

3가지 유형의 Primer 를 이용한 4개국 (중국, 일본, 러시아, 미얀마) 산 수입 이매패류의 분자계통분류학적 연구

정종민¹, 민혜린¹, 상민규¹, 박지은¹, 조항철¹, 강세원², 박소영³, 박홍석⁴, 박상용⁵, 강은경⁶,
Konstantin A. Lutaenko⁷, 신이현⁸, 이준상⁸, 이웅석¹, 황희주¹

¹순천향대학교 자연과학대학 생명시스템학과, ²한국생명공학연구원 생물자원센터, ³국립낙동강생물자원관 다양성 연구팀, ⁴(주)지앤시바이오, ⁵(주)에스씨에이치 아라, ⁶(주)한국생물보전연구소, ⁷A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (FEB RAS), ⁸순천향대학교 자연과학대학 기초과학연구소

Molecular phylogenetic study of bivalvia from four countries (China, Japan, Russia and Myanmar) using 3 types of primers

Jong Min Chung¹, Hye Rin Min¹, Min Kyu Sang¹, Jie Eun Park¹, Hang Chul Cho¹, Se Won Kang²,
So Young Park³, Hong Seog Park⁴, Sang Yong Park⁵, Eun Kyung Kang⁶,
Konstantin A. Lutaenko⁷, E Hyun Shin⁸, Jun-Sang Lee⁸, Yong Seok Lee¹ and Hee Ju Hwang¹

¹Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 31538, Korea

²Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongseup, 56212, Korea

³Animal & Plant Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, Gyeonbuk, 37242, Korea

⁴Research Institute, GnC BIO Co., LTD., 621-6 Banseok-dong, Yuseong-gu, Daejeon 34069, Korea

⁵SCHARA Inc, Asan, Chungnam, 31538, Korea

⁶Korea Biological conservation Institute Inc, Asan, Chungnam, 31538, Korea

⁷A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences (FEB RAS), Vladivostok 690041, Russia

⁸Institute for basic sciences, College of Natural Sciences, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, 31538, Korea

ABSTRACT

Imports of aquatic products continue increasing every year. When imported into Korea, the common name of a similar aquatic product is used instead of a scientific name, causing many confusions. In this study, in order to cope up with this issue, four countries with the highest number of imported bivalves were selected. The collected bivalves were totally classified into 10 orders, 17 families, 39 species. Also, the collected bivalves in the current study were identified by morphological classification. Moreover, sequence analysis of COI gene was carried out for all the collected species. The COI gene sequence was obtained with 3 type of primers. All COI sequences analyzed were subjected to molecular phylogenetic analysis. As a result, it was possible to draw conclusions very similar to the morphological classification results. Taken together, it is preferable to perform the universal primers and the lobo primer simultaneously for analyzing the COI sequence of bivalves. On the other hands, to obtain the results for scallops, the Matsumoto primers were available to conduct the analysis.

Key word: Bivalvia, Classification, Phylogenetic study, COI

서 론

Received: March 29, 2019; Revised: April 10, 2019;
Accepted: May 08, 2019

Corresponding author: Hee Ju Hwang

Tel: +82 (10) 2442-5629, e-mail: hwamux@naver.com
1225-3480/24733

This is an Open Access Article Distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

국내의 수산물에 대한 수입액은 1998년 이후 꾸준히 증가하는 추세로 2017년 12월말 기준으로 전년대비 10% 증가율을 보였다 (해양수산부, 2018). 또한 국민소득의 증가, 국내 수산물 생산량 감소 그리고 중국, 뉴질랜드, 베트남 과의 FTA 체결 등으로 국제 수산물 교역시장의 확대에 따라 수산물 수입은 지속적으로 증가할 것으로 예상된다 (수산정보포털, 2018).

수입 수산물은 수입과정에서 학명으로 기록되지 않고 국내에서 사용되는 비슷한 국명으로 통칭하는 과정에서 잘못된 종으로 이름이 바뀌거나 전혀 다른 종으로 오인될 수 있다. 특히 이매패류의 경우에는 패각을 제거하고 수입하는 경우 수입자의 의도에 따라 국내에 존재하는 비슷한 고가의 수산물로 둔갑되어 질 수도 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 수입되고 있는 수산물의 정확한 형태적 분류를 통한 종의 동정과 유전자 정보를 구축하여, 이를 토대로 올바른 수입 수산물 관리가 이루어져야 한다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 두족류의 경우에는 2016년 동남아시아 4개국인 태국, 인도네시아, 베트남 그리고 중국을 대상으로 하여 연구가 수행 되어진 바 있다 (Hwang *et al.*, 2016).

이 연구에서는 국내로 수입 되거나 앞으로 국내 수입 가능성이 높은 이매패류를 현지에서 수집하여, 형태적 종 동정과 COI 유전자 서열을 확보하여 실제로 국내에 관련 수산물이 수입되었을 때 수산물품질관리원 및 식품의약품안전처 등을 비롯한 관련 기관 및 일반인들도 손쉽게 구별 하고 판별 할 수 있는 자료를 구축하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 시료 확보

시료를 확보하기 위하여 2018년 5월부터 9월까지 주요 이매패류 수입 4개국 (중국, 일본, 러시아, 미얀마) 의 수산시장들을 방문하였으며 러시아의 경우에는 National Scientific Center of Marine Biology (NSCMB) 의 도움을 받아 잠수부를 고용하여 확보하였다. 현지에서 확보된 시료는 종별로 구분하고, 크기에 따라서 냉동된 1-3 개체를 순천향대학교로 직접 운반 하였다. 또한, 이미 국내에 수입된 종들은 국내 시장에서 구입하거나, 지방식약청의 협조를 받아 시료를 확보하였다. 하지만 중국에서 들어온 수입종의 경우 수입국내 채집 지역을 알기 어려워 제외하였다. 본 연구를 위하여 확보된 시료는 해당국에서 생산되는 모든 이매패류가 아니고, 정해진 기간에 현지에서 상업적으로 거래되는 종에 한 하였다.

2. 종의 동정

해외 4개국과 국내에서 수집된 표본들은 연구실로 옮겨서 동정 되었는데 이 과정에서 정확한 종 동정을 위하여 여러 가지 국내의 연체동물 도감을 참고하였으며 (Tucker Abbott and Peter Dance, 1982; Qi *et al.*, 1989; Okutani, 2000; Min *et al.*, 2004; Qi, 2004; Fengshan and Suping, 2008; Poppe, 2008), 동정 결과 국명이 없는 종들에 대해서는 소속과 속명을 고려하여 새로운 국명을 부여하였다. 표기된 학명과 분류 체제는 WoRMS (World Register of Marine Species, <http://www.marinespecies.org>) 의 방식을 준용 하였다.

3. 종 판별용 COI 서열분석

1) DNA 추출

실험 대상인 이매패류 샘플들로부터 DNA를 분리하기 위해 발 (foot) 과 폐각근 (adductor muscles) 부분을 grinding 한 조직 50-100 mg 을 취하여 ATL buffer 180 μ l 와 Proteinase k 20 μ l 을 섞은 후 1 시간 동안 56 $^{\circ}$ C 에 방치하였다. 그리고 AL buffer 200 μ l 를 추가하여 혼합 한 후 다시 56 $^{\circ}$ C 에서 10분간 반응시켰다. 반응 종료 후 200 μ l 에탄올을 넣고 섞은 후 spin column 으로 옮겨 8,000 rpm 으로 1분간 원심분리 하였다. 그 후 AW1 buffer 500 μ l 와 AW2 buffer 500 μ l 를 넣고 14,000 rpm 으로 3분간 원심분리 하였다. Column 에 남은 에탄올을 완전히 제거한 후 다른 튜브에 옮긴 후, 1 x TE buffer 50 μ l 를 넣고 원심분리하여 DNA를 얻었다. 이때 DNA 농도는 1 μ g 이상, purity OD 260/280 값은 1.8-2.0 이 되도록 하였다 (QIAGEN, DNeasy Blood & Tissue kit).

2) DNA 증폭, 정제 및 염기서열 분석

추출한 DNA는 종별로 Universal primer, Lobo primer 그리고 Matsumoto의 primer 를 사용하여 증폭하였다 (Lobo *et al.*, 2013; Matsumoto *et al.*, 2000). 우선 universal primer 를 사용하여 증폭되지 않는 경우 nested PCR 방법을

Table 1. 3 types of primer sequences

Primer name	Primer sequence	Product size
COI-LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	≈ 700 bp
COI-HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
COI-LoboF1	KBTCHACAAAYCAYAARGAYATHGG	≈ 700 bp
COI-LoboR1	TAAACYTCWGGRTGWCCRAARAAYCA	
Matsumoto-F	ATYGGNGGNTTYGGNAAYTG	≈ 900 bp
Matsumoto-R	ATNGCRAANACNGCNCCYAT	

활용하여 재실험하였다. 그래도 증폭이 되지 않는 경우 Lobo primer 를 사용하여 nested PCR 방법까지 재수행하였으며 최종적으로 증폭이 되지 않은 경우에는 Matsumoto primer를 사용하여 실험을 수행하였다.

증폭이 안된 시료는 1차로 진행한 PCR 산물을 G-puri purification kit으로 정제 후 나온 용액 20-30 μ l 에 elution 하였다. Elution된 PCR 산물 4-5 μ l 를 template로 하여 다시 동일한 반응액 및 Universal, Lobo, Matsumoto primer 의 cycles 조건은 아래와 같이 주어 PCR을 진행하였다.

(1) Universal primer PCR조건

PCR은 Template DNA 1 μ l, G_nC PowTaq polymerase 0.2 μ l, 10x buffer 2 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, Primer F (10 pmol) 0.5 μ l, Primer R (10 pmol) 0.5 μ l, DW (증류수) 13.8 μ l를 모아서 20 μ l 의 혼합액을 만들어 사용하였다. 2720 thermocycler (Applied Biosystems) 를 사용하여 96 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 pre-denaturation 반응 후 96 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 denature 반응, 50 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 elongation 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 extension 과정을 35 cycle 진행하고 방치 후, 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(2) Lobo primer PCR조건

Universal primer와 달리 Template DNA 4 μ l, DW 10.8 μ l로 혼합하여 사용하였다.

Lobo primer PCR 조건은 96 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 pre-denaturation 반응 후 96 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 denature 반응, 50 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 elongation 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 extension 과정을 40 cycle 진행하고 방치 후, 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(3) Matsumoto primer PCR조건

Universal primer와 달리 Template DNA 5 μ l, DW 9.8 μ l로 혼합하여 사용하였다.

Matsumoto primer의 경우 96 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 pre-denaturation 반응 후 96 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 denature 반응, 50 $^{\circ}$ C에서 20초 동안 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 elongation 후 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 extension 과정을 35 cycle 진행하고 방치 후, 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3 종의 primer 의 PCR 후 증폭된 DNA는 EtOH 침전법으로 정제한 다음, ABI 3730XL DNA Analyzer 로 양방향 sequencing을 진행하였다.

3) DNA 서열분석 (sequencing)

양방향 sequencing 이 끝난 서열들을 모아서 Phred 프로그램 사용하여 Phred score 20 이상으로 trimming 하여 FASTA 포맷으로 만들고 (Ewing, B., and Green, P., 1998; Ewing *et al.*, 1998), cap3 (Huang and Madan, 1999) 프로그램을 이용하여 Forward 서열들과 Reverse 서열들을 assembly 하였다. 이렇게 확보된 COI 서열들은 연체동물 전용 BLAST 서버를 이용하여 확인하였으며, COI 서열을 통한 분류의 동정에 대한 유의성을 확인하였다 (Lee *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2014). 또한 Barcode Of Life Data system (BOLD) 의 Identification 기능을 활용하여 COI 서열을 활용한 분자동정 결과와 형태분류와의 부합성을 확인하였다 (Ratnasingham and Hebert, 2007). NCBI 의 BLAST 프로그램 (Altschul *et al.*, 1990) 을 사용하여 각 샘플에서 확보한 COI 서열과 BOLD 에 등록된 이매패류의 서열의 유사도를 확인하였다.

4. Phylogenogram 분석

MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) 에 탑재되어 있는 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007) 프로그램을 사용하여 Multi-alignment 수행 후 Maximum likelihood 방식(500 bootstrap replication)을 사용하여 phylogenogram 을 도식화하였다.

결과 및 고찰

1. 수입 이매패류 동정 결과

국내로 수입되거나 수입 가능한 이매패류들의 샘플들은 국내 수입수산물 중 이매패류의 확인 및 4개국 방문을 통해 구입한 이매패류 샘플들의 동정결과 10목 17과 39종으로 확인되었다. 국가별로 나뉘보면 중국 9목 12과 22종, 러시아 7목 8과 16종, 일본 4목 5과 5종, 미얀마 5목 5과 6종 으로 확인되었다.

Class Bivalvia 이매패강

Order MYTILOIDA 홍합목

Family Mytilidae 홍합과

Genus *Mytilus* 홍합속

Mytilus trossulus Gould, 1850 작은진주담치 (국명신칭)

Mytilus unguiculatus Valenciennes, 1858 홍합

Genus *Perna* 초록담치속

Perna viridis (Linnaeus, 1758) 초록담치

Genus *Crenomytilus* 동해담치속

Crenomytilus grayanus (Dunker, 1853) 동해담치

Genus *Modiolus* 털담치속

Modiolus kurilensis Bernard, 1983 털담치

Order ARCOIDA 돌조개목

Family Arcidae 돌조개과

Genus *Tegillarca* 꼬막속

Tegillarca granosa (Linnaeus, 1758) 꼬막

Genus *Anadara* 피조개속

Anadara broughtonii (Schrenck, 1867) 피조개

Anadara globosa Reeve, 1844 남방소쿠리피조개 (국명신칭)

Genus *Arca* 돌조개속

Arca boucardi Jousseaume, 1894 진네모돌조개

Family Glycymerididae 밤색무늬조개과

Genus *Glycymeris* 밤색무늬조개속

Glycymeris yessoensis (Sowerby III, 1889) 북방밤색무늬조개

Order OSTREOIDA 굴목

Family Pinnidae 키조개과

Genus *Atrina* 키조개속

Atrina pectinata (Linnaeus, 1767) 키조개

Family Ostreidae 굴과

Genus *Crassostrea* 굴속

Crassostrea nippona (Seki, 1934) 바위굴

Order PECTINIDA 가리비목

Family Pectinidae 가리비과

Genus *Mizuhopecten* 큰가리비속

Mizuhopecten yessoensis (Jay, 1856) 큰가리비

Genus *Chlamys* 비단가리비속

Chlamys farreri (Jones & Preston, 1904) 파래가리비

Order CARDITIDA 주름방사늑조개목

Family Crassatellidae 참조개과

Genus *Bathytormus* 긴입잔주름조개속 (국명신칭)

Bathytormus foveolatus (Sowerby, 1870) 긴입잔주름조개 (국명신칭)

Superorder IMPARIDENTIA 부등치상목

Family Mactridae 개량조개과

Genus *Mactra* 개량조개속

Mactra antiquata Spengler, 1802 명주개량조개

Genus *Pseudocardium* 북방대합속

Spisula sachalinensis (Schrenck, 1862) 북방대합

Order ADAPEDONTA 죽합목

Family Solenidae 죽합과

Genus *Solen* 죽합속

Solen grandis Dunker, 1861 대맛조개

Family Pharidae 작두콩가리맛조개과

Genus *Sinonovacula* 가리맛조개속

Sinonovacula constricta (Lamarck, 1818) 가리맛조개

Genus *Cultellus* 비단가리맛속

Cultellus maximus (Gmelin, 1791) 남방큰비단가리맛 (국명신칭)

Order CARDIIDA 새조개목

Family Cardiidae 새조개과

Genus *Keenocardium* 잔이랑새조개속

Keenocardium californiense (Deshayes, 1839) 잔이랑새조개

Family Psammobiidae 자패과

Genus *Nuttalina* 빛조개속

Nuttallia olivacea (Jay, 1856) 두툼빛조개

Family Tellinidae 접시조개과

Genus *Tellina* 접시조개속

Tellina venulosus Schrenck, 1861 접시조개

Order MYOIDA 우럭목

Family Corbulidae 쇠방사늑조개과

Genus *Potamocorbula* 쇠방사늑조개속

Potamocorbula nimbose (Hanley, 1843) 쇠방사늑조개

Family Myidae 우럭과

Genus *Mya* 우럭속

Mya arenaria Linnaeus, 1758 우럭

Mya japonica Jay, 1857 잔주름우럭 (국명신칭)

Order VENERIDA 백합목

Family Veneridae 백합과

Genus *Ezocallista* 주름백합속

Ezocallista brevisiphonata (Carpenter, 1864) 주름백합

Genus *Dosinia* 떡조개속

Dosinia japonica (Reeve, 1850) 떡조개

Genus *Leukoma* 살조개속

Leukoma jodoensis (Lischke, 1874) 살조개

Genus *Macridiscus* 민들조개속

Macridiscus aequilatera (Sowerby I, 1825) 민들조개

Genus *Mercenaria* 비늘백합속

Mercenaria mercenaria (Linnaeus, 1758) 미동북부백합

Mercenaria stimpsoni (Gould, 1861) 비늘백합

Genus *Meretrix* 백합속

Meretrix petechialis (Lamarck, 1818) 말백합

Meretrix lyrata (G.B. Sowerby II, 1851) 남방백합
Genus *Protocallithaca* 아담스백합속
Protocallithaca adamsi (Reeve, 1863) 아담스백합
Genus *Ruditapes* 바지락속
Ruditapes philippinarum (A. Adams & Reeve, 1850) 바지락
Genus *Saxidomus* 개조개속
Saxidomus purpurata (Sowerby II, 1852) 개조개
Family Cyrenidae 재첩과
Genus *Corbicula* 재첩속
Corbicula japonica Prime, 186470 일본재첩
Genus *Paratapes* 농조개속
Paratapes undulatus (Born, 1778) 농조개

2. PCR 및 서열분석 결과

서열분석이 이루어진 종은 총 39종 54 개체였다. 같은 종을 국가 또는 채집지역에 따라 2개체 이상 서열분석을 한 종은 총 12종 27마리이었다. 개조개 (*Saxidomus purpurata*) 의 경우에는 중국에서 1 개체, 러시아에서 1 개체씩 총 2 개체를 채집하였고, 꼬막 (*Tegillarca granosa*) 의 경우 미얀마에서 1 개체, 중국에서 1 개체씩 총 2 개체를 채집하였고, 동해담치 (*Crenomytilus grayanus*) 의 경우 러시아 2 개체, 말백합 (*Meretrix petechialis*) 의 경우 중국 2 개체, 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 경우는 중국에서 1 개체, 일본에서 1 개체, 러시아에서 1 개체씩 총 3 개체를 채집되었다. 그리고 북방대합 (*Spisula sachalinensis*) 의 경우 중국, 러시아, 일본 각 1 개체 씩, 비늘백합 (*Mercenaria stimpsoni*) 의 경우 러시아 2 개체, 살조개 (*Leukoma jedoensis*) 의 경우 중국에서 1 개체, 러시아에서 1 개체씩 총 2 개체를 채집하였다. 또한, 잔주름우럭 (*Mya japonica*) 의 경우 중국에서 1개체, 러시아에서 1개체로 총 2개체를 채집하였고, 주름백합 (*Ezocallista brevisiphonata*) 의 경우 중국에서 1 개체, 러시아에서 1 개체씩 총 2 개체를 채집하였고,, 초록담치 (*Perna viridis*) 의 경우 미얀마 2 개체 그리고 큰가리비 (*Mizuhopecten yessoensis*) 의 경우 일본에서 2 개체, 러시아에서 1 개체씩 총 3 개체를 채집해서 서열분석이 수행되었다.

Universal primer를 사용하여 서열분석이 이루어진 개체 수는 27종 34 개체 샘플이었으며, 그 중 nested PCR 이 필요한 샘플은 7개 샘플이었다. Lobo primer 의해 서열분석이 이루어진 개체 수는 총 38 개체였다. 그 중 13개의 샘플은 nested PCR 에 의해 실험이 이루어졌다. Universal primer 로만 증폭이 되고 Lobo primer 에 반응이 일어나지 않는 개체는 총 12 개체였으며 그 중 nested PCR 을 진행한 개체는 3 개체였다. Universal primer 와 Lobo primer 모두에 반응

하는 개체 수는 22 개체였다. Lobo primer 에만 증폭이 되는 개체는 16 개체였다.

본 실험에서 사용된 3종의 primer 중 홍합목 (Mytiloidea), 새조개목 (Cardiida), 우럭목 (Myoidea) 의 경우 모두 Universal primer 로 증폭이 되었으며, Lobo primer 로만 증폭이 된 목에 해당된 종은 없었다. 가리비의 경우에는 Matsumoto primer 로만 서열 분석이 가능하였다. 하지만 이 매패류 전체를 대상으로 하여 일반화 시키기는 어렵다고 판단된다. 그러므로 이매패류를 대상으로 하여 COI 서열 분석을 수행하는 경우 가리비목을 제외하고는 모두 Universal 및 Lobo primer 를 동시에 실험하는 것이 권장되며 일부 샘플의 경우 증폭 반응이 일어나지 않는 경우에는 nested PCR 을 수행해야 한다는 점을 고려하여 실험을 수행하는 것이 유리하다고 판단된다.

3종류의 Primer 로 나온 서열을 cap3 프로그램을 이용하여 각 종마다 하나의 서열을 만들었다.

본 연구에 활용된 3종류의 primer 에 대한 결과를 각 샘플 종마다 정리하여 Table 2에 표기 하였다.

시퀀싱된 COI 서열들을 동정상태를 확인하고자 BOLD system 에 Identification Engine에 분석한 결과 (Table 3.), 형태학적 동정 결과와 BOLD identification 결과가 일치하거나 99% 미만으로 나오는 종 (< 99%) 은 4종이었으며, *Atrina pectinata*, *Modiolus kurilensis*, *Maetra artiquata*, *Chlamys farreri* 였다. 러시아산 *Modiolus kurilensis* 과 중국산 *Atrina pectinata* 은 두 가지 COI primer로 나온 서열의 결과가 모두 종은 같으나 매치율이 99% 미만으로 나왔는데 이는 이번에 분석한 두 종이 그 나라에서 처음으로 COI서열 분석이 되었거나, 다른 지역과는 다르게 변이가 일어난 것으로 판단된다. *Nuttallia olivacea*, *Mytilus unguiculatus*, *Bathytormus foveolatus*, *Tellina venulosus*, *Cultellus maximus*, *Meretrix lyrata*, *Magallana nippona*, *Anadara globosa*, *Protocallithaca adamsi*, *Arca boucardi* 종의 BOLD 결과 No match (Absent) 이 나왔다. BOLD 의 Identification 결과로 데이터가 나왔으나 다른 종의 서열이 나온 경우는 "Different species" 로 표시하였다. 중국산 *Meretrix petechialis* 의 경우 *Meretrix meretrix* 로 불일치를 보였다. 또한 러시아산 *Glycymeris yessoensis* 의 경우도 같은 속 다른 종이 결과로 나왔는데 이 종들은 모두 Lobo primer 로 분석된 서열이 BOLD 에 등록되어 있지 않아서 이런 결과가 나온 것으로 판단된다. 또한 *Keenocardium californiense* 의 경우에는 *Keenocardium blandum* 으로 분석되었다. 이러한 결과를 바탕으로 1차 분류는 정확히 되었으나 *Keenocardium californiense* 의 서열이 등록이 되지 않아서 결과가 상이한 것으로 판단된다.

3가지 유형의 Primer 를 이용한 4개국 (중국, 일본, 러시아, 미얀마) 산 수입 이매패류의 분자계통분류학적 연구

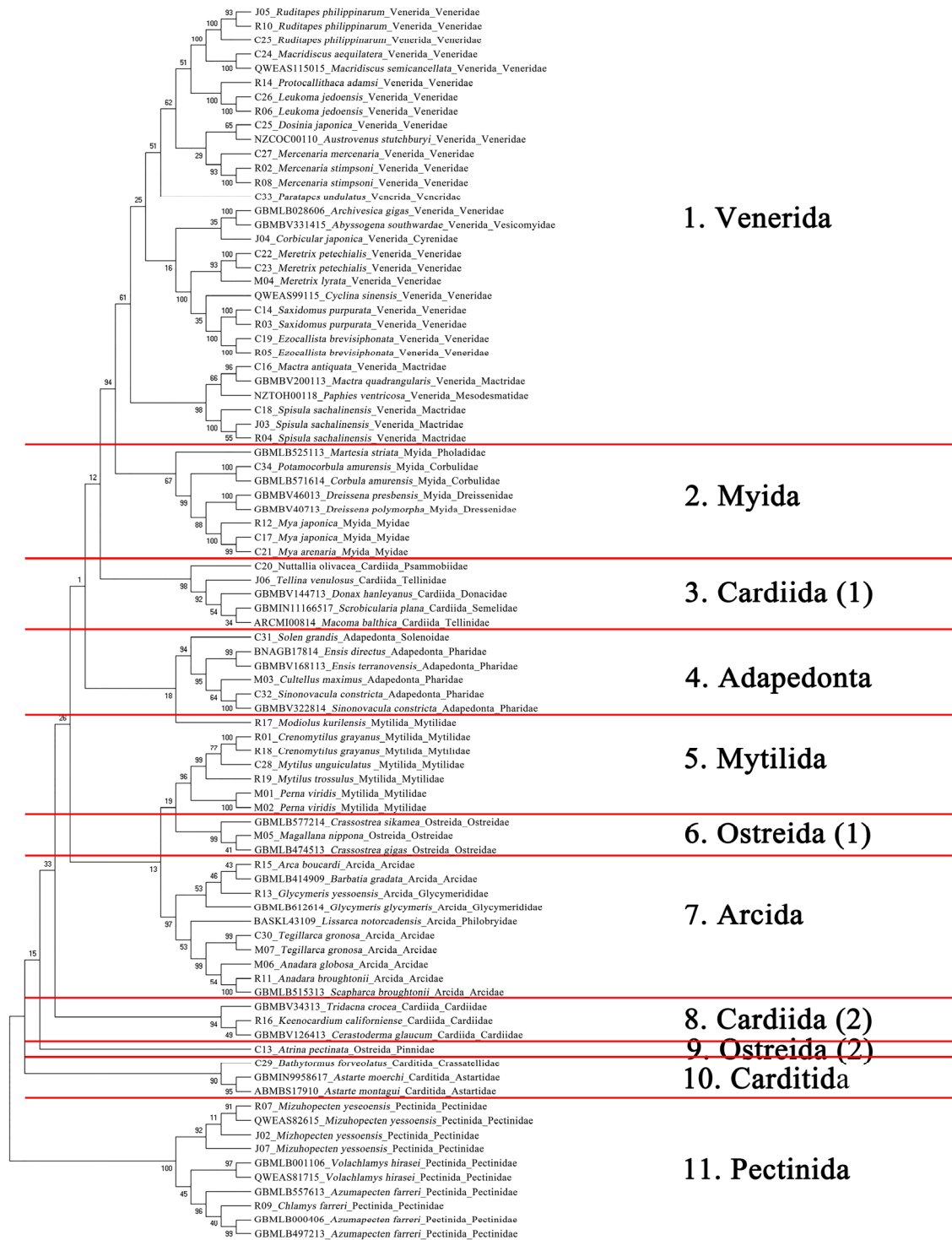


Fig. 1. Phylogenetic tree of bivalvia species include reference sequence from NCBI.

Table 2. Table shows the list of bivalves species collected in four countries and the PCR results of three primers

Order	Family	Scientific name	Common name	Universal Primer	U-nested PCR	Lobo Primer	L-nested PCR	Matsu moto	Recommend Primer	Nation
홍합목 (Mytiloidea)	홍합과 (Mytilidae)	<i>Mytilus unguiculatus</i>	홍합	0	X	0	X	X	Uni.	China
		<i>Perna viridis</i>	초록담치*	0	X	0	X	X	Uni.	Myanmar
		<i>Crenomytilus grayanus</i>	등해담치	0	X	0	X	X	Uni.	Russia
		<i>Mytilus trossulus</i>	작은진주담치	0	0	0	0	X	Uni.	Russia
		<i>Modiolus kurilensis</i>	털담치	0	X	0	0	X	Uni.	Russia
돌조개목 (Arcoidea)	돌조개과 (Arcidae)	<i>Tegillarca granosa</i>	꼬막	X	X	0	X	X	Lobo	China
		<i>Tegillarca granosa</i>	꼬막	0	X	X	X	X	Uni.	Myanmar
		<i>Anadara globosa</i>	남방소쿠리 피조개	X	X	0	X	X	Lobo	Myanmar
		<i>Anadara broughtonii</i>	피조개	X	X	0	X	X	Lobo	Russia
	<i>Arca boucardi</i>	긴네모돌조개	0	0	X	X	X	Uni.	Russia	
	밤색무늬조개과 (Glycymerididae)	<i>Glycymeris yessoensis</i>	북방밤색무늬 조개	0	0	X	X	X	Uni.	Russia
굴목 (Ostreoida)	키조개과 (Pinnidae)	<i>Atrina pectinata</i>	키조개	0	X	0	X	X	Uni.	China
	굴과 (Ostreidae)	<i>Magallana nippona</i>	바위굴	0	X	0	0	X	Uni.	Myanmar
주름방사류 조개목 (Cardittida)	참조개과 (Crassatellidae)	<i>Bathytormus foveolatus</i>	긴입잔주름조개	X	X	0	X	X	Lobo	China
부등치목 (Imparidentia)	개랑조개과 (Mactridae)	<i>Mactra antiquata</i>	명주개랑조개	0	X	X	X	X	Uni.	China
		<i>Spisula sachalinensis</i>	북방대합	X	X	0	X	X	Lobo	China
		<i>Spisula sachalinensis</i>	북방대합	X	X	0	X	X	Lobo	Russia
		<i>Spisula sachalinensis</i>	북방대합	X	X	0	X	X	Lobo	Japan
죽합목 (Adapedonta)	죽합과 (Solenidae)	<i>Solen grandis</i>	대맛조개	0	X	0	0	X	Uni.	China
	작두콩가리맷 조개과 (Pharidae)	<i>Sinonovacula constricta</i>	가리맷조개	0	X	X	X	X	Uni.	China
		<i>Cultellus maximus</i>	남방큰비단가 리맷	X	X	0	X	X	Lobo	China
가리비목 (Pectinida)	가리비과 (Pectinidae)	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	큰가리비	X	X	X	X	0	Matsu	Japan
		<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	큰가리비	X	X	X	X	0	Matsu	Russia
		<i>Chlamys farreri</i>	파레가리비	X	X	X	X	0	Matsu	Russia
새조개목 (Cardiida)	자패과 (Psammobiidae)	<i>Nuttallia olivacea</i>	두름빛조개	0	0	X	X	X	Uni.	China
	접시조개과 (Tellinidae)	<i>Tellina venulosus</i>	접시조개	0	X	0	0	X	Uni.	Japan
	새조개과 (Cardiidae)	<i>Keenocardium californiense</i>	잔이랑새조개	0	0	0	0	X	Uni.	Russia
우럭목 (Myoida)	쇄방사늑조개과 (Corbulidae)	<i>Potamocorbula amurensis</i>	쇄방사늑조개	0	X	X	X	X	Uni.	China
	우럭과 (Myidae)	<i>Mya arenaria</i>	우럭*	0	X	0	X	X	Uni.	China
		<i>Mya japonica</i>	잔주름우럭	0	X	0	0	X	Uni.	Russia

3가지 유형의 Primer 를 이용한 4개국 (중국, 일본, 러시아, 미얀마) 산 수입 이매패류의 분자계통분류학적 연구

Order	Family	Scientific name	Common name	Universal Primer	U-nested PCR	Lobo Primer	L-nested PCR	Matsmoto	Recommend Primer	Nation
백합목 (Venerida)	백합과 (Veneridae)	<i>Ezocallista brevisiphonata</i>	주름백합	X	X	O	X	X	Lobo	China
		<i>Ezocallista brevisiphonata</i>	주름백합	X	X	O	X	X	Lobo	Russia
		<i>Cyclina sinensis</i>	가무락조개	O	X	O	X	X	Uni.	China
		<i>Dosinia japonica</i>	떡조개	O	X	O	O	X	Uni.	China
		<i>Macridiscus aequilatera</i>	민들조개	O	O	O	O	X	Uni.	China
		<i>Mercenaria mercenaria</i>	미등북부백합	X	X	O	X	X	Lobo	China
		<i>Meretrix petechialis</i>	말백합*	O	X	X	X	X	Uni.	China
		<i>Paratapes undulatus</i>	농조개	X	X	O	X	X	Lobo	China
		<i>Protocallithaca adamsi</i>	아담스백합	X	X	O	X	X	Lobo	Russia
		<i>Ruditapes philippinarum</i>	바지락	O	X	O	O	X	Uni.	China
		<i>Ruditapes philippinarum</i>	바지락	O	X	O	O	X	Uni.	Japan
		<i>Ruditapes philippinarum</i>	바지락	O	X	O	O	X	Uni.	Russia
		<i>Meretrix lyrata</i>	남방백합	X	X	O	X	X	Lobo	Myanmar
		<i>Leukoma jedoensis</i>	살조개	X	X	O	X	X	Lobo	China
		<i>Leukoma jedoensis</i>	살조개	X	X	O	X	X	Lobo	Russia
		<i>Mercenaria stimpsoni</i>	비늘백합*	O	X	X	X	X	Uni.	Russia
		<i>Saxidomus purpurata</i>	개조개	O	X	O	X	X	Uni.	China
		<i>Saxidomus purpurata</i>	개조개	O	O	O	O	X	Uni.	Russia
			재첩과 (Cyrenidae)	<i>Corbicular japonica</i>	일본재첩	O	X	X	X	X

* Indicates that there are two objects with the same analysis pattern, species and country.

동물의 cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) 는 미토콘드리아 게놈에서 가장 보존적인 단백질 coding 유전자 중 하나이다. 본 연구에서 활용한 COI universal primer은 *Drosophila yakuda* 의 고도로 보존된 영역 중 3개의 coding strand와 6개의 anticoding strand를 비교하여 설계가 되어져 많은 연구자들이 활용하고 있다. 이 primer는 710 bp 정도를 증폭할 수 있는 서열로 11개의 문에서 80여종 이상의 무척추동물 COI polymerase chain reaction (PCR) 증폭에 활용되고 있다 (Folmer *et al.*, 1994). 최근 발표된 연구에서는 130,843개의 변이를 동물계의 725개 COI primer 서열과 비교하여 검토가 되었다고 한다. 그 중 177종의 무척추동물은 forward primer가 기존 연구와 비교하였을 때 4개의 보존 영역을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 또한 해초류, 곰팡이, 척추동물의 경우 대략 50%가 보존 영역이었고 극피동물은 보존 영역이 하나로 떨어져 있음을 확인하였다고 한다. Reverse primer의 경우 725개의 primer 서열은 고도로 보존되었으며, 이러한 결과를 토대로 분류군 전체를 연구하려면 다목적 primer를 설계할 필요성이 있음을 발표한 연구가 있다

(Sharma and Kobayashi, 2014).

Lobo primer 는 많은 해양 생물에 대한 DNA barcoding 은 분류군의 다양성으로 인하여 “Universal” primer 로만 모든 종의 연구가 불가하여 새로이 개발된 primer 이다. 이 논문에서 몇 종은 Universal primer 로만 분석할 수 없던 종들을 분석하여 COI-5P 영역을 확인할 수 있었고, 이를 통해 계통도까지 그릴 수 있었으나 현재 많이 사용되어지는 않는지 BOLD 에는 데이터가 없어서 “NO MATCH” 가 나오기도 하였다. 이를 보아 Universal primer 뿐만 아니라 다른 primer 로 분석한 데이터도 웹에 올려 다른 연구자들도 참고할 수 있게 해야 한다 (Lobo *et al.*, 2013).

Matsumoto primer 는 Pteriomorphia (익형아강) 에서 사용된 서열이다. 이 primer 를 사용하여 분석 시 COI 유전자의 상동 지역 뉴클레오타이드 서열은 여러 종에서 확인되었으며, 약 900 bp의 PCR product 가 만들어 진다. 이 서열은 결실되거나 삽입된 부분을 제외하면, 296 bp 의 아미노산의 영역이 남는데, Pectinidae 의 특징은 변이되는 91 영역과

Table 3. Analysis of COI sequences using BOLD identification BLAST against COI full database

	Query ID	Best ID	Top %	Low %	Note
1	C13_Atrina_pectinata	<i>Atrina pectinata</i>	97.54	96.86	< 99%
2	C14_Saxidomus_purpurata	<i>Saxidomus purpuratus</i>	99.69	80.58	
3	C15_Dosinia_japonica	<i>Dosinia japonica</i>	99.85	83.65	Synonym
4	C16_Mactra_antiquata	<i>Coelomactra antiquata</i>	98.61	82.93	< 99%
5	C17_Mya_japonica	<i>Mya japonica</i>	100	87.5	
6	C18_Spissula_sachalinensis	<i>Pseudocardium sachalinense</i>	99.85	77.24	Synonym
7	C19_Ezocallista_brevisiphonata	<i>Callista brevisiphonata</i>	99.68	81.8	Synonym
8	C20_Nuttallia_olivacea	No match			Absent
9	C21_Mya_arenaria	<i>Mya arenaria</i>	99.54	87	
10	C22_Meretrix_petechialis	<i>Meretrix meretrix</i>	100	99.53	Different Species
11	C23_Meretrix_petechialis	<i>Meretrix meretrix</i>	100	99.52	Different Species
12	C24_Macridiscus_aequilatera	<i>Macridiscus melanaegis</i>	100	87.65	Synonym
13	C25_Ruditapes_philippinarum	<i>Venerupis philippinarum</i>	100	99.22	Synonym
14	C26_Leukoma_jedoensis	<i>Protothaca jedoensis</i>	99.69	77.78	Synonym
15	C27_Mercenaria_mercenaria	<i>Mercenaria mercenaria</i>	100	99.62	
16	C28_Mytilus_unguiculatus	No match			Absent
17	C29_Bathytormus_foveolatus	No match			Absent
18	C30_Tegillarca_granosa	<i>Tegillarca granosa</i>	100	86.02	
19	C31_Solen_grandis	<i>Solen grandis</i>	99.4	78.87	
20	C32_Sinonovacula_constricta	<i>Sinonovacula constricta</i>	99.69	98.72	
21	C33_Paratapes_undulatus	<i>Paphia undulata</i>	100	79.81	Synonym
22	C34_Potamocorbula_amurensis	<i>Corbula amurensis</i>	99.83	98.68	Synonym
23	J02_Mizuhopecten_yessoensis	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	99.67	73.18	
24	J03_Spissula_sachalinensis	<i>Pseudocardium sachalinense</i>	100	77.02	Synonym
25	J04_Corbicula_japonica	<i>Corbicula japonica</i>	100	99.69	
26	J05_Ruditapes_philippinarum	<i>Venerupis philippinarum</i>	99.85	99.45	Synonym
27	J06_Tellina_venulosus	No match			Absent
28	J07_Mizuhopecten_yessoensis	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	99.83	73.33	
29	M01_Perna_viridis	<i>Perna viridis</i>	100	96.94	
30	M02_Perna_viridis	<i>Perna viridis</i>	99.82	96.78	

Query ID	Best ID	Top %	Low %	Note
31 M03_Cultellus_maximus	No match			Absent
32 M04_Meretrrix_lyrata	No match			Absent
33 M05_Magallana_nippona	No match			Absent
34 M06_Anadara_globosa	No match			Absent
35 M07_Tegillarca_granosa	<i>Tegillarca granosa</i>	99.81	95.79	
36 R01_Crenomytilus_grayanus	<i>Crenomytilus grayanus</i>	100	83.04	
37 R02_Mercenaria_stimpsoni	<i>Mercenaria stimpsoni</i>	99.85	82.57	
38 R03_Saxidomus_purpurata	<i>Saxidomus purpuratus</i>	99.84	80.58	
39 R04_Spizula_sachalinensis	<i>Pseudocardium sachalinense</i>	99.85	77.11	Synonym
40 R05_Ezocallista_brevisiphonata	<i>Callista brevisiphonata</i>	100	81.8	Synonym
41 R06_Leukoma_jedoensis	<i>Protothaca jedoensis</i>	99.53	77.83	Synonym
42 R07_Mizuhopecten_yessoensis	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	100	72.47	
43 R08_Mercenaria_stimpsoni	<i>Mercenaria stimpsoni</i>	99.85	82.67	
44 R09_Chlamys_farreri	<i>Chlamys farreri</i>	98.09	76.34	< 99%
45 R10_Ruditapes_philippinarum	<i>Venerupis philippinarum</i>	100	99.69	Synonym
46 R11_Anadara_broughtonii	<i>Scapharca broughtonii</i>	99.83	90.24	Synonym
47 R12_Mya_japonica	<i>Mya japonica</i>	99.53	86.64	
48 R13_Glycymeris_yessoensis	<i>Glycymeris sp.</i>	99.84	76.22	Different Species
49 R14_Protocallithaca_adamsi	No match			Absent
50 R15_Area_boucardi	No match			Absent
51 R16_Keenocardium_californiense	<i>Keenocardium blandum</i>	99.68	76.48	Different Species
52 R17_Modiolus_kurilensis	<i>Modiolus kurilensis</i>	98.53	82.5	< 99%
53 R18_Crenomytilus_grayanus	<i>Crenomytilus grayanus</i>	100	83.04	
54 R19_Mytilus_trossulus	<i>Mytilus trossulus</i>	99.23	99.03	

205 개의 변이되지 않는 영역이 존재하기 때문에 이 논문에서는 Pteriomorpha 의 Pectinidae (가리비과) 의 분석시 다른 primer 로의 분석에서 데이터가 나오지 않았으나 이 primer 를 사용하여 데이터를 얻을 수 있었다.

3. COI 서열을 이용한 중간 유연관계 분석

각 대상종으로부터 얻어진 COI 서열을 정렬한 후 MEGA X를 활용해서 각 종간의 유연관계를 확인하고자 하였다. 그러나 너무 다양한 목 (order) 과 과 (family) 의 종들이 존재해서

유사한 대상종끼리 묶이지 않았다. BOLD로부터 COI 서열 약 25,000여개의 데이터를 받아서 그 중에서 동일한 목에 속하며 많은 분석이 이루어진 종들을 대표로 2-3종을 추가하여 총 27 종의 COI 서열을 포함하여 중간 유연관계의 계통수를 작성하였다.

COI 서열을 이용한 분자계통학적 분석결과 백합목 (Venerida), 우럭목 (Myida), 죽합목 (Adapedonta), 가리비목 (Pectinida), 주름방사족조개목 (Carditida), 돌조개목

(Arcida), 굴목 (Ostreida) 1, 굴목 (Ostreida) 2, 홍합목 (Mytilida), 새조개목 (Cardiida) 1, 새조개목 (Cardiida) 2 으로 총 11개의 그룹으로 묶였다. 이 그룹들은 목 (order) 수준으로 묶이는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중 새조개목 (Cardiida) 에서 *Keenocarium californiense* 가 따로 구분되었고, 굴목 (Ostreida) 에서는 *Atrina pectinata* 는 따로 구분되는 결과를 보였다 (Fig. 1).

요 약

채집된 이매패류 동정 결과 총 10 목 17 과 39 종으로 확인 되었으며, *Mytilus trossulus* (작은진주담치), *Bathytormus foveolatus* (긴입잔주름조개), *Cultellus maximus* (남방큰비단가리뿔), *Anadara globosa* (남방소쿠리피조개), *Mya japonica* (잔주름우럭), 다섯 종의 경우 국명이 존재하지 않아 신칭하였다. COI 서열 분석시 Universal primer 로 모든 종이 분석되지 않아 문헌조사를 통하여 조사되어진 marine metazoa 에 특정한 Lobo primer 와 가리비목에 좀 더 특징적인 Matsumoto primer 를 추가로 사용하였다. 이매패류의 분류군 별 특이적인 primer를 선택하고자 하였으나 Matsumoto primer 로 증폭이 되어지는 가리비목의 경우 외의 대부분의 이매패류는 Universal primer 와 Lobo primer 를 동시에 사용하는 것이 효율적인 것으로 판단된다.

COI 서열을 기반으로 한 분자계통학적 분석을 위하여 BOLD에 등록되어 있는 Bivalvia COI 참고 서열 중 26 종을 선별 후 추가하여 유연관계를 확인하였다. 총 85 개의 서열을 사용하여 계통도를 그린 결과 11 개의 그룹으로 나누어지는 것을 확인하였다. 이는 9 개의 목 (order) 수준으로 그룹이 형성되며 그 중 새조개목 (Cardiida) 에서 *Keenocarium californiense* 가 따로 구분되었고, 굴목 (Ostreida) 에서는 *Atrina pectinata* 는 따로 구분되는 결과를 보였다. *A. pectinata* 는 BOLD Identification 분석결과 99 % 이하의 일치도를 보이는 종으로 주로 중국 지역에서 채집되어진 종들 중 지금까지 연구가 진행되지 않은 결과로 판단되며, *K. californiense* 의 경우 같은 속의 다른 종으로 확인되었으나 두 종 모두 등록된 서열이 거의 없어 더 많은 데이터가 등록된 결과로 생각된다. 이러한 오류는 지금까지 생산되어 공개되어진 이매패류에 대한 데이터가 부족하여 발생하는 현상이다. 본 연구에서 사용된 54개의 서열은 NCBI 의 Genbank 에 등록하였다 (ACCESSION NO MN119622-MN119675). 각 종 별로 사용한 primer 또한 표기하여 다른 연구자들이 이매패류의 COI 서열분석 관련 연구 진행 시 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 식품의약품안전처 “수입수산물 유사어종 (이매패류) 과학적 판별법 개발” 과제로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
- Ewing, B., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome. Res.*, **8**: 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome. Res.*, **8**: 175-185.
- Fengshan, X., and Suping, Z. (2008) An Illustrated Bivalvia Mollusca Fauna of China Seas. Chinese Corporation for Promotion of Humanities.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**: 294-299.
- Huang, X., and Madan, A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome. research*, **9**: 868-877.
- Hwang, H.J., Kang, S.W., Park, S.Y., Chung, J.M., Song, D.K., Park, H., Park, H.S., Han, Y.S., Lee, J.-S., and Lee, Y.S. (2016) Classification and Phylogenetic Studies of Cephalopods from four countries of South-East Asia. *Korean Journal of Malacology*, **32**: 55-62.
- Kang, S.W., Hwang, H.J., Park, S.Y., Wang, T.H., Park, E.B., Lee, T.H., Hwang, U.W., Lee, J.S., Park, H.S., Han, Y.S., Lim, C.E., Kim, S., and Lee, Y.S. (2014) Mollusks Sequence Database: Version II pp. *Korean Journal of Malacology*, **30**(4): 429-431.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.*, **35**: 1547-1549.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**: 2947-2948.
- Lee, Y.S., Jo, Y.H., Kim, D.S., Kim, D.W., Kim, M.Y., Choi, S.H., Yon, J.O., Byun, I.S., Kang, B.R., Jeong, K.H., and Park, H.S. (2004) Construction of BLAST Server for Mollusks. *Korean Journal of Malacology*, **20**: 165-169.
- Lobo, J., Costa, P.M., Teixeira, M.A., Ferreira, M.S., Costa, M.H., and Costa, F.O. (2013) Enhanced

- primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BMC Ecol.*, **13**: 34.
- Matsumoto, M., and Hayami, I. (2000) Phylogenetic analysis of the family Pectinidae (Bivalvia) based on mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I. *Journal of Molluscan Studies*, **66**: 477-488.
- Min, D.K., Lee, J.S., Koh, D.B., Je, J.K. (2004) Mollusks in Korea. Min Molluscan Research Institute. Seoul.
- Okutani, T. (2000) Marine mollusks in Japan. Tokai University Press. Tokyo.
- Poppe, G. (2008) Philippine Marine Mollusks Vol. I.
- Qi, Z. (2004) Seashells of China. Beijing: China Ocean Press.
- Qi, Z.Y., X. T. Ma, Z.R. Wang, G.Y. Ling, F.S. Xu, Z.Z. Dong, F.L. Li, R.H. Lü. (1989) Mollusca of Huanghai and Bohai. *Agricultural Publishing House, Bei Jing* **13**: 309-323.
- Ratnasingham, S., and Hebert, P.D.N. (2007) bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, **7**: 355-364.
- Sharma, P., and Kobayashi, T. (2014) Are “universal” DNA primers really universal? *Journal of Applied Genetics*, **55**: 485-496.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, **22**: 4673-4680.
- Tucker Abbott, R., and Peter Dance, S. (1982) A Compendium of Seashells.
- World Register of Marine Species [WoRMS] (2019) <http://www.marinespecies.org/index.php>
- 수산정보포털 (2018) <https://www.fips.go.kr> 수산정보포털
- 해양수산부 (2018) <http://www.index.go.kr> e-나라지표