Korean J. Ichthyol. 18(4), 329~338, 2006

한국 고유종인 자가사리(*Liobagrus mediadiposalis*) 지역개체군의 분자진화적 유연관계

김맹진 · 한송헌 · 양혜영 · 조미란 · 정상철 · 송춘복*

제주대학교 해양과학부

Evolutionary Relationship of *Liobagrus mediadiposalis* (Teleostei: Amblycipitidae) Populations in Korea Inferred from Cytochrome *b* DNA Sequences

Maeng Jin Kim, Song-Hun Han, Hye-Young Yang, Mi-Ran Jo, Sang-Chul Chung and Choon Bok Song*

Faculty of Applied Marine Sciences, Cheju National University, Jeju City 690-756, Korea

Phylogenetic relationships and DNA polymorphism among local populations of the Korean native catfish species, *Liobagrus mediadiposalis*, have been investigated based on mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. As a result, three genetically distinct groups of local populations were recognized based on the phylogenetic tree constructed. The first group was called "Nakdong-river group" that included the local populations from Geumho-river, Gyeongho-river, and Deokcheon-river; the second one was "Geum-river group"; the third one was represented as "Seomjin-river group" that included the samples from Seomjin-river, Dongjin-river and Geokum-do. The phylogeny also implied that the ancestral group of *L. mediadiposalis* have first evolved to Nakdong-river group, and later two local populations (Geum-river and Seomjin-river group) were diverged from the other lineage. DNA polymorphisms we observed were 4.4～4.7% between Geum-river group and Seomjin-river group, 5.1～5.5% between Seomjin-river group and Nakdong-river group, and 5.5～5.7% between Nakdong-river group and Geum-river group. These results indicated the long period of geographic isolation due to the river system in Korea caused such high degrees of DNA polymorphisms between local populations of *L. mediadiposalis*.

Key words : evolutionary relationship, *Liobagrus mediadiposalis*, populations, cytochrome *b*

서 론

퉁가리과(Family Amblycipitidae) 어류는 한국, 중국, 대만, 일본 남부, 미얀마, 인도, 파기스탄을 포함하는 극동아시아, 동남아시아 그리고 남아시아에 분포하고 있다(Nelson, 1994). 현재 퉁가리과 어류는 3개의 속(Genus)인 *Liobagrus*, *Amblyceps*, 그리고 *Xiurenbagrus*로 구성되어 있으며, 이 중에서 퉁가리속(Genus *Liobagrus*) 어류는 세계적으로 12종이 한국(3종), 중국(6종), 대만(2종), 그리고 일본(1종)에 종을 달리하면서 분포하고 있다(Zhao *et al*., 2004). 그리고 한국에 분포하는 퉁가리속

*Corresponding author: cbsong@cheju.ac.kr

어류는 자가사리(*L. mediadipodalis*), 퉁가리(*L. andersoni*) 그리고 퉁사리(*L. obesus*)로써 모두 한국 고유종으로 알려져 있다(Son and Choo, 1988; Son and Lee, 1989).

우리나라 고유종인 자가사리는 담수어류로서 주로 하천 상류의 자갈이나 바위가 많은 곳에 서식하고 금강, 낙동강, 섬진강 및 남해의 섬에 분포한다(Son and Choo, 1988). 이 어류의 특징은 가슴지느러미의 가시 안쪽에 4～6개의 작은 가시가 있고 하악보다 상악이 약간 긴 입을 가지며(Kim *et al*., 2005), 핵형 분석에서 퉁가리(2n=48)와 퉁사리(2n=20)와 구분되는 2n=42를 나타낸다(Son and Lee, 1989). 그리고 이들은 성장조사에서 만 1년까지는 4～6 cm, 만 2년생은 7～10 cm, 3년생은 11 cm 이상 자라는 것으로 밝혀졌으며(Son and Choo, 1988), 수계에 따라서 형태, 체색 및 유전적 차이를 나타내기 때문에 낙동강 자가사리는 *L. mediadiposalis*로, 섬진강 자가사리는 *L. mediadiposalis* ssp. 1로, 금강 자가사리는 *L. mediadiposalis* ssp. 2의 세 집단으로 보고된 바 있다(Son, 1987).

한편, 우리나라는 지역적 특성상, 크고 작은 산맥으로 인해 짧고 좁은 하천들이 많이 형성되어 각기 독특한 지리적 특성을 갖기 때문에 이러한 환경에서 서식하는 담수어류 가운데 저서성 또는 정착성이 강하여 이동이 제한적인 어류들은 오랜 시간 지리적인 고립에 의해서 종간뿐만 아니라 종 내에서도 지역개체군 사이에 상당한 유전적 차이와 형태적 차이를 나타낼 수 있다. 그러나 이와 관련한 우리나라 어류의 분포 지역별 개체군간의 유전적인 차이에 관한 연구는 지금까지 소수에 불과하다. 이들 연구는 초기에 주로 단백질 전기영동법을 이용한 동위효소(isozyme)분석을 통해서 이루어져 왔으며 퉁가리속 어류(Yang and Son, 1986), 버들치속 어류인 버들치와 버들개(Min and Yang, 1986), 끄리(Toshio *et al*., 1993) 등을 대상으로 한 연구가 보고된 바 있다. 이외에도 기름종개과 어류의 일종인 종개(*Nemacheilus toni*)와 한국산 송사리(*Oryzias latipes*)의 미토콘드리아 DNA를 대상으로 제한효소단편 길이다형성(RFLP, restriction fragment length polymorphism) 분석을 통한 개체군 집단간의 유전적 차이에 관한 연구가 수행된 바 있다(Masaru *et al*., 1997). 보다 최근에는 염기서열 결정이 용이하게 되고 PCR (중합효소연쇄반응)을 이용한 DNA 증폭이 일반화됨에 따라서 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자의 염기서열 자료를 이용한 관련 연구가 수행된 바 있다(Perdices *et al*., 2004; Kim, 2004). Cytochrome *b* 유전자는 보존적인 영역과 반보존적인 영역을 동시에 포함하는 등 여러 가지 장점을 가지고 있기 때문에 어류진화의 다양한 문제를 연구하기 위해 이용되어 왔으며(Kocher and Stepien, 1997; Song *et al*., 1998), 척추동물에서 가장 광범위한 종을 대상으로 염기서열이 알려진 유전자의 일종으로 그 단백질 산물은 구조와 기능 및 진화의 측면에서 가장 잘 연구된 분자들 중의 하나로 알려져 있다(Esposti *et al*., 1993; Johns and Avise, 1998).

따라서 이 연구는 미토콘드리아 DNA 내의 존재하는 cytochrome *b* 유전자를 대상으로 계통분류학적인 연구방법을 사용하여 우리나라에만 서식하는 고유종인 자가사리 지역개체군의 분화 역사를 추정하고 이들 개체군 사이의 염기서열 차이를 이용하여 분화 정도를 이해함으로써 향후 이들 개체군 집단의 보다 효과적인 보전과 관리를 위한 기초 자료로 활용하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시료채집

자가사리의 지역별 개체군에 따른 미토콘드리아의 cytochrome *b* 유전자의 염기서열 차이를 알아보기 위해

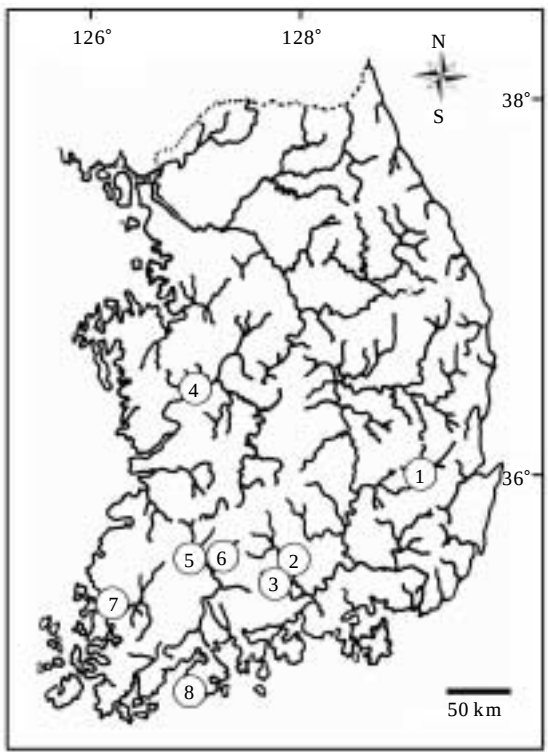

Fig. 1. A map showing the sampling localities of *L. mediadiposalis*.

Table 1. Local population name and detail sampling localities of *L. mediadiposalis*

Group	Local population	Sampling locality	No. on map
Nakdong-river	Geumho-river	Imgo-myeon, Yeongcheon-si, Gyeongsangbuk-do	1
	Deokcheon-river	Danseong-myeon, Sancheong-gun Gyeongsangnam-do	2
	Gyeongho-river	Sancheong-eup, Sancheong-gun Gyeongsangnam-do	3
Geum-river	Geum-river	Useong-myeon, Gongju-si, Chungcheongnam-do	4
Seomjin-river	Dongjin-river	Sanoe-myeon, Jeongeup-si, Jeollabuk-do	5
	Seomjin-river	Gwanchon-myeon, Imsil-gun, Jeollabuk-do	6
	Youngsan-river	Hampyeong-eup, Hampyeong-gun, Jeollanam-do	7
	Geogeum-do	Geumsan-myeon, Goheung-gun Jeollanam-do	8

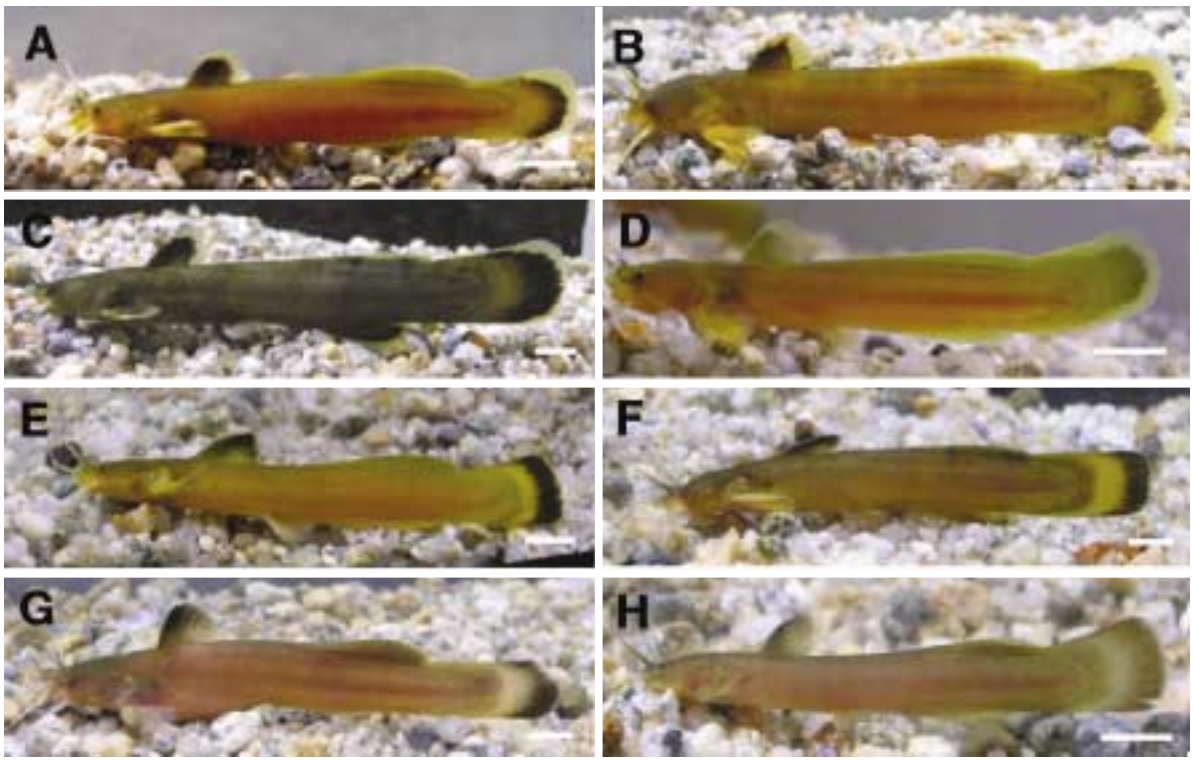

Fig. 2. External morphology and body coloration of *L. mediadiposalis* collected from 8 different localities including Geumho-river (A), Deokcheon-river (B), Gyeongho-river (C), Geum-river (D), Dongjin-river (E), Seomjin-river (F), Youngsan-river (G), and Geogeum-do (H) in Korea. Scale bars indicate one centimeter.

어류 표본은 망목이 1 mm인 반두그물을 사용하여 채집하였다. 채집은 경상북도 영천시 임고면(금호강), 경상남도 산청군 단성면(덕천강), 경상남도 산청군 산청읍(경호강), 충청남도 공주시 우성면(금강), 전라북도 정읍시 산외면(동진강), 전라북도 임실군 관촌면(섬진강), 전라남도 함평군 함평읍(영산강), 전라남도 고흥군 금산면(거금도)의 8군데에서 실시하였다(Fig. 1 and Table 1). 각 지역에서 채집된 자가사리는 가능하면 살려서 실험실로 옮겨졌으며 살아있을 때의 자가사리 외부 형태와 채색은 Fig. 2에서 보여주고 있다. 그리고 참조분류군(outgroup)으로 사용한 퉁사리(*L. obesus*)는 함평(영산강)에서 그리고 퉁가리(*L. andersoni*)는 홍천(북한강)에서 채집하였다.

2. Total DNA 추출과 PCR 증폭

시료로부터 total DNA 추출은 액체질소에 신속하게 냉동시켜 −80°C에 보관된 30～50 mg의 간이나 기저근육조직을 대상으로 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc.)를 사용하여 실시하였다. PCR 증폭은 cytochrome *b* 유전자의 주변부 tRNA 서열에 기초하여 디자인된 for-

ward primer (Glu-F3, 5′-ACC ACC GTT GT (A/T/C) (A/T/G/C)TT CAA CTA-3′)과 reverse primer (Pro-R, 5′-TAG AAT (T/C)(T/C)T (G/A)GC TTT GGG AG-3′)을 사용하여 PCR 증폭을 함으로써 각 말단 부위 근처의 tRNA 부위를 포함한 전체 cytochrome *b* 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 약 0.1～0.3 μg의 genomic DNA, 10 μL; 50 μM primers, 각각 1 μL; 10×reaction buffer, 5 μL; 2.5 mM dNTP, 5 μL; ex-Taq polymerase (Takara Bio Inc.), 1～2 unit를 넣은 다음, 최종 volume이 50 μL가 되도록 하여 Programmable Themo Controller (RTC-100, MJ Research Inc.)에서 반응시켰다. PCR 반응주기는 최초의 denaturing step을 위하여 94°C에서 2분 동안 1회 반응시키고, 이어서 94°C에서 45초, primer annealing을 위해 43°C에서 1분, primer extension을 위해 72°C에서 1분 30초의 반응 조건에서 총 30회의 반복 주기를 주었고, 최종적으로 72°C에서 7분 동안 마지막 extension을 실시하였다. PCR산물은 1×TBE buffer에서 0.8% agarose gel 상에 전기영동하여 확인하였다. 순수 정제를 위해 PCR 산물을 low-melt gel (LMP agarose, Bothesda Research Laboratories; ethidium bromide staining) 상에서 전기영동을 한 후, 예상되는 DNA 단편을 UV-lamp 하에서 잘라내어 GeneClean II Kit (Bio 101 Inc.)를 사용하여 정제하였다.

3. PCR 산물의 Cloning

PCR 산물의 cloning을 위한 숙주와 벡터로서 각각 대장균의 DH5α 균주와 pBluescript II SK (−) (Stratagene Co.)를 사용하였다. pBluescript II SK (−) 벡터는 *Hinc* II를 이용하여 절단한 후에, High pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals)로 정제하였다. Ligation은 *Hinc* II로 절단된 1 μL의 pBluescript II SK (−) 벡터, 2 μL의 insert DNA, 1 μL의 10×ligation buffer와 1 unit의 T4 DNA ligase (Promega Co.)를 넣고, 최종 volume 10 μL가 되도록 한 후에 15°C에서 18시간 동안 반응시켰다. Ligation된 산물을 형질 전환시킨 DH5α 균주들을 ampicillin, X-gal과 IPTG를 포함한 LB (Luria-Bertani) plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 그 후 배지에서 white colony를 선별하여 ampicillin이 들어있는 LB broth 배지에 접종하고 37°C 항온교반기에서 16시간 배양한 후, High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA는 제한효소 절단을 통하여 cloning의 성공 여부를 확인하였다.

4. 염기서열 결정 및 자료 분석

염기서열 결정은 cloning을 통해 얻은 재조합 plasmid DNA를 sequencing 전문업체에 의뢰하여 수행하였으며 sequencing primer는 T7과 T3를 사용하였다. 이들 염기서열의 정렬을 위하여 DNAssist version 2.2 (Pattern and Graves, 2000) 프로그램을 이용하였으며, 염기조성, 염기치환 양상 및 codon usage를 알아보기 위하여 MEGA version 3.0 (Kumar *et al*., 2004) 프로그램을 사용하였다. 그리고, 각 codon 위치에서 Kimura-2 parameter 방법에 의하여 계산한 distance values에 대하여 염기전위 (transition) 변이와 염기전환 (transversion) 변이의 개수를 plotting함으로써 포화도 (level of saturation)를 추정하였다. 왜냐하면 계통진화분석 시 한 개의 염기에서 두 번 이상의 돌연변이가 일어남으로써 생기는 포화 현상은 분석 오류 유발할 수 있기 때문이다 (Nei and Kumar, 2000).

계통유전학적인 분석은 maximum parsimony, distance, maximum likelihood method로 실시하였다. Maximum parsimony method (Fitch, 1971; MP)을 이용한 분석과 maximum likelihood method (Felsenstein, 1985; ML)를 통한 분석은 프로그램 PAUP version 4.0 (Swofford, 1998)을 사용하였다. Distance tree는 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987; NJ)과 minimum evolution (ME)의 tree-building algorithm으로 작성되었다. NJ 방법과 ML 방법을 이용한 분석은 MODELTEST Version 3.06 (Posada and Crandall, 1998) 프로그램을 사용하여 분석 자료에 가장 적합한 진화모델을 선택하여 실시하였다. 그리고, ME 방법에 의한 분석 시에는 Log Det/paralinear distance를 사용하였다. 계통수의 극성을 결정하기 위한 참조분류군 (outgroup)으로 자가사리와 같이 메기목 (Order Siluriformes), 퉁가리과 (Family Amblycipitidae)에 속하며 형태적으로 그리고 유전적으로 확연한 차이를 보이는 어류인 퉁사리 (*L. obesus*)와 퉁가리 (*L. andersoni*)를 사용하였다. MP, ME, NJ 방법을 이용한 분석 결과 계통수에 생성된 각각의 internal node에 대한 신뢰성을 확인하기 위하여 100,000회의 bootstrapping 통계검증 (Felsenstein, 1985)을 수행하였다. ML 방법에 의한 분석 시 likelihood 조건들은 MODELTEST 결과에서 얻은 자료들을 사용하였다. 즉 염기조성 (base composition)의 경우 A=0.2766, C=0.3138, G=0.1396, T=0.2700을 사용하였으며, estimated transition/transversion 비율과 함께 HYK85+G 진화모델을 사용하여 실시하였다.

결 과

자가사리의 지역별 개체군의 유전적인 다형을 알아보기 위하여 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자 서열을 조사한 결과, 다른 메기목 어류에서와 같이 cytochrome *b* 전체 유전자의 크기는 종결코돈(stop codon)으로써의 역할을 담당하는 것으로 예상되는 마지막 염기(T)를 포함하여 1,138 bp였으며 다중 정렬된 염기서열로부터의 DNA 다형의 정도는 Fig. 3에서 볼 수 있다. 이는 대부분의 경골어류의 cytochrome *b* 유전자가 1,141 bp인 것과 비교할 때 시작코돈(start codon)에서부터 11번째에서 13번째 사이에 나타난 3개의 염기결손 때문이었으며 시작코돈 ATG으로 시작하여 예상 종결코돈 TAA를 가지고 있어서 특징적인 차이는 나타내지 않았다. 계통진화적 염기서열 분석에서 전체 1,138 bp의 염기는 826개의

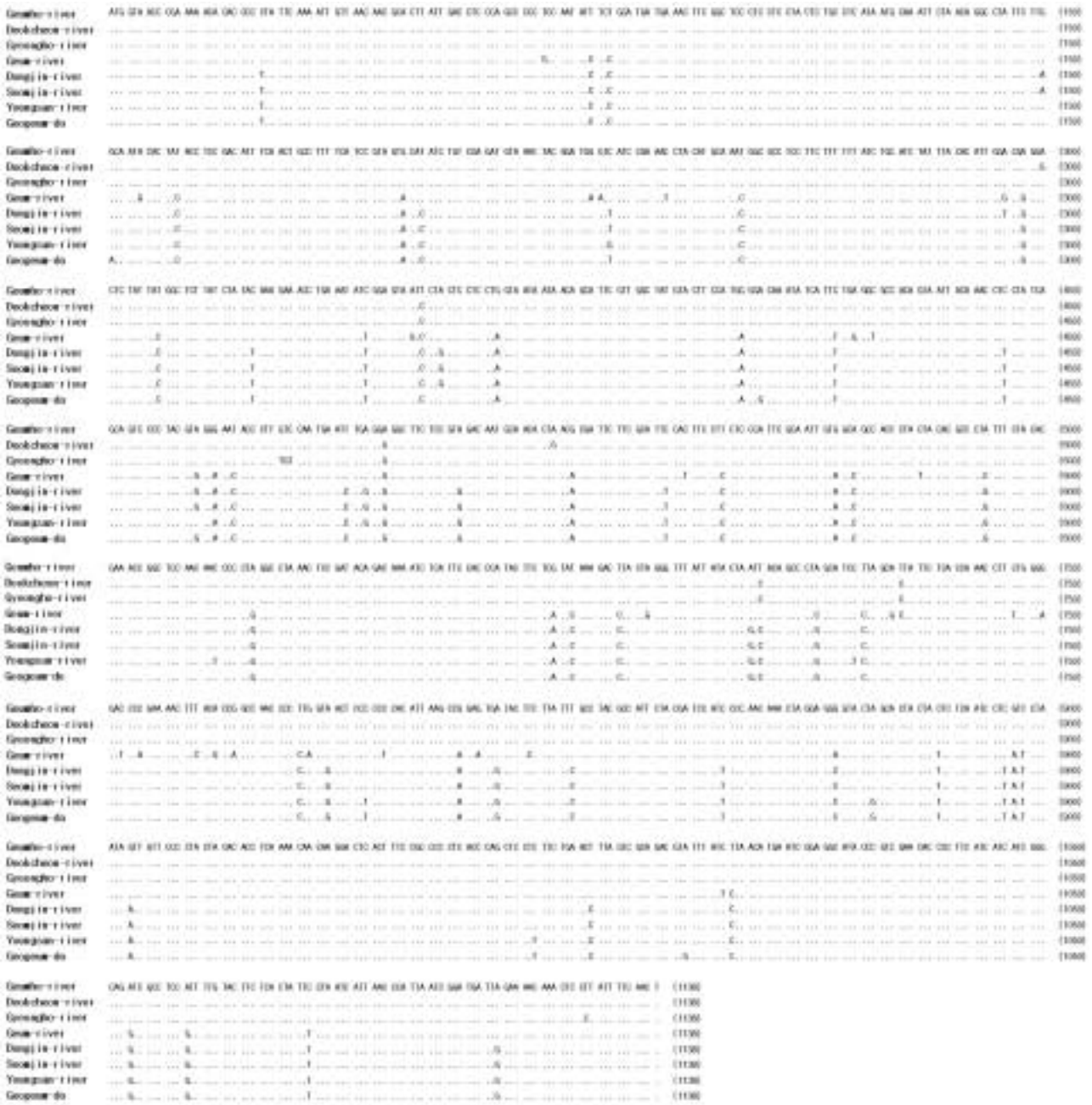

Fig. 3. The sequence alignment of mitochondrial cytochrome *b* genes of *L. mediadiposalis*. Dot (·) indicates identical bases.

Table 2. Base composition observed in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *L. mediadiposalis* collected from 8 different localities

Group (river)	Sampling locality	Codon composition (%)															
		All codon				1st codon				2nd codon				3rd codon			
		T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G	T	C	A	G
Nakdong	Geumho-river	27.7	30.7	27.6	14.1	25.0	26.3	25.3	23.4	42.7	24.3	20.6	12.4	15.3	41.4	36.9	6.3
	Deokcheon-river	27.7	30.9	27.3	14.3	24.7	26.6	25.3	23.4	42.7	24.3	20.6	12.4	14.8	42.0	36.1	7.1
	Gyeongho-river	27.4	30.9	27.5	14.1	25.0	26.6	25.3	23.2	42.2	24.5	20.6	12.7	15.0	41.7	36.7	6.6
Geum	Geum-river	27.3	31.1	27.7	13.9	24.2	26.8	25.0	23.9	42.5	24.5	20.6	12.4	15.3	42.0	37.5	5.3
Seomjin	Dongjin-river	27.2	31.4	27.1	14.3	24.5	26.8	25.0	23.7	42.7	24.3	20.6	12.4	14.5	43.0	35.6	6.9
	Seomjin-river	27.2	31.4	27.2	14.3	24.5	26.8	25.0	23.7	42.7	24.3	20.6	12.4	14.2	43.0	35.9	6.9
	Youngsan-river	27.4	31.0	27.1	14.5	24.5	26.8	25.0	23.7	42.7	24.3	20.6	12.4	15.0	42.0	35.6	7.4
	Geogeum-river	27.3	31.2	27.1	14.4	24.5	26.8	25.3	23.4	42.7	24.3	20.6	12.4	14.8	42.5	35.4	7.4
	Mean	27.4	31.1	27.3	14.2	24.6	26.7	25.1	23.6	42.6	24.3	20.6	12.4	14.9	42.2	36.2	6.7

Table 3. Comparison of transition vs. transversion mutations observed from the 10 pairs of nucleotides between mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences of *L. mediadiposalis*

Codon position	Transitionsal pairs			Transversional pairs				
	TC	AG	Total	TA	TG	CA	CG	Total
First	4	4	8	0	0	0	0	0
Second	1	0	1	0	0	0	0	0
Third	16	15	31	0	0	1	1	2
All	21	19	40	0	0	1	1	2

보존영역(conserved site)과 312개의 변이영역(variable site)으로 구성되었고, 변이영역 중 167개의 parsimony information site를 포함하고 있었다. Table 2은 자가사리의 염기조성을 나타낸 것으로써, 자가사리의 염기조성은 전체적으로 C함량이 가장 높은 30.9%가 나타났고 G함량은 가장 낮은 값인 14.2%를 보였으며 T와 A함량은 각각 27.5%로써 같은 값을 보였다. 그러나 지역별 개체군사이에는 염기조성에 있어서 큰 차이는 관찰되지 않았다. 그리고 유전자 내 염기전위 변이와 염기전환 변이의 양상은 Table 3에 나타낸 바와 같다. 첫 번째 코돈위치에서는 염기전환 변이는 없이 염기전위 변이만 8군데에서 일어났으며 T⇔C와 A⇔G 사이의 돌연변이가 각각 4군데에서 일어나서 1 : 1의 비율을 보였다. 그리고 두 번째 코돈위치에서도 염기전환 변이 없이 T⇔C 사이에 일어난 염기전위 돌연변이만 한군데에서 일어나 가장 낮은 빈도를 보였다. 세 번째 코돈에서는 T⇔C와 A⇔G 사이의 염기전위 돌연변이가 각각 16군데와 15군데에서 일어나서 거의 1 : 1의 비율을 보였으며 다른 코돈에 비해서 훨씬 높은 빈도를 보였다. 반면에 C⇔A 사이와 C⇔G 사이에 염기전환 돌연변이가 각각 한군데에서 일어나서 코돈위치 내에서는 상대적으로 낮은 빈도를 보였으나 염기전환 돌연변이는 세 번째 코돈위치에 처음으로 나타났다.

자가사리 지역개체군 내에서 개체사이에서 나타난 유전적 다형은 0～1 bp로써 거의 차이를 보이지 않았으며 자가사리 지역개체군 사이의 유전적인 다형을 *p*-distance와 염기서열 차이로 나타낸 결과는 Table 4와 같다. 섬진강, 동진강, 영산강 및 거금도에서 채집된 개체군 사이의 염기서열 차이는 1～10 bp였고 *p*-distance는 0.001～0.009였다. 낙동강 수계인 금호강, 경호강 및 덕천강 개체군 사이의 염기서열 차이는 6～8 bp로써 *p*-distance는 0.005～0.007을 보였다. 이와 같이 지리적으로 가까이 위치한 동일 수계 내지는 가까이 위치하는 지역 개체군 사이의 염기서열 차이와는 달리 금강과 거금도 사이의 염기서열 차이는 53 bp였고 *p*-distance는 0.047을 보였고, 거금도와 경호강 사이에 염기서열 차이는 63 bp였으며 *p*-distance는 0.055을 보였다. 낙동강 수계인 경호강과 금강 사이의 염기서열 차이는 65 bp였고 *p*-distance는 0.057를 보여서 조사대상 지역 개체군 간에 최대의 염기서열 차이를 나타내었다.

계통진화관계의 추론에 있어서 단일 염기 부위에 숨겨진 다중 치환은 오류를 일으킬 수 있으므로 계통학적 분석시 포화현상을 고려하여 한다(Meyer, 1993). 이 연구에서 포화현상 분석 결과, 참조분류군을 포함시켰을 경우에도 포화현상은 거의 나타나지 않았다(Fig. 4). 따라서 계통진화적인 연관관계 분석을 위한 계통수 작성시 전체 코돈을 사용하였다.

자가사리인 지역개체군 분화 역사를 추정하기 위하여 사용한 8개의 내군(ingroup)과 참조분류군인 어류 2종

Table 4. *p*-distance (lower-left) and nucleotide differences (upper-right) among *L. mediadiposalis* populations

Local population	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Geumho-river		6	8	63	59	58	61	61
2. Deokcheon-river	0.005		6	63	59	58	61	61
3. Gyeongho-river	0.007	0.005		65	61	60	63	63
4. Geum-river	0.055	0.055	0.057		50	50	55	53
5. Dongjin-river	0.052	0.052	0.054	0.044		1	9	10
6. Seomjin-river	0.051	0.051	0.053	0.044	0.001		8	9
7. Youngsan-river	0.054	0.054	0.055	0.048	0.008	0.007		9
8. Geogeum-do	0.054	0.054	0.055	0.047	0.009	0.008	0.008	

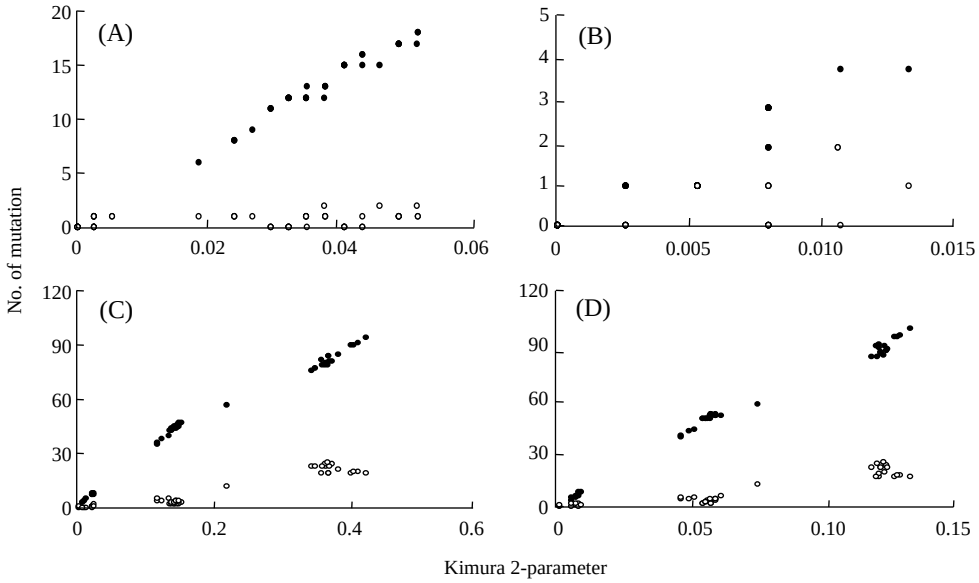

Fig. 4. Relationships of the observed number of transitions (closed circles) and transversions (open circle) for all pairs of sequence to the distance (Kimura 2-parameter) observed at the first (A), the second (B), the third (C), and all codon positions (D).

을 포함한 전체 10개의 분류군으로부터 수집한 cytochrome *b* 유전자 염기 서열을 대상으로 MP (Maximum Parsimony), NJ (Neighbor-Joining), ME (Minimum Evolution), 그리고 ML (Maximum Likelihood) 방법으로 계통수를 작성하여 비교, 분석하였다. 먼저, 선정한 참조분류군의 적정성을 조사하기 위하여 참조분류군 option을 주지 않고 근연 메기류어류 자료(data not shown)를 포함한 예비 분석결과, 참조분류군어류인 퉁사리와 퉁가리가 자가사리 지역 개체군들과 완전히 분리되어 참조분류군은 내군에 속하지 않아야 한다는 참조분류군의 기준에 합당한 것으로 나타났다.

네가지 서로 다른 방법을 이용하여 작성된 계통수는 모두 동일한 계통수 분지양상(tree topology)을 보여서 결과에 높은 신뢰성을 나타내었다. 또한 작성된 계통수에 따르면 조상형 자가사리 개체군에서 먼저 금호강, 덕천강, 경호강 개체군으로 대표되는 낙동강 집단이 분화되었으며 그 후 동진강, 섬진강, 영산강, 거금도 개체군으로 대표되는 섬진강 집단과 금강 개체군으로 대표되는 금강 집단으로 분화되었을 것으로 추정되며 이러한 관계는 89～100%의 bootstrap값으로 강하게 뒷받침되고 있다(Fig. 5).

고 찰

우리나라의 각 하천에 분포하고 있는 현재의 담수 어류는 신생대 제3기 상신세(上新世)와 신생대 제4기를 통한 몇 차례의 빙하기에 해수면이 크게 낮아져 형성되었던 고황하수계(Pale-Hwang Ho) 및 고아무르수계(Paleo-Amur River)를 통하여 중국계, 북방계 및 남방계

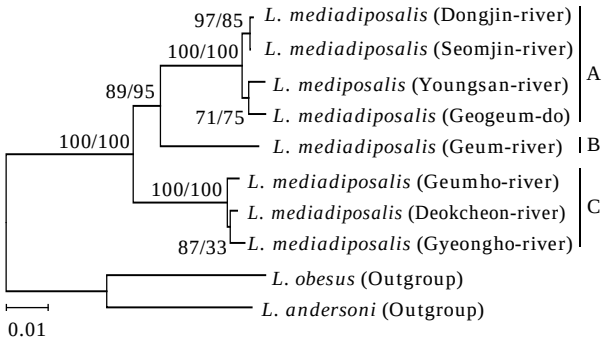

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed by neighbor-joning (NJ) method. The numbers at the left side of slash were bootstrap values based on NJ method and the numbers at the right side were the values based on maximum parsimony method. A, Seomjin-river group; B, Geum-river group; C, Nakdong-river group.

어류가 각 하천으로 침투하였고 해진기(海進基)의 해수면 상승으로 각 하천별로 격리되어 종 분화를 거치면서 형성된 결과이며 이 시기에 다수의 한국 고유종으로 분화된 것으로 보고되고 있지만 (Lindberg, 1972; Son, 1995) 아직까지 종에 따른 정확한 분화 시간과 경로에 대해서는 밝혀지지 않고 있다. 우리나라 담수어류상과 관련하여 Mori (1936)는 극동지방을 연해주지역, Amur 지역 및 한국지역으로 구분하였고 한국지역은 다시 서한아지역, 중한아지역, 동한아지역 및 남한아지역으로 세분하였다. 그 후로 담수어류 분포구계 (distribution map)와 관련된 연구는 Choi (1973)와 Jeon (1980, 1983, 1986) 등에 의해 지속적으로 수행되어 왔으나 우리나라 담수어류의 정착시기와 분화과정 등에 관한 계통분류학적인 연구는 소수에 불과한 실정이다.

우리나라 담수어류의 종내 집단의 분포양상과 관련하여 Toshio *et al.* (1993)은 끄리 (*Opsarichthys uncirostris amurensis*)의 개체군 집단에 관한 연구에서 영산강, 섬진강, 한강 집단이 가깝게 묶여서 금강 집단과 구분된다고 보고하였고, Masaru *et al.* (1997)은 송사리 (*Orizias latipes*)의 개체군 집단은 서한집단과 동한집단의 2개 집단으로 구분되는 것으로 보고하였다. 그리고 Kim (2004)은 우리나라 고유종인 꺽지 (*Coreoperca herzi*)의 조상형이 한강집단과 금강집단으로 먼저 분화 한 후 낙동강수계와 섬진강 수계의 집단으로 분화한 것으로 추정하였다. 이렇게 개체군 집단의 분포 양상은 종에 따라 다소의 차이를 보였으며 이는 어종별로 그 분화시기와 서식 및 번식 생태 등을 달리하기 때문으로 생각된다.

한편, 자가사리의 분포와 관련하여 Son (1987)은 이들의 체형, 체색 (반문) 및 동위효소분석 등의 결과를 토대로 낙동강, 섬진강 및 금강의 세 집단으로 구분하였다. 이들 중 낙동강 자가사리 집단은 거제도의 북동부 하천들과 그 동쪽인 육지의 남해 및 동해 유입하는 하천에 분포하는 반면, 섬진강 자가사리 집단은 거제도의 서남부와 남해도, 탐진강 그리고 섬진강에 분포하며, 금강 자가사리는 삼산천으로부터 금강에 이르는 서해 유입 하천에 분포하고 있다고 보고하였다 (Son and Song, 1998). 이 연구의 결과에서도 우리나라 자가사리 개체군은 크게 3개의 집단으로 구분되었다. 즉 조상형 자가사리 개체군에서 먼저 낙동강 집단 (금호강, 덕천강, 경호강 개체군)이 분화되었으며 그 후 섬진강 집단 (동진강, 섬진강, 영산강, 거금도 개체군)과 금강 집단으로 분화되었을 것으로 추정되어 Son (1987)의 결과와 유사하였다.

Cytochrome *b* 유전자를 대상으로 종내 개체군 사이의 유전적 차이에 관한 연구는 일부 어종을 대상으로 수행된 바 있다. 예를 들면 우리나라의 고유종인 꺽지에 대한 연구에서 지역별 개체군 집단간 염기서열 차이는 최대 6.9～12.1%로 나타났으며 (Kim, 2004), 중국에 서식하고 있는 피라미 (*Zacco platypus*)는 지역개체군 집단간에 4.2～12.6%의 염기서열 차이를 보인다고 보고된 바 있다 (Perdices *et al.*, 2004). 그리고 Yang and Son (1986)은 자가사리를 대상으로 하여 집단간 유전학적 차이를 알아보기 위한 동위효소분석에서 금강 집단과 낙동강 집단 간의 유전적 차이가 다른 집단간 보다 상대적으로 큰 것으로 보고하였다. Cytochrome *b* 유전자를 이용한 이 연구 결과에서도 자가사리 개체군 집단 사이의 염기서열 차이는 금강 집단과 섬진강 집단 사이의 50～53 bp (4.4～4.7%)에 비해서 금강 집단과 낙동강 집단 사이의 차이는 63～65 bp (5.5～5.7%), 그리고 낙동강 집단과 섬진강 집단 사이에서 58～63 bp (5.1～5.5%)를 나타내어 금강 집단과 낙동강 집단 사이에서 가장 유전적인 차이가 높은 것으로 나타났다. 한편, 섬진강 집단에 속하는 동진강 자가사리와 섬진강 자가사리 간의 염기서열 차이는 단지 1 bp로 가장 적게 나타났는데 이는 유역변경식 섬진강댐에 의해 동진강으로 강물이 유입되어 섬진강에 서식하는 자가사리가 동진강으로 유입된 결과인 것으로 생각된다.

어류의 분화시기를 추정하기 위하여 여러 연구자는 분자시계 (molecular clock)의 개념을 도입하여 분화시간을 계산하였다 (Cantatore *et al.*, 1994; Orti *et al.*, 1994; Sota *et al.*, 2005). Cantatore *et al.* (1994)는 cytochrome *b* 서열을 이용한 연구에서 0.8% 염기차이를 백만년으로 계산하였으며, Orti *et al.* (1994)는 2.8%당 백만년으로 계산하였다. 이를 토대로 하여 자가사리 지역개체군 집단

의 분화시기를 계산하면 지금으로 최소 약 200만년에서 최대 약 700만년전에 낙동강집단이 먼저 분화되었으며 그 후 금강 집단과 섬진강 집단의 최소 약 160만년에서 최대 약 560만년전에 분화된 것으로 추정된다. 이 추정된 자가사리의 분화 시기는 Lindberg (1972)에 의해 보고된 한국 고유종 분화 시기와 많은 차이를 보였다. 물론 어종에 따라 cytochrome *b* 유전자의 진화속도에 차이를 가질 수 있기 때문에 명확한 분화 시기는 추정하기 어렵지만 최소한 빙하기 이전 시기에 3개의 지역별 개체군의 분화가 이루어진 것으로 추정된다.

끝으로, 이 연구결과 우리나라 고유종인 자가사리는 3개의 지역개체군 집단으로 구분할 수 있으며 이들은 유전적으로 4.4～5.7%의 분명한 차이를 보이고 있기 때문에 자가사리 개체군의 보전과 관리에 있어서 유전적인 또는 진화적인 요인이 반드시 고려되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

자가사리 지역개체군의 분자계통 진화적 유연관계를 알아보기 위하여 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자 서열을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 우리나라 자가사리 개체군은 크게 3개의 집단으로 구분되었다. 즉 조상형 자가사리 개체군에서 먼저 낙동강 집단(금호강, 덕천강, 경호강 개체군)이 분화되었으며 그 후 섬진강 집단(동진강, 섬진강, 영산강, 거금도 개체군)과 금강 집단으로 분화되었을 것으로 추정할 수 있었다. 그리고 자가사리 개체군 집단 사이의 염기서열 차이는 금강집단과 섬진강집단 사이의 50～53 bp (4.4～4.7%)에 비해서 금강 집단과 낙동강 집단 사이의 차이는 63～65 bp (5.5～5.7%), 그리고 낙동강 집단과 섬진강 집단 사이에서 58～63 bp (5.1～5.5%)를 나타내어서 금강 집단과 낙동강 집단 사이에서 가장 유전적인 차이가 높은 것으로 나타났다. 이러한 개체군 집단의 분화양상과 유전적인 다형은 수계형성과 같은 지리적 변화 때문에 생기는 오랫동안의 유전적 격리에 의한 것으로 분화시기 추정결과 이들 개체군 집단들의 격리 시기는 적어도 빙하기 이전으로 거슬러 올라가는 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2006년도 친환경해양산업뉴프론티어전문인력양성사업에 의하여 지원되었음.

인 용 문 헌

Cantatore, P., M. Roberi, G. Pesole, A. Ludovico, F. Milella, M.N. Gadaleta and C. Saccone. 1994. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than mammals. J. Mol. Evol., 39 : 589～597.

Choi, K.C. 1973. On the geographical distribution of fresh water fishes south of DMZ in Korea. Korean J. Lim., 6 : 29～36.

Esposti, M.D., S.D. Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Oatarnello and A. Meyer. 1993. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. Biochim. Biophys. Acta., 1143 : 243～271.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39(4) : 783～791.

Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topolgy. Syst. Zool., 20 : 406～416.

Jeon, S.R. 1986. Studies on the key and distribution of serranid peripheral fresh-water fishes from Korea. Ph.D. Thesis SMWU, 18 : 335～355.

Jeon, S.R. 1983. Studies on the distribution and key of Cobitididae fishes (Cypriniformes) from Korea. Coll. Thesis SMWU, 11 : 289～321.

Jeon, S.R. 1980. Studies on the distribution of fresh-water fishes from Korea. Ph.D. Thesis, Choong-Ang Univ., 85pp.

Johns, G.C. and J.C. Avise. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrate from the mitochondrial cytochrome *b* gene. Mol. Biol. Evo., 15(11) : 1481～1490.

Kim, I.S., C. Youn, C.L. Lee, Y.J. Lee. B.J. Kim and J.H. Kim. 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyo-Hak publishing Co., Ltd., pp. 417～418.

Kim, M.J. 2004. Origin and Biogeography of the Korean perch (*Coreoperca herzi*) and its relatives based on phylogenetic approach with cytochrome *b* DNA sequences. M.S. Thesis, Cheju Natl. Univ., 39pp.

Kocher, T.D. and C.A. Stepien. 1997. Molecular systematics of fishes. Academic Press New York, 314pp.

Koh, B.S. and C.B. Song. 2004. Molecular phylogeny of Syngnathiformes fishes inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences. J. Kor. Fish. Soc., 37(5) : 405～413.

Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and

sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5(2) : 150～163.

Lindberg, G. 1972. 現世淡水魚類の起源. 東海大學出版社, 336pp.

Masaru, M., T. Yamagishi, M. Sakaizumi and S.R. Joen. 1997. Mitochondrial DNA variation in the Korean wild population of medaka, *Oryzias latipes*. Korean J. Limn., 2 : 119～128.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp. 1～38. *In* Molecular biology frontiers, biochemistry and molecular biology of fishes. Vol. 2. Hochachka, P.W. and T.P. Mommsen eds. Elsevier Sci. Pub. AM, 470pp.

Min, M.S. and S.Y. Yang. 1986. Classification, distribution and geographic variation of tow species of the genus *Moroco* in Korea. Korean J. Syst. Zool., 2 : 63～78.

Mori, T. 1936. Studies on the geographical distribution of fresh water fishes in Korea. Bull. Biogeogr. Soc. Japan, 6 : 35～61.

Nei, M. and S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press. New York, 333pp.

Nelson, J.S. 1994. Fishes of the world (3rd ed). John Wiley & Sons, New York, 600pp.

Orti, G., M.A. Bell, T.E. Reimchen and A. Meyer. 1994. Global survey of mitochondrial DNA sequences in the threespine stickleback: evidence for recent migrations. Evolution, 48 : 608～622.

Perdices, A., C. Cunha and M.M. Coelho. 2004. Phylogenetic of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome *b* sequences. Mol. Phylo. Evol., 31 : 192～203.

Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, 14(9) : 817～818.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4(4) : 406～425.

Son, Y.M. 1995. On the piscigeography of the freshwater of islands in Korea. Proceeding of '95 ichthyofauna and characteristics of freshwater ecosystem in Korea. pp. 51～62. (in Korean).

Son, Y.M. 1987. Systematic studies on the torrent catfish, family Amblycipitidae (Pisces: Siluriformes) from Korea. Ph.D. Thesis, Choong-Ang Univ., 81pp.

Son, Y.M. and H.B. Song. 1998. Freshwater fish fauna and distribution in Kojedo, Korea. Korean J. Ichthyol., 10(1) : 87～97.

Son, Y.M. and I.Y. Choo. 1988. Ecological studies of catfish, genus *Liobagrus* from Korea. Korean Journal of Limnology, 21(4) : 243～251.

Son, Y.M. and J.H. Lee. 1989. Karyotypes of genus *Liobagrus* (Pisces: Amblycipitidae) in Korea. Korean J. Ichthyol., 1(1, 2) : 64～72.

Song, C.B., T.N. Near and L.M. Page. 1998. Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence data. Mol. Phylo. Evol., 10(3) : 343～353.

Sota, T., M. Takahiko, S. Toshihiko, S. Hitoshi and Y. Kenichiro. 2005. Genetic differentiation of the Gobies *Gymnogobius castaneus* and *G. taranetizi* in the region surrounding the sea of Japan as inferred from a mitochondrial gene genealogy. Zoological Science, 22 : 87～93.

Swofford, D.L. 1998. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b8, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Toshio, O., S.R. Jeon and T. Kobayashi. 1993. Genetic variation and population structure in Korean piscivorous chub, *Opsariichthys bidens* from Korea. Korean J. Basic. Sci., 7 : 1～10.

Yang, S.Y. and Y.M. Son. 1986. Genetic and Morphological Variation of the Genus *Liobagrus* in Korea. Korean J. Syst. Zool., 2(2) : 1～12.

Zhao, Y., J. Lan and C. Zhang. 2004. A new species of amblycipitid catfish, *Xiurenbagrus gigas* (Teleostei: Siluriformes), from Guangxi, China. Ichthyol. Res., 51(3) : 228～232.

Received : November 14, 2006
Accepted : November 28, 2006