

미토콘드리아 *COI*와 핵 *RAG1* 유전자 분석에 의한 줄종개 (*Cobitis tetralineata*)와 왕종개 (*Iksookimia longicorpa*) 간 자연잡종 동정

이일로 · 양 현¹ · 김종환 · 김근용 · 방인철*

순천향대학교 해양생명공학과, ¹(주)생물다양성연구소

Identification of a Natural Hybrid between the Striped Spine Loach *Cobitis tetralineata* and the King Spine Loach *Iksookimia longicorpa* by Analyzing Mitochondrial *COI* and Nuclear *RAG1* Sequences by Il-Ro Lee, Hyun Yang¹, Jong-Hwan Kim, Keun-Yong Kim and In-Chul Bang* (Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea; ¹Biological Diversity Research Institute, Jeonju 561-211, Korea)

ABSTRACT A natural hybrid between the striped spine loach *Cobitis tetralineata* and the king spine loach *Iksookimia longicorpa* was genetically identified by sequence analyses of nuclear recombination activating gene 1 (*RAG1*) and mitochondrial cytochrome c oxidase I (*COI*) genes. Out of 850 base positions of *RAG1*, a total of 23 nucleotide substitutions were detected between the two parental species, whereas the electropherogram of the natural hybrid displayed double peaks at all of the 23 positions, which reflects their simple Mendelian inheritance pattern. Meanwhile, comparison of partial sequences of mitochondrial genes (*COI* in this study), which are well characterized by the maternal inheritance pattern, revealed that the maternal species of the hybrid was *C. tetralineata* because of their 100% sequence identity.

Key words : Natural hybrid, *Cobitis tetralineata*, *Iksookimia longicorpa*, *COI*, *RAG1*

서 론

근연종들 간의 교잡은 자연에서 빈번하게 일어나며, 새로운 서식처에 빠르게 적응할 수 있는 잠재력을 가진 새로운 계통을 진화시키는 원동력이 되기도 한다(Grant and Grant, 1992; Nolte *et al.*, 2005; Sonnenberg *et al.*, 2007). 한국에 서식하는 담수어류들 간에도 자연적으로 교잡이 일어나 이들 간의 잡종이 보고되고 있으나[예, 가시고기 (*Pungitius sinensis sinensis*)와 잔가시고기 (*Pungitius sinensis kaibarae*) 간 잡종(채와 양, 1990), 기름종개 (*Cobitis sinensis*)와 왕종개 (*Iksookimia longicorpa*) 간 잡종(이, 1995), 왕종개와 미꾸리 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 간 잡종(황 등, 1995) 등], 인공적으로 유도된 잡종이 아닌 자연잡종 개체들을 대상으로 정확한 가계 추정에는 매우 어려운 실정이다. 따라서 이들 잡종의 유

전적 동정을 위하여 최근 핵 유전체에서 코딩되는 유전자의 염기서열 정보가 활용되고 있다. 예를 들어, Sonnenberg *et al.* (2007)은 large subunit (LSU) ribosomal RNA (rRNA) 유전자의 염기서열 분석을 통해 *Rutilus rutilus*와 *Alburnus alburnus* 간 잡종 개체의 동정이 가능함을 밝혔다. 즉, 근연종들 간에 염기 치환이 일어난 위치들에서 이들의 잡종은 친어들의 유전 정보를 모두 반영하여 polymorphic peak들을 가지게 된다. 이렇게 잡종 동정에 있어서 핵 유전자의 염기서열 정보 분석의 유용성은 각시붕어 (*Rhodeus uyekii*)와 떡납줄갱이 (*Rhodeus notatus*) 간의 잡종 동정에도 활용된 바 있다(윤 등, 2009).

핵 유전체에서 코딩되는 recombination activating gene 1 (*RAG1*) 유전자는 척추동물들에서 널리 발견되고 잘 보존되어 있어, 어류를 비롯한 다양한 종들의 분자 계통 연구에 활용되고 있다(Mayden *et al.*, 2008; Šlechtová *et al.*, 2008). 한편, 거의 모든 진핵생물들에서 발견되는 미토콘드리아 유전체

*교신저자: 방인철 Tel: 82-41-530-1286, Fax: 82-41-530-1638,
E-mail: incbang@sch.ac.kr

는 모계 유전을 하여 유전자 재조합이 일어나지 않는 독특한 특징을 가진다. 미토콘드리아 유전체를 구성하는 다양한 유전자들 중에서 cytochrome *c* oxidase I (*COI*) 유전자는 비교적 빠른 진화율을 보이고 있어 생물종들 간의 분자 계통, 특정 종을 구성하는 개체군들 간의 유전적 변이, DNA barcode 제작 등과 같은 연구에 널리 활용되고 있다 (Wolstenholme, 1992; Avis, 2000). 본 연구에서 줄종개 (*Cobitis tetralineata*)와 왕종개 간의 자연잡종으로 추정되는 개체가 섬진강에서 채집되었으며, 이것의 잡종 여부를 동정하고 친어를 추정하기 위하여 핵 *RAG1*과 미토콘드리아 *COI* 유전자의 염기서열 정보를 분석하여 비교하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 줄종개와 왕종개 간 잡종으로 추정되는 개체

는 2008년 5월에 전라북도 진안군 마령면의 섬진강 수계에서 채집되었으며, 전장과 체장은 각각 95.1mm와 82.5mm이었다. 이들의 친어종 (parental species)으로 추정되는 줄종개와 왕종개는 2005년 7월에 전라북도 임실군 관촌면 방수리의 섬진강 본류에서 함께 채집되었다. 유전체 DNA는 이 개체들의 꼬리지느러미 일부를 절단하여 추출하였다.

핵 *RAG1* 유전자의 일부 영역을 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통해 증폭하기 위하여 RAG-1F와 RAG-RV1 (Šlechtová *et al.*, 2008)를 사용하였다. 미토콘드리아 *COI* 유전자의 전체 영역을 PCR 증폭하기 위하여 미국 국립보건원 (National Institutes of Health, NIH)의 유전자 서열 데이터베이스인 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)로부터 내려 받은 잉어목 어류종들의 *COI* 염기서열 정보를 바탕으로 범용의 primer 두 쌍들을 제작하였다 [COI-1F (5'-GCGTCTYTG-GATTTGCAATC-3')와 COI-1R (5'-GCAATAATTATTGTRCATGT-3') 및 COI-2F (5'-CCACATTYTTTGACCCSGC-

Table 1. Twenty-three base positions in which sequences of recombination activating gene 1 (*RAG1*) were different between *Cobitis tetralineata* (♀) and *Iksookimia longicorpa* (♂), and in which polymorphic bases were found in their natural hybrid. The polymorphic bases are indicated according to IUPAC codes for the sake of simplicity

Species	54	57	63	99	168	177	178	279	285	318	363	378	393	405	411	439	603	726	732	777	780	804	837
<i>C. tetralineata</i>	T	C	A	C	A	C	G	A	T	T	T	G	C	T	A	G	T	C	C	C	A	C	C
Hybrid	W	Y	W	Y	R	Y	K	R	Y	Y	K	R	Y	Y	M	R	Y	Y	Y	Y	M	M	Y
<i>I. longicorpa</i>	A	T	T	T	G	T	T	G	C	C	G	A	T	C	C	A	C	T	T	T	C	A	T

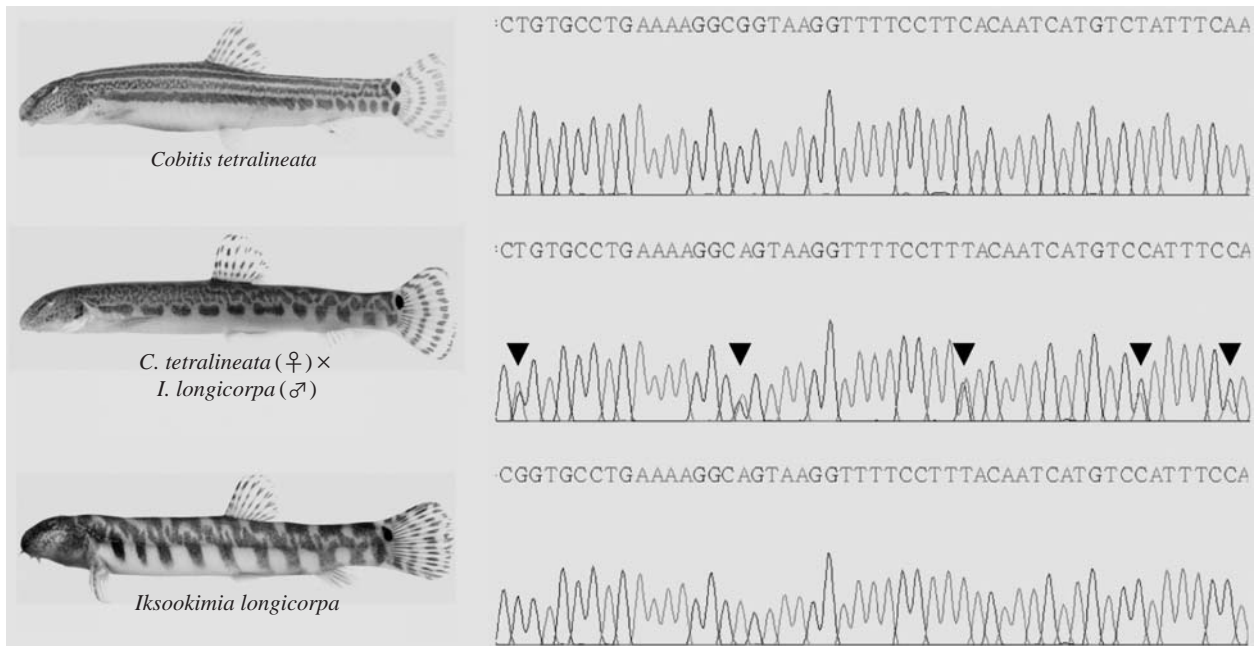


Fig. 1. A fragment of electropherograms showing sequences of recombination activating gene 1 (*RAG1*) gene of *Cobitis tetralineata* (♀) and *Iksookimia longicorpa* (♂), and their natural hybrid. The sequence traces show diagnostic positions for the two parental species and confirm double peaks at the respective positions for the natural hybrid (indicated by arrow heads). The maternity of *C. tetralineata* and the paternity of its spouse *I. longicorpa* were identified by 100% sequence identity of cytochrome *c* oxidase I (*COI*) gene between the natural hybrid and *C. tetralineata*.

3')와 COI-2R (5'-TGTGGGATGTGCCATTAAGC-3')].

PCR은 100ng의 유전체 DNA와 10 pmol의 primer들을 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer Co., Daejeon, Korea)에 추가하여 반응시켰다. PCR 조건은 94°C에서 4분간 초기 열변성시킨 후, 94°C 1분간 열변성, 45°C에서 1분간 결합 및 72°C에서 1분간 신장 반응을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer Co., Korea)로 정제한 후, PCR에서 사용하였던 primer들을 사용하여 자동염기서열분석기 ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 염기서열을 분석하였다. 확보된 RAG1과 COI 염기서열들의 electropherogram 데이터 분석은 BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 섬진강에서 채집된 줄종개와 왕종개 간의 잡종으로 추정되는 개체의 잡종 여부를 동정하기 위하여, 줄종개, 왕종개 및 잡종 각 한 개체에서 RAG1과 COI 유전자들의 염기서열 정보를 분석하였다. RAG1 염기서열 정보를 비교한 결과, 두 친어 개체들에서는 명확한 single peak들로 구성된 electropherogram들을 보였다. 이들 간에는 총 850개의 염기 위치들 중에서 23개 위치들에서 치환이 관찰되어 2.7%의 치환율을 보였다 (Table 1). 한편 잡종 개체는 electropherogram 상에서 친어 개체들 사이에서 치환이 관찰된 23개 위치 모두에서 double peak들이 관찰되었으며 (Fig. 1), 이들 이외에는 모두 single peak들로 구성되었다. 즉, 잡종 개체에서는 모계와 부계 간에 서로 다른 염기들이 함께 표현되고 있어, 멘델의 유전법칙을 따랐다. 따라서 본 연구에서 분석된 자연잡종 개체는 줄종개와 왕종개 간의 잡종임을 강하게 시사하였다. 이러한 결과는 *R. rutilus*와 *A. alburnus* 간 잡종 개체에서 핵 LSU rRNA 유전자 (Sonnenberg *et al.*, 2007)와 각시붕어와 떡납줄갱이 간 잡종 개체에서 RAG1 유전자 (윤 등, 2009)가 모계와 부계 개체들의 염기서열을 함께 표현하는 double peak들로 구성된 electropherogram을 보인 결과와도 명확히 일치하였다.

그리고 줄종개, 왕종개 및 잡종 개체에서 COI 염기서열 정보를 비교한 결과, 친어인 줄종개와 왕종개 사이에서 총 1,551개의 염기 위치들 중에서 154개 위치들에서 치환이 관찰되어 9.9%의 치환율을 보였다. 그러나 잡종 개체는 줄종개와 100%의 염기서열 유사도를 보였다. 미토콘드리아의 모계 유전의 특성 상, 이종의 친어들이 교잡하였을 경우, 잡종인 F₁ 세대의 개체들은 그 모계와 동일한 미토콘드리아 유전 정보를 가지게 된다. 따라서 우리의 결과는 자연잡종 개체의 모계가 줄종개이며 왕종개는 부계임을 강하게 시사한다.

본 연구에서는 이종의 두 친어종들과 그 잡종 개체의 핵

과 미토콘드리아 유전자들의 염기서열 정보를 함께 분석하여 비교함으로써, 잡종 여부의 판단뿐만 아니라 그 모계의 추정이 가능함을 줄종개와 왕종개 간 자연잡종 개체를 대상으로 입증하였다.

요 약

줄종개 (*Cobitis tetralineata*)와 왕종개 (*Iksookimia longicorpa*) 간 자연잡종으로 추정되는 개체를 유전적으로 동정하기 위하여 핵 recombination activating gene 1 (RAG1)과 미토콘드리아 cytochrome c oxidase I (COI) 유전자들의 염기서열을 분석하였다. RAG1 염기서열을 분석한 결과 850 bp 중에서 두 친어종들 간에 총 23개의 치환이 관찰되었고, 자연잡종 개체의 electropherogram에서는 이들 치환이 관찰된 모든 위치들에서 double peak들이 관찰되어, 멘델의 유전법칙을 따랐다. 그리고 모계를 통해 자손에게 유전되는 특징을 가지는 미토콘드리아 유전자들 중에서 COI 염기서열을 비교한 결과 잡종 개체는 줄종개와 염기서열이 100% 일치하여 그 모계는 줄종개임을 명확히 밝혀졌다.

인 용 문 헌

윤영은 · 이일로 · 박상용 · 강연종 · 김응오 · 양상근 · 남윤권 · 방인철. 2009. RAG-1 유전자의 염기서열 분석에 의한 각시붕어 *Rhodeus uyekii*와 떡납줄갱이 *R. notatus* 잡종의 동정. 한국양식학회지, 22: 79-82.

이은희. 1995. 기름종개속 어류 *Cobitis sinensis-longicorpus* complex의 교잡 실험을 통한 단성 생식 양상에 관한 연구. 전북대학교, 95pp.

채병수 · 양홍준. 1990. 가시고기 (*Pungitius sinensis sinensis*)와 잔가시고기 (*P. sinensis kaibarae*) 사이의 자연잡종. 한국어류학회지, 2: 88-94.

황영진 · 나명석 · 최충길. 1995. 왕종개 *Cobitis longicorpus*와 미꾸리 *Misgurnus anguilicaudatus*의 자연잡종에 관하여. 한국어류학회지, 7: 203-207.

Avice, J.C. 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species. Harvard Press, Cambridge.

Grant, P.R. and B.R. Grant. 1992. Hybridization of bird species. Science, 256: 193-197.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Res., 41: 95-98.

Mayden, R.L., K.L. Tang, R.M. Wood, W.-J. Chen, M.K. Agnew, K.W. Conway, L. Yang, A.M. Simons, H.L. Bart, P.M. Harris, J. Li, X. Wnag, K. Saitoh, S. He, H. Liu, Y. Chen, M. Nishida and M. Miya. 2008. Inferring the tree of life of the order Cypriniformes, the earth's most diverse clade of

- freshwater fishes: Implications of varied taxon and character sampling. *J. Syst. Evol.*, 46: 424-438.
- Nolte, A.W., J. Freyhof, K. Stemshorn and D. Tautz. 2005. An invasive lineage of sculpins, *Cottus* sp. (Pisces, Teleostei) in the Rhine with new habitat adaptations has originated by hybridization between old phylogeographic groups. *Proc. R. Soc. B*, 272: 2379-2387.
- Šlechtová, V., J. Bohlen and A. Perdices. 2008. Molecular phylogeny of the freshwater fish family Cobitidae (Cypriniformes: Teleostei): Delimitation of genera, mitochondrial introgression and evolution of sexual dimorphism. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 47: 812-831.
- Sonnenberg, R., A. Nolte and D. Tautz. 2007. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Front. Zool.*, 4: 6.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.*, 141: 173-216.