 3종의 염기서열 비교 시 가장 많은 13개의 단일 뉴클레오티드 차이를 보이는 것으로 밝혀졌다(Figure. 3). 이러한 결과를 토대로 북방전복, 등근전복, 왕전복, 말전복의 계통수 분석은 Figure 4.에 나타내었다.

Table 3. 본 연구에 사용된 전복류의 형태학적 특징

종 류		내 용
<i>Haliotis discus hannai</i> (북방전복)		○ 장란형으로서 패각이 얇고, 패각 표면은 울퉁불퉁 함. ○ 내순폭(breadth of inner lip)이 좁음.
<i>Haliotis discus discus</i> (둥근전복)		○ 패각 표면은 울퉁불퉁한 것이 적음. ○ 내순폭이 넓음. ○ 공열은 체층보다 올라와 있음. ◦ 간격 넓고 앞쪽 3-5개만 열려있음.
<i>Haliotis madaka</i> (왕전복)		○ 오랜기간 말전복과 혼동되어 왔음. ○ 경사면에 강한 결절열이 있음. ○ 공열이 거칠고 높음. ◦ 앞쪽의 4~5개만이 뚫려있음.
<i>Haliotis gigantea</i> (말전복)		○ 패각은 원형에 가까움. ○ 공열은 왕전복의 것보다 많고 가늘고 낮으며 앞쪽 4개만이 뚫려있음. ○ 왕전복에 비해 좌측 경사면이 낮아 구별 됨. ○ 나선맥이 없이 평평하며 각구의 내면은 강한 진주색 광택 보임.

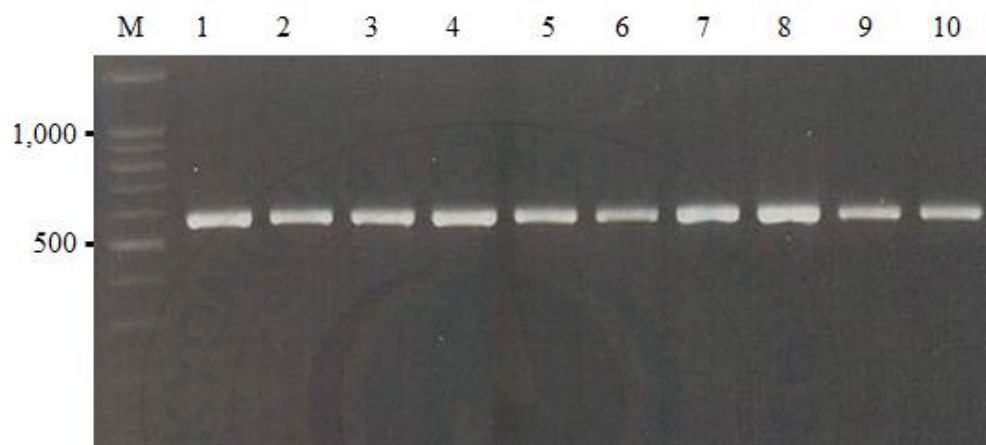


Figure 2. 전복 sample의 COI 분석을 위한 PCR 수행 결과. M; 100 bp DNA ladder, 1: Y2, 2: Y3, 3: Y4, 4: Y5, 5: Y6, 6: Y7, 7: 말전복(*H. gigantea*), 8: 왕전복(*H. madaka*), 9: 둥근전복(*H. discus discus*), 10: 북방전복(*H. discus hannai*).

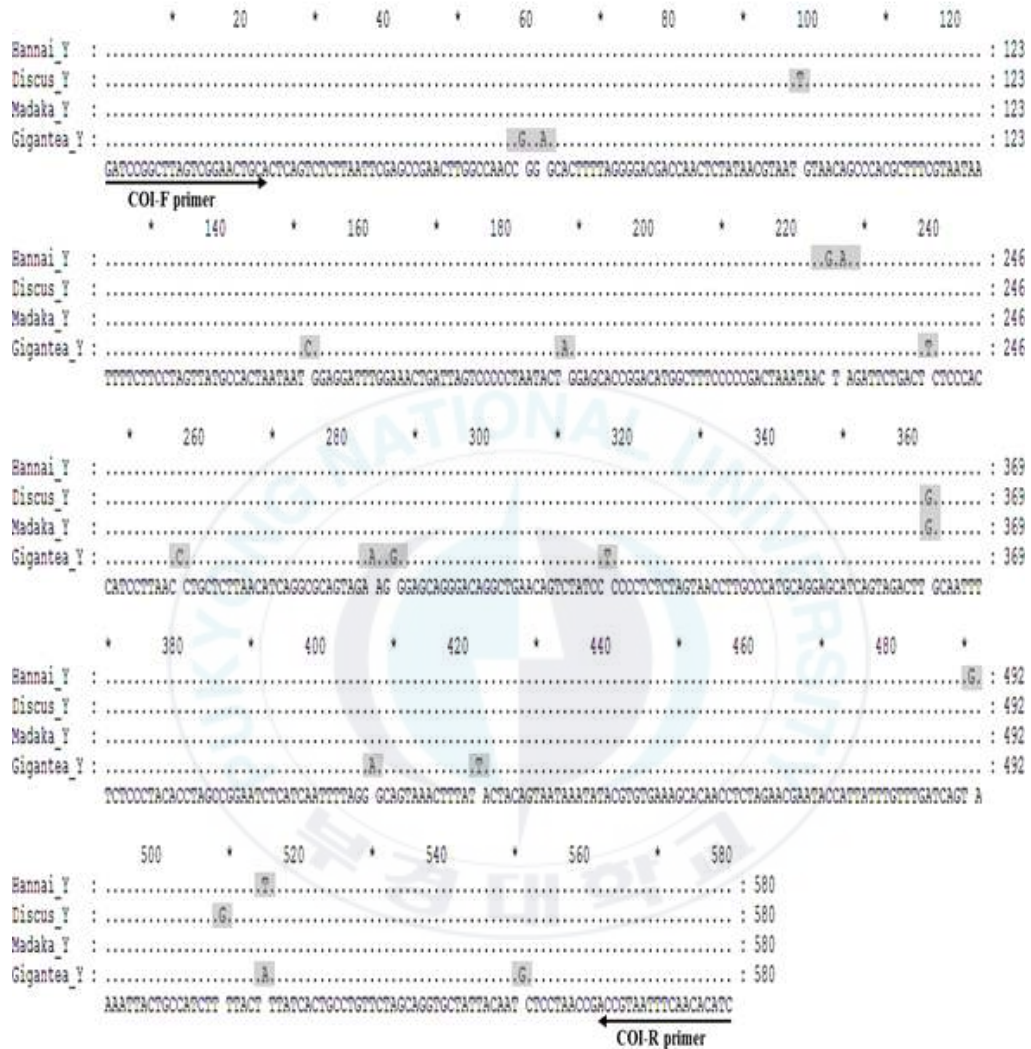


Figure 3. 한국 해 연안에 서식하는 전복 4종에 대한 COI 유전자의 유사성 분석 결과. Dot line은 각 유전자의 동일한 nucleotide이며, 변화된 nucleotide는 회색 box으로 표시하였음. 화살표 표시는 PCR 시 사용된 Primer site 임.

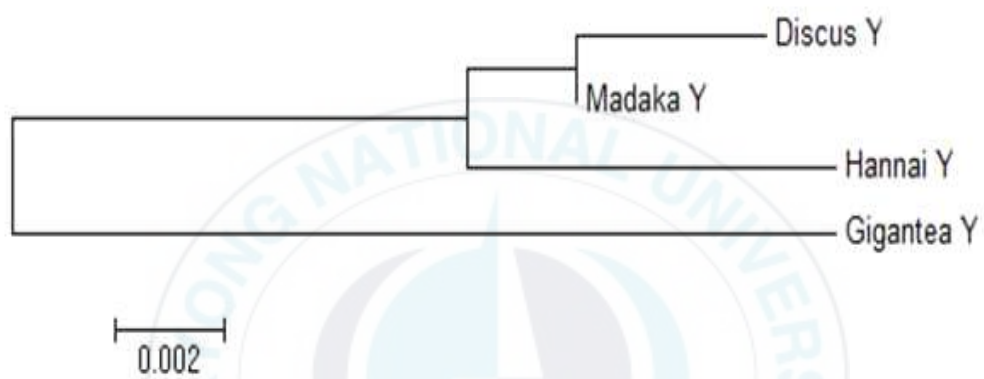


Figure 4. MEGA6 프로그램을 이용한 Mitochondria COI 유전자를 이용한 전복 4종의 진화적 유연관계.

계통수 분석 결과 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복은 유전적으로 근접한 종으로 분석된다. 하지만 이들 4종에 대한 유전적 유연관계를 세부적으로 나누면, 북방전복, 둥근전복, 왕전복은 같은 그룹으로 묶을 수 있고 말전복은 이들 3종과 유전적 유연관계가 비교적 먼 그룹으로 묶을 수 있다. 이러한 연구 결과는 An 등[2]이 발표한 논문과 같은 결과를 나타내고 있다. 또한, An 등[2]이 발표한 논문과 본 연구자에 의해 밝혀진 결과를 비교하였을 때, Figure 5에서 보는 바와 같이 북방전복, 둥근전복, 왕전복에 대한 COI 유전자의 서열은 98% 이상의 유사성을 보였다. 말전복은 An 등[2]에 의해서 밝혀진 서열과 본 연구자에 의해서 밝혀진 서열이 99%의 상동성을 보이며, 나머지 3종과는 97% 상동성을 보이는 것으로 밝혀졌다. 하지만 이들 COI 유전자를 이용하여 국내에 서식하는 4종의 전복류를 분류하기에는 한계점을 보이는 것으로 밝혀졌다. 이는 Figure 5에서 보는 바와 같이 An 등[2]이 밝힌 COI 유전자 서열과 본 연구자가 밝힌 COI 유전자를 이용한 계통수 분석에서 말전복은 다른 종과 다른 그룹을 형성하고 있지만, 다른 3종에 대한 계통수 분석에서는 명확한 그룹을 보이지 않았다.

여서도 지역에서 샘플한 자연산 전복의 진화적 유연관계를 분석하기 위해서 샘플된 전복에서 COI 유전자의 염기서열을 확보하였으며, 이들과 공시 시료로 확보한 전복 4종의 COI 유전자의 염기서열을 비교하여 진화적 유연관계 분석을 실시하였다. 이들 염기서열 분석 결과 참전복, 까막전복, 왕전복의 염기서열은 95% 이상 수준의 유사성을 보였으며 말전복은 이들 3 전복과 95% 이하의 유사성을 보였다. 또한 참전복, 까막전복 및 왕전복의 염기서열은 높은 수준의 유사성을 보였지만 참전복과 까막전복에 비해서 왕전복의 경우 5-6개의 nucleotide가 서로 다른 서열을 보였다. 또한 자연산 전복 채집군의 CO I 분석을 통하여 Y5 전복의 경우 왕전복과 가장 유사하였으며, Y8 전복의 경우는 말전복의 염기서열과 가장 유사하여 이들 전복 Y5, Y8를 각각 왕전복, 말전복으로 확인 되었다. 이에 대한 결과를 Figure 6에 나타내었다.

공시 시료와 여서도 지역 자연산 전복 등에서 확보된 전복의 COI 유전자 염기서열을 이용하여 계통수 분석을 위해 Neighbor-Joining method를 사용하여 phylogenetic tree로 분석하였다. Substitution model은 Kimura 2-parameter method를 이용했고 Bootstrap value를 1000으로 설정하여 진행하였다. Outgroup으로는 NCBI에

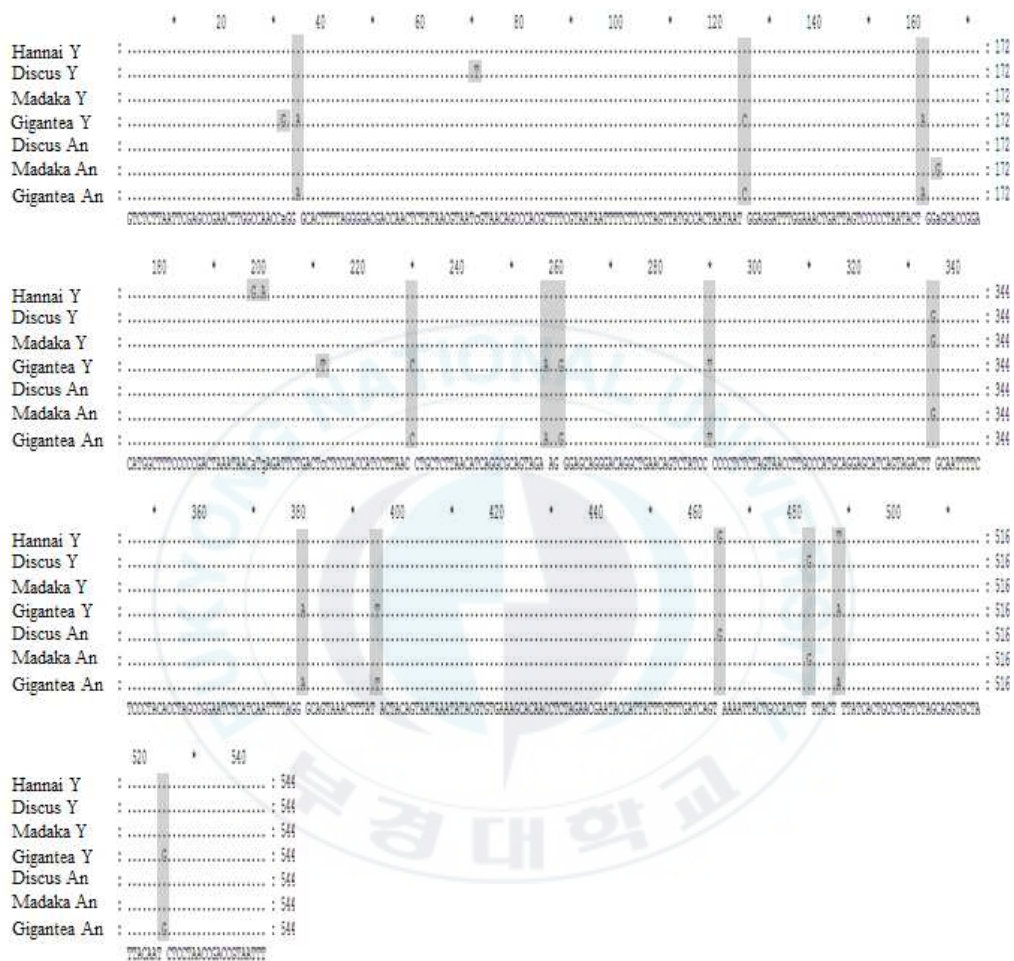


Figure 5. 본 연구자에 의해 밝혀진 COI 유전자와 An 등이 밝힌 전복 COI 유전자의 비교를 통한 COI 유전자의 유사성 관계 분석. Dot line은 각 유전자의 동일한 nucleotide이며, 변화된 nucleotide는 회색 box으로 표시하였음.

등재된 *Haliotis asinine* COI 유전자 염기서열(AY923917)을 사용하였으며, 진화적 거리를 비교하기 위해 NCBI에 등록된 *Haliotis discus hannai* (AB236697, AF060847), *Haliotis madaka* (AB236715), *Haliotis discus discus* (AY146398, AB236699, AB236701), *Haliotis gigantea* (AB236713, AB236711, AB236712, AY146400) COI 염기서열과 46개 type의 *Haliotis* sp.의 COI 염기서열(Hwang., 2010)을 이용하였다. NCBI에 등록된 57개의 전복 염기서열과 10 종류의 전복 샘플 (공시시료 및 여서도 지역 채집 자연산 전복)의 COI 분석결과를 이용하여 Neighbor-joining 방법으로 계통수를 분석하여 Figure 7에 나타내었다. 그 결과 Y2, Y3, Y4, Y7, Y6은 *Haliotis discus discus*와 같은 clade를 형성하는 것을 알 수 있으며, Y5는 *Haliotis madaka*와 같은 clade에 속한다. Y8는 *Haliotis gigantea*은 clade에 속한다. 따라서 COI 분석을 통하여 Y8는 *Haliotis gigantea* 종임을 알 수 있다.

이상과 같이 전복 COI 유전자의 계통수 분석을 통해 이들의 진화적 유연관계는 크게 1속 3종으로 분류되었다. 하지만 NCBI와 An 등이 등록한 전복 COI 유전자와 본 연구에서 밝히 4종의 염기서열을 비교 분석하면 이들의 염기서열이 95% 이상의 유사성을 가지고 있어, COI 유전자 서열 분석만으로 한국 해 연안에 서식하는 전복 4종에 대한 명확한 진화적 유연관계를 설명하기에 힘들 것으로 사료된다. 이는 Hamm과 Burton의[20] 논문에서 캘리포니아 연안 5곳에서 *Haliotis cracherodii* 전복을 채취하여 이들 전복의 COI 유전자를 분석하여 지역에 따른 COI 유전자의 유전적 유연관계를 확인하는 연구 결과에서 캘리포니아 연안에 서식하는 전복의 경우 1개 종에서 8개의 염기 서열에서 차이가 나타났고, 총 12 패턴이 나타난다고 보고하였다. 그러나 다른 유전적 분석 방법인 allozyme과 비교하였을 때, allozyme보다 낮은 다양성 수준 때문에 지역에 따른 진화적인 특징이 나타나지 않는 것으로 보고되었다. COI 유전자의 경우, 미토콘드리아 DNA가 가지는 특성 때문에 진화적 유연관계에 관한 연구에 많이 이용되고 있는 방법이지만, 다양성 수준이 낮아서 종내 혹은 종간의 구분이나 진화적 유연관계 정도를 나타내는데 있어서는 한계성이 있어 보인다. 이러한 연구 결과를 토대로 봤을 때 현재 까지 밝혀진 국내 서식 전복 4종에 대한 ITS, 미토콘드리아 16s rRNA 유전자, COI 유전자를 이용하여 종을 분류하는 것은 한계점이 있어, 이들의 진화적 유연관계를 설명하기 위해서는 다른 방법이 제시되어야 할 것으로 사료된다.

Haliotis discus discus

Haliotis discus hannai

Haliotis madaka

Haliotis gigantea

Haliotis asinina
(Outgroup)

Figure 7. 본 연구에 사용된 전복과 NCBI 등록된 전복 COI 염기서열을 이용한 계통수 분석.

전복 *Calmodulin intron DNA*를 이용한 PCR-RFLP 분석

국내에 서식하는 4종에 대한 calmodulin 유전자를 이용하여 진화적 유연 관계를 분석하고자 하였다. Calmodulin (CaM) 유전자의 경우 하등동물에서부터 고등동물에게까지 다양한 종류로 분포하는 유전자 중 하나로 알려져 있으며, 특히 사람의 경우 주된 CaM의 경우 5가지 type (CaM1, CaM2, CaM3, CaML3, CaML5) 과 다양한 CaM like 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다. Calmodulin 유전자의 경우 genomic DNA에 존재하고 있는 유전자이며, exon의 경우 그 서열이 잘 보존 되었지만, intron의 경우 중 분류를 위한 marker로 사용되어 왔다. 이런 calmodulin 유전자의 intron 부분의 다형성은 중 구분을 위한 marker로 사용되었으며, 어류 및 이매패류 등에서 중 구분을 위한 marker로 연구가 보고된 바 있다[10-12].

본 실험을 진행하기 위해서 사용된 샘플은 공시 시료 (Sample: 4종), 여서도 채집 시료(자연산 전복: 7종)을 template로 사용하여 재료 및 방법에 나와 있는 대로 실험을 실시하였다. 공시 시료 4종의 genomic DNA를 이용하여 Frist PCR로 CAD-F와 CAD-R primer를 이용하여 target 유전자를 증폭한 후 결과 다양한 PCR band를 확인 할 수 있었다(Figure 8A). 이를 다시 IT3-F와 IT3-R primer를 이용하여 second PCR 수행한 결과 4종의 전복 모두에서 약 1,200 bp에서 single band로 증폭됨을 확인 할 수 있었다(Figure 8B). Second PCR에서 얻어진 PCR product를 정제한 후 이들의 염기서열을 분석하였으며, 이에 대한 결과는 Figure 9에 나타내었다. Figure 9에의 염기서열을 살펴보면 전복 4종에서 각기 다른 제한효소 site를 확인 할 수 있었다. 즉, 북방전복은 Mun I과 Cla I site, 둥근전복은 Mun I, 왕전복은 Cla I site, 말전복에서는 Mun I과 Psp I site가 존재하였다.

전복 4종의 calmodulin intron DNA의 염기서열 특성을 바탕으로 제한효소 처리를 하였으며, Buffer 1 μ l, 제한효소 1 μ l, 정제된 DNA 5 μ l, 3차 멸균증류수 3 μ l를 혼합한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응하여 1% agarose gel에 전기영동한 결과 각 전복에 따라 특이적 band pattern을 확인 할 수 있었으며, 이를 Figure 10 및 Table 3에 정리하여 나타내었다. 결과를 살펴보면, 북방전복의 경우 Mun I, Cla I, Mun I+Cla I 처리 시 double band pattern를 보이며, Psp I에는 반응하지 않았다. 둥근전복의 경우 Psp I, Cla I에는 반응하지 않으며, Mun I 반응 시 single band pattern를 보인다.

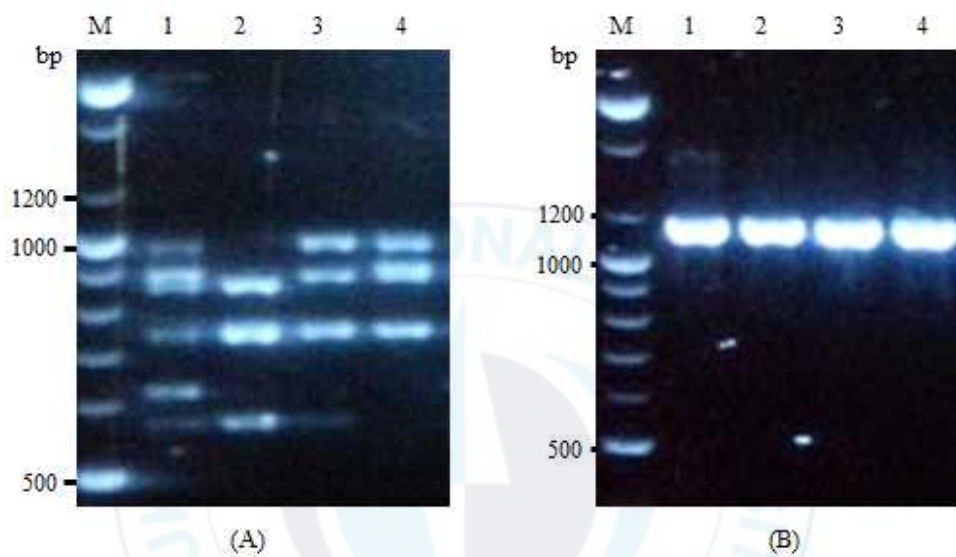


Figure 8. 공시 시료를 이용한 CaM intron DNA의 PCR 결과. (A), CaM intron DNA의 first PCR 결과. (B), CaM intron DNA의 second PCR 결과. M; 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea), 1; 북방전복, 2; 둥근전복, 3; 왕전복, 4; 말전복.

북방전복의 Mun I 및 Cla I site 포함 칼모들린 인트론 DNA 염기서열

```

1      TCAACGAGG TAGATGCTG ATGTTGAGT GGTGGGTG CGTGAGTGA GTGAGTGAG CTTTGTCT GTGTTGCT AACGCGCA CTCAGCAAT
      IT 3 Forward primer
91     AATCCAGCT TAATGAOAG CGGCTGTGA AATAAGGA AAGAGGTG GTCTGTTTC TCACAATCC GAATGGCAT CCTGTGAC CGGAAAGC
181    CAACGCTTT GTTGATCCA ATGCTAGAT GAOCATATT TAGATGACA TAGAGGAGT GTGAGGTTT AACATGTCA TAATGGATT AACGATTAA
271    TAOCOCAGT GTCTGAAA TTAATGOS AAGTTTAT GTTCTTCA TCCTCACTG TTGGAGACA AACTGACAC TCTACTTTC ACGACATA
361    CAACATTAC CTGACAGCA TGTCAACAA TTAATATA CGGACAAA ACCATTTC ATCATCACA CGAATGTTT TACTAAAT ACGAGAGAC
451    AGAGAACGA TTGCGACTT TATCATAG TTTATATT ATGAATCAC TATCAATA GTGATGATA CTAGTGTG CGGAGAAC GTGCTCTGC

      ClaI MunI
541    CTCACGCT TGCATTGT CACAACAC ATGCAAGG CAATCAAT TGTTCOCT GAAAAAAC CCAAGGGA ATGACCTCC ACATGTATA
631    TTATAATC TTTTGAAA GTTTGCTG AGGCTTGA TGTGTGTA CTTTATCA AATCAATC AGTTTCAG CATGAGGCG TATTAGGCT
721    CTTTOSAAA TCTTGATG AAGAGCAT GCGGATTG TACTACACA AGTTGGGA ATATGCGCA CCAAGGCT AAAOCTGCT AGAATCTAG
811    ATGACATA GAGGGAAG TGTACATG AGAATCAT ATGATATG GTGTGAGA AATAGTTT TAAATTCAG AATAGGTGA GTGAGTGAC
901    AGTATGTT TTATGCTG TTTAGCAA TATTCAGC AATATCAG CGGGAACA CGGAAAC TGGCTTCA ACAATTCG CCATGTGAT
991    GAATGAA CCGTGTCT CGGCTGAC GAGACAGC CTTTAAOC CTAACTAC CCGACGCG CTTGAGAT AGTAAATG AATGATTAT
1081   CTGTTATG GTCAACATT TGTATATC TGTATGCG GTTCTAAT TGATGAAA CGGCTGCA ACAACATAT CGTCAAC
      IT 3 Reverse primer

```

(A)

동근전복의 Mun I site 포함 칼모들린 인트론 DNA 염기서열

```

1      TCAACGAGG TAGATGCTG ATGTTGAGT GGTGGGTG CGTGAGTGA GTGAGTGAG CTTTGTCT GTGTTGCT AACGCGCA CTCAGCAAT
      IT 3 Forward primer
91     AATCCAGCT TAATGAOAG CGGCTGTGA AATAAGGA AAGAGGTG GTCTGTTTC TCACAATCC GAATGGCAT CCTGTGAC CGGAAAGC
181    CAACGCTTT GTTGATCCA ATGCTAGAT GAOCATATT TAGATGACA TAGAGGAGT GTGAGGTTT AACATGTCA TAATGGATT AACGATTAA
271    TAOCOCAGT GTCTGAAA TTAATGOS AAGTTTAT GTTCTTCA TCCTCACTG TTGGAGACA AACTGACAC TCTACTTTC ACGACATA
361    CAACATTAC CTGACAGCA TGTCAACAA TTAATATA CGGACAAA ACCATTTC ATCATCACA CGAATGTTT TACTAAAT ACGAGAGAC
451    AGAGAACGA TTGCGACTT TATCATAG TTTATATT ATGAATCAC TATCAATA GTGATGATA CTAGTGTG CGGAGAAC GTGCTCTGC

      MunI
541    CTCACGCT TGCATTGT CACAACAC ATGCAAGG CAATCAAT TGTTCOCT GAAAAAAC CCAAGGGA ATGACCTCC ACATGTATA
631    TTATAATC TTTTGAAA GTTTGCTG AGGCTTGA TGTGTGTA CTTTATCA AATCAATC AGTTTCAG CATGAGGCG TATTAGGCT
721    CTTTOSAAA TCTTGATG AAGAGCAT GCGGATTG TACTACACA AGTTGGGA ATATGCGCA CCAAGGCT AAAOCTGCT AGAATCTAG
811    ATGACATA GAGGGAAG TGTACATG AGAATCAT ATGATATG GTGTGAGA AATAGTTT TAAATTCAG AATAGGTGA GTGAGTGAC
901    AGTATGTT TTATGCTG TTTAGCAA TATTCAGC AATATCAG CGGGAACA CGGAAAC TGGCTTCA ACAATTCG CCATGTGAT
991    GAATGAA CCGTGTCT CGGCTGAC GAGACAGC CTTTAAOC CTAACTAC CCGACGCG CTTGAGAT AGTAAATG AATGATTAT
1081   CTGTTATG GTCAACATT TGTATATC TGTATGCG GTTCTAAT TGATGAAA CGGCTGCA ACAACATAT CGTCAAC
      IT 3 Reverse primer

```

(B)

왕전복의 Cla I site 포함 칼모들린 인트론 DNA 염기서열

```

1      TCAACGAGG TAGATGCTG ATGTTGAGT GGTGGGTG CGTGAGTGA GTGAGTGAG CTTTGTCT GTGTTGCT AACGCGCA CTCAGCAAT
      IT 3 Forward primer
91     AATCCAGCT TAATGAOAG CGGCTGTGA AATAAGGA AAGAGGTG GTCTGTTTC TCACAATCC GAATGGCAT CCTGTGAC CGGAAAGC
181    CAACGCTTT GTTGATCCA ATGCTAGAT GAOCATATT TAGATGACA TAGAGGAGT GTGAGGTTT AACATGTCA TAATGGATT AACGATTAA
271    TAOCOCAGT GTCTGAAA TTAATGOS AAGTTTAT GTTCTTCA TCCTCACTG TTGGAGACA AACTGACAC TCTACTTTC ACGACATA
361    CAACATTAC CTGACAGCA TGTCAACAA TTAATATA CGGACAAA ACCATTTC ATCATCACA CGAATGTTT TACTAAAT ACGAGAGAC
451    AGAGAACGA TTGCGACTT TATCATAG TTTATATT ATGAATCAC TATCAATA GTGATGATA CTAGTGTG CGGAGAAC GTGCTCTGC

      ClaI
541    CTCACGCT TGCATTGT CACAACAC ATGCAAGG CAATCAAT TGTTCOCT GAAAAAAC CCAAGGGA ATGACCTCC ACATGTATA
631    TTATAATC TTTTGAAA GTTTGCTG AGGCTTGA TGTGTGTA CTTTATCA AATCAATC AGTTTCAG CATGAGGCG TATTAGGCT
721    CTTTOSAAA TCTTGATG AAGAGCAT GCGGATTG TACTACACA AGTTGGGA ATATGCGCA CCAAGGCT AAAOCTGCT AGAATCTAG
811    ATGACATA GAGGGAAG TGTACATG AGAATCAT ATGATATG GTGTGAGA AATAGTTT TAAATTCAG AATAGGTGA GTGAGTGAC
901    AGTATGTT TTATGCTG TTTAGCAA TATTCAGC AATATCAG CGGGAACA CGGAAAC TGGCTTCA ACAATTCG CCATGTGAT
991    GAATGAA CCGTGTCT CGGCTGAC GAGACAGC CTTTAAOC CTAACTAC CCGACGCG CTTGAGAT AGTAAATG AATGATTAT
1081   CTGTTATG GTCAACATT TGTATATC TGTATGCG GTTCTAAT TGATGAAA CGGCTGCA ACAACATAT CGTCAAC
      IT 3 Reverse primer

```

(C)

말전복의 Mun I alc Psp I site 포함 칼모들린 인트론 DNA 염기서열

```

1      TCAACGAGG TAGATGCTG ATGTTGAGT GGTGGGTG CGTGAGTGA GTGAGTGAG TGAGTGAGT GAGTGAGCT TTGCTGTC GTTGCTAA
      IT 3 Forward primer
91     AATCCAGCT TAATGAOAG CGGCTGTGA AATAAGGA AAGAGGTG GTCTGTTTC TCACAATCC GAATGGCAT CCTGTGAC CGGAAAGC
181    CAACGCTTT GTTGATCCA ATGCTAGAT GAOCATATT TAGATGACA TAGAGGAGT GTGAGGTTT AACATGTCA TAATGGATT AACGATTAA
271    TAOCOCAGT GTCTGAAA TTAATGOS AAGTTTAT GTTCTTCA TCCTCACTG TTGGAGACA AACTGACAC TCTACTTTC ACGACATA
361    CAACATTAC CTGACAGCA TGTCAACAA TTAATATA CGGACAAA ACCATTTC ATCATCACA CGAATGTTT TACTAAAT ACGAGAGAC
451    AGAGAACGA TTGCGACTT TATCATAG TTTATATT ATGAATCAC TATCAATA GTGATGATA CTAGTGTG CGGAGAAC GTGCTCTGC

      MunI
541    CTCACGCT TGCATTGT CACAACAC ATGCAAGG CAATCAAT TGTTCOCT GAAAAAAC CCAAGGGA ATGACCTCC ACATGTATA
631    TTATAATC TTTTGAAA GTTTGCTG AGGCTTGA TGTGTGTA CTTTATCA AATCAATC AGTTTCAG CATGAGGCG TATTAGGCT
721    CTTTOSAAA TCTTGATG AAGAGCAT GCGGATTG TACTACACA AGTTGGGA ATATGCGCA CCAAGGCT AAAOCTGCT AGAATCTAG
811    ATGACATA GAGGGAAG TGTACATG AGAATCAT ATGATATG GTGTGAGA AATAGTTT TAAATTCAG AATAGGTGA GTGAGTGAC
901    AGTATGTT TTATGCTG TTTAGCAA TATTCAGC AATATCAG CGGGAACA CGGAAAC TGGCTTCA ACAATTCG CCATGTGAT
991    GAATGAA CCGTGTCT CGGCTGAC GAGACAGC CTTTAAOC CTAACTAC CCGACGCG CTTGAGAT AGTAAATG AATGATTAT
1081   CTGTTATG GTCAACATT TGTATATC TGTATGCG GTTCTAAT TGATGAAA CGGCTGCA ACAACATAT CGTCAAC

      PspI
631    CCACATGTA TATTATAA TCTTTTGA AGTTTTCG TGAGGCTT GACTGTGT AACCTTAT CAACAAAG TTTAGCAT GAGGCTAT
721    TACGCTCT TCAGAAAT GGTAGAGA GAGCATGC CGATTGAC TACACAAGT TGGGAATA TGGCACA AAGGCTAA OCTGCTAG
811    ATCTAGAT GACATAGG GGAAGTGT ACATGTGA AATCATAT CATAGCTG TTGOSAAAT AGTTTGA AATCAGAT AAGTGAATG
901    AGTGACAT ATGTTTAA TGTGCTTT TAGCAATAT TCAGCAAT ATCAGGCG GGAACAAG GAAATTTG CTTCAACA AATTACCA
991    TGTGTGAA TCAGACCG TGTCTTGG CGTGAGAG ACAAGCTT TAACACTA AGCTACCG ACGGCTCT CAGATAG TAATGCAAT
1081   GATTATCT GTATGCT ACATTTTG TTATAGCT TATTGTGT CTAAATGA TGGAAACG CTGACACA ACATATGT CAAC
      IT 3 Reverse primer

```

(D)

Figure 9. 공시 시료 전복 4종에 대한 second PCR 결과 증폭된 PCR product의 염기서열 분석 결과. (A); 북방전복, (B); 동근전복, (C); 왕전복, (D); 말전복.

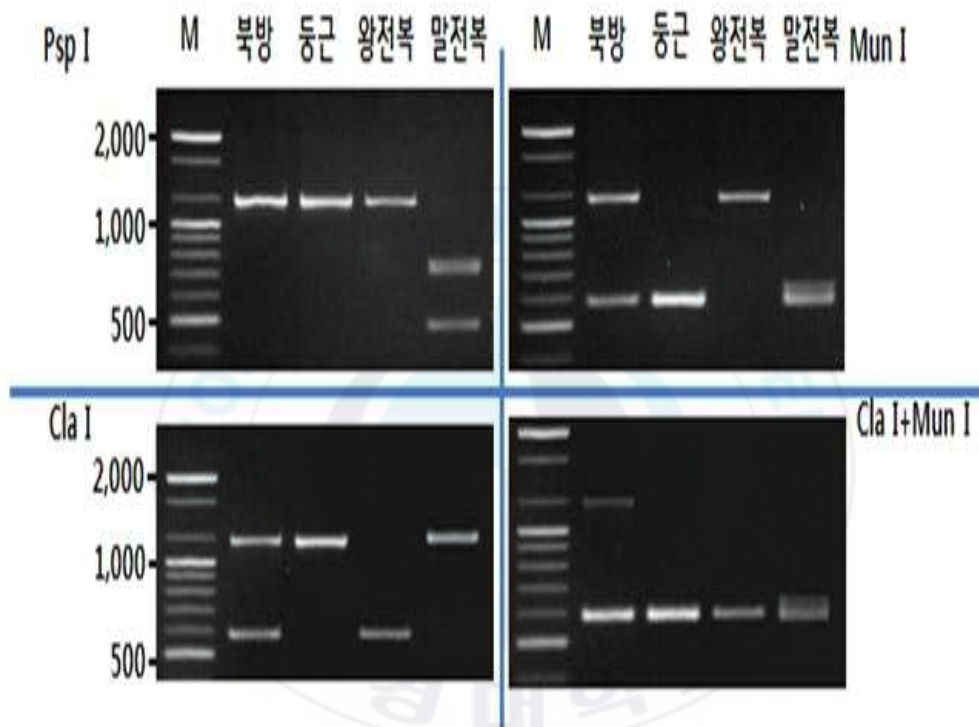


Figure 10. 공시 시료 4종에 대한 각각의 제한효소 처리 결과.

Table 4. 국내 전복 4종에 대한 PCR-RFLP 분석을 통한 종 판별

	제한효소 반응		
	PspI	MunI	ClaI
북방전복	×	○ Double band	○ Double band
등근전복	×	○	×
왕전복	×	×	○
말전복	○	○ Double band	×

왕전복은 Cla I 제한효소에서만 반응을 보이며 다른 종류의 제한효소에서는 반응되지 않는다. 말전복의 경우는 앞선 3종류의 전복인 북방, 둥근, 왕전복에서 반응하지 않는 Psp I에서 반응하여 single band pattern을 나타낸다. 이와 같은 결과를 토대로 자연산 전복 대한 CaM intron DNA의 제한효소 처리에 따른 종 분류법(PCR-RFLP)을 검증하기 위해 여서도에서 채집한 전복 샘플 7 개체를 확보하여 형태학적 분류와 CaM intron DNA의 제한효소 처리법에 대한 검증을 실시하였으며, 이에 대한 결과는 Figure 11에 나타내었다. 여서도 지역에서 채집한 전복 샘플의 경우 북방전복 2개체, 둥근전복 2개체, 말전복 2개체, 왕전복 1개체로 나타났다. Figure 11의 결과를 보면 lane 1-4번은 공시 시료로써 각각 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복이며, lane 5-11번은 여서도 지역에서 채집한 자연산 전복으로 종 분류 결과 lane 5, 8은 북방전복, lane 6, 7은 둥근전복, lane 9, 11은 말전복, lane 10은 왕전복으로 분류 되었다.

이상의 결과를 살펴봤을 때 전복 calmodulin intron III DNA 기반의 PCR-RFLP 분석법을 사용한다면 한국 해 연안에 서식하는 전복 4종인 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복에 대한 종 판별이 가능할 것으로 사료되며, 앞서 여러 연구자들의 선행 연구한 결과를 토대로 각 전복에 대한 아종 단위까지의 유전학적 유연관계가 설명가능 할 것으로 사료된다(Figure 12).

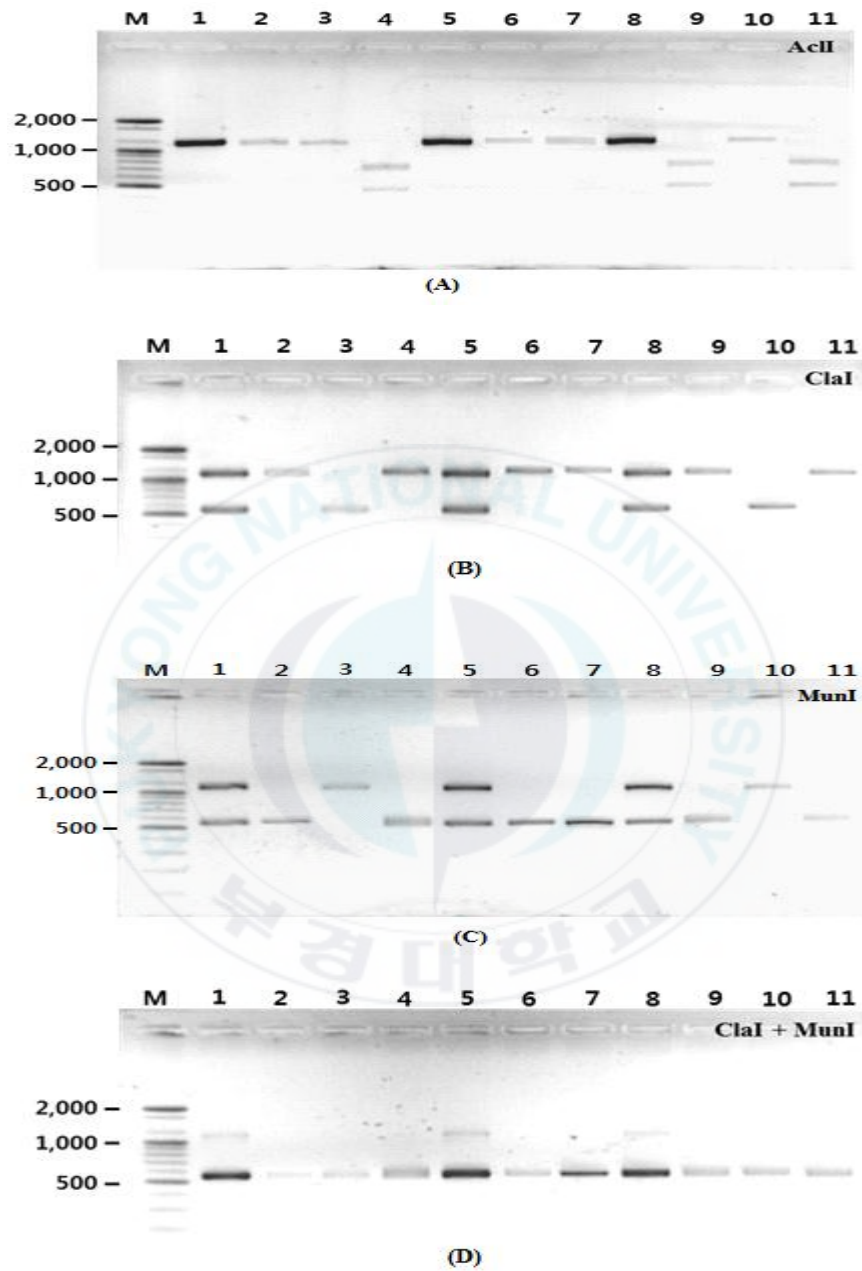


Figure 11. 여서도 지역에서 채집한 자연산 전복의 종 판별 결과. M; 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea), 1-4; 공시시료 (각, 북방전복, 둥근전복, 말전복, 왕전복), 5-11; 여서도 지역에서 채집한 자연산 전복

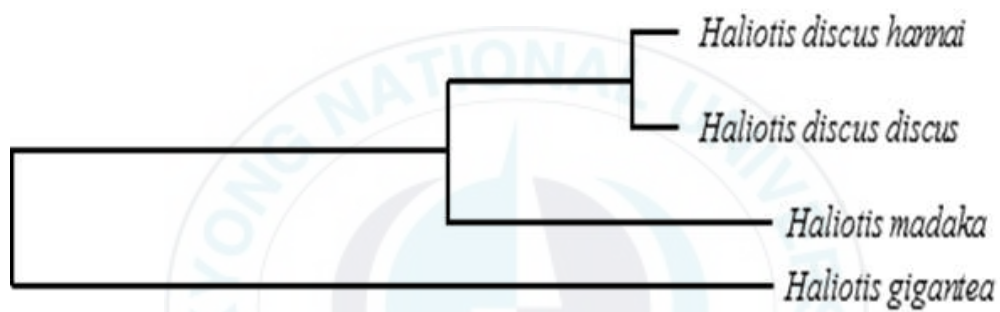


Figure 12. Calmodulin intro III DNA 염기서열 분석 결과를 바탕으로 한 한국 해 연안에 서식하는 중·대형 전복류의 계통수 분석.

IV. 고찰

한국, 일본, 중국 해 연안에 서식하는 전복은 6개종으로 구분되며, 한류성인 북방전복(*Haliotis discus hannai*)과 난류성인 둥근전복(*Haliotis discus discus*), 왕전복(*Haliotis madaka*), 말전복(*Haliotis gigantea*), 오분자기(*Haliotis diversicolor diversicolor*), 마대오분자기(*Haliotis diversicolor supertexta*) 등이 있다[2]. 전복에 대한 연구는 1960년대 전복 양식이 시도되면서 많은 연구가 광범위하게 진행되고 있으며, 현재는 분자유전학적 연구방법을 이용하여 우수 형질을 가지는 전복을 선발 육종하기 위한 방법들을 제시하고 있다. 우리나라의 경우 중·대형 종이라 할 수 있는 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복을 대상으로 교잡육종을 위한 다양한 연구가 시도되고 있다. 하지만 선발 육종에 앞서 이들 4종에 대한 명확한 종 판별 기준이 확립되지 않아 우수 형질의 전복 품종을 개발하는 것에 어려움이 있다.

이러한 이유로 본 연구에서는 우리나라 연안에 서식하는 4종의 전복을 대상으로 명확한 종 판별을 확립하기 위한 방법을 제시하고자 한다. 현재까지 전복 종 판별을 위한 연구방법으로 형태학적 분석, mitochondria DNA COI, ITS, 16s ribosomal RNA, MS marker, SNP 분석 등이 제시되고 있다. 하지만 앞서 제시된 방법들에 있어 형태학적 분류의 경우 일반인이 구분 짓기에는 상당히 어려움 점이 있으며, 전문가조차도 형태학적 특성을 통해 분류하기에 힘들음을 호소하고 있다. 또한, 전복 mitochondria DNA COI, ITS, 16s ribosomal RNA의 경우 분석 대상 종의 염기서열이 95% 이상의 유사성을 가지고 있어 이들의 염기서열 분석을 통해 4종을 구분하기에는 다소 어려움이 있으며, 장시간이 소요되는 단점을 가지고 있다. 현재는 전복 4종에 대한 MS marker와 SNP 분석을 통해 종 판별을 실시하고 있으나 이 또한 고가의 비용과 확보된 정보가 제한적이라 종 판별용 분석 방법으로 사용하기에는 애로사항이 따른다. 이에 본 연구자는 어류 및 이매패류 등에서 종 구분을 위한 marker로 연구된 바 있는 calmodulin intron DNA를 이용하여 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복의 분류법을 제시 하였으며, calmodulin intron III 부위에서 2차례의 PCR을 통해 이들을 구분 지을 수 있는 염기서열을 확보하였다.

각 전복 calmodulin intron III 부분의 염기서열을 분석한 결과 북방전복에서는 Cla I, Mun I의 제한효소 부위가 존재하고 있었으며, 둥근전복은 Mun I, 왕전복은 Cla I, 말전복은 Mun I, Psp I의 제한효소 site가 존재하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 제한효소를 이용한 4종의 전복에 대한 종 판별을 실시하였으며, 그 결과 제한효소 Psp I에 반응하는 전복은 유일하며, 북방전복은 Mun I, Cla I 제한효소 처리 시 double band가 형성됨을 밝혔다. 둥근전복과 왕전복의 경우 각각 Mun I과 Cla I 제한효소에서만 반응이 일어남을 확인하였다.

이러한 결과를 토대로 본 연구자가 제시하는 calmodulin intron III 기반의 PCR-RFLP 분석법이 저비용, 단시간에 한국 연안에서 서식하는 중·대형 전복 종인 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복의 종 판별에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 전복 교잡 육종에 있어 종 구분을 위한 기초 정보를 제공할 수 있을 것이다.



V. 요약

전복은 전복속(*Haliotis*)에 속하며 전 세계적으로 식품산업에서 중요한 복족류 연체동물이다. 우리나라에는 6개종; 북방전복(*Haliotis discus hannai*), 둥근전복(*Haliotis discus discus*), 왕전복(*Haliotis madaka*), 말전복(*Haliotis gigantea*), 오분자기(*Haliotis diversicolor diversicolor*), 마대오분자기(*Haliotis diversicolor supertexta*)가 보고되어 있다. 이 연구에서는 우리나라 해역에 서식하는 중·대형 전복과 4종인 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복의 유전학적 유연관계를 분석하기 위하여 미토콘드리아의 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 유전자와 Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 분석법을 실시하였다. 본 연구 결과 COI 유전자 분석 시 4종의 전복 중 북방전복, 둥근전복, 왕전복을 한 그룹으로 나머지 한 그룹을 말전복으로 구분하는 중 분류는 명확히 구분할 수 있었다. 하지만 북방전복, 둥근전복, 왕전복의 명확한 종 구분을 위해서 PCR-RFLP 분석법을 실시하면 북방전복, 둥근전복, 왕전복, 말전복을 명확히 구분할 수 있다. 이러한 결과는 전복 교잡육종을 이용한 수출용 전복 신종자 개발에 있어 주요 대상종인 전복과 4종에 대한 유전적 근연 관계를 규정함으로써 향후 교잡육종 연구의 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

어느 듯 시간이 흘러 석사과정의 긴 여정을 마치게 되었습니다. 학업과 직장의 과정을 동시에 하면서 이렇듯 하나의 이정표를 찍게 만들어 주시고 항상 격려를 주시며 부족한 저를 바른 길로 이끌어주신 지도교수 김군도 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 또한 저의 부족한 논문을 끝까지 읽고 수정해주신 김영태 교수님과 전용재 교수님께 깊은 감사의 글을 올립니다. 대학원 석사 과정동안 많은 관심과 학문적으로 가르침을 주셨던 이명숙 교수님, 송영환 교수님, 최태진 교수님, 김경호 교수님께 감사드립니다.

이곳 세포신호전달 실험실에 들어 온 저를 기본부터 차근차근 가르쳐준 서용배 박사, 점잖은 선비의 기품을 지닌 정인영박사, 형님미소를 항상 지우시는 이종규박사님, 누님 같으신 다정 다감 하신 성영애박사님, 실험실의 성석이, 고맙다는 말과 감사의 말을 전하고 싶습니다.

학교에 다닐 동안 물심양면 지원해 주신 대동병원 진단검사 의학과 신상기실장님, 감사합니다. 그리고 장인성계장님, 주경희주임님, 김대중주임님, 이하 다들 감사합니다. 언제나 큰형처럼 보살펴 주시고 생각 해주시는 올형님 원자력의학원 핵의학과 이상호실장님과 해운대 부민병원 하정민 선생에게 고맙다는 말을 전합니다.

끝으로 어려운 살림에도 언제나 저를 믿고 기다려준 사랑하는 나의아내 장미연, 그리고 나의 듬직한 아들 다운이, 사랑스러운 이쁜 딸 다희, 요양원에 계신 어머니, 송탄에 계신 큰형, 대구에 계신 작은형님, 모든 가족에게 사랑한다는 말과 오늘 지금 이 순간에도 저를 위해 기도하고 있을 미연이에게 논문을 바칩니다.

VII. 참고문헌

1. Birky, C. W., Fuerst, P. and Maruyamat, T. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*. 121, 613-627.
2. An, H. S., Jee, Y. J., Min, K. S., Kim, B. L. and Han, S. J. 2005. Phylogenetic analysis of six species of Pacific abalone (*Haliotidae*) based on DNA sequences of 16s rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Mar. Biotechnol.* 7, 373-380.
3. Park, C-J., Lee, J-H., Noh, J.K., Kim, H.C., Min, B.H., and Myeong, J-I. 2009. Genetic characteristics of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* in Dokdo Island, Korea. *Korean J. Malacol.* 25, 197-201.
4. Lee, J.-S., Won S.-H., Kim, S.-K., Lim, H.K., and Lee, J.S. 2014. Classification and Description of Genus *Nordotis* (Gastropoda: Vestigastropoda) from Korea. *Korean J. Malacol.* 30. 79-86.
5. Ali, B. A., Huang, T. H., Qin, D. N. and Wang, X. M. 2004. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Rev. Fish Biol. Fish.* 14, 443-453.
6. Doherty, K. R., Zweifel, E. W., Elde, N. C., McKone, M. J. and Zweifel, S. G. 2003. Random amplified polymorphic DNA markers reveal genetic variation in the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Mycologia*. 95, 19-23.

7. Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala F., van deWiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A. and Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3, 381-390.
8. Metz, E. C., Robles-Sikisaka, R. and Vacquier, V. D. 1998. Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10676-10681.
9. Seo, Y.B., Kang, S.C., Choi, S.S., Lee, J.K., Jeong, T.H., Lim, H.K., and Kim, G-D. 2016. Phylogenetic study of genus *Haliotis* in Korea by cytochrome c oxidase subunit I and RAPD analysis. *J. Life Sci.* 26, 406-413.
10. Simpson, R.J., Wilding, C.S., and Grahame, J. 2005. Intron analyses reveal multiple calmodulin copies in *Littorina*. *J. Mol. Evol.* 60, 505-512.
11. Chiou, C.-Y., Chen, I-P., Chen, C.H., Wu, H. J.-K., Wei, N.V., Wallace, C.C., and Chen, C.A. 2008. Analysis of *Acropora muricata* calmodulin (CaM) indicates that scleractinian corals possess the ancestral exon/intron organization of the Eumetazoon CaM gene. *J. Mol. Evol.* 66. 317-324.
12. Côté-Real H.B.S.M., Dixon, D.R., and Holland P.W.H. 1994. Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology.* 120. 407-413.
13. Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K. and Nakayama, I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing of urea. *Fish. Sci.* 62, 727-730.

14. Nomura, S., and Hatai, K.M. 1940. The marine fauna of Kyuroku-sima and its vicinity, northeast Honsyu, Japan. Saito Ho-on Kai Museum Research Bulletin. 19, 57-119.
15. Gmelin, J.F., 1791. Caroli a Linne Systema naturae perregna tria naturae. Systema Naturae, Ed. 13, Rub. R. Pol, Leipzig, Germany, 1, 3021-3910.
16. Reeve, L.A. 1846. Monograph of the genus *Ricinula*. conchologia Iconica 3: [unpaginated text], pls. 1-6.
17. Ino, T. 1953. Biological studies on the propagation of Japanese abalone (genus *Haliotis*). Bull. Tokai reg. Fish. Res. Lab. 5, 1-102.
18. Habe 1977. Miscellaneous knowledge about mollusks 8: *Nordotis madaka* is a new species. Chiribotan 9, 93-94.
19. Won, S.-H., Kim, S.-K., Kim, S.-C., Yang, B.-K., Lim, B.-S., Lee, J.-h., Lim, H.K., Lee, J.-S., and Lee, J.-S. 2014. The Morphological characteristics of four Korean Abalone species in *Nordotis*. Korean J. Malacol. 30, 87-93.
20. Hamm, D. E. and Burton, R. S. 2000. Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 254, 235-247.