

떡납줄갱이 *Rhodeus notatus*와 흰줄납줄개 *R. ocellatus*의 자연 종간잡종에 관한 연구

윤봉한 · 성무성 · 김용휘 · 방인철*

순천향대학교 생명과학과

A Study on the Natural Interspecific Hybrid between *Rhodeus notatus* and *R. ocellatus* by Bong Han Yun, Mu Sung Sung, Yong Hwi Kim and In-Chul Bang* (Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea)

ABSTRACT Three specimens, presumed to be natural hybrids between *Rhodeus notatus* and *R. ocellatus*, were collected from Onyangcheon Stream area, Jwabu-dong, Asan-si, Chungcheongnam-do, the Republic of Korea, and morphological and phylogenetic analyses were performed to clearly identify their parent species. The body color of the three natural hybrids was light greenish-brown on dorsal side, and the size of red area on the upper front of the dorsal fin and the outer margin of the anal fin generally showed intermediate characters between the parent species, *R. notatus* and *R. ocellatus*. Among the measurement and meristic characters, the ratio of prepectoral length and preanal length in the standard length, and the ratio of snout length, interorbital width, length of caudal peduncle and depth of caudal peduncle in the head length, and the number of longitudinal row scales were analyzed as the unique characters of natural hybrids. In the *rag1* gene of nuclear DNA, the three natural hybrids were analyzed to be reflected all the single nucleotide polymorphism sites between *R. notatus* and *R. ocellatus*, and in the phylogenetic tree using the *cytb* gene of mitochondrial DNA, they formed the same genetic clade as *R. notatus*. Therefore, three specimens, presumed to be natural hybrids analyzed in this study were identified as interspecific hybrids between female *R. notatus* and male *R. ocellatus*.

Key words: *Rhodeus notatus*, *Rhodeus ocellatus*, interspecific hybrid, natural hybrid, hybridization

서 론

교잡(hybridization)은 유전적으로 구별되는 개체군 간의 방식으로 척추동물군 중 어류에서 빈번하게 관찰되며, 종분화(speciation) 과정에 다양한 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Hubbs, 1955; Campton, 1987; Allendorf and Waples, 1996). 교잡은 유전자 흐름(gene flow)과 재조합(recombination)으로 인하여 분화를 늦추거나 역전시킬 수 있으며, 유전자 이입(introgression)을 통해 종분화를 가속화하거나 배수체화

(polyploidization)를 통해 즉각적인 종분화를 일으킬 수 있다(Wendel, 2000; Abbott *et al.*, 2013). 이러한 현상들이 진화의 원동력으로서 긍정적인 측면으로 작용할 수 있으나, 고유종과 같은 희귀한 어종의 멸종으로 이어질 수 있으므로 보전생물학적 관점에서 부정적으로도 작용할 수 있다(Grant and Grant, 1992; Rhymer and Simberloff, 1996; Gerber *et al.*, 2001).

잉어과(Cyprinidae) 어류에서 자연발생적인 교잡(spontaneous hybridization)은 더욱 빈번하게 발견되고 있으며, 체외수정, 산란 장소 및 시기 중복, 불완전한 생식적 격리기구 등과 같은 요인으로 발생 빈도가 높은 것으로 보고된 바 있다(Hubbs, 1955; Sakai and Hamada, 1985; Scribner *et al.*, 2000; Corush *et al.*, 2021). 또한, 하천구조물 설치로 인한 서식지 훼손 및 감소, 비토착 어종의 무분별한 방류와 같은 인위적인 요인으로도

저자 직위: 윤봉한(석·박사통합과정), 성무성(석·박사통합과정), 김용휘(박사후 연구원), 방인철(교수)

*Corresponding author: In-Chul Bang Tel: 82-41-530-1286, Fax: 82-41-530-1493, E-mail: incbang@sch.ac.kr

자연 교잡의 사례가 나타나고 있다(DeMarais and Minckley, 1992; Jeon *et al.*, 2018; Uemura *et al.*, 2018). 특히, 잉어과에 속하는 납자루아과(Acheilognathinae) 어류는 석패과(Unionidae) 담수 이매패류(Bivalvia)의 아가미에 알을 낳는 독특한 산란 습성에 기인하여 자연 교잡 사례는 더욱 흔하게 관찰되고 있다(Kim *et al.*, 2014, 2015; Nelson *et al.*, 2016; Chae *et al.*, 2019; Hata *et al.*, 2019; Kwak *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021).

잡종(hybrid)은 형태적으로 두 부모종의 중간형질을 나타내며, 모계종과 부계종을 명확히 추정하기 위해서 분자계통학적 분석이 수행되어야 한다(Karlsson *et al.*, 2013; Foresti *et al.*, 2013). 핵 DNA(nuclear DNA)의 recombination activating gene 1 (*rag1*) 유전자 영역은 척추동물군에서 매우 보존적이므로 동형접합(homozygote)과 이형접합(heterozygote) 상태를 분석하면 잡종 판별이 쉽게 가능하다(Cebrat *et al.*, 2008). 또한, 모계로부터 유전되는 cytochrome c oxidase I gene (*co1*), cytochrome b gene (*cytb*) 유전자 영역과 같은 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA) 분석 시 정확한 모계종 추정과 함께 부계종을 판별할 수 있다(Lee *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2017).

본 연구는 충청남도 아산시 좌부동 곡교천의 지류인 온양천 일대에서 떡납줄갱이 *Rhodeus notatus*와 흰줄납줄개 *R. ocellatus* 간의 자연 잡종으로 추정되는 3개체를 채집하여 이를 대상으로 형태학적 특징을 기록하고 분자계통학적 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 표본 채집

2021년 4월 16일 충청남도 아산시 좌부동 곡교천의 지류인 온양천 일대(36°45'36.2"N, 127°01'19.5"E)에서 납자루아과 어류의 자연 잡종으로 추정되는 3개체(체장 34.2~45.9 mm)를 채집하였으며, 동일한 장소에서 이들의 부모종으로 추정되는 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 그리고 동소출현종을 추가로 채집하였다. 동정과 분류는 Nelson *et al.* (2016)과 Chae *et al.* (2019)를 따랐다. 채집된 어류 중 자연 잡종과 이들의 부모종으로 추정되는 개체들은 체색 비교를 위하여 즉시 사진을 촬영하였으며, 유전자 분석에 필요한 시료는 배지느러미의 일부를 절단하여 99.9% 에탄올에 고정하였다. 형태 분석의 경우, 어체를 10% 포르말린 용액에 고정하여 표본(Voucher No. SUC25361-25383)을 제작한 후 이용하였다.

2. 형태학적 분석

형태 분석은 Hubbs and Largler (2004)와 Armbruster (2012)를 참고하여 15개의 계측형질과 4개의 계수형질을 측정하였다. 체장(standard length, SL)에 대한 체고(body depth, BD),

두장(head length, HL), 등지느러미 기점거리(predorsal length, PDL), 가슴지느러미 기점거리(prepectoral length, PPL), 배지느러미 기점거리(preventral length, PVL), 뒷지느러미 기점거리(preanal length, PAL), 등지느러미 기저길이(dorsal fin base length, DBL), 뒷지느러미 기저길이(anal fin base length, ABL), 미병장(length of caudal peduncle, LCP) 그리고 미병고(depth of caudal peduncle, DCP)의 비율 및 두장에 대한 문장(snout length, SnL), 안경(eye diameter, ED), 양안 간격(interorbital width, IOW), 미병장(length of caudal peduncle, LCP) 그리고 미병고(depth of caudal peduncle, DCP)의 비율의 계측형질은 1/20 mm digital calipers (SHAHE, China)를 사용하여 측정하였다. 또한, 계수형질의 경우 등지느러미 분지연조수(number of dorsal fin rays, branched, DF), 뒷지느러미 분지연조수(number of anal fin rays, branched, AF), 종렬비늘수(number of longitudinal row scales, LR) 그리고 측선비늘수(number of lateral line scales, LL)를 SMZ171 stereo microscope (Motic, China)을 사용하여 계수하였다. 측정된 계측 및 계수형질은 자연 잡종과 부모종 간의 형태를 비교하기 위해 Nikoljukin (1972)이 제시한 계산식을 이용하여 잡종지수(hybrid index, Hindex)를 산출하였다. 산출된 Hindex의 경우, 30~70의 범위일 경우 두 부모종의 중간형질, 0~30 범위는 제1 부모종, 70~100 범위는 제2 부모종 그리고 0 미만 및 100 초과 범위는 잡종의 고유한 형질이 발현된 것으로 간주하고 있으며(Šorić, 2004; Witkowski *et al.*, 2015; Kwak *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2021), 본 연구도 이를 적용하여 분석하였다.

3. Genomic DNA 추출 및 염기서열 분석

자연 잡종 3개체와 부모종으로 추정되는 떡납줄갱이와 흰줄납줄개의 배지느러미 일부를 절단하고 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (Biofact, Korea)를 이용하여 Genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. 추출된 gDNA는 핵 DNA의 *rag1* 유전자 영역의 경우, RAG1F1 (5'-CTGAGCTGCAGTCAGTACCA TAAGATGT-3')과 RAG1R2 (5'-TGAGCCTCCATGAAGTTC TGAAGRTAYTT-3'), 미토콘드리아 DNA의 *cytb* 유전자 영역의 경우, Cytb-F (5'-GAYTTGAAGAACCATCGTTGTA-3')와 Cytb-R (5'-CTTCGGATTACAAGACCGATGC-3')의 primer를 각각 사용하여 PCR을 수행하였다(Chang *et al.*, 2014; López *et al.*, 2004). PCR 조건은 95°C에서 5분간 초기변성(initial denaturation) 후 95°C에서 30초간 변성(denaturation), 53°C (*cytb*, 56°C)에서 30초간 결합(annealing), 72°C에서 1분간 신장(extension)을 35회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 7분간 최종신장(elongation)을 수행하였다. PCR 산물은 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 통한 sequencing 반응으로 염기서열 데이터를 얻었다.

4. 분자계통학적 분석

자연 잡종으로 추정되는 3개체와 이들의 부모종으로 추정되는 떡납줄갱이 및 흰줄납줄개에 대한 핵 DNA의 *rag1* (1,497 bp) 유전자 영역과 미토콘드리아 DNA의 *cytb* (1,140 bp) 유전자 영역의 염기서열 데이터는 FinchTV 1.4.0 (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>)을 이용하여 trimming을 실시하였다. 자연 잡종 3개체의 부계종을 추정하기 위하여 *rag1* 유전자 염기서열의 electropherogram에 나타나는 double peaks 양상을 분석하였으며, 모계종을 추정하기 위하여 *cytb* 유전자 염기서열을 분석하여 분자계통도로 나타내었다. 명확한 모계종 추정을 위하여 NCBI Genbank에서 납자루아과 근연종들의 *cytb* 유전자 염기서열 데이터를 수집하여 사용하였으며, MAFFT 7.450 (Kato *et al.*, 2002; Kato and Standley, 2013)를 사용하여 다중정렬한 후 분자계통분석에 사용하였다. 분자계통도는 PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010)의 Maximum-likelihood 방법을 이용하여 1,000번의 bootstrapping을 적용하였다. 치환 모델(substitution model)은 jModelTest 2.1.10 (Guindon and Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012)을 사용하여 Akaike information criterion (AIC)의 값에 따라 최적의 모델로 선정된 GTR+I+G 모델을 적용하였으며, 작성된 분자계통도는 Figtree 1.4.4 (Rambaut, 2018)를 이용하여 시각화하였다.

결 과

자연 잡종 3개체가 출현한 온양천 일대에서 동소출현종은 총 3과 16종 582개체가 채집되었다. 우점종은 피라미 *Zacco*

platypus (36.43%, 212개체), 아우점종은 떡납줄갱이 (24.74%, 144개체)와 흰줄납줄개 (22.50%, 131개체)로 나타났고, 다음으로 치리 *Hemiculter leucisculus* (4.64%, 27개체), 긴몰개 *Squalidus gracilis majimae* (3.09%, 18개체), 모래무지 *Pseudogobio esocinus* (1.89%, 11개체), 왜매치 *Abbottina springeri* (1.20%, 7개체), 붕어 *Carassius auratus* (1.03%, 6개체), 그 밖의 어류는 1% 미만의 출현비율을 보였다(Fig. 1).

자연 잡종 3개체의 체색은 등 쪽이 연한 녹색으로 떡납줄갱이의 연한 갈색과 흰줄납줄개의 진한 녹색의 중간 색상을 나타냈고, 등지느러미 앞쪽 상단 및 뒷지느러미 바깥 가장자리에 붉은색을 나타내는 면적은 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 간의 중간 크기를 나타냈다. 꼬리지느러미 기부 경우, 자연 잡종은 검은색과 붉은색이 섞인 듯하게 나타나 떡납줄갱이의 검은색과 흰줄납줄개의 붉은색이 모두 나타났다. 이외에 새공 위쪽 후단의 작은 암점, 등지느러미 기점 아래보다 앞쪽에서 시작하는 세로줄 등은 떡납줄갱이를 따랐으며, 등 앞쪽에 금속광택, 청록색의 세로줄, 뒷지느러미 전체가 붉은색을 나타내는 점 등은 흰줄납줄개를 따랐다. 또한, 떡납줄갱이와 같이 복부 아랫면 및 배지느러미가 검은 개체(Fig. 2D), 흰줄납줄개와 같이 뒷지느러미 전체가 붉은색이 강하게 나타나는 개체(Fig. 2B) 등 자연 잡종 3개체에서 체색이 모두 동일하게 관찰되지 않은 부분도 존재하였다(Fig. 2).

자연 잡종 3개체와 부모종 간의 조사한 외부형질 및 Hindex 분석 결과는 Table 1과 같으며, 15개의 계측형질 중 체장에 대한 가슴지느러미 기점거리의 비(Hindex = -62 ~ -12), 뒷지느러미 기점거리의 비(Hindex = -363 ~ -296, 290)와 두장에 대한 문장의 비(Hindex = 2226 ~ 3374), 양안 간격의 비(Hin-

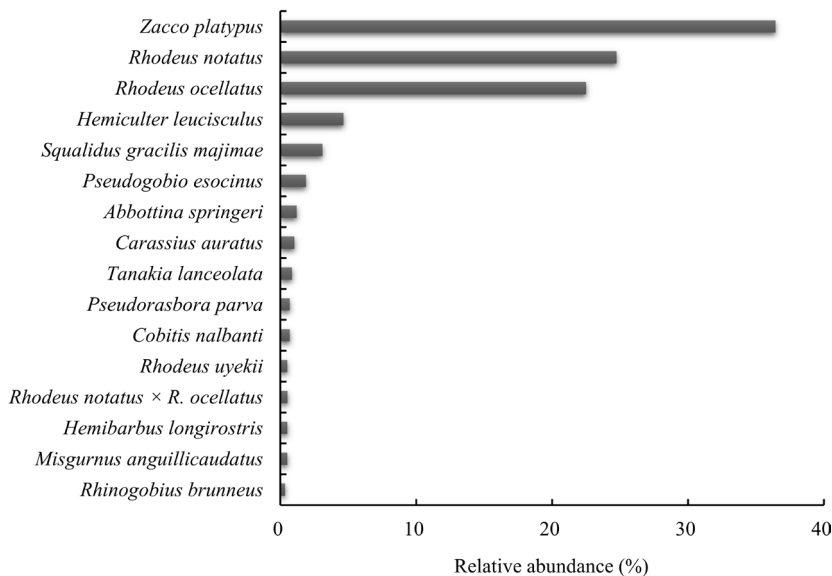


Fig. 1. Relative abundance of collected fishes in Onyangcheon Stream, Korea.

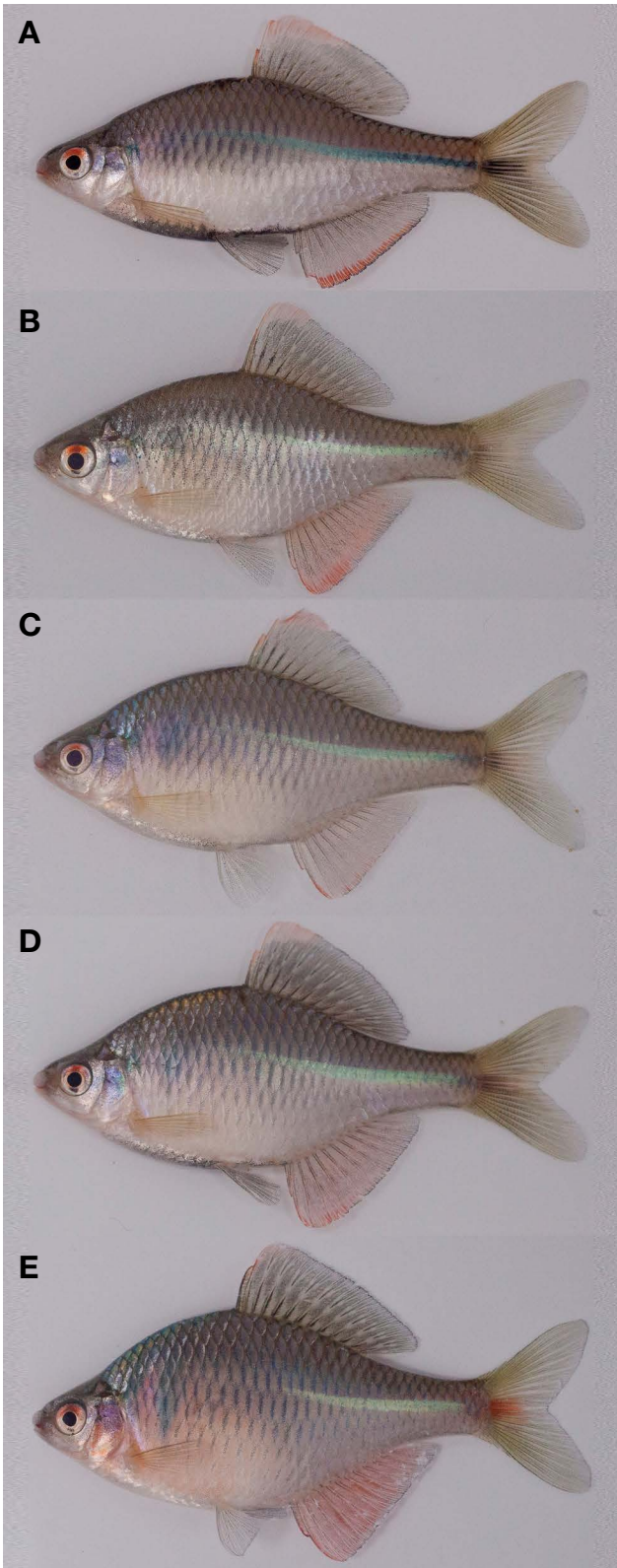


Fig. 2. Comparison of body color between natural hybrids and parent species, *Rhodeus notatus* and *R. ocellatus* (A, *R. notatus*: 43.3 mm SL; B, Hybrid 01: 34.2 mm SL; C, Hybrid 02: 44.8 mm SL; D, Hybrid 03: 45.9 mm SL; E, *R. ocellatus*: 55.9 mm SL).

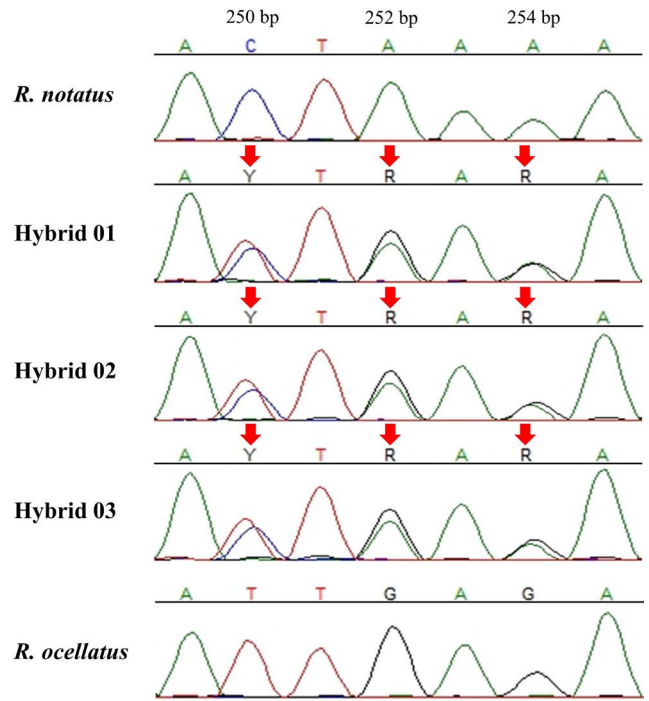


Fig. 3. Electropherograms to the *rag1* gene shown clear evidence of natural hybridization of *Rhodeus notatus* and *R. ocellatus*. Double peaks indicate by red arrows.

dex = -607 ~ -308, 1401), 미병장의 비 (Hindex = -1688, 435 ~ 2107), 미병고의 비 (Hindex = -609 ~ -428, 420) 등 6개의 계수형질이 자연 잡종 개체 모두에서 이들의 고유한 형질이 발현된 것으로 나타났다. 체장에 대한 등지느러미 기점거리의 비 (Hindex = 31 ~ 51), 등지느러미 기저길이의 비 (Hindex = 42 ~ 71)는 모두 중간형질을 따랐으며, 미병장의 비 (Hindex = 10 ~ 12)는 모두 제1 부모종인 떡납줄갱이를 따랐다. 나머지 체장에 대한 체고의 비 (Hindex = 29 ~ 93), 두장의 비 (Hindex = -38 ~ 48), 배지느러미 기점거리의 비 (Hindex = 61 ~ 108), 뒷지느러미 기저길이의 비 (Hindex = -12 ~ 4), 미병고의 비 (Hindex = 55 ~ 149)와 두장에 대한 안경 (Hindex = 69 ~ 151)의 비는 제1, 2 부모종, 중간형질, 고유한 형질 등 개체별로 다양하게 나타났다. 4개의 계수형질을 살펴보면, 종렬비늘수 (Hindex = -30 ~ -10)는 자연 잡종 3개체 모두에서 고유한 형질이 나타났고, 측선비늘수 (Hindex = 0 ~ 10)는 제1 부모종인 떡납줄갱이에 가까운 것으로 산출되었다. 등지느러미 연조수 (Hindex = 10, 85)와 뒷지느러미 연조수 (Hindex = 25, 90)는 자연 잡종 개체별로 다르게 산출되었지만 고유한 형질이나 중간형질 없이 부모종인 떡납줄갱이 또는 흰줄납줄갱이를 따르는 것으로 나타났다.

핵 DNA의 *rag1* 유전자 영역의 염기서열은 총 1,497 bp가 증폭되었다. 부모종으로 추정되는 떡납줄갱이와 흰줄납줄갱이 간의

Table 1. Comparison of 15 proportional measurements, 4 meristic counts and hybrid index (Hindex) from *Rhodeus notatus*, *R. ocellatus* and their natural hybrids

Characteristics	<i>Rhodeus notatus</i>		Hybrid		<i>Rhodeus ocellatus</i>		Hindex		
	SUC25361-25370 (N = 10)		SUC25381-25383 (N = 3)		SUC25371-25380 (N = 10)		Hybrid		
	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	01	02	03
SL(mm)	34.1~43.3	39.9 ± 2.9	34.2~45.9	41.7 ± 5.3	44.7~55.9	50.0 ± 4.6			
In % of SL									
BD	36.1~39.1	37.8 ± 1.0	39.5~42.3	41.2 ± 1.2	40.2~49.1	44.6 ± 3.1	29	82	93
HL	26.0~27.4	26.9 ± 0.4	26.1~27.3	26.5 ± 0.5	23.7~26.3	24.9 ± 0.9	36	48	-38
PDL	52.3~53.9	53.2 ± 0.6	50.8~52.5	51.7 ± 0.7	51.0~53.5	52.3 ± 0.9	51	38	31
PPL	23.8~25.7	25.0 ± 0.7	25.8~26.6	26.2 ± 0.3	22.6~24.5	23.9 ± 0.6	-52	-12	-62
PVL	42.5~46.8	44.2 ± 1.4	46.1~48.2	47.1 ± 0.9	46.1~48.2	47.1 ± 0.7	108	61	83
PAL	59.1~63.8	60.6 ± 1.4	60.4~62.0	61.0 ± 0.7	60.2~64.7	62.4 ± 1.4	290	-363	-296
DBL	20.1~24.4	22.3 ± 1.4	24.3~25.6	25.1 ± 0.6	24.8~31.1	27.6 ± 2.3	71	42	65
ABL	16.5~22.7	20.1 ± 2.0	21.0~22.1	21.5 ± 0.5	20.3~28.4	23.8 ± 2.5	-12	4	-5
LCP	21.2~24.7	23.4 ± 1.2	23.4~25.5	24.4 ± 0.9	21.8~25.6	23.4 ± 1.1	11	12	10
DCP	12.4~13.9	13.2 ± 0.4	12.5~12.9	12.7 ± 0.2	12.1~13.5	12.7 ± 0.4	149	84	55
In % of HL									
SnL	24.5~26.7	25.4 ± 0.7	29.1~30.7	30.1 ± 0.7	24.6~28.3	25.7 ± 1.0	3214	3374	2226
ED	28.2~33.6	30.0 ± 1.5	27.1~28.6	28.1 ± 0.7	25.8~30.2	27.9 ± 1.4	74	69	151
IOW	37.6~42.8	40.0 ± 1.4	38.5~45.9	41.4 ± 3.2	41.1~46.4	43.9 ± 1.4	1401	-308	-607
LCP	77.5~93.9	87.2 ± 5.3	85.6~97.8	91.9 ± 5.0	85.7~99.9	94.0 ± 4.2	435	2107	-1688
DCP	47.3~51.0	49.2 ± 1.5	47.2~49.0	47.9 ± 0.8	48.1~56.6	51.3 ± 3.2	-428	420	-609
DF	9~10	9.8 ± 0.4	10~11	10.3 ± 0.5	11~12	11.3 ± 0.5	85	10	10
AF	9~10	9.6 ± 0.5	10~11	10.3 ± 0.5	10~11	10.7 ± 0.5	90	25	25
LR	32~33	32.1 ± 0.3	33~34	33.3 ± 0.5	31~33	31.9 ± 0.8	-10	-10	-30
LL	4	4	4~5	4.3 ± 0.5	3~5	4.1 ± 0.5	0	0	10

Abbreviations are as follows. BD, body depth; DBL and ABL, dorsal and anal fin base length; DF and AF, number of dorsal and anal fin rays (branched); ED, eye diameter; HL, head length; IOW, interorbital width; LCP and DCP, length and depth of caudal peduncle; LL, number of lateral line scales; LR, number of longitudinal row scales; PDL, PPL, PVL and PAL, predorsal, prepectoral, preventral and preanal length; SL, standard length; SnL, snout length.

염기서열 변이는 총 36 bp로 나타나 약 2.4%의 변이율을 보였다. 한편, 자연 잡종 3개체는 떡납줄갱이와 흰줄납줄갱이 간의 염기서열 변이영역(36 bp)을 모두 반영하는 double peaks 양상이 관찰되었다(Table 2, Fig. 3).

미토콘드리아 DNA의 *cytb* 유전자 영역의 염기서열은 총 1,140 bp가 증폭되었으며, 떡납줄갱이와 흰줄납줄갱이 간의 염기서열 변이는 총 186~187 bp로 나타나 약 16.3~16.4%의 비교적 높은 변이율을 보였다. 한편, 자연 잡종 3개체와 떡납줄갱이 간의 염기서열 변이는 총 0~1 bp로 나타나, 약 0.00~0.09%의 매우 낮은 변이율을 보였으나, 자연 잡종 3개체와 흰줄납줄갱이 간의 염기서열 변이는 총 186~187 bp(약 16.3~16.4%)로 나타나 떡납줄갱이와 흰줄납줄갱이 간의 변이율과 동일한 수준을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 *cytb* 유전자 영역을 이용한 분자계통도에서 뚜렷하게 나타났으며, 높은 수치의 지지도(96%)를 기반으로 자연 잡종 3개체는 떡납줄갱이와 동일한 유전적

clade를 형성하였다(Fig. 5).

고찰

본 연구에서 핵 DNA의 *rag1* 유전자 영역을 이용한 분자계통학적 분석 결과, 납자루아과 어류의 자연 잡종으로 추정되는 3개체는 떡납줄갱이와 흰줄납줄갱이 간의 단일염기다형성(single-nucleotide polymorphism, SNP) 부위를 모두 반영하는 double peaks 양상(Cebrat *et al.*, 2008)이 나타나 이들의 자연 잡종임이 명확한 것으로 나타났다. 또한, 미토콘드리아 DNA의 *cytb* 유전자 영역을 이용한 분자계통학적 분석 결과에서 자연 잡종 3개체는 떡납줄갱이와 매우 낮은 염기서열 변이율(약 0.00~0.09%)을 보였으며, 분자계통도에서도 동일한 유전적 clade를 형성하였다. 따라서, 모계로부터 유전되는 미토콘드리아 DNA 특성을

Table 2. Difference in polymorphic site sequences of the *rag1* gene between natural hybrids and parent species, *Rhodeus notatus* and *R. ocellatus*

Species	Variation position (bp)*											
	27	178	204	213	226	250	252	254	261	267	333	363
<i>R. notatus</i>	G	G	T	T	A	C	A	A	A	A	T	A
Hybrid 01	R	K	W	K	M	Y	R	R	R	R	Y	R
Hybrid 02	R	K	W	K	M	Y	R	R	R	R	Y	R
Hybrid 03	R	K	W	K	M	Y	R	R	R	R	Y	R
<i>R. ocellatus</i>	A	T	A	G	C	T	G	G	G	G	C	G
	372	420	458	519	534	543	588	702	765	768	789	907
<i>R. notatus</i>	A	C	A	C	A	A	C	T	T	A	T	T
Hybrid 01	R	Y	M	Y	R	R	Y	Y	Y	M	K	Y
Hybrid 02	R	Y	M	Y	R	R	Y	Y	Y	M	K	Y
Hybrid 03	R	Y	M	Y	R	R	Y	Y	Y	M	K	Y
<i>R. ocellatus</i>	G	T	C	T	G	G	T	C	C	C	G	C
	993	994	1,032	1,053	1,062	1,137	1,140	1,143	1,149	1,186	1,380	1,407
<i>R. notatus</i>	T	C	A	A	T	T	T	T	A	A	C	T
Hybrid 01	W	M	R	R	W	Y	Y	Y	R	M	S	Y
Hybrid 02	W	M	R	R	W	Y	Y	Y	R	M	S	Y
Hybrid 03	W	M	R	R	W	Y	Y	Y	R	M	S	Y
<i>R. ocellatus</i>	A	A	G	G	A	C	C	C	G	C	G	C

*R=A/G, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, W=A/T, S=C/G

고려할 시 자연 잡종 3개체는 모계종이 떡납줄갱이임을 강력하게 지지하였다(Kivisild, 2015).

자연 잡종 3개체의 체색은 등 쪽이 연한 녹갈색으로 떡납줄갱이의 연한 갈색과 흰줄납줄개체의 진한 녹갈색의 중간 색상이었고, 등지느러미 앞쪽 상단 및 뒷지느러미 바깥 가장자리에 붉은색을 나타내는 면적은 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 간의 중간 크기로 나타나 전반적으로 부모종 간의 중간형질을 나타냈다. 또한, 자연 잡종은 꼬리지느러미 기부의 체색이 검은색과 붉은색이 혼재되어 나타났는데, 이는 꼬리지느러미 기부가 떡납줄갱이는 검은색, 흰줄납줄개는 붉은색을 띠어 Miyazawa *et al.* (2010)의 연어과(Salmonidae) 어류의 잡종 연구와 동일하게 교잡에 의한 부모종의 체색을 잘 반영한 자연스러운 패턴으로 판단된다. 한편, 이들의 체색이 모두 동일하게 발현되지 않은 부분도 관찰되었는데, 특히 떡납줄갱이에서 검은색으로 발현되는 복부 아랫면과 배지느러미, 흰줄납줄개에서 발현되는 뒷지느러미의 붉은 체색은 자연 잡종 개체별로 발현된 양상이 달라 주목되었다. 형태학적 분석의 경우, 자연 잡종 3개체는 개체별로 산출된 잡종지수들의 편차가 크게 나타나 부모종 중 어느 한 종의 형질을 따르지 않았고, 계측 및 계수형질 중 7개의 형질에서 잡종 고유의 형질이 우세하게 발현된 것으로 분석되었다. 이러한 점은 떡납줄갱이와 한강납줄개 *R. pseudosericeus* 간의 중간잡

종 연구(Kwak *et al.*, 2020)에서 자연 잡종 개체의 고유한 형태적 형질이 우세하게 나타난 점과 유사한 양상을 나타내었다. 반면에 떡납줄갱이와 각시붕어 *R. uyekii* 및 흰줄납줄개와 각시붕어 간의 중간잡종에 관한 선행 연구(Kang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012; Park and Han, 2019)에서는 잡종 고유의 형태적 형질이 우세하게 나타나지 않아, 본 연구 및 Kwak *et al.* (2020)의 연구 결과와 차이가 있었다. 이러한 연구 결과들을 종합해 볼 때, 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 간의 자연 잡종은 떡납줄갱이의 등지느러미 기점 아래보다 앞쪽에서 시작하는 세로줄, 흰줄납줄개의 세로줄이 청록색을 나타내는 점 등 부모종 각각에서 나타나는 체색들을 동시에 지니므로써 체색에 의한 부모종 판별은 미약하게나마 가능할 것으로 판단되나, 잡종지수에 의한 형태학적 분석 결과는 잡종 개체들에서 편향되지 않은 다양한 형태를 보여 부모종 판별이 어려울 것으로 판단된다.

자연 잡종 3개체가 출현한 온양천 일대에서 떡납줄갱이와 흰줄납줄개는 아우점하였으며, 이들의 산란숙주로 이용 가능한 담수 이매패류는 말조개 *Unio douglasiae*, 대칭이 *Anemina acaeformis* 등이 확인되었다. 조사구간은 상류와 하류에 하천 구조물(보, 낙차공 등)이 설치되어 하천의 연속성이 낮아진 상태로 정수역을 형성한 곳이 많았으며, 납줄개속(*Rhodeus*) 어류는 유속이 완만한 곳을 선호하기 때문에 정수화로 인한 서식지

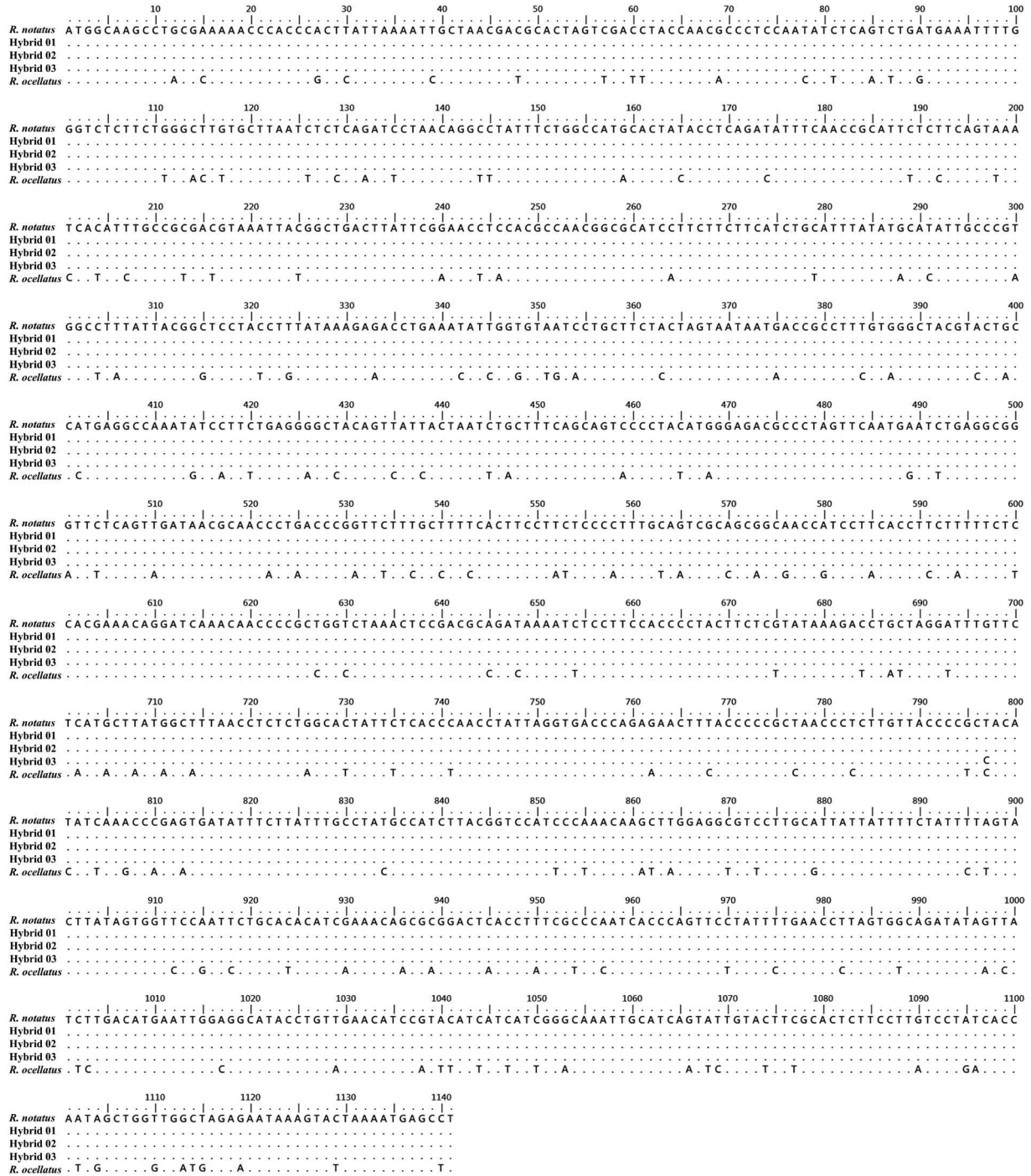


Fig. 4. Nucleotide sequence alignment of the *cytb* gene from natural hybrids and parent species, *Rhodius notatus* and *R. ocellatus*.

변화가 떡납줄갱이와 흰줄납줄개의 서식에 긍정적인 영향을 끼친 것으로 판단된다(Kim and Park, 2002; Chae *et al.*, 2019). 또한, 떡납줄갱이의 산란시기는 4~6월, 흰줄납줄개의 산란시기는 5~6월로 중복되며, 제한된 서식환경과 산란숙주는 아우점하는 두 종간의 산란 경쟁에 영향을 미쳐 흰줄납줄개 수컷이 떡납줄

갱이의 산란 과정에 개입하여 떡납줄갱이 암컷의 방란 직후 방정하여 수정에 성공함에 따라 자연적인 잡종 개체가 발생한 것으로 판단된다(Nagata, 1976; Konoh, 1996; Konoh, 2000).

본 연구에서 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 간의 자연 중간교잡은 떡납줄갱이가 모계종인 단방향으로만 발생하였으나, 본 연

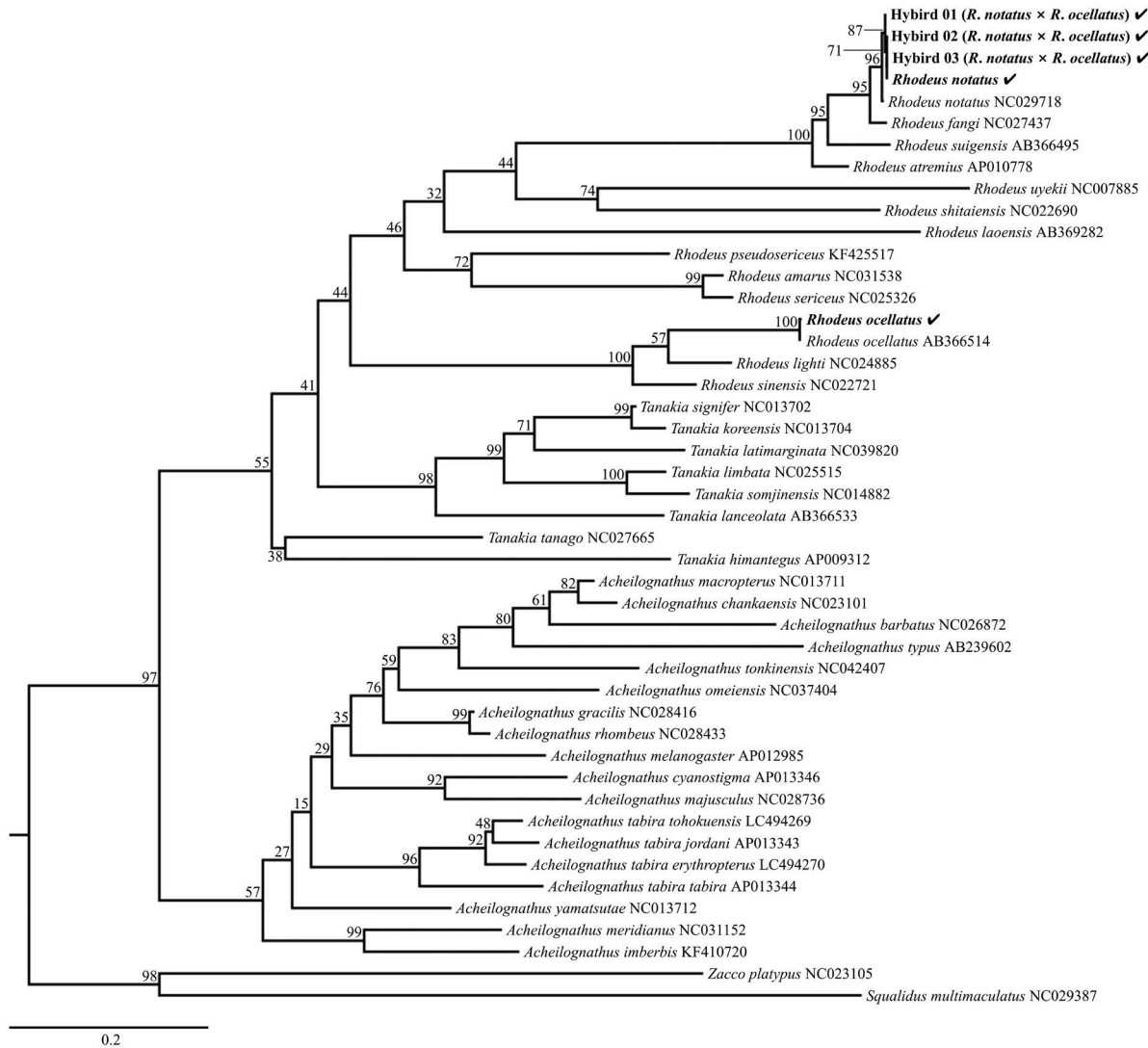


Fig. 5. Phylogenetic tree obtained from maximum-likelihood analysis of the *cytb* gene. Bootstrap values are shown at the base of each branch node. The GenBank accession numbers of each species are given after the scientific names. Bold and check indicates this study.

구와 같이 같은 납줄개속 어류인 떡납줄갱이와 한강납줄개 간의 자연 중간교잡에 대한 선행 연구는 모계종과 부계종이 서로 상반되는 교잡도 발생하는 것으로 보고한 바 있다(Kwak *et al.*, 2020). 따라서, 추후 흰줄납줄개를 모계로 하는 떡납줄갱이 간의 자연 잡종에 대한 출현 여부, 상반 교배 실험에 의한 잡종의 가능 여부 등 후속 연구를 수행하여 이들의 중간교잡이 보다 면밀히 분석되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

떡납줄갱이 *Rhodeus notatus*와 흰줄납줄개 *R. ocellatus* 간의 자연 잡종으로 추정되는 3개체를 충청남도 아산시 좌부동 곡

교천의 지류인 온양천 일대에서 채집하였으며, 이들의 부모종을 명확히 판별하기 위하여 형태학적 및 분자계통학적 분석을 수행하였다. 자연 잡종 3개체의 체색은 등 쪽이 연한 녹색으로 떡납줄갱이의 연한 갈색과 흰줄납줄개의 진한 녹색의 중간 색상이었고, 등지느러미 앞쪽 상단 및 뒷지느러미 바깥 가장 자리에 붉은색을 나타내는 면적은 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 간의 중간 크기로 나타나 전반적으로 부모종 간의 중간형질을 나타냈다. 계측 및 계수형질의 경우, 자연 잡종은 체장에 대한 가슴지느러미 기점거리의 비, 뒷지느러미 기점거리의 비와 두장에 대한 문장의 비, 양안 간격의 비, 미병장의 비, 미병고의 비 그리고 종렬비늘수 등에서 이들의 고유한 형질이 나타난 것으로 분석되었다. 핵 DNA의 *rag1* 유전자 영역에서 자연 잡종 3개체는 떡납줄갱이와 흰줄납줄개 간의 단일염기다형성 부위를 모두 받

영하는 것으로 분석되었으며, 미토콘드리아 DNA의 *cytb* 유전자 영역을 이용한 분자계통도에서는 떡납줄갱이와 동일한 유전적 clade를 형성하였다. 따라서, 본 연구에서 분석한 자연 잡종 추정 개체들은 암컷 떡납줄갱이와 수컷 흰줄납줄개 간의 중간 잡종으로 판별되었다.

사 사

이 논문은 순천향대학교의 연구비를 지원받아 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Abbott, R., D. Albach, S. Ansell, J.W. Arntzen, S.J.E. Baird, N. Bierre, J. Boughman, A. Brelsford, C.A. Buerkle, R. Buggs, R.K. Butlin, U. Dieckmann, F. Eroukmanoff, A. Grill, S.H. Cahan, J.S. Hermansen, G. Hewitt, A.G. Hudson, C. Jiggins, J. Jones, B. Keller, T. Marczewski, J. Mallet, P. Martinez-Rodriguez, M. Most, S. Mullen, R. Nichols, A.W. Nolte, C. Parisod, K. Pfennig, A.M. Rice, M.G. Ritchie, B. Seifert, C.M. Smadja, R. Stelkens, J.M. Szymura, R. Väinölä, J.B.W. Wolf and D. Zinner. 2013. Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.*, 26: 229-246. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02599.x>.
- Allendorf, F.W. and R.S. Waples. 1996. Conservation and genetics of salmonid fishes. In: *Avisé, J.C. and J.L. Hamrick (eds.), Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, U.S.A., pp. 238-280.
- Armbruster, J.W. 2012. Standardized measurements, landmarks, and meristic counts for cypriniform fishes. *Zootaxa*, 3586: 8-16. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3586.1.3>.
- Campton, D.E. 1987. Natural hybridization and introgression in fishes: Methods of detection and genetic interpretations. In: *Ryman, N. and F. Utter (eds.), Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, U.S.A., pp. 161-192.
- Cebat, M., A. Cebula, A. Laszkiewicz, M. Kasztura, A. Miazek and P. Kisielow. 2008. Mechanism of lymphocyte-specific inactivation of RAG-2 intragenic promoter of NWC: implications for epigenetic control of RAG locus. *Mol. Immunol.*, 45: 2297-2306. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.11.009>.
- Chae, B.S., H.B. Song and J.Y. Park. 2019. *A field guide to the freshwater fishes of Korea*. LG Evergreen Foundation, Seoul, Korea, 355pp.
- Chang, C.H., F. Li, K.T. Shao, Y.S. Lin, T. Morosawa, S.M. Kim, H.Y. Koo, W. Kim, J.S. Lee, S. He, C. Smith, M. Reichard, M. Miya, T. Sado, K. Uehara, S. Lavoue, W.J. Chen and R.L. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.026>.
- Corush, J.B., B.M. Fitzpatrick, E.L. Wolfe and B.P. Keck. 2021. Breeding behaviour predicts patterns of natural hybridization in north American minnows (Cyprinidae). *J. Evol. Biol.*, 34: 486-500. <https://doi.org/10.1111/jeb.13751>.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModel Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*, 9: 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- DeMarais, B.D. and W.L. Minckley. 1992. Hybridization in native Cyprinid fishes, *Gila ditaenia* and *Gila* sp., in northwestern Mexico. *Copeia*, 1992: 697-703. <https://doi.org/10.2307/1446145>.
- Foresti, F.P., D.T. Hashimoto, F.D. Prado, J.A. Senhorini and F. Foresti. 2013. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family Pimelodidae. *J. Appl. Ichthyol.*, 29: 643-647. <https://doi.org/10.1111/jai.12092>.
- Gerber, A.S., C.A. Tibbets and T.E. Dowling. 2001. The role of introgressive hybridization in the evolution of the *Gila robusta* complex (Teleostei: Cyprinidae). *Evolution*, 55: 2028-2039. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01319.x>.
- Grant, P.R. and B.R. Grant. 1992. Hybridization of bird species. *Science*, 256: 193-197. <https://doi.org/10.1126/science.256.5054.193>.
- Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk and O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.*, 59: 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Guindon, S. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, 52: 696-704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- Hata, H., Y. Uemura, K. Ouchi and H. Matsuba. 2019. Hybridization between an endangered freshwater fish and an introduced congeneric species and consequent genetic introgression. *PLoS ONE*, 14: e0212452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212452>.
- Hubbs, C.L. 1955. Hybridization between fish species in nature. *Syst. Zool.*, 4: 1-20. <https://doi.org/10.2307/2411933>.
- Hubbs, C.L. and K.F. Lagler. 2004. *Fishes of the Great Lakes region*. The University of Michigan Press, Ann Arbor, U.S.A., 29-40pp. <https://doi.org/10.3998/mpub.17658>.
- Jeon, H.B., D.Y. Kim, Y.J. Lee, H.G. Bae and H.Y. Suk. 2018. The genetic structure of *Squalidus multimaculatus* revealing the historical pattern of serial colonization on the tip of East Asian continent. *Sci. Rep.*, 8: 10629. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28340-x>.
- Kang, E.J., C.H. Kim, I.S. Park, H. Yang and Y.C. Cho. 2006. Early developmental characteristics of induced hybrids between *Rhodeus uyekii* and *R. notatus* (Pisces: Cyprinidae). *Korean J.*

- Ichthyol., 18: 339-346.
- Kanoh, Y. 1996. Pre-oviposition ejaculation in externally fertilizing fish: how sneaker male rose bitterlings contrive to mate. *Ethology*, 102: 883-899. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1996.tb01169.x>.
- Kanoh, Y. 2000. Reproductive success associated with territoriality, sneaking, and grouping in male rose bitterlings, *Rhodeus ocellatus* (Pisces: Cyprinidae). *Environ. Biol. Fishes*, 57: 143-154. <https://doi.org/10.1023/A:1004585405848>.
- Karlsson, S., M. Hagen, L. Eriksen, K. Hindar, A.J. Jensen, C.G. de Leaniz, D. Cotter, G. Guðbergsson, K. Kahilainen, S. Guðjónsson, A. Romakkaniemi and N. Ryman. 2013. A genetic marker for the maternal identification of Atlantic salmon × brown trout hybrids. *Conserv. Genet. Resour.*, 5: 47-49. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9730-6>.
- Katoh, K. and D.M. Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Katoh, K., K. Misawa, K.I. Kuma and T. Miyata. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.*, 30: 3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- Kim, B.S., E.J. Kang, H. Jang and I.S. Park. 2012. Morphometric traits and cytogenetic analysis in induced cross and reciprocal hybrid between *Rhodeus uyekii* and *R. notatus*. *Korean J. Ichthyol.*, 24: 151-159.
- Kim, H.S., S.W. Yun, H.T. Kim and J.Y. Park. 2015. Occurrence of a natural hybrid between *Acheilognathus signifer* and *A. lanceolatus* (Pisces: Cyprinidae). *Korean J. Ichthyol.*, 27: 199-204.
- Kim, H.S., S.W. Yun, J.G. Ko and J.Y. Park. 2014. Occurrence of a natural intergeneric hybrid between *Rhodeus pseudosericeus* and *Acheilognathus signifer* (Pisces: Cyprinidae) from the Namhangang (river), Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 26: 153-158.
- Kim, I.S. and J.Y. Park. 2002. *Freshwater Fishes of Korea*. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, 466pp.
- Kim, Y.H., M.S. Sung, B.H. Yun and I.C. Bang. 2021. Occurrence of a natural intergeneric hybrid between a female *Tanaka lanceolata* and a male *Rhodeus pseudosericeus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Daechoncheon stream flowing into the Yellow Sea in the Republic of Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 33: 45-46.
- Kivisild, T. 2015. Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investig. Genet.*, 6: 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13323-015-0022-2>.
- Kwak, Y.H., K.Y. Kim, K.S. Kim and H.Y. Song. 2020. Occurrence of a natural interspecific hybrid between *Rhodeus pseudosericeus* and *R. notatus* in Sangcheon Stream of the Han River, Korea. *Korean J. Ecol. Environ.*, 53: 275-285. <https://doi.org/10.11614/ksl.2020.53.3.275>.
- 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 J. Ichthyol.*, 21: 287-290.
- López, J.A., W.J. Chen and G. Ortí. 2004. Esociform phylogeny. *Copeia*, 2004: 449-464. <https://doi.org/10.1643/CG-03-087R1>.
- Miyazawa, S., M. Okamoto and S. Kondo. 2010. Blending of animal colour patterns by hybridization. *Nat. Commun.*, 1: 1-6. <https://doi.org/10.1038/ncomms1071>.
- Nagata, Y. 1976. Reproductive behaviour of a bitterling, *Rhodeus ocellatus* (Kner). *Physiol. Ecol. Japan.*, 17: 85-90.
- Nelson, J.S., T.C. Grande and M.V.H. Wilson. 2016. *Fishes of the world*, 5th ed. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, U.S.A., 707pp. <https://doi.org/10.1002/9781119174844>.
- Nikoljukin, M.J. 1972. Distant hybridization in acipenseridae and teleostei. *Moskava*, 335pp.
- Park, J.M. and K.H. Han. 2019. Early life history characteristics of an induced hybrid between *Rhodeus uyekii* and *Rhodeus ocellatus*. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 408-417. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0408>.
- Rambaut, A. 2018. FigTree. Version 1.4.4. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rhymer, J.M. and D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 27: 83-109. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>.
- Sakai, H. and K. Hamada. 1985. Electrophoretic discrimination of *Tribolodon* species (Cyprinidae) and the occurrence of their hybrids. *J. Ichthyol.*, 32: 216-224. <https://doi.org/10.11369/jji1950.32.216>.
- Scribner K.T., K.S. Page and M.L. Bartron. 2000. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10: 293-323. <https://doi.org/10.1023/A:1016642723238>.
- Song, H.Y., J.H. Kim, I.Y. Seo and I.C. Bang. 2017. Species and hybrid identification of Genus *Coreoleuciscus* species in hwnag-ji stream, nakdong river basin in Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 29: 1-12.
- Šorić, V.M. 2004. A natural hybrid of *Leuciscus cephalus* and *Alburnus alburnus* (Pisces, Cyprinidae) from the Ibar River, Western Serbia. *Arch. Biol. Sci.*, 56: 23-32. <https://doi.org/10.2298/abs0402023s>.
- Uemura, Y., S. Yoshimi and H. Hata. 2018. Hybridization between two bitterling fish species in their sympatric range and a river where one species is native and the other is introduced. *PLoS ONE*, 13: e0203423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203423>.
- Wendel, J.F. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, 42: 225-249. <https://doi.org/10.1023/A:1006392424384>.
- Witkowski, A., J. Kotusz, K. Wawer, J. Stefaniak, M. Popiołek and J. Błachuta. 2015. A natural hybrid of *Leuciscus leuciscus* (L.) and *Alburnus alburnus* (L.) (Osteichthyes: Cyprinidae) from the Bystrzyca River (Poland). *Annal. Zool.*, 65: 287-293. <https://doi.org/10.3161/00034541anz2015.65.2.010>.