Vol. 46(3):131-142
http://dx.doi.org/10.4217/OPR.2024012

Ocean and Polar Research

September 2024

Article

CC BY NC

eDNA 분석을 위한 황해 주요 수산자원의 CO1 염기서열 분석

사공현[1] · 박주면[2] · 이연정[1] · 양원석[1] · 이수정[3] · 김맹진[4] · 최동한[1*]

[1]한국해양과학기술원 기후대응·생태연구부
(49111) 부산광역시 영도구 해양로 385
[2]한국해양과학기술원 독도전문연구센터
(36315) 울진군 죽변면 해양과학길 48
[3]국립수산과학원 서해수산연구소 기후환경자원과
(22383) 인천광역시 중구 선녀바위로 14
[4]국립수산과학원 동해수산연구소 기후환경자원과
(25435) 강릉시 연곡면 동덕리 30-6

Sequence Analysis of CO1 Genes of Fishery Resources from the Yellow Sea

Hyun Sagong[1], Joo Myun Park[2], Yeonjung Lee[1], Wonseok Yang[1], Soo Jeong Lee[3], Maeng Jin Kim[4], and Dong Han Choi[1*]

[1]Ocean Climate Response and Ecosystem Research Department, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Busan 49111, Korea
[2]Dokdo Research Center, Korea Institute of Ocean Science & Technology, Uljin 36315, Korea
[3]Fisheries Resources and Environment Research Division, West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Incheon 22383, Korea
[4]Fisheries Resources and Environment Research Division, East Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Gangneung 25435, Korea

Abstract : Ocean change due to anthropogenic activities and climate change are causing a decline in cold-water fish species and emergence of subtropical fish species in Korean waters. Therefore, environmental change-dependent time-space distribution of fishery resources in Korea, which has a big fisheries industry, needs to be investigated. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding is an environmentally noninvasive method for understanding the spatiotemporal distribution of marine organisms at high spatial resolution. The highly variable cytochrome oxidase-1 (CO1) gene is used in eDNA studies for species identification across diverse taxa. However, it exhibits genetic differences depending on geographical distribution. For improving the accuracy of eDNA research, the CO1 database should be expanded by incorporating sequence information for individuals inhabiting the Korean seas. Here, 106 biological samples from the Yellow Sea were identified morphologically and their nucleotide sequences were compared with those in the GenBank. Most sequences were 100% identical with those in the GenBank. In most samples, the morphological and molecular identification results were consistent, indicating the utility of CO1. However, some nucleotide sequences differed from those in the database. Amino acid sequences translated from nucleotide sequences with less than 97% similarity showed high similarity to the amino acid database, indicating intraspecies variation due to “silent

*Corresponding author. E-mail: dhchoi@kiost.ac.kr

mutations". These results highlight the need for a sequence database of fishery resources in Korean coastal waters to improve the reliability of eDNA studies using CO1. However, because of the same CO1 sequences in several species, genetic markers need to be developed and the database should be supplemented with more sequences for reliable high-resolution eDNA studies.

Key words : fishery resources, Yellow Sea, CO1 sequence, eDNA

1. 서 론

현재 인간 활동이나 기후 변화에 의한 해양 환경 변화는 해양 생태계에 영향을 주고 있으며, 이는 우리나라 해역에서도 어획량의 변동(냉수 어종 감소, 아열대성 어류의 출현 등)으로 영향이 나타나고 있다(Lee and Jeon 2005; 김종규 2022). 삼면이 바다로 되어 있는 우리나라 특성상 수산업이 발달하였고 수산물의 소비량이 많다. 이러한 점에서 해양 환경 변화가 더욱 가속화되고 있는 시점에 수산자원의 관리를 위해서 시·공간 분포 특성에 대한 과학조사의 필요성이 커지고 있다. 수산자원의 시·공간적 분포를 보고한 이전 연구들은 주로 저인망과 저층 트롤 같은 어획을 통한 방법과 잠수를 통한 시각적 조사를 이용하였다(Chen et al. 2018; Costello et al. 2017; Farrag et al. 2019). 이러한 조사 방법들은 채집에 많은 시간과 노동력이 필요하며 포획된 생물의 종을 동정하는 것에 높은 전문성이 요구되어, 넓은 범위에서 연구를 수행하기에는 어려운 단점이 있다. 이러한 기존 조사방법의 단점을 보완하기 위해 환경유전자(environmental DNA, eDNA)를 통한 연구가 대두되고 있다(Taberlet et al. 2018). 환경유전자는 생물로부터 환경으로 떨어져 나온 피부, 비늘, 털과 분비물 등에 포함된 유전물질을 말한다. 환경유전자 연구를 위한 시료(해수, 저질 등) 채집은 환경 비 파괴적인 방법(채수, 그랩 등)을 통해 이루어지며 비교적 적은 시간과 노동력이 요구된다. 또한 메타바코딩 분석을 통해 대량 시료의 분석이 가능하고, 높은 해상도의 해양생물 정보를 제공할 수 있어 수산자원의 시·공간 분포 특성 및 자원량 추정 연구에 효과적인 방법으로 알려져 있다(Ficetola et al. 2008; Stat et al. 2017; Rourke et al. 2022). 이에 따라 현재 우리나라 담수 및 해양의 수생태계 연구에도 환경유전자 메타바코딩 분석법이 활용된 바 있다(Alam et al. 2020; Kim et al. 2022).

환경유전자 메타바코딩 분석에는 연구목적에 따라 18S rDNA (Jo et al. 2019), 16S rDNA (Bessey et al. 2020) 그리고 23S rDNA (Schulte et al. 2024) 등 다양한 DNA 마커가 사용되고 있으며, 그 중 미토콘드리아 DNA가 많은 연구들에서 선호되어진다. 미토콘드리아는 대부분 진핵생물에서 발견되는데 돌연변이 발생 확률이 높고 모계 유전으로 인해 유전자 변이가 수직적으로 유전되어 유전학, 계통학 그리고 생물종 분류 등에 유용하게 사용되고 있으며, 그 중 미토콘드리아 cytochrome oxidase-1 (CO1) 유전자는 특히 동물군에서 높은 변이를 보여 다양한 생물군의 종 동정에 유리하기 때문에 메타바코딩 분석에 유용한 DNA 마커로 빈번하게 활용되고 있다 (Colmenares et al. 2023; Karim et al. 2018; Mychek-Londer et al. 2020).

메타바코딩 분석을 위해서는 다양한 수산자원에 대한 각 마커의 유전자 정보가 요구된다. 물론, GenBank, European Nucleotide Archive (ENA), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) 등 공공유전자 정보은행에서 많은 관련 정보를 얻을 수는 있으나, 다른 지역에 분포하는 개체군 간의 유전적 변이의 존재(Narváez-Barandica et al. 2023; Villamor et al. 2014)를 고려하면, 특정 해역의 생물 유래 유전자 분석을 통한 데이터베이스의 확충은 환경유전자를 이용한 수산자원 분포 연구에 중요한 선결 과제로 평가된다. 본 연구에서는 환경유전자를 이용한 황해 수산자원 분포 연구를 위한 데이터베이스 구축의 일환으로 황해에서 채집된 수산자원의 CO1 유전자의 염기서열을 분석하였다.

2. 재료 및 방법

생물 시료의 채집

생물 시료는 2021년과 2022년에 걸쳐 황해(보령, W153, W163, W173)에서 트롤 또는 안강망을 통해 채집되었다(Fig 1). 106개의 생물 시료는 형태적 동정 이후 조직을 분리해 냉동하였고 이후 조직 시료를 동결 건조하여 보관하였다. 형태 분류는 Nakabo (2013)에 따라 수행하였다.

DNA 추출 및 PCR

동결 건조된 조직 시료 10 mg에서 DNeasy® Blood and Tissue Kits (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용해 제조사에서 제공한 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 3개의 프라이머 세트(Table 1)를 사용하여 실행하였다. 먼저

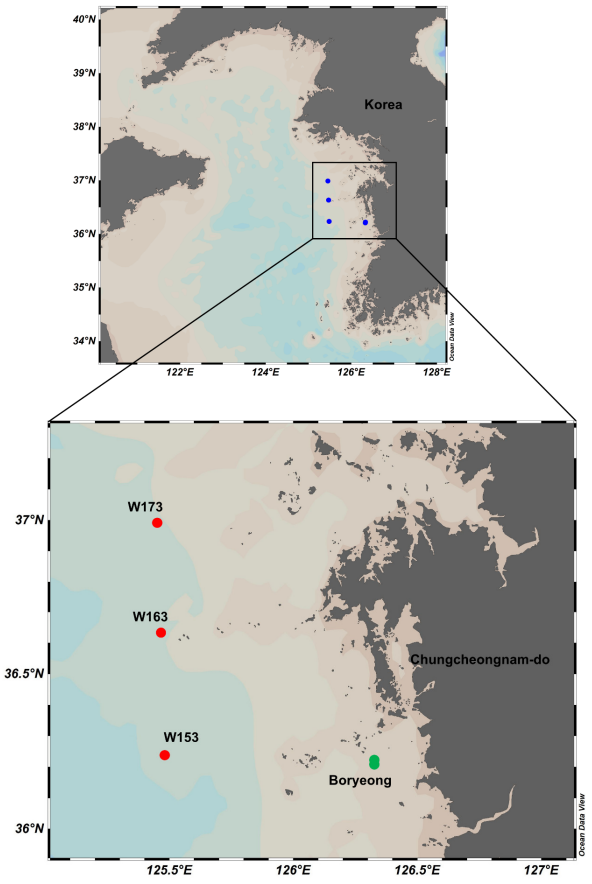

Fig. 1. Map showing the sampling site in Yellow Sea. Red and green dots represent the sites from where samples were collected using a trawl and stow net, respectively

'Sauron-S878 forward' – 'jgHCO2198 reverse' 프라이머 세트(Sauron 세트)를 사용하여 PCR을 진행하였으며, 원하는 PCR 산물이 얻어지지 않는 시료는 'LCO1490 forward' – 'HCO2198 reverse' 프라이머 세트(LCO 세트) 또는 어류에 대해서 'FishBCL forward' - 'FishBCH reverse' 프라이머 세트(BCL 세트)를 사용하여 PCR 진행하였다. PCR 반응액은 10X Ex Taq buffer 5 μl, 25 mM dNTP 4 μl, 5~20 pmol 프라이머세트 각 2 μl, 20 μg/μl BSA 0.4 μl, 25mM $MgCl_2$ 0.4 μl, Ex Taq (TaKaRa, Japan) 0.2 μl, DNA 1 μl와 멸균한 증류수(최종 부피 50 μl)를 넣어 만들었다. PCR은 각 프라이머 세트에 대해 Table 1에 제시된 조건에서 진행하였다.5분. PCR 후 증폭 밴드를 전기영동하여 확인하였으며, 추가적으로 AccuPrep® PCR/ Gel Purification Kit (Bionner, Korea)를 이용해 PCR 정제 또는 gel 정제를 하였다. 정제된 PCR 산물은 Macrogen (서울)에서 Sanger sequencing 방법으로 염기서열을 분석하였다. 최종적으로 얻어진 106개 시료의 염기서열은 GenBank에 등록(accession no. PP897035-PP897140)하였다.

염기서열을 이용한 종 분석

얻어진 염기서열은 GenBank의 BLASTn 프로그램(Altschul et al. 1997)을 통해 가장 근접한 종을 결정하였다. 99% 이상의 DNA 염기서열 유사도 수준에서 종 동정을 하였으며 BLASTn에서 가장 높은 유사도를 보인 종과 형태 분류의 종이 일치하면, 해당 종으로 동정하였다. 다수의 종이 가장 높은 유사도를 보였을 때, 형태 동정된 종으로 분류하였다. 99% 이하의 유사도를 보인 염

Table 1. Primer sets and PCR conditions used in the study

Set name	Primer	Sequence (5'-3')	References	PCR conditions
Sauron	Sauron-S878	GGD RCW GGW TGA ACW GTW TAY CCN CC	Rennstam Rubbmark et al. (2018)	94°C 5min 94°C 20sec 51°C 30sec 29x 72°C 1min 72°C 3min
	jgHCO2198	TAI ACY TCI GGR TGI CCR AAR AAY CA	Geller et al. (2013)	
LCO	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Folmer et al. (1994)	94°C 5min 94°C 30sec 42°C 30sec 30x 72°C 1min 72°C 5min
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA		
BCL	Fish-BCL	TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC	Baldwin et al. (2009)	94°C 5min 94°C 30sec 50°C 30sec 33x 72°C 1min 72°C 5min
	Fish-BCH	ACT TCY GGG TGR CCR AAR AAT CA		

기서열에 대해서는 번역된 아미노산 서열을 BLASTp 프로그램(Altschul et al. 1997)을 이용하여 비교하였다.

3. 결과 및 토의

87종(척삭동물-61, 절지동물-20, 연체동물-6)에 속하는 106개 시료의 형태 및 CO1 염기서열을 분석하였다(Table 2). 프라이머로 Sauron 세트를 이용한 PCR 증폭으로 86개의 시료에 대한 CO1 염기서열(313 bps)을 얻었으며, 이 프라이머 세트로 증폭이 되지 않은 나머지 시료는 LCO 세트로 14개 시료(658 bps)와 BCL 세트로 6개 시료(655 bps)에서 염기서열을 얻었다.

71개의 시료의 CO1 염기서열은 GenBank에 등록된 염기서열과 100% 유사도를 보였고 31개의 시료는 99.0%–99.9% 범위의 유사도를 나타냈으며 나머지 4개의 시료는 97.0% 이하의 낮은 유사도를 나타내었다(아

Table 2. Results of morphological and molecular identification for 106 samples. Bold font indicates samples with different morphological and molecular identification results. The table with the Korean names of the samples is provided as Supplementary Table S1.

Sample No.	Phylum	Morphological Identification	CO1 DNA sequence		Closest relative in GenBank		
		Scientific Name	Size (bps)	Accession No.	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)
1	Chordata	*Decapterus maruadsi*	313	PP897035	*Decapterus maruadsi*	MK264590	100
2		*Trichiurus japonicus*	313	PP897036	*Trichiurus japonicus*	MK292708	100
3		*Scomber japonicus*	313	PP897039	*Scomber japonicus*	MH638665	100
4		*Takifugu vermicularis*	313	PP897040	*Takifugu vermicularis*	OQ700762	100
5		*Ammodytes personatus*	313	PP897046	*Ammodytes personatus*	MK163330	99.4
6		*Sphyraena pinguis*	313	PP897048	*Sphyraena pinguis*	MK560560	100
7			313	PP897049		MK560560	99.7
8		*Liparis tanakae*	313	PP897050	*Liparis tanakae*	MW829367	100
9		*Platycephalus indicus*	313	PP897053	*Platycephalus indicus*	JN885883	99.7
10		*Saurida elongata*	313	PP897054	*Saurida elongata*	NC_023980	100
11		*Collichthys niveatus*	313	PP897057	*Collichthys niveatus*	MF004327	100
12		*Pampus echinogaster*	313	PP897058	*Pampus echinogaster*	MF122597	100
13		*Pleuronichthys cornutus*	313	PP897059	*Pleuronichthys cornutus*	MG835689	100
14			313	PP897060		JQ738533	100
15		*Amblychaeturichthys hexanema*	313	PP897061	*Amblychaeturichthys hexanema*	JQ738606	99.0
16			313	PP897062		NC_020786	100
17		*Tridentiger trigonocephalus*	313	PP897067	*Tridentiger trigonocephalus*	MK264461	100
18		*Zoarces gillii*	313	PP897068	*Zoarces gillii*	NC_071217	100
19			313	PP897071		MK264688	100
20		*Engraulis japonicus*	313	PP897072	*Engraulis japonicus*	MK264688	99.4
21			313	PP897073		MF628292	100
22		*Pseudopleuronectes yokohamae*	313	PP897074	*Pseudopleuronectes yokohamae*	MG835681	99.7
23		*Uranoscopus japonicus*	313	PP897077	*Uranoscopus japonicus*	KY372356	99.0
24		*Cynoglossus semilaevis*	313	PP897079	*Cynoglossus semilaevis*	DQ116751	100
25			313	PP897080		NC_012825	100
26		*Setipinna tenuifilis*	313	PP897083	*Setipinna tenuifilis*	KU302310	100
27		*Sardinella zunasi*	313	PP897084	*Sardinella zunasi*	NC_057589	99.7
28		*Pennahia argentata*	313	PP897086	*Pennahia argentata*	MK264741	100
29		*Hemitripterus villosus*	313	PP897089	*Hemitripterus villosus*	NC_046471	100
30			313	PP897090		NC_035059	99.7
31		*Chelidonichthys kumu*	313	PP897091	*Chelidonichthys kumu*	KP330564	100
32			313	PP897092		NC_035059	99.7

Table 2. Continued

Sample No.	Phylum	Morphological Identification	CO1 DNA sequence		Closest relative in GenBank		
		Scientific Name	Size (bps)	Accession No.	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)
33	Chordata	*Chaeturichthys stigmatias*	313	PP897094	*Chaeturichthys stigmatias*	MK264445	100
34		*Myersina filifer*	313	PP897095	*Myersina filifer*	MK264440	100
35		*Coilia mystus*	313	PP897096	*Coilia mystus*	MH465026	100
36		*Jaydia lineata*	313	PP897099	*Jaydia lineata*	KX388258	100
37			313	PP897100		MT363638	100
38		*Coilia nasus*	313	PP897101	*Coilia nasus*	ON684262	100
39		*Minous monodactylus*	313	PP897102	*Minous monodactylus*	MK613995	99.7
40		*Trachurus japonicus*	313	PP897103	*Trachurus japonicus*	MK777193	100
41		*Konosirus punctatus*	313	PP897104	*Konosirus punctatus*	MT381808	100
42		*Tarphops elegans*	313	PP897107	*Tarphops elegans*	KU199016	99.7
43		*Nuchequula nuchalis*	313	PP897109	*Nuchequula nuchalis*	LC484871	100
44		*Hexagrammos otakii*	313	PP897115	*Hexagrammos otakii*	AP006786	99.7
45		*Pagrus major*	313	PP897120	*Pagrus major*	LC201780	100
46		*Cynoglossus joyneri*	313	PP897121	*Cynoglossus joyneri*	KU236834	99.7
47			313	PP897122		KU236834	99.7
48			313	PP897123		MW283155	100
49		*Larimichthys polyactis*	313	PP897124	*Larimichthys polyactis*	MK264728	100
50			313	PP897125		JN250682	100
51		*Thryssa kammalensis*	313	PP897126	*Thryssa kammalensis*	MK264485	100
52		*Sillago japonica*	313	PP897127	*Sillago japonica*	MK264510	99.7
53		*Erisphex pottii*	313	PP897129	*Erisphex pottii*	KP330544	100
54		***Thryssa hamiltonii***	**313**	**PP897130**	***Setipinna tenuifilis***	**JN825732**	**100**
55		*Hyporhamphus sajori*	313	PP897131	*Hyporhamphus sajori*	KP112274	100
56		*Okamejei kenojei*	313	PP897132	*Okamejei kenojei*	HQ711863	100
57			313	PP897133		HQ711863	99.7
58		*Collichthys lucidus*	313	PP897134	*Collichthys lucidus*	KP722710	99.7
59		*Lophius litulon*	313	PP897136	*Lophius litulon*	NC_023828	100
60		*Sebastes koreanus*	313	PP897137	*Sebastes koreanus*	KY275280	100
61		*Takifugu niphobles*	658	PP897087	*Takifugu niphobles*	KY275363	100
62		*Platycephalus indicus*	658	PP897098	*Platycephalus indicus*	MT628403	100
63		*Ilisha elongata*	658	PP897110	*Ilisha elongata*	HM030767	100
64		*Takifugu obscurus*	658	PP897135	*Takifugu obscurus*	KP112457	100
65		*Pholis fangi*	658	PP897106	*Pholis fangi*	KC748108	99.9
66			658	PP897138		KC748108	100
67		*Takifugu poecilonotus*	658	PP897139	*Takifugu poecilonotus*	KY514070	100
68		*Takifugu pseudommus*	658	PP897140	*Takifugu pseudommus*	KY514075	100
69		*Paralichthys olivaceus*	655	PP897056	*Paralichthys olivaceus*	KX254475	100
70		*Kareius bicoloratus*	655	PP897063	*Kareius bicoloratus*	MH032488	99.9
71		*Miichthys miiuy*	655	PP897076	*Miichthys miiuy*	MK560626	100
72		*Pseudorhombus cinnamoneus*	655	PP897085	*Pseudorhombus cinnamoneus*	NC_022447	99.9
73		*Mugil cephalus*	655	PP897093	*Mugil cephalus*	KP112324	100
74		*Tridentiger barbatus*	655	PP897097	*Tridentiger barbatus*	MW388921	89.5

Table 2. Continued

Sample No.	Phylum	Morphological Identification	CO1 DNA sequence		Closest relative in GenBank		
		Scientific Name	Size (bps)	Accession No.	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)
75	Arthropoda	*Oratosquilla oratoria*	313	PP897037	*Oratosquilla oratoria*	MF173572	100
76		*Palaemon gravieri*	313	PP897042	*Palaemon gravieri*	KU899135	100
77		*Matuta planipes*	313	PP897043	*Matuta planipes*	HM180672	99.7
78		*Oregonia gracilis*	313	PP897045	*Oregonia gracilis*	MN138414	99.0
79		*Ovalipes punctatus*	313	PP897047	*Ovalipes punctatus*	OL876977	100
80		*Portunus trituberculatus*	313	PP897051	*Portunus trituberculatus*	KP976354	100
81		*Trachypenaeus curvirostris*	313	PP897052	*Trachypenaeus curvirostris*	KP176653	100
82		*Leptochela gracilis*	313	PP897064	*Leptochela gracilis*	OL877200	89.1
83		*Romaleon gibbosulum*	313	PP897065	*Romaleon gibbosulum*	OL877006	100
84		*Charybdis bimaculata*	313	PP897066	*Charybdis bimaculata*	MG787408	100
85		*Crangon hakodatei*	313	PP897069	*Crangon hakodatei*	OL877206	99.4
86			313	PP897070		OL877206	99.4
87		*Charybdis japonica*	313	PP897075	*Charybdis japonica*	KX060214	100
88		*Portunus sanguinolentus*	313	PP897105	*Portunus sanguinolentus*	OL877200	100
89		***Heptacarpus rectirostris***	**313**	**PP897108**	***Heptacarpus sp.***	**OP215649**	**84.0**
90		*Acetes chinensis*	313	PP897111	*Acetes chinensis*	MK941909	100
91		*Metapenaeus joyneri*	313	PP897112	*Metapenaeus joyneri*	ON329768	99.7
92			313	PP897113		MT178643	99.7
93			313	PP897114		MT178643	100
94		*Alpheus japonicus*	658	PP897044	*Alpheus japonicus*	HQ700926	100
95		***Lapreutes planirostris***	**658**	**PP897055**	***Latreutes anoplonyx***	**OR120369.1**	**97.0**
96		*Exopalaemon carinicauda*	658	PP897078	*Exopalaemon carinicauda*	MT710226	100
97		*Metapenaeopsis dalei*	658	PP897088	*Metapenaeopsis dalei*	NC_029457	`100
98	Mollusca	*Volutharpa ampullacea*	313	PP897038	*Volutharpa ampullacea*	NC_067974	99.7
99		***Loliolus japonica***	**313**	**PP897081**	***Loliolus beka***	**NC_028034**	**100**
100			**313**	**PP897082**		**HQ529509**	**99.7**
101		*Amphioctopus fangsiao*	313	PP897116	*Amphioctopus fangsiao*	HQ846127	100
102			313	PP897117		HQ846127	99.7
103		*Sepia esculenta*	313	PP897118	*Sepia esculenta*	HQ846085	99.4
104			313	PP897119		MH542447	100
105		*Euprymna morsei*	658	PP897041	*Euprymna morsei*	HQ846104	100
106		*Neverita didyma*	658	PP897128	*Neverita didyma*	NC_046594	100

작망둑, 돗대기새우, 좁은뿔꼬마새우, 넓적뿔꼬마새우) (Table 2). 분자학적 동정 결과를 형태학적 동정 결과와 비교하였을 때 대부분의 시료에서 일치하였지만 5개의 시료(풀반지, 좁은뿔꼬마새우, 넓적뿔꼬마새우 그리고 반원니꼴뚜기)들은 불일치하였고 동일 속의 다른 종(풀반지→반지, 좁은뿔꼬마새우→좁은뿔꼬마새우속, 넓적뿔꼬마새우→매끈등꼬마새우, 반원니꼴뚜기→참꼴뚜기)으로 나타났다. 이들 5개 시료 중 3종은 형태학 기반으로 동정된 종들과 90% 이하의 낮은 유사도를 나타냈고(풀반지-81.5%, 좁은뿔꼬마새우-81.6%, 반원니꼴뚜기-89.1%), 넓적뿔꼬마새우의 경우 데이터베이스에 염기서열이 등록되어 있지 않아 비교할 수 없었다.

형태학적 동정과 분자생물학적 동정 결과가 일치하는 시료 중 32개는 GenBank 데이터베이스의 자료와 1개에서 3개까지의 염기서열의 차이가 나타났다(Table 2). 그리고 복수의 시료가 분석된 몇몇 종에 있어서도 동일 종 내에서 1개 또는 2개의 염기서열 차이를 확인할 수 있었다(꼬치고기, 양태, 도화망둑 외 12종). 이러한 결과는 동일한 종이라 할지라도 지역별 개체군 또는 지역 내 개체간 유전적 변이가 발생할 수 있으며 eDNA 연구를 위해

서는 해당 지역의 수산 자원에 대한 유전자 정보 확보가 필요함을 시사한다.

데이터베이스와 97.0% 이하의 DNA 유사도를 나타내는 4개의 염기서열을 번역하여 아미노산 서열을 얻은 후 형태 분석으로 동정된 종의 아미노산 서열 데이터베이스와의 유사도를 확인하였다(Table 3). 그 결과 DNA 유사도가 89.1%로 낮았던 돗대기새우는 아미노산 서열에서 100%의 유사도를 나타냈다. GenBank 데이터베이스에 등록된 염기서열이 없어 동일 속의 매끈등꼬마새우와 97.0%의 DNA 유사도를 보였던 넓적뿔꼬마새우는 매끈등꼬마새우의 아미노산 서열과 100%의 유사도를 나타냈다. DNA 유사도가 89.5%의 낮은 값을 보인 아작망둑은 아미노산 서열 비교에서는 99.1%의 높은 유사도를 나타냈다. 마찬가지로 DNA 서열에서 동일속의 DNA 서열과 84.0%의 낮은 유사도를 보였던 좁은뿔꼬마새우는 동일종의 아미노산 서열 비교에서 96.2%로 유사도가 크게 증가하였다. 데이터베이스의 비교종과 낮은 DNA 유사도를 보인 염기서열을 확인한 결과 대부분이 코돈의 3번째 염기에서 변이가 나타나거나 류신으로 번역되는 침묵 돌연변이로 나타난 것으로 확인되었다. 이러한 침묵돌연변이는 이전 호주 어류(Ward et al. 2005)와 인도 Kakinada 해안 전갱이과(Persis et al. 2009)의 CO1 바코딩 연구들에서도 보고된 바 있어 일부 수산자원에서 빈번하게 발생되는 것으로 보인다. 따라서 동일 종이라 할지라도 지역별 개체군에 따라 DNA 수준에서의 변이가 매우 클 수 있으며, 환경유전자 연구의 신뢰성을 높이기 위해서 우리나라 근해의 수산 자원에 대한 유전자 정보의 확보를 통한 데이터베이스 확충이 필수적임을 시사한다.

두 개의 시료(풀반지, 반원니꼴뚜기)에서는 형태학적 동정과 분자학적 동정의 결과가 다르게 나타났다. 형태 기반으로 풀반지와 반원니꼴뚜기로 동정된 시료에서 얻은 염기서열의 경우 각각 GenBank의 반지와 참꼴뚜기의 염기서열과 100%의 유사도를 보였다(Table 2). 반면, 풀반지와 반원니꼴뚜기의 GenBank DNA 서열과는 90% 이하의 유사도로 확인되었다(풀반지-81.5%, 반원니꼴뚜기-89.1%). 형태학적 동정법은 육안으로 종의 형태적 특징을 관찰해 종을 식별하는 방법으로 특수한 장비나 실험 장소의 제약이 없어 이전 많은 연구에서 전통적 종 동정 방법으로 이용되어 왔다. 하지만 형태적 특징이 유사한 종들의 시각적인 구별에는 숙련된 전문가가 필요하며 성별이나 성장단계에 따른 형태 차이 그리고 시료 채집 중 발생될 수 있는 시료의 훼손의 문제가 형태 기반 동정에 어려움을 준다(Bingpeng et al. 2018; Briones-Fourzán and Hendrickx 2022). 본 연구에서 풀반지와 반원니꼴뚜기에서 나타난 두 동정법 간의 차이는 유사한 형태적 특징을 가지는 다른 종들로 오동정한 결과로 보인다. 이전 Truong et al. (2022)의 연구에서 *Glossogobius* 속의 3종에 대해 형태학적 분류와 분자적 분류 간의 불일치를 확인하였고 Gomes et al. (2015)의 연구에서는 형태적으로 동일하다고 판단한 종들을 분자학적 분석을 통하여 서로 다른 종으로 식별하였다. 좁은뿔꼬마새우의 경우 동일 종의 염기서열과는 81.6%의 낮은 유사도를 보인 반면, 동일 속의 다른 종과는 85.3%로 더 높은 유사도를 보여 형태 오동정의 가능성이 있다. 다만, GenBank 데이터베이스에 비교를 위한 좁은뿔꼬마새우의 CO1 염기서열이 동일한 지역에서 얻어진 2개의 DNA 서열만 존재하여, GenBank 상 정보의 오류 가능성도 배재할 수는 없다.

한편, 25개의 시료는 BLASTn 검색 결과 복수의 종에서 가장 높은 염기서열 유사도가 나타났다(Table 4). 흰점참복 시료는 동일 속에 속하는 4종, 7개 시료는 3종, 나머지 15개 시료에서는 2종이 동일한 염기서열을 갖는 것으로 나타나, 일부 종의 경우 본 연구에서 사용한 CO1 유전자의 영역을 대상으로 한 환경유전자 연구가 종 수준까지 분류가 가능하지 않음을 보였다. 이러한 어려움

Table 3. Results of the BLASTp search for samples with nucleotide sequence identity less than 97%, based on translated amino acid sequences.

Sample No.	Morphological Identification	Closest relative in GenBank						
		Nucleotide sequences			Amino acid sequences			
	Scientific Name	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)	Size (AAs)	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)
74	*Tridentiger barbatus*	*Tridentiger barbatus*	MW388921	89.5	218	*Tridentiger barbatus*	WDY39142	99.1
78	*Leptochela gracilis*	*Leptochela gracilis*	OL877200	89.1	104	*Leptochela gracilis*	WML78298	100
89	*Heptacarpus rectirostris*	*Heptacarpus* sp.	OP215649	84.0	104	*Heptacarpus rectirostris*	UYZ41307	96.2
95	*Lapreutes planirostris*	*Latreutes anoplonyx*	OR120369	97.0	219	*Latreutes anoplonyx*	YP_010926794	100

Table 4. Summary of BLASTn search results for 25 samples in which multiple species were identified with the highest identity levels. Bold font indicates the results of molecular identification. If there is no Korean name, it is written as n/a

Sample No.	Closest relative in GenBank		
	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)
1	***Decapterus maruadsi***	**MK264590**	**100**
	Decapterus macarellus	JQ681500	100
8	***Liparis tanakae***	**MW829367**	**100**
	Liparis agassizii	HM180656	100
	Liparis chefuensis	GU586125	100
10	***Saurida elongata***	**NC_023980**	**100**
	Saurida microlepis	NC_023980	100
12	***Pampus echinogaster***	**MF122597**	**100**
	Pampus argenteus	MF122597	100
16	***Amblychaeturichthys hexanema***	**NC_020786**	**100**
	Chaeturichthys stigmatias	NC_020786	100
18	***Zoarces gillii***	**NC_071217**	**100**
	Zoarces elongatus	HQ703959	100
26	***Setipinna tenuifilis***	**KU302310**	**100**
	Thryssa adelae	HM180923	100
33	***Chaeturichthys stigmatias***	**MK264445**	**100**
	Acanthogobius hasta	HQ711875	100
	Rhinogobius maculafasciatus	JQ343912	100
35	***Coilia mystus***	**MH465026**	**100**
	Trichiurus lepturus	MW388780	100
38	***Coilia nasus***	**ON684262**	**100**
	Coilia macrognathos	MF122134	100
40	***Trachurus japonicus***	**MK777193**	**100**
	Trachurus declivis	KM006748	100
43	***Nuchequula nuchalis***	**LC484871**	**100**
	Leiognathus brevirostris	MK264532	100
44	***Hexagrammos otakii***	**AP006786**	**99.7**
	Hexagrammos octogrammus	HQ711871	100
49	***Larimichthys polyactis***	**MK264728**	**100**
	Collichthys niveatus	NC_014263	100
	Chrysochir aureus	MZ895578	100
54	***Setipinna tenuifilis***	**JN825732**	**100**
	Thryssa adelae	HM180923	100
55	***Hyporhamphus sajori***	**KP112274**	**100**
	Hyporhamphus intermedius	NC_026467	100
56	***Okamejei kenojei***	**HQ711863**	**100**
	Raja pulchra	JN813095	100
	Okamejei boesemani	HM180813	100

Table 4. Contitneud

Sample No.	Closest relative in GenBank		
	Scientific Name	Accession No.	Identities (%)
57	***Okamejei kenojei***	**HQ711863**	**99.7**
	Raja pulchra	JN813095	99.7
	Okamejei boesemani	HM180813	99.7
58	***Collichthys lucidus***	**KP722710**	**99.7**
	Larimichthys crocea	EU266380	99.7
59	***Lophius litulon***	**NC_023828**	**100**
	Grammistes sexlineatu	NC_024108	100
61	***Takifugu niphobles***	**KY275363**	**100**
	Takifugu alboplumbeus	KY275363	100
68	***Takifugu pseudommus***	**KY514075**	**100**
	Takifugu chinensis	KY514072	100
	Takifugu rubripes	NC_034005	100
	Takifugu flavidus	NC_024199	100
77	***Matuta planipes***	**HM180672**	**99.7**
	Matuta lunaris	HM180672	99.7
87	***Charybdis japonica***	**KX060214**	**100**
	Gaetice depressus	KP976229	100
	Charybdis variegata	EU284142	100
104	***Sepia esculenta***	**MH542447**	**100**
	Sepia aculeata	LC121559	100
	Sepia robsoni	AF350495	100

을 극복하기 위해 식별이 어려운 종에 대한 특이적 프라이머를 사용하거나(Li et al. 2022) 다른 유전자 영역을 대상으로 하는 다중 프라이머 세트를 사용하는 방법(Kumar et al. 2022; Zhang et al. 2020)에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 예로 시료의 상당수를 차지하는 어류의 경우에는 12S rRNA 유전자를 타겟으로 하는 MiFish primer 세트(Miya et al. 2015)가 환경유전자 연구에 많이 사용되고 있으며 또 다른 주요 수산자원인 두족류(Kim et al. 2019)와 갑각류(Komai et al. 2019)에 대한 특이적 프라이머도 개발되어 있어 이들 프라이머를 이용한 특정 수산자원 그룹의 환경유전자 연구도 진행되고 있다.

4. 결 론

본 연구는 87종의 106개의 생물 시료에서 CO1 염기서열을 얻었다. 염기서열 분석 결과 대부분의 시료들이 GenBank에 보고된 염기서열과 100% 유사도를 보이며 형태학적 동정 결과와 일치하여, 수산 자원 연구를 위한 eDNA 연구에 CO1 유전자가 유용하게 사용될 수 있음을 시사하였다. 하지만 일부 시료에서는 GenBank 데이터베이스에 등록된 염기서열과 90% 이하의 큰 유사도 차이가 나타나기도 하여, 일부 수산자원의 경우 개체군 사이에 CO1 유전자의 변이가 크며 국내 환경유전자 연구를 통한 수산자원의 분포 연구의 신뢰성을 높이기 위해서는 국내 주요 수산자원의 직접 분석을 통한 DNA 염기서열의 데이터베이스 확충이 중요함을 시사한다. 또한 연구의 CO1 유전자 증폭 영역에서 다수의 근연종이 동일한 염기서열을 갖는 것으로 나타났으며, 이는 환경유전자 연구에 CO1 유전자를 사용하는 경우 일부 수산자원에 대해 해석 시 주의가 필요하며 이러한 종들의 경우 더 높은 해상력을 제공할 수 있는 마커의 개발이 필요함을 시사하였다.

사 사

이 논문은 해양수산과학기술진흥원(해양수산부 재원, 20210696) 및 국립수산과학원 수산과학연구사업(R2024009)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

Supplementary Information

Supplementary data are available at Ocean and Polar Research online (https://static1.apub.kr/journalsite/sites/opr/2024-046-03/N0080460301/images/OPR2024012_Supplementary%20Material.pdf).

참고문헌

김종규 (2022) 우리나라에서 기후 변화에 따른 어업 생산량의 변동. 한국재난정보학회논문집 **18**(1):194–201

Alam MJ, Kim N-K, Andriyono S, Choi H-k, Lee J-H, Kim H-W (2020) Assessment of fish biodiversity in four Korean rivers using environmental DNA metabarcoding. Peer J **8**:e9508

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res **25**(17):3389–3402

Baldwin CC, Mounts JH, Smith DG, Weigt LA (2009) Genetic identification and color descriptions of early life-history stages of Belizean Phaeoptyx and Astrapogon (Teleostei: Apogonidae) with comments on identification of adult Phaeoptyx. Zootaxa **2008**:1–22

Bessey C, Jarman SN, Berry O, Olsen YS, Bunce M, Simpson T, Power M, McLaughlin J, Edgar GJ, Keesing J (2020) Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. Environ DNA **2**(4):493–504

Bingpeng X, Heshan L, Zhilan Z, Chunguang W, Yanguo W, Jianjun W (2018) DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. PloS One **13**(6):e0198109

Briones-Fourzan P, Hendrickx ME (2022) Ecology and diversity of marine decapod crustaceans. Diversity **14**:614

Chen Y, Shan X, Jin X, Johannessen A, Yang T, Dai F (2018) Changes in fish diversity and community structure in the central and southern Yellow Sea from 2003 to 2015. J Oceanol Limnol **36**:805–817

Colmenares GMG, Montes AJG, Harms-Tuohy CA, Schizas NV (2023) Using eDNA sampling for species-specific fish detection in tropical oceanic samples: limitations and recommendations for future use. Peer J **11**:e14810

Costello MJ, Basher Z, McLeod L, Asaad I, Claus S, Vandepitte L, Yasuhara M, Gislason H, Edwards M, Appeltans W (2017) Methods for the study of marine biodiversity. In: Walters M, Scholes RJ (ed) The GEO handbook on biodiversity observation networks, Springer Nature, Heidelberg, pp. 129–163

Farrag MM, El-Naggar HA, Abou-Mahmoud MM, Alabssawy AN, Ahmed HO, Abo-Taleb HA, Kostas K (2019) Marine biodiversity patterns off Alexandria area, southeastern Mediterranean Sea, Egypt. Environ Monit Assess **191**:1–28

Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Lett **4**(4):423–425

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol **3**:294–299

Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H (2013) Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. Mol Ecol Resour **13**(5):851–861

Gomes LC, Pessali TC, Sales NG, Pompeu PS, Carvalho DC (2015) Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. Genetica **143**:581–588

Jo H, Kim D-K, Park K, Kwak I-S (2019) Discrimination of spatial distribution of aquatic organisms in a coastal ecosystem using eDNA. Appl Sci **9**(17):3450

Karim A, Saif R, Ali FS, Gil Z, Ali W (2018) Use of CO1 gene sequences for computing genetic diversity between *Cirrhinus mrigala* from two different habitats (Farm and River). J Fish and Life Sci **3**:54–57

Kim E-B, Lee SR, Lee CI, Park H, Kim H-W (2019) Development of the cephalopod-specific universal primer set and its application for the metabarcoding analysis of planktonic cephalopods in Korean waters. Peer J **7**:e7140

Kim E-B, Sagong H, Lee J-H, Kim G, Kwon D-H, Kim Y, Kim H-W (2022) Environmental DNA metabarcoding analysis of fish assemblages and phytoplankton communities in a furrowed seabed area caused by aggregate mining. Front Mar Sci **9**:788380

Komai T, Gotoh RO, Sado T, Miya M (2019) Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. Metabarcoding Metagenom **3**:e33835

Kumar G, Reaume AM, Farrell E, Gaither MR (2022) Comparing eDNA metabarcoding primers for assessing fish communities in a biodiverse estuary. PloS One **17**(6):e0266720

Lee J, Jeon D (2005) Climate change and its impact on marine ecosystem. Nat Conserv **132**:1–8

Li P, Li D, Hong Y, Chen M, Zhang X, Hu L, Liu C (2022) Combining DNA mini-barcoding and species-specific primers PCR technology for identification of heosemys grandis. Front Ecol Evol **10**:822871

Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen J, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. R Soc Open Sci **2**(7):150088

Mychek-Londer JG, Balasingham KD, Heath DD (2020) Using environmental DNA metabarcoding to map invasive and native invertebrates in two Great Lakes tributaries. Environ DNA **2**(3):283–297

Nakabo T (2013) Fishes of Japan with pictorial keys to the species I, II and III. Tokai University Press, Hadano, 1749 p

Narváez-Barandica JC, Quintero-Galvis JF, Aguirre-Pabón JC, Castro LR, Betancur R, Acero Pizarro A (2023) A comparative phylogeography of three marine species with different PLD Modes reveals two genetic breaks across the Southern Caribbean Sea. Animals **13**(15):2528

Persis M, Chandra Sekhar Reddy A, Rao L, Khedkar G, Ravinder K, Nasruddin K (2009) COI (cytochrome oxidase-I) sequence based studies of Carangid fishes from Kakinada coast, India. Mol Biol Rep **36**:1733–1740

Rennstam Rubbmark O, Sint D, Horngacher N, Traugott M (2018) A broadly applicable COI primer pair and an efficient single-tube amplicon library preparation protocol for metabarcoding. Ecol Evol **8**(24):12335–12350

Rourke ML, Fowler AM, Hughes JM, Broadhurst MK, DiBattista JD, Fielder S, Wilkes Walburn J, Furlan EM (2022) Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: a review of approaches and future considerations for resource surveys. Environ DNA **4**(1):9–33

Schulte NO, Craine JM, Leopold DR, Devitt JK, Fierer N (2024) Diversity of freshwater algal assemblages across the United States as revealed by DNA metabarcoding. Environ DNA **6**(1):e477

Stat M, Huggett MJ, Bernasconi R, DiBattista JD, Berry TE, Newman SJ, Harvey ES, Bunce M (2017) Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. Sci Rep **7**(1):12240

Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford, 253 p

Truong NT, Phan GH, Lam TT, Nguyen TH, Khang DT, Tran MT, Tran NS, Dinh QM (2022) The mismatch between morphological and molecular attribution of three Glossogobius species in the Mekong Delta. BMC Zool **7**(1):34

Villamor A, Costantini F, Abbiati M (2014) Genetic structuring across marine biogeographic boundaries in rocky shore invertebrates. PloS One **9**(7):e101135

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1462):1847–1857

Zhang S, Zhao J, Yao M (2020) A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. Methods Ecol Evol **11**(12):1609–1625

국문 참고자료의 영문표기

English translation / Romanization of references originally written in Korean

Kim J.-G. (2022) Variations in catches of fisheries according to the climate change of Korea. J Kor Soc Disaster Inform **18**:194–201

Author's Information

Hyun Sagong
Post Master Scientist, Korea Institute of Ocean Science & Technology

Joo Myun Park
Principal Research Scientist, Korea Institute of Ocean Science & Technology

Yeonjung Lee
Principal Research Scientist, Korea Institute of Ocean Science & Technology

Wonseok Yang
OSJ Student-in-training, Korea Institute of Ocean Science & Technology

Soo Jeong Lee
Research Scientist, National Institute of Fisheries Science

Maeng Jin Kim
Research Scientist, National Institute of Fisheries Science

Dong Han Choi
Principal Research Scientist, Korea Institute of Ocean Science & Technology

Received Jul. 22, 2024
Revised Sep. 10, 2024
Accepted Sep. 10, 2024

Copyright © 2024 Ocean and Polar Research
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/), which permits unrestricted educational and non-commercial use, provided the original work is properly cited.