한국 제주도에서 채집된 갯물뱀(뱀장어목: 바다뱀과) 엽상자어(Leptocephalus)의 형태 및 분자동정

지환성 · 김진구*

부경대학교 자원생물학과

Molecular and Morphological Identification of a *Muraenichthys gymnoterus* (Ophichthidae: Anguilliformes) Leptocephalus Collected on Jeju island, Korea

Hwan-Sung Ji and Jin-Koo Kim*

Department of Marine Biology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

One leptocephalus (TL 59.9 mm) from the family Ophichthidae collected from Jeju Island, Korea, was identified using morphological and molecular methods. Our ophichthid leptocephalus was identified as belonging to the genus *Muraenichthys* based on morphological characters: 157 myomeres; the origin of the dorsal fin located a little in front of the anus; a distinct melanophore present on the opercle; and six gut swellings present. An analysis of 886 base pairs of the 12S rRNA mtDNA sequences showed that our leptocephalus must be *Muraenichthys gymnoterus*, because its sequences were concordant with those of an adult *M. gymnoterus* ($d=0.001$) and next to those of *Muraenichthys* sp. leptocephalus ($d=0.034$). Here, we are the first to describe the morphological characteristics of the *M. gymnoterus* leptocephalus.

Key words: Leptocephalus, Ophichthidae, 12S rRNA, *Muraenichthys gymnoterus*, identification

서 론

바다뱀과(Ophichthidae) 어류는 뱀장어목(Anguilliformes) 어류중 가장 큰 분류군으로, 전세계적으로 52속 260종(McCosker, 2010; Eschmeyer, 2011), 우리나라에 6속 11종(Ji and Kim, 2011a, b)이 보고되어 있다. 바다뱀과 어류는 2아과 [갯물뱀아과(Myrophinae), 바다뱀아과(Ophichthinae)]로 구성되며, 이들은 엽상자어(leptocephalus)의 꼬리지느러미 발달유무, 전장에 대한 체고, 변태 전후의 등지느러미 위치로 잘 구분된다(Castle, 1984; Tabeta and Mochioka, 1988). 바다뱀과 어류의 엽상자어는 투명하고 측편된 체형, 발달된 눈과 날카로운 이빨, 소화관에 여러개의 소낭을 가지는 특징을 보인다(Leiby, 1984; Tabeta and Mochioka, 1988). 이처럼 엽상자어라는 매우 독특한 자치어 시기를 가지는 다양한 바다뱀과 어류를 대상으로 엽상자어의 분포 및 형태에 관한 다수의 연구가 수행되어 왔다. 대서양산 바다뱀과 어류의 엽상자어

(Michael and Obenchain, 1978; Leiby, 1979a; Leiby, 1981, 1982, 1984; Richardson and Cowen, 2004), 동아시아산 바다뱀과 어류의 엽상자어(Tabeta and Mochioka, 1988; Miller et al., 2002; Miller and Tsukamoto, 2006) 등에 관한 상세한 형태보고가 있었다. 그럼에도 불구하고 바다뱀과 어류는 형태적으로 매우 유사하며, 중요한 분류형질인 근절수, 소낭수 등이 중복되는 경우 정확한 종 동정을 위해서는 분자마커를 이용한 분석이 반드시 병행되어야 한다. 국내에서는 제주도산 바다뱀과 어류의 엽상자어 7개 type의 출현보고(Kim et al., 2004) 이후, 상주물뱀(*Pisodonophis sangjuensis*), 날봉장어(*Echelus uropterus*), 동해물뱀(*Scolecenchelys borealis*), 갯물뱀속(*Muraenichthys* sp.) 엽상자어의 분자동정 및 형태보고가 있었다(Ji and Kim, 2010; Ji et al., 2011; Ji et al., 2012). Ji et al. (2011)은 날봉장어의 분류학적 확실성을 바다뱀과 어류의 엽상자어의 개체발생학적 형태변이 비교를 통해 그 해결책을 제시하고자 하였다. 바다뱀과 어류는 여전히 복합 분류

Article history;

Received 25 April 2012; Revised 12 September 2012; Accepted 17 October 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5927 Fax: +82. 51. 629. 5931

E-mail address: taengko@hanmail.net

Kor J Fish Aquat Sci 45(5) 507-512, October 2012

http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0507

pISSN:0374-8111

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

군의 가능성을 가지고 있고(Wang et al., 2002), 비교적 최근 까지도 바다뱀과 어류 내 분류체계가 계속 바뀌고 있다(Castle and McCosker, 1999). 바다뱀과 어류의 분류학적 문제를 해결하고 그들의 진화 역사를 이해하기 위해서는 초기생활기에 관한 보다 많은 정보가 축적되어야 할 것이다. 따라서, 본 연구에서는 제주도 남부연안에서 채집된 바다뱀과 엽상자어 1개체를 대상으로 분자방법에 따라 정확한 종 동정을 실시하고 형태특징을 상세히 보고하며 나아가 유사종과의 식별형질을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

2011년 8월 제주 주변해역(32°46'13"N, 126°48'38"E)에서 바다뱀과에 속하는 엽상자어 1개체(전장 59.9 mm)를 플랑크톤 net로 채집하였다. 엽상자어는 채집 후 70% 에탄올에 고정하였으며, 이후 부경대학교(Pukyong National University, PKNU) 어류학실험실 표본실(Ichthyology laboratory collection)에 등록(PKU6603), 보관하였다. 몸의 각 부위의 계측 및 계측은 Tabeta and Mochioka (1988)의 방법을 따라 입체현미경(Olympus SZX-16, Japan) 하에서 관찰하였고, vernier caliper로 0.1 mm 단위까지 측정하였다.

Genomic DNA는 Chelex resion 100 용액(Bio-rad)을 이용하여 엽상자어의 우측 눈알을 떼어내 추출하였다. 미토콘드리아 DNA 12S rRNA 영역을 종특이적인 12S-F(5'-CAAAGGCCTGGTCCTGACTTTAA-3')와

12S-R(5'-CCTTCCGGTACACTTACCATGTTA-3') Primer를 제작하여 증폭시켰다. 10X PCR buffer 5 µL, 2.5 mM dNTP 4 µL, 12SR primer 5 µL, 12SL primer 5 µL, FX Taq DNA polymerase (GnP, Korea) 0.5 µL를 섞은 혼합물에 genomic DNA 5 µL (100ng)를 첨가한 후, 총 50 µL가 될 때까지 3차 증류수를 넣고 Thermal cycler (Bio-rad MJ mini PTC-1148, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Initial denaturation 94°C에서 5분; PCR reaction 35 cycles (denaturation 94°C에서 30초, annealing 56.5°C에서 30초, extension 72°C에서 1분); final extension 72°C에서 7분. 정제는 ExoSAP-IT (United States Biochemical Corporation, USA)을 이용하였다.

미토콘드리아 DNA 12S rRNA 염기서열은 BioEdit version 7의 ClustalW (Thompson et al., 1994)를 이용하여 정렬하였다. 비교 그룹으로 실험실에서 보유하고 있는 바다뱀과 어류 4종(갯물뱀, *Muraenichthys gymnopterus*; 갯물뱀속 *Muraenichthys* sp.; 상주물뱀 *Pisodonophis sangjuensis*, 제주 바다뱀 *Ophichthus asakusae*)와 NCBI (National Center for Biotechnology, Information)에 등록된 바다뱀과 어류 5종의 염기서열을 이용하였다. 추가적으로 뱀장어목 곶치과(*Muraenidae*)의 곶치(*Gymnothorax kidako*)를 외집단으로 설정하였다. 본 연구의 제주산 엽상자어의 염기서열은 NCBI에

등록(JQ924521)하였다. 유전거리는 Mega4 (Tamura et al., 2007)에서 Kimura-2-parameter 모델(Kimura, 1980)로 계산하였으며, 계통수는 MEGA4의 근린결합법(Neighbor joining method)을 이용하여 작성하였고, bootstrap은 10,000번 수행하였다.

결과 및 고찰

형태동정

제주도 남부연안에서 채집된 엽상자어(이후 제주도산 엽상자어)의 계수 및 계측자료는 Table 1과 같다. 몸은 투명하고 측편되어 있다(Fig. 1). 머리는 작고 주둥이 선단부에 날카로운 이빨이 작게 나 있다(Fig. 2A). 눈은 약간 타원형이며 앞쪽에 2개의 비공이 나 있다(Fig. 2A). 아래턱이 위턱보다 머리의 선단에 약간 돌출되어 있다(Fig. 2A). 소화관에는 6개의 소낭이 나 있다(Fig. 1). 몸의 전방에 1, 2번째 간조직(liver tissue)이 있고, 2번째 간조직에서 담낭(gall bladder)이 관찰되며, 그 뒤로 장이 항문 앞까지 길게 신장되어 있다(Figs. 2B, C). 항문전장(preal length)은 전장(total length)의 41.3%로 항문은 몸의 중앙보다 약간 앞쪽에 위치한다(Fig. 1; Table 1). 등지느러미 기점(predorsal length)은 전장의 40.3%로 항문과 거의 같거나 약간 앞쪽에 위치한다(Fig. 2C; Table 1). 체고(body depth)는 항문 지점에서 가장 높으며 전장의 9.7%에 달하고, 항문 뒤로는 완만하게 감소된다(Fig. 1; Table 1). 가슴지느러미와 꼬리지느러미는 잘 발달되어 있다(Figs. 2A, D). 새개부에 2개의 나뭇가지 모양의 흑색소포가 뚜렷하게 관찰된다(Fig. 2A). 간조직 및 소낭 등쪽에는 띠모양으로 흑색소포가 길게 나타나며, 소화관의 중앙에도 다수 관찰된다(Figs. 2B, C). 뒷지느러미기부에 흑색소포가 일직선상으로 꼬리지느러미 앞까지 나 있다(Fig. 2D). 항문 뒤부터 체측 중앙을 따라 6개의 희미한 세로띠가 나 있다(Figs. 1; 2D).

제주도산 엽상자어는 항문뒤부터 체측 중앙을 따라 열은 세로띠를 가지고, 발달된 꼬리지느러미를 가지는 특징에 의거 갯물뱀아과 어류의 일종으로 사료된다(Tabeta and Mochioka, 1988; Ji et al., 2012). 국내에는 갯물뱀아과 어류에 갯물뱀(*M. gymnopterus*)과 동해물뱀(*S. borealis*) 2종만이 알려져 있고(Kim et al., 2008; Ji and Kim, 2011a; Ji et al., 2012), 일본에는 9종[갯물뱀(*M. gymnopterus*), *Muraenichthys schultzei*, *Myrophis microchir*, 동해물뱀(*S. borealis*), *Scolecenchelys japonicus*, *Scolecenchelys macropterus*, *Scolecenchelys aoki*, *Scolecenchelys gymnota*, *Neeenchelys daedalus*]이 알려져 있다(Hatooka, 2002). 제주도산 엽상자어의 근절수(157개)를 일본산 갯물뱀아과 어류의 척추골수와 비교하면 2종[갯물뱀(*M. gymnopterus*)는 155-156개, *Myrophis microchir*는 153-164개]만 잘 일치한다. 한편, 제주도산 엽상자어는 일본에서 보고된 갯물뱀아과 2개 type (*Myrophinae* sp. 1, 2)

Table 1. Comparisons of measurements and counts for our leptocephalus M1 and *Muraenichthys* sp., *Myrophinae* sp. 1 and *Myrophinae* sp. 2

	Leptocephalus M1 (Present study)	<i>Muraenichthys</i> sp. (Ji et al., 2012)	<i>Myrophinae</i> sp. 1 (Tabeta and Mochioka, 1988)	<i>Myrophinae</i> sp. 2 (Tabeta and Mochioka, 1988)
Total length (mm, TL)	59.9	52.4	42.0-65.0	37.0-58.0
In % of total length				
Head length	5.3	5.7	-	-
Predorsal length	40.3	32.9	-	-
Preanal length	41.3	41.7	-	-
Body depth	9.7	12.4	-	-
In % of Head length				
Eye diameters	15.6	19.4	-	-
Snout length	43.9	48.5	-	-
Upper jaw length	37.6	-	-	-
Counts				
Total myomeres	157	151	137-146	125-131
Predorsal myomeres	57	37	38-43	58-67
Preanal myomeres	60	51	46-48	57-62
1st vertical blood vessel	10	21	-	-
Last vertical blood vessel	58	48	48-51	58-63
1st gut swelling	11	-	-	-
Last gut swelling	55	-	-	-
Postanal pigment	6	5	-	-
Number of nostril	2	2	2	2
Number of gut swelling	6	4	4	7

Fig. 1. *Leptocephalus* M1, Jeju Island of Korea. TL=59.9 mm. Scale bar= 3.0 mm. 1-6 indicate gut swelling. Circles indicate post anal pigments.

과 전체 근절수(제주도산 엽상자어는 157개 vs. *Myrophinae* sp. 1은 137-146개 vs. *Myrophinae* sp. 2는 125-131개)에서 잘 구분된다(Tabeta and Mochioka, 1988; Table 1). 또한, 제주도산 엽상자어는 갯물뱀아과 어류 중 *Myrophis* 속 및 *Neenchelys*속의 일부종의 엽상자어와 등지느러미 위치(제주도산 엽상자어는 항문보다 약간 앞쪽 vs. *Myrophis* 속 및 *Neenchelys* 속은 머리와 항문 사이의 중앙)에서 잘 구분되며 (Leiby, 1979b; Castle, 1984; Miller and Tsukamoto, 2006),

동해물뱀속(*Scolecenchelys*) 엽상자어와는 항문전 소낭수(제주도산 엽상자어는 6개, 동해물뱀속은 10개)에서 차이를 보였다(Ji et al., 2012). 지금까지 보고된 엽상자어 중 가장 근연종은 Ji et al. (2012)이 보고한 갯물뱀속(*Muraenichthys* sp.) 엽상자어로 새개부에 흑색소포가 뚜렷하고, 적은 수의 소낭(6개 이하), 항문뒤 체측중앙에 세로띠가 열개 분포하는 점에서 유사하지만 전체 근절수(제주도산 엽상자어는 157개 vs. *Muraenichthys* sp.는 151개), 항문전 소낭수(제주도산 엽상자어는 6

Fig. 2. *Leptocephalus* M1, Jeju Island of Korea. TL=59.9 mm. magnification of head (A), anterior gut regions (B), anal (C) and caudal region (D). Scale bar= 2.0 mm. NO, nostril; LV, liver tissue; GB, gall bladder; INT, intestine; DO, dorsal fin origin; VBV, vertical blood vessel; PAP, post anal pigment; ABP, anal fin base pigment.

개 vs. *Muraenichthys* sp. 는 4개)에서 잘 구분된다. 따라서 제주도산 엽상자어는 157개의 근절을 가져 국내 보고된 갯물뱀의 척추골수(155-156개)(Ji and Kim, 2011a)와 매우 유사하지만 일본에 서식하는 *Myrophis microchir*와 척추골수에서 중복되어 정확한 종동정은 어려웠다.

분자동정

제주도산 엽상자어의 12S rRNA 886 base pair 염기서열을 바다뱀과(*Ophichthidae*) 어류 성어의 DNA 염기서열과 분석한 결과, 우리나라 흑산도 주변에서 채집한 갯물뱀(*M. gymnopterus*) 성어와 99.9% 일치하였다. 한편, 제주도산 엽상자어는 울산 주변에서 채집한 *Muraenichthys* sp.와는 96.6% 일치하였으며, 독도에서 채집한 동해물뱀(*S. borealis*)과는 90.9% 일치하였다(Table 2). 분석에 이용된 바다뱀과 어류 중 동해물뱀이 동일속의 *Scolecenchelys breviceps*와 유전적

일치도가 99.0%로 매우 가까운 관계에 있는 것을 알 수 있었다. 이와 유사하게, 12S rRNA에 의한 분자분석에서 날봉장어(*E. uropterus*)도 동일속의 *Echelus myrus*와 유전적 일치도가 98.7%로 보고된 바 있다(Ji et al., 2012). 비록 12S rRNA 영역이 보존적 영역이지만 상기에서처럼 바다뱀과 어류의 종간 유전적 차이가 적어도 1% 이상인 점에서 종 동정의 유용한 분자마커로 사료된다. 근린결합수(NJ-tree)는 제주도산 엽상자어가 갯물뱀 성어와 거의 일직선상에 유집되어 갯물뱀의 엽상자어임을 보여준다. 나아가, 근린결합수는 갯물뱀아과(*Myrophinae*) 및 바다뱀아과(*Ophichthinae*)의 각 아과의 단계통성을 명확히 지지하지만, 까치물뱀(*Ophichthus evermanni*)의 경우 분류학적 위치가 돛물뱀속(*Pisodonophis*) 2종 사이에 위치하여 불확실한 실정이다(Fig. 3). 향후 까치물뱀에 대한 상세한 분류학적 재검토가 요망된다.

Table 2. Genetic distance among our leptocephalus M1 (1) and 9 ophichthids (2-10) with one outgroup (11)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
Leptocephalus M1 (1)											
<i>Muraenichthys gymnopterus</i> (2)	0.001										
<i>Muraenichthys</i> sp. (3)	0.034	0.035									
<i>Scolecenchelys borealis</i> (4)	0.091	0.091	0.078								
<i>Scolecenchelys breviceps</i> (5)	0.092	0.092	0.077	0.010							
<i>Ophichthus asakusae</i> (6)	0.205	0.205	0.202	0.171	0.173						
<i>Ophichthus evermanni</i> (7)	0.203	0.203	0.193	0.171	0.170	0.075					
<i>Pisodonophis cancrivorus</i> (8)	0.212	0.212	0.212	0.170	0.171	0.079	0.057				
<i>Pisodonophis sangjuensis</i> (9)	0.213	0.213	0.211	0.176	0.171	0.077	0.050	0.068			
<i>Ophisurus macrorhynchus</i> (10)	0.208	0.208	0.208	0.168	0.170	0.055	0.084	0.070	0.083		
<i>Gymnothorax kidako</i> (11)	0.222	0.222	0.220	0.209	0.207	0.193	0.219	0.204	0.230	0.193

Fig. 3. Neighbor-Joining tree based on partial mt 12S rRNA nucleotide sequences showing the relationships among our leptocephalus M1 and 9 ophichthid species with one outgroup (*Gymnothorax kidako*). The Neighbor-Joining tree using the Kimura-2-parameter distance model. 10,000 replications of bootstrap. Bar indicates genetic distance of 0.02.

참고문헌

- Castle PHJ. 1984. Notacanthiformes and Anguilliformes: Development. In: Ontogeny and systematics of fishes. Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW and Richardson SL, eds. Allen Press INC., Lawrence, U.S.A., 62-69.
- Castle PHJ and McCosker JE. 1999. A new genus and two new species of Myrophine worm-eels, with comments on *Muraenichthys* and *Scolecenchelys* (Anguilliformes: Ophichthidae). Rec Aust Mus 51, 113-122.
- Eschmeyer WN. ed. 2011. Catalog of fishes electronic version. available from: <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- Hatooka K. 2002. Ophichthidae. In: Fishes of Japan with pictorial keys to the species. Nakabo T, ed. Tokai University Press, Tokyo, Japan, 215-225.
- Ji HS and Kim JK. 2010. Molecular and morphological identification of ophichthid leptocephali from the south sea of Korea. Korean J Ichthyol 22, 279-284. (in Korean)
- Ji HS and Kim JK. 2011a. Taxonomic review of the snake-eels family Ophichthidae (Anguilliformes) from Korea. Korean J Ichthyol 23, 46-60.
- Ji HS and Kim JK. 2011b. A new species of snake eel, *Pisodonophis sangjuensis* (Anguilliformes: Ophichthidae) from Korea. Zootaxa 2758, 57-68.
- Ji HS, Lee SJ and Kim JK. 2011. Molecular identification, ontogeny and evolutionary note of *Echelus uropterus* leptocephali. Korean J Ichthyol 23, 217-224.
- Ji HS, Lee HW, Hong BK and Kim JK. 2012. Four newly re-

- ported ophichthid leptocephali species revealed by mitochondrial 12S rDNA, with implications of their occurrence in Korea. *Anim Cells Syst* 16, 415-424.
- Kim BG, Jeong CH and Han KN. 2008. New record of a worm eel *Muraenichthys gymnopterus* (Anguilliformes: Ophichthidae) from Korea. *Korean J Ichthyol* 20, 318-323.
- Kim BJ, Go YB and Lee SJ. 2004. Morphology of Ophichthidae leptocephalus in coast of Jeju Island. In: *Proc of Biannual Meeting of the Aquaculture Society of Korea*, 1, 453-454.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Leiby MM. 1979a. leptocephalus larvae of the eel family Ophichthidae. I. *Ophichthus gomesi* Castelnau. *Bull Mar Sci* 29, 329-343.
- Leiby MM. 1979b. Morphological development of the eel *Myrophis punctatus* (Ophichthidae) from hatching to metamorphosis, with emphasis on the developing head skeleton. *Bull Mar Sci* 29, 509-521.
- Leiby MM. 1981. Larval morphology of the eels *Bascanichthys bascanium*, *B. scuticaris*, *Ophichthus melanophorus* and *O. ophis* (Ophichthidae), with a discussion of larval identification methods. *Bull Mar Sci* 31, 46-71.
- Leiby MM. 1982. Leptocephalus larvae of the tribe Sphagerbranchini (pisces, Ophichthidae) in the western North Atlantic. *Bull Mar Sci* 32, 220-236.
- Leiby MM. 1984. Leptocephalus larvae of the tribe Callechelyini (Anguilliformes, Ophichthidae, Ophichthinae) in the western North Atlantic. *Bull Mar Sci* 34, 398-432.
- McCosker JE. 2010. Deepwater Indo-Pacific species of the snake-eel genus *Ophichthus* (Anguilliformes: Ophichthidae), with the description of nine new species. *Zootaxa* 2505, 1-139.
- Michael P and Obenchain CL. 1978. Leptocephali of the ophichthid genera *Ahlia*, *Myrophis*, *Ophichthus*, *Pisodonophis*, *Callechelys*, *Letharchus*, and *Apterichtus* on the atlantic continental shelf of the United states. *Bul Mar Sci* 28, 442-486.
- Miller MJ, Otake T, Minagawa G and Inagaki T. 2002. Distribution of leptocephali in the Kuroshio current and east China Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 235, 279-288.
- Miller MJ and Tsukamoto K. 2006. Studies on eels and leptocephali in Southeast Asia: a new research frontier. *Coastal Mar Sci* 30, 283-292.
- Richardson DE and Cowen RK. 2004. New leptocephalus types collected around the island of Barbados (West Indies). *Copeia* 2004, 888-895.
- Tabeta O and Mochioka N. 1988. Family Ophichthidae. In: *An Atlas of the early stage fishes in Japan*. Okiyama M, ed. Tokai University Press, Tokyo, Japan, 58-62.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22, 4673-4680.
- Wang CH, Kuo CH, Mok HK and Lee SC. 2002. Molecular phylogeny of elopomorph fishes inferred from mitochondrial 12S ribosomal RNA sequences. *Zoologica scripta* 32, 231-241.