

# 한국 동해 중부해역에 서식하는 볼락속(*Sebastes*) 어류의 미토콘드리아 유전체 비교분석

장요순 · 황선완<sup>1</sup> · 이은경<sup>2</sup> · 김 성<sup>2,\*</sup>

한국해양과학기술원 동해환경연구센터, <sup>1</sup>한국해양과학기술원 독도전문연구센터  
<sup>2</sup>한국해양과학기술원 해양생태연구센터

**Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes of the Genus *Sebastes* (Scorpaeniformes, Sebastidae) Inhabiting the Middle East Sea, Korea by Yo-Soon Jang, Sun Wan Hwang, Eun Kyung Lee and Sung Kim<sup>2,\*</sup>** (East Sea Environment Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Gyeongbuk 36315, Republic of Korea; <sup>1</sup>Dokdo Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Gyeongbuk 36315, Republic of Korea; <sup>2</sup>Marine Ecosystem Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Busan 49111, Republic of Korea)

**ABSTRACT** *Sebastes minor*, *Sebastes trivittatus*, *Sebastes owstoni*, and *Sebastes steindachneri* are indigenous fish species inhabiting the central part of the East Sea, Korea. In order to understand the molecular evolution of these four rockfishes, we sequenced the complete mitochondrial genomes (mitogenomes) of *S. minor* and *S. trivittatus*. To further analyze the phylogeny of *Sebastes* species, the mitogenomes of 16 rockfishes were comparatively investigated. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) nucleotide sequences of *S. minor* and *S. trivittatus* were 16,408 bp and 16,409 bp in length, respectively. A total of 37 genes were found in mtDNA of *S. minor* and *S. trivittatus*, including 13 protein-coding genes, 2 ribosomal RNA genes, and 22 transfer RNA genes, which exhibited similar characters with other *Sebastes* species in the East Sea, Korea. In addition, we detected a conserved motif "ATGTA" in the control region of the four *Sebastes* species, but no tandem repeat units. Comparative analyses of the congeneric mitochondrial genomes were performed, which showed that control regions were more variable than the concatenated protein-coding genes. As a result of analysing phylogenetic relationships of four *Sebastes* species by using concatenated nucleotide sequences of 13 protein-coding genes, *S. minor*, *S. trivittatus*, *S. owstoni* and *S. steindachneri* were clustered into three clades. The phylogenetic tree exhibited that *S. minor* and *S. steindachneri* shared a closer relationship, whereas *S. trivittatus* and *S. vulpes* formed another distinct clade. Our results contribute to a better understanding of evolutionary patterns of *Sebastes* species inhabiting the middle East Sea, Korea.

**Key words:** *Sebastes minor*, *Sebastes trivittatus*, mitochondrial genome, comparative analysis

## 서 론

미토콘드리아의 유전시스템은 DNA와 이 DNA가 가지고 있는 유전자를 복제하고 발현시키는 데 필요한 분자적 기구

로 이루어져 있다. 이 분자적 기구는 전사(transcription)와 번역(translation)에 필요한 거대분자를 포함하며, 거대분자의 대부분은 미토콘드리아의 유전자에 의해 암호화되어 있다. 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 분자의 크기는 척추동물의 16~17 kb 정도부터 현화식물의 2,500 kb에 이르기까지 매우 다양하고, 대개는 각각의 세포가 많은 수의 미토콘드리아를 가지기 때문에 세포 당 mtDNA 분자의 개수는 충분히 많다. 동물의

저자 직위: 장요순(책임기술원), 황선완(책임연구원), 이은경(선임기술원), 김성(책임연구원)

\*Corresponding author: Sung Kim Tel: 82-51-664-3278,  
Fax: 82-51-955-3981, E-mail: skim@kiost.ac.kr

mtDNA는 작고 유전자 배열이 촘촘하며, 두 개의 큰 전사단위로 이루어져 있고, 유전자의 정보를 암호화하고 있다(Avise, 1991).

척추동물의 미토콘드리아 유전체는 단백질 코딩 유전자 13개, 리보솜 RNA 유전자 2개, tRNA 유전자 22개 및 조절영역 1개로 구성된 전체 크기가 대략 16~18 kb인 환형구조를 가진 분자이다(Brown, 1985; Boore, 1999). 미토콘드리아 DNA는 구조의 단순성, 일정한 유전자 함량, 빠른 진화속도 및 모계유전과 같은 특징을 가졌고(Wolstenholme, 1992; Ruokonen and Kvist, 2002), 이와 같은 특징으로 인하여 미토콘드리아 DNA는 집단유전학, 생물지리학 및 계통유전학 연구에 매우 유용한 분자도구로 활용되고 있다(Xiao *et al.*, 2001; Miya *et al.*, 2003).

미토콘드리아 유전체 (mitochondrial genome, mitogenome)는 계통유전학 분야에서 풍부한 정보를 제공하는 것으로 보고되었다(Fenn *et al.*, 2008). 미토게놈 전체 염기서열은 생물 분류군 간의 계통학적 유연관계 연구에 유용한 phylogenetic 마커이다(Rahman *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017). 미토게놈 전체 염기서열을 이용하여 계통발생을 분석한 결과는 미토콘드리아 DNA의 일부 유전자만을 이용하여 분석한 것보다 더 높은 해상도로 계통수를 추론할 수 있으므로 통계적으로 더 신뢰할 수 있다(Hong *et al.*, 2009). 또한 미토게놈은 생물학적인 종분화 및 계통분기(lineage divergence) 연구를 위한 새로운 도구로(Ravin *et al.*, 2010), 미토콘드리아 DNA의 염기 구성, 코돈의 사용, 유전자 배열 순서 및 tRNA와 rRNA 유전자의 2차 구조는 분류군 간의 계통발생을 더 높은 수준으로 규명하는데 이용된다(Boore, 1999; Lei *et al.*, 2010).

미토콘드리아 DNA의 조절영역(control region, D-loop)은 일반적으로 염기치환, 짧은 삽입/결실 및 가변수의 직렬 반복(VNTRs, variable number of tandem repeats) 측면에서 볼 때, 미토게놈에서 가장 변이가 많은 부분이다. 다양한 생물 분류군의 미토게놈 조절영역에서 텐덤 반복서열(tandem repeats)이 발견되었고(Matson and Baker, 2001; Crochet and Desmarais, 2000), 이들 반복서열은 대체로 ETAS (extended termination-associated sequences) 도메인 또는 CSBs (conserved sequence blocks) 도메인에 위치하고 있다(Anderson *et al.*, 1981). 텐덤 반복서열은 특정 척추동물 분류군의 개체 및 종 내에서 길이 다형성 및 이형세포질성(heteroplasmy, 한 개의 세포나 개체에 두 종류의 미토콘드리아가 있는 것)의 원천 정보를 제공한다(Buroker *et al.*, 1990; Macey *et al.*, 1997). 결과적으로 텐덤 반복서열의 비교 분석은 집단유전 측면에서 미토게놈 진화 또는 개체군 역학(population dynamics) 연구에서 중요한 단서를 제공할 수 있다(Hoelzel *et al.*, 1993).

볼락속(*Sebastes*) 어류는 전 세계에 걸쳐 약 163종이 분포하

고 있으며, 한반도 주변 해역에는 19종이 서식하고 있다(Lee *et al.*, 2000). 한반도 주변 해역에서 서식하고 있는 볼락속 어류 중에서 돌삼뱅이(*Sebastes baramenuke*, 동해 북부 서식), 말락볼락(*Sebastes wakiyai*, 동해 북부 이북에 서식), 세줄볼락(*Sebastes trivittatus*, 동해 중부 이북 서식), 쯤볼락(*Sebastes minor*, 동해 중부 이북 서식), 탁자볼락(*Sebastes tacanowksii*, 동해 중부 이북 서식), 노랑볼락(*Sebastes steindachneri*, 동해 중부 이북 서식) 및 황볼락(*Sebastes owstoni*, 동해 중부 이북 서식)은 우리나라의 동해안에서만 출현하며, 이러한 서식지 특성으로 인하여 동해안 특산 볼락류로 구분하기도 한다. 말락볼락 및 돌삼뱅이는 동해 북부해역에만 서식하기 때문에 현재는 채집이 거의 불가능한 것으로 알려져 있고, 이 중 돌삼뱅이는 2002년 1월에 경북 울진군 후포연안에서 1개체를 채집하였다는 연구보고가 있다(Lee, 2011). 동해 중부 이북해역에서 서식하는 세줄볼락, 노랑볼락 및 탁자볼락은 적은 수의 개체가 어획되는 반면에 쯤볼락 및 황볼락은 계절에 따라 많이 어획되는 종이다.

쯤볼락(*S. minor*)은 한국 동해 북부, 일본 북부, 사할린, 쿠릴해 남부 해역에 분포하고, 세줄볼락(*S. trivittatus*)은 주로 한국 동해 중부 이북과 일본 북해도 주변 해역에 분포하며, 연안의 암초 지역에 서식하는 것으로 알려져 있다. 볼락류는 경제적으로나 생태학적으로 중요한 종으로 인식되고 있으나, 서식해역에서의 집단 구조나 생활사에 대한 연구보다는 형태학적인 특징에 관한 연구가 주로 이루어졌다. 최근에는 유전자 마커를 이용한 개체군의 구조 분석 연구결과가 발표되기도 했다(Saha *et al.*, 2017). Kai *et al.* (2003)은 mtDNA의 cytochrome b 유전자 염기서열을 이용하여 볼락류 23종의 계통발생학적 위치를 분석하였고, Hyde and Vetter (2007)는 미토콘드리아의 유전자 7개[Cytochrome b (Cytb), Cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1), 12S rRNA, 16S rRNA, tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, Control region]와 핵(nuclear) 유전자 2개[Recombination activating gene 2 (RAG2), Internal transcribed spacer 1 (ITS1)]의 염기서열을 이용하여 볼락류 65종을 대상으로 계통학적 유연관계를 분석한 바 있다. 미토콘드리아 DNA의 전체 염기서열을 이용하여 볼락속 어류의 미토게놈 특징 및 계통학적 유연관계를 분석한 연구는 그동안 보고되지 않았고, 최근에 Jia *et al.* (2020)은 쯤뱅이속 어류 3종(*Sebasticus tertius*, *Sebasticus albofasciatus*, *Sebasticus marmoratus*)에 대한 미토게놈을 해독하고 체계적으로 비교하여 계통발생 관계를 분석한 연구결과를 발표하였다.

볼락속 어류의 미토게놈 정보는 볼락과(Sebastidae) 어류의 진화학적 관계 및 계통학적 관계 규명에 유용한 도구로 이용할 수 있지만, 현재까지는 한국 주변 해역에서 서식하는 볼락속 어류 14종을 포함하여 볼락류 17종에 대한 미토게놈 정보만 보고되어 있다. 따라서 본 연구에서는 Sebastidae 어류

의 진화학적 연구에 유용한 분자정보를 확보하기 위하여 좀볼락 및 세줄볼락의 미토게놈 전체 염기서열을 해독하였으며, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈 정보와 유전체 수준에서 비교분석하고 분자계통학적 유연관계를 파악하여 한국 동해 중부해역에 서식하는 동해안 특산 볼락류의 분자진화를 이해하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 genomic DNA 분리

한국 동해 중부해역에서 삼중자망으로 채집하여 국립수산과학원 동해수산연구소의 표본 관리에 관한 지침에 따라 표본번호를 부여받은 표본을 실험재료로 사용하였다. 볼락류 표본은 근육조직을 절단하여 에탄올에 보관중인 액침표본이며, 좀볼락(*S. minor*, Minor rockfish) 표본(ESFRI 119, ESFRI 120)은 2012년 2월 26일 강원도 속초시 동명항 주변 해역(수심 60~63미터)에서 채집되었고, 세줄볼락(*S. trivittatus*, Tree stripe rockfish) 표본 ESFRI 107은 2012년 4월 24일 강원도 속초시 장사항 주변 해역(수심 22~24미터), 표본 ESFRI 116은 2012년 4월 20일 강원도 동해시 묵호항 주변에서 채집되었다.

좀볼락 액침표본(ESFRI 119, ESFRI 120)과 세줄볼락 액침표본(ESFRI 107, ESFRI 116)의 근육조직 시료(0.5 cm×0.5 cm)를 lysis buffer [10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 5 M Urea, 0.1 mg/mL proteinase K]로 충분히 용해한 후, binding buffer와 isopropanol을 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 genomic DNA는 AccuPrep<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Co., Korea)의 column으로 정제하여 전기영동으로 확인하였고, NanoDrop<sup>®</sup> ND-2000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)으로 농도를 측정하였다.

### 2. 유전자 증폭 및 sequencing

유전자 증폭 반응은 AccuPower<sup>®</sup> PCR PreMix (Bioneer Co., KOREA)에 genomic DNA 25 ng과 프라이머를 혼합하여 94°C에서 5분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 51~65°C에서 30초, 72°C에서 1분 처리를 35회 반복 실시하였다. 반응이 끝난 PCR 산물은 DNA purification Kit (TIANGEN, China)를 사용하여 정제한 후, 전기영동법으로 확인하였다. 정제된 유전자 단편을 BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)로 반응시켜 ABI 3730xL DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, USA)를 사용하여 sequencing 하였다.

### 3. 유전자 annotation 및 염기서열 분석

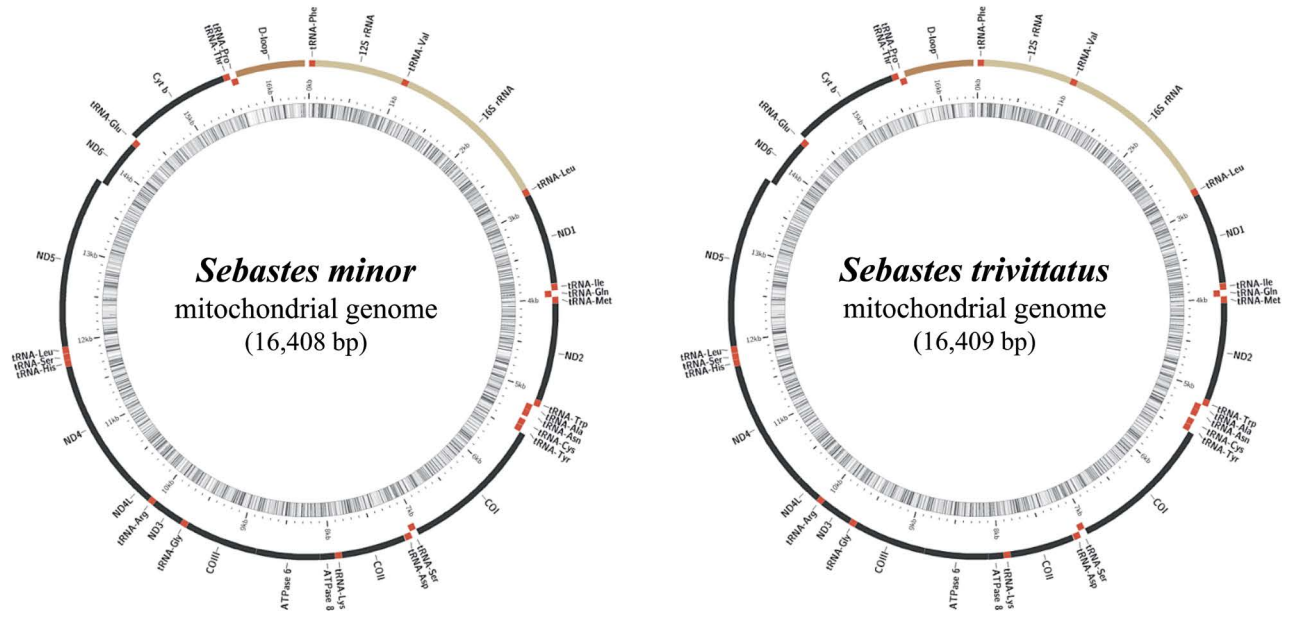
미토게놈 유전체 정보는 증폭한 유전자 단편의 염기서열을 BioEdit 7.2.5로 정리하고 Geneious Prime 2020.2 (Geneious, Netherlands)의 어셈블리 도구를 이용하여 완성하였다. 단백질 코딩 유전자(protein coding gene) 13개, 리보솜 RNA 2개 및 각 유전자의 경계는 DOGMA (Dual Organellar GenoMe Annotator, Wyman *et al.*, 2004)와 MitoFish (Iwasaki *et al.*, 2013)를 이용하여 결정하였다. tRNA와 이차구조는 tRNAscan-SE 1.21 (Lower and Eddy, 1997)로 예측하였고, 비암호화 영역은 Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007)를 이용하여 서열의 유사성으로 확인하였다.

염기 조성은 Geneious Prime 2020.2를 이용하여 통계량으로 계산하였고, GC skew[(G-C)/(G+C)]와 AT skew[(A-T)/(A+T)]로 nucleotide bias (Perna and Kocher, 1995)를 측정하였다. 유전적 거리는 MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018)를 사용하여 분석하였고, 좀볼락 및 세줄볼락 미토게놈의 map은 MitoFish와 MitoAnnotator 프로그램 (Iwasaki *et al.*, 2013)을 이용하여 작성하였다.

### 4. 분자계통학적 유연관계 분석

분자계통학적 유연관계는 한반도 주변 해역에 출현하는 볼락속 어류 14종[볼락(*Sebastes inermis*, NC\_023456), 조피볼락(*Sebastes schlegelii*, NC\_005450), 황해볼락(*Sebastes koreanus*, NC\_023265), 개볼락(*Sebastes pachycephalus*, KF836442), 황점볼락(*Sebastes oblongus*, NC\_024549), 누루시볼락(*Sebastes vulpes*, NC\_027438), 불볼락(*Sebastes thompsoni*, NC\_027447), 탁자볼락(*Sebastes taczanowskii*, NC\_027439), 우럭볼락(*Sebastes hubbsi*, NC\_027440), 흰꼬리볼락(*Sebastes longispinis*, NC\_026100), 노랑볼락(*Sebastes steindachneri*, NC\_027445), 황볼락(*Sebastes owstoni*, NC\_026191), 좀볼락(*Sebastes minor*, NC\_027444), 세줄볼락(*Sebastes trivittatus*, NC\_027446)]의 미토게놈 정보와 외국 해역에 서식하는 볼락속 어류 2종[*Sebastes aleutianus* (NC\_039779), *Sebastes fasciatus* (NC\_036048)]의 미토게놈 정보를 사용하였고, 13개의 단백질 코딩 유전자 염기서열을 연결하여 분석하였다. 외군(outgroup)은 *Scorpaenopsis cirrosa* (NC\_027735) 및 *Helicolenus hilgendorfi* (NC\_003195)의 미토게놈 정보를 이용하였다.

계통학적 유연관계 분석에 이용한 염기서열은 단백질 코딩 유전자 13개를 연결하여 Clustal W2가 포함된 MEGA-X로 정렬하였다. 분자계통 분석은 MEGA-X에서 Maximum likelihood (ML) 방법으로 진행하였고, Tamura-Nei 모델 (Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 계산된 pairwise distances 매트릭스에 Neighbor-Join 알고리즘과 BioNJ 알고리즘을 적용



**Fig. 1.** The mitochondrial genome maps of *Sebastes minor* and *Sebastes trivittatus*. Genes located at the H- or L-strand are mapped outside or inside of the circle. The names of protein-coding genes and rRNAs are expressed by standard abbreviations. The figure was generated by MitoFish and MitoAnnotator program (Iwasaki *et al.*, 2013).

하여 계통수를 생성하였다.

## 결 과

### 1. 미토게놈 구조 및 유전자 배열

좁볼락 (*S. minor*) 미토게놈 (NC\_027444) 및 세줄볼락 (*S. trivittatus*) 미토게놈 (NC\_027446)은 크기가 각각 16,408 bp 및 16,409 bp 이었고 (Fig. 1), 37개의 유전자 (13개의 단백질 코딩 유전자, 22개의 tRNA 및 2개의 rRNA와 1개의 비암호화 영역)로 구성되어 있었다. 이들 유전자의 대부분은 H (heavy) 가닥에 있었지만, 8개의 tRNA (Gln, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser-UCN, Glu, Pro)와 ND6 유전자는 L (light) 가닥에서 인코딩되었다 (Table 1). 또한 7개 locus 유전자 사이에서 전체 25개 (1~10 bp)의 염기가 중첩되는 것으로 좁볼락과 세줄볼락이 동일하였으며, 유전자 사이의 interval 서열이 좁볼락의 미토게놈은 염기 61개가 1~39 bp 크기 (9개의 Spacer)로 있었고, 세줄볼락의 미토게놈은 64개의 염기가 1~42 bp 크기 (9개의 Spacer)로 존재하였으며, 가장 긴 스페이서는 tRNA<sup>Asn</sup>과 tRNA<sup>Cys</sup> 사이에 있는 것으로 좁볼락과 세줄볼락이 동일하였다.

황볼락 및 노랑볼락 미토게놈의 크기는 각각 16,465 bp 및 16,450 bp 이었으며, 좁볼락과 세줄볼락 미토게놈의 차이는 비암호화 영역의 크기에서 비롯되었으며, 미토게놈 구조 및 유전자 구성과 배열은 좁볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락이

전반적으로 비슷하였다.

미토게놈 전체 염기서열의 염기 조성을 비교한 결과, 좁볼락의 염기 조성은 A=27.8%, T=27.2%, G=17.3% 및 C=27.6%이었고, A+T 함량이 55.0%로 G+C 함량 (45.0%)보다 높았으며, AT skew는 양의 값 (0.011)이었고, GC skew는 음의 값 (-0.229)으로 계산되었다. 세줄볼락의 염기 조성은 A=27.9%, T=26.7%, G=17.1%, C=28.4%이었고 A+T 함량은 54.5%이었으며, AT skew는 0.022, GC skew는 -0.248이었다. 황볼락 및 노랑볼락 미토게놈의 A+T 함량은 각각 54.3% 및 54.5%로 G+C 함량보다 다소 높았으며, AT skew는 각각 0.022 및 0.006, GC skew는 각각 -0.243 및 -0.231로 좁볼락과 세줄볼락을 포함한 이들 4종이 대체로 유사하였다 (Table 2).

### 2. 단백질 코딩 유전자 (Protein coding genes, PCGs) 비교

좁볼락 및 세줄볼락의 미토게놈은 13개의 단백질 코딩 유전자를 가지고 있었으며, 이들 유전자 영역의 크기는 11,429 bp로 3,833개의 아미노산을 암호화하였다. 이들 코딩 유전자의 대부분은 단백질 번역 개시코돈으로 ATG를 사용하였으며, 종결코돈은 TAG, TAA, TA 또는 T로 다양하였다. 다만 COX1 유전자는 개시코돈으로 GTG를 사용하였다. COX1, ATP8, ATP6, ND4L, ND5 및 ND6 유전자는 전형적인 종결코돈인 TAA로 단백질 번역이 종결되었고, ND1 유전자는 TAG로 종결되었다. ND2 및 COX3 유전자는 불완전 종결코돈 TA로 종

**Table 1.** Characteristics of the mitochondrial genes of *Sebastes minor* and *Sebastes trivittatus*

Locus	Strand*	Location		Intergenic sequence (bp)		Start/Stop codon	
		<i>Sebastes minor</i>	<i>Sebastes trivittatus</i>	<i>Sebastes minor</i>	<i>Sebastes trivittatus</i>	<i>Sebastes minor</i>	<i>Sebastes trivittatus</i>
tRNA <sup>Phe</sup>	H	1~68	1~68	0	0		
12S rRNA	H	69~1014	69~1013	0	0		
tRNA <sup>Val</sup>	H	1015~1086	1014~1085	0	0		
16S rRNA	H	1087~2779	1086~2778	0	0		
tRNA <sup>Leu</sup> <sub>UUR</sub>	H	2780~2853	2779~2852	0	0		
ND1	H	2854~3828	2853~3827	4	4	ATG/TAG	ATG/TAG
tRNA <sup>Ile</sup>	H	3833~3901	3832~3900	0	0		
tRNA <sup>Gln</sup>	L	3902~3972	3901~3971	-1	-1		
tRNA <sup>Met</sup>	H	3972~4042	3971~4041	0	0		
ND2	H	4043~5088	4042~5087	0	0	ATG/TA	ATG/TA
tRNA <sup>Trp</sup>	H	5089~5159	5088~5158	1	1		
tRNA <sup>Ala</sup>	L	5161~5229	5160~5228	2	2		
tRNA <sup>Asn</sup>	L	5232~5303	5231~5302	39	42		
tRNA <sup>Cys</sup>	L	5343~5406	5345~5408	0	0		
tRNA <sup>Tyr</sup>	L	5407~5477	5409~5479	1	1		
COX1	H	5479~7029	5481~7031	-1	-1	GTG/TAA	GTG/TAA
tRNA <sup>Ser</sup> <sub>UCN</sub>	L	7029~7100	7031~7102	3	3		
tRNA <sup>Asp</sup>	H	7104~7176	7106~7178	6	6		
COX2	H	7183~7873	7185~7875	0	0	ATG/T	ATG/T
tRNA <sup>Lys</sup>	H	7874~7947	7876~7949	1	1		
ATP8	H	7949~8116	7951~8118	-10	-10	ATG/TAA	ATG/TAA
ATP6	H	8107~8790	8109~8792	-1	-1	ATG/TAA	ATG/TAA
COX3	H	8790~9574	8792~9576	0	0	ATG/TA	ATG/TA
tRNA <sup>Gly</sup>	H	9575~9646	9577~9648	0	0		
ND3	H	9647~9995	9649~9997	0	0	ATG/T	ATG/T
tRNA <sup>Arg</sup>	H	9996~10064	9998~10066	0	0		
ND4L	H	10065~10361	10067~10363	-7	-7	ATG/TAA	ATG/TAA
ND4	H	10355~11735	10357~11737	0	0	ATG/T	ATG/T
tRNA <sup>His</sup>	H	11736~11804	11738~11806	0	0		
tRNA <sup>Ser</sup> <sub>AGY</sub>	H	11805~11872	11807~11874	4	4		
tRNA <sup>Leu</sup> <sub>CUN</sub>	H	11877~11949	11879~11951	0	0		
ND5	H	11950~13788	11952~13790	-4	-4	ATG/TAA	ATG/TAA
ND6	L	13785~14306	13787~14308	0	0	ATG/TAA	ATG/TAA
tRNA <sup>Glu</sup>	L	14307~14375	14309~14377	0	0		
Cytb	H	14382~15522	14384~15524	0	0	ATG/T	ATG/T
tRNA <sup>Thr</sup>	H	15523~15594	15525~15596	-1	-1		
tRNA <sup>Pro</sup>	L	15594~15663	15596~15665	0	0		
Control region		15664~16408	15666~16409				

\*H and L denote heavy and light strands. Positive (+) and negative (-) values indicate Spacer and Overlap, respectively.

결되었고, COX2, ND3, ND4 및 Cytb 유전자는 불완전 종결코돈 T로 종결되었다(Table 1).

좁블락 미토게놈의 단백질 코딩유전자 영역은 약간의 A+T 편향(55.3%)으로 AT skew (-0.045)와 GC skew (-0.291)는 음의 값을 나타냈으며, 세줄블락 미토게놈의 단백질 코

딩 유전자 영역도 약간의 A+T 편향(54.5%)으로 AT skew (-0.048)와 GC skew (-0.259) 모두 음의 값을 나타냈다(Table 2). 황블락 및 노랑블락 미토게놈의 단백질 코딩 유전자 영역의 크기, 아미노산 개수, 단백질 번역 개시코돈 및 종결코돈이 좁블락 및 세줄블락 미토게놈의 구조적 특징과 동

**Table 2.** Summary of the nucleotide composition and skewness of the mitochondrial genomes of four *Sebastes* species, *S. minor*, *S. trivittatus*, *S. owstoni*, and *S. steindachneri*

Region	A + T (%)				AT-skew				GC-skew			
	Mnrf	Tsrf	Otrf	Norf	Mnrf	Tsrf	Otrf	Norf	Mnrf	Tsrf	Otrf	Norf
Whole genome	55.0	54.5	54.3	54.5	0.011	0.022	0.020	0.006	-0.229	-0.248	-0.243	-0.231
Protein coding genes	55.3	54.5	54.3	54.5	-0.045	-0.048	-0.035	-0.053	-0.291	-0.259	-0.302	-0.288
12S rRNA	49.8	49.7	49.8	49.9	0.189	0.207	0.205	0.198	-0.092	-0.165	-0.116	-0.106
16S rRNA	53.8	53.6	53.6	53.7	0.204	0.205	0.205	0.199	-0.087	-0.080	-0.082	-0.078
tRNA genes	54.8	54.6	54.4	54.4	0.027	0.022	0.033	0.022	0.040	0.040	0.035	0.039
Control region	64.4	66.5	64.0	64.2	0.054	0.080	0.088	0.053	0.000	-0.093	-0.139	-0.095

Mnrf, Tsrf, Otrf, Norf indicate *S. minor*, *S. trivittatus*, *S. owstoni*, and *S. steindachneri*, respectively.

**Table 3.** Pairwise genetic distance for 13 protein coding genes (PCGs) and control region of *S. minor*, *S. trivittatus*, *S. owstoni*, and *S. steindachneri* mitogenomes

Gene	Species						Mean
	Mnrf-Tsrf	Mnrf-Otrf	Mnrf-Norf	Tsrf-Otrf	Tsrf-Norf	Otrf-Norf	
ND1	0.080	0.098	0.061	0.075	0.061	0.080	0.081
ND2	0.074	0.096	0.057	0.038	0.047	0.069	0.060
COX1	0.067	0.058	0.038	0.043	0.050	0.044	0.055
COX2	0.041	0.052	0.034	0.031	0.037	0.047	0.040
ATP8	0.049	0.043	0.043	0.031	0.043	0.024	0.039
ATP6	0.057	0.070	0.046	0.041	0.038	0.058	0.052
COX3	0.045	0.050	0.033	0.023	0.038	0.049	0.040
ND3	0.073	0.079	0.060	0.041	0.047	0.054	0.062
ND4L	0.049	0.031	0.031	0.046	0.049	0.021	0.042
ND4	0.094	0.076	0.066	0.076	0.063	0.029	0.074
ND5	0.089	0.100	0.061	0.062	0.068	0.077	0.081
ND6	0.091	0.132	0.065	0.082	0.080	0.118	0.091
Cytb	0.085	0.097	0.054	0.047	0.057	0.073	0.074
Nt	0.074	0.080	0.052	0.052	0.054	0.059	0.06
AA	1.093	0.234	0.230	1.124	1.122	0.015	0.644
Control region	0.461	0.848	0.694	1.021	0.922	0.395	0.724

'Nt' indicates 'the nucleotide of concatenated 13 PCGs', and 'AA' indicates 'the amino acid of concatenated 13 PCGs'. Mnrf, Tsrf, Otrf, Norf indicate *S. minor*, *S. trivittatus*, *S. owstoni*, and *S. steindachneri*, respectively.

일하였다. 단백질 코딩 유전자 영역의 염기 조성은 A + T 편향 (54.5%, 54.3%)으로 AT skew (-0.053, -0.035)와 GC skew (-0.288, -0.302)가 음의 값을 나타내는 경향 또한 4종의 볼락이 서로 매우 유사하였다(Table 2).

좀볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 염기서열 분기(sequence divergence)는 미토게놈의 단백질 코딩 유전자를 기반으로 집단쌍(pairwise) 유전적 거리를 K2P(Kimura two-parameter) distance로 계산하여 파악하였다(Table 3). 이들 볼락속 어류 4종에 대한 단백질 코딩 유전자들의 유전적 거리는

평균 0.039~0.091로 유전자 간 차이가 크지 않았으며, ATP8 유전자와 좀볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락 간의 유전적 거리는 평균 0.039로 가장 낮은 반면에, ND6 유전자와는 가장 높은 유전적 거리(평균 0.091)를 나타내었다. 이러한 결과에서 유전자 사이에 서로 다른 돌연변이압(mutation pressure)이 존재함을 알 수 있었다. ND6 유전자의 pairwise 유전적 거리는 좀볼락과 노랑볼락 사이에서 가장 낮았고(0.065), 좀볼락과 황볼락 사이에서 가장 높게(0.132) 나타났다. 13개의 단백질 코딩 유전자의 아미노산 서열을 기반으로 계산한 K2P pairwise



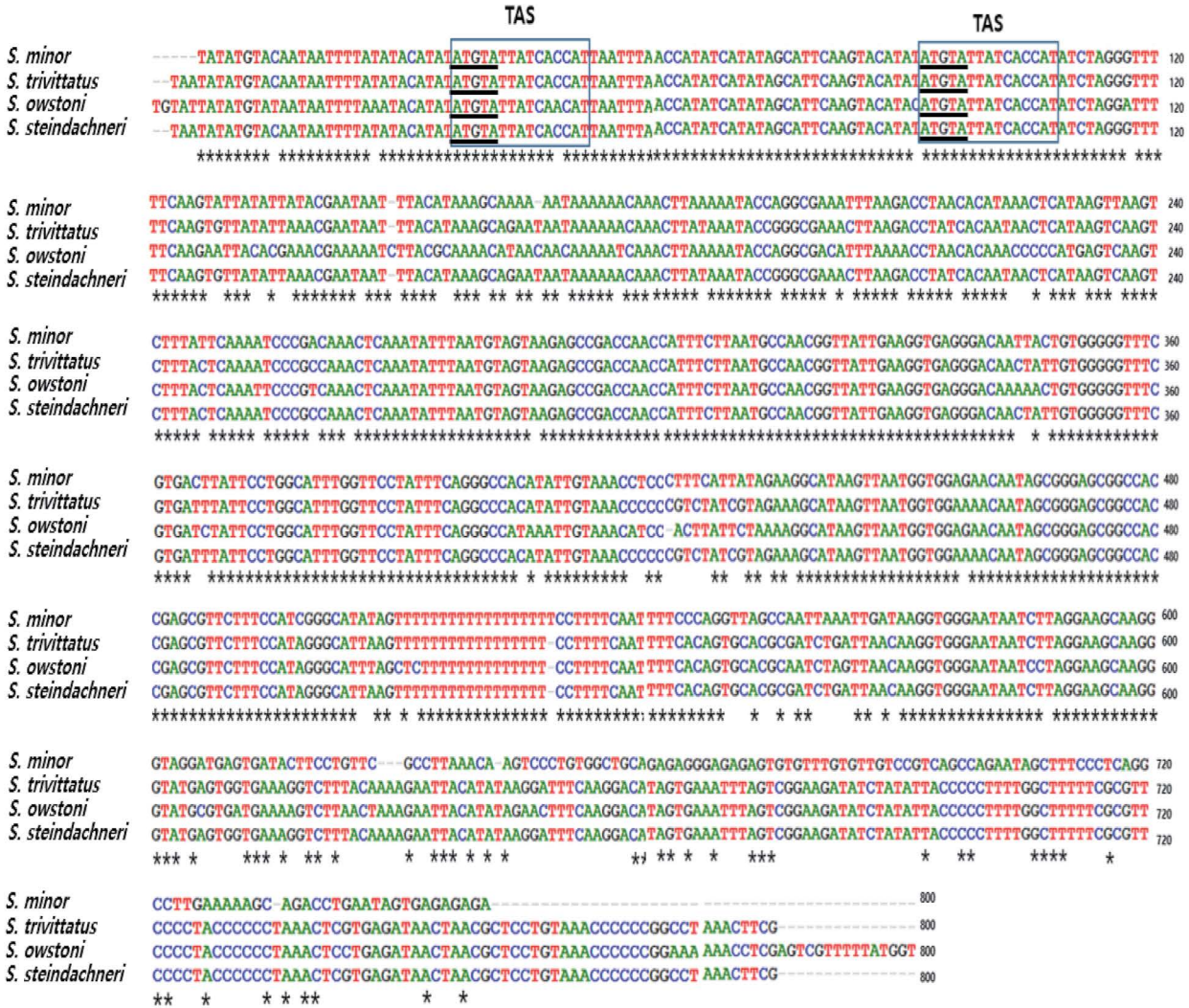
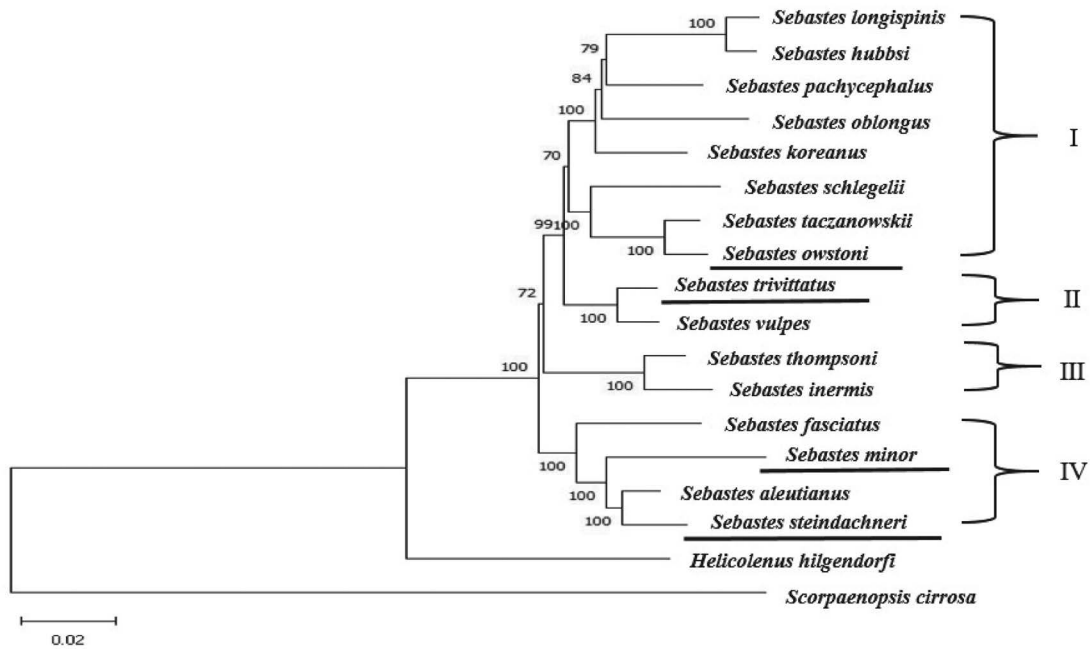


Fig. 2. Aligned sequences of control regions of four *Sebastes* mitogenomes and sequence of conserved motifs of ETAS1. The sequence in the box represents the coreTAS motif. The conserved “ATGTA” motif is underlined with black line. The ‘\*’ means the corresponding four bases are same.

유전적 거리 (0.015~1.124, 평균 0.644)는 염기서열을 이용하여 계산한 것 (0.052~0.080, 평균 0.062)보다 더 큰 값을 나타냈다. 이러한 결과에서 단백질 코딩 유전자 영역에 존재하는 염기치환의 형태는 동의적 치환(synonymous substitution, 염기서열 변이에 따른 아미노산 서열 변화 없음)보다 비동의적 치환(non-synonymous substitution, 염기서열 변이에 따라 코딩되는 아미노산 변경)이 더 많고, 이들 볼락속 미토게놈의 아미노산 서열의 차이가 4종 간의 염기서열의 차이보다 더 크다는 것을 알 수 있다. 아울러 *Sebastes* 종의 선택적 압력(selective pressure)과 진화관계를 평가하기 위하여 단백질 코딩 유전자의 진화율(Ka/Ks, Ka; 비동의적 치환, Ks; 동의적 치환) 비교분석 연구가 필요할 것으로 판단된다.

### 3. Ribosomal RNA 유전자와 transfer RNA (tRNA) 유전자 비교

리보솜 RNA는 쯔블락 및 세줄블락의 미토게놈에서 12S rRNA와 16S rRNA 유전자가 각각 1개씩 확인되었고, 12S rRNA 유전자는 tRNA<sup>Phe</sup>와 tRNA<sup>Val</sup> 사이에 있었으며, 16S rRNA 유전자는 tRNA<sup>Val</sup>과 tRNA<sup>Leu</sup><sub>UUR</sub> 사이에 위치하고 있었다. 쯔블락 미토게놈의 12S rRNA 유전자의 크기는 946 bp로 세줄블락(945 bp)보다 1 bp 길었고, 16S rRNA 유전자 크기는 1,693 bp로 쯔블락과 세줄블락이 동일하였다. 리보솜 RNA 유전자의 A + T 함량이 12S rRNA는 49.8% (쯔블락) 및 49.7% (세줄블락)이었고, 16S rRNA는 53.8% (쯔블락) 및 53.6% (세줄블락)이었다. 12S rRNA 유전자의 AT skew는 0.189 (쯔블락)



**Fig. 3.** Phylogenetic relationships of *Sebastes* species using concatenated nucleotide sequences of 13 protein coding genes (PCGs). Numbers at the nodes show ML bootstrap percentages.

및 0.207 (세줄볼락)이었으며, 16S rRNA 유전자의 AT skew는 0.204 (좁볼락) 및 0.205 (세줄볼락)로 약간의 AT 편향을 나타냈다. 리보솜 RNA의 GC skew가 12S rRNA 유전자는 -0.092 (좁볼락) 및 -0.165 (세줄볼락), 16S rRNA 유전자는 -0.087 (좁볼락) 및 -0.080 (세줄볼락)으로 2종이 유사하였으며, 염기 A와 C의 함량이 T와 G의 함량보다 많음을 의미하는 약간 음의 값을 나타냈다.

좁볼락 및 세줄볼락 미토게놈에서 22개의 tRNA 유전자 세트가 예측되었고, tRNA<sup>Leu</sup>와 tRNA<sup>Ser</sup>은 각각 두 종류씩 존재하였으며, tRNA 크기는 64 bp부터 74 bp까지 다양하였다 (Table 1). 22개의 tRNA 유전자 염기서열을 AT skew 및 GC skew로 분석한 결과, AT skew (0.027 및 0.022)와 GC skew (0.040 및 0.040)가 약간 양의 값을 나타내어 이들 tRNA 유전자 세트는 염기 A와 G로 편향되어 있음을 알 수 있다.

황볼락 및 노랑볼락 미토게놈의 리보솜 RNA 유전자와 tRNA 유전자 세트의 특징(종류와 크기, 염기 조성)은 좁볼락 및 세줄볼락 미토게놈의 구조적인 특징과 전체적으로 비슷하였다. 황볼락과 노랑볼락 역시 두 개의 리보솜 RNA 유전자가 약간의 AT 편향으로 염기 A와 C의 함량이 T와 G의 함량보다 많았고, 22개의 tRNA 유전자는 약간 양의 AT skew (0.022 및 0.033)와 GC skew (0.039 및 0.035)를 나타내어 tRNA가 염기 A와 G로 편향되었으며, 이와 같은 결과는 좁볼락 및 세줄볼락과 동일하였다.

#### 4. 비암호화(Non-coding) 영역 비교

좁볼락과 세줄볼락의 미토게놈에서 각각 745 bp 및 744 bp 크기의 긴 비암호화 서열을 확인하였으며, 이 서열은 tRNA<sup>Pro</sup>와 tRNA<sup>Phe</sup> 사이에 위치한 조절영역(control region, D-loop)이다. 이 조절영역에 “ATGTA” 모티프(motif)가 포함된 TAS block sequence [ATGN<sub>9</sub>CAT]가 존재하는 것을 확인하였으며, tandem 반복서열(tandem repeats)은 발견되지 않았다 (Fig. 2). 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈에서 확인한 비암호화 영역의 크기는 각각 799 bp 및 784 bp이었고, TAS 서열도 존재하였다. 좁볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락 미토게놈의 조절영역 염기서열은 유사도가 77.11%~91.42%로 종 간 차이가 컸으며, 좁볼락과 황볼락의 유사도가 77.11%로 가장 작았고, 세줄볼락과 황볼락의 유사도는 91.42%로 가장 컸다. 좁볼락 및 세줄볼락의 미토게놈 조절영역의 A+T 함량은 각각 64.4% 및 66.6%이었고, AT skew는 0.054~0.088로 동해안 특산 볼락류 4종 모두 양의 값을 나타낸 반면에 GC skew는 이들 볼락류 4종 모두가 음의 값(-0.139~0.000)을 나타냈다.

좁볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락 미토게놈의 조절영역(700 bp)을 Kimura의 두 매개 변수로 유전적 거리를 계산한 결과, 0.395~1.021 (평균 0.724)로 황볼락과 노랑볼락 사이가 0.395로 가장 가까웠고, 황볼락과 세줄볼락 사이의 유전적 거리가 1.021로 가장 멀었다 (Table 3).



## 5. 분자계통학적 유연관계 분석

한국 동해 중부해역에 서식하는 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 한반도 주변 해역에 출현하는 볼락속 14종 및 외국 해역에 서식하는 볼락속 2종(*Sebastes aleutianus*, *Sebastes fasciatus*)을 포함한 볼락속 16종에 대한 단백질 코딩 유전자의 염기서열을 연결하고 양볼락과(*Scorpaenidae*)의 썩감펭(*Scorpaenopsis cirrosa*) 및 홍감펭(*Helicolenus hilgendorfi*)을 외군으로 사용하여 최대개연성법(maximum likelihood, ML)과 Tamura-Nei 모델로 분자계통수를 작성하였다. 분자계통학적 유연관계를 분석한 결과(Fig. 3), 볼락속 어류 16종이 4개의 분기군(I, II, III, IV)으로 클러스터링 되었고, 동해안 특산 볼락 4종은 3개(I, II, IV)의 분기군으로 포함되어 있었다.

황볼락(*S. owstoni*)은 흰꼬리볼락(*S. longispinis*), 우럭볼락(*S. hubbsi*), 개볼락(*S. pachycephalus*), 황점볼락(*S. oblongus*), 황해볼락(*S. koreanus*), 조피볼락(*S. schlegelii*) 및 탁자볼락(*S. taczanowskii*)과 함께 클러스터링(I) 되었고, 세줄볼락(*S. trivittatus*)은 누루시볼락(*S. vulpes*)과 함께 클러스터링(II) 되었다. 쯤볼락(*S. minor*)과 노랑볼락(*S. steindachneri*)이 한 개의 분기군으로 묶였으며, 이들 볼락류는 북태평양(북해도 북부에서 베링해, 캘리포니아 중부에서 알류산 열도)에 분포하는 *Sebastes aleutianus* 및 북대서양에 분포하는 것으로 알려진 *Sebastes fasciatus*와 함께 동일한 유전적 분기군(IV)으로 클러스터링 되었다.

## 고 찰

미토게놈은 크기가 작고 구조가 단순하며 유전자 배열이 촘촘하여 생물의 종 분류, 개체군 유전학, 분자 계통지리학 및 분자생태학 등 많은 분야에서 매우 강력한 분자마커로 활용되고 있다. 어류 미토게놈의 구조 및 특성은 Johansen *et al.* (1990)이 대서양 대구(*Gadus morhua*)의 미토게놈을 완벽하게 해독하여 발표한 이후로 활발하게 연구되고 있다. 본 연구에서는 한국 동해 중부해역에 출현하는 볼락류의 분자진화 특성을 이해하기 위하여 쯤볼락 및 세줄볼락의 미토게놈을 해독하였고, 유전자 정보가 보고된 황볼락(Oh *et al.*, 2016) 및 노랑볼락(Jang *et al.*, 2016)과 비교분석하였다. 쯤볼락(*S. minor*), 세줄볼락(*S. trivittatus*), 황볼락(*S. owstoni*) 및 노랑볼락(*S. steindachneri*) 미토게놈의 크기는 각각 16,408 bp, 16,409 bp, 16,465 bp 및 16,450 bp으로 이들 미토게놈의 크기 차이는 주로 비암호화 영역의 길이에서 비롯되었다. 한반도 주변 해역에 출현하는 볼락류 14종의 미토게놈 크기는 16,396 bp~17,606 bp로 길이가 다양했으며, 황점볼락(*S. oblongus*,

NC\_024549)의 미토게놈 길이가 16,396 bp로 가장 짧은 반면에 황해볼락(*S. koreanus*, KJ775792)의 미토게놈 길이가 17,606 bp로 가장 길었다. 쯤볼락과 세줄볼락을 포함한 동해안 특산 볼락류 4종의 미토게놈은 척추동물의 미토콘드리아 DNA의 전형적인 구조인 13개의 단백질 코딩 유전자와 2개의 리보솜 RNA 및 22개의 tRNA를 포함한 37개의 유전자, 그리고 1개의 비암호화 영역으로 구성되어 있었다. 또한 대부분의 유전자가 H-가닥에서 암호화되었으나, ND6 유전자와 tRNA 유전자 8개는 L-가닥에서 암호화되었다. 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈 구조와 유전자 배열은 서로 유사하였으며, 척추동물의 미토콘드리아 DNA가 가진 특징 또한 잘 보존되어 있었다.

염기 조성에서 A+T(또는 G+C) 함량의 편향(bias)은 원핵생물 계놈의 특성 및 유전자 코드의 진화과정 설명에 필요한 방향성 돌연변이압 파악을 위하여 사용하였다(Ohama *et al.*, 1990). 쯤볼락 및 세줄볼락 미토게놈 전체의 A+T 함량은 55.5% 및 54.5%로 G+C 함량보다 컸고, 이와 같은 경향은 황볼락과 노랑볼락을 비롯한 대부분의 *Sebastes* 속 어류의 미토게놈에서 나타나는 특성으로, 후생동물 미토게놈의 일반적인 특징(Asakawa *et al.*, 1991)과 일치한다. AT skew가 쯤볼락은 0.011, 세줄볼락은 0.022로 양의 값을 나타냈고, 황볼락(0.020)과 노랑볼락(0.006) 역시 양으로 치우친(positively biased) 값으로 계산되었으며, GC skew는 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락 모두에서 음수 값을 나타냈다. 이것은 경골어류 미토게놈의 AT skew가 양의 값이고, GC skew가 음의 값을 갖는 경향과 일치하는 결과이다. Miya *et al.* (2003)은 썩뱅이목(*Scorpaeniformes*)에 속하는 모든 어류의 미토게놈 GC skew가 음의 값이었으며, *Satyrichthys amiscus*를 제외한 대부분 어류의 미토게놈 AT skew는 양의 값이었다고 보고한 바 있다.

쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락 미토게놈은 전체 길이가 11,429 bp인 13개의 단백질 코딩 유전자(protein coding genes, PCGs)를 가지고 있었으며, 3,833개의 아미노산을 암호화하였다. 이들 볼락속 4종의 13개 PCGs에 대한 특징(단백질 코딩 서열 및 아미노산 개수)은 볼락(NC\_023456), 조피볼락(NC\_005450), 황해볼락(NC\_023265), 개볼락(KF836442), 황점볼락(NC\_024549), 누루시볼락(NC\_027438), 볼락(NC\_027447), 탁자볼락(NC\_027439), 우럭볼락(NC\_027440) 및 흰꼬리볼락(NC\_026100)의 미토게놈 PCGs 특징과 유사하였다. 또한 13개 PCGs 중 12개 유전자가 ATG를 개시코돈으로 사용하는 반면에 COX1 유전자는 GTG를 개시코돈으로 사용하였다. 이것은 썩뱅이목 어류를 비롯한 많은 경골어류 미토게놈의 단백질 코딩 유전자 12개가 ATG를 개시코돈으로 이용하였고 COX1 유전자는 GTG를 개시코돈으로 이용하였다는 연구보고(Satoh *et al.*, 2006; Catanese *et al.*, 2010)와 일치한다. 쯤볼락과 세줄볼락의 미토게놈 단백질 코딩 유전자들

은 종결코돈을 TAG 및 TAA 또는 TA 및 T로 다양하게 사용했으며, TA (ND2 및 COX3 유전자의 종결코돈) 및 T (COX2, ND3, ND4 및 Cytb 유전자의 종결코돈)와 같은 불완전 종결코돈은 mRNA의 3'말단에 기인한 것으로서, 전사 후 폴리아데닐화(post-transcriptional polyadenylation)에 의해 완전해지는 것으로 추정된다(Ojala *et al.*, 1981). 황볼락과 노랑볼락을 포함한 볼락류 14종의 미토게놈 단백질 코딩 유전자의 대부분은 TAA를 종결코돈으로 사용하였고, ND1 유전자는 TAG를 종결코돈으로 사용하였으며, 불완전 종결코돈(TA 및 T)에 의해 번역(translation)되는 유전자도 있었다. 이와 같은 불완전 종결코돈에 의한 유전자의 번역은 썬뱅이목 어류의 다른 종에서도 발견되었고(Jia *et al.*, 2020), 이러한 불완전 종결코돈은 폴리아데닐화 과정(polyadenylation processes) 및 폴리시스트론 전사 절단(polycistronic transcription cleavage)에서 완전한 기능적 종결코돈으로 작용할 수 있음이 확인되었다(Ojala *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 2018). TAG는 여러 척추동물의 미토게놈에서 확인된 전형적인 종결코돈이지만, AT 염기의 높은 비율로 인하여 자주 사용되지 않는 것으로 보고되었다(Yang *et al.*, 2018). 본 연구에서는 한반도 주변 해역에 출현하는 볼락속 어류 14종의 미토게놈을 분석하여 13개의 PCGs 중 ND1 유전자 1개만 TAG를 종결코돈으로 사용하는 것을 확인하였으나, Cui *et al.* (2019)은 *Cociella crocodilus* 미토게놈의 PCGs 중 2개 유전자(ND3 및 ND6)가 TAG를 종결코돈으로 사용하는 것으로 발표하였고, Jia *et al.* (2020)은 *Sebasticus* 3종(*Sebasticus tertius*, *Sebasticus albofasciatus*, *Sebasticus marmoratus*)은 ND1 유전자와 ND6 유전자가 TAG를 종결코돈으로 사용한다고 보고하였다.

썬볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈에는 염기 중복 영역이 있었다. ATP8-ATP6 및 ATP6-COX3은 염기가 각각 10개 및 1개가 겹쳐 있었으며, ND4L-ND4는 7개의 염기가 겹쳐 있었고, ND5-ND6는 4개의 염기가 겹쳐 있었다(Table 1). 이와 같은 단백질 코딩 유전자 사이의 염기 겹침 현상은 다른 척추동물의 미토게놈에서도 발견되었다(Broughton *et al.*, 2001). Jia *et al.* (2020)은 썬뱅이목 어류 *Sebastiscus tertius*, *Sebastiscus albofasciatus* 및 *Sebastiscus marmoratus* 미토게놈에서 ATP8-ATP6는 10개의 염기가 겹쳐 있고, ATP6-COX3 사이에는 겹쳐 있는 염기가 없었으며, ND4L-ND4는 7개의 염기가 겹쳐 있었고, ND5-ND6는 4개의 염기가 겹쳐 있다고 발표하였다.

유전적 거리는 유전자 사이의 서로 다른 돌연변이압을 평가하는 데 사용된다(Reyes *et al.*, 1998). 썬볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락 미토게놈 간 염기서열 분기(sequence divergence)를 파악하기 위하여 13개의 단백질 코딩 유전자를 이용하여 계산한 pairwise 유전적 거리의 평균은 0.039~0.091로 유전자들 간 차이는 대체로 크지 않았으나, 유전자들 사이

의 돌연변이압(mutation pressure)이 서로 달랐다. 또한 아미노산 서열을 기반으로 계산한 유전적 거리와 염기서열을 기반으로 계산한 유전적 거리는 차이가 있었는데, 단백질 코딩 유전자 영역에서는 동의적 염기치환(synonymous substitution,  $K_s$ )보다 비동의적 염기치환(nonsynonymous substitution,  $K_a$ )이 더 많이 발생하여 썬볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈은 염기서열 차이보다 아미노산 서열 차이가 더 큰 것을 알 수 있다. 비동의적 염기치환과 동의적 염기치환의 비율인  $K_s/K_a$  값은 분자계통 연구에서 종의 선택적 압력과 진화관계를 평가하는 일반적인 지표로 이용한다.  $K_a/K_s$  값이 1 이하로 계산되면 순화선택(purifying selection),  $K_a/K_s$  값이 1이면 중립변이(neutral mutation) 그리고  $K_a/K_s$  값이 1 이상이면 양성선택(positive selection)으로 나타낸다(Yang and Bielawski, 2000). 본 연구에서는 썬볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈의 단백질 코딩 유전자 영역에는 아미노산 서열 차이에서 비롯된 유전자 변이가 염기서열 차이로 인한 변이보다 더 많이 존재하는 것을 확인하였고, 이와 같은 결과로 *Sebastes* 종의 선택적 압력(selective pressure)과 진화관계를 평가하기 위해서는 볼락과(Sebastidae) 어류의 미토콘드리아 단백질 코딩 유전자의 진화율( $K_a/K_s$ ,  $K_a$ ; 비동의적 치환,  $K_s$ ; 동의적 치환)을 체계적으로 분석하는 후속 연구가 필요할 것으로 판단하였다.

썬볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈은 12S rRNA와 16S rRNA 유전자를 각각 1개씩 가졌고, 16S rRNA의 크기는 1,693 bp로 이들 4종이 동일하였으며, 12S rRNA의 크기는 썬볼락, 황볼락 및 노랑볼락은 946 bp이었고, 세줄볼락은 945 bp로 약간의 차이가 있었다. 이들 볼락속 어류 4종의 리보솜 RNA의 염기 조성은 AT skew는 다소 큰 양수, GC skew는 약간 음수로 계산되었는데, 이와 같은 결과로 염기 A와 C의 함량이 각각 T와 G의 함량보다 높은 것으로 파악하였다.

한국 동해 중부해역에 서식하는 썬볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈에서 예측된 22개의 tRNA는 전형적인 clover-leaf 2차 구조를 나타냈다. tRNA<sup>Ser</sup><sub>AGY</sub>을 제외하고는 DHU arm이 없기 때문에 안정적인 2차 구조를 형성할 수 없는데(Frazer-Abel and Hagerman, 1999), 이와 같은 구조는 썬뱅이목 어류를 비롯한 경골어류의 미토게놈에서도 동일하게 나타난다(Lavrov *et al.*, 2000).

미토콘드리아 DNA에는 복제 및 전사 개시와 관련이 있는 비암호화 영역이 있는데(Fernández-Silva *et al.*, 2003), 이 영역은 조절영역(control region, CR)으로 tRNA<sup>Pro</sup>와 tRNA<sup>Phe</sup> 사이에 위치한다. 미토게놈의 복제 및 발현을 위한 주요 조절인자(regulatory element)를 포함하며, D-loop 라고도 불리는데, L-가닥과 상보적인 짧은 H-가닥의 합성과 분해에 의해 생성된 3가닥 변위(three-stranded displacement) 루프 구조에서 비롯된 이름이다. 이 부위는 H-가닥의 복제를 시작하고 H-가닥과

L-가닥의 전사를 개시하는 프로모터를 포함하고 있다(Sbisa *et al.*, 1997). 척추동물 미토게놈의 조절영역 상류에는 CR 가닥을 합성하기 위한 종결신호로 알려진 TAS-complementary TAS block 서열 내에 “ATGTA” 모티프를 포함하는 보존된 구조가 있다(Broughton *et al.*, 2001). 본 연구에서도 쯤볼락과 세줄볼락뿐만 아니라, 볼락속 어류 14종 미토게놈의 조절영역에서 “ATGTA” 모티프가 잘 보존되어 있는 것을 확인하였다. 그러나, 조절영역에서 탠덤 반복서열(tandem repeats)은 발견되지 않았다. 미토게놈의 조절영역의 크기는 종에 따라 약간씩 차이를 나타내었고, 황볼락의 조절영역 길이가 799 bp로 쯤볼락, 세줄볼락 및 노랑볼락의 조절영역보다 길었다. 미토게놈의 복제 및 전사를 조절하는 역할을 가진 D-loop의 길이 변이는 생물의 기능 및 대사에 영향을 미치게 되어 결국은 종 간의 차이(interspecific difference)를 야기한다.

미토게놈의 염기서열은 경골어류 사이의 계통발생학적 관계를 추론하는 데 널리 사용된다(Miya *et al.*, 2001). 게놈 진화(genome evolution)는 기본적으로 서식환경과 밀접한 관계가 있는 유전적 부동(random genetic drift)과 돌연변이 압력(mutation pressure)에 의해 진행되는 특성이 있다. Shen *et al.* (2019)은 심해어류가 극도로 가혹한 서식환경에 적응하기 위하여 게놈의 적응진화가 독립적으로 여러 번 발생했고, 서식환경 적응에 유리한 변이가 세대를 거듭하며 집단 내에 확산된 미토콘드리아 유전자의 양성선택(positive selection)의 신호를 확인하였다고 발표하였다. 이에 본 연구에서는 한국 동해의 중부 이북해역에서만 서식하는 것으로 알려진 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 분자진화를 이해하기 위하여 이들 4종의 미토게놈에 대하여 유전자 배열 등 유전체 구조를 비교분석하였다. 또한 서식환경 특성과 관계가 있는 유전자 변이의 존재 여부를 탐색하기 위하여 미토콘드리아 DNA의 단백질 코딩 유전자 염기서열을 이용하여 계통학적 유연관계를 살펴보았다. 한반도 주변 해역에 출현하는 볼락속 어류 미토게놈의 단백질 코딩 유전자를 연결한 염기서열을 이용하여 유전적 거리를 계산하고 계통수를 작성한 결과, 볼락속 어류 14종은 4개의 그룹으로 클러스터링 되었다. 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락은 3개의 클러스터 그룹에 위치하고 있었는데, 동해 중부 이북에 서식하는 황볼락은 우리나라의 서해안과 남해안 일부지역에 분포하여 한국 고유종으로 구분하는 황해볼락과 동일한 유전적 분기로 클러스터링 되었다. 쯤볼락 및 노랑볼락은 북태평양(북해도 북부에서 베링해, 캘리포니아 중부에서 알류산 열도)에 분포하는 *Sebastes aleutianus*와 북대서양에 분포하는 것으로 알려진 *Sebastes fasciatus*와 함께 동일한 유전적 분기군으로 클러스터링 되었다. 이와 같은 결과로 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락은 동해 중부 이북해역에 국한되어 서식하고 있지만, 이들 종의 유전적 다양성은 클 것으로 추정되었고, 미토게놈의 단백질 코딩 유전자 내

에 존재하는 염기 변이는 서식환경 특성과 직접적인 연관성은 없을 것으로 판단되었다.

## 요 약

쯤볼락(*Sebastes minor*), 세줄볼락(*Sebastes trivittatus*), 황볼락(*Sebastes owstoni*) 및 노랑볼락(*Sebastes steindachneri*)은 한국 동해 중부 이북해역에 서식하는 동해안 특산 어종이다. 이들 동해안 특산 볼락류의 분자진화를 이해하기 위하여 쯤볼락과 세줄볼락의 미토콘드리아 유전체(미토게놈)를 획득하였고, 한반도 주변 해역에 출현하는 16종 볼락의 미토게놈과 비교하였다. 쯤볼락 및 세줄볼락의 미토게놈 전체 크기는 각각 16,408 bp 및 16,409 bp이었으며, 37개의 유전자(13개의 단백질 코딩 유전자, 2개의 리보솜 RNA 유전자 및 22개의 tRNA 유전자)와 1개의 비암호화 영역으로 이루어져 있었다. 동해안 특산 볼락에 속하는 쯤볼락, 세줄볼락, 황볼락 및 노랑볼락의 미토게놈을 분석한 결과, 유전체 구조, 뉴클레오티드 구성, 유전자 배열 등에서 매우 유사한 특징을 가지고 있었다. 또한 비암호화 영역인 조절영역에 잘 보존된 “ATGTA” 모티프(motif) 2개가 존재하는 것이 확인되었고, 특정 염기서열의 반복(tandem repeats)은 발견되지 않았다. 이들 동해안 특산 볼락류 4종의 미토게놈 염기서열 간에 차이는 단백질 코딩 유전자 영역보다 조절영역에서 더 큰 것으로 나타났다. 한반도 주변 해역에 출현하는 볼락속 어류의 미토게놈 정보를 이용하여 분자계통학적 유연관계를 분석한 결과, 16종의 볼락을 4개의 클러스터(cluster)로 그룹화할 수 있었고, 이 중에서 동해안 특산 볼락류 4종은 3개의 클러스터에 속해 있었다. 황볼락(*S. owstoni*)은 흰꼬리볼락(*S. longispinis*), 우럭볼락(*S. hubbsi*), 개볼락(*S. pachycephalus*), 황점볼락(*S. oblongus*), 황해볼락(*S. koreanus*), 조피볼락(*S. schlegelii*) 및 탁자볼락(*S. taczanowskii*)과 동일한 클러스터에 속하고, 세줄볼락(*S. trivittatus*)은 누루시볼락(*S. vulpes*)과 동일한 유전적 분기군으로 나타났다. 동해안 특산 볼락류 4종 중에서 쯤볼락(*S. minor*)과 노랑볼락(*S. steindachneri*)은 동일한 클러스터로 분류되어 유연관계가 가장 높은 것으로 나타났다. 본 연구의 결과는 한국 동해 중부해역에 서식하는 볼락류의 진화양상을 이해하거나, Sebastidae 어류의 유전적 진화연구에 유용한 정보로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 사 사

본 논문은 한국해양과학기술원 주요사업인 ‘한국 주변 해양 생태계 변동 이해 및 대응 기반 연구(PE99913)’와 ‘생지화학

순환 및 해양환경변동 연구(PE99912)'의 지원을 받아 수행한 연구결과입니다. 본 연구결과 도출에 필요한 동해안 특산 볼락류 표본을 제공해 주신 국립수산물과학원의 박정호 박사님께 감사드립니다.

## REFERENCES

- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H.L. de Bruijn, 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. <https://doi.org/10.1038/290457a0>.
- Asakawa, S., Y. Kumazawa, T. Araki, H. Himeno, K. Miura and K. Watanabe. 1991. Strand-specific nucleotide composition bias in echinoderm and vertebrate mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.*, 32: 511-520. <https://doi.org/10.1007/BF02102653>.
- Avise, J.C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Genet.*, 25: 45-69. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.000401>.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27: 1767-1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>.
- Broughton, R.E., J.E. Milam and B.A. Roe. 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.*, 11: 1958-1967. <http://doi.org/10.1101/gr.156801>.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: McIntyre, R.J. (ed.), *Molecular evolutionary genetics*. Plenum Press, New York, USA, pp. 95-130.
- Buroker, N.E., J.R. Brown, T.A. Gilbert, P.J. O'Hara, A.T. Beckenbach, W.K. Thomas and M.J. Smith. 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics*, 124: 157-163. <https://doi.org/10.1093/genetics/124.1.157>.
- Catanese, G., M.M. Machado and C. Infante. 2010. Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: Strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species. *Gene*, 452: 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.12.004>.
- Crochet, P.A. and E. Desmarais. 2000. Slow rate of evolution in the mitochondrial control region of gulls (Aves: Laridae). *Mol. Biol. Evol.*, 17: 1797-1806. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026280>.
- Cui, L., R. Cao, Y. Dong, X. Gao, J. Cen and S. Lu. 2019. The first complete mitochondrial genome of the flathead *Cociella crocodilus* (Scorpaeniformes: Platycephalidae) and the phylogenetic relationships within Scorpaeniformes based on whole mitogenomes. *Genes*, 10: 533. <https://doi.org/10.3390/genes10070533>.
- Fenn, J.D., H. Song, S.L. Cameron and M.F. Whiting. 2008. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 49: 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.004>.
- Fernandez-Silva, P., J.A. Enriquez and J. Montoya. 2003. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.*, 88: 41-56. <https://doi.org/10.1113/eph8802514>.
- Frazer-Abel, A.A. and P.J. Hagerman. 1999. Determination of the angle between the acceptor and anti codon stems of a truncated mitochondrial tRNA. *J. Mol. Biol.*, 285: 581-593. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2320>.
- Hoelzel, A.R., J.M. Hancock and G.A. Dover. 1993. Generation of VNTRs and heteroplasmy by sequence turnover in the mitochondrial control region of two elephant seal species. *J. Mol. Evol.*, 37: 190-197.
- Hong, G., S. Jiang, M. Yu, Y. Yang, F. Li, F. Xue and Z. Wei. 2009. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of the cabbage butterfly, *Artogeia melete* (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 41: 446-455. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp030>.
- Hyde, J.R. and R.D. Vetter. 2007. The origin, evolution, and diversification of rockfishes of the genus *Sebastes* (Cuvier). *Mol. Phylogent. Evol.*, 44: 790-811. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.026>.
- Iwasaki, W., T. Fukunaga, R. Isagozawa, K. Yamada, Y. Maeda, T.P. Satoh, T. Sado, K. Mabuchi, H. Takeshima, M. Miya and M. Nishida. 2013. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 2531-2540. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst141>.
- Jang, Y.S., E.K. Lee, J.H. Park, K.Y. Kim and S. Kim. 2016. Complete mitochondrial genome of *Sebastes steindachneri* (Scorpaenidae: Scorpaeniformes) from the East Sea, Korea. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.*, 27: 4041-4043. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.1003834>.
- Jia, C., X. Zhang, S. Xu, T. Yang, T. Yanagimoto and T. Gao. 2020. Comparative analysis of the complete mitochondrial genomes of three rockfishes (Scorpaeniformes, *Sebastes*) and insights into the phylogenetic relationships of Sebastidae. *Biosci. Rep.*, 40: BSR20203379. <https://doi.org/10.1042/BSR20203379>.
- Johansen, S., P.H. Guddal and T. Johansen. 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Res.*, 18: 411-419. <https://doi.org/10.1093/nar/18.3.411>.
- Kai, Y., K. Nakayama and T. Nakabo. 2003. Molecular phylogenetic perspective on speciation in the genus *Sebastes* (Scorpaenidae) from the Northwest Pacific and the position of

- Sebastes* within the subfamily Sebastinae. Ichthyol. Res., 50: 239-244. <https://doi.org/10.1007/s10228-003-0163-9>.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol., 35: 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23: 2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Lavrov, D.V., W.M. Brown and J.L. Boore. 2000. A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius forficatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 13738-13742. <https://doi.org/10.1073/pnas.250402997>.
- Lee, S.K., Y.U. Kim, J.G. Myoung and J.M. Kim. 2000. Dictionary of Korean fish names. Junginsa Pub. Co., Seoul, Korea, 222pp.
- Lee, T.W. 2011. Seasonal variation in species composition of demersal fish in the coastal water off Uljin and Hupo in the East Sea of Korea in 2002. Korean J. Ichthyol., 23: 187-197.
- Lei, R., G.D. Shore, R.A. Brenneman, S.E. Engberg, B.D. Sitzmann, C.A. Bailey, L.M. Kimmel, R. Randriamampionona, J.F. Ranaivoarisoa and E.E. Louis Jr. 2010. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome for Hubbard's sportive lemur (*Lepilemur hubbardorum*). Gene, 464: 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.06.001>.
- Lower, T.M. and S.R. Eddy. 1997. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genome sequence. Nucleic Acids Res., 25: 955-964. <https://doi.org/10.1093/nar/25.5.955>.
- Macey, J.R., A. Larson, N.B. Ananjeva, Z. Fang and T.J. Papenfuss. 1997. Two novel gene orders and the role of light-strand replication in rearrangement of the vertebrate mitochondrial genome. Mol. Biol. Evol., 14: 91-104. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025706>.
- Matson, C.W. and R.J. Baker. 2001. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of red-backed voles (*Clethrionomys*). Mol. Biol. Evol., 18: 1494-1501. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003935>.
- Miya, M., A. Kawaguchi and M. Nishida. 2001. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. Mol. Biol. Evol., 18: 1993-2009. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003741>.
- Miya, M., H. Takeshima, H. Endo, N.B. Ishiguro, J.G. Inoue, T. Mukai, T.P. Satoh, M. Yamaguchi, A. Kawaguchi, K. Mabuchi, S.M. Shirai and M. Nishida. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: A new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 26: 121-138. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00332-9).
- Oh, J.N., S. Kim, E.K. Lee, J.H. Park, K.Y. Kim and Y.S. Jang. 2016. Complete mitochondrial genome of *Sebastes owstoni* (Scorpaenidae, Scorpaeniformes) from the East Sea, Korea. Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal., 27: 3952-3954. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.989501>.
- Ohama, T., A. Muto and S. Osawa. 1990. Role of GC-biases mutation pressure on synonymous codon choice in *Micrococcus luteus*, a bacterium with a high genomic GC-content. Nucleic Acids Res., 18: 1565-1569. <https://doi.org/10.1093/nar/18.6.1565>.
- Ojala, D., J. Montoya and G. Attardi. 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. Nature, 290: 470-474. <https://doi.org/10.1038/290470a0>.
- Perna, N.T. and T.D. Kocher. 1995. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. J. Mol. Evol., 41: 353-358.
- Rahman, M.M., K.B. Yoon, J.Y. Kim, M.Z. Hussin and Y.C. Park. 2016. Complete mitochondrial genome sequence of the Indian pipistrelle *Pipistrellus coromandra* (Vespertilioninae). Anim. Cells Syst., 20: 86-94. <http://dx.doi.org/10.1080/19768354.2016.1150877>.
- Ravin, N.V., Y.P. Galachyants, A.V. Mardanov, A.V. Beletsky, D.P. Petrova, Y.R. Zakharova, T.A. Sherbakova, Y.V. Likhoshway, K.G. Skryabin and M.A. Grachev. 2010. Complete sequence of the mitochondrial genome of a diatom alga *Synedra acus* and comparative analysis of diatom mitochondrial genomes. Curr. Genet., 56: 215-223. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0293-3>.
- Reyes, A., C. Gissi, G. Pesole and C. Saccone. 1998. Asymmetrical directional mutation pressure in the mitochondrial genome of mammals. Mol. Biol. Evol., 15: 957-966. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026011>.
- Ruokonen, M. and L. Kvist. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. Mol. Phylogenet. Evol., 23: 422-432. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00021-0).
- Saha, A., T. Johansen, R. Hedeholm, E.E. Nielsen, J.I. Westgaard, L. Hauser, B. Planque, S.X. Cadrin and J. Boje. 2017. Geographic extent of introgression in *Sebastes mentella* and its effect on genetic population structure. Evol. Appl., 10: 77-90. <https://doi.org/10.1111/eva.12429>.
- Satoh, T.P., M. Miya, H. Endo and M. Nishida. 2006. Round and pointed-head grenadier fishes (Actinopterygii: Gadiformes) represent a single sister group: Evidence from the complete mitochondrial genome sequences. Mol. Phylogenet. Evol., 40: 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.014>.
- Sbisa, E., F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole and C. Saccone. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. Gene, 205: 125-140. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00404-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00404-6).
- Shen, X., Z. Pu, X. Chen, R.W. Murphy and Y. Shen. 2019. Convergent

- evolution of mitochondrial genes in deep-sea fishes. *Front. Genet.*, 10: 925. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00925>.
- Sun, Y., C. Chen, J. Gao, M.N. Abbas, S. Kausar, C. Qian, L. Wang, G. Wei, B.J. Zhu and C.L. Liu. 2017. Comparative mitochondrial genome analysis of *Daphnis nerii* and other lepidopteran insects reveals conserved mitochondrial genome organization and phylogenetic relationships. *PLoS ONE*, 12: e0178773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178773>.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 173-216. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62066-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62066-5).
- Wyman, S.K., R.K. Jansen and J.L. Boore. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, 20: 3252-3255. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth352>.
- Xiao, W., Y. Zhang and H. Liu. 2001. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 18: 163-173. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0879>.
- Yang, H., J. Xia, J.E. Zhang, J. Yang, H. Zhao, Q. Wang, J. Sun, H. Xue, Y. Wu, J. Chen, J. Huang and L. Liu. 2018. Characterization of the complete mitochondrial genome sequences of three croakers (Perciformes, Sciaenidae) and novel insights into the phylogenetics. *Int. J. Mol. Sci.*, 19: 1741. <https://doi.org/10.3390/ijms19061741>.
- Yang, Z. and J.P. Bielawski. 2000. Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.*, 15: 496-503. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01994-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01994-7).
- Zhang, L.P., Y.Y. Cai, D.N. Yu, K.B. Storey and J.Y. Zhang, 2018. Gene characteristics of the complete mitochondrial genomes of *Paratoxodera polyacantha* and *Toxodera hauseri* (Mantodea: Toxoderidae). *PeerJ*, 6: e4595. <https://doi.org/10.7717/peerj.4595>.