

한국산 연어의 미토콘드리아 NADH Dehydrogenase Subunit 3 영역의 클로닝 및 DNA 염기서열 분석

최윤실 · 이윤호* · 진덕희[†]

강릉대학교 해양생명공학부, *한국해양연구원 극지연구본부

Cloning and DNA Sequences Analysis of Mitochondrial NADH Dehydrogenase Subunit 3 from Korean Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*

Yoon-Sil CHOI, Youn-Ho LEE* and Deuk-Hee JIN[†]

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Gangnung 210-702, Korea

*Laboratory of Polar Science, Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-170, Korea

Mitochondrial DNAs has been used frequently as genetic markers for the population genetic studies of salmonid fishes. Samples used in this experiment were chum salmon (*Oncorhynchus keta*) from Korea. We analyzed variation of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 gene (ND3) among 4 individuals of the Korea population. Genomic DNA was extracted from the liver of the chum salmon samples. Then, the ND3 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) including the 3' region of cytochrome oxidase III gene (COIII) and the 5' region of NADH dehydrogenase subunit 4L gene (ND4L). The size of the PCR product was 752 bp and the sequences showed some genetic variation among those four individuals. Genetic variations were observed in 7 sites as single nucleotide polymorphism (SNP). Within the open reading frame of the ND3 gene which encodes 116 amino acids, 5 nucleotide substitutions were found. Both transitional and transversional changes occurred more frequently with transitional changes. Comparison of these sequences with the others of a Japanese chum salmon in GenBank showed 5 sites of SNPs. This study provided the basic information of SNP in ND3 gene among Korean chum salmon and demonstrated the possible use of the SNP data as a genetic marker.

Key words: Mitochondrial DNA, Chum salmon, COIII, ND3, ND4L, PCR, SNP

서 론

냉수성 고급어종인 연어는 자원관리와 어획 가능한 자원량의 확대가 쉬우므로 중요 수산자원으로 주목받고 있다. 수산 선진국인 미국, 일본, 캐나다 및 러시아 등 북태평양 연안국들은 연어 자원의 지속적 증강을 위해 1993년 2월 북태평양 소하성 어류위원회를 만들어, 자국의 연어자원을 보호하고 있다. 그러나 북태평양 연안국 가운데서도 연어의 회귀량이 가장 적은 우리나라는 연어 자원에 대하여 어떠한 주장도 할 수 없는 실정이다.

최근 세계 각국에서는 수산 생물 자원을 효과적으로 관리·보존하기 위하여 분자생물학적 방법을 이용한 유전학적 연구가 활발히 행해지고 있으며, 이러한 연구 수단으로서 DNA marker 개발의 중요성이 강조되고 있다. 특히, 유전적 다형을 많이 포함하고 있는 미토콘드리아 DNA를 이용한 DNA marker 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

미토콘드리아 DNA는 염색체 DNA보다 약 10배 정도 빨리 변화하며, 미토콘드리아 DNA의 조절 영역은 다른 부분보다 5배 가량 더 빨리 진화하는 것으로 알려져 있다

(Brown et al., 1979, 1982). 그러므로 미토콘드리아 DNA는 근연종 혹은 그 이하의 집단을 비교하는데 아주 좋은 유전 표지인자로서 사용되고 있다. 특히 본 연구에 사용한 NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) 유전자는 모든 생물체의 미토콘드리아 DNA 내에 일정하게 존재하고 있으므로 최근에 생물집단간의 유전적 차이 규명에 효과적으로 이용되고 있다 (McKay et al., 1996; Verspoor et al., 1999).

지금까지 미토콘드리아 DNA를 이용한 연구로서는 미토콘드리아 DNA 염기서열을 이용한 태평양 연어의 계통분석 (Domanico and Phillips, 1995), RFLP 분석에 의한 PCR 기법에 기초한 연구 (McKay and Smith, 1997) 등이 알려져 있다. 또한 우리나라에서는 수산생물을 이용한 미토콘드리아 DNA 연구로 붕넛치과 (Park and Kim, 1995), 황해산 대하 (Hwang et al., 1997), 한국산 참굴 (Kim et al., 1997) 그리고 동해안에 서식하는 진주담치 (Kim et al., 1999) 등에 관한 연구가 수행되었으며, 연어류에 대한 유전학적 연구로는 genetic marker 개발 (Hong et al., 1999), 미토콘드리아 ribosomal RNA를 이용한 한국산 연어과의 유전적 계통도 (Lee et al., 2000) 에 관한 연구 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 우리나라 동해안으로 회귀하는 연어류의 미토콘드리아 ND3 유전자를 클로닝하여, 그 염기서열을

[†]Corresponding Author: dhjin@kangnung.ac.kr

결정하고, GenBank에 등록된 연어의 염기서열과 비교·분석하여 한국 연어류의 변이를 조사하였다.

재료 및 방법

시료 채취

본 연구에 사용된 연어 (chum salmon, *Oncorhynchus keta*)는 1999년 우리나라 동해안으로 회귀한 연어를 국립 수산진흥원 양양 내수면 연구소 채포장에서 채취한 것으로 현장에서 간을 떼어내어 즉시 얼린 다음, -80°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

Genomic DNA의 추출

연어의 genomic DNA 추출은 동결보존된 간 약 70 mg을 취하여 세절한 뒤, QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 추출하였다. 추출된 DNA 정량은 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 파장 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 농도와 순도를 확인하였다.

ND3 유전자 영역의 증폭

추출된 total genomic DNA로부터 미토콘드리아 DNA의 ND3 영역을 선택적으로 증폭시키기 위한 PCR 반응액은 0.5-1 µg의 template DNA와 1×PCR buffer (Qiagen, Germany), 1 unit의 HotstarTaq DNA polymerase (Qiagen, Germany), 0.2 mM dNTPs와 각 25 pmole의 primer를 넣어 반응용액 50 µL로 반응시켰다. Primer는 forward primer로 cytochrome oxidase III gene (COIII; 5' TTACAATCGCT-GACGGCG 3')과 reverse primer로 NADH dehydrogenase subunit 4L gene (ND4L; 5' GGTGCGGTGAAACGCGA-GTC 3')를 이용하였다 (Domanico and Phillips, 1995).

PCR 반응은 94°C에서 10분 (initial-activation) 반응 후, 94°C에서 1분 (denaturation), 50°C에서 1분 (annealing) 그리고 72°C에서 1분 (extension)의 3단계를 35회 반복한 다음, 마지막 과정으로 72°C에서 10분 (final-extension)동안 반응시켰으며, 이와 같은 PCR 반응은 MiniCycler TM (MJ research, USA)을 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel 상에서 전기영동한 다음, ethidium bromide (EtBr, 0.5 µg/mL)에 염색하여 선택적으로 증폭되었는지 확인하였다 (Sambrook et al., 1989).

Cloning 및 plasmid DNA 추출

증폭된 PCR 산물을 pCR2.1-Topo vector (Invitrogen, Netherlands)에 클로닝하여 Top 10 competent cell (Invitrogen, Netherlands)에 형질전환 시켰으며, 형질전환된 흰색 콜로니를 각 개체당 24개씩 선별하여 ampicillin (100 µg/mL)이 첨가된 액체 LB 배지에서 37°C, 250 rpm으로 하룻밤 배양하여 자란 박테리아로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다.

플라스미드 DNA 추출은 QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였고, 추출된 플라스

미드 DNA의 농도와 순도를 측정하여 각 개체당 4개의 DNA를 택하고 그 염기서열을 분석하였다.

DNA 염기서열과 아미노산서열 분석

DNA 염기서열은 ABI PRISM dye terminator cycle sequencing kit (PE Biosystem, USA)를 사용하여 95°C에서 2분 초기반응 (initial-activation) 후, 96°C에서 10초 (denaturation), 50°C에서 5초 (annealing), 60°C에서 4분 (extension)의 3단계를 25회 반복하였으며, 이와 같은 과정은 GeneAmp PCR system 2400 (PE Biosystem, USA)으로 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 에탄올에 침전시킨 후, ABI PRISM 377 DNA sequencer (PE Biosystem, USA)를 이용하여 전기영동 하였으며, 각 개체당 4개의 염기서열에 대하여 양방향의 primer에 대한 염기서열로 정렬시켜 일치하는 염기를 선택하였다.

염기서열은 GeneDoc 프로그램 (version 2.4, Cris, USA)으로 정렬시켰으며, 염기간의 상동성은 NCBI의 BLAST를 이용하여 조사하였고 GenBank에 등록된 data와 비교·분석하였다. 아미노산간의 관계를 조사하기 위해, 염기서열 중 ND3 영역만을 취하여 ExPasy에서 아미노산서열을 정렬시키고, GenPept에 등록된 ND3의 아미노산서열과 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

ND3 유전자 영역의 증폭

간 조직으로부터 추출된 genomic DNA는 평균 농도 약 700 µg/mL 순도 1.8 OD₂₆₀/OD₂₈₀로 농도와 순도가 모두 높은 DNA가 추출되었다. 미토콘드리아 ND3 영역을 선택적으로 증폭시키기 위해 COIII 유전자와 ND4L 유전자의 염기서열 일부를 primer로 이용하여 증폭시킨 결과, Fig. 1과 같이 약 750 bp 크기의 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있었다.

미토콘드리아 ND3 영역의 클로닝

증폭된 PCR 산물을 미토콘드리아 DNA의 ND3 영역을

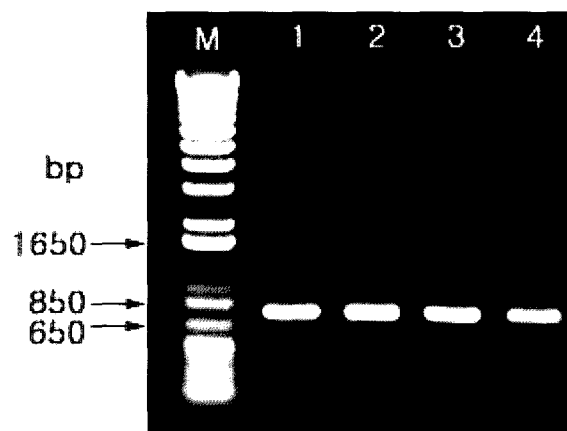


Fig. 1. Electrophoretic profiles of selectively amplified ND3 region by PCR in the salmons. M: 1 Kb Plus DNA Ladder size marker (Life technologies, USA), Lanes 1-4 : individuals from Korean chum salmon.

클로닝하기 위하여 먼저 TA Cloning Kit (Invitrogen, Netherlands)를 사용하여 벡터에 삽입시켰다. PCR 생성물을 pCR 2.1-TOPO 벡터에 연결시켜 클로닝하였으며, 삽입된 DNA의 크기를 측정하기 위해 Invitrogen에서 제작한 M13 forward primer와 M13 reverse primer를 이용하여 증폭시킨 다음, 0.8% agarose gel 상에서 전기영동 한 결과, 한국산 연어 4개체 모두에서 약 1,000 bp의 PCR 산물이 확인되었다.

염기서열 분석

우리나라 동해안으로 회귀한 연어 4개체의 ND3 유전자에 대하여 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, Fig. 2와 같이 COIII와 ND4L의 일부가 포함된 752 bp의 염기서열이 정렬되었다. 이 염기서열을 NCBI에서 얻어진 연어 (chum salmon)의 염기서열 (GenBank No. D84147)과 비교하였을 때, ND3만의 염기서열은 282-632 bp로 351 bp의 크기로 정렬되어 나타났으며, 전반부 1-281 bp는 COIII, 후반부 633-752 bp의 염기서열은 ND4L의 일부가 포함된 염기서열임을 확인할 수 있었다.

집단내 개체간의 single nucleotide polymorphism (SNP)은 Fig. 3에서 평암으로 표시한 것과 같이 4개 시료에서 7개의 위치에 서로 다른 염기가 관찰되어 개체간의 변이가 있음을 알 수 있었다. 그러나 염기의 삽입이나 결실은 관찰되지 않았다. K1 (K: Korean salmon), K2, K3 그리고 K4 시료에서 개체간의 변이가 나타난 위치는 K1, K2와 K3, K4의 65 bp (T→C)와 542 bp (A→G) 위치에서 전이(transition)에 의한 염기치환이 일어났으며, 315 bp (A→C) 위치에서는 전환(transversion)에 의한 염기치환이 일어났다. 또한, 한 개체에서만 변이가 나타난 것으로는 K2의 334 bp (T→C), 424 bp (C→T), 727 bp (C→T) 위치와 K4의 414 bp 위치에서 전이가 일어났으며, 한국산 연어의 개체간의 전이와 전환에 의한 변이율이 각각 86%, 14%로서 전이에 의한 변이가 약 6배 정도 높게 관찰되었다. 이러한 결과는 미토콘드리아 DNA내의 유전적 변이는 전이의 빈도가 전환의 빈도보다 높게 나타난다는 Brown et al., (1982)의 보고와 일치하였다.

NCBI에 등록된 연어의 염기서열과 비교한 결과 대체로 비슷하게 나타났으나, 본 실험의 541 bp (G→T)와 599 bp (G→A) 위치에서는 전체 시료 모두에서 염기치환이 관찰되어 다른 나라의 연어들과 구별할 수 있는 SNP로서의 가치가 있다고 사료된다 (Table 1). 또한 K1과 K2 시료에서 차이를 나타낸 65 bp, 315 bp, 542 bp 위치도 한국산 연어를 타국가 연어와 구별할 수 있는 SNP로서의 가치가 있다고 생각된다. 그러나 GenBank에 등록되어있는 연어의 염기서열이 연어 집단을 대표할 수 없기 때문에 McKay et al., (1996)이 보고한 염기서열과 비교한 결과, Fig. 4와 같이 541번째 염기는 GenBank에서는 guanine, McKay와 본 실험에 사용한 시료 모두가 thymine이었다. 또한 542번째 염기

Table 1. Nucleotide substitution positions in the mtDNA ND3 gene region of Korean chum salmon

Strain	Base substitution position				
	65	315	541	542	599
Chum salmon*	C	C	G	G	G
Korean 1	T	A	T	A	A
Korean 2	T	A	T	A	A
Korean 3	C	C	T	G	A
Korean 4	C	C	T	G	A

* Nucleotide sequences in GenBank of NCBI (Accession No. D84147).

는 GenBank에서는 guanine으로 K3, K4와 같은 결과이나, McKay와 본 실험의 K1, K2에서 adenine으로 나타났다. 이와 같은 결과는 SNP로서의 가능성을 시사하고 있으나, 4개체의 염기서열만을 비교한 결과이므로 본 결과를 토대로 더 많은 시료에 대한 분석이 필요하다고 생각된다.

아미노산서열 분석

정렬된 염기서열 중 ND3에 속하는 351 bp (282-632 bp) 염기를 아미노산서열로 정렬시켜 Fig. 4와 같이 나타내었다. 아미노산으로 번역되는 open reading frame (ORF)은 1번째 위치에 methionine (Met)을 지정하는 ATG 개시코돈을 시작으로 TAG 코돈을 종결코돈으로 116개의 아미노산으로 정렬되었다. Fig. 3과 같이 116개의 아미노산 중 1곳에서 전환에 의한 아미노산 치환(+)이 일어났고 2곳에서 전이에 의한 아미노산 치환(*)이 일어났다.

전환에 의해 아미노산이 바뀐 위치는 12번째 아미노산으로 K1과 K2에서 ATC로 나타나 isoleucine (Ile, I)인 아미노산이 K3와 K4에서는 첫 번째 염기가 전환되어 CTC인 leucine (Leu, L)으로 치환되었다. 전이에 의해 치환이 일어난 위치는 18번째 아미노산에서 K1, K3, K4에서 Leu (CTA)으로 정렬되었으나 K2에서는 두 번째 염기인 T가 치환되어 CCA인 proline (Pro, P)으로 바뀌어 아미노산 치환이 일어났으며, 48번째 아미노산에서는 K1, K3, K4에서 GCC인 alanine (Ala, A)으로 정렬되었으나, K2에서는 두 번째 염기가 치환된 GTC인 valine (Val, V)으로 변환되어 아미노산 치환이 일어났다. 또한 염기서열에서는 전이가 일어났으나 아미노산서열에는 변화가 나타나지 않은 2곳의 아미노산이 발견되었다. 45번째 아미노산에서는 K1, K2, K3에서 CTA인 코돈이 관찰되었고 K4에서는 첫 번째 염기에 전이가 일어난 TTA인 코돈이 관찰되었으나, 아미노산서열에서는 두 코돈 모두 Leu으로 아미노산의 치환이 발견되지 않았다. 마찬가지로 87번째 아미노산은 K1과 K2에서 CTA인 코돈이 관찰되었고 K3와 K4에서는 3번째 염기가 치환된 CTG 코돈이 관찰되었으나, 아미노산서열에서 두 코돈 모두 Leu으로 관찰되어 아미노산서열에는 변화가

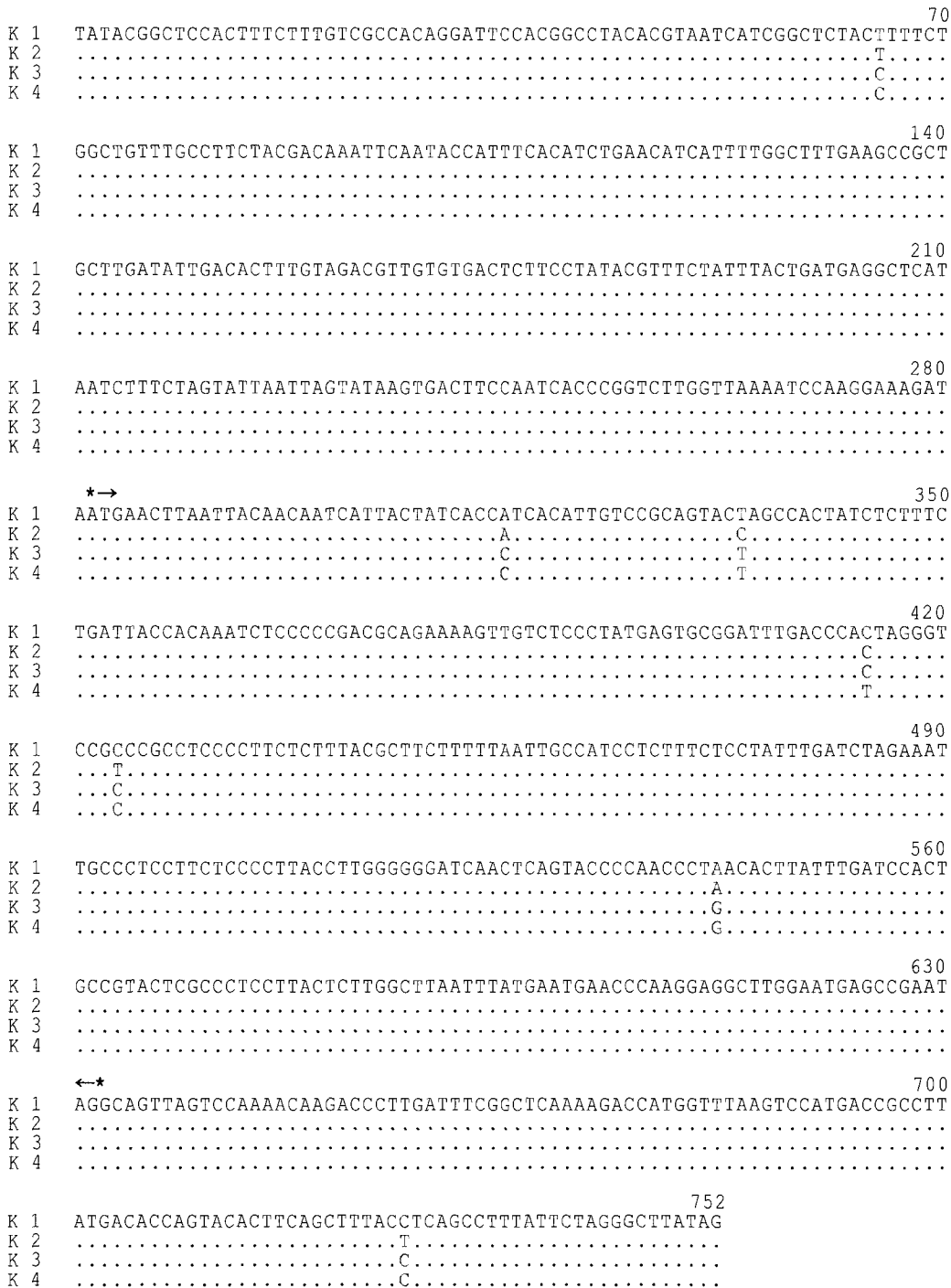


Fig. 2. Alignment of nucleotide sequences of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 gene region from Korean chum salmons. Dots correspond to identical nucleotides and the positions of base substitutions are show gray boxes. K 1-K 4: individuals from Korean salmons. *ND3 gene.

없었다. 또한 한국산 연어 4개체와 GenPept에 등록된 연어의 ND3 영역의 아미노산서열 (BAA20155)과 비교해 본 결과, Table 2에 표시한 4곳의 위치에서 아미노산 치환이 발견되었다. 12번째 위치에서 K3와 K4는 leucine으로 치환이 일어났고, 18번째 위치에서는 모두 Leu이 관찰되었으나 K2에서만 proline으로 아미노산 치환이 일어났으며, 48번째 위치에서는 K2에서만 valine으로 치환이 일어났다. 그러나

```

                                +          *          25
K 1      M N L I T T I I T I T I T L S A V L A T I S F W L
K 2      M N L I T T I I T I T I T L S A V P A T I S F W L
K 3      M N L I T T I I T I T L T L S A V L A T I S F W L
K 4      M N L I T T I I T I T L T L S A V L A T I S F W L
0
K 1      P Q I S P D A E K L S P Y E C G F D P L G S A R L      * 50
K 2      P Q I S P D A E K L S P Y E C G F D P L G S V R L
K 3      P Q I S P D A E K L S P Y E C G F D P L G S A R L
K 4      P Q I S P D A E K L S P Y E C G F D P L G S A R L
75
K 1      P F S L R F F L I A I L F L L F D L E I A L L L P
K 2      P F S L R F F L I A I L F L L F D L E I A L L L P
K 3      P F S L R F F L I A I L F L L F D L E I A L L L P
K 4      P F S L R F F L I A I L F L L F D L E I A L L L P
100
K 1      L P W G D Q L S T P T L T L I W S T A V L A L L T
K 2      L P W G D Q L S T P T L T L I W S T A V L A L L T
K 3      L P W G D Q L S T P T L T L I W S T A V L A L L T
K 4      L P W G D Q L S T P T L T L I W S T A V L A L L T
116
K 1      L G L I Y E W T Q G G L E W A E
K 2      L G L I Y E W T Q G G L E W A E
K 3      L G L I Y E W T Q G G L E W A E
K 4      L G L I Y E W T Q G G L E W A E
    
```

Fig. 3. Deduced amino acid sequences of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 gene from Korean chum salmon. +: amino acid substitution by transversion, *: amino acid substitution by transition, []: positions of base substitutions.

```

                                540          560
GenBank      TCAACTCAGTACCCCAACCCGGACACTTATTTGATCCACT
McKay      .....TA.....
K1, K2      .....TA.....
K3, K4      .....TG.....
    
```

Fig. 4. Variation site DNA sequence of the mitochondrial ND3 gene.

Notes: GenBank-Accession No. D84147; McKay et al.(1996); The present study - (K1, K2), (K3, K4).

Table 2. Comparison of amino acid sequences of ND3 from Korean chum salmon

Strain	Amino acid Substitution Position			
	12	18	48	87
Chum salmon*	I	L	A	R
Korean 1	I	L	A	L
Korean 2	I	P	V	L
Korean 3	L	L	A	L
Korean 4	L	L	A	L

* Amino acid sequence of chum salmon ND3 in GenPept of NCBI (Accession No.: BAA20155).

특이적으로 87번째 위치에서의 아미노산은 GenPept에 등록된 아미노산서열에서는 arginine으로 나타났으나, 본 실험의 결과에서는 상이하게 4개체에서 모두 Leu으로 관찰되어 전체 시료에서 아미노산 치환이 관찰되었다. 전체 비교에 있어서 아미노산 서열은 K3와 K4가 동일한 서열로 관찰되어 아미노산서열은 대표적으로 K1, K2, K3인 3가지 형태로 나타났다.

미토콘드리아 DNA는 인트론이 포함되어 있지 않고, 유전암호가 변칙적이며 세포질에서는 읽혀지지만, 미토콘드리아 DNA에서는 읽혀지지 않는 경우가 있다. 또한 특이적

으로 미토콘드리아의 유전암호가 핵에서와는 다르게 변칙적으로 해독되며, 특히 정지코돈이 불안정하다. 사람이나 쥐의 경우, 핵 DNA에서는 isoleucine으로 읽혀지는 ATA가 개시코돈인 methionine으로 이용되고 정지코돈인 TGA가 미토콘드리아 DNA에서는 tryptophan으로 읽혀지며, arginine인 AGA와 AGG 코돈이 종결코돈으로 사용되는 등 핵 DNA와는 상이한 현상이 나타난다. 그러나 이들의 변이성은 소위 생물의 미토콘드리아 DNA에 공통적으로 나타나는 것이 아니라, 생물 종에 따라 다르게 나타난다고 한다. 본 실험에서 염기서열을 아미노산 서열로 정렬시킨 결과, 정지코돈으로 읽혀지는 TGA 코돈이 tryptophan으로 읽혀진 경우가 24번, 91번, 107번 그리고 114번의 4 위치에서 관찰되었다. 이러한 결과는 사람이나 쥐의 경우와 마찬가지로 해독된다는 것을 알 수 있었다.

ND3 영역에서의 염기와 아미노산 변이를 조사하였을 때 한국산 연어 4개체간에 있어서는 유전적 변이가 일어남을 알 수 있었다. 그러나 이 영역에서 일어난 변이만을 기준으로 결론을 내리기에는 많은 오류의 가능성이 있으므로 좀더 명확한 검증을 위해 다른 미토콘드리아 영역을 이용한 연구를 함께 병행하고, 앞으로 더 많은 시료의 분석이 필요하다고 사료된다. 그러나 본 실험에서는 우리나라 동해안

으로 회귀한 연어의 미토콘드리아 ND3 유전자 영역을 클로닝하여 그 염기서열을 결정하여 비교함으로써 유전적 다양성 연구의 기초 자료로 활용할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발과제사업비 일부 지원과 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원 연구센터의 연구비 일부지원에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Brown, W.M., J.R. George and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1969-1971.
- Brown, W.M., E.M. Prager, A. Wang and A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. J. Mol. Evol., 18, 225-239.
- Domanico, M.J. and R.B. Phillips. 1995. Phylogenetic analysis of Pacific Salmon (Genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. Mol. Phylo. Evol., 4, 366-371.
- Hong, K.P., J.G. Myoung, J.K. Son and C.W. Park. 1994. A biochemical study for the development of genetic marker on Salmonids in Korea. J. Kor. Fish. Soc., 27(1), 83-88.
- Hwang, G.L., Y.C. Lee and C.S. Chang. 1997. Mitochondrial DNA analysis of the Fleishy Prawn (*Penaeus chinensis*) for stock discrimination in the Yellow Sea. J. Kor. Fish. Soc., 30(1), 88-94.
- Kim, S.H., M.S. Park, Y.H. Kim and D.W. Park. 1997. Genetic analysis of mitochondrial DNA from Korea Oysters, *Crassostrea gigas*. J. Kor. Fish. Soc., 30(5), 804-808.
- Kim, I.S., B.Y. Min, M.H. Yoon and D.H. Kim. 1999. Mitochondrial DNA polymorphism of the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) species complex on the East Coast of Korea. Kor. J. Life Sci., 9(3), 262-267.
- Lee, H.J., J.Y. Park, J.H. Lee, K.S. Min, I.G. Jeon, M.A. Yoo and W.H. Lee. 2000. Phylogeny of the subfamily Salmoninae distributed in Korea based upon nucleotide sequences of mitochondrial ribosomal RNA genes. J. Kor. Fish. Soc., 33(2), 103-109.
- McKay, S.J., R.H. Devlin and M.J. Smith. 1996. Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53, 1165-1176.
- McKay, S.J., M.J. Smith and R.H. Devlin. 1997. Polymerase chain reaction-based species identification of salmon and coastal trout in British Columbia. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 6, 131-140.
- Park, J.Y. and Y. Kim. 1995. The number of nucleotide substitutions per sites of mitochondrial DNA in the four Pleuronectid species. J. Kor. Fish. Soc., 28(5), 649-658.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 545 pp.
- Verspoor, E., E.M. McCarthy and D. Knox. 1999. The phylogeography of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16sRNA region of the mtDNA. Bio. J. Lin. Soc., 68, 129-146.

2002년 3월 29일 접수

2003년 3월 27일 수리