

미토콘드리아 DNA의 염기서열을 이용한 파파리반딧불이,
애반딧불이 및 늦반딧불이 (딱정벌레목: 반딧불이과)의
유전적 분화 및 계통적 관련

**Genetic Divergence and Phylogenetic Relationships among the
Korean Fireflies, *Hotaria papariensis*, *Luciola lateralis*, and
Pyrocoelia rufa (Coleoptera: Lampyridae), using
Mitochondrial DNA Sequences**

김익수 · 이상철 · 배진식 · 진병래 · 김삼은¹
김종길¹ · 윤형주¹ · 양성렬¹ · 임수호¹ · 손흥대

Iksoo Kim, Sang Chul Lee, Jin Sik Bae, Byung Rae Jin, Sam Eun Kim¹,
Jong Kil Kim¹, Hyung Joo Yoon¹, Sung Ryul Yang¹,
Soo Ho Lim¹ and Hung Dae Sohn

Abstract – Genetic divergence and phylogenetic relationships among the major Korean fireflies (*Hotaria papariensis*, *Luciola lateralis*, and *Pyrocoelia rufa*) were studied. A portion of mitochondrial COI (403 bp) and 16S rRNA (490~504 bp) genes were sequenced, and the GenBank-registered, homologous 16S rRNA sequences of Japanese fireflies were compared (27 species of Lampyridae, one of Lycidae, and one of Rhagophthalmidae). Greatest DNA and/or amino acid sequence divergence was found when *P. rufa*, belonging to Lampyrinae was compared with *H. papariensis* and *L. lateralis*, both belonging to Luciolinae, confirming the current taxonomic status of the species. In the PAUP and PHYLIP analyses with 16S rRNA data, grouping of the two geographic samples of *H. papariensis* with *H. tsushimana* validate the use of generic name, *Hotaria*. Nevertheless, lack of sister-group relationship of the two geographic samples of *H. papariensis* renders further investigation on this group. Although the Korean and Japanese *L. lateralis* formed a strong monophyletic group, a substantial genetic differentiation was detected between them (2.9% of 16S rRNA gene sequence divergence). Finally, the geographic samples of Korean *P. rufa* strongly formed a group with Japanese *P. rufa*, warranting the use of generic name, *Pyrocoelia*, but the genetic distance observed between the Cheju-Island individual and all others requires further investigation on this subject. Summarized, this study supports the current taxonomic status of the Korean fireflies in that each respectively formed a strong monophyletic group with its own species or genus.

Key Words – Firefly, *Hotaria papariensis*, *Luciola lateralis*, *Pyrocoelia rufa*, mtDNA, COI gene, 16S rRNA gene

동아대학교 생명자원과학대학 (College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea)

¹농촌진흥청 농업과학기술원 잠사곤충부 (Department of Sericulture & Entomology, National Institute of Agricultural Science & Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea)

초 록 - 본 연구는 파파리반딧불이 (*Hotaria papariensis*), 애반딧불이 (*Luciola lateralis*) 및 늦반딧불이 (*Pyrocoelia rufa*) 등 국내 주요 반딧불이 종의 유전적 분화 및 계통분류학적 관련을 파악하고자 하였다. 이를 위하여 mtDNA의 COI 유전자 및 16S rRNA 유전자 일부의 염기서열 (각 403 bp 및 490 bp~504 bp)을 분석하였으며 아울러 GenBank에 등록된 일본 반딧불이 29종 (반딧불이과 27종, 흥반딧과 1종 및 Rhagophthalmus과 1종)의 16S rRNA 유전자의 동일부위 염기서열을 사용하였다. 국내 세 종간의 COI 및 16S rRNA 유전자의 염기서열 그리고 COI 유전자의 아미노산 분화정도를 비교한 결과, 반딧불이아과 (Lampyrinae)의 늦반딧불이는 애반딧불이아과 (Luciolinae)에 공통적으로 속해있는 애반딧불이 및 파파리반딧불이와 다소 큰 유전적 차이를 나타냄으로 기존의 분류학적 위치를 확인하였다. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용, PAUP과 PHYLIP에 의한 계통분류학적 분석 결과, 우리 나라 애반딧불이는 일본 애반딧불이와 강력한 단일그룹을 형성하였으나 이들 간 상당한 유전적 차이 (2.9%의 16S rRNA 유전자 염기분화율)를 보였다. 국내 두 지역의 파파리반딧불이는 일본 대마도 고유종인 *H. tsushima*와 같은 계통그룹을 형성하였으므로 *Hotaria*란 속명의 사용이 타당해 보이나 파파리반딧불이는 지역 개체간 자매분류군을 형성하지 않으므로 이에 대한 추가 연구가 요망되는 실정이다. 마지막으로, 국내 늦반딧불이 지역 개체가 일본 늦반딧불이와 강력한 단일 계통그룹을 형성한 점으로 미루어 *Pyrocoelia*란 속명의 사용은 타당해 보이나 다른 모든 늦반딧불이로부터 큰 유전적 거리를 보인 제주도 개체에 대한 추가적인 연구가 요망되는 실정이다. 결론적으로, 국내 반딧불이 종들은 일본에서 공통적으로 발생하는 반딧불이 종 또는 속과 아주 강력한 계통그룹을 형성하였으므로 기존의 계통관련 연구를 지지하고 있는 실정이다.

검색어 - 반딧불이, 파파리반딧불이, 애반딧불이, 늦반딧불이, 미토콘드리아 DNA, COI 유전자, 16S rRNA 유전자

반딧불이는 남극과 북극을 제외한 전 지구상에 분포되어 있다. 국내에는 반딧불이과 (Lampyridae)내에 3아과, 6속, 8종의 반딧불이가 서식한다고 보고된 바 있다 (The Entomological Society of Korea & Korean Society of Applied Entomology, 1994). 그러나 최근 비교적 광범위한 지역을 대상으로 한 분포조사 결과, 애반딧불이아과 (Luciolinae)의 애반딧불이 (*Luciola lateralis*)와 파파리반딧불이 (*Hotaria papariensis*) 그리고 반딧불이아과 (Lampyrinae)의 늦반딧불이 (*Pyrocoelia rufa*) 등 2아과 3속 3종의 반딧불이만이 확인된 바 있어 (Kim *et al.*, 1998) 지속적인 조사가 요망되는 실정이다.

Yuasa (1937)는 *Hotaria* 속의 형태 및 생태적 특성을 들어 *Luciola*속과 구분하여 *Hotaria*속을 만들었으나, 이후 파파리반딧불이는 일본산의 *H. parvula* 또는 *H. tsushima*와의 형태적 유사성이 인식되었음에도 *Luciola* 속으로 사용된 바 있다 (Kim and Nam, 1981; Ohba, 1985; Noh *et al.*, 1990). 애반딧불이는 유충단계에서의 수중생활, 유충의 형태, 일본 일부 지방에서 일본의 반딧불이 (*L. cruciata*)와 동소종인 관계 등 (Suzuki, 1997)으로 우리 일반에게는 일본 반딧불이의 생태가 애반딧불이의 생태로 소개되고 있는 실정이다. 늦반딧불이의 경우, 본 연구에서는 늦반딧불이의 학명을 한국곤충명집 (The Entomological Society of Korea & Korean Society of Applied Entomology, 1994)에 기록되어 있는 *Lychnuris rufa*와 달리 *P. rufa*로 사용하였다. *Pyrocoelia*란 속명은 Gorham (1880)에 의해

만들어 졌지만 McDermott (1964)에 의해 *Lychnuris*란 속명이 다시 사용되었으나 최근 일본의 많은 반딧불이 연구는 *Pyrocoelia*를 사용하고 있는 실정이다 (Suzuki, 1997).

반딧불이과에 속하는 수많은 종들 중 국내에서 발생하는 반딧불이는 그 수가 극히 제한적이며 파파리반딧불이 외에는 주변국에 공통적으로 발생하고 있는 실정이므로 국내 반딧불이의 분류학적 위상 및 타 반딧불이와의 계통분류학적 연구를 독자적으로 그리고 종합적으로 수행하기에는 많은 어려움이 따르고 있다. 특히 분류학적 연구를 위해서는 여러 지역으로부터 채집된 다양한 개체가 요구되나 최근 서식처 격감 및 환경 격변으로 인한 채집의 어려움으로 형태학적 분류를 완성하기에는 많은 시일이 소요될 것으로 예상된다.

이러한 가운데 최근 Suzuki (1997)는 분자표식을 이용하여 일본에 서식하는 반딧불이의 계통적 관련에 대한 종합적인 결과를 보고하였다. 이 중 애반딧불이는 일본 전역에 광범위하게, 늦반딧불이는 대마도에서만, 그리고 파파리반딧불이의 경우, 동일 속 (*Hotaria*)에 속한 두 종이 일본에 서식하고 있으므로 (*H. tsushima* 및 *H. parvula*) Suzuki (1997)의 결과를 이용한 우리 나라 반딧불이의 분류학적 위치 및 계통분류학적 관련에 대한 연구가 가능하다.

본 연구는 국내에서 채집된 반딧불이 세 종의 미토콘드리아 DNA 중 곤충 종내 및 종간의 유전적 변이의 연구에 많이 사용되고 있는 cytochrome oxidase

Table 1. Collecting information of each species and internet accession number of the mtDNA sequences analyzed in this study

Species	Collecting locality	Animal number	Collecting date	Internet accession number			
				COI		16S rRNA	
				GenBank	GenNuri	GenBank	GenNuri
<i>H. papariensis</i>	Suan-ri, Solchon-myon, Muju-gun, Chollabuk Province	F4	1999. 6. 17	AF272639	KS103555	AF272695	KS103560
<i>H. papariensis</i>	Koejung-dong, Saha-gu, Pusan City	F26	1999. 6. 30	AF272694	KS103556	AF272696	KS103561
<i>L. lateralis</i>	Ansung City Kyonggi Province	L1	1999. 6. 15	AF272703	KS103559	AF272704	KS103565
<i>P. rufa</i>	Suan-ri, Solchon-myon, Muju-gun, Chollabuk Province	F63	1999. 7. 20	AF272702	KS103579	AF272699	KS103562
<i>P. rufa</i>	Poryong City, Chungchongnam Province	F79	1999. 9. 18	AF272697	KS103557	AF272700	KS103563
<i>P. rufa</i>	Cheju Province	F89	1999. 9. 16	AF272698	KS103558	AF272701	KS103564

subunit I (COI) 유전자와 종간의 유전적 변이의 연구에 많이 사용되고 있는 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 (Simon *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2000a, b; Lee *et al.*, 2000)의 일부 염기서열을 이용하여 종간의 유전적 변이율을 파악하였으며 아울러 GenBank에 등록된 일본 반딧불이 29종 (반딧불이과 27종, 홍반딧과 1종 및 Rhagophthalmus과 1종)의 16S rRNA 유전자의 동일부위 염기서열을 이용하여 국내 반딧불이의 유전적 분화정도 및 계통분류학적 관련을 확인하였다.

재료 및 방법

공시곤충

본 연구는 국내 반딧불이 종의 지역적 변이에 관한 연구 일환으로 1999년 6~9월까지 전북 무주, 충남 보령, 경기 안산, 부산, 제주도에서 채집된 파파리반딧불이 (*Hotaria papariensis*), 애반딧불이 (*Luciola lateralis*), 늦반딧불이 (*Pyrocoelia rufa*) 중의 일부 개체를 사용하였으며 본 연구에 사용된 개체의 채집지역은 Table 1과 같다.

미토콘드리아 DNA (mtDNA)

냉동 보관중인 반딧불이로부터 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 사용하는 Proteinase K법으로 total DNA를 추출하였다 (Kocher *et al.*, 1989). mtDNA의 COI 유전자 403 bp의 증폭을 위한 primer의 염기서열과 PCR 조건은 Kim *et al.* (2000a)에 자세히 기술하였다. 16S rRNA의 경우, 군집성 메뚜기의 일종인 *Locusta migratoria*의 mtDNA를 이용하여 primer set를 제작하였으며 (Simon *et al.*, 1994) 이들의 염기서열은 다

음과 같다. LR-N-13398, 5'-CGCCTGTTTATCAAAA-ACAT-3'; LR-J-12887, 5'-CCGGTCTGAACTCAGAT-CACGT-3'. PCR 증폭조건은 유전체 DNA를 먼저 94°C에서 7분간 denaturing한 후 40~45 cycle 동안 94°C에서 30초간 denaturing, 50°C에서 40초간 annealing 그리고 72°C에서 45초간의 extension을 반복하였다. 마지막 cycle에서의 extension 과정은 총 7분 45초간 실시하였다.

성공적인 PCR 증폭의 확인을 위하여 0.7% agarose gel에서 0.5x TAE 완충액을 사용, 전기영동을 실시하였다. 여분의 primer와 nucleotide를 제거하기 위하여 PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하였다. DNA 염기서열 분석은 ABI 377 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, CA)를 사용하여 각 나선의 염기서열을 파악하였다. 얻어진 각 개체의 염기서열은 IBI MacVector (ver. 6.5)를 이용하여 정렬하였다.

일본 반딧불이의 16S rRNA 염기서열

일본은 약 50여종의 반딧불이가 서식하는 것으로 알려져 있으며 이들 중 약 60% (29종)에 대한 16S rRNA의 염기서열과 동위효소에 대한 분류학적 보고가 있었는데 국내에서 발생하는 반딧불이가 속한 종 또는 속에 속한 일본 반딧불이 종을 포함하고 있다 (Suzuki, 1997). GenBank search를 통해 얻은 이들의 16S rRNA 염기서열을 이용하였으며 이들의 GenBank accession number는 증명 등의 기록과 함께 Table 2에 나타내었다.

PAUP 및 PHYLIP을 이용한 계통분류적 분석

본 연구에 의해 실험된 세 종간의 유전적 분화정도

Table 2. A list of species names, trapping localities, and GenBank accession number of the Japanese fireflies utilized their 16S rRNA sequences for phylogenetic analysis with Korean fireflies (Suzuki, 1997)

Species	Collecting locality	Collection date	GenBank accession number
Family Lampyridae			
Subfamily Luciolinae			
<i>Luciola cruciata</i>	Yokohama, Kanagawa Pref., Honshu	1993. 7	AB009904
<i>Luciola owadai</i>	Kume-jima Island, Ryukyus	1994. 4	AB009905
<i>Luciola lateralis</i>	Yonezawa, Yamagata Pref., Honshu	1988. 7	AB009906
<i>Luciola kuroiwae</i>	Okinawa-jima Island, Ryukyus	1991. 5	AB009907
<i>Luciola yayeyamana</i>	Ishigaki-jima Island, Ryukyus	1991. 5	AB009908
<i>Hotaria parvula</i>	Aomori, Aomori pref., Honshu	1989. 7	AB009909
<i>Hotaria tsushimana</i>	Tsushima Island, Kyushu	1990. 6	AB009910
<i>Curtos okinawana</i>	Okinawa-jima Island, Ryukyus	1991. 5	AB009911
<i>Curtos costipennis</i>	Miyako-jima Island, Ryukyus	1991. 5	AB009912
Subfamily Lampyrinae			
<i>Pyrocoelia rufa</i>	Tsushima Island, Kyushu	1995. 10	AB009913
<i>Pyrocoelia miyako</i>	Miyako-jima Island, Ryukyus	1991. 5	AB009914
<i>Pyrocoelia atripennis</i>	Ishigaki-jima Island, Ryukyus	1991. 5	AB009915
<i>Pyrocoelia discicollis</i>	Miyazaki, Miyazaki Pref., Kyushu	1995. 10	AB009916
<i>Pyrocoelia fumosa</i>	Tajima, Fukushima Pref., Honshu	1994. 8	AB009917
<i>Pyrocoelia oshimana</i>	Amami-oshima Island, Ryukyus	1996. 8	AB009918
<i>Pyrocoelia matsumurai</i>	Okinawa-jima Island, Ryukyus	1990. 12	AB009919
<i>Pyrocoelia m. kumejimensis</i>	Kume-jima Island, Ryukyus	1995. 1	AB009920
<i>Pyrocoelia abdominalis</i>	Ishigaki-jima Island, Ryukyus	1990. 12	AB009921
<i>Lucidina biplagiata</i>	Tsukuba, Ibaraki Pref., Honshu	1990. 7	AB009922
<i>Lucidina accensa</i>	Nango, Fukushima Pref., Honshu	1993. 8	AB009923
<i>Lucidina okadai</i>	Gifu, Gifu Pref., Honshu	1996. 6	AB009924
<i>Pristolycus sagulatus</i>	Yokohama, Kanagawa pref., Honshu	1994. 9	AB009925
Subfamily Cyphonocerinae			
<i>Cyphonocerus ruficollis</i>	Kyokushi, Kumamoto Pref., Kyushu	1994. 5	AB009926
Subfamily Ototretinae			
<i>Drilaster axillaris</i>	Kyokushi, Kumamoto Pref., Kyushu	1994. 5	AB009927
<i>Drilaster</i> sp.	Kume-jima Island, Ryukyus	1994. 4	AB009928
<i>Stenocladus shirakii</i>	Iriomote-jima Island, Ryukyus	1994. 12	AB009929
<i>Stenocladus</i> sp.	Kume-jima Island, Ryukyus	1995. 4	AB009930
Family Rhagophthalmidae			
<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	Iriomote-jima Island, Ryukyus	1994. 5	AB009931
Family Lycidae			
<i>Calochromus rubrovestitus</i>	Kyokushi, Kumamoto Pref., Kyushu	1994. 5	AB009932

를 파악하기 위하여 PAUP (Phylogenetic Analysis using Parsimony) ver. 3.1 (Swofford, 1990)을 사용, COI 및 16S rRNA 유전자 염기서열의 중간 분화율 및 COI gene의 아미노산 분화율을 비교하였다. 우리 나라에서 발생하는 반딧불이 종의 분류학적 위치 및 이들의 일본 반딧불이 종과의 계통분류학적 관련은 16S

rRNA 염기서열을 사용, PAUP 및 PHYLIP (Phylogeny Inference Package, ver. 3.5c; Felsenstein, 1993) 분석을 통하여 파악하였다. PAUP의 경우, heuristic법을 사용하였으며 계통수의 신뢰도는 bootstrap법을 사용하였다 (Felsenstein, 1985). 이때 outgroup으로는 Suzuki (1997)에서 처럼 Lycidae과에 속하는 *Calochromus*

			30			60
<i>H. papariensis</i> (F4)	ACGAATPAAT	AATATGAGAT	TTTGACTTCT	ACCCCOCTCT	TTATCATTAC	TCCTAATAAG
<i>H. papariensis</i> (F26)A.....A.....
<i>L. lateralis</i> (L1)	C.....CA.....T..T..	C..F..TC..T.
<i>P. rufa</i> (F63)	T.....A.....	T..A..A..ATT.....
<i>P. rufa</i> (F79)	T.....A.....	T..A..A..ATT.....
<i>P. rufa</i> (F89)	T.....	..C..A.....	T..A..A..ATT.....
			90			120
<i>H. papariensis</i> (F4)	AAGAATAGTA	GAAAATGGAG	CAGGACAGG	ATGAACAGTT	TACCCCCCTT	TATCTGCAAA
<i>H. papariensis</i> (F26)T...C
<i>L. lateralis</i> (L1)	...T...TT.C..T...C	..T..AAGT..
<i>P. rufa</i> (F63)	...T..A.T	...G..G.	...T..G..T..G..C.	...A.....
<i>P. rufa</i> (F79)	...T..A.T	...G..G.	...T..G..T..G..C.	...A.....
<i>P. rufa</i> (F89)	...T..A.T	...G.....	...T.....T..A.....	...A.....
			150			180
<i>H. papariensis</i> (F4)	TATTGCTCAT	AGAGGTTTCAT	CAGTTGATTT	AACCATCTTC	AGTTTACATC	TAGCAGGAAT
<i>H. papariensis</i> (F26)C.....G..
<i>L. lateralis</i> (L1)	C.....A....	.T..A..C..	.G..T..T..T	..GC.....T	...T.....
<i>P. rufa</i> (F63)A...C.C.	.T..A.....	.G..A..T..T	..AC..T..TT..
<i>P. rufa</i> (F79)A...C.C.	.T..A.....	.G..A..T..T	..AC..T..TT..
<i>P. rufa</i> (F89)G...GC.C.	.T..A.....	.G..A..T..T	..AC..T..TG..
			210			240
<i>H. papariensis</i> (F4)	TTCCICTATT	TTAGGAGCAG	TAAATTCAT	CTCPACAATT	ATTAATATAC	GATCAATTGG
<i>H. papariensis</i> (F26)G....T..
<i>L. lateralis</i> (L1)	C..T.....	A.....T.	T.....	T.C.....	..CC.....
<i>P. rufa</i> (F63)A...	C.T.....	.G.....T.T..CC.T.A.A.
<i>P. rufa</i> (F79)A...	C.T.....	.G.....T.T..CC.T.A.A.
<i>P. rufa</i> (F89)A...	C.C.....T..T..CC.T.A.A.
			270			300
<i>H. papariensis</i> (F4)	TATAACATTA	GACCGAATAC	CTTTGTTGT	ATGAGCTGYT	CTAATTACTG	CAATTCICCT
<i>H. papariensis</i> (F26)	C.....G.....T..
<i>L. lateralis</i> (L1)	A...T..TA....	T.....T..C..G..
<i>P. rufa</i> (F63)	A...T..T	..T.A....	...A....A...C..CT..AT.
<i>P. rufa</i> (F79)	A...T..T	..T.A....	...A....A...C..CT..AT.
<i>P. rufa</i> (F89)	A...T..T	..T.A....	..A..A....A...T..AT.
			330			360
<i>H. papariensis</i> (F4)	ACTCCTGTCC	CTTCCGGTAT	TAGCTGGGGC	AATTACTATG	CTTTTAACAG	ATCGAAATTT
<i>H. papariensis</i> (F26)A...	..C..A....A..AC.
<i>L. lateralis</i> (L1)	...TT.A...	T.G..T...CA..	...C..A..A	..A.....T.	..C.....C.
<i>P. rufa</i> (F63)	G..TT.A..T	..A..T..T.	...A..A..	T..C..A..A	T.A.....
<i>P. rufa</i> (F79)	G..TT.A..T	..A..T..T.	...A..A..	T..C..A..A	T.A.....
<i>P. rufa</i> (F89)	G...T.A..T	..A..T..T.	...A..A..	T..C..A..A	T.A.....
			390		403	
<i>H. papariensis</i> (F4)	AAATACATCC	TTTTTTGATC	CAGCTGGGGG	TGGAGACCCT	ATT	
<i>H. papariensis</i> (F26)	
<i>L. lateralis</i> (L1)T...	..C.....	..C...A..	A.....A	...	
<i>P. rufa</i> (F63)	...T.T..AC.	...A..A..	A.....T...	G.A	
<i>P. rufa</i> (F79)	...T.T..AC.	...G..A..	A.....T...	G.A	
<i>P. rufa</i> (F89)	...T.T..AA..A..	A.....A	G.A	

Fig. 1. DNA sequences (403 bases) for a region of mitochondrial COI gene in two haplotypes isolated from *H. papariensis*, one from *L. lateralis*, and three from *P. rufa*. Only nucleotides that differ from *H. papariensis* (F4) are indicated.

*rubrovestitus*를 사용하였다. PHYLIP의 경우, subprogram인 NEIGHBOR 및 DNAML을 이용한 neighbor-joining (NJ)법 및 maximum likelihood (ML)법에 의해 각 계통수를 얻었다. 계통수를 얻기 위한 첫 단계로 SEQBOOT subprogram을 이용하여 data set을 100번 반복 작성하였다. 그 다음 NJ법의 경우, subprogram인 DNADIST를 이용하여 종간의 유전적 분화 정도를 구하였는데 이때 transition과 transversion의 비율을 1:2로 지정한 후 Kimura의 2-parameter 방법 (Kimura, 1980)을 사용하였다. 이 결과를 바탕으로 100개의 계통수를 얻었으며 ML법의 경우 DNAML을 직접적으로 이용하여 100개의 계통수를 얻었으며 이때 두 가지 분석 모두 Lycidae과에 속하는 *C. rubrovestitus*를 계통수의 바닥에 오도록 하였다. 각 분석에서의 결과를 바탕으로 계통수내 각 분지의 빈도는 CONSENSE subprogram으로 구하였다.

결 과

세 종간의 mtDNA 염기서열 분화율

파파리반딧불이 (*Hotaria papariensis*) 2개체, 애반딧불이 (*Luciola lateralis*) 1개체 및 늦반딧불이 (*Pyrocoelia rufa*) 3개체의 COI 유전자 403 bp의 염기서열은 Fig. 1과 같고 이들 염기서열의 GenBank accession number는 Table 1과 같다. 종간 COI 유전자 염기서열의 변이범위는 16.9~21.1% (68~85 bp)이었으며 파파리반딧불이와 애반딧불이 사이에는 16.9% (68 bp) 또는 17.9% (72 bp), 파파리반딧불이와 늦반딧불이 사이에는 18.4~20.3% (74~82 bp), 애반딧불이와 늦반딧불이 사이에는 20.8~21.1% (84~85 bp)의 유전적 분화율이 존재하였다. 이로써 파파리반딧불이와 애반딧불이 사이에 가장 낮은 유전적 분화율이 그리고 애반딧불이와 늦반딧불이 사이에 가장 높은 유전적 분화율이

관찰되었다 (Table 3).

COI 유전자의 DNA 염기서열에 따른 아미노산(aa)

Table 3. Pairwise comparisons of COI gene sequences, their amino acid sequences, and 16S rRNA gene sequences among Korean firefly species

	COI DNA sequences					
	1	2	3	4	5	6
1. <i>H. papariensis</i> (F4)	—	0.042	0.179	0.203	0.203	0.191
2. <i>H. papariensis</i> (F26)	17	—	0.169	0.199	0.199	0.184
3. <i>L. lateralis</i> (L1)	72	68	—	0.211	0.211	0.208
4. <i>P. rufa</i> (F63)	82	80	85	—	0.002	0.042
5. <i>P. rufa</i> (F79)	82	80	85	1	—	0.045
6. <i>P. rufa</i> (F89)	77	74	84	17	18	—

	COI amino acid sequences					
	1	2	3	4	5	6
1. <i>H. papariensis</i> (F4)	—	0	0.052	0.097	0.097	0.097
2. <i>H. papariensis</i> (F26)	0	—	0.052	0.097	0.097	0.097
3. <i>L. lateralis</i> (L1)	7	7	—	0.090	0.090	0.090
4. <i>P. rufa</i> (F63)	13	13	12	—	0	0
5. <i>P. rufa</i> (F79)	13	13	12	0	—	0
6. <i>P. rufa</i> (F89)	13	13	12	0	0	—

	16S rRNA sequences					
	1	2	3	4	5	6
1. <i>H. papariensis</i> (F4)	—	0.010	0.089	0.169	0.169	0.169
2. <i>H. papariensis</i> (F26)	5	—	0.087	0.171	0.171	0.171
3. <i>L. lateralis</i> (L1)	45	44	—	0.147	0.147	0.153
4. <i>P. rufa</i> (F63)	85	86	74	—	0.000	0.008
5. <i>P. rufa</i> (F79)	85	86	74	0	—	0.008
6. <i>P. rufa</i> (F89)	85	86	77	4	4	—

Numbers above the diagonal are mean distance values; numbers below the diagonal are absolute distance values.

					50
<i>H. papariensis</i> (F4, F26)	RMNMFVLL	PPSLSLLLMS	SMVENGAGTG	WTVYPPLSAN	IAHSGSSVDL
<i>L. lateralis</i> (L1)L.....S.
<i>P. rufa</i> (F63, F79, F89)L.S.....P....
					100
<i>H. papariensis</i> (F4, F26)	TIFSLHLAGI	SSILGAVNFI	STIINMRSIG	MTLDRMPLFV	WAVLITAILL
<i>L. lateralis</i> (L1)	A.....	...M.....	...E...P..	..F.....
<i>P. rufa</i> (F63, F79, F89)	A.....PNS	.MF.Q.....
					134
<i>H. papariensis</i> (F4, F26)	LLSLPVLAGA	ITMLLTERNL	NTSEFFDPAGG	GDPI	
<i>L. lateralis</i> (L1)	
<i>P. rufa</i> (F63, F79, F89)S.....	...V	

Fig. 2. Amino acid sequences (134 amino acids) for a region of mitochondrial COI gene from three species of the Korean fireflies. Only amino acids that differ from *H. papariensis* (F4, F26) are indicated.

			30			60
<i>H. papariensis</i> (F4)	GTTTTTTTGA	TAATAAATTA	AAATTTAATC	TGCTCAATGA	TTATTTAAAT	TGCCCGAGTA
<i>H. papariensis</i> (F26)
<i>L. lateralis</i> (L1)	..C.....	.T.....	.GG.....	A.TA.....
<i>P. rufa</i> (F63, F79)	..C.....	.T.....	.G.C.....	AAG.....	A.....
<i>P. rufa</i> (F89)	..C.....	.T.....	.G.C.....	AAG.....	A.....
			90			120
<i>H. papariensis</i> (F4)	TTTTAACTGT	GCAAAGGTAG	CATAATAATT	AGCTTTTTTA	TTGGAAGCTG	GAATGAATGA
<i>H. papariensis</i> (F26)A.....
<i>L. lateralis</i> (L1)G.....AG.....
<i>P. rufa</i> (F63, F79)G.....T....A.	..A.G.A..T	.T.....
<i>P. rufa</i> (F89)G.....T....A.	..A...A..T	.T.....
			150			180
<i>H. papariensis</i> (F4)	TTGGACGAGA	AAATTTCTGT	CTCTTTATTA	ATTTTATTTA	ATTTTACTTT	TAAGTTAAAA
<i>H. papariensis</i> (F26)
<i>L. lateralis</i> (L1)A...	T.....
<i>P. rufa</i> (F63, F79)A...AT.A.	T...T.G.	...A.T...
<i>P. rufa</i> (F89)A...AT.A.	T...T.G.	...A.T...
			210			240
<i>H. papariensis</i> (F4)	GCCTTAAATT	TTTTTAAAAG	ACGAGAAGAC	CCTATAGAGT	TTAATTTGTT	GAAGATTATT
<i>H. papariensis</i> (F26)
<i>L. lateralis</i> (L1)T.A	A.TA...AA
<i>P. rufa</i> (F63, F79)	T.....	...G.....C.....	..T.....-C	A..T.....--
<i>P. rufa</i> (F89)	T.....	...G.....C.....	..T.....-C	A.....--
			270			300
<i>H. papariensis</i> (F4)	TTTTATTTGGT	ATTTTAAAA-	-TTTATTTTTT	TAATAAATTT	AGTTGGGGTG	ACTAAAAGAT
<i>H. papariensis</i> (F26)
<i>L. lateralis</i> (L1)	A.....	...AG...A	T...A..A.	...A.....	G.....
<i>P. rufa</i> (F63, F79)	-...G.ATA	...A.T..A	-----A.	.G.A.....-T.....
<i>P. rufa</i> (F89)	-...G.ATA	...A.T..A	-----A.	.G.A.....-T.....
			330			360
<i>H. papariensis</i> (F4)	TAATAAAACT	CTTTCATTTT	TAATCAATTG	TATTTGAATA	TAAAATCTAT	ATTTTAAAT
<i>H. papariensis</i> (F26)	.T.....	...T.....	C.....
<i>L. lateralis</i> (L1)	AT.AT.....	...T...AAT	.T.G.....	...A...G.
<i>P. rufa</i> (F63, F79)	...AT.....	...A.....	.G...T..A	.T.G...T	GTG.T...A	T.....G.
<i>P. rufa</i> (F89)	...AT.....	...A.....	.G...T.GA	.T.G...T	GTG.T...A	T.....G.
			390			420
<i>H. papariensis</i> (F4)	TTAAAATAAA	TTACCTTAGG	GATAACAGCG	TAATTTTTTT	TTAAAGTTCA	TATTAAAAGA
<i>H. papariensis</i> (F26)A.....
<i>L. lateralis</i> (L1)C...	...G....T
<i>P. rufa</i> (F63, F79)T....G...C...	.A.G....T	...C...TA.
<i>P. rufa</i> (F89)T....G...C...	.A.G....T	...C...TA.
			450			480
<i>H. papariensis</i> (F4)	AAAGTTTGGG	ACCTCGATGT	TGGATTAAAA	TTTATTTTAG	GTGTAGAACC	TTAAAAATTG
<i>H. papariensis</i> (F26)
<i>L. lateralis</i> (L1)	G.....T....
<i>P. rufa</i> (F63, F79)	G...A....G....A
<i>P. rufa</i> (F89)	G...A....G.G....A

Fig. 3. Continued.

			504
<i>H. papariensis</i> (F4)	AGTCTGTTCG	ACTTTTAAAA	TTTT
<i>H. papariensis</i> (F26)
<i>L. lateralis</i> (L1)
<i>P. rufa</i> (F63, F79)
<i>P. rufa</i> (F89)

Fig. 3. DNA sequences (490~504 bases) for a region of mitochondrial 16S rRNA gene in two haplotypes isolated from *H. papariensis*, one from *L. lateralis*, and two from *P. rufa*. Only nucleotides that differ from *H. papariensis* (F4) are indicated, and bars indicate deletions relative to the position of the *H. papariensis* (F4) sequence.

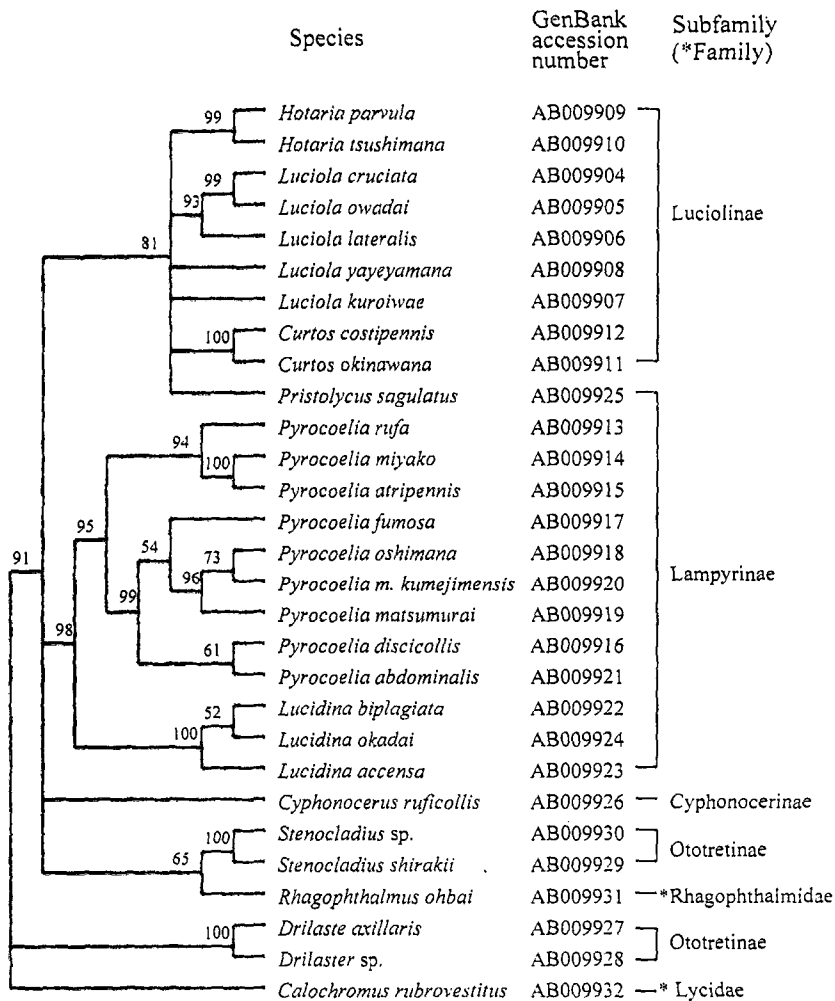


Fig. 4. PAUP analysis of mitochondrial 16S rRNA sequences using mtDNA sequence of 29 Japanese fireflies obtained through GenBank search (Suzuki, 1997). The tree shown is a single-most parsimonious tree from the heuristic search using *C. rubrovestitus* as an outgroup. The numbers shown on the branches represent bootstrap values for 1,000 replicates. Tree length is 884 steps, Consistency Index is 0.484, and Retention Index is 0.670.

분화율의 변이범위는 5.2~9.7% (7~13 aa)이었으며 종 내 아미노산 교체는 관찰되지 않았다 (Fig. 2). 파파리 반딧불이와 애반딧불이 사이에는 5.2% (7 aa), 파파리

반딧불이와 늦반딧불이 사이에는 9.7% (13 aa), 그리고 애반딧불이와 늦반딧불이 사이에는 9.0% (12 aa)의 유전적 분화율이 존재하였다. 이로써 파파리반딧불이와

애반딧불이가 가장 낮은 유전적 분화율을 그리고 파파리반딧불이와 늦반딧불이가 가장 높은 유전적 분화율을 나타내어 (Table 3) 일부 염기서열의 비교결과와 다른 결과가 나타났다.

16S rRNA 유전자의 염기서열은 Fig. 3과 같고 이들 염기서열은 GenBank에 등록하였다 (Table 1). COI 유전자에서 1 bp 차이를 보였던 늦반딧불이 F63과 F79 개체는 16S rRNA에서는 동일한 염기서열을 나타내었

다. 16S rRNA는 deletion과 addition으로 인해 종간 길이변화를 보였는데 파파리반딧불이는 502 bp이었으며, 애반딧불이는 504 bp 그리고 늦반딧불이는 490 bp로, 길이 그 자체에 있어서도 파파리반딧불이와 애반딧불이는 유사하였다. 종간 16S rRNA 염기서열의 변이범위는 8.7~17.1% (44~86 bp)이었으며 파파리반딧불이와 애반딧불이 사이에는 8.7% (44 bp) 또는 8.9% (45 bp), 파파리반딧불이와 늦반딧불이 사이에는

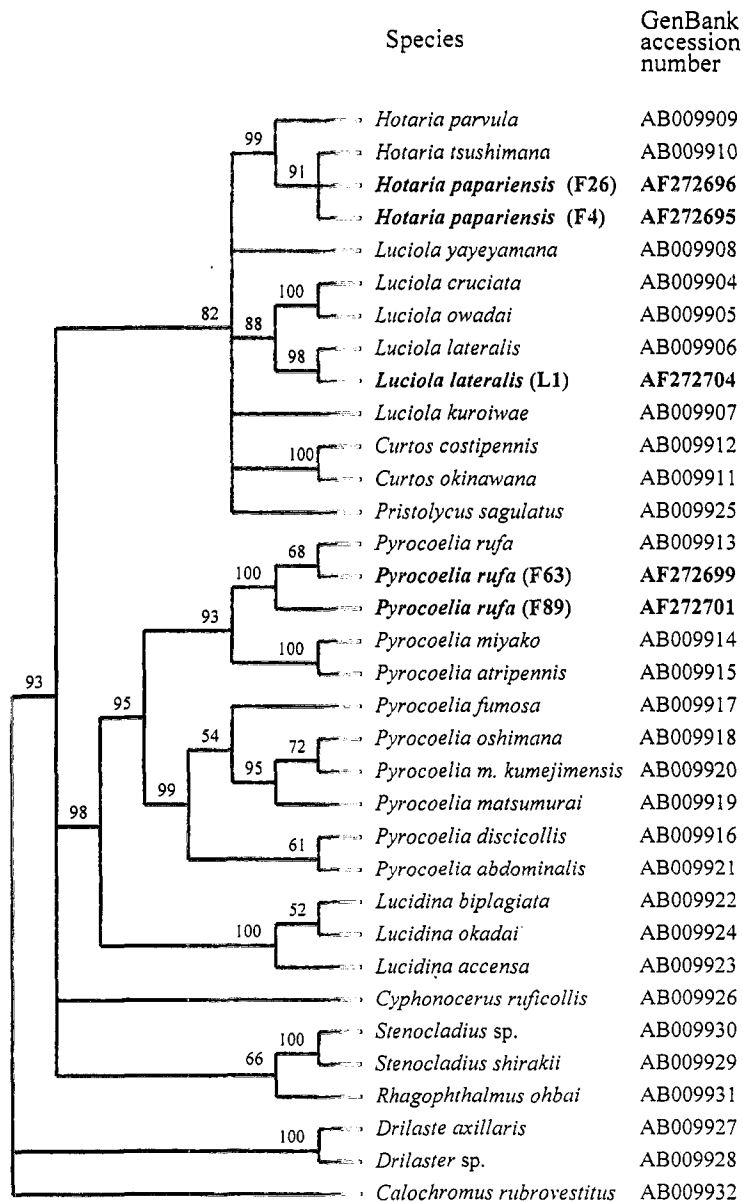


Fig. 5. PAUP analysis of mitochondrial 16S rRNA sequences using five mtDNA sequences of Korean fireflies and 29 Japanese fireflies obtained through GenBank search (Suzuki, 1997). The tree shown is a majority-rule consensus of three equally parsimonious trees from the heuristic search using *C. rubrovestitus* as an outgroup. The numbers shown on the branches represent bootstrap values for 1,000 replicates. Tree length is 902 steps, Consistency Index is 0.477, and Retention Index is 0.715.

Table 4. Pairwise comparisons among mitochondrial 16S rRNA gene sequences of the Korean fireflies and the Japanese fiveflies

Species	Genbank accession number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>Luciola cruciata</i>	AB009904	-	0.015	0.064	0.068	0.116	0.112	0.104	0.110	0.093	0.099	0.130	0.108	0.182	0.180	0.182	0.188	0.190
2. <i>Luciola owdai</i>	AB009905	8	-	0.064	0.064	0.110	0.108	0.103	0.110	0.093	0.099	0.128	0.106	0.180	0.178	0.176	0.186	0.188
3. <i>Luciola lateralis</i>	AB009906	33	33	-	0.029	0.135	0.122	0.114	0.116	0.101	0.103	0.126	0.116	0.188	0.186	0.191	0.193	0.191
4. <i>Luciola lateralis</i> (L1)	AF272704	35	33	15	-	0.126	0.114	0.106	0.106	0.097	0.095	0.126	0.120	0.174	0.172	0.178	0.178	0.176
5. <i>Luciola kuroiwae</i>	AB009907	60	57	70	65	-	0.132	0.118	0.135	0.124	0.122	0.124	0.110	0.193	0.191	0.193	0.199	0.191
6. <i>Luciola yayeyamana</i>	AB009908	58	56	63	59	68	-	0.114	0.120	0.103	0.103	0.122	0.122	0.203	0.201	0.203	0.199	0.195
7. <i>Hotaria parvula</i>	AB009909	54	53	59	55	61	59	-	0.064	0.041	0.046	0.126	0.130	0.188	0.186	0.190	0.186	0.184
8. <i>Hotaria tsushimana</i>	AB009910	57	57	60	55	70	62	33	-	0.031	0.031	0.132	0.135	0.203	0.201	0.207	0.205	0.203
9. <i>Hotaria papariensis</i> (F4)	AF272695	48	48	52	50	64	53	21	16	-	0.010	0.114	0.118	0.191	0.190	0.191	0.193	0.191
10. <i>Hotaria papariensis</i> (F26)	AF272696	51	51	53	49	63	53	24	16	5	-	0.116	0.124	0.191	0.190	0.191	0.191	0.188
11. <i>Curtos okinawana</i>	AB009911	67	66	65	65	64	63	65	68	59	60	-	0.043	0.184	0.182	0.186	0.195	0.191
12. <i>Curtos costipennis</i>	AB009912	56	55	60	62	57	63	67	70	61	64	22	-	0.188	0.186	0.190	0.197	0.191
13. <i>Pyrocoelia rufa</i>	AB009913	94	93	97	90	100	105	97	105	99	99	95	97	-	0.002	0.010	0.052	0.048
14. <i>Pyrocoelia rufa</i> (F63, F79)	AF272699	93	92	96	89	99	104	96	104	98	98	94	96	1	-	0.008	0.050	0.046
15. <i>Pyrocoelia rufa</i> (F89)	AF272701	94	91	99	92	100	105	98	107	99	99	96	98	5	4	-	0.050	0.046
16. <i>Pyrocoelia miyako</i>	AB009914	97	96	100	92	103	103	96	106	100	99	101	102	27	26	26	6	-
17. <i>Pyrocoelia atripennis</i>	AB009915	98	97	99	91	99	101	95	105	99	97	99	99	25	24	24	6	-
18. <i>Pyrocoelia discicollis</i>	AB009916	100	98	100	92	105	104	96	107	100	101	99	99	49	48	48	45	42
19. <i>Pyrocoelia fumosa</i>	AB009917	101	99	101	96	113	107	104	112	104	105	99	101	42	41	41	46	45
20. <i>Pyrocoelia oshimana</i>	AB009918	97	95	97	93	107	105	101	109	101	102	101	101	43	42	41	47	46
21. <i>Pyrocoelia matsumurai</i>	AB009919	99	97	101	95	104	106	102	111	102	103	101	103	51	50	49	52	49
22. <i>Pyrocoelia m. kumejimensis</i>	AB009920	110	109	109	106	116	112	110	119	110	111	112	114	65	64	63	67	66
23. <i>Pyrocoelia abdominalis</i>	AB009921	103	101	103	97	105	106	105	114	107	108	105	106	49	48	48	46	45
24. <i>Lucidina biplagiata</i>	AB009922	110	107	111	103	108	116	118	123	121	120	115	109	76	75	74	80	79
25. <i>Lucidina accensa</i>	AB009923	109	108	108	101	111	114	111	116	112	113	112	106	76	75	76	74	73
26. <i>Lucidina okadae</i>	AB009924	115	114	114	106	116	115	116	121	115	114	118	114	74	73	72	78	77
27. <i>Pristolycus sagulatus</i>	AB009925	50	50	49	46	63	61	56	61	51	52	57	59	94	93	94	94	93
28. <i>Cyphonocerus ruficollis</i>	AB009926	80	78	83	76	90	89	85	92	84	82	82	84	84	83	85	88	87
29. <i>Drilaste axillaris</i>	AB009927	79	78	76	75	92	85	86	88	79	77	84	81	84	83	83	85	84
30. <i>Drilaster</i> sp.	AB009928	82	80	76	80	96	88	87	90	80	80	85	82	88	87	87	90	89
31. <i>Stenocladus shirakii</i>	AB009929	97	95	101	97	97	96	92	97	93	94	95	97	106	106	108	106	107
32. <i>Stenocladus</i> sp.	AB009930	98	96	100	98	98	100	95	101	97	96	94	97	108	107	109	105	106
33. <i>Rhaqophthalmus ohbai</i>	AB009931	84	82	92	81	91	95	92	93	87	86	80	81	96	95	93	97	96
34. <i>Calochromus rubrovestitus</i>	AB009932	115	114	115	119	120	118	99	109	102	102	112	114	118	117	117	111	112

Table 4. Continued.

Species	Genbank accession number	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1. <i>Luciola cruciata</i>	AB009904	0.193	0.195	0.188	0.191	0.213	0.199	0.213	0.211	0.222	0.097	0.155	0.153	0.159	0.188	0.190	0.162	0.222
2. <i>Luciola owadai</i>	AB009905	0.190	0.191	0.184	0.188	0.211	0.195	0.207	0.209	0.221	0.097	0.151	0.151	0.155	0.184	0.186	0.159	0.221
3. <i>Luciola lateralis</i>	AB009906	0.193	0.195	0.188	0.195	0.211	0.199	0.215	0.209	0.221	0.095	0.161	0.147	0.147	0.195	0.193	0.178	0.222
4. <i>Luciola lateralis</i> (L1)	AF272704	0.178	0.186	0.180	0.184	0.205	0.188	0.199	0.195	0.205	0.089	0.147	0.145	0.155	0.188	0.190	0.157	0.230
5. <i>Luciola kuroiwae</i>	AB009907	0.203	0.219	0.207	0.201	0.224	0.203	0.209	0.215	0.224	0.122	0.174	0.178	0.186	0.188	0.190	0.176	0.232
6. <i>Luciola yayeyamana</i>	AB009908	0.201	0.207	0.203	0.205	0.217	0.205	0.224	0.221	0.222	0.118	0.172	0.164	0.170	0.186	0.193	0.184	0.228
7. <i>Hotaria parvula</i>	AB009909	0.186	0.201	0.195	0.197	0.213	0.203	0.228	0.215	0.224	0.108	0.164	0.166	0.168	0.178	0.184	0.178	0.191
8. <i>Hotaria tsushimana</i>	AB009910	0.207	0.217	0.211	0.215	0.230	0.221	0.238	0.224	0.234	0.118	0.178	0.170	0.174	0.188	0.195	0.180	0.211
9. <i>Hotaria papariensis</i> (F4)	AF272695	0.193	0.201	0.195	0.197	0.213	0.207	0.234	0.217	0.222	0.099	0.162	0.153	0.155	0.180	0.188	0.168	0.197
10. <i>Hotaria papariensis</i> (F26)	AF272696	0.195	0.203	0.197	0.199	0.215	0.209	0.232	0.219	0.221	0.101	0.159	0.149	0.155	0.182	0.186	0.166	0.197
11. <i>Curtos okinawana</i>	AB009911	0.191	0.191	0.195	0.195	0.217	0.203	0.222	0.217	0.228	0.110	0.159	0.162	0.164	0.184	0.182	0.155	0.217
12. <i>Curtos costipennis</i>	AB009912	0.191	0.195	0.195	0.199	0.221	0.205	0.211	0.205	0.221	0.114	0.162	0.157	0.159	0.188	0.188	0.157	0.221
13. <i>Pyrocoelia rufa</i>	AB009913	0.095	0.081	0.083	0.099	0.126	0.095	0.147	0.147	0.143	0.182	0.162	0.162	0.170	0.205	0.209	0.186	0.228
14. <i>Pyrocoelia rufa</i> (F63, F79)	AF272699	0.093	0.079	0.081	0.097	0.124	0.093	0.145	0.145	0.141	0.180	0.161	0.161	0.168	0.205	0.207	0.184	0.226
15. <i>Pyrocoelia rufa</i> (F89)	AF272701	0.093	0.079	0.079	0.095	0.122	0.093	0.143	0.147	0.139	0.182	0.164	0.161	0.168	0.209	0.211	0.180	0.226
16. <i>Pyrocoelia miyako</i>	AB009914	0.087	0.089	0.091	0.101	0.130	0.089	0.155	0.143	0.151	0.182	0.170	0.164	0.174	0.205	0.203	0.188	0.215
17. <i>Pyrocoelia atipennis</i>	AB009915	0.081	0.087	0.089	0.095	0.128	0.087	0.153	0.141	0.149	0.180	0.168	0.162	0.172	0.207	0.205	0.186	0.217
18. <i>Pyrocoelia discicollis</i>	AB009916	-	0.046	0.052	0.056	0.087	0.041	0.164	0.159	0.161	0.178	0.155	0.166	0.172	0.217	0.215	0.188	0.236
19. <i>Pyrocoelia fumosa</i>	AB009917	24	-	0.041	0.052	0.083	0.052	0.157	0.155	0.155	0.184	0.157	0.172	0.174	0.224	0.222	0.180	0.255
20. <i>Pyrocoelia oshimana</i>	AB009918	27	21	-	0.033	0.056	0.060	0.166	0.159	0.161	0.178	0.168	0.172	0.174	0.215	0.211	0.184	0.257
21. <i>Pyrocoelia matsumurai</i>	AB009919	29	27	17	-	0.064	0.064	0.176	0.168	0.168	0.178	0.174	0.172	0.174	0.217	0.213	0.190	0.261
22. <i>Pyrocoelia m. kumejimensis</i>	AB009920	45	43	29	33	-	0.095	0.195	0.188	0.191	0.201	0.203	0.195	0.195	0.242	0.238	0.211	0.279
23. <i>Pyrocoelia abdominalis</i>	AB009921	21	27	31	33	49	-	0.166	0.162	0.161	0.188	0.166	0.176	0.178	0.219	0.219	0.190	0.242
24. <i>Lucidina biplagiata</i>	AB009922	85	81	86	91	101	86	-	0.062	0.068	0.209	0.193	0.211	0.221	0.238	0.232	0.201	0.259
25. <i>Lucidina accensa</i>	AB009923	82	80	82	87	97	84	32	-	0.056	0.207	0.190	0.205	0.215	0.221	0.219	0.186	0.257
26. <i>Lucidina okadai</i>	AB009924	83	80	83	87	99	83	35	29	-	0.209	0.197	0.197	0.209	0.221	0.224	0.188	0.265
27. <i>Pristolyceus sagulatus</i>	AB009925	92	95	92	92	104	97	108	107	108	-	0.137	0.145	0.151	0.178	0.186	0.149	0.222
28. <i>Cyphonocerus ruficollis</i>	AB009926	80	81	87	90	105	86	100	98	102	71	-	0.153	0.161	0.190	0.188	0.166	0.232
29. <i>Drilaste axillaris</i>	AB009927	86	89	89	89	101	91	109	106	102	75	79	-	0.019	0.203	0.201	0.153	0.168
30. <i>Drilaster</i> sp.	AB009928	89	90	90	90	101	92	114	111	108	78	83	10	-	0.215	0.213	0.161	0.174
31. <i>Stenocladus shirakii</i>	AB009929	112	116	111	112	125	113	123	114	114	92	98	105	111	-	0.025	0.164	0.238
32. <i>Stenocladus</i> sp.	AB009930	111	115	109	110	123	113	120	113	116	96	97	104	110	13	-	0.159	0.238
33. <i>Rhagophthalmus ohbai</i>	AB009931	97	93	95	98	109	98	104	96	97	77	86	79	83	85	82	-	0.232
34. <i>Calochromus rubrovestitus</i>	AB009932	122	132	133	135	144	125	134	133	137	115	120	87	90	123	123	120	-

Numbers above the diagonal are mean distance values; numbers below the diagonal are absolute distance values. Bold-faced letters were obtained from this study.

16.9% 또는 17.1% (85, 86 bp), 그리고 애반딧불이와 늦반딧불이 사이에는 14.7% 또는 15.3% (74 또는 75 bp)의 유전적 분화율이 존재하였다. 이로써 파파리반딧불이와 애반딧불이는 COI 유전자의 분석결과와 마찬가지로 가장 낮은 유전적 분화율을 보였으나 가장 높은 유전적 분화율은 COI 유전자의 번역 결과와 마찬가지로 파파리반딧불이와 늦반딧불이의 비교에서 나타났다 (Table 3).

국내 반딧불이 종의 일본 반딧불이와의 관련
 국내 반딧불이 종 (*H. papariensis*, *L. lateralis*, *P. rufa*)간의 계통적 관련을 파악하고 이들의 반딧불이과 (Lampyridae)내에서의 계통분류학적인 위치를 확인하고자 PAUP과 PHYLIP 분석을 실시한 결과는 Figs. 5, 6, 7에 나타내었다. 우선, Fig. 4는 Suzuki (1997)에 의해 보고된 일본 반딧불이의 계통적 관련을 PAUP의 heuristic법을 통해 분석한 결과로, 반딧불이

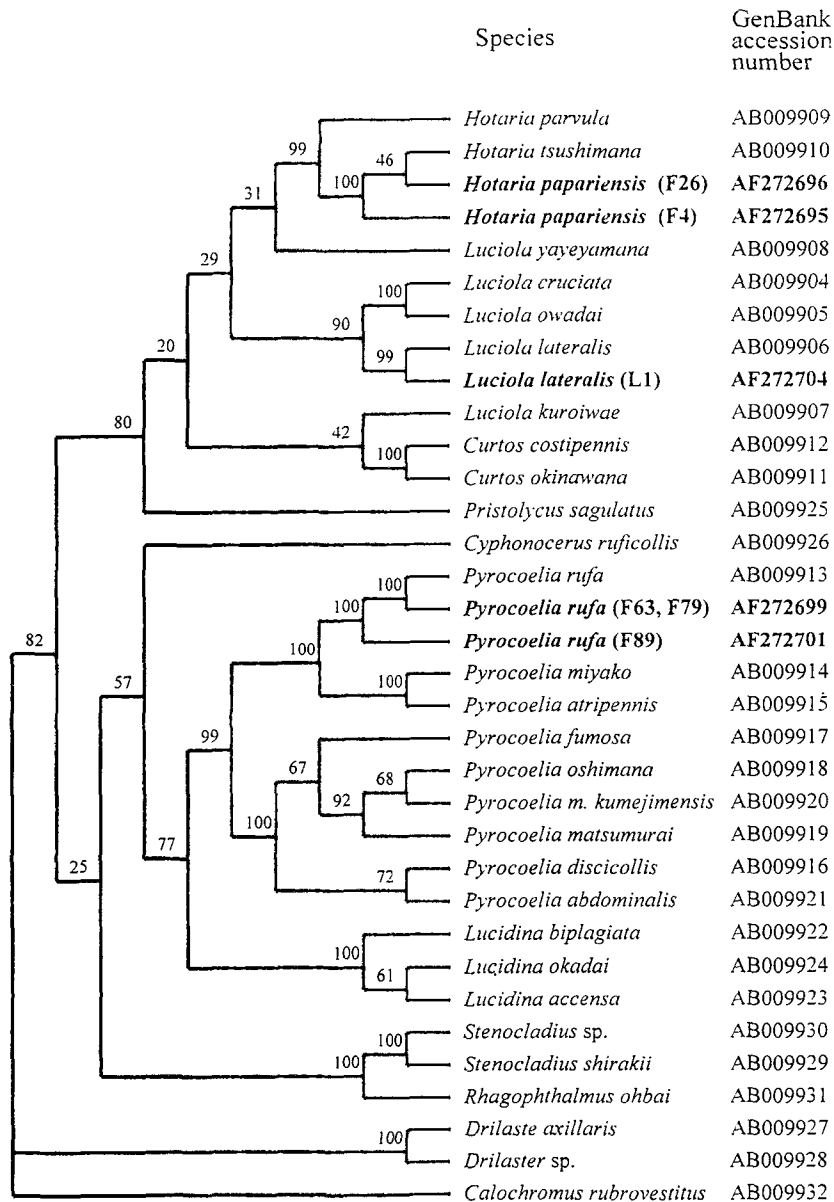


Fig. 6. PHYLIP analysis of mitochondrial 16S rRNA sequences using five mtDNA sequences of Korean fireflies and 29 Japanese fireflies obtained through GenBank search (Suzuki, 1997). The tree was obtained using the subprogram NEIGHBOR incorporated in PHYLIP with the option of Kimura's 2-parameter method (1980). The tree was rooted using *C. rubrovestitus*. The numbers shown on branches, which represent bootstrap values for 100 replications, were obtained using the subprogram CONSENSE.

아과(Lampyrinae)에 속한 *Pristolycus sagulatus*가 계통적으로 Lampyrinae에 속하는 종들과 단일 그룹을 형성하지 못한 점, 또한 Octotretinae에 속한 종들 역시 단일 계통 그룹을 형성하고 있지 못한 점 등 전반적으로 Suzuki(1997)의 분석 결과와 일치하는 계통수를 나타내었다. Suzuki(1997)가 실시했던 PHYLIP의 NJ법을 이용한 분석 역시 이와 유사하였다(자료 생략).

국내 반딧불이 종을 포함한 PAUP 분석 결과(Fig. 5), 애반딧불이(L1)는 일본 애반딧불이와 강력한 단일 계통그룹(98% bootstrap value)을 형성하였으나 두 지역 개체사이에는 상당한 유전적 차이(2.9%)가 존재하였다(Table 4). 부산(F26)과 전라북도 무주(F4)에서 채집한 파파리반딧불이는 일본 대마도 고유종인 *H. tsushima*와 강력한 단일 그룹을 형성하였으며(91% bootstrap value) 이들 종은 다시 *H. parvula*와 함께 강

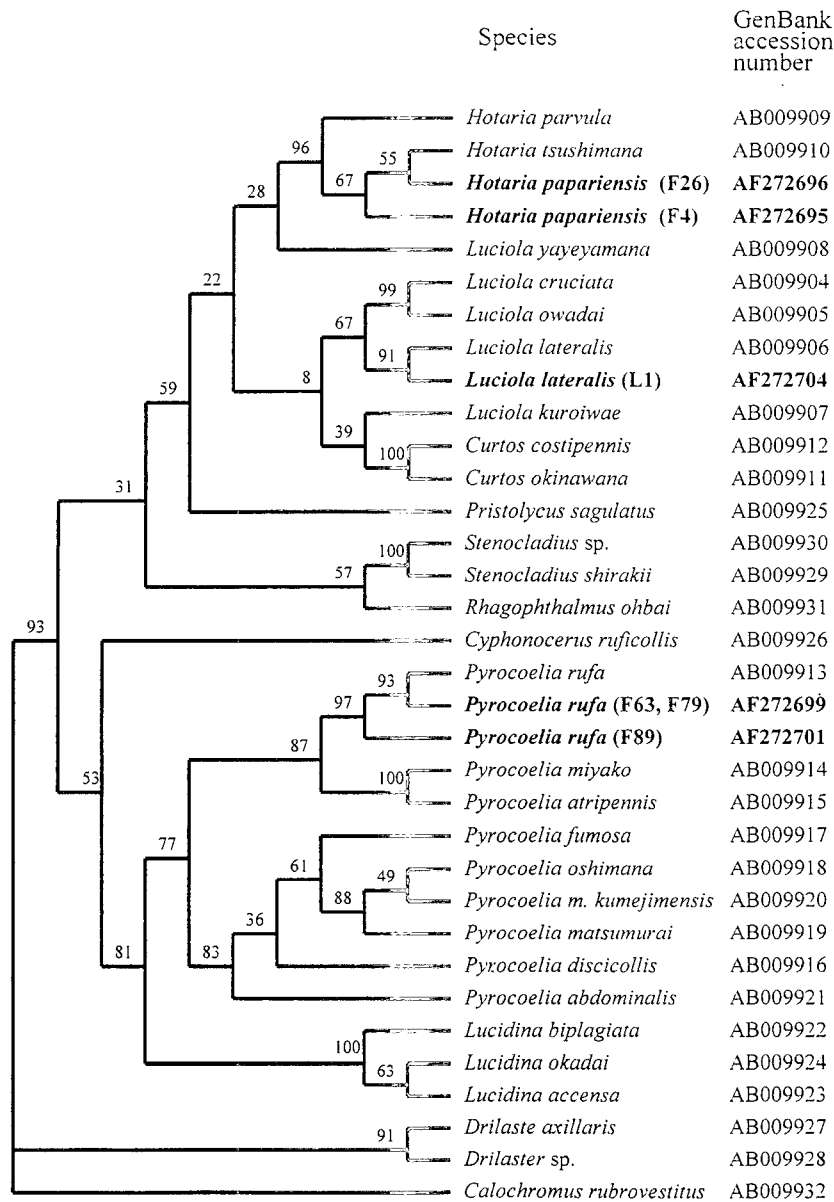


Fig. 7. PHYLIP analysis of mitochondrial 16S rRNA sequences using five mtDNA sequences of Korean fireflies and 29 Japanese fireflies obtained through GenBank search (Suzuki, 1997). The tree was obtained using the subprogram DNAML incorporated in PHYLIP with the option of Kimura's 2-parameter method (1980). The tree was rooted using *C. rubrovestitus*. The numbers shown on branches, which represent bootstrap values for 100 replications, were obtained using the subprogram CONSENSE.

력한 단일 *Hotaria* 그룹을 형성하였다(99% bootstrap value). 그러나 사용된 두 파파리반딧불이 개체 중 부산 개체는 PHYLIP의 NJ법 및 ML법으로 분석한 결과, 낮거나 높지 않은 bootstrap 수치(각 46% 또는 55%)이긴 하지만 *H. tsushimana*와 자매 분류군을 형성하였다(Figs. 6, 7). 늦반딧불이의 경우, 전북 무주(F63) 및 충남 보령(F79) 그리고 제주도(F89)에서 채집된 개체는 일본 늦반딧불이(대마도)와 전반적으로 강력한 단일 계통 그룹을 형성하였으나(Figs. 5, 6, 7) 대마도 개체는 제주도 개체에 비해 한반도 두 지역 개체와 더욱 유사(0.2%)하였다(Table 4). 이상의 결과, 국내 애반딧불리아과(Luciolinae)의 두 종 및 반딧불리아과(Lampyrinae)의 늦반딧불이의 분류학적 위치는 기존의 분류학적 체계와 일치하였다.

고 찰

국내 반딧불이 종간의 유전적 분화

종간 COI 유전자의 DNA 염기서열과 그 아미노산 분화율의 크기 차이(각 16.9~21.1% 및 5.2~9.7%)가 있는 점으로 보아 COI 유전자의 진화는 주로 아미노산 치환을 야기하지 않는 코돈부위(3rd position)에서 높게 발생하고 있다. 한편 종간 COI 유전자와 16S rRNA 유전자의 DNA 염기서열의 분화율은 각각 16.9~21.1% 또는 8.9~17.1%로 세 종간의 하한가의 크기 차이(16.9% 대 8.9%)는 상한가의 크기 차이(21.1% 대 17.1%)에 비해 몹시 큰 점을 알 수 있다. 이러한 점을 종합해 볼 때 COI 유전자의 진화는 시간이 흐를수록 제한된 염기위치에 반복적으로 발생하였을 것으로 추측되며 비교 분류군 사이에서 무한적으로 분화하고 있지 않음을 알 수 있다. mtDNA의 COI gene은 곤충의 mtDNA 부위 중 진화율이 상당히 높은 부위로 알려져 있는데(Simon *et al.*, 1994) 이처럼 높은 진화율을 가진 mtDNA 부위를 DNA 수준에서 분류학적으로 사용할 경우 제한된 부위에서의 back mutation과 parallel mutation으로 원연관계의 분류군 간 비교시 일정 수준의 분화율 이후 변이정도가 포화 상태에 이르러 계통분류학적 연구의 한계를 갖고 있다고 알려져 있다(Attardi, 1985; Simon *et al.*, 1994). 본 연구결과 COI 유전자의 DNA 수준에서의 종간 차이가 COI 유전자의 아미노산 수준 및 16S rRNA의 DNA 수준에서의 변이율과 다소 차이가 나는 것은 바로 COI 유전자의 높은 진화율, 상대적으로 보다 제한적인 부위에서의 돌연변이 가능성, 그리고 back mutation과 parallel mutation 등이 복합적으로 작용한 것으로 생각되나 이에 대한 보다 심도있는 분자진화학적 연구가 요망되는 실정이다. 그럼에도 불구하고 본 연

구 결과는 종합적으로 파파리반딧불이(*H. papriensis*) 애반딧불이(*L. lateralis*) 및 늦반딧불이(*P. rufa*) 중 파파리반딧불이와 애반딧불이의 유전적 유사성을 보여 주고 있으므로 기존의 분류학적 가설을 지지하고 있는 실정이다.

국내 반딧불이 종의 일본 반딧불이와의 관련

파파리반딧불이(*H. papriensis*)

Yuasa(1937)에 따르면 *Hotaria* 속은 암컷이 퇴화된 뒷날개를 갖고 있으며 수컷의 크기는 암컷의 그것보다 크며 유충이 육상생활을 한다는 점을 들어 *Luciola* 속과 구별을 하였으나 *Hotaria* 속의 일부 형질 또한 *Luciola* 속에서도 발견된다고 보고하였다(예를 들면, 유충의 육상생활). 이러한 이유에서인지 파파리반딧불이(*H. papriensis*)는 오랫동안 *Luciola* 속으로 분류되어 온 바 있다(Kim and Nam, 1981). 본 연구결과, 파파리반딧불이는 *H. tsushimana* 및 *H. parvula*와 함께 강력한 단일 계통그룹을 형성하였으므로(Figs. 5, 6, 7) *Hotaria* 속에 속한 일본 종들의 속명이 유지되는 한 파파리반딧불이 또한 *Hotaria* 속으로 명명하는 것이 타당하다고 판단된다.

파파리반딧불이에 관해 흥미로운 것은 부산과 무주에서 채집된 파파리반딧불이는 동일 종이므로 당연히 개체간 강력한 단일 계통그룹을 형성할 것으로 기대되었으나 그 결과는 그렇지 못했다. PAUP의 경우 *H. tsushimana*와 다분지 그룹(Fig. 5)이, PHYLIP의 NJ법과 ML법의 경우, 부산 개체(F26)는 오히려 *H. tsushimana*와 자매 분류군을 형성하였다(Figs. 6, 7). 본 연구는 초기 분류학적 목적으로 제한된 시료와 GenBank data를 이용한 관계로 확정적인 결론에 이르기 어렵지만 부산과 무주에서 채집한 두 파파리반딧불이는 상당히 다른 계통 또는 종으로 본 연구에 사용된 것은 우연히 각 계통 또는 종을 “대표”한 개체로 부산 계통이 무주의 그것에 비해 대마도의 *H. tsushimana*와 더욱 근연의 관계에 있을 것으로 추측된다. 본 연구에 사용된 파파리반딧불이내에 “cryptic species”의 존재 가능성은 COI의 염기서열의 분석결과 더욱 확연해 지는데, 분석된 두 개체간의 염기분화율은 4.2% (17 bp)로 동일 유전자 부위를 사용한 다른 곤충과 비교시 그 상한 수치가 상당히 높게 나타나 이러한 가정을 뒷받침하고 있는 실정이다. 예를 들면, 잎말이나 방과의 *Choristoneura fumiferana*의 유전적 분화율은 ~0.4% (Sperling and Hickey, 1994), 벼멸구 *Nilaparvata legens*와 *Sogatella furcifera*는 각 0.23%와 0.12% (Mun *et al.*, 1999), *Heliconius* 나비류는 0.5% (Brower, 1994), 배추좀나방 *Plutella xylostella*는 2.7% (Kim *et al.*, 2000a, b), 잎벌레과의 *Ophraella communis*는 3.8%

(Funk *et al.*, 1995)이었다. 이러한 가정을 시험하기 위하여 무주 및 부산에서 확보된 개체의 16S rRNA의 분석과 다양한 지역으로부터 채집된 시료로부터의 COI 유전자 분석이 요망되는 실정이다. 아울러 *H. tsushima*와 파파리반딧불이 두 개체의 염기분화율은 3.1%로 높은 편이지만 (Table 4) *H. tsushima*는 단지 대마도에서만 발생하고 있는 점을 고려할 때 국내 파파리반딧불이와의 종합적인 연구를 통한 동종 가능성에 대한 검토가 요망된다.

애반딧불이 (*L. lateralis*)

애반딧불이는 두 종의 생리 생태적 측면에서 일본의 대표적인 반딧불이(일명 "genji")로 알려진 *L. cruciata*와 피상적인 유사성으로 비전문가 사이에서 일본 반딧불이로 오인되어 왔던 실정이다. 그러나 유충 서식지, 먹이, 산란수, 탈피회수 등에서 명백한 차이를 보이며 (Kim, 1999) 일본 혼슈, 시코쿠, 규슈에서 두 종은 동소종이지만 이들은 발광유형, 염색체수 등이 달라 중간 교배가 불가능한 실정이다 (Suzuki, 1997). 본 연구 결과, 일본 및 국내 *L. lateralis*는 *L. cruciata*와 각 6.4% 또는 6.8%의 16S rRNA 분화를 나타내었고 (Table 4) PAUP와 PHYLIP 분석 모두 계통적으로도 *L. cruciata*는 *L. owadai*와 강력한 단일 계통그룹을 형성한 반면 일본과 한국의 *L. lateralis*는 독립적인 단일 계통그룹을 형성하므로 (Figs. 5, 6, 7) 두 종의 계통적 관련과 유전적 차이가 확인되었다.

그러나 일본 애반딧불이와 우리 나라 애반딧불이는 2.9% (15 bp)의 16S rRNA 염기분화율을 나타내고 있는데 (Table 4) 이러한 수치는 *Luciola* 속에 속한 여섯 종 중 *L. cruciata*와 *L. owadai*가 단지 1.5% (8 bp)의 염기분화를 보인 점을 감안할 때 상당한 유전적 차이로 향후 시베리아, 한반도, 일본 등지에서 서식하는 집단의 유전적 격리와 이에 따른 분류학적 검토가 절실히 요망되는 실정이다.

늦반딧불이 (*P. rufa*)

늦반딧불이는 중국, 우리 나라 및 일본 대마도에서만 발생하는 종으로 역사적으로 여러 가지 속명으로 명명된 바 있다 (Kim and Nam, 1981). PAUP 및 PHYLIP을 이용한 계통 분석결과 역시 일본과 한국의 늦반딧불이는 강력한 단일 계통그룹을 형성하였으며 전체적으로는 Suzuki (1997)의 Lampyrinae에 속한 대부분의 종들과 단일 계통그룹을 형성하였으므로 (Figs. 5, 6, 7) *Pyrocoelia*에 속한 일본 종들의 속명이 유지되는 한 *Pyrocoelia*로 분류하는 것이 타당하다고 생각된다. 더욱이 최근 속명 *Pyrocoelia*의 타당성에 대한 연구 결과가 이를 뒷받침하고 있다 (Jeng *et al.*, 1999).

그러나 본 연구 결과 흥미로운 것은 늦반딧불이 개체의 지역적 관련으로 무주/보령의 늦반딧불이 (F63,

F79)와 제주도 개체 (F89)는 0.8% (4 bp)의 염기서열 차이를 보이는 반면 이중 무주/보령 개체는 일본 대마도의 늦반딧불이와 단지 0.2% (1 bp)의 염기서열 분화율을 보였다 (Table 4). 이러한 결과는 계통분류학적 분석에도 반영되어 PAUP 및 PHYLIP 분석결과 (Figs. 5, 6, 7), 일본 늦반딧불이는 무주/보령 등 한반도 늦반딧불이 (F63, F79)와 보다 근연의 계통그룹을 형성한 반면 제주도 늦반딧불이 (F89)는 지리적 격리에 의한 유전적 격리를 반영하는 듯 하였다.

한반도, 대마도, 제주도의 늦반딧불이는 일본 연구자에 의해 각기 독립적인 종으로 간주되어 제주도 집단은 *P. saishutonis*, 한반도 집단은 *P. coreana*, 그리고 대마도 집단은 *P. tsushima*로 분류된 바 있었다 (Matsumurai, 1928). 그러나 본 연구 결과, 다만 제주도 늦반딧불이의 유전적 이질성에 대한 가능성과 이에 다른 분류학적 재검토를 지지하고 있는 실정이며 대마도 늦반딧불이는 한반도 늦반딧불이의 유전적 변이 중 일부 유전자형일 가능성이 높은 것으로 생각된다. 이러한 가정을 제시하는 배경은 본 연구 결과에 의존한 면도 있지만 더욱 중요하게는, 우리 나라 남해에는 많은 연근해 섬이 존재하며 이들 섬에 존재하는 늦반딧불이는 한반도에서 연근해 섬에 이어 대마도로 이어지는 "clinal variation"을 보일 가능성이 높기 때문이다. 실지 남해도의 늦반딧불이 집단을 조사한 결과, 대부분이 부산의 늦반딧불이와 동일한 유전자형을 보유하고 있는 동시에 극소수만이 유전적으로 독특한 유전자형이 존재하고 있는 바 (Lee *et al.*, 2000), 대마도 늦반딧불이도 남해 늦반딧불이 유전집단과 다소 독특하지만 전반적으로는 유사한 집단 유전적 구성을 갖고 있을 것으로 여겨진다.

본 연구결과, 우리 나라 주요 반딧불이 종의 분류학적 위치 및 종간의 유전적 분화정도는 확인되었지만 종내 지역간의 유전적 분화와 이와 관련된 형태적 검토, 그리고 이에 따른 일본 반딧불이와의 위치 정립 등 많은 숙제와 연구 가능성이 공존하고 있는 실정이다.

사 사

본 연구는 2000학년도 동아대학교 학술연구조성비 (공모과제)에 의하여 연구되었음.

인 용 문 헌

- Attard, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic encoding. *Int. Rev. Cytol.* 93: 93~145.
 Brower, A.V.Z. 1994. Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera:

- Nymphalidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 3: 159~174.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 29: 783~791.
- Felsenstein, J. 1993 PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver. 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle (on disk).
- Funk, D.J., D.J. Futuyma, G. Ortí and A. Meyer. 1995. Mitochondrial DNA sequences and multiple data sets: a phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae: *Ophraella*). *Mol. Biol. Evol.* 12: 627~640.
- Gorham, H.S. 1880. Materials for a revision of the Lampyridae. *Trans. Ent. Soc. Lond.* 1880: 83~112.
- Jeng, M.L., J. Lai and P.S. Yang. 1999. On the validity of the generic name *Pyrocoelia* Gorham (Coleoptera, Lampyridae, Lampyrinae), with a review of Taiwanese Species. *Jpn. J. Syst. Ent.* 5: 347~362.
- Kim, C.W. and S.H. Nam. 1981. Present status of the Korean fire-flies and their conservation. *Bull. Korean Asso. Conser. Nature, Ser. 3*: 311~324.
- Kim, I., J.S. Bae, K.H. Choi, B.R. Jin, K.R. Lee and H.D. Sohn. 2000a. Haplotype diversity and gene flow of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), in Korea. *Korean J. Appl. Entomol.* 39: 43~52.
- Kim, I., J.S. Bae, K.H. Choi, S.R. Kim, B.R. Jin, K.R. Lee and H.D. Sohn. 2000b. Mitochondrial DNA polymorphism, gene Flow, and population genetic structure of the diamondback moths, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), in Korea. *Korean J. Entomol.* 30: 21~32.
- Kim, J.K., S.E. Kim, J.Y. Choi, S.R. Yang, S.H. Lim, K.R. Lee, H.J. Kang and L. Ohba. 1998. Investigation of distribution, physiology, and ecology of the Korean fireflies. 58 pp. in Abstract of Korean J. Appl. Entomol.
- Kim, S.E. 1999. Symbol of environmental conservation - Firefly. Firefly Society of Korea. 1: 1~8.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mole. Evol.* 116: 111~120.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Pääbo, F.X. Villablanca and A.C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6196~6200.
- Lee, S.C., I. Kim, J.S. Bae, B.R. Jin, S.E. Kim, J.K. Kim, H.J. Yoon, S.R. Yang, S.H. Lim and H.D. Sohn. 2000. Mitochondrial DNA sequence variation of the firefly, *Pyrocoelia rufa* (Coleoptera: Lampyridae). *Korean J. Appl. Entomol.* 39: 181~191.
- Matsumura, S. 1928. Hotaru: interesting insects for educational materials. Tokyo-dô. 523pp. Tokyo.
- McDermott, F.A. 1964. The taxonomy of the Lampyridae (Coleoptera). *Trans. Amer. Ent. Soc.* 90: 1~72.
- Mun, J.H., Y.H. Song, K.L. Heong and G.K. Roderick. 1999. Genetic variation among Asian populations of rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae): mitochondrial DNA sequences. *Bull. Entomol. Res.* 89: 245~253.
- Noh, Y.T., K.M. Baek, I.C. Shin and I.H. Moon. 1990. Propagation of Korean Fireflies, *Luciola lateralis* Motschulsky. *Korean J. Entomol.* 20: 1~9.
- Ohba, N. 1985. Flash communication in *Hotaria tsushimana* (Coleoptera: Lampyridae). *Sci. Rept. Yokasuka City Mus.* 33: 13~17.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a composition of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651~701.
- Sperling, F.A.H. and D.A. Hickey. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* 11: 656~665.
- Suzuki, H. 1997. Molecular phylogenetic studies of Japanese fireflies and their mating systems (Coleoptera: Cantharoidea). *TMU Bull. Natl. His.* 3: 1~53.
- Swofford, D.L. 1990. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, ver. 3.0 Illinois Natural History Survey, Champaign (on disk).
- The Entomological Society of Korea & Korean Society of Applied Entomology. 1994. Check list of insects from Korea. Kon-Kuk University Press. 744 pp. Seoul.
- Yuasa, H. 1937. Description of a new genus of the family Lampyridae (Coleoptera). *Kontyû, Tokyo.* 11: 107~109.

(2000년 6월 30일 접수; 2000년 11월 22일 수리)