

한국산 쟁뚝어 (*Boleophthalmus pectinirostris*)와 남방쟁뚝어 (*Scartelaos gigas*) (Gobiidae)의 분자유전학적 계통연관과 DNA 다형화

최기호 · 정의영¹ · 박갑만^{2,*}

한국수산자원관리공단 서해지사, ¹다이브코리아 부설 한국해양환경생태연구소, ²관동대학교 의학과

Phylogenetic Relationship and DNA Polymorphism of *Boleophthalmus pectinirostris* and *Scartelaos gigas* (Teleostei: Gobiidae) of Korea by Ki Ho Choi, Ee Yung Chung¹ and Gab Man Park^{2,*} (Korea Fisheries Resources Agency West Sea Branch, Gunsan 573-030, Korea, ¹Korea Marine Environment & Ecosystem Research Institute, Dive Korea, Bucheon 420-857, Korea; ²Department of Environmental Medical Biology, Kwandong University College of Medicine, Gangnung 210-701, Korea)

ABSTRACT Phylogenetic relationships and DNA polymorphism among local populations of two Korean gobiidae species: *Boleophthalmus pectinirostris* and *Scartelaos gigas* were investigated based on 12S and 16S mitochondrial DNA and mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. DNA polymorphisms of *B. pectinirostris* between Suncheon and Gunsan populations were 100% identity from 434 bp segment of 12S rRNA gene and from 444 bp segment of mitochondrial cytochrome *b* genes, and 99.6% (2 bp different) identity from 484 bp segments of 16S rRNA genes. These results indicated the long period of geographic isolation between two populations of *B. pectinirostris* in Korea caused such high degrees of DNA polymorphisms. Based on the phylogenetic tree constructed from the two gobiid species in Korea, two genetically distinct groups of *B. pectinirostris* and *S. gigas* groups were recognized.

Key words : *Boleophthalmus pectinirostris*, *Scartelaos gigas*, Gobiidae, 12S, 16S, mitochondria cytochrome *b* gene

서 론

우리나라 망둑어과 어류는 현재 66종이 보고되었으며, 이 중 쟁뚝어와 남방쟁뚝어는 말뚝망둑어아과에 속하며 이들 2종은 형태학적으로 유사하며 가슴지느러미 기저부의 흰색 가로 줄무늬로 구분하고 있다 (Iwata and Jeon, 1987; 김, 1997; 한 등, 2012). 특히 남방쟁뚝어의 경우 Itawa and Kim (1987)에 의해 근래에 기록된 종이다. 어류는 일반적으로 주로 형태학적 분류 방법에 의해 분류되었으나, 지리적, 환경적 변화에 따른 형태적 변이 등이 나타나기도 한다 (Park

and Song, 2010). 망둑어과 어류 중 쟁뚝어 (*Boleophthalmus pectinirostris*)와 남방쟁뚝어 (*Scartelaos gigas*)는 종간에 생리·생태적으로 매우 유사하며 (Ryu *et al.*, 1995), 형태 및 서식환경 또한 비슷하여 환경적응과 관련된 종의 분화 및 계통분류에 어려움이 남아 있다. 이들 종들에서 현재까지 연구 보고된 것으로는 산란행동 및 출현 (Dotsu and Nakano, 1982), 인공증식 (Koga *et al.*, 1989), 생태와 생활사 (Ryu *et al.*, 1995), 연령과 성장 (Jeong *et al.*, 2004)에 관한 보고가 있다.

최근 분자유전학적 연구를 통해 이들의 집단간 유전자 변이의 다양성 및 종 또는 아종 수준에서 계통학적 관계를 확인하는 연구가 활발히 진행되고 있지만 (Wang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004; Keith *et al.*, 2005), 미토콘드리아 DNA 염기서열에 관한 연구는 유전학적 및 진화적 측면에서 매우

*Corresponding author: Gab Man Park Tel: 82-33-649-7480
Fax: 82-33-641-1074, E-mail: gmpark@kd.ac.kr

중요하나 지금까지 조사된 것은 genome의 약 3~5% 정도로 집단 간 계통적 연구와 비교·분석된 자료는 극히 적다 (Hillis *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). 근래들어 PCR을 이용한 DNA 증폭이 용이함으로서 미토콘드리아 유전자의 염기서열 자료를 활용한 관련 연구들이 보고되고 있다 (Perdices *et al.*, 2004). 망둑어과 어류의 분자유전학적 계통관계에 관하여 현재까지 연구 보고된 것으로는 12S rRNA를 이용한 문절망둑 *Acanthogobius hasta* (Kim *et al.*, 2004)과 망둑어류 (Wang *et al.*, 2001) 그리고 mitochondria cytochrome *b* 유전자의 염기서열 변이 (Kim *et al.*, 2003) 등이 보고되어 있다. 본 연구는 망둑어과 어류 중 형태학적으로 흡사한 짱뚱어 (*B. pectinirostris*)와 남방짱뚱어 (*S. gigas*)를 대상으로 12S rRNA, 16S rRNA 및 mitochondria cytochrome *b* 유전자의 염기서열 분석을 통해, 우리나라 짱뚱어의 종내 지리적 분자 계통분류학적 위치를 밝히고 또한 이 종들의 분자유전학적 특성을 파악하고자 하였다. 한편 짱뚱어와 함께 남방짱뚱어를 순천과 해남에서 채집해 한국산 망둑어과 내에서 계통학적 위치를 비교·분석하였다.

재료 및 방법

1. 표본 채집

짱뚱어 (*B. pectinirostris*)는 2010년 4월부터 2011년 3월 까지 순천지역 (전남 순천시 별량면 마산리)과 군산지역 (군산 옥구읍 어은리)에서 채집된 표본을 살아있는 상태로 실험실로 옮겨와 사용하였고, 남방짱뚱어 (*S. gigas*)는 순천 (전남 순천시 별량면 마산리)과 해남지역 (전남 해남군 황산면 부곡리)에서 채집하여 실험에 사용하였다.

2. 짱뚱어의 종내 (intra-species) 집단간 유전자 변이 비교

먼저 종내 유전자의 변이정도를 비교하기 위해 짱뚱어를 대상으로 순천과 군산지역에서 각각 16개체와 21개체를 대상으로 DNA를 분리하였다. 종내의 유전자 변이와 유전적 다형현상을 밝히기 위해, 12S rRNA와 16S rRNA, 그리고 mitochondrial cytochrome *b* 유전자의 염기서열을 통해 비교하고자 하였다.

3. 짱뚱어와 남방짱뚱어의 종간의 변이 비교

또한 망둑어과내 짱뚱어와 함께 말뚝망둑어아과 (subfamily)에 속하며 유사종인 남방짱뚱어를 대상으로 두 종간에 유전자 변이를 밝히기 위해 순천과 해남지역에서 채집하여 짱뚱어와 동일한 방법으로 3가지 영역의 염기서열을 비교·분석하였다.

4. 연구방법

1) DNA의 추출

실험 재료는 성체를 대상으로 종별, 지역별로 구분하여 분류한 후 사용하였다. 근육 조직 0.5~1.0 g 정도를 막자사 발에 넣어 액화질소가스 (-196°C)로 충분히 냉각시킨 다음 분쇄하여 DNeasy Tissue Kit (Qiagen, cat No. 69504)를 이용하여 DNA를 분리하였다 (Sambrook *et al.*, 1989).

2) 12S와 16S rRNA 및 mitochondria cytochrome *b* 유전자 증폭

12S rRNA는 먼저 external primers로 12SH (5'-tgactgcagagggtgacggggcggtgtgt-3')와 12SL (5'-aaaagcttcaaacctgggattgatacccccactat-3') (Huysse *et al.*, 2004)을 사용하여 증폭하였다. PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer)을 사용하여 추출한 DNA를 주형 (template)으로 TakaRa ExTak Kit (Takara Co., LTD.)를 사용하여 denaturing (95°C에서 30초), annealing (54°C에서 30초), extension (72°C for 45초)을 35회 반복하였으며, 이후 4°C에서 처리하였다. PCR 증폭 후, 1.5% agarose gel을 사용 전기영동하여 증폭된 크기를 확인하였다. 이를 다시 DNA Purification Kit (Ultra Clean 15, MO BIO, cat no. 121000-300)를 사용하여 DNA를 순수 정제하였다. 염기서열 결정은 PCR 증폭산물을 Ligation 반응 (New Improved 2x Rapid ligation buffer, promega, A1360)을 시켰으며, 이것을 재조합 DNA를 만들기 위해 pGem T-Easy Vector System II (Promega, cat. no. A1380)를 사용하였다. Plasmid DNA의 추출은 QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, cat. No. 27106)를 사용하였다. 벡터내 insert DNA를 확인하기 위해 *EcoRI* digest (promega R6011)를 처리하여 확인한 후 염기서열을 분석하였다.

한편, 16S rRNA의 primer는, 16SH (5'-ccggtctgaactcagatcagct-3')와 16SL (5'-cgctgtttatcaaaaacat-3')를 사용하였다 (Garcia-Vazquez *et al.*, 2006). PCR 반응은 initial denaturation (95°C에서 5분), denaturing (95°C에서 20초), annealing (48°C에서 20초), extension (72°C에서 20초)을 30회 반복하였으며, 다시 72°C에서 7분간 1회 처리하였다. 나머지 염기서열 분석방법은 12S rRNA 방법과 동일하게 적용하였다. 또한, mitochondria cytochrome *b* 유전자를 위한 primer는, L15803 (5'-tggggcggtttctcagtag-3')와 H16526 (5'-ctttgggagyyrrgggtgrga-3')를 사용하였다 (Keith *et al.*, 2005). PCR 반응은 initial denaturation (95°C에서 1분), denaturing (91°C에서 1분), annealing (52°C에서 1분), extension (72°C에서 2분 30초)을 30회 반복한 후 다시 denaturing (91°C에서 1분), annealing (52°C에서 1분), extension (72°C에서 10분)을 1회 처리하였다. 나머지 염기서열 분석방법은 12S rRNA 방법과 동일하게 적용하였다.

Table 1. Consensus sequences of the 12S rRNA genes for Korean Gobiidae

1. <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> (Suncheon)	GGGCGGTGTGTGCGCGCTTCAGGGCCAGTTTCAGGGGGAC
2. <i>B. pectinirostris</i> (Gunsan)
3. <i>Scartelaos gigas</i> (Suncheon)
4. <i>S. gigas</i> (Haenam)
5. <i>B. pectinirostris</i> (AF265363)
1. ACTCTATTTTC-ACCCCTTACTGCTAAATCCTCCTTTAGATGTTTG-TTTCAGTCCATCATCCGT-ATTCAGTGTAG-CAG	
2.	
3. C·C·.....A·G·.....G·.....AGA-....	
4. C·.....A·G·.....G·.....AGA-....	
5.	
1. TGAATGTAGCCCATTCTTCCCTCTCGTTGGCTACACCTCGACCTGGCGTTTTAGGTACTACCAATTGTGCTCACTTTG	
2.	
3.	
4.	
5. T.....	
1. GGCCCTTACAGGGTAAGCTGACGACGGCGGTATATAGGCGG-AAAATACAAGAGAGGGTGAGGTTTAACGGGGGTCATC	
2.	
3. ··G·.....	
4. ··G·.....	
5.	
1. GGTCTAGAACAGGCTCCTCTAGGGGGGTCTAAAGCACCGCCAAGTCTTTGGGTTTTAAGCTGTAGCTCGTAGTTCCCT	
2.	
3. G.....	
4. G.....	
5.	
1. GGCAAAT-GAGGG-TGTAAGATG--T--GATTTGAGTTTAGGGCCAGGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTT	
2.	
3.-AG·.....A·-----C·CC·T·.....T·.....	
4.-AG·.....A·-----C·CC·T·.....T·.....	
5.-----T·.....	

3) 계통 유전학적 분석

염기서열을 결정한 후 Clustal X 프로그램 (Thompson *et al.*, 1997)을 사용하여 염기서열을 배열하였다. 계통수의 극성을 결정하기 위한 참조분류군 (outgroup)으로 GenBank로부터 망둑어과에 속하는 4종, *Sicyopterus pugnans* (AY929275), *B. pectinirostris* (AF265363), 그리고 *Luciogobius guttatus* (AB108569)를 사용하였다. 계통분석은 Kimura-2-Parameters Distance에 사용되는 distance method는 MEGA version 3.0 (Kumor *et al.*, 2004)을 사용하여 Neighbor-Joining tree를 만들었다.

결 과

1. 쟁뚱어의 두 지역 (순천지역과 군산지역)간 12S와 16S rRNA 유전자 및 mitochondria cytochrome b 유전자의 염기서열 분석

본 실험을 통해 밝혀진 한국산 쟁뚱어의 순천지역과 군

산지역의 12S rRNA 유전자와 16S rRNA 유전자 및 mitochondria cytochrome b 유전자의 염기서열을 정렬 (alignment)한 결과는 Table 1에서 Table 3에 나타난 바와 같다. 쟁뚱어의 두 지역간 염기서열을 분석한 결과, 12S rRNA는 434 bp (base pair)의 염기서열을 얻었으며, 순천지역과 군산지역의 개체간에는 100% 동일한 염기서열을 보였으며, 16S rRNA 유전자 비교에서는 총 484 bp의 염기서열 중 99.6%의 차이로 2 bp가 치환된 것으로 나타났고, mitochondria cytochrome b 유전자의 분석 결과, 444 bp의 염기서열을 얻었으며, 두 지역간 100% 염기서열의 일치도를 보였다 (Tables 4~6).

이상의 3가지 유전자를 비교해본 결과를 종합해 보면, 한국산 쟁뚱어의 순천지역과 군산지역의 개체군 내에서 나타난 유전적 다형은 0~2 bp로서 차이를 보이지 않았다.

2. 쟁뚱어와 남방쟁뚱어 종간의 변이

망둑어과내 쟁뚱어와 남방쟁뚱어를 대상으로 12S와 16S rRNA 유전자 및 mitochondria cytochrome b 유전자의 염기

Table 2. Consensus sequences of the 16S rRNA genes for Korean Gobiidae

1. <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> (Suncheon)	TAATAGCGGCTGCACCATTAGGGGGTCTGATCCAACATC
2. <i>B. pectinirostris</i> (Gunsan)
3. <i>Scartelaos gigas</i> (Suncheon)
4. <i>S. gigas</i> (Haenam)
5. <i>Luciogobius guttatus</i> (AB108569)AT.....
1. GAGGTCGTAAACCCCTTGTTCGATATGGGCTCTAAAAGGGGATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTAACTCGGTCCGTTGATC	
2.	
3.	
4.	
5.	
1. GGCTTAGCCGGATCTTTTTGGTCAGATATTCTGTTAGTGAGAGCTGTGGCTCTAGCTTTAAGGGTATAATCCCTATTCCA	
2.	
3.T.....G.....G.....T·CA.....G.....G··G··C.....	
4.T.....G.....G.....T·CA.....G.....G··G··C.....	
5.T.....C·G·A.....G.....CT.....T.....G.....GG··G··--GG·C.....	
1. CATGGGGGTTTTTGTTCCTCCCGCGGTCGCCCAACCAAAGACAGGAGGGCAGATACCATCTTGTGTTTCCATT-TATC	
2. ··G.....T.....	
3. ··C.....C··G·A·T··T.....T.....GG··T.....	
4. ··C.....C··G·A·T··T.....T.....GG··T.....	
5.A·A.....A.....G····GGG···T·A··AA··T····G·	
1. TGGGGTTTTTAACATGGGCTGCCTTTTGTCTAAAGCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTTATGTTAATATCCCGCTTCTGCAC	
2.	
3.T.....A.....GAT···T.....	
4.T.....A.....GAT···T.....	
5. ·A·TG··T.....G···T.....T.....	
1. GGGGGGATCAATTTTCATTGACTAGAAAAAGGAGACAGCTTGGCCCTCGTTATGCCATTACTGGTCTCCATTAAAAAG	
2.	
3. ··A.....	
4. ··A.....	
5. ··AA··T.....G.....A.....A.....T.....	
1. ACAAGTGATTACGCTACCTTCGCACGGTCAAATACCGGCGCCG	
2.	
3.A.....T.....	
4.A.....T.....	
5.	

서열을 비교·분석하였다.

먼저 망둑어과 내 2종을 대상으로 한 12S rRNA 유전자의 염기서열 차이는 순천지역에서 채집된 짱뚱어와 남방짱뚱어는 17~18bp의 차이를 보였으며, 종내 개체 차이는 짱뚱어는 순천지역과 군산지역 개체군간에 100%의 상동성을 나타냈으며, 남방짱뚱어는 순천지역 집단에서는 개체간 변이가 없으며 해남지역 집단에서는 하나의 염기서열의 차이를 보였다. 16S rRNA 유전자의 경우, 2종간에 염기서열 차이는 짱뚱어와 남방짱뚱어 사이에서 29bp를 보였으며, 종내 개체 차이는 짱뚱어는 99.6%로 단지 2개의 염기서열의 차이를 보였으나, 남방짱뚱어는 순천지역과 해남지역 개체군간에 100% 동일하였다. mitochondria cytochrome *b* 유전자의 2종간 염기서열 차이는 짱뚱어와 남방짱뚱어 사이에

서는 76~77bp의 차이를 보였고, 종내 개체 차이는 짱뚱어는 지역간 차이가 없었으나, 남방짱뚱어는 순천지역과 해남지역 개체군간에 2bp의 차이를 보였다.

3. 분자계통수 (phylogenetic tree)

12S와 16S rRNA와 mitochondria cytochrome *b* 유전자에 근거한 분자계통수는 Fig. 1에서 Fig. 3에 나타내었다. 짱뚱어와 남방짱뚱어는 두 그룹으로 분리되었다. 3가지 유전자를 활용해서 작성한 계통수의 분지양상 (tree topology)을 보면, 망둑어과의 어느 조상종으로부터 남방짱뚱어로 분화되었으며, 그 후 짱뚱어로 분화되었을 것으로 추정되었다.

Table 3. Consensus sequences of the mitochondrial cytochrome *b* genes for Korean Gobiidae

1. <i>Boleophthalmus pectinirostris</i> (Suncheon)	CAGAAGAGGAAGTGGGGGCGGCGCGGGAAGTTAGACTTC
2. <i>B. pectinirostris</i> (Gunsan)
3. <i>Scartelaos gigas</i> (Suncheon)T...A·AA·G...A·T·C·AG·C·
4. <i>S. gigas</i> (Haenam)T...A·AA·G...A·T·C·AG·C·
5. <i>Sicyopterus pugnans</i> (AY929275)T...T·A·A·TG...A·G...G...·
1. GTTGTTTAGATGTGTGGAGGAAGGGACTACTATAAGGACTAAGATAGAGGCAAGTAAGGCAAGGACTCCTCCAAGTTTG	
2.	
3.G·G...A·A·A·G...G·C...GA...T...G·G...T...T·A...	
4.G...A·A·A·G...G·C...GA...T...G·G...T...T·A...	
5.G·G...A·A·G...T·AT...GA·G·C...G·G·C·AC·C...C...·	
1. TTAGGAATAGACCGAAGGATGGCATAGGCAAATAGGAAGTATCACTCTGGCTTGATATGAGGGGGTGTACAACTGGGTT	
2.	
3.G...T...A·A...A...T...T·A...C...T·C...	
4.G...T·A·A·A...A...T...T·A...C...T·C...	
5. ·G·G·G...T·A...A...T...T...G·C...T·G...	
1. GGCAGGTGTAAAATTGTCTGGGTCTCCTAAGTAATTAGGGGCAAATAGTGCTAGGGATGTCAGGGCAGTGAGTATGATGG	
2.	
3. T...G·G...G...A·G·G...G...A·T...A...	
4. T...G·G...G...A·G·G...G...A·T...A...	
5. T·G·G·G·G...G...C·G·G...AG·G·A...C...T·T...AGT·C...	
1. CGAAGCCTAGGAGGTCTTTGTATGAGAAGTATGGGTGGAATGGAATTTTGTCTGCATCTGAGTTAAACCCAGGGGGTTG	
2.	
3. ·A·T·G...G...G...G·G...C·T·T...A	
4. ·A·T·G...G...G...G·G...C·T·T...A	
5. ·A...A...A...G...G...G...C·AGCA...	
1. TTGGATCTGTTTCATGAAGAAATAAAAGATGAAGAACTGTAACAGCAAGGATAACAAAAGGGAAAAGAGAAAGTGAATG	
2.	
3. ·T·G·A·C...G·G·G·G...G...G·A·T...T...T...G...A·	
4. ·T·G·A·C...G·G·G·G...G...G·A·T...T...T...G...A·	
5. ·T...C...T...G·G·T·G·TA·T...C...T...G·G...G...G·	
1. CAAA	
2.	
3.	
4.	
5.	

Table 4. Pairwise differences (nucleotide differences) among 12S rRNA genes of Korean Gobiidae

Species	1	2	3	4	5
1. <i>B. pectinirostris</i> (Suncheon)		100% (0)	95.9% (18)	96.1% (17)	99.3% (3)
2. <i>B. pectinirostris</i> (Gunsan)			95.9% (18)	96.1% (17)	99.3% (3)
3. <i>S. gigas</i> (Suncheon)				99.8% (1)	95.2% (21)
4. <i>S. gigas</i> (Haenam)					95.4% (20)
9. <i>B. pectinirostris</i> (AF265363)					

Table 5. Pairwise differences (nucleotide differences) among 16S rRNA genes of Korean Gobiidae

Species	1	2	3	4	5
1. <i>B. pectinirostris</i> (Suncheon)		99.6% (2)	94.0% (29)	94.0% (29)	90.3% (47)
2. <i>B. pectinirostris</i> (Gunsan)			94.0% (29)	94.0% (29)	89.9% (49)
3. <i>S. gigas</i> (Suncheon)				100% (0)	89.9% (49)
4. <i>S. gigas</i> (Haenam)					89.9% (49)
5. <i>L. guttatus</i> (AB108569)					

Table 6. Pairwise differences (nucleotide differences) among mitochondrial cytochrome *b* genes of Korean Gobiidae

Species	1	2	3	4	9
1. <i>B. pectinirostris</i> (Suncheon)		100% (0)	82.7% (77)	82.9% (76)	79.7% (90)
2. <i>B. pectinirostris</i> (Gunsan)			82.7% (77)	82.9% (76)	79.7% (90)
3. <i>S. gigas</i> (Suncheon)				99.5% (2)	82.7% (77)
4. <i>S. gigas</i> (Haenam)					82.9% (76)
5. <i>S. pugnans</i> (AY929275)					

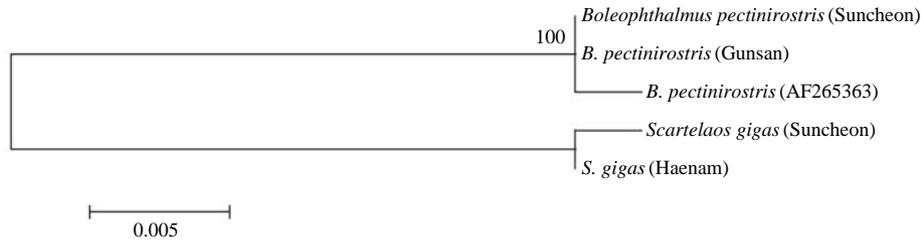


Fig. 1. Tree depicting relationships among the family Gobiidae inferred from 12S rRNA gene sequences data using *Sicyopterus pectinirostris* (AF265363) as an outgroup. Kimura-2-parameter model and the tree constructed using the Neighbor-Joining method.

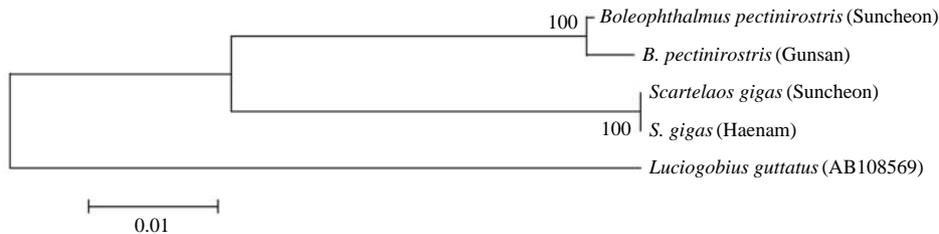


Fig. 2. Tree depicting relationships among the family Gobiidae inferred from 16S rRNA gene sequence data using *Luciogobius guttatus* (AB108569) as an outgroup.

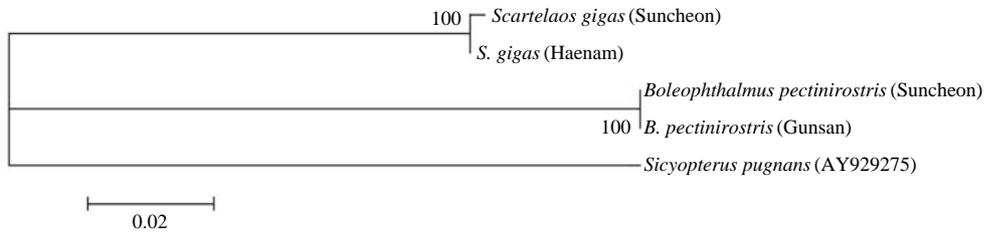


Fig. 3. Tree depicting relationships among the family Gobiidae inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequences data using *Sicyopterus pugnans* (AY929275) as an outgroup.

고찰

형태학적으로 유사한 종들간에 형태형질을 제외한 종간에 분류 및 계통에 세포질내 유전물질인 미토콘드리아 유전물질이 진화나 계통분석에 널리 이용되고 있다. 최근에 미토콘드리아 DNA 기법이 소개되면서 어류의 종내 (intra-species) 또는 종간 (inter-species)의 계통유연관계 분석이 가능해 지기 시작하였다. 특히 12S rRNA와 16S rRNA, mito-

chondria cytochrome *b* 등의 유전자 염기서열을 이용한 분자생물학적 연구는 분자계통학 연구에 있어 매우 중요한 도구로 사용될 수 있는 커다란 잠재력과 실용성이 입증되었다 (Huyse *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Keith *et al.*, 2005; Eva *et al.*, 2006).

먼저 쟁뚱어 종내 개체간 유전적 차이를 밝히기 위해 mitochondria내에 3가지 유전자를 분석한 결과, 순천지역과 군산지역간의 염기서열은 12S rRNA는 총 434 bp (base pair)

의 염기서열을 얻었으며 이를 비교 분석한 결과, 순천지역과 근산지역의 집단 간에는 100% 동일한 염기서열을 보였고, 16S rRNA 유전자는 총 484 bp의 염기서열 중 99.6%의 차이로 단지 2 bp가 치환된 것으로 나타났고, mitochondria cytochrome *b* 유전자의 경우, 444 bp의 염기서열을 얻었으며 두 지역 간 염기서열은 100%의 일치도를 보였다. Kim *et al.* (2004)은 우리나라 망둑어과 어류 중 문절망둑(*Ancanthogobius hasta*)을 대상으로 16,663 bp 길이인 전체 mitochondria를 분석하였으며, 전체 미토콘드리아 genome은 two RNA, 22tRNA와 13개의 protein-coding 유전자로 구성된 것으로 보고한 바 있다. 최근에 담수산 어류인 자가사리를 대상으로 지역개체군간 유연관계를 cytochrome *b* 유전자를 이용하여 분석한 결과, 개체군간에 크게 3집단으로 유전적 격리가 일어난 것으로 보고하였다(Kim *et al.*, 2006). 한국산 쟁뚱어를 대상으로 한 동일한 종내에서 서식지(서해, 남해)에 따른 유전적 차이나 지리적 거리의 차이가 있을 것으로 예상하였으나 이상의 3가지 유전자를 비교해 본 결과를 종합해 보면, 종내 개체 변이와 지역별 변이는 일어나지 않은 것으로 밝혀졌다.

또한 쟁뚱어와 남방쟁뚱어 2종간 비교(inter-species)에서는 순천지역 쟁뚱어와 해남지역 남방쟁뚱어를 12S rRNA 유전자와 16S rRNA 유전자 및 mitochondria cytochrome *b* 유전자 염기서열을 비교 분석한 결과, 각각 96.1% (17 bp), 94.0 (29 bp), 그리고 82.9% (76 bp)로 나타나 두 종의 유전학적 차이는 크게 나타났다. Chen *et al.* (1998)은 망둑어과 2종(*Rhinogobius maculafasciatus*, *R. giurinus*)을 대상으로 mitochondria DNA의 control region 부위 유전자를 비교 분석한 결과, 두 종간에 11.3~11.7% 그리고 *R. giurinus*의 종내 변이는 0.8~1.8% 차이를 보였다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 쟁뚱어와 남방쟁뚱어 두 종간에 3.9~17.1%의 차이를 보여 서로 다른 종으로 볼 수 있을 것으로 사료되었다. 어류의 분화시기를 추정하기 위한 분자시계 개념이 도입되어 분화시간을 여러 학자들에 의해 보고되었다(Cantatore *et al.*, 1994; Orti *et al.*, 2004; Sota *et al.*, 2005). Cantatore *et al.*, (1994)은 cytochrome *b* 유전자를 이용한 연구에서 0.8% 염기차이를 백만년으로 계산하였고, Orti *et al.*, (2004)은 2.8% 당 백만년으로 계산하였다. 본 연구에서 쟁뚱어와 남방쟁뚱어의 경우, cytochrome *b* 유전자에서 17.1%의 차이를 보여 이를 분자시계에 도입하여 2종간에 분화시기를 계산해 보면, 최소 6백만년전에 분화된 것으로 추정할 수 있다. Peng *et al.* (2004)은 중국산 중어의 지역간 근연관계를 밝히고자 미토콘드리아 cytochrome *c* oxidase subunit I 유전자와 12S ribosomal RNA 유전자를 비교한 바, 12S 유전자의 경우 1개의 염기변이만이 관찰되었고, cytochrome *c* 유전자의 경우 100% 일치하는 것으로 보고하였다. 앞으로 망둑어과와 남방쟁뚱어에 대한 추가 연구로 집단 유전학 연구

에 주로 이용되는 핵내 DNA 중 microsatellite (msDNA) 영역의 유전자 분석을 통해 대립유전자의 차이를 살펴볼 필요가 있다고 생각된다.

이와 같이 형태학적으로 흡사한 쟁뚱어와 남방쟁뚱어는 유전적으로 차이를 보였으며, 분자생물학적 연구에서 지역간 개체 차이는 외부형태학적 차이에 의한 종 분류보다 많은 정보를 제공하였으나 앞으로 망둑어 과내 좀 더 많은 종이나 지역을 대상으로 세밀한 연구가 이루어지면 한국산 망둑어과의 종내 계통유전학적 관계가 밝혀질 것으로 사료된다.

요 약

우리나라 망둑어과 어류 중 말뚝망둑어아과에 속하며 형태학적으로 흡사한 쟁뚱어(*B. pectinirostris*)와 남방쟁뚱어(*S. gigas*)를 대상으로 12S rRNA, 16S rRNA 및 mitochondria cytochrome *b* 유전자의 염기서열 분석을 통해, 종내 및 종간의 분자유전학적 특성을 파악하고자 하였다. 쟁뚱어 종내 개체간 유전적 차이를 밝히기 위해 mitochondria내에 3가지 유전자를 분석한 결과, 순천지역과 근산지역간의 염기서열은 12S rRNA는 총 434 bp (base pair)의 염기서열을 얻었으며 이를 비교 분석한 결과, 순천지역과 근산지역의 집단 간에는 100% 동일한 염기서열을 보였고, 16S rRNA 유전자는 총 484 bp의 염기서열 중 99.6%의 차이로 단지 2 bp가 치환된 것으로 나타났고, mitochondria cytochrome *b* 유전자의 경우, 444 bp의 염기서열을 얻었으며 두 지역 간 염기서열은 100%의 일치도를 보였다. 한국산 쟁뚱어를 대상으로 한 동일한 종내에서 서식지(서해, 남해)에 따른 유전적 차이나 지리적 거리의 차이가 있을 것으로 예상하였으나 이상의 3가지 유전자를 비교해 본 결과를 종합해 보면, 종내 개체 변이와 지역별 변이는 일어나지 않은 것으로 밝혀졌다. 또한 쟁뚱어와 남방쟁뚱어 2종간 비교(inter-species)에서는 순천지역 쟁뚱어와 해남지역 남방쟁뚱어를 12S rRNA 유전자와 16S rRNA 유전자 및 mitochondria cytochrome *b* 유전자 염기서열을 비교 분석한 결과, 각각 96.1% (17 bp), 94.0 (29 bp), 그리고 82.9% (76 bp)로 나타나 두 종의 유전학적 차이는 크게 나타났다. 따라서 본 연구에서 나타난 쟁뚱어와 남방쟁뚱어 두 종간에 3.9~17.1%를 보여 서로 다른 종으로 볼 수 있을 것으로 사료되었다.

인 용 문 헌

- 김익수. 1997. 한국동식물도감. 제37권 동물편 (담수어류). 교육부, 629pp.

- 한상훈 · 김병직 · 김화정 · 이승기 · 안정현. 2012. 국가 생물종 목록집[척추동물]. 국립생물자원관, 484pp.
- Cantatore, P., M. Roberi, G. Pesole, A. Ludovico, F. Milella, M.N. Candaleta and C. Saccone. 1994. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than mammals. *J. Mol. Evol.*, 39: 589-597.
- Dotsu, R. and M. Nakano. 1982. A study on the proliferation and culture of *Boleophthalmus chinensis*. *Bull. Fish. Nagasaki Univ.*, 35: 1-13.
- Eva, G.V., Z.I. Izquierdo and J. Perez. 2006. Genetic variation at ribosomal genes supports the existence of two different European subspecies in the megrim *Lepidorhombus whiffiagonis*. *J. Sea Res.*, 56: 59-64.
- Garcia-Vazquez, C., J.I. Izquierdo and J. Perez. 2006. Genetic variation at ribosomal genes supports the existence of two different European subspecies in the megrim *Lepidorhombus whiffiagonis*. *J. Sea Res.*, 56: 59-64.
- Hillis, D.M., C. Moritz and B.K. Mable. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc, pp. 205-247.
- Huysse, T., J.V. Houdt and F.A.M. Volckaert. 2004. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the "sand goby" group (Gobiidae, Teleostei). *Mol. Phylogen. Evol.*, 32: 324-336.
- Iwata, A. and S.R. Jeon. 1987. First record of four gobiid fishes from Korea. *Kor. J. Limnol.*, 20: 1-12.
- Jeong, S.J., K.H. Han, J.K. Kim and D.S. Sim. 2004. Age and growth of the blue spot mudskipper (*Boleophthalmus pectinirostri*) in the mud flat of Southwestern Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 37: 44-50.
- Keith, P., T. Galewski, G. Cattaneo-Berberi, T. Hoareau and P. Berberi. 2005. Ubiquity of *Sicyopterus lagocephalus* (Teleostei: Gobioidei) and phylogeography of the genus *Sicyopterus* in the Indo-Pacific area inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol. Phylogen. Evol.*, 37: 721-732.
- Kim, I.C., H.S. Kweon, Y.J. Kim, C.B. Kim, M.C. Gye, W.O. Lee, Y.S. Lee and J.S. Lee. 2004. The complete mitochondrial genome of the javeline goby *Acanthogobius hasta* (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic considerations. *Gene*, 336: 147-153.
- Kim, J.J., J.Y. Park and Y.U. Kim. 2003. Sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* genes in three mullets (Mugilidae, Pisces). *Kor. J. Ichthyol.*, 15: 232-240.
- Kim, M.J., S.H. Han, H.Y. Yang, M.R. Jo, S.C. Chung and C.B. Song. 2006. Evolutionary relationship of *Liobagrus mediadiposalis* (Teleostei: Amblycipitidae) populations in Korea inferred from cytochrome *b* DNA sequences. *Kor. J. Ichthyol.*, 18: 329-338.
- Kim, Y.J., W.O. Lee, J.A. Kim and J.S. Lee. 2004. Molecular phylogeny of the Gobioidei (Perciformes) from Korea inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. *Kor. J. Ichthyol.*, 16: 51-59.
- Koga, H., S. Noda, T. Noguchi and I. Aoto, 1989. Studies on artificial propagation of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostri* (Linnaeus) - III. Hatching and larval rearing. *Bull. Saga Prefect. Ariake Fish. Exp. Stn.*, 11: 17-28. (in Japanese)
- Kumer, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.*, 5: 150-163.
- Lee, H.J., J.Y. Park, W.J. Kim, K.S. Min, Y. Kim, M.A. Yoo and W.H. Lee, 1999. Genetic study of the subfamily Salmoninae based upon mitochondrial DNA control region sequences. *Kor. J. Ichthyol.*, 11: 163-171.
- Orti, G., M.A. Be, T.E. Reimchen and A. Meyer. 1994. Global survey of mitochondrial DNA sequences in the threespine stickleback: evidence for recent migration. *Evolution*, 48: 608-622.
- Park, G.M. and H.B. Song. 2010. Phylogenetic divergence in the south torrent catfish, *Liobagrus mediadiposalis* (Pisces; Amblycipitidae) of Korea. *J. Fisher. Soc. Taiwan*, 37: 173-181.
- Peng, L., W.O. Lee, J.H. Im, S.J. Lee, Y.K. Nam and D.S. Kim. 2004. Genetic analysis of long snout bullhead (*Leiocassis longirostris*) using mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I and 12S rRNA genes. *Korean J. Ichthyol.*, 16: 109-115.
- Perdices, A., C. Cunha and M.M. Coelho. 2004. Phylogenetic of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome *b* sequences. *Mol. Phylo. Evol.*, 31: 192-203.
- Ryu, B.S., I.S. Kim and Y. Choi, 1995 Ecology and life history of *Boleophthalmus pectinirostris* in Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 28: 316-324.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. Laboratory Manual*. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, 655pp.
- Sota, T., M. Takahiko, S. Toshihiko, S. Hitoshi and Y. Kenichiro. 2005. Genetic differentiation of the gobies *Gymnogobius castaneus* and *G. taranetizi* in the region surrounding the Sea of Japan as inferred from a mitochondrial gene genealogy. *Zool. Sci.*, 22: 87-93.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL-X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acids Res.*, 25: 4876-4882.
- Wang, H.Y., M.P. Tsai, J. Dean and S.C. Lee. 2001. Molecular phylogeny of gobioid fishes (Perciformes: Gobioidei) based on mitochondrial 12S rRNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.*, 20: 390-408.