

유전적 다양성 분석을 활용한 꼬막의 원산지 판별

남보혜¹, 동춘매², 이미난², 김은미³, 김우진², 김영옥², 노은수²

¹국립수산물과학원 양식연구과, ²국립수산물과학원 생명공학과, ³국립수산물과학원 연구기획과

Origin determination of *Tegilarca granosa* using genetic diversity analysis

Bo-Hye Nam¹, Chun Mae Dong², Mi Nan Lee², Eun-Mi Kim³, Woo-Jin Kim², Young-Ok Kim² and Eun Soo Noh²

¹Aquaculture Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan, 46083, Korea

²Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan, 46083, Korea

³Research Planning Division, National Institute of Fisheries Science, Busan, 46083, Korea

ABSTRACT

This study aimed to develop a genetic analysis method to identify the origin of cockles (*Tegilarca granosa*). Initially, analysis of the mitochondrial COI gene revealed genetic variations among Korean, Chinese, and Japanese cockles. While distinguishing between Chinese and Japanese cockles was challenging, a specific haplotype (H1) found only in Korean cockles allowed researchers to infer their origin. Next, we analyzed the genetic characteristics of cockle populations using 19 microsatellite markers. This analysis validated the accuracy of assigning a cockle's origin and assessed the reliability of this method. The analysis revealed that three genetic loci (Teg02, Teg08, TMP18) displayed differing numbers of alternative alleles expressed between domestic populations and Chinese and Japanese populations, indicating genetic differentiation due to geographic separation. Using 16 microsatellite markers, the accuracy and reliability of origin determination achieved 89.6% and 86.6%, respectively. This shows there's enough information to distinguish between Korean, Chinese, and Japanese cockles. The results of this study demonstrate the usefulness of genetic analysis methods in determining the origin of cockles. This method is expected to contribute significantly to ensuring the safety and quality management of cockle distribution in the future. Additionally, there is a need for continued research to improve the accuracy and ability to differentiate origins through further development of microsatellite marker-based methods.

Keywords : *Tegilarca granosa*, genetic diversity, origin determination

INTRODUCTION

최근 몇 년 간, 수산물의 안전과 품질에 관한 사항이 매우 중요한 주제로 부상하고 있으며, 소비자들은 건강 및 식품 안전에 대한 우려로 원산지에 더 많은 주의를 기울이고 있다

(Hicks, 2016). 식품의 원산지를 명확히 표시하는 것은 해당 제품에 대한 신뢰를 보장하며, 이는 식품 생산을 위한 자연환경, 생산기술, 그리고 생산 조건 등이 반영된 결과라고 볼 수 있다 (El Sheikha and Xu, 2017). 또한, 각 국가나 지역의 생산자들은 원산지를 강조하여 자국의 수산물 및 식품의 경쟁력을 높이고자 노력하고 있다 (Mizik, 2021).

Received: March 15, 2024; Revised: March 19, 2024;
Accepted: March 28, 2024

Corresponding author: Eun Soo Noh

Tel: +82 (51) 720-2451, e-mail: laperm@korea.kr
1225-3480/24863

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.

하지만 원산지 표시를 악용하는 '허위 표시' 사례가 최근 빈번하게 발생하고 있다. 국산을 포함하여 특정 국가의 식품은 소비자들 사이에서 높은 신뢰도나 인지도를 가지며, 이는 저렴한 노동력, 낮은 품질 등으로 저가의 가격으로 수입되는 식품의 원산지 둔갑 문제에 악용될 수 있다 (Noh *et al.*, 2017). 또한, 이러한 제품은 생산 환경이나 과정의 안전을 신뢰할 수 없으므로 소비자의 건강에 위험을 초래할 수 있다. 이러한 문

Table 1. Sample information of *Tegillarca granosa* for origin determination

Sample ID	Collection site	Collection date	Sample type	Number of individual
GH	Goheung-gun	2013.11.29.	Domestic	32
BS	Boseong-gun	2013.11.29.	Domestic	32
JH	Jangheung-gun	2013.11.29.	Domestic	16
HN	Heanam-gun	2013.11.29.	Domestic	24
TA	Taeam-gun	2013.11.29.	Domestic	30
C1	China	2014.12.23.	Imported	28
C2	China	2014.12.23.	Imported	28
C3	China	2014.12.23.	Imported	20
J1	Japan	2013.11.29.	Imported	16
J2	Japan	2014.04.10.	Imported	24

제를 예방하고 소비자의 안전 확보 및 유통 질서 확립을 위하여 다양한 수산물을 대상으로 한 원산지 판별 연구가 수행되고 있다.

원산지 판별을 위한 연구는 크게 두 접근 방법으로 나누어진다. 첫 번째는 동일 생물종에 대한 원산지 판별이며, 이는 국가 간 지리적 격리에 따른 유전적 고정을 기반으로 한다. 집단유전학적 분석을 통해 국가 간 동일 생물종의 유전적 차이를 밝히고 이를 원산지 판별에 적용하게 된다. 주요 연구 사례로는 마이크로세틀라이트 마커를 이용한 대개의 원산지 판별과 유전자 염기변이 차이를 이용한 바지락과 새꼬막의 원산지 판별 연구가 있다 (Kang *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2023). 두 번째는 유사 생물종에 대한 원산지 판별이며, 이는 유전학적 종 분류를 기반으로 한다. 일반적으로 해당 국가에 서식하지 않는 생물종이나, 형태적으로 유사한 경우에 적용할 수 있으며 국산과 수입산으로 판별하게 된다. 다중 PCR 분석법을 이용한 서대류, 조기류, 미꾸라지류 분석 등의 연구 사례가 이에 해당한다 (Noh *et al.*, 2016; Noh *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2022).

본 연구에서는 우리나라 서해안 주요 어업자원인 꼬막 (*Tegillarca granosa*)의 원산지 판별을 위한 연구를 수행하였다. 꼬막은 우리나라뿐만 아니라 중국, 일본을 비롯한 동남아시아 지역부터 인도양과 서태평양 지역까지 널리 분포하고 있으며, 식용으로 매우 인기가 높은 패류이다 (Liu *et al.*, 2017). 그러나 최근 해양 환경오염 및 매립, 간척 등에 따른 어장환경 악화와 서식장 축소 등으로 국내 생산량이 감소하여 중국, 일본, 필리핀 등에서 수입되어 유통되고 있다 (Kim *et al.*, 2019). 이들은 동일종으로써 형태적으로 매우 유사하여 육안으로 원산지를 판별하기 매우 어려우며, 또한 가공되어 판매되는 경우 형태적 판별이 불가능하다고 볼 수 있다. 이에 이 매패류의 생태적 특성을 고려하여 집단유전학 분석을 통해 국

산, 중국산, 그리고 일본산 꼬막의 유전적 차이를 밝히고 이를 원산지를 판별에 적용하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. Sample collection and genomic DNA extraction

국산, 중국산, 일본산 꼬막 시료는 국립수산물과학원 수산생명자원 수장고에 보존되어있는 표준시료를 사용하였으며 (Table 1), 게놈 DNA는 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada)를 이용하여 제공되는 프로토콜에 따라 추출하였다. 근육조직 20 mg을 에펜돌프 튜브에 담아 180 µL ATL buffer와 20 µL Proteinase K를 첨가한 후 56°C에서 1시간 동안 lysis 시켰다. 이후 180 µL AL buffer와 180 µL ethanol (99%)을 첨가하여 섞은 후 상등액을 column에 옮겨 8,000 rpm으로 원심분리하였다. 300 µL AW1 buffer와 동량의 AW2 buffer를 이용하여 두 번의 washing 과정을 거친 후 TE buffer를 이용하여 게놈 DNA를 회수하였다. 회수한 게놈 DNA는 1% (w/v) 아가로스 겔과 NanoVue (Ge Healthcare, Fairfield, NJ, USA) 분광광도계를 이용하여 추출 여부 및 농도를 측정하였다.

2. Sequencing analysis

꼬막 시료로부터 추출된 게놈 DNA는 종 동정 및 종내 유전적 변이 비교를 위해 미토콘드리아 DNA의 바코드 영역인 COI (Cytochrome Oxidase subunit I) 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다. 범용 프라이머인 LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'), HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3')를 사용하였으며 (Vrijenhoek., 1994), PCR 반응액의 조성은 1 µL 게놈 DNA, 2 µL 10X Ex Taq buffer, 1.6 µL dNTP

Table 2. Genetic characterization of microsatellite markers in *Tegilarca granosa*

Locus		Primer sequence	Motif	Allele size (bp)	Reference
Teg02	F	FAM ACGATCTAGTCAAGCATAACC	(AC) ₁₃	106-146	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	ACATTGTCAACTGAATCATGG			
Teg04	F	FAM TTTGGTATCAGGAATTCAAAC	(TC) ₇	133-181	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	TATGTGCAATAATGAAGTTGC			
Teg08	F	FAM AATGCGGTCTGTATGTATGTC	(CT) ₆	127-171	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	GAGGGTACATGTTTCATTCAAG			
Teg12	F	FAM TGTGTGTGTGTGAGAGAGAGA	(GA) ₈	138-204	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	ACTTTTTGCTTTAGAGGGACT			
Teg14	F	HEX CTATCAAGGACCTGATGACAG	(ATT) ₇	264-294	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	ATGACACAGTGCATTTTCATA			
Teg17	F	HEX AGTTATCAATTTAGGCCTTC	(GA) ₁₃	185-233	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	TGGAATGTGTGTTTCACTATG			
Teg19	F	HEX ATTCGTAATTTCCACAATCA	(AT) ₇	133-173	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	CTTAAGACTTGAGCAAACATGA			
Teg24	F	FAM GCACACACACATACACAAACT	(AC) ₆	135-157	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	GAAAACGTAAAAACCTACCATC			
Teg28	F	HEX TTCTAATGGAATGACCACATC	(AAT) ₇	195-243	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	TTATGTATTGTGACGAAACC			
Teg29	F	FAM GTATAAAATGTCCGCCGTACT	(TA) ₉	177-227	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	CAAAATTATGTTTCCAAGTGC			
Teg33	F	FAM TTGTGACCTGTTCAAAAACCTT	(TG) ₉	107-185	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	ACACACACACACACACACAA			
Teg35	F	FAM TGTGCACCTAATATTTGACCT	(TA) ₆	135-143	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	AAGTTGAATCTTGCTCTCGTA			
Teg37	F	HEX GACTGGAAGAAGAGGGAGATA	(GT) ₁₀	124-176	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	GGGTTGGGTACAAATCTAAAC			
Teg39	F	HEX CCTTGTATGTATAATGGCACAG	(GT) ₁₅	91-159	Liu <i>et al.</i> , 2012
	R	ACATTGAGTTAATAGATTCAGC			
TMP3	F	FAM GACAAGACGAAGTTAGCAAG	(GAA) ₁₃	118-175	Wang <i>et al.</i> , 2013
	R	GAAACGGATAGAATAATCAAAGA			
TMP12	F	HEX TTTGTCCGCTAAATCTATGTCT	(TTC) ₁₆	158-269	Wang <i>et al.</i> , 2013
	R	TGACCAACCAAGTTTTGTAAATC			
TMP18	F	HEX AGTTACAGTTGGTGTCTTTTCA	(TTTC) ₆ (ATC) ₄ GTC(TTC) ₁₁	166-310	Wang <i>et al.</i> , 2013
	R	GACAGCCTCGATGTAAGTTAAA			
TMP26	F	FAM GAAGAAGTTTGAGAATGTGG	(AAG) ₅ (AAG) ₈	147-207	Wang <i>et al.</i> , 2013
	R	TTTCTTTGTCTTCAGAGTCCTT			
KH52	F	HEX TTTTCGTTTAATTTTCTGTTG	(AT) ₆	241-373	Li <i>et al.</i> , 2012
	R	GATTCAGGTTGTCAGGGA			

mixture (2.5 mM), 1 µL forward primer (10 pmol), 1 µL reverse primer (10 pmol), 5 unit Ex Taq polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan) 로 총 20 µL로 구성하였다. PCR 증폭은 ABI verity fast thermal cycler (Applied Biosystems, Forster City, USA) 를 사용하였으며, 94°C에서 10분간 초기변성 (pre-denaturation) 후 94°C에서 30초간 변성 (denaturation), 58°C에서 30초간 결합 (annealing), 그리고 72°C에서 1분간 신장 (extension) 의 조건으로 32 cycle을 진행하였으며, 72°C에서 7분간 최종신

장 (elongation) 을 수행하였다. PCR 산물은 1% (w/v) 아가로스겔을 이용하여 증폭 유무의 확인 후, BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems, Forster City, USA) 처리 후 ABI3730XL 장비를 이용하여 염기서열 정보를 생산하였다.

3. Genotyping analysis

마이크로세틀라이트 영역의 분석에는 기존에 개발된 꼬막 유래의 19종 마커가 활용되었다 (Table 2). PCR 반응액의 조

성은 1 µL 게놈 DNA, 1 µL 10X Ex Taq buffer, 0.8 µL dNTP mixture (2.5 mM), 0.3 µL forward primer, 0.3 µL reverse primer, 4 unit Ex Taq polymerase (Takara Bio, Otsu, Japan) 로 총 10 µL로 구성하였다. PCR 증폭은 94°C에서 10분간 초기변성 (pre-denaturation) 후, 94°C에서 1분간 변성 (denaturation), 54°C에서 1분간 결합 (annealing), 그리고 72°C에서 1분간 신장 (extension) 의 조건으로 32 cycle을 진행하였으며, 72°C에서 7분간 최종신장 (elongation) 을 수행하였다. PCR 산물은 1% (w/v) 아가로스겔을 이용하여 증폭 유무의 확인 후, GeneScan 400HD (Applied Biosystems, Forster City, USA), Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Forster City, USA) 와 함께 혼합하여 94°C에서 3분간 변성한 후 ABI3730XL 장비를 이용하여 증폭산물의 크기 (Allele size) 를 분석하였다.

4. Data analysis

꼬막 시료로부터 생산된 염기서열정보는 SeqMan Pro v17.3.0 (DNA STAR, Madison, Wisconsin, USA) 소프트웨어를 이용하여 서열 병합 및 정렬을 수행하였다. 이후, DnaSP v5.10.01 소프트웨어를 이용하여 종 내 유전적 변이 및 집단별 하플로타입 (Haplotype) 을 분석하였다.

마이크로세틀라이트 분석으로 확보된 증폭 산물의 크기 정보는 GenAlEx v6.502 소프트웨어를 이용하여 기통통계 및 주성분분석 (Principal coordinates analysis, PCA) 을 수행하였으며, 집단 간의 계통학적 유연관계는 population v1.2.30 소프트웨어로 분석하였다. 또한, 꼬막의 원산지 판별 정확도 (Accuracy) 및 신뢰도 (Reliability) 은 GeneClass2 소프트웨어를 이용하여 추정하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

식품의 원산지 표기는 제품의 우수성과 안전성에 대한 정보를 제공하여 소비자에게 신뢰를 주기 위한 목적으로 시작되었다. 최근에는 국가 간 수산물의 교역이 증가하면서 각 나라는 제품의 원산지를 표기하여 소비자들에게 자국 제품의 우수성을 보여주는 전략으로 이를 적극적으로 활용하고 있다. 또한, 소비자는 제품을 선택 여부를 판단할 때 원산지 정보를 고려하는 경우가 많아졌으며, 이에 따라 원산지 표기의 정확도는 매우 중요한 문제로 여겨지고 있다. 식품의약품안전처에서는 “식품 중 사용원료 진위 판별을 위한 유전자 분석 방법”을 발간하여 주요 식품을 대상으로 명확한 생물종 판별법을 제시하고 소비자의 알 권리를 보호하기 위해 노력하고 있다 (식품의약품안전처, 2021). 하지만 현재까지 꼬막에 관한 연구는 형태학적으로 유사한 꼬막, 새꼬막, 피조개의 유전학적 생물종

판별과 새꼬막의 한국산, 중국산 원산지 판별이 수행되었으나 (Kong *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2023), 꼬막의 원산지 판별에 관한 연구는 수행된 바 없다. 과거부터 지속되어온 꼬막의 생산량 감소와 이에 따른 가격상승으로 저렴한 수입산 꼬막이 국내산으로 둔갑되어 판매된 사례가 있었으며, 본 연구에서는 이러한 사례를 예방하고자 꼬막의 원산지를 판별할 수 있는 유전학적 분석방법을 마련하고자 하였다.

유전학적 분석 방법 중 제한효소 절편길이 다형성 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 분석 방법이 생물종, 품종, 그리고 개체 간의 다양성을 관찰하기 위해 최초로 사용되었다 (Botstein *et al.*, 1980). 이 방법은 DNA에 존재하는 특정 제한효소 인식부위에 따라 DNA가 절단되는 것으로, 이 과정에서 생기는 단편의 크기 차이를 이용하여 유전적 차이를 밝히는 방법이다. 이후 PCR 기술이 발달됨에 따라 이를 바탕으로 DNA 다형성 무작위 증폭 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), 제한효소 절편길이 다형성 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), 그리고 초위성체 (Microsatellite, MS) 등의 분석 방법이 사용되고 있으며, 최근에는 염기서열 분석기술을 발달로 유전체를 해독하여 분석을 수행하기도 한다 (Choi *et al.*, 2012). 이들 방법 중 생물종의 구분을 위해 가장 많이 사용되는 바코드 영역인 미토콘드리아 COI 유전자 영역의 염기서열 분석과 초위성체 분석을 통한 집단간 유전적 차이를 기반으로 꼬막의 원산지 판별 가능성을 검토하였다.

염기서열분석을 수행하여 국산 5개 집단, 중국산 3개 집단, 일본산 2개 집단에서 250개의 미토콘드리아 COI 영역의 염기서열을 확보하였다. 품질관리 후 각 시료로부터 최소 547 bp에서 최대 661 bp의 정제된 염기서열을 얻었으며, 이들 염기서열은 미국 국립생물정보센터 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 에서 제공하는 BLAST 프로그램 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) 을 사용하여 GenBank 데이터베이스와의 비교 분석을 수행하였다. 분석 결과 모든 시료는 꼬막 (*T. granosa*, Accession No. MN119638.1) 의 COI 유전자와 99% 이상의 상동성을 갖는 것으로 확인되었다.

확보된 염기서열은 BioEdit v7.2.5 소프트웨어의 ClustalW multiple alignment를 이용하여 정렬하였으며, DnaSP v5.10.01 소프트웨어를 사용하여 집단별 하플로타입 분석을 수행하였다. 전체 250개의 미토콘드리아 COI 영역 염기서열에서 17개의 하플로타입이 확인되었으며, 국산은 12개 (H1-H12), 중국산은 5개 (H2, H13-H16), 그리고 일본산은 3개 (H2, H8, H17) 의 하플로타입으로 구성되었다 (Table 3). 주요 하플로타입의 경우 국산이 H1, H2인 반면, 중국산과 일본산은 H1 하플로타입이 존재하지 않으며, H2가 주요 하플로타입으로 확인되었다. 세부적으로는 미토콘드리아 COI 영역 염기서

Table 3. Summary of distribution of haplotype among populations of *Tegilarca granosa*

Hap	3	9	14	36	74	114	152	164	191	194	199	234	242	256	270	285	292	321	417	458	GH	BS	JH	HN	TA	C1	C2	C3	J1	J2	
H1	G	T	T	C	A	A	A	A	G	T	A	G	G	C	A	G	A	A	T	T	13	20	7	5	9						
H2	.	C	18	10	7	19	15	28	26	17	15	23	
H3	T	.	A	T	1										
H4	A	A		1									
H5	.	C		1									
H6	C	G			1								
H7	A			1								
H8	.	C	A					1					1	
H9	G	T	.	.					1						
H10	T	.	.	.					1						
H11	.	C	G					2						
H12	.	.	.	G					1						
H13	.	C	.	.	G						2					
H14	.	C	A								1			
H15	.	C	G								1			
H16	.	C	.	A								1			
H17	.	C	C	.									1		

열 중 9번째 단일염기변이 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 가 국산에서는 T 또는 C의 유전자형, 그리고 중국산과 일본산에서는 C의 유전자형만을 갖기 때문에 확인되었다. 이 결과를 기반으로 미토콘드리아 COI 영역 유전자 분석으로는 중국산과 일본산의 구별은 어려우나 국산에서만 확인되는 하플로타입 (H1) 을 이용하여 원산지의 추정이 가능한 것을 확인할 수 있다 (Fig. 1). 단, 이는 다량의 개체에서 확보되는 유전자 정보를 활용한 집단분석에서만 가능할 것이며, 소량의 개체에서는 결과의 해석이 어려움에 유의하여야 할 것으로 판단된다.

집단 간 유전적 차이는 기존 개발된 19종의 마이크로세틀라이트 마커를 이용하여 분석을 수행하였으며, 분석에 사용된 꼬막 250개체의 유전자형 (genotype) 정보를 모두 확보하였다. GenAlEx v6.502 소프트웨어를 이용하여 대립유전자의 빈도 (Frequency) 와 유전적 거리 (Genetic distance) 기반의 PCA 분석을 수행하였다. 유전자 좌위 (Locus) 별 대립유

전자 수는 Teg35 좌위에서 4개로 가장 적었으며, TMP18에서는 가장 많은 34개의 대립유전자가 관찰되었다. 대립유전자의 빈도 분석에서는 국산이 중국산, 일본산 집단과 다른 양상을 보이는 몇몇 유전자 좌위가 확인되었으며, 이는 집단별 유전적 특성이 반영된 결과로 볼 수 있다. Teg02 좌위의 110 대립유전자 발현양상은 국산 (0.146-0.281) 집단에서 높게 나타났으며, 중국산 (0.000-0.037), 일본산 (0.031-0.042) 에서는 비교적 낮게 나타났다 (Fig. 2A). 또한, 동일 좌위의 114 대립유전자는 국산 (0.047-0.125) 집단에서 낮게 나타났으며, 중국산 (0.250-0.315), 일본산 (0.188-0.271) 집단에서는 높게 나타났다. Teg08 좌위의 147 대립유전자는 국산 (0.375-0.531, 태안 제외) 집단에서 높은 발현양상을 나타냈으며 (Fig. 2B), TMP18 역시 국산 집단이 중국산, 일본산 집단보다 199 대립유전자가 현저히 많이 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2C). 이러한 유전자 좌위는 중국산과 일본산을 식별하기에는 어려움이 있으나, 국산과 이들 집단 간의 특이성을 확인할 수 있는 표지인자로 판단된다.

주성분분석 결과에서는 국산, 중국산, 그리고 일본산 3개의 그룹으로 구성되었으며, 국산 그룹 내에서는 해남, 안양, 고흥, 벌교와 태안 그룹으로 세분화되는 것으로 확인되었다 (Fig. 3). 이러한 경향은 population v1.2.30 소프트웨어를 이용한 계통수 (phylogenetic tree) 분석에서도 동일하게 확인되었으며 (Fig. 4), 이는 앞서 나타난 Teg08 좌위의 대립유전자가 국산 집단 중 태안에서만 발현양상의 차이가 나타나는 결과에 따른 것으로 사료된다. 원산지별 유전적 거리는 국산과 중국산의 경우 평균 0.125 (0.101-0.146) 로 나타났으며, 국산과 일본산은 평균 0.141 (0.114-0.181), 그리고 중국산과 일본산은 평균 0.104 (0.069-0.142) 로 확인되었다.

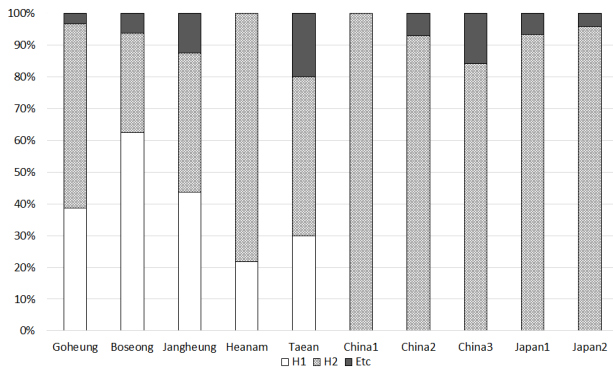


Fig. 1. Comparison of main haplotype distribution in population of *Tegilarca granosa*.

유전적 다양성 분석을 활용한 꼬막의 원산지 판별

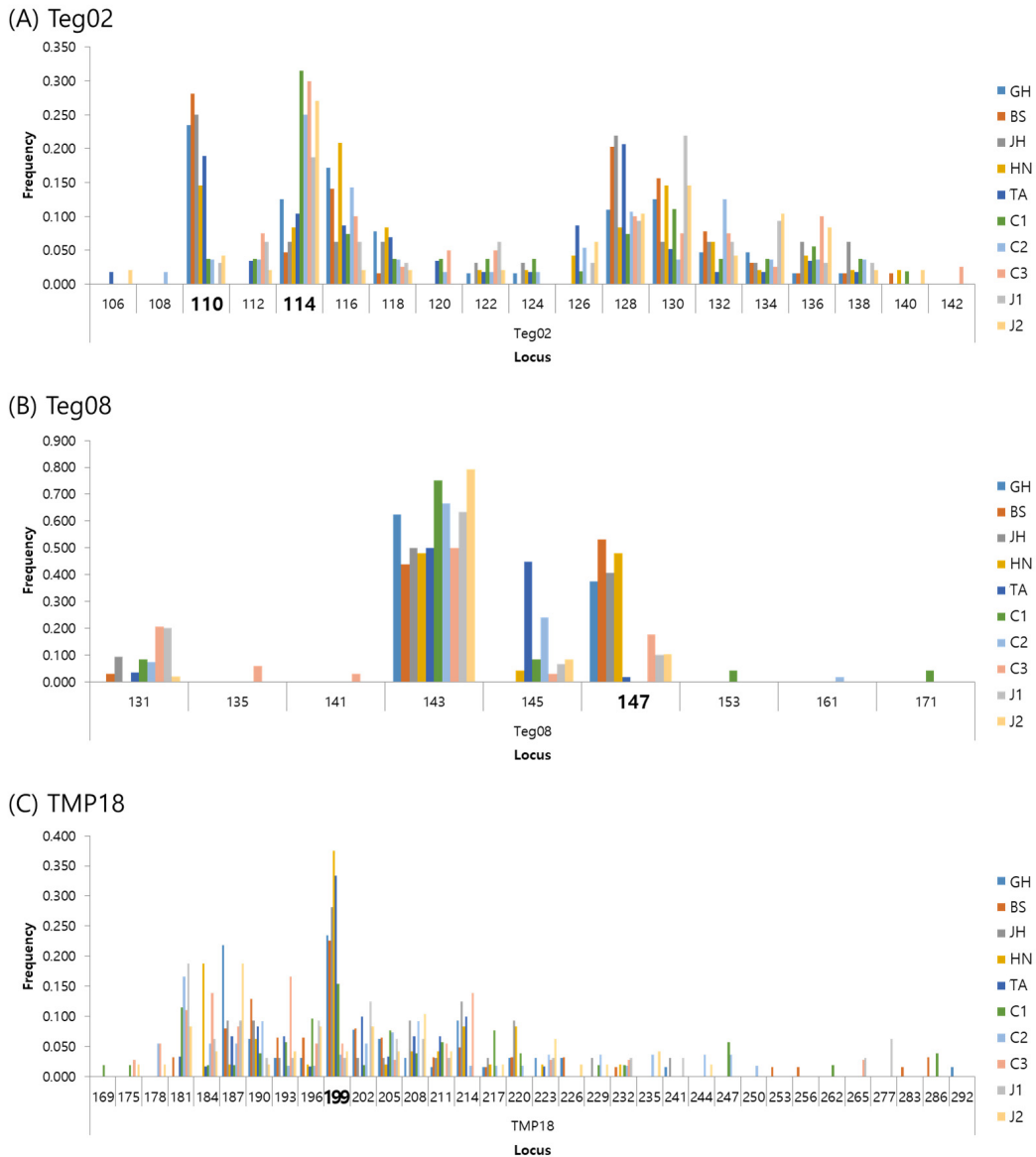


Fig. 2. Allele frequency distribution for 3 microsatellite loci in populations of *Tegilarca granosa*. (GH, Goheung; BS, Boseong; JH, Jangheung; HN, Heanam; TA, Taean; C, China; J, Japan)

마이크로세틀라이트 마커를 이용한 꼬막 원산지 판별 정확도와 신뢰도를 확인하기 위하여 베이저안 분석 (Bayesian methods) 을 기반으로 한 GeneClass2 소프트웨어를 이용하여 분석을 수행하였다. 앞서 분석한 결과들을 기반으로 중국산과 일본산을 하나의 그룹으로 통합하여 국산과 수입산으로 비교분석 하였다. 전체 19종의 마커를 적용 시 원산지 판별에 대한 정확도 88.4% (221/250), 신뢰도 87.8%로 확인되었다 (Table 4). 정확도 향상을 위한 최적의 마커 탐색을 수행하였으며, 최종 Teg24, Teg37, 그리고 Teg39를 제외한 16종의 마커를 적용 시 정확도 89.6% (224/250), 신뢰도 86.6%를

나타내었다. 원산지 판별의 신뢰도는 19종의 마커를 이용하였을 경우보다 1.2% 낮게 추정되었으나, 판별에 대한 정확도는 1.2% 향상되는 결과를 얻을 수 있었다. 세부 분석으로 국산 꼬막을 국산으로 판정하는 진양성 (True positive, TP) 은 정확도 90.3% (121/134), 신뢰도 94.7%이며, 중국산 또는 일본산으로 판정하는 위양성 (False positive, FP) 의 신뢰도는 83.0%로 다소 낮게 확인되었다. 또한 중국산 또는 일본산을 수입산으로 판정하는 진음성 (True negative, TN) 은 정확도 88.8% (103/116), 신뢰도 95.3%이며, 국내산으로 판정하는 위음성 (False negative, FN) 은 신뢰도 89.0%로 확인되었

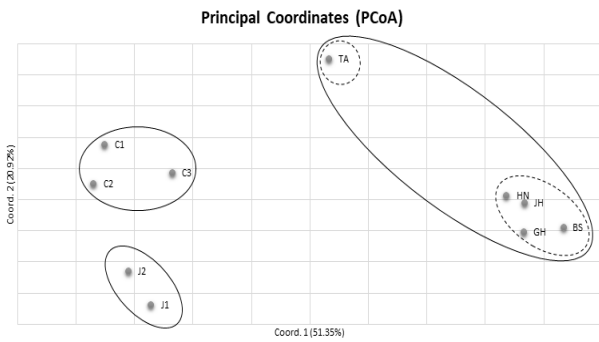


Fig. 3. Principal coordinates analysis of microsatellite loci representing the *Tegilarca granosa* populations. (GH, Goheung; BS, Boseong; JH, Jangheung; HN, Heanam; TA, Taeon; C, China; J, Japan)

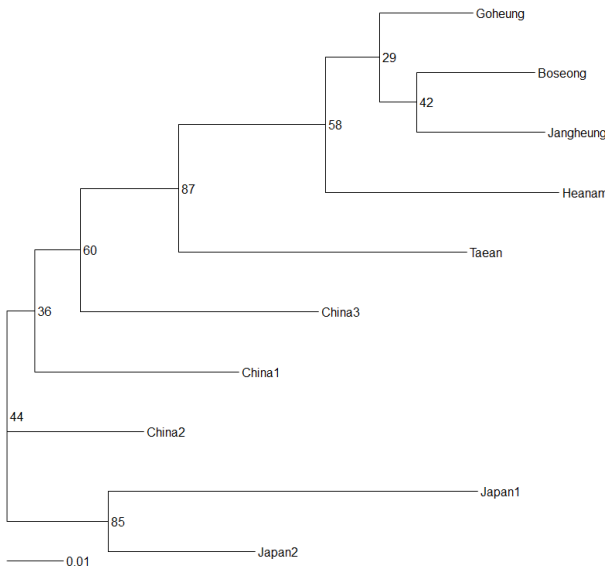


Fig. 4. Phylogenetic tree using the UPGMA method among *Tegilarca granosa* populations.

다. 위양성 및 위음성의 신뢰도가 진양성과 진음성보다 낮은 것을 고려할 때, 16종의 마이크로세틀라이트 마커는 국산 꼬막과 중국산, 일본산 꼬막의 원산지를 판별을 위한 정보를 제공하는 것으로 사료된다.

CONCLUSIONS

본 연구는 꼬막의 원산지를 판별하는 유전학적 분석 방법 개발을 목표로 한다. 이를 위해 먼저 미토콘드리아 COI 유전자 분석을 통해 국산, 중국산, 일본산 꼬막의 유전적 차이를 확인하였다. 그 결과, 중국산과 일본산 꼬막의 구분은 어려웠으나, 국산 꼬막에서만 발견되는 특정 하플로타입 (H1) 을 이용하여 원산지를 추정할 수 있음을 확인하였다.

다음으로 19종의 마이크로세틀라이트 마커를 이용하여 꼬막 집단의 유전적 특성을 분석하고, 이를 바탕으로 원산지 판별 정확도와 신뢰도를 검증하였다. 분석 결과, 3개의 유전자 좌위 (Teg02, Teg08, TMP18) 에서 국산 집단과 중국산, 일본산 집단 사이에 발견된 대립유전자 수가 상이한 것이 확인되었으며, 이는 지리적 격리에 따른 유전적 특성이 반영된 결과로 사료된다. 원산지 판별 정확도와 신뢰도는 16종의 마이크로세틀라이트 마커를 사용했을 때 정확도 89.6%, 신뢰도 86.6%로 나타났으며, 이는 국산 꼬막과 중국산, 일본산 꼬막의 원산지를 판별하는 데 충분한 정보를 제공하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구 결과는 꼬막의 원산지 판별에 유전학적 분석 방법이 유용하다는 것을 보여주며, 향후 꼬막의 유통 안전성과 품질 관리에 높은 기여를 할 것으로 기대된다. 또한, 마이크로세틀라이트 마커 기반 원산지 판별 방법을 개선하여 정확도와 신뢰도를 높일 수 있도록 연구를 지속할 필요가 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

이 논문은 2024년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업

Table 4. Analysis of origin discrimination using 16 and 19 microsatellite markers in populations of *Tegilarca granosa*

Sample type	No. of sample	16 microsatellite markers			19 microsatellite markers		
			Accuracy	Reliability		Accuracy	Reliability
Domestic population	134	TP	90.3% (121)	94.7%	TP	88.8% (119)	96.2%
		FP	9.7% (13)	83.0%	FP	11.2% (15)	75.0%
Imported population	116	TN	88.8% (103)	95.3%	TN	87.9% (102)	97.5%
		FN	11.2% (13)	89.0%	FN	12.1% (14)	86.7%
Total	250		89.6% (224)	86.6%		88.4% (221)	87.8%

(R2024018) 의 지원으로 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**(3): 314.
- Choi, J.Y., Bang, K.H., Han, K.Y. and Noh, B.S. (2012) Discrimination analysis of the geographical origin of foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(5): 503-525.
- Choi, S.S., Yoo, S.H., Seo, Y.B., Kim, J.O., Kwon, I.J., Bae, S.H. and Kim, G.D. (2023) Development and verification of single nucleotide polymorphism markers to determine country of origin of Korean and Chinese *Scapharca subcrenata*. *J. Life Sci.*, **33**(12): 1025-1035.
- El Sheikh, A.F. and Xu, J. (2017) Traceability as a key of seafood safety: reassessment and possible applications. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, **25**(2): 158-170.
- Hicks, D.T. (2016) Seafood safety and quality: The consumer's role. *Foods*, **5**(4): 71.
- Kang, J.H., Park, J.Y., Kim, E.M. and Ko, H.S. (2013) Population genetic analysis and origin discrimination of snow crab (*Chionoecetes opilio*) using microsatellite markers. *Mol. Biol. Rep.*, **40**: 5563-5571.
- Kim, E.M., Byun, S.G., An, C.M., Kang, J.H., An, H.S., Dong, C.M., Kim, M.J., Hong, Y.K. and Park, J.Y. (2014) Development of single nucleotide polymorphism markers from ESTs for discrimination between domestic and imported manila clams, *Ruditapes philippinarum*. *Food Control*, **40**: 208-213.
- Kim, E.M., Dong, C.M., Lee, M.N., Noh, J.K., Noh, E.S., Nam, B.H., Kim, Y.O. and Jung, H.S. (2022) Development of multiplex species-specific PCR for the simultaneous identification of three closely related species in the genera *Misgurnus* and *Paramisgurnus*. *Aquacult. Rep.*, **24**: 101144.
- Kim, H.J., Kang, J.S., Jung, S.W. and Park, Y.J. (2019) Changes in planktonic bivalve larvae of *Tegillarca granosa* and *Anadara kagoshimensis* in the Boseong coastal waters of South Korea. *Korean J. Environ. Biol.*, **37**(3): 351-361.
- Kong, L., Yu, H. and Li, Q. (2015) The complete mitochondrial DNA of *Tegillarca granosa* and comparative mitogenomic analyses of three Arcidae species. *Gene*, **557**(1): 61-70.
- Li, M., Zhu, L., Zhou, C., Lin, L., Fan, Y. and Zhuang, Z. (2012) Development and Characterization of EST-SSR Markers from *Scapharca broughtonii* and Their Transferability in *Scapharca subcrenata* and *Tegillarca granosa*. *Molecules*, **17**: 10716-10723.
- Liu, B., Teng, S., Shao, Y., Chai, X. and Xiao, G. (2012) Isolation and characterization of 39 novel polymorphic EST-SSR loci for the blood clam, *Tegillarca granosa*. *Conserv. Genet. Resour.*, **4**: 375-378.
- Liu, B., Teng, S., Shao, Y., Chai, X., Xiao, G., Fang, J., Zhang, J. and Wang, C. (2017) A genetic linkage map of blood clam (*Tegillarca granosa*) based on simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism markers. *J. Shellfish Res.*, **36**(1): 31-40.
- Mizik, T. (2021) Agri-food trade competitiveness: A review of the literature. *Sustainability*, **13**(20): 11235.
- Noh, E.S., Kang, H.S., An, C.M., Park, J.Y., Kim, E.M. and Kang, J.H. (2016) Rapid and specific identification of genus *Cynoglossus* by multiplex PCR assays using species-specific derived from the COI region. *J. Life. Sci.*, **26**(9): 1007-1014.
- Noh, E.S., Lee, M.N., Kim, E.M., Park, J.Y., Noh, J.K., An, C.M. and Kang, J.H. (2017) Development of a multiplex PCR assay for rapid identification of *Larimichthys polyactis*, *L. crocea*, *Atrubucca nibe*, and *Pseudolithus elongates*. *J. Life. Sci.*, **27**(7), 746-753.
- Noh, E.S., Park, Y.J., Kim, E.M., An, C.M., Park, J.Y., Kim, K.H., Song, J.H. and Kang, J.H. (2017) Development of primer set for the identification of fish species in surimi products using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Control*, **79**: 74-79.
- Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**(5): 294-299.
- Wang, Y.J., Zeng, Q.G. and Xu, L.N. (2013) Population structure of the blood clam (*Tegillarca granosa*) in China based on microsatellite markers. *Genet. Mol. Res.*, **12** (2): 892-900.
- 식품의약품안전처. (2021) 식품 중 사용원료 진위 판별을 위한 유전자 분석 방법 (증보판II).