

이 학 박 사 학 위 논 문

미토콘드리아 DNA를 이용한 산천어
(*Oncorhynchus masou*) 집단의
계통지리학적 연구



해 양 산 업 공 학 협 동 과 정

홍 관 의

이 학 박 사 학 위 논 문

미토콘드리아 DNA를 이용한 산천어
(*Oncorhynchus masou*) 집단의
계통지리학적 연구

지도교수 김 동 수

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함.

2013년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

해 양 산 업 공 학 협 동 과 정

홍 관 의

홍관의의 이학박사 학위논문을 인준함.

2013년 8월



Phylogeographic study of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) inferred from mitochondrial DNA sequence analysis

Kwan Eui Hong

Interdisciplinary Program of Ocean Industrial Engineering,
Pukyong National University

Abstract

Masu salmon, *Oncorhynchus masou*, are found only in the Far East, including Korea, Russia, and Japan, particularly in the East Sea, the Sea of Okhotsk, and the Northern Pacific Ocean (Kato, 1991). In Korea and central Japan, there are both river-resident type and anadromic type populations.

Genetic variation is important for the long-term survival of natural populations, because it confers the ability to adapt to changing environmental conditions, through the increase of fitness (Frankel and Soulé, 1981). Analyzing maternally inherited mtDNA is a useful and important way to investigate the genetic variation of populations of aquatic organisms. Many fish species, including salmons, have been genetically analyzed based on mtDNA (Park et al., 1993). Recently, Sato et al. (2001) and Yu et al. (2010a) found greater variation using nucleotide sequences in mtDNA of chum salmon and masu salmon. In particular, the NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) region of mtDNA may be a useful genetic marker, because it is conserved across all organisms and has a fast evolutionary rate (McKay et al., 1996; Verspoor et al., 1999).

This study was to estimate genetic variation and population genetics of masu salmon, *O. masou*, based on a 561 bp mitochondrial NADH dehydrogenase

subunit 5 (ND5) gene. A total of 249 fish representing 12 populations collected from 10 river-resident type and 2 anadromic type populations was analyzed. The analysis of ND5 nucleotide sequences revealed not only 10 variable sites, which defined 7 haplotypes, including some associated with their life cycle type but also 14 variable sites, which defined 14 haplotypes. Genetic diversity of Gogindong (GOL) and Buyeondong (BUL) populations were higher than those of Songhyon (SOL) and Yeongok (YOL) among river-resident type populations. Pairwise population F_{ST} estimates and neighbor-joining tree analyses inferred that river-resident of GOL and SOL were distinct with other same life type population and anadromic types. In addition, both GOL and SOL populations showed clear genetic differences with Japanese and Russian populations. Other Korean populations did not distinguish Russian samples.

The nested 95% set of plausible cladogram for the observed 7 ND5 haplotypes from Korean masu salmon populations was constructed with Nested Clade Analysis. A focal haplotype and derived haplotypes showed a clear star-like genealogy. The high haplotype diversity and limited nucleotide diversity of masu salmon populations suggest the rapid population expansion from an ancestral population with small effective population size. Neutral expectations and historical demographic expansions were investigated using Fu's F_s and Tajima's D tests, and mismatch distributions with sudden expansion model. For all populations together Fu's F_s and Tajima's D values were negative from the neutral evolution model. The mismatch distributions of masu salmon in the Far East populations appeared to be unimodal. The goodness-of-fit test did not reject the null hypothesis of sudden population expansion. Thus, all of above tests indicate a recent expansion of masu salmon.

In conclusion, this study found significant genetic differentiation of populations between two Korean populations (GOL and BUL) and other populations, which the two differentiated populations may require separate management strategies.

목 차

Abstract	I
Content	III
List of Tables	V
List of Figures	VI
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 실험어 채집	8
2. Genomic DNA 추출 및 유전자 증폭	13
3. 염기서열 해독 및 염기변이영역 확인	14
4. 통계분석	14
III. 결 과	16
1. 우리나라에 서식하는 자연산 산천어(river-resident type) 및 시마연어 (anadromic type)에 대한 계통지리학적 연구	16
가. ND5 염기변이 분석	16
나. 집단유전학적 분석	22
2. 극동아시아에서 서식하는 자연산 산천어(river-resident type)에 대한 집단유 전학적 연구	27

가. ND5 염기변이 분석	27
나. 집단유전학적 분석	31
다. 집단유전학적 역학 구조 분석	36
IV. 고 찰	39
V. 요 약	43
감사의 글	45
참고문헌	46



List of Table

Table 1. Sampling information of masu salmon used for mtDNA ND5 analysis	10
Table 2. Dified haplotypes of masu salmon based on variable nucleotide sites in the mtDNA ND5 gene	18
Table 3. Distribution pattern of mtDNA ND5 haplotypes among six populations of masu salmon	19
Table 4. Measures of mtDNA diversity calculated for each population of masu salmon	24
Table 5. Pairwise F_{ST} estimates amng the six populations of masu salmon, “+” is significant differentiation ($P < 0.05$). Probability of differentiation with P value was calculated from 1,000 replications	25
Table 6. Defined haplotypes of masu salmon based on variable nucleotide sites in the mtDNA ND5 gene	28
Table 7. Distribution pattern of mtDNA ND5 haplotypes among 10 populations of masu salmon	29
Table 8. Measures of mtDNA diversity calculated for each population of masu salmon	33
Table 9. Pairwise F_{ST} estimates amng the six populations of masu salmon. Probability of differentiation with P value was calculated from 1,000 replications. “+” indicates significant differentiation ($P < 0.05$)	34
Table 10. Parameters of the sudden expansion model and estimated time since expansion	37

List of Figures

- Fig. 1. Distribution of masu salmon, *Oncorhynchus masou* or landlocked type “yamame” and its subspecies amago, *O. masou ishikawae* in the Far East (from Kato and Machidori, 1991) 2
- Fig. 2. Photographs of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). (a) precocious male non-migrant, (b) immature parr non migrants, (c) pseudo smolt, (d) smolt migrants, and adult smolt migrants that migrated back from the sea (cited from Munakata, 2012) 3
- Fig. 3. Map of Korea, Japan and eastern Russia showing the river locations where masu salmon (*Oncorhynchus masou*) were sampled 11
- Fig. 4. Male-specific distribution of masu salmon GH-Y pseudogene (280 bp) in the Shari River and Lutga River (cited from Yu et al., 2010c) after 2% agarose gel electrophoresis 12
- Fig. 5. A single minimum spanning tree of the 7 mtDNA ND5 haplotypes of masu salmon. Circle sizes reflect haplotype abundances 20
- Fig. 6. The estimated 95% plausible set of cladogram and associated nested clade design for the ND5 haplotypes found in masu salmon. Zeros indicate haplotype states that are necessary intermediates between observed haplotypes but that were not observed in the samples. Each solid line interconnecting two haplotype states represents a single mutational change. Individual haplotypes are considered 0-step clades; haplotype separated by

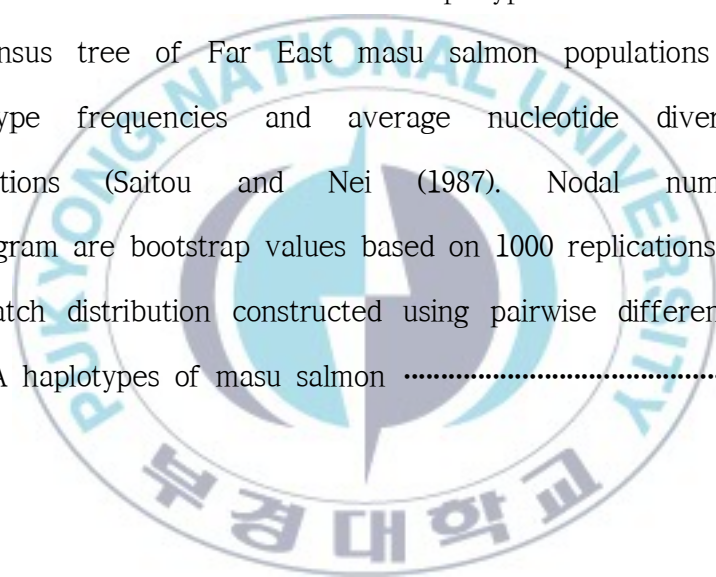
a single mutation are grouped into 1-step clades (1-1, 1-2 and 1-3); and 1-step clade separated by a single mutation are grouped into 2-step clades (2-1 and 2-2) 21

Fig. 7. Consensus tree (insert) of Korean masu salmon populations based on the haplotype frequencies and average nucleotide diversities between populations (Saitou and Nei (1987). Nodal numbers in the phenogram are bootstrap values based on 1000 replications. 26

Fig. 8. A single minimum spanning tree of the 14 mtDNA ND5 haplotypes of masu salmon. Circle sizes reflect haplotype abundances 30

Fig. 9. Consensus tree of Far East masu salmon populations based on the haplotype frequencies and average nucleotide diversities between populations (Saitou and Nei (1987). Nodal numbers in the phenogram are bootstrap values based on 1000 replications 35

Fig. 10. Mismatch distribution constructed using pairwise differences among the mtDNA haplotypes of masu salmon 38



I. 서론

산천어, *Oncorhynchus masou*는 청어목(Clupeida), 연어과(Salmonidae), 연어 속에 속하는 냉수성 어류로서 하천의 깊고 맑은 계곡에 서식하는 종으로 극동아시아지역인 우리나라, 북한, 중국, 일본, 러시아에 분포하고 있다(Fig. 1). 산천어와 같은 연어과 어류는 대부분이 하천에서 태어나 바다로 강하하여 성어가 된 후 산란을 위해 강으로 소상하는 모천 회귀성 어종이다. 그러나 ‘아마고’라고 불리는 홍점산천어(*Oncorhynchus rhodurus*)와 산천어 중 일부는 하천 잔류형으로 분류되어 연어과 어류 중에서 특이한 특성을 지니고 있다(Kato, 1991). 산천어는 주로 수컷으로 강에서 서식하는 육봉형(river-resident type)과 주로 암컷으로서 연어와 같이 산란을 위해 바다에서 성장한 후 강으로 돌아오는 소하형(anadromic type)이 존재한다. 소하형은 “송어” 또는 “시마연어”라 불리고 있으며, 체색은 은빛을 띠고 있는 것이 특징이다(Fig. 2).

산천어의 몸은 원모양으로 약간 측편된 형이고 체고가 조금 높은 편이며, 입은 크고 비늘이 작다. 체색은 황색을 띤 담적갈색으로 옆줄에는 연분홍 띠와 타원형의 세로줄무늬인 파마크(Parr-mark)가 뚜렷하게 형성되어 있다. 산천어는 성어가 되어도 파마크를 지니고 있어 소하형인 시마연어와 구분되고, 일부가 바다로 내려가는 스몰트(smolt) 존재하지만 파마크의 흔적은 남아 있다(Fig. 2). 산천어는 생후만 2년이 지나면 전장이 약 200 mm 이상이 되어 암컷은 대부분 성숙하며, 수컷은 만 1년 만에 성숙하는 것도 있다.

현재까지 산천어와 시마연어는 생리학적, 생태학적으로 서로 다른 형태의 생활상을 가지고 있지만 이들은 모두 같은 종으로서(鄭, 1977), 생활사 규명을 위한 연구가 진행되고 있다. 육봉형인 산천어는 지역에 고착되어 살고 있어 지리적 격리가 일어나기 쉽고, 소하형인 시마연어는 산란장으로 회귀하는 모천회귀 행동을 보

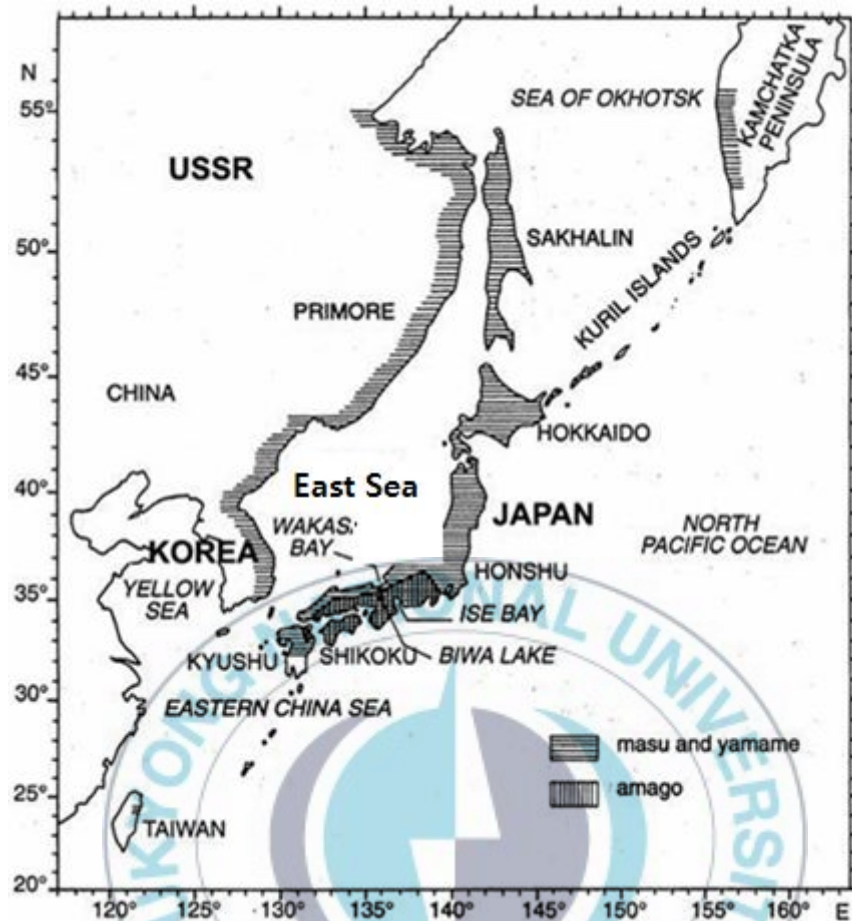


Fig. 1. Distribution of masu salmon, *Oncorhynchus masou* or landlocked type “yamame” and its subspecies amago, *O. masou ishikawae* in the Far East (Kato, 1991).

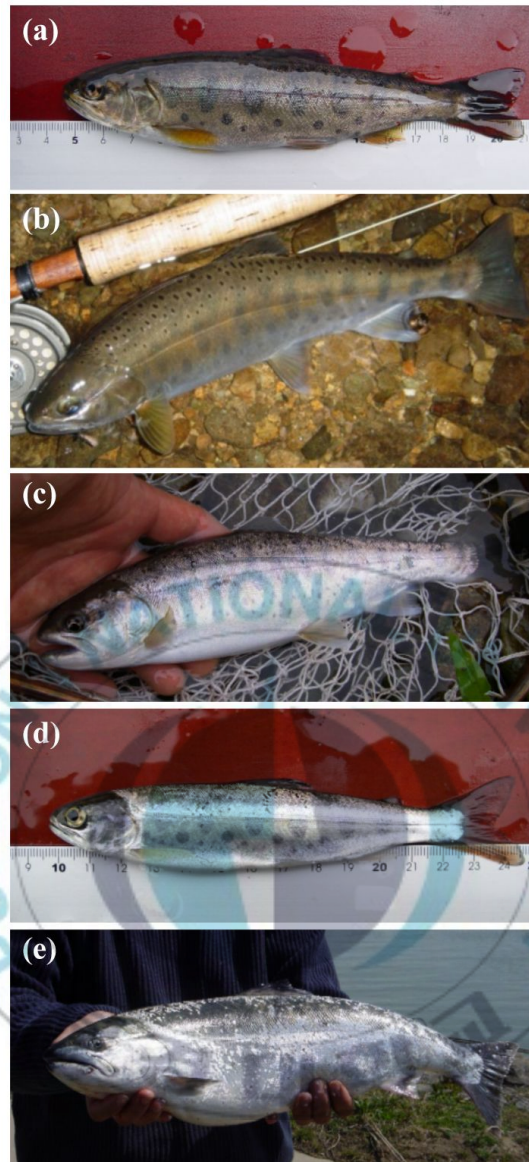


Fig. 2. Photographs of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). (a) precocious male non-migrant, (b) immature parr non migrants, (c) pseudo smolt, (d) smolt migrants, and (e) adult smolt migrants that migrated back from the sea (cited from Munakata, 2012).

이는 특성이 있다. 이러한 특성은 유전적 교류(gene flow)가 일어날 확률을 적게 만들 수 있어 집단 간에 유전적 변이(genetic variation)가 일어날 수 있다(Quinn, 1993).

산천어의 서식지는 산소가 풍부한 강 상류의 맑은 물에서 살며, 과거 1930년대까지도 울진 이북의 동해로 흐르는 각 하천에 분포했으나 환경오염으로 인한 서식지 파괴 등으로 인해 그 수가 줄어들었고 현재는 분포 구역이 크게 감소되어 강원도의 고성군, 양양군, 및 강릉시를 흐르는 각 하천에 소수가 남아 있는 실정이다. 다행히 최근 들어서는 산천어의 보존 및 복원을 위한 분류학, 생태학, 유전학 및 환경학적 연구가 활발히 이루어지고 있으며 생태관광 및 지방자치단체의 홍보용으로도 이용되어 국민의 관심이 높아지고 있다. 그러나 산천어에 대한 체계적인 연구가 수행되지 않은 상태에서 주민의 소득증대 및 높아진 국민의 관심 등을 충족시키기 위한 관광산업의 일환으로 무분별한 외래종의 도입 또는 교잡을 통한 대량 생산이 이루어지고 있다. 이는 자칫 생물이 가지는 유전적 다양성을 떨어뜨릴 우려가 있고, 또한 이렇게 생산된 종묘를 하천에 방류하는 것은 하천 생태계의 변화, 즉, 서식하는 종의 조성이나 군집구조의 변화를 유발할 수 있으며, 토착종과의 경쟁에 우위를 차지하는 경우가 있다. 또한 무분별하게 방류된 어종은 토착어종의 생태학적 연구를 어렵게 만들고, 자연생태계가 처한 문제점을 파악하는데 어렵게 하는 요인이 되고 있다. 실제로 1980년대 후반 산천어 생산량 증대를 목적으로 일본으로부터 발안난이 이식되어 인공종묘생산을 시도하였고 자원량 증대를 목적으로 대규모의 종묘방류를 실시하여 성공적인 자원복원사례가 되었다. 그러나 방류하천에서 외래종인 홍점 산천어가 발견되고 이들의 교잡종 역시 서식하게 되어 토착종과의 경쟁에서 우위를 보이는 문제점이 유발되었다.

최근에는 특정 대상어종의 관리 및 보존을 위해 유전학적 접근방법의 일환인 집단유전학적(population genetics) 기법을 통한 연구가 활발히 진행되고 있다. 집단유전학적 연구는 수산자원의 유지 관리와 지속적 생산의 확보에 관한 기본적인

정보를 제공해 왔으며, 세계 각국에서 수산 자원을 효과적으로 관리하기 위해 활발히 이용하고 있다. 집단유전학적 연구결과들은 생물다양성의 기본요소인 유전적 다양성(genetic diversity)을 확인할 수 있기 때문에 생물집단이 처한 상황을 판단하는데 직접적으로 이용되고 있다. 유전적 다양성은 다양한 개체들이 모여 있는 집단 또는 개체군에게 영향을 주는 외부환경변화 요인인 온도, 질병, 천적 및 경쟁에 적응할 수 있는 능력으로서 집단을 유지하는 가장 기본적인 요소이다(Quinn, 1993). 따라서 산천어의 보존 및 관리를 위해서는 유전적 다양성 정도를 파악할 수 있는 정량적 데이터가 확보되어야 한다. 과거 20년 동안 유전자 마커를 이용한 연어속 어류의 집단 유전학적 연구는 분자생물학기술의 발달로 짧은 연구기간에 비해 대단히 많은 연구 성과가 축적되었다.

지금까지 해양생물의 집단유전학적 연구에 가장 많이 사용되고 있는 유전자 마커로는 isozyme 다형을 이용한 다양성 해독방법이 있다. Isozyme을 이용한 연구 결과로 도출된 정보는 매우 방대하여 현재까지도 이를 활용한 연구들이 지속적으로 이루어지고 있다. 그러나 isozyme은 변이성이 떨어져 짧은 시간에 변이가 일어난 집단간 차이를 밝히는데 한계가 있었다(Brown et al., 1979). 최근에는 단시간 내에 염기서열을 해독할 수 있는 장치가 개발되고, 염기서열내에 함유하고 있는 유전자 변이영역을 대량으로 검출할 수 있게 되어 이를 활용한 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 확인이 가능하게 되었다. 이처럼 다양한 분자생물학적 기술이 개발됨에 따라, 이를 유전자 마커로 활용한 집단유전학적 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 최근 DNA의 염기배열 중에서도 변이성이 높은 유전자영역인 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA)를 마커로서 이용한 연구가 많아졌다. 미토콘드리아는 거의 모든 진핵생물의 세포에 존재하며, 별도의 DNA와 복제 및 전사를 위한 중합효소들이 있다. 또한 세포내에서 복제수가 많고 크기가 작아 분리 및 분석이 쉬우며, 돌연변이율이 높고 모계유전을 하는 특징이 있다. 생물 종이 진화하면서 염기순서가 변하기 마련이지만 미토콘드리아 DNA는 핵유전자보다 약 10배 정도

빨리 변이가 일어나는 것으로 알려져 있다(Brown et al., 1979). 따라서 근연종 혹은 그 이하의 집단과 개체를 비교하는데 아주 좋은 유전 표지인자가 된다. 미토콘드리아 DNA를 구성하는 대부분의 유전자 배열은 매우 보존적이며, NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3)와 같은 단백질을 암호화하는 유전자는 모든 생물체의 미토콘드리아 DNA 내에 일정하게 존재하고 있으므로, 최근 생물 집단간 유전적 차이를 규명하는데 있어 미토콘드리아 DNA 분석이 효과적으로 이용되고 있다. 그러나 최근에 미토콘드리아 DNA의 일부 염기순서가 핵의 DNA에 삽입되어 있는 것이 발견되었고 DNA의 변이 속도는 미토콘드리아 DNA의 것과 다르기 때문에 다른 염기순서를 보이게 되므로, 미토콘드리아 DNA 변이 분석에 보다 세심한 주의가 필요하다(Zishler et al., 1995).

연어에 존재하는 미토콘드리아 DNA의 변이 영역을 쉽게 확인하기 위한 방법들이 개발되어 염기서열 분석법(Sato et al., 2001, 2004)이나 제한효소 길이다형 분석법(Churikov and Gharret, 2002)이 연어류의 유전적 다양성(genetic diversity)을 분석 하는데 매우 효과적인 방법이라는 것이 보고되었다. Sato et al. (2001, 2004)은 염기서열 분석방법을 통해 미토콘드리아 DNA 내에 존재하는 조절영역(control region)의 염기다형을 확인한 결과, 제한효소 길이다형 분석법(RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) 보다 염기변이를 확인하는데 있어 감도가 높음을 확인하였다. 지금까지 염기서열 분석방법에 의한 연어의 미토콘드리아 DNA 조절 영역의 염기변이 다형이 타 분석 방법보다 높게 나타났지만, 지역 집단(regional group of populations)간 유전적 특성을 규명하기에는 부족한 점이 있었다. 따라서 다양한 유전자내에 존재하는 지역별 또는 종별 특이유전자 변이영역을 조사하여 연어의 집단유전학 연구에 필요한 각 유전자별로 다양한 정보를 얻을 필요가 있다. 국내에서는 연어류에 대한 유전학적 연구로는 연어집단의 골격근 내 MDH, LDH isozyme의 특성 분석(명, 1992), 한국산 연어류에서 유전자 마커 개발을 위한 생화학적 연구(홍, 1994), 한국 동해안으로 회귀하는 연어 집단에서의 몇 가지 효소 다형에

관한 연구(성, 1996), 미토콘드리아 ribosomal RNA를 이용한 한국산 연어과의 유전적 계통도(Lee et al., 2000), 연어의 계군분석을 위한 미토콘드리아 DNA의 클로닝 및 염기서열분석(최, 2002), 미토콘드리아 ND3를 이용한 한국산 연어의 유전적 다형성(Choi et al., 2003), microsatellite DNA를 이용한 연어계군분석(정 등, 2003), 한국 연어의 소상하천간 유전적 유사성(김 등, 2007) 등에 관한 연구가 수행되었다. 산천어에 관한 연구는 일본에서 형태와 생태(Kato, 1991), 채집과 사육(加藤, 1966), 방류와 채포(關, 1978), 육봉에 관한 연구(岡田·井上, 1958) 등이 있으며, 우리 나라에서는 육종에 관한 연구(Park et. al., 1993; Park and Chang, 1994; Park and Park, 1995), 산란 시기의 형태학적 특징(Park et. al., 1996) 등 많은 연구가 있으나 국내 서식 자연산 산천어 집단에 대한 유전학적 연구는 중요성에도 불구하고 Yoon et al. (2008)의 보고가 전부이다. Yoon et al. (2008)은 미토콘드리아 DNA를 마커로 산천어와 시마연어 집단간 또는 지역적 집단간 유전적 차이점을 확인하였다. 그러나 실험대상 집단의 수가 매우 적어 계통지리학적 또는 분자생태학적 연구를 위한 해석에 있어서 한계를 보이고 있다.

본 연구의 목적은 미토콘드리아 DNA의 변이영역을 유전자 마커로 이용하여 국내·외 서식 산천어(시마연어 포함)의 유전적 다양성 및 구조를 밝혀 우리나라 토종 산천어를 확보하는 것이다. 아울러 획득된 유전 정보를 이용하여 국내 서식 토종 산천어를 찾아 생태계 보존 및 보호를 위한 기초자료를 제공하기 위함이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어의 채집

본 연구에 사용된 국내산 산천어는 강원도 영동지역하천 4개소인 고성군 수동면 고진동 계곡(GOL), 양양군 손양면 송현천(SOL), 강릉시 연곡면 연곡천(YOL) 및 삼산리 부연동 계곡(BUL)에서 62개체를 플라이낚시를 이용하여 채집하였고, 시마연어는 강원도 속초(SOA)와 주문진(JUA) 연안에서 정치망에 혼획된 23개체를 이용하였다. 고진동 계곡은 1998년부터 2008년까지 양양연어사업소에서 어린연어를 방류하였던 지역으로 계곡 폭은 20~50 m, 유폭 3~10 m, 수심 10~90 cm 정도로 좁고 경사도가 심한 계곡이다. 계곡의 수량은 풍부하고, 맑고 깨끗하며 바닥에는 굵은 암석, 자갈과 모래가 혼재되어 있고, 군데군데 여울이 진 소가 있으며, 산천어가 서식할 수 있는 지역은 계곡의 위쪽으로 1 km 내외로 가늘고 길게 뻗어 있다. 송현천은 동해바다에서 포획지점까지 약 3.5~4 km 거리로 구천동 계곡과 검장리 계곡으로 갈라지는 지점으로 민통선 내에 있는 소하천인데 하류 쪽은 빨과 모래가 섞여 있고 군데군데 돌, 자갈, 모래가 있으며, 하천에는 갈대와 같은 수서식물이 있고 물은 맑지 못하고 혼탁하였다. 부연동 계곡은 남대천 54 km의 3개 지류 중 어성전천의 최상류로 강릉시 연곡면 삼산리, 두로봉(頭老峰: 1,422 m) 동쪽 계곡에서 발원한 계곡으로 계곡 폭은 40~50 m, 유폭 10~30 m, 수심 20~50 cm로 수량은 풍부하고, 맑고 깨끗하여 바닥에는 굵은 암석, 자갈과 모래가 혼재되어 있다. 연곡천은 삼산지역을 중심으로 하천폭 80~100 m, 유폭 7~8 m, 수심 50~70 cm로 봄철인데도 수량이 풍부하고 맑으며 바닥은 굵은 암석, 자갈과 모래가 혼재되어 있는 2~3 km 지역을 조사하고 채집하였다. 시료는 유전자 분석을 위해 꼬리지느러미 일부를 채취 후 100% 에탄올에 고정하거나 냉장 보관하여 실험실로 운반하였다. 일본산 산천어는 북해도

지역 하천 4개소인 시리베쯔(rSHI), 샤리(rSHA), 시베쯔(rSHB), 메나(rMEN)에서 채집하였고, 러시아산 산천어는 사할린 남부지역 2개 하천인 스코플레크(rSUK)와 루트카(rLUT)에서 채집하였다(Table 1, Fig. 3). 극동아시아지역 육붕형 산천어 중 국외집단인 일본산과 러시아산 집단은 Devlin et al. (2001)이 고안한 연어과 어류의 수컷특이 유전자인 GH-Y (male-specific growth hormone pseudogene)를 사용한 기준에 보고된 유전자 정보를 활용하였으며(Yu et al., 2010b, 2010c)(Fig. 4). 또한 국내산 산천어는 파마크가 뚜렷하며, 성분화가 이미 완료된 수컷을 사용하였다.



Table 1. Sampling information of masu salmon used for mtDNA ND5 analysis

Sampling location	Abbreviation	Year	Type of sample	Numbers of samples	Geographical co-ordinates	
					Latitude	Longitude
<i>Korea</i>						
Gojindong	GOL	2010	River-resident type	20	38° 25′01.43″N	128° 16′52.94″E
Songhyon	SOL	2010	River-resident type	15	38° 04′10.96″N	128° 29′13.66″E
Yeongok	YOL	2011	River-resident type	14	37° 50′17.57″N	128° 40′21.49″E
Buyeondong	BUL	2011	River-resident type	13	37° 48′43.94″N	128° 36′34.80″E
Sokcho coast	SOA	2010	Anadromic type	12	38° 12′09.67″N	128° 39′47.16″E
Jumoonjin cast	JUA	2010	Anadromic type	11	37° 53′50.11″N	128° 50′34.13″E
<i>Japan</i>						
Shiribetsu ⁽¹⁾	rSHI	2001	River-resident type	48	42° 38′06.27″N	140° 35′07.13″E
Shari ⁽²⁾	rSHA	2008	River-resident type	24	43° 49′32.31″N	144° 22′07.04″E
Shibetsu	rSHB	2001	River-resident type	42	44° 15′01.12″N	142° 11′04.77″E
Mena	rMEN	2001	River-resident type	24	42° 40′16.69″N	140° 14′01.66″E
<i>Russia</i>						
Sukhopletk ⁽²⁾	rSUK	2004	River-resident type	15	46° 27′50.34″N	143° 18′47.64″E
Lutga ⁽²⁾	rLUT	2004	River-resident type	11	46° 20′35.45″N	142° 14′58.20″E

⁽¹⁾Cited from Yu et al (2010b)

⁽²⁾Cited from Yu et al (2010c)

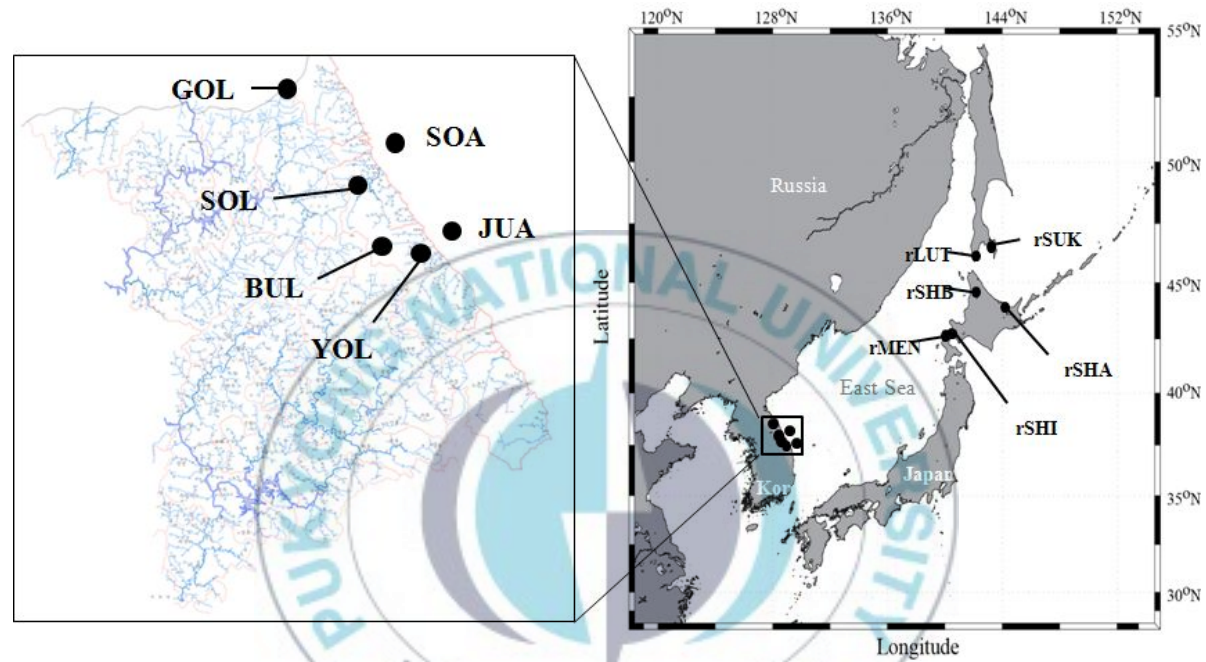


Fig. 3. Map of Korea, Japan and eastern Russia showing the river locations where masu salmon (*Oncorhynchus masou*) were sampled (see Table 1 for the site names).

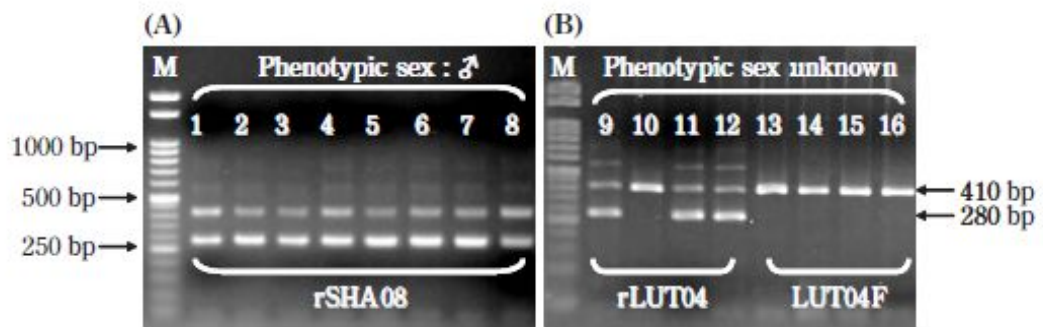


Fig. 4. Male-specific distribution of masu salmon GH-Y pseudogene (280 bp) in the Shari River and Lutga River (cited from Yu et al., 2010c) after 2% agarose gel electrophoresis.



2. Genomic DNA 추출 및 유전자 증폭

채집된 시료로부터 genomic DNA를 분리하기 위해 Blood and Cell culture DNA Midi Kit (Qiagen, Germany)를 사용하였다. Genomic DNA의 추출방법은 Kit의 매뉴얼에 따랐으며, 분리된 genomic DNA의 상태를 확인하기 위해 0.8% 아가로스 겔에 전기영동을 실시하였다. 또한 추출된 DNA의 농도는 260과 280 nm 파장의 UV spectroscopy에 의해 확인하였다.

미토콘드리아 DNA의 유전자는 NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) 유전자 영역을 선택하였으며(Yu et al., 2010a), ND5 유전자 영역을 선택적으로 증폭하기 위해 사용한 프라이머는 기존에 Kitanishi et al. (2007)이 고안한 ND5-1F와 ND5-3R을 사용하였다. PCR 반응액은 template DNA 10 μ g 0.5 μ l, 10X PCR buffer (TAKARA, JAPAN) 2.5 μ l, dNTP 0.5 μ l, Taq polymerase (TAKARA, JAPAN) 0.2 μ l, forward primer 10 pmole 0.5 μ l, reverse primer 10 pmole 0.5 μ l, DDW 20.3 μ l를 혼합하여 만든 25 μ l의 반응액을 사용하였다. PCR machine (PTC-200, Bio-Rad, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Initial denaturation 92 $^{\circ}$ C 5분간 실시하였고, denaturation 95 $^{\circ}$ C 45초, annealing 56 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 2분간 36회 반복하였으며, final extension 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 실시하였다. PCR 완료 후 1% 아가로스 겔에 PCR 생성물 5 μ l를 주입한 후 전기영동장치 (Powerpac, BIO-RAD, USA)를 100 Voltage에서 30분 동안 전기영동 시킨 후 겔을 UV transilluminator 상에서 최종 산물을 확인하였다.

3. 염기서열 해독 및 염기변이영역 확인

DNA 염기서열은 ABI PRISM dye terminator cycle sequencing kit (PE Biosystem, USA)를 사용하여 95°C 에서 2분 initial denaturation 후, 96°C 에서 10초(denaturation), 50°C 에서 5초(annealing), 60°C 에서 4분(extension)의 3단계를 25회 반복하였다. 이와 같은 과정은 GeneAmp 2400 (PE Biosystem, USA)으로 증폭시켰으며, direct sequencing을 위한 PCR 반응에 사용한 프라이머는 Yu et al. (2010a)이 고안한 ND5-R1 (5' -AGAATGAGGCCCATAGAGG-3')과 ND5-R2 (5' -TAGGCTCCCGATTGTGAGAC-3')를 사용하였다. 증폭된 PCR 산물은 에탄올에 침전시킨 후, ABI PRISM 377 DNA sequencer (PE Biosystem, USA)를 이용하여 염기서열을 해독하였다. 확보된 염기서열 내에 염기변이(nucleotide variation)의 존재유무를 확인하고 haplotype을 결정하기 위해 BioEdit ver. 7.0.9 (Hall, 1999) 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 실시하였다.

4. 통계분석

유전자형간 유전적 유연관계를 살펴보기 위해 TCS ver. 1.21, 프로그램을 사용하였다(Clement et al., 2000). 집단내 유전적 다양성을 파악하기 위해 REAP (MeElroy et al., 1993)의 Nei (1987)와 Nei and Tajima (1981)가 고안한 알고리즘이 적용된 K와 DA 프로그램을 이용하여 집단의 haplotype diversity (h)와 nucleotide diversity (π)를 측정하였다. 또한 유전자형간 유연관계를 살펴보기 위해 TCS ver. 1.21, 프로그램을 사용하였다(Clement et al., 2000). 집단간 유전적 거리를 알아보기 위해 모든 가능한 집단 조합으로 pairwise F_{ST} 수치를 측정하였다. 이상의 모든 통계학적 분석

은 ARLEQUIN program (version 2.000, Schneider et al., 2000)을 이용하였다. 집단간 유전적 유연관계는 Nei의 standard genetic distance (Nei, 1972)를 이용하여 Neighbor-joining 방법으로 계통수를 만들어 분석하였다. Bootstrap 수치는 standard genetic distance matrix조합을 1000번 resampling하여 계산하였다. 이런 과정들은 Phylip ver. 3.5c (<http://www.evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) 프로그램을 사용하였다.

국내산 서식 산천어에 대한 유전적 구조와 이와 연관된 역사적 지리 분석을 통해 과거 집단의 형성과정 및 분화 양상에 대한 이해를 위해 nested clade analysis (NCA)를 수행하였고, Templeton et al. (1995)이 고안한 inference key를 활용하였다. NCA 분석과 inference key 정보는 clade 형성 집단 간 유전적 거리(Dn), nested clade 형성 집단 간 지리적 거리 및 유전적 거리(Dn)와 유전자형(haplotype)간 거리를 고려한 알고리즘 적용 소프트웨어인 GeoDis ver. 2.5를 사용하였다.

집단의 분화 양상 중 집단의 range expansion 경향을 파악하기 위해 ARLEQUIN program ver. 2.000 (Schneider et al., 2000)을 사용하여 sudden expansion model을 이용한 개체 간 유전자형 차이 분포도 (distributions of pairwise genetic differences between individuals haplotypes), Goodness-of-fit tests를 사용하였다. 또한 산천어의 경우 시간당 염기변이율을 이용한 집단의 분화시기에 대한 정확한 데이터가 존재하지 않기 때문에 이를 역추적하기 위한 방법으로 Snook (Centropomidae) ND5의 염기변이율(1.0-4.4% per Myr)을 사용하였다. 이러한 분석방법은 산천어 유전자형의 mismatch율(τ)과 세대교번기간(일반적으로 산천어는 3년 단위임)을 접목하여 극동아시아지역 서식 산천어 집단의 분화시기를 예측하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 한국에서 서식하는 자연산 산천어(river-resident type) 및 시마연어(Anadromic type)에 대한 계통지리학적 연구

가. ND5 염기변이 분석

국내에서 서식중인 산천어와 시마연어 85개체에 대한 미토콘드리아 DNA ND5 유전자의 염기서열을 multiple alignment를 실시하여 비교분석한 결과 561bp에서 모두 10곳의 위치(85, 138, 147, 195, 219, 277, 357, 411, 442, 501 bp)에서 변이를 관찰할 수 있었으며, 총 7개의 haplotype을 결정하였다(Table 2). 7개의 haplotype 중 5개는 NCBI의 GenBank (AB252719, AB252722, AB252728, AB252730, AB469796)에 보고되었고 본 연구를 통해서 2개의 새로운 haplotype (Hap6, Hap7)을 확인할 수 있었다. 염기치환(Transition)은 모두 9(A↔G, T↔C)곳에서 관찰되었고, 염기전환(Transversion)에 의한 염기변이는 1(T↔A)곳에서만 관찰되었다. 본 연구결과, 개체간 염기치환은 전환보다 전이의 빈도가 높게 일어났다. 특정염기변이 영역에서 전이 및 전환 모두 관찰된 곳은 없었으며, 염기의 삽입이나 결실은 관찰되지 않았다. 이는 종내 집단간 변이가 염기치환에 의한 변이로 기인할 것으로 예측할 수 있을 것으로 판단된다.

염기변이를 이용하여 얻어진 총 7개 haplotype에 대한 집단별 분포 현황을 보면 Hap1은 주문진(JUA)과 부연동 계곡(BUL)을 제외한 집단에서 확인되었으며, 타 haplotype보다 높은 빈도를 보였으며, 시마연어와 산천어 집단 모두에서 나타났다. Hap12 역시 이들 두 type 모두에서 나타났으며, Hap4와 Hap20은 시마연어 특이 haplotype이고 Hap10, Hap24와 Hap27은

산천어 특이 haplotype으로 나타났다. Hap20은 시마연어인 주문진집단에서만 관찰되었고, Hap10은 산천어인 부연동 계곡, Hap24는 고진동 계곡(GOL), Hap25는 송현천(SOL)에서만 관찰되었다. 본 연구를 통해 새롭게 확인된 Hap24와 Hap25는 고진동 계곡과 송현천에서 채집한 산천어시료에서만 각각 나타났으며, 시마연어 집단에서는 확인할 수 없었다(Table 3).

Haplotype간 유연관계를 살펴보기 위해 실시한 single minimum spanning 분석 결과 Hap1을 기준으로 6개 haplotype이 방사모양(star-like)의 형태로 구성되었다(Fig. 5). 시마연어 집단에서만 특이적으로 관찰된 Hap20은 Hap1과의 염기서열 차이가 타 haplotype들에 비해 높게 나타났다.

Nested clade analysis 분석결과 1-step으로 총 3개의 clade(1-1, 1-2, 1-3)가 형성되었고, 2-step은 총 2개의 clade(2-1, 2-2)가 형성되었다. Step별 inference key를 활용한 정보 결과 clade 2-1은 제한된 유전적 흐름 현상(restricted gene flow)을 보이는 것으로 나타났다. 부연동 계곡(BUL)에서 확인된 Hap10 (clade 1-1)과 Hap12 (clade 2-2)의 경우 타 집단에서 확인된 유전자형과(clade 1-2)는 매우 이질적인 것으로 나타났다(Fig. 6). 이는 부연동 계곡 집단이 외부집단과의 유전자 교류(gene flow)가 전혀 이루어지지 않고 있음을 시사한다,

Table 2. Defined haplotypes of masu salmon based on variable nucleotide sites in the mtDNA ND5 gene

Haplotype (GenBank accession No.)	Variable nucleotide sites									
	85	138	147	195	219	277	357	411	442	501
Hap1 (AB252719)	T	A	G	A	T	T	C	C	C	A
Hap4 (AB252722)	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
Hap10 (AB252728)	.	G	.	.	C	.	T	.	T	.
Hap12 (AB252730)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
Hap20 (AB469796)	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
*Hap24	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
*Hap25	.	.	.	G	.	.	.	T	.	.

*Hap24 and Hap25: newly identified haplotypes from the present study

Table 3. Distribution pattern of mtDNA ND5 haplotypes among six populations of masu salmon

	GOL	SOL	YOL	BUL	SOA	JUA	Total
Hap1	12	14	12		9		47
Hap4					3	7	10
Hap10				5			5
Hap12			2	8		2	12
Hap20						2	2
Hap24	8						8
Hap25		1					1



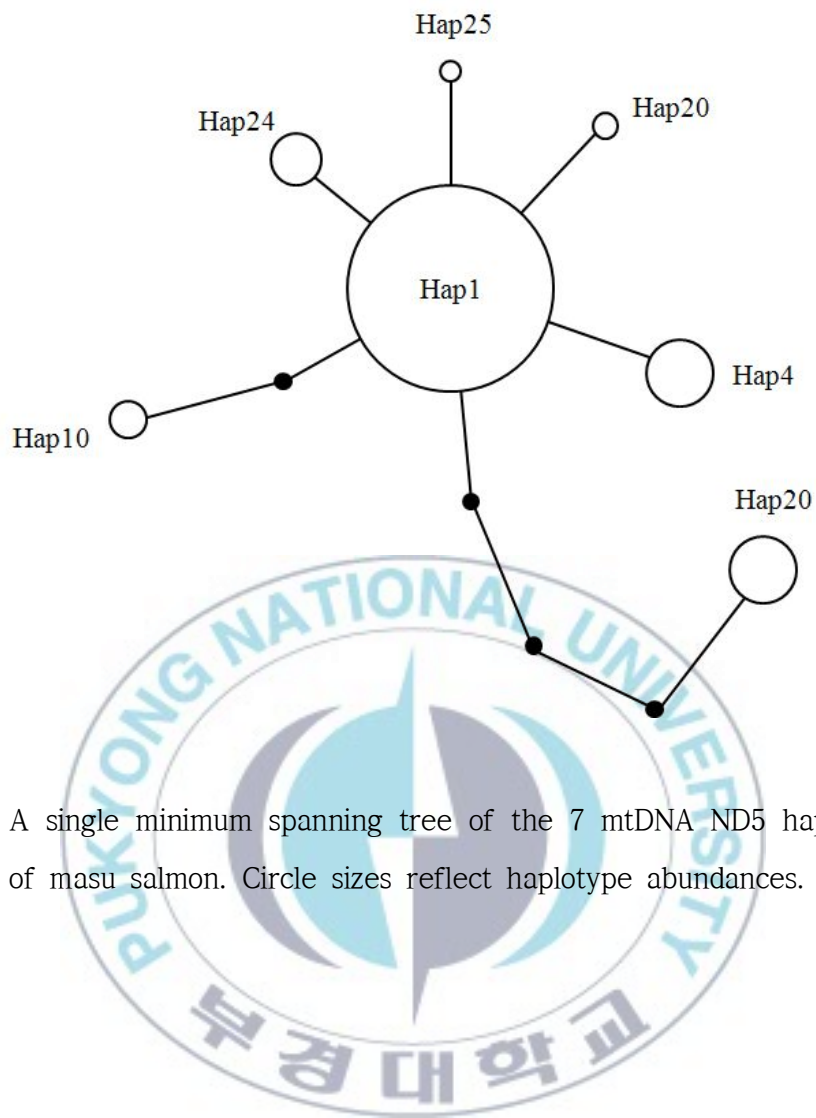


Fig. 5. A single minimum spanning tree of the 7 mtDNA ND5 haplotypes of masu salmon. Circle sizes reflect haplotype abundances.

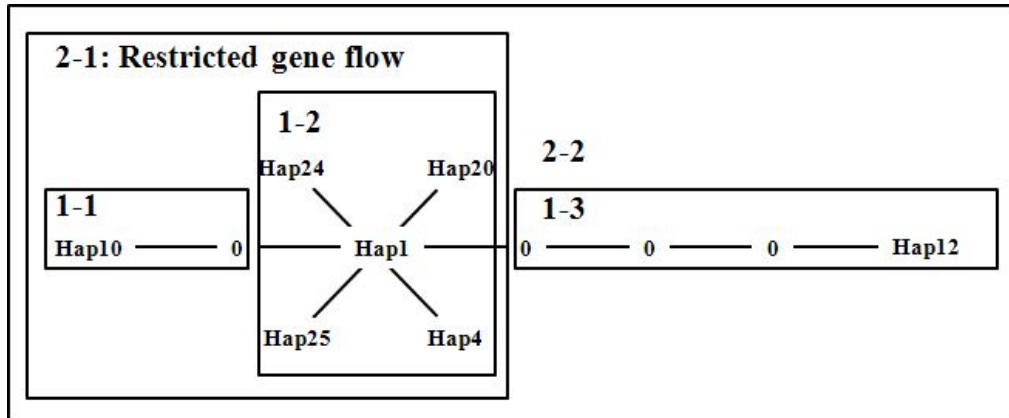


Fig. 6. The estimated 95% plausible set of cladogram and associated nested clad design for the ND5 haplotypes found in masu salmon. Zeros indicate haplotype states that are necessary intermediates between observed haplotypes but that were not observed in the samples. Each solid line interconnecting two haplotype states represents a single mutational change. Individual haplotypes are considered 0-step clades; haplotype separated by a single mutation are grouped into 1-step clades (1-1, 1-2 and 1-3); and 1-step clade separated by a single mutation are grouped into 2-step clades (2-1 and 2-2).

나. 집단유전학적 분석

집단별 유전자 다양성 조사를 위해 획득된 haplotype의 수, haplotype 다양성(h)과 nucleotide 다양성(π)을 각각 조사하였다(Table 4). 주문진 연안에서 채집한 시마연어 집단에서는 3개의 haplotype이 관찰되었고, 나머지 집단에서는 2개의 haplotype이 관찰되었다. Haplotype 다양성은 시마연어 집단이 0.409~0.582로 나타났으며, 산천어 집단의 경우 0.133~0.518로 나타났다. 이는 시마연어의 유전적 다양성이 산천어집단보다 높은 것으로 사료된다. Nucleotide 다양성은 0.001~0.006로 모든 집단에서 매우 낮았다. 산천어 집단 내에서의 haplotype 다양성은 고진동 계곡(GOL)과 부연동 계곡(BUL) 집단이 각각 0.505와 0.518로 나타났으며, 송현천(SOL)과 연곡천(YOL)은 이보다 적은 0.133과 0.264로 나타났다.

집단간 유전적 차이점을 확인하기 위해 통계학적 방법인 F_{ST} test를 통해 유전적 거리(genetic distance)를 측정하였다(Table 5). 고진동 계곡(GOL) 집단의 경우 타 집단과의 F_{ST} 값은 0.293~0.556으로 나타났으며, 부연동 계곡(BUL)은 0.323~0.556의 F_{ST} 값을 보였다. 뿐만 아니라 이들 두 집단은 타 집단 모두와 유의적으로 매우 큰 차이점($P < 0.05$)을 확인할 수 있었다. 반면 이들 집단을 제외한 집단간 F_{ST} 값은 0.074~0.338로 나타났다. 시마연어인 속초연안 채집 시료는 산천어인 송현천(SOL)과 연곡천(YOL) 시료와는 유전적 차이점을 확인할 수 없었지만 주문진(JUA)에서 채집한 시마연어의 경우 모든 산천어 집단과 유전적 차이점을 확인할 수 있었다.

집단 간 유전적 유연관계를 알아보기 위해 neighbor-joining과 consensus tree 분석방법을 사용하였다(Fig. 7). 시마연어 집단인 주문진(JUA)과 속초(SOA)는 62%의 bootstrap값으로 그룹이 형성되었으며, 산천어 집단의 경우 부연동 계곡(BUL)과 연곡천(YOL) 집단은 시마연어 집단들과

유전적으로 밀접한 관계를 보였고 고진동 계곡(BUL)과 송현천(SOA)은 시마
언어 집단들과 그룹이 형성되지 않았다.



Table 4. Measures of mtDNA diversity calculated for each population of masu salmon

Sampling location	No. of haplotypes	$h \pm SD$	π
GOL	2	0.505 $\pm$ 0.136	0.001
SOL	2	0.133 $\pm$ 0.136	0.001
YOL	2	0.264 $\pm$ 0.136	0.002
BUL	2	0.518 $\pm$ 0.082	0.006
SOA	2	0.409 $\pm$ 0.082	0.001
JUA	3	0.582 $\pm$ 0.142	0.004



Table 5. Pairwise F_{ST} estimates among the six populations of masu salmon, “+” is significant differentiation ($P < 0.05$). Probability of differentiation with P value was calculated from 1,000 replications

	GOL	SOL	YOL	BUL	SOA	JUA
GOL		+	+	+	+	+
SOL	0.293			+		+
YOL	0.213	0.074		+		+
BUL	0.556	0.534	0.339		+	+
SOA	0.289	0.158	0.101	0.489		+
JUA	0.379	0.338	0.173	0.323	0.143	

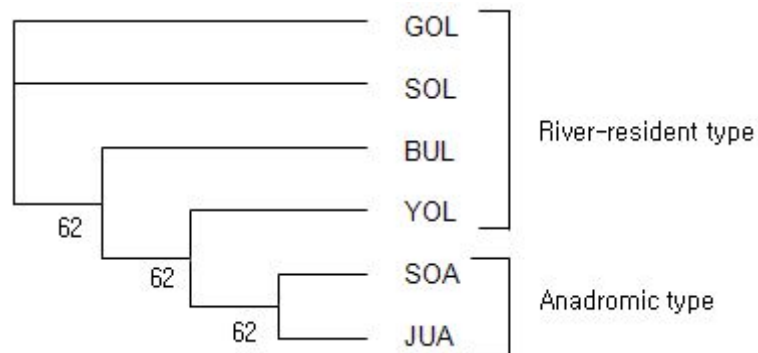
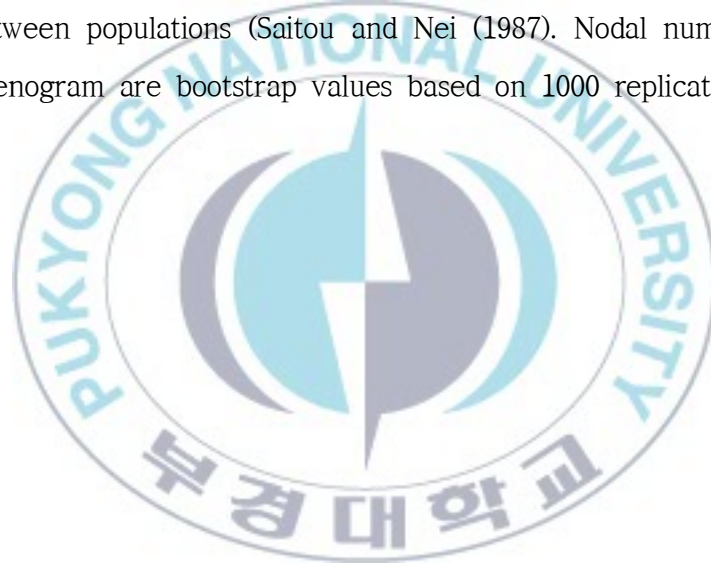


Fig. 7. Consensus tree (insert) of Korean masu salmon populations based on the haplotype frequencies and average nucleotide diversities between populations (Saitou and Nei (1987). Nodal numbers in the phenogram are bootstrap values based on 1000 replications.



2. 극동아시아에서 서식하는 자연산 산천어(river-resident type)에 대한 집단유전학적 연구

가. ND5 염기변이 분석

극동아시아 지역인 한국, 일본, 러시아에서 서식하고 있는 산천어 (river-resident type) 총 10개 집단 226개체의 미토콘드리아 DNA ND5 유전자 영역을 선택적으로 증폭하였고, ND5 partial sequence data의 염기서열을 분석한 결과 14개 위치에서 염기의 변이를 확인할 수 있었다(Table 6). 염기변이를 이용하여 Yu et al. (2010)에 의해 얻어진 기존의 12개 haplotype (Hap1~Hap4, Hap7, Hap8, Hap10~Hap15)과 본 연구를 통해 새롭게 획득된 2개의 haplotype (Hap24, Hap25) 총 14개의 haplotype을 확인하였다. Haplotype간 염기변이를 살펴보면 277 bp에서 전환(transversion)에 의한 염기변이가 일어났으며, 이를 제외한 모든 변이 자리에서 전이(transition)에 의한 염기변이가 관찰되었다.

집단간의 haplotype 구성을 살펴보면, 부연동 계곡(BUL)을 제외한 모든 집단에서 50% 이상이 Hap1을 갖는 것으로 나타났다(GOL:12/20, SOL:14/15, YOL:12/14, rSHI:29/48, rSHA:11/24, rSHB:26/42, rMEN:19/24, rSUK:14/15, rLUT:8/11). 또한 한국 산천어 집단에서만 특이적으로 관찰된 haplotype은 모두 3개(Hap10, Hap24, Hap25)로 나타났다. 일본 산천어에서만 관찰된 haplotype은 모두 6개(Hap3, Hap4, Hap8, Hap12, Hap13, Hap15)이고 러시아 집단은 2개(Hap7, Hap14)로 나타났다(Table 7).

Haplotype간 유연관계를 살펴보기 위해 실시한 single minimum spanning 분석 방법 결과 시마연어 집단을 제외하고, 지역 개체군 및 시료의 수를 늘렸음에도 불구하고 tree의 모양은 Hap1을 기준으로(focal haplotype) 방사모양(star-like)으로 13개 haplotype과 연결되어 있었다. 한국

Table 6. Defined haplotypes of masu salmon based on variable nucleotide site in the mtDNA ND5 gene

Haplotype	Variable nucleotide sites													
	85	105	108	135	138	147	148	195	219	223	277	357	411	442
Hap1	T	A	G	A	A	G	G	A	T	G	T	C	C	C
Hap2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.
Hap4	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap7	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap8	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap10	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T	.
Hap11	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.	.
Hap12	.	.	.	.	G	.	.	.	C	.	.	T	.	T
Hap13	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	T	.	.
Hap14	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap15	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap24*	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap25*	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.

*Hap24 and Hap25: newly identified haplotypes from the present study

Table 7. Distribution pattern of mtDNA ND5 haplotypes among 10 populations of masu salmon

Population	Number of individuals with haplotype													
	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap7	Hap8	Hap10	Hap11	Hap12	Hap13	Hap14	Hap15	Hap24	Hap25
GOL	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0
SOL	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
YOL	12	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
BUL	0	0	0	0	0	0	5	8	0	0	0	0	0	0
rSHI	29	0	1	11	0	0	0	1	0	0	6	0	0	0
rSHA	11	0	1	0	0	0	0	11	1	0	0	0	0	0
rSHB	26	2	1	0	0	1	0	11	0	0	0	1	0	0
rMEN	19	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
rSUK	14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
rLUT	8	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

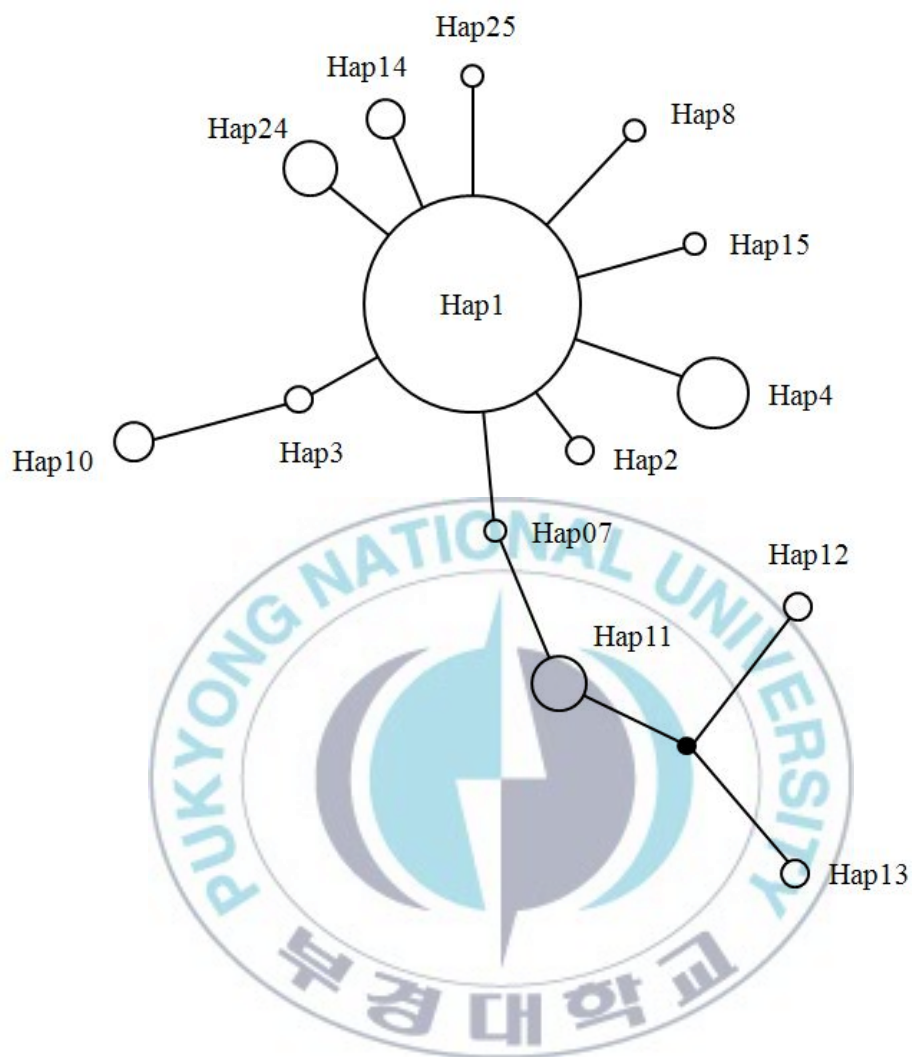


Fig. 8. A single minimum spanning tree of the 14 mtDNA ND5 haplotypes of masu salmon. Circle sizes reflect haplotype abundances.

의 부연동 계곡(BUL) 높은 빈도로 관찰된 Hap11은 러시아집단인 rLUT에서 만 발견된 Hap7으로부터 분지 되었고 Hap12와 Hap13이 연속적으로 분지 되었다(Fig. 8).

나. 집단유전학적 분석

극동아시아 지역 서식 집단별 유전적 다양성을 파악하기 위해 haplotype 다양성(h)과 nucleotide 다양성(π)을 조사하였다(Table 8). haplotype 다양성은 일본산 집단인 rSHA에서 가장 높았고(0.601 ± 0.055), 러시아집단인 rSUK에서 가장 낮은 값(0.133 ± 0.112)을 나타내었다. nucleotide 다양성은 모든 집단에서 낮게 나타났다($0.001 \sim 0.006$).

집단 간 유전적 차이를 확인하기 위해 통계학적 방법인 F_{ST} test를 통해 집단간 유전적 거리(genetic distance)를 산정하였다(Table 9). 고진동 계곡(GOL)과 타 집단 간 F_{ST} 값은 $0.213 \sim 0.509$ 로 나타났으며, 모든 집단과 유의적인 차이($P < 0.05$)를 보였다. 특히, 고진동 계곡과 부연동 계곡(BUL)간의 F_{ST} 값은 0.509 로 타 집단 간 비교구보다 높은 점은 매우 특이하다. 이는 이들 두 집단이 서로 독립적인 유전적 집단을 형성하고 있음을 보여준다. 한국산 산천어 집단 중 송현천(SOL)과 연곡천(YOL)은 러시아 집단들과의 F_{ST} 값은 $0.000 \sim 0.017$ 로 유전적으로 매우 가까운 것으로 나타났다. 일본산 집단의 경우 rSHA를 제외한 모든 집단은 러시아 집단 간 F_{ST} 값은 $-0.009 \sim 0.071$ 로 매우 낮았으며, 러시아 집단 간의 값은 -0.023 으로 나타났다.

극동아시아지역 서식 산천어 집단의 유전적 유연관계를 알아보기 위해 neighbor-joining방법을 사용하여 consensus tree를 사용하였다(Fig. 9). 한국산 산천어의 유전적 형질은 지역별로 러시아산과 일본산 유전형질을 다르게 공유하고 있음을 확인하였다. 고진동 계곡(GOL)은 일본집단인

rSHB와 그룹을 형성하였고 그 외 3개(SOL, BUL, YOL) 집단들은 러시아의 모든 집단과 일본의 rMEN집단과 함께 62%의 bootstrap값으로 그룹이 형성되었다. 본 분석결과 극동아시아 서식 산천어 집단은 총2개의 그룹(그룹A: GOL-rSHB, 그룹B: rSHI-rSHA-YOL-rLUT-rMEN-BUL-SOL-rSUK)이 형성되었으며, 그룹B는 2개의 하위그룹(rSHI-rSHA/YOL-rLUT-rMEN-BUL-SOL-rSUK)으로 형성되었다.



Table 8. Measures of mtDNA diversity calculated for each population of masu salmon

Sampling location	No. of haplotypes	$h \pm SD$	π
GOL	2	0.505 $\pm$ 0.136	0.001
SOL	2	0.133 $\pm$ 0.136	0.001
YOL	2	0.264 $\pm$ 0.136	0.002
BUL	2	0.518 $\pm$ 0.082	0.006
rSHI	5	0.578 $\pm$ 0.063	0.001
rSHA	4	0.601 $\pm$ 0.055	0.002
rSHB	6	0.558 $\pm$ 0.055	0.002
rMEN	3	0.312 $\pm$ 0.055	0.001
rSUK	2	0.133 $\pm$ 0.112	0.001
rLUT	4	0.491 $\pm$ 0.175	0.001

Table 9. Pairwise F_{ST} estimates among the six populations of masu salmon. Probability of differentiation with P value was calculated from 1,000 replications. “+” indicates significant differentiation ($P < 0.05$).

	GOL	SOL	YOL	BUL	rSHI	rSHA	rSHB	rMEN	rSUK	rLUT
GOL		+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOL	0.293		-	+	+	+	+	-	-	-
YOL	0.213	0.074		+	+	+	-	-	-	-
BUL	0.509	0.492	0.304		+	-	+	+	+	+
rSHI	0.241	0.078	0.116	0.506		+	+	+	-	-
rSHA	0.399	0.352	0.148	0.116	0.358		-	+	+	+
rSHB	0.238	0.120	0.023	0.271	0.164	0.069		-	-	-
rMEN	0.216	0.049	0.010	0.353	0.104	0.191	0.024		-	-
rSUK	0.265	0.000	0.012	0.429	0.071	0.268	0.049	-0.009		-
rLUT	0.222	0.017	0.015	0.384	0.042	0.257	0.057	0.008	-0.023	

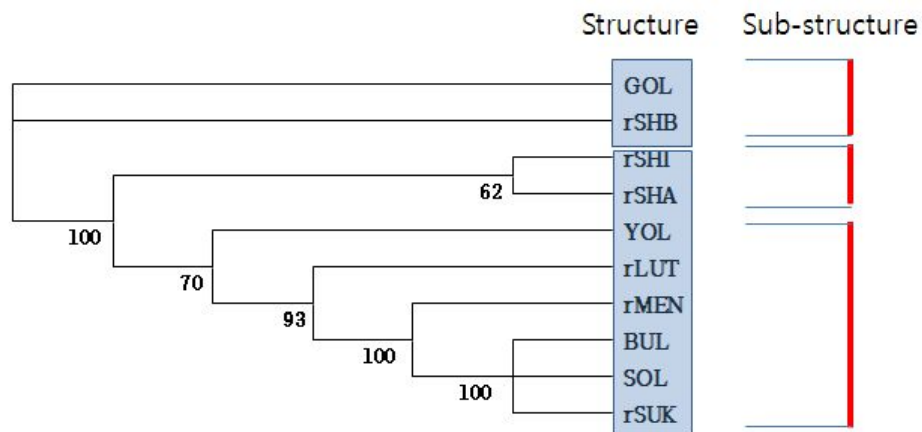


Fig. 9. Consensus tree of Far East masu salmon populations based on the haplotype frequencies and average nucleotide diversities between populations (Saitou and Nei (1987). Nodal numbers in the phenogram are bootstrap values based on 1000 replications.

다. 집단유전학적 역학 구조 분석

산천어의 미토콘드리아 ND5 유전정보를 통해 집단의 과거 분화양상(range expansion)을 파악하기 위해 sudden expansion model (SEM)을 이용하여 인구학적 역사(demographic history)를 추정하였다(Table 10). SEM에 적합 여부를 확인하기 위해 Neutrality test 항목인 F_u 's F_s 와 Tajima's D 값을 산정하였으며, Mismatch distribution 요인들을 활용하여 결정하였다. 극동아시아 서식 산천어 집단의 F_u 's F_s 값은 -6.62이고 Tajima's D 값은 -1.37이다. 개체 간 유전자형 차이(pair-wise differences) 분포도를 보면 단봉형(unimodal) 형태이고 유전자형간 차이가 크면 클수록 빈도수가 급격히 감소하고 있음을 알 수 있다(Fig 10). 일반적으로 F_u 's F_s 와 Tajima's D 값이 음의 값을 보이면 집단의 급속한 분화가 이루어고 있는 집단에서 관찰되고, pair-wise differences의 분포도가 단봉형이면 집단이 최근에 분화되었다는 근거로 사용된다. 따라서 본 연구결과 극동아시아지역 산천어 집단은 최근에 급속도로 팽창되었을 것으로 사료된다. 또한 goodness-of-fit tests 결과 P_{SSD} 가 0.05 이하이면 평형상태(equilibrium)인 집단에서 관측되는데 본 연구에서는 P_{SSD} 가 0.606인 점으로 미루어보아 산천어 집단이 평형 안정화되지 않고 급속도로 팽창했다는 가설을 지지해 주고 있다. 극동아시아지역 산천어 집단의 분화시기를 측정한 결과 약 89,000년 전으로 나타났다.

Table 10. Parameters of the sudden expansion model and estimated time since expansion

Population	Neutrality tests		Mismatch distribution			
	Fu' s F_s (P value)	Tajima' s D (P value)	τ	θ_0	θ_1	P_{SSD}
GOL	1.41(0.69)	1.43(0.96)	0.8	0.0	99999.0	0.076
SOL	-0.65(0.11)	-1.16(0.16)	2.9	0.1	0.5	0.102
YOL	2.70(0.89)	-0.53(0.32)	3.0	0.0	0.2	0.026
BUL	4.59(0.96)	2.01(0.99)	0.0	0.0	99999.0	0.000
rSHI	-0.91(0.21)	-0.91(0.21)	0.8	0.0	99999.0	0.081
rSHA	0.82(0.69)	-0.10(0.48)	2.4	0.0	2.3	0.110
rSHB	-1.15(0.23)	-0.69(0.30)	2.4	0.0	1.6	0.232
rMEN	0.84(0.66)	-0.73(0.27)	3.0	0.0	0.4	0.070
rSUK	0.23(0.32)	-1.5(0.05)	3.2	0.1	0.1	0.084
rLUT	-2.04(0.00)	-1.6(0.04)	0.7	0.0	99999.0	0.494
Entire	-6.62(0.02)	-1.37(0.05)	2.2	0.0	1.5	0.606

τ , time since expansion measured in mutational time units; θ_0 and θ_1 , population sizes scaled by mutation rate before and after expansion, respectively. P_{SSD} , the probability when the simulated SSD (sum of squared deviations) of the mismatched distribution is larger than the observed SSD in the goodness-of-fit test.

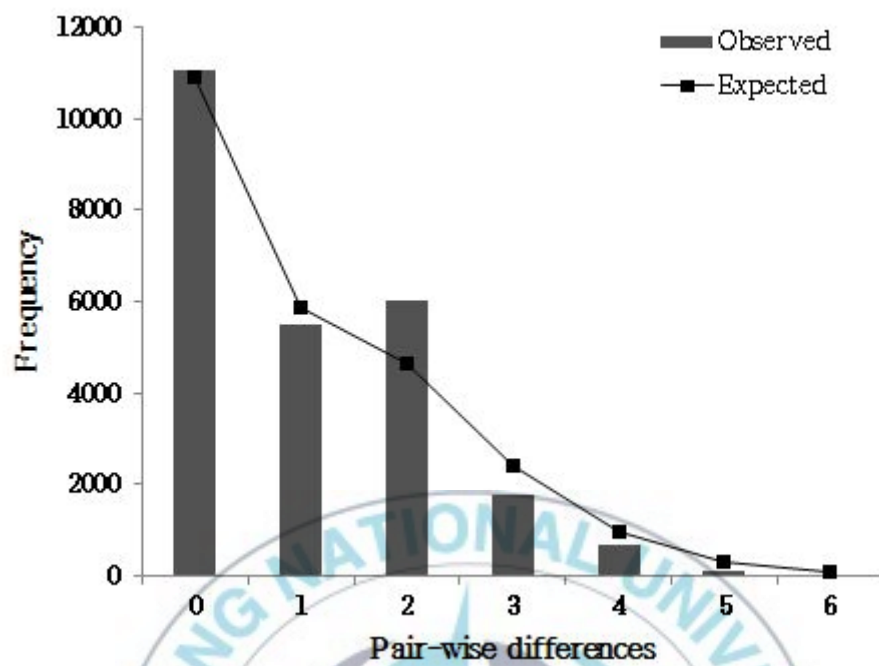


Fig. 10. Mismatch distribution constructed using pairwise differences among the mtDNA haplotypes of masu salmon.

IV. 고 찰

최근 분자생물학적 방법을 이용하여 수산생물자원을 효과적으로 관리하고 보전하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 미토콘드리아 내에 있는 여러 유전자들이 표지인자로서의 가능성에 대한 연구가 이루어 졌다(Thomas et al., 1986; Thomas and Beckenbach, 1989; McVeigh and Davidson, 1991; Avise et al., 1992; Shedlock et al., 1992). 그러나 한국에 서식하고 있는 산천어 집단에 대한 유전학적 연구는 수산자원으로서의 중요성이 높음에도 불구하고 그동안 매우 미흡하였다. Yoon et al. (2008)이 미토콘드리아 DNA를 이용하여 자연산 산천어와 인공부화 산천어에 대한 유전적 차이점을 분석한 연구가 있을 뿐이다. 국외의 경우 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석방법을 통해 동아시아 지역 산천어의 계통지리학적 연구결과가 다수 보고되었지만(Kitanishi et al., 2007; Yu et al., 2010a) 모든 시료가 시마연어집단을 대상으로 분석이 실시되었으며, 한국집단의 경우 정확한 시료정보가 표기되어 있지 않아 유전자 분석에 어려움이 있다.

최근 일본에서 산천어와 시마연어의 유전적 차이점이 일부 집단에서 확인되었으나, 이는 제한된 지역시료에 국한된 결과이다(Yu et al., 2010a). 산천어의 지역에 따른 유전적 차이에 관한 연구 결과들은 국내서식 산천어 집단의 유전적 구조 및 다양성에 관한 연구 수행의 필요성을 보여준다. 현재 국내 서식 자연산 산천어와 시마연어에 관한 집단 간 유전적 상관성 분석에 관한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 염기서열 분석방법을 이용하여 산천어의 미토콘드리아 DNA 내에 존재하는 ND5 유전자 영역의 유전적 다양성을 확인하고 생활양상에 따라 구분되고 있는 산천어와 시마연어 집단간 유전적 차이점

유무를 조사하였다. 산천어의 미토콘드리아 DNA ND5 유전자 영역에 대한 염기서열 분석을 통하여 561 bp의 염기서열 정보를 획득하였으며, 이들로 부터 7개의 유전자형을 결정하였다. 염기서열 정보를 분석한 결과 일부 시료에서 집단특이 또는 산천어와 시마연어 특이 haplotype을 관찰할 수 있었으며, 이러한 유전적 특징들은 ND5가 마커로서 사용될 수 있을 것이다. 또한 특정염기변이 영역에서 전이 및 전환 모두 관찰된 곳은 없었고, 염기의 삽입이나 결손 또한 관찰되지 않았다. 이는 종내 집단 간 변이가 염기 치환에 의해 일어날 수 있음을 보여주는 결과이다. Brown et al. (1979)에 의하면 일반적으로 미토콘드리아 DNA 변이는 대부분 염기 치환에 의해 일어나고, 전이의 빈도가 전환보다 높게 나타나는 것으로 보고하였는데 본 연구결과에서도 산천어와 시마연어의 미토콘드리아 DNA에서도 동일하게 나타났다.

한국산 산천어 집단의 유전적 다양성은 송현천과 연곡천 집단이 고진동 계곡과 부연동 계곡 집단보다 낮았다. 이는 과거에 산천어 방류가 이들 두 지역에서 지속적으로 이루어졌기 때문으로 사료된다. 유전자 병목 현상은 종묘생산 어종 및 양식어종에 흔히 나타나는 현상으로서 제한된 어미수를 이용한 개체증식, 근친교배에 기인한다(Avise, 1998). 또한 고진동 계곡과 부연동계곡은 그동안 산천어 방류가 없었던 곳으로 자연환경이 비교적 잘 보존되고 있는 지역들이다. 또한 고진동 계곡과 부연동 계곡의 산천어 집단과 우리나라 연안에서 채집한 시마연어의 유전적 다양성은 기존에 보고된 자료(Yu et al., 2010a)와 비교하면 일본 북해도 서식 시마연어 집단과 유사한 경향을 보였다. 또한 과거 우리나라 산천어집단의 경우 유전자 다양성이 0.7이상을 보였지만 2010년 이후에 채집한 산천어는 0.5이하로 나타나 시간에 따라 유전자 다양성이 현저히 감소하고 있었다. 따라서 국내산 산천어 개체군의 유전적 다양성 보존을 위해선 개체군간 유전적

교류가 자연적으로 이루어질 수 있도록 생태계 관리가 필요한 시점이다.

극동아시아 지역 서식 산천어 집단의 haplotype 다양성은 높은 반면에 nucleotide 다양성은 매우 낮게 나타났다. 이는 유전적 변이가 단시간에 이루어져 유전자간 명확한 차이를 나타낼 수 있는 변이 축적이 이루어지지 않았기 때문으로 사료된다(Avise, 2000). 또한 일반적으로 single minimum spanning tree의 모양이 방사모양(star-like) 형태로 구성되어 있으면 haplotype간 유전적 차이가 크지 않기 때문이다. 이는 haplotype간 유전적 차이를 명확히 구분할 만큼의 염기변이들이 축적되지 않았기 때문으로 사료된다(Avise, 2000). 이러한 현상은 주로 최근에 분화되었거나 분화속도가 빠른 집단에서 발견된다. 따라서 국내서식 산천어와 시마연어 집단은 최근에 집단의 확장(expansion) 또는 분화(division)가 일어났음을 예측할 수 있다. 좀 더 정확한 집단의 분화양상을 파악하기 위해 실시한 역학 구조 분석 결과에서도 산천어 집단이 최근에 분화가 이루어났고 급속한 집단의 팽창이 이루어졌음을 확인하였다. 본 연구결과 산천어 집단은 258만 년 전부터 1만 년 전까지 진행된 마지막 빙하기인 플라이스토세(Pleistocene)가 끝난 이후에 집단이 확장된 것으로 나타났다. 빙하가 녹으면서 해수면이 상승되어 보다 넓은 지역으로의 이동이 가능해 졌기 때문으로 판단된다.

통계학적 방법인 pairwise F_{ST} 수치 및 Neighbor-joining tree 분석 방법을 이용하여 집단 간 유전적 차이점과 유연관계를 확인한 결과 연곡천과 송현천의 경우 러시아 집단과 유전적으로 매우 가까웠고, 시마연어와도 차이점을 확인할 수 없었다. 따라서 연곡천과 송현천은 러시아에서 유래한 유전자형을 공유하고 있을 것으로 판단된다, 반면, 부연동 계곡과 고진동 계곡 산천어 집단이 타 집단과 유전적으로 매우 큰 것으로 확인되었다. 이는 한국에서 서식하고 있는 산천어 집단 내에는 유전적으로 독립적인 집단이 존재하는 것을 의미한다. 또한 이들 집단들은 러시아산 및 일본 집단들

과 생식적으로 격리가 꾸준히 이루어지고 있음을 의미한다. 이러한 결과는 시마연어에서도 뚜렷이 나타나고 있다. 이 들 두 집단은 집단의 유지를 위한 암컷이 시마연어가 아닌 산천어 내에서 자체적으로 개체군을 유지하고 있거나 송현천과 연곡천 집단과 유전적으로 다른 지역의 시마연어를 이용하고 있을 것으로 판단된다. 유전자은행(NCBI; National Center for Biotechnology Information)에서 얻은 데이터를 이용하여 지금까지 확인된 유전자형을 비교 분석한 결과 고진동 계곡에서 얻어진 일부 유전자형은 일본 및 러시아 집단에서 확인할 수 없었다. 또한 부연동 계곡의 경우 일본과 러시아산 산천어와 시마연어에서 높은 빈도로 나타나는 유전자형인 Hap1을 전혀 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 고진동과 부연동 계곡 집단이 우리나라 고유 산천어일 가능성이 매우 높음을 시사해 준다.

이 들 두 집단은 타 집단과 비교했을 때 유전적 다양성이 높아 국내 고유 산천어에 대한 자원회복 및 종 보전 등에 이용될 수 있을 것으로 보인다. 따라서 향후 이들에 대한 보다 구체적이고 체계적인 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다

V. 요 약

본 연구의 목적은 유전자 마커를 이용하여 국내 산천어의 유전적 다양성 및 구조를 밝혀 외래종의 분포현황을 파악하고 우리나라 토종 산천어를 확보하기 위해 실시하였다. 또한 획득된 유전 정보를 이용하여 토종 산천어의 생태계 보존과 자원관리를 위한 기초자료를 제공하기 위함이다.

국내에서 서식중인 산천어와 시마연어 85개체의 미토콘드리아 DNA ND5 유전자의 염기서열을 비교분석한 결과 10개의 염기변이 영역이 관찰되었으며, 총 7개의 유전자형을 결정하였다. 고진동 계곡과 부연동 계곡 개체군의 유전적 다양도는 타 집단보다 높았고, 유전적으로도 타 집단과 다르게 나타났다.

극동아시아 지역 서식 산천어 집단의 haplotype 다양성은 높은 반면에 nucleotide 다양성은 매우 낮게 나타났고, haplotype 간 haplotype간 유전적 차이가 크지 않았다. 또한 집단유전학적 역학 구조 분석을 실시하여 집단의 분화 양상을 파악한 결과 F_u 's F_s 와 Tajima's D 값, Mismatch distribution 그래프, goodness-of-fit tests 결과 P_{SSD} 결과는 극동아시아지역 산천어 집단은 최근에 급속도로 팽창되었음을 보여주었다.

통계학적 방법인 pairwise F_{ST} 수치를 이용하여 집단간 유전적 차이점을 확인한 결과 부연동 계곡과 고진동 계곡 집단은 일본과 러시아 집단과 유전적 차이를 보였으며, 송현천과 연곡천 집단은 유전적으로 러시아 집단과 매우 가깝게 나타났다. 특히, Nested clade analysis 분석결과 부연동 계곡의 경우 확인된 유전자형은 타 집단의 유전자형과는 매우 이질적인 것으로 나타났고, 고진동 계곡의 경우 고유 유전자형의 검출 빈도가 월등히 높은 것으로 미루어 보아 이 둘 두 집단은 타 집단과의 유전자 교류가 적

게 일어나고 있음을 시사한다.

본 연구 결과를 종합해 볼 때, 타 지역 및 외래종과 유전적으로 차이를 보이는 고진동 계곡과 부연동 계곡 집단은 우리나라 고유 산천어일 가능성이 매우 높음을 시사해 주고 있어 이들의 관리를 위한 구체적이고 체계적인 연구가 수행되어야 할 것이다.



감사의 글

이 논문이 완성되기까지 부족함이 많은 저에게 정열과 성의로 정성껏 지도하여 주신 김동수 교수님께 진심으로 존경과 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 중에서도 부족한 논문의 심사를 맡아 좋은 가르침을 주신 순천향대학교 방인철 교수님, 한국해양과학기술원 노충환 박사님, 부경대학교 남윤권 교수님, 공승표 교수님께도 감사를 드립니다.

지금도 항상 바른길을 갈수 있도록 용기를 주신 한국수산자원관리공단 양태선 이사장님 감사합니다.

어려운 여건 속에서도 학위과정을 다닐 수 있도록 많은 관심으로 응원해 주신 전 양양내수면연구소 백국기 소장님, 손송정 소장님, 이채성 박사님, 부경대학교 김윤 교수님, 조재운 교수님, 강릉원주대학교 박기영 교수님, 권오남 박사님께 감사드립니다.

이 연구를 수행함에 있어 현장의 어려움을 이겨내며 자료수집을 도와주신 양양연어사업소 박기열 박사님, 김경식님, 김태영님, 김두호님, 이순중님, 김주경님 그리고 말없이 도와준 직원들에게도 감사를 드립니다.

무엇보다도 시작부터 끝까지 이 논문이 완성될 수 있도록 큰 도움을 주신 윤문근 박사님께 진심으로 감사드립니다.

항상 믿음으로 지켜봐 주신 장모님 사랑합니다. 그리고 많은 어려움과 힘든 과정에도 학문에 전념할 수 있도록 용기를 준 사랑하는 아내와 이해하는 마음이 아름다운 예쁜 딸 지원, 이제는 남자다운 모습으로 건강하게 자란 준환에게 작은 선물이 되었으면 합니다.

그리고 하나님과 함께 계신 아버지, 어머니, 장인어른께 마음속 깊이 감사함을 드리며, 그 크신 사랑에 비해 한없이 모자라지만 작은 기쁨이라도 되었으면 하는 마음으로 늦게나마 이 논문을 바칩니다.

참고문헌

- Avice JC. 1998. The history and purview of phylogeography: personal reflection. *Mol Ecol* 7, 371-379.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.
- Avice JC, Bowen BW, Lamb T, Mcylan AB and Bermingham E. 1992. Mitochondrial DNA evolution at a turtle's pace: evidence for a low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Mol Biol Evol* 9, 457-473.
- Brown WM, George JR and Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1969-1971.
- Churikov D and Gharrett AJ. 2002. Comparative phylogeography of the two pink salmon broodlines: an analysis based on a mitochondrial DNA genealogy. *Mol Ecol* 11, 1077-1101.
- Clement M, Posada D and Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9, 1657-1659.
- Choi YS, Lee YH and Jin DH. 2003. Cloning and DNA sequences analysis of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 from Korea chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *J Kor Fish Soc* 36(2), 94-99.
- Devlin RH, Biagi CA and Smailus DE. 2001. Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica* 111, 43-58.
- Frankel, OH. and Soulé ME. 1981. *Conservation and Evolution*. Pages

- 1-327. Cambridge University Press, New York.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95-98.
- Hong K., Myoung JG, Son JK and Park CW. 1994. A biochemical study for the development of genetic marker on salmonids in Korea. *Bull Korean Fish Soc* 27, 83-88.
- Kato F. 1991. Life histories of masu and amago salmon (*Oncorhynchus masou* and *O. rhodurus*). In: *Pacific Salmon Life Histories*. Groot C and Margolis L, eds, University of British Columbia Press, Vancouver, Canada, 447-520.
- Kitanish S, Edo K, Yamamoto T, Azuma N, Hasegawa O and Higashi S. 2007. Genetic structure of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations in Hokkaido, northernmost Japan, inferred from mitochondrial DNA variation. *J Fish Biol* 71, 437-452
- Lee HJ, Park JY, Lee JH, Min KS, Jeon IG, Yoo MA and Lee WH. 2000. Phylogeny of the subfamily salmoninae distributed in Korea based upon nucleotide sequences of mitochondrial ribosomal RNA genes. *J Korean Fish Soc* 33, 103-109.
- McElroy D, Moran P., Bermingham E and Kornfield I. 1993. REAP: An integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *J Hered* 83, 157-158.
- McKay SJ, Devlin RH and Smith MJ. 1996. Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences. *Can J Fish*

- Aquat Sci 53, 1165–1176.
- McVeigh HP and Davidson WS. 1991. A salmonid phylogeny inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. J Fish Biol 39 (Suppl. A), 277–282.
- Munakata A. 2012. Migratory Behaviors in Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*) and the influence of endocrinological factors. Aqua-Bio Sci Monog 5, 29–65.
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. Amer Nat 106, 283–292.
- Nei M. 1987 Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, USA.
- Nei M and Tajima F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics 97, 145–163.
- Park L., Brainard MA, Dightman DA and Winans GA. 1993. Low levels of intraspecific variation in the mitochondrial DNA of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Mol Mar Biol Biotech 2, 362–370.
- Park IS and Park KY. 1995. Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid in cherry salmon, *Oncorhynchus masou*. J of Aquaculture 8, 21–29 (in Korean).
- Park IS, Seon KB, Hong KE and Rho YG. 1996. Morphometric characteristics of diploid and triploid cherry salmon, *Oncorhynchus masou* during the prespawning period. Bull Nat'l Fish Res Dev Inst Korea 52, 37–43 (in Korean).
- Park IS, KIM HB, HUH HT and KIM SC, 1993. Masculinization of Masu Salmon (*Oncorhynchus masou*) by Treatments of 17α -

- methytestosterone. OCEAN RESEARCH 15(1), 29-36 (in Korean).
- Park, IS and Zhang CI 1994. Morphometrical Differences between Diploid and Induced Triploid Cherry Salmon, *Oncorhynchus masou*. The Korean Journal of Ichthyology 6(2), 206-221 (in Korean).
- Quinn TP. 1993. A review of homing and stray of wild and hatchery produced salmon. Fish Res 18, 29-44.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol Biol Evol 4, 406-425.
- Sato S, Ando J, Ando H and Abe S. 2001. Genetic variation among Japanese populations of chum salmon inferred from the nucleotide sequences of mitochondrial DNA control region. Zool Sci 18, 99-106.
- Sato S, Kohima H, Ando J, Ando H, Wilmot RL, Seeb LW, Efremov V, LeClair L, Buchholz W, Jin DH, Urawa S, Kaeriyama M, Urano A and Abe S. 2004. Genetic population structure of chum salmon in the Pacific Rim inferred from mitochondrial DNA sequence variation. Environ Biol Fish 69, 37-50.
- Schneider S, Roessli D and Excoffier L. 2000. Arlequin. Version 2.000 University of Geneva, Geneva: available at the web site <http://lgb.unige.ch/arlequin/>.
- Shedlock AM, Parker JD, Crispin DA, Pietsch TW and Burner GC. 1992. Evolution of the salmonid mitochondrial control region. Mol Phylogenet Evol 1, 179-192.
- Taniguchi N, Pérew-Enriquez R and Nugroho E. 2003. DNA markers as a tool for genetic management of brood stock for aquaculture. In:

- N. Shimizu, T. Aoki, I. Hirono and F. Takashima ed., *Aquatic Genomics-Steps Toward a Great Future*. Springer-Verlag, Tokyo, 417-429.
- Templeton AR, Routman E, Phillipa CA. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140, 767-782.
- Thomas WK, Withler RE and Beckenbach AT. 1986. Mitochondrial DNA analysis of pacific salmonid evolution. *Can J Zool* 64, 1058-1064.
- Thomas WK and Beckenbach AT. 1989. Variation in salmonid mitochondrial DNA: evolutionary constraints and mechanisms of substitution. *J Mol Evol* 29, 233-245.
- Verspoor E, McCarthy EM and Knox D. 1999. The phylogeography of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16sRNA region of the mtDNA. *Bio J Linnean Soc* 68, 129-146.
- Yoon M, Jin HJ, Seong KB and Jin DH. 2008. Genetic variation of Korean masu salmon (*Oncorhynchus masou*) populations inferred from mitochondrial DNA sequence analysis. *J Fish Sci Technol* 11, 36-40.
- Yu JN, Azuma N, Yoon M, Brykov V, Urawa S, Nagata M, Jin DH and Abe S. 2010a. Population genetic structure and phylogeography of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses. *Zool Sci* 27, 375-385.

- Yu JN, Noguchi D, Azuma N, Taniguchi N, Urawa S and Abe S. 2010b. Genetic relationships between anadromous and non-anadromous forms of masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in the same river. Nati Taiwan Muse Speci Pub 14, 25-37.
- Yu JN, Azuma N, Brykov V. Urawa S, Ohkuma K and Abe S. 2010c. Genetic relationships between anadromous and non-anadromous masu salmon (*Oncorhynchus masou*) inferred from mitochondrial and microsatellite DNA variation. Fish Gene Breed Sci 39, 1-11.
- Zischler H, Gelsert H, von Haeseler A and Pääbo S. 1995. A nuclear 'fossil' of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. Nat 378, 489-492.
- 김고은, 김충곤, 이운호. 2007. 한국 연어의 소상하천간 유전적 유사성과 차이점 및 일본 연어와 유전적 관계. 한국해양학회지, 12(2): 94-101.
- 명정구. 1992. 한국산 연어속 (*Oncorhynchus* sp.) 어류의 형태학적 연구. 부산수산대학교 대학원 박사학위논문, pp 141.
- 성기백. 1996. 한국 동해안 회귀 연어집단에서의 몇 가지 효소 다형. 강릉대학교 대학원 석사학위논문. pp 31.
- 최윤실. 2002. 연어의 계군분석을 위한 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3 영역의 클로닝 및 DNA 염기서열 분석. 강릉대학교 대학원 석사학위논문. pp 64.
- 홍경표, 명정구, 손진기, 박철원. 1994. 한국산 연어류에서 Genetic Marker 개발을 위한 생화학적 연구. 한국수산학회지. 27, 83-88.
- 加藤文男, 1966. 大型ヤマメ. 採集と飼育. 28(8), 262-263.
- 岡田 鵬・井上 聡, 1958, 槻平人造湖の魚類. I. 陸封マス及びヤマメ. 槻平生物

研究所研究報告 2, 1-15.

關 泰夫, 1978. i只見湖で再捕されたヤマメ(サクラマス・ *Oncorhynchus masou*)とその由來に ついて. 新潟縣内水面水産試験場調査研究報告 6, 1-5.

鄭文基, 1977. 韓國魚圖譜. 一志社, 124-125.

