

기름종개과(Family Cobitidae) 어류의 계통분류에 관한 연구. 7. 새코미꾸리의 mtDNA 분석에 의한 종분화 연구

김 재 흡 · 민 미 숙 · 김 종 범 · 양 서 영
(인하대학교 이과대학 생물학과)

적 요

한국 고유종인 새코미꾸리(*Cobitis rotundicaudata*)의 집단간 유전적 차이에 따른 종분화 여부를 밝히기 위하여 4개 집단을 대상으로 mitochondrial DNA(mtDNA)의 RFLP 분석을 실시하였다. *C. rotundicaudata* mtDNA를 10개의 6-base cutting 제한효소로 처리한 다음 그 절편양상을 비교, 분석한 결과 4개 집단 공히 mtDNA의 전체 genome 크기는 약 16.5 ± 0.5 Kbp였으며 공통질편수(F)에서 한강 2개 집단(가평, 진부)과 동해안 마읍천 집단간의 F값은 0.911로 매우 가까웠으나 낙동강의 산청집단은 타 3개 집단과 $F=0.375$ 로 차이가 있었다. 또한, 염기치환율(p)에 있어서도 한강 2개 집단 및 마읍천 집단간은 평균 $p=0.005$ 로 매우 유사하였으나, 산청 집단은 타 집단들과 염기치환율에 있어 $p=0.059$ 로 종수준의 뚜렷한 차이를 나타내어서 이들은 각각 별종으로 사료된다.

Key words: speciation, Cobitidae, *Cobitis rotundicaudata*, mtDNA RFLP

서 론

최근 생물군의 분류에는 생물체의 모든 특징이 분류형질로 이용되고 있다. 그 중 세포유전학적 형질인 염색체의 수와 핵형 그리고 각종 banding방법에 의한 구조적 특징, 분자수준에서의 DNA 분석 등은 종 및 집단의 유전적 특징을 반영하므로 근연종의 계통 및 진화단계를 분석하는데 매우 유용하다. 척추동물의 mitochondrial DNA(mtDNA)는 대부분 그 크기가 15.7-23.0 Kbp(Brown, 1983; Lansman *et al.*, 1983; Kessler and Avise, 1985)이며 모계 유전물질로 비암호 서열 부위가 존재하지

* 본 연구는 1992년도 교육부 기초과학육성연구비의 지원(BSRI-92-121)에 의해 수행된 것임.

않아 재조합 현상이 일어나지 않는 특징을 지니고 있으므로 유전적 표식인자로서의 중요성이 인식되어, 최근에는 mtDNA 분석방법을 이용한 어류의 계통진화 연구가 활발히 수행되고 있다(Raicu and Taisescu, 1972; Hartley and Horne, 1982; Lee *et al.*, 1984; Gyllensten *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1988).

현재 기름종개과 어류는 전세계적으로 약 200여종이 분류, 보고되어 있으며(Nelson, 1984), 우리나라에는 2아과 5속 14종 및 아종이 기재되어있다(Kim, 1980; Kim and Lee, 1988; Jeon, 1983; Yang *et al.*, 1989; Kim, 1992). 그 중 기름종개속에 속하는 한국고유종인 새코미꾸리(*Cobitis rotundicaudata* Wakiya et Mori, 1929)는 한강, 낙동강 및 금강수계에 분포한다고 보고되어 있으나(Uchida, 1939; Chyung, 1977), 동해안의 삼척군 마음천에도 분포함이 확인되어 있으며(Kim, 1979; Jeon, 1983) Park과 Yang(1992)은 외부형태분석 및 전기영동에 의한 유전자분석결과 낙동강으로 유입되는 산청집단의 *C. rotundicaudata*는 별종일 가능성이 높다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 한반도의 고유종으로 별종의 가능성이 시사된(Park and Yang, 1992) *C. rotundicaudata*의 산청집단과 서해안의 한강 및 동해안의 삼척 마음천 집단 등 4개 집단을 대상으로 mtDNA RFLP 분석을 실시하여 종분화의 정도를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 실험재료는 4개집단 47개체를 채집하여 mtDNA 분석에 사용하였다(Table 1). MtDNA는 Bernatchez와 Dodson(1990)의 방법에 따라 생체의 간, 신장 및 심장으로 부터 분리추출하였고, 각 개체별 조직의 양이 적어 동일집단 개체들의 조직을 합하여 총 1.5-2.0 gr정도의 양을 추출하였다. MtDNA는 6개의 염기를 인식할 수 있는 10가지의 제한효소(*Ava* I, *Bgl* I, *Cla* I, *Eco* RI, *Xba* I, *Bam* HI, *Hin* dIII, *Pst* I, *Xho* I and *Pvu* II)를 각각 처리한 후, 0.8%의 agarose gel로 전기영동하고 ethidium-bromide로 염색하여 제한효소별 절편양상을 확인, 분석하였다. Nei와 Li(1979)의 공식을 이용하여 각 집단의 mtDNA 절편이동도에 따라 비교되는 집단간 공통절편수의 비율(F값)을 얻고 이 F값에 의하여 상대적인 각 염기치환율(p)을 산출하였다.

Table 1. Collection localities, dates and number of specimens of *Cobitis rotundicaudata*.

Locality	Collection date	No. of specimens
1. Kapyong : Kapyong-up, Kyonggi-do	Jul. 10, 1992	11
2. Chinbu : Chinbu-myon, Kangwon-do	Jul. 14, 1992	14
3. Sanchong : Saengcho-myon, Kyongsangnam-do	Sep. 13, 1992	9
4. Maup : Keundok-myon, Kangwon-do	Aug. 26, 1992	13

결과 및 고찰

C. rotundicaudata 의 mtDNA를 제한효소 처리하여 얻어진 절편분석결과 mtDNA의 크기는 약 16.5 ± 0.5 Kbp로서 제한효소별로 집단간 다소의 크기차이가 발견되었다. 절편분석 결과 한강수계의 2개 집단과 동해안 삼척집단은 유사한 절편양상을 나타내었으나 낙동강의 산청집단은 타집단들과 많은 차이를 보였다(Fig. 1).

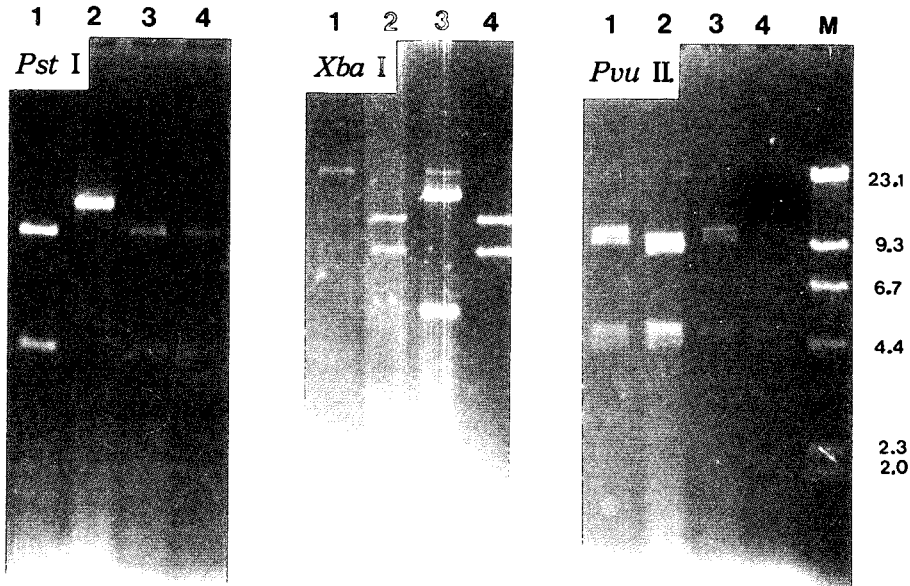


Fig. 1. Fragment patterns produced by *Pst* I, *Xba* I and *Pvu* II digestion of mtDNA in 4 populations of *C. rotundicaudata*. Numbers represent the collection localities listed in Table 1.

제한효소별 절편양상을 살펴보면, 10가지의 제한효소로 처리된 것들중 *Xba* I의 경우 가평집단에서 5개의 절편이 관찰되었는데 이들 절편 중 이동도가 가장 느린 것은 incomplete digested mtDNA로 보이나 나머지 4개 절편을 합한 크기를 비교분석한 결과 2가지의 mtDNA genotype이 존재함을 알 수 있었다. *Bgl* I은 한강의 가평 및 진부 집단에서 4개의 절편이 확인되었고, 삼척 마음천 집단에서는 한강 2개 집단에서 나타난 4개의 절편외에 이동도에 뚜렷한 차이를 보이는 2개의 절편이 존재하며 이외에도 2개의 절편이 더 있어 *Bgl* I 역시 2가지의 genotype이 있음이 확인되었다. 한편 *Pvu* II의 경우에는 4개 집단 공히 4개씩의 절편으로 *Bgl* I, *Xba* I의 경우와 같이 집단내 2개의 genotype이 존재하는 것이 확인되었다.

10개의 제한효소를 처리하여 얻은 총 절편수를 집단별로 비교한 결과 마음천집단은 28개로 절편수가 가장 많았고, 산청집단은 22개로 절편수가 가장 적었다(Table 2). 각 집단간 공통절편수의 비교에서 한강 2 집단과 마음천집단간은 모두 24개의 공통절편을 갖고 있으나, 낙동강의 산청집단은 타 3개집단들과 *Cla* I을 제외한 전 제한효소의 절편양상에 차이를 보이며 8개의 공통절편만을 갖고 있었다(Table 3).

Table 2. Total fragment numbers of mtDNA of *Cobitis rotundicaudata*.

Populations	Restriction enzymes										Total
	Pst I	Ava I	Bgl I	Xho I	Cla I	Eco RI	Xba I	Bam HI	Hin dIII	Pvu II	
1. Kapyong	3	1	1	4	4	2	2	4	2	3	26
2. Chinbu	3	1	1	4	2	2	2	4	2	3	24
3. Sanchong	3	0	1	6	2	2	1	4	0	3	22
4. Maup	3	1	1	8	2	2	2	4	2	3	28

Table 3. The number of shared mtDNA fragments among the 4 populations of *C. rotundicaudata*.

Populations	Restriction enzymes										Total
	Pst I	Ava I	Bgl I	Xho I	Cla I	Eco RI	Xba I	Bam HI	Hin dIII	Pvu II	
1. KP-2.CB	3	1	1	4	2	2	2	4	2	3	24
1. KP-3.SC	2	0	1	2	0	1	0	2	0	0	8
1. KP-4.MU	3	1	1	4	2	2	2	4	2	3	24
2. CB-3.SC	2	0	1	2	0	1	0	2	0	0	8
2. CB-4.MU	3	1	1	4	2	2	2	4	2	3	24
3. SC-4.MU	2	0	1	2	0	1	0	2	0	0	8

Abbreviations: 1. KP:Kapyong, 2. CB:Chinbu, 3. SC:Sanchong, 4. MU:Maup

이들 공통절편수를 토대로 Nei와 Li(1979)의 공식에 의해 공통절편수의 비율(F)과 염기치 환율(p)을 측정 한 결과 4개 집단의 평균 F값 및 p값은 각기 F=0.643, p=0.032이었으나 산청집단을 제외한 3개 집단간은 F=0.911(p=0.005)로 근연관계가 매우 가깝게 나타난 반면, 산청과 타 3개 집단간은 F=0.375, p=0.059로 일반적인 어류의 종간차이(Lee *et al.*, 1989)를 나타냈다(Fig. 2).

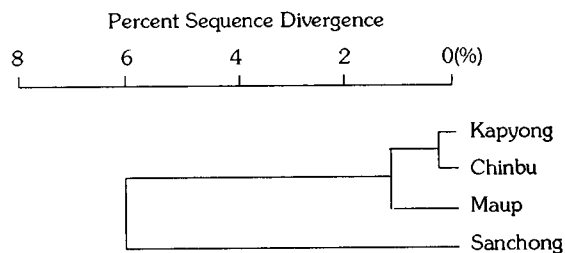


Fig. 2. Genetic phenogram based on the analysis of mtDNA sequence divergence among the 4 populations of *C. rotundicaudata*.

Table 4. Estimates of mtDNA fragment homology (F value, above diagonal) and sequence divergence (p value, below diagonal) among the 4 populations of *C. rotundicaudata*.

Populations	1	2	3	4
1. Kapyong	-	0.960	0.375	0.889
2. Chinbu	0.002	-	0.391	0.885
3. Sanchong	0.059	0.056	-	0.360
4. Maup	0.007	0.007	0.061	-

Park과 Yang(1992)의 보고에서도 *C. rotundicaudata* 산청집단이 한강 및 동해안 집단들과 형태적으로 유의한 차이를 보였으며, 전기영동법에 의한 동위효소 분석결과에서도 *Est-1*, *Est-2* 및 *Ipo* 등 3개 유전자에서 집단특유의 대립인자를 갖고있어 타 집단들과 구분되며, 타 집단들과의 평균 유전적 근연치도 $S=0.70$ 으로서 뚜렷한 유전적 차이가 있는 것으로 보고되어, 본 연구결과와 일치되었는데 이러한 결과들은 산청 집단이 종분화가 이루어진 별종임을 나타낸다.

따라서, 본 연구결과와 선행 연구결과들을 종합하여 볼 때 *C. rotundicaudata* 한강 및 동해안 집단들은 동일종으로 확인되나 산청집단은 형태, 동위효소, mtDNA의 차이 정도로 보아 뚜렷이 구분되는 별종으로 사료되며 앞으로 이들의 분류학적 위치 확인 및 신종기재가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bernatchez, L. and J. J. Dodson, 1990. Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish(*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial DNA restriction analysis. *Evolution* **44**: 1263-1271.
- Brown, W. M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA, In: *Evolution of genes and proteins*(Nei, M. and R. K. Koehn, eds.). Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 62-88.
- Chyung, M. K., 1977. *The Fishes of Korea*. Il-Ji Sa, Seoul.
- Gyllensten, U., R. F. Leary, F. W. Allendorf and A. C. Wilson, 1985. Introgression between two cutthroat subspecies with substantial karyotypic, nuclear and mitochondrial genomic divergence. *Genetics* **111**: 905-915.
- Hartley, S. E. and M. T. Home, 1982. Chromosome polymorphism in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Chromosoma* **87**: 461-468.
- Jeon, S. R., 1983. Studies on the distribution and key of Cobitidae fishes(Cypriniformes) from Korea. *Bull. Sangmyung Women's Univ.* **11**: 289-321.
- Kessler, L. G. and J. C. Avise, 1985. A comparative description of mtDNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. *Mol. Bio. Evol.* **2**:109-125.
- Kim, I. S., 1979. Morphological characters of Korean spinous loach, *Cobitis rotundicaudata* (Cobitidae, Cypriniformes). *Bull. Inst. Basic Sci. Jeonbug Natl. Univ.* **2**:111-117.
- Kim, I. S., 1980. A systematic study of the genus *Cobitis* from Korea. Ph.D. Dissertation, Chung Ang University.

- Kim, I. S. and G. Y. Lee, 1988. Taxonomic study of the cobitid fish, *Cobitis lutheri* Rendahl and *C. striata* Ikeda(Cobitidae) from Korea. Korean J. Syst. Zool. **4**: 91-102.
- Kim, J. H., 1992. Systematic study on the fishes of the family Cobitidae(Pisces, Cypriniformes) in Korea. Ph. D. dissertation, Inha University, pp. 176.
- Lansman, R. A., J. C. Avise, C. F. Aquadro, J. F. Shapira and S. W. Daniel, 1983. Extensive genetic variation in mitochondrial DNAs among populations of the deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. Evolution **37**: 1-16.
- Lee, H. Y., H. S. Lee, J. W. Cho and Y. O. Lee, 1984. The karyotype analysis on 21 species of fresh water fish in Korea(II). Bull. Inst. Basic Sci., Inha Univ. **5**:125-140.
- Lee, H. Y., S. Y. Yang, C. S. Chang and C. S. Park, 1989. Evolutionary study on the Dark Chub(*Zacco temmincki*). VIII. Mitochondrial DNA analysis of the subfamily Danioninae (Pisces, Cyprinidae). Korean J. Genet. **11**: 175-187.
- Lee, H. Y., S. Y. Yang, S. G. Paik, C. S. Park, S. L. Yu and S. K. Lee, 1988. A study on the speciation of a fresh water fish *Zacco temmincki*. VII. Variation of mitochondrial DNA between 2 types of *Z. temmincki*. Korean J. Zool. **31**: 263-242.
- Nei, M. and W. H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 5269-5273.
- Nelson, J. C., 1984. Fishes of the world. A Wiley-Interscience Publ. pp. 123-130.
- Park, B. S. and S. Y. Yang, 1992. Systematic studies of the genus *Cobitis* in Korea III. Geographic variations of *Cobitis rotundicaudata*. Korean J. Zool. **35**: 497-504.
- Raicu, P. and E. Taisescu, 1972. *Misgurnus fossilis*, a tetraploid fish species. J. Heredity **63**: 92-94.
- Uchida, K., 1939. The Fishes of Korea. Bull. Fish. Exp. Sta. Gov. Gener. Korea. **1**: 330-346.
- Wakiya, Y. and T. Mori, 1929. On two new species of the genus *Cobitis* from Corea. J. Chosen Nat. Hist. Soc. **9**: 31-33.
- Yang, S. Y., B. S. Park, and J. H. Kim, 1989. Systematic studies of the genus *Cobitis* (Pisces: Cobitidae) in Korea. I. Geographic variations and classification of *Cobitis koreensis*. Korean J. Zool. **32**: 242-251.

RECEIVED: 24 March 1997

ACCEPTED: 15 June 1997

**Systematic Study on the Fishes of the
Family Cobitidae(Pisces, Cypriniformes)
7. A Study on Mitochondrial DNA Differentiation and Speciation in
Korean Cobitid Fish, *Cobitis rotundicaudata***

Jae Heup Kim, Mi Sook Min, Jong Bum Kim and Suh Yung Yang
(Department of Biology, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

ABSTRACT

The analysis of mitochondrial DNA RFLP was performed to clarify the taxonomic status along molecular differentiation among the populations of *Cobitis rotundicaudata*. The mtDNA genome size was about 16.5 ± 0.5 Kbp, and the site variation was detected in all populations. The patterns of mtDNA restriction fragment were homogeneous in all populations($F=0.911$) except Sanchong population(Naktong-river). The average F values between Sanchong population and others were rather low($F=0.375$). The value of nucleotide sequence divergence(p) between Sanchong population and others showed interspecific level of difference($p=0.059$). Hence it is concluded that Sanchong population of *Cobitis rotundicaudata* should be treated as a distinct species.