J. Aquaculture
Vol. 21(3), 196-200, 2008

한국양식학회지
Journal of Aquaculture
©Korean Aquaculture Society

AFLP 분석에 의한 어름치 *Hemibarbus mylodon*의 유전 다양성

이윤아, 윤영은, 남윤권[1], 방인철*
순천향대학교 해양생명공학과, [1]부경대학교 양식학과

Genetic Diversity of Endangered Fish *Hemibarbus mylodon* (Cyprinidae) Assessed by AFLP

Yoon-A Lee, Young-Eun Yun, Yoon Kwon Nam[1] and In-Chul Bang*
Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea
[1]Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Korean spotted barbel *Hemibarbus mylodon*, is an endangered and endemic freshwater species in the Korean peninsula. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to analyze the genetic diversity and population genetic structure of three populations (Bukhan, Namhan and Imjin-river). Fifteen AFLP primer pairs produced 795 products of which 135 were polymorphic (17%). Percentages of polymorphic bands were similar among the three populations, with accounting 11.9%, 11.1%, and 13.4% for Bukhan, Namhan and Imjin-river populations, respectively. An average genetic similarity among the three populations was 0.969. The average heterozygosity (0.033-0.040) and genetic diversity (0.036-0.043) were significantly low. Pairwise distance and fixation index analyses of three populations also suggested quite a low genetic differentiation one another. These results would provide a fundamental baseline data to develop the effective strategy for the management and restoration of this endangered fish species.

Keywords: Endangered species, *Hemibarbus mylodon*, AFLP, Genetic diversity, Genetic differentiation

서 론

우리나라의 한강, 임진강 및 금강 상류에만 분포하는 고유어종인 어름치 *Hemibarbus mylodon*는 천연기념물 제 238 및 259호로 지정하여 보호하고 있다. 그러나 1980년 이후에는 금강 수계에서 어름치를 직접 확인한 예가 없어 금강의 어름치는 사실상 절멸된 것으로 추정하고 있으며, 전국적으로도 개체군의 크기가 점점 감소되어 멸종위기에 있다(Kim, 1997). 환경 변화 및 생태계 파괴와 같은 직접적인 개체군의 감소현상과 이에 따른 산란에 참여하는 개체군의 수가 줄어 근친교배가 증가하게 되고 열성 유전자의 급속한 발현 현상에 따른 유전 다양성의 감소는 멸종의 원인으로 작용할 수 있다(Frankham et al., 2002; Taylor, 2003). 따라서 멸종 위기종의 인공종묘방류사업은 종 보존 및 자원 조성을 위해 꼭 필요하지만 우선적으로 방류 대상종의 유전적 다양성에 관한 정보의 수집과 다양성이 높은 집단을 선별하여 종묘생산 및 방류에 의한 복원 후 집단의 유전적 다양성 변화 추정 등의 연구가 수행되어야 한다(Kawamura et al., 2007; Kim et al., 2007).

*Corresponding author: incbang@sch.ac.kr

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 기술은 유전적 유사도가 가까운 종에서도 유전적 변이와 다형성을 나타내기 때문에 종 특이적인 marker 검출과 유전 다양성 분석에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다(Roa et al., 1997; Blears et al., 1998). 이는 어류의 집단 유전학 연구에 있어 유용한 방법이며 (Liu et al., 2003), 분석하고자 하는 재료의 수가 적은 반면 많은 수의 유전적 변이를 분석하고자 할 때 유용한 방법이다(Knorr et al., 1999). 특히 많은 개체수의 포획이 어려운 멸종 위기종의 분석에 있어 효과적으로 이용되고 있다(Hua Yue et al., 2004; Chen et al., 2005; Lee et al., 2008). 뿐만 아니라, AFLP 기술의 경우 microsatellite 분석과 비교 시 지리적으로 다른 집단의 개체확인에 보다 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Sønstebø et al., 2007).

최근 들어 어름치의 복원 연구의 일환으로서 유전체 정보 및 유전 다양성 연구 등이 수행된 바 있어 EST 탐색(Bang et al., 2007a), 중금속 노출에 따른 스트레스 관련 유전자 발현(Bang et al., 2007b; Cho et al., 2007), β-cytoskeletal actins 유전자의 특징과 분자계통(Kim et al., 2008) 및 microsatellite 분리(Kim et al., 2007) 등이 수행된 바 있으나, 그 중요성에도 불구하고 어름치의 집단간 유전 다양성 및 유전적 구조 분석에 관한 연

구는 보고된 바 없다. 이에 본 연구는 현재 멸종위기에 처해 있는 어름치의 장내외 보존 대책을 수립하기 위한 기초 연구로, 어름치가 서식하고 있는 북한강, 남한강 그리고 임진강 수계의 3집단을 대상으로 AFLP 지문분석을 통하여 유전 다양성 및 집단구조에 관한 정보를 수집하고자 하였다.

재료 및 방법

실험어의 채집 및 genomic DNA의 분리

본 연구에 사용한 어름치는 문화재청의 문화재 훼손 허가를 취득한 후 북한강(강원도 인제군 내린천), 임진강(경기도 연천군 임진강), 남한강(강원도 정선군 조양강)에서 2004년 3월부터 2004년 8월에 걸쳐 채집한 개체들로서 수계별로 15개체를 분석에 사용하였다. Genomic DNA는 꼬리지느러미 일부를 절단하여 Asahida et al. (1996)의 방법에 따라 분리하고 흡광광도계 측정과 0.7% agarose gel 전기영동을 통해서 DNA의 양과 질을 확인한 후 실험에 이용하였다.

AFLP 지문 분석

AFLP 분석은 Vos et al. (1995)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. Genomic DNA 500 ng을 *Eco*RI/*Mse*I (Promega, USA)제한효소 조합을 이용하여 절단시켰다. 절단 산물을 순수 분리한 후 *Eco*RI/*Mse*I adapter를 첨가하여 ligation 반응을 실시하고 1차 PCR을 수행하였다. 반응액을 1×TE로 50배 희석하여 *Eco*RI /*Mse*I selective primer를 이용하여 2차 PCR 을 수행하고 최종 PCR 반응액을 5% denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음, silver staining kit (Promega, USA)로 염색하여 관찰하였다. PCR 증폭을 포함한 모든 반응 조건은 제조사들의 권고 방법에 의거하여 실시하였다.

유전 다양성 분석 및 통계처리

Gel 상에서 각 위치에 확인된 DNA band의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 matrix code를 작성한 후, NTSYS 프로그램(Rohlf, 1992)을 사용하여 각 개체간의 유사도 matrix를 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means)로 분석한 후 각각을 군집화하고 이를 토대로 dendrogram를 작성하였다. 각 집단별의 유전적 유사도는 Nei and Li (1979)의 공식을 적용하여 계산하였으며, TFPGA 프로그램을 사용하여(Miller, 1997) 어름치 각 집단별 및 전체의 평균 이형접합율과 평균 유전 다양성 수준을 구하였다. 또한 상기 3개 집단간 유전적 거리를 구하고, 각 집단간의 Hardy-Weinberg 평형 (HWE)을 검정하기 위하여 유전적 분화도(fixation index)를 분석하였다. 유전적 분화도 수치에 대한 유전적 검정은 무작위 대립유전자 치환 과정을 10,000번 이상 반복하여 수행하였다. 이러한 작업은 모두 Arlequin 프로그램(ver. 2.000, Stefan et al., 2000)을 사용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

집단별 유전 다양성

어름치 3수계 집단 (북한강, 남한강, 임진강)의 유전 다양성을 분석하기 위하여 총 15개의 primer 쌍으로 AFLP를 수행한 결과(Fig. 1), 전체 밴드의 수는 북한강 773, 남한강 774그리고 임진강 772개로 나타났으며, 다형성 밴드 비율은 북한강 11.9%, 남한강 13.4% 임진강이 11.1%로 분석되어 남한강 집단이 높게 나타났으나 집단간 유의적 차이는 거의 없었다. 또한 집단 내 유전적 유사도는 0.962-0.971로 분석되어 역시 집단간 차이는 거의 없었으며, 전체 집단에 대한 어름치 평균 유사도는 0.969로 나타나 멸종위기 어류인 미호종개의 0.942보다 높은 결과를 보였고, 다형성 밴드 비율은 21.5-24.5% 보다 낮아(Lee et al., 2008) 유전 다양성이 매우 떨어지는 결과로 나타났다(Table 1).

어름치 집단별 평균 이형접합율은 0.03-0.04로 분석되었고, 평균 유전 다양성은 0.041로 나타나 멸종위기 어류인 미호종개의 평균 이형접합율 0.06-0.08, 유전 다양성 0.088보다 낮은 것으로 분석되었으며(Lee et al., 2008), 일반적으로 협소한 서식지를 가지는 어류는 다른 어류들에 비해 낮은 이형접합율을 보인다는 결과와 일치하였다(Salgueiro et al., 2002; Hanfling et al., 2004). Kim et al. (2007)은 어름치의 microsatellite 분석 결과 기대치 이형접합율이 0.19-0.94로 집단 내에서 유전자 흐름이 진행중인 것으로 보고하였다. 이는 microsatellite분석 결과

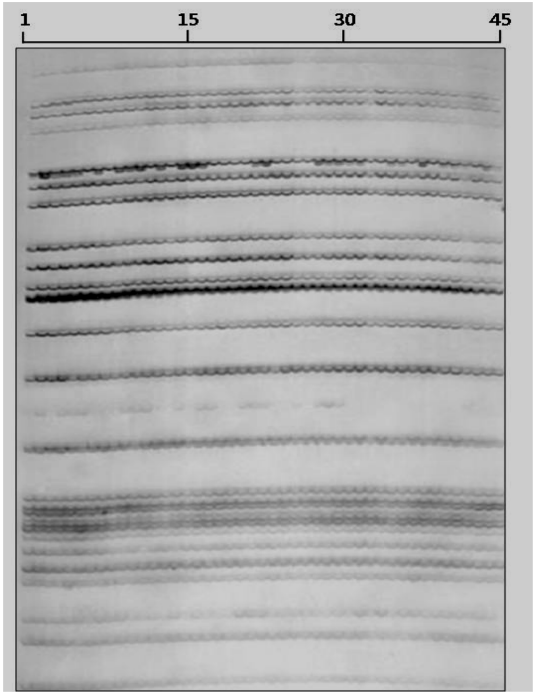

Fig. 1. Representative gel to show AFLP fingerprint patterns of three *Hemibarbus mylodon* populations generated with a primer combination of E/AGC-M/CAG. Lanes 1-15, Bukhan river population; lanes 16-30, Imjin river population; lanes 31-45, Namhan river population.

Table 1. Summary on the AFLP profiles of three *Hemibarbus mylodon* populations

Information of AFLP marker	Populations			Total
	Bukhan river	Namhan river	Imjin river	
Total no. of bands	773	774	772	795
No. of polymorphic bands	92	104	86	135
Polymorphism (%)	11.9	13.4	11.1	17.0
Average genetic similarity	0.971	0.962	0.971	0.969
Average heterozygosity	0.033	0.040	0.0350	0.040
Average genetic diversity*	0.036 ±0.019	0.043 ±0.022	0.037 ±0.020	0.041 ±0.020

*Mean±SD.

Table 2. Pairwise distance (above the diagonal) and fixation index (below the diagonal) among three populations of Hemibarbus mylodon based on the AFLP analysis

	Bukhan river	Namhan river	Imjin river
Bukhan river	-	0.005	0.007
Namhan river	0.062*	-	0.005
Imjin river	0.104*	0.039*	-

*P<0.01.

polymorphism, 이형접합율이 AFLP 분석 결과보다 높게 나타난다는 보고와 같은 양상을 나타내었다(Hua Yue et al., 2004; Sønstebø et al., 2007).

위와 같이 어름치는 유전 다양성이 매우 낮은 것으로 분석되어, 개체군 감소의 위험에 처한 집단에서 보여지는 병목현상의 증거로 낮은 수준의 유전 다양성을 가지게 된다는 보고와 일치하는 결과이며(Houlden et al., 1997), 이러한 유전적 병목현상을 밝히기 위해서는 더 많은 채집을 통한 분석이 필요할 것으로 판단되나, 추후 분석 시료 수에 따른 결과의 유의성 검토를 통해 추가 실험 여부를 결정하여야 할 것으로 판단된다.

집단간 유전적 구조

집단간 분화도(fixation index)값은 북한강과 임진강 사이가 0.104로 가장 높았고, 북한강과 남한강 사이가 0.062, 남한강과 임진강 사이가 0.039으로 나타나 모든 집단간에서 유의적인 차이를 보여(P<0.01) 유전적 분화가 진행되는 것으로 분석되었다(Table 2). 또한 집단간 분화도 값은 0.01-0.15으로 Wright (1978)의 제안에 따라 집단간 분화 수준이 낮거나 보통인 것으로 나타났다. 또한 집단간 유전적 거리는 북한강과 임진강 사이가 0.007, 북한강과 남한강 사이가 0.005 그리고 남한강과 임진강 사이가 0.005로 집단간 분화도와 같은 경향을 보이며 매우 가깝게 나타났다(Table 2). 환경의 변화와 남획 등으로 인해 멸종위기의 처해 있는 잉어과 어류인 *Gymnocypris przewalskii*의 경우 0.05-0.07사이의 집단간 유전적 거리를 보고하여 비교적 큰 차이를 보고한 바 있으며(Chen et al., 2005), 미호종개는 0.017-0.021로 집단간에 큰 차이는 없는 것으로 보고하여(Lee et al., 2008) 어름치의 경우에도 집단간의 차이가 작은 것으로 분석되었다.

개체간의 유사도 matrix에 따른 3집단 전체의 UPGMA dendrogram을 그린 결과(Fig. 2) 집단이 서로 구분되지 않아 뚜렷한 집단의 분화는 관찰되지 않았으나, 일부 집단의 개체들이 독립된 clade를 나타내고 있어 집단간 분화도 값과 유사한 경향을 보이며 유전적 분화가 진행되고 있음을 시사하였다(P<0.01).

Wood et al. (2007)은 환경변화에 따른 서식환경의 악화가 진행됨에 따라 집단의 감소에 따른 멸종의 위험을 보고한 바 있

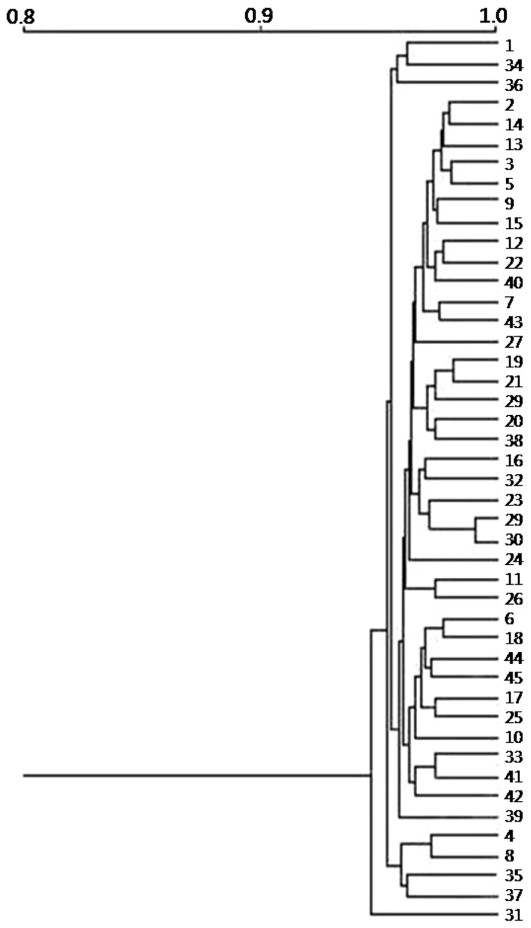

Fig. 2. A representative dendrogram showing the genetic relationships among three *Hemibarbus mylodon* populations based on genetic distance data. Dendrogram was constructed by the UPGMA clustering method. Lanes 1-15, Bukhan river population; lanes 16-30, Imjin river population; lanes 31-45, Namhan river population. It is note that no clear genetic differentiation among the three populations was observed.

다. 특히 개체수가 적은 집단에서 세대를 되풀이 하는 경우 유전적 부동과 근친교배에 의해 낮은 유전 다양성의 현상을 보이며, 현재 멸종 위험에 처해있는 종들은 유전적 부동 현상에 놓여있다고 보고한바 있다(Wilson et al., 2005). 현재 어름치 서식지의 개체수가 점점 감소하고 있으며, 어름치 서식처 중 하나였던 금강에서는 절멸된 것으로 추정되어 앞으로 어름치 종 전체의 멸종 가능성도 있는 것으로 판단되므로 이미 천연기념물로 지정하여 보호하고 있으나, 추후 멸종위기 야생동식물로 지정하는 등의 보다 체계적인 보호 대책이 마련되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

한국 고유종이며 멸종위기에 처해 있는 어름치 *Hemibarbus mylodon* 3집단 (북한강, 남한강, 임진강)의 유전적 다양성 및 집단의 유전적 구조를 분석하기 위하여 AFLP분석을 실시하였다. 총 15 primer 쌍을 이용한 3집단의 AFLP 분석에서 795개의 bands가 생성되었으며, 집단 내 다형 band의 출현 빈도는 3개 집단에서 북한강 11.9%, 남한강 11.1%, 임진강 13.4%로 유사하게 나타났고, 평균 유사도는 96.6%로 나타났다. 평균 이형 접합율(0.033-0.040)과 유전적 다양도(0.036-0.043)는 매우 낮은 값을 보였다. 3개의 집단의 Pairwise distance 및 pairwise fixation index 역시 매우 낮은 값을 나타내어 본 연구에서 분석한 어름치 3개 집단은 유전적으로 매우 밀접한 근연관계를 나타내었다. 이러한 결과는 추후 본 종의 복원 및 관리에 필요한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업 연구개발과제의 지원에 의하여 이루어졌음. 또한 어름치 집단의 채집을 도와주신 국립수산과학원 중부내수면연구소 이완옥 박사님과 김영주, 김흥구 사장님께 감사드립니다.

참고문헌

Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama, 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. Fish. Sci., 62, 727–730.

Bang, I. C., Y. H. Lim, Y. S. Cho, S. Y. Lee and Y. K. Nam, 2007a. Survey of expressed sequence tags from tissue-specific cDNA libraries in *Hemibarbus mylodon*, an endangered fish species. J. Aquacult., 20, 248–254.

Bang, I. C., Y. S. Cho, I. R. Lee and Y. K. Nam, 2007b. Effects of acute metal exposures on the viability and mRNA expression of metallothionein in *Hemibarbus mylodon* fry. Korean J. Limnol., 40, 489–494.

Blears, M. J., S. A. De Grandis, H. Lee and J. T. Trevors, 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 21, 99-114.

Chen, D., C. Zhang, C. Lu, Y. Chang and J. Chang, 2005. Amplified fragment length polymorphism analysis to identify the genetic structure of the *Gymnocypris przewalskii* (Kessler, 1987) population from the Qinghai Basin, China. J. Appl. Ichthyol., 21, 178–183.

Cho, Y. S., S. Y. Lee, K. -Y. Kim, I. C. Bang, D. S. Kim and Y. K. Nam, 2007. Gene structure and expression of metallothionein during metal exposures in *Hemibarbus mylodon*. Ecotox. Environ. Safe., 71, 25–137.

Frankham, R., J. D. Ballou and D.A. Briscoe, 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, Univ. Press, Cambridge.

Hanfling, B., W. Durka and R. Brandl, 2004. Impact of habitat fragmentation on genetic population structure of roach, *Rutilus rutilus*, in a riparian ecosystem. Conserv. Genet., 5, 247–257.

Houlden, B. A., L. Woodworth and K. Humphrey, 1997. Captive breeding, paternity determination, and genetic variation in chimpanzees (*Pan troglodytes*) in the Australasian region. Primates, 38, 341–347.

Hua Yue, G, Y. Li, L. C. Lim and L. Orban, 2004. Monitoring the genetic diversity of three Asian arowana (*Scleropages formosus*) captive stocks using AFLP and microsatellites. Aquacult., 237, 89–102.

Kawamura, K., M. Kubota, M. Furukawa and Y. Harada, 2007. The genetic structure of endangered indigenous populations of the amago salmon, *Oncorhychus masouishikawae*, Conserv. Genet., 8, 1163–1176.

Kim, I. S., 1997. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. Vol. 37 Freshwater fishes. Ministry of Education. 629 pp.

Kim, W. J., Y. A. Lee and I. C. Bang, 2007. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers for the endangered Korean freshwater fish *Hemibarbus mylodon*. Mol. Ecol. Notes, 7, 516–518.

Kim, K. -Y., S. Y. Lee, Y. S. Cho, I. C. Bang, D. S. Kim and Y. K. Nam, 2008. Characterization and phylogeny of two β,-cytoskeletal actins from *Hemibarbus mylodon* (Cyprinidae, Cypriniformes), a threatened fish species in Korea. DNA Seq., 19, 87–97.

Knorr, C., H. H. Cheng and J. B. Dodgson, 1999. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. Anim. Genet., 30, 28–35.

Lee, I. R, Y. A. Lee, H. C. Shin, Y. K. Nam, W. J. Kim and I. C. Bang, 2008. Genetic diversity of an endangered fish, *Iksookimia choii* (Cypriniformes), from Korea as assessed by amplified fragment length polymorphism. Korean J. Limnol., 41, 97–102.

Liu, Z. J., A. Karsi, P. Li, D. Cao and R. Dunham, 2003. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family, Genet., 165, 687–694.

Miller, M., 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows programme for the analysis of allozyme and

molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Nei, M. and W. H. Li, 1979. Mathematical model for studing genetical variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3321–3323.

Roa, A. C., M. M. maya, M. C. Duque, J. Tohme, A. C. Allem and M. W. Bonierbale, 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. Theor. Appl. Genet., 95, 741–746.

Rohlf, S. B., 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.7. Applied Biostatistics Inc., New York, USA.

Salgueiro P., G. Carvalho, M. J. Collares-Pereira and M. M. Coelho, 2002. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaecypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. Biol. Conserv., 109, 47–56.

Sønstebø, J. H., R. Borgstrøm and M. Heun, 2007. A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. Mol. Ecol., 16, 1427–1438.

Stefan S., D. Roessli and L. Excoffier, 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Taylor, A.C., 2003. Assessing the consequences of inbreeding for population fitness: past challenges and future prospects. (in) W.V. Holt, A.R. Pickard, J. Rodger & D.E. Wildt (eds.), Reproductive Science and Intezgrated Conservation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 67–81.

Vos, P., R. Hodgers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau, 1995. AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 23, 4407-4414.

Wilson, G. A., J. S. Nishi, B. T. Elkin and C. Strobeck, 2005. Effects of a recent founding event and intrinsic population dynamics on genetic diversity in an ungulate population. Conserv. Genet., 6, 905–916.

Wood, C. M., J. Du, J. Rogers, C. J. Brauner, J. G. Richards, J. W. Semple, B. W. Murray, X. Q. chen and Y. Wang, 2007. Przewalski's naked carp (*Gymnocypris przewalskii*): An endangered species taking a metabolic holiday in Lake Qinghai, China. Physiol. Biochem. Zool., 80, 59–77.

Wright, S., 1978. Evolution and the Genetics of Populations; Vol 4: Variability Within and Among Natural Populations. 590 pp.

원고접수 : 2008년 8월 1일
심사완료 : 2008년 8월 9일
수정본 수리 : 2008년 8월 12일