

# RAPD PCR에 의한 4대강 쉬리 *Coreoleuciscus splendidus* 개체군들의 유전변이 분석

송하윤 · 방인철\*

순천향대학교 해양생명공학과

**Genetic Variation of *Coreoleuciscus splendidus* Populations from Four Major Rivers in Korea as Assessed by RAPD PCR by Ha-Yoon Song and In-Chul Bang\*** (Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea)

**ABSTRACT** Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to investigate the genetic variations of *Coreoleuciscus splendidus* within and among the West Korea Subdistrict populations (in Han and Geum Rivers) and the South Korea Subdistrict populations (in Seomjin and Nakdong Rivers). Twelve random primers were employed to generate RAPD markers. All primers were produced to identify specific RAPD markers between the West and South Korea Subdistrict populations. Analyses of genetic similarity and distance among the West and South Korea Subdistrict populations of *C. splendidus* also revealed similar results, with low genetic similarity (0.49~0.53) and high distance value (0.63~0.71). UPGMA dendrogram based on genetic distance was also similar in results. Therefore, the West Korea Subdistrict populations and the South Korea Subdistrict populations vary in genetic structure, and *C. splendidus* in the South Korea Subdistrict may represent a different species.

**Key words :** *Coreoleuciscus splendidus*, RAPD PCR, genetic variation

## 서 론

쉬리 *Coreoleuciscus splendidus*는 잉어목(Cypriniformes) 모래무지아과(Gobioninae)에 속하는 일차 담수어로 Mori (1935)에 의해 최초로 기록된 우리나라 고유종이다. 본 종은 서해로 흐르는 한강과 금강, 남해로 흐르는 섬진강, 낙동강 등 여러 하천에 분포하고 있으며, 하천 중상류의 맑은 물이 흐르는 곳에서 서식한다(김 등, 2005).

우리나라는 지역적인 특성상, 크고 작은 산맥으로 인하여 복잡하게 형성된 독립 수계 및 소하천들은 각기 독특한 지형적 특성으로 인하여 종분화를 일으키는데 중요한 역할을 하고 있다(김 등, 2003). 쉬리의 경우도 백두대간을 중심으로 금강과 한강을 포함하는 서한아 수계와 섬진강과 낙동강을 포함하는 남한아 수계간 집단이 측선 상부 세로줄의

색깔, 지느러미 반점의 분포 및 뒷지느러미 기저부 반점의 유무와 같은 형태적 특징들이 서로 달라(미발표 자료) 집단간 유전학적 분석이 요구되는 실정이다.

최근 Song and Park (2006)은 쉬리 6개 집단의 미토콘드리아 Cytochrome *b*와 16S rRNA 유전자들의 부분 염기서열 분석을 통하여 집단간 유전적 변이를 비교 분석한 결과 집단간 유전적 변이는 큰 차이가 없이 거의 동일한 것으로 보고한 바 있다. 그러나 위에서 언급한 바와 같이 형태적 차이를 보이는 수계별 쉬리 집단에 대해 종 또는 아종 수준에서 유전적 차이를 재확인할 필요가 있다.

DNA 다형현상 분석 중 하나인 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) PCR은 임의의 염기서열을 가진 한 가닥의 짧은 oligonucleotide primer를 이용하여 genomic DNA의 임의 부분을 증폭시키는 실험법으로써 매우 간편하며, 알려진 염기서열 정보가 없어도 유전 다양성과 유연관계를 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 PCR증폭에 의해 만들어진 DNA단편들은 그 분자의 크기가 다르기 때문에,

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

어류의 유전적 변이 (Dinesh *et al.*, 1996; Todd *et al.*, 1997), 종 분류 (Bardacki and Skibinski, 1994; Degani *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Callejas and Ochando, 2001) 등 다양한 연구에 적용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 RAPD PCR을 이용하여 형태적으로 차이를 보이고 있는 서한아 수계의 한강과 금강, 남한아 수계의 섬진강과 낙동강에 서식하는 쉬리를 대상으로 유전적 변이 여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어 채집

본 실험에 사용한 쉬리는 2007년 4월에 서한아 수계에 속하는 한강과 금강, 남한아 수계에 속하는 섬진강과 낙동강으로 유입되는 하천들에서 죽대 (망목 4×4 mm)를 사용하여 각각 4 개체씩 채집하였으며, 자세한 채집 장소는 아래와 같다.

- 서한아 수계 (West Korea Subdistrict)

St. 1 : 강원도 평창군 평창읍 평창강 (남한강)

St. 2 : 충청남도 금산군 방우리 적벽강 (금강)

- 남한아 수계 (South Korea Subdistrict)

St. 1 : 전라북도 임실군 관촌면 조원천 (섬진강)

St. 2 : 경상남도 산청군 시천면 덕천강 (낙동강)

### 2. 채집된 어류의 genomic DNA 분리

Genomic DNA는 꼬리지느러미를 절단하여 Asahida *et al.* (1996)의 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) 추출 방법을 인용하여 이용하여 추출하였다. 상기 시료를 포함하는 완충용액에 proteinase K (Sigma, USA)를 100 mg/mL의 농도로 첨가하여 55°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 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.

### 3. RAPD PCR 분석

RAPD PCR 분석을 위해 SRILS UniPrimer kit (Seolin Co., Korea)의 random primers를 사용하였다. PCR 반응은 100 ng의 template DNA, 1 unit *Taq* DNA polymerase, 20 mM dNTP mixture, 10×PCR buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 pmole primer가

포함된 20 μL 반응 혼합액에서 수행하였다. PCR 조건은 처음 94°C에서 4분간 DNA를 denaturation 하고, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 elongation을 각각 35회 반복한 후 최종 elongation을 72°C에서 7분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 TBE buffer에서 녹인 1.5% agarose gel에서 전기영동 후 EtBr 용액으로 염색하여 DNA 단편들의 유무를 확인하였다.

통계분석은 gel상에서 눈으로 직접 확인된 DNA 단편들의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 데이터 matrix를 작성한 후, TFGA (ver. 1.3; <http://iubio.bio.indiana.edu.au/tfpga/>) 프로그램을 사용하여 (Miller, 1997) 각 개체간의 유사도 matrix를 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) 방법을 이용하여 각각을 군집화하고 이를 토대로 dendrogram을 작성하였다. 또한 POPGENE (ver. 1.31)을 이용하여 각 집단간 유전적 유사도 및 거리를 측정하였다 (Yeh *et al.*, 1997).

## 결과 및 고찰

서한아 수계와 남한아 수계의 쉬리 집단들을 구분하는 RAPD PCR 단편들의 수와 크기를 Table 1에 정리하였다. 사용한 12개의 random primer들 모두에서 특이적 PCR 단편들을 탐색할 수 있었다. 특히 서한아와 남한아 수계를 구별할 수 있는 특이적 PCR 단편들이 탐색되는 random primer의 수는 각각 11개와 5개로 나타났다. Channel catfish와 blue catfish의 유전학적 다양성 분석에서 100개의 random primer 중 중간 특이적 PCR 단편들을 생산하는 primer의 수는 75개로 평균 6.1개의 중 특이적 단편들을 검출한 바 있다 (Liu *et al.*, 1999). 또한 잉어과 어류 *Barbus* 속 8종을 대상으로 10개의 random primer들 모두에서 4~13개의 중

**Table 1.** The numbers and sizes of specific markers from *Coreoleuciscus splendidus* populations analyzed by RAPD PCR

Primer No.	West Korea Subdistrict		South Korea Subdistrict	
	Numbers	Marker sizes (bp)	Numbers	Marker sizes (bp)
1	1	1150	-	-
2	1	1420	-	-
3	2	1090, 900	1	1520
4	-	-	1	700
5	1	780	3	1670, 1200, 1040
6	1	930	2	720, 170
7	1	2150	-	-
8	1	1430	-	-
9	1	1250	-	-
10	2	2210, 1120	2	780, 540
11	1	1700	-	-
12	1	830	-	-
Total	13		9	

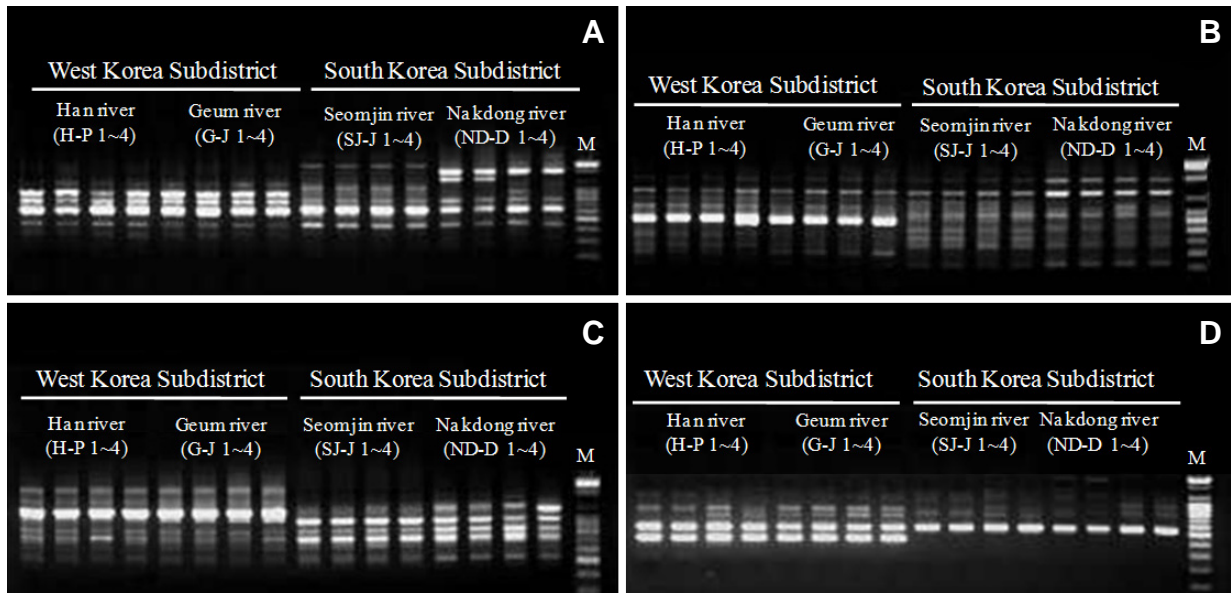


Fig. 1. RAPD PCR band patterns of four *Coreoleuciscus splendidus* populations generated with SRILS UniPrimer kit No. 1 (A), 6 (B), 10 (C) and 12 (D). H-P 1-4, Han River population; G-J 1-4, Geum River population; SJ-J 1-4, Seomjin River population; ND-D 1-4, Nakdong River population. M, 100 bp marker.

Table 2. Pariwise genetic similarity (above the diagonal) and pairwise distance (below the diagonal) among the four populations of *Coreoleuciscus splendidus* based on the RAPD analysis

Population		West Korea Subdistrict		South Korea Subdistrict	
		Han River	Geum River	Seomjin River	Nakdong River
West Korea Subdistrict	Han River	–	0.94	0.49	0.53
	Geum River	0.06	–	0.50	0.53
South Korea Subdistrict	Seomjin River	0.71	0.69	–	0.90
	Nakdong River	0.63	0.63	0.11	–

특이적 단편들이 개발된 바 있다(Callejas and Ochando, 2001). 본 실험에서도 12개의 random primer들 모두에서 서한아 수계와 남한아 수계의 쉬리 집단들을 구분할 수 있는 PCR 단편들이 나타나, Liu *et al.* (1999)의 실험에서와 같은 높은 효용성을 나타내었다. 특히 primer No. 12의 830 bp 위치에서 나타나는 서한아 집단에 특이적인 단편과 primer No. 10의 780 bp 위치에서 나타나는 남한아 집단에 특이적인 단편은 다른 primer들에서 나타나는 특이적 단편들에 비해 매우 뚜렷하게 나타나 두 집단의 구분이 매우 용이하였다. 따라서 본 실험에서 탐색된 RAPD PCR 단편들은 한강과 금강의 서한아 수계 집단들과 섬진강과 낙동강의 남한아 수계 집단들을 구분할 수 있는 DNA marker로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 여겨진다(Fig. 1).

쉬리 집단들 간의 유전적 유사도를 분석한 결과 한강과 금강 집단들은 0.94로 가장 높게 나타났으며, 한강과 섬진강 집단들은 0.49로 가장 낮았다. 집단들 간의 유전적 거리 또한 한강 집단과 금강 집단이 0.06으로 가장 가깝게 나타

났고, 한강 집단과 섬진강 집단이 0.71로 가장 멀게 나타났다(Table 2). 각 개체들 간의 유전적 거리에 기초하여 작성한 UPGMA dendrogram 결과에서도 한강과 금강의 서한아 수계 집단들과 섬진강과 낙동강의 남한아 수계 집단들이 뚜렷하게 분기되었다(Fig. 2).

RAPD PCR을 이용하여 담수 어류의 유전적 변이를 분석한 연구에서 김(2003)은 칼납자루 *Acheilognathus koreensis*와 임실납자루 *A. somjinensis*간 유전적 유사도는 0.68로 비교적 낮아 유전적으로 두 종을 명확히 구분된다고 보고하였으며, Bardakci and Skibinski (1993)는 *Oreochromis* 속 2종들과 *O. niloticus* 4아종들 간의 유전적 유사도를 분석한 결과 *Oreochromis* 속 2종들 간에는 0.7로 나타났으며, *O. niloticus*의 4아종들 간에는 0.89~0.92로 나타나 종과 아종 간 유전적 유사도 차이가 뚜렷하게 구분된 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서도 서한아 수계와 남한아 수계의 쉬리 집단들 간의 유전적 유사도는 0.49~0.53으로 칼납자루와 임실납자루 간의 0.68, *Oreochromis* 속 2종 간의 0.7보다

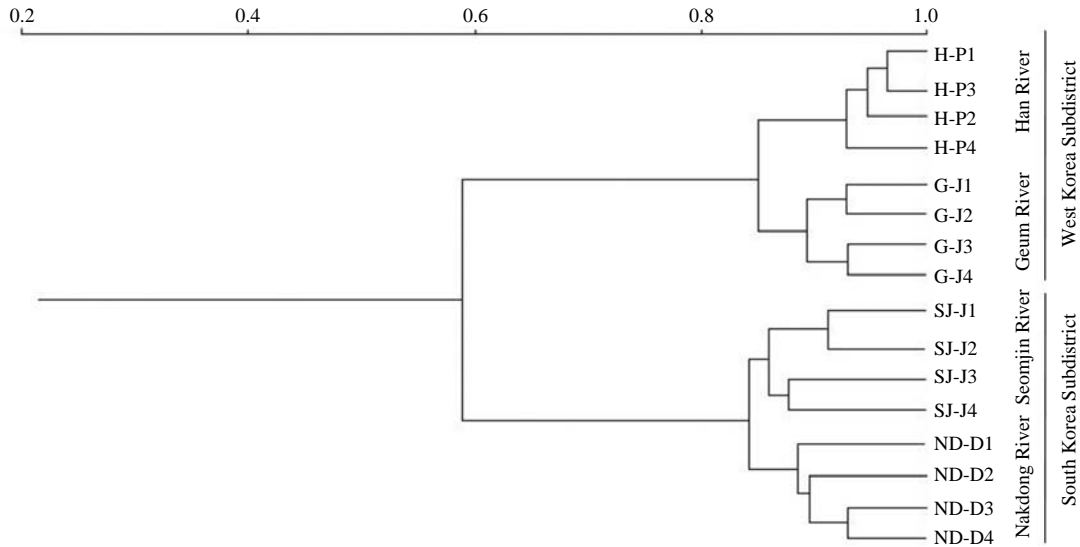


Fig. 2. UPGMA dendrogram for the four *Coreoleuciscus splendidus* populations based on average linkage cluster analysis using RAPD markers. H-P 1-4, Han River population; G-J 1-4, Geum River population; SJ-J 1-4, Seomjin River population; ND-D 1-4, Nakdong River population.

낮게 나타났으며, 각 수계 내의 집단간 유전적 유사도는 0.9~0.94로 나타나 집단 또는 아종 수준의 차이가 나타났다. 또한 UPGMA 분석 결과 두 수계 간의 유전적 거리가 0.6의 범위에서 뚜렷하게 분기되어 *Oreochromis* 속 2종 간의 유전적 거리(0.3~0.35; Bardacki and Skibinski, 1994) 보다 월등하게 높은 값을 보였고 각 수계의 쉬리 집단이 뚜렷하게 구분되어 유집되는 결과를 나타내 4대강에 서식하는 쉬리 집단은 수계 집단간 유전적으로 구분되는 독립적인 집단으로 나타났다.

따라서 본 연구에서 형태적으로 차이가 나는 서한아 수계와 남한아 수계의 쉬리 집단들 간에 특이적 RAPD PCR 단편들이 탐색되었으며, 이에 기초한 유전적 유사도와 유전적 거리는 동일 속에 속하는 다른 종간의 값들보다 유전적 유사도는 현저히 낮았고 유전적 거리는 현저히 높게 나타나며, 서한아 수계의 한강, 금강 집단과 남한아 수계의 섬진강, 낙동강에 서식하는 쉬리 집단은 서식하는 수계에 따라 유전적으로 잘 구분되어 나타났다. 한편 한반도의 수계는 백두산에서 지리산으로 이어지는 백두대간을 경계선으로 서한아 지역과 남한아 지역 및 동북한아 지역으로 뚜렷하게 구분이 되며 이러한 지질학적 혹은 생태학적 조건 등의 상호작용에 의하여 생물종은 제한된 분포 범위를 지니게 된다(김 등, 2005). 본 연구에서도 서한아와 남한아 수계에서 서식하는 쉬리 집단은 중 수준에서의 유전적 변이를 보였으며, 우리나라의 담수어류 분포구계와 잘 일치하고 있음을 나타내었다. 그러나 본 연구에서는 동해안에 서식하는 쉬리 집단에 대한 분석이 이루어지지 않았으므로 차후 이들 집단에 대한 분석이 이루어져야 할 것이다. 또한 본 연구에서

관찰된 변이를 중심으로 우리나라에 분포하는 모든 쉬리 집단들을 대상으로 다양한 분자계통학적 및 집단유전학적 분석과 함께 형태형질들의 분석에 의한 본 종의 분류학적 재검토가 요구된다.

## 요 약

본 연구는 RAPD PCR 분석을 통하여 한국의 서한아 수계(한강, 금강)와 남한아 수계(섬진강, 낙동강)에 서식하는 쉬리 집단들 간의 유전변이를 비교하였다. 4집단들 간의 유전적 변이를 분석한 결과, 사용한 12개의 random primer들 모두에서 서한아 수계 집단과 남한아 수계의 집단들을 구분하여 주는 특이적 PCR 단편들을 확인할 수 있었다. 유전적 유사도 분석에서 한강, 금강의 서한아 수계 집단들과 섬진강, 낙동강의 남한아 수계 집단들의 유전적 유사도는 0.49~0.53로 낮게 나타났고 유전적 거리는 0.63~0.71로 높게 나타났다. 유전적 거리에 기초한 UPGMA dendrogram 분석에서도 서한아 수계와 남한아 수계의 집단들이 명확하게 구분되었다. 따라서 서한아와 남한아 수계의 쉬리 집단은 유전적 구조에 있어 큰 차이가 있으며, 남한아 수계의 쉬리는 서한아 수계 쉬리와 진화적으로 뚜렷하게 구분되는 집단으로 판단된다.

## 인 용 문 헌

김동준. 2003. 칼납자루 *Acheilognathus koreensis*와 임실납자루

- A. somjinensis*의 분자계통학적 연구. 순천향대학교 대학원 석사학위 논문, 35pp.
- 김영자 · 김일찬 · 이세영 · 이완옥 · 조용철 · 이재성. 2003. 한국산 어류 미토콘드리아 DNA의 분자계통학적 이용 및 보존. 한국육수학회지, 36: 221-234.
- 김익수 · 최 윤 · 이충렬 · 이용주 · 김병직 · 김지현. 2005. 한국원색어류대도감. 교학사, 서울, pp. 39-116.
- Asahida, T.T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffer containing high concentration of urea. Fish. Sci., 62: 727-730.
- Bardacki, F. and D.O.F. Skibinski. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish, species and subspecies identification. J Hered., 73: 117-123.
- Callejas, C. and M.D. Ochando. 2001. Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian peninsula. J. Fish Biol., 59: 1589-1599.
- Degani, G., J. Pitcovsiki, T. Dobski and Y. Plotsky. 1997. DNA fingerprint bands applied to analysis of variations in angel-fish (*Pterophyllum scalare*) (Cichlidae) strains. J. Aquacult. in the Trop., 12: 43-51.
- Dinesh, K.R, T.M. Lim, W. Chan and V.P.E. Phang. 1996. Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. Aquacult. Intl., 4: 19-30.
- Liu, Z.J., P. Li, B.J. Aegue and R.A. Dunham. 1999. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. Aquaculture., 174: 59-68.
- 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.Marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>.
- Mori, T. 1935. Studies on the geographical distribution of freshwater fish in Korea. Bull. Biogeogr. Soc. Jap., 7: 35-61.
- Song, H.B. and G.M. Park. 2006. A Molecular genetic variation among intra-populations of Korean shiner, *Coreoleuciscus splendidus* Mori (Cyprinidae). Kor. J. Ichthyol., 18: 78-86.
- Todd, C.D., A.M. Walker, K. Wolff, S.J. Northcott, A.F. Waler, M.G. Ritchie, R. Hoskins, R.J. Abbott and N. Hazon. 1997. Genetic differentiation of populations of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Kroyer) ectoparasitic on wild and farmed salmonids around the coasts of Scotland: evidence from RAPD marker. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 210: 251-274.
- Yeh, F.C., T. Boyle, Y. Rongcai, Z. Ye and J.M. Xian. 1999. POP-GENE, Version 1.31. A Microsoft Window Based Free Ware for Population Genetic Analysis., University of Alberta, Edmonton.