

RAG-1 유전자의 염기서열 분석에 의한 각시붕어 *Rhodeus uyekii*와 떡납줄갱이 *R. notatus* 잡종의 동정

윤영은, 이일로, 박상용, 강연중¹, 김응오¹, 양상근¹, 남윤권², 방인철*
순천향대학교 해양생명공학과, ¹국립수산과학원 남부내수면연구소, ²부경대학교 양식학과

Genetic Identification of Hybrids between *Rhodeus uyekii* and *R. notatus* by Sequence Analysis of RAG-1 Gene

Young-Eun Yun, Il-Ro Lee, Sang Yong Park, Eon-Jong Kang¹, Eung-O Kim¹, Sang-Keun Yang¹, Yoon Kwon Nam² and In-Chul Bang

Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

¹Southern Regional Inland Research Institute, NFRDI Jinhae 645-806, Korea

²Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Reciprocal interspecific hybrids between two bitterling species *Rhodeus uyekii* (RU) and *R. notatus* (RN) were genetically identified based on the partial sequence analysis of recombination activating gene-1 (RAG-1) gene. Out of 863 bp positions analyzed, 13 nucleotide substitutions were detected between the two parental species (RU and RN genotypes). Both the induced hybrids (RU♀ × RN♂; UN genotype) and their reciprocal counterparts (RN♀ × RU♂; NU genotype) displayed the double peaks (or polymorphism) of sequence chromatograms at the 13 diagnostic positions, indicating that those hybrids were actual karyogamy derived from the two parental haploid genomes. However, it was not possible to distinguish between the reciprocal interspecific hybrids.

Keywords: Hybrids, Bitterlings, *Rhodeus uyekii*, *R. notatus*, RAG-1, Sequence polymorphism

서 론

납자루아과(the subfamily Acheilognathinae) 어류는 소형의 담수어로 혼인색이 화려하고 먹이 순치와 사육이 용이하며 산란 및 생활 습성이 특이하여 관상어로의 개발 가능성이 높다 (Kim et al., 1999a). 이 중 각시붕어 *Rhodeus uyekii* 는 한국 고 유종이며 실험 모델 어류로서 그 이용 가능성을 인정받아 인공 교잡(Suzuki and Jeon, 1988a; Suzuki and Jeon, 1988b), 초기 발생(Suzuki et al., 1985; Kim and Han, 1990), 골격학적 연구 (Kim, 1997), 염산리도카인과 clove oil의 마취효과(Kang et al., 2005) 등에 관한 연구들이 진행되었다. 또한 우리나라 토종 관상어로 개발하기 위한 연구의 일환으로 혼인색의 색소조성 분석(Kim et al., 1999a), carotenoids 첨가 사료와 체색의 관계 (Kim et al., 1999b)와 같은 체색 개선에 관한 연구가 이루어진 바 있다.

납자루아과 어류는 수컷이 암컷에 비해 화려하여 관상어의 가치가 높아 전 수컷 생산을 위한 연구의 일환으로 각시붕어와

떡납줄갱이 *R. notatus* 의 잡종유도에 따른 초기 발생에 관한 연구가 수행된 바 있다(Kang et al., 2006). Kawamura and Hosoya (2000)는 납자루아과 어류의 3속의 10종을 대상으로 잡종을 유도한 보고에서 일부 잡종에서 전 수컷이 유도됨을 보고한 바 있으며, Kang et al. (2006)은 각시붕어와 떡납줄갱이 잡종의 초기발생 특징에 관한 연구에서 난황 형태 및 자어(larvae)는 중간 형질을 띠지만 이후 점차 주로 부계의 형질이 주로 나타남을 보고한 바 있다. 그러나 이들 유도된 개체들을 대상으로 한 유전자 분석 등을 통한 유전학적 동정은 수행된 바 없으며, 때문에 인공 교배에 의해 유도된 해당 개체들이 어떤 karyogamy 유전형을 띠고 있는지 여부는 확인되지 않은 상태이다.

잡종의 유전형은 특정 nuclear DNA 영역의 분석을 통해 확인할 수 있으며(Wendel and Doyle, 1998), 최근 Sonnenberg et al. (2007)은 large subunit (LSU) rDNA 영역을 이용하여 잡종 어류(*Rutilus rutilus* × *Alburnus alburnus*)를 동정한 바 있고, 이들의 연구에서 염기서열의 chromatogram을 분석 시 잡종 개체들은 양친간 차이가 있는 특정 위치에서 double peaks 가 관찰됨을 보고한 바 있다. 핵에서 encoding되는 recombination

*Corresponding author: incbang@sch.ac.kr

activating gene (RAG) 유전자는 척추동물의 전반에 걸쳐서 발견되며(Groth and Barrowclough, 1999), 그 염기서열이 매우 잘 보존되어 있고(Cebrat et al., 2008), 진화율을 비교적 잘 반영하는 것으로 알려져 있어 최근 분자계통연구에 많이 사용되고 있다(Slechtova et al., 2007).

이에 본 연구에서는 각시붕어를 모계로 한 교잡 실험군(*R. uyeikii* ♀ × *R. notatus* ♂; UN), 그리고 떡납줄갱이를 모계로 한 교잡 실험군(*R. notatus* ♀ × *R. uyeikii* ♂; NU)을 대상으로 RAG-1 유전자의 염기서열 분석을 통한 양친과 잡종 유도된 잡종 개체의 유전적 동정을 수행하였다.

재료 및 방법

실험어

본 연구에 사용한 각시붕어(*R. uyeikii*; 유전형 약어, RU)와 떡납줄갱이(*R. notatus*; RN) 친어는 전북 완주군 용진면 하리에서 시판되는 유인어망을 이용하여 채집하였으며, 이들 친어로 부터 각시붕어를 모계로 한 교잡 실험군(*R. uyeikii* ♀ × *R. notatus* ♂; UN), 떡납줄갱이를 모계로 한 교잡 실험군(*R. notatus* ♀ × *R. uyeikii* ♂; NU)은 Kang et al. (2006)의 방법에 따라 교잡종을 유도하였다. 유도된 교잡종과 친어는 각각 5개체씩을 실험에 사용하였다.

Genomic DNA의 분리 및 PCR

Genomic DNA는 각시붕어(RU)와 떡납줄갱이(RN) 및 인공종묘 생산된 교잡종(UN, NU)의 꼬리지느러미 일부를 절단하여 Asahida et al. (1996)의 방법에 따라 DNA를 추출하였으며, 핵에서 encoding 되는 RAG-1 유전자의 염기서열 분석은 Quenouille et al. (2004)의 RAG-1F (5'-AGCTGTAGTCAGTAYCACAAATG-3')와 Slechtova et al. (2007)의 RAG-RV1 (5'-TCCTGRAAGATYTTGTAGAA-3') primers를 사용하여 863 bp를 PCR 증폭시켰다. PCR 반응은 주형 DNA 100 ng과 primer 10 pmol을 사용하여 PCR Premix 20 µl (Bioneer, Korea)로 반응시켰다. PCR 조건은 최초 94°C에서 4분간 denaturation 시킨 후, 94°C 1분간 denaturation, 43°C에서 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension 반응을 35회 반복하였다. 증폭된 산물을 1.0% agarose gel 상에서 전기영동 한 후에 ethidium bromide 용액으로 염색 하여 증폭된 PCR 산물의 유무를 확인하였다.

염기서열 분석

효과적으로 증폭된 PCR 산물은 PCR purification kit (Bioneer, Korea)로 정제한 후, PCR primers를 사용하여 direct sequencing 방법으로 염기서열분석기(ABI 3730XL; Applied biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열 데이터를 BioEdit (ver. 7.0.9) 프로그램(Hall, 1999)을 사용하여 다중 배열하였고(Thompson et al., 1997), 각각의 염기를 대상으로 double peaks 유무를 확인하여 염기변이 영역을 탐색하고 변이율을 구하였다.

결과 및 고찰

양친과 잡종 유도된 개체의 유전적 차이를 알아보기 위하여 RAG-1 유전자의 일부 단편의 염기서열(863 bp)을 분석한 결과, 각시붕어와 떡납줄갱이 간에 비교적 많은 염기서열 변이가 관찰되었다. 분석된 염기서열 863 bp 중 13개 위치에서 변이가 관찰되어 변이율은 약 1.5%로 나타났다(Table 1). 교잡군인 UN 유전형과 NU 유전형을 각각 5개체씩 분석한 결과 모계와 부계의 염기서열 차이를 보인 13개의 변이 위치에서 양친의 염기서열이 함께 표현되는 double peaks 양상을 보였다(Fig 1). 그러나 UN 유전형과 NU 유전형의 염기서열 차이는 관찰되지 않았다.

최근 핵에서 encoding되는 LSU rDNA의 일부 영역을 분석하여 *R. rutilus*와 *A. alburnus* 사이의 잡종 개체의 동정에 관한 연구(Sonnenberg et al., 2007), *Cottus perifretum*와 *C. rhenanus* 중간 잡종에 관한 연구(Busse et al., 1999) 결과와 동일하게 본 연구에서도 각시붕어와 떡납줄갱이 잡종 개체에 대한 염기서열 peaks가 모계와 부계의 변이영역 염기서열을 모두 반영하는 double peaks 양상과 일치하는 결과를 보였다.

본 연구에서 분석된 각시붕어와 떡납줄갱이 사이의 잡종 개체들은 양친으로부터 유래한 각 반수체 조합을 잘 보존하고 있는 karyogamy로서, 인위적인 잡종 유도 시 보고된 바 있는 우연한 처녀생식(spontaneous gynogenesis or androgenesis)에 의한 개체 형성은 아닌 것으로 판단된다. 그러나 본 염기서열 분석만으로는 정교배체와 상반교배체에서 유도된 잡종개체를 구분할 수는 없었으며 이는 karyogamy 형성시 부계 및 모계 반수체들의 선택적 기여 정도가 거의 없었기 때문으로 여겨진다. 따라서 이들 두 중간 정교배체와 상반교배체를 구분하기 위해서는 모계유전을 하는 미토콘드리아 유전자의 염기서열 분석을

Table 1. Sequences variations of RAG-1 gene from *Rhodeus uyeikii* and *R. notatus*, and their reciprocal hybrids

Genotype*	Position													
	16	27	66	87	204	261	363	372	420	534	549	588	765	
RU	C	A	G	G	A	G	G	G	T	G	C	T	C	
UN	C&T	A&G	G&A	G&A	A&T	G&A	G&A	G&A	T&C	G&A	C&T	T&C	C&T	
NU	C&T	A&G	G&A	G&A	A&T	G&A	G&A	G&A	T&C	G&A	C&T	T&C	C&T	
RN	T	G	A	A	T	A	A	A	C	A	T	C	T	

*RU, *R. uyeikii*; UN, *R. uyeikii* × *R. notatus*; NU, *R. notatus* × *R. uyeikii*; RN, *R. notatus*.

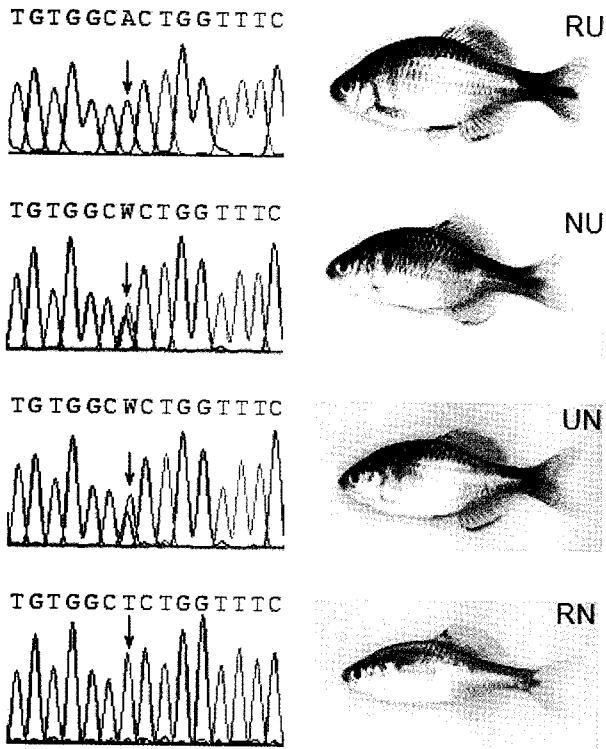


Fig. 1. Sequence chromatograms showing diagnostic positions for *Rhodeus uyekii* and *R. notatus*, and their reciprocal hybrids. Note double peaks at the positions for the reciprocal hybrids. RU, *R. uyekii*; UN, *R. uyekii* × *R. notatus*; NU, *R. notatus* × *R. uyekii*; RN, *R. notatus*.

병행하여야 할 것으로 판단된다.

또한 자연에서 채집된 떡납줄갱이 일부 개체에서도 해당 염기서열에서 double peaks가 표현되는 양상이 관찰되었는데(미 발표 자료) 이들 개체들은 자연상태에서 형성된 잡종으로 판단된다. 어류는 자연상태에서도 종간 잡종이 빈번히 발생하고 있다(Kuriwa et al., 2007). Jansson et al. (1991)은 자연 잡종의 발생요인으로 산란 시기가 일치하거나 산란 장소의 부족 현상, 그리고 sneaker 행동과 같은 원인을 보고한 바 있다. 또한 납자루아과는 암컷이 이대패의 새강에 산란을 한 후 수컷이 방정하는 특이한 습성을 가진 종으로 *Rhodeus*속에 포함되는 흰줄납줄개 *R. ocellatus* 및 *R. sericeus* 의 sneaker 행동에 관한 연구가 보고된 바 있다(Kanoh, 2000; Candolin and Reynolds, 2002). 따라서 떡납줄갱이의 관상어 개발 등을 위해서는 사용 어미들에 대한 정확한 유전적 종의 동정이 반드시 선행되어야 함을 시사하고 있으며, 아울러 여러 납자루아과 어류가 공존하는 수계의 개체를 채집하여 자연 잡종 출현 여부에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 연구과제(RP-2008-AQ-111)의 지

원에 의해 수행되었으며, 본 논문의 심사를 위해 수고해 주신 익명의 심사자들에게도 감사드립니다.

요 약

한국 고유종인 각시붕어 *R. uyekii* 와 떡납줄갱이 *R. notatus* 로부터 유도된 정교배 및 상반교배 잡종어류의 분자생물학적 동정을 위하여 핵에서 encoding되는 RAG-1 유전자의 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 863 bp의 염기서열 중 각시붕어와 떡납줄갱이 사이에는 총 13개의 위치에서 염기서열 변이가 탐색되었다. 잡종어류의 RAG-1 유전자 염기서열을 분석한 결과 모계와 부계의 염기서열 차이를 보인 13개의 변이 부분에서 부모의 염기서열을 다같이 반영하는 double peaks 패턴을 보였으나 정교배체(UN 유전형)와 상반교배체(NU 유전형) 간의 염기서열 차이는 관찰되지 않았다.

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.

Busse, K., J. Freyhof and A. Zarske, 1999. Serum-electrophoretic patterns of various cyprinid hybrids from the rivers Elbe and Sieg (Teleostei: Cyprinidae). *Abh. Mus. Tierk. Dresden.*, 21, 265-272.

Candolin, U. and J. D. Reynolds, 2002. Why do males tolerate sneakers? Tests with the European bitterling, *Rhodeus sericeus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 51, 146-152.

Cebat, M., A. Cebula, A. Laszkiewicz, M. Kasztura, A. Miazek and P. Kisielow, 2008. Mechanism of lymphocyte-specific inactivation of RAG-2 intragenic promoter of NWC: Implications for epigenetic control of RAG locus. *Mol. Immunol.*, 45, 2297-2306.

Groth, J. G. and G. F. Barrowclough, 1999. Basal divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Mol. Phyl. Evol.*, 12, 115-123.

Hall, T. A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.

Jansson, H., I. Holmgren, K. Wedin and T. Andersson, 1991. High frequency of natural hybrids between Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and brown trout, *S. trutta* L., in a Swedish river. *J. Fish Biol.*, 39, 343-348.

Kang, E.-J., C.-H. Kim, I.-S. Park, H. Yang and Y.-C. Cho, 2006. Early developmental characteristics of Induced hybrids between *Rhodeus uyekii* and *R. notaus* (Pisces: Cyprinidae). *Kor. J. Ichthyol.*, 18, 339-346. (in Korean)

Kang, E.-J., E.-M. Kim, Y. J. Kim, S. G. Lee, D. S. Sim, Y.-H. Kim and I.-S. Park, 2005. Effect of lidocaine hydrochloride and clove oil as anaesthetic on Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii* and bitterling, *Acheilognathus koreensis*. *J. Aquacult.*,

- 18, 272–279. (in Korean)
- Kanoh, Y., 2000. Reproductive success associated with territoriality, sneaking, and grouping in male rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus* (Pisces: Cyprinidae). *Environ. Biol. Fishes.*, 57, 143–154.
- Kawamura, K. and K. Hosoya, 2000. Masculinization mechanism of hybrids in bitterlings (Teleostei: Cyprinidae). *J. Hered.*, 91, 464–473.
- Kim, I.-J., 1997. A osteological study of *Rhodeus uyekii*. *Kor. J. Ichthyol.*, 9, 130–140. (in Korean)
- Kim, H. S., Y. H. Kim, J.-Y. Jo, G. H. Yoon and B.-S. Ha, 1999a. Nuptial color component of Korean rose bitterling (*Rhodeus uyekii*). *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 520–524. (in Korean)
- Kim, H. S., Y. H. Kim, S. H. Cho and J.-Y. Jo, 1999b. Effects of dietary carotenoids on the nuptial color of the bitterling (*Rhodeus uyekii*). *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 276–279. (in Korean)
- Kim, Y. U. and K. H. Han, 1990. Early life history of the Korean bitterling, *Rhodeus uyekii* (Cyprinidae), with a note on minute tubercles on the skin surface. *Kor. J. Ichthyol.*, 2, 159–168. (in Korean)
- Kuriwa, K., N. Hanzawa, T. Yoshino, S. Kimura and M. Nishida, 2007. Phylogenetic relationships and natural hybridization in rabbitfishes (Teleostei: Siganidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Mol. Phyl. Evol.*, 45, 69–80.
- Quenouille, B., E. Bermingham and S. Planes, 2004. Molecular systematic of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.*, 31, 66–88.
- Slechtova, V., J. Bohlen and H. H. Tan, 2007. Families of Cobi-toidea (Teleostei: Cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbus*, *Psilorhynchus*, *Swepenticobitis* and *Vaillantella*. *Mol. Phyl. Evol.*, 44, 1358–1365.
- 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.
- Suzuki, N. and S.-R. Jeon, 1988a. Hybridization experiments in acheilognathine fishes (Cyprinidae), an intrageneric hybrid between *Rhodeus uyekii* and *R. ocellatus smithi*. *Kor. J. Limnol.*, 21, 129–142. (in Korean)
- Suzuki, N. and S.-R. Jeon, 1988b. Hybridization experiments in acheilognathine fishes (Cyprinidae), an intrageneric hybrid between *Rhodeus suigensis* and *R. uyekii*. *Kor. J. Limnol.*, 21, 57–78. (in Korean)
- Suzuki, N., N. Akiyama and T. Hibiya, 1985. Development of the bitterling, *Rhodeus uyekii* (Cyprinidae), with a note on minute tubercles on the skin surface. *Jap. J. Ichthyol.*, 32, 28–34.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins, 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876–4882.
- Wendel, J. F. and J. J. Doyle, 1998. Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 265–296.

원고접수 : 2009년 1월 9일

심사완료 : 2009년 1월 28일

수정본 수리 : 2009년 1월 29일