

한국 섬진강산 누치(*Hemibarbus labeo*)의 분자 계통유전학적 연구

박기연¹ · 이완옥¹ · 곽인실^{1,2,*}

¹전남대학교 수산과학연구소, ²전남대학교 해양기술학부

Molecular Phylogenetic Study of the Barbel Steed (*Hemibarbus labeo*) in Seomjin River of Korea.
Kiyun Park¹ (0000-0003-2965-6970), Wan-Ok Lee¹ (0000-0001-5063-3357) and In-Sil Kwak^{1,2,*} (0000-0002-1010-3965) (¹Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Division of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea)

Abstract Barbel steed (*Hemibarbus labeo*) is a small freshwater fish species as semi-bottom dwellers distributed in eastern Asia. We carried out characterization of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from the mitochondrial DNA of *H. labeo* in the Seomjin River to identify the phylogenetic location of *H. labeo* in the genus *Hemibarbus* and Cyprinidae. Multiple alignment of the 577 bp COI sequence revealed high sequence homology (99~100%) between Seomjin River *H. labeo*. The nucleotide sequence similarity between *H. labeo* (HD1) and *H. mylodon* was 88.91% and that of *H. longirostis* was 88.81% among the three species found in Korea. In addition, the nucleotide sequence similarities of *H. maculatus*, *H. medius*, *H. umbrifer* and *H. barbatus* showed 98.97%, 97.20%, 96.87% and 98.85%, respectively. Phylogenetic analysis on seven species of the genus *Hemibarbus* showed that the *H. labeo* collected in this study formed two clades. One of which consisted of Hadong, Imsil, Kangjin. The other one formed a step with HD2, HD8 and HD9 of Hadong and the *H. labeo* reported in Busan, Asan and Seoul, Korea. Phylogenetic position of the *H. labeo* among Cyprinidae showed 0.143 for the evolutionary distance from *Zacco platypus* and 0.006 for the *H. maculatus*. In addition, the genetic position of the *H. labeo* among 28 species of Cyprinidae was found to be located in Group I, including Gobioninae fishes. The results of this study will provide key genetic information for the taxonomic comparison in Cyprinidae and study of model fish for pollution monitoring in freshwater environments.

Key words: *Hemibarbus labeo*, cytochrome c oxidase subunit I (COI), phylogenetic analysis, Cyprinidae, freshwater environment

서 론

급속한 산업화와 인구의 증가로 인해 발생한 오염물질은 어류가 서식하는 한반도 및 중국대륙의 담수환경에 지속적으로 영향을 미치고 있다. 누치가 주로 분포하는 대형

하천들은 오염 부하량이 비교적 높은 큰 담수역으로 잉어과 어류인 붕어 등을 모니터링 모델 어종으로 환경오염 정도에 대해 알려져 있다(Gye, 2004). 급격한 환경오염에 따라 담수환경의 건강성 평가를 위한 모델종으로 넓은 분포 수역을 가지는 잉어과 어류의 종 분류에 관한 연구가 필요하다. 이들 잉어과 어류 중 누치는 대만, 하이난, 일본, 베트남 북부, 한국, 중국 등 동아시아에 널리 분포하는 담수어이다(Zhang, 1954; Yen, 1985; Kim, 1997).

누치(*Hemibarbus labeo*)는 잉어목(Cypriniformes), 잉어

Manuscript received 4 July 2019, revised 14 August 2019,
revision accepted 19 August 2019

* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149,
E-mail: inkwak@hotmail.com / iskwak@chonnam.ac.kr

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

과(Cyprinidae)의 모래무지아과(Gobioninae)에 속하는 담수 어류로 큰 강의 모래와 자갈이 깔려있고, 유속이 완만한 중, 하류의 저서에서 서식한다(Lin *et al.*, 2010). 전 세계적으로 16종이 보고되어 있는 누치속 *Hemibarbus* 어류의 형태적 특징은 1쌍의 수염을 가지고 말굽형의 입이 아래쪽으로 위치하며 등지느러미 최후불분기조의 형태가 동일하고, 체측 반점과 측선린의 배열을 제외한 특징이 종 간 뚜렷하지 않아 형태적 구별이 쉽지 않은 분류군이다(Kim *et al.*, 2005; Ko *et al.*, 2017). 누치, 참마자(*H. longirostris*), 어름치(*H. mylodon*) 등 누치속 *Hemibarbus* 3종이 우리나라에서 서식하고 있다(Kim and Park, 2007; Kim *et al.*, 2009; Froese and Pauly, 2014). 누치의 분포는 한반도의 서남해로 유입되는 하천, 중국 동남부, 만주, 일본 남서부로 보고되어 있다(Zhang, 1954; Yen, 1985; Kim, 1997). 이들 3종 중에 누치는 육식성으로 수생태계의 상위 소비자로서 수서곤충의 유충, 실지렁이, 소형 갑각류를 섭식하고 때론 모래와 함께 부착조류 등을 먹이로 한다(Kim and Park, 2002). 중국에서는 누치를 양식대상종으로 개발하였는데, 박테리아의 감염에 의한 질병으로 생산에 영향을 받는다고 보고되기도 하였다(Chen *et al.*, 2019). 누치의 이러한 어병 문제를 해결하기 위하여 병원성 유기체에 대한 숙주 면역에 주요한 역할을 하는 간(liver)-발현 항균 펩타이드 2(LEAP-2)에 대한 연구가 최근에 이루어지고 있다(Chen *et al.*, 2019). 또한, 한국에서는 누치의 연령과 성장에 관한 연구와 누치속 어류의 종 확인을 위한 세포유전학적 특성 분석에 대한 일부 연구만 보고 되었다(Bang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012).

하천 환경에 따른 어류 군집 및 종 다양성의 변화는 생태계 구조 변화와 연관되어 있다. 분자 계통유전학적 분석을 통한 담수 어류의 유전적 기원(origin)과 계보(lineage) 확인은 밝혀지지 않은 생물 다양성 정보를 추적함으로써 하천 생태계 자원관리의 주요한 정보를 제공해 준다(Iyiola *et al.*, 2018). 예로, 한국산 피라미속(*Zacco*) 어류의 분자계통 연구는 한국, 일본, 중국, 대만 등 동아시아 분포 피라미속에서 한국산 피라미속의 계통유전학적 유연관계를 밝혀주고, 참갈겨니와 갈겨니의 분화 기원분석에도 적용되었다(Oh and Park, 2009). 또한 한국산 쏘가리의 보존과 관리를 위한 유전적 기원 분석 및 지역별 개체군 간 유전적 변이를 계통유전학적 분석을 통해 연구하였다(Kim and Song, 2011). 하천 생태계에서 이러한 분자유전학적 연구들은 미기록종의 기원 및 어류 집단의 다양성 분석을 통해 자원보존 및 관리에 유전적 기초자료를 제공하며 형태적 특징만으로 종 분류가 어려운 연구에 분자계통 정보를 활용하여 보다 정확한 분류 연구 접근이 가능하다.

누치는 중국의 북동쪽 지역에서는 식용으로 많이 이용되고 있지만, 최근 수십년간 남획과 환경오염으로 누치 자원이 급격히 감소되고 있다(Lu *et al.*, 2015). 이에 지속적인 이용과 보존을 위한 인공적인 번식에 대한 연구가 이루어지고 있지만(Xu *et al.*, 2009) 자원관리와 인공증식에 따른 대량생산 기술개발이 요구되기도 한다. 또한 우리나라에서 보고된 누치속 3종 어류의 형태적 분류와 더불어 계통유전학적 비교를 통한 누치속 어류의 유전적 정보 발굴도 필요하다. 일부 누치의 난황전구단백질 유전자에 대한 연구나 안동 임화호에 서식하는 누치 내 중금속함량분석에 대한 연구는 보고되었으나 누치에 관한 연구는 아직도 많이 부족하다(Gye, 2004; Shin *et al.*, 2010).

본 연구에서는 한국 섬진강 수계에 서식하는 누치를 대상으로 미토콘드리아 DNA인 cytochrome c oxidase subunit I(COI) 유전체를 분석하여 누치속 어류의 계통유전학적 위치와 잉어과(Cyprinidae) 내 진화적 근연관계를 확인하고, 이를 근거로 누치속 어류의 계통유전학적 기준을 제공하고 하천환경 변화에 따른 어류의 분자적 영향을 모니터링하는 데 필요한 주요한 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 어류인 누치 채집

본 연구에 사용된 누치는 2018년 7월 전라남도 임실(ImSil: IS, UN1, UKN2), 순창(SunChang: SC), 강진(GangJin: GJ), 하동(HaDong: HD) 등의 섬진강 수계에서 족대(5×5 mm) 및 투망(7×7 mm)을 사용하여 19마리를 채집하였다(Fig. 1). 채집한 어류는 즉시 실험실로 옮긴 후 무게와 길이 측정 후 근육조직을 채취하여 -80°C Deep freezer(Thermo Fisher Scientific)에 보관하였다. 종의 판별은 국내에서 보고된 검색표(Kim and Park, 2002)를 이용하였다.

2. Genomic DNA Extraction

누치 total genomic DNA 추출은 Bioneer의 AccuPrep genomic DNA extraction kit를 사용하여 제공되는 프로토콜에 따라 수행하였다. EP tube에 TL buffer 200 µL를 넣고 근육조직을 갈아 균질하게 homogenize하고 Proteinase K 20 µL, RNase A 10 µL를 넣어 단백질과 RNA를 제거하였다. 60°C에서 1시간 Lysis 과정을 거치고 GB buffer와 Ethanol을 넣고 원심분리 후 상등액을 취하였다. WA1과 WA2 buffer를 통해 washing 과정을 거친 후 EA buffer

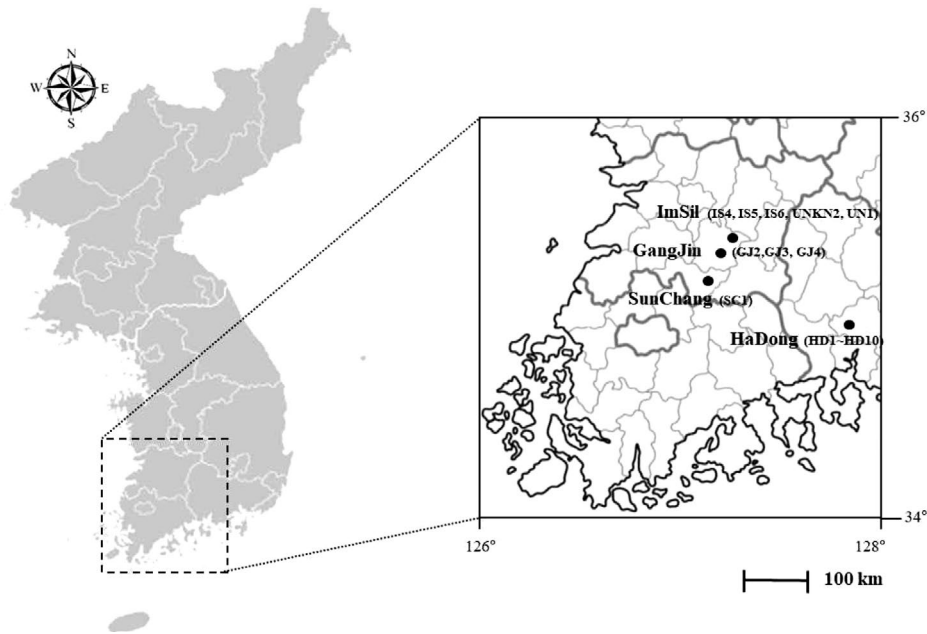


Fig. 1. Map of fish sampling sites in Korea.



Fig. 2. Barbel steed (*Hemibarbus labeo*) in this study.

로 Genomic DNA를 elution하여 사용시까지 -80°C 딥프리저에 보관하였다. 추출된 DNA의 질 (quality)은 1.0% 아가로즈 (w/v)젤로 나노드롭 (NanoDrop ND-2000 spectrophotometer) (Implen, Munich, Germany)으로 농도 (quantity)를 확인하였다.

3. 누치 COI 유전자의 PCR 증폭 및 염기서열 확인

누치 미토콘드리아 DNA에서 COI 유전자 증폭을 위해 Bioneer의 Taq DNA polymerase를 사용하여 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하였다. 증폭에 이용된 Primer는 FishForward1: TCAACCAACCACAAAGA

CATTGGCAC와 FishReverse1: TAGACTTCTGGGTGCCAAAGAATCA (Ward *et al.*, 2005)이다. 30 μL PCR mixture에는 20 μL 멸균된 ultrapure water, 3.0 μL 10 \times PCR buffer, 1 μL of 각각의 primer (20 mmol L^{-1}), 1.5 μL dNTPs (2.5 mmol L^{-1} each), 0.5 μL Taq DNA polymerase (2.5 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$, Bioneer, Korea), 그리고 3.0 μL genomic DNA template (30 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) 등이 포함된다. PCR cycle 조건은 95°C 7분간 초기 변성 후 95°C 에서 30초 변성, 53°C 에서 40초 primer 결합, 72°C 에서 1분간 합성 과정을 38회 반복하여 증폭하였으며, 반복 완료 후 최종 합성은 72°C 에서 10분간 이루어졌다. PCR결과는 1.5% 아가로즈젤을 이용한 전기영동을 통해 시각화로 확인하였다. 또한 PCR

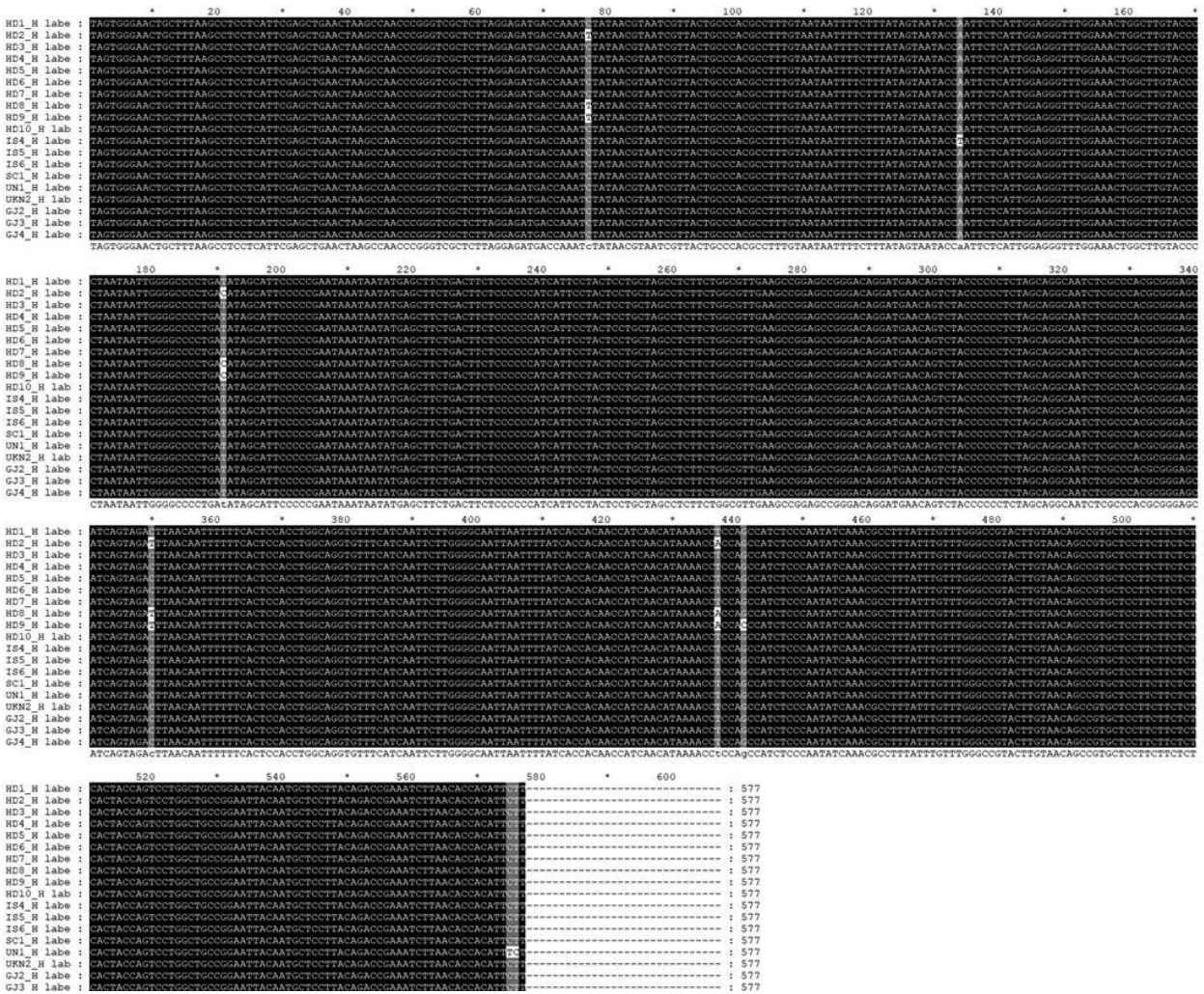


Fig. 3. Multiple alignment of COI sequences in *H. laevis* of Seomjin River.

증폭된 결과물들 (PCR amplification products)은 DNA Gel Extraction Kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 젤 조각 (gel slices)으로부터 정제하고 (purified), ABI3730xl DNA Analyzer 플랫폼 (Macrogen, Korea)으로 시퀀싱하여 염기 서열을 결정하였다.

4. 데이터 분석

섬진강 수계에서 채집된 누치의 COI 유전자 시퀀스는 NCBI GenBank 데이터베이스에 있는 다른 누치속 또는 잉어과의 어류들의 상동 서열 (homologous sequences)을 비교하였다. COI 시퀀스의 다중배열 (multiple alignment) 분석은 CLUSTALW2 software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)을 이용해 수행했으며 다중배열은 GeneDoc Program (version 2.6.001)으로 나타냈다. 계통

유전학적 분석 (phylogenetic analysis)은 Mega X software (version 10.04)을 사용하여 1000 bootstrap으로 neighbor-joining trees로 나타냈고 쌍의 진화적 거리 (pairwise genetic distances)도 Maximum Composite Likelihood method를 통해 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 한국의 서남부지역 섬진강 수계에 서식하는 누치의 미토콘드리아 DNA를 발굴하고 COI 유전자를 비교분석하여, 동아시아 여러나라에서 보고된 잉어과 내 어류들에서 계통유전학적 위치와 진화적 근연관계를 분석하였다. 채집된 전체 누치의 전장, 체장, 무게 평균은 12.9 cm, 10.7 cm, 33.3 g (Minimum 6.1 cm, 5.0 cm, 1.8

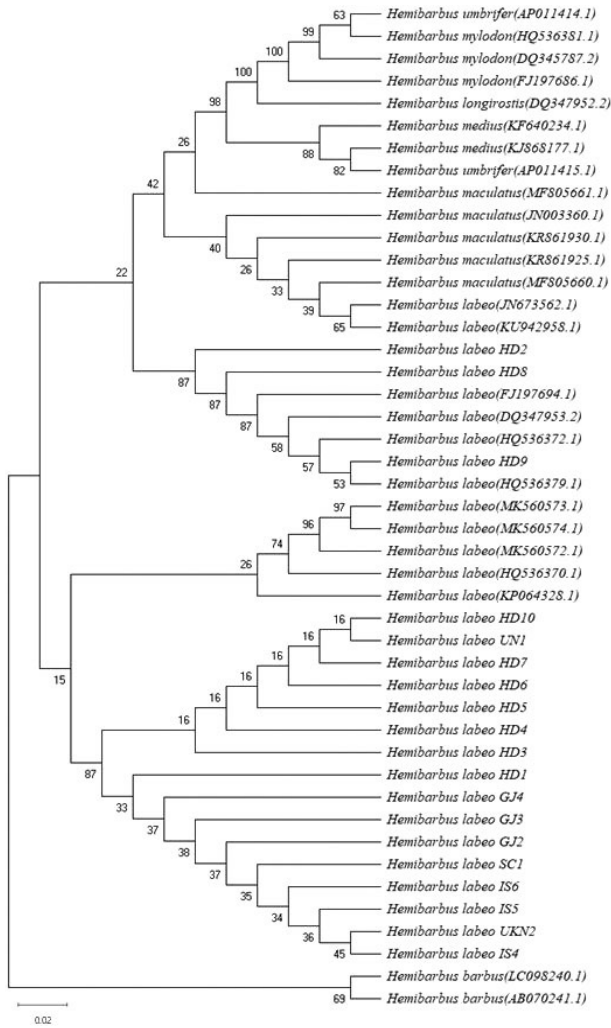


Fig. 4. Phylogenetic tree of the COI sequences in 7 species of *Hemibarbus* constructed by neighbor-joining analysis (bootstrap value 1000). The numbers at the nodes are the percentage bootstrap values.

g, Maximum 20.3 cm, 17.0 cm, 79.8 g) 이었다 (Fig. 2). 본 연구에서 채집된 누치에서 미토콘드리아 DNA 내 577 bp COI 유전자를 발굴하여 염기서열을 다중배열한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. 각 지역에서 채집된 누치의 COI 시퀀스는 개체별 99~100% 염기서열 상동성을 나타내며 유전적 다양성이 높지 않았다. 하지만 하동지역의 3개체 (HD2, HD8, HD9)와 임실지역의 2개체 (IS4, UN1)에서 개체별 염기변이가 나타났다.

나아가 GenBank에 등록된 누치속 7종 (*H. laeobe*, *H. longirostis*, *H. mylodon*, *H. maculatus*, *H. medius*, *H. umbrifer*, *H. barbuis*)의 COI 시퀀스 (Kim *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012)와 본 연구에서 발굴한 섬진강

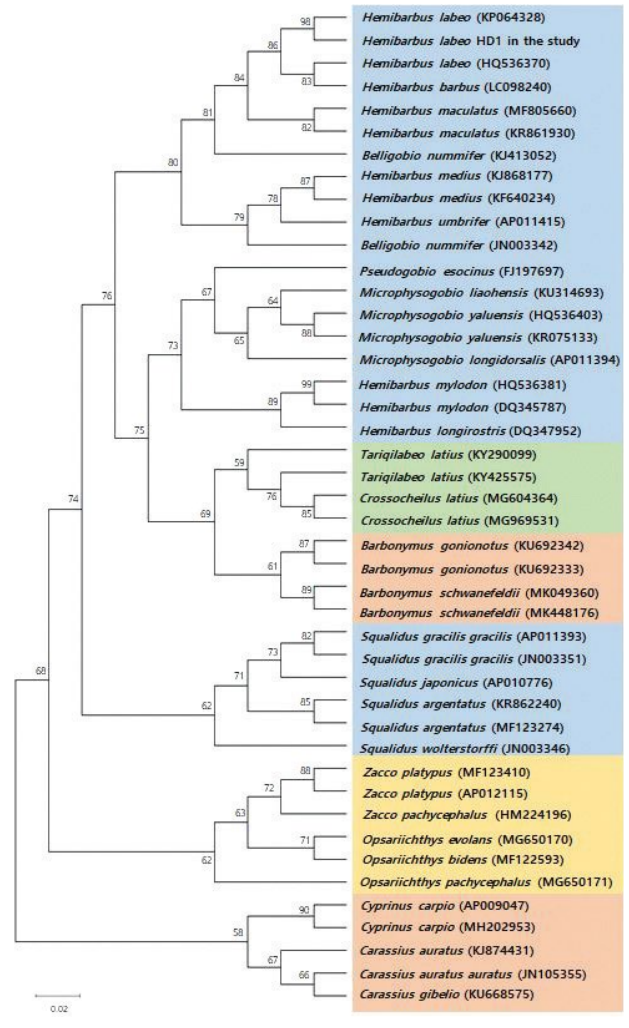


Fig. 5. Phylogenetic tree of the COI sequences in 28 species of Cyprinidae constructed by neighbor-joining analysis (bootstrap value 1000). The numbers at the nodes are the percentage bootstrap values.

누치 COI 시퀀스를 비교하여 계통유전학적 (phylogenetic) 으로 분석하였다 (Fig. 4) (Table 1). 분석결과, 우리나라에 서식하는 누치속 3종에서 누치 (*H. laeobe*: HD1)와 어름치 (*H. mylodon*)의 염기서열 유사성 평균은 88.91%, 누치 (*H. laeobe*: HD1)와 참마자 (*H. longirostis*)의 염기서열 유사성 평균은 88.81%이었다. 또한, *H. maculatus*, *H. medius*, *H. umbrifer*, *H. barbuis*는 각각 누치와의 염기서열 상동성 평균이 98.97%, 97.20%, 96.87%, 98.85% 등으로 나타났다. 누치속 7종은 계통유전학적으로 크게 5개의 계통분기 (clade tree)를 형성하였다 (Fig. 4). 본 연구에서 분석한 섬진강 누치 (*H. laeobe*)들은 두개의 단계통 (clade)을 형성하는데 하나는 하동, 임실, 강진, 순창의 섬진강 누치들로만

Table 1. List of 7 species in *Hemibarbus*.

Species	Sequence ID	Region	Country
<i>Hemibarbus labeo</i> UKN2*	MN267851		
<i>Hemibarbus labeo</i> IS4*	MN267844		
<i>Hemibarbus labeo</i> IS5*	MN267845	ImSil	
<i>Hemibarbus labeo</i> IS6*	MN267846		
<i>Hemibarbus labeo</i> UN1*	MN267852		
<i>Hemibarbus labeo</i> SC1*	MN267847	SunChang	
<i>Hemibarbus labeo</i> GJ2*	MN267848		
<i>Hemibarbus labeo</i> GJ3*	MN267849	GangJin	
<i>Hemibarbus labeo</i> GJ4*	MN267850		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD1*	MN267834		Korea
<i>Hemibarbus labeo</i> HD2*	MN267835		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD3*	MN267836		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD4*	MN267837		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD5*	MN267838	HaDong	
<i>Hemibarbus labeo</i> HD6*	MN267839		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD7*	MN267840		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD8*	MN267841		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD9*	MN267842		
<i>Hemibarbus labeo</i> HD10*	MN267843		
<i>Hemibarbus barbus</i>	LC098240.1		Japan
<i>Hemibarbus barbus</i>	AB070241.1		Japan
<i>Hemibarbus labeo</i>	JN673562.1		Taiwan
<i>Hemibarbus labeo</i>	FJ197694.1	Busan	Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	KU942958.1		Taiwan
<i>Hemibarbus labeo</i>	KP064328.1		China
<i>Hemibarbus labeo</i>	DQ347953.2	ASan	Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	MK560572.1	AnDong	Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	MK560573.1	AnDong	Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	MK560574.1	AnDong	Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	HQ536370.1		Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	HQ536372.1	Seoul	Korea
<i>Hemibarbus labeo</i>	HQ536379.1		Korea
<i>Hemibarbus maculatus</i>	JN003360.1		USA
<i>Hemibarbus maculatus</i>	KR861930.1		China
<i>Hemibarbus maculatus</i>	KR861925.1		China
<i>Hemibarbus maculatus</i>	MF805660.1		Rusia
<i>Hemibarbus maculatus</i>	MF805661.1		Rusia
<i>Hemibarbus medius</i>	KJ868177.1		China
<i>Hemibarbus medius</i>	KF640234.1		Taiwan
<i>Hemibarbus umbrifer</i>	AP011415.1		Japan
<i>Hemibarbus longirostis</i>	DQ347952.2	Busan	Korea
<i>Hemibarbus mylodon</i>	FJ197686.1	Busan	Korea
<i>Hemibarbus mylodon</i>	AP011414.1		Japan
<i>Hemibarbus mylodon</i>	DQ345787.2	Asan	Korea
<i>Hemibarbus mylodon</i>		Seoul	Korea

*Samples used in this study

이루어진 단계통, 다른 하나는 하동의 HD2, HD8, HD9와 국내 부산, 아산, 서울 등지에서 보고된 누치들과 단계통으로 나타난다. 그 외 안동에서 보고된 누치들과 중국 누치가 단계통을 형성하고, 대만 누치와 나머지 누치속 5종을 포함하는 단계통, 그리고 *H. barbus*끼리 계통을 형성하였

다. 그러나 참마자와 어름치는 각각 다른 분지를 형성하여 별도의 계통군으로 묶였다. 섬진강에 서식하는 누치들은 누치속 내 다른 어류와 계통유전학적으로 근연관계에 있는 개체와 독립되어 섬진강의 특색을 나타내는 개체들로 나누어짐을 확인할 수 있었다.

Table 2. Pairwise distance matrix inferred from the nucleotide substitution of CO1 sequence of the family Cyprinidae.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1	-																											
2	0.143	-																										
3	0.150	0.175	-																									
4	0.152	0.166	0.129	-																								
5	0.149	0.163	0.129	0.123	-																							
6	0.134	0.168	0.158	0.181	0.186	-																						
7	0.141	0.142	0.156	0.167	0.157	0.116	-																					
8	0.142	0.168	0.165	0.185	0.192	0.011	0.121	-																				
9	0.145	0.126	0.161	0.162	0.144	0.162	0.134	0.175	-																			
10	0.147	0.147	0.179	0.158	0.148	0.162	0.122	0.162	0.110	-																		
11	0.037	0.127	0.147	0.153	0.141	0.130	0.121	0.134	0.136	0.130	-																	
12	0.019	0.135	0.139	0.143	0.139	0.127	0.122	0.134	0.138	0.139	0.027	-																
13	0.016	0.133	0.139	0.142	0.139	0.128	0.124	0.136	0.132	0.137	0.027	0.009	-															
14	0.142	0.131	0.165	0.179	0.161	0.168	0.158	0.172	0.148	0.161	0.131	0.135	0.129	-														
15	0.006	0.133	0.139	0.147	0.144	0.132	0.126	0.141	0.136	0.136	0.026	0.008	0.005	0.129	-													
16	0.037	0.125	0.141	0.148	0.131	0.138	0.130	0.146	0.120	0.141	0.042	0.027	0.026	0.127	0.026	-												
17	0.143	0.009	0.175	0.166	0.163	0.168	0.142	0.168	0.126	0.147	0.127	0.135	0.133	0.131	0.133	0.125	-											
18	0.040	0.121	0.137	0.148	0.131	0.136	0.130	0.144	0.116	0.145	0.046	0.031	0.029	0.123	0.030	0.003	0.121	-										
19	0.149	0.143	0.172	0.163	0.153	0.162	0.146	0.166	0.056	0.119	0.128	0.134	0.137	0.151	0.136	0.143	0.132	-										
20	0.153	0.134	0.141	0.155	0.160	0.151	0.138	0.153	0.124	0.130	0.130	0.144	0.140	0.142	0.144	0.152	0.134	0.156	0.121	-								
21	0.148	0.161	0.171	0.170	0.156	0.173	0.141	0.184	0.116	0.137	0.129	0.129	0.135	0.172	0.137	0.135	0.161	0.133	0.120	0.165	-							
22	0.152	0.137	0.155	0.138	0.163	0.159	0.148	0.159	0.110	0.134	0.133	0.137	0.139	0.167	0.141	0.153	0.137	0.128	0.063	0.127	0.142	0.104	-					
23	0.149	0.137	0.157	0.146	0.155	0.159	0.172	0.152	0.176	0.122	0.162	0.164	0.149	0.143	0.170	0.150	0.159	0.157	0.140	0.142	0.147	0.161	0.134	-				
24	0.151	0.157	0.148	0.151	0.157	0.174	0.155	0.174	0.126	0.162	0.158	0.147	0.141	0.168	0.148	0.157	0.157	0.155	0.140	0.142	0.145	0.157	0.132	0.005	-			
25	0.153	0.151	0.148	0.142	0.158	0.147	0.123	0.145	0.144	0.151	0.141	0.145	0.137	0.146	0.142	0.145	0.151	0.145	0.142	0.094	0.154	0.131	0.134	0.158	0.156	-		
26	0.145	0.163	0.127	0.121	0.003	0.181	0.155	0.188	0.146	0.146	0.137	0.135	0.135	0.159	0.139	0.131	0.163	0.131	0.155	0.157	0.158	0.161	0.154	0.157	0.155	0.156	-	
27																												

1. *Hemibarbus labeo* (in this study); 2. *Zacco platypus*; 3. *Cyprinus carpio*; 4. *Sinocyclocheilus grallani*; 5. *Barbonymus schwanefeldii*; 6. *Squalidus gracilis*; 7. *Squalidus japonicus*; 8. *Squalidus argenteatus*; 9. *Microphysogobio yaluensis*; 10. *Pseudogobio esocinus*; 11. *Belligobio nummifer*; 12. *Hemibarbus barbus*; 13. *Hemibarbus labeo*; 14. *Hemibarbus longirostris*; 15. *Hemibarbus maculatus*; 16. *Hemibarbus medius*; 17. *Hemibarbus mylodon*; 18. *Hemibarbus umbrifer*; 19. *Bivia springeri*; 20. *Ctenopharyngodon idella*; 21. *Gobio cynocephalus*; 22. *Microphysogobio kiatingensis*; 23. *Microphysogobio taohensis*; 24. *Rhinogobio cylindricus*; 25. *Rhinogobio ventralis*; 26. *Squaliobarbus curriculus*; 27. *Rhodeus ocellatus ocellatus*

잉어과(Cyprinidae) 내 28종의 어류의 COI 시퀀스를 바탕으로 계통유전학적(phylogenetic) 분석을 통해 누치의 계통유전학적 위치를 확인하였다(Fig. 5). 종 간의 진화적 유연관계를 분석하기 위한 진화적 거리는 DNA 염기서열 염기치환 정도를 Kimura 2-parameter distance model을 이용하여 계산하였다(Table 2). 섬진강 누치(HD1)와 피라미(*Zacco platypus*)와의 진화적 거리는 0.143, 흰줄납줄개(*Rhodeus ocellatus ocellatus*)와는 0.145, 눈볼개(*Squaliobarbus curriculus*)와 초어(*Ctenopharyngodon idella*)는 0.153, 그리고 누치속 어류인 *H. maculatus*와 진화적 거리는 0.006이다(Table 2). 누치가 포함된 모래무지아과(Gobioninae) 내에서의 진화적 거리는 0.006(*H. maculatus*)~0.152(*Rhinogobio cylindricus*)로 가장 가까운 유연관계부터 유전적으로 먼 유연관계까지 폭넓게 나타났다(Table 2). 계통유전학적(phylogenetic) 분석은 잉어과 28종의 진화적 연관관계가 크게 4 그룹으로 나뉘어짐을 보여 주었다. 그룹 1(Blue color on Fig. 5)은 누치를 포함하는 모래무지아과(Gobioninae) 어류들로 형성되고, 그룹 2(Green color on Fig. 5)는 Labeoninae 어류들로 형성되고, 그룹 3(Orange color on Fig. 5)는 잉어아과(Cyprininae) 어류들로 형성되며, 그룹 4(Yellow color on Fig. 5)는 피라미아과(Danioninae) 어류로 이루어져 있다. 모래무지아과는 연구에서 분석된 누치를 포함한 다수의 누치속 어류들이 하나의 단계통을 이루고 돌마자(*Microphysogobio yaluensis*)와 배가사리(*M. longidorsalis*)를 포함하는 어류들과 누치속 어름치(*H. mylodon*)와 참마자(*H. longirostis*)를 포함하는 하나의 단계통이 나타났다. 하지만 모래무지아과 내의 물개속(*Squalidus*) 어류들은 진화적 계통수에서 다른 분지의 단계통으로 나타났다(Fig. 5). 그 외 피라미(*Zacco platypus*)를 포함하는 피라미아과(Danioninae) 어류들이 다른 분지의 단계통을 이루고 잉어(*Cyprinus carpio*)를 포함하는 잉어아과 어류들이 하나의 단계통을 나타냈다. Labeoninae에 속하는 *Crossocheilus latius*와 *Tariqilabeo latius* 어류와 잉어아과 내 *Barbonymus gonionotus*와 *Barbonymus schwanefeldii* 어류들은 계통유전학적으로 다른 분지를 나타내며 잉어아과 어류들과는 분리되어 모래무지아과에 가까운 유연관계를 나타냈다(Fig. 5 and Table 2). 이러한 결과들은 섬진강 수계의 누치(*H. labeo*)들이 계통유전학적으로 누치속 내 *H. maculatus*와 가장 가까우며 잉어과 내 계통유전학적으로 그룹 1의 담수어류들과 진화적 근연관계가 있는 유전적 위치를 보여주고 있다.

잉어과 내 누치의 계통유전학적 위치에 대한 결과는 외부적 형태 분류뿐 아니라 분자유전학적인 분류의 기준을 제공함으로써 외래종 확인이나 어류자원 보존 및 관리에 활

용할 수 있을 것이다. 누치는 담수환경 모니터링 및 부가가치가 있는 담수어종임에도 불구하고 관련 연구는 충분하지 않다. Lu (2015)는 중국 흑룡강 누치의 양식종과 자연종에서 20개의 다형성(polymorphic) microsatellites 표지마커를 발굴하였다. 이러한 정보는 누치의 유전적 보존을 위해 유용한 기술적 방법을 제공하지만 잉어과 내 누치의 계통유전학적인 위치를 파악하기는 힘들다. 본 연구에서는 누치속 및 잉어과 내 누치의 계통유전학적 연관관계를 미토콘드리아 DNA의 COI 시퀀스를 비교하여 분석하였다. COI 유전자는 서로 다른 보존적인 염기서열의 변이를 가지고 있어 척추동물의 분류군에 이용되며 종 구분을 위한 DNA barcoding 연구에도 널리 응용되고 있다(April *et al.*, 2011). 잉어과 내 국내 분포하는 모래무지아과 어류는 17속 22종 이상이 분포하여 이들 중에 대한 계통유전학적 연구를 위한 형태적인 검토와 다양한 유전적 분석방법이 필요하다.

국내 서식하는 누치속 어류 중 어름치는 천연기념물 제 259호로 환경변화에 매우 민감하여 개체수 영향을 받는 멸종위기종이다(Ko *et al.*, 2017). 멸종위기종의 보존과 관리를 위해서는 대상 종의 유전적 정보 분석을 통해 멸종 위기 원인을 규명하고 복원 대책을 수립해야 한다(Lee *et al.*, 2008). AFLP(Amplified fragment length polymorphism)를 이용한 북한강, 남한강, 임진강 수계 어름치의 유전적 다양성 분석은 집단 간 평균 유사도가 0.975로 다양성이 낮으며 각 하천에 분포하는 어름치가 유사한 집단임을 보고하였다(Lee *et al.*, 2008). 본 계통유전학적 연구에서는 어름치가 누치속 내에서 누치보다 참마자와 단계통을 형성함으로써(Fig. 5) 계통유전학적으로 유연관계가 더 밀접함이 확인되었다. 미토콘드리아 DNA를 이용한 모래무지아과 및 누치속 어류들의 계통유전학적 분석은 국내 섬진강산 누치들의 다양성과 유전적 변이에 대한 분자계통정보를 제공함으로써 생물자원으로써 누치의 보존 및 관리, 환경변화에 따른 형태적 변이와 연관된 분자종분류를 위해 활용될 수 있을 것이다. 나아가 본 연구는 모래무지아과 내 어류들의 멸종위기 분석 및 복원을 위한 비교 유전적 자료로 제공될 것이다.

적 요

섬진강 수계에 서식하는 누치(*Hemibarbus labeo*)의 미토콘드리아 DNA에서 cytochrome c oxidase subunit I(COI) 유전자를 발굴하고 누치속 *Hemibarbus* 및 잉어과(Cyprinidae) 내 계통유전학적인 위치를 확인하는 연구

를 수행하였다. 발굴된 577 bp COI 시퀀스의 다중배열 결과 섬진강산 누치들의 높은 염기서열 상동성을 보였다 (99~100%). 우리나라에서 발견되는 누치속 3종에서 누치 (*H. laeoa*: HD1)와 어름치 (*H. mylodon*)의 염기서열 유사성은 88.91%, 참마자 (*H. longirostis*)와는 88.81%이었다. 또한, *H. maculatus*, *H. medius*, *H. umbrifer*, *H. barbatus*는 각각 누치와의 염기서열 유사성이 98.97%, 97.20%, 96.87%, 98.85% 등으로 나타났다. 누치속 7종의 계통유전학적 분석결과 섬진강산 누치 (*H. laeoa*)들은 두개의 단계통(clade)을 형성하는데 하나는 하동, 임실, 강진, 순창의 섬진강 누치들로만 이루어진 단계통, 다른 하나는 하동의 HD2, HD8, HD9와 국내 부산, 아산, 서울 등에서 채집 보고된 누치들과 단계통을 형성하였다. 잉어과 내 섬진강산 누치(HD1)의 계통진화적 위치는 피라미 (*Zacco platypus*)와는 진화적 거리가 0.143, 누치속 *H. maculatus*와는 0.006으로 나타났다. 또한 잉어과 28종 내 계통유전학적 위치는 모래무지아과(Gobioninae) 어류들이 포함된 그룹 I에 섬진강산 누치가 위치함을 확인하였다. 본 연구의 결과는 누치를 포함하는 잉어과 내 어류의 계통유전학적 비교와 환경오염에 따른 담수환경 모니터링을 위한 모델어류의 발굴 연구에 주요한 유전적 정보를 제공할 것이다.

저자기여도 개념설정: 광인실, 방법론: 광인실 & 박기연, 분석: 박기연 & 이완옥, 자료제공: 이완옥 & 박기연, 자료관리: 광인실 & 박기연, 원고 초안작성: 박기연, 원고 교정: 광인실, 이완옥, 박기연, 원고 편집 및 검토: 광인실, 이완옥, 박기연, 과제관리: 광인실, 연구비 수주: 광인실. 모든 저자는 논문의 결과에 동의하였고, 출판될 최종본을 검토하고 동의하였습니다.

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 이 논문은 한국연구재단 중점연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임 [NRF-2018-R1A6A1A-03024314].

REFERENCES

April, J., R.L. Mayden, R.H. Hanner and L. Bernatchez. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 10602-10607.

Bang, I.C., Y.A. Lee and W.O. Lee. 2008. Cytogenetic analysis of three *Hemibarbus* species (Cypriniformes) from Korea. *Journal of Aquaculture* **21**: 259-264.

Chen, J., Y.P. Lv, Q.M. Dai, Z.H. Hu, Z.M. Liu and J.H. Li. 2019. Host defense peptide LEAP-2 contributes to mono-

cyte/macrophage polarization in barbel steed (*Hemibarbus laeoa*). *Fish and Shellfish Immunology* **87**: 184-192.

Froese, R. and D. Pauly (Eds). 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. Retrieved from <http://www.fishbase.org>. version.

Gye, M.C. 2004. Analysis of vitellogenin gene expression by RT-PCR in *Hemibarbus laeoa* (Cyprinidae) for the analysis of estrogenic activity in aquatic environment. *Korean Journal of Limnology* **37**: 122-129.

Iyiola, O.A., L.M. Nneji, M.K. Mustapha, C.G. Nzeh, S.O. Oladipo, I.C. Nneji, A.O. Okeyoyin, C.D. Nwani, O.A. Ugwumba, A.A.A. Ugwumba, E.O. Faturoti, Y.Y. Wang, J. Chen, W.Z. Wang and A.C. Adeola. 2018. DNA barcoding of economically important freshwater fish species from north-central Nigeria uncovers cryptic diversity. *Ecology and Evolution* **8**: 6932-6951.

Ko, M.H., H.R. Kim, S.Y. Park and I.C. Bang. 2017. Egg development and early life history of the Natural Monument species *Hemibarbus mylodon* (Pisces: Cyprinidae) in Korea. *Korean Journal of Ichthyology* **29**: 101-108. (in Korean)

Kim, I.S. 1997. Illustrated Encyclopedia of Fauna & Flora of Korea. Vol. 37. Freshwater Fishes. Ministry of Education., Korea. Seoul. pp. 220-225. (in Korean).

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 Publishing Co., Seoul, Korea, pp. 614.

Kim, I.S. and J.Y. Park. 2002. Freshwater Fishes of Korea. Kyohak Press, Seoul. 465 pp.

Kim, I.S. and J.Y. Park. 2007. Freshwater Fishes of Korea. Kyohak Publishing, Seoul, 467 pp. (in Korean).

Kim, K.Y., Y.H. Lim, I.C. Bang and Y.K. Nam. 2009. Phylogenetic relationships among three new *Hemibarbus* mitochondrial DNA sequences belonging to the subfamily Gobioninae (Teleostei, Cypriniformes, and Cyprinidae). *Mitochondrial DNA Part A* **20**: 119-144.

Kim, M.J. and C.B. Song. 2011. Origin of the Korean mandarin fish, *Siniperca scherzeri* and its molecular phylogenetic relationships to other *Siniperca* Fishes. *Korean Journal of Ichthyology* **23**: 95-105.

Lee, W.O., M.M. Zhang, C.W. Oh, J.M. Baek and K.J. Song. 2012. Age and growth of barbel steed *Hemibarbus laeoa* in Goe-san lake in Korea. *Fisheries and Aquatic Sciences* **15**: 353-359.

Lee, Y.A., Y.E. Yun, Y.K. Nam and I.C. Bang. 2008. Genetic diversity of endangered fish *Hemibarbus mylodon* (Cyprinidae) assessed by AFLP. *Journal of Aquaculture* **21**: 196-200

Li, P., D. Xu, Z. Peng and Y. Zhang. 2012. The complete mitochondrial genome of the spotted steed, *Hemibarbus maculatus* (Teleostei, Cypriniformes). *Mitochondrial DNA Part A* **23**: 34-40.

Lin, C.J., H.D. Lin, J.P. Wang, S.C. Chao and T.Y. Chiang.

2010. Phylogeography of *Hemibarbus labeo* (Cyprinidae): secondary contact of ancient lineages of mtDNA. *Zoologica Scripta* **39**: 23-35.
- Lu, C., G.Y. Gu, L. Geng, L. Cheng, C. Li, G. Tong, H. Jiang, S. Mahboob, W. Xu and X. Sun. 2015. Isolation and characterization of twenty polymorphic microsatellites for *Hemibarbus labeo* (Cyprinidae). *Conservation Genetics Resources* **7**: 89-92.
- Oh, M.K. and J.Y. Park. 2009. A molecular systematics of Korean *Zacco* species inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene sequence. *Korean Journal of Ichthyology* **21**: 291-298.
- Shin, M.J., Y.M. Park, J.E. Lee and E.W. Seo. 2010. Heavy metal contents of *Hemibarbus labeo* in Andong and Imha reservoirs. *Korean Journal Limnology* **43**: 377-384.
- Ward, R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last and P.D. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **360**: 1847-1857.
- Xu, W., C.T. Li, L.W. Geng, H.W. Sun and X.Y. Liu. 2009. Growth and reproduction of reared *Hemibarbus labeo* in the Wusuli River. *Journal of Fisheries Sciences of China* **16**: 550-556.
- Yen, M.D. 1985. Species composition and distribution of the freshwater fish fauna of the North of Vietnam. *Hydrobiologia* **121**: 281-286
- Zhang, C.L. 1954. Distribution of the freshwater fishes in China. *Geographical Bulletin* **20**: 279-284.