

제주 근해에서 채집된 나망곰치, *Gymnothorax minor* (뱀장어목, 곰치과) 엽상자어의 분자동정 및 형태기재

이승종 · 지환성¹ · 김진구^{1,*}

국립수산과학원 아열대수산연구센터, ¹부경대학교 자원생물학과

Molecular Identification and Morphological Description of *Gymnothorax minor* (Muraenidae, Anguilliformes) Leptocephali off Jeju Island by Seung-Jong Lee, Hwan-Sung Ji¹ and Jin-Koo Kim^{1,*} (Subtropical Fisheries Research Center, NFRDI, Jeju 690-192, Korea; ¹Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea)

ABSTRACT Two leptocephali (36.2~69.2 mm in total length) of the family Muraenidae were collected off Jeju Island, Korea. They were identified using 742 base pairs of mitochondrial DNA 12S rRNA sequences, and their morphological description were presented. The two leptocephali were identified to *Gymnothorax minor* based on genetic distance ($d=0.000$), being well consistent with that of *G. minor* adult collected off Tongyeong. *Gymnothorax minor* leptocephali are characterized by morphological combinations: total myomeres 137~139, predorsal myomeres 32, preanal myomeres 82~86, body depth in total length more than 10%.

Key words : *Gymnothorax minor*, leptocephalus, identification, Muraenidae, 12S rRNA

서 론

곰치과 어류(Muraenidae)는 뱀장어목(Anguilliformes) 어류의 구성원인 뱀장어과(Anguillidae), 바다뱀과(Ophichthidae), 봉장어과(Congridae), 갯장어과(Muraenesocidae), 긴꼬리장어과(Synphobranchidae) 어류와 유사하게 버들잎 모양의 엽상자어(=엽형유생) 시기(leptocephalus stage)를 가진다(Nelson, 2006). 뱀장어목 어류의 엽상자어기에 종을 구분하는 주요 형태형질인 근절수는 성어의 척추골수와 잘 일치하며(Castle, 1965; Smith, 1989), 이는 분자 연구로 입증된 바 있다(지와 김, 2010; 지 등, 2011; Ji *et al.*, 2012).

곰치과(Muraenidae) 어류의 엽상자어는 가슴지느러미가 매우 작아 다른 분류군의 엽상자어와 잘 구분된다(Castle, 1984; Smith, 1989). 곰치과 어류의 엽상자어에 관한 연구는 *Muraena* sp.의 형태(Nair, 1947), 7속(*Anarchias*, *Channomuraena*, *Uropterygius*, *Enchelycore*, *Gymnothorax*, *Muraena*,

Thyrsoidea)에 관한 형태(Castle, 1984), 대서양산 곰치류(Smith, 1989), 일본산 6개 미동정 분류군(Tabeta and Mochioka, 1988) 등 다양하다. 그러나 이들 분류군의 형태정보가 여전히 부족하고, 근절수가 중복될 경우 종분석은 사실상 어려운 실정이다. 최근, 야생에서 채집된 곰치과 엽상자어의 실내 사육을 통한 발생단계별 형태특징(Tawa and Mochioka, 2009; Tawa *et al.*, 2012a), *Scuticaria tigrina* 엽상자어의 형태 및 분자동정(Tawa *et al.*, 2012b) 등 다양한 방법으로 종을 분석하고 있다.

자치어는 발생단계별 형태특징이 급격히 변한다(Kendall *et al.*, 1984). 엽상자어는 일반 어류와 달리 성어기의 형태와 완전히 다르기 때문에 성어와의 형태 비교를 통한 종동정이 사실상 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 분자마커를 이용한 종 동정 방법이 최근 주목받고 있다(지와 김, 2010; Ji *et al.*, 2012; Tawa *et al.*, 2012b; Ko *et al.*, 2013).

따라서 본 연구는 제주도 연안에서 채집된 곰치과 엽상자어 2개체를 대상으로 분자분석에 의한 종동정 결과를 제시하고, 형태 특징을 상세히 기재하고자 한다.

*Corresponding author: Jin-Koo Kim Tel: 82-51-629-5927,
Fax: 82-51-629-5931, E-mail: taengko@hanmail.net

재료 및 방법

2011년 8월 한국 제주 주변해역 (N32° 23'53", E125° 46' 54")에서 곱치과 엽상자어로 추정되는 2개체 (전장 36.2~69.2 mm)를 RN80 네트(망구 직경 80 cm, 망목 0.333 mm)로 채집하였다. 채집 후 70% 에탄올에 고정하였으며, 이후 부경대학교 (Pukyong National University, PKU) 어류학실험실 (Ichthyology laboratory collection)에 등록, 보관하였다. 몸의 각 부위의 계수 및 계측은 Tabeta and Mochioka (1988)의 방법을 따랐으며, 입체현미경 (Olympus SZX-16, Japan) 하에서 관찰하였고, 0.1 mm 단위까지 측정하였다. 흑색소포의 각 부위의 명칭은 Tawa and Mochioka (2009)을, 이빨 배열식은 Castle (1984)을 따랐다.

정확한 종 동정을 위해 우측 눈알을 떼 내어 Chelex resin 100 용액 (Bio-rad)으로 genomic DNA를 추출하였다. 미토콘드리아 DNA 12S rRNA 영역은 12L-F (5'-TTTCATGTTTCCTTGCGGTAC-3')와 12S-R (5'-CCTTCCGGTACACTT-ACCATGTTA-3') 프라이머 (Wang *et al.*, 2002)를 이용하여 증폭하였다. 10X PCR buffer 5 µL, 2.5 mM dNTP 4 µL, 12S-L primer 5 µL, 12S-R primer 5 µL, FX Taq DNA polymerase (GnP, Korea) 0.5 µL를 섞은 혼합물에 genomic DNA 5 µL (100 ng)를 첨가한 후 총 50 µL가 될 때까지 3차 증류수를 넣고 Thermal cycler (Bio-rad MJ mini PTC-1148, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Initial denaturation 94°C에서 5분; PCR reaction 35 cycles (denaturation 94°C에서 30초, annealing 50.0°C에서 30초, extension 72°C에서 1분); final extension 72°C에서 7분. 최종산물은 ExoSAP-IT (United States Biochemical Corporation, USA)을 이용하여 정제하였으며, Big Dye terminator (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 direct cycle sequencing을 실시하였다. DNA 염기서열은 자동염기서열분석기 (Applied Biosystems, USA)를 이용해서 결정하였으며, 결정된 염기서열은 DDBJ/EMBL/GenBank에 등록하였다 (등록번호: 곱치과 엽상자어, JX313648-JX313649; 나망곱치 성어, JX313650).

미토콘드리아 DNA 12S rRNA 염기서열은 BioEdit version 7의 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하였다. 비교그룹으로 2009년 8월 한국 남해의 통영에서 채집된 나망곱치 (*Gymnothorax minor*) 성어와 NCBI (National Center for Biotechnology, Information)에 등록된 곱치과 어류 7종의 염기서열을 이용하였다. 외집단으로는 바다뱀과의 날붕장어 (*Echelus uropterus*)와 붕장어과의 붕장어 (*Conger myriaster*)를 이용하였다. 유전거리는 Mega4 (Tamura *et al.*, 2007)에서 Kimura-2-parameter 모델 (Kimura, 1980)로 계산하였다. 근린결합수 (Neighbor joining tree)는 Mega4를 이용하여 작성하였고, bootstrap은 10,000번 수행하였다.

결 과

1. 형태기재

전장 36.2~69.2 mm 엽상자어 (n=2, PKU 6568, 6599)의 전체 근절수는 137~139개, 향문앞 근절수는 82~86개이며, 등지느러미앞 근절수는 모두 32개이다. 36.2 mm 엽상자어에서 머리와 주둥이 사이는 약간 오목하게 만입되어 있지만, 69.2 mm 엽상자어에서는 둥글게 된다 (Fig. 2A, B). 눈은 크고 머리의 척추 중앙에 위치하며, 눈의 앞쪽에 2개의 콧구멍이 떨어져 있다. 양턱의 선단부는 동일한 위치에 있고, 양턱에는 길고 날카로운 이빨이 1열로 나 있다. 양턱의 이빨 배열식은 36.2 mm 엽상자어에서는 $\frac{1+IV+3}{1+IV+3}$ 이며, 69.2 mm 엽상자어에서는 $\frac{1+V+3}{1+V+3}$ 으로 증가하였다.

36.2 mm 엽상자어에서 두장은 전장의 8.3%, 체고는 전장의 10.2%, 향문전장은 전장의 73.0%로 향문은 몸의 중앙보다 뒤쪽에 위치하며, 69.2 mm 엽상자어에서는 두장은 전장의 5.8%로 약간 감소하였고, 체고는 전장의 11.6%로 약간 증가하였으며, 향문전장은 전장의 70.4%로 약간 감소하였다 (Table 1).

지느러미 발달에서는 36.2 mm 엽상자어에서는 지느러미 줄기는 형성되지 않았으나, 막상으로 존재하며, 69.2 mm 엽상자어에서는 등지느러미 줄기와 뒷지느러미 줄기가 나타났다 (Fig. 1B). 수직혈관은 36.2 mm 엽상자어에서는 12개, 69.2 mm 엽상자어에서는 20개 있고, 첫번째는 5~6번째 근절, 마지막은 80~82번째 근절에 위치한다.

몸은 완전히 투명하고 머리와 몸의 일부에만 흑색소포가 있다 (Figs. 1A, 2A, B). 점모양의 흑색소포는 머리의 콧구멍 (no), 주둥이 배쪽 (vsr), 머리 등쪽 (shb)과 후방 배쪽 (pvb), 아래턱의 배쪽 (vslj)과 뒤쪽 (plj), 목의 배쪽 (vt), 아가미두껍 (op), 목에서 담낭 사이 (tg), 근절 사이 (sc)에 있다 (Fig. 2A, B). 흑색소포는 척추중앙을 따라 꼬리지느러미 앞까지 1열로 나 있고, 36.2 mm 엽상자어에서는 막지느러미 등쪽 가장 자리를 따라 꼬리지느러미 끝까지 1열, 69.2 mm 엽상자어에서는 등지느러미와 뒷지느러미 가장 자리를 따라 꼬리지느러미 끝까지 1열로 나 있다. 담낭의 전반부 소화관 배쪽으로 흑색소포가 1열로 나 있지만 담낭의 후반부부터 소화관의 등과 배쪽 가장 자리에 각각 1열로 점모양의 흑색소포가 향문까지 분포한다.

2. 분자동정

제주산 엽상자어 2개체의 12S rRNA 742 bp 염기서열이 통영산 나망곱치 (*Gymnothorax minor*) 성어의 염기서열과 100% 일치하였다. 나망곱치의 종내 유전적 변이는 중간 유



Fig. 1. Lateral view of *Gymnothorax minor*, Jeju Island from Korea. TL=36.2 mm (A), TL=69.2 mm (B). Scale bars=4.0 mm. DO indicates dorsal origin.

Table 1. Comparisons of measurements and counts among *Gymnothorax minor* leptcephali

	PKU 6568 (Present study)	PKU 6599 (Present study)	<i>Gymnothorax minor</i> (Tawa and Mochioka, 2009)
Total length (mm, TL)	36.2	69.2	40.2~74.6
In % of total length			
Head length	8.3	5.8	4.7~6.7
Predorsal length	—	27.3	25.8~35.6
Preanal length	73.0	70.4	70.2~80.1
Body depth	10.2	11.6	11.9~16.7
In % of Head length			
Eye diameters	20.0	20.0	—
Snout length	36.8	25.0	—
Upper jaw length	50.0	37.6	—
Counts			
Total myomeres	137	139	135~142
Predorsal myomeres	—	32	31~42
Preanal myomeres	82	86	87~95
1st vertical blood vessel	5	6	6~18
Last vertical blood vessel	80	82	77~85
Number of nostrill	2	2	2
Dentition formular	$\frac{1+IV+3}{1+IV+3}$	$\frac{1+V+3}{1+V+3}$	$\frac{1+V-VI+5-10}{1+V-VIII+2-6}$

전적 변이 1.5~10.0%보다 작아 종을 구분할 수 있는 분자 지표로 판단된다. 근린결합수(Neighbor joining tree)를 통해 제주산 엽상자가 나망곰치 성어와 일직선상에 유집되었고, 곰치 (*G. kidako*) 및 *G. polygonius*와는 비교적 근연관계에 있다. 상위분류군 간의 유연관계를 살펴보면, 곰치과 어류가 봉장어과 어류와 최대 유전거리 27.1%를 보인 반면, 바다뱀과 어류와는 최대 21.2% 차이를 보여 (Table 2), 곰치과 어류는 봉장어과 어류보다 바다뱀과 어류에 보다 가까

웠다 (Fig. 3). 따라서 유전자 염기서열정보에 근거하여 엽상자어 2마리 모두 나망곰치로 동정하였다.

고찰

제주산 엽상자어 2개체의 분자동정 결과, 나망곰치의 엽상자어로 확인되었다. 또한, 제주산 엽상자어의 전체 근절수

Table 2. Genetic distance among two *Gymnothorax minor* (1~2) and 8 muraenids (3~10) with two outgroup (11~12)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
Leptocephalus sp. A (1)											
Leptocephalus sp. B (2)	0.000										
<i>Gymnothorax minor</i> (3)	0.000	0.000									
<i>Gymnothorax kidako</i> (4)	0.077	0.077	0.077								
<i>Gymnothorax polygonius</i> (5)	0.077	0.077	0.077	0.015							
<i>Gymnothorax flavimarginatus</i> (6)	0.100	0.100	0.100	0.089	0.087						
<i>Gymnothorax miliaris</i> (7)	0.085	0.085	0.085	0.089	0.087	0.099					
<i>Muraena augusti</i> (8)	0.097	0.097	0.097	0.098	0.092	0.101	0.119				
<i>Muraena helena</i> (9)	0.085	0.085	0.085	0.094	0.089	0.085	0.104	0.045			
<i>Enchelycore anatina</i> (10)	0.095	0.095	0.095	0.110	0.105	0.108	0.097	0.127	0.108		
<i>Echelus uropterus</i> (11)	0.212	0.212	0.212	0.220	0.205	0.196	0.212	0.207	0.207	0.208	
<i>Conger myriaster</i> (12)	0.266	0.266	0.266	0.263	0.260	0.256	0.252	0.271	0.264	0.264	0.218

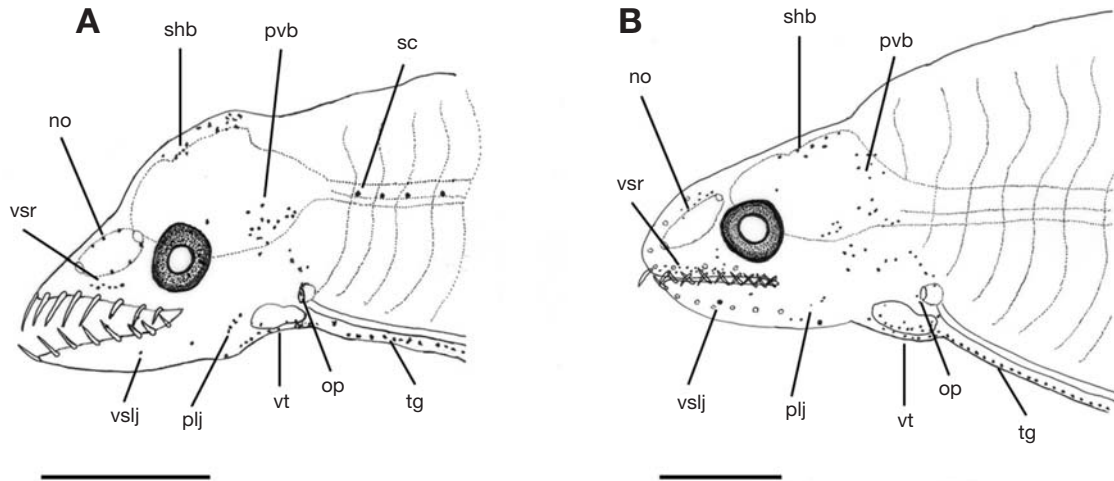


Fig. 2. Lateral view of head of *Gymnothorax minor* leptocephalus, Jeju Island from Korea. TL=36.2 mm (A), TL=69.2 mm (B). No: nasal organ; op: opercular region; plj: posterior margin of lower jaw; pvb: posterior ventral surface of brain; shb: dorsal surface of head and brain; tg: throat to posterior margin of gall bladder; vsr: ventral surface of rostrum; vslj: ventral surface of lower jaw; vt: ventral portion of throat; sc: spots per myomere. Scale bars=1.5 mm.

(137~139개)는 남해에서 채집된 성어 나망곰치의 척추골수(139개)와 잘 일치하는 결과를 보였다(Table 1; Kim *et al.*, 2012). 제주산 나망곰치 엽상자어는 일본산 나망곰치 엽상자어의 전체 근절수(135~142)와 잘 일치하나(Table 1; Fig. 2; Tawa and Mochioka, 2009), 항문 앞 근절수(국내산은 82~86, 일본산은 87~95)에서는 차이를 보였다(Table 1). 이러한 차이는 성장에 따른 변화나 적은 표본 수, 또는 개체변이일 가능성도 있다.

나망곰치 엽상자어는 흑색소포 분포에서 곰치과 어류의 유사 분류군과 잘 구분된다. 엽상자어 시기에 곰치속 어류의 흑색소포는 머리와 척색 중앙, 담낭 앞쪽 소화관 배쪽에 1열, 담낭 뒤쪽 소화관의 등쪽 및 배쪽 가장자리에 각각 1열 나 있고, 등지느러미와 뒷지느러미 기부를 따라 1열, 등지느러미 기점 앞쪽, 막지느러미 등 나망곰치 엽상자어는 흑색소포 분포에서 곰치과 어류의 유사 분류군과 잘 구분

된다. 엽상자어 시기에 곰치속 어류의 흑색소포는 머리와 척색 중앙, 담낭 앞쪽 소화관 배쪽에 1열, 담낭 뒤쪽 소화관의 등쪽 및 배쪽 가장자리에 각각 1열 나 있고, 등지느러미와 뒷지느러미 기부를 따라 1열, 등지느러미 기점 앞쪽, 막지느러미 등쪽에 1열로 나 있다(Castle, 1984; Tawa and Mochioka, 2009).

본 연구에서 제주산 나망곰치 엽상자어는 곰치속 어류의 엽상자어기의 흑색소포 분포 특징과 잘 일치하나, 69.2 mm 엽상자어에서는 척색 중앙의 흑색소포가 꼬리말단에만 관찰되는 점에서 약간 달랐다. 즉, 나망곰치 엽상자어는 성장하면서 머리 뒤쪽 척색 중앙의 흑색소포가 사라지고, 변태 직후가 되어야 비로소 체측에 수십 개의 가로띠가 형성된다(Tawa and Mochioka, 2009). 이와 같이 나망곰치는 체형 뿐만 아니라 흑색소포의 분포 유형도 급격하게 변하는 것으로 추정된다.

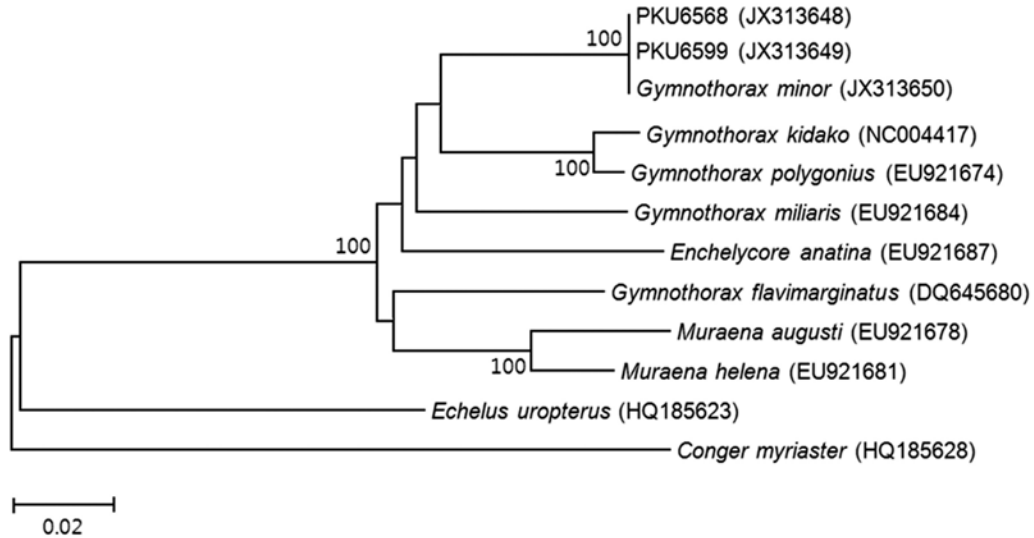


Fig. 3. Neighbor-joining tree based on partial mt 12S rRNA nucleotide sequences showing the relationships among 2 muraenids leptocephali and 8 species of muraenids adults with 2 outgroups. The Neighbor-joining tree using the Kimura-2-parameter distance model. 10,000 replications of bootstrap. Bar indicates genetic distance of 0.02.

한편, 알락곰치속 (*Enchelycore*) 업상자어는 머리와 척색 중앙, 소화관에 흑색소포가 없어 (Castle, 1984) 곰치속 어류의 업상자어와 잘 구분된다. 또한, *Muraena*속 업상자어는 머리와 척색 중앙에 흑색소포가 있는 점에서 곰치속 어류의 업상자어와 유사하나 담낭 뒤쪽 소화관 등쪽의 흑색소포 (나망곰치는 1열, *Muraena*속은 없음) 및 막지느러미 등쪽 흑색소포 (나망곰치는 1열, *Muraena*속은 없음)에서 잘 구분된다 (Castle, 1984).

요 약

한국 제주도에서 채집된 곰치과 (Muraenidae) 업상자어 2 개체 (전장 36.2~69.2 mm)를 대상으로 mtDNA 12S rRNA 724 base pair 염기서열을 분석한 결과, 한국 통영에서 채집된 나망곰치 (*Gymnothorax minor*) 성어와 100% 일치하였다. 나망곰치 업상자어는 전체 근절수가 137~139개, 등지느러미 앞 근절수가 32개, 항문앞 근절수가 82~86개, 전장에 대한 체고가 10% 이상인 형태적 특징을 나타내었다.

사 사

이 연구는 국립수산물연구원 (2013년 제주 주변 연근해어업 및 환경생태조사, RP-2013-FR-006)의 지원에 의해 수행되었습니다. 본 논문의 보다 높은 질적 수준을 위해 세심하게 검토하여 주신 익명의 세분 심사위원께 감사드립니다.

인 용 문 헌

지환성 · 김진구. 2010. 남해에서 채집된 바다뱀과 업상자어 (Leptocephali)의 형태 및 분자동정. 한국어류학회지, 22: 279-284.

지환성 · 이수정 · 김진구. 2011. 날뿔장어 (*Echelus uropterus*) 업상자어의 분자동정, 개체발생 및 진화학적 고찰. 한국어류학회지, 23: 217-224.

Castle, P.H.J. 1965. Muraenid leptocephali in Australasian Waters. Trans. Roy. Soc. N.Z. Zool., 7: 57-84.

Castle, P.H.J. 1984. Notacanthiformes and Anguilliformes: Development. In: Moser, H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall and S.L. Richardson (eds.), Ontogeny and Systematics of Fishes. Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol., Lawrence, pp. 62-93.

Ji, H.S., H.W. Lee, B.K. Hong and J.K. Kim. 2012. Four newly reported ophichthid leptocephali species revealed by mitochondrial 12S rDNA, with implications of their occurrence in Korea. Anim. Cells. Syst., 16: 415-424.

Kendall, A.W., E.H. Ahlstrom and H.G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser, H.G., W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall and S.L. Richardson (eds.), Ontogeny and Systematics of Fishes. Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol., Lawrence, pp. 11-22.

Kim, S.Y., H.S. Ji and J.K. Kim. 2012. Review of the scientific name and redescription of the banded moray eel, previously reported as *Gymnothorax reticularis* (Muraenidae, Anguilliformes) in Korea. Korean J. Ichthyol., 24: 292-296.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucle-

- tide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120.
- Ko, H.L., Y.T. Wang, T.S. Chiu, M.A. Lee, M.Y. Leu, K.Z. Chang, W.Y. Chen and K.T. Shao. 2013. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 8(1): e53451. doi:10.1371/journal.pone.0053451.
- Nair, R.V. 1947. On the metamorphosis of two leptocephali from the Madras plankton. *Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B*, 25: 1-14.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the world*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 601pp.
- Smith, D.G. 1989. Family Muraenidae: leptocephali. In: Böhlke, E.B. (ed.). *Fishes of the Western North Atlantic*. Mem. Sears Found. Mar. Res., 1: 900-916.
- Tabeta, O. and N. Mochioka. 1988. Family Muraenidae. In: Okiyama M. (ed.), *An Atlas of the Early Stage Fishes in Japan*. Tokai Univ. Press, Tokyo, pp. 37-42.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.
- Tawa, A. and N. Mochioka. 2009. Identification of aquarium-raised muraenid leptocephali, *Gymnothorax minor*. *Ichthyol. Res.*, 56: 340-345.
- Tawa, A., H. Kishimoto, T. Yoshimura and N. Mochioka. 2012a. Larval identification following metamorphosis in the slender brown moray *Strophidon ui* from the western North Pacific. *Ichthyol. Res.*, 59: 8-13.
- Tawa, A., M. Kobayakawa, T. Yoshimura and N. Mochioka. 2012b. Identification of leptocephalus larvae of the tiger moray *Scuticaria tigrina* (Anguilliformes; Muraenidae) based on morphometric and genetic evidence. *Ichthyol. Res.*, 59: 378-383.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Wang, C.H., C.H. Kuo, H.K. Mok and S.C. Lee. 2002. Molecular phylogeny of elopomorph fishes inferred from mitochondrial 12S ribosomal RNA sequences. *Zool. scr.*, 32: 231-241.