

# AFLP 분석에 의한 병어속 (*Pampus*) 3종의 유전 변이

윤영은 · 박상용 · 배주승<sup>1</sup> · 방인철\*  
 순천향대학교 해양생명공학과, <sup>1</sup>인천광역시청 수산사무소

## Genetic Variation of the Three *Pampus* spp. (Pisces: Stromateidae) using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Young-Eun YOON, Sang Yong PARK, Joo-Seung BAE<sup>1</sup> and In-Chul BANG\*  
 Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea  
<sup>1</sup>Incheon Fisheries Office, Incheon Metropolitan City, Incheon 400-103, Korea

Genetic variation and relationship of two wild (*Pampus argenteus* and *P. echinogaster*) and one cultured (*P. chinensis*) pomfret fish belonging to the genus *Pampus* were assessed. Specimens were collected from Korea and China and subjected to amplified fragment length polymorphism (AFLP) DNA fingerprinting. Four primer combinations generated a total of 304 DNA fragments ranging from 153 to 251 bands. Polymorphism and genetic diversity of cultured *P. chinensis* (22.9% and 0.038) were significantly lower than the two wild species of *P. argenteus* (93.6% and 0.311) and *P. echinogaster* (94.0% and 0.290). Genetic distance ranged from 0.335 (*P. argenteus* and *P. echinogaster*) to 0.646 (*P. argenteus* and *P. chinensis*) and showed a congeneric relationship within this genus. Twenty one of specific AFLP markers from four primer combinations bands were produced. These results suggest that AFLP polymorphism may be a useful marker for genetic identification among the three species studies here.

Key words: *Pampus argenteus*, *P. echinogaster*, *P. chinensis*, AFLP, Genetic variations

### 서 론

병어는 농어목(Perciformes), 병어과(Stromateidae)에 속하는 어종으로 전세계에 3속 15종이 보고되었으며(Nelson, 2006), 우리나라에는 병어(*Pampus argenteus*), 덕대(*P. echinogaster*) 및 중국병어(*P. chinensis*)의 1속 3종이 서식하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2005). 병어과 어류는 회유성 어류로 주로 저층에 서식하며, 병어와 덕대는 우리나라 서해와 남해안 일대, 일본남부, 동중국해에 분포하고, 중국병어는 우리나라 남해와 중국해에 분포하고 있다(Cho et al., 1989; Lee and Jin, 1989).

병어속에 관한 연구로 우리나라에 서식하는 3종의 형태학적 연구(Kim and Han, 1989), 병어와 *P. punctatissimus*의 형태학적 연구(Liu and Li, 1998), 덕대와 *P. punctatissimus*의 형태학적 연구(Dolganov et al., 2007)가 이루어진 바 있으며, 덕대의 식성(Huh, 1989) 및 연령과 성장(Kang et al., 1989), 한국 근해 병어류의 성숙과 산란(Lee and Jin, 1989) 등의 연구가 보고된 바 있다.

그 중 병어와 덕대는 형태학적으로 매우 유사하여 혼동되어 취급되었다(Kim and Han, 1989; Lee and Jin, 1989). 그러나 병어와 덕대의 턱의 생김새, 지느러미, 극조와 연조수 및 두부 후방에 보이는 미세한 빗살무늬 등으로 외부 형태적인 구별이 가능하고, 장의 길이 및 상늑골수 등의 내부적인 형태로도

구분이 가능한 것으로 알려져 있으며(Kim and Han, 1989), 척추골수, 새과수의 차이가 보고된 바 있다(Dolganov et al., 2007). 또한 병어와 덕대는 중국병어와 지느러미 모양, 턱의 생김새 및 척추골에서 뚜렷하게 구별이 가능하다고 보고된 바 있으나(Kim and Han, 1989), 실제로 외부형태적으로 이들 종을 동정하기가 쉽지 않다. 최근 병어와 중국에서 알려져 있는 *P. sinensis* 및 *P. cinereus* 3종간의 유전적 집단분석을 위한 microsatellites가 수행된 바 있으나(Yang et al., 2006), 우리나라에 알려진 3종에 대한 유전학적 동정을 위한 연구는 현재까지 이루어진 바 없다.

따라서 본 연구에서는 형태적으로 매우 유사한 3종간의 차이를 명확히 밝히고자 유전적 유사도가 가까운 종에서 유전적 변이를 나타내어 집단 구조 분석과 종 특이적인 marker 검출에 효과적인 것으로 알려져 있는 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 분석(Roa et al., 1997; Liu and Cordes, 2004)을 통한 병어, 덕대 및 중국병어 사이의 유전적 변이를 추정하고 유전학적 동정을 위한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험어 및 genomic DNA의 분리

본 연구에 사용된 병어 *P. argenteus*와 덕대 *P. echinogaster*는 전남 신안군 흑산도 근해에서 자연산을 채집하였고, 중국 병어 *P. chinensis*는 중국 푸젠성 샤먼시 소재 가두리양식장

\*Corresponding author: incbang@sch.ac.kr

에서 사육 중인 양식산을 확보하여 Asahida et al. (1996)의 방법에 따라 꼬리지느러미에서 genomic DNA를 추출하여 AFLP 분석에 각각 10마리씩을 사용하였다.

#### AFLP 지문 분석

AFLP 분석은 Vos et al. (1995)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. Genomic DNA 1 $\mu$ g을 *EcoRI/MseI* 제한효소 (Promega, USA)를 첨가하여 반응시켜 이중 절단한 후 순수 분리하고 T4 DNA ligase (Promega, USA)와 *EcoRI/MseI* adapter를 첨가하여 ligation 반응을 수행하였다. 반응이 종료된 DNA를 대상으로 AFLP® Pre-amp Primer Mix I (Invitrogen, USA), *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) 1 unit, 10 $\times$ PCR 용액을 첨가하여 pre-amplification 반응을 수행하였다. 반응액을 1TE로 50배 희석하고 희석산물 5 $\mu$ L를 대상으로 *EcoRI/MseI* selective primer, 10 $\times$ PCR, dNTP, *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) 1 unit을 이용하여 2차 PCR 을 수행하였다. 이때 PCR 반응은 touch-down PCR법을 이용하여 94 $^{\circ}$ C 30초, 65-56 $^{\circ}$ C (회당 0.7 $^{\circ}$ C씩 감소) 30초, 72 $^{\circ}$ C 60초 간 12회 순환 반응을 실시 후 annealing 반응을 56 $^{\circ}$ C 30초로 고정하여 총 24회 반복 수행하였다. 최종 PCR product는 6% denaturing polyacrylamide gel에 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음, silver staining kit (Promega, USA)로 염색하여 결과를 분석하였다.

#### 유전 다양성 분석 및 통계처리

Gel 상에서 확인된 DNA 단편들은 밴드의 유무에 따라 0 또는 1로 표시하여 matrix code를 작성한 후, 각 개체간의 유사도 matrix를 NTSYS 프로그램을 이용하여 (Rohlf, 1992) UPGMA로 분석하여 각각을 군집화하고 이를 토대로 dendrogram를 작성하였다. 각 집단별의 유전적 유사도 (genetic similarity)는 Nei and Li (1979)의 공식을 적용하여 계산하였다. 또한 TFPGA (ver. 1.3) 프로그램을 사용하여 (Miller, 1997) 병어 덕대 및 중국병어의 평균 이형접합율 (heterozygosity)과 유전적 거리 (genetic distance)를 구하였고, 또한 ARLEQUIN (ver. 2.000) 프로그램 (Schneider et al., 2000)을 사용하여 평균 유전 다양성 (genetic diversity) 수준을 구하였다.

### 결과 및 고찰

#### 유전 다양성

자연산 병어와 덕대, 양식산인 중국병어 각각 10마리씩 4개

의 primer 조합 (E/ACT-M/CAG, E/ACG-M/CAT, E/ATG-M/CCC, E/AAT-M/CGC)으로 AFLP를 수행한 결과 중 총 밴드 수, 다형성 밴드수준, 집단 내 유사도, 이형접합율, 그리고 유전다양성은 Table 1에 정리하였다. 총 304 개의 밴드가 관찰되었으며, 각 집단별 전체 밴드의 수는 병어 251개, 덕대 234개, 중국병어 153개로 분석되어 양식산인 중국병어 집단의 밴드수가 가장 적게 나타났다.

집단 내 유전적 유사도는 병어 0.666, 덕대 0.681, 중국병어가 0.944로 나타나 중국병어는 자연산 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 0.90-0.91 (Xu et al., 2006)보다 높은 결과를 보여 개체간 유전적 유사도가 매우 높게 나타났으나, 병어와 덕대는 비교적 낮은 결과를 보였다. 평균 이형접합율은 병어 0.288, 덕대 0.273, 중국병어가 0.033으로 분석되어 병어와 덕대는 자연산 황돔 (*Dentex tumifrons*)의 0.19-0.22 (Xia and Jiang, 2006), 자연산 은어 (*Plecoglossus altivelis*) 0.095-0.107 보다 높은 수준으로 분석되었다 (Seki et al., 1999). 일반적으로 해수어가 담수 또는 담수나 해수를 왕래하며 서식하는 양서류성 어종보다 높은 이형접합율을 나타낸다는 보고 (Ward et al., 1994)와 같이 회유성 어종인 은어보다 높은 이형접합율을 보였다. 그러나 중국병어는 회유성이면서 멸종위기에 처한 은어 아과의 아종인 *P. altivelis ryukyuensis*의 0.022 보다 약간 높은 수준을 나타내어 이형접합율이 낮은 것으로 분석되었다 (Seki et al., 1999).

다형성 밴드 수준은 병어 93.6%, 덕대 94.0%, 중국병어 22.9%로 병어와 덕대는 넙치의 58.3% (Xu et al., 2006), 황돔의 43.8% (Xia and Jiang, 2006)보다 높은 수준으로 나타났으며, 양식산인 중국병어는 자연산 개체인 병어와 덕대 보다 매우 낮은 22.9%의 다형성 밴드를 보였다. 평균 유전 다양성은 병어 0.311, 덕대 0.290, 중국병어 0.038로 중국병어의 다양성이 낮은 것으로 분석되었다. 중국병어 내의 유전적 다양성이 감소된 경향은 양식된 집단의 다형성 밴드 및 유전 다양성의 수준이 자연집단에 비해 낮은 결과를 나타낸다는 보고와 같은 양상을 나타내었다 (Murakaeva et al., 2003; Skaala et al., 2004). Hedgecock (1994)은 양식집단의 경우 적은 수의 친어로 많은 자손을 생산할 때 유전적 부동과 근친교배의 원인으로 자연산에 비해 유전적 다양성의 감소의 초래를 보고한 바 있다. 그러나 중국병어는 2000년대 초부터 양식이 시작된 것으로 알려져 근친교배가 지속적으로 이루어졌을 가능성 보다는 적은 수의 친어를 사용하여 인공종묘생산을 함으로서 다형성 밴드 및 유전 다양성이 낮아졌을 가능성을 배제할

Table 1. Summary of the AFLP profiles of three species in the genus *Pampus*

Information of AFLP markers	<i>P. argenteus</i>	<i>P. echinogaster</i>	<i>P. chinensis</i>
Total number of bands	251	234	153
Polymorphisms (%)	93.6	94.0	22.9
Average genetic similarity	0.666	0.681	0.944
Average heterozygosity	0.288	0.273	0.033
Average genetic diversity	0.311 $\pm$ 0.165	0.290 $\pm$ 0.154	0.038 $\pm$ 0.022

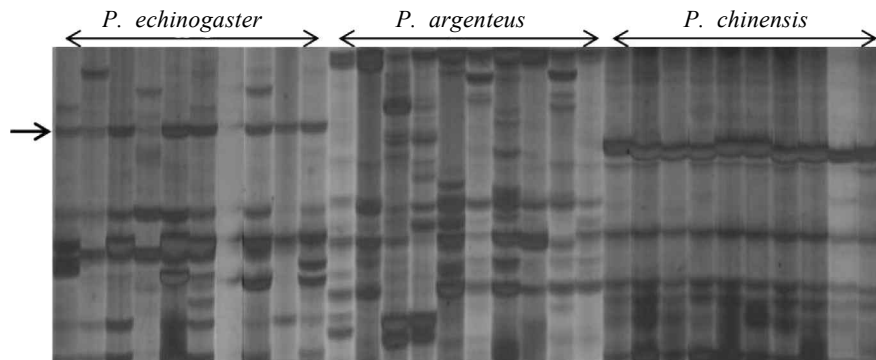


Fig. 1. Representative gel to show AFLP specific marker of three species of genus *Pampus* generated with a primer combination of E/ATG-M/CCC (above) and E/AAT-M/CGC (below). Arrow shows the specific marker bands.

수 없을 것으로 판단된다. 또한 중국병어가 낮은 유전다양성을 보유할 가능성이 있어 자연산 집단과 양식집단의 유전다양성에 대한 추가연구가 필요할 것으로 판단된다.

#### 유전적 구조

각 어종별 10개체 모두에서 검출되는 specific marker band는 E/ACT-M/CAG 조합에서 2개의 중국병어 specific marker band, E/ACG-M/CAT 조합에서는 덕대와 중국병어 각각 1개의 specific marker band, E/ATG-M/CCC 조합에서 덕대 1개, 중국병어 10개의 specific marker band, E/AAT-M/CGC 에서는 병어 1개, 중국병어 5개의 specific marker band가 각각 확인되었다(Fig. 1). AFLP 기술을 이용하여 은어와 아종인 *P. altivelis ryukyuensis*의 종 특이적인 marker를 검출하여 유전적 동정을 한 보고와 같이 (Seki et al., 1999) 본 연구에서도 효과적으로 종 특이적 marker가 검출되었다.

유전적 거리는 병어와 중국병어가 0.646, 덕대와 중국병어가 0.584, 병어와 덕대가 0.335로 나타나 병어와 덕대가 가깝게 나타났으며, 병어와 중국병어가 가장 멀게 분석되었다(Table 2). Shaklee and Pauly (1982)와 Thorpe and Sole-Cava (1994)는 단백질 또는 allozyme의 전기영동에 의한 유전적 거리에 의해 계통적인 차이를 구분한 바 있으며, Chen et al. (2005)은 AFLP 전기 영동에 의한 유전적 거리를 구분하여, 평균 0.05 이상은 동종집단 또는 아종 수준, 평균 0.30 이상의 수준은 종, 0.90 이상의 수준은 속 수준의 차이로 보고한 바 있어 3종간의 유전적 거리에 의해 확연히 종 수준의 차이가 나타났다.

각 개체간의 유사도 matrix에 따른 전체개체의 UPGMA dendrogram 결과 3종간 명확하게 분리되어 독립된 분지를 형성하였고, 병어와 덕대는 유전적 거리와 유사한 근연관계

Table 2. Pairwise distance among three species in the genus *Pampus* based on the AFLP analysis

Species	<i>P. argenteus</i>	<i>P. echinogaster</i>	<i>P. chinensis</i>
<i>P. argenteus</i>	-	0.335	0.645
<i>P. echinogaster</i>		-	0.584
<i>P. chinensis</i>			-

를 보였고, 중국병어는 유전적 거리가 가장 멀게 나타났다(Fig. 2).

위의 결과는 병어과 어류 3종을 형태학적으로 구분할 수 있다는 연구결과(Kim and Han, 1989)와도 잘 일치하였으며, 유전학적 분석에서도 3종간 특이 marker의 존재 및 유전적 거리차이로 뚜렷히 구분되었다. 본 연구 결과 각 종별 특이 band는 primer 제작을 통해 유전적 동정을 위한 specific marker로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

#### 참고 문헌

- 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.
- Cho, K.D., J.C. Kim and Y.K. Choe. 1989. Studies on the fishery biology of pomfrets, *Pampus* spp. in the Korean waters 5. Distribution and fishing condition. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 22, 294-305.
- Chen, D., C. Zhang, C. Liv. Y. Chang and J. Chang. 2005. Amplified fragment length polymorphism analysis to identify the genetic structure of the *Gymnocypris przewalskii* (Kessler, 1876) population from the Qinghai Basin, China. *J. Appl. Ichthol.*, 21, 178-183.
- Dolganov, V.N., V.E. Kharin and V.V. Zemnukhov. 2007. Species composition and distribution of butterfishes (Stromateidae) in waters of Russia. *J. Ichthyol.*, 47, 579-584.
- Hedgecock, D. 1994 Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*, Beaumont A.R., ed. Chapman and Hall, London, pp. 122-134.
- Huh, S.H. 1989. Studies on the fishery biology of pomfrets,

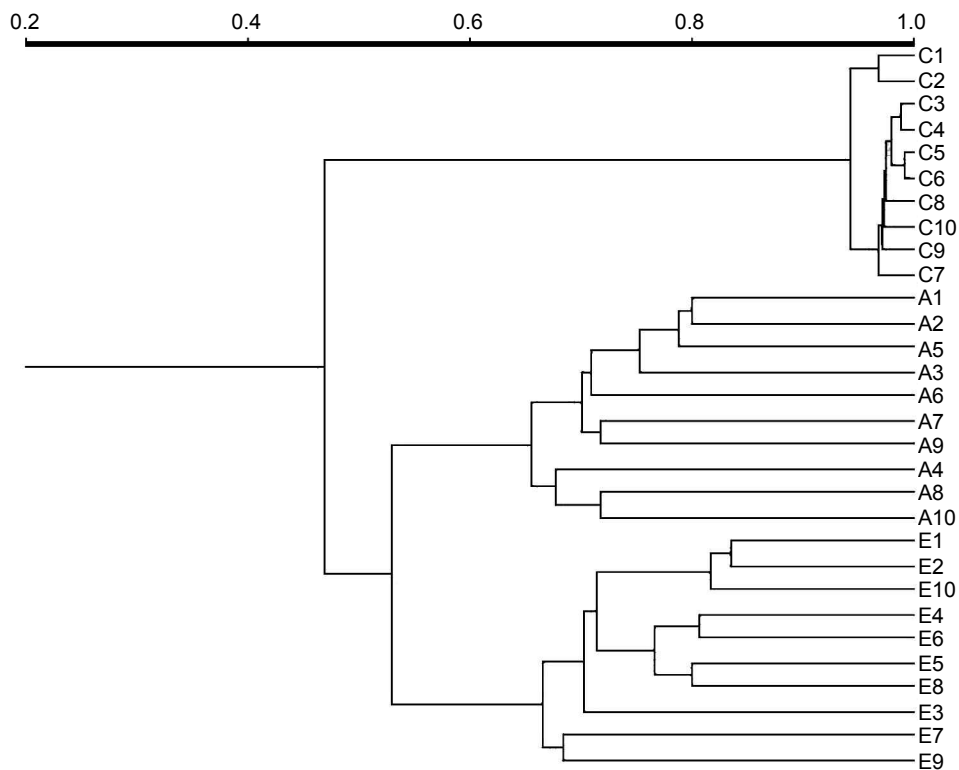


Fig. 2. UPGMA dendrogram showing the genetic relationships among three species in the genus *Pampus* based on genetic distance data. A1-10, *P. argenteus*; E1-10, *P. echinogaster*; C1-10, *P. chinensis*.

*Pampus* spp. in the Korean waters. 4. Food of *Pampus echinogaster*. Bull. Korean Fish. Soc., 22, 291-293.

Kang, Y.J., D.W. Lee, B.Q. Hong and Y.S. Kim. 1989. Studies on the fishery biology of pomfrets, *Pampus* spp. in the Korean waters. 3. Age and growth of Korean pomfret, *Pampus echinogaster*, from the China Sea. Bull. Korean Fish. Soc., 22, 281-290.

Kim, I.S., Y. Choi, C.L. Lee, Y.J. Lee, B.J. Kim and J.H. Kim. 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyo-Hak Publ. Co., Ltd., Seoul, 1-615.

Kim, Y.U. and K.H. Han. 1989. Studies on the fishery biology of pomfrets, *Pampus* spp. in the Korean waters. 1. Morphology of the two species of the genus *Pampus*. Bull. Korean Fish. Soc., 22, 241-265.

Lee, T.Y. and J.J. Jin. 1989. Studies on the fishery biology of pomfrets, *Pampus* spp. in the Korean waters. 2. Gonadal maturation and spawning. Bull. Korean Fish. Soc., 22, 266-280.

Liu, Z.J. and J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquacult., 238, 1-37.

Liu, J. and C.S. Li. 1998. Redescription of stromateoid fish *Pampus punctatissimus* and comparison with *Pampus argenteus* from Chinese coastal waters. Chin. J. Oceanol. Limnol., 16, 161-166.

Miller, M. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Murakaeva, A., K. Kohlmann, P. Kersten, B. Kamilov and D. Khabibullin. 2003. Genetic characterization of wild and domesticated common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations from Uzbekistan. Aquacult., 218, 153-166.

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

Nelson, J.S. 2006. Fishes of the world. John Wiley and Sons, Inc. New York. 4th edition., 1-601.

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.

Seki, S., J.J. Agresti, G.A.E. Gall, N. Taniguchi and B.

- May 1999. AFLP analysis of genetic diversity in three populations of ayu, *Plecoglossus altivelis*. Fish. Sci., 65, 888-892.
- Shaklee, J.B. and P. Pauly. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins. Pac. Sci., 36, 141-157.
- Skaala, Ø., B. Høyheim, K. Gloverand and G. Dahle. 2004. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): allelic diversity and identification of individuals. Aquacult., 240, 131-143.
- Schneider, 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.
- Thorpe, J.P. and A.M. Sole-Cava. 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematic. Zool. Scr., 23, 3-18.
- 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.
- Ward, R.D., M. Woodwark and D.O.F. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. J. Fish. Biol., 44, 213-232.
- Xia, J. and S. Jiang. 2006. Genetic structure of yellowback sea bream *Dentex tumifrons* in China inferred from AFLP data. Fish. Sci., 72, 829-834.
- Xu, X., Q. Zhang, Z. Wang, J. Qi, Z. Zhang, Z. Bao and H. Nakagawa. 2006. Assessing genetic diversity of wild populations of Japanese flounder using AFLP markers. Acta Oceanologica Sinica, 25, 82-89.
- Yang, W.T., J. Li and G.H. Yue. 2006. Multiplex genotyping of novel microsatellites from silver pomfret (*Pampus argenteus*) and cross-amplification in other pomfret species. Mol. Ecol. Notes., 6, 1073-1075.

---

2009년 1월 29일 접수  
 2009년 2월 7일 수정  
 2009년 4월 1일 수리