

18s 리보솜 DNA 서열 분석에 의한 한국산 가시고기속 (genus *Pungitius*, Gasterosteidae: Pisces) 어류의 계통학적 연구

서 보 근 · 채 병 수*

계명대학교 생물학과, *환경부 생태계조사단

Phylogenetic Study of the Genus *Pungitius* (Gasterosteidae: Pisces) from Korea by the Sequence Analysis of 18s Ribosomal DNA

Bo-Keun Seo and Byung-Soo Chae*

Department of Biology, Keimyung Univ., Taegu 704-701, Korea

*Nature Conservation Bureau, Ministry of Environment, Kwacheon, Kyunggi-do 427-760, Korea

The sequences of two fragments of 18s ribosomal DNA were determined to elucidate relationship between *Pungitius sinensis* and *P. kaibarae*. The proportion of G+C pair is 54.85% to 55.15% in *P. kaibarae* populations and 52.76% in *P. sinensis*. Number of substitutions ranges from 10~18 among the populations of *P. kaibarae* and up to 165 between *P. sinensis* and *P. kaibarae*. The value of sequence divergence were 0.0118~0.0195 among the populations of *P. kaibarae* and 0.2136~0.2306 between *P. sinensis* and *P. kaibarae*. The result of pairwise comparison of the sequences indicate that phylogenetic relationship between *P. sinensis* and *P. kaibarae* was differentiated to specific level.

Key words : Pisces, *Pungitius*, sequence analysis, UPGMA.

서 론

극동지역의 가시고기속 어류 (genus *Pungitius*)에는 가시고기 (*P. sinensis*), 잔가시고기 (*P. kaibarae*), 청가시고기 (*P. pungitius*), 두만가시고기 (*P. tymensis*) 등이 몇 종 혹은 아종으로 구분되고 있는데, 연구자에 따라 분류학적 수준이 다르게 분류되고 있어 계통학적으로 문제가 많은 집단이다 (池田, 1933; Okada, 1960; Münzing, 1969; Wootton, 1976; 宮地 등, 1976; 정, 1977; 전, 1987; 김, 1997). 이들은 그 형태가 비슷하고 유전적인 분석에

서도 그들간의 관계가 복잡하여 분류에 어려움이 많다 (高田, 1987; Yang and Min, 1990).

한반도 이남에 서식하는 가시고기속 어류로는 가시고기와 잔가시고기의 두 종류가 있는데 동지느러미가시의 수, 기초막의 색깔, 인판의 발달정도 등과 같은 형태적 특징에 의하여 비교적 쉽게 구분할 수 있기 때문에 가시고기와 잔가시고기를 구분하거나, 지역에 따라 변이를 나타내는 잔가시고기 개체군들 사이를 구분하는데 큰 문제는 없다. 다만 학자에 따라서 이들 가시고기와 잔가시고기의 개체군들을 아종 혹은 별종으로 분류하므로써 그 계통학적 위치를 확정하는데 혼란이 있다 (전, 1987;

Chae and Yang, 1988; 김, 1997).

본 연구에서는 최근에 계통학적 연구에 많이 이용되고 있는 18s 리보솜 DNA 염기서열분석을 시도하여 한반도 이남에 서식하고 있는 가시고기속 어류인 가시고기와 잔가시고기 사이의 유연관계 및 계통학적 문제를 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 가시고기와 잔가시고기의 재료는 Table 1에 제시된 바와 같으며, 망목 3×3 mm의 족대를 이용하여 채집하였다. 각 채집지의 어류는 산채로 실험실로 운반한 후 냉동하여 간조직을 적출하였다. DNA는 Palumbi (1996)의 방법에 의하여 분리되었는데, 간조직 50~90 mg을 잘게 자른 후 400 µl의 STE (100 mM EDTA, 10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.5)에 넣고 마쇄하였다. homogenate는 1,000 rpm (Hettich Mikro 24~48R, Angle rotor; radius 92 mm)에서 5분간 원심분리 후 상등액을 취하였고, 다시 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 pellet을 취하였다. 여기에 44 µl의 SDS (10 per cent)와 400 µl TE buffer를 혼합하여 50°C에서 1시간 정치하였다. DNA는 phenol-IAC (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1)로 3회 정제한 후, 2.0 vol.의 ice-cold absolute ethanol을 가하여 -20°C의 냉동고에 넣어 overnight 시켰다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척, 건조 후 증류수에 현탁하여 실험에 사용하였다.

미국산 bird spider (*Eurypelma californica*)의 18s rDNA에서부터 design된 primer (forward primer 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3', reverse primer 5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3')를 제노텍(주)에 의뢰·합성하여 증폭에 사용하였다. PCR의 증폭은 먼저 optimization kit (stratagene)으로 최적의 PCR buffer와 adjunct를 찾은 다음 멸균 처리한 PCR tube를 얼음 위에 두고 각 tube당 PCR 10Xbuffer 2.5 µl, 0.05 mM dNTP, forward, reverse primer 각 0.1 µg씩, template DNA 38 ng, 1 unit의 Taq DNA polymerase, 15 mM (NH₄)₂SO₄를 가하고 멸균 증류수를 첨가하여 총 25 µl가 되게 한다. 증폭 조건은 전체 35 cycle 중 1st cycle은

94°C 3분, 57°C 2분, 72°C 2분으로 하고, 이후 cycle은 94°C 1분, 57°C 2분, 72°C 2분, 35th cycle은 94°C 1분, 57°C 2분, 72°C 8분으로 처리한 후 4°C를 계속 유지토록 하였다.

PCR산물은 GenElute Agarose Spin Column (Supelco, Bellefonte, PA)으로 정제한 후 기초과학연구원센터에 sequencing을 의뢰하였다.

Sequence data는 Clustal W (ver. 1.5) (Thompson *et al.* 1994) program으로 alignment 되었고, Phylip 3.5c (Felsenstein, 1993) program의 DNADIST로 distance matrix를 얻었다. Dendrogram은 UPGMA 분석법에 의해 만들어졌다.

결 과

조사한 가시고기속 어류 4개체군의 염기서열은 Fig. 1에 나타내었다. 이는 PCR에 의해 cloning된 약 1,200 base의 염기 중에서 forward primer에 의해서 sequencing된 약 360 base (first fragment)와 reverse primer에 의해서 sequencing된 약 570 base (second fragment)를 함께 alignment한 것이다.

염기의 조성에 있어서는 4집단 모두 G+C pair의 비율이 A+T pair의 비율보다 약간 더 높았는데 잔가시고기의 개체군들은 54.85~55.15%이었으며 가시고기 개

Table 2. Sequence divergence estimates calculated by DNADIST (PHYLIP 3.5c) (above diagonal) and numbers of substitution (below diagonal)

Populations	J	P	S	H
J	-	0.2165	0.2306	0.2136
P	166 (53/113)	-	0.0195	0.0118
S	177 (56/121)	18 (2/16)	-	0.0151
H	165 (54/111)	10 (0/10)	12 (2/10)	-

Below diagonal includes numbers of total substitutions and transition/transversion in the parentheses. See Table 1 for the symbols of populations.

Table 1. Taxa used in this study and their collecting localities

Taxa	Symbol	Locality
<i>Pungitius sinensis</i>	J	Jusu River (Okkye-myon, Tonghae-shi, Kangwon-do)
<i>Pungitius kaibarae</i>	P	Pukchon River (Kansong-up, Kosong-gun, Kangwon-do)
	S	Sachon River (Sachon-myon, Kangnung-shi, Kangwon-do)
	H	Hyongsan River (Naenam-myon, Kyongju-shi, Kyongsangbuk-do)

H GAACCAGCAAGCGCGCC-AATTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAA
 S GAACCAGCAGGCGCGCCAATTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAA
 P AAGCCAGCAGGCGCGCA-AATTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAA
 J GAACCAGCAGGCGCGCA-AATTACCCACTCCCAGCTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAA
 * * * * *

H CAATACAGGACTCTTTGAGGCCCTGTAATTGGAATGGGTACACTTTAAATCCTTTAACG
 S CAATACAGGACTCTTTGAGGCCCTGTAATTGGAATGGGTACACTTTAAATCCTTTAACG
 P CAATACAGGACTCTTTGAGGCCCTGTAATTGGAATGGGTACACTTTAAATCCTTTAACG
 J CAATACAGGACTCTTTGAGGCCCTGTAATTGGAATGGGTACACTTTAAATCCTTTAACG
 * * * * *

H AGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCG
 S AGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCG
 P AGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCG
 J AGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCG
 * * * * *

H TATATTAAGTTGCTGTAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCTGACGGT
 S TATATTAAGTTGCTGTAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCTGACGGT
 P TATATTAAGTTGCTGTAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCTGACGGT
 J TATATTAAGTTGCTGTAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGATCGAGCTGACGGT
 * * * * *

H CCGCCGCGAGGCGTGCCACCGTCTGTCCCAGCCCCTGCCTCTCGGCGCCCCCTCGATGCT
 S CCGCCGCGAGGCGTGCCACCGTCTGTCCCAGCCCCTGCCTCTCGGCGCCCCCTCGATGCT
 P CCGCCGCGAGGCGTGCCACCGTCTGTCCCAGCCCCTGCCTCTCGGCGCCCCCTCGATGCT
 J CCGCCGCGAGGCGTGCCACCGTCTGTCCCAGCCCCTGCCTCTCGGCGCCCCCTCGATGCT
 * * * * *

H CTTGACTGAGTGTCCCGCCGGGGCCCCGAAGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAA
 S CTTGACTGAGTGTCCCGCCGGGGCCCCGAAGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAA
 P CTTGACTGAGTGTCCCGCCGGGGCCCCGAAGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAA
 J CTTGACTGAGTGTCCCGCCGGGGCCCCGAAGCGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAA
 ** * * * * *



H AGCAGGCG-ATCCGACGGCGTTATT-CCCATGACCCGCCGGGCAGCGTCCGGGAAACCAA
 S AAGTTTCGGATCCGGCGGCGTTATT-CCCATGACCCGCCGGGCAGCGTCCGGGAAACCAA
 P AGCAGGCG-ATCCGCGGCGTTATT-CCCATGACCCGCCGGGCAGCGTCCGGGAAACCAA
 J AGCAGGCCCTTTTACGGTTCAATGGCCTTTTGCTTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC
 * * * * *

H AGTCTTTGGGTTCCGGGGG-GAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGA
 S AGTCTTTGGGTTCCGGGGG-GAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGA
 P AGTCTTTGGGTTCCGGGGG-GAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGA
 J ATGCGTTATCCCCTGATTCTGTGTATAACCGTATAACTGCCTTTGAAGTGAGCTGATACC
 * * * * *

H A-GGGCAC-CACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCAA
 S AAGGGCAC-CACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTC-A
 P A-GGGCAC-CACCAGGAGTGGAGCCTACGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAACCTCA
 J GCTGGCACGCAGCCGACTGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTCACAAAGCAGGGGAAATA-G
 * * * * *

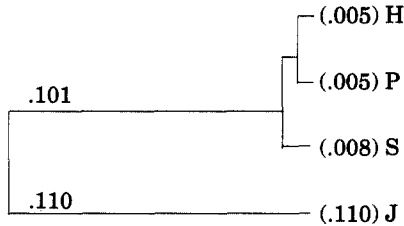


Fig. 2. A dendrogram revealing relationship among the four populations of genus *Pungitius*. Distance matrix data generated by DNADIST (PHYLIP 3.5c) was used in cluster analysis (UPGMA). See Table 1 for the symbols of populations.

같이 잔가시고기의 간성 북천, 사천천, 경주 형산강의 개체군들은 초기에 하나의 집단으로 묶여지는 경향을 나타내었으며, 이들 집단과 육계 주수천의 가시고기 개체군은 유전적으로 관계가 먼 것으로 나타났다.

고 찰

가시고기속 어류는 북극해를 중심으로 하는 거의 대부분의 연안지역에 분포하며 유럽에서는 프랑스와 흑해 및 카스피해 연안까지, 극동지역에서는 한국, 중국, 일본까지, 그리고 북아메리카에서는 캘리포니아와 오대호유역 및 인접한 대서양 연안까지 남하하는 등 매우 널리 분포하고 있다(Wootton, 1976). 이들은 지역에 따라 분화가 일어나 몇 종으로 구분되어 있는데, 극동지역의 것이 가장 분화가 심하다.

한반도에 서식하고 있는 가시고기속 어류 4종, 가시고기(*P. sinensis*), 잔가시고기(*P. kaibarae*), 청가시고기(*P. pungitius*), 두만가시고기(*P. tymensis*) 중 두만가시고기는 형태적 및 유전적 분석의 결과 다른 점이 많아서 일본에서도 완전한 별종으로 취급되고 있다(高田, 1987; 川那部 · 水野, 1989). 그러나 일본산 청가시고기(*P. pungitius*)는 아이소자임에 의한 유전적 관계의 분석 결과 淡水型, 雄物型, 汽水型으로 구분되는데 이들 중 淡水型은 가시고기와 같은 군으로 묶여지는 것으로 밝혀져 가시고기와 청가시고기는 크게 가시고기+청가시고기 淡水型, 청가시고기 雄物型, 청가시고기 汽水型이라는 3개의 집단으로 구분됨을 보여주고 있다(高田, 1987).

한반도의 남부에 서식하는 가시고기(*P. sinensis*)와 잔가시고기(*P. kaibarae*)에 대하여 전(1987)과 채(1988)는 각각 아종의 수준인 *P. sinensis sinensis*와 *P. sinensis kaibarae*로 판단하였으며, Kim et al.(1989)과 김(1997)은 이들을 별종의 관계로 보았다. 그러나 이러한 구분은 모두 형태적인 면과 분포양상에 대한 유사한 자료를 바

탕으로 서로 상이한 해석을 한 바 이들간의 관계가 아종 또는 별종인지를 정의할 수 있는 뚜렷한 근거를 찾기는 어렵다.

한편 Yang and Min(1990)은 이들에 대한 19개의 genetic loci의 대립인자의 빈도를 조사하여 가시고기와 잔가시고기 사이 그리고 잔가시고기 내에서 강릉이북의 집단과 이남의 집단 사이의 평균 유전적 근연치(S)를 각각 0.606과 0.690으로 밝히고 별종으로 보고했다. 이를 *Lepomis*속의 I(genetic identity)값인 동종 0.98, 아종 0.84와 별종 0.54(Avise, 1976)와 비교해 보면 그 사이의 값 정도가 된다. 이는 동일 data에서 S값과 I값을 계산할 때 S값이 약간 낮게 나타나는 것(Avise, 1976)을 감안하면 아종 쪽에 보다 더 가까우나, 이들 값 자체가 taxa간에 약간의 차이가 있으므로, 별종으로 보는 것에 무리가 없을 듯하다.

본 연구에서 실시한 염기서열의 분석 결과는 sequence divergence의 정도가 distance(D)로 계산되어 있는데(Table 2), 잔가시고기 개체군들 사이는 0.0118~0.0195, 가시고기와 잔가시고기 개체군 사이는 0.2136~0.2306으로 나타났다. 이 결과를 연어속(*Oncorhynchus*)의 계통연구를 위하여 mtDNA의 D-loop sequence를 분석한 Kitano et al.(1997)의 종간의 D값 0.0315~0.0950과 속간의 D값 0.0858~0.1448과 비교하면, 잔가시고기 개체군들은 동일종, 가시고기와 잔가시고기 개체군 사이는 별종일 뿐 아니라 속까지도 다를 정도의 값이 된다. 또, 최근 국내에서 연구된 연어아과 어류의 mtDNA control region의 분석(이 등, 1999) 결과인 종간의 D값 0.0542~0.0708과 속간의 D값 0.1328~0.1649와 비교하여도 전자의 경우와 같이 해석된다.

동일 종류의 data에서 얻은 결과는 아니지만 Avise(1976)와 Yang and Min(1990)의 결과를, 식 $D = -\ln I$ 혹은 $D = -\ln S$ (Avise, 1976; Swofford and Olsen, 1990)를 이용하여 D값으로 환산하여 염기서열의 분석결과와 비교해 보면, Avise(1976)의 *Lepomis*속의 경우 동종이 0.02, 아종이 0.17 및 별종이 0.62로 환산되고, Yang and Min(1990)의 가시고기와 잔가시고기 사이의 값은 0.500 그리고 잔가시고기 내에서 강릉이북의 집단과 이남의 집단 사이의 값은 0.371이 된다. 이들과 본 연구의 결과를 비교하여도 잔가시고기 개체군들 사이는 동일종, 가시고기와 잔가시고기 개체군 사이는 아종 이상의 분화를 보여준다.

따라서 저자들은 가시고기(*P. sinensis*)와 잔가시고기(*P. kaibarae*)를 별종으로 분류하는데는 동의하나, 잔가시고기내의 개체군들에 대한 결과는 Yang and Min(1990)의 경우와 현저히 다르므로, 일단 재고의 여지가

있다고 보고 판단을 유보하고자 한다.

적 요

한국산 가시고기 (*Pungitius sinensis*)와 잔가시고기 (*P. kaibarae*) 사이의 관계를 밝히기 위하여 18s 리보솜 DNA 두 단편의 염기서열을 분석하였다. G+C pair의 비율은 잔가시고기의 개체군에서 54.85~55.15%, 가시고기에서 52.76%로 나타났다. 잔가시고기 개체군들 사이의 염기치환수는 10~18개, 가시고기와 잔가시고기 사이의 염기치환수는 165개였다. 거리지수의 값은 잔가시고기의 개체군들 사이는 0.0118~0.0195, 가시고기와 잔가시고기 개체군 사이는 0.2136~0.2306으로 나타났다. 이들 개체군간 염기서열의 분석 결과는 잔가시고기와 가시고기가 종수준으로 분화한 것을 보여주었다.

사 사

본 연구는 공저자 중 서보근의 연구년(1995. 9~1996. 8) 수혜에 의해 이루어진 것이다.

인 용 문 헌

- Awise, J.C. 1976. Genetic differentiation During Speciation. pp. 106~122. In: Molecular Evolution. F.J. Ayala, ed. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Chae, B.S. and H.J. Yang. 1988. Comparison of the morphology between two populations of eightspine stickleback, *Pungitius sinensis kaibarae* (Tanaka). Korean J. Lim. 21(2) : 79~91.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5 c. The University of Washington, Seattle.
- Kim, I.S., C.H. Youn and J.H. Lee. 1989. Morphological variation and karyotype of the Korean species of sticklebacks (Pisces: Gasterosteidae) in Korea. Korean J. Syst. Zool. 5(2) : 107~119.
- Kitano, T., N. Matsuoka and N. Saitou. 1997. Phylogenetic relationship of the genus *Oncorhynchus* species inferred from nuclear and mitochondrial markers. Genes and genetic systems, 72 : 25~34.
- Münzing, J. 1969. Variabilität, Verbreitung und Systematik der Arten und Unterarten in der Gattung *Pungitius* Coste, 1848 (Pisces, Gasterosteidae). Z. Zool. Syst. Evol. Forsch. 7 : 208~233.
- Okada, Y. 1960. Studies on the freshwater fishes of Japan II. Special Part. J. Fac. Fish., Pref. Univ. Mie 4(3): 589~860.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. pp. 205~247. In: Molecular Systematics. D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable eds. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Swofford, D.L. and G.J. Olsen. 1990. Phylogeny reconstruction. pp. 411~501. In: Molecular Systematics. D. M. Hillis and C. Moritz, ed. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Research, 22 : 4673~4680.
- Wootton, R.J. 1976. The Biology of the Sticklebacks. Academic Press, London.
- Yang, S.Y. and M.S. Min. 1990. Genetic variation and systematics of the sticklebacks (Pisces, Gasterosteidae) in Korea. Korean J. Zool. 33(4) : 499~508.
- 김익수. 1997. 한국동식물도감 제37권 동물편(담수어류). 교육부.
- 이희정 · 박주연 · 김우진 · 민광식 · 김 윤 · 유미애 · 이원호. 1999. 미토콘드리아 DNA control region의 염기분석에 의한 연어아과 어류의 유전학적 연구. 한국어류학회지, 11(2): 163~171.
- 전상린. 1987. 한국산 독중개과 및 큰가시고기와 주연성담수어의 검색과 분포. 상명여자대학교논문집 19 : 549~576.
- 정문기. 1977. 한국어도보. 일지사. 서울.
- 채병수. 1988. 한국산 가시고기 (*Pungitius sinensis*: Gasterosteidae)의 형질분석에 의한 분류. 경북대학교박사학위논문. pp. 82.
- 池田嘉平. 1933. トゲウオの分布と其の變異. 動物學雜誌 45(534) : 141~173.
- 川那部浩哉 · 水野信彦. 1989. 日本の淡水魚. 山と溪谷社. 東京.
- 宮地傳三郎 · 川那部浩哉 · 水野信彦. 1976. 原色日本淡水魚類圖鑑. 保育社. 大阪.
- 丹信實. 1977. ミナミトミヨ(サバツヤユ)頃. 淡水魚 3 : 135~140.
- 高田啓介. 1987. トミヨ屬魚類の遺傳的分化. 水野信彦 · 後藤晃 編 “日本の淡水魚類 - その分布, 變異, 種分化をめぐって”. 東海大學出版會. 東京. 134~143.