

# 한국고유종 북방종개(어류강, 미꾸리과)의 집단유전학적 구조<sup>1a</sup>

장숙진<sup>2</sup> · 고명훈<sup>3</sup> · 권예슬<sup>4</sup> · 원용진<sup>2,3\*</sup>

## Population Genetic Structure of the Korean Endemic Species, *Iksookimia pacifica* (Pisces: Cobitidae) Distributed in Northeast Korea<sup>1a</sup>

Sook-Jin Jang<sup>2</sup>, Myeong-Hun Ko<sup>3</sup>, Kwan Ye-seul<sup>4</sup>, Yong-Jin Won<sup>2,3\*</sup>

### 요 약

북방종개(*Iksookimia pacifica*)의 유전적 다양성과 구조적 특징을 밝히기 위해 동해 독립하천들에 서식하는 10개의 집단들을 대상으로 핵유전자와 미토콘드리아 유전자에 기반한 집단유전학적 분석을 실시하였다. 일부 예외적인 경우를 제외하고, 미토콘드리아와 핵유전자 모두 통계적으로 유의미한 집단 간 유전적 분화가 관찰되었다. 핵유전자들의 DNA 서열자료에서 추출한 유전자형 자료를 Bayesian 방법으로 분석한 결과 북방종개는 천진천과 양양남대천을 기준으로 북쪽과 남쪽의 두 개의 그룹으로 나뉘는 구조를 보였다. 현재 동해 하천들이 지리적으로 단절되어 온 독립 수계라는 것을 감안했을 때, 남북으로 구별되는 집단유전적 구조는 북방종개가 한반도에 정착했던 초기 조상 집단이 남북으로 갈라지는 지리적인 분리 사건과 관련되었을 것으로 해석되며, 이러한 초기 조상집단의 지리적 분리 이후, 두 조상 그룹들은 남북의 지리적인 범위 내에서 하천 별 고립에 따른 추가적인 분화 과정을 거쳤을 것으로 추정된다. 주목할 점은, 자산천 집단의 많은 개체들이 지리적 거리가 먼 양양남대천 및 강릉남대천 집단과 하나의 유전적 cluster를 형성하고 있는 것이다. 이와 함께 미토콘드리아 유전자의 경우 몇몇 이웃하는 집단들 사이에 현저히 낮은 유전적 분화도 그리고 일부 집단들에서 매우 낮은 유전적 다양성이 관찰되었다. 본 집단유전학적 결과는 향후 북방종개의 보존 및 관리를 위한 기초자료로 제시될 것이다.

주요어: 핵 유전자, 미토콘드리아 유전자, 유전적 클러스터, 도입

### ABSTRACT

Population genetic studies of 10 groups of *Iksookimia pacifica* were conducted to investigate the genetic diversity and population genetic structure across its known range in South Korea. Population DNA sequences of one mitochondrial gene (*mtCOI*) and three nuclear genes (*IRBP*, *EGR2B*, *RAG1*) were examined in samples collected from ten streams that flow into the East Sea. Both mitochondrial and nuclear sequences exhibited significant differentiation among populations except a few cases. The Bayesian analysis of the multi-locus

1 접수 2017년 5월 17일, 게재확정 2017년 9월 11일

Received 17 May 2017; Accepted 11 September 2017

2 이화여자대학교 에코크리에티브 협동과정 Interdisciplinary Program of EcoCreative, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

3 이화여자대학교 에코과학부 Division of EcoScience, Ewha Womans University, Seoul, 120-750, Korea

4 국립낙동강생물자원관 Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 742-350, Korea

a 이 논문은 국립생물자원관에서 추진하는 “자생 생물자원의 유전자 다양성 연구” 사업에서 지원하는 “주요 동물자원의 유전자(체) 다양성 연구(NIBR201403102)” 과제로 수행되었으며, 또한 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2015R1A2A2A01007117)

\* 교신저자 Corresponding author: Tel: 02)3277-4630, Fax: 02)3277-2385, E-mail: won@ewha.ac.kr

genotypes inferred from the DNA sequences of nuclear genes clustered the individual fish largely into two geographical groups: a northern group (from Baebong stream to Cheonjin stream) and a southern group (Yangyangnamdae stream to Gangneungnamdae stream). Given that the streams flowing into the East Sea are geographically isolated water systems, such separation of genotypes can be interpreted by the geographical separation of common ancestors into north and south that had colonized South Korea. Since the initial geographical separation of the ancestral population by north and south, the ancestral groups seem to have experienced further differentiation into the current genetic clusters through the physical isolation of streams by the East Sea in each region. It is notable that many individuals in the Jasan stream formed a genetic cluster with those of Yangyangnamdae and Gangneungnamdae streams which are distant from each other. In addition, mitochondrial gene showed low genetic differentiation between some neighboring populations and very low level of genetic diversity in several populations. The present population genetic study will provide valuable information for the conservation and management of the Korean endemic fish species, *I. pacifica*.

**KEY WORDS: NUCLEAR GENES, MITOCHONDRIAL GENE, GENETIC CLUSTERS, INTRODUCTION**

## 서 론

북방종개(*Iksookimia pacifica*)는 잉어목(Cypriniformes), 미꾸리과(Cobitidae)에 속하는 참종개속(*Iksookimia*) 어류로, Kim *et al.* (1999)에 의해 기름종개속(*Cobitis*)의 “*Cobitis pacifica*”로 신종 보고 되었으나, 이후 반문 및 형태적 특징을 근거로 참종개속으로 전속되었다(Kim, 2009). 북방종개는 분포구계상 참종개속 어류 중 유일하게 동북한 아지역(Northeast Korea subdistrict)에 서식하는 우리나라 고유 어종으로, 동해안의 강릉남대천 이북의 독립 하천들에 서식한다(Kim, 1997; Kim, 2009). 주로 유속이 느리고 하상이 모래로 이루어진 곳에 서식하여 자갈과 돌바닥에 서식하는 다른 참종개속 어류와 차이를 보인다(Kim, 1997; Choi and Byeon, 2009; Ko, 2015).

북방종개가 서식하는 동해안 하천들은 길이가 짧으며 각 하천들이 오랫동안 격리되어 온 독립하천들로, 이곳에 서식하는 어류 종들 또한 고립된 환경에 적응하여 제한된 개체군의 크기를 유지해 오면서 각 하천의 집단들은 서로 다양한 지리적 유전자 분화(geographical genetic differentiation) 양상을 보여왔다(Jang *et al.*, 2006; Bae and Suk, 2015). 특히적으로, 동해안 지역은 2002년부터 2003년까지 연속적인 대형 태풍으로 인해 심각한 홍수가 일어났으며 이로 인해 서식지가 교란되고 홍수 복구과정에서 많은 어종들이 자원복원 차원에서 무분별하게 방류된 바 있으며, 최근에 많은 종들이 유입된 것으로 보고되고 있다(Yoon and Kim, 2004; Lee *et al.*, 2010; Ko and Bang, 2013; Byeon and Oh, 2015).

지금까지 보고된 북방종개에 관한 연구는 형태 분류학적

연구(Kim *et al.*, 1999; Kim, 2009)와 핵형분석(Kim and Lee, 1986), 초기생활사(Lee *et al.*, 2011), 생태적 특성(Choi and Byeon, 2009; Ko, 2015; Ko and Won, 2016), 난막구조(Kim and Park, 1995) 등이 있으며, 한국의 어류적 색목록집에서 하천공사로 서식지가 교란되어 관심대상종(Least Concern, LC)으로 평가된 바 있다(NIBR, 2011). 유전자에 기반한 연구는 계통 유전학적 연구(Šlechtová *et al.*, 2008; Kwan, 2015; Perdices *et al.*, 2016)가 있으나, 집단유전학적 분석에 대한 연구는 아직까지 수행되지 않았다. 집단유전학적 연구는 집단별 유전자 다양성 및 집단 구조의 정보 등을 제공하기 때문에, 우리나라 멸종위기어종 및 한국고유어종 등에서 종 복원 및 보전 관리의 중요한 연구 분야로 활용되어왔다(ME, 2009a, 2009b, 2011a, 2011b; MLTM, 2010, 2011).

따라서 본 연구에서는 한국고유종 북방종개의 집단유전학적 연구를 통해 동해 각 하천들에 서식하는 북방종개 집단들 간의 유전자 다양성 및 집단 간 분화 양상을 확인하여 생물학적 특징을 밝히고, 더불어 보전 및 관리방안을 제시하고자 하였다.

## 연구방법

### 1. 시료확보

북방종개(*Iksookimia pacifica*)의 표본은 2014년부터 2015년까지 강원도 일대에서 족대(망목 4×4 mm)를 사용하여 독립하천 10곳에서 북방종개를 채집하였다(Figure 1, Table 1). 집단유전학적 분석을 위한 표본 수는 Pluzhnikov

Table 1. Sampling location and number of specimens (N)

Stream (county, province)	Abbreviation	Lat(N)/Long(E)	N
Baebong S. (Goseong, Gangwon)	BB	38.538/128.403	10
Jasan S. (Goseong, Gangwon)	JS	38.440/128.422	10
Buk S. (Goseong, Gangwon)	BU	38.371/128.435	10
Nam S. (Goseong, Gangwon)	NA	38.381/128.487	10
Oho S. (Goseong, Gangwon)	OH	38.327/128.525	10
Cheonjin S. (Goseong, Gangwon)	CJ	38.262/128.549	10
Yangyang namdae S. (Yangyang, Gangwon)	YN	38.072/128.624	10
Sangun S. (Yangyang, Gangwon)	SU	38.044/128.688	10
Yeongok S. (Gangneung, Gangwon)	YG	37.856/128.840	10
Gangneung namdae S. (Gangneung, Gangwon)	GN	37.746/128.881	10

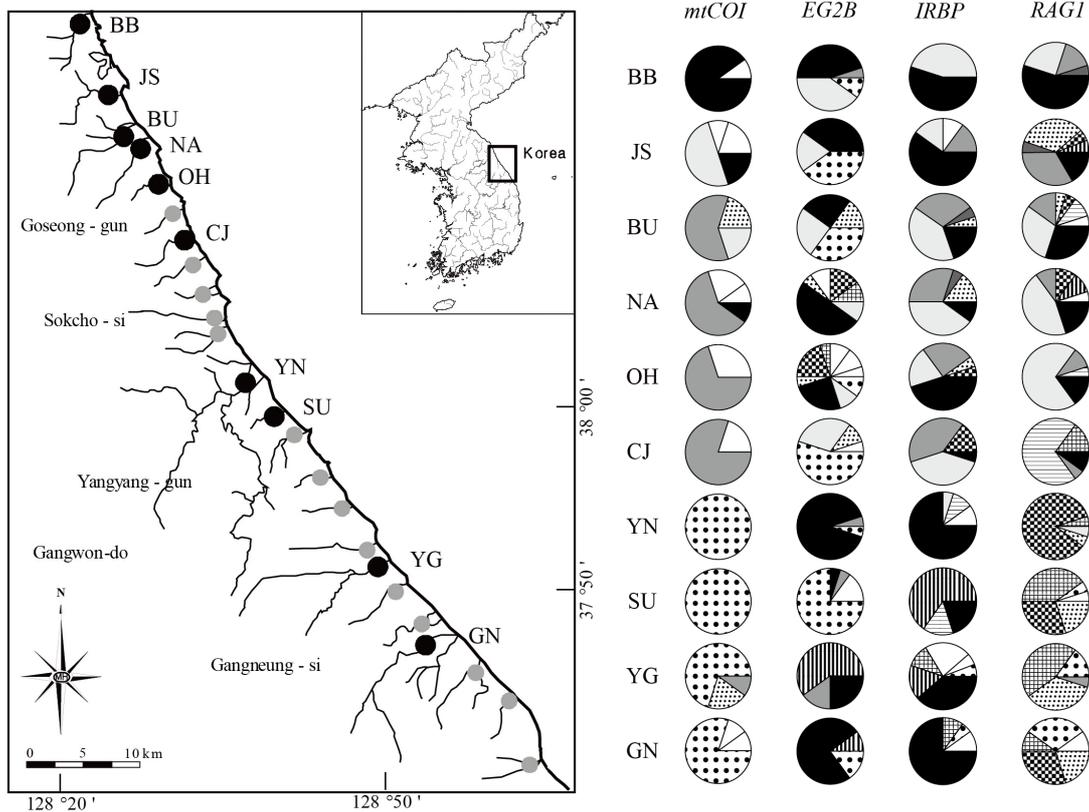


Figure 1. Map of sampling sites and allele frequencies of four different loci in ten populations of *Iksookimia pacifica*. Black circles in the map represent streams sampled and grey circles represent streams where no *I. pacifica* was observed in our field survey during 2014 and 2015. The abbreviation indicating the sampled sites corresponds to the list in Table 1. The black and white and different hatching patterns of the circles in the right panel represent different alleles; the white color represents private alleles seen only at that single locality, and different private alleles are separated by a black line

and Donnelly (1996)와 Hudson (2000), Felsenstein (2006) 이 제시한 통계적 검증력을 고려하여 하천 별로 10개체씩을 무작위로 선정하여 20개의 반수체가 포함되도록 하였다. DNA 분석을 위해 가슴지느러미와 배지느러미 1개씩을 절단하여 99% 알코올에 고정하였으며, 나머지 표본은 10% 포르말린 수용액에 고정하여 표본을 제작하였다.

## 2. DNA 염기서열 확보

표본의 genomic DNA는 DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였으며, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하여 DNA 서열을 확보하였다. 1개의 미토콘드리아 유전자 좌위 *mtCOI* (Cytochrome-c-oxidase subunit I)와 세 개의 핵 유전자 좌위 *EGR2B* (Early growth response 2B), *IRBP* (Interphotoreceptor retinoid-binding protein), *RAG1* (Recombination activating gene 1)에 대해 유전자 서열을 확보하였다. 이때 핵유전자의 경우 2n이므로 개체당 2개의 반수체를 각각 확보하여 분석하였다. 본 연구에서는 사용한 미토콘드리아 유전자는 핵유전자에 비해 빠른 유전자 변이 속도로 인해 비교적 짧은 시간 내에 발생하는 중 내 집단 간 분화 및 유전 변이에 대한 정보를 포함하고 있어 일반적으로 중내 집단유전학 연구에서 많이 사용되는 반면, 주로 모계유전을 통해서만 다음 세대로 전달되어 부계를 통해 전달되는 유전 정보를 설명하지 못하기 때문에 이러한 단점을 보완하기 위해 핵유전자 좌위들을 같이 분석에 사용하였다(Avise, 2004; Beebe and Rowe, 2008). 중합효소 연쇄 반응은 nested PCR 방식으로 실시하였고 각 마커의 PCR 조건은 아래에 자세히 기술하였다. 1차와 2차 PCR의 조건은 *mtCOI* 서열을 제외하고 모두 동일하였다. *mtCOI* 마커의 조건은 initial denaturation 95°C에서 5분; PCR reaction 35 cycles (denaturation 94°C에서 1분, annealing 50°C에서 1분(2차 PCR에서는 55°C로 1분, extension 72°C에서 1분 30초); final extension 72°C에서 5분이었다. *IRBP* 마커의 조건은 initial denaturation 95°C에서 4분; PCR reaction 35 cycles (denaturation 95°C에서 40초, annealing 53°C에서 40초, extension 72°C에서 1분 5초); final extension 72°C에서 7분이었다. *EGR2B* 서열의 경우에는 *IRBP* 서열 조건과 동일하였으나, PCR reaction 35 cycles 중 annealing 단계의 온도만 55°C로 달랐다. *RAG1* 마커의 조건은 initial denaturation 95°C에서 5분; PCR reaction 35 cycles (denaturation 94°C에서 1분, annealing 단계에서는 touchdown 방식으로 60°C에서 1분 30초로 시작하여 매 cycle마다 0.5°C씩 온도를 낮춰 진행하였으며, 최종적으로 55°C에 도달한 이후부터는 54°C로 온도를 낮추어 나머지 cycles을

진행, extension 72°C에서 1분 5초); final extension 72°C에서 7분이었다. PCR 과정 이후, ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 DNA 서열을 확보하였으며, Geneious v. 6.1.8 프로그램을 사용하여 확보한 서열을 수정하였다. 최종적으로 분자분석을 위해 사용된 염기서열의 길이는 *mtCOI*의 경우 852bp, *EGR2B*는 664bp, *IRBP*는 662bp, 그리고 *RAG1*은 790bp이었으며, 핵유전자 서열은 모두 exon 부분이었다. 핵유전자 서열들의 heterozygotic site들은 PHASE 프로그램을 통해 각각의 단상형(haplotype)으로 분리된 후 집단유전학적 분석을 위해 사용되었으며(Stephens *et al.*, 2001; Stephens and Donnelly, 2003), 분석에 사용된 모든 염기서열은 GenBank database에 등록되었다(accession numbers: KY651384-KY652079).

## 3. 집단유전학적 분석

집단유전학적 분석에 앞서, Genepop v. 4.2 프로그램을 이용하여 확보한 유전자 좌위들과 10개의 집단들에 대해 하디-와인버그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium) 및 핵유전자 좌위들 간의 연관불평형(Linkage disequilibrium)을 시험하였다(Rousset, 2008). 각 시험은 핵유전자 서열 자료를 genotype data로 변형시킨 후 유전자 빈도에 근거하여 실시되었으며, 시험의 통계적 유의성( $\alpha$ -value)은 Bonferroni 교정에 의해 계산되었다. 유전자 다양성 및 유전자 별 대립인자 수는 Arlequin v. 3.5 프로그램을 이용하여 계산하였으며(Excoffier and Lischer, 2010), 대립유전자 풍부도(Allele richness)는 Hp Rare v.1.1 프로그램의 Rarefaction 기법을 이용하여 계산하였다(Kalinowski, 2005). 대립유전자 풍부도 계산 시, 각 개체군마다의 대립유전자(allele) 수의 차이로 인해 발생할 수 있는 오류를 제거하기 위해 각 집단마다 계산에 사용하는 대립유전자 수를 10개로 통일시켰다.

각 집단 간 유전적 분화도(Genetic differentiation,  $F_{ST}$ )는 Arlequin v. 3.5 프로그램을 통해 계산하였으며(Excoffier and Lischer, 2010), 3개의 핵유전자 서열 자료들은 PGDSpider v.2.0.5.0를 이용하여 multi-locus genotype 데이터로 전환된 후 분석되었다(Lischer and Excoffier, 2012). 추가적으로 같은 프로그램을 이용하여 각 하천 별 지리적 거리와 각 집단 간의 유전적 분화도 간의 상관관계를 보기 위해 Mantel test를 실시하였으며, 각 집단 간 지리적 거리는 각 채집지역의 위도와 경도를 이용하여 채집지역 사이의 직선 거리를 이용하였다(GeoDatasource; <http://www.geodatasource.com/distance-calculator>).

복방종개 집단의 유전학적 구조를 살펴보기 위해 STRUCTURE v. 2.3.4 프로그램의 Bayesian admixture

Table 2. Genetic markers used in this study

Locus	Primer	Sequence (5'-3')	Reference	
<i>mtCOI</i>	1st	COI-1F	GCGTCTYTGGATTGCAATC	Lee <i>et al.</i> (2009)
		COI-1R	GCAATAATTATTGTRCATGT	
	2nd	COI-2F	CCACATTYTTTGACCCSGC	
		COI-2R	TGTGGGATGTGCCATTAAGC	
<i>EGR2B</i>	1st	E2B205F	ACTTRTCCTATYCCAGCAGCTT	Chen <i>et al.</i> (2008)
		E2B1108R	TTTTGTGTGTCTCTTTCTYTCGTC	
	2nd	E2B22F	TCCATTGACTCTCAGTACCCA	This study
		E2B784R	GGATGTGGGTCGTCAGGT	
<i>IRBP</i>	1st	IRBP115F	TKCTCACCAGAAARACTCACRGG	Liu <i>et al.</i> (2012)
		IRBP1021R	AGTTGTCTGCAACMAGTGYSGC	
	2nd	IRBP21F	CGCCAGCAGTAACACAGAAA	This study
		IRBP835R	CCAACCCTGGGATTTCCGG	
<i>RAG1</i>	1st	RAG-1F	AGCTGTAGTCAGTAYCACAARATG	Quenouille <i>et al.</i> (2004)
		RAG-RV1	TCCTGRAAGATYTTGTAGAA	Šlechtová <i>et al.</i> (2007)

model을 이용하였으며(Pritchard *et al.*, 2000; Hubisz *et al.*, 2009), 핵유전자 좌위들의 multi-locus genotype 데이터를 사용하였다(Lischer and Excoffier, 2012).  $K$  값의 범위를 1부터 10까지 하여 각  $K$  값마다  $1 \times 10^5$ 번의 burn-in과  $5 \times 10^6$ MCMC(MarkovchainMonteCarlo)를 각각 5번씩 반복하였으며, Evanno *et al.* (2005)의  $\Delta K$  값에 근거하여 가장 적합한  $K$  값을 도출하였다(Earl, 2012). STRUCTURE 분석 결과에 기반하여 10개의 집단들을 북쪽과 남쪽 그룹으로 나누는 후, Arlequin v. 3.5를 이용하여 AMOVA를 실시하였으며(Excoffier and Lischer, 2010), Arlequin v. 3.5과 HapStar v. 0.7 (Teacher and Griffiths, 2011)을 이용하여 ‘Minimum spanning tree’ 방식으로 haplotype network를 그렸다.

## 결 과

본 연구에서는 북방종개(*Iksookimia pacifica*) 10개 집단에 대한 유전학적 분석을 위해 1개의 미토콘드리아 유전자 좌위(*mtCOI*)와 3개의 핵 유전자 좌위(*EGR2B*, *IRBP*, *RAG1*)를 사용하였다. 3개의 핵유전자 좌위들을 시험해 본 결과, 통계적으로 유의미한 연관불평형 관계를 보이는 좌위는 없었다(Bonferroni correction;  $N=10$ ,  $\alpha < 0.005$ ). 본 연구에서 사용된 10개의 집단들은 자산천(JS) 집단만을 제외하고 모두 하디-와인버그 평형에서 벗어나지 않았으며(Bonferroni correction;  $N=10$ ,  $\alpha < 0.005$ ), 특히 각 집단에 대해 3개의 핵유전자 좌위를 별도로 고려하여 시험한 결과, 마찬가지로 *IRBP* 유전자 서열이 유일하게 자산천 집단에서 유의미한 이형접합자 감소

(heterozygote deficiency,  $F_{IS}$ )값을 보여 하디-와인버그 평형 가설을 기각하였다(Bonferroni correction;  $N=30$ ,  $\alpha < 0.001$ ) (Table 3).

4개의 유전자 좌위들에 대해 10개의 집단들은 거의 집단 내 1개 이상의 유전자 변이를 보였는데, 예외적으로 양양남대천(YN)과 상운천(SU) 집단은 다른 하천에 서식하는 집단임에도 불구하고 20개체 모두 동일한 미토콘드리아 유전자 서열을 지니고 있었다(Figure 1, Table 3). 그 중에서도 양양남대천(YN) 집단은 미토콘드리아 유전자를 포함한 모든 유전자에서 공통적으로 가장 낮은 유전자 다양성(gene diversity,  $H$ )을 보였다. 평균 유전자 다양성(Mean of  $H$ ) 역시 양양남대천(YN) 집단이 0.23으로 가장 낮았으며, 북천(BU) 집단이 0.74로 가장 높았다. 유전자 좌위 별 전체 대립유전자 수는 남천(NA) 집단이 22개로 가장 많은 유전자 수를 보유하고 있었으며, 배봉천(BB)과 양양남대천(YN)이 12개로 가장 적은 수를 보유하고 있었다. Rarefaction 방법에 기반한 대립유전자 풍부도 수치 역시 양양남대천(YN) 집단에서 2.13으로 가장 낮았으며, 반면 남천(NA) 집단이 4.40으로 가장 높았다.

10개의 북방종개 집단들 간의 유전적 분화도( $F_{ST}$ )를 살펴본 결과(Table 4), 대체적으로 유의미한 유전적 분화가 관찰되었다. 먼저 3개의 핵유전자 genotype data는 북방종개 10개의 집단이 대부분 서로 유전적으로 유의미하게 분화되어 있음을 보여주었다. 대체적으로 이러한 유의미한 집단 간 유전적 분화가 미토콘드리아 서열의 경우에도 나타났지만, 몇몇 인접한 하천 그룹들에서는 낮은 분화가 관찰되기

Table 3. Genetic diversity indices of four loci examined across ten populations

Indices <sup>1</sup>	BB	JS	BU	NA	OH	CJ	YN	SU	YG	GN	Total
<i>mtCOI</i> (N)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100
<i>k</i>	1	10	7	8	1	7	0	0	9	2	21
<i>a</i>	2	4	3	4	2	2	1	1	3	3	14
<i>H</i>	0.20	0.73	0.62	0.64	0.47	0.36	0.00	0.00	0.51	0.38	0.78
<i>EGR2B</i> (N)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	200
<i>k</i>	3	3	4	5	6	3	3	4	5	3	9
<i>a</i>	4	3	4	6	9	4	3	4	3	3	14
<i>H</i>	0.66	0.67	0.77	0.73	0.89	0.63	0.19	0.43	0.58	0.43	0.77
<i>F<sub>IS</sub></i> <sup>2</sup>	-0.14	-0.34	0.01	-0.07	0.06	0.01	0.00	-0.01	0.10	-0.05	
<i>IRBP</i> (N)	20	20	20	20	20	20	20	20	18	20	198
<i>k</i>	1	5	7	7	8	6	3	5	4	4	12
<i>a</i>	2	4	5	5	5	4	4	3	6	4	15
<i>H</i>	0.52	0.62	0.74	0.75	0.73	0.69	0.44	0.54	0.80	0.44	0.77
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0.38	0.88	-0.05	0.01	0.01	-0.12	-0.01	0.12	-0.15	-0.06	
<i>RAG1</i> (N)	20	18	20	20	20	20	20	20	20	20	198
<i>k</i>	6	8	10	10	7	7	7	7	3	8	17
<i>a</i>	4	6	7	7	4	4	4	5	4	5	14
<i>H</i>	0.64	0.78	0.82	0.76	0.50	0.50	0.28	0.74	0.68	0.80	0.88
<i>F<sub>IS</sub></i>	-0.04	0.20	-0.06	0.04	-0.10	-0.05	-0.01	0.14	-0.04	-0.03	
Total											
Total alleles	12	17	19	22	20	14	12	13	16	15	
Mean of <i>H</i>	0.51	0.70	0.74	0.72	0.65	0.54	0.23	0.43	0.64	0.51	
Allele richness <sup>2</sup>	2.66	3.78	3.99	4.40	3.90	2.95	2.13	2.67	3.53	3.29	
Pr( <i>F<sub>IS</sub></i> )	0.92	0.00	0.73	0.49	0.37	0.72	0.48	0.15	0.77	0.69	

<sup>1</sup>N, the number of haploid; *k*, the number of polymorphic sites; *a*, the number of allele; *H*, gene diversity; *F<sub>IS</sub>*, heterozygote deficiency, <sup>2</sup>Statistically significant values are bold (Significant level was corrected by Bonferroni method), <sup>3</sup>Rarefaction estimates of mean allelic richness for 4 loci based on minimum sample size of 10

도 하였다. 특히 북천에서 천진천까지의 집단들(북천(BB), 남천(NA), 오호천(OH), 천진천(CJ)) 사이와 양양남대천에서 강릉남대천까지의 집단들(양양남대천(YN), 상운천(SU), 연곡천(YG), 강릉남대천(GN)) 사이가 서로 유전적으로 분화하지 않았음을 보였다.

집단 간의 유전적 분화 정도가 지리적 거리와 상관관계가 있는지 알아보기 위해 Mantel test를 실시하였다. 그 결과, 핵유전자와 미토콘드리아 유전적 분화도 값 모두 집단 간 지리적 거리와 통계적으로 유의미한 상관관계를 보이지 않았다(핵유전자: Mantel's  $r=0.119$ ,  $P=0.266$ ; 미토콘드리아 유전자: Mantel's  $r=0.259$ ,  $P=0.075$ ).

STRUCTURE 결과에 따라 북방종개 10개의 집단은 천진천(CJ)과 양양남대천(YN)을 기준으로 북쪽과 남쪽으로

나뉘어지는 2개의 cluster를 형성하였다( $K=2$ ) (Figure 2). 북쪽 cluster에는 배봉천부터 천진천 사이에 위치한 집단들(배봉천(BB), 자산천(JS), 북천(BU), 남천(NA), 오호천(OH), 천진천(CJ))이 포함되며, 남쪽 cluster에는 양양남대천부터 강릉남대천까지의 집단들(양양남대천(YN), 상운천(SU), 연곡천(YG), 강릉남대천(GN))이 포함되었다. 특히 적으로 자산천 집단(JS)의 개체들은 지리적으로는 북쪽에 위치하고 있음에도 불구하고 절반 가량의 개체들이 남쪽 cluster에 속하는 것으로 관찰되었다. 이와 같이 남쪽 cluster의 유전형질을 공유하는 개체들을 좀 더 세밀히 알아보기 위해 더 큰  $K$ 값의 막대그래프를 관찰해본 결과, 그 절반의 이질적 개체들은 양양남대천과 강릉남대천 집단이 형성하는 cluster에 속하였다(Figure 2).

Table 4. Genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) of nuclear and *mtCOI* genes

$F_{ST}$	BB	JS	BU	NA	OH	CJ	YN	SU	YG	GN
BB		<b>0.375</b>	<b>0.756</b>	<b>0.831</b>	<b>0.948</b>	<b>0.756</b>	<b>0.988</b>	<b>0.988</b>	<b>0.722</b>	<b>0.964</b>
JS	<b>0.095</b>		<b>0.379</b>	<b>0.508</b>	<b>0.646</b>	<b>0.374</b>	<b>0.796</b>	<b>0.796</b>	<b>0.508</b>	<b>0.778</b>
BU	<b>0.056</b>	<b>0.066</b>		-0.011	0.131	-0.073	<b>0.848</b>	<b>0.848</b>	<b>0.476</b>	<b>0.828</b>
NA	<b>0.101</b>	<b>0.144</b>	0.025		0.074	-0.011	<b>0.894</b>	<b>0.894</b>	<b>0.535</b>	<b>0.873</b>
OH	<b>0.115</b>	<b>0.136</b>	<b>0.052</b>	0.036		0.131	<b>0.972</b>	<b>0.972</b>	<b>0.627</b>	<b>0.949</b>
CJ	<b>0.288</b>	<b>0.227</b>	<b>0.106</b>	<b>0.235</b>	<b>0.256</b>		<b>0.848</b>	<b>0.848</b>	<b>0.483</b>	<b>0.828</b>
YN	<b>0.361</b>	<b>0.281</b>	<b>0.358</b>	<b>0.326</b>	<b>0.364</b>	<b>0.530</b>		0.000	0.214	0.000
SU	<b>0.366</b>	<b>0.230</b>	<b>0.239</b>	<b>0.323</b>	<b>0.320</b>	<b>0.299</b>	<b>0.466</b>		0.214	0.000
YG	<b>0.268</b>	<b>0.181</b>	<b>0.220</b>	<b>0.233</b>	<b>0.239</b>	<b>0.328</b>	<b>0.388</b>	<b>0.253</b>		0.198
GN	<b>0.221</b>	<b>0.108</b>	<b>0.227</b>	<b>0.224</b>	<b>0.231</b>	<b>0.393</b>	<b>0.132</b>	<b>0.328</b>	<b>0.188</b>	

Above diagonal: *mtCOI*, below diagonal: nuclear genes. Statistically significant values are bold

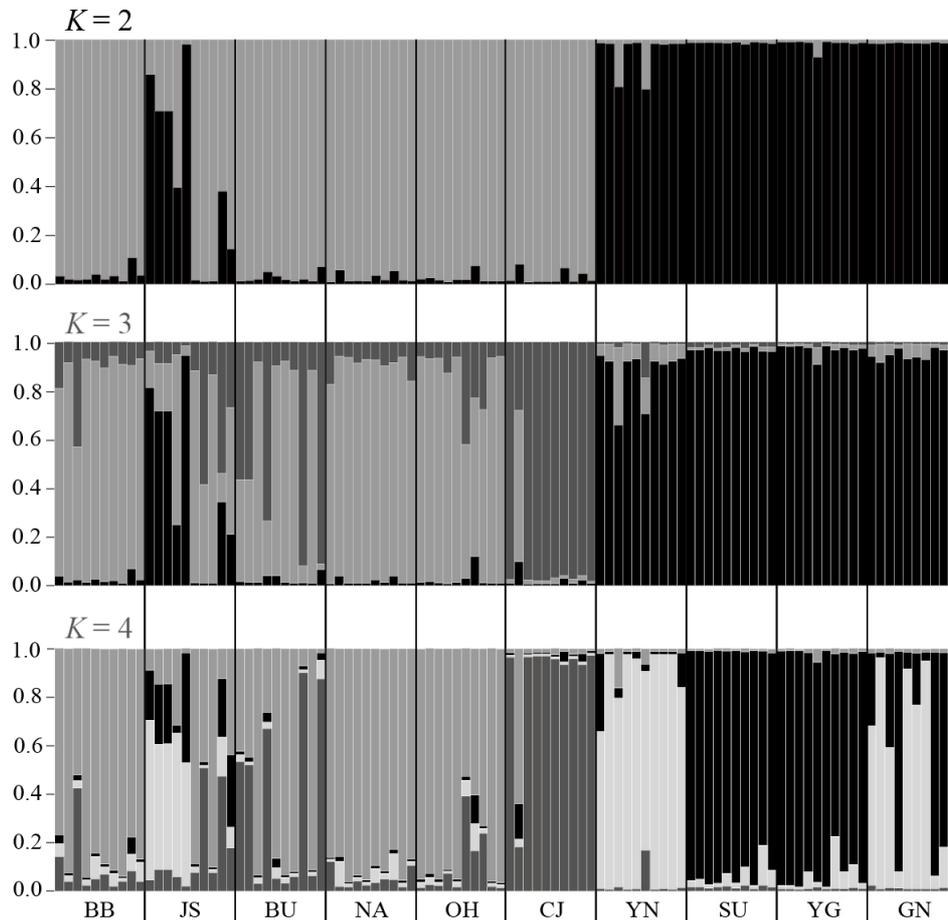


Figure 2. Multi-locus genotypic assignments for nuclear markers resulted from STRUCURE analyses ( $K=2\sim 4$ ). When  $K$  was 2 (the upper most panel), vertical bars indicate probabilities that an individual could be assigned to northern group (grey) and southern group (black). The other two panels also show such probabilities from all individuals when  $K$  was 3 and 4, respectively. The different darkness of the grey

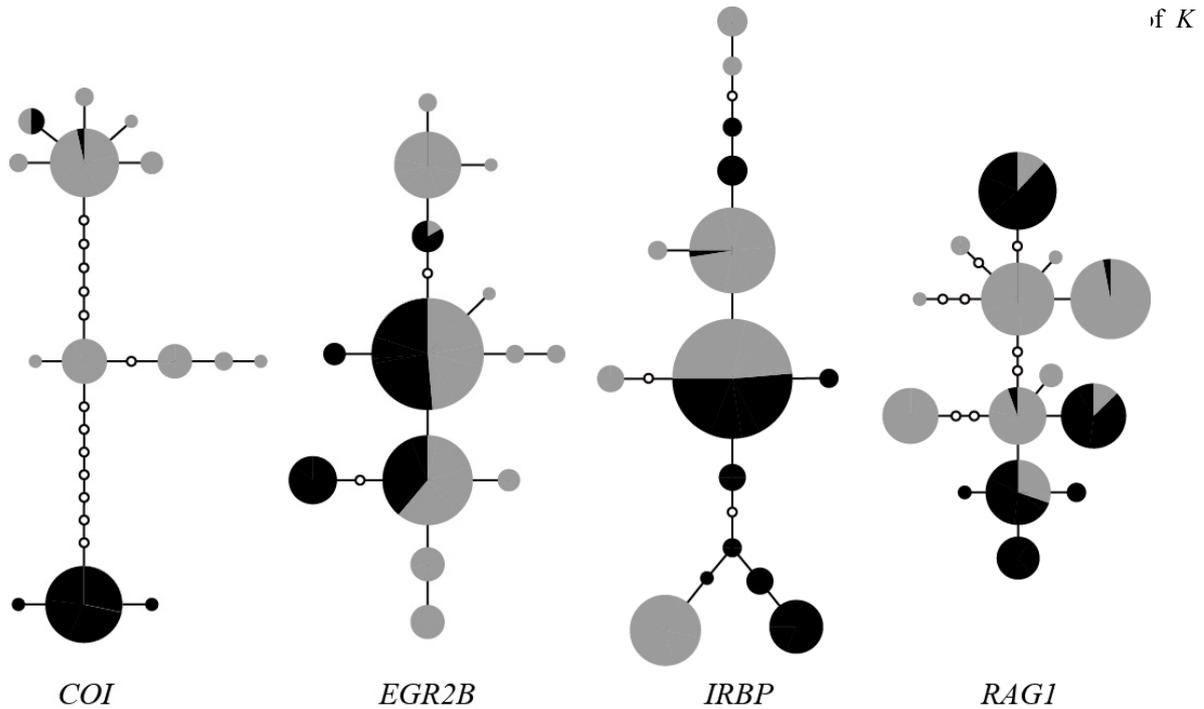


Figure 3. Haplotype network of the four genetic loci. The circles represent each haplotype which is scaled proportionally by relative frequency. The empty smallest circles represent missed haplotypes in DNA samples and the line between the circles represents a single nucleotide difference between them. The two colors of circles correspond to the two clusters resulted from STRUCTURE analysis (Figure 2): grey, northern cluster; black, southern cluster

이러한 STRUCTURE 결과에 기반하여 북쪽과 남쪽 cluster를 각각의 그룹으로 설정하여 AMOVA를 실시한 결과, 미토콘드리아 서열(*mtCOI*)의 전체 유전 변이의 분산 가운데 64.25%는 그룹 간 차이에 기인하였고, 16.90%는 그룹 내 집단 간의 차이, 18.85%는 집단 내 개체들 간의 차이에 기인하여, 그룹 간의 차이가 북방종개 집단의 미토콘드리아 유전자 변이에 가장 큰 영향을 미치고 있었다. 반면, 핵유전자 좌위(*EGR2B*, *IRBP*, *RAG1*)의 전체 유전 변이 분산 가운데 9.74%만이 그룹 간의 차이에 기인하였으며, 17.82%는 그룹 내 집단 간의 차이, 72.44%로 집단 내 개체들 간의 차이에서 기인하여, 그룹 간의 차이보다는 집단 내 개체들 간의 차이가 북방종개 집단의 핵유전자 변이에 더 큰 영향을 미치고 있음을 보여주었다. 이러한 경향성은 haplotype network에서도 관찰이 되었는데, 미토콘드리아 단상형들은 북쪽과 남쪽 그룹 간의 지리적 구분이 비교적 명확했지만 핵유전자 단상형들은 지리적 구분이 뚜렷하지 않았다(Figure 3).

## 고찰

본 연구에서는 한국 고유종 북방종개(*Iksookimia pacifica*)가 서식하는 동해의 독립하천들을 확인하고, 집단들의 유전자 다양성 및 구조를 살펴보았다. 북쪽으로는 배봉천에서 남쪽으로는 강릉남대천에 이르기까지 전체 10개의 하천에서 북방종개가 서식하는 것으로 확인되었으며, 각 하천들은 서로 지리적으로 단절되어 직접 바다로 유입되기 때문에 북방종개 집단들 역시 서식지에 정착한 이후 지리적인 유전적 분화를 겪어왔다고 예상되었다. 본 연구의 결과는 이러한 가설을 지지하였으며, 더불어 동해 하천들의 지리적, 환경적 특징과 관련된 북방종개 집단들의 유전자 다양성 및 구조를 밝혔다.

### 1. 집단의 유전자 다양성

전체 10개의 북방종개 집단들 중 유일하게 자산천(JS) 집단만이 유의미한 하디-와인버그 평형에서 통계적으로 벗어났는데, 이와 관련하여 집단 내 근친 교배구조(inbreeding), 비무작위 짝짓기(non-random mating), 및 왈런드(Wahlund)

효과 등이 대표적인 원인으로 알려져 있다. STRUCTURE 결과에 기반했을 때, 이 원인들 중에서 왈런드 효과에 의한 영향이 크게 작용했을 것으로 예상된다(Figure 2). 집단 내에 유전적으로 격리 혹은 분화된 다른 아집단들이 존재할 때 집단의 이형접합체(heterozygosity) 빈도가 예상 값보다 감소하는 현상(heterozygote deficiency)을 왈런드 효과라 일컫는데, 자산천의 경우 배봉천 다음으로 북쪽에 위치하고 있음에도 불구하고 집단의 다수의 개체들이 먼 거리에 위치한 남쪽의 양양남대천(YN)과 강릉남대천(GN)의 유전자형을 공유하였다. 이는 자산천(JS) 집단이 인위적 방류 등에 의해 교란되어 왈런드 효과에 의한 유의미한 이형접합자 감소를 초래하였을 가능성을 제시한다.

북부동해안은 2002년과 2003년에 연속적인 태풍 “루사”와 “매미”로 인한 대규모 홍수가 발생하였고 이후 하천복원 공사와 더불어 하천복원의 명분으로 한강에 서식하는 어류뿐만 아니라 동해에 서식하는 많은 어류가 방류되어 급격한 어류상 변화가 보고되어 왔다(Yoon and Kim, 2004; Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Ko and Bang, 2013; Byeon and Oh, 2015). 북방종개의 직접적인 방류기록은 확인할 수 없었으나 많은 기관 및 단체에서 무분별로 어류를 방류한 것으로 볼 때 충분한 가능성이 있다고 생각되며, 이러한 인위적 요인이 북방종개 집단의 유전자에 영향을 미쳤을 것으로 의심된다.

각각의 집단들에 대한 미토콘드리아 유전자(*mtCOI*)는 핵유전자 보다 낮은 유전자 다양성을 보였으며, 특히 양양남대천(YN)과 상운천(SU) 집단의 20개의 개체들은 서로 다른 하천에 서식하고 있음에도 불구하고 오직 하나의 유전자 서열만을 가지고 있었다(Table 3). 이러한 다양성의 소실은 최근 이들 집단에서 일어난 병목현상(bottleneck)과 관련이 있다고 보여진다.

## 2. 유전적 분화도 및 집단유전학적 구조

전체 10개의 북방종개 집단들은 핵유전자에 기반한 Bayesian 분석에 따라 지리적으로 북쪽과 남쪽 그룹으로 나뉘었다. 이러한 핵유전자들의 집단유전학적 구조는 미토콘드리아 유전자의 AMOVA 분석에서도 일관되게 관찰되었다. 그럼에도 불구하고 핵유전자들의 AMOVA 결과는 상대적으로 남북간 그룹들 간에 유전적 변이의 분산이 크지 않음을 보여주었다(9.74%). 이러한 미토콘드리아 유전자와 핵유전자들의 차이는 모계유전을 하는 세포 소기관인 미토콘드리아 유전자보다 핵유전자가 유효집단크기가 4배나 크다는 일반적인 이론으로부터 설명될 수 있다(Birky *et al.*, 1983). Birky *et al.* (1983)에 따르면 유효집단크기가 4배나 작은 미토콘드리아 유전자는 핵유전자에 비해 집단간 격리

의 영향을 훨씬 빠르고 민감하게 받는다는 점이 제시되었는데, 북방종개의 핵유전자와 미토콘드리아 유전자 역시 이러한 일반적인 민감도 차이를 나타냈다고 해석된다.

북방종개 집단이 한반도에 정착한 역사를 대략적으로 추론해 본다면, 먼저 조상형 다형성을 포함한 북방종개들이 북쪽과 남쪽으로 크게 나뉘어 정착하였고, 그 후 이 두 그룹이 지역 내에 있는 개별 하천들로 격리되면서 추가적인 유전적 분화가 축적되어 갔다고 해석된다. 북방종개와 달리, 동해 북부하천부터 남부하천까지 넓은 분포를 보이는 잔가시고기(*Pungitius kaibarae*)의 경우, 조상집단이 북쪽에서 남쪽 방향으로의 점차적인 이동을 통해 서식지에 정착했을 가능성이 제시되었다(Bae and Suk, 2015). 북방종개는 유전적 분화도와 지리적 거리 사이에 명확한 상관관계가 없는 것으로 나왔다. 따라서 Bae and Suk (2015)의 연구에서 제시된 북쪽으로부터 남쪽 방향의 이동 양상은 관찰되지 않았다. 이러한 차이는 각 어류 종의 진화역사, 생활사 및 이동 능력의 차이와 관련이 있을 것으로 추정된다.

미토콘드리아 유전자(*mtCOI*)의 경우, 핵유전자에 비해 상대적으로 집단 간 유전적 분화도가 컸지만, 일부 이웃하는 집단들 사이에서는 분화도가 높지 않은 경우도 관찰되었다(Table 4). 이러한 경우들은 미토콘드리아 유전자 다양성이 완전히 소실된 양양남대천(YN)과 상운천(SU) 집단들과 나머지 다른 집단들과의 상호비교에서 주로 관찰되었다. 일반적으로 개체수 병목현상의 유전다양성 감소 효과는 유효 집단크기가 큰 핵유전자에 비해서 유효집단크기가 작은 미토콘드리아 두드러진다는 사실이 잘 알려져 있다(Fay and Wu, 1999). 양양남대천과 상운천 집단의 미토콘드리아 유전자 다양성 감소는 태풍과 같은 외부요인에 따른 서식지 훼손과 그 결과 나타난 개체수 병목현상으로 해석된다.

기존 연구들을 보면, 많은 멸종위기 어류들은 같은 종이라 할지라도 수계별로 분화가 진행되어 독립 수계별로 관리 방안이 필요하다고 보고된 바 있다(MLTM, 2010, 2011; ME, 2011a, 2011b). 이러한 양상은 본 연구에서도 확인되는데, 동해안 하천에 서식하는 북방종개는 유전적으로 유사한 몇몇 하천 그룹들로 구별되었다. 따라서 북방종개의 보전 및 관리를 위해서는 유전적으로 구별되는 그룹 간의 무분별한 방류는 반드시 지양되어야 하며 그룹 별로 보존대책이 필요하다고 판단된다.

## REFERENCES

- Avise, J.C.(2004) Molecular Techniques. Molecular Markers, Natural History, and Evolution(2nd ed.). Sinauer Associates, Massachusetts, 112-113pp.
- Bae, H.G. and H.Y. Suk(2015). Population genetic structure and colonization history of short ninespine sticklebacks (*Pungitius kaibarae*). Ecology & Environment 5(15): 3075-3089.
- Beebe, T.J.C. and G. Rowe(2008) An Introduction to Molecular Ecology(2nd ed.). Oxford University Press, New York, 213-214pp.
- Birky, C.W., T. Maruyama and P. Fuerst(1983) An approach to population and evolutionary genetics theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. Genetics 103: 513-527.
- Byeon, H.K. and J.K. Oh(2015) Fluctuation of fish community and inhabiting status of introduced fish in Gangeungnamdae stream, Korea. Korean Journal of Environment and Ecology 29(5): 718-728. (in Korean with English abstract)
- Chen, W.J., M. Miya, K. Saitoh and R.L. Mayden(2008) Phylogenetic utility of two existing and four novel nuclear gene loci in reconstructing tree of life of ray-finned fishes: the order Cypriniformes (Ostariophysi) as a case study. Gene 423(2): 125-134.
- Choi, J.K. and H.K. Byeon(2009) Ecological characteristics of *Cobitis pacifica* (Cobitidae) in the Yeongok Stream. Korean Journal of Limnology 42(1): 26-31. (in Korean with English abstract)
- Earl, D.A.(2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation genetics resources 4(2): 359-361.
- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet(2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. and H.E.L. Lischer(2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10: 564-567.
- Fay, J.C. and C.I. Wu(1999) A human population bottleneck can account for the discordance between patterns of mitochondrial versus nuclear DNA variation. Molecular Biology and Evolution 16: 1003-1005.
- Felsenstein, J.(2006) Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? Molecular Biology Evolution 23(3): 691-700.
- Hubisz, M.J., D. Falush, M. Stephens and J.K. Pritchard(2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Molecular Ecology Resources 9(5): 1322-1332.
- Hudson, R.(2000) A new statistic for detecting genetic differentiation. Genetics 155: 2011-2014.
- Jang, M.H., J.D. Yoon, B.S. Chae and G.J. Joo(2006) Molecular phylogeny of *Pungitius kaibarae* from mitochondrial DNA sequences in selected streams flowing into the East Sea. Korean Journal of Limnology 39(2): 265-270. (in Korean with English abstract)
- Kalinowski, S.T.(2005) Hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. Molecular Ecology Notes 5(1): 187-189.
- Kim, C.H., K.E. Hong, J.H. Kim and K.H. Kim(2006) Ichthyofauna in Yeongok stream, Gangneung, Korea. Korean Journal of Ichthyology 18(3): 244-250. (in Korean with English abstract)
- Kim, I.S.(1997) Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea, Freshwater Fishes. Ministry of Education, Yeongi, 629pp. (in Korean)
- Kim, I.S.(2009) A review of the spined loaches, family Cobitidae (Cypriniformes) in Korea. Korean Journal of Ichthyology. 21: 7-28.
- Kim, I.S. and J.H. Lee(1986) A chromosomal study on the genus *Cobitis* (Pisces: Cobitidae) in the southern part of Korea. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 19(3): 257-564. (in Korean with English abstract)
- Kim, I.S. and J.Y. Park(1995) Adhesive membrane of oocyte in Korean cobitid species (Pisces, Cobitidae). Korean Journal of Zoology 38: 212-219. (in Korean with English abstract)
- Kim, I.S., J.Y. Park and T.T. Nalbant(1999) The far-east species of the genus *cobitis* with the description of three new taxa (Pisces: Ostariophysi: Cobitidae). Travaux du Museum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa" 44: 373-391.
- Ko, M.H.(2015) Habitat characteristics and feeding ecology of the Korean endemic species, *Iksookimia pacifica* (Pisces: Cobitidae) in the Bukcheon (stream), Korea. Korean Journal of Ichthyology 27(4): 275-283. (in Korean with English abstract)
- Ko, M.H. and Y.J. Won(2016) The age and spawning characteristics of the Korean endemic spine loach, *Iksookimia pacifica* (Pisces: Cobitidae) in the Bukcheon (stream), Korea. Korean Journal of Ichthyology 28(2): 72-78. (in Korean with English abstract)
- Ko, M.H. and I.C. Bang(2013) Fish community structure and inhabiting status of endangered species in Baebong Stream. Korean Journal of Environment and Ecology 46(2): 192-204. (in Korean with English abstract)
- Kwan, Y.S.(2015) Molecular Phylogenetic and Population Genetic Studies of the Freshwater Fish Family Cobitidae (Teleostei: Cypriniformes) in Korea. Ph. D. Dissertation, Ewha Womans University, Seoul, 143pp.
- Lee, I.R., H. Yang, J.H. Kim, K.Y. Kim and I.C. Bang(2009) 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. Korean Journal of Ichthyology 28(2): 72-78. (in Korean with English abstract)
- Lee, W.O., K.H. Kim, J.M. Baek, Y.J. Kang, H.Z. Jeon and C.H. Kim(2011) Embryonic development and early life history of the northern loach, *Cobitis pacifica* (Pisces: Cobitidae). Korean Journal of Limnology 44(1): 1-8. (in Korean with English abstract)
- Lee, W.O., M.H. Ko, J.M. Baek, D.H. Kim, H.Z. Jeon and K.H. Kim(2010) Characteristics of fish fauna and community structure in Buk Stream of Goseong, Korea. Korean Journal of Ichthyology 22(4): 238-248. (in Korean with English abstract)
- Lischer, H.E.L. and L. Excoffier(2012) Pgdspider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. Bioinformatics 28(2): 298-299.
- Liu, S.Q., R.L. Mayden, J.B. Zhang, D. Yu, Q.Y. Tang, X. Deng and H.Z. Liu(2012) Phylogenetic relationships of the cobitoidea (teleostei: Cypriniformes) inferred from mitochondrial and nuclear genes with analyses of gene evolution. Gene 508(1): 60-72.
- ME (Ministry of Environment)(2009a). Culture and Restoration Research of *Pseudobagrus brevicorpus*. 75pp. (in Korean with English abstract)
- ME (Ministry of Environment)(2009b). Development of Genetic Diversity Analysis, Culture and Ecosystem Restoration Techniques for Endangered Fish, *Iksookimia choii*. 537pp. (in Korean with English abstract)
- ME (Ministry of Environment)(2011a). Development of Culture Techniques and Construction of Monitoring System for Released Seedlings of Endangered Fish *Koreocobitis naktongensis*. 250pp. (in Korean with English abstract)
- ME (Ministry of Environment)(2011b) Culture and Restoration Research of Endangered Freshwater Fish (four species include *Liobagrus obesus*). 359pp. (in Korean with English abstract)
- MLTM (Ministry of Land & Transport and Maritime Affairs) (2010) Culture and Restoration of Endangered Species in the Major Four River Drainages. 489pp. (in Korean)
- MLTM (Ministry of Land & Transport and Maritime Affairs) (2011) Culture and Restoration of Endangered Species in the Major Four River Drainages (II). 364pp. (in Korean)
- NIBR (National Institute of Biological Resources)(2011) Breeding Manual of Endangered Freshwater Fish. Incheon, 239pp. (in Korean)
- Perdices, A.J., Bohlen, V. Šlechtová and I. Doadrio(2016) Molecular evidence for multiple origins of the European spined loaches (Teleostei, Cobitidae). Plos One 11(3): e0144628. doi:10.1371.
- Pluzhnikov, A. and P. Donnelly(1996). Optimal sequencing strategies for surveying molecular genetic diversity. Genetics 144: 1247-1262.
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly(2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155(2): 945-959.
- Quenouille, B., E. Bermingham and S. Planes(2004) Molecular systematics of the damselfishes (teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 31(1): 66-88.
- Rousset, F.(2008) Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for windows and linux. Molecular Ecology Resources 8(1): 103-106.
- 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. Molecular Phylogenetics Evolution 47(2): 812-831.
- Šlechtová, V., J. Bohlen and H.H. Tan(2007) Families of cobitoidea (teleostei; cypriniformes) as revealed from nuclear genetic data and the position of the mysterious genera *Barbucca*, *Psilorhynchus*, *Serpenticobitis* and *Vaillantella*. Molecular Phylogenetics and Evolution 44(3): 1358-1365.
- Stephens, M. and P. Donnelly(2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. The American Journal of Human Genetics 73(5): 1162-1169.
- Stephens, M., N.J. Smith and P. Donnelly(2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. The American Journal of Human Genetics 68(4): 978-989.
- Teacher, A.G. and D.J. Griffiths(2011) Hapstar: Automated haplotype network layout and visualization. Molecular Ecology Resources 11(1): 151-153.
- Yoon, Y.Y. and H.S. Kim(2004). Effect of typhoon "Rusa" on the natural Yeon-gok stream and coastal ecosystem in the Yeong-dong province. Journal of Korean Society for Marine Environment & Energy 7(1): 35-41. (in Korean with English abstract)