KOREAN JOURNAL OF ICHTHYOLOGY, Vol. 21, No. 2, 67-75, June 2009
ISSN: 1225-8598

Received : May 8, 2009
Revised : June 23, 2009
Accepted : June 25, 2009

한국산 둑중개속 어류 개체군들의 형태 변이 및 AFLP 분석을 통한 유전 변이

변화근 · 김근식[1] · 송하윤[1] · 방인철[1,]*

강원대학교 환경연구소, [1]순천향대학교 해양생명공학과

Morphological Variations and Genetic Variations Inferred from AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Analysis of *Cottus* Populations (Scorpaeniformes: Cottidae) in Korea ***by Byeon Hwa Kun, Keun-Sik Kim[1], Ha-Yoon Song[1] and In-Chul Bang[1,*]*** (Environmental Research Institute, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea; [1]Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea)

ABSTRACT Morphological and genetic variation of *Cottus* populations in Korea were compared to each other in the watershed. Morphological variation was analyzed by meristic and morphometric characters, and by fertilized egg sizes. Genetic variation was assessed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting. *Cottus koreanus* populations of rivers and streams running towards the eastern coasts of the Korean Peninsula were significantly different in morphometric characters from populations in rivers and streams running towards the western and southern coasts of the Korean Peninsula, but did not differ in meristic characters and fertilized egg sizes. *Cottus* populations in the upper streams-Yangyangnamadae Stream, Jusu Stream and Samcheogosip Stream-were the same in meristic and genetic characters. However, the *Cottus* sp. population from Baebong Stream is related to *C. hangiongensis* in meristic characteristics and to *C. koreanus* in the morphometric characteristics of length of the ventral fin ray and in the fertilized egg size. Pairwise genetic distances assessed by the AFLP method among *C. koreanus* populations were in the range of 0.110 to 0.221. Genetic distances between *C. hangiongensis* and *C. koreanus* populations varied from 0.542 to 0.621, and those between the *Cottus* sp. population of Baebong Stream and *C. koreanus* populations from 0.222 to 0.304. The result of the UPGMA dendrogram shows the *Cottus* sp. population of Baebong Stream was clearly separated of other *C. koreanus* populations.

Key words : *Cottus*, AFLP, morphology, egg size, genetic variation

서 론

둑중개속(*Cottus*) 어류는 담수역과 해수역을 왕래하는 양측 회유형과 하천 육봉형이 알려져 있다(Watanabe, 1960). 한반도에 분포하는 둑중개속 어류는 둑중개 *Cottus koreanus*, 참둑중개 *C. czerskii*, 한둑중개 *C. hangiongensis* 3종이 보고되어 있다(Mori and Uchida, 1934). 이들 세 종 중 *C. czerskii*는 북한의 두만강에서만 발견되며, 남한에는 둑중개와 한둑중개가 분포하는 것으로 알려져 있다(전, 1986; Kim and Youn, 1992; 변, 1995a). 일반적으로 난의 크기와 포란수 등 생태적인 특징이 *Cottus* 종들을 분류하는데 중요한 형질로 이용되나(Goto, 1978, 1981), 둑중개와 한둑중개는 형태적 분류 기준이 명확하지 않으며 암수에 따른 성장 차이가 보고되고 있다(Goto, 1984; 변, 1996).

남한에서는 둑중개가 한강, 임진강, 낙동강 상류역에 분포하고 반면 한둑중개는 중부 이북의 동해로 유입되는 하천의 하류역에 분포한다(전, 1986; 변, 1995a). 둑중개는 육봉화된 어류로 대란형이며 포란수는 적고(변, 1995b), 부화한 치어는 바로 산란장 바닥에 가라앉아 저서생활을 한다. 반

*교신저자: 방인철 Tel: 82-41-530-1286, Fax: 82-41-530-1638,
E-mail: incbang@sch.ac.kr

면 한둑중개는 양측회유성 어류(Goto, 1981; 변, 1995a)로 소란형이며 포란수는 많고(Goto, 1977; 변, 1995b), 부화한 치어는 연안으로 이동하여 일정기간 동안 부유생활을 한 후 하천으로 소상하여 하류역 여울에 서식한다(Goto, 1981; 변, 1995b). 그러나 최근 동해안으로 유입되는 하천 중 삼척 오십천, 주수천, 양양남대천, 배봉천 상류역에서 한둑중개와 다른 형태 및 서식지를 가지는 새로운 *Cottus* 집단이 발견되었다.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 유전자 지문 분석 기술은 유전적으로 근연인 종 간에도 고도의 유전적 변이 및 다형성을 검출할 수 있고, 한 번에 많은 유전자 좌위를 검색할 수 있으며, 또한 시료의 수에 제한을 받지 않는 등의 다양한 장점을 가지고 있어, 특정 분류군의 유전다양성 분석, 잡종 판별, marker 탐색, 집단 구조 분석 등에 매우 유용하다(Knorr *et al*., 1999; Mariette *et al*., 2001; Bonin *et al*., 2007). 위와 같은 장점을 이용하여 최근 미호종개(Lee *et al*., 2008a), 어름치(Lee *et al*., 2008c) 등의 멸종위기 어류의 유전 다양성을 분석하였으며, 배스(Lee *et al*., 2008b), 대하(Sung *et al*., 2007) 등의 유전구조를 보고한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 현재까지 보고된 바 없는 동해로 유입되는 하천에서 발견된 *Cottus* 집단을 동정하기 위하여 기존의 둑중개속 어류와의 형태 비교 및 AFLP 분석을 통한 유전적 변이를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 조사 시기 및 조사 지점

조사에 사용된 *Cottus* 군집 표본은 2006년 3월부터 2007년 7월까지 서해, 남해 및 동해로 유입되는 9개 하천에서 각 1개 지점씩 총 9개 지점에서 2～3회에 걸쳐 채집했다(Fig. 1). 둑중개는 서해와 남해로 유입되는 임진강, 북한강, 남한강, 낙동강 상류역 4개 지점(St. 1～4)과 동해로 유입되는 하천인 배봉천, 양양남대천, 주수천, 삼척오십천 4개 지점에서 채집하였다(St. 5～8). 한편 한둑중개는 삼척오십천 하류 1개 지점에서 채집하였다(St. 9).

St. 1: 경기도 포천시 이동면 도평리(임진강 수계)
St. 2: 강원도 홍천군 북방면 북방리(북한강 수계)
St. 3: 강원도 횡성군 강림면 부곡리(남한강 수계)
St. 4: 경상북도 봉화군 석포면 대현리(낙동강 수계)
St. 5: 강원도 고성군 현내면 마달리(배봉천 수계)
St. 6: 강원도 양양군 서면 갈천리(양양남대천 수계)
St. 7: 강원도 강릉시 옥계면 산계리(주수천 수계)
St. 8: 강원도 삼척시 도계읍 산기리(삼척오십천 상류)

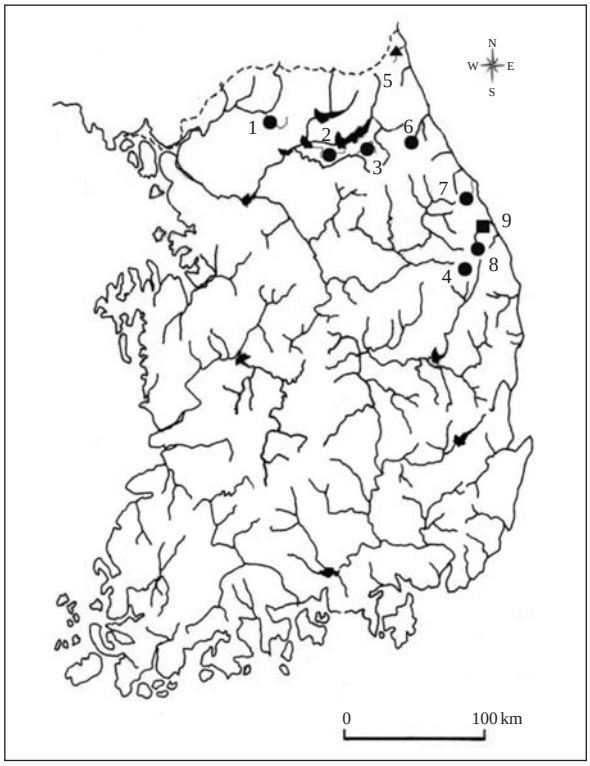

Fig. 1. Sampling sites of *Cottus* populations in Korea. Circles, *Cottus koreanus*; a square, *C. hangiongensis*; a triangle, *Cottus* sp.

St. 9: 강원도 삼척시 남양동(삼척오십천 하류)

2. 조사방법

1) 어류 채집 및 표본 관찰

어류 채집은 족대(4×4 mm, 1×1 mm)를 사용하였으며 채집된 표본들은 현장에서 10% 포르말린액에 고정하였고, 유전적 분석을 위한 개체는 99% 알코올에 처리하였다. 종 동정은 전(1998), 변(1995b), Ryouji *et al*.(2005) 등의 검색표를 이용하였다. 어류의 외부형태 측정은 변(1995b)과 전(1998)에 의거하였으며, 각 집단별 15개체씩 측정하였다. 난의 직경은 산란 직후 산란장에 분포하는 수정란을 사용하였으며, 수정란의 난괴(egg-cluster) 당 30개씩 무작위로 선정하여 1/20 mm caliper (Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

2) 통계 분석

집단별 측정된 각 계측 형질은 암수로 구분하여 두장, 체고, 미병장, 미병고, 배지느러미 길이 및 뒷지느러미 길이는 체장에 대한 백분비(%)로서 분석하였으며, 입폭과 문장은 두장에 대한 백분비(%)로 분석하였다. 각 parameter에 대한 유의성 검증을 위해 one-way analysis of variation (ANOVA)를 실시하였으며, 수정란의 크기에 대한 유의성 검증을 위

해 t-test를 실시하였다. 통계자료의 유의성 파악을 위해 P-value는 0.05수준에서 검증하였다.

3) 채집된 어류의 genomic DNA 추출

각 집단별 샘플의 genomic DNA는 고정된 표본을 24시간 동안 흐르는 물로 세정한 후 꼬리지느러미를 1 cm^2 내외로 절단하여 TNES-urea buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 125 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8.0; 0.5% SDS; 8 M urea)를 이용하여 추출하였다. 상기 시료를 포함하는 완충용액에 proteinase K (Sigma, USA)를 100 mg/mL의 농도로 첨가하여 55˚C에서 12시간 동안 반응한 후, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 처리하여 단백질을 제거하였으며, 2-propanol로 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 DNA는 70% ethanol을 이용하여 세척하고 1 × TE (10 mM Tris-Cl; 1 mM EDTA pH 8.0)로 용해시켰다. 준비한 시료는 spectrophotometer 측정과 0.8% agarose gel 전기영동을 통해서 DNA의 양과 질을 확인한 후 실험에 이용하였다.

4) AFLP 유전자 지문 분석

AFLP는 Vos *et al*. (1995)의 방법을 기본으로 변형하여 사용하였다. 총 2 μg의 DNA를 *Eco*RI 제한효소 (Promega, USA) 10 unit로 37˚C에서 4시간 절단한 후 절단 정도를 전기영동상으로 확인하였고, 에탄올 침전을 이용하여 절단한 DNA를 회수하였다. 두 번째 제한효소 반응을 위해서 *Mse*I 제한효소 (Promega, USA) 2 unit을 첨가하여 65˚C에서 4시간 동안 반응시켰으며, 절단 산물을 다시 순수 분리한 후 *Eco*RI/*Mse*I adapters를 첨가하여 ligation 반응을 실시하였다. 반응을 마친 DNA 5 μL를 대상으로 AFLP® pre amp-primer mix I (Invitrogen, USA), *Taq* DNA polymerase (Intron, Korea) 1 unit, 5 mM dNTP, 10× PCR buffer-용액을 첨가하여 pre-amplification 반응을 수행하였다. PCR 반응조건은 94˚C 30초, 56˚C 60초, 72˚C 60초간 총 20회 반복하였다. PCR 반응산물을 TE 완충용액으로 50배 희석한 후 희석산물 5 μL를 대상으로 *Eco*RI selective primer와 *Mse*I selective primer를 이용하여 상기와 동일하게 2차 PCR 조성물을 제조하였다. 이때 PCR 반응은 touch-down PCR법을 이용하여 94˚C 30초, 65～56˚C (회당 0.7˚C씩 감소) 30초, 72˚C 60초간 12회 순환 반응을 실시 후 annealing 온도를 56˚C 30초로 고정하여 총 24회 반복 수행하였다. 최종 증폭 산물 20 μL에 6 μL의 formamide loading dye (95% formamide; 10 mM EDTA pH 8.0; 0.05% bromophenol blue; 0.05% xylene cyanol FF)를 첨가한 후 94˚C 5분간 가열하고 이중 3 μL를 취하여 5% denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 1,600 V에서 3시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동된 DNA 단편들은 silver staining kit (Promega, USA)를 이용하여 염색 후 관찰하였다. 연구에 사용한 adapters 및 primers의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Sequence information of adapters and primers used for AFLP analysis

		Sequence (5′→3′)
Adapters	*Eco*RI	Forward: CTCGTAGACTGCGTACC Reverse: AATTGGTACGCAGTC
	*Mse*I	Forward: GACGATGAGTCCTGAG Reverse: TACTCAGGACTCAT
Pre-amplification primers	*Eco*RI	GACTGCGTACCAATTCA
	*Mse*I	ATGAGTCCTGAGTAAC
Selective amplification primers	*Eco*RI	E/AGA GACTGCGTACCAATTCAGA E/ACT GACTGCGTACCAATTCACT E/AGA GACTGCGTACCAATTCAGA
	*Mse*I	M/CTA ATGAGTCCTGAGTAACTA M/CGT ATGAGTCCTGAGTAACGT M/CGA ATGAGTCCTGAGTAACGA

5) Data analysis

Silver staining된 gel 상에서 눈으로 직접 확인된 DNA 단편들은 밴드의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 matrix code를 작성한 후, TFPGA (ver. 1.3; http://iubio.bio.indiana.edu.au/tfpga/) 프로그램을 사용하여 (Miller, 1997) 각 집단간 유전적 거리를 측정하였다. 각 개체간의 유사도 matrix는 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means)방법을 이용하여 각각을 군집화하고 이를 토대로 dendrogram을 작성하였다. 이러한 작업은 수리분류분석용 프로그램인 NTSYS 프로그램을 이용하였다 (Rohlf, 1992).

결 과

1. 형태적 특징

채집된 어류 중 암컷의 계측 및 계수 형질의 측정 결과는 Table 2와 같으며, 수컷의 계측 및 계수 형질의 측정 결과는 Table 3과 같다. 두장은 모든 집단에서 암컷과 수컷 모두 유의적인 차이 ($P < 0.05$)가 나타나지 않았다. 체고는 양양남대천, 배봉천 집단의 암컷과 한둑중개 집단 수컷이 다른 집단과 비교하여 유의적인 차이를 나타내었으며, 삼척오십천 집단은 암컷과 수컷 모두 유의적인 차이를 나타내었다. 미병장은 삼척오십천 집단과 한둑중개 집단의 암컷이 다른 집단과 구분되는 유의적인 차이를 나타내었으나, 수컷은 집단간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 미병고는 양양남대천, 삼척오십천, 배봉천, 한둑중개 집단의 암수 모두 유의적인 차이가 나타났다. 배지느러미길이는 한둑중개 집단의 암컷이 다른 집단과 뚜렷하게 구분되는 유의적인 차이가 나타났으며, 삼척오십천, 배봉천, 한둑중개 집단의 수컷은 다른 집단과 유의적인 차이가 나타났다. 뒷지느러미길이는 주수천, 삼척오십천 집단의 암컷이 다른 집단과 유

Table 2. Comparison of morphological characters among *Cottus koreanus* populations of female

Female characters	*Cottus koreanus*							*Cottus* sp.	*Cottus hangiongensis*
	IJ	BH	NH	ND	YN	JS	SO	BB	SOD
% of SL									
HL	27.2±1.1^{a}	27.2±1.2^{a}	27.1±1.6^{a}*	27.7±1.6^{a}	27.6±1.7^{a}	28.4±1.9^{a}	28.5±0.9^{a}	28.1±1.8^{a}	27.6±1.7^{a}
BD	19.3±1.5^{a}	19.2±1.6^{a}	19.8±1.7^{ab}	19.1±2.1^{a}	21.6±1.4^{b}	20.1±1.6^{ab}	21.2±1.2^{b}	21.0±1.2^{b}	20.4±1.9^{ab}
CPL	16.2±1.0^{ab}	16.3±1.2^{ab}	17.1±1.2^{a}	17.1±1.6^{a}	16.7±1.3^{ab}	16.4±1.3^{ab}	15.8±1.2^{b}	16.2±1.3^{ab}	18.5±1.8^{c}
CPD	8.6±0.3^{a}	8.4±0.6^{a}	8.6±0.6^{a}	8.2±1.1^{a}	9.6±0.8^{b}	9.2±0.8^{ab}	9.7±1.0^{b}	9.9±0.8^{b}	9.9±1.0^{b}
VFR-L	19.5±2.0^{a}*	19.7±1.5^{a}*	19.3±2.1^{a}*	18.6±2.3^{a}*	19.8±1.4^{a}*	19.6±0.9^{a}*	20.3±1.0^{a}*	18.9±1.4^{a}*	18.6±1.4^{a}
AFR-L	10.5±0.9^{a}*	10.8±0.7^{ab}*	10.6±0.7^{ab}*	10.4±1.1^{a}*	10.7±1.0^{ab}*	11.6±1.0^{b}*	11.5±1.3^{b}*	11.2±1.0^{ab}*	10.4±1.2^{a}*
% of HL									
MW	55.6±2.0^{a}*	57.6±3.5^{a}*	57.5±3.2^{a}*	57.1±3.6^{a}*	61.8±4.1^{ab}*	65.0±5.8^{b}*	64.3±4.7^{b}*	58.4±4.7^{a}*	58.9±4.3^{a}*
SnL	29.2±1.3^{a}	29.9±1.6^{a}*	29.4±2.1^{a}*	29.5±1.8^{a}	30.1±2.5^{a}	29.9±2.6^{a}	30.2±2.1^{a}	29.3±2.0^{a}	26.9±1.3^{b}
Meristics									
P	12～13	13	12～13	12～13	13	13	12～13	13～14	13～14
D1	8	8	8	8	7～8	8	8	7～9	8～9
D2	18～21	18～20	18～20	19～21	20	19～21	19～20	18～22	20～22
A	14～17	14～17	14～16	14～17	15～16	15～16	15～16	15～17	16～17

Means in columns with a same superscript letter are not significantly different ($P>0.05$).
* indicates significant of sex dimorphism.
Abbreviation: IJ, Imjin River; BH, Bukhan River; NH, Namhan River; ND, Nakdong River; YN, Yangyangnamdae Stream; JS, Jusu Stream; SO, Samcheokosip Stream; BB, Baebong Stream; SOD, Samcheokosip Stream (down-Stream); SL, standard length; BD, body depth; HL, head length; CPL, caudal peduncle length; CPD, caudal peduncle depth; AFR-L, anal fin ray length; VFR-L, ventral fin ray length; MW, mouth width; SnL, snout length; P, number of pectoral fin rays; D1, number of first dorsal fin rays; D2, number of second dorsal fin rays; A, number of anal fin rays.

Table 3. Comparison of morphological characters among *Cottus koreanus* populations of male

Male characters	*Cottus koreanus*							*Cottus* sp.	*Cottus hangiongensis*
	IJ	BH	NH	ND	YN	JS	SO	BB	SOD
% of SL									
HL	28.1±1.2^{a}	28.5±1.6^{a}	28.8±1.3^{a}	28.6±1.7^{a}	28.0±2.0^{a}	28.5±2.5^{a}	29.3±1.2^{a}	28.7±2.0^{a}	28.9±1.6^{a}
BD	19.6±1.2^{a}	20.1±1.7^{a}	21.1±1.6^{ab}	19.9±1.3^{a}	21.4±1.4^{ab}	21.4±1.1^{ab}	22.1±2.0^{b}	21.4±1.4^{ab}	21.8±1.7^{b}
CPL	16.6±1.7^{a}	16.3±1.7^{a}	17.3±2.2^{a}	16.7±2.9^{a}	16.3±1.8^{a}	16.7±1.8^{a}	15.7±0.9^{a}	16.7±1.6^{a}	17.8±1.9^{a}
CPD	8.8±0.3^{a}	8.8±0.6^{a}	8.9±1.0^{a}	8.8±0.8^{a}	9.8±0.8^{b}	9.5±0.8^{ab}	9.8±1.0^{b}	9.9±1.1^{b}	10.2±1.0^{b}
VFR-L	28.2±2.8^{ab}	28.2±3.8^{ab}	30.5±3.2^{a}	28.9±3.1^{a}	25.3±2.7^{ab}	26.9±2.7^{ab}	25.9±2.3^{b}	25.8±3.2^{b}	19.1±2.5^{c}
AFR-L	14.8±1.6^{a}	13.7±1.4^{ab}	13.7±1.7^{ab}	13.8±1.6^{ab}	12.3±1.7^{ab}	13.2±2.1^{ab}	12.8±1.6^{ab}	12.1±1.8^{b}	13.9±2.5^{ab}
% of HL									
MW	71.3±5.8^{a}	70.1±6.0^{a}	70.4±4.2^{a}	70.3±5.9^{a}	72.5±5.7^{a}	71.5±6.5^{a}	70.6±5.7^{a}	69.2±4.8^{a}	69.6±5.5^{a}
SnL	30.5±1.2^{ab}	31.6±2.0^{a}*	31.4±1.6^{a}	30.1±2.0^{ab}	31.1±1.8^{ab}	30.4±1.6^{ab}	30.2±2.0^{ab}	29.4±1.4^{b}	28.1±1.9^{b}
Meristics									
P	12～13	13	13	12～13	13	12～13	13	13～14	13～14
D1	8	8	8	8	8	8	7～8	8～9	8～9
D2	18～21	18～21	18～21	18～21	20～21	20～21	19～20	18～22	20～21
A	14～17	14～17	14～16	14～16	15～17	15～17	15～16	15～17	16～17

Means in columns with a same superscript letter are not significantly different ($P>0.05$).
Abbreviation: IJ, Imjin River; BH, Bukhan River; NH, Namhan River; ND, Nakdong River; YN, Yangyangnamdae Stream; JS, Jusu Stream; SO, Samcheokosip Stream; BB, Baebong Stream; SOD, Samcheokosip Stream (down-Stream); SL, standard length; BD, body depth; HL, head length; CPL, caudal peduncle length; CPD, caudal peduncle depth; AFR-L, anal fin ray length; VFR-L, ventral fin ray length; MW, mouth width; SnL, snout length; P, number of pectoral fin rays; D1, number of 1st dorsal fin rays; D2, number of 2nd dorsal fin rays; A, number of anal fin rays.

의적인 차이를 나타내었으며, 배봉천 집단의 수컷이 다른 둑중개 집단과 유의적인 차이를 나타내었다. 입폭은 주수천, 삼척오십천 집단 암컷이 다른 집단과 구분되는 유의적인 차이를 나타내었으나, 수컷은 모든 집단에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 문장은 배봉천 집단의 수컷이 다른 집단의 수컷과 구분되는 유의적인 차이를 보였으며, 한둑중개 암컷과 수컷에서 모든 집단과 뚜렷하게 구분되는 유의적인 차이를 보였다. 따라서 서남해로 유입되는 하천과 동해로 유입되는 하천이 뚜렷하게 구분되지는 않았으나, 특정 형질, 특정 집단에서 통계적으로 유의한 결과를 나타내었다.

계측형질 중 성적이형으로 나타난 형질 중 두장은 남한강 집단에서만 나타났으며, 뒷지느러미길이와 입폭은 둑중

개 집단과 한둑중개 집단 모두에서 공통적으로 나타났다. 배지느러미길이는 둑중개 집단만 나타나는 성적이형으로 한둑중개 집단과 차이가 났으며, 북한강 둑중개 집단에서만 문장에서 성적이형이 나타났다.

계수형질은 둑중개가 가슴지느러미 연조수가 12～13개, 제1등지느러미 연조수는 8개, 제2등지느러미 연조수는 18～21개, 뒷지느러미 연조수는 14～17개였으며, 배봉천 *Cottus* 집단 어류가 가슴지느러미 연조수가 13～14개, 제1등지느러미 연조수는 7～9개, 제2등지느러미 연조수는 18～22개, 뒷지느러미 연조수는 15～17개, 한둑중개는 가슴지느러미 연조수가 13～14개, 제1등지느러미 연조수는 8～9개, 제2등지느러미 연수는 20～22개, 뒷지느러미 연조수는 16～17개로 나타났다. 둑중개는 계수 형질에 있어 한둑중개와 큰 차이는 없었으나 가슴지느러미, 등지느러미, 뒷지느러미의 연조수가 한둑중개에 비해 다소 적었으며, 배봉천 *Cottus* 집단 어류는 연조수에 있어서는 둑중개에 비해 다소 많아 한둑중개와 유사하였다.

2. 수정란의 크기

임진강, 북한강, 남한강, 낙동강 상류에서 채집된 둑중개 집단의 수정란 직경은 평균 3.04～3.06 mm로 대란형에 속하였고, 삼척오십천 하류역에서 채집된 한둑중개 수정란 직경은 평균 1.91 mm로 소란형에 속하였다. 한편 동해로 유입되는 하천 중 주수천, 삼척오십천 상류역에서 채집된 둑중개 집단의 수정란 직경은 각각 평균 3.02 mm, 3.04 mm로 대란형에 속하였다. 한편 양양남대천에서 채집된 둑중개 어류의 수정란은 직경 2.98 mm, 배봉천에서 채집된 집단의

Table 4. Comparison of egg sizes among populations of *Cottus koreanus*, *Cottus* sp. and *C. hangiongensis*

	C. koreanus							*Cottus* sp.	*C. hangiongensis*
Sampling station	IJ	BH	NH	ND	YN	JS	SO	BB	SOD
	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30	n=30
Egg size (mm)	3.06 ± 0.08^{a}	3.05 ± 0.08^{a}	3.04 ± 0.09^{a}	3.05 ± 0.07^{a}	2.98 ± 0.06^{b}	3.02 ± 0.07^{a}	3.04 ± 0.05^{a}	2.93 ± 0.06^{b}	1.91 ± 0.06^{c}

IJ, Imjin River; BH, Bukhan River; NH, Namhan River; ND, Nakdong River; YN, Yangyangnamdae Stream; JS, Jusu Stream; SO, Samcheokosip Stream; BB, Baebong Stream; SOD, Samcheokosip Stream (down-Stream).

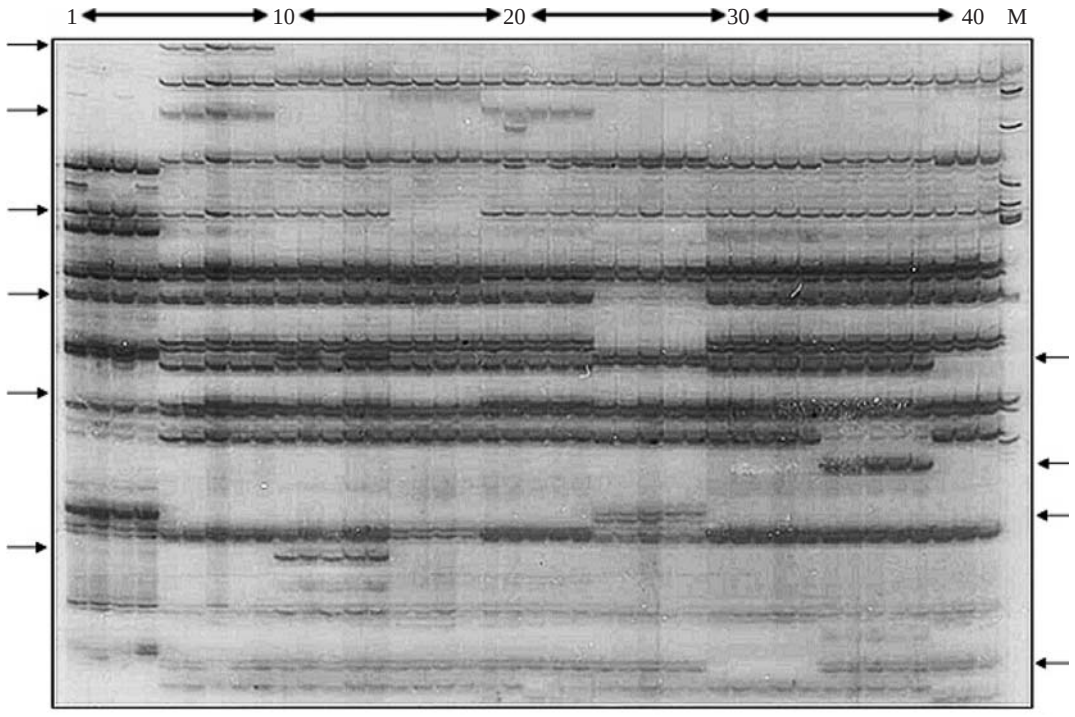

Fig. 2. AFLP fingerprint patterns from nine populations of *Cottus* populations generated with a primer combination of E/AGA~M/CGA. Lanes 1-4, *C. hangiongensis* population; lanes 5-23, 29-41, *C. koreanus* populations from Nakdong River (5-9), Imjin River (10-14), Bukhan River (15-18), Namhan River (19-23), Jusu Stream (29-33), Yangyangnamdase Stream (34-38), and Samcheokosip Steram (39-41); lanes 24-28, *Cottus* sp. populations from Basebong Stream. M, 1 kb DNA ladder. Arrows indicates population specific markers.

수정란 직경은 2.93 mm로 대란형에 속하나 다른 둑중개 집단에 비해 직경이 다소 작았다. 통계처리 결과 양양남대천과 배봉천 집단의 수정란은 한둑중개 및 다른 둑중개 집단의 수정란과 구분되는 유의적인 차이를 나타내었으며, 한둑중개의 수정란 역시 둑중개 집단과 구분되는 유의적인 차이를 나타내었으나, 임진강, 북한강, 남한강, 낙동강, 삼척오십천, 주수천 등의 둑중개 집단은 집단 간 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 4).

3. AFLP 유전자 지문분석

각 집단별 AFLP 유전자 지문분석 결과, 3조합의 selective primer에서 283개의 유효 band가 검출되었으며, 각 집단 간 특이 band가 탐색이 되었다(Fig. 2). 둑중개 개체군들과 한둑중개 개체군을 뚜렷하게 구분해주는 특이 band가 총 40개 검출되었으며, 둑중개 개체군들을 구분할 수 있는 특이 band가 소수 검출되었다. 한편 동해안 배봉천 개체군에서는 둑중개와 한둑중개 개체군들과 뚜렷하게 구분되는 특이 band가 다수 검출되었다(Table 5).

AFLP 유전자 지문분석에 기초한 한국산 *Cottus* 집단 간의 유전적 거리를 Table 6에 나타내었다. 둑중개 7집단 간 유전적 거리는 0.106～0.221로서, 평균 유전적 거리는 0.148이었다. 남한강 집단과 낙동강 집단이 0.106으로 가장 가깝게 나타났으며, 북한강 집단과 삼척오십천 집단이 0.221로 가장 멀게 나타났다. 이 중 동해로 유입되는 양양남대천, 주수천, 그리고 삼척오십천 상류에 서식하는 집단들 간의 유전적 거리는 0.117～0.174로서, 평균 유전적 거리는 0.138로 나타났다. 주수천 집단과 양양남대천 집단이 0.117로 가장 가까웠으며, 삼척오십천 상류 집단과 주수천 집단이 0.174로 가장 멀게 나타났다. 서해와 남해로 유입되는 임진강, 낙동강, 남한강 그리고 북한강 집단과 동해로 유입되는 양양남대천, 주수천, 그리고 삼척오십천 상류에 서식하는 집단들 간의 유전적 거리는 0.110～0.221로서, 평균 유전적 거리는 0.147로 나타났으며, 양양남대천 집단과 임진강 집단이 0.110으로 가장 가깝게 나타났다. 한둑중개 집단과 둑중개 7집단 간 유전적 거리는 0.542～0.621로서 평균 유전적 거리는 0.581로 나타났다. 한편 배봉천의 *Cottus* 집단은 둑중개 집단들과 0.222～0.304로서, 평균 유전적 거리가 0.271로 나타났으며, 한둑중개 집단과의 유전적 거리가 0.598로 나타났다.

유전적 거리에 따른 한국산 *Cottus* 집단 간의 UPGMA dendrogram을 작성한 결과 동해안 상류역에 삼척오십천, 주수천, 양양남대천의 둑중개 집단들이 임진강, 북한강, 남한강, 낙동강의 둑중개 집단들과 유집되었다. 반면 삼척오십천 하류역의 한둑중개 집단과 배봉천의 *Cottus* 집단은 둑중개 집단들과 명확하게 분리되었다(Fig. 3).

Table 5. The number of specific marker bands from nine *Cottus* populations by AFLP analysis

Populations		No. of specific marker bands
C. koreanus	Imjin River	0
	Bukhan River	4
	Namhan River	4
	Nakdong River	0
	Yangyangnamdae Stream	1
	Jusu Stream	5
	Samcheokosip Stream	6
C. sp.	Baebong Stream	18
C. hangiongensis	Samcheokosip Stream	45

고 찰

서해와 남해로 유입되는 하천의 상류역에 서식하는 둑중개는 수계의 분리에 따른 외부 형태의 차이가 없었고, 변

Table 6. Pairwise Genetic distance from nine *Cottus* populations by AFLP analysis

Populations		*C. koreanus*							*C.* sp.	*C. hangiongensis*
		IJ*	BH	NH	ND	YN	JS	SO	BB	SOD
C. koreanus	IJ	–	0.176	0.131	0.151	0.110	0.144	0.184	0.276	0.542
	BH		–	0.156	0.167	0.147	0.180	0.221	0.272	0.585
	NH			–	0.106	0.116	0.109	0.129	0.265	0.577
	ND				–	0.149	0.157	0.164	0.283	0.574
	YN					–	0.117	0.122	0.222	0.589
	JS						–	0.174	0.276	0.581
	SO							–	0.304	0.621
C. sp.	BB								–	0.598
C. hangiongensis	YND									–

*IJ, Imjin River; BH, Bukhan River; NH, Namhan River; ND, Nakdong River; YN, Yangyangnamdae Stream; JS, Jusu Stream; SO, Samcheokosip Stream; BB, Baebong Stream; SOD, Samcheokosip Stream (down-Stream).

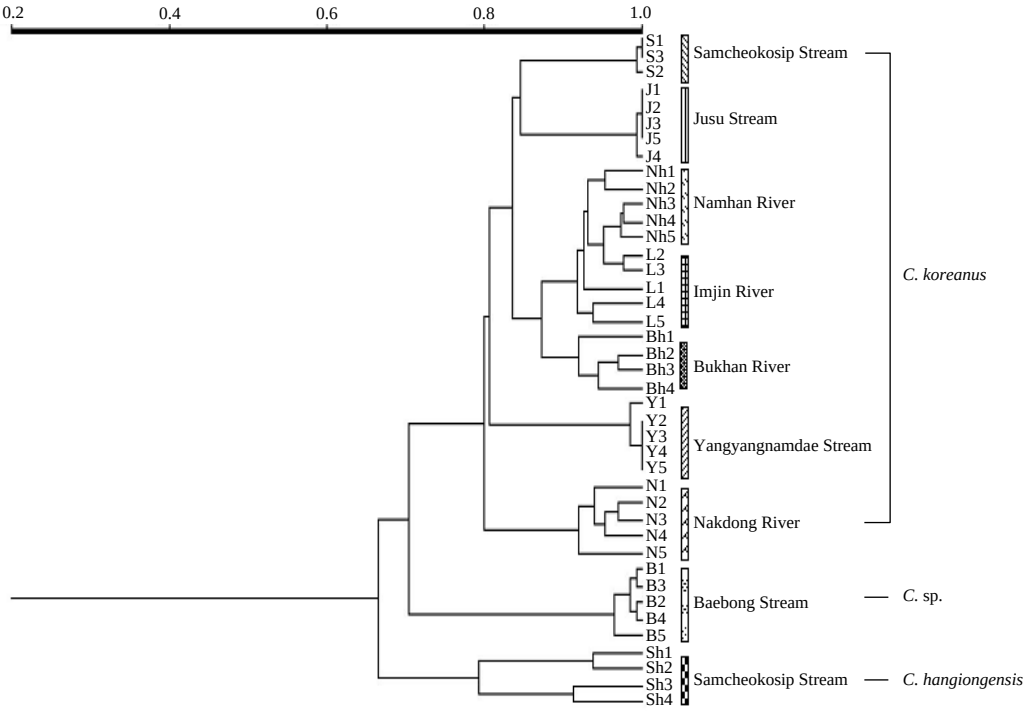

Fig. 3. Dendrogram reconstructed by the UPGMA method showing phylogenetic relationships among nine *Cottus* populations based on genetic distance data.

(1995b), 전(1998), Ryouji *et al*.(2005) 등의 형태형질 측정 결과와 비교적 일치하였다. 낙동강 상류역에 분포하는 집단의 외부형태적인 조사는 본 조사에서 처음 실시되었으며, 조사 결과 한강 수계의 집단과 형태적인 차이가 없어 서해와 남해로 유입되는 하천의 상류역에 서식하는 둑중개는 지리적 변이가 발생하지 않은 것으로 생각된다.

전(1986, 1998)과 변(1995a)은 둑중개가 서해와 남해로 유입되는 하천 상류역에 국한되어 분포하는 것으로 보고하였으나, 본 연구를 통해 본 종이 동해로 유입되는 일부 하천의 상류역에도 분포하고 있는 것이 최초로 확인되었다. 각 계측형질 별로 통계분석 결과 기존의 서해와 남해로 유입된 집단과 동해로 유입되는 일부 하천의 집단은 암컷에서는 두장, 배지느러미 길이를 제외한 모든 형질에서 분포역에 따라 부분적으로 유의한 차이를 보였으며, 수컷에서도 두장, 미병장, 입폭을 제외한 모든 형질에서 분포역에 따라 부분적으로 유의한 차이를 보였다. 하지만 계수 형질이 서해와 남해로 유입되는 하천의 상류역에 서식하는 둑중개와 일치하였다. 따라서 동해로 유입되는 하천의 둑중개는 서남해로 유입되는 하천의 둑중개와 지리적 변이가 발생한 것으로 판단된다.

둑중개와 한둑중개는 생태적 차이가 엄격히 구별되나 계측형질은 동해로 유입되는 하천의 둑중개와 유사하여 분류형질로서 뚜렷이 구별되지 않는 특징을 나타내었다. 하지만 암컷의 미병장과 문양, 수컷의 배지느러미길이 형질은 통계적으로 유의한 수준에서 구분되었으며, 둑중개 집단에 비해 한둑중개 집단이 짧게 나타나 변(1996)과 전(1986)의 보고와 일치하였다.

둑중개 속 어류의 경우 수정란 크기에서 Goto (1975)는 수정란을 직경의 크기에 따라 1.9～2.2 mm 내외인 소란형과 2.8～3.2 mm 내외인 대란형으로 구분하였으며, *C. nozawae*는 동일 수계에서 상류역에는 대란형이 하류역에서는 소란형이 존재하는 것으로 보고한 바 있다(Goto, 1978). 수정란에 있어 임진강, 북한강, 남한강, 낙동강, 양양남대천 상류, 주수천 상류, 삼척오십천 상류, 배봉천 상류 등에 서식하는 집단은 수정란이 2.9 mm 이상으로 대란형이며, 육봉형에 속하였으나, 양측회유성인 한둑중개는 소란형으로서 생태적으로 구별되었다. 양양남대천과 배봉천 집단의 수정란은 대란형에 속하나 다른 둑중개 집단에 비해 다소 작게 나타나 두 집단의 난 크기 차이에 대한 추가적인 생태학적 검증이 필요할 것으로 판단된다.

특히 배봉천의 *Cottus* 집단의 수컷은 배지느러미 길이가 암컷보다 현저히 길어 둑중개와 유사한 계측형질을 보였으나, 계수형질인 가슴지느러미, 제1등지느러미, 제2등지느러미 등의 연조수에 있어 둑중개에 비해 다소 많아 한둑중개와 유사한 특징을 보였다. 이는 형태적으로 배지느러미 길이에 있어 둑중개와 가깝고 가슴지느러미와 등지느러미 연

조수에 있어 한둑중개에 가까운 특징을 가지고 있었으며, 수정란에 있어서는 대란형에 속하나 다른 둑중개 집단과 차이를 보이는 생태적 특징을 나타내 추후 생태적 형질에 대해 면밀한 검토가 필요한 것으로 판단된다.

AFLP 유전자 지문분석의 결과는 제한효소와 selective primers에 약 50～100개의 유효한 band를 생성해 낼 수 있다(Rusell *et al*., 1997). 본 연구 수행결과 또한 3개의 selective primers 조합에서 283개의 유효 band가 검출되어 AFLP 분석이 효과적으로 적용되었음을 알 수 있다.

AFLP fingerprinting 기법을 이용하여 종 또는 집단 간의 특이적 DNA marker의 검출에 관한 연구는 주로 식물과 미생물을 중심으로 수행되어져 왔으나, Channel catfish, blue catfish와 이들의 F_1과 F_2 세대 및 역교배체를 구별할 수 있는 marker 개발(Liu *et al*., 1998), *Plecoglossus altivelis*의 3집단 간 특이적인 AFLP marker를 개발을 통한 아종 및 계통의 유전적 동정과 교잡종 식별(Seki, 1999)에 유용한 도구로서 활용된 바 있다. 본 연구에서도 3개의 primer 조합에서 특이 band가 나타나 높은 효용성을 보여주었으며, 특히 E/AGA-M/CGA primers 조합에서 다른 조합에 비해 한국산 *Cottus* 집단 간의 차이를 명확히 구별할 수 있는 특이 band가 다수 검출되어 집단 간 유전적 변이 확인이 가장 용이하였다(Fig. 2).

Nei (1975)는 집단 간 유전적 거리 값이 0～0.05 범위에 포함되면 동일 집단 내의 개체 간의 차이로, 0.02～0.20 범위에 포함되면 아종 수준의 차이로 구분하였으며, Shaklee and Pauly (1982)는 0.05 이상은 아종 수준, 0.30 이상은 종 수준, 0.90 이상은 속 수준의 차이로 보고한 바 있다. 따라서 기존에 밝혀진 집단인 서해와 남해로 유입되는 강에 서식하는 둑중개 집단과 동해안 상류역에 서식하는 둑중개 집단 간 평균 유전적 거리가 0.148로 나타나 아종 수준의 차이를 보였으며, 둑중개 7집단 간 평균 유전적 거리가 0.138로 나타나 둑중개 집단간 서식지의 격리로 인한 유전적 거리 차이로 판단된다. 또한 최근 AFLP를 이용한 대만산 *Zacco pachycephalus*와 *Z. platypus* 집단의 집단 구조 분석 및 형태적 차이 연구에서 *Z. platypus*의 L1 type과 L2 type의 유전적 거리가 0.64를 근거로 매우 높은 유전적 분화가 일어났음을 보고한 바 있다(Ma *et al*., 2006). 둑중개 7집단들과 한둑중개 집단 간의 유전적 거리는 0.542～0.621로 종 수준의 차이 및 높은 유전적 분화를 보여 현재의 분류가 명확히 이루어졌음을 알 수 있었다. 한편 배봉천의 *Cottus* sp. 집단은 한둑중개 집단과 유전적 거리가 0.598로 나타나 둑중개 7집단과 한둑중개 집단 간의 유전적 거리와 유사하였으나, 둑중개 7집단들과 유전적 거리가 0.222～0.304, 평균 0.271로 0.1 이상의 큰 차이를 보이며, UPGMA dendrogram 결과 또한 다른 둑중개 집단들과 명확하게 분리되어 유전적으로 독특한 집단으로 판단된다. 따라서 이 집단에 대한 분자계통학적인 추가 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

한국의 *Cottus* 속 어류 9개체군들의 형태 및 유전 변이를 서로 비교하였다. 형태변이 분석은 계수, 계측 형질 및 수정난의 크기를 분석하였으며, 유전 변이 분석은 AFLP fingerprinting을 이용하였다. 조사결과 동해로 흐르는 하천의 둑중개 집단은 서해와 남해로 흐르는 강 또는 하천의 둑중개 집단과 계측형질에서 유의적인 차이를 보였으나, 계수형질과 수정난 크기의 차이는 없었다. 하지만 배봉천의 *Cottus* sp. 집단은 계수형질에 있어 한둑중개와 비슷하였고, 배지느러미의 계측형질과 수정난의 크기는 둑중개와 비슷하였다. AFLP를 이용한 유전적 거리를 추정한 결과 둑중개 집단 간 0.110～0.221로 나타났다. 한둑중개 집단과 둑중개 집단 간 0.542～0.621로 나타났고, 배봉천의 *Cottus* sp. 집단과 둑중개 집단 간 0.222～0.304로 나타났다. UPGMA dendrogram결과 *Cottus* sp. 집단은 다른 둑중개 집단과 분리되었다.

인 용 문 헌

변화근. 1995a. 한국산 둑중개의 생태학적 연구. 강원대학교 대학원 박사학위논문, pp. 92-95.

변화근. 1995b. 한국산 둑중개속(*Cottus*)의 분류학적 재검토와 자어의 형태적 특징. 한국어류학회지, 7: 128-134.

변화근. 1996. 한국산 둑중개(*Cottus poecilopus*)의 성적 이형. 한국어류학회지, 8: 14-21.

전상린. 1986. 한국산 둑중개과 및 큰가시고기과 주연성 단수어의 검색과 분포. 상명여자대학 논문집, 14: 83-115.

전상린. 1998. 한국산 둑중개와 한둑중개의 검색과 분포. 상명대학교 기초과학연구소, 11: 1-14.

Bonin, A., D. Ehrich and S. Manel. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. Mol. Ecol., 16: 3737-3758.

Goto, A. 1975. Ecological and morphological divergence of the freshwater sculpin, *Cottus nozawae* Snyder-I. Spawning behavior and process of the devlopment in the post-hatching stage. Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ., 26: 31-37.

Goto, A. 1977. Ecological and morphological studies on the freshwater sculpins in Hokkaido. Dissertation, Hokkaido Univ., 207pp.

Goto, A. 1978. Comparative studies on the maturation process of two types of *Cottus nozawae*-I. The annual cycle of ovarian development. Japan. J. Ichthyol., 25: 115-123.

Goto, A. 1981. Life history and distribution of a River sculpin, *Cottus hangiongensis.* Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ., 32: 10-21.

Goto, A. 1984. Life history and distribution of a River sculpin, *Cottus hangensis*. J. Japan. Ichthyol., 31: 161-166.

Kim, I.S. and C.H. Youn. 1992. Synopsis of the Family Cottidae (Pisces: Scorpaeniformes) from Korea. Kor. J. Ichthyol., 4: 54-79.

Knorr, C., H.H. Cheng and J.B. Dodgson. 1999. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. Anim. Genet., 30: 28-35.

Lee, I.R., Y.A. Lee, H.C. Shin, Y.K. Nam, W.J. Kim and I.C. Bang. 2008a. Genetic diversity of an endangered fish, *Iksookimia choii* (Cypriniformes), from Korea as assessed by amplified fragment length polymorphism. Kor. J. Limnol., 41: 97-102 (in Korean)

Lee, W.O., I.R. Lee, H.Y. Song and I.C. Bang. 2008b. Genetic differentiation of the largemouth bass *Micropterus salmoides* from the major rivers and reserboirs in Korea assessed by AFLP. Kor. J. Limnol., 41: 395-401. (in Korean)

Lee, Y.A., Y.E. Yun, Y.K. Nam and I.C. Bang. 2008c. Genetic diversity of endangered fish *Hemibarbus mylodon* (Cyprinidae) assessed by AFLP. Kor. J. Aquaculture, 21: 196-200. (in Korean)

Liu, Z.J., P. Li, B.J. Aegue and R.A. Dunham. 1998. Ingeritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctaus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. Mol. Gen. Gent., 258: 260-268.

Ma, G.C., H.S. Tsao, H.P. Lu and H.T. Yu. 2006. AFLPs congruent with morphological differentiation of Asian common minnow *Zacco* (Pisces: Cyprinidae) in Taiwan. Zoologica., 35: 341-351.

Mariette, S., D. Chagne, C. Lezier, P. Pastuszka, A. Raffin, C. Plomion and A. Lremer. 2001. Genetic distance within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite marker. Heredity, 86: 469-479.

Miller, M. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. http://www.Marksgenetic software.net/tfpga.htm.

Mori, T. and K. Uchida. 1934. A revised catalogue of the fishes in Chosen. J. Chosen Nat. Hist. Soc., 19: 24.

Nei, M. 1975. Molecular population genetics and the theory of evolution (Translated by Wang Jiayu). China Agriculture Press, Beijing, China, pp. 121-123.

Rohlf, S.B. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.7. Applied Biostatistics Inc., New York, USA.

Rusell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of lecels of genetic variation among barley accessions detdcted by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. Theor. Appl. Genet., 95: 714-722.

Ryouji, F., Y. Choi and Y. Mamoru. 2005. A new species of freshwater sculpin, *Cottus koreanus* (Pisces: Cottidae) from Korea. Species Distance, 10: 7-17.

Seki, S. 1999. AFLP analysis of genetic distance in three populations of Ayu *plecoglossus altivelis*. Fisheries Science, 6: 888-892.

Shaklee, J.B. and P. Pauly. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by electrophoresis analysis of proteins. Pac. Sci., 36: 141-157.

Sung, Y.G., Y.K. Nam, H.S. Han and I.C. Bang, 2007. Genetic diversity and variation of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* populations as inferred by AFLP fingerprinting. J. Aquaculture, 20: 255-259. (in Korean)

Vos, P., R. Hodgers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23: 4407-4414.

Watanabe, M. 1960. Fauna Japonica, Cottidae (Pisces), pp. 11-218.