

碩士學位論文

실고기어류(Syngnathids)의
분자계통분류학적 연구



濟州大學校大學院

海洋生物工學科

高範碩

2003年 12月

실고기어류(Syngnathids)의
분자계통분류학적 연구

指導教授 宋 春 福

高 範 碩

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함

2003年 12月

高範碩의 理學碩士 論文을 認准함

審査委員長 이 제 희 (인)

委 員 여 인 규 (인)

委 員 송 춘 복 (인)

濟州大學校 大學院

2003年 12月

Phylogenetic Relationships among Syngnathid Fishes
Based on Mitochondrial Cytochrome *b*
DNA Sequences

Beom-Seok Koh
(Supervised by professor Choon Bok Song)



A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

Department of Marine Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

Dec. 2003

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 시료	7
2. Tatal DNA 추출	7
3. PCR 증폭	8
4. PCR 산물의 cloning	9
5. 염기서열 결정 및 자료 분석	10
III. 결 과	12
1. 염기서열 결정과 염기 구성 편차	12
2. 염기서열의 진화	13
3. 포화도 분석	42
4. 계통분석	45
IV. 고 찰	51
V. 요 약	54
VI. 참 고 문 헌	56
감사의 글	62

Abstract

The syngnathid fishes were generally known as the pipefish, seahorse and seadragon, having the most unusual morphology among all fishes. The previous morphology-based taxonomic frameworks within the family Syngnathidae had emphasized the significance of the male brood pouch and reproductive biology in defining the group. However, as there have been several different hypotheses proposed by different investigators, a few molecular phylogenetic studies were attempted to test the hypothesis on the taxonomy, evolutionary origin and phylogeography of the Syngnathidae. These molecular studies had mainly focused on species relationships within either the family Syngnathidae or the subfamily Hippocampinae. In this study, ingroup taxa were somewhat extended to the major species of three other families within the order Syngnathiformes to clarify the phylogeny of the syngnathid fishes. Sequence data derived from the mitochondrial cytochrome *b* gene were used to determine the phylogenetic relationships among 21 species belonging to the order Syngnathiformes, and for ingroup analysis three species from the order Gasterosteiformes were used as the outgroup.

Neighbor-joining distance, maximum parsimony and maximum likelihood phylogenetic analyses using the first and second codons due to the possible saturation of transitions on the third codon position strongly supported that the family Syngnathidae, the suborder Syngnathoidei and the order Syngnathiformes were all monophyletic groups. However, there were some phylogenetically unresolved groups such as phylogenetic relationships among the subfamilies within the family Syngnathidae. Although much of previous morphological analyses were supported by our molecular data, there were some significant discrepancies between molecular

and morphological work. Such an interesting result was that the weedy seadragon (*Phyllopteryx taeniolatus*) strongly grouped together with the New Zealand pot-belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*). Considering the markedly different brooding structure between them, this result was totally unexpected and might be explained by multiple independent origins of brooding structure or hybridization between the female *Hippocampus* and other syngnathid species having individual membranous egg compartment. The further detail studies should be necessary by adding more relevant species to the analysis and/or analyzing nuclear DNA data to confirm the possible reason for it in the future.



I. 서론

실고기어류(Syngnathids)는 pipefish, seahorse 그리고 seadragonfish를 포함하고 있으며, 대서양, 인도양, 태평양 등지의 열대성, 온대성 해역에 널리 분포하고 있다(Kendrick, 2002; Kuitert, 2000; Rosen 1988). 이들은 분류학적으로 실고기과(Syngnathidae)에 포함되어 있으며 실고기과에는 4 아과(Subfamily), 53 속(Genus), 약 336 종(Species)이 보고되어 있다(Lourie, 1999).

대부분의 실고기어류는 바다에 서식하지만 이들중 약 35종은 기수지역, 약 17종은 담수에 분포하며(Lourie, 1999), 저서유영을 하거나 물체에 감겨 붙으려는 습성이 있고, 새우류, 갯가재류, 갑각류의 유생 등을 즐겨 먹는다(Franzoi et al., 1991).

일반적으로 수컷이 새끼를 보살피는 부성보육(parental care)의 특성을 갖는 이들은 암컷이 수컷의 보육낭이나 부화장소에 알을 낳으며 수컷이 이를 기른다고 보고되어 있다(Herald 1959; Breder & Rosen 1966; Dawson 1985; Lourie et al. 1999).

실고기과(Family Syngnathidae)내에서의 초기분류는 수컷의 보육낭의 위치와 발달을 반영하여 행해 졌으며(Duncker 1915; Herald 1959), 보육낭의 위치에 따라 subfamily Urophori와 subfamily Gastrophori로 구분하였다(Herald 1959). 즉, 보육낭의 발달 정도, 부화 시 알의 노출의 유무 등을 기준에 따라 보다 세분하였으며, 이로 인해 근연한 stickleback이 약 7종인데 비해 300종 이상의 많은 종으로 분류되었다(Dawson 1985; Wootton 1984). 최근에는 실고기과를 4개의 아과로 구분하고 있다. 즉, 선형의 체형에 꼬리지느러미가 작으며, 단순한 구조의 보육낭을 갖는 종을 실고기아과(Syngnathinae)로, 꼬리지느러미가 없고, 단순한 구조의 보육낭을 갖는 종을 Solegnathinae, 그리고 판과 같은 형태의 큰 꼬리지느러미를 갖으며 단순한 구조의 보육낭을 갖는 종을 Doryrhamphinae로, 마지막으로 꼬리지느러미가 없으며 발달된 구조의 보육낭을 갖는 종을 해마아과(Hippocampinae)로 분류하고 있다(Kuitert, 2000).

그러나 실고기과에 포함되는 해마아과(Hippocampinae) 어류의 경우 일반적으로 어류의 형태학적인 분류에 사용되는 꼬리지느러미 혹은 배지느러미와 같은 특정한 신체적

특징을 갖고 있지 않기 때문에 형태학적인 분류가 어려우며, 분류가 애매한(cryptic) 종들이 다른 종으로 분류되는 경우가 있어서(Knowlton, 1993), 100여종 이상으로 보고 되었으나(Eschmeryer, 1998), 확실하게 인정되는 종명만을 포함시켜 약 32종으로 개정되었다(Lourie et al, 1999). 아울러 최근에도 계속 새로운 종이 발견되고 있으며 이에 따른 새로운 개정이 이루어지고 있다.

이처럼 근연종들 사이에서 분류학적 보고와 계통분류적 유연관계의 추정사이의 논쟁은 불가피하며, 형태학적 분류의 한계를 극복할 수 있는 방법으로서 유전적 접근에 관심을 갖게 되었다(Arnaud et al., 1999; Bowen et al., 2001; Burrige and White, 2000; Colborn et al., 2001; Grant and Leslie, 2001; McMillan and Palumbi, 1995; Muss et al., 2001).

Kocher et al (1989)이 cytochrome *b* 유전자의 일부분을 universal primers 로 이용하여 PCR방법을 통해 성공적으로 증폭한 이후로, 계통관계 추정에 있어서 cytochrome *b* 유전자의 염기서열을 이용한 연구가 폭발적으로 증가하였다. 이러한 유전자가 갖고 있는 여러 가지 유리한 점들 때문에, 수많은 연구자들이 어류 진화의 다양한 문제를 연구하기 위하여 미토콘드리아의 cytochrome *b* 유전자를 이용해 왔다 (Brito et al., 1997; Korcher and Stepien, 1997; Song et al., 1998; Rocha-Olivares et al., 1999; Allegrucci et al., 1999). 이 유전자는 아마도 현재까지 척추동물에서 가장 광범위하게 염기서열이 알려진 유전자이며(Irwin, 1991; Johns and Avise, 1998), 그 단백질 산물은 구조와 기능 및 진화의 측면에서 가장 잘 연구된 분자들 중의 하나이다(Esposti et al., 1993).

Cytochrome *b* 유전자를 이용한 실고기어류의 계통분류로는 해마속 (Genus *Hippocampus*)에 특히 많은 연구가 되었으며(Sara, 1999; Casey, 1999; Peter, 2003), 뿐만아니라 cytochrome *b* 유전자, 12S rRNA 그리고 16S rRNA 유전자를 함께 이용한 연구도 행해진바 있다(Wilson et al., 2001).

본 연구에서는 현재 형태학적 접근만으로는 그 분류가 모호한 실고기어류를 대상으로 mitochondrial cytochrome *b* 유전자의 염기서열을 근거한 분자계통학적연구를 실시하여 그 결과가 기존의 형태학적 분류와의 차이를 조사하고, 이를 통해 실고기어류의 진화에 따른 형태적 변화를 유추해보는 것을 연구 목적으로 두고있다.

Table 1. List of species of Syngnathids to be examined

Order	Suborder	Family	Scientific Name	Abbreviated species name
Syngnathiformes	Syngnathoidei	Syngnathidae	<i>Syngnathus schlegeli</i>	S_sch
			<i>Syngnathus acus</i> *	S_acu*
			<i>Syngnathus leptorhynchus</i> *	S_lep*
			<i>Syngnathus louisianae</i> *	S_lou*
			<i>Syngnathus scovelli</i> *	S_sco*
			<i>Corythoichthys haematopterus</i>	C_hae1,2
			<i>Corythoichthys intestinalis</i> *	C_int*
			<i>Hippocampus histrix</i>	H_his1,2
			<i>Hippocampus ingens</i>	H_ing
			<i>Hippocampus abdominalis</i> *	H_abd*
			<i>Hippocampus kuda</i>	H_kud
			<i>Hippocampus erectus</i> *	H_ere*
			<i>Hippocampus kelloggi</i> *	H_kel*
			<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	S_bia
			<i>Dunckerocampus dactylophorus</i>	D_dac
			<i>Phyllopteryx taeniolatus</i>	P_tae
	Aulostomodei	Aulostomidae	<i>Aulostomus chinensis</i>	A_chi
		Centriscidae	<i>Aeoliscus strigatus</i>	A_stri
		Fistularidae	<i>Fistularia commersonii</i>	F_com
Gasterosteiformes		Gasterosteidae	† <i>Gasterosteus aculeatus</i>	G_acu
			† <i>Gasterosteus wheatlandi</i> *	G_whe*
			† <i>Pungitius kaibarae</i>	P_kai

* The cytochrome *b* sequence some of Syngnathinae and Hippocampinae were obtained from GenBank(Wilson, A. B., 2001. Casey, S. P., 1999).

† Outgroups were selected in the Gasterosteiformes.

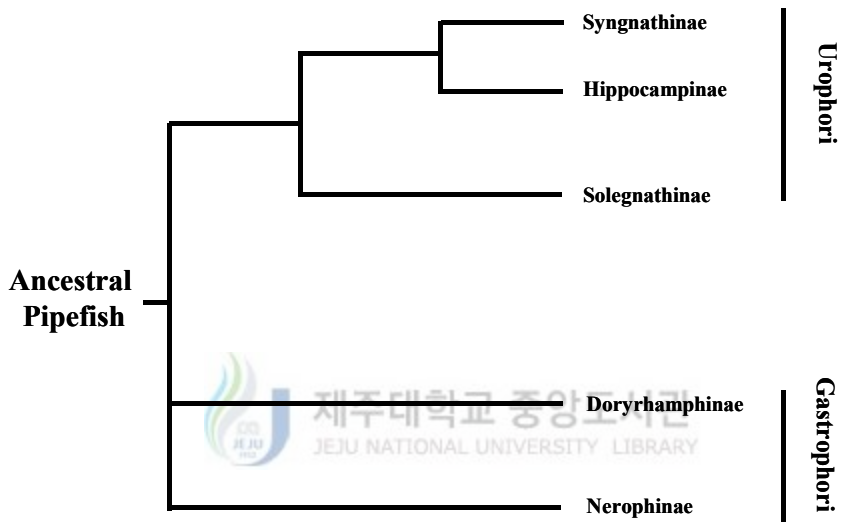


Fig. 1. Phylogenetic hypotheses of the Syngnathids based on the morphological characters by brood pouch (Herald, 1959).

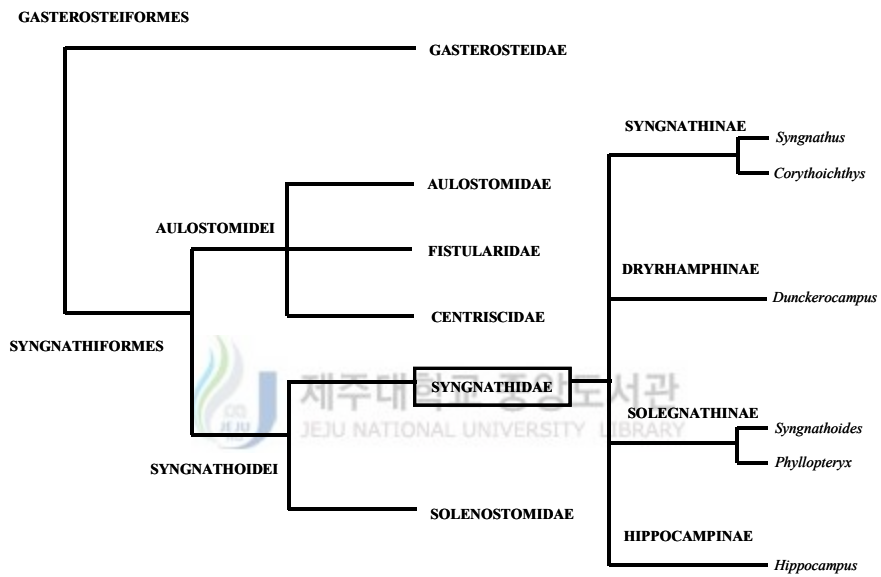


Fig. 2. Phylogenetic hypotheses of the Syngnathiformes based on the morphological characters (Kuitert, 2000).

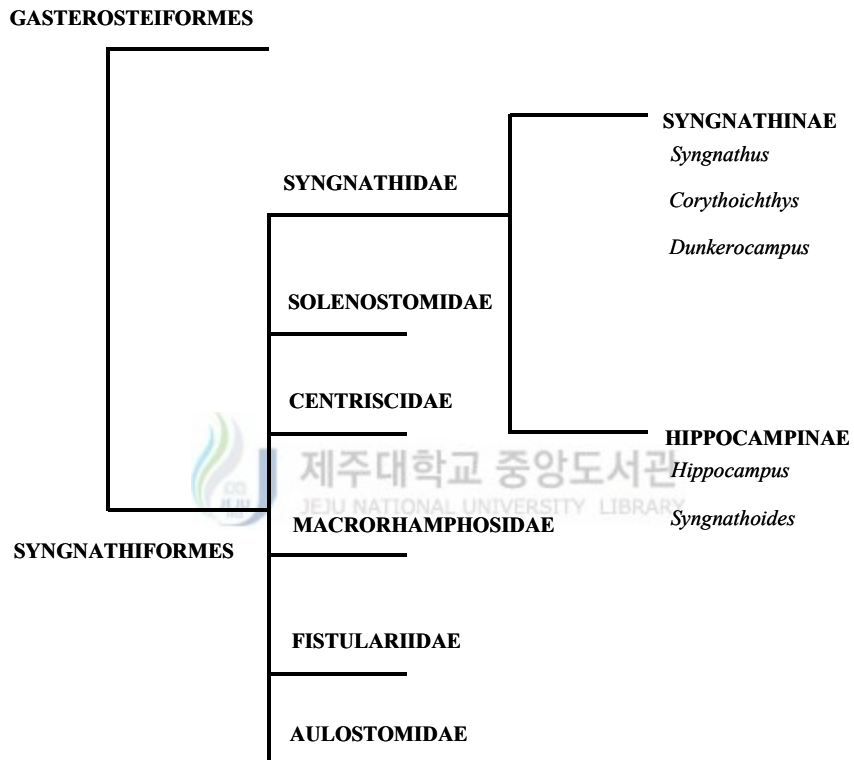


Fig. 3. Phylogenetic hypothesise of the Syngnathiformes based on the morphological characters (Masuda, 1992).

II. 재료 및 방법

1. 시료

각 개체로부터 간이나 기저 근육조직을 추출하여, 액체질소에 신속하게 냉동시켜 -80℃에 보관하였으며, 동정은 Kuitert(2000)와 Masuda(1992)의 지침을 참고하여 종수준까지 행하였다. 대부분의 시료는 제주도 연근해에서 수집되었으며, 일부는 오래전 주의 Covallis 시의 관상어 수족관에서 구입하였으며, 시료중 실고기(*Syngnathus schlegelii*)는 제주대학교 양식실험실 노점교수님, 그리고 New Zealand Pot-belly Seahorse, Weddy Seadragon(*Hippocampus abdominalis*, *Phyllopteryx taeniolatus*), 가시고기(2종; *Gasterosteus aculeatus*, *Pungitius kaibarae*)는 코엑스 아쿠아리움 한원민 대리님으로부터 제공 받아 사용하였다.

2. Total DNA 추출

30-50 mg의 간이나 기저 근육조직으로부터 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc.)을 이용하여 total DNA 시료를 추출하였다. DNA의 농도는 분광광도계(He Mios 8, Unicam Ltd, UK)를 이용하여 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 확인하였고, DNA의 순도는 분광광도계에서 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 확인하였다.

3. PCR 증폭

Cytochrome *b* 유전자의 주변부 tRNA 서열에 기초하여 디자인된 forward primer (Glu-F1, 5'-CCA CCG TTG T(T/C)(G/A) TTC AAC TAC-3')과 reverse primer (Thr-R1, 5'-CCG (G/A)(T/C)T TAC AAG A(T/C)(T/C) GGC GTT C-3')을 이용하여 중합효소연쇄반응법에 의하여 각 말단 부위 근처의 tRNA 부위를 포함한 전체 Cytochrome *b* 유전자들을 증폭하였다.

PCR 반응은 약 0.1-0.3 μg 의 genomic DNA 10 μl , 50 μM 의 각각의 primer (forward primer, Glu-F1과 reverse primer, Thr-R1) 1 μl , 10 reaction buffer(bioneer co.) 5 μl , 2.5 mM의 각각의 dNTP (bioneer co.) 5 μl 와 1-2 unit의 Taq polymerase (bioneer co.)를 초순수를 이용하여 최종 volume이 50 μl 가 되도록 한 후에, PCR 반응시 반응물의 증발을 막기 위해 1-2 방울의 mineral oil을 첨가하여, Programmable Thermo Controller (RTC-100, MJ Research Inc.)에서 반응시켰다. PCR 반응 주기는 최초의 denaturing step을 위하여 94°C에서 2분 동안 1회 반응시키고, 이어서 반복주기로서 94°C에서 45초, primer annealing을 위해 43°C에서 1분, primer extension을 위하여 72°C에서 1분 30초씩 총 30회의 반복주기를 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 7분 동안 마지막 extension을 실시하였다.

1 × TBE buffer (45 mM Tris-borate, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide로 염색시킨 0.8% agarose (Agarose LE, Promega Co.) gel에 PCR 증폭 산물과 1-kb DNA ladder (MBI Fermentas)를 동시에 loading 하여 그 밴드 길이를 비교한 후 유전자를 확인하였다. 유전자의 순수 정제를 위해 PCR 산물을 low-melt gel (LMP agarose, Bethesda Research Laboratories; ethidium bromide 염색) 상에서 전기영동을 한 후, 예상되는 DNA fragment를 함유한 gel 부위를 UV-lamp 하에서 내려내어 GeneClean II Kit (Bio 101 Inc.)을 이용하여 정제하였다.

Table 2. Primer used for PCR amplification and sequencing

Primer Name	Sequence	Target	Direction
Glu-F1^a	5' - CCA CCG TTG TYR TTC AAC TAC A - 3'	cyt^b	Forward
Thr-R1^a	5' - CCG RYT TAC AAG AYY GGC GTT C - 3'	cyt^b	Reverse
SK^b	5' - CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC - 3'		
T7^b	5' - GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C - 3'		

a: Primer designed for PCR amplification.

b: Sequencing primer designed for the pBluescript phagemid vector.

4. PCR 산물의 Cloning

PCR 산물의 cloning을 위한 숙주와 벡터로서 각각 대장균의 DH5 α 균주와 pBluescript II SK(-) (Stratagene Co.)를 사용하였다.

37°C에서 2시간 동안 제한효소 Hinc II를 이용하여 2.5 μ g의 pBluescript II SK(-) 벡터를 절단시킨 후에, High pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals)을 이용하여 제조사의 방법으로 그 벡터를 정제하였다.

정제 후에는 agarose gel 상에서 그 농도를 측정하였으며, Ligation은 Hinc II로 절단된 1 μ l의 pBluescript II SK(-) 벡터, 2 μ l의 Insert DNA, 1 μ l의 10 ligation buffer와 1 unit의 T4 DNA ligase (Promega Co.)를 함유하여 최종 volume 10 μ l가 되도록 한 후에 15°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 그 ligation된 산물을 DH5 α competent cell과 함께 새로운 eppendorf tube에 넣어서 42°C에서 1분 30초 동안 heat Shock을 가한 후에, 항온교반기(shaking incubator)를 이용하여 37°C에서 30분 동안 그 혼합물을 배양함으로서 DH5 α competent cell로 형질전환 시켰다.

그 cell들을 ampicillin, X-gal과 IPTG가 처리된 LB (Luria-Bertani) plate에 도말하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 그 배지에서 white colony를 선별하여 ampicillin이

들어있는 LB broth 배지에서(37℃) 항온교반기를 이용하여 16시간 배양하였으며, double-stranded sequencing을 위하여, 예상되는 clone들을 함유한 overnight culture에서 High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals)을 이용하여 plasmid DNA를 수집하였다.

Plasmid DNA를 0.8% agarose gel에 loading하여 cloning과 형질전환이 성공적으로 이루어졌는지를 함께 loading한 1 kb-ladder와 절단되지 않은 pBluescript II SK(-)의 밴드와 비교함으로써 확인하였다.

5. 염기서열 결정 및 자료 분석

Cloning을 통해 얻은 재조합 plasmid DNA를 전문업체에 의뢰하여 sequencing하였다. 염기서열 자료를 얻기 위하여 T7과 SK primer를 사용하였으며, 이를 통해 얻은 자료는 DNAssist (shareware, version 1.02, Hugh Pattern, 2000) 프로그램을 이용하여 연속된 염기서열 자료로 정렬하였다. 정렬된 자료는 peak data를 육안으로 확인하여 보정하였다.

염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상 및 codon usage는 MEGA(version 2.0, programmed by kumar et al., 2001) 프로그램으로 계산되었다.

각 codon 위치에서 p distance values에 대한 transition과 transversion의 수를 plotting함으로써 포화도(level of saturation)를 추정하였으며, 이를 통해 포화된 자료로부터 유발되는 noise를 방지하기 위하여, 모든 분석은 첫 번째와 두 번째 codon 위치에 있어서의 transition과 transversion을 이용한 자료군으로 분석되었다(Song et al., 1998; Nei and Kumar 2000). Phylogenetic tree는 parsimony와 distance 방법으로 작성되었으며, PAUP (version 4.0b8, Swofford, 1998) 프로그램을 이용하였다.

PAUP 프로그램을 통한 parsimony 분석에서 분지도(phylogenetic tree)는 maximum parsimony (Fitch, 1971; MP)와 maximum likelihood 방법(Felsenstein, 1985; ML)에 의하여 작성되었다. 가장 단순한 분지도를 찾기 위하여 parsimony algorithm의 heuristic search option이 사용되었으며, 모든 자료는 동등하게 weighting하여 분석하였다.

distance의 계산은 MODELTEST version 3.06 (Posada, 1998)를 참고하여 HYK85 +G + I (Hasegawa et al. 1985) evolution model을 이용하였다.

Distance tree 는 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987; NJ)과 minimum evolution (ME)의 tree-building algorithm으로 작성되었다.

Tree의 극성을 결정하기 위한 참조분류군(outgroup)으로서 큰가시고기목의 *Gasterosteus aculeatus*, *Gasterosteus wheatlandi* 그리고 *Pungitius sinensis*를 사용하였다.

생성된 tree의 각각의 internal node의 신뢰성을 통계적으로 평가하기 위하여, 1000회의 bootstrapping (Felsenstein, 1985)을 수행하였다. 각각의 bootstrap분석은 PAUP 프로그램을 이용하였다.



Ⅲ. 결과

1. 염기서열 결정과 염기 구성 편차

실고기어류(Syngnathids)의 분자계통분석을 위해 사용된 24종에 대한 cytochrome *b* 유전자의 완전한 염기서열이 확인되었다.

그 결과 조사된 이들 24종의 미토콘드리아 genome의 부분적인 유전자 순서는 일반적인 척추 동물의 유전자 순서와 동일하였다($tRNA^{Glu} - Cytb - tRNA^{Thr} - tRNA^{Pro}$).

Cytochrome *b* 유전자의 염기서열에 있어서 염기조성과 편차, codon usage를 Table 3, Table 4에 나타내었다. Table 4은 이들 24종의 cytochrome *b* 유전자들이 현재까지 연구된 다른 척추 동물들 처럼 불균등한 염기조성을 가지고 있다는 것을 보여주고 있다. 즉, 전체적으로 낮은 G(Guanine) 염기조성과 거의 균일한 나머지 T(Thymine), C(Cytosine) 및 A(Adenine)의 염기조성을 보여주고 있다. 특히 지금까지 연구된 어류에서처럼 (Meyer, 1993; Cantatore et al., 1994; Song et al., 1998; Allegrucci et al., 1999), 첫 번째 코돈 위치에서는 거의 균일한 염기조성을 보이는 반면에 두 번째와 세 번째 코돈 위치들은 다른 염기들에 비하여 G 염기조성이 상대적으로 낮았다. 또한 첫 번째 코돈 위치에서 계산된 염기구성 편차는 두 번째와 세 번째 코돈 위치에서의 편차보다 더 작았다(all : 0.12, first : 0.027, second : 0.215, third : 0.237). 이러한 경향은 percid 어류들에서도 보고되고 있다(all: 0.139, first : 0.045, second : 0.217, third : 0.227; Song, 1998).

2. 염기서열의 진화

정렬된 24종의 cytochrome *b* 유전자들은 모두 1140 bp의 nucleotide들로 이루어져 있으며, 615개의 variable site들과 520개의 parsimony informative site들을 포함하고 있었다. 예상했던 것처럼, 세 번째 코돈 위치들이 첫 번째 혹은 두 번째 코돈 위치들보다 변이가 더 심하였다.

Cytochrome *b* 유전자들로부터 추정되는 번역 산물은 380개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 이 유전자들의 번역은 ATG 개시코돈으로 시작되어 TAA 혹은 AGA 종결코돈으로 종결되는 것으로 추정되었다. 번역의 종결을 위한 transcriptional processing과 polyadenylation 모델(Anderson, 1981)에 근거한 이러한 가설은 이들 cytochrome *b* 유전자들의 전사물들이 U 혹은 AG로 끝나며 이들은 전사 후 번역전 polyadenylation 과정에 의하여 종결코돈(UAA 혹은 AGA)으로 가공되는 것으로 추정하고 있다.



```

#Achi ATG GCC AGC CTC CGA AAG ACC CAC CCT CTC TTG AAA GTC GGT AAT [ 45]
#Chae1 ... ..A. ..A ..C ..A ..A ... ..C ..T C.C ... A.. ACA ... [ 45]
#Ddac ... ..A. ..A ..G ..A ... ..A ..A C.T ... A.T .CC ..C [ 45]
#Gacu ... ..A ... ..A ... ..A ..G ... ..C ..A C.A ... A.. .C. ..C [ 45]
#Hhis2 ... ..A. ..T ... ..A ..T ... ..C A.. C.T ... A.T .CC ..C [ 45]
#Hing ... ..A. ..T ... ..A ..T ... ..C A.T C.C ... A.T .CC ..C [ 45]
#Hhis1 ... ..A. ..T ... ..A ..T ... ..C A.. C.T ... A.. .CC ..C [ 45]
#Sbia ... ..A. ... ..C ..A ... ..A A.T A.T ... A.T .CC ..C [ 45]
#Ssch ... ..A. ... ..A ... ..A A.T C.A ... A.T .C. ... [ 45]
#Sacu ... ..A. ..A ... ..A ... ..C A.. C.A ... A.T .C. ... [ 45]
#Slep ... ..A. A.A ... ..A ..T ... ..A ..A ... A.T .C. ... [ 45]
#Slou G.. ... ..A. ..A ..G ..A ... ..T ..C A.. C.A ... A.. .CC ... [ 45]
#Ssco ... ..T C.. ..A ... ..A ... ..A ..T C.A ... A.. .C. ... [ 45]
#Cint ... ..A. ..A ..C ..A ..A ... ..C ..T C.C ... A.. ACA ... [ 45]
#Habd ... ..A. ..T ... ..A ... ..C ... C.T ... A.T .CC ..C [ 45]
#Hkud ... ..A. ..T ... ..A ..T ... ..A ..C.T ... A.. .CC ..C [ 45]
#Here ... ..A. ... ..A ... ..G A.T C.T ... A.. .CC ... [ 45]
#Hkel ... ..A. ..T ... ..A ..T ... ..C A.. C.T ... A.. .C. ..C [ 45]
#Chae2 ... ..A. ..A ..C ..A ..A ... ..C ..T C.C ... A.. ACA ... [ 45]
#Ptae ... ..A. ..T ... ..A ... ..C ... C.T ... A.T .CC ..C [ 45]
#Pkai ... ..A ... ..A ... ..A ..G ... ..A C.A ... A.. .C. ..C [ 45]
#Astr ... ..GCT ..T ..G ..A ... ..C ..T C.A ... A.T .CA ... [ 45]
#Gwhe ... ..A ... ..A ... ..A ..G ... ..C ..A C.A ... A.. .CA ..C [ 45]
#Fcom ... A.A ... ..T ... ..A ..A ..T ..C A.. A.C ... C.. .CA ..C [ 45]

```

Fig. 4. Alignment of the cytochrome *b* sequence of sepecies of Syngnathids, and the Gasterosteiformes used as the outgroup.

Dots represent nucleotides identical to those of the first sequence.

#Achi GAC GCA CTA GTT GAC CTC CCC ACT CCC GCG ACC TTA TCA GTA TGA [90]
 #Chae1T G.G ..T T.A .A. A.CC ..G [90]
 #DdacAT G.C ... T.C .A. ACC [90]
 #Gacu A.TC G.C ... T.A .AT A.T [90]
 #Hhis2 ..T ..C T.G ..A ..T ..A ..T G.A ..A T.A .AT A.T ..C [90]
 #Hing ..T ..C ..T ..AA ..T G.A ..A T.A .AT A.T ..T [90]
 #Hhis1 ..T ..C T.G ..A ..T ..A ..T G.A ..A T.A .AT A.T ..C [90]
 #Sbia A.T ... A.C ..AT ..T G.C ..T T.A .A. A.T ..T ..T ..G [90]
 #SschC ..C ..AA G.A ..A T.C .A. A.C ..G ..C ... [90]
 #Sacu ..T ..C ..C ..AA G.A ..A T.A .AT A.C ..C C.C ... [90]
 #Slep ..T ..C ..T ..AT ..T G.A ..A T.A .AT A.T ..T C. ... [90]
 #SlouC ..C ..AA ..A G.A ..A T.C .A. A.C ... A.C ATG [90]
 #Ssco C.T ..C T.TA G.A ..A T.A .A. A.TC ... [90]
 #CintT G.G ..T T.A .A. A.CC ..G [90]
 #Habd A. ..C ..T ..AA ..T G.A ..A T.A .A. A.T ..T ..T ... [90]
 #HkudC ..T ..AA ..T G.A ..A T.A .A. A.C ..T [90]
 #Here A. ..C ..T ..AG ..T G.A ..A T.T .A. A.C ..T [90]
 #Hkel ..T ..C ..C ..AA ..T G.A ..A T.A .A. A.C ..TG [90]
 #Chae2T G.G ..T T.A .A. A.CC ..G [90]
 #Ptae A. ..C ..T ..AA ..T G.A ..A T.A .A. A.T ..T ..T ... [90]
 #Pkai A.T ... T. G.C ... T.A .AT A.C [90]
 #Astr A.TT G.C ... T.C .A. A.C ..T ..G ... [90]
 #Gwhe A.TA G.C ..T T.A .AT A.T ..G [90]
 #FcomTG ..T ..T ..A G.A ..A T.C .A. A.T ..G ..G ... [90]

Fig. 4. Continued.

#Achi TGA AAC TTT GGG TCA CTC CTT GGC CTA TGC TTA ATC ATC CAA ATC [135]
 #Chae1C ..ACT ... C.. GC. .CG [135]
 #DdacT ..C ..C ..T T.A ..G [135]
 #GacuT ..CA ..TTT [135]
 #Hhis2TC T.A T.A ..AT ..G GGT GCT [135]
 #HingTC T.A T.A ..AG GG. GCT [135]
 #Hhis1TC T.A T.A ..AT ..G GGT GCT [135]
 #SbiaT ..C ..C ..T ... T.G ..G T.G ..T ... GCT GCA [135]
 #SschTTG ..A T.. ..T ..G GGA GCT [135]
 #Sacu ..G ..TA ..G T.. ..T ... GGA GCA [135]
 #SlepCT ..T T.A ..AT ... GGA GCA [135]
 #SlouTT ..T ..A ..A T.. ..T ... GGT GCA [135]
 #SscoTA ..CA ..AT C.. GCT GCG [135]
 #CintC ..ACT ... C.. GC. .CG [135]
 #Habd ..GCT T.G T.A ..AT ... GG. GCT [135]
 #HkudC ..A ..C T.A ..A T.. ..T GC. [135]
 #HereC T.A T.A ..A ..GA GCT [135]
 #HkelT T.A T.G ..A T..T ..C. ..G ... [135]
 #Chae2C ..ACT ... C.. GC. .CG [135]
 #Ptae ..GCT T.A T.A ..AT ... GG. GCT [135]
 #PkaiT ..C ..AA T.. [135]
 #AstrC ..C ..C ..G ..C ..A GC. .C.T [135]
 #GwheT ..C ..AA ..TTT [135]
 #FcomT ..CA ..C ..C ... C.. ... GCA [135]

Fig. 4. Continued.

#Achi GCC ACT GGC CTC TTC CTT GCT ATA CAC TAC ACC CCT GAT ATC GAC [180]
 #Chae1 CT. ..C ..A T.AG T.ACA [180]
 #Ddac CTT ..A ..A ..A ..T T.A ..C T.AC. [180]
 #Gacu .T.G ..TAT T.CT .CT [180]
 #Hhis2 CTT ..A ..G T.A ..T T.A ..AT T.A ..C ..T .CA [180]
 #Hing CT. ..A ..A T.A ..T T.A ..A ..G ..T T.AT .CA [180]
 #Hhis1 CTT ..A ..G T.A ..T T.A ..AT T.A ..C ..T .CA [180]
 #Sbia CTT ..AAA ..CT ..T ... T..CA [180]
 #Ssch CT. ..C ..G ..AC ..A T.A ..CC. [180]
 #Sacu CT.G ..A ..T ..C ..A T..CT [180]
 #Slep CTTA T.AA T.ACA [180]
 #Slou CT. ..C ... T.AA ..ATT T.G ..CC. [180]
 #Ssco CT. ..C ..A T.A ..T ..C ..A T.AT .CG [180]
 #Cint CT. ..C ..A T.AG T.ACA [180]
 #Habd CTT ..A ..A T.A ..T T.A ..A T.AT .C. [180]
 #Hkud CTT ..A ..A T.A ..T ..A ..A G..T ... T.AT .CA [180]
 #Here CTT ..A ..A ..A ..T ..A ..A T.A ..C ..T .CA [180]
 #Hkel CT. ..A ..A ..A ..T ..A ..AT ..T ... T.AT .CA [180]
 #Chae2 CT. ..C ..A T.AG T.ACA [180]
 #Ptae CTT ..A ..A T.A ..T T.A ..A T.AT .C. [180]
 #Pkai CTAT ..TTA T.AT .C. [180]
 #Astr CTT ..A ... T.AG ..A T.C ..C ... TC. [180]
 #Gwhe CTT ..C ..G ..TAT ..T ..T T..T .CT [180]
 #Fcom ..G ..A ..A ..AA ..AA T.CCA [180]

Fig. 4. Continued.

#Achi TCC GCC TTC TCT TCC GTA GCC CAT ATC TGC CGA GAC GTA AAC TAC [225]
 #Chae1 A.. ..A ..T ..CCT ..C ..T ..T ..T .TT [225]
 #Ddac A.. ..AC ..A ..C A.A ..CT [225]
 #Gacu A.A ..T ..T ..CC .GA ..CTT ... [225]
 #Hhis2 A.. ..A ..TA ... A.ATT [225]
 #Hing A.. ..A ..TA ... A.ATT [225]
 #Hhis1 A.. ..A ..TA ... A.ATT [225]
 #Sbia A.T ..AA ..T ..T ..CTT [225]
 #Ssch A.A ..AC ..A ..C A..TTC ... [225]
 #Sacu A.A ..AA ..C A..TC [225]
 #Slep A.A ..AC ..A ..T A..T ..T ..T ..TT ... [225]
 #Slou A.A ..AA ..C A.TTTC ..T ... [225]
 #Ssco A.A ..AA ..T A.A ..C ..TTC [225]
 #Cint A.. ..A ..T ..CCT ..C ..T ..T ..T .TT [225]
 #Habd A.. ..AA ..A ... A.A ..C ..T ..T ..G [225]
 #Hkud A.. ..AA ... A.ATGT ... [225]
 #Here A.. ..TA ... A.ATG ..T [225]
 #Hkel A..A ... A.ATT [225]
 #Chae2 A.. ..A ..T ..CCT ..C ..T ..T ..T .TT [225]
 #Ptae A.. ..AA ..A ... A.A ..C ..T ..T ..G [225]
 #Pkai A.AT ..AC .GAT [225]
 #Astr A.A ..AT ..CC ..T ..T [225]
 #Gwhe A.A ..T ..TT ..T .GG ..CTT [225]
 #Fcom A.T ..AATCGC [225]

Fig. 4. Continued.

#Achi GGA TGA CTA ATT CGA AAC ATG CAC GCC AAC GGA GCC TCC TTC TTC [270]
 #Chae1 ..C ... T..C ..T ..AA ..T ..G ..A ..A ..T ... [270]
 #Ddac T.G ..C ..C ..TT ... [270]
 #Gacu ..C C.C ..TT ..C ..AT ... [270]
 #Hhis2 ..TC ..T ..A ..TTA ..AT [270]
 #Hing ..T ... T..C ..T ..A ..T ..T ..TA ..AT [270]
 #Hhis1 ..TC ..T ..A ..TTA ..AT [270]
 #Sbia ..CT ..C ..C .GT ..ATC ..A ..T [270]
 #Ssch ..GT ..C ..C ..TC ..A ..TT [270]
 #Sacu ..GC ..T ..TC ..A ..AT [270]
 #Slep ..G ... T..T ..T ..A ..T ..T ..TA ..AT [270]
 #Slou ..G ... T.. ..C ..CA ..T ..TA ..A [270]
 #Ssco ..GC ..T ..T ..A ..TC ..A ..A ..T ..T [270]
 #Cint ..C ... T..C ..T ..AA ..T ..G ..A ..A ..T ... [270]
 #Habd ..C ... T.. ..C ..CA ..T ..TA ..TT [270]
 #Hkud ..TCA ..T ..TA ..TT [270]
 #Here ..TC ..T ..A ..T ..T ..TA ..TT [270]
 #Hkel ..TCA ..TT ..G ..A ..TT [270]
 #Chae2 ..C ... T..C ..T ..AA ..T ..G ..A ..A ..T ... [270]
 #Ptae ..C ... T.. ..C ..CA ..T ..TA ..TT [270]
 #Pkai T.A ..TG ..A ..A ..T ... [270]
 #AstrC ..C ..T ..T ..ATC ..A [270]
 #Gwhe ..CCC.CC ..AT ... [270]
 #Fcom ..C ..G ..T ..C ..G ..T ..A ..T ... C.. ..G ..AT ... [270]

Fig. 4. Continued.

#Achi TTC ATT TGC ATC TAC GCC CAC ATC GCC CGA GGC CTC TAT TAC GGC [315]
 #Chae1T CT.T ..AG [315]
 #Ddac ..TT ... CT. ..T ..T ..AA ..T ..C ... [315]
 #GacuC ..TT ATG ..TG.A ..T ..C ..T ... [315]
 #Hhis2 ..TT TTA ..TGA ..TA [315]
 #HingT ..T ..T TTAAG ..TA [315]
 #Hhis1 ..TT TTA ..TGA ..TA [315]
 #SbiaT ATA ..TC ..TCA [315]
 #SschC ..T ..T ..T ATA T.G ..C ... [315]
 #SacuC ..T ..T ..T ATATT ..A ..C ..T ... [315]
 #Slep ..TT ..T ... ATA ..T ..TA T.A ..C ... [315]
 #SlouTT ATAT ..TT T.G ..C ... [315]
 #SscoC ..T ..T ... ATAT T.A ..CA [315]
 #CintT CT.T ..AG [315]
 #Habd ..TT ..T ... CTA ..T ..T ..A ..G ..G ..T ..CA [315]
 #Hkud ..T ..C ..T CTA ..T ..T ..AA ..T ..CG [315]
 #Here ..T ..C ..T ..T ..T CTGT ..AA ..T ..C ..T ..A [315]
 #Hkel ..T ..C ..T CTTT ..AGCA [315]
 #Chae2T CT.T ..AG [315]
 #Ptae ..TT ..T ... CTA ..T ..T ..A ..G ..A ..T ..CA [315]
 #PkaiC ..T ..T ... ATGT ..GAA ..TT ... [315]
 #AstrC CTTG ..T ..CG [315]
 #Gwhe ..T ..C ..T ATGG.AC ... [315]
 #FcomCT ... ATGT ..AT ... [315]

Fig. 4. Continued.

#Achi TCT TAC CTA TAC AAA GCG ACC TGA AAT CTC GGA GTA GTA CTC CTC [360]
 #Chae1 ..C C.. ..T ..T ..G .AA ..TC A.T ..C ... A.T ..T ..A [360]
 #Ddac AAC A.. A.. ... A.TT [360]
 #Gacu AAC A.T A.T ..T ..A [360]
 #Hhis2 ..A ... T.. ..TAA G..TT T.A [360]
 #Hing ..A ... T.. ..TAA ..TC G.TTA T.A [360]
 #Hhis1 ..A ... T.. ..TAA G..TT T.A [360]
 #SbiaT AA ..AC A..C ... T.T ..A [360]
 #Ssch ..C ..T ..C ..TA. A.T ..G ..C ..C ..T ..T [360]
 #Sacu ..CTAA G.. ..G ..T A.C ..A ..G [360]
 #Slep ..A ..T T.G ..TAAC A.T ..TT ..A ... [360]
 #Slou ..C ..T T.. AAC G.. ..T ..C A.T ... T.G [360]
 #SscoT AA ..A A.T ..C ..T ..T ..G ..A [360]
 #Cint ..C C.. ..T ..T ..G .AA ..TC A.T ..C ... A.T ..T ..A [360]
 #HabdT T.G ..TAA G.GC ..C ..T ..A [360]
 #Hkud ..A ..T T.. ..TAA ..T G.GT ..A [360]
 #Here ..C ..T T.. ..TAA G.TT ..A [360]
 #Hkel ..G ..T T.. AA ..T G.TC A.T ..T ..A [360]
 #Chae2 ..C C.. ..T ..T ..G .AA ..TC A.T ..C ... A.T ..T ..A [360]
 #Ptae T.G ..TAA G.GC ..C ..T ..A [360]
 #Pkai ..C AA ..AC A.. ..G ..T ..CA [360]
 #Astr ..CT.A. ..AC G.T ..G ..T ..T ..A ... [360]
 #Gwhe T.. ..T ..G .A.C A.TG ..T ..T T.A [360]
 #Fcom ..AC ..TAA G.A ..C ..T ..C ..A ... [360]

Fig. 4. Continued.

#Achi CTT CTT GTA ATA ATA ACG GCC TTC ATG GGC TAT GTC CTC CCC TGA [405]
 #Chae1G GGTG ... G.CCG [405]
 #Ddac A.. T.G GC. ..T ..A ... G.A ..AA ..A ..A ... [405]
 #Gacu ... T.A ..C ..GA G.T ..TT ..A ... [405]
 #Hhis2GCC ..T ..A ... G.A ..AA T.A ..T ... [405]
 #HingGCC ..T ..A ... G.A ..AG T.A ..T ... [405]
 #Hhis1GCC ..T ..A ... G.A ..AA T.A ..T ... [405]
 #Sbia ..C T.A ..T ... GC. ..TT G.A ..A ..CG [405]
 #Ssch T.A ..G GCC ..TT G.AC ... T.A ..A ... [405]
 #Sacu T.A ..C GCT ..C ..T ..T G.AC ... T.A ..G ... [405]
 #Slep ..A GC. ..A ..T ..T G.. ..TA [405]
 #Slou ..AG ... GCT ..C ..T ..T G..CA ..A ... [405]
 #Ssco ..G ..C GCC ..A ..T ... G.AG ..G ..A ... [405]
 #CintG GGTG ... G.CCG [405]
 #Habd ..CT ... GCT ..T ..A ..T G.A ..G ..C ..T ..A [405]
 #HkudGCC ..T ..A ... G.A ..AT T.A [405]
 #HereGCC ..C ..A ... G.A ..TAG [405]
 #Hkel ..CGCC ..T ..A ..T G.A ..A ..C ..T ..A [405]
 #Chae2G GGTG ... G.CCG [405]
 #Ptae ..CT ... GCT ..T ..A ..T G.A ..G ..C ..T ..A [405]
 #PkaiA ..C ..GA ..A ... G.T ..G ..C ..T ..A ..A ... [405]
 #Astr ..C T.A T..T G.TC ..A ..T ..T ... [405]
 #Gwhe ..C T.A ..TA ..T ... G.T ..TT ..T ..A ... [405]
 #Fcom ..C ..AGT ..T G.CG ..G ..A ... [405]

Fig. 4. Continued.

#Achi GGA CAA ATA TCT TTC TGA GGA GCA ACC GTC ATT ACT AAC CTC CTA [450]
 #Chae1C ..T ..GAC ..CA A.. [450]
 #DdacTCA ..C ..CC [450]
 #GacuAT ..A ..TCA ..T [450]
 #Hhis2G ..C ..TC ..A ..TCA A.. [450]
 #HingCC ..A ..TCA A.. [450]
 #Hhis1G ..C ..TC ..A ..TCA A.. [450]
 #Sbia ..GA ..TG ..T ..A ..TC ..T T.A A.. [450]
 #SschCG ..G ..A ..T ..CT A.. [450]
 #SacuCGA ..TCT A.. [450]
 #Slep ..TAC ..A ..T ..CA.. [450]
 #SlouG ..AGACA.G [450]
 #SscoCGAC ..C ..T ... A.. [450]
 #CintC ..T ..GAC ..CA A.. [450]
 #HabdG ..C ..TT ..A ..T ..CT T.A ACG [450]
 #HkudC ..A ..T ..C ..AA A.. [450]
 #HereCC ..A ..TCA A.. [450]
 #HkelCA.T ..A ..TCA A.. [450]
 #Chae2C ..T ..GAC ..CA A.. [450]
 #PtaeG ..C ..TT ..A ..T ..CT T.A A.G [450]
 #PkaiGT ..C ..AC [450]
 #AstrG ..C ..A ..ACG ..C [450]
 #GwheC ..A ..T ..CA ..C [450]
 #Fcom ..GG ..ACGC [450]

Fig. 4. Continued.

#Achi TCT GCT TTC CCA TAC GTA GGG GAC ACC CTA GTC CAA TGA ATC TGG [495]
 #Chae1C G.. ..T ..T .CT ..CC ..T G.. ... [495]
 #Ddac ..A ..A G.. ..C ..T ..C ..A A.. .A.TA [495]
 #Gacu ..A ..C G..T ..C A.. T.A T.. ..TT ..A [495]
 #Hhis2 ..T. ..C G.GT A.T ..C A.. GAT T.. ..TG G.G ..A [495]
 #HingC G.AT A.C ..C A.T GAT T.. G.A ..A [495]
 #Hhis1C G.GT A.T ..C A.. GAT T.. ..TG G.G ..A [495]
 #Sbia ..A ... G.A ..TA A.T GAT T.T ..A ..G ... G.T ..A [495]
 #SschA G.A ..T ..T A.T ..A ACG GA. ..C G.. ..A [495]
 #SacuG G.A ..C ... A.. ..C AC. GA. ..TG G.. ..A [495]
 #SlepA G.A ..T ... A.T ..A ACT GATA G.. ..A [495]
 #SlouA G.A ..C ... A.T ..T AC. GAT ..C ..T G.. ..A [495]
 #SscoC G.AA.T ..C ACT GAT ..T G.A ..A [495]
 #CintC G.. ..T ..T .CT ..CC ..T G.. ... [495]
 #HabdA G.AT ..T ..T A.. GA. T.. ..G ..G ... G.A ..A [495]
 #Hkud ..C ... G.AT A.C ..C A.T GAT T.. ..A G.G ..A [495]
 #Here ..C ... G.A ..T ..T ..T A.. GAT T.. ..A G.. ..A [495]
 #Hkel ..C ... G.G ..G ..T A.T ..T A.. GAT T.. ..AG G.G ..A [495]
 #Chae2C G.. ..T ..T .CT ..CC ..T G.. ... [495]
 #PtaeA G.AT ..T ..T A.. GA. T.. ..G ..G ... G.A ..A [495]
 #Pkai ..A ... G.. ..CC ..C A.. T.GAT ..A [495]
 #Astr ..A ..C G.AT ..G ..A A..GT ..A [495]
 #Gwhe ..A ..C G.T ..CT ..C A.. T.. T.. ..TT ..A [495]
 #Fcom G.T ..T ..T ..C ..T A.T ..G ..TG [495]

Fig. 4. Continued.

#Achi GGC GGC TTC TCG GTA GAC AAC GCC ACC CTC ACC CGC TTC TTC ACC [540]
 #Chae1G ..T ..TT ..AA ..GG.. [540]
 #DdacA ..T ..AGA ..T ..T G.A [540]
 #Gacu ..GT ..C ..TT.A ..A ..TT G.. [540]
 #Hhis2 ..G ..G ..T ..CT ..T ..T ... T.AA ..T ... G.A [540]
 #Hing ..A ..G ..T ..CT ..T ..T ... T.AA ..T ... G.A [540]
 #Hhis1 ..G ..G ..T ..CT ..T ..T ... T.AA ..T ... G.A [540]
 #Sbia ..GT ..A ..C ..TAG.A [540]
 #Ssch ..AA ..TT ..T ..T ..T ..A ..A ..T ... G.. [540]
 #SacuTA ..TTA ..AG.. [540]
 #Slep ..G ..TA ..T ..TT ..T ..T ..T ..AG.T [540]
 #Slou ..AA ..T ..TTA ..G ..G G.. ... G.. [540]
 #Ssco ..A ..AA ..TT ..T ..A ..TT G.. [540]
 #CintG ..T ..TT ..AA ..GG.. [540]
 #HabdT ..TTT.GT ..T ... G.G [540]
 #Hkud ..A ..A ..T ..CT ..T ..T ..AA ..T ..T G.A [540]
 #Here ..G ..G ..T ..TT ..T ..T ..AA ..T ... G.A [540]
 #Hkel ..G ..A ..TTAA ..G ... G.A [540]
 #Chae2G ..T ..TT ..AA ..GC.. [540]
 #PtaeT ..TTT.GT ..T ... G.A [540]
 #Pkai ..GT ..T ..CTAAT G.. [540]
 #AstrG ..T ..A ..TAGT ..A [540]
 #Gwhe ..AT ..T ..TT ..AT G.. [540]
 #Fcom ..AA ..TATT G.A [540]

Fig. 4. Continued.

#Achi CTC CAC TTC CTT ATG CCC TTC GTC ATC GTA GCA GCC ACA GTC CTC [585]
 #Chae1 T.TA C.C ..A ... A.. G.G .C. ... A.. ... A.. G.. [585]
 #Ddac T.T T.A C.C ..A ..T A.T G.A .C.A ... A.T G.. [585]
 #Gacu T.T T.A T.C ..A ..TT .CT .GT C.T G.. [585]
 #Hhis2 T.. ..T ..T T.A C.CT A.T G.A .C. ..C ..A T.. A.A G.T [585]
 #Hing T..T T.A C.C ..A ..T A.T G.A .C. ..C ..A T.. A.A G.T [585]
 #Hhis1 T.. ..T ..T T.A C.CT A.T G.A .C. ..C ..A T.. A.A G.T [585]
 #Sbia T.. ..TC C..T A.T G.A .CT ..TC C.G A.T [585]
 #Ssch T.T ..T ..T T.A C.T ..A ..T A.T G.. .CC ..CT A.T G.T [585]
 #Sacu T..A C.A ..A ... A.T G.. .CC ..CT A.. A.. [585]
 #Slep T.T ..T C.T ..A ..T A.T G.T .CC ..T C.G G.. [585]
 #Slou T.. ..T ... T.A C.C ..A ..T A.T ..T .CC ..CT ..T G.A [585]
 #Ssco T.T ..T ... T.A C.C ..A ..T ..T GGT .CC ..CC C.T G.T [585]
 #Cint T.TA C.C ..A ... A.. G.G .C. ... A.. ... A.. G.. [585]
 #Habd T.. ..T ... T.A C.T ..A ... A.T G.A .C. ..C ..A T.. A.A G.T [585]
 #Hkud T.. ..TA C.T ..A ... A.T G.T .C. ..C ..A ... A.G A.T [585]
 #Here T.. T.A C.C ..A ... A.T G.T .C. ..C ..A T.T A.A G.T [585]
 #Hkel T.. ..TA C.T ..A ... A.T G.T .C. ..C ..A T.. A.A G.. [585]
 #Chae2 T.T .C.A C.C ..T ... A.. G.G .C. ... A.. ... A.. G.. [585]
 #Ptae T.. ..T ... T.A C.T ..A ... A.T G.A .C. ..C ..A T.. A.A G.T [585]
 #Pkai T..T T.A T.C A.. ..T .CC .G.G C.A G.. [585]
 #Astr T.T T.CT ... C.A .C. ..C ..A ..C C.A A.T [585]
 #Gwhe T.. T.A T.T ..TA ..T .CC .GT ..T ... C.T G.T [585]
 #Fcom T..C T.. ..G ... A.T ..T .C. ..GGC ..T A.. [585]

Fig. 4. Continued.

#Achi CAC CTC CTT TTC CTA CAT GAG ACA GGG TCA AAT AAC CCG CTG GGG [630]
 #Chae1 T.AC ..C C.A ..C ..G ..CC GCC ..T [630]
 #DdacT T.ACCGT ..C GCT ..C [630]
 #GacuTT ..C C..C ..TT ..T ..C [630]
 #Hhis2A T.ATT GCA ..T [630]
 #Hing ... T.A ..ACACT GCA ..T [630]
 #Hhis1A T.ATT GCA ..T [630]
 #SbiaG.CTACC GCA ... [630]
 #SschT T.G ..T ..T ..C ..ACT GCA ..A [630]
 #SacuT T.AT ..CC ..TT GCA ... [630]
 #SlepAC ..ATA GCC ..A [630]
 #SlouA T.G ..T ..CAC ..T ..CT GCA ..T [630]
 #SscoT ..AC ..C C.A ..G ..CC ..T ..C GC. ... [630]
 #CintT.AC ..C C.A ..C ..C ..G ..CC GC. ..T [630]
 #Habd ..T ..G ..AT ..C ..AACT GCA ..A [630]
 #HkudA ..CCAA ..T GCC ..A [630]
 #HereA ..CCAG ..C ..T ..T GCC ..A [630]
 #Hkel ... G.A ..C ..T ..T ..C ..AA ..TT GCC ..A [630]
 #Chae2 ..T ... T.AC ..C C.A ..C ..C ..G ..C ..CC GC. ..T [630]
 #Ptae ..T ..G ..AT ..C ..AA ..G ..CT GCA ..A [630]
 #PkaiTC ..C C.A ..C ..CCC ..C [630]
 #AstrGT.G ..CA GCC ..C [630]
 #GwheT ..CT ..C C.AC ..GT ..C ..T ..C [630]
 #Fcom ... A.. ..CC ..C ..A ..G ..TCA AC. ..C [630]

Fig. 4. Continued.

#Achi CTG ACC CGC AAC GCA GAC AAA GTG TCA TTC CAC CCA TAC TTC TCC [675]
 #Chae1 ..T .A. TCT G.T A.C C.CT [675]
 #Ddac T.A .A. TCA G.. ..T ..G ..ACT ..T [675]
 #GacuA. TCA G.. ..T A.C ..C ..TCT ..T [675]
 #Hhis2 A.T .A. TC. G.TT ... A.CT ..T ..T ..A [675]
 #Hing A.T .A. TC. G.TT ... A.C ..CT ..TA [675]
 #Hhis1 A.T .A. TC. G.TT ... A.CT ..T ..T ..A [675]
 #Sbia T.A .A. TCA G.. A.T A.CTC [675]
 #Ssch T.. .AT TCA G.. ..C ..T ... A.C ..TTT ... [675]
 #Sacu T.A .A. TCA G.. ..T ..T ... A.C ..TT ..T [675]
 #Slep ..A .AT TCG G.. ..T ..T ... A.C ..T ..TT ..TT [675]
 #Slou T.. .A. TCG G.. ..C A.C ..C [675]
 #SscoG. TCA G.. ..C A.C ..T ..TG [675]
 #Cint ..T .A. TCT G.T A.C C.CT [675]
 #Habd A.T .A. TCA G.. ..T ..T ... A.CC ..T ..T ..T [675]
 #Hkud A.C .AT TCT G.T A.C ..GCT C.A [675]
 #Here A.T .A. TCT G.TCT ..CA [675]
 #Hkel A.T .A. TCT G.T A.T ..TT ..GA [675]
 #Chae2 T.A ..T TCT G.T A.C C.CCT .TT [675]
 #Ptae A.T .A. TCA G.. ..T ..T ... A.CT ..T ..T ..T [675]
 #Pkai ..A .A. TCA G.T ..T A.C ..CTT ..T [675]
 #Astr ..C .A. TC. G.. ..C ..T ... A.T ..CTA [675]
 #Gwhe ..C .A. TCA G.. ..T ..T ... A.C ..TTT ..T [675]
 #Fcom T.A .AT TCG G.. ..GG A.C ..CA [675]

Fig. 4. Continued.

#Achi TAC AAA GAC ATC CTA GGC TTC CTA GCC CTT CTT GCA CTC CTC GCA [720]
 #Chae1 ..T C.T G.T ..G ... GCC A.A ..C ... ATT GC. T.G .T. [720]
 #Ddac C..A ... GCC .G. ..A ..A ATC ACA ... A.C [720]
 #Gacu ..T C.. ..T GC.A ..A ATT GC. ..T A.. [720]
 #Hhis2 ..T T.A T.. ..A ..T GCCC ... ATT GCT ... A.. [720]
 #Hing ..T T.AA ..T GCCC ... ATT GC. ..T A.. [720]
 #Hhis1 ..T T.A T.. ..A ..T GCCC ... ATT GCT ... A.. [720]
 #Sbia ..T ..G ..T T.A T.. ..G ... GC. .TG ATT GCA ..A A.. [720]
 #Ssch C.T T.. ..A ..T GCT .TA T.A ..A ATT GC. ..A ATC [720]
 #Sacu C.. ..T ..A ..T GC. .TG ..C ..C ATT AC. ..A ATC [720]
 #Slep ..T C.. GCT .TG ..C ..A ATT GC. ..T ATC [720]
 #Slou C.T ..G ..A ..T GCT .TA ..C ... ATT GC. ..A A.C [720]
 #SscoG ..T C.. T.G ..T ..T GCT .TA ..A ... ATT TCT T.A ATC [720]
 #Cint ..T C.T G.T ..G ... GCC ..A ..C ... ATT GC. T.G .T. [720]
 #Habd ..T T.A T.. ..G ..T GCC ..TA ATC AC. ... A.. [720]
 #Hkud ..T ..G ... C.A T.. ..A ... GCC ..T T.A T.A ATT GC. T.. A.. [720]
 #Here T.A T.. ..A ... GCCA ..A ATT A.A ... A.. [720]
 #Hkel C.A T.. ..A ... GCCA ..G ATT GCT ... A.. [720]
 #Chae2 ..T ..G ... T.T G.T ..T ... GCC ..A .CC ... ATT GC. T.G .T. [720]
 #Ptae ..T T.A T.. ..G ..T GCC ..TA ATC AC. ... A.. [720]
 #Pkai ..T C.. ..CT GC.C ... ATT TC. ... A.. [720]
 #Astr ..T C..T GCG ..T ..C ..G .TT GC. ..G A.. [720]
 #Gwhe ..T C.G ..T ..T ... GC.A ... ATT GC. T.A A.. [720]
 #Fcom C.AA ... GG.C ... CTT GCT ... A.C [720]

Fig. 4. Continued.

#Achi ACA CTT GCC ATA TTT ACC CCT AAT CTC CTC GGT GAT CCC GAC AAC [765]
 #Chae1 T.T A.. ... G..A ..A ..C ... T.A ..A ..C ..A [765]
 #Ddac T.C ..A ..A C.. ..C T.. ..C ..G ..G ..A ..C [765]
 #Gacu T.C ..A ..A C.. ... G.TC ..G ..T ..AT ... [765]
 #Hhis2 T.. A.. ..T T..A ..C A.T T.A ..AT [765]
 #Hing T.G A.. ... T..A ..C A.T T.A ..GTT [765]
 #Hhis1 T.. A.. ..T T..A ..C A.T T.A ..AT [765]
 #Sbia T.C T.A ... C..A ..C ..C ..A ..T ..G ..C ..T [765]
 #Ssch .GT A.. ..A C.G ... T..T.A ..A ..A ..C ..G [765]
 #Sacu .GC A.. ..A C.T ..C T.. ..CT.A ..AG [765]
 #Slep .GC A.C ... T.. ... T.A ..CA ..G ..AG ..T ... [765]
 #Slou .GT A.. ..A C.C ..C T.. ..A ..C ..T T.A ..A ..C ..TT [765]
 #Ssco .GTT C.. ..C T..A T.A ..G ..C ..A [765]
 #Cint T.T A.. ... C..A ..A ..C ... T.A ..A ..C ..A [765]
 #Habd T.. A.. ... T.. ..CC ... A.. ..A ..G ..C ..T [765]
 #Hkud T.. A.G ... T.. ..C ..A ..A ..C A.T ..T ..G ..C ..T ..T... [765]
 #Here T.. A.. ... C.. ..C ..AA.T ..T ..A ..C ..T ... [765]
 #Hkel T.. A.. ... C.TA ..G ..C A.T ..T ..AT ..T ... [765]
 #Chae2 T.T A.. ... C..A ..A ..C T.. T.A ..A ..C ..A [765]
 #Ptae T.. A.. ... T.. ..CC ... A.. ..A ..G ..C ..T [765]
 #Pkai ..T ..A ..A C.C ..C G.T ..GG T.G ..AT ..T ... [765]
 #Astr T..T T.. ... G.. ..AT.A ..C ..C ..A ..T ... [765]
 #Gwhe T.. ..A ..A C.. ... G.A ..A ..C ..G ..T ..A ..C ..T [765]
 #Fcom T.C ..A ... C.C ..C T.. ..C ..C ... T.A ..G ..C [765]

Fig. 4. Continued.

#Achi TTC ACC CCT GCT AAC CCC TTA GTA ACT CCC CCC CAC ATC AAA CCC [810]
 #Chae1CAC ..C ..T ..AG ..A [810]
 #DdacT. ..A ..CC ..C ..A ..AG ... [810]
 #GacuAACA ..TG ..T [810]
 #Hhis2A ..A ..CA C.. ..GG ..T ..T ..T ... [810]
 #HingA ..A ..CA C..G ..T ..T ..T ... [810]
 #Hhis1A ..A ..CA C.. ..GG ..T ..T ..T ... [810]
 #SbiaACGTT [810]
 #SschA ..C ..ATT ..T ..T ..G ..A [810]
 #SacuA ..C ..ATTT ..A ..TG [810]
 #Slep ..TA ..C ..T ..A ..G ..T ..C ..AT ..TA [810]
 #Slou ... CGG ..C ..AT ... AGTTG ..A [810]
 #SscoAAA C.C ..CA ..TTA [810]
 #CintCAC ..C ..T ..AG ..A [810]
 #Habd ..T ..G ..GAT ..T ..T ... [810]
 #Hkud ..T ..A ..A ..CTCTT ..G ..A [810]
 #HereA ..A ..CCAT ..T ... [810]
 #HkelA ..A ..CTGT ... [810]
 #Chae2CAC ..C ..T ..AG ..A [810]
 #Ptae ..T ..G ..G ..CAT ..T ..T ... [810]
 #PkaiC ..AA C.. ..TT ..AT [810]
 #AstrA ..AT ..T C.GAG ..TA [810]
 #Gwhe ..T ..TA ..T ..G C.. ..C ..C ..AT ..G ..T [810]
 #FcomA ..CC.C ..G ..C ..T ..A ..T ..T ..G ..T [810]

Fig. 4. Continued.

#Achi GAG TGG TAC TTC CTG TTT GCT TAC GCC ATC CTC CGG TCC ATT CCA [855]
 #Chae1 T.. ..C ..AT ..T ..A ..A ..A ..C ... [855]
 #Ddac ..A ..A ..TACAA ..T ..C ..G [855]
 #Gacu ..A T..CT ..T ..A ..T ..C ... [855]
 #Hhis2A ..TA ..C ..C ..T ..TT ..A ..A ..C ... [855]
 #Hing ..A ..A ..TA ..C ..C ..T ..TT ..A ..A [855]
 #Hhis1A ..TA ..C ..C ..T ..TT ..A ..A ..C ... [855]
 #Sbia T.. ..CAA ..CT [855]
 #Ssch ..A ..A T.ACTAC ..T [855]
 #Sacu ..A ..A T..CA ..A ..C ..T [855]
 #SlepTCC ..T ..TTTC [855]
 #Slou ..A T..AC ..C [855]
 #SscoA T..T ..T ..A ..A ..C ..C [855]
 #Cint T.. ..C ..AT ..T ..A ..A ..A ..C ... [855]
 #Habd ..AT ..T ..AC ..T ..T ..TA ..G ..C ... [855]
 #Hkud ..A ..AT ..AC ..T ..T G.. ..A ..A ..AT [855]
 #Here ..A ..AT ..A ..CT ..TA ..A ..A [855]
 #HkelA ..T ..T ..AC ..T T.A ..A ..A ..C ... [855]
 #Chae2 T.. ..C ..AT ..T T.A ..A ..A ..C ... [855]
 #Ptae ..AT ..T ..AC ..T ..T ..TA ..G ..C ... [855]
 #Pkai ..A ..A ..T ... T..T ..AC ... [855]
 #AstrAT ..A ..T ..TT [855]
 #GwheA T.ACTG ..AC ... [855]
 #Fcom ..AA ..C ..C ..TTA ..C ..C [855]

Fig. 4. Continued.

#Achi AAC AAA TTA GGC GGA GTC CTA GCC CTC CTC GCA TCC ATC CTC ATC [900]
 #Chae1G ..A ..G ..A ..TG ..A T.. ..AT G.. [900]
 #DdacG C.. ..A ..T ..A T..A ..A T.C G.. ..T .CT G.. [900]
 #Gacu ..T ... C.T ..A ..CT ..AT ..CA G.. [900]
 #Hhis2 C.. ..AA T.A T.A TTC ..A ... T.A G.A [900]
 #Hing C.. ..A ..T ..A T.A T.A TTC ..A ..T T.A G.A [900]
 #Hhis1 C.. ..AA T.A T.A TTC ..A ... T.A G.A [900]
 #Sbia ..TAAT ... T.G T.A ... [900]
 #Ssch ..T ... C.G ..A ..T ..G T..T ... T.GT ... [900]
 #Sacu ..T ... C.. ..A ..T ..A T.. T.. ..T ..T ..T G.T [900]
 #Slep ..T ... C.C ..T ..T ..A T..T T.C T.A G.. [900]
 #Slou .G. ... C.T ..AA T..A T.GT G.T [900]
 #Ssco C.. ..AA T.. ..T ..T ... G.T [900]
 #CintG ..A ..G ..A ..TG ..A T.. ..AT G.. [900]
 #HabdG C.. ..A ..T ..GG ..A ..G T.. ..G ... T.G G.G [900]
 #Hkud ..T ... C.. ..G ..C ..A T.G ..T ..T ..A TTC ..A ..T T.A G.G [900]
 #Here C.. ..A ..T ..A T.. ..A ..A ..A TTC ..A ... T.A G.A [900]
 #Hkel C.. ..G ..T ..A T.. ... T.A T.A TTC ..A ..T T.A G.A [900]
 #Chae2G ..A ..G ..A ..TG ..A T.. ..AT G.. [900]
 #PtaeG C.. ..A ..T ..GG ..A ..G T.. ..G ... T.G G.G [900]
 #PkaiG C.T ..AA ..CT ..T ..C T.A ... [900]
 #Astr ..T ..G C.G ..A ..T ..A T.. ..A ..G ... TTC T.G G.T [900]
 #Gwhe C.T ..AT ..AT ..C ..TT G.A [900]
 #Fcom ..T ... C.GCTC G.. [900]

Fig. 4. Continued.

#Achi CTG ATG GCA ATA CCA TTC CTT CAC ACT TCA AAA TTC CGA GGC TTG [945]
 #Chae1 T.A ... CTC G.C ..C C.. T.GC ..T ... CAAA C.C [945]
 #Ddac T.A ..A TT. G.G ... A.T ..AC ..T ... CAA C.T [945]
 #Gacu T.. ..A .T. G.C ..C A..T ..A ..T ... CAA ..T ... C.T [945]
 #Hhis2 T.A ..A CT. G.C ... A..T ..A ..T ... CAAA C.C [945]
 #Hing T.A ..A CT. G.T ... A.TT ..A ..C ... CAAA C.C [945]
 #Hhis1 T.A ..A CT. G.C ... A..T ..A ..T ... CAAA C.T [945]
 #Sbia ..T ... CTC G.C ..T A.T ..CG ..T ... CAAA ... [945]
 #Ssch ..A ... CTC G.C ..T A.TC ..G CAAA [945]
 #Sacu T.. ..A CT. G.C ..C A.T ..CC ..T ..G CAA C.. [945]
 #Slep ..T ... TT. G.T ..T A.. ..ACG CAAG ..A [945]
 #Slou T.A ..A TT. G.C ..C GC. ..CC ..C ... CAG C.A [945]
 #SscoA .T. G.. ..C A.A ..CC ..T ... CAAA C.T [945]
 #Cint T.A ... CTC G.C ..C C.. T.GC ..T ... CAAA C.C [945]
 #Habd T.A ..A CT. G.. ..T A.TA ..T ... CAAA C.T [945]
 #Hkud T.A ..A CT. G.C ... A.. ..CA ..C ... CAAA C.T [945]
 #Here T.. ..A CTC G.T ... A.T ..CA ..T ... CAGA C.C [945]
 #Hkel T.A ..A CT. G.C ... A.. ..CG ..C ... CGAA C.C [945]
 #Chae2 T.A ... CTC G.C ..C C.. T.GC ..T ... CAAA C.C [945]
 #Ptae T.A ..A CT. G.. ..T A.TA .NT ... CAAA C.T [945]
 #Pkai T.A ..A .TG G.C ..G A..A ..T ... CAA ..A ..G C.. [945]
 #Astr ..A ..A CTC G.C ..C A.T ..C ..T ..A ..C .TC CA.A .CA [945]
 #Gwhe T.A ..A .T. G.C ..T A.TA ..C ... CAA ..T ... C.C [945]
 #Fcom ..T ..A CT. G.C ..C A.T ..CC ..C ..G CAG ..G .CA C.T [945]

Fig. 4. Continued.

#Achi AAC TTC CGC CCG GCC TCT CAA TGA GTT TTC TGA ATC TTC CTG GGG [990]
 #Chae1 .CG ..T A.T AGCTT T.A GC. C.T G.C .CC [990]
 #Ddac .CTA ..C CTA A.. ... ATT T.A TC. C.A GCT .CA [990]
 #Gacu .CA ..T ..A ..C CTT A.GTT T.A ..TCT C.T A.T .CA [990]
 #Hhis2 .C.A ..T TTT GGCTT A.A GCA ..A G.T .CA [990]
 #Hing .C.A ..C TTT GGC ... CTT A.A GCA ..A G.T .CA [990]
 #Hhis1 .C.A ..T CTT GGCTT A.A GCA ..A G.T .CA [990]
 #Sbia .TAA ..C ATA AG. ... CT. T.A ..T ..G .C. C.T G.A .CA [990]
 #Ssch .C. .A. ..G ..A ATA GGA ... ATC C.CCA C.. G.T .CT [990]
 #Sacu .CTA ..A ATG GGA ... ATC C.C GCT ..A G.A .CC [990]
 #Slep .CTA ..A ATA GG. ... ACT C.. ..T ... GCT ..A G.C .CT [990]
 #Slou .CTGG GGATC C.. ..TC. C.A G.T .CA [990]
 #Ssco .CTA ..C ATA GGA ... ATC C.C GC. ..A G.C .CC [990]
 #Cint .CG ..T A.T AGCTT T.A GC. C.T G.C .CC [990]
 #Habd .CTA ..C TT. GGC ..G CTT A.ACA .CA G.T .CA [990]
 #Hkud .C. ..T ..A ..A TTT GG. ... CTT A.AG ..A G.C .CA [990]
 #Here .CTA ..C TT. GGC ... CTT A.AA C.A G.C .CA [990]
 #Hkel .CTA ..C TTT GG.TT ACA C.A ..A G.T .CA [990]
 #Chae2 .CG ..T A.T AGCTT T.A ..T ... GC. C.T G.C .CC [990]
 #Ptae .CTA ..C TT. GGC ..G CTT A.A ..TCA ..A G.T .CA [990]
 #Pkai .CAG ..C .T. A..TT C.AC. C.. A.C .CA [990]
 #Astr .C. ..T ..A ..T ATT A.CTC C.C ..T ..G .CA C.T GCA ATA [990]
 #Gwhe .CG ..T ..A ..A ATT A.ATC T.A ..TCT C.T A.T .CA [990]
 #Fcom .C.G ..T CT. A.C ... ATC T.A ..T ... GCA ... G.A .CA [990]

Fig. 4. Continued.

#Achi AAT GTA CTT CTC CTT ACG TGG ATT GGA GGT ATA CCG GTT GAA CAA [1035]
 #Chae1 G.C A.. ... G..C ..A ..C ..C ..G ..T ..A ..C .C. [1035]
 #Ddac G.. ..T A.. G..A ..A ..CC ..G ..A ..ACC [1035]
 #Gacu G.. ... GCC A.TC ..ACCC [1035]
 #Hhis2 G.. A.. A.. A.. T.ACAT ..ACC [1035]
 #Hing G.. A.. A.C A.. T.A ..AG ..A ..G ..T ..ACC [1035]
 #Hhis1 G.. A.. A.. A.. T.ACAT ..ACC [1035]
 #Sbia G.C A.. ... A.. ..A ..C ..AA ..G ..CCC [1035]
 #Ssch G.. A.. GCA A.. T.A ..A ..AATG.C [1035]
 #Sacu G.C A.G GCG A.T ..A ..A ..AAAG .C. [1035]
 #Slep G.C A.. A.. A.T ..CA ..CG ..T ..A ... GC. [1035]
 #Slou G.. A.G GCA A.. ..C ..A ..A ..CC ..G ..C ..C ... GCG [1035]
 #Ssco G.. A.. G.A A.. T.A ..A ..A ..CG ..G ..CAC. [1035]
 #Cint G.C A.. ... G..C ..A ..C ..C ..C ..G ..T ..A ..C .C. [1035]
 #Habd G.. A.. A.A A.TC ..AA ..G ..T ..ACC [1035]
 #Hkud G.C A.G A.A A.T T.A ..A ..AAT ..ACT [1035]
 #Here G.C A.. A.G A.T ..G ..A ..AA ..G ..C ..ACC [1035]
 #Hkel G.C A.. A.. A.T ..A ..A ..A ..C ..G ..A ..G ..C ..ACC [1035]
 #Chae2 G.C A.. ... G..C ..A ..C ..C ..C ..G ..T ..A ..C .C. [1035]
 #Ptae G.. A.. A.A A.TC ..AA ..G ..T ..ACC [1035]
 #Pkai G.C ..C GCC A.. ..AC ..C ..A ..C ..C ..CA ..AC [1035]
 #Astr G.. ..T A.A A..TCC ..G ..T ..AC [1035]
 #Gwhe G.C ... GCC A.T ..A ..C ..AT ..C ..G ..CC [1035]
 #Fcom G.C ..C A.C A.. ..C ..C ..AG ..A ..GC ..G ..C [1035]

Fig. 4. Continued.

#Achi CCC TAT ACC CTT GTA GGC CAG GCC GCC TCC TTC CTA TAC TTT TTC [1080]
 #Chae1 ..ATT AG. ..T ..ATGT G.. A.T ..T ... GCT [1080]
 #DdacTT ..G A.CTA ..T ... A.T A.TC .CA [1080]
 #GacuTC .T. A.. A.T ..A ..A .TT ..A ... G.A ..TC .CT [1080]
 #Hhis2 ..A ..C .TT T.A A.C ..A ..A CTA ..G ..T G.T A.CC C.. [1080]
 #HingC .TT ..A A.CA CTA ..G ..T G.T A.CC C.T [1080]
 #Hhis1 ..A ..C .TT T.A A.C ..A ..A CTA ..G ..T A.T A.CC C.. [1080]
 #Sbia ..T ..C .T. A.C A.C ..ATT ..A ..A G.T G.CC C.T [1080]
 #SschC .T. G.C A.TTA ..A ..A A.T A.C ..T ..C ACG [1080]
 #Sacu ..A ..C .T. G.. A.T ..A ..A .TA ..A ..T A.T G.T ..T ..C ACA [1080]
 #Slep ..ATT G.. A.T ..A ..A .TA ..A ... A.T A.T ..T ... C.A [1080]
 #Slou ..A ..C .TT ... A.CA .TA ..A ..A A.. A.T ..T ... ACA [1080]
 #Ssco ..TT. G.C A.C ..A ..A AT.G ..T A.C A.A [1080]
 #Cint ..ATT AG. ..T ..ATGT G.. A.T ..T ... GCT [1080]
 #Habd ..G ..C .T. ..A A.T ..A ..A .TA ..A ..G A.T G.. ..T ..C C.T [1080]
 #HkudTT T.A A.C ..T ..A TTA ..A ..A G.T G.TC C.T [1080]
 #Here ..GTT ..A A.TA CTA ..A ..A G.T A.T ..T ..C C.T [1080]
 #Hkel ..T ..C .T. ..A A.CA CTA ..A ..A A.T G.C ..T ..C C.T [1080]
 #Chae2 ..ATT AG. ..T ..ATGT G.. A.T ..T ... GCT [1080]
 #Ptae ..GT. ..A A.T ..A ..A CTA ..A ..G A.T G.. ..T ..C C.T [1080]
 #Pkai ..A .TC .T. A.C A.T ..A ..A .TT ..A ..T G.AC. [1080]
 #Astr ..G .TC .TT A.. ACC ..A ..A ATT ..A ..T A.T G..C .CA [1080]
 #GwheTC .TT A.. A.T ..A ..A ATT ..A ... G.A A.TC .CT [1080]
 #Fcom ..A .T. GT. A.C A.CA .T.CC C.T [1080]

Fig. 4. Continued.

#Achi GCT ATT ATT GTG CTC TTC CCC TTG GTC GGA TGA GCA GAA AAT CAG [1125]
 #Chae1 AT. T.C C.. ..C ..T A.. ..A ACC .CA ..TGC A.A [1125]
 #Ddac ATC T.C T.A ..A T.T A.. ..A G.A ACA ATTC ACT [1125]
 #Gacu TTA T.C C.A ..T T.A .A. ..A GGA .CA .C. GT. AT. ..G ..C A.A [1125]
 #Hhis2 ATC T.. T.A .CA GCT C.A ..T ..A TCA A.A [1125]
 #Hing ATC T.. T.A .CA GCT ..A ..T ..A TCA ..T A.A [1125]
 #Hhis1 ATC T.. T.A .CA GCT C.A ..T ..A TCA A.A [1125]
 #Sbia AT. T.. ... A.C ..G GC.CA .C. .C. ..G A..C A.. [1125]
 #Ssch ATC T.C C.A C.A T.G A.. ... A.A AG. ..T ... A.. A.A [1125]
 #Sacu ATC T.C C.A C.A ..A GC. ... A.A AG. ..C ... A.G A.A [1125]
 #Slep AT. T.C C.A T.C T.A A.T ..T A.A AG. ..C ... A.G A.A [1125]
 #Slou AT. T.C C.C A.A T.G G.. ..A A.A AGT ..T ... A.. A.. [1125]
 #Ssco ATC T.C C.G C.. ... A.T ... A.. AG. ..C ... A.C A.A [1125]
 #Cint AT. T.C C.. ..C ..T A.. ..A ACC .CA ..TGC A.A [1125]
 #Habd .TC T.C C.A .CA GCT ..A ..T A.A TCAC A.A [1125]
 #Hkud ATC T.. T.A .C. GCT ..A ..T G.A TCT ..T ... AT. ..G ... A.A [1125]
 #Here ATC T.. C.A .CA GCT ..A ..T GCA TCA ..T ... ATGC A.A [1125]
 #Hkel AT. T.. T.A .C. GC. ..A ..T A.A TCT ..C ... AT. A.A [1125]
 #Chae2 AT. T.C C.. ..C ..T A.. ..A ACC .CA ..TGC A.A [1125]
 #Ptae .TC T.C C.A .CA GCT ..A ..T A.A TCAGC A.A [1125]
 #Pkai CTA T.C C.A ..C T.T .AT ..A GGA .CA .C. AT. .T.C A.A [1125]
 #Astr ATC T.C C.A .CC ..T A.. ... C.A .CA ..TT.C .T. [1125]
 #Gwhe TTA T.C C.A ..A ..A .A. ..A GG. .CA .C. GT. AT. ..G ..C A.A [1125]
 #Fcom CTG C.C C.C A.T T.G .CA ... C.. .CA ..GTGC A.. [1125]

Fig. 4. Continued.

#Achi CTC CTT GTA TGA GGA [1140]
 #Chae1 A.. ..A AC. C.. AC. [1140]
 #Ddac A.A ... AA. ... ACT [1140]
 #Gacu A.GA. ... AC. [1140]
 #Hhis2 G.T ... AA. ... AAT [1140]
 #Hing G.T ... AA. ... AAT [1140]
 #Hhis1 G.T ... AA. ... AAT [1140]
 #Sbia A.T A.A AA.C. [1140]
 #Ssch GC. T.. AA. ... ATC [1140]
 #Sacu GC. T.C AA. ... ATC [1140]
 #Slep GCT T.C AA. ... AT. [1140]
 #Slou GCT T.C AA. ... ATC [1140]
 #Ssco GC. T.C AA.CC [1140]
 #Cint A.. ..A AC. C.. AC. [1140]
 #Habd A.T ... AA. ... AAT [1140]
 #Hkud A.T ... AA. ... AAC [1140]
 #Here A.. ... AA. ... AAT [1140]
 #Hkel A.T ... AA. ... AAT [1140]
 #Chae2 A.. ..A AC. C.. AC. [1140]
 #Ptae A.T ... AA. ... AAT [1140]
 #Pkai A.AA. ... AC. [1140]
 #Astr GC. T.A .A. CA. AAT [1140]
 #Gwhe A.GA. ... AC. [1140]
 #Fcom GC. ... AA.C. [1140]

Fig. 4. Continued.

Table 3. Codon usage observed in the cytochrome *b* gene of Syngnathids

UUU(F)	11.3(0.80)	UCU(S)	6.0(1.61)	UAU(Y)	5.8(0.78)	UGU(C)	1.6(1.08)
UUC(F)	17.1(1.20)	UCC(S)	5.5(1.47)	UAC(Y)	8.9(1.22)	UGC(C)	1.4(0.92)
UUA(L)	12.3(1.30)	UCA(S)	8.5(2.27)	UAA(*)	0.0(0.00)	UGA(W)	10.9(1.72)
UUG(L)	2.5(0.26)	UCG(S)	1.3(0.35)	UAG(*)	0.0(0.00)	UGG(W)	1.8(0.28)
CUU(L)	13.6(1.44)	CCU(P)	6.0(1.10)	CAU(H)	3.8(0.67)	CGU(R)	0.7(0.34)
CUC(L)	11.3(1.20)	CCC(P)	7.0(1.28)	CAC(H)	7.6(1.33)	CGC(R)	1.4(0.69)
CUA(L)	14.1(1.50)	CCA(P)	7.5(1.36)	CAA(Q)	5.5(1.72)	CGA(R)	5.0(2.44)
CUG(L)	2.9(0.30)	CCG(P)	1.4(0.26)	CAG(Q)	0.9(0.28)	CGG(R)	1.1(0.53)
AUU(I)	15.0(1.01)	ACU(T)	4.0(0.73)	AAU(N)	6.8(0.72)	AGU(S)	0.4(0.11)
AUC(I)	14.6(0.99)	ACC(T)	8.8(1.60)	AAC(N)	12.1(1.28)	AGC(S)	0.7(0.19)
AUA(M)	7.9(1.39)	ACA(T)	7.7(1.40)	AAA(K)	8.2(1.71)	AGA(*)	0.0(4.00)
AUG(M)	3.5(0.61)	ACG(T)	1.5(0.27)	AAG(K)	1.4(0.29)	AGG(*)	0.0(0.00)
GUU(V)	6.7(1.04)	GCU(A)	6.3(0.73)	GAU(D)	4.3(0.75)	GGU(G)	3.4(0.51)
GUC(V)	7.3(1.14)	GCC(A)	13.5(1.58)	GAC(D)	7.2(1.25)	GGC(G)	6.9(1.04)
GUA(V)	9.8(1.51)	GCA(A)	13.0(1.52)	GAA(E)	3.6(1.54)	GGA(G)	11.7(1.77)
GUG(V)	2.0(0.31)	GCG(A)	1.5(0.17)	GAG(E)	1.1(0.46)	GGG(G)	4.5(0.68)

The number of indicates the frequency in which the codons are used.

All frequencies are average over all taxa. The termination codons were indicated by asterisks.

Table 4. Base composition at each codon position in the mitochondrial Cytochrome *b* gene of Syngnathids.

Species	Codon composition															
	All				1st				2nd				3rd			
	T	C	A	G	T1	C1	A1	G1	T2	C2	A2	G2	T3	C3	A3	G3
<i>Achi</i>	26.8	33.9	22.2	17.1	23.2	27.6	22.1	27.1	40.5	25.5	19.5	14.5	16.6	48.7	25	9.7
<i>Chae1</i>	27.9	31.6	23.7	16.8	22.9	25.3	24.2	27.6	39.2	27.4	19.7	13.7	21.6	42.1	27.1	9.2
<i>Ddac</i>	27.7	30.1	27.4	14.8	25	23.9	25	26.1	39.7	26.8	20.3	13.2	18.4	39.5	36.8	5.3
<i>Gacu</i>	31.7	28.7	24.7	14.9	24.2	25.5	23.4	26.8	40.8	25.3	20.3	13.7	30	35.3	30.5	4.2
<i>Hhis2</i>	32.7	23.4	28.5	15.4	28.7	20	23.7	27.6	40	25.8	20.8	13.4	29.5	24.5	41.1	5
<i>Hing</i>	32.4	24.2	28.5	14.9	28.2	20.5	23.7	27.6	39.7	26.1	20.8	13.4	29.2	26.1	41.1	3.7
<i>Hhis1</i>	32.5	23.6	28.6	15.3	28.4	20.3	23.9	27.4	39.7	26.1	20.8	13.4	29.5	24.5	41.1	5
<i>Sbia</i>	30.4	28.4	25.3	16	25	22.4	25.8	26.8	40	26.3	20.5	13.2	26.1	36.6	29.5	7.9
<i>Ssch</i>	30.1	28.2	25.6	16.1	25.3	21.8	26.1	26.8	39.7	25.5	20.8	13.9	25.3	37.1	30	7.6
<i>Sacu</i>	28.8	29.3	26	16	23.9	23.7	25.5	26.8	39.7	26.1	20.3	13.9	22.6	38.2	32.1	7.1
<i>Step</i>	33.5	24.5	26.5	15.5	25	22.6	25.5	26.8	40.3	25.5	20.3	13.9	35.3	25.3	33.7	5.8
<i>Slou</i>	28.9	29.2	25	16.9	25	22.1	25.3	27.6	39.2	26.3	20	14.5	22.4	39.2	29.7	8.7
<i>Saco</i>	29.3	28.8	25.9	16.1	23.9	25	24.2	26.8	40	25.8	19.7	14.5	23.9	35.5	33.7	6.8
<i>Cint</i>	27.9	31.6	23.6	16.9	22.9	25.5	23.9	27.6	39.2	27.4	19.7	13.7	21.6	41.8	27.1	9.5
<i>Habd</i>	31.1	25.3	27	16.6	26.3	22.1	24.2	27.4	38.9	26.8	20.8	13.4	28.2	26.8	36.1	8.9
<i>Hkud</i>	31.8	24.2	28.8	15.2	26.6	21.6	24.5	27.4	40.5	25.5	20.8	13.2	28.4	25.5	41.1	5
<i>Hare</i>	30.6	26	28.4	15	24.5	23.9	24.7	26.8	40.5	25.5	20.8	13.2	26.8	28.4	39.7	5
<i>Hkal</i>	31.1	25.8	27.8	15.4	26.1	22.4	25.5	26.1	40.3	25.8	20.5	13.4	26.8	29.2	37.4	6.6
<i>Chae2</i>	28.7	31.3	23.2	16.8	23.9	24.7	23.9	27.4	39.2	28.2	18.9	13.7	22.9	41.1	26.6	9.5
<i>Ptae</i>	31.4	25	27.1	16.4	26.3	22.4	24.2	27.1	39.6	26.1	20.8	13.5	28.4	26.6	36.3	8.7
<i>Pkai</i>	28.7	30.1	26.1	15.1	23.9	25.8	23.9	26.3	40.5	25.3	20.8	13.4	21.6	39.2	33.7	5.5
<i>Astr</i>	29.1	30.9	23.9	16.1	24.2	26.3	23.2	26.3	40.5	27.1	19.7	12.6	22.6	39.2	28.9	9.2
<i>Gwhe</i>	31.8	27.8	25.2	15.3	24.2	25.3	23.9	26.6	40.8	25.3	20.3	13.7	30.3	32.9	31.3	5.5
<i>Foom</i>	26.4	33.5	22.5	17.6	22.4	27.1	23.4	27.1	40.3	26.6	20	13.2	16.6	46.8	23.9	12.6
Mean	30	28.1	25.9	15.9	25	23.7	24.3	27	40	26.2	20.3	13.6	25.2	34.6	33.1	7.2
Bias*			0.12				0.027				0.215				0.237	

The frequencies are shown as percentages.

a : Bias in base composition is calculated as

$$C = (2/3) \sum_{i=1}^4 | C_i - 0.25 |$$

where C is the compositional bias and C_i is the frequency of the i th base.

3. 포화도 분석

염기서열 자료에서 계통분석 추론에 오류를 야기시킬 수 있는 염기서열의 포화 여부를 확인하기 위하여 모든 코돈 위치, 첫 번째 코돈 위치, 두 번째 코돈 위치, 그리고 세 번째 코돈 위치, 첫 번째와 두 번째 코돈 위치에서 개별적으로 포화도 분석을 수행하였다(Figure 5-7). 분석된 코돈 위치 대부분에서, transition이 transversion보다 빨리 축적되었으며, 이 분석을 통하여 세번째 코돈 위치에서 transition과 transversion들이 포화되어 있다는 것을 알 수 있었다. 반면에 첫 번째와 두 번째 코돈 위치에서의 transition과 transversion들은 p -distance가 증가함에 따라 거의 선형으로 축적되었다. 이러한 결과들에 근거하여, 첫 번째와 두 번째 코돈 위치에서의 치환(transition, transversion)에 대한 자료군을 계통분석에 이용하였다.

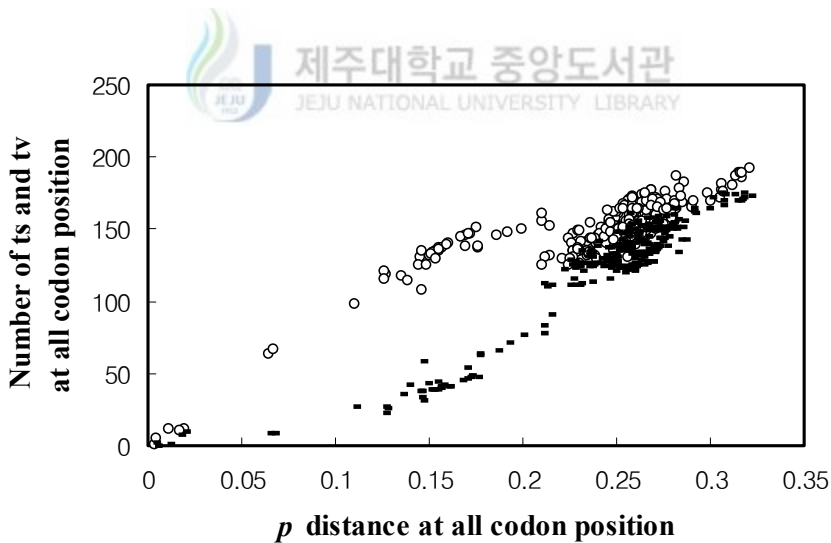
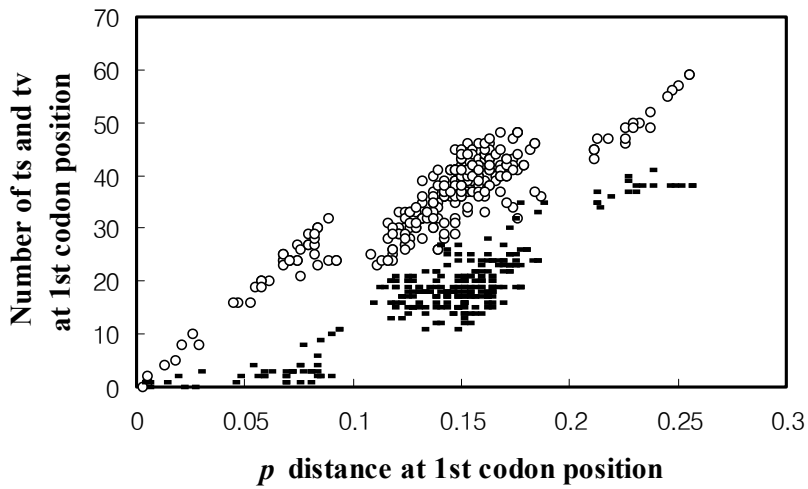


Fig. 5. Relationships of the observed number of transitions (ts) and transversions (tv) for all pairs of sequence to p -distance observed at all codon positions. The following symbols were used - open circles, transitions and beelines, transversion.

(A)



(B)

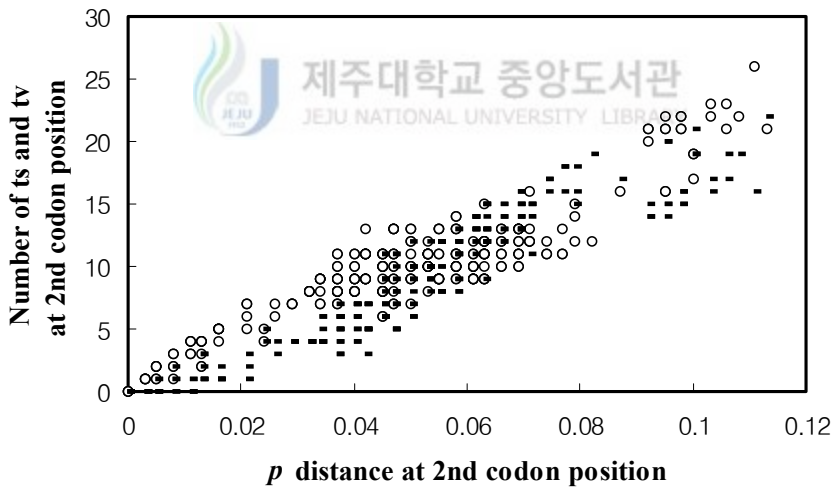
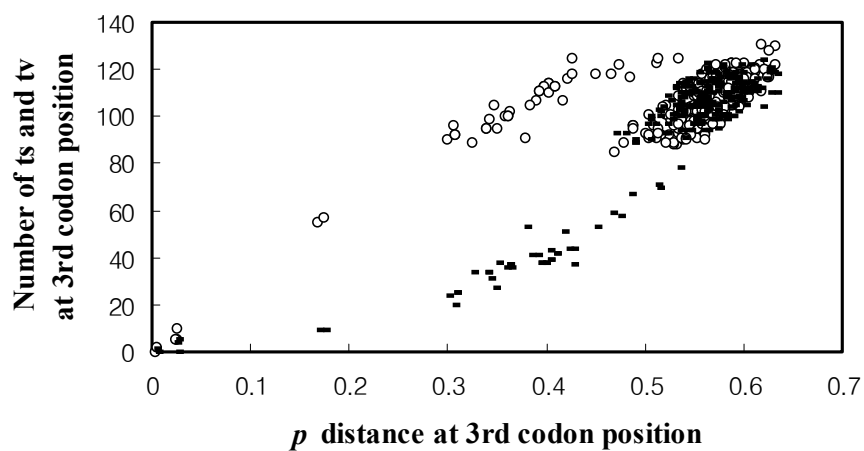


Fig. 6. Relationships of the observed number of transitions (ts) and transversions (tv) for all pairs of sequence to p -distance observed at first codon positions(A) and second codon positions(B).

The following symbols were used - open circles, transitions and beelines, transversion.

(A)



(B)

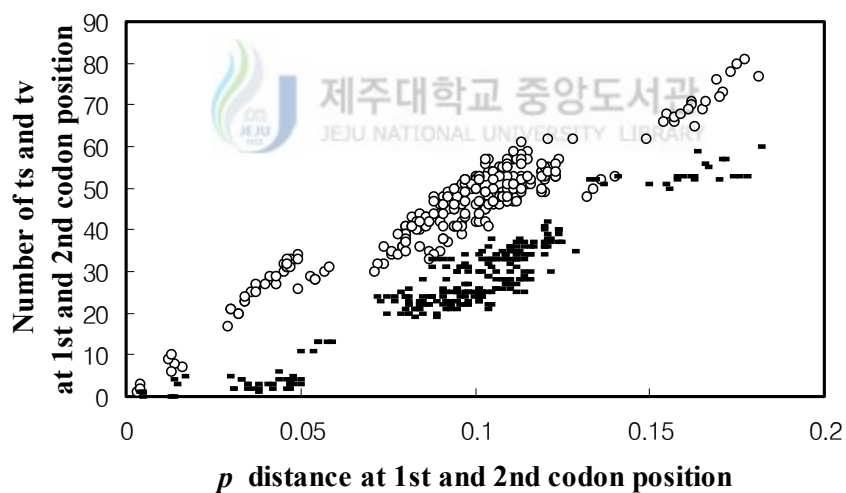


Fig. 7. Relationships of the observed number of transitions (ts) and transversions (tv) for all pairs of sequence to p -distance observed at third codon positions(A) and first and second codon positions(B).

The following symbols were used - open circles, transitions and beelines, transversion.

4. 계통분석

계통수(phylogenetic tree)는 단순성의 원칙(parsimony)에 근거한 방법과 거리(distance)에 근거한 방법으로 작성되었다. 포화된 자료는 계통관계의 추론에 있어서 오류를 야기시킬 수 있으므로(Meyer, 1993), 계통분류학적 분석은 포화 현상(단일 nucleotide 부위에서의 숨겨진 다중 치환)을 고려하여 첫 번째와 두 번째 코돈 위치에서의 치환만을 이용하여 수행되었다.

Figure 8 - 11은 실고기어류의 21종과 분류참조군 3종의 cytochrome *b* 유전자로들로부터 MP(maximum parsimony)와 ML(maximum likelihood), 그리고 MODELTEST version 3.06 (Posada, 1998)에 의해서 채택한 Hasegawa (1985)의 HYK85+G+I distance를 이용하여 NJ(Neighbor-Joining)를, LogDet/paralinear값으로 distance를 측정하여 ME(minimum evolution) tree-building algorithm에 의하여 작성된 계통수를 나타내었다. MP를 이용하여 작성한 계통수(Figure 8)에서 3종의 분류참조군에 대해 실고기목어류들이 단진화군을 이루고 있음을 확인하였다. 실고기속, 해마속, *Corythoichthys*속, *Dunckerocampus*속, 그리고 *Syngnathoides*속의 어류들이 각각의 그룹을 이루고 있으나 기존 형태적 분류에 있어 Solegnathinae아과에 포함되는 *Phyllopteryx*속으로 분류되는 weedy seadragon의 경우 해마속에 포함됨을 관찰할 수 있었다. 또한 *Dunckerocampus*속이 실고기과에 있어서 진화의 초기에 분화되는 조상종으로 나타남을 93%의 bootstrap값으로 확인하였다. NJ를 통해 작성된 계통수(Figure 9)에서 역시 실고기목 어류들이 단진화군을 이루고 있음을 알 수 있었다. 반면, 속 수준에서 각각 그룹을 이루고 있으나 이 계통수에서 역시 weedy seadragon의 위치는 해마속의 그룹에 포함됨을 확인하였다. ME에 의한 계통수(Figure 10)는 NJ를 이용하여 작성된 계통수와 비교하여 해마속과 실고기속, *Syngnathoides*속으로 나누어지는 분지에서의 52%의 bootstrap값을 무시한다면 거의 같은 결과를 얻을 수 있었다. ML을 통해 작성된 계통수(Figure 11)는 heuristic search를 통해 계산되었으며 이 역시 실고기목의 어류들이 단진화군(monophyletic group)을 이루고 있었다. ML의 계통수에서도 weedy seadragon은 해마속에 포함되며, 형태학적으로 같은 아과에 포함되는 *Syngnathoides*속은 실고기속에 가깝게 묶임을 확인 할 수 있었다.

이들 분석 모두에서 실고기목에 포함되는 어류들의 단진화성은 100%의 bootstrap 값에 의하여 통계학적으로 뒷받침되었다. 반면, MP에 의한 계통수를 제외한 다른 계통수에서 창고기아목(Suborder Aulostomodei)은 결여진화군(paraphyletic group)으로 관찰되었다.

그러나 몇몇 종을 제외하고 현재 형태학적 분류와 대부분 일치되는 결과로 미루어 cytochrome *b* 유전자의 실고기어류에 대한 분자계통학적 유용성을 확인할 수 있었다.

또한 Weedy Seadragon이라 불리는 *Phallopteryx taeniolatus*는 모든 계통수에서 공통적으로 해마아과의 clade에 포함됨을 관찰할 수 있었으며, 서로 다른 방법을 이용한 각각의 계통수에서 대부분의 경우 subfamily 간의 계통진화적인 관계는 분명하지 않았다.

Table 5. Hierarchical likelihood ratio test of phylogenetic model as implemented by MODELTEST version 3.06 (Posada, 1998)

Model	-ln(likelihood)	Gamma(G)	Proportion of invariable site(I)
JC	3894 . 8748		
F81	3868 . 0444		
HYK	3746 . 6970		
HYK + G	3476 . 0383		
HYK + G + I	3461 . 6780 *	0 . 5357	0 . 5084

* selected model of evolution ($P < .01$).

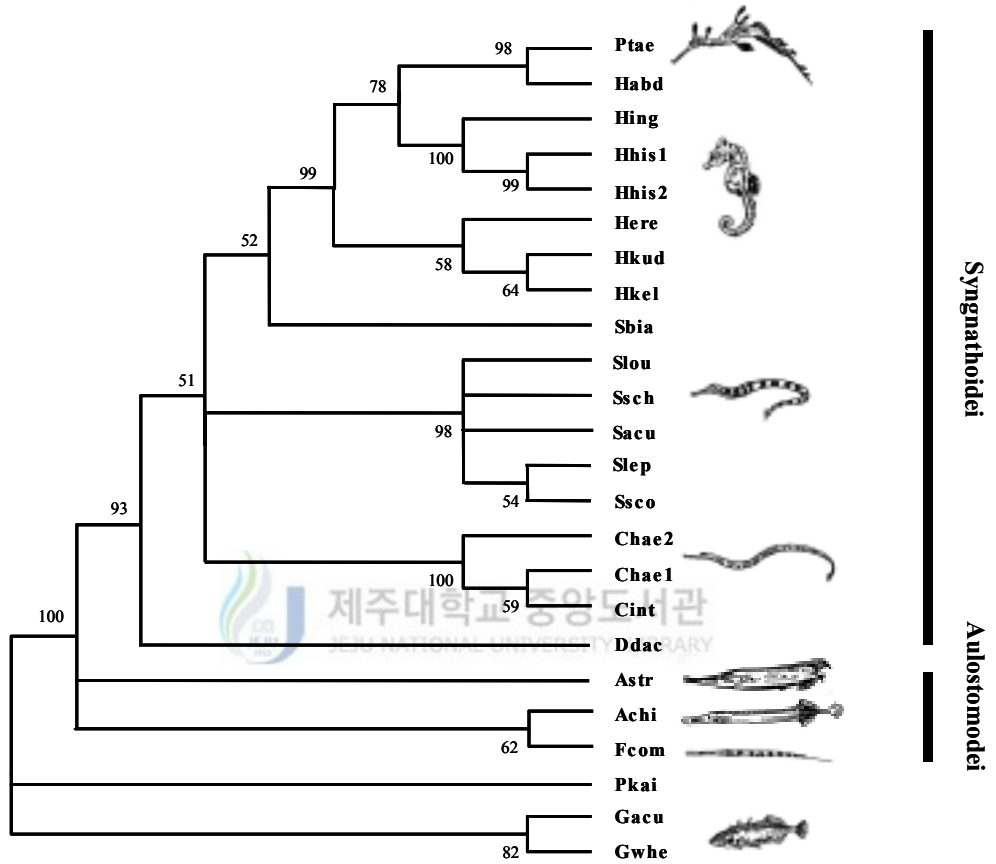


Fig. 8. 50% majority-rule consensus tree of 21 Syngnathids species recovered from *cytb* sequences (parsimony-informative characters: 152) according to the Maximum parsimony method (all characters have equal weight). Bootstrap values (heuristic search : 1000 replications) are displayed over internal nodes.

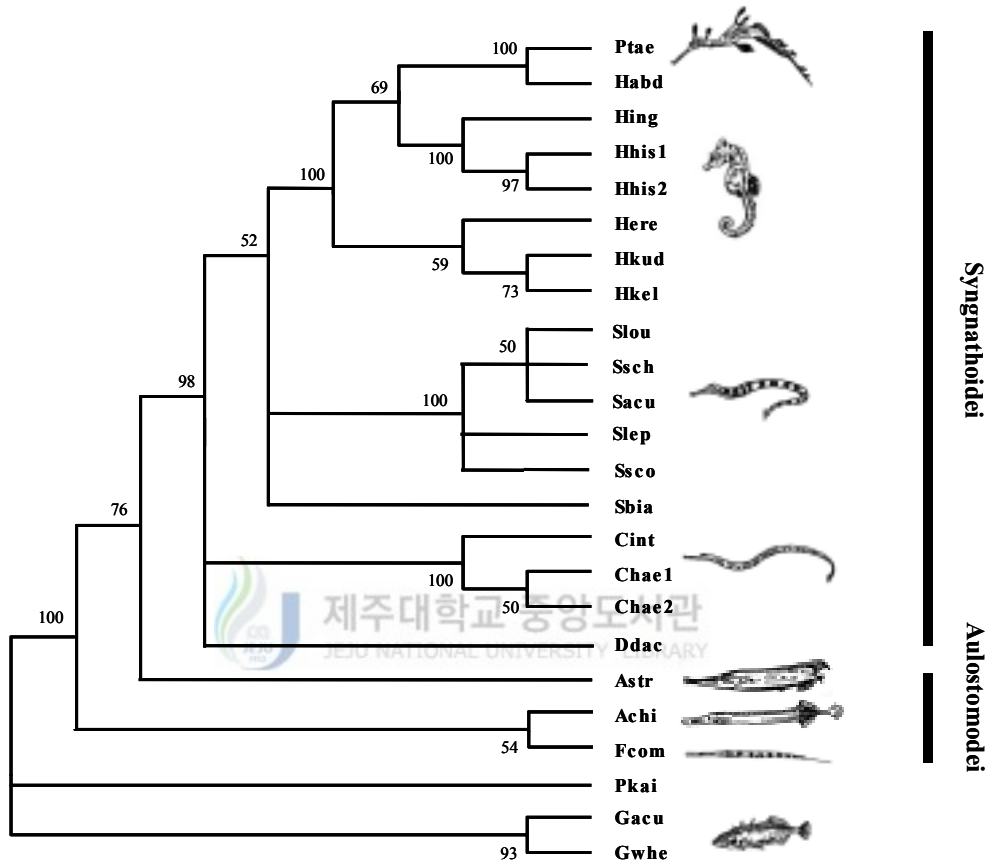


Fig. 9. 50% majority-rule consensus tree of 21 Syngnathids species recovered from *cytb* sequences (760 bp) according to the Neighbor-joining method - HYK85+I+G distance. Bootstrap values (1000 replications) are displayed over internal nodes.

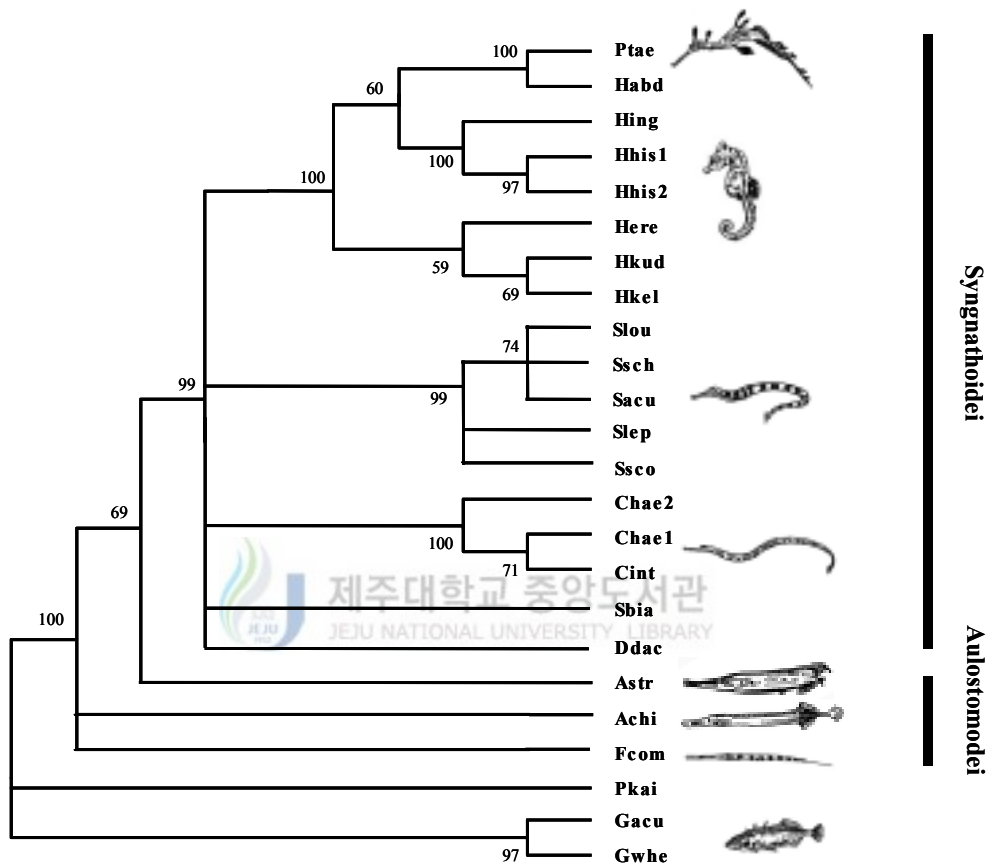


Fig. 10. 50% majority-rule consensus tree of 21 Syngnathids species recovered from *cytb* sequences (760 bp) according to the Minimum evolution method - LogDet/paralinear distance.

Bootstrap values (1000 replications) are displayed over internal nodes.

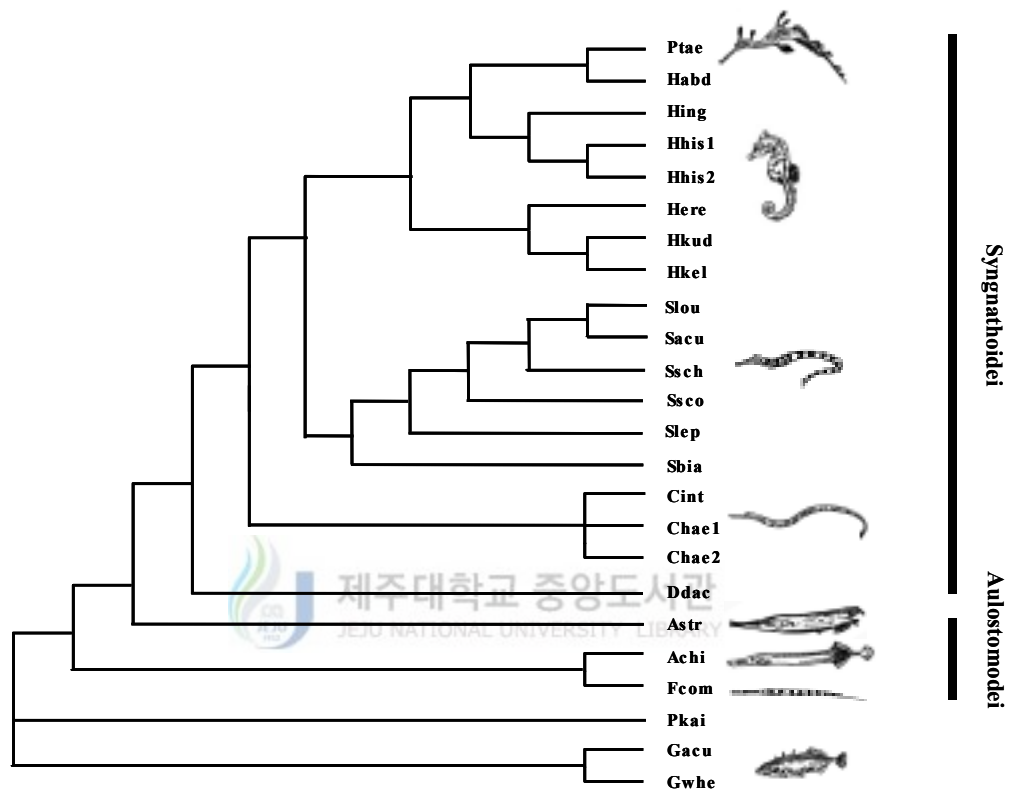


Fig. 11. Maximum likelihood tree of 21 Syngnathids species recovered from *cytb* sequences (760 bp) using the HYK85+G+I model of evolution.

Likelihood settings : ts / tv ratio = 3.0058, and assumed nucleotide frequencies = A(0.22309), C(0.24914), G(0.20297), T(0.32480).

IV. 고찰

미토콘드리아 DNA(mtDNA, mitochondrial DNA)는 핵 DNA와 비교하여 더 많은 서열 다양성을 포함하고 있으며, 그 진화양상이 더 직관적인 방법으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 최근 염기서열 결정법의 개선과 더불어 이러한 이유들로 인하여, 동물 mtDNA는 다양한 수준의 계통분류학적 의문을 해결하는 연구에 많이 이용되고 있다.

더욱이, cytochrome *b* 유전자는 어류에 있어서 개체군에서부터 더 높은 준위의 분류 단계까지 분석하는데 이용되고 있다(Kocher and Stepien, 1997). Song et al (1998)은 cytochrome *b* 유전자의 염기서열을 이용하여 Percidae의 분류를 재검토하였고, Etheostominae와 Luciopercinae내의 소형 저서어류의 독립적인 진화에 대한 계통분류학적 증거에 대하여 논하였다. Schmidt et al (1998)은 잉어과 *Lythurus* 속 어종들 간의 계통분류학적 관계를 추정하는데 cytochrome *b* 유전자 서열을 이용하였다. 게다가, cytochrome *b* 유전자의 염기서열은 Atlantic cod (Carr et al., 1991), Pacific sockeye salmon (Bickham et al., 1995)과 dusky grouper (Gilles et al., 2000)에 있어서 종내 변이를 탐지하는데 이용되었다.

한편, 수많은 연구자(Myer, 1993; Griffiths, 1997; Takezaki and Gojobori, 1999)들이 정확한 계통수를 작성하기 위해서는 각 코돈 위치들 간의 치환율 변이를 고려하는 것이 중요하다고 하였으며, 포화도 분석에 근거하여 이 연구에 이용된 24종의 cytochrome *b* 유전자들 간의 transitional substitution (특히 3번째 코돈 위치)은 거의 포화되어 있는 것으로 분석되었다. 이러한 포화된 자료는 실제 계통관계를 추정하는데 오류를 야기시킬 수 있으므로, 계통관계를 추정하는데 이를 신중하게 고려하는 것이 필요하다. 여러 연구자들(Brito, 1997; Song et al., 1998)이 유연관계가 다소 먼 분류군들 간의 계통수를 작성하는데 3가지 코돈 위치 모두에서의 자료를 이용하였다. 그러나 본 연구결과 Figure 5.에서 보여지듯 3가지 코돈 위치 모두에서 transversion보

다 transition이 빨리 축적됨을 확인할 수 있었고, 이는 transition후 다시 한번 더 치환이 일어났음을 추측할 수있었다. 이러한 숨겨진 다중치환 현상을 보정하기 위한 방법으로 최근, 일부 저자들(Birolay et al., 1998)은 첫 번째와 두 번째 코돈 위치에서의 치환(transition, transversion) 혹은 3가지 코돈 위치 모두에서의 transversion만을 이용하였다. 이 연구에서는 오류의 가능성을 갖고 있는 모든 코돈 위치에서의 자료는 피하고 첫 번째와 두 번째 코돈 위치에서의 치환(transition, transversion)에 대한 자료군 만을 이용하여 계통관계를 추정하였다.

이를 통해 작성된 계통수는 실고기목(Syngnathiformes)의 어류들이 높은 bootstrap 값으로 단진화군을 이루고 있음을 확인할 수 있었으며, subfamily 수준에서 기존 형태학적 분류와 거의 유사한 계통수를 나타내고 있는 점으로 미루어 실고기어류의 계통분류학적 연구 시 cytochrome *b* 유전자의 사용이 매우 유용함을 알 수 있었다.

계통수를 통한 진화의 위치는 방법론에 따라 *Dunckerocampus dactyliophorus*가 조상종으로 구분되기도 하지만 대부분의 계통수에 있어 subfamily 간의 계통진화적인 관계는 분명하지않았다. 이러한 현상이 다른 척추동물에서 볼 수 있는 지질연대에 있어서 상대적으로 단기간에 일어난 진화적 현상 때문인지 또는 분석자료에서 기인한 것인지에 대해서는 보다 세밀한 연구가 수행되어야 할것으로 생각된다.

주목할만한 점으로는 기존 형태학적 분류 시 subfamily Solegnathinae에 포함되는 *Phyllopteryx taeniolatus*(Weedy Seadragon)의 위치가 서로 다른 방법으로 작성된 계통수에 있어 일관되게 해마아과에 포함된다는 사실이다. 결국 번식 패턴에 있어 전혀 다른 진화를 겪은 해마속의 어류와 Weedy Seadragon이 같은 그룹을 형성한다는 것은, 본 연구 결과에 있어 두 가지의 유추가 가능한데, 첫 번째로는 해마속 어류들의 진화에 있어 back mutation이 발생했을 가능성과 두 번째로는 해마아과 어류들의 진화초기에 다른 원시적인 번식 패턴을 갖는 암컷과의 잡종이 형성됐을 가능성이다.

잡종형성의 가능성은 mitochondrial DNA인 cytochrome *b* 유전자를 이용한 본 계통수에서 모계유전을 따르기에 Weedy Seadragon의 위치가 발달된 형태의 보육낭을 갖는 해마속에서 나타났으리라 상상할 수 있었다.

하지만 본 연구는 mitochondrial DNA를 이용하였기에 이를 통해 back mutarion이나 잡종화 현상에 대해서는 확실하게 밝혀낼 수 는 없었다. 그러나 Solegnathinae아과에 포함되는 *Haliichthys*속, *Phycodurus*속, 및 *Solegnathus*속의 몇몇 대표종을 추가

시킨다면 이들의 위치에 대한 새로운 해석이 가능하리라 사료된다.

실고기과는 근연한 다른 과(family) 어류에 비해 훨씬 다양한 종을 포함하고 있으며(52속, 330종), 가장 활발하게 연구되고 있으나, 아직도 형태적으로 분류하기에는 어려움이 많다. 현재 cytochrome *b*를 이용한 *Syngnathus*속과 *Hippocampus*속의 계통관계에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Peter, 2003). 이들 연구는 대부분 지리적인 요인에 따라 속(genus) 수준에서의 분자계통연구를 시도한 것으로서, 실고기목에 대한 cytochrome *b* 유전자를 이용한 분자계통연구는 이번 연구가 처음이다. 비록 실고기목에 포함되는 몇몇 대표종이 부족하여 subfamily간의 계통진화적인 관계가 분명하진 않았으나, 이 결과가 실고기어류의 분자계통학적 연구에 많은 도움될 수 있으리라 기대한다.



V. 요약

실고기류(Syngnathides)에 속하는 어류들은 그 외관이 일반 어류와 사뭇 달라 과거로부터 현재까지 형태학적 분류에 어려움을 겪고 있다. 이들은 체형이 가늘고, 입이 관모양으로 되어 있어 흔히 pipefish 혹은 tube-mouthed fish라 불리운다.

대서양, 인도양, 태평양등지의 열대성, 온대성해역에 넓게 퍼져있으며, 새우류나 갯가재류등의 갑각류를 주 먹이로 한다.

이들은 번식형태에 있어 일반 어류와 차이를 보이는데, 수컷의 보육낭을 통해 새끼를 부화시키는 방식을 취하고 있다. 일반적으로 어류의 분류에 사용되는 지느러미가 뚜렷하지 않아 이들의 taxonomy는 현재 까지도 정확하지 않다.

이번 연구는 mitochondrial DNA의 하나인 cytochrome *b* 유전자를 이용하여 계통분류학적 유연관계를 추정함으로써 이들의 taxonomy를 재확인 하고 아울러 실고기류의 분자계통분류 연구시 cytochrome *b* 유전자의 유용성을 확인하는데 목표를 두고 있다. 계통수의 추정을 위하여 Parsimony 방법으로는 maximum parsimony와 maximum likelihood 원리를 이용하였으며, nucleotide의 염기 치환에 따른 distance를 근거로 하여, Neibhor-Joining과 Minimum Evolution 방법을 이용하였다.

실험결과 얻어진 계통수는 기존 taxonomy (Kuitert, 2000)와 유사하게 실고기어류들이 하나의 clade를 이루는 것을 확인할 수 있었다. 서로 다른 방법으로 작성된 계통수에 있어 일관되게 실고기목에 있어 단진화군을 나타내는 점으로 미루어 실고기어류의 계통분류학적 연구에 있어서 cytochrome *b* 유전자 염기서열의 유용성을 확인할 수 있었다. 계통수를 통한 진화의 위치는 방법론에 따라 *Dunckerocampus dactyliophorus*가 조상종으로 구분되기도 하지만 대부분의 계통수에 있어 subfamily 수준에서의 분지에서 resolution이 나타나지 않기 때문에 확실히 단정지을 수 없었다. 그리고 주목할만한 점으로는 기존 형태학적 분류시 subfamily Solegnathinae에 포함되는 *Phyllopteryx taeniolatus*(Weedy Seadragon)의 위치가 서로 다른 방법으로 작성된 계통수에

있어 일관되게 해마아과에 포함된다는 사실이다. 본 연구에서는 이에 대한 명쾌한 해석이 불가능 하지만 Solegnathinae아과에 포함되는 몇몇 종을 첨가시켰을 시 새로운 해석이 가능하리라 여겨진다.



VI. 참고문헌

- Allegrucci, G., Caccone, A., Sbordoni, V., 1999. Cytochrome *b* sequence divergence in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and phylogenetic relationship Among some Perciformes species. *J. Zool. Syst. Evol. Research* 37:149-156
- Arnaud, S., Bonhomme, F., Borsa, P., 1999. Mitochondrial DNA analysis of the genetic relationships among populations of scad mackerel (*Decapterus macarellus*, *D. macrosoma*, and *D. russelli*) in South-East Asia. *Mar. Biol.* 135:699-707.
- Bickham, J. W., Wood, C. C., and Patton, J. C., 1995. Biogeographic implications of cytochrome *b* sequences and allozymes in sockeyes (*Oncorhynchus nerka*). *J. Hered.* 86:140-144.
- Briolay, J., Galtier, N., Brito, R. M., and Bouvet, Y., 1998. Molecular phylogeny of cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9(1):100-108.
- Brito, R. M., Briolay, J., Galtier, N., Bouvet, Y., and Coelho, M. M., 1997. Phylogenetic relationships within genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese fresh waters, based on mitochondrial DNA cytochrome *b* sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8(3):435-442.

- Bowen, B.W., Bass, A.L., Rocha, L.A., Grant, W.S., Robertson, D.R., 2001. Pylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale. *Evolution* 55:1029-1039.
- Breder CM and Rosen DE, 1996. Modes of reproduction in fishes. *New York: Natural History press.*
- Burridge, C.P., White, R.W.G., 2000. Molecular phylogeny of the antitropical subgenus *Goniistius* (Perdiformes: Cheilodactylidae: Cheilodactylus): evidence for multiple transequatorial divergences and nonmonophyly. *Biol. J. Linn.* 70:435-458.
- Casey, S.P., 1999. A phylogenetic study of seahorses using the cytochrome *b* gene of mitochondrial DNA. *Unpublished ph.D. thesis, Institute of Zoology, Regents Park, London, NW1 4RY, United Kingdom*
- Clutton-Brock TH, 1991. The evolution of parental care. Princeton, NJ: *Princeton University Press.*
- Colborn, J., Crabtree, R.E., Shaklee, J.B., Pfeiler, E., Bowen, B.W., 2001. The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula spp.*): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution* 55:807-820.
- Dawson CE, 1985. Indo-pacific pipefishes (Red sea to the Americas). *Ocean Springs, MS: Gulf Coast Research Laboratory*
- Duncker G, 1915. Revision der Syngnathidae. *Mitt Hamb Zool Mus Inst.* 32:9-120

- Espoti, M.D., Vries, S.D., Crimi, M., Ghelli, A., Patarnello, T., and Meyer, A., 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1143:243-271.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783-791.
- Fitch, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20:406-416.
- Franzoi, P., Maccagnani, R., Rossi, R & Ceccherelli, V. U. 1993. Life cycles and feeding habits of *Syngnathus taenionotus* and *S. abaster* (Pisces, Syngnathidae) in a brackish bay of the Po River Delta (Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series* 97:71-81.
- Grant, W.S., Leslie, R.W., 2001. Inter-ocean dispersal is an important mechanism in the zoogeography of hake (Pisces: Merluccius spp.). *J. Biogeogr.* 28:699-721.
- Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 21:160-174.
- Herald ES, 1959. From pipefish to seahorse—a study of phylogenetic relationships. *Proc Calif Acad Sci.* 29:465-473.
- Irwin, D.M., Kocher, T.D., and Wilson, A.C., 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32:128-144.
- John, G.C., and Avise, J.C., 1998. A comparative summary of genetic distances in

the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Mol. Biol. Evol.* 15(11):1481-1490.

Knowlton N, 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:189-216.

Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6196-6200.

Kocher, T. D., C. A. Stepien. 1997. Molecular systematics of fishes. *Academic Press* New York. 314 pp.

Kuiter, R.H., 2000. Seahorses, Pipefishes and Relatives—A comprehensive Guide to Syngnathiformes. TMC Publishing, Chorleywood, UK.

Lourie SA, Vincent ACJ, and Hall HJ, 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. *London: Project Seahorse*

McMillan, W.O., Palumbi, S.R., 1995. Concordant evolutionary patterns among Indo-West-pacific butterflyfishes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 260:229-236.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. pp. 1-38. In *Molecular biology frontiers, Biochemistry and molecular biology of fishes, vol. 2*. P. W. Hochachka, and T. P. Mommsen (eds). Elsevier Science publishers. AM. 470 pp.

Muss, A., Robertson, D.R., Stepien, C.A., Wirtz, P., Bowen, B.W., 2001.

Pylogeography of *Ophioblennius*: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55:561-572.

Nei, M., and Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press. New York. 333 pp.

Patterson, H. G., and Graves, S. 2000. DNAssist: the integrated editing and analysis of molecular biology sequences in windows. *Bioinformatics* 16(7):652-653.

Peter, R.T., Michael, I.C., and Conrad, A.M., 2003. The evolutionary history of seahorses (Syngnathidae: Hippocampus): molecular data suggest a West Pacific origin and two invasions of the Atlantic Ocean. *Mol. Pyl. Evol. Unpublished.*



Posada, D. and Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9):817-818.

Rocha-Olivares, A., Kimbrell, C.A., Eitner, B.J., and Vetter, R.D., 1999. Evolution of a mitochondrial cytochrome b gene sequence in the species-rich genus *Sebastes* (Teleostei, Scorpaenidae) and its utility in testing the monophyly of the subgenus *Sebastomus*. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-425.

Rosen, B.R., 1988. Progress, problems and patterns in the biogeography of reef corals and other tropical marine organisms. *Helgoländer Meeresunters.* 42, 269-301.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing trees. *J. Mol. Bio. Evol.* 4:406-425.

- Sara, A.L., Janet, C.P., Stephen, P.C., 1999. The taxonomy of Vietnams exploited seahorses(family Syngnathidae). *Biol. J. L. Soc.* 66:231-256.
- Song, C.B., T. J. Near, and L. M. Page. 1998. Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10(3):343-353.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Takezaki, N., and Gojobori, T., 1999. Correct and incorrect vertebrate phylogenies obtained by the entire mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 16(5):590-601.
- Vincent A, Ahnesjö I, Berglund A, and Rosenqvist G, 1992. Pipefishes and seahorses: Are they all sex role reversed? *Trends Ecol Evol.* 7:237-241.
- Wilson, A.B., Vincent, A., Ahnesjö, I., Meyer, A., 2001. Male Pregnancy in Seahorses and Pipefishes(Family Syngnathidae):Rapid Diversification of Paternal Brood Pouch Morphology Inferred From a Molecular Phylogeny. *The American Genetic Association.* 92:159-166.
- Wootton RJ, 1984. A functional biology of the sticklebacks. *London: Croom Helm.*

감사의 글

책과 논문들이 어지러이 쌓여있는 책상을 보며 이렇게 부족한 제가 이제 그 결과물을 제출해야한다 생각하니 후련하다는 마음보다 아쉬운 마음이 앞섭니다. 학문으로의 길이 아무리 힘들어도 곁에서 자상하게 도닥여 주시고 한편으론 엄하게 꾸짖어 주시며 논문의 시작에서 마무리 까지 꼼꼼하게 살펴주신 송춘복 교수님께 가장 먼저 감사의 마음을 전합니다. 그리고, 논문을 정성껏 심사해주시고 격려를 아끼지 않으셨던 이철휘, 여인규 교수님께도 감사의 말씀 드립니다. 또한 학위과정중 배움의 길로 인도해 주시고 따뜻하게 저를 지켜봐 주신 이기완 교수님, 허문수 교수님, 전유진 교수님, 박근태 교수님 감사드립니다.

이 연구를 위해 귀한 샘플을 제공해 주신 노섬 교수님과 어류양식실험실의 최영웅, 김영석 선배에게 특히 감사드립니다. 그리고, 실험을 진행함에 있어 급한 순간마다 도움을 주었던 박영미를 비롯한 유전공학 실험실원들 모두에게 고마움을 전합니다. 그리고 멀리 떨어져 있음에도 불구하고 항상 떨치지 못하는 후배걱정에 꼼꼼히 안부를 물으시고, 연구의 단계마다 조언을 아끼지 않으신 강거영 선배님을 비롯하여 우리 어류유전육종실험실의 김맹진, 양윤철, 오상규, 원영득, 한송현, 조미란, 노지윤, 양혜영, 그리고 박사과정의 Reza에게도 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 당신의 일보다는 자식걱정에 한숨이 더 많으신 어머니, 그리고 최선이란 무엇인지 몸으로 말씀하시는 아버지, 항상 사랑하는 누나, 그리고 동생 용석, 귀염둥이 준혁, 성혁, 소연에게 자그만 보답으로 이 논문을 받칩니다.