

mtDNA COI 기반 상업적 갈치류(*Trichiurus* spp.) 및 지역 계통의 신속 판별을 위한 SNP 기반 다중 PCR 분석법 개발

동춘매 · 이미난 · 박희정 · 노은수 · 김은미¹ · 황인준 · 강정하 · 정효선*

국립수산과학원 생명공학과, ¹국립수산과학원 연구기획과

Development of an SNP-based Multiplex PCR Assay for Rapid Discrimination of Commercial Hairtail (*Trichiurus* spp.) and Their Geographic Lineages

Chun Mae Dong, Mi-Nan Lee, Hee Jeong Park, Eun Soo Noh, Eun-Mi Kim¹, In Joon Hwang, Jung-Ha Kang and Hyo Sun Jung*

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

¹Research Planning Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

Hairtail fishes (*Trichiurus* spp.) constitute economically important marine resources that are widely consumed in Asian countries; however, species-level identification is often difficult because of their highly similar morphology and frequent processing. This limitation increases the risk of species substitution and seafood mislabeling. In this study, we developed an single nucleotide polymorphism (SNP)-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for the rapid discrimination of commercially important *Trichiurus* groups and their geographic lineages based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequences. Sequence analysis showed that samples from Korea, China, and Japan corresponded to *Trichiurus japonicus*, whereas those from Venezuela and Dubai corresponded to *Trichiurus lepturus*. Samples from Oman and Pakistan and those from Senegal showed high similarity to Indian Ocean and West African *Trichiurus* sp. lineages, respectively, indicating that these groups could not be confidently assigned to a single described species based on COI data alone. Phylogenetic and haplotype analyses further revealed clear genetic differentiation among groups and regional variation within species. Overall, we developed a lineage-associated SNP-based multiplex PCR assay capable of generating distinct amplicons for each group in a single reaction. This method provides a rapid and cost-effective tool for species authentication and traceability of commercial hairtail products.

Keywords: *Trichiurus*, Multiplex PCR, SNP, Species identification, Traceability

서론

갈치류는 갈치과(Trichiuridae)에 속하는 해양성 어종으로, 전 세계 열대 및 아열대 해역에 널리 분포한다(Nakamura and Parin, 1993). 주로 대륙붕 및 대륙사면의 수심 약 50–1,500 m 범위에서 서식하며, 일부 종은 야간에 수직 이동(diel vertical migration)을 통해 표층으로 이동하여 먹이 활동을 수행하는 것으로 알려져 있다(Nakamura and Parin, 1993; Martins and

Haimovici, 1997). 갈치류는 어류, 갑각류 및 두족류를 포식하는 육식성 어종으로, 연안 생태계에서 중상위 포식자로서 중요한 생태적 역할을 수행하며, 빠른 성장과 비교적 짧은 수명을 특징으로 한다(Shin et al., 2022). 특히 동중국해, 남중국해 및 일본 주변 해역은 주요 분포 및 어획 해역으로, 연근해 어업에서 중요한 수산자원을 형성한다.

이러한 생태적·어업적 중요성에도 불구하고, 갈치류는 체형과 외형적 형질이 종 간에 매우 유사하여 형태학적 형질에 기

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2452 Fax: +82. 51. 720. 2456

E-mail address: jhs3010@korea.kr



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2026.0402>

Korean J Fish Aquat Sci 59(4), 402-410, August 2026

Received 7 May 2026; Revised 1 July 2026; Accepted 15 July 2026

저자 직위: 동춘매(연구원), 이미난(연구원), 박희정(연구원), 노은수(연구사), 김은미(연구관), 황인준(연구관), 강정하(연구관, 생명공학과 과장), 정효선(연구사)

반한 종 구분이 어렵다. 특히 가공 또는 절단된 형태로 유통되는 경우 형태학적 동정이 사실상 불가능하며, 이로 인해 종 혼용 및 수산물 오표시(seafood mislabeling) 문제가 지속적으로 보고되고 있다(Cawthorn et al., 2012; Galimberti et al., 2013; Filonzi et al., 2023). 또한 과거에는 *Trichiurus* 속의 일부 계통은 종 수준까지 명확히 분류되지 않아 *Trichiurus* sp.로 보고되거나, 서로 다른 종들이 *Trichiurus lepturus*로 통합되어 취급되는 등 분류학적 혼란이 지속되어 왔으며, 최근 분자계통학 연구를 통해 이들에 대한 재분류가 이루어지고 있다(Lee and Kim, 2014; Yi et al., 2022). 이러한 문제는 수산물 유통의 신뢰성을 저하시킬 뿐만 아니라, 정확한 종 식별과 자원 관리에도 부정적인 영향을 미칠 수 있다.

더 나아가, 갈치류는 동일 종 내에서도 지리적 분포에 따라 유전적 변이가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 계통 간 차이는 자원 관리 및 원산지 판별에 중요한 정보를 제공할 수 있다(Xiao et al., 2014; Hsu et al., 2022). 그러나 기존 연구들은 대부분 종 수준의 식별 및 수산물 진위 판별에 초점을 두고 있으며(Ward et al., 2005), 동일 종 내 지역 집단을 구별할 수 있는 실용적인 분자 마커의 개발은 상대적으로 제한적으로 이루어져 왔다. 특히 국내 연안에서는 *Trichiurus japonicus*가 주요 서식종으로 보고되고 있으나, 인접 해역에서는 동일 속 내 다양한 종이 보고되고 있어 국내 해역에서도 추가적인 *Trichiurus* 종의 분포 가능성을 배제하기 어렵다(Lee and Kim, 2014; Yi et al., 2022). 따라서 국내 유통 및 서식 갈치류의 종 구성과 유전적 특성에 대한 체계적인 분석이 요구된다.

미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 영역은 종간 변이를 효과적으로 반영할 수 있어 다양한 해양 생물의 종 동정에 널리 활용되어 왔다(Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005). 그러나 이러한 염기서열 기반 방법은 분석 과정에 시간과 비용이 소요되며, 다수 시료를 대상으로 한 신속한 판별에는 한계가 있다. 이에 따라 특정 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)를 기반으로 한 간편

하고 신속한 분자 마커 개발이 요구되며, 특히 다중 multiplex polymerase chain reaction (PCR) 기법은 하나의 반응에서 여러 표적을 동시에 분석할 수 있어 분석 효율성을 크게 향상시킬 수 있는 방법으로 주목받고 있다(Markoulatos et al., 2002). 이러한 접근법은 수산물 종 식별 및 위·변조 판별 연구에서도 효과적으로 활용된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 mtDNA COI 영역의 염기서열 변이를 기반으로 국내외에 서식하거나 유통 및 수입되는 갈치과 어류 2종(*T. japonicus* 및 *T. lepturus*)과 *Trichiurus* sp.을 대상으로 종 특이적 SNP를 발굴하고, 이를 이용하여 종 수준뿐만 아니라 동일 종 내 지역 계통까지 구별 가능한 다중 PCR 기반 분자 마커를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 확보 및 Genomic DNA 추출

본 연구에서는 국내외에 서식하거나 유통·수입되는 갈치과 어류 2종(*T. japonicus* 및 *T. lepturus*)과 미동정 계통(*Trichiurus* sp.)을 대상으로 분석을 수행하였다. 근육 조직 시료는 대한민국 부산에 위치한 국립수산물과학원 해양생물자원은행(Marine Biological Resource Bank)에서 확보하였으며, 한국, 중국, 일본, 베네수엘라, 두바이, 세네갈, 오만 및 파키스탄을 포함한 8개 국가 및 지역에서 수집되었다. 상세한 시료 정보는 Table 1에 제시하였다.

Genomic DNA는 DNeasy® 96 Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 분리·정제하였다. 제조사의 프로토콜을 기반으로 수행하였으며, 일부 조건은 표준 실험실 방법에 따라 최소한으로 조정하였다. 각 시료 20 mg을 E-tube에 담고, ATL buffer (200 µL)와 Proteinase K (20 µL)를 첨가한 후, 56°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 이후 AL buffer (150 µL)와 99% ethanol (150 µL)을 첨가하여 혼합

Table 1. Sampling information of *Trichiurus* spp. used in this study, including collection locations, dates, sample sizes, and specimen accession numbers

Genus	Scientific name	Sample location	Collection date	Sample size (per region)	Total (combined)	Specimen accession number
<i>Trichiurus</i>	<i>T. japonicus</i>	Korea	April 2020	32	125	NIFS-FS-21002054-21002085
		China	March 2020	20		NIFS-FS-21002034-21002053
		Japan	March 2020.	15		NIFS-FS-21002019-21002033
			March 2020	58		NIFS-FS-21001937-21001994
<i>Trichiurus</i>	<i>T. lepturus</i>	Venezuela	March 2020	18	18	NIFS-FS-21002104-21002121
		Dubai	March 2020	18	18	NIFS-FS-21002086-21002103
		Senegal	March 2020	6	6	NIFS-FS-21009238-21009243
<i>Trichiurus</i> sp.		Oman	March 2020	19	38	NIFS-FS-21009201-21009219
		Pakistan	March 2020	19		NIFS-FS-21009220-21009237

한 후, S-Block이 장착된 DNeasy 96 plate로 옮겨 $6,000 \times g$ 에서 10초간 원심분리하였다. 그 후, column plates를 교체하고 AW1 buffer (400 μ L)를 첨가한 뒤, 동일한 조건에서 30초간 원심분리하였다. 다시 column plates를 교체한 후, AW2 buffer (400 μ L)를 첨가하여 $14,000 \times g$ 에서 7분간 원심분리하였다. Ethanol을 완전히 제거하기 위해 column을 실온에서 건조한 후, AE buffer (180 μ L)를 첨가하여 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA는 2.0% (w/v) agarose gel 전기영동으로 확인하였으며, E-Graph Gel Documentation System (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 이용하여 시각화하였다. 이후 NanoPhotometer N60 Touch (Implen GmbH, Munich, Germany)를 사용하여 DNA 농도를 측정하였다.

COI 유전자의 PCR 증폭 및 염기서열 분석

본 연구에서는 갈치류의 종 동정 및 SNP 탐색을 위해 mtDNA COI 유전자의 PCR 증폭과 염기서열 분석을 수행하였다. 미토콘드리아 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 유전자의 일부 구간은 표준 DNA 바코드 영역(-650 bp)을 확보하기 위해 범용 프라이머 VF2_t1과 FishR2_t1을 사용하여 증폭하였다 (Ivanova et al., 2007).

또한, 갈치류 COI 영역 증폭을 위한 프라이머 TL_COI-1F와 TL_COI-2R를 이용하여 확장된 COI 영역(-1,016 bp)을 증폭하였다. 해당 프라이머는 GenBank에서 확보한 갈치류 COI 염기서열을 다중 서열 정렬하여 도출된 보존 영역을 기반으로 설계하였다(Table 2). 프라이머의 melting temperature (T_m)는 OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA)를 이용하여 계산하였다.

PCR 반응은 총 10 μ L 부피로 수행하였다. $10 \times$ PCR buffer 1 μ L (최종 $MgCl_2$ 농도 2.0 mM), dNTP 혼합액(각 10 mM) 0.2 μ L, 각 프라이머(10 pmol/ μ L; 최종 농도 0.5 μ M) 0.5 μ L, hot-start Taq DNA polymerase (1 U) 0.15 μ L, 주형 DNA 1 μ L (40 ng), 그리고 멸균 증류수로 최종 부피를 맞추었다.

PCR 증폭은 Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 반응 조건은 초기 변성 95°C 에서 10분 후, 35회 반복으로 95°C 에서 55초 변성, 56°C (VF2_t1/

FishR2_t1) 또는 54°C (TL_COI-1F/TL_COI-2R)에서 55초 결합, 72°C 에서 55초 신장으로 설정하였으며, 최종 신장은 72°C 에서 5분간 수행하였다.

PCR 산물은 ethidium bromide로 염색한 1.8% (w/v) agarose gel에서 확인하였으며, E-Graph Gel Documentation System(ATTO Corporation)을 이용하여 시각화하였다. 단편 크기는 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 기준으로 추정하였다.

증폭 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH)를 이용하여 정제하였으며, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 분석은 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)에서 수행하였다.

염기서열 크로마토그램은 SeqMan™ Pro 17 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)과 BioEdit v7.2를 이용하여 편집 및 조립하였다. 종 동정은 NCBI BLASTn 결과와 계통분석, haplotype 분석 결과를 종합하여 수행하였으며, 서열 일치도 98% 이상 및 E-value $< 1 \times 10^{-50}$ 을 기준으로 1차 판정하였으며, 최종 동정은 BLASTn 결과, 계통분석 및 haplotype 분석 결과를 종합하여 수행하였다(Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005).

유전적 다양성 지표(haplotype 수; haplotype 다양도; 다형성 위치 수; 염기 다양도)는 DnaSP v5.10.01 (Librado and Rozas, 2009)을 이용하여 계산하였으며, median-joining haplotype network는 NETWORK v5.0 (Bandelt et al., 1999)을 이용하여 작성하였다. 계통수는 MEGA X 프로그램을 이용하여 Kimura 2-parameter 모델 기반의 neighbor-joining 방법으로 구축하였으며, bootstrap 분석은 1,000회 반복하여 수행하였다.

SNP 확인 및 프라이머 설계

확장된 COI 염기서열은 종 및 계통 간 변이를 분석하기 위해 GenBank에 등록된 참조 서열(한국 및 중국 및 일본, *T. japonicus* (AP012507.1); 베네수엘라 및 두바이, *T. lepturus* (JQ365607.1; KU945006.1); 오만 및 파키스탄, 인도양 *Trichiurus* sp. (LC269240.1); 세네갈, 서아프리카 *Trichiurus* sp. (KF965501.1))과 정렬하였다.

정렬된 서열을 기반으로 종 및 계통 특이적 단일염기다형성

Table 2. Primer sequences used for amplification of the mtDNA COI region of *Trichiurus* spp

Oligo name	Sequence (5'→3')	Product size (bp)	T_m ($^\circ\text{C}$)	Description
VF2_t1	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C	-650	56	Universal COI primer
FishR2_t1	CAG GAA ACA GCT ATG ACA CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A			
TL_COI-1F	AGCCCATGCCTTCGTAAT	-1,016	54	Primers for extended COI amplification
TL_COI-2R	ACGAAGGCTTCTCATAAGA			

COI, cytochrome c oxidase subunit I; T_m , melting temperature.

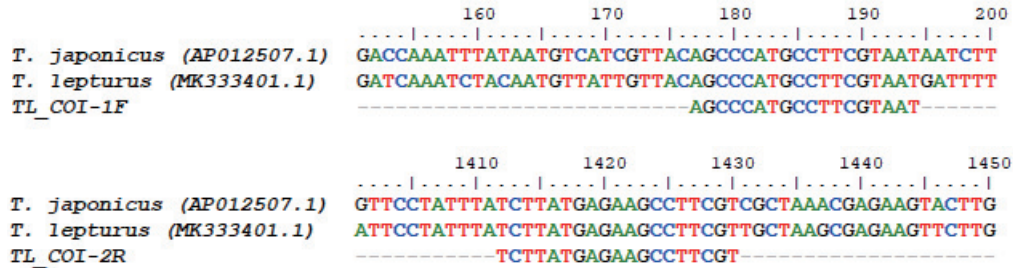


Fig. 1. Schematic representation of primer binding sites on the mtDNA COI region used for amplification and marker development. COI, cytochrome c oxidase subunit I.

후보 위치를 선별하였다. 종 및 계통 특이적 정방향 프라이머는 진단 염기가 3' 말단에 위치하도록 설계하였다. 이는 3' 말단의 염기 불일치는 증폭 특이성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Kwok et al., 1990; Morin et al., 2004).

프라이머 설계 시 GC 함량, melting temperature, 및 2차 구조 형성 여부를 고려하였으며, agarose gel 전기영동에서 명확한 구분이 가능하도록 증폭 산물의 크기를 조정하였다. 프라이머의 특이성은 단일 PCR (singleplex PCR)과 agarose gel 전기영동을 통해 평가하였다.

다중 PCR (multiplex PCR) 시스템 개발

갈치과 어류의 종 및 지역 계통 구별을 위해 종 및 계통 특이적 프라이머(TJ_368F, TL_518F, TN_632F, TS2_887F, TS_944F)와 공통 역방향 프라이머(TL_COI-2R)를 이용하여 다중PCR을 수행하였다. 각 프라이머는 각각 *T. japonicus*, *T. lepturus*, 그리고 *Trichiurus* sp.의 종 또는 지역 계통을 구별할 수 있도록 설계되었다.

PCR 반응은 총 10 µL 부피로 수행하였다. 10× PCR buffer 1 µL (최종 MgCl₂ 농도 2.0 mM), dNTP 혼합액(각 10 mM) 0.2 µL, 각 forward primer (10 pmol/µL; 최종 농도 0.1 µM) 0.1 µL, TL_COI-2R primer (10 pmol/µL) 0.3 µL, hot-start Taq DNA polymerase (0.5 U) 0.1 µL, 주형 DNA 1 µL (40 ng), 그리고 멸균 증류수로 최종 부피를 맞추었다.

PCR 증폭은 초기 변성 95°C에서 11분 후, 35회 반복으로 95°C에서 55초 변성, 54°C에서 55초 결합, 72°C에서 55초 신장으로 수행하였으며, 최종 신장은 72°C에서 5분간 수행하였다.

PCR 산물은 1.8% (w/v) agarose gel에서 전기영동 후 UV 하에서 확인하였으며, 단편 크기는 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen)를 기준으로 추정하였다. 혼합 주형(mixed-template) 시료는 각 집단의 DNA를 동일한 양으로 혼합하여 조제하였다.

결과 및 고찰

시료 확보 및 염기서열 분석

국내외에 서식하거나 유통 및 수입되는 갈치과 어류 2종(*T.*

japonicus 및 *T. lepturus*)과 *Trichiurus* sp.을 대상으로 한 시료를 수집하여 분석에 이용하였다(Table 1).

mtDNA COI 바코드 영역(VF2_t1/FishR2_t1, -650 bp)을 이용하여 염기서열을 확보하였으며, 추가적으로 TL_COI-1F/TL_COI-2R 프라이머를 이용하여 확장된 COI 영역(-1,016 bp)의 염기서열을 확보하였다(Fig. 1, Table 2).

확보된 염기서열을 NCBI BLASTn 데이터베이스와 비교한 결과, 한국, 중국 및 일본 시료는 *T. japonicus* (AP012507.1)와 99% 이상의 염기서열 유사도(E-value < 1 × 10⁻⁵⁰)를 나타냈다. 베네수엘라 및 두바이 시료 역시 *T. lepturus* (JQ365607.1; KU945006.1)와 99% 이상의 유사도를 보였으며, 두 집단 모두 동일 종으로 판정되었다. 그러나 COI 염기서열 정렬 결과, 베네수엘라 집단과 두바이 집단에서 서로 다른 지역 특이적 SNP가 확인되었으며, 이를 기반으로 본 연구의 다중PCR에서는 두 지역 계통을 구분할 수 있도록 마커를 설계하였다. 오만 및 파키스탄 시료는 인도양 *Trichiurus* sp. (LC269240.1), 세네갈 시료는 서아프리카 *Trichiurus* sp. (KF965501.1)과 각각 99% 이상의 유사도를 나타냈다. 그러나 해당 참조서열들은 명확한 종 수준으로 동정되지 않은 *Trichiurus* sp.로 등록되어 있으므로, 본 연구에서는 이들 시료를 각각 인도양계 *Trichiurus* sp. 및 서아프리카계 *Trichiurus* sp.로 구분하여 처리하였다.

이러한 결과는 COI 바코드 기반 분석이 갈치류의 종 구분에 유용함을 재확인시켜 주며, 확장된 COI 영역을 통해 일부 집단에서 종 수준으로 명확히 정의되지 않은 계통이 존재함을 시사한다. COI 기반 분석은 일부 근연종에서 충분한 분해능을 제공하지 못할 수 있으며, incomplete lineage sorting 또는 introgression의 영향이 있을 수 있다. 따라서 해당 집단에 대한 명확한 분류학적 검증을 위해서는 추가적인 형태학적 및 핵 유전체 기반 분석이 필요하다. 이러한 경향은 기존 연구에서도 동일 속 내에서 형태학적으로 구분이 어려운 계통이 보고된 바 있다(Cawthorn et al., 2012; Galimberti et al., 2013).

유전적 다양성 및 계통 분석

한국, 중국 및 일본 시료는 BLASTn 분석에서 모두 *T. japonicus* 참조서열(AP012507.1)과 99% 이상의 높은 유사도를 보였

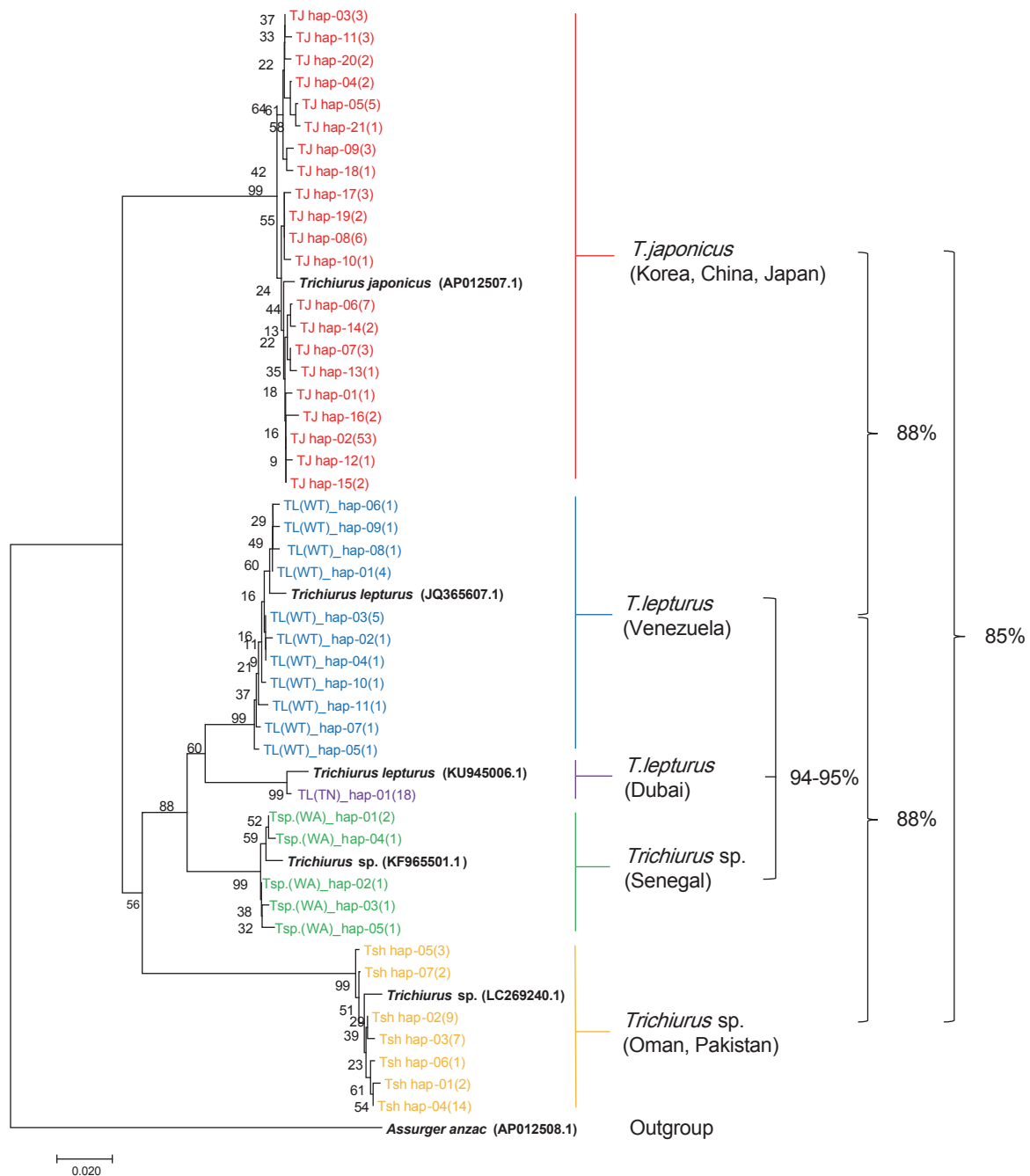


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on mtDNA COI sequences of *Trichiurus* samples analyzed in this study. The tree was constructed using the Kimura 2-parameter model, and bootstrap values are shown at the nodes. Bootstrap values were calculated based on 1,000 replicates.

으며, 계통분석에서도 동일한 *T. japonicus* clade에 포함되었다. 따라서 본 연구에서는 이들 시료를 *T. japonicus*로 판정하였다. 다만 국가별 haplotype 구성과 다양도에는 차이가 있어, 동일 종 내 지역 계통 간 유전 변이가 존재할 가능성이 확인되었다. mtDNA COI 영역을 기반으로 종내 및 종간 유전적 변이를 분

석한 결과, 쌍별 염기서열 유사도(pairwise sequence similarity)는 분석 구간 및 정렬 조건에 따라 변동을 보였으며, 전체적으로 85–95% 범위를 나타냈다. 특히 *T. lepturus* 집단과 *Trichiurus* sp. 간 유사도는 88–95% 범위로 나타났다. 계통분석 결과, 각 집단은 종 및 지역 계통에 따라 명확히 구분되는 경향을 보였으

Table 3. Genetic diversity indices of *Trichiurus* spp. based on mtDNA COI sequences

	Korea, China, Japan	Venezuela	Dubai	Senegal	Oman, Pakistan
Total number of individuals (N)	125	18	18	6	38
Number of polymorphic sites	42	11	0	6	7
Number of haplotypes (H)	41	11	1	5	7
Nucleotide diversity (π)	0.004	0.003	0.000	0.004	0.002
Haplotype diversity (Hd)	0.807	0.895	0.000	0.933	0.782

며, *T. japonicus*와 *T. lepturus*는 각각 독립적인 clade를 형성하였고, *Trichiurus* sp.는 인도양계(오만 및 파키스탄)와 서아프리카계(세네갈) 집단으로 구분되는 양상을 보였다(Fig. 2).

COI 영역을 기반으로 한 haplotype 분석 결과, *T. japonicus*에서는 총 41개의 haplotype이 확인되었으며, 그 중 Hap_2이 53 개체로 가장 높은 빈도를 보였고 한국, 중국 및 일본 집단에서 공통적으로 관찰되었다. 이러한 결과는 한국, 중국 및 일본 집단이 동일한 *T. japonicus* 계통에 속하면서도, 집단 내 haplotype 다양성을 보유하고 있음을 시사한다(Avise, 2000).

유전적 다양성을 나타내는 haplotype diversity (Hd)와 nucleotide diversity (π)는 한국에서 각각 0.915 및 0.005, 중국에서 0.763 및 0.004, 일본에서 0.754 및 0.004로 나타났으며, 한국 집단에서 상대적으로 높은 유전적 다양성을 보였다. 이는 한국 집단이 중국 및 일본 집단보다 상대적으로 다양한 haplotype을 포함하고 있음을 시사하며, 다만 보다 명확한 해석을 위해서는 추가적인 지역 및 개체군을 포함한 연구가 필요하다. Table 3은 통합된 집단을 기반으로 산출된 유전적 다양성 지수를 제시하며, 국가별 분석 결과는 본문에 별도로 기술하였다.

한편, *Trichiurus* sp.는 인도양계(오만 및 파키스탄)와 서아프리카계(세네갈) 집단으로 구분하여 분석하였으며, 전체적으로 12개의 haplotype이 확인되었다. *T. lepturus*의 경우 베네수엘라 집단에서 Hd와 π 는 각각 0.895 및 0.003으로 나타났으며, 두바이 집단은 단일 haplotype으로 구성되었다(Table 3). 이는 지역 간 유전적 구조 차이를 시사하며, 해양 어류에서 미토콘드리아 DNA를 기반으로 한 지역 집단 간 유전적 분화가 보고된 바 있다(Grant and Bowen, 1998; Avise, 2000; Ward et al., 2005).

Trichiurus sp.의 경우 세네갈 집단은 Hd 0.933 및 π 0.004로 나타났으나, 분석 개체수가 6개체로 제한적이므로 해당 값은 예비적 결과로 해석되어야 한다. 오만 및 파키스탄 집단은 Hd 0.782 및 π 0.002로 나타났으며, 이러한 결과는 *Trichiurus* sp. 내 지역 계통 간 COI 변이가 존재할 가능성을 시사한다(Table 3).

SNP 기반 다중 PCR 마커 개발

COI 염기서열 정렬 분석을 통해 갈치류의 종 및 지역 계통을 구별할 수 있는 다형성 염기 위치(polymorphic sites)를 확인하였다(Table 4, Fig. 3). 분석된 SNP는 총 5개 위치(368, 518, 632, 887, 944 bp)에서 확인되었으며, 각 위치는 종 또는 지역

계통에 따라 특이적인 염기 치환 패턴을 나타냈다. 특히, 518 bp 위치에서는 베네수엘라 집단의 *T. lepturus*에서만 A로 치환된 변이가 확인되었으며, 632 bp 위치에서는 본 연구에서 분석한 두바이 집단에서만 C가 확인되어 해당 집단을 구별할 수 있는 SNP 후보로 확인되었다. 또한 944 bp 위치에서는 본 연구에서 분석한 세네갈 집단의 *Trichiurus* sp.에서만 C가 확인되어 해당 집단을 구별할 수 있는 SNP 후보로 확인되었다.

확인된 SNP 정보를 기반으로 각 종 및 지역 계통을 구별할 수 있는 forward primer를 설계하고, 공통 reverse primer를 이용하여 다중 PCR 시스템을 구축하였다(Table 5). 분석에 사용된 시료를 대상으로 한 다중 PCR에서는 비특이적 증폭이 관찰되지 않았다. 각 primer set은 SNP 위치를 포함하도록 설계되었으며, 특히 3' 말단에 진단 염기를 배치하여 비표적 종에서의 비특이적 증폭 가능성을 최소화하도록 설계하였다(Kwok et al., 1990). 이를 통해 하나의 반응에서 여러 집단을 동시에 구별할 수 있도록 하였다.

또한 다중 PCR 기반 SNP 마커는 여러 표적을 동시에 증폭할 수 있어 분석 효율성을 크게 향상시키며, 염기서열 분석 없이도 종 판별이 가능하다는 점에서 기존 COI 바코딩 기반 방법의 한계를 보완할 수 있다(Hebert et al., 2003; Morin et al., 2004; Ward et al., 2005).

본 연구에서 개발된 primer set은 서로 다른 크기의 증폭 산물을 생성하도록 설계되어 전기영동을 통해 명확한 밴드 패턴으로 종 및 지역 계통을 구별할 수 있었다. 특히, 268–845 bp 범위

Table 4. Species- and geographic lineage-specific polymorphic sites identified in the mtDNA COI region of *Trichiurus* spp

Species (Origin)	Polymorphic sites (bp)				
	368	518	632	887	944
<i>T. japonicus</i> (Korea, China, Japan)	A	.	.	A	.
<i>T. lepturus</i> (Venezuela)	.	A	.	A	.
<i>T. lepturus</i> (Dubai)	.	.	C	A	.
<i>Trichiurus</i> sp. (Oman, Pakistan)	C	G	A	C	T
<i>Trichiurus</i> sp. (Senegal)	.	.	.	A	C

COI, cytochrome c oxidase subunit I. Dots (.) indicate nucleotides identical to the reference sequence (*T. japonicus*), while different letters represent nucleotide substitutions. Positions refer to nucleotide positions in the aligned mtDNA COI sequence.

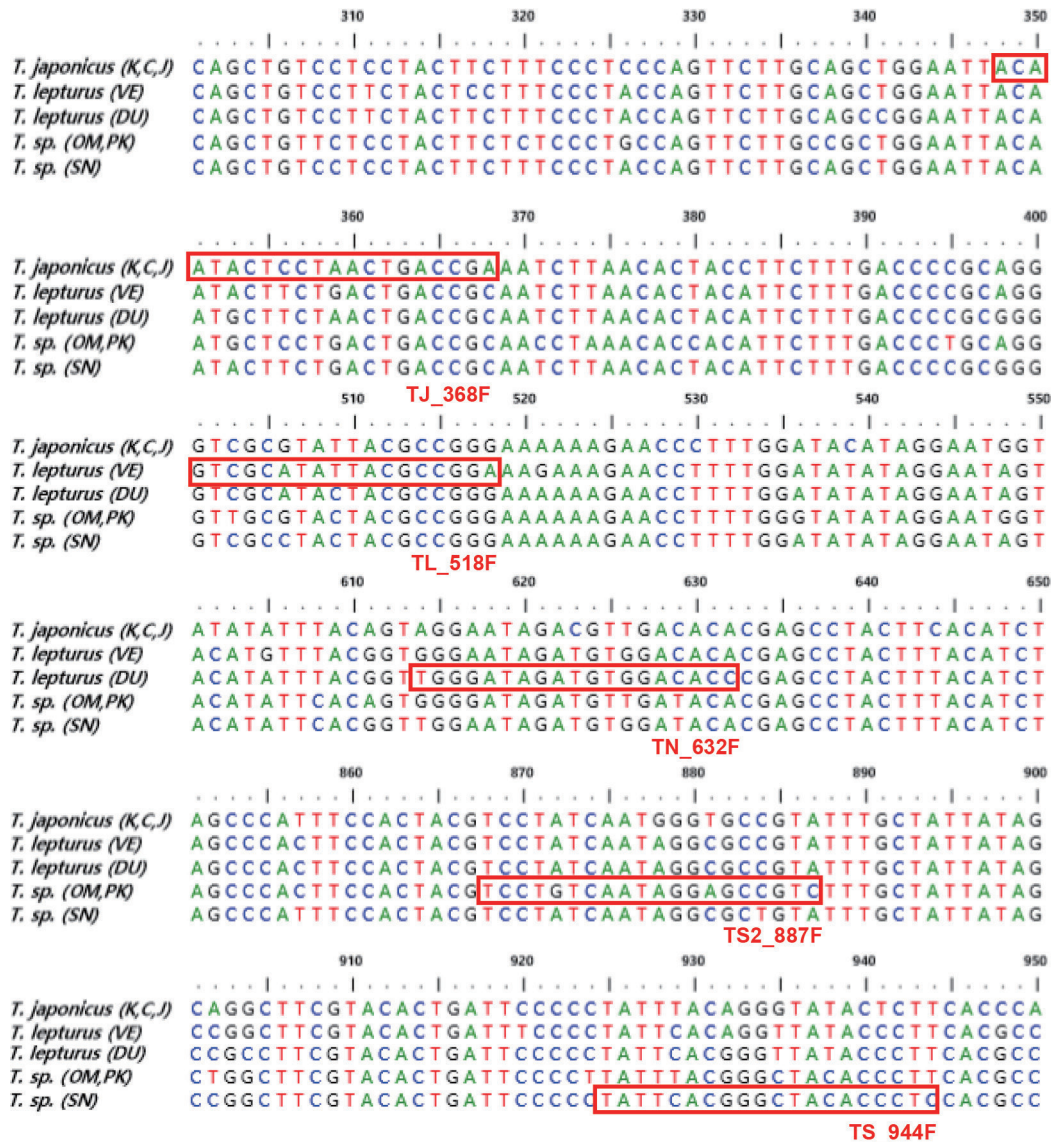


Fig. 3. Nucleotide alignment of mtDNA COI sequences from *Trichiurus* spp. showing species- and geographic lineage-specific SNP sites used for primer design. COI, cytochrome c oxidase subunit I; SNP, single nucleotide polymorphism. Polymorphic sites are indicated at specific nucleotide positions in the aligned sequences.

의 다양한 크기의 증폭 산물은 다중 PCR 조건에서 안정적인 분리를 가능하게 하였으며, 이는 실제 유통 시료의 신속한 판별에도 효과적으로 적용될 수 있음을 시사한다.

개발된 마커를 적용한 결과, 각 집단에 따라 서로 다른 크기의 증폭 산물이 확인되었다. *T. japonicus* (한국, 중국, 일본)는 845 bp, *T. lepturus* (베네수엘라)는 692 bp, *T. lepturus* (두바이)는 580 bp, *Trichiurus* sp. (오만 및 파키스탄)는 325 bp, *Trichiurus* sp. (세네갈)는 268 bp의 증폭 산물을 나타냈다. 이를 통해 각 집단을 명확히 구별할 수 있음을 보여준다(Fig. 4). 본 연구에서 분석에 사용된 대표 염기서열은 GenBank에 accession numbers

PZ269095–PZ269098 및 PZ269100으로 등록되었다.

이러한 결과는 본 연구에서 개발된 SNP 기반 다중 PCR 마커가 *T. japonicus*, *T. lepturus* 및 *Trichiurus* sp. 계통의 각 집단을 명확히 구별할 수 있음을 보여준다. 특히 *T. lepturus*와 *Trichiurus* sp.의 본 연구에서 분석한 일부 지역 집단 간 COI 기반 유전적 차이를 효과적으로 판별할 수 있음을 시사한다. 다만 본 연구에서 확인된 SNP 후보의 보편성을 검증하기 위해서는 다양한 지역 및 개체군을 포함한 추가적인 후속 연구가 필요하다.

본 연구에는 몇 가지 한계가 존재한다. 우선, 분석에 사용된 시료는 일부 국가에서 수집된 제한된 집단에 국한되어 있어, 다양

Table 5. Species- and lineage-specific primer sets developed for multiplex PCR-based discrimination of *Trichiurus* spp. and geographic lineage

Primer	Sequence (5'→3')	Target group	Country of origin	Product size (bp)	T _m (°C)
TJ_368F	ACAATACTCCTAACTGACCGA	<i>T. japonicus</i>	Korea, China, Japan	845	54
TL_518F	GTCGCATATTACGCCGGA	<i>T. lepturus</i>	Venezuela	692	
TN_632F	TTGGGATAGATGTGGACACC	<i>T. lepturus</i>	Dubai	580	
TS2_887F	TCCTGTCAATAGGAGCCGTC	<i>Trichiurus</i> sp.	Oman, Pakistan	325	
TS_944F	TATTCACGGGCTACACCCTC	<i>Trichiurus</i> sp.	Senegal	268	
TL_COI-2R	ACGAAGGCTTCTCATAAGA	Common reverse primer	All groups	—	

PCR, multiplex polymerase chain reaction; T_m, melting temperature.

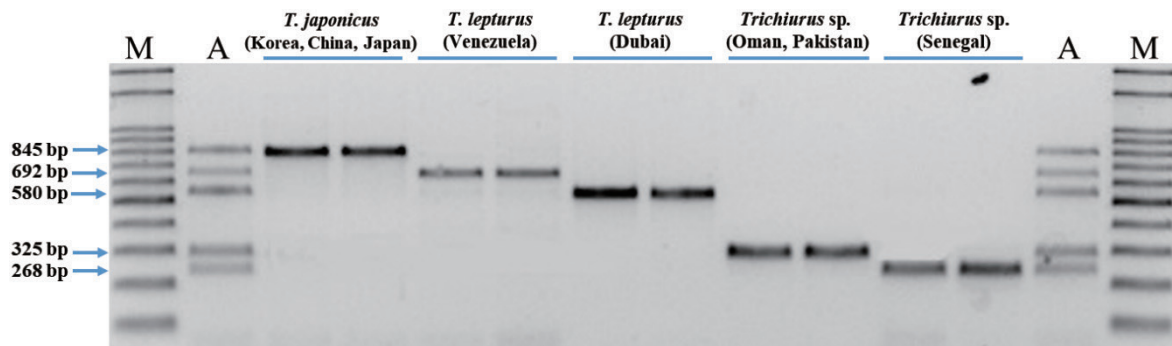


Fig. 4. Multiplex PCR amplification for species and geographic lineage discrimination of *Trichiurus* spp. using SNP-based primers. Lanes M, 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); lanes A, mixed-template samples containing equal amounts of DNA from all target groups; paired lanes 1–5, *T. japonicus* (845 bp), Venezuelan *T. lepturus* (692 bp), Dubai *T. lepturus* (580 bp), Omani and Pakistani *Trichiurus* sp. (325 bp), and Senegalese *Trichiurus* sp. (268 bp), respectively. PCR, polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism.

한 해역을 대표하는 지리적 변이를 충분히 반영하지 못할 수 있다. 따라서 본 연구에서 제시된 결과를 전 세계 *Trichiurus* 속 어류 전체에 일반화하기에는 한계가 있다. 또한, 본 연구에서 도출된 SNP 마커는 특정 집단을 기반으로 설계되었기 때문에, 다양한 개체군에서의 보편성 및 안정성에 대한 추가적인 검증이 필요하다. 일부 SNP는 집단 특이적 변이일 수 있으며, 보다 폭넓은 지역 및 개체군을 포함한 후속 연구가 요구된다. 본 연구에서는 비표적 종(non-target species)에 대한 교차 반응 검증이 수행되지 않았으므로, 다른 어종에서의 비특이적 증폭 가능성에 대해서는 추가적인 평가가 필요하다. 또한 본 연구에서 개발된 다중 PCR 기반 분석법은 종의 존재 여부를 신속하게 판별하는 데에는 효과적이거나, 혼합 시료 내 종 구성 비율을 정량적으로 분석하는 데에는 한계가 있다. 그럼에도 불구하고 종 특이적 다중 PCR 기반 분석법은 분석 시간과 비용을 절감하면서 다수의 시료를 신속하게 판별할 수 있어 수산물 중 식별, 유통 모니터링 및 식품 진위 판별 분야에서 효과적인 분석 기법으로 널리 활용되고 있다(Markoulatos et al., 2002). 또한 갈치류는 지역 집단 간 유전적 다양성과 집단구조가 보고되어 있으므로(Xiao et al., 2014; Hsu et al., 2022), 본 연구에서 개발된 SNP 기반 분자마

커는 향후 다양한 지역 집단과 비표적 종을 포함한 추가적인 검증이 이루어진다면 집단 식별과 수산자원 관리를 위한 유용한 분자마커로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2026년도 국립수산물학원 수산과학연구사업(R2026018, 수산 유전자원의 탐색 및 활용)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Avice JC. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, MA, U.S.A., 24-27.
- Bandelt HJ, Forster P and Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- Cawthorn DM, Steinman HA and Witthuhn RC. 2012. DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African mar-

- ket. Food Res Int 46, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.011>.
- Filonzi L, Ardenghi A, Rontani PM, Voccia A, Ferrari C, Papa R, Bellin N and Nonnis Marzano F. 2023. Molecular barcoding: A tool to guarantee correct seafood labelling and quality and preserve the conservation of endangered species. Foods 12, 2420. <https://doi.org/10.3390/foods12122420>.
- Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S and Labra M. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. Food Res Int 50, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>.
- Grant WS and Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. J Hered 89, 415-426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci 270, 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Hsu KC, Yi MR, Gu S, He XB, Luo ZS, Kang B, Lin HD and Yan YR. 2022. Composition, demographic history, and population structures of *Trichiurus*. Front Mar Sci 9, 875042. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.875042>.
- Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH and Hebert PDN. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. Mol Ecol Notes 7, 544-548. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x>.
- Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C and Sninsky JJ. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Res 18, 999-1005. <https://doi.org/10.1093/nar/18.4.999>.
- Lee SJ and Kim JK. 2014. Identification of *Trichiurus* (Pisces: Trichiuridae) eggs and larvae from Korea, with a taxonomic note. Fish Aquat Sci 17, 137-143. <https://doi.org/10.5657/FAS.2014.0137>.
- Librado P and Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25, 1451-1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- Markoulatos P, Siafakas N and Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. J Clin Lab Anal 16, 47-51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>.
- Martins AS and Haimovici M. 1997. Distribution, abundance and biological interactions of the cutlassfish *Trichiurus lepturus* in the southern Brazil subtropical convergence ecosystem. Fish Res 30, 217-227. [https://doi.org/10.1016/S0165-7836\(96\)00566-8](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(96)00566-8).
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK and the SNP workshop group. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. Trends Ecol Evol 19, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>.
- Nakamura I and Parin NV. 1993. FAO species catalogue. Vol. 15. Snake mackerels and cutlassfishes of the world (Families Gempylidae and Trichiuridae). An annotated and illustrated catalogue of the snake mackerels, snoeks, escolars, gemfishes, sackfishes, domine, oilfish, cutlassfishes, scabbardfishes, hairtails, and frostfishes known to date. FAO Fisheries Synopsis 125, 1-136.
- Shin D, Park TH, Lee CI, Jeong JM, Lee SJ, Kang S and Park HJ. 2022. Trophic ecology of largehead hairtail *Trichiurus japonicus* in the South Sea of Korea revealed by stable isotope and stomach content analyses. Front Mar Sci 9, 910436. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.910436>.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR and Hebert PDN. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360, 1847-1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>.
- Xiao Y, Ren G, Song N, Li J and Gao T. 2014. Genetic diversity and population structure of largehead hairtail, *Trichiurus japonicus*, based on mtDNA control region. Mitochondrial DNA 25, 473-481. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.809427>.
- Yi MR, Hsu KC, Gu S, He XB, Luo ZS, Lin HD and Yan YR. 2022. Complete mitogenomes of four *Trichiurus* species: A taxonomic review of the *T. lepturus* species complex. ZooKeys 1084, 1-26. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1084.71576>.