

서해산 일반 꽃게와 보라색 변이 꽃게의 계측형질 및 AFLP 분석에 의한 집단 구조

연인자 · 송미영 · 황학진 · 손명호 · 김종빈 · 임양재 · 김영섭 · 김근식¹ · 방인철^{1*}

국립수산과학원 서해수산연구소 어업자원팀, ¹순천향대학교 해양생명공학과

Population Structure of the Blue and Purple Types of the Blue Crab *Portunus trituberculatus* (Miers) from the West Sea of Korea Based on Morphometric Characteristics and AFLP Analysis

Inja YEON, Mi-Young SONG, Hak-Jin HWANG, Myoung-Ho SOHN, Jong-Bin KIM, Yang-Jae IM, Young-Seop KIM, Keun-Sik KIM¹ and In-Chul BANG^{1*}

Fishery Resources Team, West Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Incheon 400-420, Korea

¹Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

In Korean waters, there are two color types (blue and purple) of the blue crab *Portunus trituberculatus*. The blue type is common, but the ratio of the purple type has increased in landings. To determine whether there were significant morphometric or genetic differences between the blue and purple types, crabs caught from the West Sea of Korea were examined. Based on covariance analysis, there were significant differences in 1 of 10 morphometric characteristics of males between the two types, in none of the ten characteristics for females. Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) DNA fingerprinting, no specific AFLP marker was detected for each type. The heterozygosity and genetic diversity were very low. Analyses of pairwise distance, the F_{st} index, and genetic similarity revealed similar results, with very low genetic differentiation. Therefore, there is no significant difference between blue and purple types of the crab from the West Sea of Korea, and the two types in the West Sea can be managed as one stock.

Key words: Blue crab, Population structure, Morphometric analysis, AFLP analysis, West Sea

서론

꽃게, *Portunus trituberculatus*는 절지동물문 갑각강 십각목 꽃게과에 속하며, 유영지를 가지고 장거리를 회유하는 종으로써 대만 연안으로부터 중국대륙 연안, 일본 본주 연안 및 우리나라 연안까지 널리 분포하는 것으로 알려져 있다 (Kim, 1973). 우리나라 연근해에서는 동해 안인진 이남부터 울릉도, 제주도를 포함 동·남·서해안에 넓게 분포하며, 특히 우리나라 서해 및 남해와 일본 연안에서는 산업 종으로 매우 각광받는 종이다 (Kim, 1973; Sakai, 1939; Yeon, 1997). 최근 우리나라 서해 꽃게어획량은 2002년에 18,195톤으로 최고치에 이른 후 감소하기 시작하여 2004년에는 2,295톤으로 최저를 나타내어 (MOMAF, 2007), 꽃게 자원이 점차 감소되고 있는 실정이다. 이에 따라 꽃게 자원을 지속적으로 이용하기 위한 보다 강력한 관리조치의 필요성이 제기되고 있다. 효율적 자원관리를 위해서는 우선 자원의 관리단위인 개체군이 검정되어야 한다 (Cushing, 1968). 일반적으로 꽃게의 체색은 등면이 초록색을 띠는 연한 청색 (blue type)으로 알려져 있지만 최근 우리나라 서해 및 남해에서 몸 전체가 보라색을 띠는 개체 (purple type)

의 출현이 증가하고 있어, 꽃게의 종 또는 개체군 수준에서의 차이 유무에 대한 의문점이 대두되고 있다. Kim (1985)은 동해산 꽃게와 서해산 꽃게의 경우 공생따개비의 생태학적 특성에 의거 두 군은 서로 분리된 군으로 고찰하였고, Yeon et al. (1992)은 서해산 꽃게와 동중국해산 꽃게의 비교형태학적 방법 및 공생따개비의 생태 및 형태학적 방법에 의거 두 군의 차이성이 인정된다고 하였다. 동일종의 분포범위 내에서 각각 다른 환경조건의 생활구역을 몇 세대에 걸쳐 차지하고 있는 집단인 개체군들은 체부위의 형태나 체질에서의 차이 및 생태적 차이와 유전자형 조성비의 차이를 갖게 된다. 따라서 개체군을 식별하는 데는 형태학적 방법과 생태학적 방법, 표지방류법, 유전학적 방법 등이 많이 이용되고 있다. 꽃게는 체질적 형질을 갖고 있지 않으므로 비체질적 형질 (계측적 형질)을 이용하게 된다. 비체질적 형질은 대개 발생 후 환경의 영향을 받음으로써 결정되는 것이기 때문에 체질적 형질에 비해 계군 식별에 있어서 좋은 형질이 못되나 꽃게와 같이 체질적 형질이 없는 종에는 많이 사용된다. 비체질적 형질 (외부형태학적 비교 형질)을 비교하여 계군을 식별하는 데는 개체에 대한 측정치들의 상대성장에 대한 회귀관계를 공분산분석법으로 해석하는 방법이 주로 사용된다 (Zhang,

*Corresponding author: incbang@sch.ac.kr

1991). 유전적 다양성을 분석하는 기술 중 AFLP (amplified fragment length polymorphism) 기술은 간편한 분석법과 높은 재현성을 바탕으로 유전자 표지를 발굴하기 위한 연구 방법으로서 각광 받고 있는 기술이다 (Vos et al., 1995; Mackill et al., 1996; Jones et al., 1997; Li et al., 2006). 본 기술은 유전적 유사도가 가까운 종이나 품종 간에도 고도의 유전적 변이 및 다형성 검출, 한번에 많은 유전자 좌위 (locus)를 검색, 시료의 수가 제한된 경우에도 많은 유전적 변이 검출 등의 다양한 장점을 가지고 있어 유전자 다양성 분석, 잡종 판별, 표현형관련 마커 탐색, 집단구조 분석에 매우 유용하다고 알려져 있다 (Roa et al., 1997; Blears et al., 1998; Knorr et al., 1999; Mariette et al., 2001; Bonin et al., 2007).

그러므로 본 연구는 몸 전체가 보라색을 띠는 보라색 색소변이 꽃게 (purple type)가 청색을 띠는 일반 꽃게 (blue type)와 집단 또는 종 수준에서 다른지 여부를 확인하기 위하여 계층형질 분석, 비만도 측정을 통한 생태학적 분석과 AFLP fingerprinting을 이용한 집단구조 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

꽃게 재료

비교형태학적 방법에 이용된 꽃게는 2007년 6월 18일과 7월 7일에 연평도연안 (37°29'N, 125°24'E - 37°33'N, 125°30'E)에서 꽃게 삼중닷자망에 의해 어획된 것으로 (Fig. 1), blue type의 꽃게는 암컷 27마리, 수컷 31마리였고, purple type의 꽃게는 암컷 37마리, 수컷 40마리였다. 이들 시료의 채집지, 채집일자, 성별 크기 등은 Table 1과 같다. AFLP 분석을 위해 이용된 꽃게는 2007년 7월 7일에 연평도연안 (37°30'N, 125°24'E)에서 꽃게 삼중닷자망에 의해 어획된 blue 및 purple type의 꽃게 각각 30마리였다.

비교형태학적 분석

비교형태학적 방법을 통한 꽃게의 체색에 따른 종 또는 개체군 수준에서의 차이 유무를 분석하기 위해 개체간의 변이가 비교적 적은 11개의 표징형질을 선택하였다 (Yeon et al., 1992). 각 형질별 측정은 두흉갑폭 (carapace width: CW), 두흉갑장 (carapace length: CL), 최대 두흉갑폭 (carapace width with spine: CWS), 두흉갑의 전연장 (carapace marginal length: CML), 눈 위 양옆 가시간의 길이 (outer orbital length: OOL), 복부 제3-5절의 중앙장 (central length of segment 3-5: MSL3-5), 복부 제6절의 중앙장 (central length of segment 6: MSL6), 미절

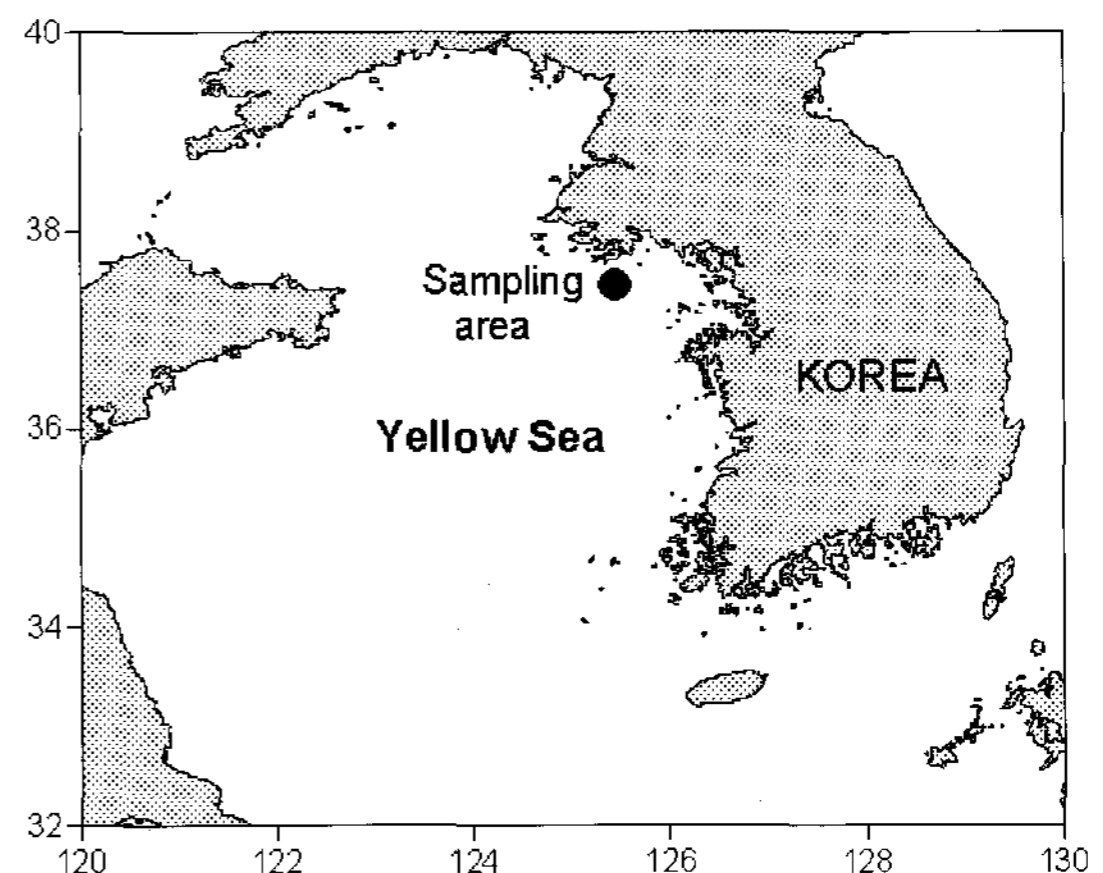


Fig. 1. Location of sampling area.

장 (telson length: TEL), 복부 제3-5절의 최대폭 (maximum width of segment 3-5: MSW3-5), 복부 제6절의 최대폭 (maximum width of segment 6: MSW6)과 미절의 최대폭 (telson width: TEW)의 길이를 digital vernier caliper를 활용하여 0.01 cm 단위까지 측정하였다 (Fig. 2). 통계 처리는 체색에 따른 형태학적 표징형질의 차이성 유무를 분석하기 위해 형태학적으로 차이가 있는 (Yeon et al., 1992) 암컷과 수컷을 분리한 후, 각 측정값들을 이용하여 두흉갑폭 (CW)에 대한 각각 형질간의 상대성장 (Huxley, 1932)의 회귀직선식을 구하고, 회귀직선식의 기울기와 절편에 대해 공분산 분석을 수행한 후, 5% 수준에서 유의성의 유무를 검토하였다 (Zar, 1999).

AFLP 분석

Genomic DNA 분석에서는 blue와 purple type의 집단별 30마리씩 다리를 절단하여 absolute ethanol에 고정된 후 실험실로 옮겨 증류수를 이용하여 세척한 후 TNEs-urea buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 4 M urea)와 proteinase K (Sigma, USA)를 첨가하여 55°C에서 반응시킨 다음 phenol: chloroform: isogamy alcohol (25:24:1)과 chloroform으로 처리하였다. 그 후 isopropanol로 DNA를 침전시키고, 70% ethyl alcohol로 세척한 후 TE (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)로 37°C에서 DNA를 용해시켰다. 준비한 시료는 spectrophotometer 측정과 0.7% agarose gel 전기영동을 통해서 DNA의 양과 질을 확인하였다. Genomic DNA를 총량 2 µg으로 희석하여 EcoR I 제한효소 (Biolabs, USA) 5 unit와 Mse I 제한효소 (Biolabs, USA) 10 unit을 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 이중절단 후, 절단된 DNA에 1/10 vol. 3 M NaOAc

Table 1. Sampling data for morphometric analysis of the blue crab, *Portunus trituberculatus* from the West Sea of Korea

Body color type	Sex	Number of samples	Carapace width (CW)		
			Mean (cm)	Range (cm)	Standard deviation
Blue	Female	27	11.16	8.11 - 12.85	1.51
	Male	31	11.03	8.34 - 14.55	1.59
Purple	Female	37	10.20	8.67 - 11.87	0.86
	Male	40	10.24	8.25 - 12.73	0.97

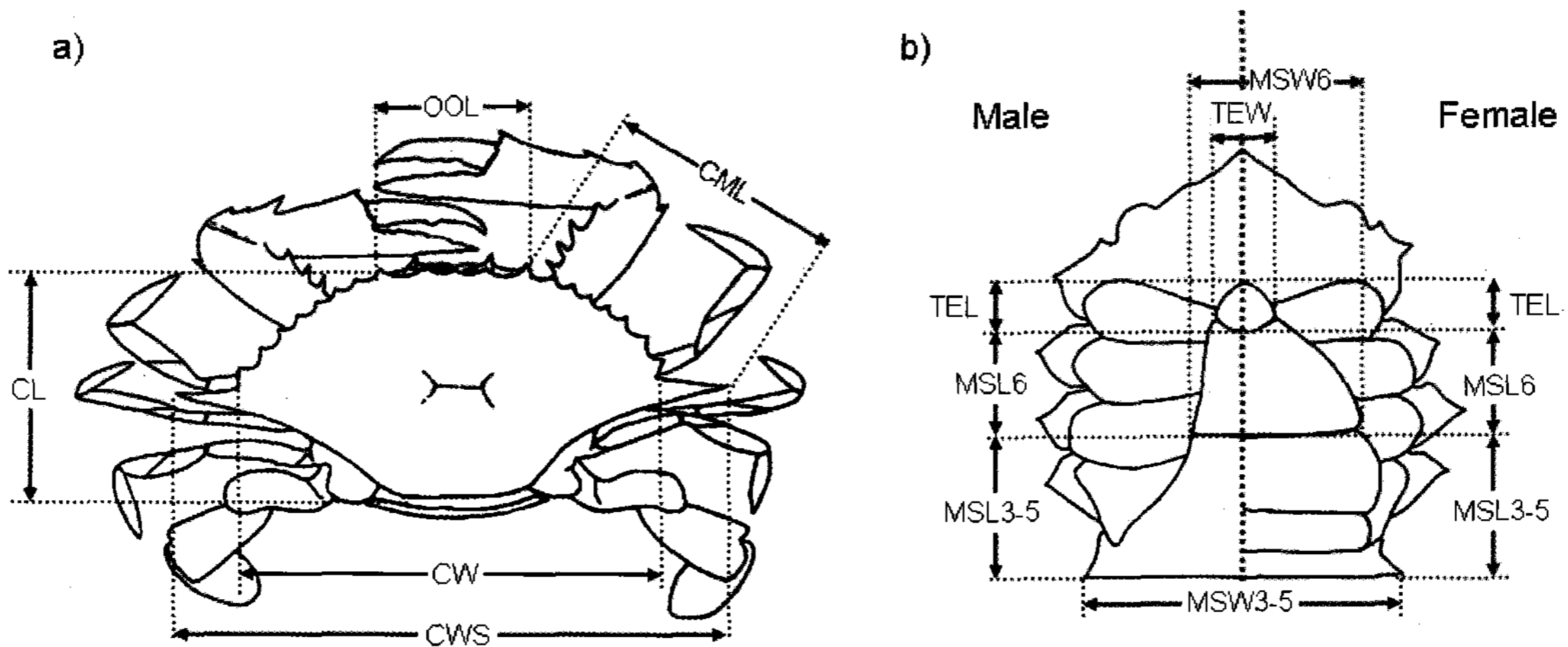


Fig. 2. Morphological measurements of the blue crab, *P. trituberculatus*. CW, carapace width; CL, carapace length; CWS, carapace width with spine; CML, carapace marginal length; OOL, outer orbital length, MSL3-5, central length of segment 3-5; MSL6, central length of segment 6; TEL, telson length; MSW3-5, maximum width of segment 3-5; MSW6, maximum width of segment 6; TEW, telson width.

와 두배의 100% 에탄올을 첨가하여 DNA 단편들을 침전시킨 후 3차 증류수에 용해하였다. 이 용해액에 각각 2 unit T4 DNA ligase (Promega, USA)와 EcoR I/Mse I adapter를 첨가하여 최종 부피가 50 μ L가 되도록 조정한 후 15°C에서 16시간 동안 ligation하였다. Ligation된 DNA 5 μ L, AFLP Pre-amp Primer Mix I (Invitrogen, USA), 2 unit Taq DNA polymerase, 10X PCR buffer를 첨가하여 PCR 반응액을 총 50 μ L로 조정한 후 1차 증폭 반응을 실시하였다. 증폭 조건은 처음 94°C에서 5분간 변성하였으며, 94°C에서 30초, 56°C에서 1분, 72°C에서 1분간 20회 실시 후 72°C에서 5분간 추가로 extension을 수행하였다. 반응액을 TE 완충용액으로 50배 희석하여 2차 증폭 반응의 재료로 사용하였다. 희석액 5 μ L, EcoR I selective primer, Mse I selective primer, dNTPs, 10X PCR buffer를 최종 20 μ L가 되도록 첨가하여 2차 증폭 반응을 하였다. 증폭 조건은 처음 94°C에서 5분간 변성시켰으며, touchdown PCR법을 이용하여 94°C에서 30초, 65°C-56°C (회당 0.5°C씩 감소)에서 30초, 72°C에서 60초간 12회 실시 후 annealing 온도를 56°C에서 30초로 고정하여 총 24회를 반복 수행한 후 최종 extension을 72°C에서 5분간 수행하였다. 최종 증폭 반응액 20 μ L에 6 μ L의 formamide loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF)를 첨가한 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 그 중 3 μ L를 미리 50°C로 가열된 6% denaturing polyacrylamide gel에 loading한 후 2,000 V에서 2시간 동안 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음, silver staining kit (Promega, USA)로 염색하여 확인하였다. 본 연구에 사용한 selective primer 조합은 E/AAG-M/CGA, E/ATG-M/CAT, E/ACA-M/CGA의 3 조합이며, adapter 및 primer의 염기서열은 Table 2에 나타내었다. Silver staining된 gel 상에서 눈으로 직접 확인된 DNA 단편들은 밴드의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 matrix code

Table 2. Adapters, primer sequences used for AFLP analysis for the blue crab, *P. trituberculatus* from the West Sea of Korea

		Sequence (5' → 3')	
Adapter	EcoR I	F	CTCGTAGACTGCGTACC
		R	AATTGGTACGCAGTC
	Mse I	F	GACGATGAGTCCTGAG
		R	TACTCAGGACTCAT
Pre-amplification primer	EcoR I		GACTGCGTACCAATTCA
	Mse I		ATGAGTCCTGAGTAAC
Selective amplification primer	EcoR I	E/AAG	GACTGCGTACCAATTCAAG
		E/ATG	GACTGCGTACCAATTCATG
		E/ACA	GACTGCGTACCAATTCACA
	Mse I	M/CGA	ATGAGTCCTGAGTAACGA
	M/CAT	ATGAGTCCTGAGTAACAT	

를 작성한 후, TFPGA (ver. 1.3; <http://iubio.bio.indiana.edu.au/tfpga/>) 프로그램을 사용하여 (Miller, 1997) 꽃게 두 집단의 평균 이형접합율 (heterozygosity, He)과 평균 유전 다양성 (genetic diversity, GD) 수준을 구하였다. 집단간 Hardy-Weinberg 평형 (HWE)을 검정하기 위하여 유전적 분화도 (genetic differentiation, Fst)를 분석하였다 (Wright, 1951). Fst 수치에 대한 유전적 검정 (*P)은 무작위 대립유전자 치환 (random allelic permutation) 과정을 10,000번 이상 반복하여 수행하였다. 이러한 작업은 Arlequin 프로그램 (ver. 2.000, Stefan et al., 2000)을 사용하였다. 각 개체간의 유사도 matrix를 UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic means)로 분석하여 각각을 군집화 (clustering)하고 이를 토대로 계층도 (dendrogram)를 작성하였다. 각 집단의 유전적 유사도 (genetic similarity, GS)는 Nei와 Li (1979)의 공식을 적용하여 분석하였다.

Table 3. Descriptive statistics of relative growth equations between the blue and purple types of the blue crab, *P. trituberculatus* from the West Sea of Korea by sex. The bold indicates significant difference at the 5% level

Sex	Parameter	Body color type	Relative growth equation	F-value	
				Slope	Elevation
Female	CWS	Blue	CWS=1.3261 CW ^{0.9988} (R ² =0.97)	0.02	1.55
		Purple	CWS=1.2213 CW ^{0.9545} (R ² =0.95)		
	CL	Blue	CL=0.5987 CW ^{0.9959} (R ² =0.99)	0.29	0.85
		Purple	CL=0.4987 CW ^{1.0992} (R ² =0.98)		
	MSL	Blue	MSL=0.1284 CW ^{0.9976} (R ² =0.96)	0.05	0.07
		Purple	MSL=0.1111 CW ^{1.0299} (R ² =0.88)		
	MSW	Blue	MSW=0.0029 CW ^{1.9756} (R ² =0.95)	0.38	0.00
		Purple	MSW=0.0008 CW ^{2.2518} (R ² =0.84)		
	CML	Blue	CML=0.3773 CW ^{1.0902} (R ² =0.97)	0.03	0.14
		Purple	CML=0.3836 CW ^{1.0897} (R ² =0.96)		
	OOL	Blue	OOL=0.8004 CW ^{0.8338} (R ² =0.95)	0.50	0.01
		Purple	OOL=1.2898 CW ^{0.7313} (R ² =0.83)		
	MSL 3-5	Blue	MSL 3-5=0.0576 CW ^{1.2752} (R ² =0.97)	0.00	2.56
		Purple	MSL 3-5=0.0505 CW ^{1.298} (R ² =0.94)		
TEL	Blue	TEL=0.0582 CW ^{1.026} (R ² =0.94)	0.55	0.46	
	Purple	TEL=0.0798 CW ^{0.9544} (R ² =0.83)			
MSW 3-5	Blue	MSW 3-5=0.2069 CW ^{1.1545} (R ² =0.98)	0.14	0.78	
	Purple	MSW 3-5=0.1473 CW ^{1.2251} (R ² =0.94)			
TEW	Blue	TEW=0.009 CW ^{1.4551} (R ² =0.95)	0.29	0.24	
	Purple	TEW=0.0036 CW ^{1.6482} (R ² =0.87)			
Male	CWS	Blue	CWS=1.088 CW ^{1.0356} (R ² =0.97)	0.43	0.29
		Purple	CWS=1.4093 CW ^{0.9788} (R ² =0.97)		
	CL	Blue	CL=0.781 CW ^{0.9386} (R ² =0.87)	0.07	0.09
		Purple	CL=0.704 CW ^{0.96} (R ² =0.98)		
	MSL	Blue	MSL=0.1302 CW ^{1.0043} (R ² =0.80)	0.04	0.02
		Purple	MSL=0.1546 CW ^{0.9687} (R ² =0.94)		
	MSW	Blue	MSW=0.2764 CW ^{0.8365} (R ² =0.83)	0.34	2.27
		Purple	MSW=0.1182 CW ^{1.0105} (R ² =0.82)		
	CML	Blue	CML=0.5044 CW ^{1.0239} (R ² =0.96)	0.07	0.04
		Purple	CML=0.4357 CW ^{1.0547} (R ² =0.93)		
	OOL	Blue	OOL=0.8863 CW ^{0.8107} (R ² =0.98)	0.61	4.05
		Purple	OOL=0.8184 CW ^{0.8311} (R ² =0.96)		
	MSL 3-5	Blue	MSL 3-5=0.1355 CW ^{1.0744} (R ² =0.97)	0.48	0.71
		Purple	MSL 3-5=0.1848 CW ^{1.0055} (R ² =0.94)		
TEL	Blue	TEL=0.1554 CW ^{0.8081} (R ² =0.85)	0.88	3.25	
	Purple	TEL=0.0507 CW ^{1.0392} (R ² =0.85)			
MSW 3-5	Blue	MSW 3-5=0.4174 CW ^{0.9897} (R ² =0.97)	1.05	0.01	
	Purple	MSW 3-5=0.655 CW ^{0.8927} (R ² =0.95)			
TEW	Blue	TEW=0.0853 CW ^{0.9396} (R ² =0.85)	0.05	1.54	
	Purple	TEW=0.0463 CW ^{1.064} (R ² =0.87)			

결과 및 고찰

형태학적 표징형질에 의한 집단간 비교 분석

꽃게의 체색에 따른 형태학적 비교형질의 차이유무를 암컷과 수컷을 분리하여 비교분석한 결과, 암컷의 경우 두흉갑폭(CW)에 대한 10개 모든 비교형질에서 유의한 차이가 인정되지 않았고, 수컷의 경우에는 오직 두흉갑폭에 대한 OOL 형질

간의 절편에서만 유의한 차이가 인정되었다 (Table 3). 즉, 형태학적 표징형질의 비교분석결과에 의거 blue type과 purple type의 꽃게 간에는 암컷과 수컷 모두에서 총 20개의 계측형질 중 19개 형질 간에는 유의성이 인정되지 않았으며, 오직 1개 형질에서만 유의성이 인정되었다. 그러므로 blue type과 purple type 간의 꽃게는 종 또는 개체군 수준에서 동일 그룹에

속하며, 서로 체색만이 다른 것이라 판단된다. 형태학적 계측 형질에 의한 계군분석법은 1940년에 Snedecor와 Cochran (1980)에 의해 개발된 후 세계 여러 과학자들에 의해 적용되어 왔다. 한국에서도 남해 및 서해산 참돔의 형태학적 표징형질에 의한 집단 분석 (Kim, 1970), 한국 동해산과 서해산 청어간의 형태학적 표징형질의 차이유무 (Park and Yeon, 1981), 한국 서해 및 동중국해에 분포하는 꽃게 개체군의 비교형태학적 연구 (Yeon et al., 1992) 등에 적용되어 왔다.

AFLP를 이용한 집단 구조 분석

총 3개의 selective primer 조합에서 274개의 유효밴드가 검출되었으며, selective primer 조합 당 약 91.3개의 유효밴드가 탐색되었다. AFLP는 제한효소의 인지부위와 3' 말단부위에 첨가된 selective nucleotide의 G, C 함량 및 primer의 조합형에 따라 크게 좌우되며 일반적으로 적절한 primer, 제한효소의 선발에 의해 약 50-100개의 유효한 band를 생성해 낼 수 있다고 알려져 있다 (Russell et al., 1997; Aarts et al., 1998; Reineke and Karlovsky, 2000). 본 연구에서도 91.3개의 유효한 밴드가 탐색되어 제한효소 및 primer 조합형이 적절히 이용되었고, 두 꽃게 집단 (blue type과 purple type)에 효과적으로 적용되었음을 알 수 있다. 꽃게 두 집단의 다형성 밴드는 blue type이 76개, purple type이 90개로 나타났으며, 다형도 (polymorphism)는 blue type이 27.7%, purple type의 집단에서 32.8%로 나타나 purple type의 집단이 다소 높게 나타났으나 큰 차이는 없었다 (Table 4). 우리나라 꽃게 집단의 AFLP band 다형도는 Wang et al. (2003)이 새우류의 다형도 분석 결과 *Penaeus canaliculatus* (24.6%), *P. monodon* (25.0%), *P. chinensis* (26.7%)와 유사한 경향이었으나, *P. merguensis* (45.1%), *P. japonicus* (60.8%)보다는 낮은 값으로 나타났다. 두 꽃게 집단을 구분할 수 있는 특이 밴드는 전혀 관찰되지 않았으며, 잡종을 확인할 수 있는 밴드 또한 관찰되지 않아, 두 꽃게 집단의 차이는 집단 수준 또는 다른 종과의 잡종에 의한 현상이 아닌 것으로 판단된다. 두 꽃게 집단 내 평균 이형접합율은 blue type이 0.0908, purple type이 0.0975로 나타났으며, 평균 유전 다양성은 blue type이 0.0940, purple type이 0.0987로 나타났다. 이는 Sung et al. (2007)의 대하 4집단의 평균 이형접합률 (0.1285-

0.1177), 평균 유전 다양성 (0.1194-0.1094) 결과와 비교 시 상대적으로 낮은 값으로 분석되었으며, 두 꽃게 집단 내 평균 유전적 유사도 또한 두 집단 모두 0.96으로 대하의 집단 내 평균 유전적 유사도 (0.911-0.906)에 비해 높게 나타나 꽃게 집단이 대하 집단에 비해 유전적 다양성이 낮은 것으로 분석되었다. 두 꽃게 집단 간 유전적 근연 관계를 추정하기 위한 유전적 분화도 및 유전적 거리를 분석한 결과 집단간 분화도는 0.0892, 유전적 거리는 0.0334, 집단간 유전적 유사도는 0.9666으로 나타났다. Sung et al. (2007)은 낮은 집단간 분화도 (0.0563-0.0105)와 높은 유전적 유사도 (0.9967-0.9889)에 근거하여 우리나라 연안 및 중국 연안의 대하 4집단을 유전적 차이가 없다고 보고한 바 있다. 따라서 두 꽃게 집단간의 유전적 분화도, 유전적 거리 또한 Sung et al. (2007)의 보고와 유사한 결과를 나타내어 두 꽃게 집단 또한 유전적으로 차이가 없는 단일 계통군으로 판단된다. 또한 두 꽃게 집단 내 개체간의 유사도 matrix를 이용하여 유전거리 계수를 기초로 작성한 UPGMA dendrogram 결과 역시 blue type과 purple type 집단이 집단별로 구분되지 않고, 두 꽃게 집단의 개체들이 서로 혼재되어 있었으며, 집단간 유전적 거리가 매우 가깝고 높은 유사성을 잘 표현하고 있어 두 꽃게 집단이 단일계통군임을 뒷받침 하고 있다 (Fig. 3). 위의 결과를 종합해 보면 꽃게는 집단 내 유전적 다양성이 낮고, 유사성이 높게 나타남으로서 개체간 유전적으로 매우 가까운 종으로 분석되었다. 주목할 점으로 첫째, 두 꽃게 집단을 구별할 수 있는 특이 마커는 전혀 발견 되지 않았고, 둘째, 두 집단 간 유전적 분화는 낮으며, 셋째, 두 집단은 유전적으로 매우 밀접한 근연 관계를 나타내었다는 점이다. 따라서 유전적으로 매우 밀접한 blue type과 purple type의 꽃게는 동일 계통군으로 판단된다. Kim (1985)은 꽃게 아가미에 부착 서식하는 따개비 종류 (*Octolasmis* spp.)의 종류별 부착비율이 동해에 분포하는 꽃게와 서해에 분포하는 꽃게 간에 차이가 있어 두 군이 다른 계군에 속할 것이라고 관찰하였다. 그리고 Yeon et al. (1992)은 우리나라 서해에 분포하는 꽃게와 동중국해에 분포하는 꽃게 개체군간에 13개의 형태학적 비교형질과 공생 따개비류의 종류별 부착률, 형태, 체장조성 등에 의해 분석한 결과 두 군은 서로 분리된

Table 4. Summary of the detection of AFLP markers in blue and purple types of the blue crab, *P. trituberculatus* from the West Sea of Korea

Information of AFLP marker	Body color type	
	Blue	Purple
No. of samples	30	30
Total no. of bands	274	274
No of primers	3	3
Average number of band	91.3	91.3
Total no. of polymorphic band	76	90
Percent of polymorphic bands (%)	27.7	32.8
Average genetic similarity	0.96	0.96
Average heterozygosity	0.0908	0.0975
Average genetic diversity	0.0940±0.0475	0.0987±0.0500

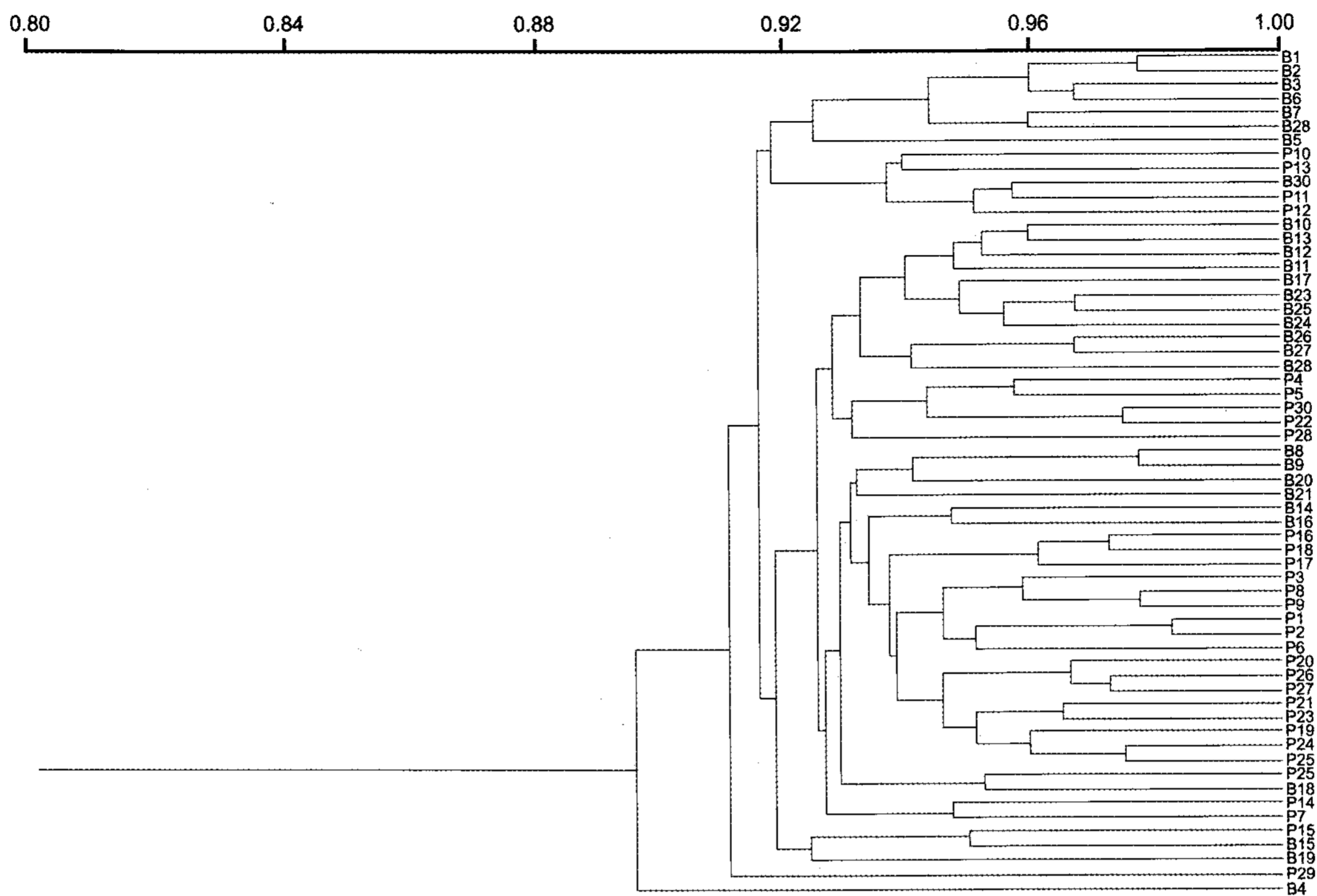


Fig. 3. Dendrogram showing phylogenetic relationships among the blue and purple type blue crabs, *P. trituberculatus* from the West Sea of Korea based on genetic distance data constructed by the UPGMA clustering method.

계통군이라 보고하였다. 이들 연구결과를 통하여 보면, 서식 해역을 달리하는 꽃게 집단은 개체군 수준에서 형태학적 특성, 공생 따개비의 부착 상태 특성 등에서 차이를 보이는 것을 알 수 있다. 그러나 본 연구에서는 같은 서식처에 분포하며 체색이 다른 두 꽃게 집단 (blue type, purple type)은 외부 형태학적 형질의 비교분석에서 10개의 비교형질 중 수컷에서 오직 한개 형질간 (CW와 OOL)의 절편에서만 유의성이 인정되었으며, AFLP fingerprinting 기법을 이용한 집단 구조 분석 결과에서는 두 집단 간 유전적 차이를 보이지 않아 한국 서해에 분포하는 blue type의 꽃게와 purple type의 꽃게는 같은 계통군에 속하는 것으로 판단된다. 외부형태의 계측 형질간 비교에서 수컷의 경우에서만 1개 형질간의 절편에서 차이가 나타나는 것은 집단 차원에서의 차이가 아니라 측정 과정에서의 오류일 가능성이 높은 것으로 사료된다. 두 꽃게 집단의 색소변이 원인은 분석된 비만도의 차이에 의한 현상으로 생각해 볼 수 있다. 두 집단간 두흉갑폭 (CW)에 대한 체중 (BW)의 상대성장식에 의한 공분산분석 결과 기울기에서는 유의성이 인정되지 않았지만, 절편에서는 5% 수준에서 유의한 차이를 보였다. 암컷 blue type 꽃게는 $BW=0.0001CW^{3.007}$ ($R^2=0.99$)로, purple type 꽃게는 $BW=0.0002CW^{2.846}$ ($R^2=0.93$)로 표현되었으며, 수컷 blue type의 꽃게는 $BW=0.0001CW^{2.9659}$ ($R^2=0.96$)로, purple type 꽃게는 $BW=0.0001CW^{2.9583}$ ($R^2=0.92$)로 나타나 같은 체급인 blue type 꽃게의 체중이 purple type 꽃게의 체중에 비해 암컷의 경우에는 약 20%, 수컷의 경우에는 약 3.5% 높은 것으로 분석되었다. 따라서 꽃게의 색소변이는

먹이를 선택적으로 섭취하여 나타난 색소농축이 표현된 것으로 판단된다. 일반적으로 갑각류의 색소변이는 서식처 background color에 대한 적응과 염분변화, 계절적 온도변화, 빛에 의한 반응 등의 환경적 요인 (Carlson, 1935; McGaw and Naylor, 1992; Felder and Staton, 1994; Melville-Smith et al., 2003) 및 먹이의 종류에 따른 체색의 변화 (Melville-Smith et al., 2003) 등이 보고된 바 있다. 따라서 유전적으로 차이가 없는 것으로 나타난 두 꽃게 집단 중 purple type 꽃게의 색소변이는 유영생물인 꽃게의 서식처 선택을 위한 이동에 따른 서식처 background color, 염분, 온도 그리고 빛 등의 환경적 요인에 적응한 현상 또는 선택적인 먹이 섭취로 인한 현상 등으로 설명할 수 있을 것이며, 정확한 원인규명을 위해서는 생태학적, 지리학적 그리고 영양학적인 추가 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 국립수산과학원 “서해 꽃게 자원회복을 위한 자원조사·평가 연구, RP-2008-FR-003”의 일환으로 수행되었다. 본 연구에 사용된 샘플과 측정 자료를 위해 애써주신 서해 수산연구소 어업자원팀 홍승현, 김인수, 박창이, 전정순, 이진미, 최민정님 등에 감사의 뜻을 표합니다.

참 고 문 헌

Aarts, H.J., L.A. van Lith and J. Keijer. 1998. High-

- resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 131-135.
- Bleas, M.J., S.A. de Grandis, H. Lee and J.T. Trevors. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 99-114.
- Bonin, A., D. Ehrich and S. Manel. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol. Ecol.*, 16, 3737-3758.
- Carlson, S.P. 1935. The color changes in *Uca pugilator*. *Zoology*, 21, 549-551.
- Cushing, D.H. 1968. *Fisheries Biology, A Study in Population Dynamics*. University of Wisconsin Press, Madison, WI, USA, 1-200.
- Felder, D.L. and J.L. Staton. 1994. Genetic differentiation in trans-Floridian species complexes of *Sesarma* and *Uca* (Decapoda: Brachyura). *J. Crust. Biol.*, 14, 191-209.
- Huxley, J. 1932. *Problems of Relative Growth*. Methuen & Co., London, UK, 1-276.
- Jones, C.J., K.J. Edwards and S. Castaglione. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.*, 3, 381-390.
- Kim, H.S. 1973. A Catalog of Anomura and Brachyura from Korea. *Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea*. Vol. 14. Anomura and Brachyura. Samwha Co., Seoul, Korea, 1-694.
- Kim, I.H. 1985. Korean barnacles (Crustacea, Cirripedia, Thoracia). Ph.D. Thesis, Seoul National University, Korea, 1-201.
- Kim, Y.M. 1970. On the result of morphological measurement of the red sea bream, *Pagrus major* in the southern and western coast of Korea, Rep. *Fish. Res.*, 8, 103-111.
- Knorr, C., H.H. Cheng and J.B. Dodgson. 1999. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim. Genet.*, 30, 28-35.
- Li, Z., J. Li, Q. Wang, Y. He and P. Liu. 2006. The effects of selective breeding on the genetic structure of shrimp *Fenneropenaeus chinensis* populations. *Aquaculture*, 258, 278-282.
- Mackill, D.J., Z. Zhang, E.D. Renona and P.M. Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 39, 969-977.
- Mariette, S., D. Chagne, C. Lezier, P. Pastuszka, A. Raffin, C. Plomion and A. Kremer. 2004. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite marker. *Heredity*, 86, 469-479.
- McGaw, I.J. and E. Naylor. 1992. Salinity preference of the shore crab, *Carcinus maenas* in relation to coloration during intermoult and to prior acclimation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 155, 145-159.
- Melville-Smith, R., Y.W. Cheng and A.W. Thomson. 2003. Factors affecting colour change in 'white' western rock lobsters, *Panulirus cygnus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 291, 111-129.
- Miller, M. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows programme for the sanalysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>.
- MOMAF. 2007. *Statistical Yearbook of Maritime Affairs and Fisheries 2003-2207*. Ministry of Maritime and Fisheries, Korea.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studing genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74, 5267-5273.
- Park, C.S. and I.J. Yeon. 1981. Morphometric comparison of herring, *Clupea pallasii* Cuvier et Valenciennes, between western waters and eastern waters of Korea. *Bull. Fish. Res. Dev. Agency*, 27, 103-109.
- Reineke, A. and P. Karlovsky. 2000. Simplified AFLP protocol: replacement of primer labeling by the incorporation of alpha-labeled nucleotides during PCR. *Biotechniques*, 28, 622-623.
- Roa, A.C., M.M. Maya, M.C. Duque, J. Tohme, A.C. Allem and M.W. Bonierbale. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other Manihot species. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 741-746.
- Rusell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 714-722.
- Sakai, T. 1939. *Studies on the Crabs of Japan*. IV. Brachygnatha. Brachyrhyncha. *Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, Sect. 2B*, 365-374.
- Snedecar, G.W. and W.G. Cochran. 1980. *Statistical Method*. 8th ed., Iowa State University Press, Ames, IO, USA, 1-507.
- Stefan, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

- Sung, Y.G., Y.K. Nam, H.S. Han and I.C. Bang. 2007. Genetic diversity and variation of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* populations as inferred by AFLP fingerprinting. *J. Aquacult.*, 20, 255-259.
- Vos, P., R. Hodgers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23, 4407-4414.
- Wang, Z.Y., K.H. Tsoi and K.H. Chu. 2003. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochem. System. Ecol.*, 32, 399-407.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15, 313-354.
- Yeon, I.J. 1997. Fishery biology of the Blue crab, *Portunus trituberculatus* (Miers) in the West Sea of Korea and the East China Sea. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Korea, 1-139.
- Yeon, I.J., C.S. Park and S.Y. Hong. 1992. Comparative morphometric characteristics and commensal barnacles of the blue crab, *Portunus trituberculatus* (Miers) in the western coast of Korea and the East China Sea. *Bull. Natl. Fish. Res. Dev. Agency*, 46, 53-68.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice-Hall International, Inc., Upper Saddle River, NJ, USA, 1-663.
- Zhang, C.I. 1991. *Fisheries Resources Ecology*. Wooseong Co., Seoul, Korea, 1-399.

2008년 2월 20일 접수

2008년 4월 17일 수리