

Original article

한강 수계 내 서식하는 깔따구류 유충의 속 수준에서의 분류 형질

박재원¹ · 고봉순¹ · 유현수² · 공동수³ · 객인실^{1,2,*}

¹전남대학교 환경해양학과, ²전남대학교 수산과학연구소, ³경기대학교 생명과학과

Taxonomic Characteristics of Chironomids Larvae from the Hangang River at the Genus Level. Jae-Won Park¹ (0000-0002-4067-7089), Bong-Soon Ko¹ (0000-0003-2761-0231), Hyunsu Yoo² (0000-0002-0129-4624), Dongsoo Kong³ (0000-0001-8438-1417) and Ihn-Sil Kwak^{1,2,*} (0000-0002-1010-3965) (¹Department of Environment Oceanography, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ³Department of Life Science, Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea)

Abstract The Hangang River* is necessary to manage the water environment of severe pollution due to the high density of residential areas, parks, and agriculture and the large population concentrated there. Benthic macroinvertebrates, such as chironomids larvae, are bioindicator species that reflect environmental changes and are crucial for water quality monitoring. In this study, we investigated morphological characteristics and molecular analysis of the chironomids larvae inhabiting the Hangang River area for water environment surveys. For this research, 20 rivers, lakes, and urban area in the Hangang River basin were selected. Chironomids larvae were collected from July to September 2022, and their appearance and characteristics were identified through morphological identification. In addition, phylogenetic analysis was performed based on the mtCOI gene sequences of the collected chironomids larvae, and identification at the genus level was confirmed. As a result, 32 species and 18 genera of 3 subfamilies of Chironomidae larvae were identified, and *Stictochironomus* sp. dominated most sites (6 sites). The morphological characteristics of the identified chironomids larvae, such as the mentum, ventromental plate, and antenna, were organized into table and pictorial keys, and a Bayesian inference molecular phylogeny was presented. These results provide basic morphological information for genus-level identification and can be used as fundamental information for water quality management.

*The public nomenclature following by NGII 2015

Key words: chironomids, larvae, morphology, pictorial key, Hangang river

서 론

한강은 면적 26,219 km², 길이 514 km인 한국에서 큰 하

천 중 하나로 서울특별시, 경기도, 강원도 등 주요 지역을 경유한다(Byeon, 2018). 한강 주변에는 공원, 농경지, 주거지 등이 밀집하여 많은 인구들이 몰려 있으며, 농업용수, 산업용수, 식수 등 전 인구의 40%가 한강의 수자원을 사용하고 있다(Kim and Na, 2007; Yoo *et al.*, 2020). 최근에는 급속도로 많아진 인구와 개발 등으로 인해 수질오염이 심각해지고 있으며, 이를 예방하기 위해 오염된 산업용수 배출제한조치 및

Manuscript received 9 June 2023, revised 30 June 2023,
revision accepted 30 June 2023
* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-61-659-7149
E-mail: inkwak@hotmail.com/iskwak@chonnam.ac.kr

생태계에 대한 정밀조사를 진행하고 있다(Park *et al.*, 2021).

저서대형무척추동물은 생활사가 다양하며, 수 환경변화에 민감하게 반응하므로, 출현종이 달라지는 특성과 우점종의 분포를 바탕으로 수질오염 정도를 파악할 수 있다(Lee *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2019; Jung *et al.*, 2022). 그중 깔따구류 유충은 서식지 환경 및 먹이원 등에 반응하여 개체수 및 종 다양성이 영향을 받는 환경지표종이고, 환경변화에 따라 생태적 특성과 형태적 특징이 영향을 받는다(Carr and Hiltunen, 1965; Kwak, 2015). 주로 호수, 하천 등 다양한 수계에 서식하며, 약 1~2달의 수중 생활 동안 알, 유충 1~4령기, 번데기의 생활사를 거쳐 성충으로 우화한 뒤 수일 동안 육지 생활을 한다(Kwak, 2015; Reyes *et al.*, 2021). 이러한 이유로 깔따구류 유충은 주로 독성노출 실험에 많이 이용되고 있다(Montaño-Campaz *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020; Park and Kwak, 2020). 그러나 수서 환경변화에 따른 깔따구 연구는 충분하지 않으며, 특히 유충 분류에 대한 연구는 매우 미비하다.

전 세계적으로 약 10,000종의 깔따구류가 발견되었으며(Armitage *et al.*, 2012), 국내에서는 1994년 43종의 깔따구류가 처음 보고되었고(ESA and KSAE, 1994), 현재 400여 종이 국립생물자원관 한반도의 생물다양성 종리스트에 등록되어 있다(성체 기준). 깔따구류 유충의 형태는 종마다 매우 유사한 특징을 가져, 대부분 목, 아과 수준으로 보고서가 작성되며, 환경부 “수생태계 현황 조사 및 건강성 평가”에서도 유충 분류는 목, 과 수준에서 이루어지고 있다.

깔따구류 유충의 정확한 종 동정을 위한 시도는 과거부터 지속적으로 진행되고 있으나 형태적 특징으로는 속 수준까지 가능하였다(Failla *et al.*, 2016; Cranston, 2019). 종 수준의 동정을 하기 위해 형태 특징 구분에 주로 사용되는 머리와 꼬리를 제외한 나머지 몸을 이용하여 DNA 염기서열 분석을 통해 역동정을 한 사례가 있었다(Kim *et al.*, 2012; Failla *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2022a, b). 미토콘드리아 염기서열은 변형이 높게 일어나기 때문에 주로 진화 연구와 인구 유전학, 종 식별에 널리 이용되는 유전자이다(Carew *et al.*, 2007; Pfenninger *et al.*, 2007). 이와 같이 깔따구류 분류는 DNA 염기서열 분석을 토대로 역동정과 함께 형태 분석을 하고 있으며, 정확성이 높다. 본 연구 이전에 2020, 2021년 정수장에서 발견된 깔따구류 유충을 동정하였고(Kwak *et al.*, 2020, 2021), 총 19속의 깔따구류 유충을 정리하였다(National Institute of Biological Resources, 2022). 본 연구에서는 한강 권역 내 다양한 환경에 서식하는 깔따구류 유충의 형태적 특징을 조사하기 위해, 7월에서 9월 동안 3차례에 걸쳐 한강 권역 20곳에서 시료를 채집하여, 깔따구류 유충의 동정을 실시하였다. 동정은 속 수준까지 하였고, 동정을 마친 깔따구류 유충의 주요 부속지 하순기절(Mentum),

촉각(Antenna), 복부기절판(Ventromental plates) 등 형태적 특징을 정리하였고, 분자 계통 분석 결과를 제공하였다. 이는 추후 수질환경에 서식하는 깔따구류 유충의 동정 기초 정보로 활용될 것이다.

재료 및 방법

1. 깔따구류 유충 샘플링 및 조사 정점

조사 기간은 2022년 7월에서 9월 동안 월 1회 총 3번 실시하였다. 시료 채집 장소는 한강 권역 지점에 하천, 호소, 도심 지역 등 총 20곳을 선정하였다(Fig. 1). 깔따구류 유충 시료 채집은 수심이 얇은 지점에서는 코어 채니기(Core sampler)를 사용하였으며, 깊은 지점에서는 그랩(Ponar grab)을 이용하였다. 퇴적물을 20 cm 깊이까지 채취하였으며, 채집한 퇴적물은 표준망체(Size: 0.2 mm)를 사용하여 입자 크기가 작은 퇴적물을 제거 후 현장에서 95% 에탄올로 고정하여 실험실로 옮긴 뒤 보관하였다.

2. 깔따구류 유충 형태적 동정

깔따구류 유충은 표본이 상하지 않도록 실험실에서 생물 시료만 골라낸 후(Sorting) 에탄올로 다시 보존하여 종을 동정하였다. 형태 동정은 “수환경 오염지표인 깔따구과 개론”(Kwak, 2015)과 “The Chironomidae”(Armitage *et al.*, 2012) 그리고 깔따구 분류기 문헌(Cranston, 2019)을 참고하였다. 형태 동정은 실제 현미경(Leica, S8AP0)을 이용해 속 수준의 분류를 하였으며, 지점별로 동일 속 내에서 3개체씩 두부와 후측 측지를 촬영하여 관찰하였다. 주요 부속지 형태를 관찰하기 위해 측지와 두부를 해부하여 슬라이드 위 마운트 시약에(CMC-10) 올린 후 커버 글라스로 덮어 영구표본 슬라이드를 제작하였다. 제작한 슬라이드는 고배율광학현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였으며, 두부(Head capsule)의 촉각(Antenna), 하순기절(Mentum), 복부기절판(Ventromental plates), 순설(Ligula), 부순설(Paraligula)과 몸(Body)의 항문 강모(Anal setae), 복부세관(Ventral tubules), 측세관(Lateral tubules) 그리고 후측 측지(Posterior parapods)의 발톱(Claw) 등을 촬영하였다.

3. DNA 염기서열 분석

유전자 염기서열 분석을 위해 두부와 후측 측지를 해부하고 남은 몸통을 이용하였다. DNA 추출은 Genomic DNA extraction kit (Bioneer, Korea) 프로토콜에 따라 수행하였다. 추출한 DNA는 Table 1의 COI primer로 중합효소 연쇄

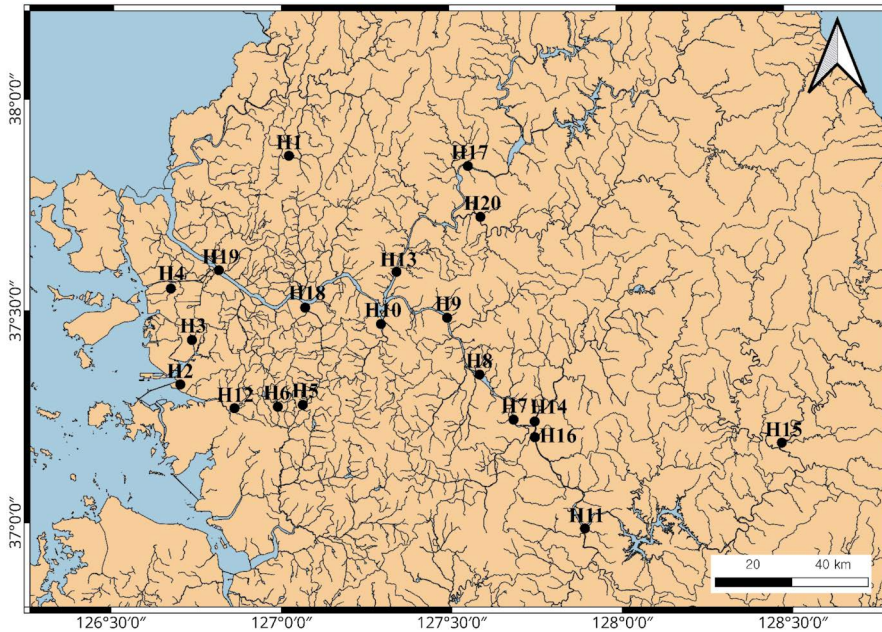


Fig. 1. Sampling sites of Chironomidae larvae using core-sampler in the Hangang river in 2022.

Table 1. PCR primers and lengths of aligned sequence for mitochondrial DNA.

Markers	Primer sequences (5' to 3')	Reference
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG (25mer)	Folmer <i>et al.</i> (1994)
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (26mer)	

Table 2. PCR conditions for COI primer amplicons.

	Temperature	Duration	Cycles
Hot start	95°C	7 min	1
Denaturation	72°C	40 sec	10
Annealing	50°C	40 sec	40
Extension	72°C	50 sec	
Final extension	72°C	7 min	1
Hold	4°C	∞	–

반응 (Polymerase chain reaction)을 진행하였다 (Folmer *et al.*, 1994; Kwak *et al.*, 2020). PCR cycle은 Table 2 조건으로 진행하였으며, 1.5% 아가로스겔 (agarose gel)로 전기영동하여 증폭된 밴드 부분을 절단한 후 PCR gel purification Kit (Solgent, Korea)를 이용해 정제하였다.

4. 분자 계통 분석

DNA 염기서열은 MEGA X (Tamura *et al.*, 2021) 프로그

램에서 기본 매개변수를 사용하여 정렬하였다 (Clustal W) (Thompson *et al.*, 1994). 속 수준의 동정을 확인하기 위해 NCBI 웹페이지에서 형태로 분석한 속과 같은 속의 염기서열 정보를 받아 함께 분석하였고, 아웃 그룹으로는 먹파리와 2종, 줌모기와 3종을 선정하여 분자 계통 분지도에 포함하였다 (Table 3). 염기서열들의 정확한 진화 모델을 찾기 위해 JModelTest 2.1. 10 (Darriba *et al.*, 2012) 프로그램과 Akaike 기준 정보를 사용하였고 (Hurvich and Tsai, 1989), 갈따구류 유충의 미토콘드리아 염기서열 자료에 대한 최적 모델로 “HKY + G + I”가 제안되었다 (Hasegawa *et al.*, 1985). Bayesian inference는 BEAST v1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) 프로그램을 사용하여 미토콘드리아 염기서열 자료의 계통발생학적 관계를 추론하였으며, 설정에서 4개의 감마 범주를 포함하였다. Clock rate는 곤충에서 일반적으로 사용되는 백만 년당 미토콘드리아 염기서열 돌연변이 비율인 1.4%와 2.6%의 평균 값인 0.02로 설정하였다 (Knowlton *et al.*, 1993). Yule process (Gernhard, 2008)는 BEAST 로그에 설정된 기본 값을 사용하였으며, 10,000,000세대 분석과

Table 3. List of Chironomidae taxa identified using the DNA barcode (NCBI) library in this research.

	Subfamily	Genus	Species	Accession number (NCBI)	
1	Chironominae	Chironomus	<i>Chironomus circumdatus</i> (Kieffer, 1916)	OP381679.1*	
2			<i>Chironomus flaviplumus</i> (Tokunaga, 1940)	KP902731.1	
3			<i>Chironomus nipponensis</i> (Tokunaga, 1940)	OP381719.1*	
4			<i>Chironomus ramosus</i> (Chaudhuri <i>et al.</i> , 1992)	MN934236.1	
5			<i>Cryptochironomus</i>	<i>Cryptochironomus</i> sp.	MZ656641.1
6			<i>Demicryptochironomus</i>	<i>Demicryptochironomus</i> sp.	JN265113.1
7			<i>Dicrotendipes</i>	<i>Dicrotendipes pelochloris</i> (Kieffer, 1912)	JF412112.1
8			<i>Glyptotendipes</i>	<i>Glyptotendipes tokunagai</i> (Sasa, 1979)	OP381673.1*
9			<i>Lipiniella</i>	<i>Lipiniella moderata</i> (Kalugina, 1970)	OP381707.1*
10			<i>Microchironomus</i>	<i>Microchironomus tener</i> (Kieffer, 1918)	KP902784.1
11			<i>Microtendipes</i>	<i>Microtendipes britteni</i> (Edwards, 1929)	LC329125.1
12			<i>Paratendipes</i>	<i>Paratendipes albimanus</i> (Meigen, 1818)	LC329162.1
13			<i>Polypedilum</i>	<i>Polypedilum cultellatum</i> (Goetghebuer, 1931)	LC495009.1
14				<i>Polypedilum masudai</i> (Tokunaga, 1938)	JF412140.1
15				<i>Polypedilum nubifer</i> (Skuse, 1889)	JF412147.1
16				<i>Polypedilum yongsanense</i> (Ree and Kim, 1981)	JF412158.1
17			<i>Stictochironomus</i>	<i>Stictochironomus sinsauensis</i> (Ree and Jeong, 2010)	JF412163.1
18			<i>Tanytarsus</i>	<i>Tanytarsus formosanus</i> (Kieffer, 1912)	KU720133.1
19				<i>Tanytarsus</i> sp.	KT613377.1
20			<i>Cricotopus</i>	<i>Cricotopus bimaculatus</i> (Tokunaga, 1936)	JN887060.1
21				<i>Cricotopus sylvestris</i> (Fabricius, 1794)	LC495046.1
22				<i>Cricotopus triannulatus</i> (Macquart, 1826)	OM974439.1
23	Tanypodinae	<i>Ablabesmyia</i>	<i>Ablabesmyia monilis</i> (Linnaeus, 1758)	JN887045.1	
24			<i>Hayesomyia</i>	<i>Hayesomyia tripunctata</i> (Goetghebuer, 1992)	LC329114.1
25			<i>Procladius</i>	<i>Procladius choreus</i> (Meigen, 1804)	OP381670.1*
26			<i>Tanypus</i>	<i>Tanypus punctipennis</i> (Meigen, 1818)	OM974447.1
27				<i>Ceratopogonidae</i> spp.	KT278229.1
28	Leptoconopinae	<i>Leptoconops</i>	<i>Leptoconops irritans</i>	OM672398.1	
29	Forcipomyiinae	<i>Atrichopogon</i>	<i>Atrichopogon</i> sp.	ON342482.1	
20	Simuliinae	<i>Austrosimulium</i>	<i>Austrosimulium ungulatum</i>	MF141975.1	
31	Simuliinae	<i>Greniera</i>	<i>Greniera ivanovae</i>	JF872734.1	

*The accession number of chironomids larvae from Korea.

1,000세대 분석을 함께 진행하였다. 분자 계통 분지도를 시각화로 표현하기 위해 FigTree v1.4.4. (Rambaut, 2018) 프로그램 사용하였다.

결과 및 고찰

한강 권역 20개 지점에서 7월에서 9월 동안 3차례 조사한 결과 총 3아과 18속 32종의 깔따구류 유충을 발견하였

다(깔따구아과(Chironominae) 21종, 깃깔따구아과(Orthocladiinae) 5종, 늪깔따구아과(Tanypodinae) 6종). 형태적 특징으로는 종 수준의 동정이 어려워 속 수준으로 동정하였다(Table 4). 20지점들 중 깔따구 유충이 발견되지 않은 H2 지점을 제외하고, 각 정점에서 우점하는 깔따구류 유충의 속은 달랐으나, 반지깔따구속(*Stictochironomus*)에 포함되는 종이 6개 정점에서 우점하였다(Table 4). 반지깔따구속에 포함되는 대표 종인 신사우반지깔따구(*Stictochironomus sinsauensis* Ree and Jeong, 2010) 유충은 주로 물이 흐르는 강, 호수

Table 4. List of the chironomids larvae from the Hangang river in 2022.

	Subfamily	Genus	Species	Dominated stations
1	Chironominae	<i>Chironomus</i>	<i>Chironomus</i> sp. 1	—
2			<i>Chironomus</i> sp. 2	H3, H12
3			<i>Chironomus</i> sp. 3	H9
4			<i>Chironomus</i> sp. 4	H10
5		<i>Cryptochironomus</i>	<i>Cryptochironomus</i> sp. 1	—
6		<i>Demicryptochironomus</i>	<i>Demicryptochironomus</i> sp. 1	—
7		<i>Dicotendipes</i>	<i>Dicotendipes</i> sp. 1	—
8			<i>Dicotendipes</i> sp. 2	—
9		<i>Glyptotendipes</i>	<i>Glyptotendipes</i> sp. 1	—
10		<i>Lipiniella</i>	<i>Lipiniella</i> sp. 1	—
11		<i>Microchironomus</i>	<i>Microchironomus</i> sp. 1	—
12		<i>Microtendipes</i>	<i>Microtendipes</i> sp. 1.	—
13		<i>Paratendipes</i>	<i>Paratendipes</i> sp. 1	H1
14		<i>Polypedilum</i>	<i>Polypedilum</i> sp. 1	H11
15			<i>Polypedilum</i> sp. 2	H5, H19
16			<i>Polypedilum</i> sp. 3	—
17			<i>Polypedilum</i> sp. 4	H13, H20
18			<i>Polypedilum</i> sp. 5	—
19		<i>Stictochironomus</i>	<i>Stictochironomus</i> sp. 1	H7, H8, H14-H17
20		<i>Tanytarsus</i>	<i>Tanytarsus</i> sp. 1	H4
21			<i>Tanytarsus</i> sp. 2	H6
22	Orthoclaadiinae	<i>Corynoneura</i>	<i>Corynoneura</i> sp. 1	—
23			<i>Cricotopus</i>	H1
24		<i>Cricotopus</i>	sp. 2	—
25			sp. 3	—
26			sp. 4	H18
27	Tanypodinae	<i>Ablabesmyia</i>	<i>Ablabesmyia</i> sp. 1	—
28			<i>Ablabesmyia</i> sp. 2	—
29		<i>Hayesomyia</i>	<i>Hayesomyia</i> sp. 1	—
30		<i>Procladius</i>	<i>Procladius</i> sp. 1	H20
31			<i>Procladius</i> sp. 2	—
32		<i>Tanypus</i>	<i>Tanypus</i> sp. 1	—

퇴적물에서 발견된다(Epler, 2001).

갈따구류 유충의 형태 동정을 위한 분류키는 두부에 하순 기절, 순설, 복부기절판, 부순설, 촉각 등의 특징과, 후측 측지에 향문 강모, 발톱 등이 이용되지만, 형태만으로는 구분이 어려워 일부 전문가들 위주로 진행되고 있다(Ram *et al.*, 2014).

한강 권역에서 채집된 갈따구류 유충 18속의 주요 형태적 특징을 Tables 5, 6에 정리하였다. 갈따구류 유충의 두부를 관찰하였을 때 늪갈따구아과는 나머지 아과들보다 두부의 길이가 길며, 눈도 1쌍으로 관찰되었다. 갈따구아과와 깃갈따구아과는 두부가 짧고 둥글며, 눈이 2쌍이지만, 갈따구

아과는 두 쌍의 눈이 수직, 깃갈따구아과는 수평으로 분포하는 것을 확인하였다. 하순기절은 갈따구 두부의 턱 중앙에 있는 이빨로 다른 부속지에 비해 경화되어 있어 이빨의 모양 및 개수에 따라 갈따구류 유충 형태 동정에 있어 기본이 된다(Fig. 2A) (Antczak-Orlewska *et al.*, 2021). 하순기절의 이빨 모양별로 속을 나누면 6 (L) - 3 (M) - 6 (L) 3속 (*Chironomus*, *Microchironomus*, *Microtendipes*), 6 (L) - 1 (M) - 6 (L) 4속 (*Cryptochironomus*, *Dicotendipes*, *Glyptotendipes*, *Cricotopus*), 6 (L) - 4 (M) - 6 (L) 4속 (*Lipiniella*, *Paratendipes*, *Polypedilum*, *Stictochironomus*), 5 (L) - 1 (M) - 5 (L) 2속 (*Cryptochironomus*, *Tanytarsus*), 7 (L) - 1 (M) - 7 (L)

Table 5. Morphological characteristics of Chironominae, Orthoclaadiinae in Hangang river in 2022.

Subfamily	Genus	Mentum		Antenna	Distribution features
		L (Lateral teeth)	M (Median teeth)		
Chironominae	<i>Chironomus</i>	6 (L) - 3 (M) - 6 (L)		5 segmented	2 pairs of ventral tubules, lateral tubules
	<i>Cryptochironomus</i>	6 (L) - 1 (M) - 6 (L), 5(L) - 1 (M) - 5 (L)		5 segmented	Median teeth pale
	<i>Demicryptochironomus</i>	7 (L) - 1 (M) - 7 (L)		5 segmented	Median teeth pale
	<i>Dicrotendipes</i>	6 (L) - 1 (M) - 6 (L)		5 segmented	End of Ventromental plates with crenulated
	<i>Glyptotendipes</i>	6 (L) - 1 (M) - 6 (L)		5 segmented	1 pair of ventral tubules
	<i>Lipiniella</i>	6 (L) - 4 (M) - 6 (L)		5 segmented	1 pair of ventral tubules
	<i>Microchironomus</i>	6 (L) - 3 (M) - 6 (L)		5 segmented	Outer 3 lateral teeth fused form
	<i>Microtendipes</i>	6 (L) - 3 (M) - 6 (L)		6 segmented	Antenna with 1~2 lauterborn organ
	<i>Paratendipes</i>	6 (L) - 4 (M) - 6 (L)		6 segmented	Antenna with 1~2 lauterborn organ, median teeth pale
	<i>Polypedilum</i>	6 (L) - 4 (M) - 6 (L)		5 segmented	Antenna with 1~2 lauterborn organ
	<i>Stictochironomus</i>	6 (L) - 4 (M) - 6 (L)		6 segmented	Antenna with 1~2 lauterborn organ
	<i>Tanytarsus</i>	5 (L) - 1 (M) - 5 (L)		5 segmented	Antenna with long pedicel of lauterborn organ
Orthoclaadiinae	<i>Corynoneura</i>	5 (L) - 3 (M) - 5 (L), 5 (L) - 2 (M) - 5 (L)		4 segmented	Length of Antenna longer than head
	<i>Cricotopus</i>	6 (L) - 1 (M) - 6 (L)		5 segmented	Eyes horizontally distributed

Table 6. Morphological characteristics of Tanypodinae larvae in Hangang river in 2022.

Subfamily	Genus	Ligula	Paraligula	Antenna	Distribution features
Tanypodinae	<i>Ablabesmyia</i>	5 teeth	Bifid	4 segmented	Head elongated, with 3 claws of dark brown
	<i>Hayesomyia</i>	5 teeth	Bifid	4 segmented	Head elongated
	<i>Procladius</i>	5 teeth	Several teeth	4 segmented	Paraligula with multiple teeth
	<i>Tanypus</i>	5 teeth	Several teeth	4 segmented	Paraligula with long multiple teeth

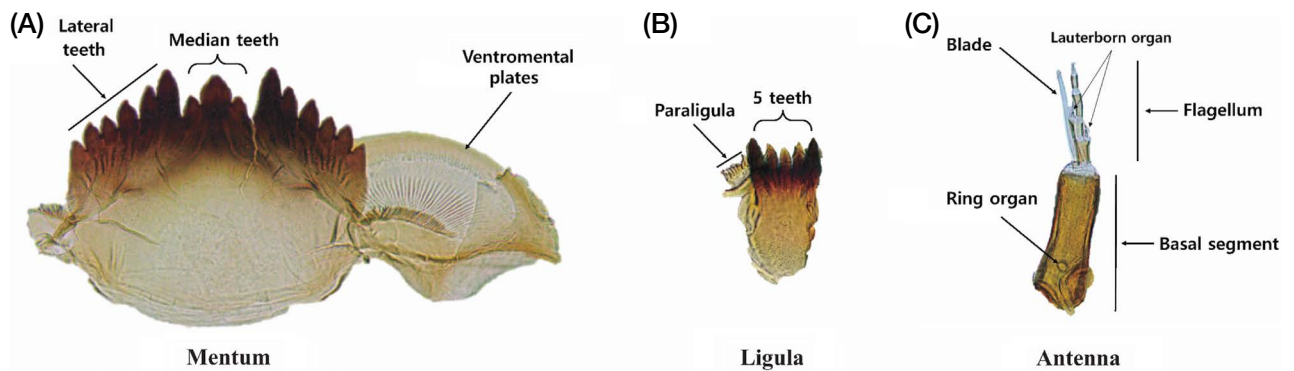


Fig. 2. Morphological characteristics (A) Mentum, (B) Ligula, (C) Antenna.

1속(*Demicryptochironomus*), 5 (L) - 3 (M) - 5 (L), 5 (L) - 2 (M) - 5 (L) 1속(*Corynoneura*) 모양으로 구분이 되며, *Cryptochironomus*와 *Corynoneura*는 2가지 모양의 하순기절 이빨

이 확인되었다. *Cryptochironomus*, *Demicryptochironomus*, *Paratendipes*, *Tanytarsus*속은 중앙 이빨이 다른 속들에 비해 경도가 약한 것으로 관찰되었다. 순설은 다른 아과와 달

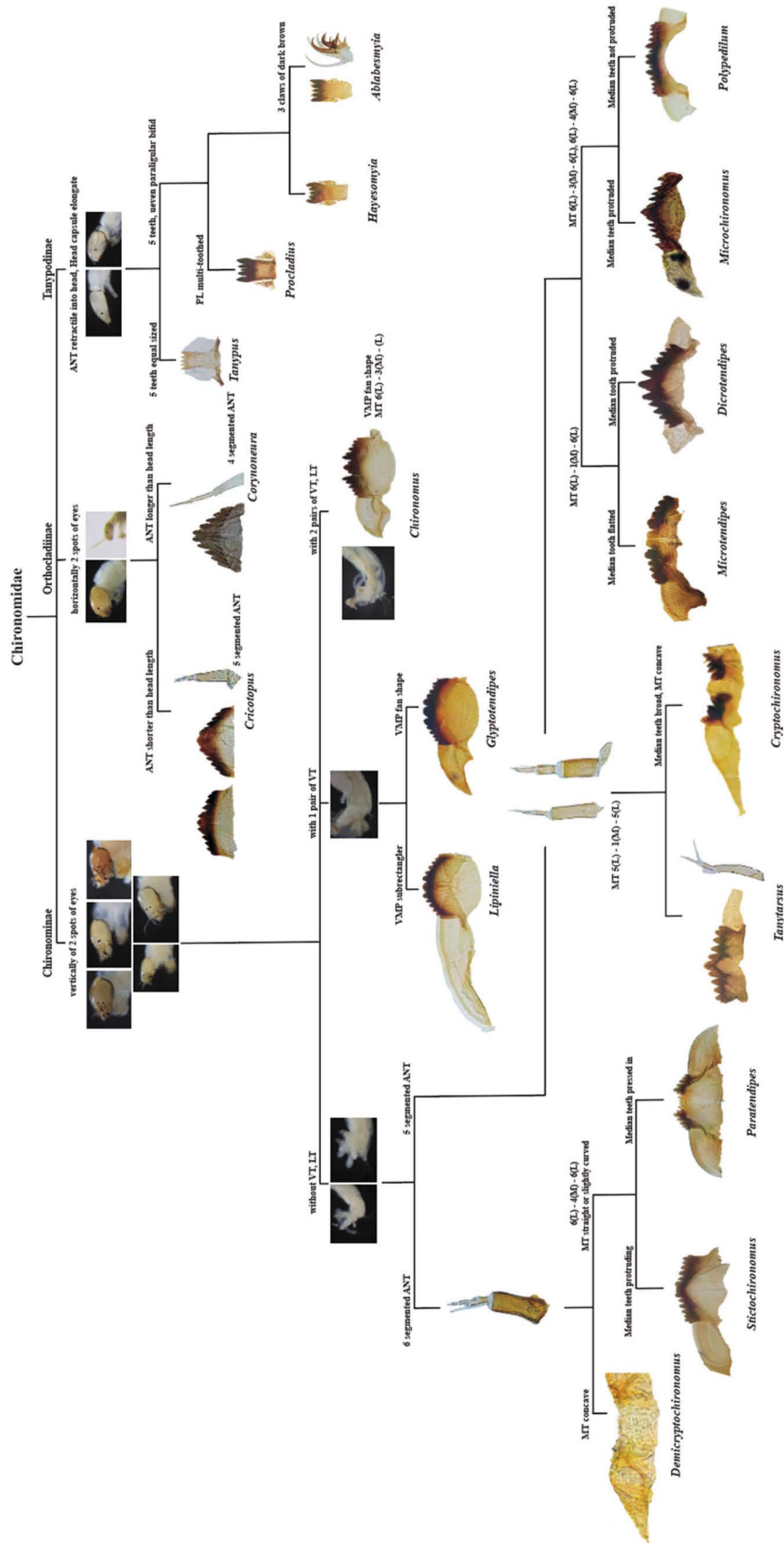


Fig. 3. Pictorial key using the morphological characteristics of the Chironomidae larvae in Hangang river in 2022. ANT, Antenna; PL, Parafaligula; VT, Ventral tubules; LT, Lateral tubules; VMP, Ventromental plates; MT, Mentum.

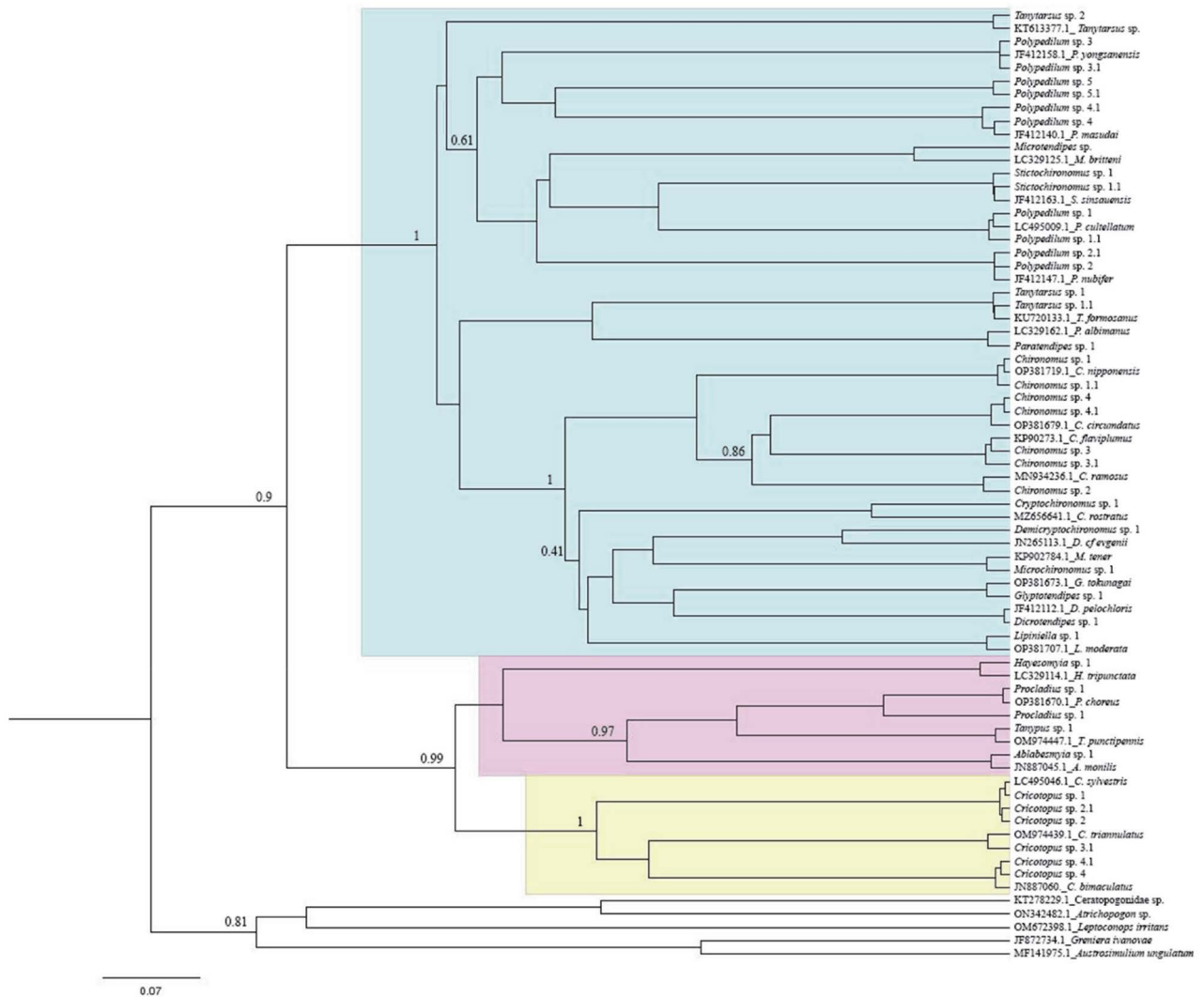


Fig. 4. Bayesian inference cladogram of the Chironomidae from Hangang river based on mtCOI sequences. Numbers above branches represent posterior probability (Blue: Chironominae, Purple: Tanypodinae, Yellow: Orthoclaadiinae).

리 늘깔따구아과의 두부 안에 존재하는 부속지로 하순기절과 동일하게 이빨의 개수 및 모양에 따라 동정키가 된다(Fig. 2B). 순설의 이빨 모양은 4개 속 *Ablabesmyia*, *Hayesomyia*, *Procladius*, *Tanypus*에서 5개로 관찰되었다. 복부기절판은 하순기절의 옆에 있으며, 모양, 위치와 판의 선에 따라 형태 동정에 쓰인다. 깔따구아과를 포함한 대부분의 아과에서 판의 모양이 현미경으로 관찰이 가능하며, 깃깔따구아과의 종들은 복부기절판의 선 모양이므로 아과를 구별하는 데 있어 주요 부속지이다. 늘깔따구아과는 복부기절판이 존재하지 않으며, 부순설의 모양 및 이빨 개수에 따라 동정키로 쓰인다(Larocque-Tobler, 2014). 촉각은 두부 앞쪽에 위치해 있으며, 마디 수, 길이, Lauterborn organ의 존재 유무 등이 동정키로 이용

되고 있다(Fig. 2C). 속별로는 5마디 10속(*Chironomus*, *Cryptochironomus*, *Demicryptochironomus*, *Dicrotendipes*, *Glyptotendipes*, *Lipiniella*, *Microchironomus*, *Polypedium*, *Tanytarsus*, *Cricotopus*), 6마디 3속(*Microtendipes*, *Paratendipes*, *Stictochironomus*), 4마디 5속(*Corynoneura*, *Ablabesmyia*, *Hayesomyia*, *Procladius*, *Tanypus*)으로 관찰되었다. *Tanytarsus*와 *Corynoneura*는 촉각이 두부의 전장 길이보다 길었으며, *Microtendipes*, *Paratendipes*, *Polypedium*, *Stictochironomus*, *Tanytarsus*는 촉각 마디에 Lauterborn organ이 관찰되었다. 후측 촉지를 관찰하였을 때 *Chironomus*, *Glyptotendipes*, *Lipiniella*는 복부세관이 1쌍 이상 보였으며, 1는 2쌍의 복부세관과 측세관이 관찰되었다. 세관의 길이랑 형태는 종 수준의 동정키다(Yoon and Chun, 1992; Cranston,

2019; Kang *et al.*, 2022b). 형태가 매우 유사한 *Ablabesmyia*와 *Hayesomyia*의 후측 측지에 발톱을 관찰하였을 때 *Ablabesmyia*는 3개의 발톱이 짙은 갈색을 띠어 구분되었다.

2022년 국내에서 형태 분류로 종 수준의 동정을 시도한 사례가 있었으며(Kang *et al.*, 2022b) 본 연구와 마찬가지로 3개 아과 구분 시 안점의 수와 분포 형태를 사용하였으며, 나머지 종 수준의 동정에는 주로 하순기절의 형태가 사용되었다. 하지만 하순기절의 경우 변형이 심하고, 이빨이 부러지는 경우가 많기 때문에 종 수준의 동정에 사용하기 어렵다고 판단하였지만, 측각과 후측지의 형태로 구분한 경우는 명확한 특징이 있었으므로, 종을 구분하는 키로 충분하다고 판단하였다. 하지만 측각으로 구분된 종인 *Tanytarsus kiseogi*, *T. ahyoni*는 이번 연구에서 출현하지 않았기에 종 동정에 사용할 수 없었다.

갈따구류 유충의 하순기절은 같은 속에 속하는 일부 종들도 다른 모양을 가질 수 있으며, 먹이, 환경, 채집 방법 등에 따라 변형이 있을 수 있다. *Chironomus columbiensis*의 하순기절은 채석장, 농업, 축산업 등의 다른 환경의 노출에 따라 변형, 공백, 마모 등이 일어났다(Montano-Campaz *et al.*, 2019). 이는 인구가 밀집되어 농업, 축산업, 공업 등과 인접한 한강에서 서식하는 갈따구류 유충에 형태적 변이가 발생하여 오동정을 일으킬 수 있다.

미토콘드리아 유전자 분석에 사용된 개체는 총 41개이며, BEAST 프로그램으로 분석한 결과 모든 매개변수(posterior, likelihood, priors, tree likelihood, tree height, Yule model, birth rate 등)가 권장되는 값인 200을 넘어 사후 분포 추정 값이 효과적이라고 할 수 있었다. Bayesian 추론 분지도 결과는 2022년 124개의 미토콘드리아 유전자 분석 결과(Kang *et al.*, 2022a)와 같았다. 깃갈따구아과와 늪갈따구아과는 하나의 분지로 묶이고 갈따구아과와는 다르게 묶이는 것으로 결과가 나왔으며(Fig. 4), 분지 안에서 깃갈따구아과와 늪갈따구아과도 높은 확률로 구분되었다. 또한 형태를 이용하여 속 수준으로 동정한 갈따구류 유충은 Bayesian 추론 분지도 결과에서도 명확하게 구분되었다(Fig. 4).

갈따구류 유충의 형태만을 기준으로 종 수준의 동정을 하는 것은 아직 분석이 미비하여, 한계에 부딪히고 있는 상태이다. 유전자 염기서열은 차이를 보이거나 형태적 차이가 미세한 경우 Cryptic species로 구분되는데 이를 개선하기 위해 다른 분류군에서 사용하는 기하학적 형태 분석을 한 사례도 있다(Durdevic *et al.*, 2023). 대략에 초점을 맞추어 사진을 촬영하고 Centroid point를 기준으로 Landmark를 표시한 다음 대략을 영역별로 구분하여 AI 프로그램이 자동으로 종을 동정하도록 설정하였다. 실험에 사용한 각 아과에 포함된 3종은 아과 수준에서 최소 88퍼센트 이상으로 명확하게 구분되

었지만 종 수준에서는 정확도가 떨어지는 것으로 결과가 나왔다. AI 학습으로 컴퓨터가 자동으로 종을 동정하는 것에 대한 최초의 시도였으나 아직 연구자가 직접 역동정을 하는 것에 비해 확률이 떨어지는 것을 알 수 있다.

향후 종 수준의 동정을 위해 본 연구에서 작성한 Pictorial key 외에 분류키 작성 연구는 진행 중에 있으며, DNA 염기서열을 세밀하게 분석하여 분자 계통자료를 포함할 것이다. 또한 현재 제시된 자료들은 수질의 수질 관리 및 조사에 중요하게 활용될 것이다.

적 요

갈따구류 유충(Chironomidae larvae)은 저서성대형무척추 동물로 수질 및 환경오염 생물 모니터링에 중요한 지표생물이다. 본 연구에서는 2022년 7월에서 9월 동안 한강의 다양한 수계에서 서식하는 갈따구류 유충을 채집하여 형태적 동정 및 유전자 계통 분석을 실시하였다. 20개 지점에서 총 3아과 18속 32종의 갈따구류 유충이 출현하였으며, 반지갈따구속에 속하는 1개 종이 6개 지점에서 우점하였다. 갈따구류 유충을 분류하는 데 이용하는 몸통, 두부, 하순기절, 측각 등을 관찰하여 특징을 Pictorial key로 제시하였고, 유전자 계통 분석 결과 3개 아과가 명확하게 구분되었으며, 속 수준에서도 구분이 되었다. 이러한 결과들은 갈따구류 유충 동정에 도움이 될 것이고, 수질 조사 및 관리에 기초적인 자료로 활용할 것으로 기대된다.

저자정보 광인실(전남대학교 해양융합과학과 교수), 박재원(전남대학교 환경해양학과 대학원생), 고봉순(전남대학교 환경해양학과 대학원생), 유현수(전남대학교 수산과학연구소 박사), 공동수(경기대학교 생명과학과 교수)

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

이해관계 본 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없습니다.

연구비 본 결과물은 한국연구재단의 지원(NRF-2018-R1A6A1A-03024314)을 받아 연구되었습니다. 본 연구는 환경부(MOE) 수생태계 보전 연구사업과 한국환경산업기술원(KEIRI)의 지원을 받아 연구되었습니다(2021003050001 and 2022003050006).

REFERENCES

- Antczak-Orlewska, O., M. Płóciennik, R. Sobczyk, D. Okupny, R. Stachowicz-Rybka, M. Rzdokiewicz, J. Siciński, A. Mroczkowska, M. Krapiec, M. Słowiński and P. Kittel. 2021. Chironomidae Morphological Types and Functional Feeding Groups as a Habitat Complexity Vestige. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 583831.
- Armitage, P.D., L.C. Pinder and P. Cranston. 2012. The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges. Springer, Netherlands.
- Byeon, H.K. 2018. Characteristic of fish community and distribution of exotic species at the Hangang River in Seoul, Korea. *Korean Journal of Ichthyology* **30**(3): 144-154.
- Carew, M.E., V. Pettigrove, R.L. Cox and A.A. Hoffmann. 2007. DNA identification of urban Tanytarsini chironomids (Diptera: Chironomidae). *Journal of the North American Benthological Society* **26**(4): 587-600.
- Carr, J.F. and J.K. Hiltunen. 1965. Changes in the bottom fauna of western Lake Erie from 1930 to 1961. *Limnology and Oceanography* **10**(4): 551-569.
- Cranston, P.S. 2019. Identification guide to genera of aquatic larval Chironomidae (Diptera) of Australia and New Zealand. *Zootaxa* **4706**(1): 71-102.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModel Test 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**(8): 772.
- Đurđević, A., A. Medeiros, V. Žikić, A. Milosavljević, D. Savić-Zdravković, M. Lazarević and D. Milošević. 2023. Mandibular shape as a proxy for the identification of functional feeding traits of midge larvae (Diptera: Chironomidae). *Ecological Indicators* **147**: 109908.
- Epler, J.H. 2001. Identification manual for the larval Chironomidae of North and South Carolina. USEPA Grant.
- Failla, A.J., A.A. Vasquez, P. Hudson, M. Fujimoto and J.L. Ram. 2016. Morphological identification and COI barcodes of adult flies help determine species identities of chironomid larvae (Diptera, Chironomidae). *Bulletin of Entomological Research* **106**(1): 34-46.
- Folmer, O., W.R. Hoeh, M.B. Black and R.C. Vrijenhoek. 1994. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**(5): 294-299.
- Gernhard, T. 2008. The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology* **253**(4): 769-778.
- Hasegawa, M., H. Kishino and T. Yano. 1985. Dating of the humanape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160-174.
- Hong, C., W.S. Kim, J.Y. Kim, S.Y. Noh, J.H. Park, J.K. Lee and I.S. Kwak. 2019. Change of benthic macroinvertebrates community composition following summer precipitation variance. *Korean Journal of Ecology and Environment* **52**(4): 348-357.
- Hurvich, C.M. and C.-H. Tsai. 1989. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika* **76**(2): 297-307.
- Jung, S.W., Y.H. Kim, J.H. Lee, D.G. Kim, M.K. Kim and H.M. Kim. 2022. Biodiversity Changes and Community Characteristics of Benthic Macroinvertebrates in Weir Section of the Nakdong River, South Korea. *Korean Journal of Environment and Ecology* **36**(2): 150-164.
- Kang, H.J., M.J. Baek, J.H. Kang and Y.J. Bae. 2022a. Diversity and DNA Barcode Analysis of Chironomids (Diptera: Chironomidae) from Large Rivers in South Korea. *Insects* **13**(4): 346. <https://doi.org/10.3390/insects13040346>.
- Kang, H.J., M.J. Baek, J.H. Kang and Y.J. Bae. 2022b. DNA Barcoding of Chironomid Larvae (Diptera: Chironomidae) from Large Rivers in South Korea to Facilitate Freshwater Biomonitoring and Public Health Surveillance. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **19**(19): 12035.
- Kim, K.S. and Y. Na. 2007. The present state and improvement of water quality of Han River. *Journal-Korean Society of Environmental Engineers* **29**(11): 1169.
- Kim, S., K.H. Song, H.I. Ree and W. Kim. 2012. A DNA barcode library for Korean Chironomidae (Insecta: Diptera) and indexes for defining barcode gap. *Molecules and Cells* **33**: 9-17.
- Kim, W.S., B. Choi, M.K. Kim, S.H. Chae and I.S. Kwak. 2020. Expression of heat shock protein 70 gene and body color changes in non-biting midge larvae (*Glyptotendipes tokunagai*) effected by O₃ treatment. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**(4): 324-330.
- Knowlton, N., L.A. Weigt, L.A. Solórzano, D.K. Mills and E. Bermingham. 1993. Divergence in proteins, mitochondrial DNA, and reproductive compatibility across the isthmus of Panama. *Science* **260**(5114): 1629-1632.
- Kwak, I.S. 2015. Introduction to the Chironomidae as a water pollution indicator. Chonnam National University Press, pp. 13-156.
- Kwak, I.S., J.W. Park, W.S. Kim and K.Y. Park. 2020. Morphological and Genetic Species Identification in the Chironomus Larvae (Diptera: Chironomidae) Found in Domestic Tap Water Purification Plants. *Korean Journal of Ecology and Environment* **53**: 286-294.
- Kwak, I.S., J.W. Park, W.S. Kim and K. Park. 2021. Morphological and genetic species identification in the Chironomidae larvae found in tap water purification plants in Jeju. *Korean Journal of Ecology and Environment* **54**(3): 240-246.
- Larocque-Tobler, I. 2014. The Polish sub-fossil chironomids. *Palaeontologia Electronica* **17**(1): 1-28.
- Lee, J.W., J.K. Choi, S.H. Oh and G.W. Choi. 2010. A study on the benthic macroinvertebrates and biological water quality evaluation in nature sabbatical area of Unmunsan. *Korean Journal of Environment and Ecology* **24**(1): 1-13.
- Montaño-Campaz, M.L., L. Gomes-Dias, B.E. Toro Restrepo and

- V.H. García-Merchán. 2019. Incidence of deformities and variation in shape of mentum and wing of *Chironomus columbiensis* (Diptera, Chironomidae) as tools to assess aquatic contamination. *PLoS One* **14**(1): e0210348.
- National Geographic Information Institute Ministry of Land, Infrastructure and Transport Republic of Korea. 2015. Toponymic Guidelines for Map and Other Editors for International Use Republic of Korea. Second Edition.
- National Institute of Biological Resources. 2022. The research on the diversity and ecological characteristics of chironomids larvae from Korea.
- Park, K. and I.S. Kwak. 2020. Cadmium-induced developmental alteration and upregulation of serine-type endopeptidase transcripts in wild freshwater populations of *Chironomus plumosus*. *Ecotoxicology Environmental Safety* **192**: 110240.
- Park, M., Y. Cho, K. Shin, H. Shin, S. Kim and S. Yu. 2021. Analysis of water quality characteristics in unit watersheds in the hangang basin with respect to tmdl implementation. *Sustainability* **13**(18): 9999.
- Pfenninger, M., C. Nowak, C. Kley, D. Steinke and B. Streit. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. *Molecular Ecology* **16**(9): 1957-1968.
- Ram, J.L., F. Banno, R.R. Gala, J.P. Gizicki and D.R. Kashia. 2014. Estimating sampling effort for early detection of non-indigenous benthic species in the Toledo Harbor Region of Lake Erie. *Management of Biological Invasions* **5**(3): 209-216.
- Rambaut, A. 2018. FigTree, version v.1.4.4. Accessed 25 October 2020.
- Reyes-Maldonado, R., B. Marie and A. Ramírez. 2021. Rearing methods and life cycle characteristics of *Chironomus* sp. Florida (Chironomidae: Diptera): A rapid-developing species for laboratory studies. *PLoS One* **16**(2): e0247382.
- Suchard, M.A., P. Lemey, G. Baele, D.L. Ayres, A.J. Drummond and A. Rambaut. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* **4**(1): vey016.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**(7): 3022-3027.
- The Entomological Society of Korea and Korean Society of Applied Entomology (ESA and KSAE). 1994. Check List of Insects from Korea. 1-744.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**(22): 4673-4680.
- Yoo, H.J., D.K. Kim, H.H. Kwon and S.O. Lee. 2020. Data driven water surface elevation forecasting model with hybrid activation function - A case study for Hangang River, South Korea. *Applied Sciences* **10**(4): 1424.
- Yoon, I.B. and D.J. Chun. 1992. Systematics of the genus *Chironomus* (Diptera: Chironomidae) in Korea. *Entomological Research Bulletin* **18**: 1-14.
- Yoon, S.H., J.W. Park, J.Y. Park, J.J. Seo, S.K. Jeong, J.K. Chung and S.J. Bae. 2019. Classification and Distribution of Chironomidae (Diptera) using DNA Barcoding at Urban Streams in Gwangju, South Korea. *Korea Journal of Ecology and Environment* **52**(4): 385-393.