

국내 연안 서식 어류 위내용물의 DNA-metabarcoding 분석

Analysis of Stomach Contents of Domestic Coastal Fishes Using DNA-metabarcoding

박지원¹, 유태식², 김원석¹, 김용준¹, 지창우², 박인실^{1,2,*}

Jiwon Park¹, Tae-Sik Yu², Won-Seok Kim¹, Yong Jun Kim¹, Chang Woo Ji², Ihn-Sil Kwak^{1,2,*}

¹전남대학교 해양융합학과,
²전남대학교 수산과학연구소

¹Department of Ocean Integrated Science,
Chonnam National University, Yeosu 59626,
Republic of Korea

²Fisheries Science Institute, Chonnam National
University, Yeosu 59626, Republic of Korea

*Correspondence to Ihn-Sil Kwak
E-mail: iskwak@chonnam.ac.kr

Received November 21, 2023

Revised January 10, 2024

Accepted January 10, 2024

Abstract : Gut contents analysis in fish can identify changes in habitat environments as aquatic food network predators, which plays a pivotal role in determining biodiversity. DNA metabarcoding technology for analyzing the stomach contents of fish has recently attracted attention as a molecular analysis method that goes beyond the limitations of traditional visual observation. In this study, DNA metabarcoding analysis using 18S rRNA V9 primers was conducted on fish species purchased at fisheries markets in the East Sea, West Sea, and South Sea of South Korea for a comparative analysis of the stomach contents. High levels of Zooplankton and Phytoplankton were detected in the stomach contents of *Chelidonichthys spinosus*, *Pennahia argentata*, *Takifugu pardalis*, *Scombrops boops*, *Larimichthys polyactis*, *Kaiwarinus equula*, *Sebastes schlegelii*, and *Sebastiscus marmoratus*. Decapoda were the highest detected in *Pagrus major*, and fish were detected in *Lophiomus setigerus* of each stomach content. In addition, various taxa were detected in *Arctoscopus japonicus*, including fish and Crustacea. In the correlation analysis between the diversity index, LMnb, and LSnb for fish stomach contents, the diversity index and LMnb showed a high positive correlation (0.98), but the diversity index and LMnb showed a low correlation (0.01). The hierarchical clustering of fish according to stomach contents was divided into three groups, with the main stomach contents of each group being Malacostraca (Group 1), fish (Group 2), and Zooplankton and Phytoplankton (Group 3). These results suggest the possibility that food source analysis through DNA metabarcoding can identify the difficult to observe with the naked eye and complement the results of microscopic examination. However, at the same time, it was shown that analysis of stomach contents using DNA metabarcoding should interact with microscopic analysis for interpretation in the analysis of substantial food sources.

Keywords : Fish, Gut contents analysis, DNA metabarcoding, 18S rRNA V9 primer, Fisheries market

서론

DNA 메타바코딩 (Metabarcoding)은 NGS (Next generation sequencing) 기법을 기반으로 유기물 내 존재하는 DNA 정보를 통해 구체적인 분류군 정보를 확보할 수 있다. PCR에 기반을 둔 위내용물의 먹이 생물 염기서열 분석법은 소화가 덜 된 먹이생물과 포식자의 섭식 관계 분석에 유용하게 사용되고 있다 (Zaidi, 1999). 우리나라에서 수생물 위내용물에 대해 NGS

를 적용한 연구는 Cytochrome c oxidase subunit 1 (COI), 18S rRNA 프라이머를 사용하여 먹이원 분석을 한 예 (Kim, 2017; Ko *et al.*, 2022; Oh *et al.*, 2022)가 있지만, COI 프라이머는 사전 정보가 없는 다양한 전체 진핵생물을 파악하고 탐지하기에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다 (Kwak *et al.*, 2022). 반면에 18S rRNA V9 프라이머는 동·식물플랑크톤을 포함한 저서무척추동물을 광범위하게 탐지할 수 있는 프라이머로 어류의 위내용물 분석에는 유용하다. 국외에서는 *Sardina*

pilchardus (정어리과), *Sprattus sprattus* (청어과), *Acipenser fulvescens* (철갑상어과) 등의 위내용물에 대해 18S rRNA 프라이머를 이용하여 분석하여 보고하였다(Krieger and Fuerst 2004; Albaina *et al.*, 2016). 국내에서 18S rRNA 프라이머를 이용한 위내용물 분석은 저서무척추동물에 주로 사용되어져 왔으나, 해양 생물의 위내용물 분석 연구 사례는 극히 드물다(Chae *et al.*, 2021; Ko *et al.*, 2022; Oh *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2023).

국내 담수 및 해수에서 보고된 어류는 총 4강 45목 223과 724속 1,291종이며, 이 중 기수어종을 포함한 담수어류가 216종, 해양어류는 1,075종이다(NIER, 2019). 그러나, 먹이원에 대해 보고된 어류는 45종의 담수어(Kim *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2023)와 120종의 해양어류만이 연구되어 있다. 어류의 형태적 특징 및 서식환경, 지리적 분포와 같은 정보는 국내 어류 데이터베이스에서도 제공하고 있으나 섭식 생태를 포함한 먹이원 연구는 섭식 길드(예, 포식성)는 짧게 서술되고 있다(Kim *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2014). FishBase (Froese and Pauly, 2023)와 같은 외국의 어류 데이터베이스 플랫폼에서도 영양 단계(Trophic level)와 섭식 길드만 보고되어 있을 뿐 먹이원에 관한 정보는 보고되어 있지 않다(Ji *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2023). 어류 식성 연구는 섭식 특성, 영양 상태 및 영양 발달 단계를 이해할 수 있는 중요한 정보를 제공한다(Jo *et al.*, 2019). 먹이원 연구는 하위 생물과 상위 생물 간의 먹이사슬 구조를 알려주고, 군집 내에서 영양 단계의 물질이동을 이해하는 데 도움을 준다(Litvak and Leggett, 1992; Ji *et al.*, 2020). 대부분 먹이원 연구는 대상 생물의 위를 적출 후 실체현미경을 통해 확인하는 육안 관찰(Microscopic identification) 내용물을 분석하기 때문에 식물플랑크톤이나 동물플랑크톤과 같은 미소 먹이원은 정확한 동정이 어렵다. 또한 저서무척추동물이나 어류와 같은 크기가 다소 큰 먹이원도 섭식과정에서 파편화되거나 위 속에서 소화액

과 융합되어 형태적으로 분석하기 어렵다. 이런 형태적 분석의 단점을 극복하기 위해 최근 분자생물학적 기술인 메타바코딩 기법(Sequence assignment species, SAS)을 이용하여 위내용물에 대한 연구가 진행되고 있다(Harms-Tuohy *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017; Gunther *et al.*, 2021; Ko *et al.*, 2022; Oh *et al.*, 2022).

본 연구에서는 어류의 다양한 위내용물을 효율적으로 탐지하기 위해 18S rRNA V9 프라이머를 이용하여 국내 연안에 출항하여 입항하는 어선으로부터 구입한 11종 어류의 위내용물을 탐지 및 분석하였다. 이를 통해 대한민국 동해와 남해, 서해 어종의 해역에 따른 어종의 먹이원 구성 차이를 살펴보고자 하였다. 나아가 NGS 기법을 통해 분석된 어류의 위내용물 정보를 토대로 어종의 먹이원 다양성과 계층적 군집분석을 통해 어종 간의 먹이원 차이 및 섭식 생태를 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 위내용물 시료 확보

국내 연안에 서식하는 어류 위내용물 분석을 위해 2021년 2월 동해 포항, 남해 완도와 통영, 서해 목포 수협 어판장에서 당일 조업하여 입항하는 어선의 11종의 어류를 각 1마리씩 구매하였다(Table 1). 구입한 생물 종들은 현장에서 위를 적출하여 15 mL conical tube에 80% ethanol로 보관하였다. 전라남도 목포시 수협 어판장에서 성대(*Chelidonichthys spinosus*), 보구치(*Pennahia argentata*), 줄복(*Takifugu pardalis*), 아귀(*Lophiomus setigerus*) 4종을 구입하였다. 포항시 어판장에서 도루묵(*Arctoscopus japonicus*)을 구매하였으며, 통영시 어판장에서는

Table 1. List of fish species analyzed for stomach content, and location of fish market

Location	Latitude and longitude	Order	Family	Scientific name	TL (mm)	BL (mm)
Mokpo	N 34°46'50.63" E 126°22'46.74"	Scorpaeniformes	Triglidae	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	215	180
		Perciformes	Sciaenidae	<i>Pennahia argentata</i>	146	123
		Tetraodontiformes	Tetratodontidae	<i>Takifugu pardalis</i>	125	103
		Lophiiformes	Lophiidae	<i>Lophiomus setigerus</i>	307	255
Tongyeong	N 34°50'20.19" E 128°25'01.86"	Perciformes	Pomatomidae	<i>Scombrops boops</i>	253	204
		Perciformes	Sciaenidae	<i>Larimichthys polyactis</i>	207	169
		Perciformes	Sparidae	<i>Pagrus major</i>	167	138
		Perciformes	Carangidae	<i>Kaiwarinus equula</i>	196	164
Wando	N 34°19'35.21" E 126°44'58.87"	Scorpaeniformes	Scorpaenidae	<i>Sebastes schlegelii</i>	189	165
		Scorpaeniformes	Scorpaenidae	<i>Sebastiscus marmoratus</i>	215	189
Pohang	N 36°02'11.74" E 129°22'09.62"	Perciformes	Trichodontidae	<i>Arctoscopus japonicus</i>	236	203

게르치(*Scombrops boops*)와 참조기(*Larimichthys polyactis*), 참돔(*Pagrus major*), 갈전갱이(*Kaiwarinus equula*)를 구입하였다. 완도군 수협 어판장에서는 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)과 솜뱅이(*Sebastiscus marmoratus*)를 구입하였다.

2. 어류 위내용물로부터 DNA 추출과 메타바코딩

DNA 추출 전, 위 조직에 대한 오염을 방지하기 위해 1X PBS (Phosphate-buffered saline)를 이용하여 위를 세척하였다. PBS로 위내용물 세척 후 위 내부에 생물 조직이 있는 경우, 조직을 10~25 mg으로 잘라서 위 내부를 씻은 PBS 용액과 함께 1.75 microtube에 넣어 시료를 냉동 보관하였다. 어류의 위내용물 genomic DNA 추출은 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen Hilden, Germany)를 이용하였으며, 제공된 protocol (Djurhuus *et al.*, 2017)에 따라 진행하였다. 추출한 DNA는 평균 흡광도 260 nm와 280 nm 파장으로 microplate reader (Thermo Fisher, USA)를 이용하여 DNA 순도를 측정하였다. 위내용물을 탐지하기 위해 18S rRNA V9 (1380F~1510R) 프라이머 (Forward: 5'-CCCTGCCHTTTGTACACAC-3'와 Reverse: 5'-CCTTCYGCAGGTTACCTAC-3')를 이용하여 PCR 분석을 진행하였다 (Amaral-Zettler *et al.*, 2009). PCR 조건은 AccuPower® PCR PreMix (BIONEER, Korea)를 이용하여 94°C 3분 후 94°C에서 30초, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초간 합성 과정을 35회 반복하여 증폭한 후 72°C에서 5분간 추가 진행하여 1차 PCR을 진행하였다. 2차 PCR은 Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, USA) index kit를 이용하여 진행하였다. 95°C에서 3분간 초기 진행 후, 95°C에서 30초 변성, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 합성 과정을 8회 진행한 후 72°C에서 5분 추가 수행하였다. 수행된 PCR 산물은 1.5% Agarose gel 전기 영동을 통해 결과물을 시각화하여 확인하였다. NGS 분석은 iSeq™100 (Illumina, USA)을 이용하여 시행하였다. 획득된 염기서열은 Qiime2 pipeline (Bolyen *et al.*, 2019)을 이용하여 ASV (Amplicon sequence variant) 형태로 산출하였으며, nucleotide 데이터베이스로 NCBI (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov>)의 BLAST를 이용하여 taxonomy assignment를 $\geq 97\%$ 일치도로 분석하여 진행하였다. 추가적으로 Host 어류와 동일한 과(Family)의 유전자는 위내용물 분석 단계에서 제외하였다.

3. 섭식 생태 분석

어류 위내용물 상대빈도 분석은 과 수준(Family level)에서 ASV 값을 추출하여 개체별로 비교하였다. DNA 메타바코딩을 통해 분석한 어류의 위내용물과 기존 문헌에 분석된 어류의 먹이원을 비교하기 위해, 학술 데이터베이스인 NDL (National Digital Library)와 Kiss (Korean studies Information Service

System), KISTI (Korean Institute of Science and Technology Information), Google Scholar에서 어종별 먹이원 문헌을 수집하였다. 본 연구에서 채집한 11종 중 7종의 먹이원이 보고되어 있었으며 (Huh *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007; Baek *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Huh *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2022; Kang *et al.*, 2022), 먹이원을 생물 분류군 단위(예, 과, 목, 강, 문)으로 정리하여 분석하였다.

기존 문헌에서 검출된 먹이원 수와 DNA를 통해 검출된 먹이원 수에 대한 먹이원 수의 비율을 산출하기 위해 FGnb (Food source in Gut contents for Niche breadth)를 아래와 같은 식을 통해 계산하였다.

$$FGnb = \frac{\text{No. of detected gut contents by SAS}}{\text{No. of gut contents by MSI}}$$

각 어류의 먹이원 다양성을 구하기 위해 Shannon diversity (Shannon, 1948), Levin's measure (Levins, 1968) 및 Levin's standardized niche breadth (Levins, 2020)를 아래의 식으로 산출하여 비교하였으며, 이들의 통계적 차이를 분석하기 위해 분산분석(ANOVA)를 사용하여 유의성을 검정하였다.

$$H' = - \sum P_j \log P_j$$

H' = Shannon - Wiener measure of niche breadth이며, P_j = 먹이원 j 를 섭식할 확률을 나타낸다. Levin's measure은 레빈 측정 (Levin's measure of niche breadth, LMnb, $\hat{B} = 1/\sum \hat{P}_j^2$) (Levins, 1968)을 이용하였으며, Levin's standardized niche breadth (LSnb) (Levins, 2020)은 아래의 식을 통해 산출하였다.

$$\hat{B}_A = \frac{\hat{B} - 1}{n - 1}$$

$\hat{B}$ 는 LMnb를 사용하여 구하며, P_j = 먹이원 j 를 섭식할 확률, n = 전체 먹이원 하위분류군 수를 나타낸다. 계산된 레빈 표준 생태지위 지수($\hat{B}_A$) 값은 1에 가까울 경우 다양한 먹이원을 먹은 어류를 나타내고 0이면 한 종류의 먹이만 섭식한 것이다.

LMnb는 대상 종의 먹이원 분포를 정량화하는 방법으로, 먹이원 활용의 균일성과 다양성을 반영하며 값이 클수록 다양한 먹이원을 사용한다는 것을 의미한다. 먹이원 수가 고려되어 있지 않은 식으로, 메타바코딩 위내용물 분석에 사용되었다. LSnb는 먹이원 수에 따라 보정되며 먹이원 수를 고려하여 상대적인 먹이원 사용량을 비교할 수 있다.

4. 먹이원에 따른 해양 어류 섭식 특성 유형화

해양 어류를 먹이원에 따라 분류하고, 먹이원과의 관계를 확인하기 위해 계층적 군집분석(Dray and Legendre, 2008)을 수행하였다. 계층적 군집분석은 Bray-Curtis 거리(Beals, 1984)

를 구한 후 Ward 연결법(Ward, 1963)을 이용하여 먹이원의 유사성에 따라 어종을 그룹화하였다. 계층적 군집분석을 위한 입력자료는 강(class) 수준의 자료를 사용하였다. 본 연구에서 수행한 분석은 R (Team, 2021) 프로그램 (v.4.1.0; <https://www.r-project.org/>)을 이용하였으며 Vegan 패키지(Oksanen *et al.*, 2019)를 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 18S rRNA V9을 이용한 어류 위내용물 분석

서해 목포 어시장에서 구입한 성대의 전체 위내용물은 분류군에 따라 7문 13강 23목 27과 31속이 나왔으며, 보구치는 7문 13강 27목 31과 35속, 졸복은 8문 18강 29목 35과 41속, 아귀는 5문 5강 6목 10과 11속으로 조사되었다. 남해에서 채집한 게르치의 위내용물은 8문 20강 31목 38과 45속으로 조사되었으며 참조기는 8문 15강 28목 33과 38속의 먹이원이 검출되었다. 남해 어시장에서 구입한 참돔의 전체 위내용물은 6문 7강 12목 16과 18속으로 나타났으며 갈전갱이는 8문 17강 28목 37과 44속으로 조사되었다. 그리고 남해에서 구입한 어류인 조피볼락의 위내용물은 8문 20강 36목 43과 50속이었으며, 솜뱅이는 8문 17강 29목 35과 44속의 위내용물이 검출되었다. 동해 어시장에서 구입한 어류의 위내용물 분석 결과, 도루묵은 6문 6강 8목 8과 9속의 위내용물이 검출되었다(Table 2). Table 2는 어류의 18S rRNA 프라이머로 검출된 어류의 모든 위내용물을 나타내었다.

어류 위내용물 상대 분석 결과(Table 3), 소화되어 현미경 하에서 관찰할 수 없었던 다양한 미소 생물이 메타바코딩을 통하여 시각화되었다. 목포에서 구입한 성대(F1)의 위내용물 상대

빈도에서 ASV 빈도가 가장 높은 위내용물은 식물플랑크톤으로 72.3%를 차지하였다. 이 중, 녹색소구체과(Chlorococcaceae)와 돋보기말과(Chromulinaceae)가 각각 37.5%, 26.2%를 차지하였다. 식물플랑크톤 다음으로 높은 비율을 보인 위내용물은 원생동물의 침모하모충과(Oxytrichidae)가 25.3%로 조사되었다. 이 같은 결과는, 둥근돗대기새우(*Leptochela sydnensis*), 게류, 어류를 주로 섭식한 성대 먹이원 문헌(Huh *et al.*, 2007)에 비해 매우 다양한 위내용물을 확인할 수 있었다.

본 연구의 보구치(F2) 위내용물에서는 식물플랑크톤에 속하는 *Tetracystis*가 41.4%, *Ochromonas*가 24.5%, 동물플랑크톤에 속하는 침모하모충속(*Oxytricha*)이 19.8%로 검출되었다. 하지만, COI 프라이머를 사용한 보구치 위내용물 연구(Kim and Kwak, 2022)에서는 저서무척추동물에 속하는 갯가재(*Grotesquely oratoria*)와 두발가락게불이속(*Aliaporcellana* sp.), 긴발딱총새우(*Alpheus japonicas*)가 주요한 위내용물로 나타났으며, 육안으로 보구치의 위내용물 관찰한 연구(Huh *et al.*, 2018)에서는 십각류(Decapoda)가 65.1%, 갑각류(Crustacea)가 27.1%, 다모류(Polychaeta)가 7.1% 순으로 나타났다. 동일한 어류 내에서 각기 다른 프라이머를 사용하였을 때 18S rRNA 프라이머가 COI 프라이머에 비해 동·식물플랑크톤을 광범위하게 탐지할 수 있었으며, 육안으로 관찰이 어려운 먹이원 분류군을 위내용물로 확인할 수 있었다.

졸복(F3)의 위내용물은 식물플랑크톤류 녹색소구체과가 35.1%로 조사되었으며, 돋보기말과가 25.7%, 요각류가 0.2%, 곤쟁이류가 0.1% 차지하였다. 아귀목 아귀과에 속하는 황아귀(*Lophius litulon*)의 선행연구(Baeck and Huh, 2003; Park *et al.*, 2014)에서 황아귀의 주 먹이생물은 어류로 나타났으며, 멸치를 포함한 다양한 어종의 섭식이 보고되었다. 본 연구에서는 아귀(F4)의 위내용물은 대부분 주걱치과(Pempheridae)와 청어과(Clupeidae) 어류로 나타났으며 각각 54.0%와 41.5%의

Table 2. Number of food sources for each fish species according to taxonomy level

Site	Scientific name	Abb.	Genus	Family	Order	Class	Phylum
West Sea	<i>Chelidonichthys spinosus</i>	F1	31	27	23	13	7
	<i>Pennahia argentata</i>	F2	35	31	27	13	7
	<i>Takifugu pardalis</i>	F3	41	35	29	18	8
	<i>Lophiomus setigerus</i>	F4	11	10	6	5	5
South Sea	<i>Scombrops boops</i>	F6	45	38	31	20	8
	<i>Larimichthys polyactis</i>	F7	38	33	28	15	8
	<i>Pagrus major</i>	F8	18	16	12	7	6
	<i>Kaiwarinus equula</i>	F9	44	37	28	17	8
	<i>Sebastes schlegelii</i>	F10	50	43	36	20	8
	<i>Sebastiscus marmoratus</i>	F11	44	35	29	17	8
East Sea	<i>Arctoscopus japonicus</i>	F5	9	8	8	6	6

Table 3. Continued

Phylum	Class	Order	Family	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Chordata	Actinopterygii	Clupeiformes	Clupeidae	-	-	-	41.5	-	-	0.2	-	0.1	-	-
			Engraulidae	0.1	0.1	0.1	3.3	-	0.1	-	-	0.1	0.1	-
			Oplegnathidae	0.3	0.3	0.2	-	-	-	-	-	0.1	0.2	-
		Perciformes	Pempheridae	-	-	-	54.0	-	-	0.7	1.6	0.1	-	-
			Serranidae	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
			Scombridae	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
		Pleuronectiformes	Cynoglossidae	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Paralichthyidae	0.1	0.2	-	-	-	0.1	-	-	0.3	-	-
			Pleuronectidae	-	0.1	0.2	-	-	0.3	0.4	-	0.1	0.1	0.1
		Scorpaeniformes	Cottidae	-	-	-	-	33.1	-	-	-	-	-	-
			Triglidae	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	-	-
		Others		0.1	-	-	-	-	0.1	0.3	0.1	-	0.1	-
	Chondrichthyes	Lamniformes	Lamnidae	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	0.1

비율을 보여 먹이원에 대한 정확한 분류군의 정보를 세밀하게 제시할 수 있었다.

도루묵은 주로 수심 100~200 m의 대륙붕의 모래 또는 펄로 구성되어 있는 저질에 서식하는 저서어류이다(Lee and Kang, 2006). 포항에서 구입한 도루묵(F5)의 위내용물에서는 독중개과(Cottidae) 어류가 33.1%, 하늘엽새우과(Hyperiidae)가 31.9%, 매오징어과(Enoploteuthidae) 26.4%로 주 위내용물로 검출되었다. 가장 높게 검출된 독중개과는 종(species) 수준에서 분석하였을 때 북태평양과 강원도 연안에 분포하는 실횃대(*Porocottus allisi*)로 나타났다(Kim *et al.*, 2005). 또한, 하늘엽새우과와 매오징어과는 수심이 깊은 동해 연안의 저서에 서식하는 생물로, 메타바코딩을 통해 검출된 위내용물 결과가 어류의 서식처를 유추할 수 있는 것을 보여주었다.

통영에서 구입한 게르치(F6)의 위내용물 중 식물플랑크톤이 전체 ASV 상대빈도에서 61.3%를 차지하였으며, 이 중에서 녹색소구체과가 34.8%를 차지하였다. 그 다음 ASV 값이 높은 분류군은 유성모류(Ciliophora)로 첨모하모충과가 36.3%로 조사되었다. 참조기(F7)는 식물플랑크톤류가 59.0%, 어류 먹이원이 2.3%로 확인되었다. 한국 연안해역에서 출현하는 참조기의 식성연구(Kang *et al.*, 2022)에서는 어식성으로 보고하여, 내용물이 혼합되어 관찰이 어려운 식물플랑크톤에 대한 언급이 없었다. 집게류와 단각류를 주로 먹는다고 알려져 있는 참돔(F8)의 경우(Kim, 2006), 본 연구에서도 절지동물이 94.0%로 나타나 기존의 연구와 유사하였다. 참돔의 위내용물 중, 십각목의 꽃게과(Portunidae)가 88.6%로 가장 높았으며 식물플랑크톤과 어류가 각각 2.3%, 1.8%로 소량 발견되었다. 갈전갱이(F9)의 위내용물 ASV 상대빈도 분석 결과, 가장 비율이 높은 분류군은 식물플랑크톤으로 59.5%의 비율을 보였다. 식물플랑크톤에 속하는 위내용물 중, 녹색소구체과가 28.3%로 나타났으며 돋보기말과가 23.8%의 비율을 보였다. 식물플랑크톤을 제외한 위내용물 중 ASV 빈도가 높은 위내용물은 유성모류로 38.6% 조사되었다.

완도에서 구입한 조피볼락(F10)의 위내용물 속에서 가장 비율이 높은 과는 녹조류의 녹색소구체과 32.9%, 첨모하모충과 26.0%를 차지하였다. 그 외에도 전체 가장 높은 ASV 값을 가진 분류군은 식물플랑크톤으로 확인되었다. 일반적으로 기존 연구(Lee *et al.*, 2012)에서 솜뱅이는 섭이 활동 시 먹이생물종을 선택적으로 섭이하지 않고 서식 당시 해역에 다량으로 분포하는 먹이를 주로 섭이하고 있는 것을 알려져 있다. 본 연구에서 솜뱅이(F11)는 첨모하모충과가 38.7%로 위내용물 중 비율이 가장 높았으며 그 밖에도 식물플랑크톤의 다양한 생물의 ASV가 조사되었다.

줄복, 게르치, 갈전갱이는 과거 먹이원에 관한 연구가 보고되지 않았으나, DNA 메타바코딩 분석을 통해 어종의 위내용물을 확인할 수 있었다. 이는 메타바코딩 분석 기법이 기존 먹이원

분석이 확인되지 않았던 어종들의 섭식 생태를 파악할 수 있는 다량의 정보를 제공해 줄 수 있음을 제시한다.

2. 해양 어류 섭식생태 분석

MSI와 SAS (18S rRNA V9 프라이머)에 검출되는 위내용물 수를 비교하기 위해 FGnb를 산출하였으며, 도루묵과 참돔을 제외한 5종(성대, 보구치, 참조기, 쏜뱅이, 조피볼락)에서 MSI에 비해 SAS에서 검출되는 먹이원 수가 많은 것을 확인하였다(Table 4). MSI를 통해 관찰하는 위내용물은 최소 100개체 이상 어류를 해부하여 산출되지만, SAS를 통한 위내용물 연구는 단일 개체의 위내용물 분석에 적용 가능성을 살펴보았다.

11종의 어류 중 LMnb가 가장 큰 어류는 조피볼락으로 3.87의 지수 값을 보였다. 다음으로 성대(3.64), 보구치(3.41), 졸복(3.66), 아귀(2.15), 도루묵(3.47), 게르치(3.44), 참조기(3.6), 갈전갱이(3.49), 쏜뱅이(3.3), 참돔(1.27) 순으로 산출되었다.

SAS를 통해 분석된 해양 어류의 LSnb 값이 0.35로 나타난 도루묵은 다른 어류에 비해 위내용물 내 출현분류군이 다양하게 확인되었다. 반면, 참돔은 LSnb 값이 0.02로 나타나 다른 어종에 비해 검출된 위내용물 수가 낮게 나타났으며, 주된 위내용물은 꽃게과(Portunidae)의 민꽃게속(*Thalamita*)이었다. 다양도 지수(H')가 가장 높게 나타난 어류는 조피볼락으로 0.72값을 보였으며, 가장 낮은 값으로는 참돔으로 0.25값을 보여 먹이원 폭과 비슷한 양상을 보였다.

다양도 지수와 LMnb와 LSnb 간 상관분석에서는 다양도 지수와 LMnb 간 유의한 양의 상관관계를 보였다(Fig. 1). 하지만 LSnb와 다른 두 지수와 관계에서는 낮은 양의 상관관계를 나타냈다. 이는 다양도 지수와 LMnb에는 검출된 위내용물 수가

반영되지 않지만, LSnb의 경우, 위내용물 수가 고려되기 때문에 차이가 나타난 것으로 생각된다.

3. 해양 어류 섭식생태 분석

계층적 군집 분석에서 11종의 어류는 검출된 위내용물에 따라 3개의 그룹을 형성하였다(Fig. 2). 계층적 군집의 가로축과 세로축은 각각 먹이원과 어류 그룹을 나타냈다. 도루묵과 참돔을 포함한 그룹 1은 연갑강(Malacostraca)이 높게 검출되어 저서무척추동물을 섭식하는 어류로 나타났다. 아귀를 포함한 그

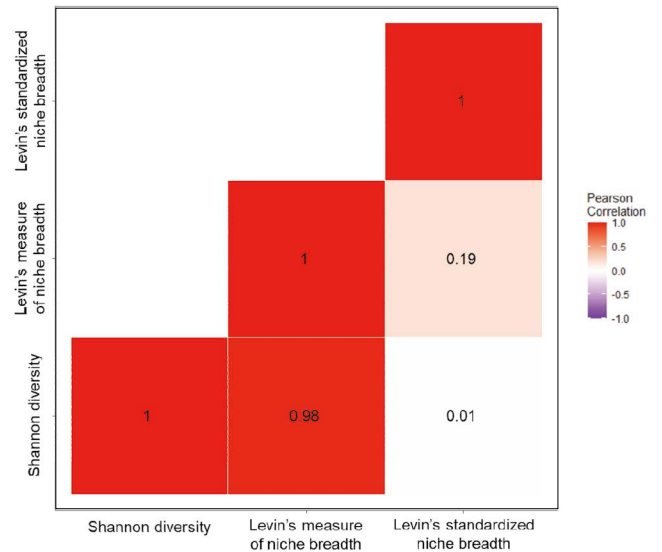


Fig. 1. Heatmap Pearson's correlation coefficient for the three niche breadth indices.

Table 4. Comparison of niche breadth indices among eleven fish species sampled in fisheries markets

Scientific name	No. of food source (Family level)		FGnb (SAS/MSI)	Shannon diversity	LMnb SAS (Family level)	LSnb SAS (Family level)
	MSI	SAS				
<i>Chelidonichthys spinosus</i>	20	27	1.4	0.69	3.64	0.1
<i>Pennahia argentata</i>	12	31	2.6	0.66	3.41	0.08
<i>Takifugu pardalis</i>	—	35	—	0.68	3.66	0.08
<i>Lophiomus setigerus</i>	—	10	—	0.38	2.15	0.13
<i>Arctoscopus japonicus</i>	11	8	0.7	0.57	3.47	0.35
<i>Scombrops boops</i>	—	38	—	0.66	3.44	0.07
<i>Larimichthys polyactis</i>	14	33	2.4	0.68	3.60	0.08
<i>Pagrus major</i>	32	16	0.5	0.25	1.27	0.02
<i>Kaiwarinus equula</i>	—	37	—	0.66	3.49	0.07
<i>Sebastes schlegelii</i>	24	43	1.8	0.72	3.87	0.07
<i>Sebastiscus marmoratus</i>	18	35	1.9	0.64	3.30	0.07

'No. of food source' indicates the number of the family level that fish species consumed the food sources.
MSI: Microscopic identification; SAS: Sequence assignment species

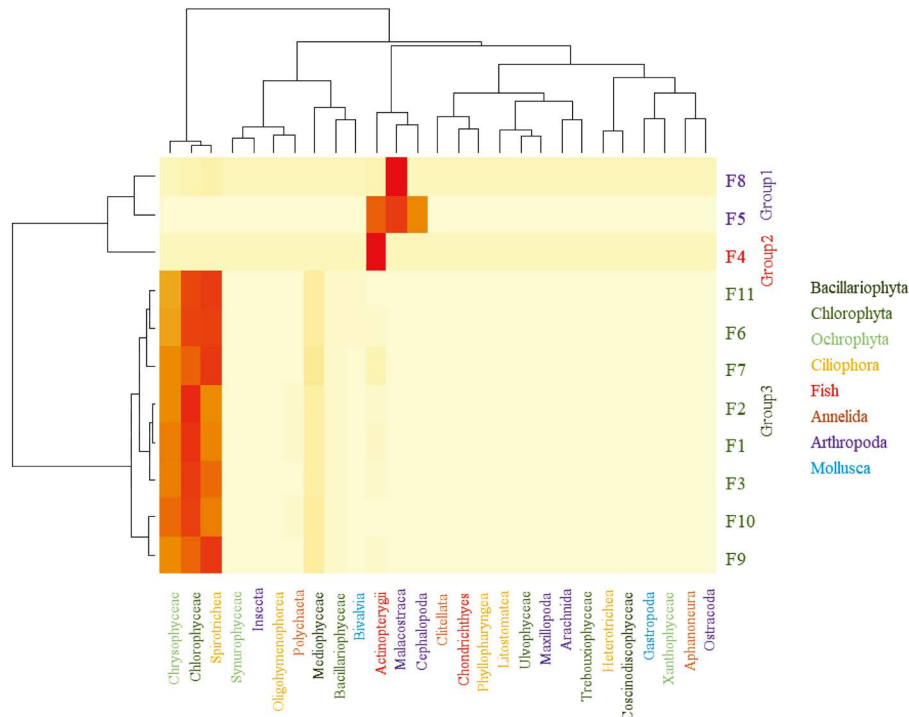


Fig. 2. Hierarchical cluster analysis of fish species according to their food source. The abbreviation for fish species can be found in Table 1.

그룹 2는 조기어강(Actinopterygii)이 주로 검출되어 어식성 어류로 구분되어졌다. 가장 많은 수의 어종을 포함한 그룹 3 (성대, 보구치, 줄복, 게르치, 참조기, 갈전갱이, 조피볼락, 솜뱅이)은 식물플랑크톤에 속하는 황조강(Chrysophyceae)과 녹조류(Chlorophyceae), 동물플랑크톤에 속하는 선모류(Spirotrichea)가 주로 검출되어 플랑크톤 식성 어류로 구분되었다.

기존 도루묵의 먹이원 연구(Lee *et al.*, 2007)에서는 갑각류를 주로 섭식하였지만 본 연구에서는 어류도 섭식한 것으로 분석되어, 스캐빈저(Scavenger) 역할을 한 것으로 볼 수 있다. 이는 에너지 효율 측면에서 살아가는 데 필요한 에너지를 얻기 위해 여러 종류의 먹이생물을 섭식하는 도루묵의 생존 전략으로 보인다(Huh *et al.*, 2006). 또한 기존 문헌(Kim, 2006)에서 단각류를 주로 섭식하는 종으로 알려진 참돔은 십각목이 주된 위내용물로 나타났다.

과거에는 어류 먹이원을 식별하기 위해 육안으로 관찰하여 형태학적 특성을 사용하였으나 위 안에 있는 먹이원은 형태적 특징이 변형 및 파괴되는 경우가 많아 분석에 어려움이 있었다. 하지만 DNA 메타바코딩 분석은 육안 확인이 어려운 미소 먹이원에 대해서도 높은 분석력을 보였다. 어시장 어류의 경우 채집 환경을 정확히 알 수 없는 단점을 보완하는 방안이 필요하지만, 본 연구를 통해 적은 개체를 활용하여 위내용물 분석에 DNA 메타바코딩 방법 적용 가능성을 확인할 수 있었다. 이는 야외 조사를 통한 직접 포획 조사 방법과 다량의 수산자원을 소비하

여 위내용물을 분석해야 한다는 단점을 보완할 수 있을 것으로 기대되며, 나아가 수산생물자원 관리를 위한 주요한 정보로 활용될 수 있을 것이다.

결론

본 연구는 국내 연안 어선이 채집한 어류를 판매하는 새벽 시장에서 구매한 신선한 해양 어류 11종의 위내용물을 DNA 메타바코딩 기법을 활용하여 분석하였다. 성대, 보구치, 줄복, 게르치, 참조기, 갈전갱이, 조피볼락, 솜뱅이의 위내용물에서는 동식물플랑크톤이 높게 검출되었으며, 참돔은 십각목, 아귀는 어류가 가장 높게 검출되었다. 또한 도루묵은 어류와 갑각류를 포함한 다양한 분류군이 검출되었다. 어류 위내용물에 대한 다양도 지수와 LMnb와 LSnb 간 상관분석에서 다양도 지수와 LMnb가 높은 양의 상관관계(0.98)를 보여주었으나, 다양도 지수와 LMnb 간 낮은 상관관계(0.01)를 보여주었다. 위내용물에 따른 어류의 계층적 군집분석은 3개의 그룹으로 구분되었으며, 각 그룹의 주 위내용물은 Group 1 연갑강, Group 2 어류, Group 3 동식물플랑크톤이었다. 본 연구를 통해 DNA 메타바코딩을 이용한 어류의 위내용물 분석은 기존의 현미경 검정 결과와 상호 보완적인 분석이 가능함을 확인하였다. 따라서 DNA 메타바코딩을 이용한 NGS 기법은 어류의 위내용물 분석 분야

에서 세밀한 섭식 생태 정보 획득에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

참고 문헌

- Albaina, A., M. Aguirre, D. Abad, M. Santos and A. Estonba, 2016. 18S rRNA V9 metabarcoding for diet characterization: a critical evaluation with two sympatric zooplanktivorous fish species. *Ecol. Evol.*, 6(6), 1809-1824.
- Amaral-Zettler, L.A., E.A. McCliment, H.W. Ducklow and S.M. Huse, 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PLoS One*, 4(7), e6372.
- Baeck, G.W. and S.H. Huh, 2003. Feeding habits of juvenile *Lophius litulon* in the coastal waters of Kori, Korea. *Korean J. Aquat. Sci.*, 36(6), 695-699.
- Baeck, G.W., Y.M. Yeo, J.M. Jeong, J.M. Park and S.H. Huh, 2011. Feeding habits of scorpion fish, *Sebastiscus marmoratus*, in the coastal waters of Tongyeong, Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 23(2), 128-134.
- Beals, E.W., 1984. Bray-curtis ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data. *Adv. Ecol. Res.*, 14, 1-55.
- Bolyen, E., J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam and F. Asnicar, 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.*, 37(8), 852-857.
- Chae, Y.J., H.J. Oh, Y.J. Kim, K.H. Chang and H.B. Jo, 2021. Application of DNA analysis for identification of prey items on zooplankton: Selective treatment method. *Korean J. Ecol. Environ.*, 54(3), 247-256.
- Djurhuus, A., J. Port, C.J. Closek, K.M. Yamahara, O. Romero-Maracini, K.R. Walz, D.B. Goldsmith, R. Michisaki, M. Breitbart and A.B. Boehm, 2017. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels. *Front. Mar. Sci.*, 4, 314.
- Dray, S. and P. Legendre, 2008. Testing the species traits - environment relationships: the fourth - corner problem revisited. *Ecology*, 89(12), 3400-3412.
- Froese, R. and D. Pauly, 2023. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (10/2023).
- Gunther, B., J.M. Fromentin, L. Metral and S. Arnaud-Haond, 2021. Metabarcoding confirms the opportunistic foraging behaviour of Atlantic bluefin tuna and reveals the importance of gelatinous prey. *PeerJ*, 9, e11757.
- Harms-Tuohy, C.A., N.V. Schizas and R.S. Appeldoorn, 2016. Use of DNA metabarcoding for stomach content analysis in the invasive lionfish *Pterois volitans* in Puerto Rico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 558, 181-191.
- Huh, S.H., H.C. Choi and J.M. Park, 2018. Feeding relationship between co-occurring silver croaker (*Pennahia argentata*) and Japanese sillago (*Sillago japonica*) in the Nakdong River estuary, Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 30(4), 224-231.
- Huh, S.H., H.W. Kim and G.W. Baeck, 2006. Feeding habits of red sea bream, *Pagrus major* in the coastal waters off Busan, Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 18(3), 216-222.
- Huh, S.H., J.M. Park and G.W. Baeck, 2006. Feeding habits of spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) in the southern sea of Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 39(1), 35-41.
- Huh, S.H., J.M. Park and G.W. Baeck, 2007. Feeding habits of bluefin searobin (*Chelidonichthys spinosus*) in the coastal waters off Busan. *Korean J. Ichthyol.*, 19(1), 51-56.
- Ji, C.W., D.S. Lee, D.Y. Lee, I.S. Kwak and Y.S. Park, 2020. Analysis of food resources of 45 fish species in freshwater ecosystems of South Korea (Based on literature data analysis). *Korean J. Ecol. Environ.*, 53(4), 311-323.
- Ji, C.W., D.S. Lee, D.Y. Lee, Y.S. Park and I.S. Kwak, 2023. Analysis of food preference and competition based on stomach contents of fish species inhabiting fresh and brackish waters in South Korea. *Ecol. Fresh. Fish*, 32(1), 64-79.
- Jin, S.Y., D.G. Kim, C.S. Gi, D.Y. Kang, J.E. Lee, H.S. Park, H.J. Yang, H.Y. Soh and G.W. Baeck, 2022. Feeding habits of the sandfish, *Arctoscopus japonicus* in the coastal waters of East Sea. *Korean J. Ichthyol.*, 19(1), 44-50.
- Jo, H., D.K. Kim, K. Park, W.O. Lee and I.S. Kwak, 2019. A literature review of fish feeding research in the coast-estuary areas of Korean peninsula. *Korean J. Ecol. Environ.*, 52(2), 126-135.
- Jung, J.H., J.Y. Park, Y.H. Yoon, H.M. Lim and W.J. Kim, 2014. A survey on fish habitat conditions of domestic rivers and construction of its database. *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, 36(3), 221-230.
- Kang, D.Y., C.S. Gi, D.G. Kim, S.Y. Jin, H.Y. Soh and G.W. Baeck, 2022. Feeding habits of small yellow croaker, *Larimichthys polyactis* in coastal waters of Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 34(3), 201-207.
- Kim, H.G. and I.S. Kwak, 2022. Determination of spatial and individual variations in the dietary composition of *Pennahia argentata* in coastal waters of South Korea using metabarcoding and morphological analyses. *Reg. Stud. Mar. Sci.*, 55, 102556.
- Kim, H.W., 2006. Comparison of feeding habits between *Pagrus major* and *Dentex tumifrons* in the coastal waters off Busan, Korea. Master Thesis, Pukyong National University, 59pp.
- Kim, I.S., J.Y. Park, H. Yang, H.H. Lee, Y.S. Seo and G.P. Park, 2011a. Construction of Korean freshwater fishes DB. Korea Institute of Science and Technology Information.
- Kim, I.S., Y. Choi, C.L. Lee, Y.J. Lee, B.J. Kim and J.H. Kim, 2005a. Illustrated book of Korean fishes. KyoHak Publishing Co Ltd, Seoul, 615pp.
- Kim, I.S., Y. Choi, C.R. Lee, Y.J. Lee, B.J. Kim and J.H. Kim, 2005b. Primary color Korean fishes encyclopedia. Kyohak.
- Kim, J.B., J.Y. Kim, D.W. Lee and J.H. Choi, 2011b. Feeding habits of bluefin searobin *Chelidonichthys spinosus* around Jeju Island. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 44(4), 378-382.
- Kim, S.T., 2017. Application of next generation sequencing (NGS) tech-

- nique for the stomach content analysis of marine fish. Ph. D. Thesis, Pukyong National University, 133pp.
- Ko, B.S., J.W. Park, C.W. Ji and I.S. Kwak, 2022. Analysis of food sources of pre- and post-diet in a bivalve using DNA metabarcoding. *Korean J. Ecol. Environ.*, 5(4), 360-367.
- Krieger, J. and P. Fuerst, 2004. Characterization of nuclear 18S rRNA gene sequence diversity and expression in an individual lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *J. Ecol. Environ.*, 20(6), 433-439.
- Kwak, I.S., C.W. Ji, W.S. Kim and D.S. Kong, 2022. The list of Korean organisms registered in the NCBI nucleotide database for environmental DNA research. *Korean J. Ecol. Environ.*, 55(4), 352-359.
- Lee, H.W. and Y.J. Kang, 2006. Age determination and growth using the transverse section method of otoliths sandfish, *Arctoscopus japonicus*, in the eastern sea of Korea. *Ocean Polar. Res.*, 28(3), 237-243.
- Lee, H.W., Y.J. Kang, S.H. Huh and G.W. Baeck, 2007. Feeding habits of the sandfish, *Arctoscopus japonicus* in the East Sea, Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 19(1), 44-50.
- Lee, S.J., B.Y. Kim and H.K. Cha, 2012. Feeding habits of *Sebastiscus marmoratus* in the coastal waters of Jeju Island, Korea. *J. Kor. Soc. Fish. Ocean. Technol.*, 48(4), 379-386.
- Levins, R., 1968. Evolution in changing environments: some theoretical explorations. Princeton University Press.
- Levins, R., 2020. Evolution in changing environments. Princeton University Press.
- Litvak, M.K. and W.C. Leggett, 1992. Age and size-selective predation on larval fishes: the bigger-is-better hypothesis revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldendorf.*, 81(1), 13-24.
- National Institute of Environmental Research (NIER), 2019. Guidelines for survey and assessment of stream/river ecosystem health (stream). NIER, Incheon, Korea.
- Oh, G.H., Y.J. Kim, W.S. Kim, C. Hong, C.W. Ji and I.S. Kwak, 2022. Analysis of stomach contents of marine organisms in Gwangyang bay and Yeosu fish market using DNA metabarcoding. *Korean J. Ecol. Environ.*, 55(4), 368-375.
- Oksanen, J., F.G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. Minchin, R. O'hara, G. Simpson and P. Solymos, 2019. 'vegan', Community ecology package, version, 2(9).
- Park, C.J., S.B. Yoon, H.S. Lee, S.Y. Jang, K.H. Kim, D.H. Hong and G.J. Joo, 2023. Applicability of next-generation sequencing for analysis of stomach contents in fish. *Korean J. Ecol. Environ.*, 56(1), 104-125.
- Park, J.M., S.H. Huh, J.M. Jeong and G.W. Baeck, 2014. Diet composition and feeding strategy of yellow goosefish, *Lophius litulon* (Jordan, 1902), on the southeastern coast of Korea. *J. Appl. Ichthyol.*, 30(1), 151-155.
- Park, K.D., Y.J. Kang, S.H. Huh, S.N. Kwak, H.W. Kim and H.W. Lee, 2007. Feeding ecology of *Sebastes schlegeli* in the Tongyeong marine ranching area. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.*, 40(5), 308-314.
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.*, 27(3), 379-423.
- Team, R.C., 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020.
- Ward Jr., J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.*, 58(301), 236-244.
- Yoon, T.H., H.E. Kang, S.R. Lee, J.B. Lee, G.W. Baeck, H. Park and H.W. Kim, 2017. Metabarcoding analysis of the stomach contents of the Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) collected in the Antarctic ocean. *PeerJ*, 5, e3977.
- Yu, T.S., C.W. Ji and I.S. Kwak, 2023. Hierarchical interaction between food diversity and competition in brackish fish species in South Korea. *Fishes*, 8(6), 313.
- Zaidi, R., 1999. Can the detection of prey DNA amongst the gut contents of invertebrate predators provide a new technique for quantifying predation in the field?. *Mol. Ecol.*, 8, 2081-2088.