

〈Original article〉

제한절편 길이 다형성(RFLP) 분자마커를 이용한 납자루아과 담수어류 3종의 난과 치어 중 동정 기법 개발

최 희 규 · 이 혁 제*

상지대학교 생명과학과 분자생태및진화학실험실

Development of a Species Identification Method for the Egg and Fry of the Three Korean Bitterling Fishes (Pisces: Acheilognathinae) using RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Markers

Hee-kyu Choi and Hyuk Je Lee*

*Molecular Ecology and Evolution Laboratory, Department of Biological Science,
College of Science & Engineering, Sangji University,
Wonju 26339, Republic of Korea*

Abstract - This study aimed to develop a species identification method for the egg and fry of the three Korean bitterling fishes (Pisces: Acheilognathinae), including *Acheilognathus signifer*, *Acheilognathus yamatsutae* and *Rhodeus uyekii* based on the PCR-based Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) markers. We conducted a field survey on the Deokchicheon River from the North Han River basin, where the three Acheilognathinae species co-occur, and also analyzed the existing sequence dataset available from the GenBank. We found coexistence of the three species at the study site. The egg and fry were obtained from the host mussels (*Unio douglasiae sinuolatus*) by hand from May to June 2015 and in May 2017. To develop PCR-based RFLP markers for species identification of the three Acheilognathinae fish species, restriction enzymes pinpointing species-specific single nucleotide variation (SNV) sites in mitochondrial DNA COI (cytochrome oxidase I) and *cyt b* (cytochrome *b*) genes were determined. Genomic DNA was extracted from the egg and fry and RFLP experiments were carried out using restriction enzymes *Apal* I, *Stu* I and *EcoR* V for *A. signifer*, *A. yamatsutae* and *R. uyekii*, respectively. Consequently, unambiguous discrimination of the three species was possible, as could be seen in DNA band patterns from gel electrophoresis. Our developed PCR-based RFLP markers will be useful for the determination of the three species for the young and would assist in studying the spawning patterns and reproductive ecology of Acheilognathinae fishes. Furthermore, we believe the obtained information will be of importance for future maintenance, management and conservation of these natural and endangered species.

Keywords : bitterling, egg and fry, species identification, PCR-RFLP, host mussels

* Corresponding author: Hyuk Je Lee, Tel. 033-730-0436,
Fax. 033-730-0430, E-mail. hyukjelee@sangji.ac.kr

서 론

잉어과(Cyprinidae) 납자루아과(Pisces: Acheilognathinae) 어류는 몸이 납작하고 체고가 높은 소형 담수어류로서 전세계에 약 40여종이 보고된 바 있으며(Bogutskaya and Komlev 2001; Damme *et al.* 2007), 그 중 우리나라에는 2속 14종이 기록되어 있다(Kim and Park 2002). 납자루아과 어류는 담수산 석패과(Bivalvia: Unionidae) 패류의 아가미 안에 산란하는 독특한 생물학적 특징을 가지고 있다(de Wit 1955). 수컷은 산란시기에 화려한 혼인 색을 띠며, 숙주조개 주위에서 자신의 영역을 방어하고, 암컷은 긴 산란관을 발달시켜 숙주조개의 아가미 안에 난을 산란한다. 산란 직후 수컷은 숙주조개의 아가미에 자신의 정자를 방출하고, 숙주조개의 호흡에 의해 조개 속으로 정자가 옮겨지며, 조개 내에서 난의 수정이 일어난다(Smith *et al.* 2004). 수정이 이루어진 뒤 약 3~6주 발생과정을 거친 후 유영능력을 획득하게 되면 조개 밖으로 이동하여 독립된 생활을 한다(Uchida 1939; Aldridge 1999). 이러한 독특한 번식 행동(reproductive behavior)을 가진 담수어류 종은 생활사 초기 단계가 숙주조개에 전적으로 의존되기 때문에 서식처 환경에 숙주조개 개체 수 감소 시 멸종위기 가능성이 높아진다고 보고되었다(David *et al.* 2010).

최근 인간의 인위적인 간섭에 의한 오염 및 하천사업으로 납자루아과가 숙주로 이용하는 석패과 패류의 개체수가 급격히 감소하고 있으며, 이로 인해 납자루아과의 개체수가 전 세계적으로 감소하고 있는 추세이다(Bogan 1993; Watters 1996). 우리나라 또한, 총 4종의 납자루아과 어류 종인 한강납줄개(*Rhodeus pseudosericeus*), 임실납자루(*Acheilognathus somjinensis*), 묵납자루(*A. signifer*) 및 큰줄납자루(*A. majusculus*)가 야생생물 보호 및 관리에 관한 법률 시행규칙(2017년 12월 29일 개정)에 근거하여 멸종위기 야생생물 I·II급으로 지정되어 보호받고 있으며, 한국의 멸종위기 야생생물 적색 자료집(Red Data Book)에서는 위기(EN; endangered)종, 준위협(NT; near threatened)종 및 관심대상(LC; least-concern)종으로 포함되어 있다(NIBR 2011).

국내의 경우 납자루아과 담수어류에 대한 산란양상을 파악하기 위한 생태학적 연구가 진행된 바 있으나, 난 및 치어의 동정을 위해 발생과정을 형태적으로 확인하여 종 동정을 수행하였다고 보고된 바 있으며(Kim *et al.* 2013, 2014), 아직 유전학적인 방법을 이용한 숙주조개 속 난 및 치어에 대한 종 판별 연구는 수행되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 PCR (polymerase chain reaction) 기반 RFLP(restriction fragment length polymorphism; 제한절편 길이 다형성) 분자기법을 이용하여 홍천강 지류인 덕치천(북한강수계)에 동서

하고 있는 납자루아과 어류 3종 묵납자루, 줄납자루 및 각시붕어의 난 및 치어를 대상으로 정확한 동정을 수행하여 납자루아과 담수어류의 산란양상을 보다 정확히 규명하고 향후 이들 자연개체군의 효과적인 유지, 관리 및 보전 방법 개발에 활용할 수 있는 과학적 기초 데이터를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상 지역

연구대상 지점의 선정은 납자루아과 담수어류가 2종 이상 동서한다고 알려져 있으며, 과거 문헌조사 결과 개체수가 풍부한 하천을 기준으로 선정하였다. 연구대상 지역인 덕치천(Fig. 1)은 한강대권역, 한강수계, 북한강, 홍천강 본류로 유입되는 지류이며, 덕치천의 하류는 환경부에서 수행한 제3차 전국자연환경조사(덕치천 유역의 담수어류)결과 본 연구대상종인 납자루아과 어류 묵납자루(*A. signifer*)와 줄납자루(*A. yamatsutae*)가 다수 분포한다고 알려져 있다.

Sampling Site: 강원도 홍천군 동면 덕치리 덕치천
(N 37°41'52.98", E 127°55'41.72")

2. 재료 및 방법

1) 납자루아과 담수어류의 난 및 치어확보
납자루아과 담수어류의 난 및 치어의 확보를 위해 본 연

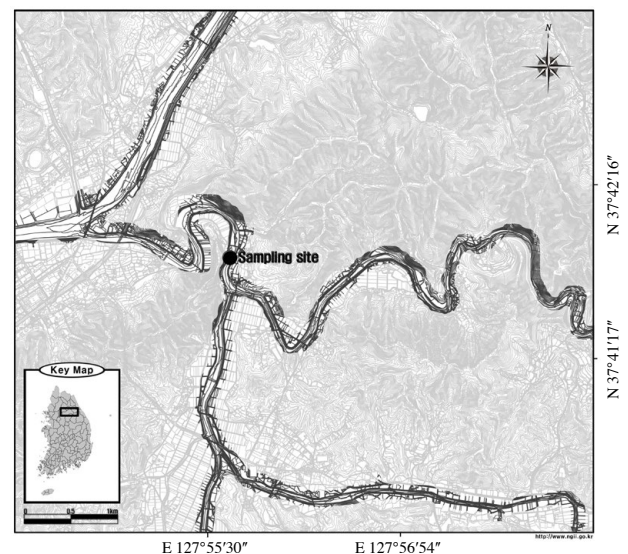


Fig. 1. Map showing the study site, the Deokchicheon River originating from the North Han River basin (N 37°41'52.98", E 127°55'41.72") in Hongcheon, Gangwon-do, Korea.

구 대상종의 산란시기에 대한 문헌조사를 수행하였고(Song 2004; Baek 2005; Kim *et al.* 2015), 조사결과 덕치천 일대의 납자루아과 어류의 산란시기가 겹치는 5월~6월에 시료채집을 실시하였다. 현지 어류정량조사 결과 기존 문헌으로 확인된 묵납자루(*A. signifer*)와 줄납자루(*A. yamatsutae*)가 서식하고 있는 것을 확인하였으며, 같은 납자루아과에 속하는 각시붕어(*R. uyeikii*)가 추가적으로 관찰되었다. 따라서, 묵납자루, 줄납자루 및 각시붕어 3종을 대상으로 본 연구를 수행하였다.

납자루아과 어류의 숙주조개로 알려진 작은말조개(*Unio douglasiae sinuolatus*)의 채집은 현장에서 주로 손으로 채집하였으며, 어류의 채집은 투망(망목 7×7 mm)과 족대(망목 5×5 mm)를 이용하였다. 문헌조사 결과 묵납자루가 출현한다고 보고된 바 있어 법정보호종인 묵납자루의 포획은 원주지방환경청의 포획허가(2015-17, 2017-10)를 취득한 후 조사를 진행하였으며, 어류의 동정은 기존에 발표된 검색표(Kim 1997; Kim and Park 2002)의 분류 체계에 따라 동정하였다. 채집된 납자루아과 어류의 동정은 추후 실험실에서 숙주조개 내 육안으로 확인된 난 및 치어의 잠재적인 대상종을 파악하는데 이용하였다.

채집된 납자루아과 어류는 현장에서 동정하고 사진촬영 후 기록하고 방류하였다. 채집된 숙주조개는 각각 1개체씩 test tube (50 mL, FalconTM, Fisher Scientific, USA)에 넣어 99% 에틸알코올에 고정 후 실험실로 운반하였고, 실험실로 운반된 숙주조개의 아가미 속 난 및 치어를 추출하여 99% 에틸알코올이 들어있는 micro-centrifuge E-Tube (1.5 mL)에 넣어 보관하였다. 채집된 33개 숙주조개 내 총 161개의 난 및 치어가 확인되었으며, 제한효소를 선정하기 전 난과 치어의 동정을 위해 육안으로 식별 가능한 크기와 모양이 다른 31개체를 무작위로 선별하여 미토콘드리아 DNA COI과 *cyt b* 유전자 염기서열을 분석한 결과, 묵납자루 8개체, 줄납자루 4개체 및 각시붕어 19개체로 문헌 및 현지조사 시 확인된 3종이 모두 관찰되었다.

2) Genomic DNA 추출 및 미토콘드리아 DNA PCR (Polymerase Chain Reaction)

Genomic DNA의 추출은 채집한 난 및 치어의 일부 대략 2 mm를 절단하여 G-spin Total DNA Extraction Kit (INTRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 추출하였으며, 추출된 DNA의 확인은 fluorometer (Invitrogen, USA)를 이용하여 DNA의 농도를 확인 후 실험에 이용하였다.

미토콘드리아 DNA의 COI (cytochrome oxidase I)과 *cyt b* (cytochrome b) 유전자를 대상으로 PCR을 통해 유전자 증폭 실험을 수행하였으며, 기존 연구에서 어류를 대상으로 개발

된 primers를 이용하였다(Ivanova *et al.* 2007; Chang *et al.* 2014).

사용된 primer 뉴클레오티드(nucleotide) sequences (5'-3')는 다음과 같다.

COI - FW (FF2d) (5'-TTCTCCACCAACCACAARGAYAT YGG-3')

RV (FR1d) (5'-CACCTCAGGGTGTCCGAARAAY CARAA-3')

Cyt b - FW (Cytb-F) (5'-GAYTTGAAGAACCATCGTTGT-3')

RV (Cytb-R) (5'-CTTCGGATTACAAGACCGATG-3')

PCR 반응은 sterilized water 8.9 µL, 10X Green buffer (Thermo Scientific Inc., USA) 1.5 µL, forward/reverse primers 0.5 µL, dNTP (Bio Basic Inc., Canada) 1.5 µL, Taq Polymerase (Thermo Scientific Inc., USA) 0.1 µL 및 genomic DNA 2 µL를 사용하여 총 15 µL로 수행하였고, PCR 증폭은 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 COI 유전자의 경우 94°C에서 2분간 초기 변성(denaturation) 후 94°C에서 30초간 denaturation, 52°C에서 40초간 결합(annealing), 72°C에서 1분간 신장(extension) 반응을 35회 반복하였으며, 이후 72°C 10분으로 최종 extension 후 증폭을 완료하였다. *Cyt b* 유전자의 경우 94°C에서 4분간 초기 변성 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 반응을 35회 반복하였으며, 이후 72°C 5분으로 최종 extension 반응 후 증폭을 완료하였다.

3) RFLP (restriction fragment length polymorphism) 실험

RFLP 분석을 위해서 NCBI (national center for biotechnology information)의 GenBank로부터 문헌 및 덕치천 현지조사 결과 관찰된 묵납자루(*A. signifer*), 줄납자루(*A. yamatsutae*) 및 각시붕어(*R. uyeikii*)의 미토콘드리아 DNA COI과 *cyt b* 유전자 염기서열을 확보한 후(GenBank Accession Nos.: HQ536266.1, HQ536281.1, HQ536507.1, KF410748.1, and EF483937), Bioedit ver. 7.2.5을 이용하여 Clustal W 분석을 통해 각각 종별로 특이 단일염기변이(Single Nucleotide Variation; SNV)를 가진 염기서열을 확인하였다. 염기서열 분석 결과, 묵납자루의 *cyt b*와 줄납자루와 각시붕어의 COI 유전자의 경우 종 내 개체 간 염기서열 변이 수준이 높아 제한효소 선정에서 제외하였다. 제한효소의 선정은 'Restriction enzyme digest of DNA' (San Millán *et al.* 2013)에서 제공하는 제한효소 검색 프로그램에 각각 종별 특이 염기서열을 입력한 후 각 제한효소 최소 인식 서열 크

Target gene	Restriction Enzyme	Species	192	231
COI	Apal I (G'TGCA_C)	<i>A. signifer</i>	C T T G T C C C G C T A A T A A T C G G T G C A C C C G A C A T G G C C T T C C	
		<i>A. yamatsutae</i> A G A G	
		<i>R. uyekii</i> G T C T	
<i>Cyt b</i>	Stu I (AGG'CCT)	<i>A. yamatsutae</i>	A T T T C C C A A A T C C T C A C A G G C C T A T T C T T A G C A A T G C A C T	163
		<i>R. uyekii</i> T G A C C C A	
<i>Cyt b</i>	EcoRV (GAT'ATC)	<i>R. uyekii</i>	G T C C T G C C C T G G G G C C A G A T A T C A T T T T G A G G C G C C A C C G	433
		<i>A. yamatsutae</i> A A A G C A G	

Fig. 2. Alignments from 3' to 5' end of 192-231, 124-163 and 394-433 bp fragments of mitochondrial DNA COI and *cyt b* regions for the three species (*A. signifer*, *A. yamatsutae* and *R. uyekii*) in the Acheilognathinae fishes (GenBank accession nos: HQ536266.1, HQ536281.1, HQ536507.1, KF410748.1, EF483937; Ivanova *et al.* 2007; Chang *et al.* 2014). Dots in the alignment indicate that the corresponding sequences are identical between the species analyzed. The inverted triangles filled in black indicate each of the restriction sites predicted for the *Apal I*, *Stu I* and *EcoR V* restriction enzymes in the three Acheilognathinae fishes.

기 (minimum recognition size for each restriction enzyme)는 “4”로 설정하여 이용하였다. 종 동정을 위한 RFLP 마커로 결정된 제한효소는 *Apal I* (G'TGCA_C), *Stu I* (AGG'CCT) 및 *EcoR V* (GAT'ATC)로 총 3개의 제한효소 (Enzymomics, Korea)를 이용하였으며, *Apal I* 효소의 경우 묵납자루 미토콘드리아 COI의 유전자 부위 (660 bp)에서 217 bp 부분을 절단하였고, 나머지 2종의 경우 절단되는 부분이 없었다. *Stu I* 효소의 경우 줄납자루 미토콘드리아 *cyt b*의 유전자 부위 (1140 bp)에서 143 bp 부분을 절단하였고, 각시붕어의 경우 절단되는 부분이 없었다. *EcoR V* 효소의 경우 각시붕어는 동일한 유전자 부위 (1140 bp)에서 413 bp 부분이 절단되었고, 줄납자루는 절단되는 부분이 존재하지 않았다 (Fig. 2).

RFLP 실험은 sterilized water 10 μ L, buffer (*Apal I*, *Stu I* - 1X EzBuffer IV, *EcoR V* - 1X EzBufferIII) 1 μ L, restriction enzyme (10 units μ L⁻¹) 0.2 μ L 및 PCR products 5 μ L로 총 16.2 μ L의 양을 반응시켰고, 2720 thermal cycler (Applied Biosystems)를 이용하여 37°C에서 약 3~4시간 반응하였다. 반응이 완료된 산물은 1.2%의 Agarose gel로 약 20분간 전기영동을 수행하였으며, 100 bp DNA Ladder (INtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 각각 밴드의 위치를 확인하였다 (Wolf *et al.* 2000).

결과 및 고찰

1. PCR-RFLP 실험을 이용 전기영동을 통한 종 판별

납자루아과 어류인 묵납자루 (*A. signifer*), 줄납자루 (*A. yamatsutae*) 및 각시붕어 (*R. uyekii*) 3종에 대한 유전자 부위, PCR product의 크기 (bp), 제한효소 처리 후 얻은 DNA 단편 길이의 크기 (bp)와 위치를 파악한 결과 묵납자루 (*A. signifer*)의 경우 미토콘드리아 COI 부위를 대상으로 PCR한 결과 총 660 bp에서 제한효소 *Apal I*에 의해 G'TGCA_C의 염기서열이 위치한 217 bp 부분을 인식하여 절단하였고, 줄

납자루의 경우 미토콘드리아 *cyt b* 부위를 대상으로 PCR한 결과 총 1140 bp에서 제한효소 *Stu I*에 의해 AGG'CCT의 염기서열이 위치한 143 bp 부분을 인식하여 절단하였으며, 각시붕어의 경우 미토콘드리아 *cyt b* 부위를 대상으로 PCR한 결과 총 1140 bp에서 제한효소 *EcoR V*에 의해 G'TGCA_C의 염기서열이 위치한 412 bp 부분을 인식하여 절단하였다 (Table 1; Fig. 3).

PCR-RFLP 실험은 각각 종별로 최소 10개체 이상 수행하였고, 제한효소처리 이후 전기영동 결과 묵납자루의 경우 미토콘드리아 COI 부위에서 *Apal I* 효소에 반응하여 2개의 밴드가 확인되었으며 (lane B), 나머지 줄납자루와 각시붕어는 *Apal I* 효소에 반응하지 않고 1개의 밴드가 나타났다 (lane C, D) (Fig. 3). *Apal I* 효소의 처리로 묵납자루 종 개체를 식별한 후 나머지 개체들을 대상으로 추가적인 PCR-RFLP 실험을 수행하였고, 그 결과 줄납자루의 경우 미토콘드리아 *cyt b* 부위에서 *Stu I* 효소에 반응하여 2개의 밴드가 확인되었으며 (lane E), 나머지 각시붕어는 효소에 반응하지 않고 1개의 밴드가 나타났다 (lane F). 각시붕어의 경우 동일한 미토콘드리아 *cyt b* 부위에서 *EcoR V* 효소에 반응하여 2개의 밴드가 확인되었으며 (lane H), 줄납자루는 효소에 반응하지 않고 1개의 밴드가 나타났다 (lane G) (Fig. 3).

기존에 선행된 연구의 경우 납자루아과 어류가 동서할 때 난 및 치어의 동정을 위해 직접 패트리디쉬에서 인공 수정시킨 후 발생과정을 기록하여 형태적으로 확인하는 방법으로 종 동정을 수행하였다고 보고된 바 있으며 (Kim *et al.* 2014), 본 연구에서는 같은 서식처에 동서하는 3종의 납자루아과 어류인 묵납자루, 줄납자루 및 각시붕어 난 및 치어를 대상으로 유전자 염기서열 분석을 통해 각각 종별로 특이성을 가진 염기서열을 확인하여 종별 특이 단일염기변이 (SNV)를 이용하여 제한효소를 선정하였고, 선정된 제한효소를 통하여 각각 3종 어류의 난 및 치어의 동정을 성공적으로 수행하였다.

RFLP 분자기법의 이용은 어류뿐만 아니라 식물과 균류의

Table 1. DNA fragment sizes expected from restriction enzyme treatments (e.g. PCR-based RFLP experiments) for three different species of the family Acheilognathinae including *A. signifer*, *A. yamatsutae* and *R. uyeekii*. Two DNA fragments of 217 and 443 bp were expected to be produced owing to the presence of a restriction site (G^TTGCA_C) of *Apal* I at mtDNA COI region (660 bp) sequences for *A. signifer*. Two fragments of 143 and 997 bp were expected to be generated due to the presence of a restriction site (AGG^CCCT) of *Stu* I at the mtDNA *cyt b* (1140 bp) for *A. yamatsutae*. Two segments of 412 and 728 bp were expected, due to the presence of a restriction site (GAT^AATC) of *EcoR* V at the *cyt b* (1140 bp) sequences for *R. uyeekii*

Species	mtDNA gene amplified	PCR product sizes (bp)	Restriction enzyme	Expected fragment lengths (bp) after digestion with respective restriction enzymes	
<i>A. signifer</i>	COI	660	<i>Apal</i> I (G ^T TGCA _C)	217	443
<i>A. yamatsutae</i>	<i>cyt b</i>	1140	<i>Stu</i> I (AGG ^C CCT)	143	997
<i>R. uyeekii</i>	<i>cyt b</i>	1140	<i>EcoR</i> V (GAT ^A ATC)	412	728

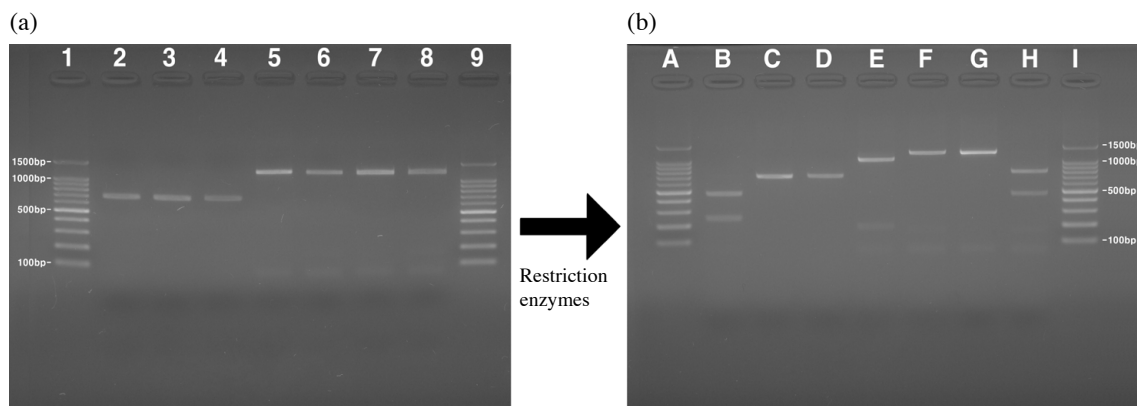


Fig. 3. Results of restriction fragment length polymorphism (RFLP) experiments for the three Korean bittering fishes. (a) DNA bands produced from PCR reaction (lanes 2–8) in gel electrophoresis (lanes 1 and 9: 100 bp ladder). Lanes 2–4 represent mtDNA COI PCR products for each of the three species. *A. signifer* (lane 2); *A. yamatsutae* (lane 3); *R. uyeekii* (lane 4). Lanes 5–8 represent mtDNA *cyt b* PCR products for each of the species. *A. yamatsutae* (lanes 5 and 7); *R. uyeekii* (lanes 6 and 8). (b) DNA bands obtained from RFLP experiments (lanes B–H) in gel electrophoresis (lanes A and I: 100 bp ladder). Lanes B–D represent *Apal* I products for each of the species. *A. signifer* (lane B); *A. yamatsutae* (lane C); *R. uyeekii* (lane D). Lanes E (*A. yamatsutae*) and F (*R. uyeekii*) represent *Stu* I products. Lanes G (*A. yamatsutae*) and H (*R. uyeekii*) represent *EcoR* V products.

DNA 지문검색 (DNA fingerprinting) 방법으로 오랜 기간 동안 널리 이용되고 있으며 (Weising *et al.* 1994), 최근 한국산 전복 속 (*Haliotis*) 4종에 대한 종판별 방법으로도 효과적으로 적용된 바 있다 (Kang 2017). 이러한 방법은 연구 대상 생물 종 개체의 특정 유전자부위를 모두 DNA 염기서열 결정 (sequencing) 없이 개발된 RFLP 마커를 이용 실험실에서 유전자 증폭 후 간단한 제한효소처리만으로 비교적 저비용, 단 시간에 정확한 종 동정을 수행할 수 있다는 점에서 효율성이 있어 오랜 기간 동안 사용되고 있다.

본 연구 결과를 바탕으로 RFLP 분자기법을 이용하여 납자루아과의 난 및 치어에 대한 종판별 결과, 문헌 및 현지 조사 시 확인되었던 3종의 납자루아과 어류가 전기영동 밴드 상 모두 뚜렷하게 종간 차이가 나타났다 (Fig. 3). 본 연구에서 새로이 개발된 RFLP 마커는 기존 연구에서 사용된 난 및 치어 대상 형태적으로 종을 확인하는 방법보다 좀 더 빠

르고 효과적이며 정확하게 3종을 판별할 수 있으나, 우리나라에 현재 서식하고 있는 납자루아과 어류 2속 14종의 모든 염기서열을 비교 분석하여 개발된 분자마커는 아니기 때문에 본 연구에서 개발된 제한효소마커는 묵납자루, 줄납자루 및 각시붕어 3종에 국한되며 향후 본 연구방법을 적용하여 납자루아과 어류 2속 14종에 대한 RFLP 마커가 개발될 경우 우리나라에 서식하는 납자루아과 전체 어류종의 산란 양상, 번식생태 및 행동을 이해하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 PCR 기반 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; 제한절편 길이 다형성) 분자기법을 활용하

여 난 및 치어 대상 납자루아과 어류 3종의 동정을 좀 더 빠르고 정확하게 파악하고 납자루아과 어류의 종별 산란양상 및 번식생태 이해에 대한 기여가 목적이다. 본 연구를 위해 기존 선행된 문헌자료를 확인하고 납자루아과 어류가 2종 이상 동서하고 있는 지역을 확인하여 현지조사를 수행하였다. 현지조사 결과 확인된 납자루아과 어류는 묵납자루 (*Acheilognathus signifer*), 줄납자루 (*A. yamatsutae*) 및 각시붕어 (*Rhodeus uyekii*)로 총 3종이 확인되었으며, 확인된 납자루아과 어류와 동서하고 있는 숙주조개(작은말조개; *Unio douglasiae sinuolatus*)를 채집하여 숙주조개 속 납자루아과 어류의 난 및 치어를 확보하였다. 현지조사 결과 확인된 납자루아과 어류 3종을 대상으로 미토콘드리아 DNA COI과 *cyt b* 유전자 염기서열을 비교하여 각각 종별로 특이성을 지닌 부위(단일염기변이; Single Nucleotide Variation: SNV)에 맞는 제한효소를 선정하였고, 숙주조개 속 난 및 치어를 대상으로 genomic DNA를 추출하여 PCR-RFLP 실험을 수행한 결과 현지조사 시 확인된 납자루아과 어류 3종의 독특한 제한절편 길이 양상을 전기영동을 통하여 확인하였다. 본 연구를 통해 묵납자루, 줄납자루 및 각시붕어의 종을 판별할 수 있는 RFLP 마커를 개발하였으며, 숙주조개 난 및 치어를 대상으로 정확한 종의 동정을 보다 빠르고 효과적으로 수행하여 각각 납자루아과 종별 산란양상을 보다 정확히 규명하고 향후 이들 자연개체군의 효과적인 유지, 관리 및 보전 방법 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 (과제번호: NRF-2014R1A1A 2059401, 과제명: 분자생태학적 연구를 통한 멸종위기 담수 어종 보전·복원 기술 개발; 과제번호: NRF-2016R1D1A1B 03934959, 과제명: 집단유전체학 및 전사체학 분석 기반 한반도 자생 담수어류 두 근연종(독중개, 한독중개) 생태적응 및 종분화 기작 이해)의 지원을 받아 수행되었습니다. 본 연구 수행을 위하여 현장 시료 채집에 도움을 준 상지대학교 생명과학과 분자생태및진화학실험실 대학원 및 학부 학생들께 감사를 표합니다.

REFERENCES

- Aldridge DC. 1999. Development of European bitterling in the gills of freshwater mussels. *J. Fish Biol.* 54:138–151.
- Baek HM. 2005. Ecological studies on the Korean Bitterling, *Acheilognathus signifer* (Cyprinidae) in Korea. PhD. Thesis, Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
- Bogan AE. 1993. Freshwater bivalve extinctions (Mollusca: Unionoidea): a search for causes. *Am. Zool.* 33:599–609.
- Bogutskaya NG and AM Komlev. 2001. Some new data to morphology of *Rhodeus sericeus* (Cyprinidae: Acheilognathinae) and a description of a new species, *Rhodeus colchicus*, from west Transcaucasia. *Proc. Zool. Inst.* 287:81–97.
- Chang CH, F Li, KT Shao, YS Lin, T Morosawa, S Kim, H Koo, W Kim, JS Lee, S He, C Smith, M Reichard, M Miya, T Sado, K Uehara, S Lavoué, WJ Chen and RL Mayden. 2014. Phylogenetic relationships of Acheilognathidae (Cypriniformes: Cyprinoidea) as revealed from evidence of both nuclear and mitochondrial gene sequence variation: evidence for necessary taxonomic revision in the family and the identification of cryptic species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 81:182–194.
- Damme DV, N Bogutskaya, RC Hoffmann and C Smith. 2007. The introduction of the European bitterling (*Rhodeus amarus*) to west and central Europe. *Fish Fish.* 8:79–106.
- De Wit JD. 1955. Some observations on the European bitterling (*Rhodeus amarus*). *S. Afr. J. Sci.* 51:249–251.
- Ivanova NV, TS Zemlak, RH Hanner and PD Hebert. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* 7:544–548.
- Kang SC. 2017. Phylogenetic Study of Genus *Haliotis* in Korea by PCR-RFLP analysis. Master thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim HS, H Yang, GH Go and JY Park. 2014. Spawning pattern in the freshwater mussel *Lamprotula leai* and *Unio douglasiae sinuolatus* of *Acheilognathus signifer* (Pisces: Acheilognathinae). *Korean J. Ichthyol.* 26:83–88.
- Kim HS, JG Go, WS Choi and JY Park. 2015. Population ecology of Korean rose bitterling, *Rhodeus uyekii* (Pisces: Acheilognathinae) in the Bongseocheon, Mankyonggang (River), Korea. *Korean J. Ichthyol.* 27:78–85.
- Kim IS. 1997. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea. Ministry of Education, Seoul, Korea. p. 632.
- Kim IS and JY Park. 2002. Freshwater fishes of Korea. Kyohak, Seoul. p. 515.
- NIBR. 2011. Red data book of endangered fishes in Korea. National Institute of Biological Resources. Ministry of Environment, Korea.
- San Millán RM, I Martínez-Ballesteros, A Rementeria, J Garaizar and J Bikandi. 2013. Online exercise for the design and simulation of PCR and PCR-RFLP experiments. *BMC Res. Notes* 6:513.
- Smith C, M Reichard, P Jurajda and M Przybylski. 2004. The

- reproductive ecology of the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). J. Zool. 262:107–124.
- Song HB. 2004. Ecological studies on the Korean Bitterling, *Acheilognathus yamatsutae* (Cyprinidae) in Korea. PhD. Thesis, Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
- Uchida K. 1939. The fishes of Tyosen (Korea). Part I. Nematognathi, Eventognathi. Bull. Fish. Exp. St. Govern-Gen. Tyosen 6:1–458.
- Watters GT. 1996. Small dams as barriers to freshwater mussels (Bivalvia, Unionoida) and their hosts. Biol. Conserv. 75:79–85.
- Weising K, H Nybom, K Wolff and W Meyer. 1994. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. Boca Raton, USA. p. 322.
- Wolf C, M Burgener, P Hübner and J Lüthy. 2000. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. LWT-Food Sci. Technol. 33:144–150.
- Zanatta DT and CC Wilson. 2011. Testing congruency of geographic and genetic population structure for a freshwater mussel (Bivalvia: Unionoida) and its host fish. Biol. J. Linn. Soc. 102:669–685.

Received: 5 August 2018

Revised: 14 August 2018

Revision accepted: 17 August 2018