

## 실고기목 어류 (Syngnathiformes)의 분자계통학적 분류

고범석 · 송춘복\*  
제주대학교 해양과학부 해양생물공학과

### Molecular Phylogeny of Syngnathiformes Fishes Inferred from Mitochondrial Cytochrome *b* DNA Sequences

Beom Seok KOH and Choon Bok SONG\*

Department of Marine Biotechnology, College of Ocean Science, Cheju National University,  
Jeju 690-756, Korea

The previous morphology-based taxonomic frameworks within the family Syngnathidae had emphasized the significance of the male brood pouch and reproductive biology in defining the group. However, several different hypotheses had been proposed by different investigators. This study has been carried out to determine the phylogenetic relationships among 19 species belonging to the order Syngnathiformes with three Gasterosteiformes species as outgroup taxa by using the mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. Phylogenetic analyses based on neighbor-joining distance, maximum parsimony, minimum evolution and maximum likelihood method strongly supported that the family Syngnathidae, the suborder Syngnathoidae and the order Syngnathiformes were all monophyletic group. Although much of previous morphological analyses were supported by our molecular data, there were some significant discrepancies between molecular and morphological work. Such an interesting result was that the weedy seadragon (*Phyllopteryx taeniolatus*) strongly grouped together with the New Zealand pot-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*). Considering the markedly different brooding structure between them, this unexpected result might be explained whether by multiple independent origins of brooding structure or by hybridization between the female *Hippocampus* and other syngnathid species having individual membranous egg compartment. In addition, the suborder Aulostomoidei was paraphyletic group because the shrimpfish (*Aeliscus strigatus*), belonging to the family Centriscidae, always grouped together with the family Syngnathidae as a sister taxon.

Key words: Molecular phylogeny, Syngnathiformes, Cytochrome *b* DNA sequence

#### 서 론

실고기어류 (Syngnathids)는 실고기 (pipefish), 해마 (seahorse) 그리고 해룡 (seadragon)을 포함하고 있으며, 대서양, 인도양, 태평양 등지의 열대성, 온대성 해역에 널리 분포하고 있다 (Kendrick and Hyndes, 2002; Kuitert, 2000). 이들은 분류학적으로 실고기과 (Syngnathidae)에 속하며, 실고기과에는 4아과 (subfamily), 53속 (genus), 약 336종 (species)의 어류가 포함되어 있다 (Lourie, 1999).

실고기과 (Family Syngnathidae)에 속하는 어류의 초기분류는 수컷의 보육낭의 위치와 발달 정도에 따라서 행해졌으며 (Duncker, 1915; Herald, 1959), 보육낭의 위치에 따라 Subfamily Urophori와 Subfamily Gastrophori로 구분하였다 (Herald, 1959). 즉, 보육낭의 발달 정도, 부화 시 알의 노출 유무 등을 기준으로 보다 세분하여 약 300종으로 분류하였다 (Dawson, 1985; Wootton, 1992). 최근에는 실고기과를 4개의 아과로 구분하고 있다 (Kuitert, 2000). 즉, 선형의 체형에 꼬리지느러미가 작으며, 단순한 구조의 보육낭을 갖는 실고기아과

(Syngnathinae), 꼬리지느러미가 없고, 단순한 구조의 보육낭을 갖는 Solegnathinae, 판과 같은 형태의 큰 꼬리지느러미를 갖고, 단순한 구조의 보육낭을 갖는 Doryrhamphinae, 그리고 꼬리지느러미가 없으며, 발달된 구조의 보육낭을 갖는 해마아과 (Hippocampinae)이다.

그러나, 실고기과에 포함되는 해마아과 (Hippocampinae) 어류의 경우, 일반적으로 어류의 형태학적인 분류에 사용되는 꼬리지느러미 혹은 배지느러미와 같은 형태 형질을 갖고 있지 않고, 종 내에서도 서식처에 따라서 형태나 체색의 변이가 심하기 때문에 형태학적인 분류가 애매한 (cryptic) 종들이 새로운 종으로 분류되는 경우가 많아서, 약 100종 이상으로 보고되었으나 (Knowlton, 1993; Eschmeyer, 1998), Lourie et al. (1999)은 확실하게 인정되는 종 (species)만을 포함시켜 약 32종으로 개정하였다.

이러한 형태학적 분류의 한계를 해결하기 위하여 다수의 학자들은 유전적 접근에 관심을 갖게 되었다 (Arnaud et al., 1999; Bowen et al., 2001; Colborn et al., 2001). Kocher et al. (1989)이 cytochrome *b* 유전자의 일부분을 PCR (중합효소연쇄

\*Corresponding author: cbsong@cheju.ac.kr

반응)을 통해 성공적으로 증폭한 이후, 계통분류학적 연구에 있어서 cytochrome *b* 유전자의 염기서열을 이용한 연구가 폭발적으로 증가하였다. 미토콘드리아의 cytochrome *b* 유전자가 갖고 있는 여러 가지 유리한 점들 때문에, 많은 연구자들이 어류 진화의 다양한 문제를 연구하기 위하여 이용해 왔다 (Allegrucci et al., 1999; Korcher and Stepien, 1997; Song et al., 1998). 이 유전자는 아마도 현재까지 척추동물에서 가장 광범위하게 염기서열이 알려진 유전자이며 (Irwin et al., 1991; Johns and Avise, 1998), 그 단백질 산물은 구조와 기능 및 진화의 측면에서 가장 잘 연구된 분자들 중의 하나이다 (Esposti et al., 1993).

Cytochrome *b* 유전자를 이용한 실고기목 어류의 계통분류로는 해마속 (*Hippocampus*)내의 중간 유연관계에 관한 연구들이 있으며 (Casey, 1999; Peter et al., 2004), 그 외에도 12S rRNA이나 16S rRNA 유전자를 이용한 연구 역시 이루어져 왔다 (Wilson et al., 2001).

이 연구는 어류 가운데 가장 형태학적으로 특이하게 분화되어서 분류가 모호한 실고기목 어류를 대상으로 그들의 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자 염기서열 자료를 이용하여 계통분류학적인 유연관계를 밝힘으로써 실고기목 어류의 분류체계를 재조명하고, 궁극적으로 이들의 외부 형태, 산란 형태 및 생식 기관의 진화 과정을 이해할 목적으로 수행하였다.

## 재료 및 방법

### Total DNA 추출과 PCR 증폭

실험에 사용한 시료들의 분류학적인 위치는 Table 1과 같다. 이들 실험 재료의 동정은 Kuitert (2000)의 지침을 참고하여 종 수준까지 동정하였다. 이들 시료로부터 total DNA 추출은 액체질소에 신속하게 냉동시켜 -80°C에 보관된 30-50 mg의 간이나 기저 근육조직을 대상으로 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc.)를 사용하여 실시하였다. DNA의 농도는 분광광도계(HeLios  $\beta$ , Unicam Ltd., UK)를 이용하여 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 확인하였다. PCR 증폭은 cytochrome *b* 유전자의 주변부 tRNA 서열에 기초하여 디자인된 forward primer (Glu-F1, 5'-CCA CCG TTG T(T/C)(G/A) TTC AAC TAC-3')과 reverse primer (Thr-R1, 5'-CCG (G/A)(T/C)T TAC AAG A(T/C)(T/C) GGC GTT C-3')을 사용하여 PCR 증폭을 함으로써 각 말단 부위 근처의 tRNA 부위를 포함한 전체 cytochrome *b* 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 약 0.1-0.3  $\mu$ g의 genomic DNA, 10  $\mu$ L; 50  $\mu$ M primers (forward primer, Glu-F1과 reverse primer, Thr-R1), 각각 1  $\mu$ L; 10x reaction buffer, 5  $\mu$ L; 2.5 mM dNTP, 5  $\mu$ L; *pfu* polymerase (Stratagene), 1-2 unit를 넣은 다음, 초순수를 이용하여 최종 volume이 50  $\mu$ L가 되도록 하였다. PCR 반응시 반응물의 증발을 막기 위해 1-2 방울의 mineral oil을 첨가하여, Programmable Thermo

Table 1. List of the order Syngnathiformes species and outgroup taxa examined

| Species Name (Abbreviated name)               | Order             | Suborder      | Family         | GenBank Accession No. |
|---|-------------------|---------------|----------------|-----------------------|
| <i>Syngnathus schlegeli</i> (S_sch)           | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY786429              |
| <i>Syngnathus acus</i> (S_acu*)               | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF356073              |
| <i>Syngnathus leptorhynchus</i> (S_lep*)      | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF356064              |
| <i>Syngnathus louisianae</i> (S_lou*)         | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF356070              |
| <i>Syngnathus scovelli</i> (S_sco*)           | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF356068              |
| <i>Corythoichthys haematopterus</i> (C_hae 1) | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY787229              |
| <i>Corythoichthys haematopterus</i> (C_hae 2) | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY787230              |
| <i>Corythoichthys intestinalis</i> (C_int*)   | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF356052              |
| <i>Hippocampus histrix</i> (H_his 1)          | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY787227              |
| <i>Hippocampus histrix</i> (H_his 2)          | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY787228              |
| <i>Hippocampus ingens</i> (H_ing)             | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY786430              |
| <i>Hippocampus abdominalis</i> (H_abd*)       | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF192641              |
| <i>Hippocampus kuda</i> (H_kud)               | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY786431              |
| <i>Hippocampus erectus</i> (H_ere*)           | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF192662              |
| <i>Hippocampus kelloggi</i> (H_kel*)          | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AF192678              |
| <i>Syngnathoides biaculeatus</i> (S_bia)      | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY786432              |
| <i>Dunckerocampus dactylophorus</i> (D_dac)   | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY787231              |
| <i>Phyllopteryx taeniolatus</i> (P_tae)       | Syngnathiformes   | Syngnathoidei | Syngnathidae   | AY787226              |
| <i>Aulostomus chinensis</i> (A_chi)           | Syngnathiformes   | Aulostomoidei | Aulostomidae   | AY786433              |
| <i>Aeoliscus strigatus</i> (A_str)            | Syngnathiformes   | Aulostomoidei | Centriscidae   | AY786434              |
| <i>Fistularia commersonii</i> (F_com)         | Syngnathiformes   | Aulostomoidei | Fistulariidae  | AY786435              |
| † <i>Gasterosteus aculeatus</i> (G_acu)       | Gasterosteiformes |               | Gasterosteidae | AY787224              |
| † <i>Gasterosteus wheatlandi</i> (G_whe*)     | Gasterosteiformes |               | Gasterosteidae | AF356078              |
| † <i>Pungitius kaibarae</i> (P_kai)           | Gasterosteiformes |               | Gasterosteidae | AY787225              |

\*The cytochrome *b* sequences reported by Wilson (2001) and Casey (1999).

†Outgroup taxa selected in the order Gasterosteiformes.

Controller (RTC-100, MJ Research Inc.)에서 반응시켰다. PCR 반응주기는 최초의 denaturing step을 위하여 94°C에서 2분 동안 1회 반응시키고, 이어서 94°C에서 45초, primer annealing을 위해 43°C에서 1분, primer extension을 위해 72°C에서 1분 30초의 반응 조건에서 총 30회의 반복 주기를 주었고, 최종적으로 72°C에서 7분 동안 마지막 extension을 실시하였다.

PCR산물은 1×TBE buffer에서 0.8% agarose gel 상에 전기영동하여 확인하였다. 순수 정제를 위해 PCR 산물을 low-melt gel (LMP agarose, Bothesda Research Laboratories; ethidium bromide staining) 상에서 전기영동을 한 후, 예상되는 DNA 단편을 UV-lamp 하에서 잘라내어 GeneClean II Kit (Bio 101 Inc.)를 사용하여 정제하였다.

PCR 산물의 Cloning

PCR 산물의 cloning을 위한 숙주와 벡터로서 각각 대장균의 DH5α 균주와 pBluescript II SK(-) (Stratagene Co.)를 사용하였다. pBluescript II SK(-) 벡터는 37°C에서 2시간 동안 제한효소 Hinc II를 이용하여 절단한 후에, High pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals)로 정제하였다. Ligation은 Hinc II로 절단된 1 μL의 pBluescript II SK(-) 벡터, 2 μL의 insert DNA, 1 μL의 10x ligation buffer와 1 unit의 T4 DNA ligase (Promega Co.)를 넣고, 최종 volume 10 μL가 되도록 한 후에 15°C에서 18시간 동안 반응시켰다. Ligation된 산물을 DH5α competent cell과 섞고, 42°C에서 1분 30초 동안 heat shock을 가한 후에, 37°C 항온교반기(shaking incubator)에서 30분 동안 배양하였다. 형질 전환시킨 DH5α 균주들을 ampicillin, X-gal과 IPTG를 포함한 LB (Luria-Bertani) plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 그 후 배지에서 white colony를 선별하여 ampicillin이 들어있는 LB broth 배지에 접종하고 37°C 항온교반기에서 16시간 배양한 후, High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA는 제한효소 절단을 통하여 cloning의 성공 여부를 확인하였다.

염기서열 결정 및 자료 분석

염기서열 결정은 cloning을 통해 얻은 재조합 plasmid DNA를 sequencing 전문업체에 의뢰하여 수행하였으며 sequencing primer는 T7과 SK를 사용하였다. 이를 통해 얻은 염기서열 자료를 GenBank에 제출하였으며 그들의 Accession No.는 Table 1에 나타내었다. 이들 염기서열의 정렬을 위하여 DNAssist version 2.2 (Pattern and Graves, 2000) 프로그램을 이용하였으며, 염기조성, 염기치환 양상 및 codon usage를 알아보기 위하여 MEGA version 2.0 (Kumar et al., 2001) 프로그램을 사용하였다. 그리고, 각 codon 위치에서 p distance values에 대한 transition과 transversion의 수를 plotting함으로써 포화도 (level of saturation)를 추정하였다. 계통진화분석 시 한 개의 염기에서 두 번 이상의 돌연변이 (mutation)가 일어남으로써 생기는 포화 현상은 분석 오류 유발할 수 있기 때문에, 모든

분석은 전체 1,140 bp의 염기 중 첫 번째와 두 번째 codon 위치의 염기 서열인 760 bp를 대상으로 실시하였다 (Nei and Kumar, 2000).

계통유전학적인 분석은 maximum parsimony, distance, maximum likelihood method로 실시하였다. Maximum parsimony method (Fitch, 1971; MP)를 이용한 분석과 maximum likelihood method (Felsenstein, 1985; ML)를 통한 분석은 프로그램 PAUP version 4.0b8 (Swofford, 1998)을 사용하였다. Distance tree는 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987; NJ)과 minimum evolution (ME)의 tree-building algorithm으로 작성되었다. NJ 방법과 ML 방법을 이용한 분석은 MODELTEST Version 3.06 (Posada and Crandall, 1998) 프로그램을 사용하여 분석 자료에 가장 적합한 evolution model 선택하여 실시하였다. 그리고, ME 방법에 의한 분석 시에는 LogDet/paralinear distance를 사용하였다. 계통수의 극성을 결정하기 위한 참조 분류군 (outgroup)으로 큰가시고기목 (Gasterosteiformes)에 속해있는 *Gasterosteus aculeatus*, *Gasterosteus wheatlandi* 그리고 *Pungitius sinensis*를 사용하였다. 그리고, MP, ME, NJ 방법을 이용한 분석 결과 계통수에 생성된 각각의 internal node에 대한 신뢰성을 통계적으로 확인하기 위하여, 1,000회의 bootstrapping 통계검증 (Felsenstein, 1985)을 수행하고, 이 결과에 따라 50% majority-rule consensus tree를 작성하였다. ML 방법에 의한 분석 시 likelihood 조건은 empirical base composition과 transition/transversion 비율을 사용하였으며, 선택된 HYK85+G+I evolution model (Table 2)을 사용하여 실시하였다.

Table 2. Result of hirerarchical likelihood ratio test for phylogenetic model implemented by MODELTEST version 3.06 (Posada and Crandall, 1998)

| Model                | -ln (likelihood) | Gamma (G) | Proportion of invariable site (I) |
|----------------------|------------------|-----------|-----------------------------------|
| JC                   | 3894.8748        |           |                                   |
| F81                  | 3868.0444        |           |                                   |
| HYK                  | 3746.6970        |           |                                   |
| HYK+G                | 3476.0383        |           |                                   |
| HYK+G+I <sup>1</sup> | 3461.6780        | 0.5357    | 0.5084                            |

<sup>1</sup>Selected model of evolution (P<0.01).

결 과

염기서열 변이와 염기 조성 편차

실고기어류 (Syngnathids)의 분자계통분석을 위해 사용된 22종으로부터 24개의 cytochrome b 유전자의 완전한 염기서열을 다중정렬 (multiple alignment)하였다. 정렬된 24개의 cytochrome b 유전자들은 모두 1,140 bp의 염기로 이루어져 있으며, 615개의 variable sites와 520개의 parsimony informative sites를 포함하고 있었다. 예상했던 것처럼, 세 번째 codon 위치들이 첫 번째 혹은 두 번째 codon 위치들 보다 변이가 더 심하였다. Cytochrome b 유전자들로부터 추정되는 변역

산물은 380개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이 유전자들의 번역은 ATG 개시codon으로 시작되어 TAA 혹은 AGA stop codon으로 종결되는 것으로 추정되었다. 번역의 종결을 위한 transcriptional processing과 polyadenylation 모델(Anderson et al., 1981)에 근거한 이러한 가설은 이들 cytochrome *b* 유전자들의 전사물들이 U 혹은 AG로 끝나며 이들은 전사 후 번역 전의 polyadenylation 과정에서 stop codon (UAA 혹은 AGA)으로 가공되는 것으로 추정하고 있다.

한편, cytochrome *b* 유전자의 염기서열에 있어서 염기 조성 편차를 Table 3에 나타내었다. 이들 24종의 cytochrome *b* 유전자들이 현재까지 연구된 다른 척추 동물들 처럼 불균등한 염기조성을 가지고 있다는 것을 보여주고 있다. 즉, 전체적으로 낮은 G (Guanine, 15.9%) 염기조성과 거의 균일한 나머지 T (Thymine, 30.0%), C (Cytosine, 28.2%) 및 A (Adenine, 25.9%)의 염기조성을 보여주고 있다. 특히 지금까지 어류를 대상으로 한 보고들 (Meyer, 1993; Cantatore et al., 1994; Song et al., 1998; Allegrucci et al., 1999)과 유사하게 첫 번째 codon 위치에서는 거의 균일한 염기조성을 보이는 반면에 두 번째와 세 번째 codon 위치들은 다른 염기들에 비하여 G 염기조성이

상대적으로 낮았다 (Table 3 참조). 또한 첫 번째 codon 위치에서 계산된 염기 조성 편차는 두 번째와 세 번째 codon 위치에서의 편차보다 훨씬 낮게 나타났다 (all, 0.12; first, 0.027; second, 0.215; third, 0.237). 이러한 경향은 Song et al. (1998)에 의해 연구된 Percids 어류들에서의 보고 (all, 0.139; first, 0.045; second, 0.217; third, 0.227)와 아주 유사하였다.

#### 포화도 분석

계통분석에 있어서 오류를 야기시킬 수 있는 염기서열의 포화 여부를 확인하기 위하여 모든 codon 위치, 첫 번째 codon 위치, 두 번째 codon 위치, 그리고 세 번째 codon 위치, 첫 번째와 두 번째 codon 위치에서 개별적으로 포화도 분석을 수행하였다. 분석된 codon 위치 대부분에서, transition이 transversion보다 빨리 축적되었으며, 세 번째 codon 위치에서 특히 transition mutation들이 포화되어 있다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1). 반면에 첫 번째와 두 번째 codon 위치에서의 transition과 transversion 변이의 축적은 *p*-distance가 증가함에 따라 거의 직선형으로 증가되어 뚜렷한 포화 현상을 관찰할 수 없었다. 따라서, 이러한 포화 현상이 계통관계의 추론에 있어서 오류를 야기시킬 수 있으므로 (Meyer, 1993) 첫 번째와

Table 3. Base composition at each codon position in the mitochondrial cytochrome *b* gene of Syngnathiformes fishes and outgroups

| Species           | Codon composition |      |      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |       |      |      |      |
|-------------------|-------------------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|
|                   | All               |      |      |      | 1st   |      |      |      | 2nd   |      |      |      | 3rd   |      |      |      |
|                   | T                 | C    | A    | G    | T1    | C1   | A1   | G1   | T2    | C2   | A2   | G2   | T3    | C3   | A3   | G3   |
| A_chi             | 26.8              | 33.9 | 22.2 | 17.1 | 23.2  | 27.6 | 22.1 | 27.1 | 40.5  | 25.5 | 19.5 | 14.5 | 16.6  | 48.7 | 25.0 | 9.7  |
| C_hae1            | 27.9              | 31.6 | 23.7 | 16.8 | 22.9  | 25.3 | 24.2 | 27.6 | 39.2  | 27.4 | 19.7 | 13.7 | 21.6  | 42.1 | 27.1 | 9.2  |
| D_dac             | 27.7              | 30.1 | 27.4 | 14.8 | 25.0  | 23.9 | 25.0 | 26.1 | 39.7  | 26.8 | 20.3 | 13.2 | 18.4  | 39.5 | 36.8 | 5.3  |
| G_acu             | 31.7              | 28.7 | 24.7 | 14.9 | 24.2  | 25.5 | 23.4 | 26.8 | 40.8  | 25.3 | 20.3 | 13.7 | 30.0  | 35.3 | 30.5 | 4.2  |
| H_his2            | 32.7              | 23.4 | 28.5 | 15.4 | 28.7  | 20.0 | 23.7 | 27.6 | 40.0  | 25.8 | 20.8 | 13.4 | 29.5  | 24.5 | 41.1 | 5.0  |
| H_ing             | 32.4              | 24.2 | 28.5 | 14.9 | 28.2  | 20.5 | 23.7 | 27.6 | 39.7  | 26.1 | 20.8 | 13.4 | 29.2  | 26.1 | 41.1 | 3.7  |
| H_his1            | 32.5              | 23.6 | 28.6 | 15.3 | 28.4  | 20.3 | 23.9 | 27.4 | 39.7  | 26.1 | 20.8 | 13.4 | 29.5  | 24.5 | 41.1 | 5.0  |
| S_bia             | 30.4              | 28.4 | 25.3 | 16.0 | 25.0  | 22.4 | 25.8 | 26.8 | 40.0  | 26.3 | 20.5 | 13.2 | 26.1  | 36.6 | 29.5 | 7.9  |
| S_sch             | 30.1              | 28.2 | 25.6 | 16.1 | 25.3  | 21.8 | 26.1 | 26.8 | 39.7  | 25.5 | 20.8 | 13.9 | 25.3  | 37.1 | 30.0 | 7.6  |
| S_acu             | 28.8              | 29.3 | 26.0 | 16.0 | 23.9  | 23.7 | 25.5 | 26.8 | 39.7  | 26.1 | 20.3 | 13.9 | 22.6  | 38.2 | 32.1 | 7.1  |
| S_lep             | 33.5              | 24.5 | 26.5 | 15.5 | 25.0  | 22.6 | 25.5 | 26.8 | 40.3  | 25.5 | 20.3 | 13.9 | 35.3  | 25.3 | 33.7 | 5.8  |
| S_lou             | 28.9              | 29.2 | 25.0 | 16.9 | 25.0  | 22.1 | 25.3 | 27.6 | 39.2  | 26.3 | 20.0 | 14.5 | 22.4  | 39.2 | 29.7 | 8.7  |
| S_sco             | 29.3              | 28.8 | 25.9 | 16.1 | 23.9  | 25.0 | 24.2 | 26.8 | 40.0  | 25.8 | 19.7 | 14.5 | 23.9  | 35.5 | 33.7 | 6.8  |
| C_int             | 27.9              | 31.6 | 23.6 | 16.9 | 22.9  | 25.5 | 23.9 | 27.6 | 39.2  | 27.4 | 19.7 | 13.7 | 21.6  | 41.8 | 27.1 | 9.5  |
| H_abd             | 31.1              | 25.3 | 27.0 | 16.6 | 26.3  | 22.1 | 24.2 | 27.4 | 38.9  | 26.8 | 20.8 | 13.4 | 28.2  | 26.8 | 36.1 | 8.9  |
| H_kud             | 31.8              | 24.2 | 28.8 | 15.2 | 26.6  | 21.6 | 24.5 | 27.4 | 40.5  | 25.5 | 20.8 | 13.2 | 28.4  | 25.5 | 41.1 | 5.0  |
| H_ere             | 30.6              | 26.0 | 28.4 | 15.0 | 24.5  | 23.9 | 24.7 | 26.8 | 40.5  | 25.5 | 20.8 | 13.2 | 26.8  | 28.4 | 19.7 | 5.0  |
| H_kel             | 31.1              | 25.8 | 27.8 | 15.4 | 26.1  | 22.4 | 25.5 | 26.1 | 40.3  | 25.8 | 20.5 | 13.4 | 26.8  | 29.2 | 37.4 | 6.6  |
| C_hae2            | 28.7              | 31.3 | 23.2 | 16.8 | 23.9  | 24.7 | 23.9 | 27.4 | 39.2  | 28.2 | 18.9 | 13.7 | 22.9  | 41.1 | 26.6 | 9.5  |
| P_tae             | 31.4              | 25.0 | 27.1 | 16.4 | 26.3  | 22.4 | 24.2 | 27.1 | 39.6  | 26.1 | 20.8 | 13.5 | 28.4  | 26.6 | 36.3 | 8.7  |
| P_kai             | 28.7              | 30.1 | 26.1 | 15.1 | 23.9  | 25.8 | 23.9 | 26.3 | 40.5  | 25.3 | 20.8 | 13.4 | 21.6  | 39.2 | 33.7 | 5.5  |
| A_str             | 29.1              | 30.9 | 23.9 | 16.1 | 24.2  | 26.3 | 23.2 | 26.3 | 40.5  | 27.1 | 19.7 | 12.6 | 22.6  | 39.2 | 28.9 | 9.2  |
| G_whe             | 31.8              | 27.8 | 25.2 | 15.3 | 24.2  | 25.3 | 23.9 | 26.6 | 40.8  | 25.3 | 20.3 | 13.7 | 30.3  | 32.9 | 31.3 | 5.5  |
| F_com             | 26.4              | 33.5 | 22.5 | 17.6 | 22.4  | 27.1 | 23.4 | 27.1 | 40.3  | 26.6 | 20.0 | 13.2 | 16.6  | 46.8 | 23.9 | 12.6 |
| Mean              | 30.0              | 28.2 | 25.9 | 15.9 | 25.0  | 23.7 | 24.3 | 27.0 | 40.0  | 26.2 | 20.3 | 13.5 | 25.2  | 34.5 | 33.1 | 7.2  |
| Bias <sup>1</sup> | 0.12              |      |      |      | 0.027 |      |      |      | 0.215 |      |      |      | 0.237 |      |      |      |

The frequencies are shown as percentages.

<sup>1</sup>Bias in base composition (Irwin et al., 1991) is calculated as  $C = (2/3) \sum_{i=1}^4 |C_i - 0.25|$ , where C is the compositional bias and  $C_i$  is the frequency of the *i*th base.

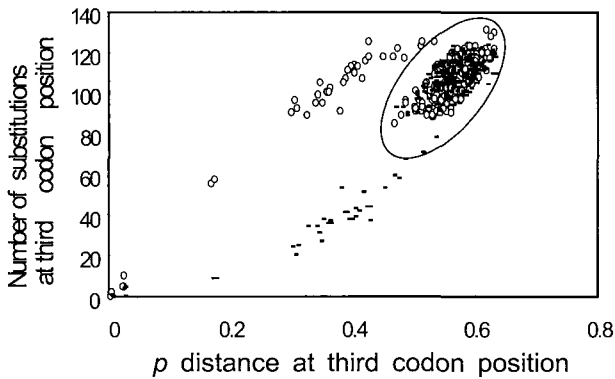


Fig. 1. Relationships of the observed number of transitions (open circles) and transversions (beelines) for all pairs of sequence to *p*-distance observed at third codon positions. Points enclosed in oval are comparisons between Syngnathiformes species and outgroups.

두 번째 codon 위치에서의 염기만을 대상으로 계통분석을 실시하였다.

계통분석

실고기목 어류의 19종과 분류참조군인 가시고기목 어류 3종으로부터 얻은 총 24개의 cytochrome *b* 유전자 염기 서열을 대상으로 MP (Maximum Parsimony), NJ (Neighbor-Joining), ME (Minimum Evolution), 그리고 ML (Maximum Likelihood) 방법으로 계통수를 작성하여 비교, 분석하였다. 먼저, 선정한 outgroup (참조분류군)의 적정성을 조사하기 위하여 outgroup option을 주지 않고 모든 어류를 대상으로 계통수 작성을 실시한 결과, 가시고기목 어류들은 실고기목 어류와 서로가 완전히 분리되어 각각의 단진화군을 이루고 있어서 outgroup은 ingroup에 속하지 않아야 한다는 outgroup의 기준에 합당한 것으로 나타났다. MP 방법을 이용하여 작성한 계통수 (Fig. 2)에서 3종의 참조분류군에 대해 실고기목 어류들이 단진화군을 이루고 있음을 확인하였다. 실고기속, 해마속, *Corythoichthys*속, *Dunckerocampus*속, 그리고 *Syngnathoides*속의 어류들이 각각의 그룹을 이루고 있으나, 기존 형태적 분류에 있어 Solegnathinae아과 내의 *Phyllopteryx*속으로 분류되는 weedy seadragon (*Phyllopteryx taeniolatus*)의 경우 해마속에 포함됨을 관찰할 수 있었다. 또한 *Dunckerocampus*속이 실고기과에 있어서 진화의 초기에 분화된 조상종으로 나타났으며 이는 93%의 높은 bootstrap값을 보였다. NJ 방법을 이용하여 작성된 계통수 (Fig. 3)에서 역시 실고기목 어류들이 단진화군을 이루고 있음을 알 수 있었다. 그리고, 이들은 대부분의 경우 아과 (subfamily) 내의 속 (genus)에 따라서 그룹을 형성하였으나, 이 계통수에서 역시 weedy seadragon의 계통 분류학적 위치는 해마아과 내의 해마속에 속하는 New Zealand pot-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*)와 100% bootstrap value를 보이며 강하게 그룹을 이루는 것을 확인하였다.

ME 방법에 의한 계통수 (Fig. 4)는 NJ 방법을 이용하여

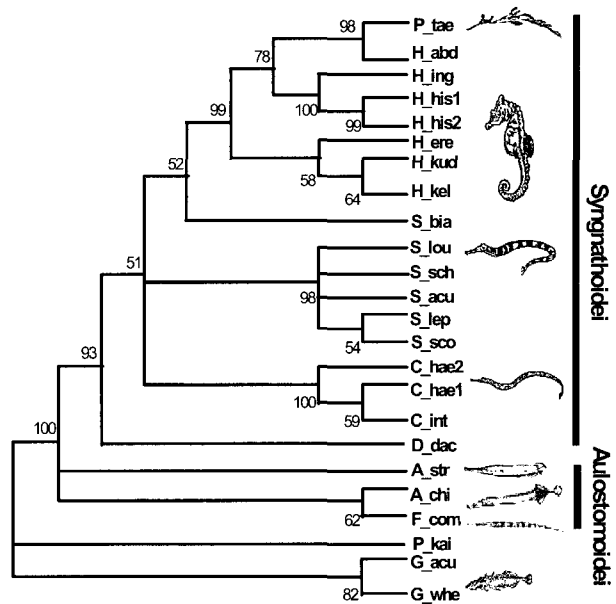


Fig. 2. 50% majority-rule consensus tree of 19 Syngnathiformes species recovered from cytochrome *b* sequences (parsimony-informative characters: 152) according to the MP method. Bootstrap values (heuristic search: 1,000 replications) are displayed over internal nodes.

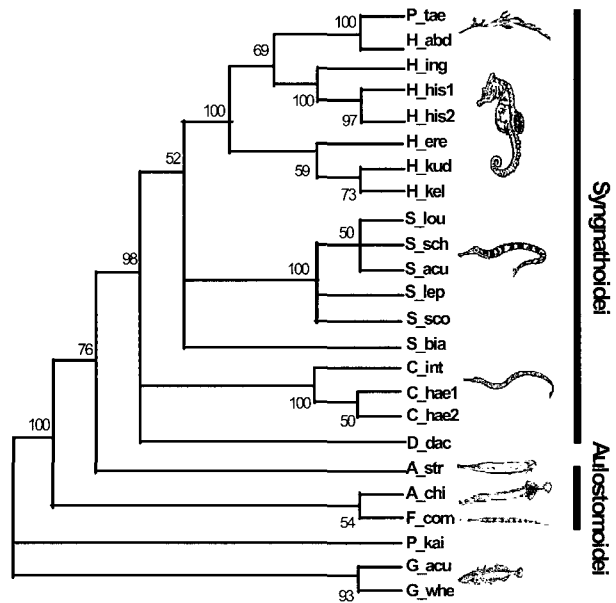


Fig. 3. 50% majority-rule consensus tree of 19 Syngnathiformes species recovered from cytochrome *b* sequences (760 bp) according to the NJ method - HYK85+I+G distance. Bootstrap values (1,000 replications) are displayed over internal nodes.

작성된 계통수에서 해마속과 실고기속, *Syngnathoides*속으로 나누어지는 분지에서의 52%의 낮은 bootstrap값을 고려한다면 서로 유사한 결과를 나타내었다. ML 방법을 통해 작성된

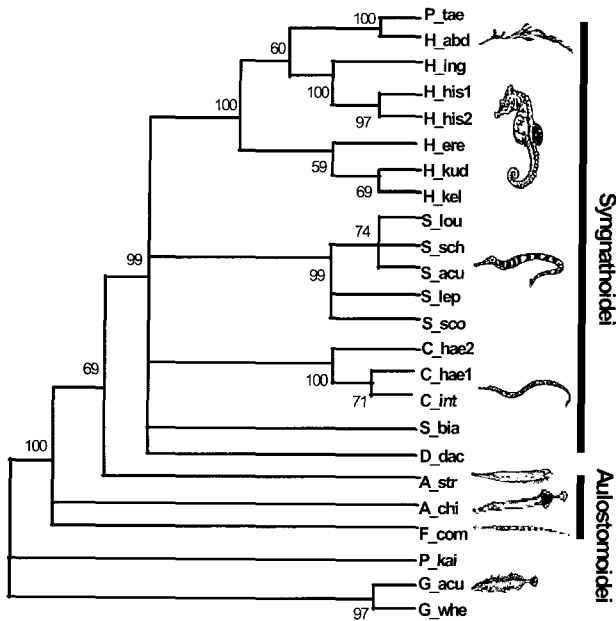


Fig. 4. 50% majority-rule consensus tree of 19 Syngnathiformes species recovered from cytochrome *b* sequences (760 bp) according to the ME method - LogDet/paralinear distance. Bootstrap values (1,000 replications) are displayed over internal nodes.

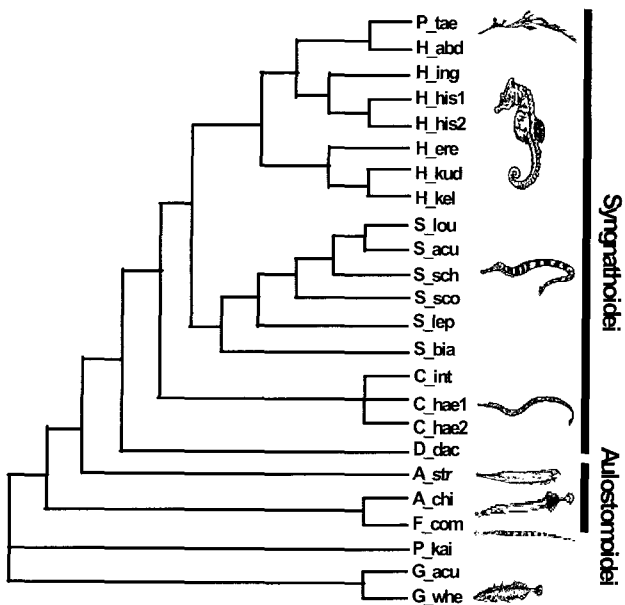


Fig. 5. Phylogenetic tree of 19 Syngnathiformes species recovered from cytochrome *b* sequences (760 bp) according to the ML method. Likelihood setting: transition/transversion ratio=3.0058, and assumed nucleotide frequencies= A(0.22309), C(0.24914), G(0.20297), T(0.32480).

계통수 (Fig. 5) 작성은 heuristic search 방법을 통해 실시하였으며 이 결과에서도 실고기목의 어류들이 단진화군 (monophyletic group)을 이루고 있었다. 또한, 다른 방법의 결과와 마찬가지로

지로 weedy seadragon은 해마속 (*Hippocampus*)과 가깝게 그룹을 이루었으며, 형태학적으로 weedy seadragon과 같은 아과 (Subfamily solegnathinae)에 포함되는 *Syngnathoides*속은 실고기아과 (Subfamily Syngnathinae)에 속하는 실고기속 (*Syngnathus*)의 자매분류군으로 나타났다. 이들 분석 모두에서 실고기목과 실고기아목으로 분류되는 어류들의 단진화성은 90% 이상의 bootstrap값에 의하여 통계학적으로 뒷받침되었다. 반면, 모든 분석에서 Family Centriscidae에 속한 shrimpfish (*Aeliscus strigatus*)가 Family Syngnathidae와 자매분류군 (sister group)을 이룸으로써 shrimpfish를 포함하고 있는 창고기아목 (Suborder Aulostomoidei)은 결여진화군 (paraphyletic group)으로 나타났다. 그러나, 몇몇 종을 제외하고는 현재의 형태학적 분류와 대부분 일치되는 결과를 보였다.

### 고찰

미토콘드리아 DNA (mtDNA, mitochondrial DNA)는 핵 DNA와 비교해 볼 때 일반적으로 빠르게 진화하는 것으로 밝혀져 있다. 그리고 이들은 모계유전을 하며 유전자 재조합이 거의 일어나지 않기 때문에 계통분류학적인 연구에 이용할 경우 많은 이점을 가지고 있다. 따라서, 최근의 염기서열 결정법의 개선과 더불어 동물 mtDNA는 다양한 수준의 계통분류학적 문제를 해결하기 위해서 이용되고 있다. 또한, cytochrome *b* 유전자는 어류의 개체군 연구에서부터 과 (family)간의 유연관계와 같은 상위 분류 단계까지 분석하는데 이용되고 있다(Kocher and Stepien, 1997). Song et al. (1998)은 cytochrome *b* 유전자의 염기서열을 이용하여 Percidae의 분류를 재검토하였고, Subfamily Etheostomatinae와 Subfamily Lucio-percinae내의 소형 저서어류의 독립적인 진화에 대한 계통분류학적 증거에 대하여 논하였다. 또한, cytochrome *b* 유전자의 염기서열은 Atlantic cod (Carr et al., 1991), Pacific sockeye salmon (Bickham et al., 1995)과 dusky grouper (Gilles et al., 2000)에 있어서 유전자의 종내 변이 탐지 목적으로도 이용되었다.

한편, 여러 연구자들 (Meyer, 1993; Takezaki and Gojobori, 1999)은 정확한 계통수를 작성하기 위해서는 각 codon 위치에 따른 치환을 변이를 고려하는 것이 중요하다고 언급하였다. 따라서, 포화도 분석에 근거하여 이 연구에 이용된 24개의 cytochrome *b* 유전자들 간의 transitional substitution (특히 3번째 codon 위치)은 특히 ingroup과 outgroup 사이에서 거의 포화되어 있는 것으로 분석되었다. 이러한 포화된 자료는 실제로 계통 관계를 추정하는데 오류를 야기시킬 수 있으므로, 계통 관계를 추정하는데 이를 신중하게 고려하는 것이 필요하다. 여러 연구자들 (Brito et al., 1997; Song et al., 1998)이 유연관계가 다소 먼 분류군들 간의 계통수를 작성하는데 3가지 codon 위치 모두를 이용하였다. 그러나, 이 연구결과에서 볼 수 있듯이 3가지 codon 위치 모두에서 transversion보다 transition이 빨리 축적되었으며, 이는 transition 치환 후에 다시 한번 더

치환이 일어났음을 추측할 수 있다. 이러한 숨겨진 다중치환 현상을 보정하기 위한 방법으로 일부 연구자들은 첫 번째와 두 번째 codon 위치에서의 치환 (transition; transversion) 혹은 3가지 codon 위치 모두에서의 transversion만을 분석에 이용하였다 (Birolay et al., 1998). 따라서, 이 연구에서는 자료에 기인하는 오류를 최소화하기 위하여 첫 번째와 두 번째 codon 위치에서의 치환 (transition; transversion)에 대한 자료군만을 이용하여 계통관계를 추정하였다. 이를 통해 작성된 계통수는 실고기목과 실고기아목의 분류군이 높은 bootstrap 값으로 단진화군을 이루고 있음을 확인할 수 있었으며, family와 subfamily 수준에서 일부 기존 형태학적 분류 체계와 다른 점이 발견되었으나 전반적으로 상당히 유사한 계통수를 나타내고 있는 점으로 미루어 실고기어류의 계통분류학적 연구 시 cytochrome *b* 유전자의 유용성을 알 수 있었다. 계통진화적인 분석 결과, MP와 ML에 의한 계통수에서 *Dunckerocampus dactyliophorus*가 실고기과 (Family Syngnathidae)의 조상종으로 구분되기도 하지만, 방법론을 달리할 경우 일관된 subfamily 간의 계통진화적인 관계는 얻을 수 없었다. 이러한 현상이 다른 척추동물에서 볼 수 있듯이 특정 지질 연대에 상대적으로 단기간에 일어난 진화적 현상 때문인지 또는 분석 자료에서 기인한 것인지에 대해서는 보다 세밀한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한, 주목할 만한 점으로는 기존 형태학적 분류 시 Subfamily Solegnathinae에 포함되는 weedy seadragon (*P. taeniolatus*)의 계통분류학적 위치가 서로 다른 방법으로 작성된 계통수에 있어 일관되게 해마아과 (Subfamily Hippocampinae)에 포함된다는 사실이다. 번식 패턴에 있어 전혀 다른 해마속 어류와 weedy seadragon이 계통분류학적으로 가깝게 그룹을 형성하는 이유에 대해서 두 가지의 유추가 가능할데, 첫 번째로는 해마속 어류들의 진화 과정에서 번식 패턴의 back mutation이 일어났을 가능성과 두 번째로는 mitochondrial DNA는 모계유전을 하기 때문에 해마아과 어류들의 진화초기에 이들 수컷과 다른 원시적인 번식 패턴을 갖는 암컷과의 사이에 잡종이 형성되었을 가능성이 있다. 하지만, 이 연구는 mitochondrial DNA를 이용하였기에 이를 통해 잡종화 현상에 대해서 확실하게 밝혀낼 수는 없었다. 그러나 Solegnathinae아과에 포함되는 *Haliichthys*속, *Phycodurus*속, 및 *Solegnathus*속의 몇몇 대표종을 추가시킨다면 이들의 계통분류학적인 위치에 대한 새로운 해석이 가능하리라 사료된다. 끝으로, 실고기과는 근연한 다른 과 (family) 어류에 비해 훨씬 많은 종을 포함하고 있으며 (52속, 330종), 형태적으로 특이하게 분화되어 있고 종 내의 형태적인 변이가 심하기 때문에 아직도 분류에 어려움이 많다. 최근에는 cytochrome *b*를 이용한 *Syngnathus*속과 *Hippocampus*속의 계통관계에 대한 연구 (Peter et al., 2004)가 수행된 바 있지만, 지리적인 요인에 따라 속 (genus) 수준에서의 분자계통 연구를 시도한 것으로써, 실고기목에 대한 분자계통 분류학적인 연구는 이번이 처음이다. 따라서, 이 연구에서 밝혀진 결과들을 기초로 하여 보다 심도

있는 연구를 통해 실고기목 어류의 분류학적인 재검토가 필요할 것으로 사료된다.

## 사 사

시료 중 실고기 (*Syngnathus schlegeli*)는 제주대학교 노섭교수님, 그리고 New Zealand pot-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*), weedy seadragon (*Phyllopteryx taeniolatus*), sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*, *Pungitius kaibarae*)는 KOEX Aquarium의 한원민님으로부터 제공받았습니다. 시료 제공에 깊이 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Allegrucci, G., A. Caccone and V. Sbordoni. 1999. Cytochrome *b* sequence divergence in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and phylogenetic relationship among some Perciformes species. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 37, 149-156.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijin, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J.H. Smith, R. Staden and I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465.
- Arnaud, S., F. Bonhomme and P. Borsa. 1999. Mitochondrial DNA analysis of the genetic relationships among populations of scad mackerel (*Decapterus macarellus*, *D. macrosoma*, and *D. russelli*) in South-East Asia. *Mar. Biol.*, 135, 699-707.
- Bickham, J.W., C.C. Wood and J.C. Patton. 1995. Biogeographic implications of cytochrome *b* sequences and allozymes in sockeyes (*Oncorhynchus nerka*). *J. Hered.*, 86, 140-144.
- Briolay, J., N. Galtier, R.M. Brito and Y. Bouvet. 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9(1), 100-108.
- Bowen, B.W., A.L. Bass., L.A. Rocha, W.S. Grant and D.R. Robertson. 2001. Pylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution*, 55, 1029-1039.
- Cantatore, P., M. Rovetti, G. Pesole, A. Ludovico, F. Milella, M.N. Gadaleta and C. Saccone. 1994. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J. Mol. Evol.*, 39, 589-597.
- Carr, S.M. and H.D. Marshall. 1991. Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene of Atlantic cod (*Gadus*

- morhua*) by the polymerase chain reaction. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48, 48-52.
- Casey, S.P. 1999. A phylogenetic study of seahorses using the cytochrome *b* gene of mitochondrial DNA. Ph.D. Thesis, Institute of Zoology, London.
- Colborn, J., R.E. Crabtree, J.B. Shaklee, E. Pfeiler and B.W. Bowen. 2001. The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. Evolution, 55, 807-820.
- Dawson, C.E. 1985. Indo-Pacific pipefishes, Mississippi, USA: The Gulf Coast Research Library.
- Duncker, G. 1915. Revision der Syngnathidae. Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst., 32, 9-120.
- Eschmeyer, W.N. 1998. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences, San Francisco, Vols. 1-3.
- Esposti, M.D., S.D. Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patarnello and A. Meyer. 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. Biochim. Biophys. Acta, 1143, 243-271.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39(4), 783-791.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Syst. Zool., 20, 406-416.
- Gilles, A., A. Miquelis, J.P. Quignard and E. Faure. 2000. Molecular phylogeography of western Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus*. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie - Life Sciences, 323, 195-205.
- Herald, E.S. 1959. From pipefish to seahorse a study of phylogenetic relationships. Proc. Calif. Acad. Sci., 29, 465-473.
- Irwin, D.M., T.D. Kocher and A.C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. J. Mol. Evol., 32, 128-144.
- Johns, G.C. and J.C. Avise. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. Mol. Biol. Evol., 15 (11), 1481-1490.
- Kendrick, A.J. and G.A. Hyndes. 2002. Patterns in the abundance and size-distribution of syngnathid fishes among habitats in a seagrass-dominated marine environment. Estuar. Coast. Shelf Sci., 57, 631-640.
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. Ann. Rev. Eco. System., 24, 189-216.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pääbo, F.X. Villablanca and A.C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 6196-6200.
- Kocher, T. D. and C.A. Stepien. 1997. Molecular Systematics of Fishes, Academic Press, New York, pp. 314.
- Kuiter, R.H. 2000. Seahorses, Pipefishes and Relatives - A Comprehensive Guide to Syngnathiformes, TMC Pub., Chorleywood, UK.
- Kumar, S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics, 17(2), 1244-1245.
- Lourie, S.A., A.C.J. Vincent and H.J. Hall. 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. London: Project Seahorse.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Molecular Biology Frontiers, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Hochachka, P.W. and T.P. Mommsen, eds. Elsevier Science Publishers. AM., 2, pp. 470.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press. New York, pp. 333.
- Patterson, H.G. and S. Graves. 2000. DNAssist: The integrated editing and analysis of molecular biology sequences in windows. Bioinformatics, 16(7), 652-653.
- Peter, R.T., I.C. Michael and A.M. Conrad. 2004. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: *Hippocampus*): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. Mol. Phylogent. Evol., 30(2), 273-286.
- Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14(9), 817-818.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4(4), 406-425.
- Song, C.B., T.J. Near and L.M. Page. 1998. Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence data. Mol. Phylogenet. Evol., 10(3), 343-353.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b8, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takezaki, N. and T. Gojobori. 1999. Correct and incorrect vertebrate phylogenies obtained by the entire mitochondrial DNA sequences. Mol. Biol. Evol., 16(5), 590-601.



Wilson, A.B., A. Vincent, I. Ahnesjö and A. Meyer. 2001. Male pregnancy in seahorses and pipefishes (family Syngnathidae): rapid diversification of paternal brood pouch morphology inferred from a molecular phylogeny. *The American Genetic Association*, 92, 159-166.

Wootton, R.J. 1992. *A Functional Biology of Sicklebacks*, University of California Press.

---

2004년 9월 18일 접수  
2004년 10월 28일 수리