

동해유입천에 서식하는 잔가시고기의 미토콘드리아 DNA를 이용한 계통분류학적 연구

장민호 · 윤주덕¹ · 채병수² · 주기재^{1,*}

(일본국립환경연구원, ¹부산대학교 생물학과, ²국립공원연구원)

Molecular Phylogeny of *Pungitius kaibarae* from Mitochondrial DNA Sequences in Selected Streams Flowing into the East Sea. Jang, Min-Ho, Ju-Duk Yoon¹, Byung-Soo Chae² and Gea-Jae Joo^{1,*} (National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, 305-8506, Japan; ¹Department of Biology, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea; ²National Park Research Institute, Namwon 590-811, Korea)

The nucleotide sequence variations of mitochondrial DNA were investigated to understand genetic differentiation for five different *Pungitius kaibarae* populations at five study sites from selected four streams flowing into the East Sea. The complete sequences of mtDNA control regions of them were determined the constant sites 342 bp and variable sites 183 bp including parsimony informative sites 122 bp. Based on the phylogenetic tree, five populations were monophyletic unit (97% MP and 100% NJ) and separated two groups (Myongpa-Songhuen stream group and others group). The population of Baebong stream (82nd bp, G-A) consistently formed them of the Jasan stream into a monophyletic unit even though it is closer than Myongpa stream (99th bp, T-C) from the Baebong stream. Further studies on the molecular phylogeny for the primary freshwater fish are needed to establish for the fish biodiversity conservation in mountainous and upland streams.

Key words : mtDNA, *Pungitius kaibarae*, monophyletic unit, biodiversity conservation

큰가시고기목(Gasterosteiformes) 어류는 총 11과 71속 257종이 서식하고 있으며, 이 중 약 19종이 담수에 서식하고 40여종이 기수역, 약 198여종이 해수에 서식하는 것으로 알려져 있다(Nelson, 1994). 큰가시고기과(Gasterosteidae) 내에 모두 5속 7종이 존재하고 있으며, 국내에는 2속 5종이 서식하고 있다(김, 1997; 김과 박, 2002). 이중 냉수성 어류인 가시고기속(genus *Pungitius*)은 북반구 극지역을 중심으로 분포하고 있는 주극성 어류로, 북미 및 북유라시아의 담수에 서식하는 것으로 보고되고 있으며, 아직까지 중수에 대한 구체적인 언급은 없는 실정이다(Münzing, 1969; Wootton, 1976). 일부 자

료(www.fishbase.org)에 의하면 가시고기속 어류는 모두 8종으로 분류되기도 한다.

극동아시아지역에 분포하고 있는 가시고기는 아무르강 수계를 중심으로 크게 *Pungitius pungitius*(청가시고기; 주극성 분포, 한반도 및 일본 Hokkaido부터 Kamchatka 반도까지 분포), *P. sinensis*(가시고기; *P. pungitius*와 유사한 분포), *P. tymensis*(두만가시고기; Sakhalin열도와 Hokkaido), *P. kaibarae*(잔가시고기; 한반도 및 일본 Kyoto)의 4종으로 분류된다(Münzing, 1969; 전, 1987; 채, 1988; Takahashi *et al.*, 2001; 김과 박, 2002). 그러나 이들 4종은 분류의 기준이 되는 형질의 변이 범위가 중

* Corresponding author: Tel: 051) 583-0172, Fax: 051) 510-2258, E-mail: gjjoo@pusan.ac.kr

복되고 유전적인 분석에서도 그들 간의 관계가 복잡하여 문제가 있는 집단으로 인식되고 있다 (Münzing, 1969; Wootton, 1976; 채와 양, 1990; Takahashi *et al.*, 2001; Takahashi and Goto, 2001). 이 중 *P. kaibarae*는 일본의 료토에서 최초로 발견되어 신종으로 보고된 이후 현재는 일본 내에서 절멸한 것으로 알려져 있고 (中坊, 2000), 국내에서는 동해로 유입되는 하천의 중, 하류에 서식하는 것으로 알려져 있다 (김과 박, 2002). 특히 *P. sinensis*와 *P. kaibarae*의 분류는 논란이 있었으며, 학자에 따라서는 아종 혹은 별종으로 분류하기도 하였다. 전 (1987)과 채 (1988)는 각각 아종 수준인 *P. sinensis sinensis*와 *P. sinensis kaibarae*로 판단하였으며, Kim *et al.* (1989)과 김 (1997) 등은 형태적 차이와 분포 양상에 따라 두 종이 다른 종임을 보고하였고, Yang and Min (1990)은 이들에 대한 19개 genetic loci의 대립인자 빈도를 조사하여 별종으로 보고 하였다. 서와 채 (2000)는 18s 리보솜 DNA 서열 분석을 통해 두 종간에 유전적 차이가 있어 별종으로 보고하였다.

한반도에 서식하는 큰가시고기와 어류는 모두 5종으로 *Gasterosteus aculeatus* (큰가시고기), *P. sinensis*, *P. tymensis*, *P. pungitius*, *P. kaibarae*로 *G. aculeatus*와 *P. sinensis*는 동해뿐 아니라 남해와 서해로 유입되는 일부 하천에서도 서식하며, 이들을 제외한 3종은 모두 동해로 흐르는 하천의 중, 하류에 서식하는 것으로 알려져 있다. 가시고기속 어류는 일생을 담수에서만 생활하는 것으로 알려져 있으나 자세한 생활사는 밝혀지지 않았다. 현재까지, 국내에서 가시고기에 대한 연구는 행동 (박과 이, 1999), 형태적 특성 (Chae and Yang, 1988; Kim *et al.*, 1989; 채와 양, 1989), 가시고기와 잔가시고기의 자연잡종 (채와 양, 1990) 및 종간의 멜라닌 색소포의 차이 (Youn *et al.*, 2002) 등에 관한 연구들이 수행되었다. 특히, 분자계통학적 연구 (채, 1988; Yang and Min, 1990; 서와 채, 2000; Chae and Seo, 2003)는 가시고기속 내의 종간차이에 관한 연구가 이루어졌으며, 각 하천에 서식하는 개체군의 유전적 차이나 유전자의 교류 등에 관한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 미토콘드리아 DNA를 이용하여 동해로 흐르는 작은 하천에 서식하는 *P. kaibarae* 개체군들의 담수서식에 따른 지리 및 생식적 격리로 인한 계통분류학적 차이를 알아보고자 하였다. 또한, 문헌자료 등을 통해 극동아시아 지역에 서식하고 있는 가시고기 개체군들의 유전적 유연관계를 계통학적으로 밝혀보고자 한다.

본 연구를 위해 사용된 *P. kaibarae*는 강원도 고성군

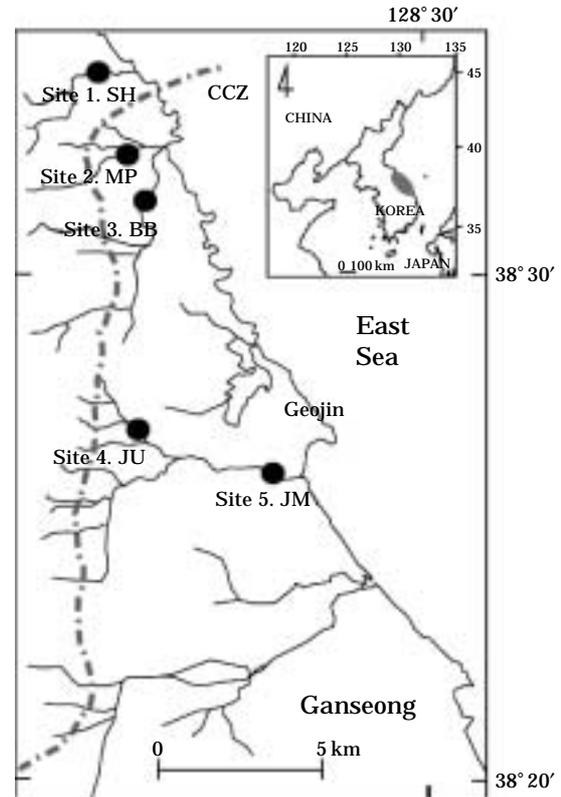


Fig. 1. Map showing sampling sites for *Pungitius kaibarae* collection of northern east part of Gangwon-do. SH, Songhyeon Stream; MP, Myeongpa Stream; BB, Baebong Stream; JU, Jasan Stream (upstream); JM, Jasan Stream (downstream).

에 위치한 모두 4개 하천, 5개 지점을 선정하여 채집하였다 (Fig. 1). 지점 1은 현내면 송현리 송현천 하류 (SH)이며, 지점 2는 현내면 명파리 명파천 하류 (MP), 지점 3은 현내면 배봉리 배봉천 하류 (BB), 지점 4와 5는 거진읍 송정리와 자산리의 자산천 상류 (JU)와 하류 (JM)를 각각 대표지점으로 선정하였다. 어류 채집은 각 조사지점에서 망목 5 × 5 mm의 족대를 이용하여 수행하였다.

채집된 개체는 살아있는 상태로 실험실에 옮겨와 간조직을 적출하였다. DNA는 50 mg 정도의 간조직을 잘게 자른 후, DNA추출용액 1 mL에 보관하였다. 이 DNA 시료는 proteinase K stock용액과 RNase A stock용액을 각각 4 μ L과 4 μ L을 혼합한 후 1.5 mL용 homogenizer로 분쇄하였다. 미토콘드리아 DNA의 분리는 Chapman and Powers (1984)의 Non-diet 방법을 개량하여 사용하였다. PCR (polymerase chain reaction)은 각각의 dNTP 0.2 mM, 각 primer 0.25 μ M, 1 × *Ex Tag* buffer (TaKaRa Co. Japan)와 1 unit의 *Ex Tag* DNA polymerase (*Ex Tag*TM,

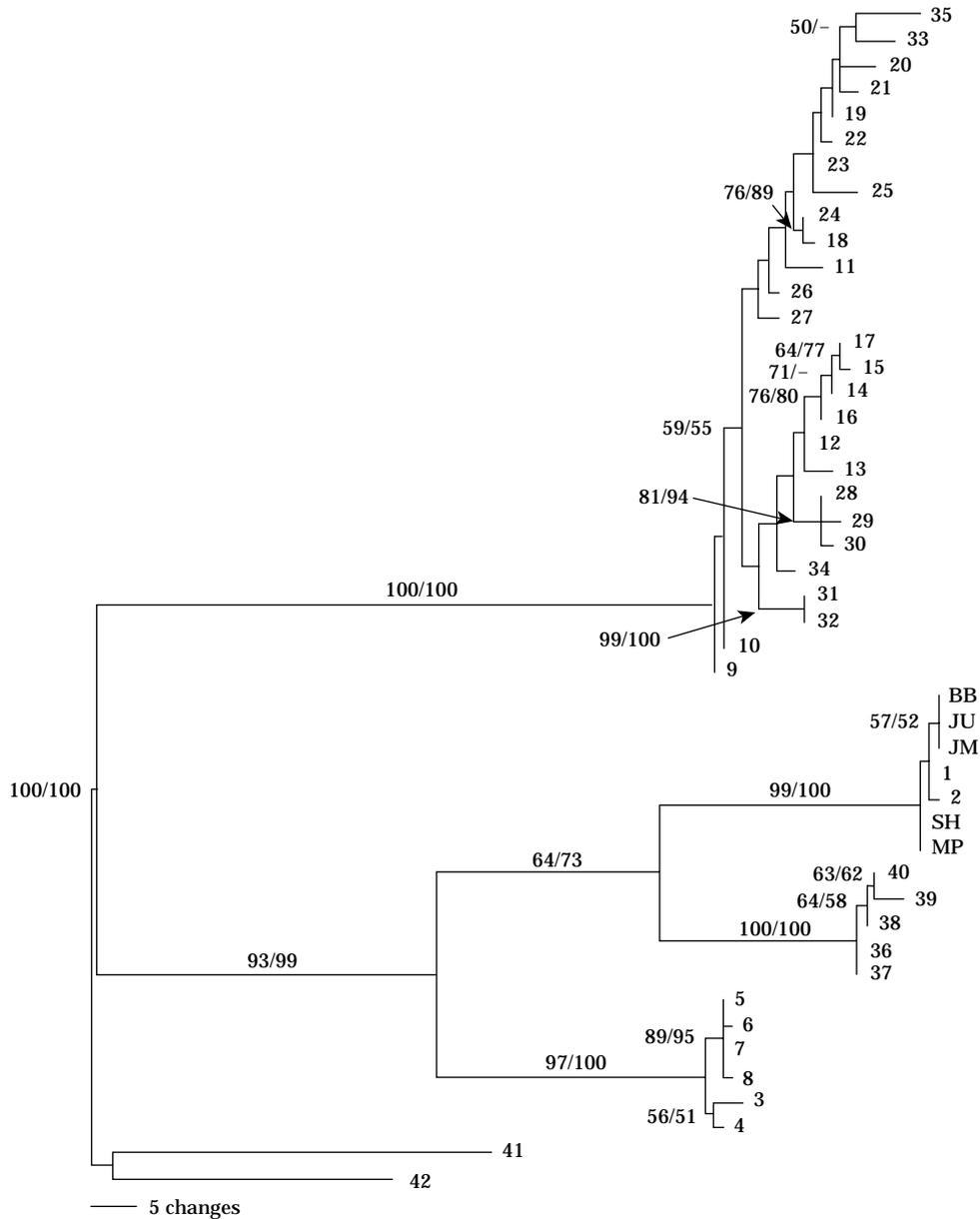


Fig. 2. Phylogenetic tree based on genetic distances estimated between 47 samples (including 42 samples from Takahashi and Goto, 2001) aligned CR sequences (haplotypes) of ninespine sticklebacks. The bootstrap values near the branches were calculated using the maximum parsimony and neighbor joining method.

TaKaRa Co. Japan)를 포함해 총 25 μ L로 반응액을 구성하였으며, denaturing (94°C에서 1분), annealing (58°C에서 1분), extension (72°C에서 1분) cycle을 30회 반복하였다. PCR을 통해 얻어진 산물은 QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN Co. USA)을 사용하여 정제하였다. 미토콘드리아 DNA control region은 Lee 등(1995)에 기술된 K primer를 변형한 L-Thr (5'-AGCTCAGCGYCA-GAGCGCCGGTCTTGTA-3')과 Kocher 등(1989)의

H00651 primer를 변형한 H-12S (5'-TAAAGTCAGC-ACCAAGCCTT-3') primer를 이용해 cycle sequencing을 실시하였다. ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin-Elmer Co., Norwalk, USA)을 사용하여 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 58°C에서 4분간의 반응을 25회 반복하였다. 이렇게 얻어진 extension products는 에탄올 침전후 automated DNA sequencer (ABI PRISM 377)로 전기영동하였다.

미토콘드리아 DNA control region의 염기서열은 DNA-SIS ver. 2.5 program (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.)으로 정렬하여, maximum parsimony (MP)과 neighbor joining (NJ) 방법으로 계통유전학적 분석을 실시하였다. PHYLIP version 3.5 c package (Felsenstein, 1993)의 DNAPARS 및 NEIGHBOR program을 이용하여 각각의 phylogenetic tree를 결정하였으며 NJ와 MP 계통수 작성에는 1,000회의 bootstrapping 통계검증을 수행하였다. 우리나라 동해안 5개 지점에서 채집한 *P. kaibarae*의 집단간 관계 분석은 PAUP* (Swofford, 2002)를 이용한 parsimony network 분석을 수행하였다.

채집한 *P. kaibarae* 개체군 5개의 염기서열에 따른 계통도는 Fig. 2에 나타내었다. 정렬된 염기서열은 총 525 bp이며, 이 중 변이가 없는 constant sites는 342 bp이며, 변이가 있는 variable sites는 모두 183 bp였고 이중 parsimony informative sites는 122 bp로 나타났다. AT/CG 비율은 지점 1 (송현천)과 지점 2 (명파천)에서 1.67로 나타났으며 나머지 지점은 1.7로 나타났다. Takahashi and Goto (2001)는 가시고기속의 control region의 정렬된 염기서열은 약 830~930 bp로 이중에서 100~300 bp region (약 200 bp)이 과변이부위 (hypervariable region)인 것으로 보고하였다.

본 5개 조사지점에 대한 결과를 Takahashi and Goto (2001)의 결과와 함께 MP (Maximum Parsimony)와 NJ (Neighbor-Joining) 방법으로 계통수를 작성하여 비교, 분석하였다. 본 연구와 선행연구에서 사용된 out group은 큰가시고기 (*Gasterosteus aculeatus*, 41)와 실비늘치 (*Aulichthys japonicus*, 42)로 완전히 분리되어 단진화군을 이루므로 out group으로서 합당한 것으로 나타났다. 선행연구(Takahashi and Goto, 2001)에 의하면 극동아시아 지역의 가시고기 (*P. pungitius*, *P. sinensis*, *P. tymensis*)는 크게 세 집단으로 구분되어있다. 첫 번째 그룹 (Group A)은 *P. tymensis* 집단으로 사할린 남부와 홋카이도 동부의 일부 하천에서 채집된 동종 개체들이 하나의 그룹을 이루었다 (97% MP 및 100% NJ bootstrap value). 두 번째 그룹 (Group B)은 *P. tymensis*의 sister group으로, 아무르강과 한반도 동해안에서 채집된 *P. sinensis* 집단이며 이들은 아무르강 아집단과 한반도 아집단으로 세분되어져 있다 (64% MP 및 73% NJ bootstrap value). 세 번째 그룹 (Group C)은 시베리아 동남부에서부터 캄차카를 거쳐 일본 본토까지 가장 광범위하게 분포하고 있는 집단으로 *P. sinensis*와 *P. pungitius*, 그리고 두 종의 혼합형으로 구성되어 있다 (97% MP 및 100% NJ bootstrap value; Takahashi and Goto, 2001).

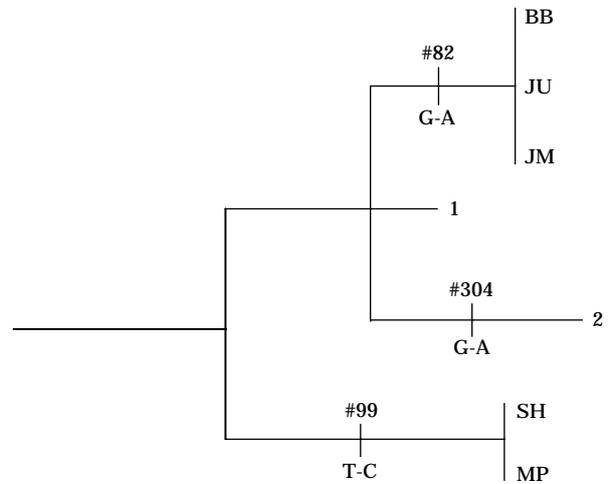


Fig. 3. The most parsimonious network of *Pungitius kaibarae* based on mtDNA control region (525 bp). Vertical bars represent a single mutational step.

한반도 아집단으로 이용된 강릉 남대천 (1번), 고성군 오호천 (2번; Takahashi and Goto, 2001)과 본 연구에 사용된 5지점의 개체군들은 99% MP 및 100% NJ bootstrap value를 보이며 강한 단계통을 이루었다. 하지만 Takahashi and Goto (2001)는 한반도 아집단에 이용한 종이 *P. sinensis*로 기록하고 있지만 본 조사에 사용된 종은 *P. kaibarae* 개체들로, 선행연구에 이용된 개체들과 함께 단계통임을 보여준 결과는 모두 같은 종임을 의미하며, 이는 선행연구에 사용된 개체들이 오동정 되었을 가능성을 배제할 수 없다. 아울러 저자들의 미공개 자료들에 따르면 강릉남대천에서 채집되었던 개체들은 모두 *P. kaibarae* 였던 점을 볼 때 오동정일 가능성이 더욱 크다고 판단된다. 본 연구에서 나타난 강한 단계통의 결과는 한반도에 분포하는 *P. kaibarae* 개체군들이 진화초기에 동일한 조상종으로부터 분화되었음을 보여주고 있다. 하지만, 한반도 내에서의 결과는 배봉천과 자산천의 상하류가 낮은 bootstrap 값을 보였다 (57% MP 및 52% NJ bootstrap value).

우리나라 5개 개체군간의 nucleotide의 차이는 Fig. 3에 나타내었다. 지점 1과 2는 정렬된 염기서열 중 99번째에서 T-C 변이가 있어 두 지점은 단일계통임을 알 수 있다. 반면 지점 3, 4, 5는 82번째 염기서열에서 G-A 변이가 있어, 이 역시 세 지점의 집단이 단일계통임을 보여주고 있다. Takahashi and Goto (2001)는 강릉 남대천의 샘플에서 염기서열 중 304번째 G-A 변이가 있는 것을 보여주었다. 본 결과와 비교할 때 지점 1 (송현천)과 2 (명파

천)의 *P. kaibarae* 개체는 그 이남의 *P. kaibarae* 개체들과 유전적으로 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 담수에서만 서식하는 *P. kaibarae*의 생활사를 고려할 때 각 하천에 서식하는 *P. kaibarae* 개체군들이 지사적인 분포에 따라 유전적으로 고립되고 있음을 나타내고 있다. 배봉천의 개체는 지리적으로 가까운 명파천 개체보다는 지리적으로 먼 자산천의 개체군과 관계통을 이루고 있다.

특정 산악지역에 분포하는 지역의 고유어종들은 유전적 다양성이 매우 낮으며, 때때로 절멸 위기까지 처하게 된다(Carvalho, 1993; Hanski and Gilpin, 1997). 동해로 유입되는 하천은 지리적 특성상 하천의 길이가 매우 짧고, 하천간 연결이 많지 않아 지천이 발달되지 않은 상황에서 바다로 직접 유입된다. 이러한 하천들의 특징(짧은 길이, 적은 지천)은 산악지역에 고립된 어류들과 유사한 환경을 제공하게 된다. 따라서 각 하천에 서식하는 어류는 유전적 교류가 일어날 수 없으며 지리적으로 가까운 개체군간에서도 장기적으로 유전적 고립에 따른 분화가 일어날 수 있다. 동해유입천에 서식하는 연어과 어류의 경우 바다에서 모천으로 회귀하는 과정에서 유전적 교류가 일어날 수 있으나 순수 담수어의 경우 하천간 개체군의 유전적 교류는 어렵다. 본 연구에서 *P. kaibarae*는 일생을 담수에서만 생활하는 생활사로 인해 유전적 고립을 추정할 수 있다. 따라서 지사적 구별과 더불어 각 하천의 독립성이 뚜렷한 동해 유입천에 서식하는 순수담수어에 대한 보다 많은 계통분류학적 연구를 통해 종 분화의 과정 및 진행 상황을 파악할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

계통분석에 많은 도움을 준 이주미 박사님과 양은찬님께 감사드립니다.

인 용 문 헌

김익수. 1997. 한국동식물도감 제37권 동물편(담수어류). 교육부, 서울, 629pp.
 김익수, 박종영. 2002. 한국의 민물고기. 교학사, 서울, 465pp.
 박시룡, 이진수. 1999. 한국산 잔가시고기(*Pungitius sinensis kaibarae*)의 텃세 행동, 한국생태학회지 **22**(3): 163-167.
 서보근, 채병수. 2000. 18s 리보솜 DNA 서열 분석에 의한 한국산 가시고기속(genus *Pungitius*, Gasterosteidae: Pisces) 어류의 계통학적 연구, 한국어류학회지 **12**(1): 14-19.

전상린. 1987. 한국산 독종개과 및 큰가시고기과 주연성 담수어의 검색과 분포, 상명여자대학교논문집 **19**: 549-576.
 채병수, 양홍준. 1989. 한국산 가시고기(*Pungitius sinensis*: Gasterosteidae)의 인판의 지리적 변이, 한국어류학회지 **1**(1, 2): 42-53.
 채병수, 양홍준. 1990. 가시고기(*Pungitius sinensis*)와 잔가시고기(*Pungitius kaibarae*) 사이의 자연잡종, 한국어류학회지 **2**(1): 88-94.
 채병수. 1988. 한국산 가시고기(*Pungitius sinensis*: Gasterosteidae)의 형질분석에 의한 분류. 경북대학교 박사학위논문, 82pp.
 中坊徹次. 2000. 日本産 魚類檢索 全種の同定 第二版. 東海大學出版會, 東京, 1818pp.
 Carvalho, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish. Biol.* **43**(A): 53-73.
 Chae, B.S. and B.K. Seo. 2003. Phylogenetic study on the genus *Pungitius* (Pisces: Gasterosteidae) populations by the RAPD analysis. *Korean J. Ichthyol.* **15**(1): 12-18.
 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.
 Chapman, R.W. and D.A. Powers. 1984. A method for the rapid isolation of mitochondrial DNA from fishes. Maryland Sea Grant College University of Maryland 1222, H.J. Partterson Hall College Park, MD 20742UM -SG-TS-84, p. 1-11.
 Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
 Hanski, I.A. and M.E. Gilpin. 1997. Metapopulation Biology: Ecology, Genetics and Evolution. Academic Press, San Diego.
 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.
 Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, 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. USA* **86**: 6196-9200.
 Lee, W., J. Conroy, W.H. Howell and T.D. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* **41**: 54-66.
 Münzing, V.J. 1969. Variabilität, verbreitung and systematik der arten und unterarten in der gattung *Pungitius* Coste, 1848 (Pisces, Gasterosteidae). *Z. Zool. Syst. Evol.*

- Forsch.* **7**: 208-233.
- Nelson, J.S. 1994. Fishes of the world. 3rd edition, John Wiley and Sons, New York, 600pp.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takahashi, H. and A. Goto. 2001. Evolution of East Asian ninespine sticklebacks as shown by mitochondrial DNA control region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**: 135-155.
- Takahashi, H., K. Takata and A. Goto. 2001. Phylogeography of lateral plate dimorphism in the freshwater type of ninespine sticklebacks, genus *Pungitius*. *Ichthyol. Res.* **48**: 143-154.
- Wootton, R.J. 1976. The biology of the sticklebacks. Academic Press, London, 387pp.
- 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.
- Youn, C.H., S.D. Lee and K.S. Kim. 2002. Melanophores of *Pungitius sinensis* and *Pungitius kaibarae* (Gasterosteidae, Pisces). *Korean J. Ichthyol.* **14**(2): 100-108.
- (Manuscript received 13 April 2006,
Revision accepted 26 May 2006)